

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

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para optar
por el grado académico de Licenciado en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación de la mezcla de jugos como estrategia potencial para la inhibición de
Alicyclobacillus acidoterrestris en jugo de naranja**

Daniel Alejandro Badilla Cambroneró
Carné: B40763

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Junio, 2021

Tribunal Examinador

Proyecto final de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.


Elaborado por:

Daniel Alejandro Badilla Cambronero

Aprobado por:



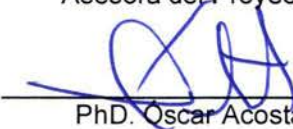
Dra. Natalia Barboza Vargas
Presidenta del Tribunal



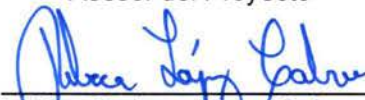
PhD. Jessie Usaga Barrientos
Directora del Proyecto



Lic. Gabriela Davidovich
Asesora del Proyecto



PhD. Oscar Acosta
Asesor del Proyecto



Msc. Rebeca Lopez Calvo
Profesor designado

Dedicatoria

A mi familia y amigos por ser un apoyo incondicional.

Agradecimientos

A mis padres, quienes me apoyaron en todo momento, pues a pesar de las dificultades que enfrenté, nunca dudaron en estar a mi lado y brindarme toda la ayuda que necesité.

A mis amigos, confidentes de mis adversidades, quienes siempre estuvieron ahí para escucharme. Gracias a Camilo, Ire, Cata, María, y a Mar, a quien le debo el haberme aventurado en esta carrera que se ha convertido en una de las mejores decisiones en mi vida.

A Paola, quien me ayudó a familiarizarme y enamorarme de este tema, y que siempre respondió a mis dudas de la manera atenta y amable.

Gracias a todos los profesores que estuvieron en el momento que necesité de ellos. A la profesora Gabriela, por su disposición para ser parte de mis asesores, por ayudarme con el uso de las instalaciones, sus prontas revisiones y estar pendiente de mi trabajo. Al profesor Óscar, porque a pesar de contar con poco tiempo, sus ayudas siempre me brindaron calma en el proceso y visualizar la finalización de este, además de mostrar siempre interés por mi desarrollo como profesional. Por último, a la profesora Jessie Usaga, a quien no puedo describir lo mucho que agradezco por haberme aceptado como tesario. Gracias por brindar todo el apoyo y más en los momentos difíciles, por aclarar cada una de mis inquietudes, por atender mis llamadas de pánico y por su constante interés en ver finalizado este proyecto. ¡Gracias!

Gracias a Laura y Vanny, quienes estuvieron ahí en el laboratorio de microbiología del CITA, y me brindaron todo el apoyo que necesité en su momento. Gracias a Henry y Luis, por su ayuda con los equipos al trabajar en la Escuela de TA. Gracias a Don Martín y Jeffrey por abrirme las oficinas y guardar las cajas que dejé en su momento. Gracias a Alonso y José Pablo, quienes me ayudaron con la elaboración de los jugos. Gracias a Geova y Luis, por ayudarme con los materiales y reactivos que necesitara.

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de jugos de frutas estables a temperatura ambiente.....	19
Figura 2. Curva de sobrevivencia o muerte de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (ATCC 49025) en jugos tropicales (cas, mora y piña) almacenados a 45°C.	31
Figura 3. Cambios en la población de <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025) en jugo de maracuyá (15,1 °Brix, pH 2,89), néctar de mora (7,2 °Brix, pH 2,50) y cas (8,2 °Brix, pH 2,42) durante la incubación a 45°C.....	38
Figura 4. Cinéticas de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025) en mezclas de jugo de naranja-mora durante 28 días de almacenamiento a 45°C.....	39
Figura 5. Población final y variación de la desviación estándar según los niveles de sustitución de jugo de naranja con jugo de mora.	42
Figura 6. Colonias típicas de <i>A. acidoterrestris</i> en agar YSG luego de 3 días de incubación a 45°C.	62
Figura 7. Crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> luego de rayado en placa con agar YSG para la preparación del inóculo de 6 log (placa izquierda, 5 días a 45°C) y 3 log (placa derecha, 3 días a 45°C).	62
Figura 8. Dispersión de la biomasa de una placa completa de YSG con <i>A. acidoterrestris</i> luego de 5 días de incubación a 45°C, en 9 mL de APE 0,1%.	63
Figura 9. Efecto de dilución en el recuento de <i>A. acidoterrestris</i> mediante la técnica de vaciado utilizando agar YSG.	63
Figura 10. Efecto de dilución en el recuento de <i>A. acidoterrestris</i> en un jugo coloreado (Mora), mediante la técnica de vaciado utilizando agar YSG.....	64
Figura 11. Ausencia de colonias de <i>A. acidoterrestris</i> en los controles negativos, colocados directamente (jugo sin dilución) en agar YSG de los jugos de naranja, mora, cas y maracuyá (de izquierda a derecha, respectivamente), luego de ser incubados a 45°C por 3 días.	64
Figura 12. Cámara de flujo durante el proceso de llenado e inoculación de los jugos de fruta con <i>A. acidoterrestris</i>	65
Figura 13. Jugos (cas, maracuyá y mora) inoculados con <i>A. acidoterrestris</i> y manipulados para su almacenamiento a 45°C.	65
Figura 14. Jugo de naranja parcialmente sustituido en tres diferentes niveles (50, 25 y 12.5% mora, de izquierda a derecha), y control positivo (etiqueta blanca) y negativo (etiqueta rosada).	66
Figura 15. Cambio de color experimentado en las mezclas de jugo de naranja-mora (50, 25 y 12.5% mora, de izquierda a derecha, respectivamente) inoculadas con <i>A. acidoterrestris</i> e incubadas por 28 días a 45°C.	66

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Recuentos de prueba de crecimiento o viabilidad de <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025) en 3 jugos, durante un almacenamiento de 6 días a 45°C.	30
Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica de los tres jugos tropicales elaborados y utilizados en el estudio de sobrevivencia de <i>A. acidoterrestris</i> (promedio \pm desviación estándar, n=3).	34
Cuadro 3. Tiempo necesario para alcanzar una población crítica de 5 log (UFC/mL) de <i>A. acidoterrestris</i> (ATCC 49025) en mezclas de jugo de naranja-mora, incubadas a 45°C.	43

Resumen

Badilla Cambroner, Daniel Alejandro.

Evaluación de la mezcla de jugos como estrategia potencial para la inhibición de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja

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

Badilla Cambroner, D., 2021.

60 hojas: 14 ilustraciones - 168 referencias.

La industria de jugos es una de las más importantes del mundo, la cual representa en Costa Rica cerca del 1% de los ingresos percibidos por exportaciones durante el año 2019, y de los cuales el jugo de naranja lidera el mercado en todo el mundo. Uno de los mayores retos que enfrenta la comercialización del jugo de naranja es el deterioro causado por *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bacteria gram positiva, acidófila y formadora de endosporas, capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos habitualmente aplicados en la industria de jugos de frutas. Debido a las preocupaciones actuales del consumidor y la desconfianza con el uso de aditivos, el uso de antimicrobianos naturales ha mostrado un aumento en los últimos años. Este documento tuvo como objetivo analizar el efecto de diferentes frutas tropicales sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja, como alternativa al uso habitual de antimicrobianos comerciales.

Se eligieron tres frutas tropicales (cas, maracuyá y mora) que previamente habían sido identificadas con potencial para inhibidor el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Se procesaron hasta obtener un jugo de maracuyá, y dos néctares, cas y mora, estables a temperatura ambiente. Se llenaron botellas de vidrio por cada bebida y para cada punto de muestro, con un espacio de cabeza del 40%, y cada una se inoculó con *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en una población de 10^5 - 10^6 UFC/mL, luego de aplicar un choque térmico (75°C por 20 min). Las botellas se incubaron a 45°C y se realizaron los recuentos de la bacteria por el método de vaciado en placas de Petri con agar Yeast Starch Glucose (YSG) acidificado con HCl a pH $3,7 \pm 0,1$. Las placas se incubaron a 45°C por 3 días. Además, se realizó una caracterización fisicoquímica de los jugos y néctares, estableciendo su análisis proximal, sólidos solubles, pH, glucosa, fructosa y sacarosa, ácidos orgánicos y vitamina C, polifenoles totales y antocianinas. Posteriormente se escogió el jugo en el cual se mostró la mayor inhibición, seleccionando el néctar de mora, para luego realizar sustituciones parciales (12,5, 25 y 50%) de jugo de naranja con un jugo de mora, y comprobar si aún en dilución podía ejercer un efecto antimicrobiano sobre poblaciones que representan niveles de

contaminación natural en jugos de frutas (10^2 - 10^3). Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se ajustó un modelo exponencial, escogiendo como parámetro de comparación la asíntota; además, se comparó a nivel de poblaciones finales y tiempos para alcanzar una población crítica de 5 log (UFC/mL) y se analizaron estadísticamente mediante el programa JMP 9.

Según la caracterización de los jugos, la mayoría se encuentran en rangos donde el crecimiento de *A. acidoterrestris* es viable, a diferencia de los altos niveles de vitamina C en el cas, y la presencia de polifenoles totales en cas y maracuyá, y antocianinas en mora. Con respecto a las cinéticas, se observó una disminución en las poblaciones iniciales para las bebidas de las tres frutas, de los cuales mora y cas presentaron el mayor efecto, sin mostrar diferencias significativas entre ambos. Se decide utilizar la mora debido a la facilidad de acceso y producción nacional. La segunda etapa reveló que los niveles de sustitución no presentan diferencias significativas, por lo que no se puede asegurar que sustituciones parciales con jugo de mora, inferiores al 50%, logran inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de naranja contaminados y expuestos a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria (45°C). La potencia (β) de la prueba para el valor de asíntota y población final fue de 0,30 y 0,45, respectivamente. Sin embargo, al comparar el 50% de sustitución de jugo de naranja con jugo de mora versus el control (jugo de naranja sin sustitución), se muestran diferencias significativas, evidenciando que *A. acidoterrestris* no crece a los niveles de contaminación en mezclas de 50:50 con jugo de naranja-mora, y por ende, existe un efecto de inhibición de la mora aún en dilución. En términos de tiempo, un mayor grado de sustitución (jugo de naranja por jugo de mora) implicó un mayor tiempo para poder alcanzar la población de deterioro, aunque no se encontraron diferencias significativas.

En síntesis, con los resultados obtenidos se evidencia que es posible inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos donde su deterioro es inminente (jugo de naranja), mediante la incorporación de productos con presencia de compuestos inhibitorios, como el jugo de mora. De este modo, es importante evaluar otras frutas y métodos para maximizar el contenido de compuestos inhibitorios, que logren controlar el crecimiento de *A. acidoterrestris* de manera natural en niveles de sustitución aún menores.

JUGO DE NARANJA, FRUTAS TROPICALES, ANTIMICROBIANOS NATURALES,
INHIBICIÓN, ANTOCIANINAS, *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*.

PhD. Jessie Usaga Barrientos

Escuela de Tecnología de Alimentos

Abreviaciones y definiciones

%: Porcentaje

A. acidoterrestris: *Alicyclobacillus acidoterrestris*

AIJN: Association of the Industry of Juices and Nectars (Asociación de la industria de jugos y néctares)

ANDEVA: Análisis de varianza

AOAC: Association of Analytical Communities (Asociación de las comunidades analíticas)

APE: Agua peptonada estéril

AT: Antocianinas totales

BPA: Buenas prácticas agrícolas

BPF: Buenas prácticas fabricación

BPM: Buenas práctica manufactura

°Brix: Grados brix (sólidos solubles)

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos

CMN: Concentración mínima inhibitoria

COMEX: Ministerio de Comercio Exterior

DPA: Ácido dipicolínico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

ECG: Equivalentes de cianidin-3-glucósido

EE. UU.: Estados Unidos

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)

FDA: Food and drug administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

g: gramo

GRAS: Generally recognized as safe (generalmente reconocido como seguro)

h: hora

HCl: Ácido clorhídrico

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

L: Litro

kg: kilogramo

µg: microgramo

mg: miligramo

mL: mililitro

N: normalidad

NaClO: hipoclorito de sodio

NEPA: Nutrition Education and Promotion Association Community

OMS: Organización Mundial de la Salud

ppm: partes por millón

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica

PT: Polifenoles totales

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

RTCR: Reglamento Técnico Costa Rica

TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

UE: Unión Europea

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)

VD: valor diario

YSG: Yeast Starch Glucose (Levadura Almidón Glucosa)

Índice general

Tribunal Examinador	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Cuadros	v
Resumen	vi
Abreviaciones y definiciones	viii
1. Justificación	1
2. Objetivos	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. Marco teórico	6
4. Materiales y métodos	18
4.1 Localización	18
4.2 Elaboración de los jugos de fruta	18
4.3 Pruebas preliminares	21
4.4 Caracterización fisicoquímica de los jugos de fruta tropicales	22
4.4.1 Determinación de pH	22
4.4.2 Determinación de sólidos solubles	22
4.4.3 Determinación de azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa	23
4.4.4 Determinación de ácidos orgánicos	23
4.4.5 Determinación de vitamina C	23
4.4.6 Determinación de polifenoles totales	23
4.4.7 Determinación de antocianinas totales	24
4.4.9 Determinación del análisis proximal	24
4.4.10 Diseño y análisis estadístico	24
4.5 Objetivo específico 1: Determinación de las cinéticas de sobrevivencia o muerte de <i>A. acidoterrestris</i> en jugos y néctares de frutas tropicales de Costa Rica (cas, maracuyá y mora) durante 11 días de almacenamiento	24
4.5.1 Selección de la bacteria	24
4.5.2 Preparación del inóculo	24
4.5.2.1 Recuento de <i>A. acidoterrestris</i>	25
4.5.3 Preparación e inoculación de las muestras	26
4.5.4 Muestreo de <i>A. acidoterrestris</i> durante el estudio	26

4.5.5 Diseño y análisis estadístico	27
4.6 Objetivo específico 2: Evaluación del efecto inhibitorio del jugo con mayor potencial de inhibición de <i>A. acidoterrestris</i> en jugo de naranja.....	27
4.6.1 Preparación del inóculo	27
4.6.2 Preparación e inoculación de las muestras	28
4.6.3 Recuento de <i>A. acidoterrestris</i> durante el estudio.....	28
5. Resultados y discusión.....	30
6. Conclusiones	44
7. Recomendaciones	45
8. Bibliografía	47
9. Anexos	62

1. Justificación

Los jugos y concentrados de frutas representaron un 10% del total de exportaciones nacionales en cuanto al ámbito alimentario, esto durante el año 2019 (PROCOMER, 2019). Es así como estos productos se posicionan como el segundo grupo alimentario con mayor volumen de exportación para Costa Rica (Alpizar *et al.*, 2018). Además, durante este mismo año las frutas tropicales conservadas en su jugo representaron, a nivel de exportaciones, un ingreso cercano a los 114 millones de dólares, lo que representa el 1% del total de ingresos percibidos por exportaciones (COMEX, 2021b). Por lo tanto, es imposible no pensar en su relevancia a nivel nacional, dado su impacto económico. En consecuencia, es importante la asignación de recursos para la búsqueda de nuevos métodos, que aseguren su calidad en respuesta a las demandas actuales del mercado.

El consumo de frutas en sus diferentes presentaciones está promovido por las diferentes instituciones nacionales e internacionales de la salud, debido a sus múltiples beneficios (Slavin & Lloyd, 2012; Folkvord, 2020). Este grupo de alimentos se caracteriza por su alto contenido de agua, siendo el componente predominante de los jugos de frutas. Los nutrientes que prevalecen, después del agua, son los carbohidratos, entre ellos se incluye: sacarosa, fructosa, glucosa y sorbitol, los cuales son fuente de energía (Gil, 2010; Settembre *et al.*, 2018). Sin embargo, uno de los mayores beneficios y razones por las cuales se fomenta la ingesta de frutas y productos derivados, es la presencia de vitaminas y compuestos fitoquímicos con propiedades funcionales (Slavin & Lloyd, 2012), que incluyen flavonoides, fitoestrógenos, compuestos azufrados, monoterpenos y péptidos bioactivos (Estrada *et al.*, 2018). Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios sintetizados por plantas, que tienen un impacto significativo en el mejoramiento de la salud humana (Settembre *et al.*, 2018). Una porción de 237 mL de jugo de naranja, por ejemplo, provee el 100% o más del valor diario (VD) recomendado de vitamina C, por lo que es una excelente fuente de esta. Además, son una buena fuente de folato y potasio. El jugo de naranja también suple vitaminas del complejo B y vitamina A, en al menos un 10% del VD. Mientras que, a nivel de minerales, este tipo de jugo aporta magnesio, hierro y calcio, en al menos un 10% del VD (Rampersaud & Valim, 2017).

Por las razones anteriores, las frutas y vegetales presentan una composición densa en nutrientes, mientras que son relativamente bajos en calorías, lo cual puede ayudar tanto a adultos como a niños a alcanzar y mantener un peso saludable (Rampersaud & Valim, 2017). Asimismo, diferentes estudios constatan que su ingesta tiene efectos beneficiosos a largo plazo en la salud, como reducción en el riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares (Heyman & Abrams, 2017). Presentan fibra dietética, antioxidantes y otras sustancias que refuerzan el sistema inmunológico, en algunos casos se ha logrado disminuir

la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas y enfermedades asociadas (obesidad, diabetes tipo II), favorecen un envejecimiento saludable y en casos particulares previenen la aparición de cataratas producto de la edad (Ministerio de Salud, 2011).

Cabe resaltar que la transformación de las frutas enteras a los extractos en su forma de jugo provoca que estos presenten un contenido de fibra dietética menor que las frutas enteras y cuando se consumen en exceso, pueden aportar calorías extras a la dieta. Por tanto, al menos la mitad de la cantidad recomendada de fruta debe provenir de frutas enteras (U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture, 2015). No obstante, se ha demostrado que los compuestos biológicos activos son más fácilmente absorbidos y digeridos por el organismo si son ingeridos de jugos en comparación con la fruta entera (Gomes *et al.*, 2020). Aun así, el departamento de agricultura de USA (USDA) recomienda, para una dieta de 2000 calorías, el consumo de dos tazas de fruta diariamente, o el equivalente, donde una taza de jugo 100% fruta es homólogo a una de esas dos porciones. Otras instituciones, como el Servicio Nacional de Salud (National Health Service (UK)), establece como recomendación diaria cinco porciones de frutas y vegetales (“five a day”), el cual puede ser sustituido adecuadamente con 150 mL de jugo 100% fruta o vegetal (Putnik *et al.*, 2020). En contraste, el Ministerio de Salud (2011) en Costa Rica no especifica el número de porciones provenientes de las frutas, solo promueve el consumo de cinco porciones entre vegetales y frutas diario, además de indicar una equivalencia inferior entre fruta y jugo, al mencionar que medio vaso (125 mL aproximadamente) de jugo es igual a una porción de fruta

Los productos elaborados a partir de frutas, como las bebidas pasteurizadas, se consideraron durante muchos años alimentos microbiológicamente estables debido a su bajo pH (<4,0) (Kakagianni *et al.*, 2018). Sin embargo, en 1982 se logró constatar uno de los primeros deterioros en jugos de frutas ácidos pasteurizados, y en ese momento se relacionó con *Bacillus acidoterrestris*, esto porque las primeras cepas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* se asociaron con géneros previamente estudiados, al ser un microorganismo ácido-termófilo, aerobio, Gram positivo y productor de endosporas; calzaba con la clasificación y características del género *Bacillus*. Estudios posteriores lograron esclarecer la existencia de un grupo de bacterias con características similares, dando paso al descubrimiento de un nuevo género bacteriano denominado *Alicyclobacillus* (Da Costa *et al.*, 2015).

Aunque el deterioro por *Alicyclobacillus* spp. anteriormente se consideraba esporádico, una encuesta de 1998 realizada por la Asociación Nacional de Procesadores de Alimentos (NEPA, siglas en inglés) en los EE. UU., informó que el 35% de los fabricantes de jugos de frutas experimentaron deterioro, causado por microorganismos acidófilos formadores de esporas sospechosos de ser *A. acidoterrestris* (Ciuffreda *et al.*, 2015). Estudios realizados en el 2011, en 180 muestras de concentrados de frutas tropicales y subtropicales obtenidos de

las instalaciones de procesamiento de la empresa Florida, revelaron que 6,1% se encontraban contaminados por esta bacteria (Tianli *et al.*, 2014). Lo que revela que el problema ha persistido a lo largo de los años.

A la fecha, más de 20 especies pertenecientes al género *Alicyclobacillus* han sido descritas, pero solo cuatro especies (*acidoterrestris*, *pomorum*, *herbarius* y *acidiphillus*) han sido reportadas como responsables del deterioro de jugos y bebidas de frutas. Sin embargo, *A. acidoterrestris* es considerado el más importante debido al número de casos de deterioro y a su incidencia (Rajauria & Tiwari, 2018). Esta bacteria es capaz de resistir los tratamientos térmicos normalmente aplicados en la industria de los jugos, puesto que se busca combinaciones de tiempo y temperatura (pH <3,7, 80°C por 30 s) con una letalidad suficiente para eliminar la totalidad de las células vegetativas de microorganismos patógenos y que a su vez permita conservar las propiedades de las frutas (tanto sensoriales como nutricionales). No obstante, las endosporas de esta bacteria en particular son capaces de resistir este tipo de tratamientos, logrando germinar en ambientes ácidos si se exponen a una temperatura óptima (>20°C), debido a su naturaleza acidófila (Kakagianni *et al.*, 2018).

Asimismo, uno de los mayores problemas en relación con el deterioro causado por *A. acidoterrestris* es su detección, pues durante su crecimiento genera un deterioro poco perceptible, a diferencia del típico deterioro en jugos, no se produce gas y no se presentan cambios sustanciales en el pH. En algunos casos se puede generar un ligero sedimento y/o turbidez. Sin embargo, su característica más importante y por la cual se debe controlar, es debido a la generación de sabores desagradables al alcanzar poblaciones de 10^4 - 10^5 UFC/mL, asociados con la producción de guaiacol, 2,6-dibromofenol (2,6-DBP) y 2,6-diclorofenol (2,6-DCP). El guaiacol es el metabolito predominante relacionado con el deterioro de jugos de frutas contaminados con *A. acidoterrestris*, el cual se asocia con sabores "medicinales, ahumados o antisépticos". El umbral humano para la detección de este compuesto es bajo, pudiendo ser detectado en agua mediante degustación en concentraciones de 0,013 ppm (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019); mientras que otros autores indican una sensibilidad de 0,002 ppm directamente en jugos mediante un panel entrenado (Kakagianni *et al.*, 2018). Debido a la alta sensibilidad en su detección, fácilmente se genera el rechazo por parte del consumidor, implicando consecuencias económicas, así como daños de la marca para el producto involucrado.

El deterioro de jugos y bebidas ácidas estables a temperatura ambiente, por la acción de este microorganismo, puede ocurrir mucho tiempo antes de la fecha de vencimiento y usualmente los productores no se dan cuenta de los incidentes, hasta que se reciben las quejas por parte de los consumidores (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). La temperatura durante el almacenamiento y distribución son las variables más importantes que afectan el crecimiento de la bacteria. A temperaturas inferiores a los 20°C, en jugos pasteurizados con

pH inferior a 4, no se espera la germinación de las esporas de *Alicyclobacillus* y su crecimiento. Empero, el control de la temperatura durante el proceso de distribución es algo que se encuentra fuera del alcance de los productores, y por lo tanto, no puede controlarse directamente (Kakagianni *et al.*, 2018). Además, la aplicación de condiciones de refrigeración generaría un incremento en los gastos injustificados para un producto que debería ser estable a temperatura ambiente. Por estas razones, debido a que el control de *A. acidoterrestis* mediante los métodos comunes de acidificación y aplicación de tratamientos térmicos tradicionales no es totalmente efectivo en las bebidas y jugos de frutas, es que la industria se encuentra en la búsqueda de nuevas formas de poder limitar el desarrollo de este microorganismo en estas matrices, mediante la aplicación de nuevos procedimientos o técnicas, así como nuevos ingredientes.

A raíz de los principales hallazgos reportados en antiguas investigaciones sobre *A. acidoterrestis* en proyectos de graduación de la Escuela de Tecnología de Alimentos, de la Universidad de Costa Rica, específicamente el trabajo de Worsfold (2019) y Gamboa (2020); es que se planteó el desarrollo de esta investigación. En el primer trabajo se obtuvo un crecimiento nulo de esta bacteria en la mayoría de los jugos estudiados (piña, mora, cas y maracuyá), observándose crecimiento únicamente en jugo de naranja (Worsfold, 2019). No obstante, la literatura reporta el crecimiento de *A. acidoterrestis* en algunas de estas matrices, como lo es el caso de jugos de piña con pH 3,3 y 13,4 °Brix (Bevilacqua *et al.*, 2008). Esta contradicción de resultados generó sospechas sobre la composición de las pulpas utilizadas para la elaboración de los jugos, cuya fuente correspondió a una empresa nacional que comercializa pulpas, o bien sobre las posibles diferencias ocasionadas por la variedad del fruto utilizado, composición química o condiciones de ejecución del experimento.

Asimismo, es gracias a la investigación de la estudiante de Ingeniería de Alimentos, Paola Gamboa, que se logra constatar que el uso de antimicrobianos como el benzoato de sodio, sorbato de potasio y la nisina, en niveles aceptados por la legislación vigente o bien por debajo del valor sugerido según proveedores de la bacteriocina específicamente, logra un efecto inhibitorio sobre el microorganismo de interés (Gamboa, 2020). La sumatoria de estas investigaciones reforzaron la sospecha de la composición de las pulpas utilizadas en la primera investigación (posible presencia de compuestos antimicrobianos no reportados o en concentraciones traza dado el ambiente de procesamiento), y el interés por confirmar si realmente el microorganismo de interés no crece en los jugos estudiados por un efecto inhibitorio, causado por la composición de las frutas, o bien por la presencia no intencional o no reportada de compuestos antimicrobianos. Como consecuencia, para el desarrollo de este trabajo final de graduación, se realizaron pruebas preliminares utilizando jugos de elaboración propia y de composición conocida en la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), con garantía de ausencia de antimicrobianos agregados y

se corroboró el efecto inhibitorio para el microorganismo en jugo de maracuyá, una de las matrices previamente estudiadas. Son estos resultados los que motivan a realizar la determinación de las curvas o cinéticas de muerte o sobrevivencia en el tiempo, de la bacteria, en los jugos donde se observó un efecto de inhibición, pues pese a conocer que puede haber inhibición de crecimiento, aún se desconoce si existe un efecto bactericida, es decir que compuestos presentes en dichos jugos pueden causar la muerte del microorganismo durante el tiempo de almacenamiento cuando se parte de una concentración alta de *A. acidoterrestris*. Asimismo, la capacidad inhibitoria previamente demostrada de estos jugos despierta el interés por evaluar la posibilidad de generar mezclas con jugos en los que la bacteria es capaz de crecer (naranja y manzana, por ejemplo) con aquellos que han mostrado capacidad inhibitoria (mora, por ejemplo), esto para lograr formulaciones de jugo 100% fruta, con la mínima sustitución con otro jugo, y con el control sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Esto, sin la necesidad de incorporar algún antimicrobiano de origen sintético, lo que abre opciones para el desarrollo de futuras combinaciones y formulaciones de jugos o bebidas de frutas, sin riesgo de un posible deterioro por este microorganismo y caracterizados por una etiqueta "limpia": libre de preservantes.

Por otro lado, como parte de los hallazgos de investigaciones previas, se evidenció el fuerte potencial de deterioro en jugos comerciales de naranja nacional, si estos se contaminaran con la bacteria en estudio, revelando que este inconveniente es de importancia en nuestro país (Gamboa, 2020). En la búsqueda de resolver este problema, pero evitando la adición de antimicrobianos que no son bien aceptados por los consumidores (Asioli *et al.*, 2017); es que se propuso el presente trabajo. La propuesta responde a las tendencias actuales en la producción de jugos, las cuales están centradas en el consumidor y en introducir diferentes variedades de jugos, sabores y mezclas. Es así como la industria de alimentos está experimentando un desplazamiento a productos más "naturales", y es en esta línea que busca aprovechar las propiedades que se encuentran normalmente en los alimentos para lograr resolver parte de los problemas actuales. Por estas razones, las bebidas naturales sin aditivos o preservantes, están liderando el mercado de jugos de frutas y vegetales (Rajauria & Tiwari, 2018).

En este mismo eje de investigación, se han realizado estudios similares utilizando mezclas de jugo de manzana y granada, logrando reducciones de hasta 3,17 log UFC/mL de *A. acidoterrestris* en mezclas con 40% de jugo de granada, mientras que los jugos control (jugo de manzana) alcanzaron cargas de hasta 7,17 log UFC/mL luego de 14 días de incubación a 37°C (Molva & Baysal, 2015b). No obstante, el presente proyecto, a diferencia del resto de investigaciones existentes, se enfocó en frutas tropicales de producción nacional que no han sido estudiadas previamente, para así constatar el posible efecto inhibitorio de

algunos jugos sobre el deterioro causado por *A. acidoterrestris* en jugos de frutas pasteurizados estables a temperatura ambiente.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Evaluar la mezcla de jugos de diferentes frutas tropicales como estrategia potencial para la inhibición de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar las cinéticas de sobrevivencia o muerte de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en tres jugos de frutas tropicales de Costa Rica (cas, maracuyá y mora) durante 11 días de almacenamiento.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de tres concentraciones diferentes del jugo con mayor potencial de inhibición, sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja.

3. Marco teórico

3.1. Industria de jugos y concentrados de frutas a nivel global y nacional

La industria de jugos de frutas es una de las más grandes unidades manufactureras de alimentos (Mushtaq, 2018). El valor económico de la producción de jugos fue confirmado durante los últimos 5 años con datos estadísticos de la Unión Europea (UE), donde la producción de jugos no elaborados a partir de concentrados se incrementó en 5,4%, mientras la producción de jugos exprimidos frescos creció un 4,8%. Simultáneamente la producción de néctares y otros tipos de bebidas de frutas disminuyó en 3,8% y 1,6%, respectivamente (Putnik *et al.*, 2020). Las frutas que se utilizan con frecuencia para la producción de jugo son: cítricos/naranjas, lima, maracuyá, mango, manzana, piña, uvas y bayas (Mushtaq, 2018). En cuanto a los sabores, el jugo de naranja representa el 29,1% de la demanda mundial, mientras que la cuota de mercado restante se divide entre el jugo de manzana (27,1%), jugo de uva (8,5%), jugo de piña (3,6%), jugo de pomelo (2,1%), jugos de una sola fruta o verdura (15,2%), mezclas de jugos (9,3%), cítricos (4,5%) y jugo de tomate (0,5%) (Priyadarshini & Priyadarshini, 2018).

La industria de jugos hace uso de las frutas de menor calidad (grado C), las cuales no es posible comercializar en su forma fresca al no cumplir con los estándares establecidos, por lo

que se destinan hacia procesos donde su transformación permite su aprovechamiento, logrando incrementar su valor (Mushtaq, 2018). Por lo general, las frutas son procesadas para la obtención de concentrados, pues presentan ventajas (Yousefi *et al.*, 2012) asociadas con la reducción del porcentaje de agua, obteniendo como resultado una disminución en el volumen y peso de los productos; por lo tanto, el embalaje, el transporte y los costos de almacenamiento también se reducen. Además, la concentración proporciona estabilidad microbiológica y el aumento de la vida útil de los jugos de frutas como resultado de un aumento en la presión osmótica y una reducción en la actividad de agua (Passos & Ribeiro, 2009).

El jugo de naranja es el jugo de frutas más consumido en todo el mundo, contiene una amplia gama de micronutrientes y fitoquímicos a los que se le han atribuido efectos preventivos frente al diagnóstico de varias enfermedades no transmisibles, como enfermedades cardio metabólicas, trastornos neurológicos y algunos tipos de cáncer. La lista de compuestos bioactivos incluye vitamina C, polifenoles (principalmente flavanonas), carotenoides (xantofilas, criptoxantinas, carotenos), folatos y melatonina (Castello *et al.*, 2020). Se estima que la producción de naranjas frescas en todo el mundo ronda las 49361 toneladas métricas (Tm) durante el periodo 2020 y 2021, de las cuales un 40% son destinadas para su procesamiento, principalmente en forma de jugos y/o concentrados (USDA, 2021). Los principales países productores de jugo de naranja son Brasil, Estados Unidos, México y la Unión Europea (UE). En este mismo orden de ideas, a nivel estadístico los principales consumidores a nivel doméstico son la UE (49%), Estados Unidos (29%), China (6%), Canadá (5%), Brasil (5%) y Japón (4%) (USDA, 2021).

3.2. Tendencias en el mercado de jugos

Los consumidores actualmente exigen alimentos que se produzcan y se procesen de una manera sostenible, que se consideren frescos, naturales y con alto valor nutricional (Granato *et al.*, 2020). Por esta razón, la industria de alimentos ha dirigido sus esfuerzos hacia la producción de alimentos más saludables y que generen beneficios en la salud humana (Estrada *et al.*, 2018). Una manera de responder a estas necesidades del consumidor es mediante el diseño de nuevos productos o agregando ingredientes funcionales a los productos ya existentes (Putnik *et al.*, 2020). Según Granato *et al.* (2020), un alimento funcional es un alimento que cuando se consume regularmente dentro de una dieta diversa, en niveles eficaces, tiene efectos potencialmente positivos en la salud más allá de la nutrición básica, por lo tanto, un ingrediente funcional son todas aquellas sustancias que resultan beneficiosas para la salud humana.

En consecuencia, la demanda de nuevos jugos funcionales está creciendo rápidamente, para el 2020 se estimaba que el mercado global para comidas funcionales alcanzaría 304,5

millones de dólares, con un crecimiento promedio anual de 8,5%. A la luz de estas tendencias, los consumidores adquieren jugos o bebidas de frutas para satisfacer sus necesidades de nutrientes diarios y mejorar su bienestar de una manera más fácil y rápida, como respuesta al acelerado estilo de vida, con menos tiempo para comer fruta fresca (Putnik *et al.*, 2020). Es así como se prefiere en mayor medida el consumo de jugos de frutas, especialmente “naturales” o aquellos que contienen 100% fruta, con mínimo procesamiento y ausencia de preservantes (Snyder & Worobo, 2017; Putnik *et al.*, 2020). Las principales tendencias en los últimos años son: bebidas funcionales (super frutas, omega-3, probióticos y prebióticos), mercadeo con niños (alternativas saludables a bebidas carbonatadas), bebidas embellecedoras (belleza desde el interior), jugos “gourmet” y jugos éticos (orgánicos y empaque verde) (Priyadarshini & Priyadarshini, 2018).

3.3. Industria de jugos en Costa Rica

Según el Ministerio de Comercio Exterior (COMEX) (2021a), el sector agrícola correspondió a un 39,72% de las exportaciones totales durante el año 2019. En este mismo año las frutas tropicales conservadas en su jugo representaron un ingreso cercano a los 114 millones de dólares, lo que representa el 1% del total de ingresos percibidos por exportaciones (COMEX, 2021b). Según el último informe de la Cámara Promotora del Comercio (PROCOMER), en el año 2019 los productos pertenecientes a la categoría de jugos y concentrados de frutas abarcaron el 10% de las exportaciones del sector alimentario. Costa Rica presenta como principales clientes los siguientes países: Estados Unidos, Holanda, España, Bélgica, Francia, China, Panamá y México (PROCOMER, 2019). Además, Costa Rica se encuentra en el puesto número 13 (0,58%) de producción mundial de naranja fresca, del cual un 74% se utiliza para el procesamiento, colocando al país en el décimo puesto (1,3%) a nivel mundial (USDA, 2021).

3.4. Definiciones de jugo y néctar de fruta

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) un jugo de fruta es aquel que se obtiene directamente de la fruta o vegetal, no puede ser concentrado o reconstituido, y sin la adición de ningún otro componente, como acidulantes o endulzantes (FDA, 2019). Asimismo, según el Reglamento Técnico de Costa Rica: Jugos y Néctares de Frutas, un jugo o zumo de fruta, es un líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas frescas en buen estado y debidamente maduras. Algunos jugos podrán elaborarse junto con sus vesículas (botellitas), semillas y cáscaras, cuando no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación (BPF). Además, los jugos deben elaborarse mediante procedimientos

que mantengan las características físicas, químicas, sensoriales y nutricionales de la fruta de la que proceden (RTCR, 2005).

En cuanto a su agrupamiento, los jugos pueden ser clasificados de acuerdo con la naturaleza de extracción y elaboración (jugos clarificados, concentrados, pulpas, purés, néctares, siropes y otros) (Mushtaq, 2018), o según la composición, estableciendo como un jugo de un solo tipo aquel proveniente de un solo tipo de fruta, mientras que un jugo mixto es el producto de la mezcla de dos o más jugos, o jugos y puré de diferente tipo de fruta (RTCR, 2005). Una pequeña fracción de los jugos de frutas se ha nombrado según el tipo de beneficio fisiológico, como jugos deportivos o isotónicos, nutracéuticos, energéticos, herbales, inteligentes y otros (Mushtaq, 2018). Un néctar de fruta, corresponde por su parte al producto sin fermentar, pero fermentable, producido bajo la definición de jugo, con la incorporación de agua, con o sin la adición de azúcares, miel, jarabes, y/o edulcorantes artificiales (RTCR, 2005). Es un producto destinado al consumo directo, obtenido mezclando toda la parte comestible de la fruta finamente dividida y tamizada, con adición de agua, con o sin adición de azúcares y los aditivos alimentarios permitidos (RTCA, 2005).

3.5. Compuestos fenólicos

La estructura molecular de los compuestos fenólicos se caracteriza por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, y pueden encontrarse como una molécula simple o polimerizada, junto con carbohidratos simples o complejos, así como derivados de ésteres (Soto *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019). Debido a su naturaleza química, los compuestos fenólicos son altamente solubles en agua (Soto *et al.*, 2017; Alappat & Alappat, 2020; Eker *et al.*, 2020; Rashid *et al.*, 2020). Dentro de los compuestos fenólicos se destacan los polifenoles, metabolitos secundarios, presentes en frutas y vegetales, que se encuentran divididos en ácidos fenólicos, flavonoides y no flavonoides (Soto *et al.*, 2017; Soquetta *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2020). Específicamente, los polifenoles representan el 70% de los compuestos bioactivos encontrados en las frutas (Mattos *et al.*, 2017), estableciéndose como la principal fuente de compuestos fenólicos en la dieta del ser humano (Soto *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019). Muchos estudios han demostrado una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y el potencial antioxidante de frutas y vegetales (Soto *et al.*, 2017), así como su asociación con beneficios en la salud humana (Khoo *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2020). Uno de los subgrupos de los polifenoles de mayor interés son las antocianinas.

Las antocianinas pertenecen al subgrupo de los polifenoles, llamado flavonoides (Khoo *et al.*, 2017; Alappat & Alappat, 2020; Eker *et al.*, 2020). Se definen como pigmentos no fotosintéticos sintetizados en el citoplasma, y almacenados en el lumen de las vacuolas de las células epidérmicas, y se encuentran en diferentes partes de las plantas,

especialmente flores, frutas y tallos. Se caracterizan por tener coloraciones rojas en condiciones ácidas, mientras que se perciben de forma azul en condiciones alcalinas (Khoo *et al.*, 2017; Nassour *et al.*, 2020). Además, su contenido en los alimentos generalmente es proporcional a la intensidad del color del producto y aumentan a medida que madura la fruta (Septembre *et al.*, 2018). Las antocianinas difieren en la posición y el número de grupos hidroxilos, el grado de metilación de grupos hidroxilos, la naturaleza y el número de carbohidratos unidos a la aglicona y ácidos alifáticos o aromáticos unidos (Ma *et al.*, 2019; Eker *et al.*, 2020). En la naturaleza, más de 600 antocianinas y 30 antocianidinas han sido identificadas, pero seis de estas agliconas son las más comunes y ampliamente distribuidas en alimentos: cianidina (50%), delphinidina (12%), pelargonidina (12%), peonidina (12%), malvidina (7%) y petunidina (7%) (Khoo *et al.*, 2017; Eker *et al.*, 2020; Rashid *et al.*, 2020). La mayoría de las antocianinas en los alimentos son derivados de la cianidina, siendo así que la glucósido-3-cianidina es la forma más ampliamente distribuida y abundante en plantas comestibles, y consecuentemente, es el compuesto más estudiado. Las principales fuentes de antocianinas en la dieta son las frutas y verduras pigmentadas. Su formación se ve favorecida en ambientes ácidos (Khoo *et al.*, 2017; Eker *et al.*, 2020). A pesar de que estos compuestos se encuentran relacionados con la resistencia de las plantas ante enfermedades (Bendokas *et al.*, 2018), las antocianinas son generalmente reconocidas como seguras ("GRAS": *generally regarded as safe*) y toleradas en los humanos, colocándolas como uno de los nuevos colorantes aceptados bajo la clasificación E163 en la Unión Europea (Nassour *et al.*, 2020). En los alimentos, las antocianinas inhiben la oxidación lipídica y proteica; además, numerosos estudios revelan que presentan acción prebiótica, al incrementar poblaciones de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. o *Actinobacteria*, potenciando la microbiota intestinal (Eker *et al.*, 2020).

3.6. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son metabolitos primarios de las plantas. Es posible encontrar altas acumulaciones de estos compuestos en varias frutas, especialmente bayas, como mora (*Rubus* spp.). El ácido málico y el ácido cítrico pertenecen a las sustancias más abundantes con un papel clave en el metabolismo y fisiología de las plantas, principalmente producidos en el ciclo del ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) y en menor grado en el ciclo del glioxilato. (Adamczak *et al.*, 2020). Son considerados conservantes naturales y están clasificados como "GRAS" y son ampliamente utilizados debido a su actividad antioxidante, capacidad acidificante, bajo costo y propiedades antimicrobianas, que logran reducir el número de bacterias, tanto de deterioro como patógenas (Oh *et al.*, 2016; Olaimet *et al.*, 2018). Dentro de los ácidos orgánicos algunos presentan una mayor actividad antimicrobiana (Bushell *et al.*, 2019), entre los mejores se destaca el ácido láctico (pKa 3,08), acético (pKa 4,75) y propiónico

(pKa 4,87), siendo estos dos últimos los más efectivos, debido a su mayor valor de pKa y mayor porcentaje de ácido sin disociar a un pH dado (Özcelik *et al.*, 2016), ya que para ejercer su actividad antimicrobiana este debe difundir a través de la membrana, lo cual es posible en su forma neutra o protonada, cuyo carácter es más lipofílico (Amrutha *et al.*, 2017). Sin embargo, los ácidos orgánicos y sus sales son considerados ácidos débiles, por lo que no se disocian por completo en agua, sino a un pH específico, y la proporción depende del valor de pKa en combinación con el pH exterior del medio (Peh *et al.*, 2020), por lo que su efectividad se ve potenciada por el pH del alimento, si este es igual o menor que la pKa del ácido (Radkowski *et al.*, 2018).

3.7. Deterioro microbiológico de jugos

El deterioro en los alimentos se describe como cambios indeseables que ocurren en los alimentos debido al desarrollo de microorganismos (Rashid *et al.*, 2020). Los problemas de calidad en los alimentos, como resultado del deterioro microbiano, son un problema significativo dentro de la industria alimentaria, que resulta en el desaprovechamiento, insatisfacción del cliente y una amenaza para la marca asociada. Las estimaciones mundiales alertan que cerca del 40% del suministro de alimentos no se consume, y específicamente el 25% podría desperdiciarse debido al deterioro microbiano. Aunque las plantas poseen sistemas de defensa contra el deterioro microbiano, después de la cosecha y la senescencia, estas defensas se pierden y se deterioran más fácilmente, es así como los productos frescos y procesados de vegetales son susceptibles al deterioro (Snyder & Worobo, 2017).

Los jugos y/o bebidas de frutas, como la mayoría de los alimentos ácidos, frecuentemente llegan a deteriorarse como resultado de la contaminación con bacterias ácido-tolerantes, junto con levaduras y mohos. Las frutas y vegetales contienen los nutrientes necesarios para facilitar el crecimiento de microorganismos, por lo que su control oportuno es crítico para mantener la calidad a lo largo del proceso de producción y comercialización. Los mohos y las levaduras toleran condiciones de alta presión osmótica, bajo pH ($\text{pH} \leq 4,0$) y pueden crecer a temperaturas de refrigeración (Steyn *et al.*, 2011; Vantarakis *et al.*, 2011). Algunas frutas, incluidas las naranjas, son susceptibles a la contaminación con algunas especies fúngicas, como *Aspergillus*, debido a su bajo pH, alta humedad y composición de nutrientes. Asimismo, las especies de levaduras aisladas más frecuentemente de jugos cítricos son algunas especies de *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, algunas menos comunes pertenecen al género *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hanseniaspora* y *Metschnikowia* (Vantarakis *et al.*, 2011).

Con el objetivo de controlar la prevalencia de estos microorganismos en el producto final, la industria de jugos aplica un proceso de pasteurización acoplado a un llenado en caliente, donde el producto es mantenido a una temperatura entre 86-96°C por aproximadamente 2

min, suficiente para inactivar microorganismos mesófilos de deterioro (Steyn *et al.*, 2011). Los tratamientos térmicos durante la producción de concentrados de frutas, junto con características fisicoquímicas inherentes, incluida la alta concentración de azúcares (65-68 °Brix), el bajo pH (3,5-4,0), la presencia de ácidos orgánicos, actividad de agua reducida (0,85-0,99) y reducción de oxígeno, resultan en una fuerte inhibición del crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos y de deterioro (Passos & Ribeiro, 2009; Sultan *et al.*, 2019). Es por ello que el deterioro en bebidas de frutas reconstituidas es restringido a un pequeño número de bacterias Gram positivas, formadoras de endosporas y algunas especies de hongos termorresistentes, capaces de sobrevivir la concentración y procesos de pasteurización (Steyn *et al.*, 2011). Como consecuencia de la presión selectiva adicional de los jugos de frutas ácidas, *Alicyclobacillus* corresponde a uno de los mayores problemas a nivel de deterioro (Snyder & Worobo, 2017). Específicamente, los tratamientos térmicos convencionales aplicados en la industria de jugos (88-96°C por 2 min (Walker & Phillips, 2008) o 92°C por 10 s y un enfriamiento a 35°C en menos de 30 min (Spinelli *et al.*, 2009)), en lugar de inactivarla las endosporas, inducen a su germinación y crecimiento. La mayoría o todas las células vegetativas son eliminadas por el proceso térmico aplicado, más del 99% de las células vegetativas son eliminadas a 80°C por 20 min a un pH de 4,0; por lo que las responsables del deterioro son las esporas sobrevivientes, los valores D revelan su alta resistencia ($D_{90^{\circ}\text{C}}$ 16-23 min y $D_{95^{\circ}\text{C}}$ 0,06-5,3) (Clotteau, 2014), específicamente en jugo de naranja (pH \approx 3,5) estos valores corresponden a $D_{85^{\circ}\text{C}}$ 65,6 min y $D_{91^{\circ}\text{C}}$ 11,9 min (Pinto *et al.*, 2019). Las esporas requieren de las condiciones apropiadas bajo las cuales germinar y crecer, como un enfriamiento lento en la zona de 40-50°C (Tianli *et al.*, 2014). A pesar de que un procesamiento más intenso logra inactivar las esporas, dichos tratamientos pueden impactar adversamente el producto a nivel sensorial y nutricional, mientras se experimenta un incremento de los costos energéticos (Osopale *et al.*, 2019).

El suelo es considerado como el principal hábitat del género *Alicyclobacillus*, y la fuente más importante de contaminación en productos ácidos (Smit *et al.*, 2011; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). La contaminación de jugos de frutas es típicamente generada por residuos de tierra en la superficie de las frutas. Se ha encontrado recuentos altos en muestras de suelo, en el rango de 10^4 - 10^6 UFC/mL (Takahashi, 2007). Los empleados también pueden acarrear células vegetativas o esporas y representar una fuente de contaminación (Smit *et al.*, 2011; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). En último caso, se ha observado altos niveles de endosporas (10^3 UFC/mL) en el agua de irrigación (Takahashi, 2007), y de limpieza de las áreas de procesamiento, así como para ingrediente de los jugos (Steyn *et al.*, 2011). De este modo, la carga contaminante inicial puede variar según las prácticas agrícolas, la higiene de los empleados y los aspectos relacionados con el campo y las áreas circundantes (Snyder & Worobo, 2017). A pesar de que las cargas presentes en las frutas se minimicen, mediante la

implementación de buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM), con la gran escala de la industria moderna de alimentos, y la distribución a escala mundial, un pequeño número de microorganismos viables podrían ser suficientes para contaminar grandes volúmenes de jugo (Merle & Montville, 2012).

Los datos recopilados, revelan que la incidencia y severidad del deterioro presenta variaciones según el tipo de jugo, época de procesamiento, prácticas de cosecha y demás variables involucradas (Oteiza *et al.*, 2015). Se ha observado un mayor número de casos durante las épocas más calientes, como el inicio de la primavera y verano, asociado con procesos de distribución inadecuados (Huang *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Así mismo, durante la época lluviosa, los recuentos obtenidos son significativamente más bajos al analizar los frutos (Takahashi, 2007), mientras las bajas precipitaciones o lluvias, faciliten que el polvo se deposite en la superficie de las frutas, así como otras bacterias termo acidófilas formadoras de spora (McKnight *et al.*, 2010), aumentando la carga en los frutos, y por ende, los niveles de contaminación inicial.

3.8. *Alicyclobacillus*: generalidades del microorganismo y deterioro ocasionado

El nombre del género *Alicyclobacillus* deriva de la presencia de ácidos grasos ω alicíclicos a nivel de membrana, los mismos contribuyen a su resistencia térmica y su naturaleza acidófila, siendo resistente a los tratamientos de pasteurización normalmente aplicados a productos de fruta concentrados de alta acidez (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Los lípidos que contienen ácidos grasos con un anillo ciclohexano, pueden estabilizar la estructura de la membrana, al lograr empaquetarse densamente, obteniendo una baja difusión a temperaturas altas. Particularmente, los ácidos grasos ω -ciclohexano y ω -cicloheptano, forman un recubrimiento con fuertes enlaces hidrofóbicos, reduciendo la permeabilidad (Merle & Montville, 2012). En el caso específico de *A. acidoterrestris*, el 90% de la membrana celular contiene ácidos grasos ω -ciclohexano, específicamente 11-ciclohexilundecanoico y 13-ciclohexiltridecanoico (da Costa *et al.*, 2015). Otros factores que han sido asociados con la resistencia al calor de las endosporas, es la presencia de proteínas termoestables, así como la mineralización por cationes divalentes con ácido dipicolínico (DPA) (Steyn *et al.*, 2011).

Los incidentes de deterioro por miembros del género *Alicyclobacillus* han sido reportados frecuentemente e incluye un diverso rango de productos, como alimento de alta acidez, estables a temperatura ambiente, procesados mediante llenado en caliente, pasteurizados, enlatados, alta temperatura ("ultra heat-treatment") o carbonatados (Steyn *et al.*, 2011; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Esto indica que el microorganismo es capaz de deteriorar jugos de frutas y vegetales pasteurizados, té embotellado, bebidas isotónicas y otras de bajo pH, así como productos estables a temperatura ambiente (Merle & Montville, 2012). Datos estadísticos revelan el riesgo de contaminación de diferentes tipos de jugos: jugo de fruta

para mezclar (9-42,1%), concentrado de jugo de manzana (30,5-75%), concentrado de jugo de naranja (82,1%), productos de jugos frescos (32%), concentrado de manzana (83,3%), jugo de naranja (14,7%) y concentrados de frutas (naranja, mango, coco y piña; 8%) (Clotteau, 2014). Aunque la diversidad de jugos es amplia, existe una especie predominante con respecto al deterioro de jugos, *A. acidoterrestris*, aunque se reportan con menor frecuencia otras especies como *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*, *A. pomorum* y *A. dauci* (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019).

Uno de los principales retos que se enfrentan en relación con la detección de la contaminación de *Alicyclobacillus* spp. es el tipo de deterioro que experimentan los productos (Ciuffreda *et al.*, 2015), el cual puede ocurrir mucho tiempo antes de su fecha de expiración (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Este se clasifica como "flat sour" o agriado plano (Huang *et al.*, 2015), por lo que los jugos deteriorados parecen normales, sin modificación en el envase, señal predominante en los jugos contaminados con otros microorganismos como alerta de contaminación, con poco o ningún cambio en el pH (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Algunas especies de *Alicyclobacillus* causan que ciertos jugos de fruta clarificados manifiesten turbidez y/o un ligero sedimento blanco en el fondo del envase (Ciuffreda *et al.*, 2015); no obstante, el recuento microbiano necesario para generar aromas detectables está por debajo del necesario para provocar cambios del aspecto general (Snyder & Worobo, 2017). De este modo, la característica más común de la contaminación de *Alicyclobacillus* es un mal olor identificado como ahumado, medicinal, fenólico, antiséptico, pungente o picante, asociado con la presencia de guaiacol (2-metoxifenol) y otros halofenoles (Ciuffreda *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Los compuestos asociados con mal sabor causado por las especies de *Alicyclobacillus* incluye tres principales compuestos químicos: guaiacol (2-metoxifenol), 2,6-dibromofenol (2,6-DBF) y 2,6-diclorofenol (2,6-DCF). Guaiacol es el metabolito principal asociado con el deterioro (mal sabor y olor) en jugos de frutas, mientras que los otros dos han sido aislados de productos con grandes poblaciones de *Alicyclobacillus* spp. (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). No obstante, la producción de guaiacol no se limita a especies de *Alicyclobacillus*, sino también algunos otros géneros bacterianos (*Bacillus*), así como algunas especies de mohos y levaduras (Smit *et al.*, 2011).

En el caso del deterioro provocado por *A. acidoterrestris*, existe un nivel crítico de células que debe estar presente. La concentración de células aceptada más ampliamente para producir un deterioro detectable a nivel sensorial se encuentra entre 10^4 y 10^5 UFC/mL (Huang *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). El umbral sensorial de los humanos para la presencia de guaiacol es bajo, por lo que es fácilmente detectado por evaluación olfatoria. Se ha reportado que la concentración umbral de guaiacol en agua es de 0,021 ppm para olor y 0,013 ppm para la detección mediante degustación (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Aun así, la sensibilidad del consumidor a estos aromas es muy variable, por lo que no existe un

límite bien establecido en el que los consumidores rechacen el producto (Snyder & Worobo, 2017).

La ruta para la producción de guaiacol es mediada por una conversión biológica del ácido ferúlico, compuesto comúnmente encontrado en jugos de frutas, ya que se encuentra asociado con la lignina, componente estructural de la pared celular de las células vegetales (Hu *et al.*, 2020). Inicialmente, el ácido ferúlico es descarboxilado a 4-vinilguaiacol o transformado directamente a vanilina o ácido vanílico. Si se empieza con 4-vinilguaiacol como sustrato, este es oxidado a vanilina, y nuevamente oxidado en ácido vanílico, para finalmente ser descarboxilado a guaiacol (Tianli *et al.*, 2014; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Además, *Alicyclobacillus* spp. también puede convertir el ácido vanílico en otros compuestos como metoxi-hidroquinona y ácido proto-catéquico (Smit *et al.*, 2011; Ciuffreda *et al.*, 2015).

3.9. Factores que influyen en el desarrollo de *Alicyclobacillus* y producción de guaiacol

La producción de guaiacol es una reacción rápida bajo condiciones deseables para cada cepa (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019), y depende de factores como la cantidad de bacterias viables, tipo de cepa, temperatura de almacenamiento, concentración de oxígeno disuelto, uso de choque térmico, y el tipo de matriz, que se relaciona tanto con la concentración de precursores para la generación guaiacol, así como la presencia de inhibidores bacterianos (Ciuffreda *et al.*, 2015). Existe una correlación positiva entre la concentración de los sustratos que puede usar directamente *A. acidoterrestis* con la cantidad final de guaiacol (Hu *et al.*, 2020). Algunos precursores son la vanilina, el ácido vanílico y el ácido ferúlico, presentes en algunas frutas y sus jugos, de estos tres solamente la vanilina o el ácido vanílico pueden ser transformados directamente por *Alicyclobacillus* spp. sin la participación de otra bacteria (Hu *et al.*, 2020). El ácido vanílico es un derivado natural de la lignina y también es introducido a las bebidas como un ingrediente (Ciuffreda *et al.*, 2015), por lo que el deterioro se puede dar con facilidad. La tirosina es otro posible precursor (Tianli *et al.*, 2014; Ciuffreda *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). El jugo de naranja contiene entre 3,4-13,5 µg de tirosina por mL de jugo; sin embargo, esta reacción no ha sido profundamente estudiada (Ciuffreda *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019).

El crecimiento de *Alicyclobacillus* sp., y su potencial deterioro se ve influenciado por la capacidad de sobrevivencia y adaptación a las condiciones experimentadas. Las variables que influyen en el desarrollo de *Alicyclobacillus* se detallan a continuación:

3.9.1. Temperatura de almacenamiento

La temperatura corresponde a un factor externo al jugo que afecta el crecimiento. La mayoría de las especies presentan un crecimiento entre 20-70°, con algunas excepciones. La temperatura más baja de crecimiento está reportada para la especie *A. disulfidooxidans*,

la cual se encuentra en lodos de aguas residuales, capaz de crecer a 4°C. En contraste, *A. acidocaldarius* es capaz de crecer a 70°C y normalmente es aislado de suelo, frutas y jarabes (Ciuffreda *et al.*, 2015). En el caso específico de *A. acidoterrestris*, puede crecer entre 20-55°C con un rango óptimo de 40-50°C (Ciuffreda *et al.*, 2015). Sin embargo, se reporta crecimiento hasta los 70°C para algunas cepas (Smit *et al.*, 2011; Tianli *et al.*, 2014).

3.9.2. pH

Las especies pertenecientes al género *Alicyclobacillus* presentan un crecimiento que va desde un pH de 0,5 para *A. disulfidooxidans*, encontrada en lodos provenientes de aguas residuales (Ciuffreda *et al.*, 2015), hasta 7,5 en el caso de *A. pohliae* (Tianli *et al.*, 2014), especie aislada de suelo geotérmico (Glaeser *et al.*, 2013). En el caso específico de *A. acidoterrestris*, esta puede crecer en ambientes con un pH entre 2,0-6,0 (Bevilacqua *et al.*, 2008; Ciuffreda *et al.*, 2015).

3.9.3. Contenido de sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles por encima de los 18-20 °Brix, inhibe la germinación de las esporas de *Alicyclobacillus* sp. (Bevilacqua *et al.*, 2008; Steyn *et al.*, 2011). Es así como el crecimiento de esta bacteria en concentrados de jugos (>40 °Brix), que contienen cargas de 10² UFC/mL, no son asociados con deterioro (Steyn *et al.*, 2011), pero una vez que estos son diluidos para producir jugos mediante reconstitución, las condiciones favorables permiten la multiplicación de las esporas hasta niveles suficientes para causar deterioro (Smit *et al.*, 2011). Se ha reportado la inhibición de *A. acidoterrestris* CRA7152 en jugo de manzana (15 °Brix a un pH de 3,5) a 43°C durante 16 días de almacenamiento (Peña *et al.*, 2011). Los °Brix de los jugos comerciales se encuentran entre 11 y 14 °Brix, dependiendo de la fruta (Úbeda, 2012). Por lo tanto, los sólidos solubles en los niveles que se encuentran normalmente no representan una barrera contra el crecimiento de esta bacteria.

3.9.4. Tipo de atmósfera

Aunque algunos estudios sugieren la tolerancia de algunas cepas por niveles de oxígeno de 0,1%, el género *Alicyclobacillus* spp presenta microorganismos aerobios estrictos y requieren de la presencia de oxígeno para crecer en bebidas de frutas (Ciuffreda *et al.*, 2015; Gordon, 2017). Una excepción es la especie *A. pohliae*, aislada de suelo geotérmico (Antártica), cuyo comportamiento en algunos casos es el de un microorganismo anaerobio facultativo (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Aunque el suministro limitado de oxígeno puede retardar el crecimiento de las células vegetativas, no previene que se alcancen altas concentraciones del microorganismo (Smit *et al.*, 2011) y la producción de guaiacol puede ser incluso mayor en estos casos (Huang *et al.*, 2015). Aun así, se promueven medidas para

limitar la disponibilidad de oxígeno. Algunos fenómenos asociados con la cantidad de oxígeno disponible son el espacio de cabeza, material de empaque y compuestos secuestradores. Con respecto al espacio de cabeza, la concentración de oxígeno confinado en este espacio determina el oxígeno disuelto. La tasa de crecimiento en envases parcialmente llenos es mayor en comparación con un llenado total. En los casos que no es posible eliminar el espacio de cabeza, la utilización de atmósferas modificadas puede ralentizar el crecimiento (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Por otra parte, se debe contemplar la permeabilidad del empaque al oxígeno. De tal forma *A. acidoterrestris* crece más fácil en botellas PET, seguido de empaques de cartón de larga duración (TetraPack) y por último latas y botellas vidrio, cuya transferencia producto-ambiente es prácticamente nula (Takahashi, 2007). Por último, la adición de ácido ascórbico (vitamina C) puede disminuir el oxígeno disponible (Sultan *et al.*, 2019), el rango de 150-200 mg/L es suficiente para reducir el contenido de oxígeno a 0,1% o crear condiciones anaeróbicas en jugo de naranja (Takahashi, 2007; Chmal & Papiewska, 2011).

3.9.5. Compuestos inhibitorios

A. acidoterrestris ve afectado su desarrollo por la presencia de extractos y aceites esenciales de piperáceas (de Pascoli *et al.*, 2018), saponina (Huang *et al.*, 2015), eucalipto, semillas de uva (Molva & Baysal, 2015a), granada, espirulina (Ciuffreda *et al.*, 2015), cítricos y romero (Gordon, 2017). Aunque la composición de los aceites esenciales puede variar según el modo de extracción, la planta y el clima (Bevilacqua *et al.*, 2008), los compuestos activos que han mostrado actividad antimicrobiana contra *A. acidoterrestris* son: carvacrol, cinamaldehído (100 ppm), eugenol, citral-geraniol y D-limoneno (Bevilacqua *et al.*, 2008; Steyn *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Otros compuestos que ejercen control sobre el desarrollo de *A. acidoterrestris* son los ácidos orgánicos (ácido benzoico (0,061 g/L) > ácido caprílico (0,316 g/L) y butírico (0,303 g/L) > ácido acético (0,727 g/L) > ácido tartárico, láctico, málico y cítrico (4,58-7,07 g/L)) (Bevilacqua *et al.*, 2008; Tianli *et al.*, 2014). Además, *Alicyclobacillus* no es capaz de crecer en jugos de uva roja debido a la presencia de polifenoles (Yokota *et al.*, 2007). El ácido cinámico y el benzaldehído también representa una barrera (McKnight *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2015). Por otra parte, la presencia de bacteriocinas, como la nisina (efecto esporo-estático en jugo de naranja a 25-100 IU/mL o 15,62 µg/mL), la enterocina, la bificina C6165, paracina C, bacteriocina RC y bovicina HC5, también han demostrado ser una barrera para el crecimiento de *Alicyclobacillus* (Bevilacqua *et al.*, 2008; Steyn *et al.*, 2011; Ciuffreda *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; de Pascoli *et al.*, 2018; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Otros agentes inhibidores son los emulsificantes (Monolaurina, 5-7 mg/L) (Bevilacqua *et al.*, 2008; Clotteau, 2014; Huang *et al.*, 2015) y enzimas como la lisozima (0,25-2 g/L) (Bevilacqua *et al.*, 2008; Clotteau, 2014), la papaína

(0,98 µg/mL) y la bromelina (62,5 µg/mL) (Dos Anjos *et al.*, 2016; Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Por último, el lactato de calcio, usado en la industria de jugos para la fortificación (Clotteau, 2014), así como el quitosano (1,4g/L) (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019), el arginato láurico y la ε-polisina (Rui *et al.*, 2015; Hu, 2020), inhiben el desarrollo de *Alicyclobacillus*.

4. Materiales y métodos

4.1 Localización

Todas las determinaciones experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y de la Escuela de Tecnología de Alimentos, específicamente los laboratorios de microbiología y química, así como la planta piloto. Ambas instituciones se encuentran localizadas en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Montes de Oca.

4.2 Elaboración de los jugos de fruta

Se preparó un lote de jugo de cada una de las 3 frutas seleccionadas (cas, maracuyá y mora), para obtener un jugo 100% fruta, estable a temperatura ambiente. El jugo de maracuyá se preparó según la definición de la FDA, la cual indica que para que un jugo sea considerado como 100% fruta, debe ser obtenido directamente de la fruta o vegetal, no puede ser concentrado o reconstituido, y sin la adición de ningún otro componente, como acidulantes o endulzantes (FDA, 2019). Para la preparación de los jugos, se siguió el procedimiento descrito en la Figura 1. Es importante aclarar que, para el cas y la mora del primer objetivo se incorporó agua en un 15 y 20% con respecto a la masa inicial de fruta luego del pelado y troceado, y como resultado, luego de la molienda se obtuvo un néctar, producto de preparación similar a un jugo con la distinción que presenta agua añadida, con un porcentaje mayor al que presenta la fruta normalmente, con o sin endulzantes (RTCA, 2005; RTCR, 2005). No obstante, para el objetivo 2, el jugo de mora utilizado si corresponde a un jugo 100%. Por otra parte, para el jugo de naranja se utilizó un jugo comercial al 100% de la marca Tropicana y tipo Grovestand (con mucha pulpa), dado que en una investigación previa se determinó que, de los jugos de naranja comercializados en Costa Rica, éste representa la matriz comercial con el mejor perfil para el crecimiento de *A. acidoterrestris* (Gamboa, 2020).

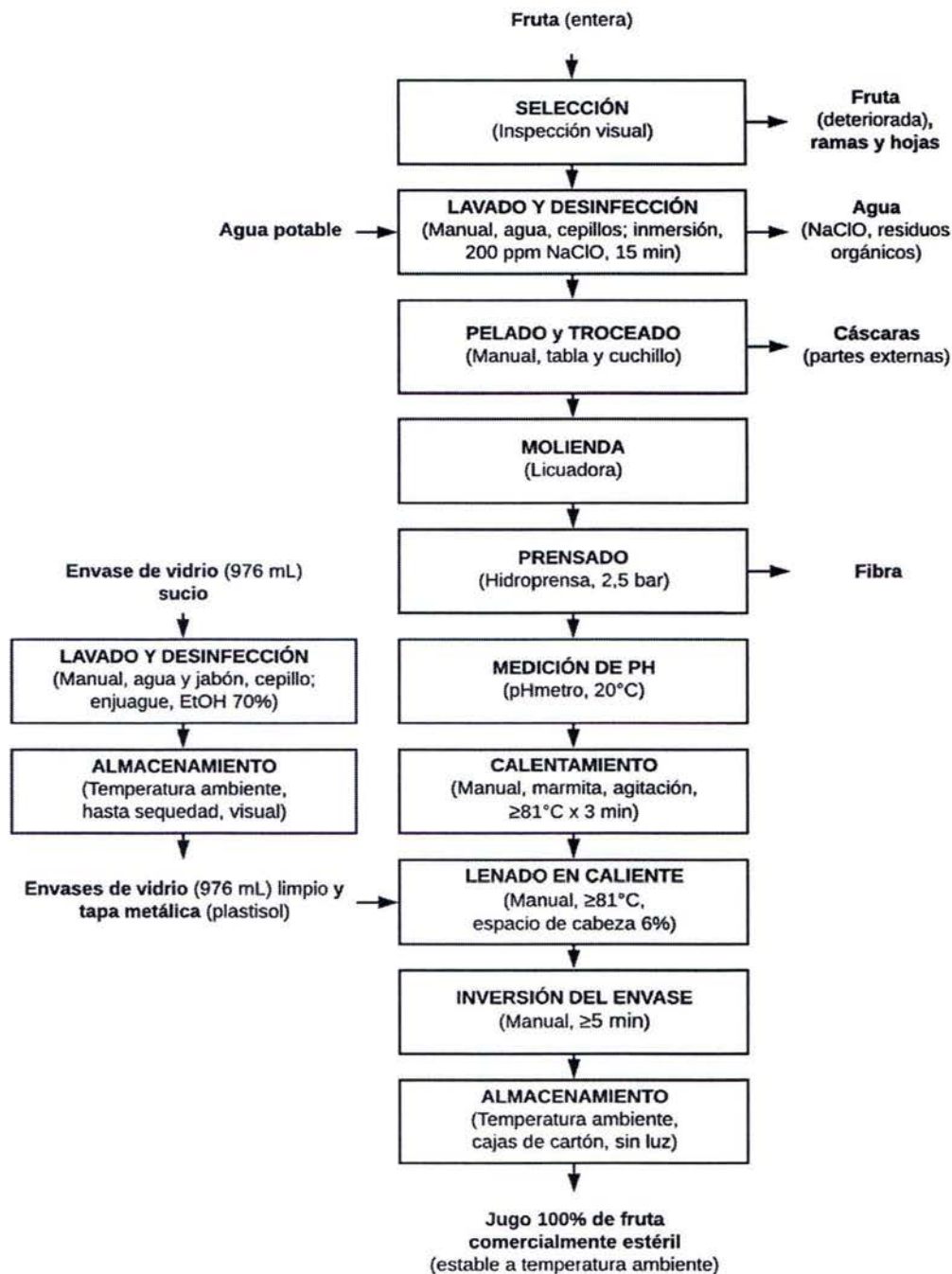


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de jugos de frutas estables a temperatura ambiente.

Para reducir la carga microbiológica en el producto, las frutas se sometieron a las etapas de lavado y desinfección, ya que el dimensionamiento de un tratamiento térmico está relacionado con la carga microbiológica inicial de un alimento (Liu *et al.*, 2019). Por esta razón,

se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO), desinfectante más utilizado en la industria alimentaria para el lavado de frutas y vegetales (Gil *et al.*, 2009; García *et al.*, 2017). Se utilizó 200 ppm, máxima concentración permitida para disoluciones en contacto directo con alimentos (FDA, 2019b), bajo las condiciones propuestas por Tanaro *et al.* (2019), pH neutro y un tiempo de exposición de 15 min. Para el jugo de mora no se realizó el proceso de desinfección, solo lavado con agua, debido a la naturaleza del producto.

Para estabilizar microbiológicamente los jugos preparados, se aplicó el tratamiento térmico recomendado por Padilla-Zakour (2008) para productos ácidos, con pH menor a 3,9, calentando a 81°C por 3 min, y realizando un llenado a una temperatura $\geq 81^\circ\text{C}$, seguido de la inversión de los envases por 5 min, para lograr esterilizar la totalidad del envase y la tapa. Se determinó el pH de cada bebida antes y después de aplicar calor, para corroborar que el tratamiento térmico fue el adecuado.

Como la generación de vacío se ve afectada por el espacio de cabeza, se utilizó un valor de al menos un 6% de la capacidad máxima (con un máximo de 10%) (Tucker & Featherstone, 2010). Al seguir estas indicaciones, correspondientes a un proceso de llenado en caliente, se obtuvo un producto comercialmente estéril, alimento libre de microorganismos capaces de reproducirse bajo condiciones normales no refrigeradas de almacenamiento y distribución (Chhabra, 2017). Alcanzar este estado es necesario para realizar una inoculación controlada.

En cuanto a los envases, se utilizaron envases de vidrio (Ashurst, 2016), a los cuales se les realizó una desinfección con alcohol al 70% (Russel *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2011; Graziano *et al.*, 2013). Una vez envasados los jugos, estos fueron almacenados en un lugar oscuro (cajas de cartón) (Navia *et al.*, 2014) a temperatura no superior a 35°C.

Para corroborar la efectividad de todas las medidas anteriormente descritas y confirmar la esterilidad comercial de los jugos, se realizaron dos tipos de análisis. El primero corresponde al recuento total aerobio de mesófilos, el cual se realizó según los procedimientos del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), "P-SA-MM-001", basado en los métodos de Da Silva *et al.* (2013) y Salfinger & Lou (2015). Se implementó el método de vaciado con agar estándar (aproximadamente 20 mL). Luego de agitar y solidificar el agar, se incubó a 35°C por 48 horas (CITA, 2017a). Una modificación que se realizó fue la adición de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) para impartir un color rojizo a las colonias y facilitar el proceso de conteo (Vardanian *et al.*, 2017). El segundo análisis que se realizó fue el recuento total de mohos y levaduras, contaminantes comúnmente encontrados en jugos (Sperber & Doyle, 2009). Igualmente, se realizó, de acuerdo con los procedimientos del CITA, "P-SA-MM-007", basado en los métodos de Da Silva *et al.* (2013) y Salfinger & Lou (2015), con algunas modificaciones. Se llevó a cabo mediante el método de vaciado en sustitución del esparcimiento en agar papa dextrosa acidificado (pH 3,5, ácido

tartárico) (CITA, 2017b), seguido de una incubación a 30°C por 48 horas, metodología utilizada por Splittstoesser & Churrey (1989) y Tandon *et al.* (2003), logrando reducir los tiempos de incubación de cinco a dos días al aumentar la temperatura de 25°C a 30°C, esta medida facilitó la programación de las actividades en el laboratorio, lo cual era requisito producto de la pandemia por COVID-19. Ambos métodos se realizaron para cada lote de jugo por triplicado, utilizando directamente la muestra (sin diluciones), pues se esperaba ausencia de microorganismos.

4.3 Pruebas preliminares

Prueba 1: Comportamiento de los jugos sospechosos. Se realizó un montaje de tres muestras de jugos elaborados en planta piloto a partir de fruta fresca para corroborar el crecimiento de *A. acidoterrestis* en jugo maracuyá y piña. Con ese objetivo, se elaboraron dos de esos jugos (maracuyá y piña) estables a temperatura ambiente (pH $\leq 3,9$, tratados a 81°C por 3 min, seguido de un llenado en caliente a 81°C e inversión de los envases por ≥ 5 min) en las instalaciones de la planta piloto del CITA y se utilizó un tercer jugo comercial de naranja, marca Tropicana, como control positivo.

Una vez listos los jugos, se preparó un inóculo a partir de colonias crecidas en agar "Yeast Starch Glucose" (YSG), pH $3,7 \pm 0,1$ (HCl 1 N), incubado a 45°C por 5 días, en placas invertidas y colocadas dentro de bolsas plásticas para evitar deshidratación y agrietamiento del agar. Se tomó, con un asa bacteriológica, una colonia y se dispersó en 10 mL de agua peptonada al 0,1%. Seguidamente, se realizó un choque térmico (75°C por 20 min, midiendo la temperatura interna en el punto frío de un tubo con el mismo nivel de agua) en un baño de agua con circulación, para inactivar las células vegetativas y activar las esporas presentes, y de esta manera lograr una suspensión de células viables y de carga conocida.

Se realizaron los cálculos correspondientes para inocular 200 mL de jugo y obtener una carga final de 3 log UFC/mL (aproximadamente). Por lo tanto, se adicionó 1,5 mL de inóculo en botellas de vidrio estériles de 225 mL, seguido de los 200 mL de jugo. Una vez homogeneizados, se tomaron 50 mL del jugo y se colocaron en tubos de centrifuga estériles con tapa y se almacenaron a 45°C hasta su muestreo. Las determinaciones de los recuentos se realizaron durante los días 0 (carga inicial), 3 y 6. Para lo cual se realizaron las diluciones pertinentes, seguido de la técnica de vaciado en agar YSG (pH 3,7) y una incubación a 45°C por 3 días, para finalmente contabilizar visualmente aquellas colonias de color blanco-crema.

Prueba 2: Estandarización del inóculo (carga de 6 log a partir de 1 mL de inóculo en 135 mL de muestra). Una vez listos los jugos, se preparó un inóculo a partir de colonias crecidas en agar "Yeast Starch Glucose" (YSG), pH $3,7 \pm 0,1$ (HCl 1 N), incubado a 45°C por

3 días, en placas invertidas y colocadas dentro de bolsas plásticas para evitar deshidratación y agrietamiento del agar. Se tomó, con un asa bacteriológica, toda la biomasa de una placa entera y se dispersó en 9 mL de agua peptonada al 0,1%. Seguidamente, se realizó un choque térmico (75°C por 20 min, midiendo la temperatura interna en el punto frío de un tubo con el mismo nivel de agua) en un baño de agua con circulación, para inactivar las células vegetativas y activar las esporas presentes, y de esta manera lograr una suspensión de células viables y de carga conocida.

Se realizaron los cálculos correspondientes para inocular 135 mL de jugo y obtener una carga final de 6 log UFC/mL (aproximadamente). Por lo tanto, se adicionó 1 mL de inóculo en botellas de vidrio estériles de 225 mL, seguido de los 134 mL de jugo. Una vez homogeneizados, se almacenaron a 45°C hasta su muestreo. Las determinaciones de los recuentos se realizaron durante los días 0 (carga inicial), 3, 5 y 7. Para lo cual se realizaron las diluciones pertinentes, seguido de la técnica de vaciado en agar YSG (pH 3,7) y una incubación a 45°C por 3 días, para finalmente contabilizar visualmente aquellas colonias de color blanco-crema.

Para ambas pruebas preliminares solo se realizó una repetición de los ensayos

4.4 Caracterización fisicoquímica de los jugos de fruta tropicales

Se determinó la composición fisicoquímica de los diferentes jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), para poder asociar sus características al crecimiento o inhibición del microorganismo de interés, *A. acidoterrestis*. Los análisis se realizaron por triplicado y se reportaron como un promedio de los datos, junto con su desviación estándar ($n=3$). Estos análisis fisicoquímicos fueron realizados por el Laboratorio de Química del CITA.

4.4.1 Determinación de pH

Se determinó el pH a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según el procedimiento "P-SA-MQ-012" (CITA, 2020d), basado en el método número 981.12 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2005).

4.4.2 Determinación de sólidos solubles

Se determinó la concentración de sólidos solubles, expresada como Brix, de cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora, según el procedimiento "P-SA-MQ-046" (CITA, 2019d), basado en el método número 932.12 de la AOAC (2012).

4.4.3 Determinación de azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa

Se determinó el contenido de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según el procedimiento "P-SA-MQ-011" (CITA, 2020a) basado en los métodos de Pirisino (1983) y Sullivan & Carpenter (1993).

4.4.4 Determinación de ácidos orgánicos

La concentración de los ácidos: ascórbico, cítrico, málico, fórmico, succínico y tartárico, es la más utilizada para la determinación de la autenticidad de los jugos (Correa & Rivera, 2018). De estos, el ácido cítrico, málico y tartárico son regulados en jugos de fruta comerciales por el Código de Prácticas del AIJN (*AIJN-European Fruit Juice Association*) (Sokolowska *et al.*, 2013). En consecuencia, se realizó la determinación de cuatro ácidos orgánicos (cítrico, málico, succínico y ascórbico) a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según el procedimiento "P-SA-MQ-051" (CITA, 2019a) basado en los métodos de Fernández & McGregor (1994), Nozal *et al.* (2003) y Gokturk (2006). Cabe aclarar, que la determinación del ácido ascórbico se realizó mediante otra metodología, que permite cuantificar las dos especies en las que se encuentra (ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico) (ver apartado 4.4.5).

4.4.5 Determinación de vitamina C

Se determinó la concentración de ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), siguiendo el procedimiento del CITA (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 compuestos. Es importante conocer la concentración de vitamina C debido a su efecto potenciador (50-100 mg/L) e inhibidor (150-200 mg/L) sobre *A. acidoterrestris* (Chmal & Papiewska, 2011).

4.4.6 Determinación de polifenoles totales

Se determinó el contenido de polifenoles totales a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según el procedimiento "P-SA-MQ-048" (CITA, 2019c), basado en los métodos de Slinkard & Singleton (1977), Georgé & Brat (2005), y se reportó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG).

4.4.7 Determinación de antocianinas totales

Se determinó el contenido de antocianinas totales a cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según el procedimiento "P-SA-MQ-047" (CITA, 2019b) basado en el método de Guisti y Wrolstad (2001), y se reportó como mg equivalentes de cianidin-3-glucósido (ECG).

4.4.9 Determinación del análisis proximal

Se determinó el contenido de humedad, grasa, proteína, cenizas y carbohidratos totales (por diferencia) para cada uno de los jugos elaborados (cas, maracuyá y mora), según los procedimientos del CITA: Humedad: P-SA-MQ-002 (CITA, 2020e) basado en el método número 920.151 de la AOAC (s.f.). Grasa cruda por extracto etéreo: P-SA-MQ-005 (CITA, 2019e) basado en el método de Carpenter *et al.* (1993). Proteína mediante la determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl utilizando equipos Foss Tecator, P-SA-MQ-003 (CITA, 2016) basado en el método número 920.152 de la AOAC (s.f.). Cenizas totales: P-SA-MQ-004 (CITA, 2020c) basado en el método número 940.26 de la AOAC (s.f.).

4.4.10 Diseño y análisis estadístico

Los resultados de los análisis fisicoquímicos se reportan como el promedio de los valores obtenidos de tres repeticiones, junto con su desviación estándar (n=3).

4.5 Objetivo específico 1: Determinación de las cinéticas de sobrevivencia o muerte de *A. acidoterrestris* en jugos y néctares de frutas tropicales de Costa Rica (cas, maracuyá y mora) durante 11 días de almacenamiento.

4.5.1 Selección de la bacteria

Se utilizó *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 correspondiente a una cepa comercial aislada de una muestra de tierra en Alemania. El microorganismo se encontraba almacenado a $-20 \pm 3^\circ\text{C}$ en viales con glicerol (10%) y caldo enriquecido (cerebro-corazón) para mantener su viabilidad hasta la ejecución del experimento (Côté, 2011).

4.5.2 Preparación del inóculo

Para obtener la concentración de células viables deseada, se realizaron dos etapas. Se inició por retirar del congelador las reservas de bacterias que se encontraban en los viales a $-20 \pm 3^\circ\text{C}$ en caldo enriquecido, hasta lograr obtener un caldo en estado líquido a

temperatura ambiente. Seguidamente, con el asa microbiológica estéril se tomó una asada y se rayó la totalidad de una placa con agar YSG, uno de los medios más sensibles para la recuperación de esporas de *A. acidoterrestris* (Henczka *et al.*, 2013), acidificado según Smit *et al.* (2011), con 1 N HCl hasta un pH de $(3,7 \pm 0,1)$. Las placas se incubaron a 45°C, temperatura reportada como óptima por Tayefe *et al.* (2014), por 72 horas, dentro de bolsas plásticas para evitar deshidratación y agrietamiento del medio, e invertidas.

En la segunda etapa, basado en pruebas preliminares, con un asa bacteriológica estéril se tomó toda la biomasa de una placa con la bacteria crecida en agar YSG y se dispersó en 9 mL de agua peptonada estéril (APE) al 0,1%. Listos los tubos necesarios, estos se colocaron en un baño de agua caliente con recirculación. Se agregó un tubo extra con el mismo volumen de APE, para introducir un termómetro en el punto frío del tubo (sin tocar las paredes), y de esta forma asegurar la exposición de temperatura durante el tiempo especificado, necesario para eliminar las células vegetativas y activar las esporas en estado de latencia (Smit *et al.*, 2011). En respuesta a la metodología seguida por Worsfold (2019), se utilizó 75°C por 20 min, combinación reportada por Gocmen *et al.* (2005). Luego del choque térmico, los diferentes tubos se unificaron en otro recipiente estéril, para estandarizar la población del microorganismo que se agregó a los diferentes jugos, cuyo valor se encontraba entre 7 y 8 log UFC/mL (concentración del inóculo).

4.5.2.1 Recuento de *A. acidoterrestris*

La determinación de la población inicial de *A. acidoterrestris* se realizó a partir de los jugos inoculados en el día 0, esto para cada jugo (cas, maracuyá y mora), mediante la técnica de vaciado, utilizando agar YSG acidificado (pH $3,7 \pm 0,1$, HCl 1 N). Se agitó manualmente la botella con el jugo inoculado para asegurar una mayor representatividad, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos por Walker & Phillips (2005) y Pornpukdeewattana *et al.* (2019), si la muestra es agitada antes del muestreo, la detección del crecimiento de *A. acidoterrestris* es generalmente mayor que si el envase no se mueve y se muestrea del fondo o superficie. Siguiendo con el proceso, se realizaron diluciones seriadas con APE al 0,1% y las mismas se platearon utilizando la técnica de vaciado en agar YSG. Cada placa contó con su duplicado y se incubaron a 45°C por 3 días (Murray *et al.*, 2007) dentro de bolsas plásticas para evitar deshidratación y agrietamiento del agar, de forma invertida. Pasado el tiempo de incubación, se efectuó el conteo de colonias, de color blanco crema, amarillentas, opacas y traslúcidas (Smit *et al.*, 2011) y se reportó como carga inicial según las placas con un número de colonias dentro del rango contable, entre 25-250 colonias. Por último, se multiplicó por el inverso de la dilución a la que correspondían.

4.5.3 Preparación e inoculación de las muestras

Las muestras fueron transferidas de los frascos en los que se envasaron en caliente a botellas pequeñas, de forma aséptica, donde se llevó a cabo la incubación una vez inoculadas. Para minimizar el riesgo de contaminación, se utilizó la cámara de flujo laminar para este proceso. Se utilizó botellas de vidrio estériles con capacidad para 225 mL, las cuales presentaron un volumen total de 135 mL (134 mL de jugo + 1 mL de inóculo), para obtener un espacio de cabeza del 40%, y así favorecer el crecimiento de *A. acidoterrestris* durante el tiempo de almacenamiento (Worsfold, 2019). Además, con ese volumen de inóculo se logró obtener una carga final cercana a los 6 log UFC/mL en las muestras de jugo inoculados, valor utilizado por Molva & Baysal (2015b) para corroborar un efecto de inhibición contra *A. acidoterrestris*. Listas las muestras, estas fueron tapadas con papel aluminio estéril para evitar desecación, y agitadas manualmente para asegurar una distribución homogénea del microorganismo en la matriz en estudio. Las muestras inoculadas se incubaron a 45°C hasta el momento de su muestreo. Además, se conservó una botella de cada jugo sin inocular (control negativo), la cual se muestreó hasta el último día de incubación para corroborar la ausencia de *A. acidoterrestris* en los jugos elaborados.

4.5.4 Muestreo de *A. acidoterrestris* durante el estudio

La determinación del recuento de la bacteria presente en los jugos inoculados se ejecutó de acuerdo con lo descrito en el apartado 4.5.2.1, con las siguientes variaciones. Se realizaron diluciones seriadas con APE al 0,1%. Los muestreos se llevaron a cabo los días 0, 3, 8 y 11, tomando como referencia pruebas preliminares.

Una vez finalizado el período establecido, se tomó una muestra del último jugo, esto por cada lote, y se realizó un análisis para comprobar la presencia de *A. acidoterrestris*. Se utilizó 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* (JFJA, 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. El crecimiento debe presentarse solo en la de 45°C para confirmar la presencia de *A. acidoterrestris*. Además, para el último día de muestreo, se realizó un recuento directo (sin dilución) en agar YSG, de los respectivos controles negativos (jugo sin inocular, pero incubado a 45°C), para comprobar la ausencia de *A. acidoterrestris* en los jugos utilizados previo a la inoculación.

4.5.5 Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental irrestricto aleatorio unifactorial. El factor corresponde al tipo de fruta, con tres tratamientos (cas, maracuyá y mora), realizando tres repeticiones del experimento. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para asegurar que las poblaciones del inóculo inicial no fueran significativamente diferentes entre las tres frutas, estableciendo diferencias significativas con valores de P menores a 0,05.

Por otra parte, los datos de las curvas fueron ajustados a un modelo exponencial (no lineal), y se seleccionó para el análisis el parámetro "a".

$$\log(\text{población}) = a + b \cdot \text{Exp}(c \cdot \text{Tiempo})$$

a: Asíntota

b: Escalar

c: Tasa de crecimiento

A partir de las asíntotas se realizó un ANDEVA para comparar los valores obtenidos para cada tratamiento. Al encontrar diferencias significativas ($P < 0,05$), se aplicó una comparación de medias utilizando la prueba Tukey.

Para todos los análisis se utilizó el programa JMP 9 y se estableció un nivel de confianza del 95%.

4.6 Objetivo específico 2: Evaluación del efecto inhibitorio del jugo con mayor potencial de inhibición de *A. acidoterrestris* en jugo de naranja.

Este apartado se realizó con el jugo de mora considerando los resultados del objetivo 1. Se realizaron mezclas mediante la sustitución parcial de jugo de naranja 100%, de la marca Tropicana y tipo Grovestand (con mucha pulpa), tomando como punto de partida la mayor concentración posible sin que represente la mayoría de la formulación (50% de jugo con potencial inhibitorio). Además, se evaluaron dos concentraciones adicionales correspondientes al 25 y 12,5% de sustitución de jugo de naranja con el jugo de mora.

4.6.1 Preparación del inóculo

Se realizó de manera similar al apartado 4.5.2, con las siguientes variaciones. Se utilizaron colonias luego de 5 días de incubación, de las cuales se tomaron dos colonias y se dispersaron en 10 mL de APE al 0,1%.

4.6.2 Preparación e inoculación de las muestras

Se colocó el volumen necesario de cada jugo para lograr las concentraciones finales establecidas (12.5, 25 y 50% de jugo de mora) y las condiciones de espacio de cabeza e inoculación, mencionadas en el apartado 4.5.3, para una carga final entre 2 y 3 log UFC/mL en las muestras de jugo inoculadas, carga comúnmente encontrada en concentrados de jugos contaminados con esta bacteria (Peña & de Massaguer, 2006; Oteiza *et al.*, 2015). Además, se contempló un control positivo, correspondiente al jugo comercial de naranja 100% marca Tropicana, tipo Grovestand (con mucha pulpa), inoculado con la bacteria de interés, *A. acidoterrestris*.

4.6.3 Recuento de *A. acidoterrestris* durante el estudio

Esta determinación se realizó similar al apartado 4.5.4, con las siguientes variaciones. Se realizó un muestreo el día 0 para determinar la carga inicial, seguido de los días 2, 4, 7, 10, 14, 21 y 28, posterior a la inoculación. Debido a que el deterioro causado por *A. acidoterrestris* se genera a partir de una concentración de células superior a 10^4 - 10^5 UFC/mL (Tianli *et al.*, 2014), se utilizó el valor superior de 10^5 UFC/mL para el cálculo pues corresponde al valor que se reporta con mayor frecuencia en la literatura como necesario para que una población de *A. acidoterrestris* genere compuestos asociados al deterioro en jugos. Esta determinación se realizó por triplicado. Por último, en el caso de las placas donde no se logró detectar colonias, se reportó el límite de cuantificación, que corresponde a 25 colonias en 1 mL del jugo sin diluir, equivalente a 1,4 log UFC/mL.

4.6.4 Diseño y análisis experimental

El diseño experimental corresponde a un irrestricto aleatorio unifactorial. El factor corresponde a la concentración de jugo con potencial inhibitorio, con cuatro tratamientos (sustitución de 50, 25, 12,5 y 0% jugo de mora), y tres repeticiones. Se realizó un ANDEVA para asegurar que las poblaciones del inóculo inicial no fueran significativamente diferentes entre las mezclas y el control, estableciendo diferencias significativas con valores de P menores a 0,05 ($P < 0,05$).

Por otra parte, los datos de las curvas fueron ajustados a un modelo exponencial (no lineal), y se seleccionó para el análisis el parámetro "a".

$$\log(\text{población}) = a + b \cdot \text{Exp}(c \cdot \text{Tiempo})$$

a: Asíntota

b: Escalar

c: Tasa de crecimiento

Se hizo una predicción de los tiempos necesarios para alcanzar una población crítica de 5,0 log (UFC/mL) según el modelo de ajuste, utilizando la función "Solver" de Excel. A partir de las asíntotas, las poblaciones finales y el tiempo de población crítica, se realizó un ANDEVA para comparar los valores de cada tratamiento. Al no encontrarse diferencias significativas, se reporta la potencia de la prueba (valor β) según el método descrito por Pearson y Hartley (1951), empleando el número de tratamientos ($k=4$) y repeticiones ($n=3$), un valor de α de 0.05, una diferencia mínima relevante por detectar (δ) de 2 log UFC/mL para la asíntota y población final, asumiendo como varianza (s^2) el error experimental obtenido (CME). Es importante aclarar que la diferencia mínima relevante se seleccionó de forma arbitraria considerando factores tales como la alta variabilidad de los resultados.

Además, se realizó de manera aislada (sin los tratamientos 12,5 y 25% mora) un ANDEVA entre el jugo control (jugo de naranja 100%) y la mezcla más concentrada (50% mora), comparando las poblaciones finales y el valor de asíntota.

Para todos los análisis se utilizó el programa JMP 9 y se estableció un nivel de confianza del 95%.

5. Resultados y discusión

5.1 Pruebas preliminares

Se ejecutaron dos pruebas preliminares con objetivos y tiempos de ejecución diferentes. La primera se realizó para eliminar las sospechas originales vinculadas a la composición de los jugos (presencia potencial de antimicrobianos no declarados) y la segunda para corroborar que el inóculo lograra la carga de 6 log (UFC/mL), cuya metodología no se conocía con precisión.

Se realizó un montaje de tres muestras de jugos elaborados en planta piloto a partir de fruta fresca, para corroborar los resultados obtenidos por Worsfold (2019), sobre el crecimiento nulo de *A. acidoterrestris* en jugo de cas, maracuyá, mora y piña. No obstante, se utilizó únicamente piña y maracuyá, porque para el jugo de piña sí existen reportes previos de crecimiento (Bevilacqua *et al.*, 2008); y en el caso del jugo de maracuyá, a pesar de presentar un perfil óptimo para el crecimiento (Worsfold, 2019), no existe abundante evidencia sobre su efecto en el crecimiento de *A. acidoterrestris*. En el caso de la mora y el cas, la primera presenta un perfil similar al jugo de uva roja, donde la presencia de polifenoles ha mostrado una inhibición del crecimiento de *A. acidoterrestris* (Smit *et al.*, 2011), por lo que se esperaba un resultado similar. Respecto al cas, no se logró conseguir fruta fresca para elaborar el jugo, dado el periodo de cultivo y cosecha, lo cual era estrictamente necesario para asegurar la composición 100% fruta (sin preservantes, acidulantes u otros aditivos), lo que sí se logró en los jugos evaluados (maracuyá y piña).

Los resultados se reportan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Recuentos de prueba de crecimiento o viabilidad de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en 3 jugos, durante un almacenamiento de 6 días a 45°C.

Jugo	Tiempo de incubación (días)	Recuento (log UFC/mL)
Naranja comercial	0	3,5
	3	5,3 (E*)
	6	5,8
Maracuyá	0	3,3
	3	2,5 (E)
	6	2,2 (E)
Piña	0	3,6
	3	2,6
	6	2,7

* E: estimado

A partir de estos resultados se concluyó lo siguiente:

- El cálculo realizado permitía predecir la carga microbiológica requerida en el jugo previo a la ejecución del experimento y luego de aplicar el tratamiento térmico.

- El jugo 100% de maracuyá presenta un efecto potencialmente inhibitorio contra *A. acidoterrestris*; resultado en concordancia con lo reportado por Worsfold (2019).
- La composición de la matriz afecta el manejo de volúmenes (jugo 100% de piña, contiene mucha fibra, volumen dispensado en puntas de pipeta y pipetas plásticas, es menor al medido). En consecuencia, se decidió aplicar un proceso de prensado de la fruta, utilizando una membrana (manta) para obtener un jugo con menor presencia de fibra.

La segunda prueba se realizó como una manera de corroborar que la metodología planteada permitía obtener un recuento de 6 log UFC/mL en la muestra inicial, así como observar el comportamiento de la población a lo largo de 3 días de muestreo (D3, D5 y D7) en tres jugos (cas, mora y piña).

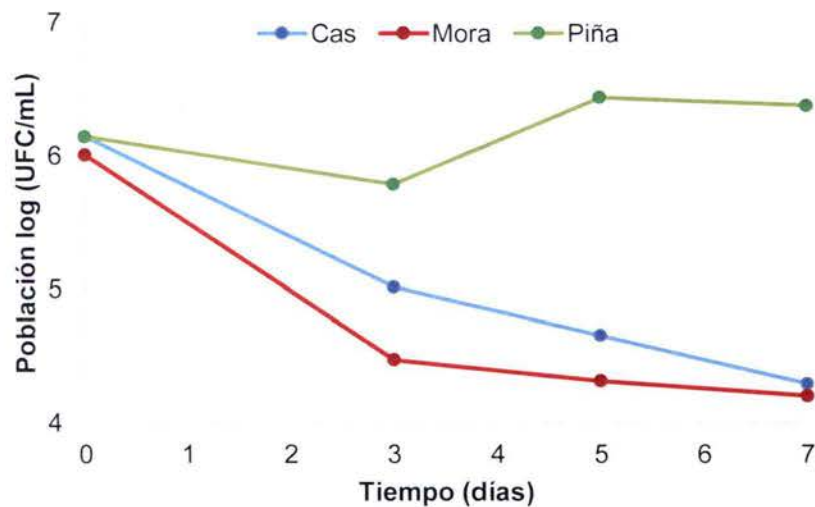


Figura 2. Curva de sobrevivencia o muerte de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025) en jugos tropicales (cas, mora y piña) almacenados a 45°C.

A partir de estos resultados se concluyó la siguiente información:

- Los jugos de cas y mora presentan el comportamiento esperado (disminución en la población bacteriana), lo cual revela su potencial uso en la inhibición de *A. acidoterrestris*.
- El jugo de piña mantuvo una población cercana a los 6 log UFC/mL (recuento inoculado), indicando la sobrevivencia de *A. acidoterrestris*. Resultado acorde con algunos reportes previos en la literatura.

- La población de *A. acidoterrestris*, para las muestras (cas y mora) y condiciones evaluadas (almacenamiento a 45°C), mostró una disminución leve a lo largo del tiempo.

En el caso del jugo de piña, aunque se ha identificado la incapacidad de *A. acidoterrestris* de sobrevivir y crecer en esta matriz (ver Figura 2), observando una disminución en las poblaciones bacterianas (McKnight *et al.*, 2010), otros autores destacan la habilidad de soportar el crecimiento de esta bacteria (Osopale *et al.*, 2019). No obstante, la viabilidad depende del nivel de contaminación inicial y principalmente de las características del jugo (McKnight *et al.*, 2010). Por tanto, a pesar de que los primeros resultados revelan una disminución de casi 1 log en la población bacteriana (ver Cuadro 1), los resultados de esta segunda prueba, los cuales responden a una situación más real a la planteada, revelan que la composición del jugo no es suficiente barrera para inhibir la bacteria de interés. Como consecuencia, se decidió eliminar el jugo de piña para la realización del estudio.

Además, como consecuencia del comportamiento observado, los tiempos de muestreo se definieron más distanciados, pues no se observó una disminución abrupta en las poblaciones de *A. acidoterrestris* durante los primeros 7 días de incubación de la bebida.

Por último, esta segunda prueba preliminar no analizó el jugo de maracuyá debido a problemas en la compra y la elaboración del jugo asociados a la realidad nacional y limitaciones de acceso a la fruta producto de la pandemia por COVID-19. A diferencia de la piña, maracuyá presentó un mejor efecto de inhibición en la primera prueba preliminar (ver Cuadro 1) y por tanto se decidió utilizar para las pruebas definitivas.

5.2 Objetivo específico 1: "Determinar las cinéticas de sobrevivencia o muerte de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en 3 jugos de frutas tropicales de Costa Rica (cas, maracuyá y mora) durante 14 días de almacenamiento".

Como se muestra en el Cuadro 2, el agua y los carbohidratos corresponden a los compuestos mayoritarios de las muestras, lo cual coincide con la gran parte de las frutas, cerca de $88 \pm 0,10$ g es agua, y $10,20 \pm 4,70$ g carbohidratos totales, de cada 100 g de fruta fresca (Hernández *et al.*, 2020). De los tres productos, el jugo de mora presentó la mayor proporción de humedad, asociado a la naturaleza de la fruta y la proporción de agua utilizada durante el procesamiento de molienda (ver apartado 4.2), cuyo valor fue el mayor, con un 20% de agua añadida respecto al material vegetal inicial, seguido de un 15% para el cas, y 0% para el maracuyá. Normalmente la mora presenta valores de humedad entre 92,80-93,30 g de agua y 5,60 g de carbohidratos (Farinango, 2010), ligeramente por debajo del valor obtenido.

Respecto al contenido de proteína, este fue un poco inferior en los néctares, de acuerdo con lo reportado por Hernández *et al.* (2020), $0,92 \pm 0,43$ g/100 g; el jugo de maracuyá sí se apegó a estos valores reportados en la literatura. Por otra parte, las cenizas en las frutas están compuestas por diferentes minerales, los cuales podrían catalizar reacciones de oxidación y disminuir la efectividad de algunos compuestos inhibitorios, aunque los niveles se encontraron dentro de los niveles comunes (Hernández *et al.*, 2020). En orden descendente, los principales minerales presentes en las frutas son: potasio, sodio, fósforo, calcio, magnesio, hierro, zinc y cobre (Gil, 2010). Por último, la concentración de grasa se encontraba por debajo del límite cuantificable, ya que la mayoría de las frutas no son una fuente importante de este macronutriente, mostrando valores cercanos a $0,29 \pm 0,26$ g/100 g (Hernández *et al.*, 2020), con una incertidumbre de magnitud similar al valor reportado, evidenciando alta subjetividad en la determinación. Estas últimas características hacen de los jugos de frutas una de las matrices alimentarias más apropiadas para incorporar antimicrobianos naturales, debido a que el contenido de proteínas y lípidos pueden afectar el efecto antimicrobiano (Molva & Baysal, 2015a). De menor a mayor efecto negativo se tiene el siguiente orden: mora > cas > maracuyá.

En el caso del cas y el maracuyá, de los carbohidratos analizados, la fructosa presentó la mayor concentración mientras en el caso de la mora, fue la glucosa. En contraste, la sacarosa mostró los niveles más bajos para las tres frutas, tanto así que en la mora no fue posible su detección. Este disacárido experimenta reacciones que provocan la descomposición en sus monómeros (Becker *et al.*, 2016), glucosa y fructosa, por lo que, en la mayoría de las frutas, estos forman la mayor proporción de azúcares solubles (Nookaraju *et al.*, 2010). La cantidad cambia con la madurez de la fruta, y muestran niveles máximos en la maduración, con un aumento progresivo de estas hexosas y una disminución de sacarosa (Jia *et al.*, 2013), atribuido a una menor actividad enzimática de la sacarosa sintasa, la glucoquinasa y la fructoquinasa, y una mayor actividad de la invertasa ácida, responsable del metabolismo de sacarosa en frutas (Nookaraju *et al.*, 2010). En términos de actividad microbiológica, un mayor contenido de carbohidratos en la fruta puede promover el crecimiento bacteriano y reducir la actividad antimicrobiana (Becker *et al.*, 2016), en el caso de *A. acidoterrestris*, de los tres carbohidratos cuantificados, solo es capaz de fermentar glucosa y fructosa (Silva & Gibbs, 2001), por lo tanto, de mayor a menor capacidad de crecimiento del microorganismo en las matrices, se presenta el siguiente orden: maracuyá > mora > cas.

Cuadro 2. Caracterización fisicoquímica de los tres jugos tropicales elaborados y utilizados en el estudio de sobrevivencia de *A. acidoterrestis* (promedio \pm desviación estándar, n=3).

Análisis proximal (100 g)	Cas	Maracuyá	Mora
Humedad (g)	92 \pm 13	85 \pm 12	94 \pm 13
Carbohidratos (por diferencia) (g)	7 \pm 13	13 \pm 12	5 \pm 13
Proteína (N: 6.25) (g)	0,305 \pm 0,018	0,854 \pm 0,050	0,216 \pm 0,050
Grasa cruda (g)	<0,10 NC	<0,10 NC	<0,10 NC
Ceniza (g)	0,634 \pm 0,047	0,780 \pm 0,057	0,292 \pm 0,021
Fructosa (g)	1,46 \pm 0,20	3,29 \pm 0,46	1,43 \pm 0,20
Glucosa (g)	0,80 \pm 0,13	2,92 \pm 0,46	1,74 \pm 0,27
Sacarosa (g)	0,348 \pm 0,041	0,631 \pm 0,074	<0,17 ND
Ácido cítrico (g)	2,23 \pm 0,22	2,52 \pm 0,25	1,70 \pm 0,17
Ácido málico (g)	0,0512 \pm 0,0051	1,38 \pm 0,14	0,96 \pm 0,10
Ácido succínico (g)	1,92 \pm 0,19	0,991 \pm 0,099	0,102 \pm 0,010
Ácido ascórbico (mg)	40,2 \pm 3,6	2,66 \pm 0,24	<0,47 ND
Vitamina C (mg)	42,0 \pm 3,8	4,36 \pm 0,39	<0,934 ND
Sólidos solubles	8,2 \pm 0,1	15,1 \pm 0,1	7,2 \pm 0,1
pH	2,42 \pm 0,01	2,89 \pm 0,01	2,50 \pm 0,01
Antocianinas totales (AT) (equivalentes de cianidin-3-glucósido) (mg)	<13,81 NC	<13,75 NC	37,7 \pm 2,6
Polifenoles totales (PT) (equivalentes de ácido gálico) (mg)	261 \pm 19	24,6 \pm 1,7	<15,95 NC

*ND: No detectable

*NC: No cuantificable

El ácido de mayor abundancia correspondió al ácido ascórbico en sus dos formas, expresado como vitamina C, ya que tanto el ácido L-ascórbico (forma reducida) como el ácido L-dehidroascórbico (forma oxidada) tienen actividad biológica (Rojas & Narváez, 2009). El cas y el maracuyá presentaron este comportamiento, aunque para la mora no fue posible su detección a pesar de que esta fruta se reconoce por su aporte de vitamina C, con valores entre 8 y 15 mg (Farinango, 2010), lo que sugiere pérdidas a lo largo de su manejo y procesamiento. La degradación de vitamina C en los jugos de fruta depende del procesamiento, condiciones de almacenamiento, tipo de envase, concentración de oxígeno, incidencia de la luz, catalizadores metálicos, enzimas y pH (Acosta & Fontana, 2021). Estudios realizados en jugo de mora por Agudelo *et al.* (2020), revelaron que cerca de un 68% de la vitamina C inicial se pierde luego de calentar por 15 s a 80°C, tratamiento inferior al aplicado (\geq 81°C por 3 min), por lo que las reducciones podrían ser mayores en este estudio, con valores finales menores a los límites de detección.

En este mismo orden de ideas, la adición de 100 mg/L de ácido ascórbico a jugo de manzana ha demostrado tener un efecto estimulante en el crecimiento de *A. acidoterrestis*,

mientras que a 150 mg/L o concentraciones mayores se obtiene un efecto inhibitor al secuestrar el oxígeno disuelto, necesario debido al metabolismo aerobio de *A. acidoterrestris* (Pornpukdeewattana *et al.*, 2019). Al comparar con el valor obtenido para el cas (\approx 420 mg/L), este es mayor a los 150-200 mg/L (Chmal & Papiewska, 2011), por lo que podría ser un factor limitante en el crecimiento de *A. acidoterrestris*, que resulta concordante con los resultados de Worsfold (2019). En el caso del maracuyá, los niveles (43,6 mg/L) son bajos como para causar inhibición, lo que podría estar causando el efecto contrario; por lo tanto, de mayor a menor capacidad de crecimiento se presenta el siguiente orden: maracuyá > mora > cas, colocando a la mora entre ambas frutas debido a la ausencia de vitamina C, según la metodología aplicada.

Por lo general, para que la mayoría de los ácidos orgánicos presentes en frutas logren ejercer un efecto inhibitorio sobre las bacterias, se deben tener concentraciones superiores a los 1000 μ g/mL, valor que los categoriza como compuestos sin actividad antimicrobiana frente a otros compuestos de mayor actividad (de Pascoli *et al.*, 2018). A pesar de esto, los estudios específicos para *A. acidoterrestris* describen que el ácido cítrico, láctico, málico y tartárico, necesitan concentraciones entre los 4,58-7,07 g/L para lograr un efecto sobre su crecimiento (Bevilacqua *et al.*, 2008; Tianli *et al.*, 2014). De los ácidos determinados, solo el málico se encuentra en concentraciones inferiores al mínimo. En general, el perfil de ácidos del cas concuerda con los valores reportados por Rojas (2017). Sin embargo, el ácido cítrico y málico no suelen mostrar una inhibición significativa de *A. acidoterrestris*, como si lo hacen otros ácidos orgánicos como el acético (Tokuda, 2007). De manera específica, *A. acidoterrestris* es una bacteria que se adapta y crece en ambientes de alta acidez, por lo que el impacto podría ser bajo, aunque no se descarta su sinergia con otros compuestos, debido a la disminución del pH (Bonetti *et al.*, 2020). Al establecer una clasificación de mayor a menor crecimiento, se presenta el siguiente orden: mora > maracuyá > cas, debido a los niveles inferiores de ácidos orgánicos en la mora.

Por otra parte, en jugos o pulpas, los sólidos solubles están conformados por los azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua (RTCR, 2005). La mayoría de estos elementos al ser solubles interactúan con el agua, limitando su uso para las reacciones metabólicas de los microorganismos, en consecuencia, el contenido de sólidos solubles (\geq 20 °Brix) inhibe la germinación de las endosporas (Steyn *et al.*, 2011), aunque se tienen evidencias que, en jugos concentrados de 18 °Brix, *A. acidoterrestris* es incapaz de desarrollarse (Silva *et al.*, 2021). Según los valores de concentración de sólidos solubles en los que se presenta crecimiento, 5,4-16,2 °Brix (Osopale *et al.*, 2019), las tres matrices permiten el desarrollo de *A. acidoterrestris*. Con respecto al pH, las cepas de *A. acidoterrestris* muestran la habilidad de germinar y crecer en un rango de pH entre 2,0-6,0 (Sokolowska *et*

al., 2020), aunque otros autores reportan valores más extremos, entre 1,5 y 6,5 (Osopale *et al.*, 2019). No obstante, el rango óptimo se encuentra entre 3,5 y 4,0 (Zhao *et al.*, 2021), por lo que el orden de crecimiento de más a menos favorable es: maracuyá > mora > cas (ver Cuadro 2).

El mayor contenido de polifenoles por su parte se presentó en el cas, el cual contiene principalmente flavonoides y ácidos fenólicos (Pérez & Rojas, 2018). Los valores resultaron inferiores a 485,8 mg/100 g EAG (Rojas, 2017), y la diferencia podría asociarse con la preparación (ver apartado 4.2), ya que al realizar el prensado la cáscara es retenida en la malla y con ello gran parte de estos compuestos, pues se reporta un contenido de polifenoles en la cáscara 29,5% mayor que en la pulpa (Pérez & Rojas, 2018). En orden de contenido, el maracuyá presentó la segunda concentración más alta. Esta fruta presenta diferentes fitoquímicos, dentro de los cuales se destacan los compuestos fenólicos (Olszewska *et al.*, 2020), como flavonoides (Mara & Maróstica, 2018). En contraste, la concentración en la mora resultó ser muy baja como para ser cuantificable. De acuerdo con Santos *et al.* (2017), el ácido gálico es un compuesto fenólico con baja concentración en la mora, entre 0,53-0,84 mg por 100 g de peso fresco, por debajo del límite cuantificable (15,95 mg/100 g) de la metodología empleada. Además, según los resultados obtenidos por Parseh & Shahablavasani (2019), en la granada el contenido de compuestos fenólicos totales es mayor en la cáscara, mientras el contenido de antocianinas es mayor en el jugo, lo que podría explicar la no cuantificación de polifenoles, pero sí de antocianinas, debido al procesamiento aplicado (ver apartado 4.2). Asimismo, estudios realizados por Soto *et al.* (2017), demuestran que luego de la pasteurización del jugo de mora, muchos polifenoles son afectados, aun usando el menor tiempo a la mayor temperatura, 92°C por 10 s (Azofeifa *et al.*, 2015).

A diferencia de lo anterior, las antocianinas mostraron el comportamiento contrario, pues solo se logró cuantificar en el néctar de mora, con 37,7 mg equivalentes de cianidin-3-glucósido (ECG), compuesto de mayor abundancia en bayas (Khoo *et al.*, 2017). En comparación con los resultados de Worsfold (2019), el contenido fue ligeramente menor. La disminución en los niveles de antocianinas podría estar definida por el procesamiento, así como la materia prima, aunque no se presentan diferencias importantes. La estabilidad de estos compuestos depende del tipo y grado de procesamiento, la estructura, el pH, la temperatura, las condiciones de luminosidad, la presencia de iones metálicos, enzimas y oxígeno (Khoo *et al.*, 2017; Alappat & Alappat, 2020; Eker *et al.*, 2020). Además, la presencia y la cantidad de polifenoles están relacionados con la fisiología de la planta, la variedad, las condiciones de crecimiento (clima, composición del suelo), la cosecha, el grado de madurez, el transporte y almacenamiento (Becker *et al.*, 2016; Soquetta *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2020).

En términos de efecto antimicrobiano, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos fenólicos se encuentra entre los 50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es mucho mayor que la concentración encontrada en algunos productos como jugos de uva ($\leq 3 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Takahashi, 2007). Realizando una estimación, el contenido de antocianinas en el néctar de mora es cercano a los 377 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor superior al mínimo. En el caso del cas, el valor ronda los 2610 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 246 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el maracuyá, con respecto al contenido de polifenoles totales. En términos generales, el maracuyá cuenta con el menor potencial de inhibición, pues presenta la menor concentración y el pH más alto, según Takahashi (2007) los polifenoles tienen un efecto antimicrobiano más fuerte a menores pH, el cual se podría ver reducido o eliminado a pH altos. En el caso del cas y la mora, estos no son comparables debido a la diferencia en los compuestos predominantes. Sin embargo, entre los ácidos fenólicos y flavonoides, las antocianinas destacan en términos de actividad antimicrobiana, pues tienen el potencial para dañar las células bacterianas al destruir la pared celular, la membrana y matriz intercelular (Khoo *et al.*, 2017; Alappat & Alappat, 2020), provocando la liberación de constituyentes celulares como ácidos nucleicos y proteínas, afectando el metabolismo microbiano al dificultar la transferencia de información y energía, y controlando la capacidad de autoprotección al suprimir la síntesis de compuestos (Mattos *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018; Alappat & Alappat, 2020), efecto visible en bacterias Gram positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, a partir de las dos horas posterior a la exposición (Sun *et al.*, 2018).

La Figura 3 muestra el comportamiento de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en las tres frutas seleccionadas. Según el ANDEVA realizado a los valores de la carga inicial, se evidencia que las poblaciones en el día 0 no son significativamente diferentes ($P > 0,05$); por lo tanto, los tratamientos son comparables entre sí, ya que, según McKnight *et al.* (2010), la habilidad de este microorganismo para sobrevivir y crecer en jugos depende del nivel de contaminación inicial y principalmente de las características del jugo, como inhibidores naturales. En relación con el comportamiento de la bacteria a través del tiempo, en la Figura 3 se observa que los tres tratamientos mostraron una reducción en la población inicial, demostrando el potencial uso para el control de *A. acidoterrestris*. El efecto observado está asociado a la composición de cada fruta, y algunos de los aspectos más importantes se mencionaron anteriormente (contenido de ácido ascórbico, polifenoles totales y antocianinas). De acuerdo con Mattos *et al.*, (2017), los polifenoles son capaces de inhibir las células vegetativas, capaces de reducir el conteo de células y, por lo tanto, prevenir el deterioro causado por *A. acidoterrestris*.

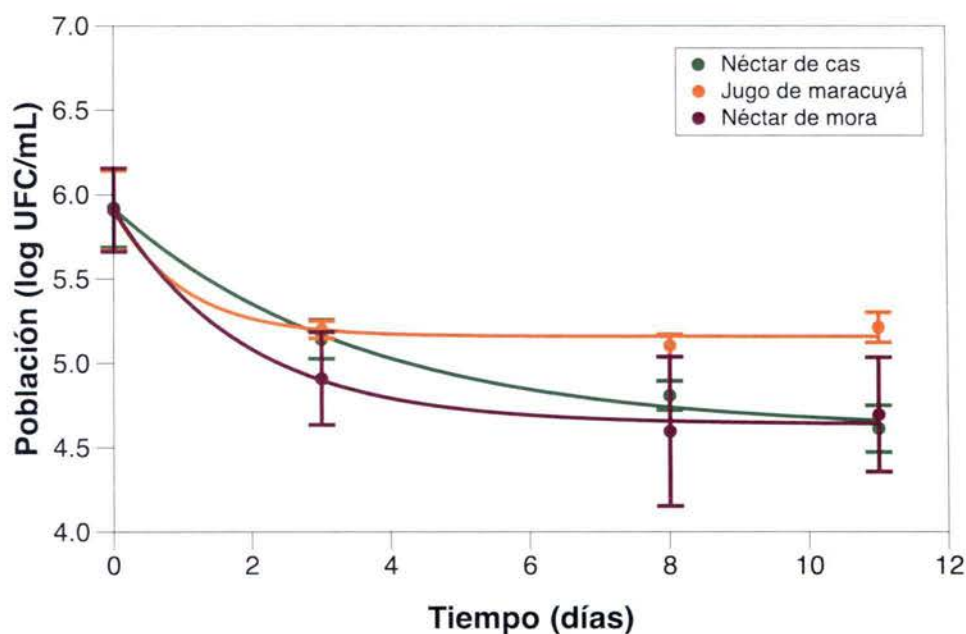


Figura 3. Cambios en la población de *A. acidoterrestri* (ATCC 49025) en jugo de maracuyá (15,1 °Brix, pH 2,89), néctar de mora (7,2 °Brix, pH 2,50) y cas (8,2 °Brix, pH 2,42) durante la incubación a 45°C.

Al comparar los valores del parámetro a (asíntota), obtenidos a partir de las curvas ajustadas, para cada fruta, el ANDEVA revela que existen diferencias significativas ($P = 0,0419$) entre las frutas utilizadas. Las frutas en las que la población disminuyó en mayor medida resultaron ser la mora y el cas, con los menores valores de asíntota, carga a la cual tiende a estabilizarse la población bacteriana. Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, se evidenció que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) para los siguientes pares: maracuyá-mora y mora-cas, mientras que para el cas y el maracuyá sí. Algunos estudios realizados bajo condiciones de incubación similares (45°C por 28 días), lograron reducciones entre 1,45-3,15 log (UFC/mL) en frambuesa (7,0 °Brix, pH 3,17), y 1,04-4,34 log (UFC/mL) en fresa (7,0 °Brix, pH 3,64), siendo los descensos dependientes de la cepa (Sokolowska *et al.*, 2020). Al comparar, las reducciones obtenidas fueron bajas, con menos de un 1 log (UFC/mL) para el maracuyá, así como 1,3 y 1,2 log (UFC/mL), para el cas y la mora, respectivamente, resultados similares a las cepas más resistentes del estudio realizado por Sokolowska *et al.*, (2020).

Partiendo de que tanto la mora como el cas son frutas capaces de afectar la viabilidad de *A. acidoterrestri* en su forma de bebida, se decidió continuar las pruebas con la mora debido a la facilidad para conseguir la materia prima. Además, en los últimos años registrados, 2017 y 2018, la producción de mora fresca se ha mostrado estable, con una producción de 3,375 Tm (SEPSA, 2019). Por su parte, la inexistencia del cas en estos

registros permite inferir que la producción es mucho menor, según PIMA (s.f.) durante el 2017 y 2018 se reporta la comercialización de 202,6 y 215,2 Tm de cas. De igual modo, al contemplar su elaboración y composición, el néctar de mora mostró un comportamiento similar a pesar de presentar un mayor nivel de dilución, con un 5% más de agua respecto al cas (ver apartado 4.2, Figura 1).

5.3 Objetivo específico 2: “Evaluar el efecto inhibitorio de tres concentraciones diferentes del jugo con mayor potencial de inhibición, sobre el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de naranja”.

En la Figura 4 se resumen los principales resultados obtenidos. Los cuatro tratamientos presentaron una población inicial muy similar, según el ANDEVA no se presentaron diferencias significativas ($P = 0,9004$), que como se mencionó anteriormente, es necesario para poder realizar una comparación entre los tratamientos. El valor de la población inicial se mantuvo cercano a los 3 log (UFC/mL), valor que normalmente presentan los jugos contaminados. Según Peña & de Massguer (2006) una contaminación inicial de 10^2 UFC/mL, es una carga comúnmente encontrada en concentrados de jugo de naranja, así como Hu (2020), quien cataloga niveles de 10^3 - 10^4 UFC o esporas por mL, como inóculos relativamente bajos de *Alicyclobacillus*, capaces de simular los niveles de contaminación natural en jugos.

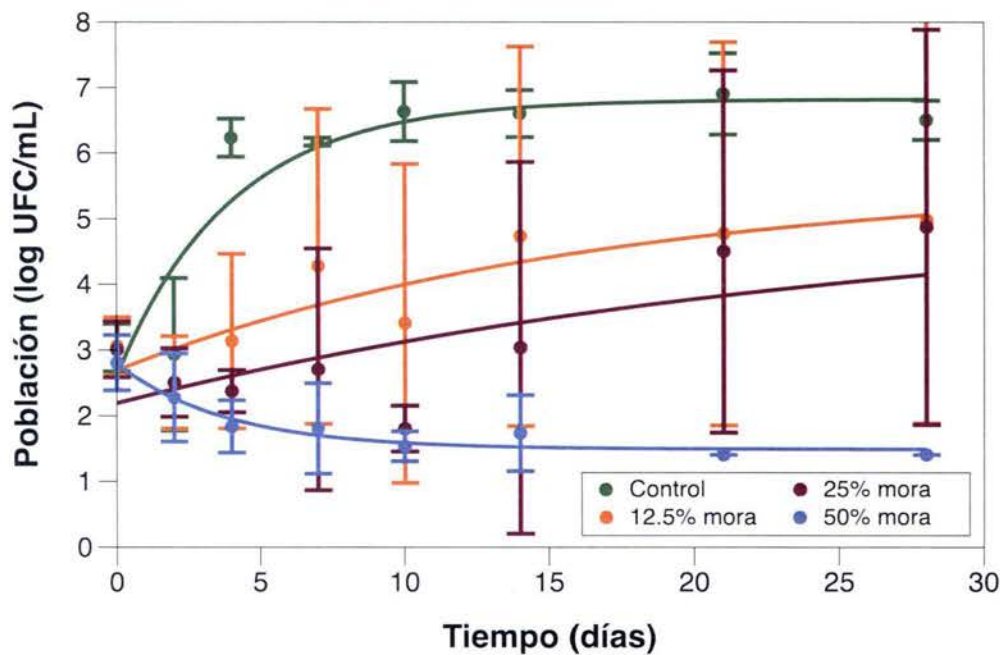


Figura 4. Cinéticas de sobrevivencia de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en mezclas de jugo de naranja-mora durante 28 días de almacenamiento a 45°C.

En la Figura 4 se observan dos comportamientos distintos, tanto disminución como crecimiento. A niveles de 50% de sustitución de jugo de naranja con jugo de mora se observó un descenso en las poblaciones finales, mientras que en niveles menores de sustitución se presentó crecimiento en el comportamiento promedio, así como en el control (solo jugo de naranja). Específicamente, el control mostró una variabilidad baja, por lo tanto, se puede asegurar que la composición general del jugo de naranja no representa un efecto adverso para el desarrollo de *A. acidoterrestris*, sino lo contrario, en concordancia con los resultados de Gamboa (2020), esto a pesar de que el jugo de naranja presenta de manera natural compuestos fenólicos y vitamina C (Chanson *et al.*, 2016).

Al comparar el comportamiento de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en las mezclas de jugos, según el parámetro a del modelo de ajuste, los valores de las asíntotas no presentan diferencias significativas ($P = 0,2935$) entre los tratamientos aplicados. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos, no se puede asegurar que sustituciones parciales con jugo de mora, inferiores al 50%, logren inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos de naranja contaminados y expuestos a la temperatura óptima de crecimiento (45°C). La potencia de la prueba (valor β) calculada corresponde a 0,30. De igual forma, al comparar las poblaciones finales no se obtuvieron diferencias significativas ($P = 0,0963$). En este caso, la potencia de la prueba (valor β) corresponde a 0,45. En general, las potencias calculadas resultaron inferiores a los 0,8 que se establece como un valor de referencia para maximizar las posibilidades de encontrar el efecto en términos factibles de muestreo (Quezada, 2007); por lo tanto, lo recomendable en consecuencia de los resultados obtenidos es realizar más repeticiones para aumentar la potencia y con ello la posibilidad de encontrar la diferencia si es que existe.

La imposibilidad de detectar diferencias entre los tratamientos, según el análisis de los parámetros a (asíntotas) y las poblaciones finales, puede deberse principalmente a la variabilidad de los recuentos obtenidos en los tratamientos de 12,5 y 25% jugo de mora (ver Figura 4, desviación estándar), pues en algunas repeticiones se obtuvo crecimiento, mientras que en otras no, lo que impide establecer el comportamiento más probable o verdadero. Si se compara con los resultados de Rashid *et al.* (2020), concentraciones más altas son necesarias para destruir la célula bacteriana que para retardar el crecimiento bacteriano; por lo tanto, los niveles de sustitución inferior podrían estar experimentando un retraso en alguna de sus fases de crecimiento, similar a los resultados de Molva & Baysal (2015b), donde las menores concentraciones experimentaron ligeras reducciones en las primeras etapas de muestreo, con un seguido aumento de las poblaciones en las que no se obtuvo inhibición de *A. acidoterrestris*.

Asimismo, con respecto a los valores alcanzados para el parámetro a (asíntota) y la población final, este se acerca con mayor precisión a la concentración de células viables en

el jugo, pues corresponde al máximo de la población que puede soportar la matriz a lo largo del tiempo, ya sea por la composición del jugo, limitación de nutrientes por unidad de volumen, o por condiciones del microorganismo, así como otros factores no establecidos. Los valores resultaron un poco inferiores a lo encontrados en la literatura, con valores cercanos a los 7 log (UFC/mL) en jugos donde se conoce su crecimiento, como manzana (Molva & Baysal, 2015b), así como $7,2 \pm 0,2$ (Worsfold, 2019) y $7,1 \pm 0,2$ (Gamboa, 2020) en naranja, con diferencias menores a 1 log (UFC/mL).

Continuando con el comportamiento de *Alicyclobacillus* en las mezclas, a pesar de la variabilidad observada en los puntos medios de concentración (12,5 y 25%), la mezcla de jugos naranja-mora (50:50) presentó recuentos constantes en las tres repeticiones, con una asíntota de $1,3 \pm 0,1$ log (UFC/mL), por debajo del límite de cuantificación (1,4 log (UFC/mL), el cual se estableció con el fin de proporcionar una estimación más conservadora en las reducciones obtenidas (Usaga *et al.*, 2021), al establecer que podría existir una población baja, pero no detectable. Por lo tanto, este valor corresponde a un valor estimado, pues tanto placas donde se lograron visualizar colonias (<25 UFC/mL) como en aquellas en las que no (tratamiento 50%), se reportaron con 25 UFC/mL. En este sentido, la asíntota real del comportamiento de *A. acidoterrestis* en jugo de naranja-mora se desconoce, pero podría ser menor a 1,4 log UFC/mL.

En la Figura 5 se puede observar como la variabilidad de los resultados disminuye en los extremos de la curva, lo cual refleja que el comportamiento es más constante para estos tratamientos, siendo de crecimiento para el control (100% naranja) y muerte para la mezcla de 50% (ver Figura 4). Al realizar una comparación entre estos dos (control y 50% de sustitución de jugo), el ANDEVA indica que las asíntotas y las poblaciones finales, presentan diferencias significativas ($P = 0,0001$). En términos prácticos, la sustitución de jugo de naranja en un 50% con jugo de mora, puede ser suficiente para mantener las poblaciones por debajo del límite de deterioro (10^4 - 10^5 UFC/mL), aún en condiciones óptimas de crecimiento (45°C), durante un periodo de 28 días. El comportamiento tan variable en los valores de concentración medios (12,5 y 25%), se podría asociar con un acercamiento a la CMI por debajo del 50%, donde pequeñas variaciones como el volumen de los jugos, volumen del inóculo, estado fisiológico de la bacteria ("fuerza del inóculo"), agitación y demás factores, impacten significativamente y determinen si se da o no el crecimiento de *A. acidoterrestis*. Según Huang *et al.* (2015), la presencia de *Alicyclobacillus* en productos ácidos no necesariamente causa deterioro, aún en una concentración de células alta de hasta 10^3 UFC/mL, y el resultado final depende de la concentración del microorganismo, temperatura de exposición, tratamiento de choque térmico, medio de crecimiento y disponibilidad de oxígeno.

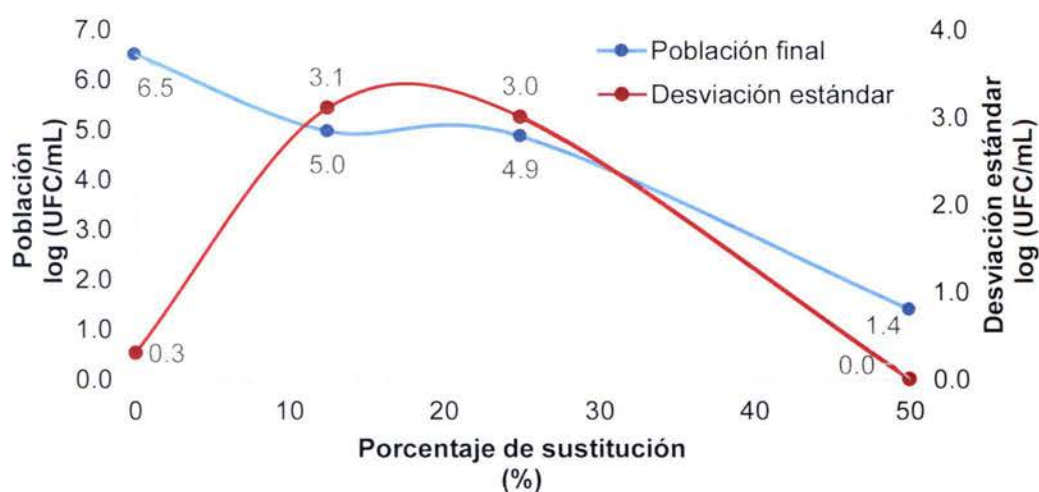


Figura 5. Población final y variación de la desviación estándar según los niveles de sustitución de jugo de naranja con jugo de mora.

Existe evidencia que las mezclas de jugo como manzana-naranja-piña y manzana-frambuesa-uva, no permiten el crecimiento de *A. acidoterrestris* (Tokuda, 2007). Más recientemente, se ha logrado observar el control en jugo de manzana-granada (pH 3,60, 12,55 °Brix), con un mínimo de 40% granada, logrando transformar una carga inicial de 5,53 en 2,36 log (UFC/mL), luego de 14 días de incubación a 37°C. No obstante, al comparar con las condiciones utilizadas, el jugo de granada contaba con niveles superiores de los compuestos inhibitorios de las frutas seleccionadas (ver Cuadro 2), con concentraciones de $157,78 \pm 5,23$ mg/100 mL de EAG, un poco más de la mitad (≈ 130 mg/100 g EAG) presente en el cas, fruta que demostró tener la mayor concentración de polifenoles totales. Empero, en la mora no se logró cuantificar ($<15,95$ mg/100 g), lo que dificulta su comparación y asociación con los resultados. A pesar de ello, los valores finales podrían ser similares a la mitad del contenido de antocianinas, partiendo de resultados obtenidos por Molva & Baysal (2015b), los cuales mostraron una fuerte correlación entre la concentración del jugo sustituto y el contenido de compuestos inhibitorios ($R^2 > 0,956$). Por lo tanto, el valor podría ser mayor a 190 $\mu\text{g/mL}$ ECG, superior a la CMI de los compuestos fenólicos (50-1000 $\mu\text{g/mL}$) según Takahashi (2007).

Los estudios más recientes se han centrado en la evaluación de extractos, demostrando que es posible obtener una CMI de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para un extracto de ácido carnósico al 20%, proveniente de romero (Piskernik *et al.*, 2016). Otros compuestos recientemente evaluados son el ácido cinámico (CMI, 0,375 mg/mL) y el ácido clorogénico (CMI, 2,0 mg/mL) (Cai *et al.*, 2018). Por tanto, la concentración de antocianinas podría ser

eventualmente superior a la CMI del romero y cercana a la del ácido cinámico; suponiendo que los compuestos presentan estructuras y mecanismos antimicrobianos similares, la sustitución al 50% si tiene la capacidad de provocar inhibición y control de la población de *A. acidoterrestris* en jugos donde se sabe que es capaz de crecer, como el jugo de naranja.

De forma complementaria, se determinó el comportamiento en términos predictivos del tiempo que tomaría en alcanzarse una población crítica de deterioro (entre 10^4 y 10^5 log (UFC/mL)). Es importante aclarar que para este cálculo solo se utilizó dos de las tres repeticiones, pues a nivel individual la segunda repetición no mostró crecimiento mientras que las dos restantes sí. Como se observa en el Cuadro 3, conforme aumenta la concentración de mora también aumenta el tiempo necesario para alcanzar un potencial deterioro.

Cuadro 3. Tiempo necesario para alcanzar una población crítica de 5 log (UFC/mL) de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025) en mezclas de jugo de naranja-mora, incubadas a 45°C.

Tratamiento (% mora)	Tiempo (días)
0 ⁽³⁾	2,69 ± 0,02
12,5 ⁽²⁾	9 ± 4
25 ⁽²⁾	21 ± 9
Valor de F (P)	0,1169

*Número de repeticiones: (3) tres y (2) dos.

En general, los datos resultaron similares a los obtenidos por Molva & Baysal (2015b), donde a mayor concentración de jugo inhibitorio, mayor fue el tiempo necesario para incrementar las poblaciones de *A. acidoterrestris*. Por lo tanto, el deterioro podría retrasarse como máximo en 13 y 30 días con 12,5 y 25% de mora, respectivamente, en comparación a un deterioro en 2,69 días, en el jugo control (solo jugo de naranja). De igual forma, al analizar los tiempos para que las mezclas experimenten un potencial deterioro, tampoco se presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

A pesar de no encontrar diferencias significativas no se calculó la potencia de la prueba debido a dos elementos. El primero se encuentra asociado a que en una de las tres repeticiones para dos de los tratamientos no fue posible realizar el cálculo, pues el microorganismo no creció. Y segundo, no existe información disponible en la literatura sobre un valor de tiempo a establecer como diferencia mínima relevante por detectar (δ). Por lo tanto, debido a que el método escogido no puede estimar la potencia bajo las singularidades del caso, se decide no reportar dicho valor; sin embargo, los resultados que se muestran en este documento podrán ser utilizados en futuras investigaciones para calcular un tamaño de muestra en función de un beta adecuado (β cercano a 0,80), y si existe una diferencia poder detectarla.

Por otra parte, el tiempo para que el jugo control alcanzara la población crítica resultó ser ligeramente superior a los 2,2 ($\pm 0,2$) y 1,43 ($\pm 0,08$) días reportado por Worsfold (2019) y Gamboa (2020), respectivamente, lo cual podría estar asociado a las fechas de muestreo, el analista (error aleatorio), entre otras variables.

Por último, es importante aclarar que dentro del análisis de tiempo no se contempló los valores de 50%, pues las poblaciones disminuyeron de manera consistente en todas las repeticiones, y en términos de cálculos, el tiempo para alcanzar la población objetivo (10^5 log (UFC/mL)) tiende al infinito, que bajo la realidad del análisis se limita a los 28 días del estudio, pues se desconoce el comportamiento luego de este período. Por lo tanto, según el cálculo de tiempo solo el 50% de sustitución de jugo no presenta deterioro, en lo que concierne con *A. acidoterrestris* (ATC 49025), con resultados similares a tratamientos con aditivos como benzoato de sodio (0,1%), sorbato de potasio (0,1%) y nisina (Gamboa, 2020), así como otros agentes en los que se ha comprobado su acción contra *A. acidoterrestris*.

En síntesis, partiendo de los hallazgos encontrados y el comportamiento de los datos, la información generada puede resultar de utilidad para el planteamiento de nuevas investigaciones, no solo para jugo de naranja sino en general para la conservación de jugos naturales, en la búsqueda de satisfacer las necesidades de consumidores más informados y preocupados por su bienestar.

6. Conclusiones

- El tipo de jugo o néctar tiene un impacto en las cinéticas de sobrevivencia o muerte de *A. acidoterrestris* (ATCC 49025), al representar un ambiente con condiciones alejadas de las óptimas.
- Existe congruencia entre los valores reportados en la literatura como condiciones adversas para el desarrollo de *A. acidoterrestris* y el grado de inhibición observado, mostrando la curva de muerte celular más acelerada, mayor disminución en el mismo tiempo, en los néctares de cas y mora, y en menor grado en el caso del jugo de maracuyá.
- El grado de sustitución de jugo de naranja con jugo de mora tiene un impacto sobre la capacidad de *A. acidoterrestris* de crecer y producir deterioro, logrando a mayor grado de sustitución un mayor retraso en el tiempo necesario para alcanzar poblaciones de deterioro de 10^5 UFC/mL.
- Sustituciones de 50% jugo de mora en jugo de naranja son suficientes para impedir el desarrollo de cargas poblacionales naturalmente encontradas en productos contaminados con *A. acidoterrestris*, y por ende, existe un efecto de inhibición de la

mora aún en dilución, evidenciando su capacidad como tratamiento alternativo en el control del deterioro de *A. acidoterrestris*, aún en condiciones óptimas de desarrollo (45°C y 40% espacio de cabeza).

7. Recomendaciones

- Repetir el estudio y realizar más repeticiones para aumentar la potencia del análisis, y así corroborar si existen diferencias significativas entre mezclas de jugo naranja-mora en el crecimiento de muestras contaminadas con *A. acidoterrestris*.
- Evaluar el comportamiento de *A. acidoterrestris* bajo condiciones reales de almacenamiento, como temperatura ambiente, para determinar si el efecto es el mismo y la duración de este.
- Realizar más estudios con frutas que se sabe son deterioradas por *A. acidoterrestris* y frutas de producción nacional que a nivel de composición presenten potencial para la inhibición de *A. acidoterrestris*, como el cas, debido a los beneficios que pueden brindar los agentes antimicrobianos naturales frente a los tratamientos físicos convencionales (menor costo relativo, mayor facilidad de uso, capacidad de suprimir el crecimiento de las poblaciones sobrevivientes).
- Realizar una mejor caracterización de los jugos, incluyendo por ejemplo contenido de fibra, ya que algunos carbohidratos complejos pueden reducir la actividad antimicrobiana (Molva & Baysal, 2015a).
- Debido a que las mayores concentraciones de antocianinas se encuentran en la piel o cáscara de las bayas (Bendokas *et al.*, 2018) y a menor tamaño, más antocianinas por unidad de volumen (Becker *et al.*, 2016), es importante contemplar para futuras pruebas la posibilidad de incorporar el producto sin prensar, aplicar tratamientos como ultrasonido o microondas que modifiquen la integridad de las células para liberar más compuestos inhibitorios con efectos mínimos sobre los compuestos de interés (Soto *et al.*, 2017; Pérez *et al.* 2018; Eker *et al.*, 2020), implementar alguna tecnología simple de concentración, establecer posibles mejores variedades, para lograr maximizar el contenido de compuestos inhibitorios y establecer un menor porcentaje de sustitución que logre mantener en mayor medida las características del jugo de naranja.
- Determinar la CMI para lograr optimizar el porcentaje de sustitución que garantice mantener bajo control el crecimiento de *A. acidoterrestris* en jugos mixtos de naranja-mora.
- Una vez determinada la CMI, realizar un análisis sensorial de la mezcla de jugos identificada con potencial de inhibición contra *A. acidoterrestris*, para determinar el agrado y si es viable su comercialización como producto de consumo directo.

- Realizar una caracterización (pH, °Brix, vitamina C, polifenoles totales y antocianinas) del jugo mixto capaz de inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* y así poder asociar con certeza los factores que prevalecen luego de la dilución y que siguen siendo responsables de la actividad antimicrobiana.
- Contemplar los costos asociados con el uso de extractos versus el uso de jugo natural (como se utilizó en el estudio), como alternativa para el uso de compuestos fenólicos como agentes antimicrobianos (Olszewska *et al.*, 2020), en menor cantidad y con menos modificaciones en el "jugo madre".
- Realizar un estudio de vida útil a temperatura ambiente para corroborar la estabilidad de los jugos mixtos durante el almacenamiento a temperatura ambiente, pues a la temperatura de incubación (45°C) se observaron cambios indeseables que podrían generar rechazo e impedir su uso.

8. Bibliografía

- Acosta, J. & Fontana, T. (2021). Variação da concentração de vitamina C em sucos de laranja armazenados com diferentes condições de luminosidade e temperatura. *Revista Thema*, 19(1): 95-106.
- Adamczak, A.; Ozarowski, M. & Karpiński, T. (2020). Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1): 109.
- Agudelo, P.; Luna, J. & Quintero, V. (2020). Formulación y evaluación fisicoquímica de jugo de mora (*Rubus glaucus* Benth) enriquecido con calcio y vitamina C. *Biocología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 18(1): 56-63.
- Alappat, B. & Alappat, J. (2020). Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules*, 25(23): 5500.
- Alpizar, M.; Apuy, E.; Medaglia, C.; Mora, E.; Moreira, L.; Segura, S.; López, K. & Ulloa, E. (2018). Estadísticas de Comercio Exterior Costa Rica, 2017. 2da ed. San José, Costa Rica: PROCOMER.
- Amrutha, B.; Sundar, K. & Halady, P. (2017). Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microbial Pathogenesis*, 111(1): 156-162.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Method 942.15, Acidity (Titratable) of Fruit Products*. Recuperado el 21 de mayo del 2020 del sitio web de Association of Official Analytical Chemists: <http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=15499>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official Method 981.12, pH of Acidified Foods*. Recuperado el 21 de mayo del 2020 del sitio web de Association of Official Analytical Chemists: <http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=18372>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Official Method 932.12, Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products, Refractometer Method*. Recuperado el 21 de mayo del 2010 del sitio web de Association of Official Analytical Chemists: <http://www.eoma.aoc.org/methods/info.asp?ID=15125>
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (s.f.) International, "Official Methods of Analysis", versión vigente según consulta en línea <http://www.eoma.aoc.org/>.
- Ashurst, P. (2016). The Stability and Shelf Life of Fruit Juices and Soft Drinks. *The Stability and Shelf Life of Food*: 347–374.
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99(1): 58-71.

- Azofeifa, G.; Quesada, S.; Pérez, A.; Vaillant, F. & Michel, A. (2015). Pasteurization of blackberry juice preserves polyphenol-dependent inhibition for lipid peroxidation and intracellular radicals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42(1): 56-62.
- Bendokas, V.; Šarkinas, A.; Jasinauskienė, D.; Anisimovienė, N.; Morkūnaitė, Š.; Stanys, V. & Šikšnianas, T. (2018). Antimicrobial activity of berries extracts of four *Ribes* species, their phenolic content and anthocyanin composition. *Folia Hort*, 30(2): 249-257.
- Bonetti, A.; Tugnoli, B.; Rossi, B.; Giovagnoni, G.; Piva, A. & Grilli, E. (2020). Nature-Identical Compounds and Organic Acids Reduce *E. coli* K88 Growth and Virulence Gene Expression In Vitro. *Toxins*, 12(1): 468.
- Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M. & Corbo, M. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2): 103-110.
- Burel, C.; Kala, A. & Purevdorj, L. (2020). Impact of pH on citric acid antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*: 1-9.
- Bushell, F.; Tonner, P.; Jabbari, S.; Schmid, A. & Lund, P. (2019). Synergistic Impacts of Organic Acids and pH on Growth of *Pseudomonas aeruginosa*: A Comparison of Parametric and Bayesian Non-parametric Methods to Model Growth. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Cai, R.; Yuan, Y.; Wang, Z.; Guo, C.; Liu, B.; Pan, C.; Liu, L. & Yue, T. (2015). Effects of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth and guaiacol production. *International Journal of Food Microbiology*, 214(1): 145-150.
- Cai, R.; Miao, M.; Yue, T.; Zhang, Y.; Cui, L.; Wang, Z. & Yuan, Y. (2018). Antibacterial activity and mechanism of cinnamic acid and chlorogenic acid against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in apple juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5): 1697-1705.
- Cámara Promotora del Comercio (PROCOMER) (2021). Anuario estadístico 2019. Consultado el día 07 de febrero del 2021, mediante vía web: <https://www.procomer.com/exportador/documentos/anuario-estadistico-2019/>
- Carpenter, D.; Ngeh, J. & Lee, S. (1993). "Lipid Analysis" in *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*, Eds. Sullivan y Carpenter. AOAC International.
- Castello, F.; Fernández, M.; Cerrillo, I.; Escudero, B.; Ortega, Á.; Rosi, A.; Bresciani, L.; Del Rio, D. & Mena, P. (2020). Absorption, metabolism, and excretion of orange juice (poly)phenols in humans: The effect of a controlled alcoholic fermentation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 695(1): 108627.
- Chanson, A.; Braesco, V.; Chupin, J. & Bouillot, L. (2016). Nutritional Composition of Orange Juice: A Comparative Study between French Commercial and Home-Made Juices. *Food and Nutrition Sciences*, 7(1): 252-261.

- Chhabra, R. (2017). CRC Handbook of thermal Engineering. 2 ed. Boca Raton: CRC Press.
- Chmal, E. & Papiewska, A. (2011). The possibility of thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit and vegetable juices. *Biotechnology and Food Science*, 75(1): 87-96.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2016). Nitrógeno total por el método Kjeldahl utilizando equipos Foss Tecator. P-SA-MQ-003. Emisión No. 7. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2017a). Recuento de mesófilos aerobios. P-SA-MM-001. Emisión No. 3. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2017b). Recuento de mohos y levaduras. P-SA-MM-007. Emisión No. 4. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2019a). Determinación de ácidos orgánicos por HPLC. P-SA-MQ-051. Emisión No. 3. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2019b). Determinación de antocianinas. P-SA-MQ-047. Emisión No. 10. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2019c). Determinación de polifenoles totales. P-SA-MQ-048. Emisión No. 5. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2019d). Grados brix. P-SA-MQ-046. Emisión No. 3. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2019e). Grasa cruda por extracto etéreo. P-SA-MQ-005. Emisión No. 9. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2020a). Acidez total. P-SA-MQ-011. Emisión No. 10. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2020b). Azúcares por HPLC. P-SA-MQ-006. Emisión No. 15. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2020c). Cenizas Totales. P-SA-MQ-004. Emisión No. 9. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2020d). Determinación del pH. P-SA-MQ-012. Emisión No. 10. San José, Costa Rica.
- CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos). (2020e). Humedad. P-SA-MQ-002. Emisión No. 9. San José, Costa Rica.
- Ciuffreda, E.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M. & Corbo, M. (2015). *Alicyclobacillus* spp.: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. *Microorganisms*, 3(4): 625-640.
- Clotteau, M. (2014). *Alicyclobacillus* spp. Control in the Fruit Juice Industry. *Pall Food and Beverage*: 1-14.

- Correa, Y. & Rivera, J. (2018). Evaluación de ácidos orgánicos en refrescos de fruta comerciales por cromatografía líquida de alta eficiencia. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 1(1): 18-22.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault, D., Sylvain, J.-F., & Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*, 22(8): 1413–1418.
- Da Costa, M.; Rainey, F. & Albuquerque, L. (2015). *Alicyclobacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: 1-18.
- De Pascoli, I.; dos Anjos, M.; da Silva, A.; Lorenzetti, F.; Cortez, D.; Mikcha, J.; Nakamura, T.; Nakamura, C. & de Abreu, B. (2018). Piperaceae extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice. *Industrial Crops and Products*, 116(1): 224-230.
- Da Silva, N., Hiromi, M., Amstalden, V., Ferraz De Arruda, N., Da Silva, M. & Romeiro, R. (2013). *Microbiological examination methods of food and water*. London, UK: Taylor & Francis Group.
- Dos Anjos, M.; da Silva, A.; de Pascoli, I.; Graton, J.; Machinski, M.; Peralta, R. & de Abreu, B. (2016). Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp.. *International Journal of Food Microbiology*, 216(1): 121-126.
- Dos Santos, M.; de Sá Mendes, N.; Cameron, L.; Ferreira, M. & Gonçalves, É. (2020). Optimization of chemical extraction of phenolic compounds from fruits and vegetable residue by UPLC-MSE. *International Journal of Food Properties*, 23(1): 2144-2159.
- Eker, M.; Aaby, K.; Budic, I.; Rimac, S.; El, S.; Karakaya, S.; Simsek, S.; Manach, C.; Wiczowski, W.; de Pascual, S. (2019). A Review of Factors Affecting Anthocyanin Bioavailability: Possible Implications for the Inter-Individual Variability. *Foods*, 9(2): 2-18.
- Estrada, H.; Restrepo, C & Iglesias, M. (2018). Aceptabilidad Sensorial de Productos de Panadería y Repostería con Incorporación de Frutas y Hortalizas Deshidratadas como Ingredientes Funcionales. *Información tecnológica*, 29(4): 13-20.
- Farinango, M. (2010). Estudio de la fisiología postcosecha de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y de la mora variedad brazos (*Rubus* sp.) Ingeniera Agroindustrial. Quito, Ecuador, Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería, 1-142 p.
- Fernández, E. & McGregor, J. (1994). Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77(1): 2934-2939.
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 2019a. Code of Federal Regulations Title 21. Part 101. Food Labeling (en línea). Disponible en <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=101.30>
- FDA (Food and Drug Administration, EEUU). 2019b. Code of Federal Regulations Title 21. Part 178. Indirect Food Additives: Adjuvants, Production aids, and Sanitizers. (en

línea). Disponible en
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=178.1010>

- Folkvord, F. (2020). *The Psychology of Food Marketing and (Over) eating*. New York: Routledge.
- García, J., Medina, L., Mercado, J. & Baéz, R. (2017). Evaluación de desinfectantes para el control de microorganismos en frutas y verduras. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 18(1): 9-22.
- Georgé, S. & Brat, P. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 1370-1373.
- Gil, M.; Selma, M.; López, F. & Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2): 37-45.
- Gil, Á. (2010). *Tratado de Nutrición. Tomo II. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. 2 ed.* Madrid: Médica Panamericana, D.L.
- Glaeser, S.; Falsen, E.; Martin, K. & Kampfer, P. (2013). *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 63(Pt 10): 3623-3627.
- Gocmen, D.; Elston, A.; Williams, T.; Parish, M.; 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.
- Gomes, D.; Moreira, J.; Souza, L.; Araújo, K.; Sanches, E.; de Araújo, J.; Rodrigues, S.; Fernandes, F; Campelo, P. (2020). Improvement of the Bioavailability of Amazonian Juices Rich in Bioactive Compounds Using Glow Plasma Technique. *Food and Bioprocess Technology*, 13(4): 670-679.
- Gordon, A. (2017). Case study: addressing the problem of *Alicyclobacillus* in tropical beverages. In *Food Safety and Quality Systems in Developing Countries*. London: Academic Press.
- Gokturk, N. (2006). Organic acid, tocopherol and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(2): 156-159.
- Graziano, M.; Graziano, K.; Pinto, F.; Bruna, C.; Souza, R. & Lascala, C. (2013). Effectiveness of disinfection with alcohol 70% (w/v) of contaminated surfaces not previously cleaned. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 21(2): 618-623.
- Granato, D.; Barba, F.; Kovačević, D.; Lorenzo, J.; Cruz, A. & Putnik, P. (2020). Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 11(3): 1-26.

- Guisti, M. & Wrolstad, R. (2001). Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Henczka, M.; Djas, M. & Filipek, K. (2013). Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1): 1-8.
- Hernández, Y.; Lobo, M. & Gonzáles, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*, 96(1): 654-664.
- Hernández, P.; Mata, C.; García, A.; Hernández, G.; Reggio, D. & Tapia, M. (2020). Agrupación nutricional de las frutas y hortalizas en Venezuela. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 33(1): 5-13.
- Heyman, M. & Abrams, S. (2017). Fruit Juice in Infants, Children, and Adolescents: Current Recommendations. *Pediatrics*, 139(6): 1-8.
- Hu, X.; Huang, E.; Barringer, S. & Yousef, A. (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(1): 108883.
- Huang, X.; Yuan, Y.; Guo, C.; Gekas, V. & Yue, T. (2015). *Alicyclobacillus* in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control. *Food Reviews International*, 31(2): 91-124.
- Japan Fruit Juice Association (JFJA). 2003. *The Unified Detection Method of Thermoacidophilic Bacteria in Raw Materials of Fruit Juice*. Japón: Japan Fruit Juice Association.
- Javanmard, M. & Akbari, A. (2020). Antimicrobial effects of pomegranate peel extract on *Lactobacillus plantarum* and shelf life of Thousand Island dressing. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 3(1): 7-14.
- Jia, H.; Wang, Y.; Sun, M.; Li, B.; Han, Y.; Zhao, Y.; Li, X.; Ding, N.; Li, C.; Ji, W. & Jia, W. (2013). Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist*, 198(2): 453-465.
- Kakagianni, M.; Kalantzi, K.; Beletsiotis, E.; Ghikas, D.; Lianou, A. & 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(1): 40-49.
- Khoo, H.; Azlan, A.; Tang, S. & Lim, S. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1): 1361779.

- Lima, M.; Paiva, C.; Fernández, C.; Harel, J.; Dubreuil, J.; de Souza, E. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130(1): 259-270.
- Liu, Q.; Jin, X.; Feng, X.; Yang, H. & Fu, C. (2019). Inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on organic carrot (*Daucus carota* L.) treated with low concentration electrolyzed water combined with short-time heat treatment. *Food Control*, 106(1): 106702.
- 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(1): 89-93.
- Ma, Y.; Ding, S.; Fei, Y.; Liu, G.; Jang, H. & Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, (1): 106712.
- Mara, A. & Maróstica, M. (2018). Chapter 2. Yellow passionfruit: General characteristics and by-products usage. En Sáyago, S & Álvarez, E. (coords.), *Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados*. Fabro Editores. Recuperado el 06 de abril de 2021, de <http://alimentos-autoctonos.fabro.com.mx/legal.html>.
- Mattos, G.; Tonon, R.; Furtado, A. & Cabral, L. (2017). Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4): 1055-1064.
- McKnight, I.; Eiroa, M.; Sant'Ana, A. & Massaguer, P. (2010). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. *Food Microbiology*, 27(8): 1016-1022.
- Merle, J. & Montville, T. (2012). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: The Organism, the Challenge, Potential Interventions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(1): 153-158.
- Mertz, C. (2009). *Micro-constituants de la mure andine et de la tomate d'arbre: caractérisation et impact du traitement thermique*. Tesis de Doctorado en Biochimie, Chimie et Technologie des Aliments, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
- Ministerio de Comercio Exterior (COMEX). (2021b). Principales Productos Exportados 2019. Recuperado de https://www.comex.go.cr/media/8166/06_exports_productos.xlsx el día 26 de febrero del 2021.
- Ministerio de Comercio Exterior (COMEX). (2021a). Exportaciones totales por sector económico 2007-2019. Recuperado de https://www.comex.go.cr/media/8164/04_exports_sector.xlsx el día 26 de febrero del 2021.

- Ministerio de Salud. Comisión Intersectorial de Guías Alimentarias (CIGA) (2011). Guías alimentarias para Costa Rica. 2da ed. San José, Costa Rica: CIGA, Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS).
- Molva, C. & Baysal, A. (2015a). Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1): 238-245.
- Molva, C. & Baysal, A. (2015b). Effects of pomegranate and pomegranate-apple blend juices on the growth characteristics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 type strain vegetative cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, 200(1): 52-56.
- Murray, M.; Gurtler, J.; Ryu, J.; Harrison, M. & Beuchat, L. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1): 59-69.
- Mushtaq, M. (2018). Chapter 8. Extraction of fruit juice: an overview. En *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis* (1ra ed., pp. 131–159). London: Elsevier, Academic Press.
- Nassour, R.; Ayash, A. & Al-Tameenmi, K. (2020). Anthocyanin pigments: Structure and biological importance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 13(4): 45-57.
- Navia, D.; Ayala, A. & Villada, H. (2014). Interacciones empaque-alimento: migración. *Revista Ingenierías Universidad De Medellín*, 13(25): 99-113.
- Nookaraju, A.; Upadhyaya, C.; Pandey, S.; Young, K.; Hong, S.; Park, S. & Park, S. (2010). Molecular approaches for enhancing sweetness in fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 127(1): 1-15.
- Nozal, M.; Bernal, J.; Gómez, L.; Higes, M. & Meana, A. (2003). Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34(2): 181-188.
- Oh, M.; Lee, J.; Jeong, Y. & Kim, M. (2016). Synergistic Antilisterial Effects of Mixtures of Lysozyme and Organic Acids. *Journal of Food Protection*, 79(12): 2184-2189.
- Olaimat, A.; Al-Holy, M.; Abu Ghoush, M.; Al-Nabulsi, A.; Qatatsheh, A.; Shahbaz, H.; Osaili, T. & Holley, R. (2018). The Use of Malic and Acetic Acids in Washing Solution to Control *Salmonella* spp. on Chicken Breast. *Journal of Food Science*, 83(8): 2197-2203.
- Olszewska, M.; Gędas, A. & Simões, M. (2020). Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. *Food Research International*, 134(1): 109214.

- Osoyale, B.; Adewumi, G.; Witthuhn, R.; Kuloyo, O. & Oguntoyinbo, F. (2019). A review of innovative techniques for rapid detection and enrichment of *Alicyclobacillus* during industrial processing of fruit juices and concentrates. *Food Control*, 99(1): 146-157.
- Oteiza, J.; Soto, S.; Alvarenga, V.; Sant'Ana, A. & Giannuzzi, L. (2014). Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 172(1): 119-124.
- Oteiza, J.; Soto, S.; Alvarenga, V.; Sant'ana, A. & Gianuzzi, L. (2015). Fate of *Alicyclobacillus* spp. in enrichment broth and in juice concentrates. *International Journal of Food Microbiology*, 210(1): 73-78.
- Özcelik, S.; Kuley, E. & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 73(1): 536-542.
- Padilla-Zakour, O. (2008). Chapter 20, Good Manufacturing Practices. In Heredia, N; Wesley, I; García, S (eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd. p. 395-414.
- Pagliarulo, C.; De Vito, V.; Picariello, G.; Colicchio, R.; Pastore, G.; Salvatore, P. & Volpe, M. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 190(1): 824-831.
- Parseh, H. & Shahablavasani, A. (2019). Comparing total anthocyanins, total phenolics and antioxidant activities of extracts (aqueous, organic and anthocyanin) obtained from pomegranate (peel, juice, and seed) and antimicrobial activity of peel extracts on the four pathogenic bacteria. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 2(1): 7-12.
- Passos, M. & Ribeiro, C. (2009). Innovation in food engineering: new techniques and products. CRC Press. USA, Boca Raton: p. 747.
- Pearson, E. & 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.
- Peh, E.; Kittler, S.; Reich, F. & Kehrenberg, C. (2020). Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations—A synergistic effect? *PLOS ONE*: 1-13.
- Peña, W. & de Massaguer, 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.; Zúñiga, A. & 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.
- Pérez, A. & Rojas, C. (2018). Capítulo 4. Cas. En Sáyago, S. & Álvarez, E. (coords.), Alimentos vegetales autóctonos iberoamericanos subutilizados. Fabro Editores.

- Recuperado de <http://alimentos-autoctonos.fabro.com.mx/legal.html> el 06 de abril de 2021.
- Pérez, B.; Herrera, M.; Mora, R.; Zebadúa, J.; Silva, E.; Oliart, R.; Pérez, C. & Guzmán, R (2018). Effect of microwaves and ultrasound on bioactive compounds and microbiological quality of blackberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 87(1): 47-53.
- Pinto, C.; Martins, A.; Santos, M.; Fidalgo, L.; Delgadillo, I. & Saraiva, J. (2019). Growth inhibition and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* endospores in apple juice by hyperbaric storage at ambient temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52(1): 232-236.
- Pirisino, J. (1983). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Lactose, Glucose, and Galactose in Lactose-Reduced Milk. *Journal of Food Science*, 48(3): 742-744.
- Piskernik, S.; Klančnik, A.; Demšar, L.; Možina, S. & Jeršek, B. (2016). Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. *Food Control*, 60(1): 205-214.
- Priyadarshini, A. & Priyadarshini, A. (2018). Chapter 2. Market dimensions of the fruit juice industry. (1ra ed., pp. 15–32). London: Elsevier, Academic Press.
- Programa Integral de Mercadeo Agropecuario (PIMA). (s.f.) ÍNDICE ESTACIONAL SIMM, HEREDIA, COSTA RICA PERIODO DEL 2012 AL 2019. Nombre de producto: Cas. Recuperado de <http://bpm.pima.go.cr:8080/ap/cm/PG29L2/AuraPortal.aspx> el 06 de abril de 2021.
- Putnik, P.; Pavlić, B.; Šojić, B.; Zavadlav, S.; Žuntar, I.; Kao, L.; Kitonić, D.; Kovačević, D. (2020). Innovative Hurdle Technologies for the Preservation of Functional Fruit Juices. *Foods*, 9(1): 699.
- Pornpukdeewattana, S.; Jindaprasert, A. & Massa, S. (2019). *Alicyclobacillus* spoilage and control - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15.
- Quezada, C. (2007). Potencia estadística, sensibilidad y tamaño de efecto: ¿Un nuevo canon para la investigación? *Onomázein*, 2(16): 159-170.
- Radkowski, M.; Zdrodowska, B. & Gomółka, M. (2018). Effect of Succinic Acid on Elimination of Salmonella in Chicken Meat. *Journal of Food Protection*, 81(9): 1491-1495.
- Rajauria, G. & Tiwari, B. (2018). *Fruit Juices. Extraction, Composition, Quality and Analysis*. San Diego, Estados Unidos: Elsevier.
- Rashid, S.; Tong, W.; Leong, C.; Abdul, N.; Taher, M; Ahmad, N.; Tan, W. & Teo, S. (2020). Anthocyanin Microcapsule from *Clitoria ternatea*: Potential Bio-preservative and Blue Colorant for Baked Food Products. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1): 65-72.

- Raybaudi, R.; Mosqueda, J. & Martín, O. (2009). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*, 20(2): 105-112.
- Rampersaud, G. & Valim, M. (2017). 100% citrus juice: Nutritional contribution, dietary benefits, and association with anthropometric measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1): 129-140.
- Reglamento Técnico de Costa Rica (RTCR) 390: 2005. Jugos y Néctares de Fruta. N°32916. San José, Costa Rica: 10 de octubre, del 2005.
- Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA). 67.04.48:07. Alimentos y Bebidas Procesados. Néctares de Frutas. Especificaciones. Normas General del Codex para Zumos (Jugos) y Néctares de Frutas (CODEX STAN 247-2005).
- Rodríguez, A.; Correa, A.; Suárez, M. & López, J. (2011). Valoración de desinfectantes mediante el método dilución-neutralización en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en plantas de beneficio porcino. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2(1): 187-201.
- Rojas, D. & Narváez, C. (2009). Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas en Colombia. *Quim. Nova*, 32(9): 2336-2340.
- Rojas, C. (2017). Morphological and chemical characteristics of fruits of the genus *Psidium* with special reference to bioactive compounds. Doctorado em Trophologiae, Universidad de Bonn, Alemania. Cuvillier Verlag Göttingen.
- Rui, C.; Yahong, Y.; Zhouli, W.; Chunfeng, G.; Bin, L.; Chunqing, P.; Laping, L. & Tianli, Y. (2015). Effects of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth and guaiacol production. *International Journal of Food Microbiology*, 214(1): 145-150.
- Russel, A.; Hugo, W. & Ayliffe, G. (1999). Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 3 ed. Oxford, Reino Unido: Blackwell Science Ltd.
- Salfinger, Y. & M, Lou. (2015). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 8. American Public Health Association. 5 ed. Washington D.C., U.S.A.
- Santos, M.; Pio, R.; Castilho, L.; Fonseca, F.; Patto, C. & Saczk, A. (2017). Antioxidant activity and total phenol content of blackberries cultivated in a highland tropical climate. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39(1): 43-48.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA). (2019). Boletín Estadístico Agropecuario. N°29. Serie cronológica 2015-2018. Recuperado de <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA29.xls> el 06 de abril de 2021.

- Septembre, A.; Remize, F. & Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International*, 104(1): 86-99.
- Silva, F. & Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2): 0-74.
- Silva, A.; Polonio, J.; Polli, A.; dos Santos, J.; Capelari, L.; Oliveira, V.; Pimenta, V.; Braz, A.; Gonçalves, J.; Correia, R.; Azevedo, J.; Pamphile, J. & Abreu, B. (2021). Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in commercial orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 338(1): 109019.
- Slavin, J. & Lloyd, B. (2012). Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in Nutrition*, 3 (4), 506-516.
- Slinkard, K. & Singleton, V. (1977). Total phenol analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- Smit, Y.; Cameron, M.; Venter, P. & Witthuhn, R. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiology*, 28(3): 331-349.
- Snyder, A. & Worobo, R. (2018). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85(1): 144-150.
- Sokołowska, B.; Niezgodna, J. & Chotkiewicz, M. (2013). Opportunities to Germinate and Grow of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in the Presence of Organic Acids. Focusing on Modern Food Industry (FMFI), 2(1): 10-16.
- Sokołowska, B.; Połaska, M. & Dekowska, A. (2020). *Alicyclobacillus*-Still Current Issues in the Beverage Industry. *Safety Issues in Beverage Production*: 105-146.
- Soquetta, M.; Terra, L. & Bastos, C. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1): 400-412.
- Soto, M.; Palma, M. & García, M. (2017). Phenolic Compounds-Biological Activity: Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. (Chapter 1).
- Sperber, W. & Doyle, M. (2009) *Food Microbiology and Food Safety. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. New York: Springer.
- Spinelli, A.; Sant'Ana, A.; Rodrigues, S. & Massaguer, P. (2009). Influence of Different Filling, Cooling, and Storage Conditions on the Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in Orange Juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7409-7416.

- Splittstoesser, D. & Churey, J. (1989). Effect of low concentrations of sorbic acid on the heat resistance and viable recovery of *Neosartorya fischeri* ascospores. *Journal of Food Protection*, 52(11): 821-822.
- Steyn, C.; Cameron, M. & Witthuhn, R. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1): 1-11.
- Sullivan, D. & Carpenter, D. (1993). *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*. AOAC International. 455-534.
- Sultan, Q.; Wahab, S.; Noor, M.; Durrani, Y.; Muhammad, A.; Bilal, H & Ud, M. (2019). Effect of head space, processed water and vitamin C on pasteurized hot filled orange juice during storage. *Pure and Applied Biology*, 8(2): 1008-1015.
- Sun, X.; Zhou, T.; Wei, C.; Lan, W.; Zhao, Y.; Pan, Y. & Wu, V. (2018). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, 94(1): 155-161.
- Takahashi K.; Goto, K.; Tanaka, T.; Tanada, S.; Sawaki T. & Yamamoto, R. (2007). Chapter 8. Factors of spoilage caused by *Alicyclobacillus* and prevention measures. In: Yokota A.; Fujii T. & Goto, K. (eds). *Alicyclobacillus*. Springer, Tokyo: 117-148.
- Tanaro, J.; Piaggio, M.; Gasparovic, A. & Lound, L. (2019). Lavado y desinfección con hipoclorito de sodio de lechuga contaminada con *Escherichia coli* O157:H7. *Ciencia, Docencia y Tecnología - Suplemento*, 9(9): 247-254.
- Tandon, K.; Worobo, R.; Churey, J. & Padilla-Zakour, O. (2003). Storage quality of pasteurized and UV treated apple cider. *Journal of Food Processing and Preservation*, 27(1): 21-35.
- Tayefe, M.; Zade, A.; Hashemi, S.; Hasannia, F. (2014). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Commercial Spoiled Apple Juice and Study on Some Influence Parameters on its Growth in Apple Juice. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, H. Botany*, 5(1): 73-78.
- Tianli, Y.; Jiangbo, Z. & 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.
- Tokuda, H. (2007). Chapter 6. Growth profile of *Alicyclobacillus* in fruit juices. En Yokota, A.; Fujii, T. & Goto, K. (eds). *Alicyclobacillus*. Springer, Tokyo: 92-105.
- Tucker, G. & Featherstone, S. (2010). *Essentials of Thermal Processing*. Sussex, Blackwell Publishing Ltd.
- Úbeda, A. (2012). Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas. *Ingeniería Agrónoma*. Cartagena, Colombia, Universidad Politécnica de Cartagena, 1-125 p.

- U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. December 2015. Recuperado de <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>. el 25 de marzo del 2020.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2021). Citrus: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, Global Market Analysis. USDA: 1-13. Recuperado de <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> el día 08 de febrero del 2021.
- Usaga, J.; Acosta, Ó.; Churey, J.; Padilla, O. & Worobo, R. (2021). Evaluation of high-pressure processing (HPP) inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in acid and acidified juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 339(1): 109034.
- Vardanian, A.; Kurzbaum, E.; Farber, Y.; Butnariu, M. & Armon, R. (2017). Facilitated enumeration of the silicate bacterium *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. (formerly *Bacillus mucilaginosus*) via tetrazolium chloride incorporation into a double agar-based solid growth medium. *Folia Microbiologica*, 63(3): 401-404.
- Vantarakis, A.; Affifi, M.; Kokkinos, P.; Tsibouxi, M. & Papapetropoulou, M. (2011). Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece. *Anaerobe*, 17(6): 288-291.
- Walker, M. & Phillips, C. (2005). The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *Int. Journal Food Science Technology*, 40(1): 557-562.
- Walker, M. & Phillips, C. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*, 43(1): 250-260.
- Walls, I. & Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Aust.* 52(1): 286-288.
- Wechtersbach, L. & Cigić, B. (2007). Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(1): 767-772.
- 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. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, 1-93 p.
- Yokota, A.; Fujii, T. & Goto, K. (2007). *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer.
- Yousefi, S.; Emam, Z.; Mousavi, S. & Askari, G. (2012). Comparing the effects of microwave and conventional heating methods on the evaporation rate and quality attributes of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate. *Food Bioprocess Technology*, 5(4): 1328-1339.

Zhao, N.; Zhang, J.; Qi, Y.; Xu, J.; Wei, X. & Fan, M. (2021). New insights into thermo-acidophilic properties of *Alicyclobacillus acidoterrestris* after acid adaptation. *Food Microbiology*, 94(1): 103657.

9. Anexos



Figura 6. Colonias típicas de *A. acidoterrestri* en agar YSG luego de 3 días de incubación a 45°C.

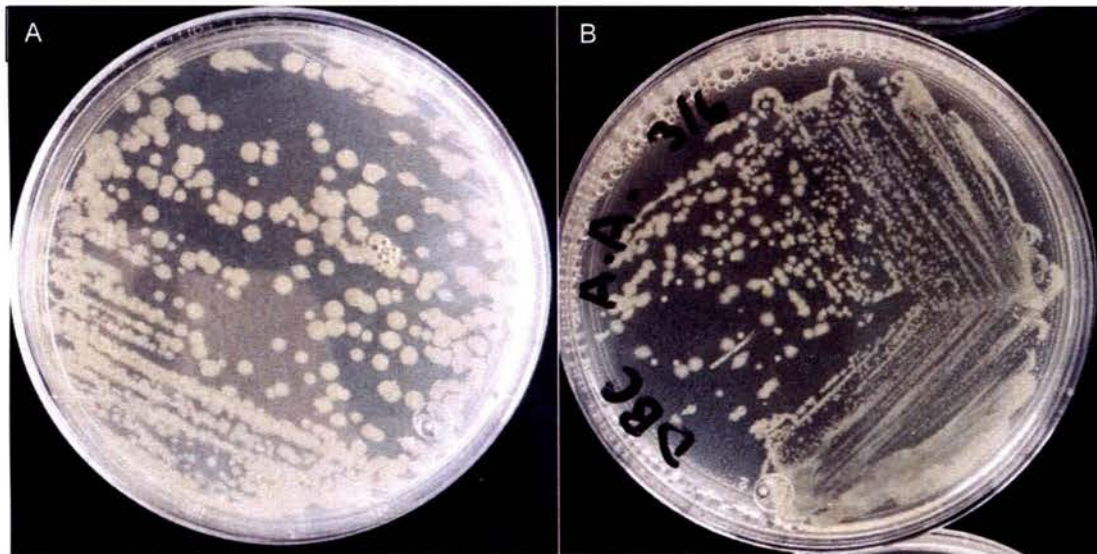


Figura 7. Crecimiento de *A. acidoterrestri* luego de rayado en placa con agar YSG para la preparación del inóculo de (A) 6 log (5 días a 45°C) y (B) 3 log (3 días a 45°C).

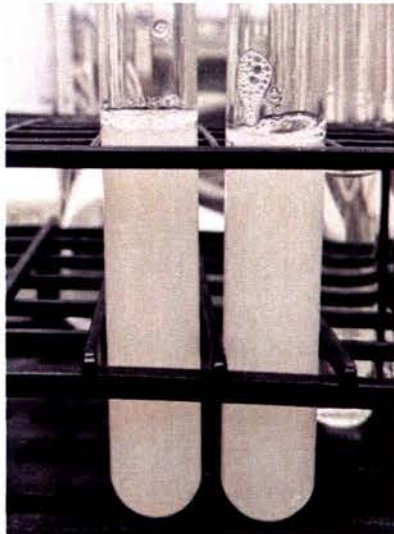


Figura 8. Dispersión de la biomasa de una placa completa de YSG con *A. acidoterrestis* luego de 5 días de incubación a 45°C, en 9 mL de APE 0,1%.



Figura 9. Efecto de dilución en el recuento de *A. acidoterrestis* mediante la técnica de vaciado utilizando agar YSG.

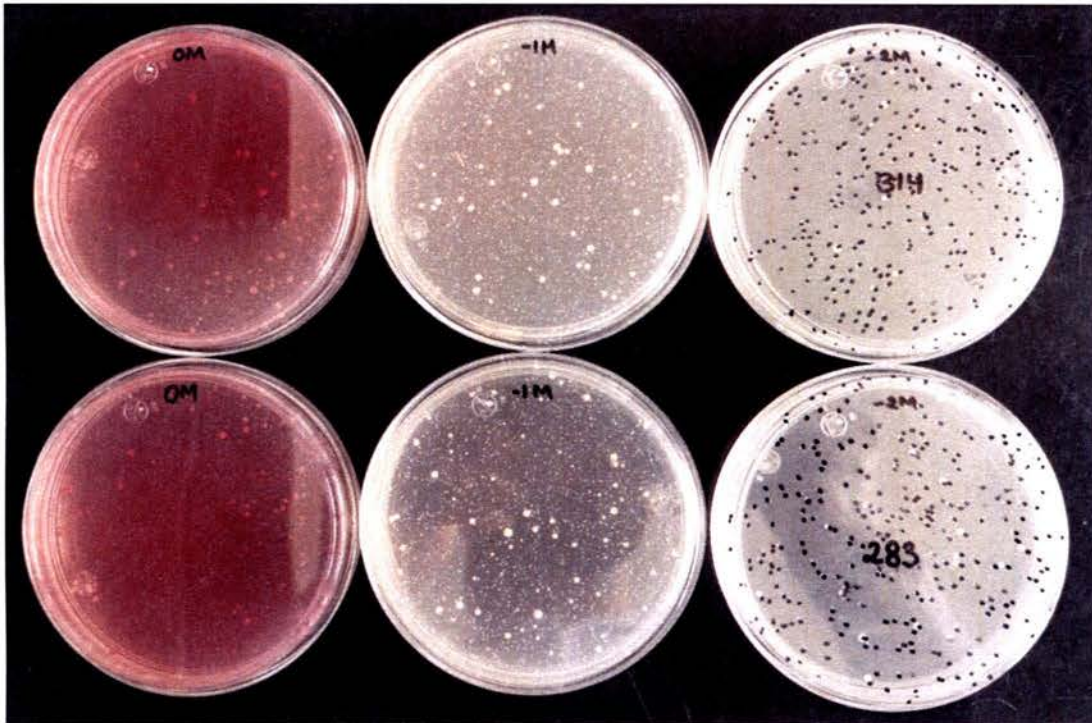


Figura 10. Efecto de dilución en el recuento de *A. acidoterrestis* en un jugo coloreado (mora), mediante la técnica de vaciado utilizando agar YSG.

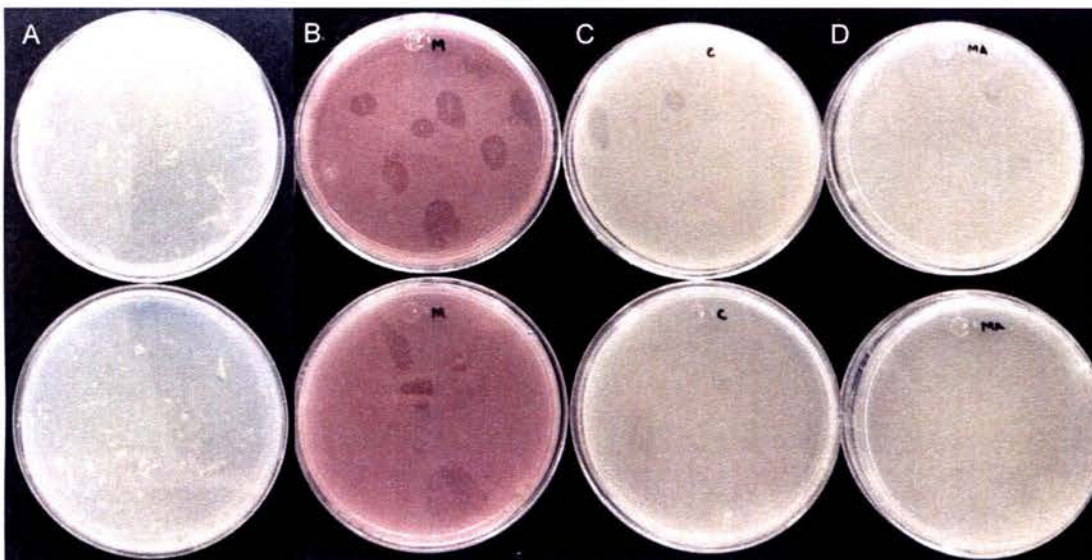


Figura 11. Ausencia de colonias de *A. acidoterrestis* en los controles negativos, colocados directamente (jugo sin dilución) en agar YSG de los jugos de (A) naranja, (B) mora, (C) cas y (D) maracuyá, luego de ser incubados a 45°C por 3 días.

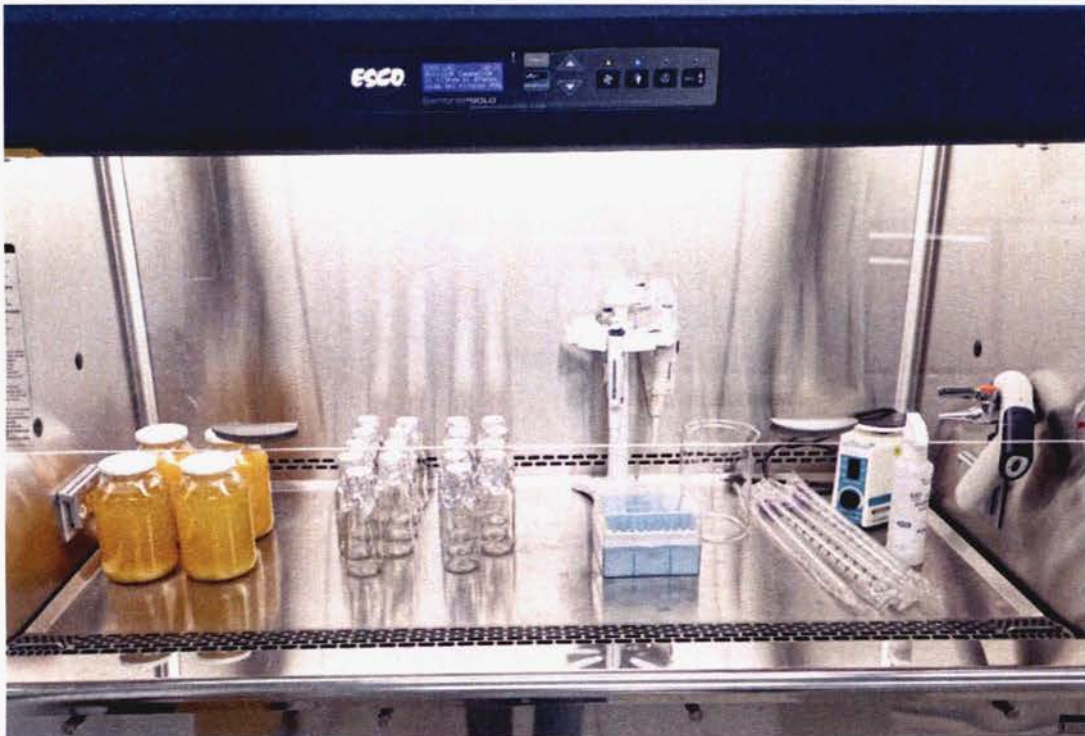


Figura 12. Cámara de flujo durante el proceso de llenado e inoculación de los jugos de fruta con *A. acidoterrestris*.



Figura 13. Jugos (cas, maracuyá y mora) inoculados con *A. acidoterrestris* y manipulados para su almacenamiento a 45°C.



Figura 14. Jugo de naranja parcialmente sustituido en tres diferentes niveles (50, 25 y 12,5% mora, de izquierda a derecha), y control positivo (etiqueta blanca) y negativo (etiqueta rosada).



Figura 15. Cambio de color experimentado en las mezclas de jugo de naranja-mora (50, 25 y 12,5% mora, de izquierda a derecha, respectivamente) inoculadas con *A. acidoterrestis* e incubadas por 28 días a 45°C.