



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA

Desarrollo de Métodos Rápidos para la
Detección de *Alicyclobacillus* spp. en
Materia Prima Destinada a la Elaboración
de Bebidas y Zumos de Frutas.

M^a Pilar Fernández Fernández

2015



D^a. María Jesús Periago Castón, Catedrática de Universidad del Área de Nutrición y Bromatología, y D. José Antonio Gabaldón Hernández, Profesor Titular de Universidad.

A U T O R I Z A N:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de métodos rápidos para la detección de *Alicyclobacillus* spp. en materia prima destinada a la elaboración de bebidas y zumos de frutas”, realizada por D^{ña}. M^a Pilar Fernández Fernández, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de Noviembre de 2015

Fdo. Dra. MJ Periago Castón

Fdo. Dr. JA Gabaldón Hernández

Facultad de Veterinaria

Campus Universitario de Espinardo. 30071 Murcia
T. 868 883 904 – F. 868 884 147 – www.um.es/veterina/

Agradecimientos

Llegar a este apartado de la tesis doctoral supone una gran satisfacción y orgullo después del gran esfuerzo y número de horas dedicadas. Para mí este punto es igual e incluso más importante que el resto del trabajo porque tiene una carga emocional enorme, y porque me brinda la oportunidad de agradecer a todas aquellas personas que han colaborado de alguna manera, porque sin ellas no lo hubiera conseguido.

A mis hijas **Cloe y Astrid**, dos regalos de la vida que me colman de alegría, a las que espero y deseo servir de ejemplo de que luchar por tus sueños merece la pena. A **Pedro**, mi marido y padre de mis niñas, por su gran cariño, consejos e infinita paciencia conmigo. A mi perro **Hermes**, que siempre me transmite su buen humor hasta en mis momentos más tensos.

A mis **padres**, personas imprescindibles en mi vida, que me han enseñado valores como la honestidad, la honradez y el esfuerzo, que siempre están con su cariño incondicional, ayuda y motivación. A mis **hermanos**, por su apoyo y aprecio, que es recíproco.

Agradezco a **Juver Alimentación**, por permitir realizar parte de esta tesis doctoral proporcionándome el equipo de impedancia eléctrica y las muestras necesarias para llevar a cabo el experimento.

A **María Jesús Periago**, mi directora de tesis, por su gran competencia profesional y por su dedicación y entrega que se ve reflejada en este trabajo. Y por supuesto, por su amabilidad y sensibilidad con una madre doctoranda.

A **José Antonio Gabaldón**, mi director de tesis, por su amistad, por haber puesto a mi disposición sus acreditados conocimientos en la materia, por haber sabido mantenerme siempre en tensión y no bajar la guardia.

Al personal del **Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología**, por el buen ambiente de trabajo. En especial a **Toñi y Nieves**, por su simpatía y buen hacer profesional.

A **Pablo Serrano**, por su amistad y por su inquietud investigadora. Bajo su dirección en Juver Alimentación, su estímulo y su confianza profesional, nació y se

desarrolló este trabajo de investigación por la necesidad de métodos más rápidos y eficientes para la determinación de *Alicyclobacillus*.

A **Manuel Chico**, por su amistad, por su apoyo científico y por la buena opinión profesional que tiene de mí y que no duda en expresar públicamente.

A **Ana Abenza** y **Esther Garrido**, por su ayuda en la realización de los análisis, por su confianza en el proyecto y por su amistad.

A **Luis Coll** y **Ángel Abellán**, por su ayuda entusiasta y su colaboración en material y análisis necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A mis amigas **Sevy Rodríguez** y **Rosana Herrero**, por su apoyo emocional, animándome en momentos de flaqueza y agobio, recordándome mi valía para llevar a cabo este proyecto.

A mis hijas, Cloe y Astrid.

A Pedro.

Hay ojos que verán nuestra memoria...

ANDRÉS NEUMAN

Índice General

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	33
CAPITULO II. OBJETIVOS	39
1. Objetivo General.....	39
2. Objetivos específicos.....	39
CAPITULO III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	43
1. Historia de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	43
2. Características de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	47
2.1. Morfología. Propiedades fisiológicas y bioquímicas.....	47
2.2. <i>Alicyclobacillus</i> spp. como bacteria alterante.....	51
2.3. Compuestos responsables del mal olor y mecanismos de formación.....	53
3. Parámetros de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	57
3.1. Temperatura de crecimiento.....	57
3.2. Periodo de incubación.....	58
3.3. pH.....	58
3.4. Condiciones de choque térmico.....	59
3.5. Efecto de la concentración y tipo de zumo.....	59
4. Métodos clásicos de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	63
4.1. Medios de cultivo.....	64
4.1.1. Bacillus acidocaldarius médium (BAM).....	64
4.1.2. Orange serum agar (OSA).....	65
4.1.3. Potato dextrose agar (PDA).....	66
4.1.4. Yeast starch glucose agar (YSG-AGAR).....	67
4.1.5. HGYE.....	67
4.1.6. K AGAR.....	68
4.1.7. SK AGAR.....	69
4.2. Comparación de los diferentes medios de cultivo.....	70

4.3. Método unificado para la detección de bacterias termo-acidófilas.....	72
4.3.1. Método para zumos concentrados clarificados.....	72
4.3.2. Método para zumos concentrados no clarificados.....	73
4.4. Método diferenciación e identificación de <i>Alicyclobacillus</i>	74
4.4.1. Método de temperatura diferencial de crecimiento.....	74
4.4.2. Método de la peroxidasa.....	75
4.5. Método IFU para la detección de <i>Alicyclobacillus</i> en zumos de fruta.....	77
4.5.1. Método para zumos concentrados turbios y otras materias primas con concentración de <i>Alicyclobacillus</i> superior a 100 ufc/mL.....	78
4.5.2. Método para zumos concentrados turbios y otras materias primas con concentración de <i>Alicyclobacillus</i> inferior a 100 ufc/mL.....	79
4.5.3. Método para zumos concentrados y materias primas filtrables.....	80
4.5.4. Método de confirmación de <i>Alicyclobacillus</i>	80
5. Sistema de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica.....	81
5.1. Introducción.....	81
5.2. Aplicaciones.....	82
5.3. Fundamento de la técnica.....	84
5.4. Técnicas de impedancia eléctrica directa e indirecta.....	84
5.4.1. Impedancia eléctrica directa.....	84
5.4.2. Impedancia eléctrica indirecta.....	85
6. Sistema de identificación de microorganismos por PCR.....	87
6.1. Introducción.....	87
6.2. Aspectos metodológicos: fundamentos y fase de la PCR.....	88
6.3. Diseño de métodos de identificación de microorganismos mediante amplificación específica de ADN.....	90
6.3.1. Diseño de cebadores y sondas.....	92
6.3.2. Factores de la PCR a considerar en las aplicaciones de identificación de microorganismos.....	93
6.3.2.1. Extracción de ADN: material de origen, método de extracción, calidad requerida y calidad.....	93
6.3.2.2. Componentes de la reacción de PCR.....	94
6.4. La PCR en tiempo real (RTi-PCR).....	96
6.4.1. Agentes intercalantes en la molécula de ADN.....	97

6.4.2. Sondas de hidrólisis.....	99
6.4.3. Sondas de hibridación en tándem.....	100
6.4.4. Sondas de horquilla (Molecular Beacons).....	101
6.4.5. Cuantificación	103
6.4.5.1. Cuantificación absoluta.....	105
6.4.5.2. Cuantificación relativa.....	106
7. Otros métodos de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	107
CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
1. Descripción de las muestras.....	111
1.1. Zumo concentrado de uva.....	112
1.2. Zumo concentrado de manzana.....	113
1.3. Zumo concentrado de piña.....	114
1.4. Zumo concentrado de naranja.....	115
1.5. Cremogenado de melocotón-nectarina.....	116
1.6. Cremogenado de pera.....	116
1.7. Puro zumo de naranja.....	116
2. Diseño experimental.....	119
2.1. Experiencia 1. Selección del tratamiento térmico más adecuado en la activación de esporas de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en zumo concentrado de manzana.....	120
2.2. Experiencia 2. Estudio de la técnica de impedancia eléctrica más adecuada para la detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en zumo concentrado de manzana.....	122
2.3. Experiencia 3. Desarrollo de un método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica indirecta en concentrados, cremogenados y zumos.....	125
2.4. Experiencia 4. Desarrollo de un método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por PCR en concentrados, cremogenados y zumos.....	128
2.5. Experiencia 5. Análisis químico y caracterización de las muestras.....	131
3. Métodos analíticos.....	132
3.1. Determinación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por microbiología clásica.....	132

3.2. Determinación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica directa e indirecta.....	135
3.3. Extracción y cuantificación por PCR de ADN de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	138
3.4. Determinación de grados BRIX.....	142
3.5. Determinación de pH.....	143
3.6. Determinación de ácido tartárico, L-málico y fumárico.....	143
3.7. Determinación de glucosa, fructosa y sacarosa.....	146
3.8. Determinación de pectinas solubles en agua.....	149
3.9. Determinación de ácido cítrico.....	152
3.10. Determinación de ácido isocítrico.....	155
3.11. Determinación de la actividad antioxidante (ORAC).....	157
3.12. Determinación de compuestos fenólicos totales.....	160
3.13. Determinación de flavonoides libres.....	163
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	167
1. Experiencia 1. Selección del tratamiento térmico más adecuado en la activación de esporas de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en zumo concentrado de manzana.....	167
2. Experiencia 2. Estudio de la técnica de impedancia eléctrica más adecuada para la detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. en zumo concentrado de manzana.....	172
3. Experiencia 3. Desarrollo de un método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica indirecta en concentrados, cremogenados y zumos.....	180
4. Experiencia 4. Desarrollo de un método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por PCR en concentrados, cremogenados y zumos.....	211
5. Experiencia 5. Análisis químico y caracterización de las muestras.....	233
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	253
CAPITULO VII. RESUMEN.....	257
CAPITULO VIII. SUMMARY.....	263
CAPITULO XIX. BIBLIOGRAFIA.....	267

Índice de Figuras

FIGURA 1. Estructura química de Guaiacol, 2,6-Dibromofenol y 2,6-Diclorofenol.....	53
FIGURA 2. Síntesis de formación de guayacol	55
FIGURA 3. Producción de guayacol por <i>A. acidoterrestris</i>	56
FIGURA 4. Método estándar de filtración por membrana para detección de bacterias termo-acidófilas.....	73
FIGURA 5. Método estándar de siembra y propagación para la detección de bacterias termo-acidófilas.....	74
FIGURA 6. Principio del Método de Peroxidasa.....	76
FIGURA 7. Esquema de análisis de Test de Peroxidasa.....	77
FIGURA 8. Metodo IFU para concentrados turbios y concentraciones > 100 ufc/mL.....	78
FIGURA 9. Método IFU para concentrados turbios y concentración < 100 ufc/mL.....	79
FIGURA 10. Método IFU de filtración por membrana para muestras filtrables.....	80
FIGURA 11. Esquema del sistema de detección microbiana por impedancia eléctrica directa.....	85
FIGURA 12. Curvas de crecimiento microbiano por impedancia eléctrica indirecta.....	87
FIGURA 13. Esquema de los ciclos de la PCR.....	89
FIGURA 14. Detección de la amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (SYBR® Green).....	98
FIGURA 15. Mecanismo de acción de sondas de hidrólisis tipo TaqMan® en el PCR en tiempo real	100
FIGURA 16. Comparación de las fases de ciclo de amplificación y detección de fluorescencia en los sistemas de PCR en tiempo real más utilizados	102
FIGURA 17. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real	103
FIGURA 18. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de uva.....	112
FIGURA 19. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de manzana.....	113
FIGURA 20. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de piña.....	114

FIGURA 21. Diagrama de flujo de procesado de zumo concentrado de naranja.....	115
FIGURA 22. Diagrama de flujo de producción de cremogenado de melocotón–nectarina.....	117
FIGURA 23. Etapas del proceso de producción de zumo puro de naranja.....	118
FIGURA 24. Etapas de activación de esporas de <i>Alicyclobacillus</i> spp. a diferentes tratamientos térmicos.....	121
FIGURA 25. Etapas de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica directa.....	122
FIGURA 26. Curvas de crecimiento microbiano detectadas por impedancia eléctrica directa.....	123
FIGURA 27. Etapas de detección de <i>Alicyclobacillus</i> spp. por impedancia eléctrica indirecta.....	124
FIGURA 28. Detección de crecimiento microbiano por impedancia eléctrica directa.....	137
FIGURA 29. Detección de crecimiento microbiano por impedancia eléctrica indirecta.....	138
FIGURA 30. Cromatograma de determinación de ácidos tartárico, málico y fumárico en zumo concentrado de uva blanca.....	146
FIGURA 31. Cromatograma de determinación de glucosa, fructosa y sacarosa de un zumo concentrado de manzana.....	148
FIGURA 32. Recta patrón de los compuestos fenólicos.....	162
FIGURA 33. Recta patrón flavonoides.....	163
FIGURA 34. Representación gráfica de la correlación obtenida entre el tiempo de detección medido por impedancia eléctrica indirecta y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de microbiología clásica empleando medio BAM Agar para la detección de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	178
FIGURA 35. Curvas de crecimiento de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> por impedancia eléctrica indirecta, donde se representa el tiempo de ensayo frente al porcentaje de cambio de impedancia en el medio de cultivo.....	179
FIGURA 36. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de uva.....	184
FIGURA 37. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de manzana.....	185

FIGURA 38. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de piña.....	186
FIGURA 39. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de naranja.....	187
FIGURA 40. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para cremogenado de melocotón-nectarina.....	188
FIGURA 41. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para cremogenado de pera.....	189
FIGURA 42. Representación gráfica de la recta de calibrado para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo puro de naranja.....	190
FIGURA 43. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de uva empleando una cepa de referencia.....	194
FIGURA 44. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de manzana empleando una cepa de referencia.....	195
FIGURA 45. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de piña empleando una cepa de referencia.....	196
FIGURA 46. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de naranja empleando una cepa de referencia.....	197
FIGURA 47. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir	

de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en cremogenado de melocotón-nectarina empleando una cepa de referencia	198
FIGURA 48. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en cremogenado de pera empleando una cepa de referencia	199
FIGURA 49. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo puro de naranja empleando una cepa de referencia	200
FIGURA 50. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de uva	204
FIGURA 51. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de manzana	205
FIGURA 52. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de piña	206
FIGURA 53. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de naranja	207
FIGURA 54. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para cremogenado de melocotón-nectarina	208
FIGURA 55. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para cremogenado de pera	209
FIGURA 56. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo puro de naranja	210
FIGURA 57. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo de sensibilidad	212
FIGURA 58. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón obtenido en agua ultrapura estéril, cuantificado el logaritmo decimal de unidades formadoras de colonias por fluorescencia	213
FIGURA 59. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón obtenido en agua ultrapura estéril, cuantificadas las unidades formadoras de colonias en logaritmo decimal por recuento en placa de BAM Agar	213
FIGURA 60. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de uva	223

FIGURA 61. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de manzana.....	223
FIGURA 62. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de piña.....	224
FIGURA 63. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de naranja.....	224
FIGURA 64. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para cremogenado de melocotón-nectarina.....	225
FIGURA 65. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para cremogenado de pera.....	225
FIGURA 66. Representación gráfica de la recta de correlación para <i>A. acidoterrestris</i> obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo puro de naranja.....	226
FIGURA 67. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de uva.....	229
FIGURA 68. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de manzana.....	229
FIGURA 69. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de piña.....	230
FIGURA 70. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de naranja.....	230
FIGURA 71. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en cremogenado de melocotón-nectarina.....	231
FIGURA 72. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en cremogenado de pera.....	231
FIGURA 73. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo puro de naranja.....	232

Índice de Tablas

TABLA 1. Especies de <i>Alicyclobacillus</i> y su fuente.....	45
TABLA 2. Rangos pH y T ^a de crecimiento de <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	48
TABLA 3. Crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en bebidas comerciales.....	61
TABLA 4. Investigación sobre el crecimiento de <i>A. acidoterrestris</i> en bebidas	62
TABLA 5. Ratio de dilución de concentrados de zumos de fruta recomendados para la detección de <i>Alicyclobacillus</i>	62
TABLA 6. Composición del medio de cultivo BAM.....	65
TABLA 7. Composición del medio de cultivo YSG-Agar.....	67
TABLA 8. Composición del medio de cultivo HGYE.....	68
TABLA 9. Composición del medio de cultivo K-agar.....	68
TABLA 10. Composición del medio de cultivo SK-agar.....	70
TABLA 11. Esquema de cantidades a añadir de muestra, caldo BAT e inóculo para el desarrollo del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> por impedancia eléctrica indirecta.....	126
TABLA 12. Volúmenes de muestra, caldo BAT e inóculo empleados en la elaboración del método de determinación de <i>Alicyclobacillus</i> por PCR.....	129
TABLA 13. Parámetros físico-químicos analizados en los zumos concentrados de uva y de manzana.....	131
TABLA 14. Parámetros físico-químicos analizados en zumos concentrados de piña, de naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja.....	131
TABLA 15. Composición de Diluyente Solución Ringer ¼	133
TABLA 16. Composición de caldo BAT.....	133
TABLA 17. Composición de BAM Agar.....	133
TABLA 18. Patrones de Trolox empleados en la determinación de la actividad antioxidante.....	159
TABLA 19. Volúmenes de reactivos adicionados a la microplaca para la determinación de capacidad antioxidante por ORAC	160
TABLA 20. Procedimiento de cuantificación de los compuestos fenólicos totales.....	162
TABLA 21. Recuentos expresados en log (ufc/mL) de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> por las técnicas de siembra en superficie y en masa	169

TABLA 22. Recuentos en log (ufc/mL) de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en BAM Agar tras inocular un zumo concentrado de manzana con distintos volúmenes de inóculo y tras aplicar diferentes tratamientos térmicos.....	170
TABLA 23. Porcentaje de recuperación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en medio BAM Agar en diferentes diluciones del inóculo la tras aplicación de choques térmicos.....	171
TABLA 24. Detección de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> por impedancia eléctrica directa.....	174
TABLA 25. Detección de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> por impedancia eléctrica indirecta.....	175
TABLA 26. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de uva.....	287
TABLA 27. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de manzana.....	290
TABLA 28. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de piña.....	293
TABLA 29. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de naranja.....	296
TABLA 30. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado melocotón–nectarina.....	299
TABLA 31. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado de pera.....	302
TABLA 32. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo puro de naranja.....	305
TABLA 33. Ecuación lineal, coeficiente de regresión y varianza explicada obtenidas para la cuantificación de <i>Alicyclobacillus</i> spp. para cada matriz a partir de (log ufc/mL) y tiempo de detección en horas.....	183
TABLA 34. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de uva empleando una cepa de referencia.....	308
TABLA 35. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de manzana empleando una cepa de referencia.....	310
TABLA 36. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de piña empleando una cepa de referencia.....	312

TABLA 37. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de naranja empleando una cepa de referencia.....	314
TABLA 38. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado de melocotón-nectarina empleando una cepa de referencia.....	316
TABLA 39. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado de pera empleando una cepa de referencia.....	318
TABLA 40. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo puro de naranja empleando una cepa de referencia.....	320
TABLA 41. Ecuación de la recta, varianza explicada y coeficiente de correlación obtenidos a partir de log (ufc/mL) y el tiempo de detección en horas empleando una cepa de referencia.....	192
TABLA 42. Comparativa de los coeficientes de correlación obtenidos con la cepa aislada a partir de un zumo de melocotón y uva comercial y una cepa de referencia de <i>A. acidoterrestris</i>	193
TABLA 43. Comparación del log (ufc/mL) obtenido mediante microbiología clásica con siembra en superficie en BAM Agar y el log (ufc/mL) obtenido aplicando cada ecuación lineal por el método de impedancia indirecta.....	201
TABLA 44. Valores de log (ufc/mL) ciclos de detección por RTi-PCR en la construcción de la recta de calibrado para el método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> a partir de la cepa de referencia.....	215
TABLA 45. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de uva.....	216
TABLA 46. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de manzana.....	217
TABLA 47. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de piña.....	218
TABLA 48. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo concentrado de naranja.....	219
TABLA 49. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado de melocotón-nectarina.....	220
TABLA 50. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en cremogenado de pera.....	221

TABLA 51. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> en zumo puro de naranja.....	222
TABLA 52. Ecuación de la recta, varianza explicada y coeficientes de correlación obtenidos a partir de log (ufc/mL) por fluorescencia y el número de ciclos (C_T).....	227
TABLA 53. Relación entre log (ufc/mL) obtenido mediante microbiología clásica con BAM Agar y log (ufc/mL) obtenido mediante RTi-PCR.....	228
TABLA 54. Valores de AIJN de los parámetros de ácidos cítrico, isocítrico, fumárico, L-málico, tartárico, fructosa, glucosa, sacarosa y pectinas solubles en agua para las materias primas empleadas en el estudio.....	235
TABLA 55. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de uva.....	236
TABLA 56. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de manzana.....	237
TABLA 57. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de piña.....	238
TABLA 58. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de naranja.....	239
TABLA 59. Parámetros físico-químicos de cremogenado de melocotón–nectarina.....	240
TABLA 60. Parámetros físico-químicos de cremogenado de pera.....	241
TABLA 61. Parámetros físico-químicos de zumo puro de naranja.....	242

Abreviaturas

A: Adenina.

AAM: *Alicyclobacillus Acidoterrestis* Medium.

AA ó AAT: *Alicyclobacillus Acidoterrestis*.

ACB: *Alicyclobacillus*.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AAHP: 2, 2'- azobis (2-amidino-propano) diclorohidrato.

AIJN: Asociación europea de productores de zumos de frutas.

BAM: *Bacillus Acidocaldarius* Medium.

BAT: *Bacillus acidoterrestis*.

C: Citosina.

Ca-DPA: Calcio – dipicolinato.

CL: Citrato liasa.

CMI: Concentración mínima inhibidora.

C₇: Número de ciclo.

dNTP: Desoxirribonucleótidos-trifosfato.

DPA: Ácido dipicolínico.

EDTA: Etilendiaminotetraacético.

FRET: Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia.

G: Guanina.

GA: Ácido galacturónico.

GAE: Ácido gálico.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

ICDH: Isocitrato deshidrogenasa.

IFU: International Federation of Fruit Juice Producers.

IMS: Separación inmunomagnética.

IR: índice de refracción.

ITR: Secuencias repetidas invertidaas.

JFJA: Japan Fruit Juice Association.

KOH: Hidróxido potásico.

L-LDH: L – lactato deshidrogenasa.

L-MDH: L – malato deshidrogenasa.

mM: Milimolar (moles/mL).

NADH: Nicotinamida – adenina dinucleotido reducido.

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato reducido.

Ng/L: Nanogramos/Litro.

nm: Nanómetro.

mM: Moles/mL.

OGM'S: Organismos modificados genéticamente.

ORAC: Oxygen Radicals Absorption Capacity.

OSA: Orange Serum Agar.

qPCR: Reacción de cadena polimerasa a tiempo real.

pb: Pares de bases.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PCR: Reacción en Cadena Polimerasa.

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal.

rpm: Revoluciones por minuto.

RTi-PCR: Reacción en cadena Polimerasa a tiempo real.

T: Timina.

TAB: Bacterias Termo-Acidófilas.

Tm: Temperatura de fusión.

Tt: Tratamiento térmico.

ufc/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro.

UV: Ultravioleta.

Valor de E o (%E): Valor de impedancia del electrodo.

Valor de M o (%M): Valor de impedancia del medio.

YSG-Agar: Yeast - Starch - Glucose Agar (Levadura – Almidón – Glucosa Agar).

µg: Microgramo.

µL: microlitro.

µM: Micromolar (milimoles/mL)

µm: Micras.

µg/L: ppb (partes por billón).

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

Introducción

En 1980, se aislaron especies de *Bacillus* acidófilos a partir de zumo de manzana, y se identificaron como un nuevo tipo de bacterias que podrían provocar mermas en la producción, con los consiguientes pérdidas económicas. Denominadas en un principio como *Bacillus acidoterrestris* (Deinhard et al., 1987), se incluyeron más tarde dentro de un género nuevo denominado *Alicyclobacillus* spp. (Wisotzkey et al., 1992).

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria termoacidófila, no patógena, formadora de esporas, capaz de crecer entre 26-60 °C (T^a óptima 42-53 °C) y en el intervalo de pH entre 2,0 y 6,0, con valores óptimos de 3,5 a 5,0 (Smit et al., 2011). Debido a estas propiedades, es considerada como una amenaza importante en la industria de zumos y bebidas de frutas (Steyn et al., 2011), originando considerables pérdidas económicas en zumos de frutas y otras bebidas de bajo pH (Silva y Gibbs, 2001; Lee et al., 2002; Jensen y Whitfield, 2003; Walker y Phillips, 2005), por la producción de sabores indeseables en el producto final. Por ello, la detección y cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. supone un desafío para las industrias de zumos de frutas, debido a que el desarrollo de sabores “a medicina”, asociado habitualmente a la formación en el zumo de compuestos utilizados con finalidad antiséptica (Cerny et al., 1984; Orr et al., 2000) tiene importantes consecuencias para las empresas. Colocar en el mercado un zumo con un sabor “no agradable” al paladar puede incidir negativamente en el consumidor, provocando un rechazo a la marca en cuestión, hecho que afecta claramente a futuras compras y quedando la imagen de la marca seriamente dañada.

Debido a la resistencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a altas temperaturas y a bajos valores de pH se han realizado diferentes estudios en productos elaborados, evidenciando que los zumos de fruta, son bastante susceptibles al deterioro por este microorganismo. Este deterioro es difícil de determinar mediante inspección visual, ya que el zumo alterado presenta un aspecto normal, con un ligero sedimento y, además, no hay producción de gas ni sustancias que alteren el pH (Silva et al., 1999; Sinigaglia et al., 2003). El microorganismo crece lentamente en los productos terminados y a concentraciones entre 10⁵-10⁶ ufc/mL –en zumo de manzana-, produce suficiente guayacol para alterar el sabor (Pettipher et al., 1997; Silva et al., 1999). Las

condiciones de almacenamiento y el pH favorecen el crecimiento, siendo uno de los factores limitantes para la evolución de este microorganismo la concentración de sólidos solubles, al ser inhibido cuando el contenido en azúcar en zumos de frutas supera los 18 °Brix.

En este sentido, la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos es uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria. Para ello, la aplicación de controles microbiológicos a lo largo de toda la cadena de procesado es imprescindible para minimizar riesgos y garantizar la calidad y seguridad de los productos destinados al consumo.

Los métodos tradicionales para la detección de microorganismos en alimentos se basan en el aislamiento e identificación de colonias en medios selectivos tras uno o varios pasos de enriquecimiento lo que alarga el proceso y, en ocasiones, el resultado no es concluyente.

Habitualmente, se emplean diferentes metodologías en el control de calidad de este microorganismo, entre ellos los métodos microbiológicos clásicos de recuento en placa, la microscopía, los análisis bioquímicos, la caracterización morfológica, la evaluación sensorial mediante el olfato (Pettipher y Osmundson, 2000) o a través de sensores [narices electrónicas (Gobbi et al., 2010)]. La mayoría de estas determinaciones requieren desde 48 horas a un par de semanas hasta que el resultado final es conocido. En consecuencia, estos métodos son inadecuados para productos que tienen una vida media limitada (por ejemplo los zumos refrigerados).

Como alternativa destacan los métodos cromatográficos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre los primeros, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permite determinar inequívocamente, los componentes volátiles producidos en zumos de frutas contaminados por *Alicyclobacillus* spp. (Bianchietal., 2010). Por otra parte, las técnicas de PCR, constituyen una buena alternativa por su rapidez, sensibilidad y precisión. La PCR a tiempo real (RTi-PCR), además, ofrece la posibilidad de cuantificar los microorganismos presentes en la muestra automatizando el proceso, lo que permite procesar un número elevado de muestras, reduciendo los problemas de contaminaciones posteriores (Connoretal., 2005; Durak et al., 2010). Sin embargo, aunque estas metodologías están siendo muy utilizadas en laboratorios de investigación, continúan siendo nuevas para los laboratorios de análisis de alimentos.

Si tenemos en cuenta que en la actualidad la mayoría de empresas tienen una producción en continuo, es deseable aplicar métodos de análisis que sean rápidos y

fiables, permitiendo así tomar medidas correctoras cuando proceda, demorando lo menos posible el proceso de producción. En este sentido, el desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de detección sensibles, que permitan la identificación rápida de microorganismos susceptibles de provocar mermas en la producción, son de especial interés para la industria alimentaria.

Las técnicas de impedancia y PCR constituyen una buena alternativa a los métodos microbiológicos clásicos de cultivo en placa por su especificidad, sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados. El sistema de identificación de microorganismos mediante impedancia eléctrica está basado en la actividad metabólica de los microorganismos, en concreto en su capacidad para crecer en medios de cultivos más selectivos. Su fundamento se basa en la detección de cambios en la conductividad eléctrica del medio de cultivo inducidos por el crecimiento microbiano. Con respecto al sistema de identificación de microorganismos mediante PCR en tiempo real, se basa en la detección de la fluorescencia emitida durante la progresión de una reacción de PCR (amplificación), disponiendo del resultado en tiempo real. La detección automatizada de la señal fluorescente evita la electroforesis posterior y los tubos de PCR se desechan sin abrir, con lo que se reduce notablemente el riesgo de contaminaciones así como el tiempo de análisis.

En la presente Tesis Doctoral se propone la aplicación de la técnica de impedancia eléctrica y la RTi-PCR para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, evaluándose asimismo su utilidad como prueba diagnóstica en el control microbiológico de distintas materias primas, como zumos concentrados, cremogenados y zumos empleados en la elaboración de zumos y bebidas de frutas comerciales.

CAPITULO II. OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo general.

El trabajo de investigación de la presente Tesis Doctoral se justifica por la necesidad que existe, dentro de la industria de la alimentación, de disponer de nuevos sistemas de análisis más sensibles, sencillos y rápidos que los que existen en la actualidad. Por ello como objetivo general se propone desarrollar y adaptar procedimientos de análisis rápidos, basados en dos metodologías distintas: *i)* impedancia y *ii)* PCR a tiempo real, como sistemas de detección y/o cuantificación de *Alicyclobacillus* spp., para ser aplicadas de forma rutinaria en el control de calidad de zumos concentrados, cremogenados y zumos utilizados en la industria de zumos de frutas.

Objetivos específicos.

Para la consecución del objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1.-Desarrollo de un método de detección y cuantificación por Impedancia Eléctrica de *Alicyclobacillus* spp., en zumos concentrados, cremogenados y zumos de frutas comerciales.

2.- Evaluación de la RTi-PCR para la detección automatizada de *Alicyclobacillus* spp., en zumos concentrados, cremogenados y zumos de frutas comerciales.

3.- Determinar la relación existente entre el crecimiento de este microorganismo y los factores intrínsecos de los zumos concentrados, cremogenados y zumos (pH, acidez titulable, contenido de ácidos orgánicos, °Brix y compuestos fenólicos totales), que pueden afectar al crecimiento microbiano.

CAPITULO III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Revisión Bibliográfica

1. Historia de *Alicyclobacillus* spp.

Bacillus acidocaldarius fue la primera especie aislada por Darlan y Brok de varios ambientes térmicos y ácidos, tanto acuosos como terrestres, del parque nacional de Yellowstone y el parque nacional volcán de Hawaien, EEUU, como la única bacteria que poseía ácidos grasos ω -ciclohexanos y haponoides, considerándose el único miembro conocido como termófilo y acidófilo de la familia Bacillus (Darland y Brock, 1971; Chang y Kang, 2004).

Por otro lado, Hippchen et al. (1981) aislaron bacilos del suelo que no eran ni termófilos ni acidófilos, pareciéndose mucho a las cepas aisladas años más tarde por Cerny et al. (1984) en un zumo de manzana alterado, informando de la presencia de ácidos grasos ω -ciclohexanos procedentes de la bacteria del género Bacillus, de origen no térmico, siendo éste el microorganismo causante del deterioro del zumo.

Años más tarde, Deinhard et al. (1987) evidenciaron como resultado de pruebas bioquímicas realizadas en 13 Bacillus termófilos y acidófilos aislados, incluyendo los aislados del suelo por Hippchen y los aislados del zumo de manzana por Cerny, que existían otras especies de Bacillus con ácidos grasos ω -ciclohexano específicos y haponoides, no exclusivos solamente de *B. acidocaldarius*.

Así, Deinhard et al. (1987) determinaron la existencia de una estrecha relación de los ácidos grasos ω -ciclohexanos y haponoides entre *B. acidocaldarius* y los aislados de orígenes no térmicos, y propusieron una nueva especie que incluía las aisladas por Hippchen y Cerny, identificada como *Bacillus acidoterrestris* (*B. acidocaldarius* y *B. acidoterrestris* difieren en el uso de fuentes de carbono). Además estos investigadores identificaron otro microorganismo del suelo poseedor de ácidos grasos ω -alicíclicos, llamado *Bacillus cycloheptanicus*, con características diferentes a las de los otros Bacillus, en cuanto al requerimiento obligado de nutrientes como metionina, isoleucina y pantotenato, pero con los mismos ácidos grasos. A través de ensayos de hibridación de ADN-ADN, demostraron la baja similitud de *B. cycloheptanicus* con *B. acidocaldarius* y *B. acidoterrestris*.

Wisotzkey et al. (1992), estudiaron las propiedades taxonómicas de *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* y *B. cycloheptanicus* usando secuencias de análisis comparativas de 16S rRNA con los siguientes resultados:

- En la comparación de la primera secuencia se observó que *B. acidocaldarius* y *B. acidoterrestris* tenían una identidad cercana (98,8%), por lo que claramente pertenecen al mismo género. Sin embargo, *B. cycloheptanicus* estaba más distante de estos dos, siendo el porcentaje de 93,2% y 92,7% respectivamente.
- En el estudio de la segunda estructura de 16S rRNAs, se vio que era idéntica o muy similar entre ellos.

Basados en los resultados de este estudio, Wisotzkey et al. (1992), propusieron que *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* y *B. cycloheptanicus* fueran reclasificados en un nuevo género *Alicyclobacillus*, debido a los ácidos grasos ω -alicíclicos contenidos en su membrana celular. Como resultado de esta clasificación, las 3 especies fueron renombradas como *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus cycloheptanicus*.

Recientemente han sido identificadas más especies de *Alicyclobacillus*: Albuquerque et al. (2000), aislaron *A. hesperidum* de suelos orgánicos. Goto et al. (2002), aislaron *A. herbarius* de té de hierbas fabricado a partir de flores secas de hibisco. Matsubara et al. (2002), aislaron *A. acidiphilus* de bebidas ácidas de Japón. Nakano et al. (2015), aislaron *A. dauci* de mezclas vegetales y zumos de frutas. Todos estos microorganismos son capaces de producir guayacol y causar deterioro en bebidas ácidas.

En la **Tabla 1** se muestran las diferentes especies de *Alicyclobacillus* y la principal fuente en la que podemos encontrarlo.

Tabla 1. Especies de *Alicyclobacillus* y su fuente.

Especies	Referencia	Fuente
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	Darland & Brock, 1971	Suelo, materia prima y bebidas, etc
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	Nicolaus et al., 1998	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1	Albuquerque et al., 2000	Suelo, materia prima, bebidas, etc
<i>Alicyclobacillus mali</i>	Kusano et al., 1997	Zumo manzana
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	Tsuruoka et al., 2003	Compost
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	Goto et al., 2002	Suelo
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	Simbahan et al., 2004	Suelo
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	Deinhard et al., 1987 Wisotzkey et al., 1992	Suelo, materia prima, bebidas, zumo manzana.
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 3 (<i>A. fastidiosus</i>)	Goto et al., 2007	Materia prima y bebidas
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	Matsubara et al., 2002	Materia prima y bebidas
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	Albuquerque et al., 2000	Suelo
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 1 (<i>A. saccharis</i>)	Goto et al., 2007	Materia prima y bebida, azúcar.
<i>Alicyclobacillus</i> sp. 2	No publicado	Suelo

<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	Deinhard et al., 1987	Suelo
<i>Alicyclobacillus sp. (A. macrosporangidus)</i>	Goto et al.,	Suelo
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	Goto et al., 2003	Zumo frutas
<i>Alicyclobacillus sp. 4 (A. contaminans)</i>	Goto et al., 2007	Suelo
<i>Alicyclobacillus sp. 5 (A. contaminans)</i>	Goto et al., 2007	Materia prima y bebidas
<i>Alicyclobacillus sp. 6 (A. kakegawaensis)</i>	Goto et al., 2007	Suelo
<i>Alicyclobacillus sp. 7 (A. kakegawaensis)</i>	Goto et al., 2007	Suelo
<i>Alicyclobacillus sp. 8 (A. shizuokaensis)</i>	Goto et al., 2007	Suelo
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	Goto et al., 2002	Hierba
<i>Alicyclobacillus sp. 9 (A. herbarius)</i>	Goto et al., 2007	Suelo
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Karavaiko et al., 2005	Suelo
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Karavaiko et al., 2005	Suelo
<i>Alicyclobacillus dauci</i>	Nakano et al., 2015	Mezclas vegetales y zumo de frutas

2. Características de *Alicyclobacillus* spp.

2.1. Morfología y propiedades fisiológicas y bioquímicas.

Alicyclobacillus spp. es una bacteria Gram (+), de forma bacilar, termófila, acidófila y formadora de esporas. Dependiendo de las distintas especies el rango de temperatura de crecimiento está comprendido entre 20 y 70 °C, siendo óptimo el intervalo 42–60 °C. También puede crecer en un amplio rango de pH, generalmente entre 2,5 y 6,0 (Pettipher et al., 1997; Walls y Chuyate, 1998; Orr et al., 2000; Yamazaki et al., 2000; Chang y Kang, 2004).

Alicyclobacillus acidocaldarius posee las características de crecimiento más extremas del grupo, desarrollándose en un rango de temperatura comprendido entre 45 y 70 °C y en un rango de pH de 2,0 a 6,0 (Walls y Chuyate, 1998; Chang y Kang, 2004). Por tanto, el crecimiento de estas bacterias se ve reducido a valores de pH y temperatura fuera de los rangos óptimos. En la **Tabla 2** se muestran los valores de temperatura y pH de crecimiento para diferentes especies de *Alicyclobacillus*.

Alicyclobacillus spp., aunque son estrictamente aerobios puede sobrevivir en condiciones micro-aeróbicas, inhibiéndose el crecimiento en ausencia de oxígeno.

Su metabolismo de azúcares tiene lugar con producción de ácido y suele variar bastante dependiendo de las especies, aunque no va acompañado de producción de gas (Goto et al., 2006). En función del estado nutricional de las células, presencia de sal, ácidos orgánicos, polifenoles y alcoholes, el crecimiento puede inhibirse, aunque algunas cepas presentan resistencia a estos inhibidores (Yokota et al., 2007).

La formación de endosporas es terminal o sub-terminal. Las colonias en BAM (*Bacillus Acidocaldarius Medium*), son de color blanco crema, no pigmentadas, planas y circulares (Darland et al. 1971; Hippchen et al., 1981; Deinhard et al., 1987; Cerny et al. 2000; Orr et al., 2000; Goto et al., 2002; Matsubara et al., 2002).

La característica más significativa de *Alicyclobacillus* spp. es la presencia de ácidos grasos ω -alicíclicos como el mayor componente de su membrana (Poralla et al., 1983; Chang y Kang, 2004).

Investigaciones sugieren que los ácidos grasos ω -alicíclicos están asociados a la resistencia de *Alicyclobacillus* spp. en condiciones ácidas y altas temperaturas.

Tabla 2. Rangos pH y T^a de crecimiento de *Alicyclobacillus* spp.

Especies	Rango T^a crecimiento	T^a óptima crecimiento	Rango pH crecimiento	pH óptimo	Referencia
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	35-70	55-60	2,5–6,0	4,5-5,0	Goto et al., 2006; Anonymous, 2009
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	45-70	63	2,5-5,0	4,0	Nicolaus et al., 1998
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 1	35-70	55-60	2,0-6,0	4,0-4,5	Albuquerque et al., 2000
“ <i>Alicyclobacillus mali</i> ”	35-65	50	2,0-5,5	4,0-5,0	Albuquerque et al., 2000
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	40-65	55	2,5-6,5	5,5	Tsuruoka et al., 2003
<i>Alicyclobacillus</i> genomic species 2	35-70	55-60	2,5-6,0	4,0-4,5	Goto et al., 2002a
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	35-65	55	2,0-6,0	4,0	Simbahan et al., 2004
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	20-55	40-50	3,0-6,0	3,5-4,0	Hippchen et al., 1981; Deinhard et al., 1987 ^a ; Wisotzkey et al., 1992; Walls y Chuyate, 1998
<i>Alicyclobacillus</i> sp.3 (<i>A.fastidiosus</i>)	20-55	40-45	2,0-5,5	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	20-55	50	2,5-5,5	3,0	Matsubara et al., 2002
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	35-60	50-53	2,5-5,5	3,5-4,0	Albuquerque et al., 2000

<i>Alicyclobacillus sp.1 (A.saccharis)</i>	30-55	45-50	2,0-6,0	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus sp.2</i>	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Goto et al., 2002a
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	30-55	50	3,0-5,5	4,0	Poralla y König, 1983; Deinhard et al., 1987b; Wisotzkey et al.,1992; Wall y Chuyate, 1998
<i>Alicyclobacillus sp. (A. macrosporangidus)</i>	35-60	50-55	3,0-6,5	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	30-60	45-50	2,5-6,5	4,4-5,0	Goto et al., 2003
<i>Alicyclobacillus sp. 4 (A. contaminans)</i>	35-60	50-55	3,0-6,0	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus sp.6 (A.kakegawaensis)</i>	40-60	50-55	3,0-6,5	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus sp. 8 (A.shizuokaensis)</i>	35-60	45-50	3,0-6,5	4,0-4,5	Goto et al., 2007
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	35-65	55-60	3,5-6,0	4,5-5,0	Goto et al., 2002a
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	4-40	35	0,5-6,0	1,5-2,5	Dufresne et al., 1996; Karavaiko et al., 2005
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	≤20-55	37-42	1,5-5,0	2,5-2,7	Karavaiko et al., 2005
<i>Alicyclobacillus dauci</i>	20-50	40	3,0-6,0	4,0	Nakano et al., 2015

Así, Wisotzkey et al. (1992) evidenciaron este hecho cuando los cultivos crecían a altas temperaturas o bajo pH. Observaron que los anillos estrechamente empaquetados de ácidos grasos ω -alicíclicos, podían formar un revestimiento de protección para la membrana celular, contribuyendo a la resistencia de *Alicyclobacillus* spp. en condiciones ácidas y altas temperaturas. Otros investigadores estudiaron la influencia de los lípidos ω -ciclohexanos en la adaptación de las membranas bacterianas en condiciones térmico-acidófilas (Kannenbergh et al., 1984; Krischke et al., 1990; Pontius et al., 1998; Vieira et al., 2002).

Excluyendo *A. pomorum*, todos los miembros de *Alicyclobacillus* poseen dos tipos de ácidos ω -alicíclicos como los principales ácidos grasos celulares (ácido graso ω -cyclohexyl y ácido graso ω -cycloheptyl). A nivel de especies, *A. acidocaldarius*, *A. acidocaldarius* subsp. *Rittmannii*, *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. disulfidooxidans*, *A. mali*, *A. hesperidum*, *Alicyclobacillus* genomic species 1, *Alicyclobacillus* genomic species 2, *A. sedaiensis*, *A. tolerans* and *A. vulcanis* poseen ácidos grasos ω -cyclohexyl. *A. cycloheptanicus* y *A. herbarius* poseen ácidos grasos ω -cycloheptyl. *A. pomorum* no contiene ninguno de estos ácidos grasos, presentando formas iso y trans de ácidos grasos ramificados.

Además del grupo descrito, existen otros microorganismos que poseen estos ácidos como, *Sulfobacillus* spp. (Golovachera et al., 1979, Dufresne et al., 1996; Norris et al., 1996), *Curtobacterium pusillum* (SuzuKi et al., 1981), *Propionibacterium cyclohexanicum* (Kusano et al., 1997), pero como componente minoritario.

La resistencia al calor y pH de *Alicyclobacillus* spp. ha dado lugar a diferentes investigaciones, incluyendo el estudio de los ácidos grasos ω -alicíclicos y los haponoides en la función de la membrana.

Otro factor asociado con la resistencia térmica de endosporas de *Alicyclobacillus*, es la presencia de proteínas y enzimas estables al calor, así como la mineralización por cationes divalentes con ácido dipicolínico (DPA), especialmente el complejo calcio-dipicolinato (Ca-DPA) (Chang y Kang, 2004; Jay et al., 2005b). La integridad estructural de endosporas de *A. acidoterrestris* a bajo pH puede estar afectada por cationes divalentes, y su resistencia al calor estar asociada a fuertes uniones de calcio y manganeso. Se observó que la resistencia térmica de endosporas de *A. acidoterrestris* fue mucho mayor por DPA y Ca que sólo con Ca (Yamazaki et al., 1997). El contenido mineral de las endosporas maduras se agota en condiciones adversas de pH, mermando en consecuencia su resistencia térmica (Bender y Marquis, 1985; Chang y Kang, 2004). Por tanto, ciertos minerales podrían tener un

efecto protector sobre las bacterias, ya que aumentan su resistencia al calor por la disminución de la actividad de agua (Jay et al., 2005b).

2.2. Alicyclobacillus como bacteria alterante.

Otro punto de interés estriba en la prevención del deterioro debido a *Alicyclobacillus* spp. La primera incidencia de alteración de zumo de manzana por *A. acidoterrestris* en 1982 convirtió a esta bacteria en un foco de gran atención y preocupación en la industria de zumos (Cerny et al., 1984). Siendo un microorganismo de deterioro potencial, el papel de patogenicidad del mismo se convirtió también en un tema de preocupación.

Con el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria, Walls y Chuyate (2000) realizaron un estudio de patogenicidad de esporas de *Alicyclobacillus* spp. que consistió en inyectarlo directamente en ratones, no detectando síntomas de la enfermedad, revelando ausencia de patogenicidad de estas cepas bajo las condiciones experimentales evaluadas. En otro estudio, conejillos de indias fueron alimentados con zumo inoculado con cepas de *A. acidoterrestris* (5×10^6 ufc/mL), no detectando signo de enfermedad alguno. Además, tampoco se ha descrito enfermedad alguna en humanos que hayan consumido zumo contaminado con este microorganismo. Por tanto, las investigaciones concluyen que *A. acidoterrestris* no es patógeno a los niveles estudiados, constituyendo el deterioro de bebidas ácidas por *Alicyclobacillus* spp. un serio problema económico para la industria de zumos de frutas y no una preocupación de seguridad alimentaria (Wall y Chuyate, 2000; Smit et al., 2011).

Splittstoesser et al. (1994 y 1996) investigaron la viabilidad de crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. en diferentes bebidas comerciales. Consiguieron aislar *Alicyclobacillus* spp. en zumos de manzana y tomate, observando una mayor concentración en zumo de tomate que en manzana. Diferentes zumos de frutas, manzana-naranja-piña (pH 2,9; 14,8 °Brix), pomelo (pH 3,2; 10,4 °Brix), naranja (pH 3,6; 12,0 °Brix), piña (pH 3,3; 13,4 °Brix), también desarrollaron alguno de los aislados ensayados. Sin embargo, arándano (pH 2,4; 14 °Brix), manzana-uva (pH 2,8-3,7; 12,2-14,8 °Brix), manzana-uva-cereza (pH 3,7; 12,4 °Brix), zumo de ciruela (pH 3,7; 18,8 °Brix) y zumo de uva Concord (pH 2,9-3,3) no dieron crecimiento.

El deterioro de zumos concentrados de fruta por *Alicyclobacillus* no es probable cuando el contenido en sólidos solubles es superior a 20 °Brix inhibiendo la

germinación de endosporas de *Alicyclobacillus* (Splittstoesser et al., 1994; Chang y Kang, 2004). Sin embargo, estas endosporas conservan su viabilidad en el concentrado de fruta, que tras la dilución a zumo, se podrían multiplicar a valores elevados causando deterioro del producto final (Borlinghaus y Engel, 1997). Posteriormente, para crear un ambiente favorable para el deterioro del zumo reconstituido, se deben dar una serie de factores combinados entre sí, como son la presencia de especies *Alicyclobacillus* con un nivel adecuado de contaminación, temperatura óptima de crecimiento, oxígeno disponible, medio constituyente, contenido de sólidos solubles apropiado, potencial redox y pH (Borlinghaus y Engel, 1997; Chang y Kang, 2004; Walker y Phillips, 2008a).

Las características físico-químicas de los zumos concentrados de frutas como son, la alta concentración de azúcar (65-80 °Brix), bajo pH (3,5-4,0), la presencia de ácidos orgánicos, baja actividad de agua (0,85-0,99) y concentraciones de oxígeno y nitrógeno reducidas, asociadas a los tratamientos térmicos aplicados para su producción, inhiben de manera considerable el crecimiento de microorganismos patógenos y mesófilos alterantes. Así, el deterioro de un zumo de frutas reconstituido a partir de concentrados va a ser ocasionado por un reducido grupo de microorganismos formadores de endosporas, bacterias Gram (+) y hongos resistentes al calor, capaces de aguantar los procesos de concentración y pasteurización (Pontius et al., 1998; Silva y Gibbs, 2004, Jay et al., 2005a, Deák, 2008).

Aunque no todas las especies de *Alicyclobacillus* son caracterizadas como microorganismos alterantes (AIJN, 2008), *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. hesperidum*, *A. cycloheptanicus*, *A. acidiphilus*, *A. fastidiosus* y *A. pomorum*; están implicados habitualmente en alteraciones de productos vegetales y frutas altamente ácidos (Yamazaki et al., 1996; Gocmen et al., 2005; Goto et al., 2007). A simple vista, la alteración de estas bebidas es difícil de detectar ya que no está asociada a la formación de gas, pero puede originar un incremento en la turbidez o formación de sedimento (Borlinghaus y Engel, 1997; Walls y Chuyate, 1998; Lusardi et al., 2000).

En el desarrollo de una estrategia para prevenir el deterioro por *Alicyclobacillus* spp., es importante investigar su resistencia al calor en bebidas comercialmente disponibles, para poder determinar si la destrucción de esporas es viable bajo las condiciones de tratamiento habituales. Así, Yamazaki et al. (1997) evaluaron la resistencia al calor de la cepa *A. acidoterrestris* AB-1 aislada de una bebida en mal estado, determinando valores de $D_{89^{\circ}\text{C}} = 10,9-13,7$ minutos y $D_{95^{\circ}\text{C}} = 2,1-3,2$ minutos, siendo el valor de D, el tiempo requerido para reducir la población microbiana 1/10, respecto a la cantidad inicial, a la temperatura de ensayo. Estos resultados indican que

el proceso de pasteurización aplicado actualmente no es suficiente para la eliminación de esporas de *Alicyclobacillus* en zumos y bebidas de frutas.

Recapitulando, el deterioro de zumos de frutas pasteurizados por *Alicyclobacillus* spp. supone un desafío para la industria alimentaria. *Alicyclobacillus* spp. como microorganismo termófilo no crece por debajo de 20 °C. Diferentes estudios revelan que el almacenamiento de zumos de frutas comerciales pasteurizados por debajo de 20 °C podría prevenir la germinación y crecimiento de esporas, y proporcionar así un importante punto de control para prevenir la alteración por *Alicyclobacillus* spp. Sin embargo, los zumos de frutas pasteurizados son generalmente almacenados y distribuidos a temperatura ambiente y dependiendo de las condiciones climatológicas donde se comercialice, puede existir un mayor o menor riesgo de alteración.

2.3. Compuestos responsables del mal olor y sus mecanismos de producción.

Alicyclobacillus es la principal causa de malos olores (olor medicinal) en zumos de frutas, y es considerado una causa grave de deterioro para la industria de zumos de frutas. Los componentes químicos determinados en casos de alteración y formación de mal olor son guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol.

En la **Figura 1** se muestran las estructuras químicas de estos componentes.

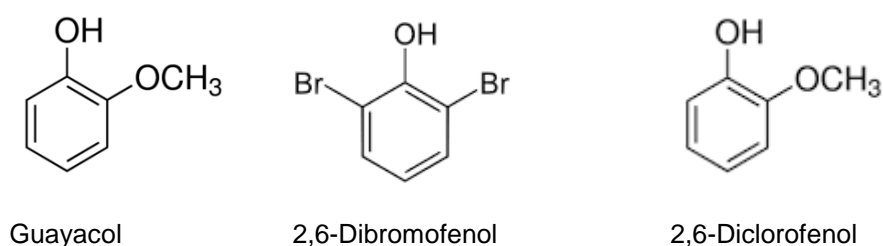


Figura 1. Estructura química de Guayacol, 2,6-Dibromofenol y 2,6-Diclorofenol.

Entre estos compuestos, guayacol es la principal y más importante preocupación, presentando un olor ácido y “medicinal”, ya que el consumidor lo detecta incluso a concentraciones muy bajas, ya que su nivel de detección sensorial es extremadamente bajo, 1 µg/L (ppb) en agua y 10 ppb en zumo de naranja. Suele

detectarse en zumos alterados, con una concentración que varía entre 10 y 200 ppb aproximadamente, dependiendo de las cepas y condiciones de trabajo (Yokota et al., 2007).

Cuando *A. acidoterrestris* es inoculado en zumo de naranja y conservado a 25 °C, el guayacol es detectado en pocos días (Pettipher et al., 1997). Basados en la experiencia de este autor, hay casos donde el crecimiento podría ser observado entre 1 y 2 días. Resultados obtenidos en estudios realizados por otros autores (Jensen, 2000), evidencian que la generación de guayacol es superior en zumo de naranja que en zumo de manzana, siendo la temperatura de 46 °C más favorable que la de 37 °C.

Dentro del género *Alicyclobacillus* spp., las especies productoras de guayacol son: *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, *A. herbarius*, y *Alicyclobacillus* sp. 2. Entre estas especies, *A. acidoterrestris* produce las cantidades más altas de guayacol, sin embargo, existen algunos estudios que describen el deterioro causado por *A. acidiphilus* y *A. herbarius* al generar guayacol. Aunque *A. herbarius* tiene la capacidad para producir guayacol, no se ha observado crecimiento en bebidas (Goto, 2000). Por el contrario, la habilidad de las especies restantes para producir guayacol no ha sido descrita (Goto, 2003).

Goto (2003) observó que durante la fase activa de crecimiento a temperaturas de 35 ó 55 °C no se producía guayacol. Sin embargo, la producción de guayacol se iniciaba cuando el número de células viables empezaba a declinar o llegaba a una fase de equilibrio.

El deterioro sensorial también se produce por la formación de otros compuestos como 2,6-dibromofenol y 2,6-diclorofenol, que como ocurre con guayacol, generan olor “medicinal”. El límite de detección sensorial para ambos componentes es de 0,5 ng/L y 6,2 ng/L, respectivamente. Jansen y Whitfield (2003) describieron que el 2,6-dibromofenol se genera transcurridas 24 horas de la inoculación de un zumo de frutas con *A. acidoterrestris* y almacenamiento a 45 °C en presencia de oxígeno.

El mecanismo de producción de guayacol como compuesto formador de mal-olor ha sido dilucidado por diferentes autores (Peleg et al., 1992; Pettipher et al., 1997; Goto, 2000), y puede deberse a una reacción oxidativa o bien por metabolismo del ácido ferúlico, vainillina o ácido vainílico, ruta descrita en la **Figura 2**.

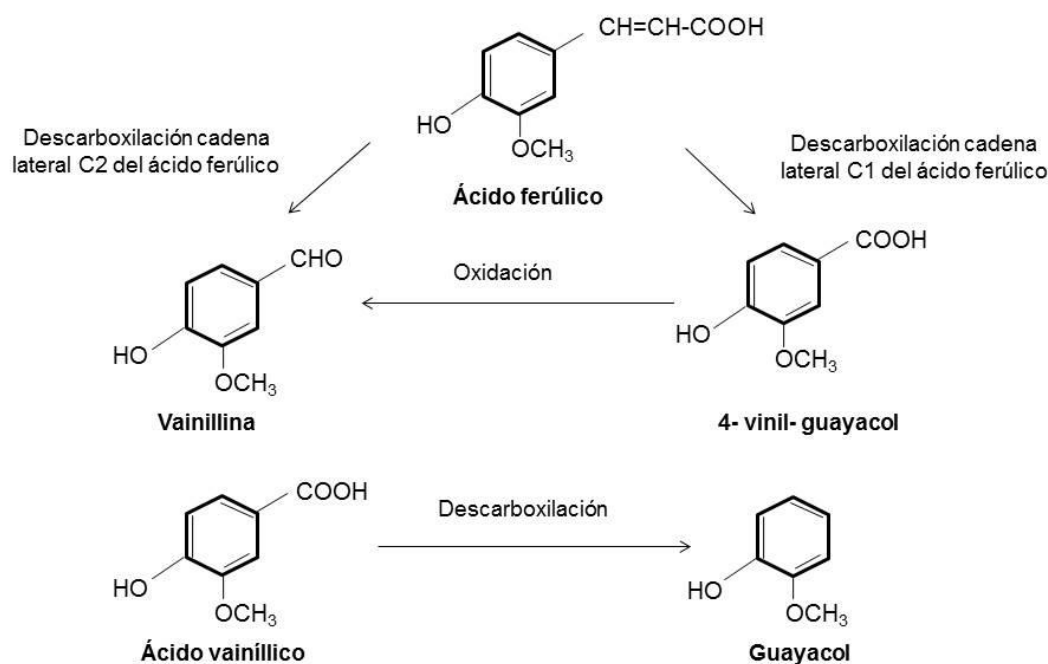


Figura 2. Síntesis de formación de guayacol.

Peleg et al. (1992) estudiaron la conversión de ácido ferúlico a vainillina y vainillina a ácido vainílico e indicaron que se trataba principalmente de una reacción oxidativa con algún proceso enzimático. Huang et al. (1993) llevó a cabo una investigación sobre la ruta del guayacol por *Rhodotorula rubra*, observando que la primera reacción, la conversión de ácido ferúlico a vainillina dependía de la enzima CoA/ATP y NAD⁺ (Nicotinamida–adenina dinucleotido). En otras investigaciones se observó que la ruta de degradación de ácido ferúlico a vinil-guayacol era catalizada por la enzima descarboxilasa ácido ferúlico (Nazareth y Mavinkurve, 1986; Rahouti et al., 1989; Edlin et al., 1995, Donaghy et al., 1999).

Podría suponerse que la biosíntesis de ácido ferúlico a vainillina tiene como componente intermediario 4-vinil-guayacol, pero hay algunos informes que indican la no-participación de 4-vinil-guayacol en la ruta (Peleg et al., 1992). Recientemente se han informado de nuevos mecanismos de producción de guayacol. Se propone que en la producción de guayacol a partir de la vainillina en zumo de naranja, no interviene el proceso oxidativo y que la reacción enzimática de *A. acidoterrestris* es la única vía dominante (Goto, 2005). Existen estudios que confirman que la vainillina y el ácido vainílico son precursores del guayacol. Una vía metabólica directa de vainillina a

guayacol parecía ser la ruta seguida por *A. acidoterrestris*, sin embargo, se ha comprobado que la conversión metabólica de ácido vainílico a guayacol es más rápida que la conversión de la vainillina a guayacol (Smit et al., 2011; Witthuhn et al., 2012). Estas reacciones se muestran en la **Figura 3**.

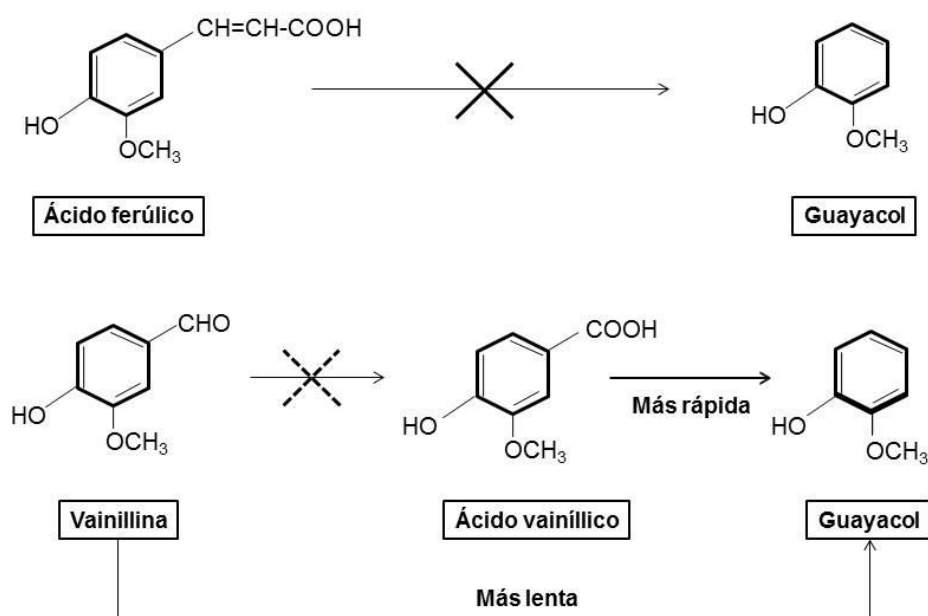


Figura 3. Producción de guayacol por *A. acidoterrestris*.

Estudios previos indicaban que el ácido ferúlico de los zumos de frutas podría ser un posible precursor de la producción de guayacol por *Alicyclobacillus* spp. Witthuhn et al. (2012) emplearon diferentes concentraciones de ácido ferúlico y vainílico para determinar si en presencia de *A. acidoterrestris* actuaban como precursores del guayacol. Los resultados obtenidos mostraron que el guayacol se sintetizaba a partir del ácido vainílico pero no en presencia del ácido ferúlico, indicando que la mayor o menor concentración de este ácido fenólico en la composición polifenólica de los zumos, no tiene influencia en el deterioro de los mismos.

Vainillina y ácido vainílico son producidos por muchos tipos de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, sin embargo la producción de guayacol se observa en muy pocos organismos, principalmente *Bacillus* y algunos

Actinomicetes (Rosazza et al., 1995); *Pseudomonas acidovorans* (Vicuña et al., 1987); *Streptomyces setonii* (Pometto et al., 1981); *Rhodotorula rubra* (Huang et al., 1993). Dentro de *Bacillus*, las bacterias conocedoras de producir guayacol son *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa* (formalmente *Paenibacillus polymyxa*) y *B. licheniformis* (Niwa, 2004).

El ácido vainílico puede estar presente en los zumos de frutas debido a la contaminación, pero también es un derivado del ácido ferúlico que forma parte del polímero lignina que se encuentra en la pared celular de las células vegetales. La lignina puede ser metabolizada por bacterias y hongos convirtiéndose en vainillina, ácido vainílico. Los microorganismos son capaces de convertir además el ácido vainílico a alcohol vainílico, catecol y metoxihidroquinona (Huang et al., 1993; Rosazza et al., 1995; Karmakar et al., 2000).

En cuanto a las reacciones que componen la síntesis de halofenoles, no existen evidencias claras en bibliografía, aunque estudios han demostrado que los compuestos necesarios para que estas reacciones tengan lugar son los compuestos fenólicos, peróxido de hidrógeno, iones haluro y haloperoxidasa. Jansen y Whitfield (2003) determinaron que a través de un sistema enzimático de *Alicyclobacillus* spp. se formaban halofenoles a partir de trazas de compuestos fenólicos, peróxido de hidrógeno e iones haluro presentes en los zumos de frutas.

3. Parámetros que afectan a la detección de *Alicyclobacillus*.

Además de los parámetros extrínsecos habituales que se tienen en cuenta para medir el crecimiento bacteriano del *Alicyclobacillus* spp. (características de los medios de cultivo, choque térmico de activación de esporas, tiempo y temperatura de incubación), otros factores intrínsecos asociados al alimento son fundamentales para detectar su presencia y determinar su concentración en los zumos y bebidas de frutas.

3.1. Temperatura de crecimiento.

Aunque el rango de temperatura para el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. es muy amplio y varía de 20 a 70 °C según las especies (Smit et al., 2011), la temperatura de crecimiento empleada por el “Unified Method for Detection of Thermo-

acidophilic bacteria” es de 45 °C; y ha sido reconocida como la temperatura óptima para la detección de *A. acidoterrestris* y otras especies productoras de guayacol.

En la bibliografía científica existen diferentes valores de temperatura que se pueden considerar óptimos para las especies de *Alicyclobacillus*, ya que el rango adecuado para la detección de *A. acidocaldarius* está entre 50-55 °C, siendo el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de estos microorganismos entre 35 y 65 °C, excepto para *A. disulfidooxidans*, *A. tolerans* y *A. ferrooxydans* que son capaces de desarrollarse a temperaturas inferiores a 20 °C (Matsubara et al., 2002, Smit et al., 2011). En el método unificado y consensuado del JFJA Working Group (“Unified method for detection of thermo-acidophilic bacteria”) utilizando YSG agar, las especies *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cycloheptanicus* y *A. hesperidum* forman colonias dentro de los 5 días de incubación a 30 °C, mientras que otras especies no lo hacen. Estas limitaciones en el crecimiento en función de la temperatura han determinado que la incubación a 45 °C, sea la temperatura de elección ya que permite el crecimiento de todas las especies (Yokota et al., 2007).

3.2. Período de incubación.

Cuando la concentración de células vegetativas viables es superior a 10^3 ufc/mL el crecimiento es satisfactorio en inoculaciones en medio líquido de YSG e incubando a la temperatura óptima de crecimiento durante 24 horas. Sin embargo, para inóculos con concentraciones inferiores a 10^2 ufc/mL el crecimiento no es detectado en 24 horas. Debido a que el crecimiento depende de la concentración inicial de células vegetativas, la metodología unificada (“Unified method for detection of thermo-acidophilic bacteria”) recomienda 5 días de enriquecimiento para asegurar el crecimiento de todas las especies de *Alicyclobacillus* (Yokota et al., 2007).

3.3. pH.

El pH de crecimiento está comprendido en el rango de 2,5 a 6,0 para las distintas especies de *Alicyclobacillus*, mostrando un pH óptimo de 4,0 en las especies más importantes que pueden verse involucradas en el deterioro de los zumos y bebidas de frutas. Es por ello que los medios de cultivo utilizados para la detección y cuantificación de este microorganismo, requieren una acificación previa hasta alcanzar los valores óptimos.

3.4. Condiciones de choque térmico.

Aunque el tratamiento térmico no es esencial para la germinación de esporas de *Alicyclobacillus* spp., tal vez debido a la alta temperatura que se utilizan durante la fase de cultivo, y tratarse de una bacteria esporulada, el método unificado (Unified Method for Detection of Thermo-acidophilic bacteria) recomienda la activación de esporas a 70 °C/20 minutos.

La utilización del choque térmico previo al cultivo tiene una doble finalidad. Por un lado facilitar la homogeneización de la germinación de esporas con el fin de tener un crecimiento más homogéneo; y por otro, eliminar otros microorganismos contaminantes como levaduras y bacterias lácticas. Por esta razón, no se considera necesario aplicar el choque térmico cuando el producto es analizado inmediatamente después de la esterilización. Pero por el contrario, cuando una muestra es analizada después de un largo periodo de refrigeración sí es aconsejable el choque térmico para sincronizar la germinación. Eiroa et al. (1999) investigaron la germinación de *A. acidoterrestris* y concluyeron que el tratamiento térmico a 70 °C durante 20 minutos era óptimo para la activación de esporas. Sin embargo, en la bibliografía científica se han utilizado diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para activar las esporas y poder cuantificar la concentración de las células vegetativas (Walls y Chuyate, 2000; Chang y Kang, 2004; Witthuhn et al., 2011).

3.5. Efecto de la concentración y tipo de zumo.

Diferentes estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto que las características físico-químicas del zumo influyen enormemente en la presencia de *Alicyclobacillus* spp. en los zumos y bebidas de frutas, ya que determina la termorresistencia de este microorganismo a los tratamientos térmicos aplicados habitualmente en la industria alimentaria.

Los tratamientos térmicos que proporcionan estabilidad comercial a los zumos de frutas y concentrados dependen de las características intrínsecas de los mismos, ya que el pH, la concentración de azúcares solubles, la concentración de ácidos orgánicos, la actividad de agua, la presencia de oxígeno reducido y la concentración de nitrógeno son inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas y alterantes (Steyn et al., 2011). Es por ello que todos estos factores afectan a la termorresistencia, y por lo tanto, a la presencia de *Alicyclobacillus* spp., siendo uno de los principales géneros bacterianos involucrados en el deterioro de las materias primas y

concentrados de frutas en la industria de zumos y bebidas (Howard, 2006). Los orígenes principales de contaminación de *Alicyclobacillus* son el suelo, pasando a la superficie de las frutas tras su recolección, y el agua de procesamiento si no contiene cloro (Wisse y Parish, 1998; Groenewald et al., 2009; Durak et al., 2010). En la guía de prácticas para el *Alicyclobacillus* de AIJN (AIJN 2008) se hace hincapié en la calidad de transporte y recirculación del agua en el proceso de elaboración de cremogenados y concentrados de zumos de frutas como fuente de contaminación y recontaminación por *Alicyclobacillus* spp. Steyn et al. (2011) determinaron el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. en las distintas etapas de fabricación de zumos concentrados de frutas con sistema de recirculación de agua.

La termorresistencia de las esporas de *Alicyclobacillus* spp. se ve incrementada en zumos con alta concentración en sólidos solubles o grados Brix y valores de pH bajo. La mayor concentración de azúcares, que se relaciona con una menor actividad agua, influye en la resistencia de las endoesporas a los tratamientos térmicos. Se ha visto este efecto en zumo de uva cuando se incrementa de 16 y 30 °Brix a 65 °Brix (Splittstoesser et al., 1998), o en zumo de limón cuando se compara un concentrado de 50 °Brix con el de 65 °Brix (Maldonado et al., 2008). Sin embargo el valor de pH presenta resultados contradictorios ya que no siempre un menor valor de pH se ha relacionado con una mayor termorresistencia, por lo que las características de los zumos también influyen. Además del valor final del pH, la termorresistencia de *Alicyclobacillus* spp. se ve afectada por el tipo de ácido utilizado para acidificar los zumos o concentrados antes del tratamiento. Así según el tipo de ácido la inhibición de *Alicyclobacillus* spp. tiene lugar en el siguiente orden: ácido acético > ácido adipínico > ácido láctico > ácido succínico. Por otro lado, la termorresistencia no se ve significativamente afectada por la presencia de ácido fumárico, ácido L-ascórbico, ácido L-málico o ácido cítrico (Pontious et al., 1998; Yamashita, 2006).

También la presencia de pectinas y el hecho de que el zumo haya sido sometido a un proceso de clarificación puede determinar la resistencia de las endoesporas, ya que la presencia de pectinas incrementa la resistencia a los tratamientos térmicos, por lo que aumenta la supervivencia y la incidencia del *Alicyclobacillus* spp., tal y como publicaron Maldonado et al. (2008) para el zumo de limón.

Además de las características del zumo también hay que tener en cuenta la especie y la cepa, ya que pueden tener una mayor o menor sensibilidad para crecer en matrices alimentarias distintas. Splittstoesser et al. (1998) investigaron el crecimiento de dos cepas de *A. acidoterrestris* en diferentes tipos de zumos, evaluando el efecto

conjunto del pH y la concentración de azúcares en distintas materias primas (**Tabla 3**). Tras la inoculación en zumo manzana, zumo de tomate, zumo de naranja, zumo de pomelo y zumo de uva blanca, así como en la combinación de zumo de manzana-naranja-piña, obtuvieron resultados positivos al observar crecimiento de una o de las dos cepas estudiadas. Posteriormente, Goto (2003) estudió el comportamiento de varias cepas de *A. acidoterrestris* en una variedad de zumos de frutas llegando a la conclusión de que el crecimiento de las cepas depende del tipo de zumo y de la fuente de aislamiento de las cepas (**Tabla 4**).

Tabla 3. Crecimiento de *A. acidoterrestris* en bebidas comerciales (Splittstoesser et al., 1998).

Tipo bebida	pH	Brix	Crecimiento	
			Cepa VF	Cepa WAC
Zumo manzana	3,5	11-11,4	+	+
Zumo tomate	4,0	7,0	+	+
Zumo manzana-uva	2,8-3,7	12,2-14,8	-	-
Zumo manzana-naranja-piña	2,9	14,8	-	+
Zumo manzana-uva-cereza	3,7	12,4	-	-
Zumo uva tinta	2,9-3,3	13,6-15,8	-	-
Zumo arándano	2,4	14,0	-	-
Zumo pomelo	3,2	10,4	+	-
Zumo naranja	3,6	12,0	+	-
Zumo uva blanca (Riesling)	3,4	10,8	+	+
Zumo uva blanca (Elvira)	3,4	7,8	+	+
Zumo uva tinta (Cabernet sauvignon)	3,7	12,2	-	-
Zumo uva tinta (Pitonage)	3,8	10,9	-	-
Zumo piña	3,3	13,4	+	-
Zumo ciruela	3,7	18,8	-	-

El desarrollo de *Alicyclobacillus* también se ve afectado por la concentración del zumo. Miembros del Grupo de trabajo JFJA (Japan Fruit Juice Association) estudiaron la posible relación entre la concentración del zumo y las características de crecimiento, examinando el perfil de crecimiento de la bacteria en varios zumos de frutas. Los resultados obtenidos confirmaron que existe una estrecha relación con el tipo de fruta. Para el zumo de naranja hubo un buen crecimiento, sin embargo tendía a inhibirse cuando el zumo alcanzaba una concentración entre 50-60% (Niwa, 2004). Para zumos con alto contenido en polifenoles, como el zumo de uva, la detección de

Alicyclobacillus se complicaba cuando el zumo se concentraba entre 10-20% (Mitsuda, 2004).

De acuerdo con todos estos resultados se estableció el ratio de dilución recomendado según la metodología unificada para la detección de bacterias termoacidófilas y se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 4. Investigación sobre el crecimiento de *A. acidoterrestris* en bebidas (Goto, 2003).

Cepas <i>A. acidoterrestris</i>									
	B2065	B2066	B2067	RB1	RB221	RB253	RB346	RB359	TAB H1
30% zumo manzana	+	+	+	-	+	-	+	+	+
30% zumo manzana	+	+	-	+	-	+	+	+	+
30% zumo limón	-	+	-	+	+	-	+	+	-
30% zumo pomelo	-	+	+	+	+	-	+	+	+
100% zumo mezclas de frutas	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Cepas B2065-B2067: aisladas de zumo de manzana; RB1, RB253 y RB346: aisladas de zumo de naranja; RB221: aislado de bebida isotónica; RB359: aislado de zumo de mango; TAB H1: aislado de zumo de piña.

+: crecimiento; -: no crecimiento.

Tabla 5. Ratio de dilución de concentrados de zumos de fruta recomendados para la detección de *Alicyclobacillus* (Goto, 2003).

Zumo concentrado de fruta	Ratio dilución
Zumo manzana (70 °Brix)	1:10
Zumo naranja (65 °Brix)	1:10
Zumo uva tinta (65 °Brix)	1:20 a 1:50
Zumo uva blanca (65 °Brix)	1:20
Zumo zanahoria (40 °Brix)	1:10
Zumo limón (50 °Brix)	1:10
Zumo pomelo (55 °Brix)	1:20
Zumo melocotón (55 °Brix)	1:10

4. Métodos clásicos de detección de *Alicyclobacillus spp.*

Una vez reconocida la importancia de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas es necesaria la búsqueda de procedimientos de aislamiento e identificación precisos.

Desde 1982, con la aparición de incidentes de contaminación por *Alicyclobacillus* (más tarde identificado como *A. acidoterrestris*) que ocurrieron en Alemania, se desarrollaron más de 40 métodos de detección de *Alicyclobacillus* en todo el mundo, obteniendo una sensibilidad y precisión diferentes entre ellos, generando conflictos comerciales entre los resultados del país de producción y después de la importación del producto.

En 2001, la “International Federation of Fruit Juice Producers” (IFU Paris, France) comenzó organizando esfuerzos de cooperación internacional hacia la normalización de métodos para detectar bacterias termo-acidófilas. Los esfuerzos dieron como resultado la publicación de “First Standard IFU-Method on the Detection *Alicyclobacillus* in Fruit Juices” en abril 2003. Más tarde, una revisión del método IFU titulado “Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices, revision 1, fue publicada en septiembre 2004 (IFU Handbook Microbiological Methods, Method No.12).

En 2002, en Japón, Japan Fruit Juice Association (JFJA) organizó una reunión con las compañías productoras de bebidas (10 en total) para discutir el desarrollo y adopción por la industria de un método unificado de detección de “bacterias termo-acidófilas (*Alicyclobacillus*)”. Los participantes estudiaron los factores que conducen a la contaminación de los alimentos por *Alicyclobacillus*, acordando un método unificado desarrollado por el grupo de trabajo de JFJA, iniciado en primavera 2003. Después de varias reuniones y colección de un largo número de datos experimentales, se propusieron varias directrices para la identificación de organismos pertenecientes al género *Alicyclobacillus* que fueron validadas por cada una de las empresas participantes. El método fue publicado en inglés el 23 de febrero de 2003 y presentado en la IFU con el objetivo de llegar a un consenso internacional. Mejoras a la metodología aprobada se añadieron por su grupo de trabajo en la primavera de 2004, y sugerencias para un método aún más sencillo y más preciso (Yokota et al., 2007).

4.1. Medios de cultivo.

Alicyclobacillus no es una bacteria capaz de crecer en cualquier medio de cultivo, ya que un requisito indispensable es la acidificación del medio de cultivo, que suele realizarse con ácido málico, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico hasta pH 3,5-4,0. Los medios de cultivo más comúnmente utilizados son BAM (Bacillus Acidocaldarius Medium), OSA (Orange Serum Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), YSG agar (Yeast-Starch-Glucose agar), HGYE y K agar (Splittstoesser et al., 1994; Silva et al., 1999; Pettipher y Osmundson, 2000; Silva y Gibbs, 2001).

4.1.1. Bacillus acidocaldarius medium (BAM).

Fue el primer medio de cultivo propuesto por Darland y Brock (1971). Este medio fue formulado para aislar *Bacillus acidocaldarius*, de ahí su nombre. Posteriormente, *A. hesperidum* también fue aislado usando BAM combinado con membrana de filtración (Albuquerque et al., 2000).

Debido de la reclasificación del género Bacillus al nuevo género *Alicyclobacillus* por Wisotzkey et al. (1992) por contener ácidos grasos alicíclicos en su membrana celular, el medio también fue renombrado por *Alicyclobacillus Acidoterrestris Medium* (AAM), aunque los dos nombres se mencionan indistintamente en la literatura.

Existen varias versiones de BAM: Farran et al. (1983) propuso la adición de 1 mL de solución de elementos traza. Deinhard et al. (1987) y Silva et al. (1999), usaron BAM con elementos traza y glucosa (5 g/L). Silva et al. (1999); Silva (2000a); Silva et al. (2000b), hicieron modificaciones del medio que consistió en la adición de tres soluciones mezcladas después de la esterilización a 121 °C durante 10 minutos, compuesta por **solución a**, **solución b** y **solución c** como se muestran en la **Tabla 6**.

Pinhatti et al. (1997) evaluaron la especificidad y sensibilidad de los medios de BAM y OSA para el recuento de *A. acidoterrestris* en un concentrado de naranja congelado. Para ello diluyeron el concentrado a la primera dilución y realizaron un choque térmico a 80 °C durante 10 minutos para la germinación de esporas. Posteriormente fue incubado para enriquecimiento a 50 °C durante 24 y 48 horas. *A. acidoterrestris* fue observado en placa después de incubar a 50 °C durante 24 horas. BAM dió recuentos ligeramente más elevados que OSA.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo BAM (Silva et al., 1999; Silva, 2000a; Silva et al., 2000b)

Solución a (ajustada con H ₂ SO ₄ hasta pH 4,0)	
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g
Extracto levadura	2,0 g
Glucosa	5,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
Agua destilada	500 mL
Solución b	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,03 g
Agua destilada	1000 mL
Solución c	
Agar	15 g
Agua destilada	500 mL

4.1.2. Orange Serum Agar (OSA).

Orange Serum Agar se ha utilizado durante mucho tiempo en el cultivo y recuento de microorganismos asociados con el deterioro de productos cítricos: Hays (1952) describió el uso de OSA para el recuento y aislamiento de microorganismos causantes de la alteración de concentrado de naranja. Murdock et al. (1952) utilizó un OSA similar que contenía 0,5% dextrosa y 2% agar en la evaluación de medios de cultivo para concentrados cítricos. Hays y Riester (1952) recomendaron OSA a pH 5,5

para el estudio de los sabores anómalos originados por deterioro de concentrado de naranja congelado.

Tras estas investigaciones OSA acidificado a pH 5,5 fue aceptado y designado como el medio de cultivo estándar para el control de microorganismos asociados a la alteración de productos cítricos. Pero este medio también fue adaptado para el aislamiento de *Alicyclobacillus* spp.

Pettipher et al. (1997) compararon Nutrient Agar, Trypticase Soja Agar, BAM; Potato Dextrose Agar (PDA), y OSA (Orange Serum Agar) para recuperar *A. acidoterrestris*. BAM, PDA y OSA observaron crecimiento mientras que en Nutrient Agar y Trypticase Soja Agar no hubo desarrollo de colonias. Comparado con PDA y BAM, la propagación de colonias en OSA dio los rendimientos más altos. Posteriormente, Jensen (2000) informó acerca de un crecimiento mejorado de *Alicyclobacillus* spp. cuando OSA era suplementado con 0,5% de sacarosa.

4.1.3. Potato Dextrose Agar (PDA).

Potato Dextrose Agar es un medio de cultivo estándar utilizado en la determinación de mohos y levaduras en leche y otros alimentos (American Public Health Association, 1976 y 1978). Puesto que la acidificación del medio de cultivo es un procedimiento frecuentemente utilizado para la inhibición del desarrollo de bacterias y facilitar así el crecimiento de mohos y levaduras, los métodos estándares recomiendan la acidificación de PDA hasta $\text{pH } 3,5 \pm 0,1$ después de la esterilización. El medio no debe ser calentado una vez acidificado, ya que el ácido hidroliza el agar y destruye sus propiedades de solidificación.

Splitstoeser et al. (1994) descubrieron el aislamiento de *Alicyclobacillus* spp. en zumos de frutas pasteurizados con mal-olor, prefiriendo PDA sobre otros medios generalmente utilizados para el cultivo de bacterias formadoras de esporas. La detección fue obtenida después de 24 horas de incubación a 43 °C en medio PDA a pH 3,5 y PDA a pH 5,6, aunque la recuperación fue mucho menor en PDA a pH 5,6.

Diferentes autores también observaron que PDA ajustado a pH 3,5 era un buen medio de cultivo selectivo para la detección de esporas de *Alicyclobacillus* spp. (Splitstoeseret al., 1998; Walls y Chuyate, 2000). Mohos resistentes al calor como *Byssochlamys* fueron completamente inhibidos sin disminuir la recuperación de *Alicyclobacillus* cuando se incubaron a 53 °C. McIntyre et al. (1995) observaron que la

esporulación en PDA (pH 3,5) era detectada entre 24 y 36 horas y un crecimiento denso de colonias, si la temperatura de incubación era elevada hasta 50 °C y 55 °C.

4.1.4. Yeast-Starch-Glucose Agar (YSG Agar).

En Japón, un medio selectivo llamado yeast-starch-glucose agar es usado para la detección de microorganismos termo-acidófilos en bebidas ácidas (Motohiro y Hiroko, 1994). La composición del medio ajustado a pH 3,7 viene indicada en la **Tabla 7**.

Este medio se ha utilizado en distintos productos de origen vegetal. Goto et al. (2002) aislaron *A. herbarius* usando filtración por membrana y YSG Agar. Para ello, suspendieron flores secas de hibisco en agua destilada, dejándolas reposar. Posteriormente pasaron el sobrenadante a través de un filtro de membrana de tamaño de poro 45 µm (micras) y diámetro 47 mm. El filtro fue colocado en YSG agar e incubado a 50 °C durante 5 días. Matsubara et al. (2002) también usaron YSG agar directamente cultivando una muestra de bebida ácida sobre la placa sin utilizar el método de filtración por membrana. Las placas fueron incubadas a 45 °C durante 3 días.

Tabla 7. Composición del medio de cultivo YSG-Agar (Motohiro y Hiroko, 1994).

Extracto de levadura	2,0 g
Almidón soluble	2,0 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 mL

4.1.5. HGYE.

Este medio de cultivo fue utilizado en un estudio realizado por Hiraishi et al. (1997) para el cultivo y aislamiento de cepas de *Alicyclobacillus* spp. El medio fue ajustado a pH 3,0 y contenía 3% agar cuando se empleó como medio sólido. Su composición se muestra en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo HGYE (Tanimoto et al., 1996)

Glucosa	0,4%
(NH₄)₂SO₄	0,3%
Trypticase soy broth	0,1%
Extracto de levadura	0,05%
MgSO₄·7H₂O	0,05%
K₂PO₄	0,01%
K₂SO₄	0,01%

4.1.6. K Medium o K agar.

K agar fue descrito por primera vez por Walls y Chuyate (1998). Para el ajuste de pH posterior a la esterilización (en autoclave a 121 °C durante 15 minutos) se empleó ácido málico 25% (p/v) filtrado y esterilizado. El medio se compone por los ingredientes reflejados en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Composición del medio de cultivo K agar (Walls y Chuyate, 1998).

Extracto de levadura	2,5 g
Peptona	5,0 g
Glucosa	1,0 g
Tween 80	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua desionizada	990 mL

Según estudios realizados con medios de cultivo, aislamientos de *Alicyclobacillus* spp. que fueron probados crecieron en K agar (pH 3,7) con crecimiento entre 1 y 2 días a 43 °C, en lugar de 5 días a 35 °C. Walls y Chuyate (1998) compararon K agar con otros medios de cultivo usados para el aislamiento de bacterias de productos ácidos, como OSA y PDA. En K agar se obtuvo una mayor recuperación de *A. acidoterrestris* que en OSA a todas las temperaturas de incubación utilizadas. En resumen, K agar fue superior que los otros medios testados, mostrando un crecimiento más rápido y una mayor recuperación. Entre todas las temperaturas

ensayadas, los recuentos más altos en K agar se consiguieron a una temperatura de incubación de 43 °C.

En el caso de muestras con una concentración baja de esporas se utilizó el sistema de filtración por membrana para concentrar las esporas y obtener así resultados más fiables para determinar la presencia o ausencia de esporas que con la pre-incubación.

Orr y Beuchat (2000) también apoyaron la recuperación de *A. acidoterrestris* en K agar en un estudio sobre los efectos de ciertos desinfectantes para eliminar esporas de *A. acidoterrestris*, obteniendo mejores resultados en K agar (pH 3,7) que en OSA y PDA.

El procedimiento descrito por Walls y Chuyate (1998) para evaluar *A. acidoterrestris* incluye choque térmico a 80 °C durante 10 minutos, con o sin filtración y posterior siembra en placas de K agar (pH 3,7), e incubación a 43 °C durante 48 horas. Sin embargo, en varios productos deteriorados por *A. acidoterrestris* y reclamados por consumidores, no fueron detectados los recuentos de esporas. Esto supone la necesidad de modificar y desarrollar un procedimiento de aislamiento con mayor sensibilidad y así reducir el número de falsos negativos en productos a base de zumos de frutas (Chang y Kang, 2004).

4.1.7. SK agar.

Este medio de cultivo fue desarrollado por Chang y Kang (2005) empleando como medio de cultivo base el K agar. Para ello estudiaron la influencia de varios factores como Tª, pH, acidulante del medio de cultivo, Tween 80 y cationes en el desarrollo de *Alicyclobacillus* spp. Para el estudio emplearon 7 cepas de *Alicyclobacillus* spp. y fueron ensayados con SK agar, K agar, PDA y OSA, obteniendo mejores resultados con SK agar, concluyendo que era más sensible proporcionando una mejor estimación de concentraciones reales de *Alicyclobacillus* spp. y potencialmente útil como medio de aislamiento utilizado en la industria de zumos.

Para ello, determinaron como factores óptimos de crecimiento: Tª de incubación 43 °C, ajuste del medio a pH 4,0 con ácido tartárico 10%, adición de 1 mL de Tween 80 por litro y 0,5 g/L de Ca²⁺. Por el contrario, observaron que suplementar con Mg²⁺ no era efectivo y con Fe²⁺ no era aconsejable.

Por tanto, el nuevo medio de cultivo quedaría con una composición indicada en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Composición del medio de cultivo SK agar (Chand y Kang, 2005).

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Tween 80	1,0 mL
Agua destilada	1.000 mL
Ca²⁺	0,5 g

La sensibilidad que obtuvieron estos autores para el aislamiento de *Alicyclobacillus spp.* con distintos medios siguió el siguiente orden: SK > PDA > K > OSA. SK agar fue capaz de recuperar recuentos bajos de contaminación de *Alicyclobacillus spp.*

4.2. Comparación de los diferentes medios de cultivo.

Henczka et al. (2013) realizaron un estudio de comparación de medios de cultivo con el fin de optimizar un método eficiente para la enumeración y detección de esporas de *A. acidoterrestris*, especialmente en productos de frutas. Para este propósito, se usaron los tres medios más frecuentemente utilizados (BAT agar, YSG agar y K agar) y el nuevo SK agar aplicado para la recuperación de esporas de *A. acidoterrestris*. También investigaron las condiciones de crecimiento y la morfología de *A. acidoterrestris*. La más alta recuperación de esporas se obtuvo con YSG agar, después por orden decreciente respectivamente fueron SK agar, BAM agar y K agar.

El alto rendimiento obtenido en YSG apoya las recomendaciones de este medio de cultivo para el aislamiento de *Alicyclobacillus spp.* en zumos de frutas hechas por International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) y la Japan Fruit Juice Association (JFJA) (IFU, 2007; JFJA, 2003). YSG agar contiene dos fuentes de carbono: glucosa y almidón soluble, que parecen ser favorables para el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Aunque YSG agar es el medio que permite la más alta recuperación de esporas de *A. acidoterrestris* entre los medios investigados, presenta algunas desventajas y limitaciones, ya que es un medio de composición simple sin ningún sistema tampón. Por esta razón, no es recomendado para incubaciones largas de *Alicyclobacillus* debido a la posible acidificación del medio que pueda ocurrir durante el

crecimiento de microorganismos. YSG agar además es compatible con el crecimiento de especies de *Alicyclobacillus* distintas a *A. acidoterrestris*. (Yokoya et al., 2007).

En comparación con YSG agar, BAT agar contiene trazas de elementos y mucha más glucosa, que puede promover el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp., mientras que K agar predominantemente soporta el crecimiento de *A. acidoterrestris* y posiblemente también el de las otras especies *Alicyclobacillus*.

Por ello BAT agar es más efectivo para la recuperación de *A. acidocaldarius*, mientras que el uso de K agar resulta más eficaz en el aislamiento de *A. acidoterrestris*.

La "American Public Health Association" propuso el uso de K agar e incubación de las placas a 43 °C durante 3 días (Evancho y Walls, 2001). Sin embargo, "Japan Fruit Juice Association" (JFJA) recomendó el uso de YSG agar e incubación a 30 °C, 5 días para el aislamiento de *Alicyclobacillus* (JFJA, 2003). Por otra parte, la "International Federation of Fruit Juice Producers" (IFU) propuso un método estándar para la detección de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas en 2004, que fue revisado en 2007 (IFU Method No. 12, titulado "Method on the detection of taint producing *Alicyclobacillus* in fruit juices"). Este método recomienda la aplicación de K agar (pH 3,7) en combinación con BAT (pH 4,0) o YSG (pH 3,7). Las placas son incubadas a 45 °C durante 2-5 días (IFU, 2007; Steyn et al., 2011).

Actualmente BAT agar, YSG agar y K agar son los medios de cultivo más utilizados para la detección de *Alicyclobacillus* spp (Henczka et al., 2013).

Existe poca investigación reportada en la literatura en cuanto a las comparaciones de recuperación de *A. acidoterrestris* usando los tres medios de cultivo más comúnmente utilizados (BAT, YSG y K agar) y SK agar. El uso de SK agar para la recuperación de *Alicyclobacillus* sólo ha sido reportada por Chang y Kang (2005) hasta la fecha.

Murray et al. (2007) investigaron 10 tipos de medios incluyendo BAT agar, YSG agar y K agar aplicados a la enumeración de esporas de *Alicyclobacillus*. Witthuhn et al. (2007) encontraron que la aplicación de PDA (pH 3,7) y OSA (pH 5,5) e incubación a 50 °C 3 días, resultó con una recuperación de *Alicyclobacillus* spp. en zumos y concentrados de frutas. La inclusión del choque térmico a 80 °C durante 10 minutos fue favorable en la detección de esporas de *Alicyclobacillus*. Estos medios se compararon con K agar, YSG agar y BAM. Witthuhn et al. (2011) compararon tres métodos para el aislamiento de *Alicyclobacillus* a partir de zumo concentrado de melocotón diluido usando tres tipos de medios (BAT agar, PDA y K agar) en

combinación con filtración por membrana. El nivel más alto de recuperación fue empleando BAT agar con estriado en placa e incubación a 45 °C durante 3 días y el menos efectivo con K agar.

Referente al tipo de técnica de análisis existen pocos estudios publicados en cuanto a la aplicación de filtración por membrana como técnica de enumeración de esporas de *Alicyclobacillus* (Pettipher y Osmundson, 2000; Goto et al., 2002; Lee et al., 2007).

4.3. Método unificado para la detección de bacterias termo-acidófilas.

Es un método de detección de bacterias termo-acidófilas que fue conjuntamente diseñado por un consorcio de 10 empresas de bebidas y la JFJA. Este método utiliza como medio de cultivo YSG (pH 3,7 ± 0,1) e incubación a la temperatura de 45 °C. Para muestras que sean susceptibles de ser filtradas se emplea el sistema de filtración por membrana adicionalmente al sistema de siembra en estría en placa empleado para las muestras que no puedan ser sometidas a filtración.

4.3.1. Método para zumos concentrados clarificados.

El método de filtración por membrana para muestras que puedan ser filtradas, consiste en diluir el zumo concentrado tomando 10 g o mL y 90 g o mL de agua o diluyente estéril consiguiendo la muestra diluida (1:10) y tratarla térmicamente a 70 °C durante 20 minutos.

Posteriormente se filtra la dilución después de tratarla térmicamente, pasándola a través de un filtro membrana de 0,45 µm de tamaño de poro y se transfiere la membrana a la superficie de una placa de YSG agar. A continuación se incuba a 45 °C recomendando incubar durante 3-5 días. El esquema de esta determinación queda reflejado en la **Figura 4**.

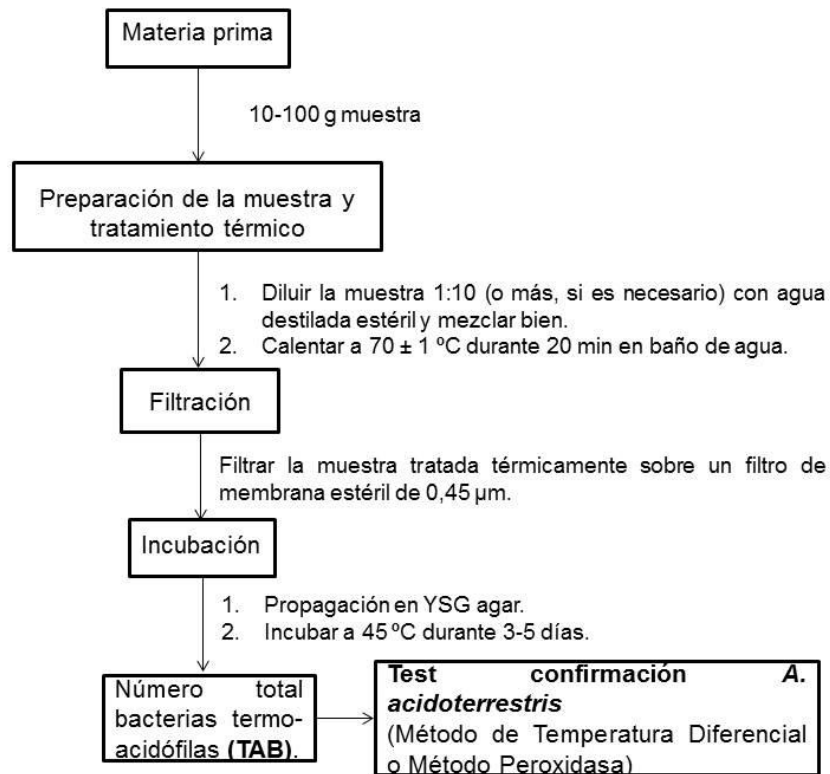


Figura 4. Método estándar de filtración por membrana para detección de bacterias termo-acidófilas (TAB).

4.3.2. Método para zumos concentrados no clarificados.

El método de siembra en estría en placa consiste en diluir las muestras concentradas de zumo, generalmente 10 g o mL de muestra + 90 g o mL de caldo YSG obteniendo la dilución (1:10). Posteriormente, se tratan térmicamente a 70 °C durante 20 minutos y se incuban a 45 °C durante 3-5 días. Transcurridos los días de incubación, la determinación del crecimiento de las colonias se realiza transfiriendo 0,1 mL de la dilución 1:10 incubada, a una placa de YSG agar por siembra en estría. Las placas se incuban a 30 °C y 45 °C durante 3-5 días para evaluar el tipo de microorganismo. Las etapas de este método se muestran en la **Figura 5**.

Para la confirmación de *A. acidoterrestris* pueden utilizarse los test de peroxidasa y test de temperatura diferencial de crecimiento, los cuales se explican a continuación.

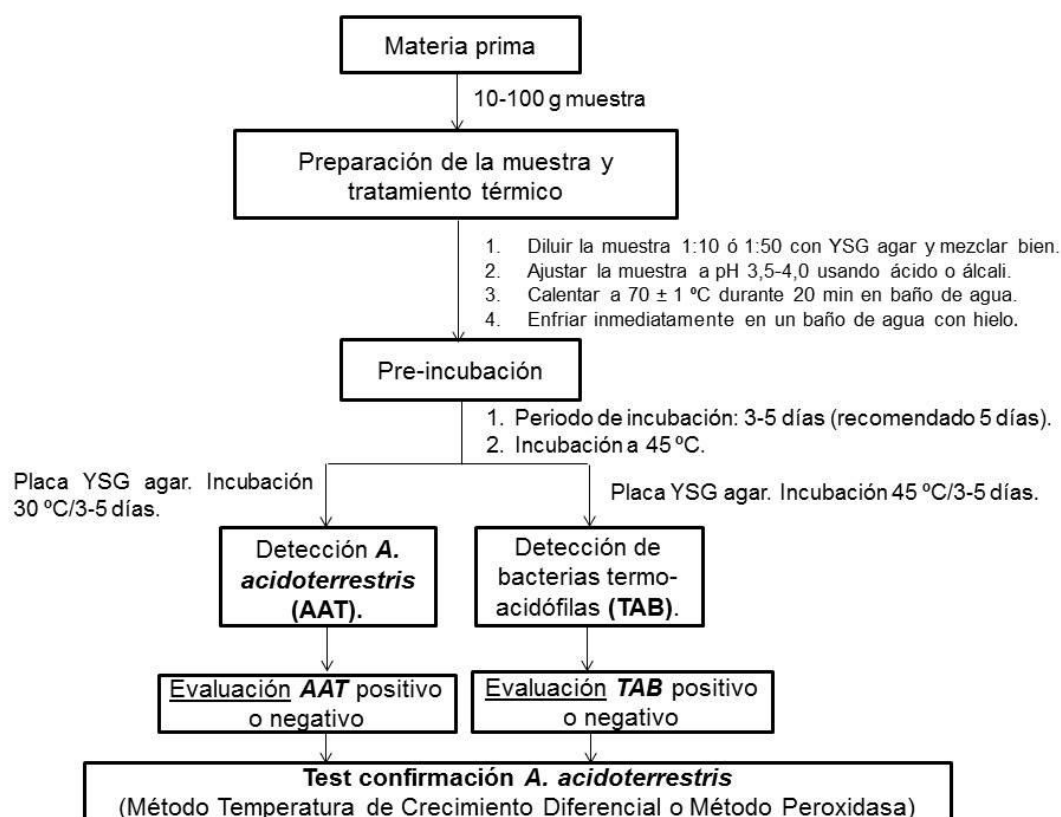


Figura 5. Método estándar de siembra y propagación para la detección de bacterias termo-acidófilas (TAB).

4.4. Métodos de diferenciación e identificación de Alicyclobacillus.

La diferenciación de las colonias detectadas de bacterias termo-acidófilas puede verificarse mediante varios sistemas de confirmación descritos en la Guía de Buenas Prácticas para *Alicyclobacillus* (AIJN, 2008).

4.4.1. Método de temperatura diferencial de crecimiento.

Este método se basa en el hecho de que *A. acidoterrestris* tiene una temperatura óptima de crecimiento relativamente baja en comparación con otras especies de *Alicyclobacillus* (Walls y Chuyate, 1998; Chang y Kang, 2004). Permite la diferenciación entre el grupo de *A. acidocaldarius* y el grupo de *A. acidoterrestris* (incluyendo *A. acidiphilus* y *A. hesperidum*) en un período de 24 horas.

En la práctica, consiste en tomar con un asa de siembra con una colonia o mezcla de colonias y extender en dos placas de YSG agar, incubando una placa a 45 °C y otra a 65 °C, observando su crecimiento después de 18-20 horas.

La interpretación de los resultados sería la siguiente:

- Crecimiento de colonia clara a 45 °C y no observación de crecimiento a 65 °C indica *A. acidoterrestris*.
- No crecimiento a 45 °C y observación de crecimiento a 65 °C indica desarrollo del grupo *A. acidocaldarius* y negativo para *A. acidoterrestris*.
- Crecimiento de colonias claras a 45 °C y 65 °C: positivo de para *A. acidoterrestris* y también para el grupo de *A. acidocaldarius* (esto significa que ambas especies pueden estar presentes en la muestra).
- No desarrollo de colonias observadas a las dos temperaturas: negativo para *A. acidoterrestris* y positivo para *A. acidocaldarius* (principalmente *Alicyclobacillus* especies genomic 1).

El grupo comprendido por *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus* y *A. hesperidum* presentan el mismo comportamiento que *A. acidoterrestris*. Sin embargo, *A. cycloheptanicus* y *A. hesperidum* no producen guayacol.

4.4.2. Método de Peroxidasa.

El método de la peroxidasa que fue desarrollado por Niwa et al. (2002) está basado en la detección de guayacol producido por *A. acidoterrestris* y otros productores de guayacol mediante reacciones enzimáticas.

Se trata de un método muy útil para la diferenciación de colonias de una placa, como especies productoras de guayacol cuando se utiliza en combinación con otras pruebas de rutina, tales como el método unificado para la detección de TAB (descrito anteriormente).

Además, puede ser utilizado para otros microorganismos productores de guayacol que no sean *Alicyclobacillus* como *Bacillus subtilis* (Niwa, 2004).

Este método consiste en la formación de guayacol a través del ácido vanílico por *A. acidoterrestris* y los demás productores de guayacol en el medio de detección. Cuatro moléculas de guayacol son convertidas a tetra-guayacol en la presencia de H₂O₂ y peroxidasa. El esquema del principio de método de peroxidasa se indica en la **Figura 6**.

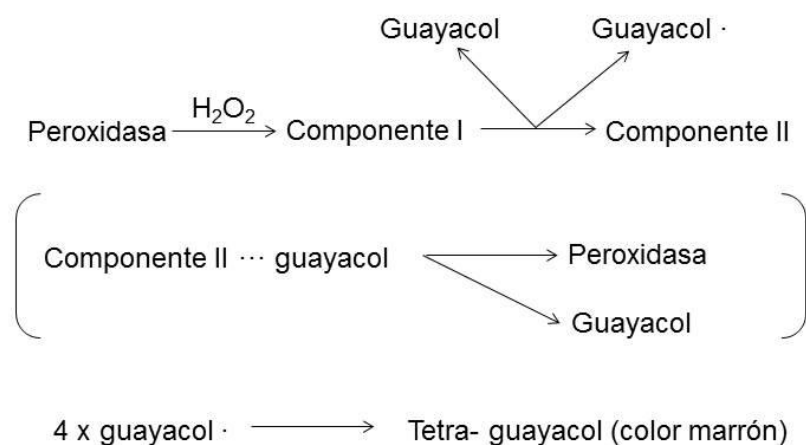


Figura 6. Principio del Método de Peroxidasa.

La determinación de guayacol se realiza mediante la observación de la diferencia de pardeamiento de la suspensión con observación respecto al control, sin necesidad de equipamiento técnico especial. Un diagrama del método de análisis se muestra en la **Figura 7**.

Actualmente, esta prueba ha sido comercializada en forma de kit de análisis por Kyokuto Pharmaceutical Co, Ltd. (Japón), reduciendo así el trabajo necesario para adecuar y validar el medio y otros reactivos (Yokota et al., 2007).

Estos kits constituyen una parte del método IFU "Method on Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices" (IFU Method No. 12, Rev. 1, September 2004) para la detección de especies de *Alicyclobacillus* formadoras de guayacol.

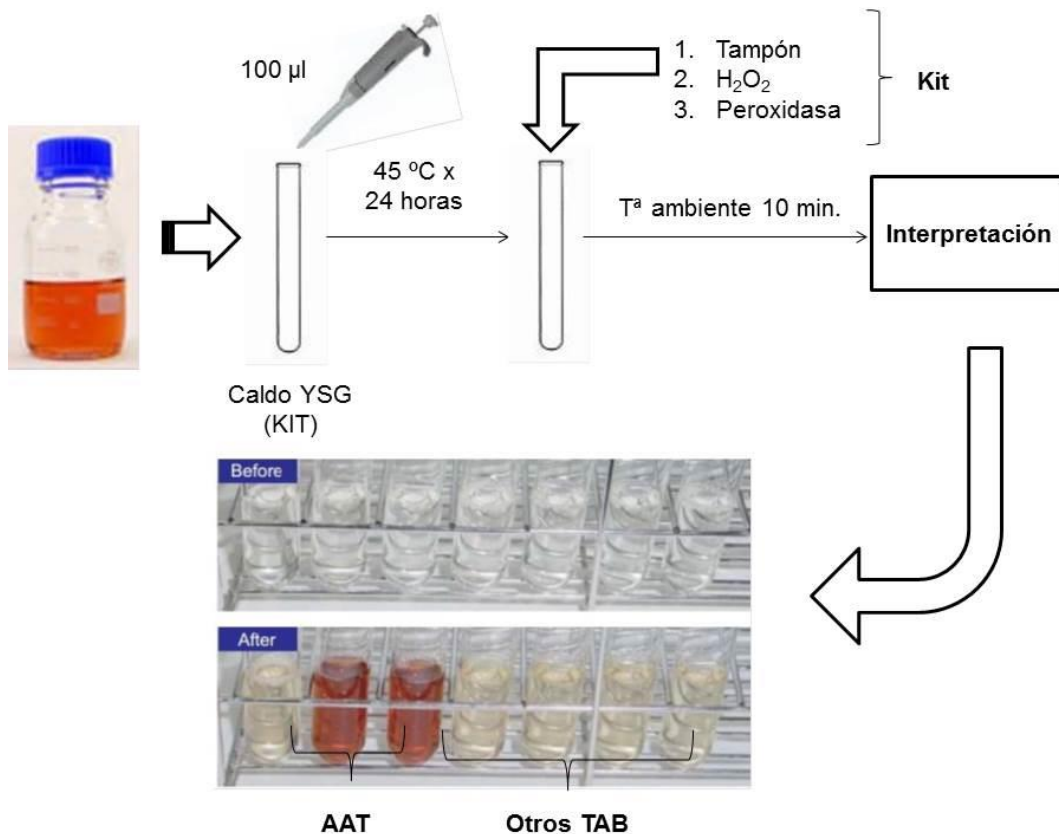


Figura 7. Esquema de análisis de Test de Peroxidasa.

4.5. Método IFU para la detección de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas.

El método IFU de detección de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas, revisión 1, fue desarrollado por el grupo de trabajo de microbiología en septiembre de 2004 y está basado en el uso de K-agar combinado con BAT agar (pH 4,0) o YSG (Yokota et al., 2007). Dependiendo del tipo de muestra, clarificada o turbia y de la concentración de *Alicyclobacillus* presente en la muestra, las etapas de análisis pueden variar, siendo común la dilución del concentrado de zumo tomando 10 mL de muestra y 90 mL de diluyente estéril (agua estéril, solución salina, tampón fosfato, caldo BAT o caldo YSG), y el tratamiento térmico a 80 °C durante 10 minutos y posterior enfriado hasta 40-45 °C.

El sistema de confirmación de este método está basado en la incapacidad de *Alicyclobacillus* para crecer en un medio de cultivo estándar a pH neutro, el crecimiento y producción de esporas a 45 °C en medio de cultivo con pH < 4,0 (K-agar

y YSG/BAT) y crecimiento poco probable a 65 °C en YSG (IFU 2007; Steyn et al., 2011).

4.5.1. Método para zumos concentrados turbios y otras materias primas con concentración de Alicyclobacillus superior a 100 ufc/ml.

Se toma una alícuota de 0,1 mL de la dilución tratada térmicamente y se siembra por estría en placa de K-agar, y YSG o BAT agar.

Incubar durante 2 a 5 días a 45 ± 1 °C.

Posteriormente se confirman las colonias desarrolladas.

Las etapas a seguir se detallan en la **Figura 8**.

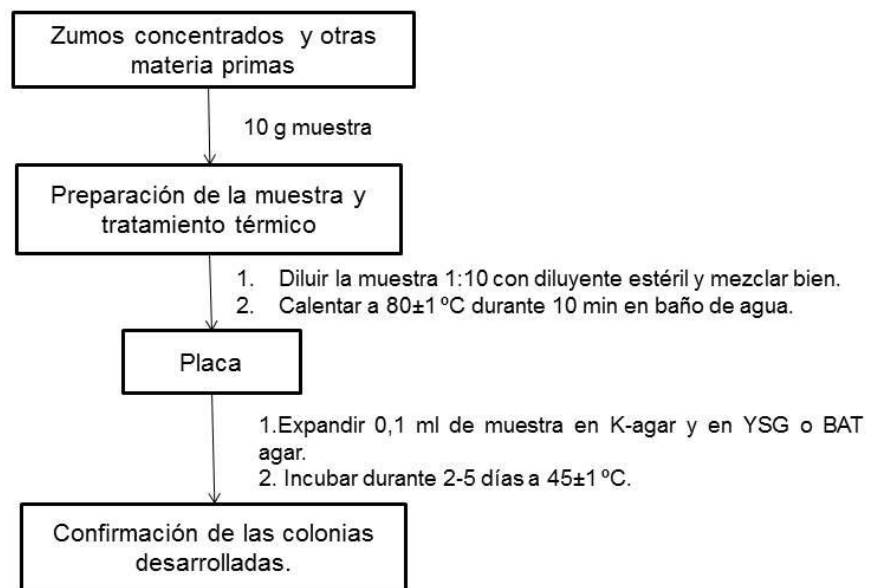


Figura 8. Metodo IFU para cocentrados turbios y concentraciones > 100 ufc/mL.

4.5.2. Método para zumos concentrados turbios y otras materias primas con concentración de *Alicyclobacillus* inferior a 100 ufc/ml.

Una vez obtenida la dilución (1:10) formada por 10 gramos o mL de muestra y 90 gramos o mL de solución salina, BAT caldo o YSG caldo, se somete a tratamiento térmico de 80 °C durante 10 minutos en un baño de agua, e inmediatamente después se enfría hasta 40-45 °C.

La dilución de la muestra tratada por calor se incuba durante 5 días a 45 ± 1 °C para su enriquecimiento.

Transcurridos 2 días, transfir 0,1 mL de la muestra enriquecida en K-agar e YSG o BAT agar e incubar las placas durante 2 días a 45 ± 1 °C.

Si no hay crecimiento en estas placas repetir la siembra después de los 5 días de enriquecimiento de la muestra.

Se realiza confirmación del crecimiento de colonias.

Los pasos del método se reflejan en la **Figura 9**.

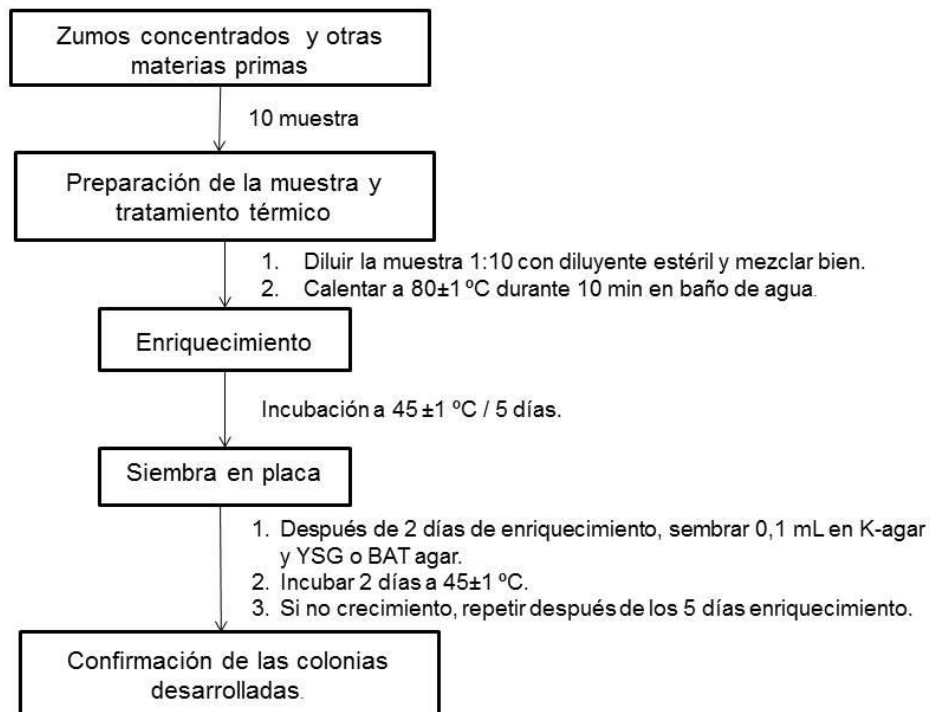


Figura 9. Método IFU para concentrados turbios y concentración < 100 ufc/mL.

4.5.3. Método para zumos concentrados y otras materias primas filtrables.

La dilución (1:10) ya calentada de la muestra se filtra a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

Colocar el filtro en una superficie de K-agar y YSG o BAT agar e incubar a 45 ± 1 °C durante un período de 2 a 5 días.

Confirmar las colonias desarrolladas.

El esquema de las etapas de análisis se refleja en la **Figura 10**.

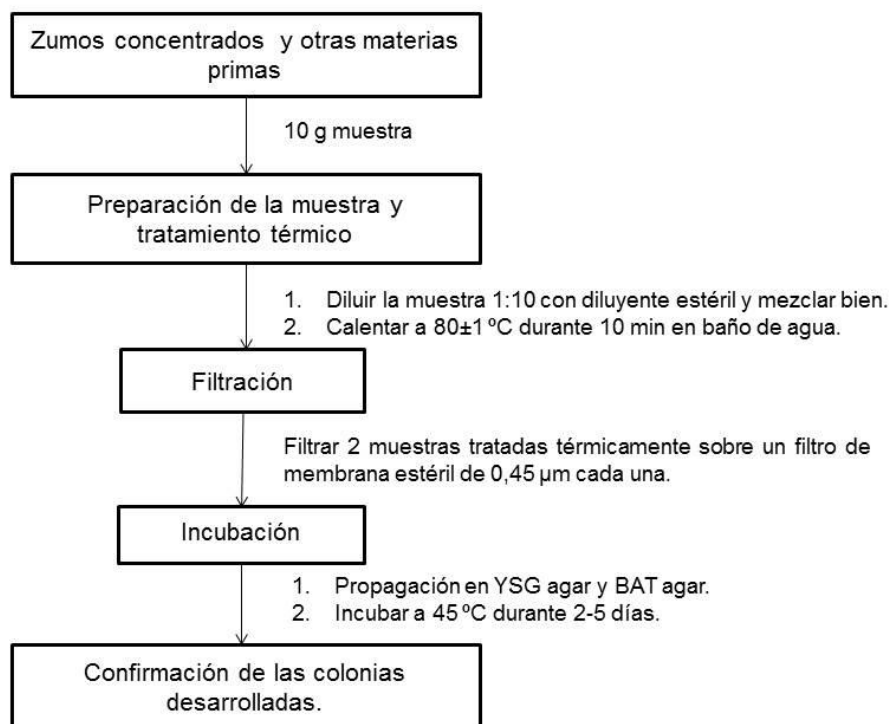


Figura 10. Método IFU de filtración por membrana para muestras filtrables.

4.5.4. Método de confirmación de Alicyclobacillus.

Consiste en examinar las colonias desarrolladas en K-agar, YSG agar y BAT agar por cualquiera de los 3 métodos descritos anteriormente.

Seleccionar un número representativo de cada tipo de colonia para realizar la confirmación.

Para cada colonia seleccionada, expandir una porción en una placa de K-agar, y otra porción a una placa con medio de cultivo a pH neutro [(7,0) ej: Plate Count Agar] y además a dos placas de YSG agar.

Incubar las palcas de K-agar, Plate Count Agar y una de YSG agar a 45 ± 1 °C durante 3 a 5 días. La segunda placa de YSG agar incubar a 65 ± 1 °C durante 2 a 3 días.

Observar el crecimiento de las placas. Si existe crecimiento en la placa a pH neutro (Plate Count Agar), el resultado es negativo de *Alicyclobacillus*.

Examinar las colonias en K-agar por microscopio de contraste de fases o realizando una tinción de esporas.

Si no hay crecimiento en K-agar observar las placas de YSG agar. La formación de esporas puede no producirse en YSG agar, de ahí que surja la necesidad de emplear BAT agar a pH < 4,0 con el objetivo de excluir bacterias formadoras de esporas y acido-tolerantes como *Bacillus coagulans*.

Observar la placa de YSG agar a 65 °C, es improbable el crecimiento de cepas de *Alicyclobacillus* a esta temperatura. Si se observa crecimiento se considera como negativo de *Alicyclobacillus*.

El registro de colonias que producen esporas a pH 3,7 y no crecimiento a pH > 6,0 y no crecimiento a 65 °C son presuntivamente *Alicyclobacillus*.

5. Sistema de detección de microorganismos por impedancia eléctrica.

5.1. Introducción.

La medición por impedancia puede utilizarse en microbiología para la detección, cuantificación e incluso identificación de algunas bacterias. El conocimiento básico de esta técnica fue proporcionado por Ur y Brown (1975); Firstenberg-Eden y Eden (1984); Silley y Forsythe (1996) y Wawerla et al. (1999).

Existen dos técnicas de medición, la directa e indirecta, ambas empleadas en microbiología. Estas dos técnicas han sido descritas ampliamente desde hace más de 30 años y han sido aplicadas gracias a la comercialización de instrumentación adecuada desde hace 20 años aproximadamente (Ribeiro et al., 2003).

5.2. Aplicaciones.

Esta metodología posee normas oficiales en Francia, normas AFNOR (Asociación Francesa de Normalización):

- AFNOR, NF V08-105. Octubre 2010. Uso de la tecnología de impedancia en el análisis de alimentos y piensos de origen animal.
- AFNOR, NF V08-106. Impedancia para la detección de *Escherichia coli* en marisco, validado de acuerdo con la norma ISO 16140.
- VALIDACIÓN AFNOR: Método de impedancia para la detección de Enterobacteriaceae y *Enterobacter sakazakii* en productos lácteos y leches infantiles de acuerdo con la norma ISO 16140.

Y normas oficiales en Alemania DIN (Instituto Alemán de Normalización):

- DIN 10115:1999-04. Bases para la detección e identificación de microorganismos mediante el método general de impedancia.
- DIN 10120:2001. Detección de *Salmonella* en alimentos usando el método de impedancia.
- DIN 10122:2005-09. Análisis de alimentos. Enumeración de microorganismos por medio del método de impedancia. Determinación del recuento de bacterias mesófilas aerobias.

Así como validaciones según ISO 16140:

- Recuento de *Escherichia coli*. en bivalvos.
- Detección de Enterobacteriaceae en leches infantiles.
- Enumeración de *Escherichia coli* en aguas de baño.
- Enumeración de *Enterococcus* en aguas de baño.
- Enumeración de coliformes en aguas de preparación.

Además, existen muchos artículos y documentos que describen aplicaciones tanto de las técnicas directa como de la indirecta, siendo la mayoría revisados por Silley y Forsythe (1996) y Waverla et al. (1999). La mayor parte de las aplicaciones se han centrado en la detección y cuantificación de microorganismos en la leche, productos lácteos, carne, pescado, verduras congeladas, productos de granos, productos de confitería, levaduras en zumos de frutas y vino y *E. coli* en potable agua.

De forma más específica, la técnica de impedancia indirecta ha permitido su uso en varias aplicaciones, tales como:

- La detección y la estimación de levaduras en zumos de fruta (Deak y Beuchat, 1993; Owens, 1989).
- Detección de bacterias alterantes de alimentos (Bolton, 1990).
- Detección y estimación de *Pseudomonas* (Franken y van der Zouwen, 1993).
- Detección de bacteriófagos específicos de bacterias lácticas (Svensson 1994).
- Detección de *Shewanella putrefaciens* (Le Den, 1995).
- *Salmonella* (Madden et al., 1996).
- *E. coli* en agua potable (Colquhoun et al. 1996).
- *Haematococcus pluvialis* (Gong y Chen, 1997).
- Detección y seguimiento de la actividad específica y el crecimiento microbiano en muestras heterogéneas (Fortin et al. 1996).
- Determinación de la sensibilidad de un antibiótico específico, siendo posible determinar la concentración mínima de inhibición de agentes antibacterianos (Sawai et al., 2002).
- Medida de crecimiento microbiano en matrices complejas de alimentos como salsas, puré calabacín, pudding de chocolate (Johnson et al., 2014)

La técnica de impedancia eléctrica directa ha sido aplicada en estudios como:

- Medición de actividad acidificante de bacterias ácido-lácticas (Nieuwenhof, 1984; Tsai y Luedecke, 1989; Latrille et al., 1992).
- Detección de bacteriófagos (Waes y Bossuyt, 1984; Carminati y Neviani, 1991).
- Detección de *Salmonella* (Pless et al., 1994).
- Detección y cuantificación de coliformes y *E. coli* en chorizo (Periago et al., 1996).
- Detección de *Bacillus stearothermophilus* (Flint y Brooks, 2001).
- Detección de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras de agua. (Szita et al., 2007).

- Cuantificación de Enterobacterias, coliformes y bacterias ácido-lácticas en el proceso de maduración de salchichón (Priego et al., 2011).

5.3. Fundamento de la técnica.

El principio de este método puede resumirse, brevemente, en que los microorganismos cuando crecen y metabolizan los componentes presentes en el medio alteran la composición química, ya que los nutrientes son consumidos produciéndose productos finales del metabolismo. Estos compuestos producen cambios en la resistencia al paso de la corriente, que son expresados como reducciones porcentuales de los valores iniciales de microorganismos, siendo medidas por las variables, valor de M y valor de E, respectivamente (Pless et al., 1994). El valor de M se refiere a las variaciones de conductividad (impedancia) producidas en el medio. El valor de E indica los cambios de impedancia producidos por los electrodos.

El tiempo requerido para la detección de cambios de impedancia está inversamente relacionado con la concentración inicial de microorganismos presentes en la muestra (Cady et al., 1978; Eden y Eden, 1984). Según Cady et al. (1978) y Silverman y Muñoz (1979) los tiempos de detección oscilan entre 2,6 a 11,4 horas en función de la concentración de microorganismos. Según Ribeiro et al. (2003) el método de impedancia posee un límite de sensibilidad de 10,9 μmol de CO_2 , y una respuesta rápida, siendo capaz de detectar de 1 a 10^8 microorganismos/mL entre 5 y 50 horas, con una repetibilidad muy buena (variación < 3%).

5.4. Técnicas de Impedancia Eléctrica Directa e Indirecta.

Existen dos técnicas conductimétricas para detectar microorganismos tanto cualitativa (presencia/ausencia) como cuantitativamente (recuento), impedancia eléctrica directa e impedancia eléctrica indirecta, siendo ambas una alternativa a los métodos tradicionales de análisis microbiológico.

5.4.1. Impedancia eléctrica directa.

Se basa en la detección de los cambios eléctricos producidos en un medio de cultivo debido a la liberación de moléculas ionizadas durante el crecimiento microbiano (Richard et al., 1986).

Así la detección de microorganismos por impedancia eléctrica directa se fundamenta en la capacidad que poseen los microorganismos para metabolizar las moléculas del medio de cultivo. Los nutrientes del medio de cultivo (glúcidos, proteínas...) son moléculas eléctricamente neutras o débilmente ionizadas. Estas moléculas son metabolizadas por los microorganismos en crecimiento y transformadas en moléculas más pequeñas, con polaridad y/o carga eléctrica, como por ejemplo ácido láctico, acético, cítrico, aminoácidos. El efecto final de esta actividad metabólica es un incremento de la conductividad eléctrica del medio de cultivo medible mediante dos electrodos sumergidos en el medio de cultivo. La no variación de la impedancia del medio de cultivo (valor de M) a lo largo del tiempo indica la ausencia de microorganismos viables. De este modo, se puede establecer una correlación entre cambios en la impedancia eléctrica y la concentración inicial de microorganismos en la muestra, por tanto, los cambios rápidos de la conductividad del medio de cultivo son debidos a elevadas poblaciones microbianas y los lentos a una menor carga microbiana inicial (Ur y Brown, 1975; Brooks, 1986; Pless et al., 1994).

En la **Figura 11** se muestra un esquema del fundamento del sistema de detección microbiana por impedancia eléctrica directa.

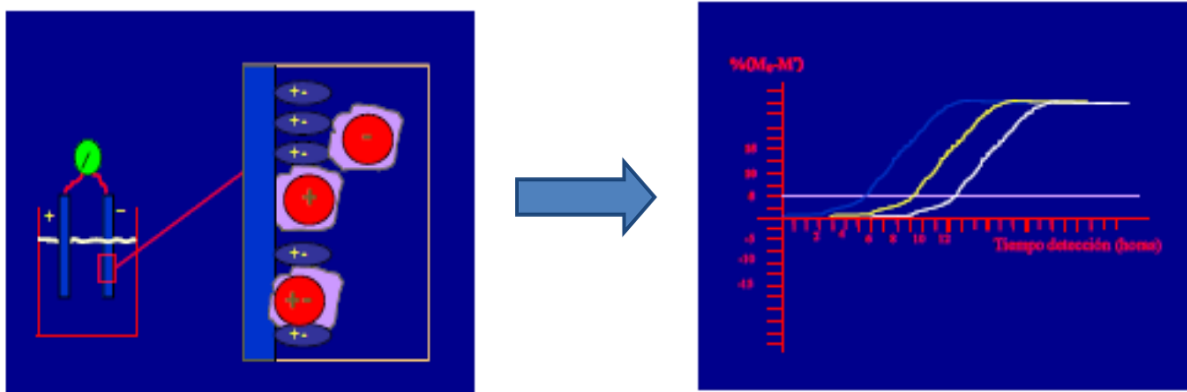


Figura 11. Esquema del sistema de detección microbiana por impedancia eléctrica directa.

5.4.2. Impedancia eléctrica indirecta.

El sistema de detección por impedancia eléctrica indirecta registra los cambios causados no sólo por el metabolismo microbiano, sino también los cambios producidos en las capas iónicas de los electrodos de medición.

Los electrodos son sumergidos en el medio de cultivo y las variaciones de impedancia derivan de los cambios en la conductancia del electrolito, a su vez producido por la actividad metabólica de los microorganismos (Silley y Forsythe 1996).

El medio de cultivo inoculado con la muestra se encuentra en una cámara separada de los electrodos y del KOH añadido. El CO₂ producido como resultado del metabolismo normal o de la actividad microbiana es absorbido por el KOH causando una disminución en los valores de impedancia.

Por lo tanto, la variación de la impedancia es cuantitativa y cualitativamente correlacionada con la producción de CO₂, según la siguiente reacción:



En consecuencia, la conductancia molar de la solución reactante ($\Delta\Lambda_0$), por mol de CO₂ (Ribeiro et al., 2003), es calculada por:

$$\begin{aligned}\Delta\Lambda_0 &= \Lambda_0(\text{HCO}_3^-) - \Lambda_0(\text{OH}^-) \\ \Delta\Lambda_0 &= 44.5 \times 10^{-4} - 198.3 \times 10^{-4} \\ \Delta\Lambda_0 &= -153.8 \times 10^{-4} \text{ S}\cdot\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}\end{aligned}$$

Esta técnica se utiliza cuando la concentración de sales del medio de cultivo es demasiado alta o demasiado baja, así el metabolismo microbiano es registrado a través de la producción de CO₂ (Owens et al. 1989).

Owens et al. (1989) describieron por primera vez el principio de esta técnica basada en la absorción de CO₂ producido por la actividad metabólica de los microorganismos que crecen en un medio de cultivo, a medida que el CO₂ es absorbido por una solución alcalina de KOH, a valores de pH por encima de 11, se convierte en carbonato que conduce a un cambio neto en la conductividad, como consecuencia de la alta actividad molar del ion hidróxido (Butler, 1982; Owens et al., 1989). Esta transformación queda dibujada en la **Figura 12**.

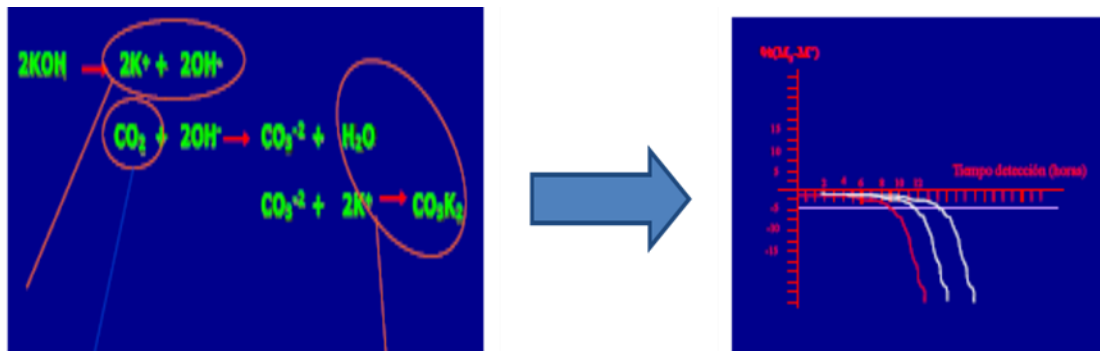


Figura 12. Curvas de crecimiento microbiano por impedancia eléctrica indirecta.

Uno de los valores potenciales de la impedancia eléctrica indirecta es que los medios de cultivo convencionales con altos niveles de sales como agentes selectivos pueden ser utilizados para la detección de bacterias patógenas, como por ejemplo, caldo Rappaport-Vassiliadis para el aislamiento de Salmonella, ya que contiene 40 g/L de cloruro de magnesio, que debido a la alta conductancia son imposibles de detectar por la técnica de impedancia eléctrica directa (Bolton, 1990; Franken y van der Zouwen, 1993; Blivet et al., 1998).

Druggan et al. (1993) estudiaron la utilidad de impedancia indirecta en la industria de alimentos y bebidas por su elevada sensibilidad y rapidez en la obtención de resultados.

Actualmente, existe un método de detección de *Alicyclobacillus acidiphilus* comercializado por la marca SY-LAB, fabricante del sistema de impedancia Bactrac mediante medida indirecta.

6. Sistema de Identificación de microorganismos por PCR.

6.1. Introducción.

Los métodos microbiológicos basados en el cultivo, además de requerir más tiempo hasta obtener el resultado final, con frecuencia pueden originar identificaciones erróneas o incluso indeterminaciones, sin llegar a identificar especies que comparten un gran número de caracteres. Además, la identificación basada en pruebas bioquímicas es un método laborioso que lleva implícito problemas de reproducibilidad

y ambigüedad, y en general presenta un bajo poder de discriminación a nivel de especie.

El desarrollo e introducción de nuevas técnicas moleculares para la detección y cuantificación de microorganismos han desplazado en los últimos años a los métodos tradicionales basados en el cultivo. Entre estas técnicas, destacan las tecnologías de ADN recombinante ya que los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos han revolucionado el campo del diagnóstico microbiano. Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye una de las técnicas de mayor utilidad para la detección e identificación de microorganismos como alternativa a los métodos tradicionales, debido a la elevada discriminación, precisión y reproducibilidad, así como a la rapidez y sencillez en la realización de dicha técnica (Hill, 1996).

Kleppe et al. (1971) describieron por primera vez los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). No obstante, hasta 1985 no fueron publicados los primeros datos experimentales por Saiki et al. (1985, 1988), aunque el descubrimiento de la PCR fue atribuido a Kary B. Mullis, investigador del mismo grupo, el cual fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1993 (Persing, 1991).

6.2. Aspectos metodológicos: Fundamentos y fases de la PCR.

El fundamento de la PCR es la amplificación in vitro de ADN mediante una ADN polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos sintéticos (cebadores o primers), diseñados para hibridar en orientación 5'-3' en cada una de las cadenas de ADN, delimitando así el fragmento a amplificar. Cada cebador determina el punto de inicio para la síntesis de una cadena complementaria de ADN añadiendo desoxinucleótidos gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa termoestable. Durante el desarrollo de la reacción, este fragmento de ADN se multiplica de forma exponencial generando múltiples copias denominadas amplicones de un fragmento concreto de un genoma, pudiéndose obtener millones de copias del mismo. El proceso consta de tres fases que se repiten cíclicamente: i) desnaturalización del ADN a temperaturas por encima de 90 °C, donde la doble hélice de ADN se separa en dos hebras, ii) unión de los cebadores a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento de ADN molde que se desea amplificar a la temperatura óptima para ello (habitualmente entre 50 °C y 60 °C), y iii) extensión de la síntesis de una cadena sencilla en la dirección 5'→3' mediante la actuación de enzima ADN polimerasa, la

cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde, originando así un fragmento de doble cadena por complementariedad (Park et al., 1993). Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8, y así sucesivamente (**Figura 13**). Si los ciclos se producen un número “n” de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

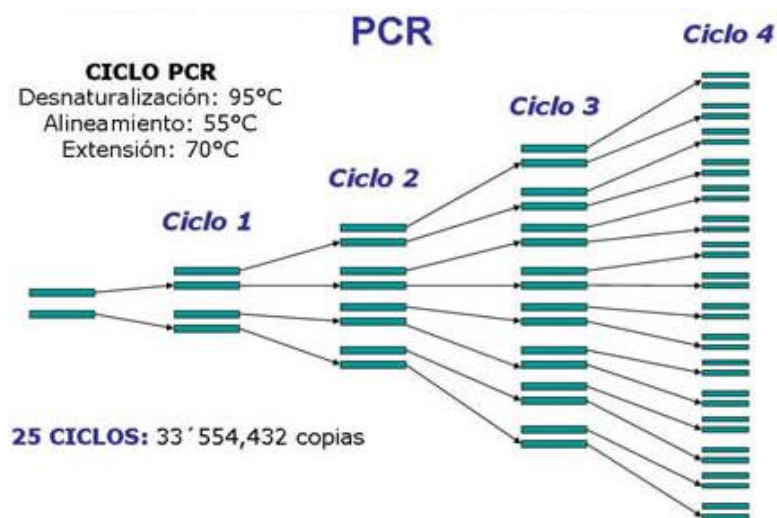


Figura 13. Esquema de los ciclos de la PCR

Debido a la sencillez de la técnica, su empleo en los laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección microbiológica. Problemas tales como la dificultad de detección de determinados virus y la imposibilidad de aislamiento de algunos microorganismos por su dificultad o incapacidad para desarrollarse *in vitro*, pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa, a veces obligada, para su empleo en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico como la medicina forense, identificación genética o control de calidad de las industrias (Sun et al., 1995; Mead et al., 1999; Blackstone et al., 2003).

En la PCR convencional, la visualización de los resultados se hace por electroforesis en gel de agarosa, en presencia de bromuro de etidio y durante la irradiación con luz ultravioleta (Kidd et al., 2000). La técnica de la PCR suele aplicarse para la identificación de microorganismos a partir de ADN purificado, así como para la detección directa desde el homogeneizado de la muestra (clínica, ambiental,

alimentos), ya que no precisa del aislamiento previo del microorganismo y por tanto puede aplicarse a poblaciones mixtas. Uno de los inconvenientes de la técnica de la PCR clásica es que no discrimina entre células vivas y muertas, incluso puede amplificar restos de ADN procedentes de células inactivadas (Josephson et al., 1993). En cuanto a la metodología, las principales dificultades incluyen hacer accesibles los ácidos nucleicos y eliminar los inhibidores de la reacción de PCR en un rango amplio de matrices complejas (Wilson, 1997).

Un aspecto importante para que la PCR se lleve a cabo en condiciones óptimas es el diseño de los iniciadores o cebadores. Son oligonucleótidos o moléculas de ADN monocatenario de entre 15 y 30 nucleótidos que la enzima ADN polimerasa termoestable emplea para comenzar a polimerizar, de forma que el punto de inicio de la síntesis de nuevas moléculas de ADN lo establece la posición del iniciador. Es condición indispensable que los cebadores sean específicos del ADN que se vaya a amplificar. Para ello, es habitual recurrir a la información recopilada por otros investigadores y almacenada en las bases de datos.

6.3. Diseño de métodos de identificación de microorganismos mediante amplificación específica de ADN.

Los métodos de identificación de microorganismos basados en cebadores específicos se han desarrollado gracias al incremento de la información genómica en las bases de datos, cada vez disponible para más especies, que posibilitan la búsqueda de polimorfismos susceptibles de usarse para el diseño de cebadores específicos de especie. Bajo condiciones adecuadas, estos cebadores producen amplificación sólo si en la muestra se encuentra presente el ADN de la especie para la que han sido diseñados. Los análisis mediante PCR con cebadores específicos de especie son relativamente rápidos, pero suelen requerir otros procedimientos posteriores, como secuenciar el producto amplificado o digerir con nucleasas de restricción. Como se ha descrito anteriormente, la PCR se basa en la amplificación in vitro del ADN que permite la obtención de microgramos (μg) de ADN a partir de cada molécula inicial (Saiki et al., 1988). Cualquier segmento de ADN o de ARN puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes con las que puedan hibridar los oligonucleótidos complementarios que actúan como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. Una pequeña disminución en la eficacia de cada ciclo puede reducir enormemente la producción final. Así, si disminuye la eficiencia un 5% en cada ciclo, tras 25 ciclos se conseguiría sólo la mitad del producto

esperado. Por esto, es conveniente optimizar las concentraciones individuales de cada componente de la reacción y los parámetros de temperatura y tiempo. No todos los componentes tienen la misma importancia, siendo los más críticos, la concentración del ión magnesio, el diseño y selección de los cebadores, la optimización de temperaturas, tiempos y la propia muestra (Ling et al., 1991).

Los resultados de PCR son muy sensibles a las condiciones de amplificación por lo que deben ser cuidadosamente controladas para lograr repetitividad y evitar posibles variaciones entre laboratorios o experimentos así como falsos negativos y falsos positivos (Edwards y Gibbs, 1994). Entre los muchos factores que pueden influir en el resultado final del PCR, son destacables el diseño apropiado de los cebadores, la calidad y concentración del ADN, la presencia de inhibidores o de contaminación, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de ADN polimerasa y el programa de amplificación. Para controlar los resultados de la reacción deben realizarse en las mismas condiciones que las muestras a analizar los siguientes controles descritos a continuación (Kocher y Wilson, 1991):

- Control negativo: una reacción con todos los reactivos excepto el ADN molde para comprobar la ausencia de ADN contaminante en todos los reactivos. La contaminación puede deberse a una molécula de ADN remanente de un proceso previo, a un cruce contaminante con otra muestra, a un operador, o incluso a microorganismos presentes en el ambiente.
- Control de extracción: PCR realizado con muestra procedente de una extracción realizada en paralelo con agua destilada para comprobar la ausencia de ADN en las soluciones de extracción o detectar ADN contaminante.
- Control positivo: es una reacción realizada con ADN molde conocido, para comprobar el correcto funcionamiento de las soluciones de extracción y detectar ADN transportado entre muestras.
- Control interno positivo: es una reacción en la que, además de la muestra de ADN a analizar, se añade ADN control que amplifique con los cebadores. Este control es útil para determinar si la muestra de ADN contiene inhibidores de la PCR, y se suele utilizar cuando es crítico evitar la aparición de falsos negativos.

En la práctica, la reacción PCR es compleja, pues la concentración de los cebadores y de los nucleótidos libres disminuye en cada ciclo, mientras que va

umentando la cantidad de producto. La competencia de unión entre los cebadores complementarios y los productos hace que el sistema llegue eventualmente a un límite en el que la cantidad de producto no se incrementa, por lo que el número óptimo de ciclos depende de la concentración inicial de ADN una vez que la reacción se ha optimizado (Innis et al., 1999).

Otra limitación de esta técnica viene dada por los errores que comete el enzima Taq polimerasa. Las sustituciones de bases ocurren aproximadamente $1,1 \times 10^{-4}$ pb (pares de bases) y los cambios de estructura y mutaciones en una cada $2,4 \times 10^{-5}$ pb. Esto es debido probablemente a la ausencia de actividad exonucleasa 3'→5' en la enzima purificada. Un error en $1,1 \times 10^{-4}$ pb parece insignificante, sin embargo, tras 30 ciclos de amplificación da un error cada 300 pb de muestra. Estos errores serían observables si la amplificación se realiza a partir de una única molécula de ADN, no obstante, si la reacción de PCR se realiza a partir de cientos de moléculas de ADN estos errores son únicamente el 0,3% de las muestras y no son observables (Tindall y Kunkel, 1988).

6.3.1. Diseño de cebadores y sondas.

La región de ADN a amplificar debe estar limitada por oligonucleótidos definidos que hibridan con la molécula diana. Esto significa que la secuencia de ADN debe ser ya conocida, o al menos predecible con un 90% de certeza en las regiones donde el cebador hibrida (Lockley y Bardsley, 2000a). El grado de variación genética a lo largo del genoma de un microorganismo no es constante, por lo que su identificación molecular debe dirigirse a áreas del genoma que sean suficientemente significativas para diferenciarlos de otros microorganismos cercanos.

En cuanto al diseño de los cebadores para lograr la especificidad de especie, se ha demostrado que el extremo 3' del cebador es crítico para la amplificación. En condiciones adecuadas de reacción, un desapareamiento del nucleótido situado en ese extremo inhibe la amplificación. El uso de cebadores específicos basados en cambios de base en el extremo 3' han sido descritas para la discriminación de especies filogenéticas muy próximas (Kwok et al., 1990; Lockley and Bardsley, 2002). Los desapareamientos en la región interna del cebador afectan a su especificidad dependiendo de su carácter y posición relativa. Cuantitativamente, se ha encontrado que las hibridaciones con cambios en los nucleótidos Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G) tales como A-A, G-A, A-G, C-C, producen una disminución de la amplificación mucho más acusada que si se trata de otros cambios como A-C, C-A, T-

G, G-T (Stadhouders et al., 2009). Los cebadores con T, C o G en el extremo 3', son más específicos que los que contienen el nucleótido A ya que estos últimos logran la amplificación independientemente de los nucleótidos del ADN diana. En el caso de que la especificidad se base en el penúltimo nucleótido, la eficiencia de amplificación se reduce, especialmente si se trata del nucleótido A (Ayyadevara et al., 2000). Por otra parte, un desapareamiento en la zona central del cebador tiene un efecto mucho más drástico en la temperatura de anillamiento que los desapareamientos en las zonas laterales (Hall et al., 2001; Rennie et al., 2008).

6.3.2. Factores de la PCR a considerar en las aplicaciones de identificación de microorganismos.

6.3.2.1. Extracción de ADN: material de origen, método de extracción, cantidad requerida y calidad.

En general, para la reacción de PCR no es necesario disponer gran cantidad ni calidad de ADN, pudiendo este encontrarse tanto en estado mono como bicatenario. En alimentos es importante conocer el origen de las muestras, así como los posibles procesos a los que han sido sometidas. Los tratamientos térmicos pueden producir precipitación de proteínas que se arrastran durante el proceso de purificación e inhiben finalmente la PCR. Una fragmentación excesiva de ADN producida por calor puede igualmente afectar la amplificación al producirse fragmentos de menor tamaño que el amplicón. En el caso de muestras envasadas sometidas a tratamiento térmico, el rendimiento suele ser bajo. Sin embargo, una ligera fragmentación del ADN sería incluso deseable, ya que se facilitaría la desnaturalización de la muestra y permitiría un mejor acceso a la misma del cebador y la polimerasa.

La cantidad de ADN utilizada por reacción es muy variada, desde microgramos (μg) a cantidades tan pequeñas como el ADN extraído de una sola célula (Zhang et al., 1992). En principio, no parece que la cantidad de ADN a utilizar sea determinante en el proceso, y únicamente sería necesario que la muestra contenga al menos una cadena intacta de ADN que incluya la región a amplificar y en la cual las impurezas estén lo suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización. En la práctica, el número de copias mínimo de secuencia molde para que se detecte el producto final

tras la amplificación depende de la sensibilidad de cada método y de las condiciones de reacción (Teletchea et al., 2005).

6.3.2.2 Componentes de la reacción de PCR.

- Polimerasa: a pesar de que existen distintos tipos de ADN polimerasas termoestables con diferentes características, en la mayoría de los métodos de identificación descritos hasta ahora se usa la Taq ADN polimerasa. Es una ADN polimerasa termoestable con actividad 5'→3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. Por esto último, no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma. También posee una actividad terminal transferasa que ajusta un solo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del fragmento amplificado.

Existen dos formas de Taq polimerasa disponibles: una enzima nativa purificada de *Thermus aquaticus* y una enzima producida por métodos genéticos en *E. coli* (Myers y Gelfand, 1991). Existen variantes comerciales, como la denominada AmpliTaq®, una forma modificada por ingeniería genética de la enzima diseñada para Hot-Start PCR. Esta polimerasa es inactiva hasta que se incuba 7-10 minutos a 95 °C por lo que impide totalmente la unión de cebadores no específicos y la formación de dímeros de cebadores durante el tiempo de preparación.

- Los cebadores: son oligonucleótidos de 15-30 bases, los cuales actúan como punto de partida para que la enzima ADN polimerasa alargue sus extremos 3', copiando la cadena complementaria del ADN de la muestra con la que hibridan previamente. Definen los extremos 5' del fragmento amplificado (producto corto de la reacción) ya que es la última base que puede copiar la enzima. La longitud del cebador debe ser lo suficientemente larga como para tener una zona homóloga específica en el genoma con la que hibride de forma estable a la temperatura de anillamiento (Kocher y Wilson, 1991). En principio, los dos cebadores que delimitan el fragmento a amplificar pueden estar muy separados en el genoma ya que la reacción puede amplificar fragmentos de hasta varias kilobases de longitud. En la práctica, se seleccionan las posiciones más próximas que permitan cada uno de los métodos de análisis, ya que la amplificación es más eficiente y robusta cuanto menor es el tamaño del

amplificación. Como regla general se seleccionan cebadores teniendo en cuenta las siguientes premisas (Saiki et al., 1988):

a) Seleccionar cebadores con un contenido en G y/o C de al menos el 50% para facilitar la unión al ADN molde a temperatura relativamente alta que impida las uniones inespecíficas.

b) Evitar la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas o que sean complementarias entre sí, especialmente en sus extremos 3', ya que podrían dar lugar a la formación de los denominados dímeros de cebadores (también conocidos por su denominación en inglés, primer-dimer). Cuando los extremos 3' de los cebadores hibridan, se forma dicho artefacto que al ser polimerizado por la enzima, reduce la eficiencia de la amplificación.

c) Se debe evitar, además, la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3'. Los cebadores suelen utilizarse a una concentración entre 0,1-1,0 μM (milimoles/mL), lo que disminuye el riesgo de formación de productos inespecíficos y de artefactos (dímeros de cebadores). Concentraciones más elevadas pueden provocar el inicio en lugares ectópicos con la consiguiente amplificación de secuencias no diana, y por el contrario, el PCR es extremadamente ineficaz cuando la concentración del cebador es limitante.

- Ión Magnesio (Mg^{2+}): la concentración de magnesio afecta a los siguientes aspectos de la reacción de PCR (Kocher y Wilson, 1991):

i. Hibridación del cebador con el ADN molde; ii. Temperatura de disociación de las cadenas, tanto de ADN molde como de los productos del PCR, por lo que afecta a la especificidad de los productos del PCR; iii. Continuidad de la actividad de la ADN polimerasa. La carencia de Mg^{2+} puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad y puede incrementar las uniones inespecíficas y la formación de artefactos, como por ejemplo dímeros de cebadores (Eckert y Kunkel, 1990).

Aunque en la mayoría de los métodos de identificación de microorganismos que utilizan PCR se mantiene una concentración de ión magnesio estándar de 2,5 mM (moles/mL), existen algunos casos en los que condiciones particulares de hibridación obligan a optimizar experimentalmente su concentración. Por otra parte, la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u otros quelantes en la solución de ADN molde pueden afectar a la cantidad de Mg^{2+} libre, enmascarando la concentración de Mg^{2+} óptima para la reacción (Innis et al., 1999).

6.4. La PCR en tiempo real (RTi-PCR).

Las técnicas basadas en PCR son muy sensibles, detectando niveles no apreciables con otros métodos. Sin embargo, esa sensibilidad es una desventaja cuando la legislación del etiquetado permite cierto grado de contaminación. Un argumento muy común en contra del uso de las técnicas basadas en PCR es que, es demasiado sensible y trazas de material pueden dar falsos positivos (Sawyer et al., 2003). Por otra parte el uso de métodos de PCR clásicos no permite la cuantificación del ADN en la muestra de una forma sencilla y robusta, por lo que éstos sólo son adecuados en aplicaciones cualitativas. Por esto, en los últimos años se ha extendido el uso de técnicas de PCR en tiempo real o Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR o RTi-PCR), que difiere de la PCR clásica en que permite el análisis continuo de la amplificación del ADN y que fue puesta a punto por Higuchi et al. (1993). Se basa en la detección de fluorescencia asociada a cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR, lo que permite obtener una cinética del incremento de fluorescencia de la que se pueden calcular datos cuantitativos, absolutos o relativos, del número de copias de ADN molde inicial en la mezcla de reacción (Brodmann y Moor, 2003). Además, el ciclo de amplificación que se toma para realizar los análisis presenta la ventaja de que ningún componente se encuentra limitando el transcurso de la reacción por lo que la amplificación se encuentra en su fase exponencial (Heid et al., 1996). Los métodos de PCR en tiempo real se han convertido en la tecnología más ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de ADN, por contar con una enorme sensibilidad, ser muy específico de la secuencia, no llevar asociado procesos post-amplificación y lograr un mayor rendimiento de muestra (Wong y Medrano, 2005). El uso del PCR en tiempo real presenta la ventaja de permitir la realización de medidas en un estado de amplificación temprano (fase exponencial), consiguiendo mayor precisión que los análisis a tiempo final y la posibilidad de prescindir del análisis electroforético de los productos del PCR (Bustin et al., 2005). Además, mediante el uso de sondas o intercalantes fluorescentes se pueden diseñar amplicones muy cortos, lo que es crítico cuando se analiza ADN procedente de muestras forenses deterioradas o alimentos procesados (Wittwer et al., 1997b). Cuando se utilizan sondas fluorescentes se logra un aumento en la especificidad de la señal recogida en la reacción, y habitualmente no es necesario realizar ningún análisis posterior para completar la identificación (Heid et al., 1996). La disponibilidad de diferentes fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda permite, además, diseñar de forma sencilla sistemas múltiplex en los que se analizan simultáneamente hasta cuatro marcadores en la misma mezcla de reacción. Finalmente, el hecho de que el ciclo en

el que se alcanza un nivel de fluorescencia determinado es inversamente proporcional al número de copias inicial de ADN molde en la reacción, permitiendo realizar medidas cuantitativas (Higuchi et al., 1993).

En el desarrollo de la reacción de RTi-PCR se diferencian tres etapas: la desnaturalización del ADN, la hibridación de los cebadores y sondas y la extensión o polimerización 5'→3'. La cuantificación de las muestras se realiza durante la fase exponencial (Heid et al., 1996), donde la eficiencia de la reacción es del 100%, ya que en esta fase la cantidad de producto acumulado se duplica en cada ciclo de amplificación. Se pueden utilizar diversos sistemas para el seguimiento en tiempo real de la amplificación por PCR basados en fluorescencia: agentes intercalantes, sondas de hidrólisis, sondas de hibridación o sondas con estructura de horquilla (Wittwer et al., 1997a). La elección de la química de la sonda tiene un impacto sobre la sensibilidad de ensayos de PCR y debe considerarse como una estrategia de optimización (Josefsen et al., 2009).

A continuación se detallan las opciones de sondas más utilizadas de las disponibles en el mercado.

6.4.1. Agentes intercalantes en la molécula de ADN.

Son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR[®] Green (Wittwer et al., 1997b). SYBR[®] Green es un fluorocromo del grupo de las cianinas que se une al surco menor del ADN de doble cadena, principio por el cual se puede hacer seguimiento del transcurso de la amplificación como se muestra en la **Figura 14**. El producto sintetizado en cada ronda de amplificación puede visualizarse de forma continua, siendo la intensidad de luz emitida proporcional a la cantidad de complejo SYBR[®] Green-ADN en la solución (Wittwer et al., 1997a). La gran ventaja que presenta es que al unirse a cualquier ADN de doble cadena, no requiere ni el diseño ni la optimización de las sondas marcadas. Por lo tanto, una vez que tenemos un ensayo de PCR diseñado, podemos realizarlo en tiempo real.

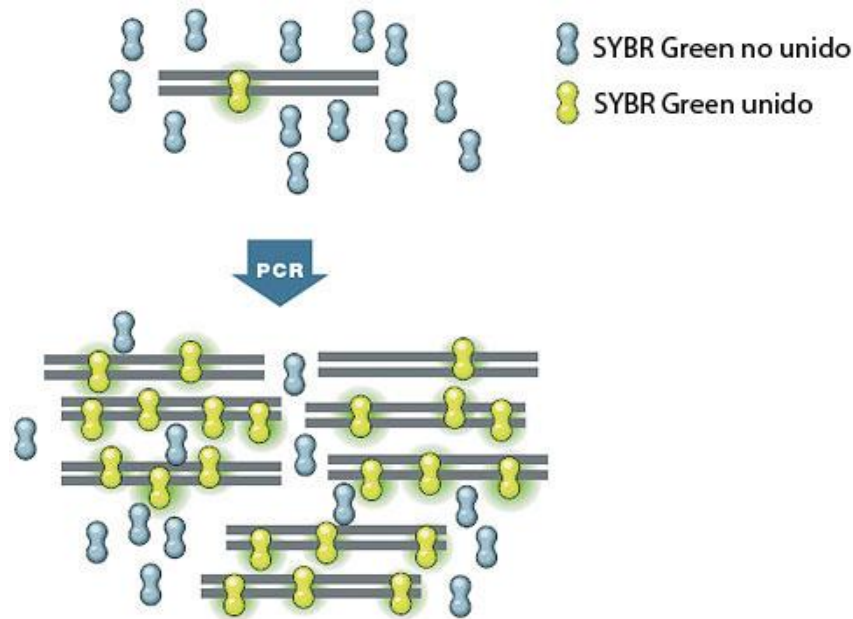


Figura 14. Detección de la amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (SYBR[®] Green). El colorante se une al surco menor del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario. Como consecuencia de esta unión, se produce un incremento de la señal fluorescente (representado en color verde). Debido al aumento de la cantidad de ADN recién sintetizado tras cada ciclo del PCR, la emisión de fluorescencia aumenta en proporción al número de moléculas del ADN bicatenario presentes en la mezcla.

Es la opción más sencilla y económica para la detección con PCR en tiempo real. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es que no dan información sobre la especificidad de la reacción, sin distinguir entre productos de reacción específicos de los inespecíficos (como los dímeros de oligonucleótidos), con lo que existe la probabilidad de detección de falsos positivos. Por tanto, la sensibilidad del SYBR[®] Green detección está limitada por la formación de productos inespecíficos (Wittwer et al., 1997a). Por este motivo, la mayoría de los protocolos que usan esta aproximación toman precauciones adicionales y se apoyan para confirmar los resultados de medida de fluorescencia del PCR en análisis de los productos por electroforesis. Algunos autores proponen el uso de las curvas de fusión de los productos de PCR. SYBR[®] Green permite distinguir las señales obtenidas a partir de distintos productos de PCR y así diferenciar unos fragmentos de otros mediante el estudio de sus distintas temperaturas de fusión (T_m = temperatura a la que el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada). Al separarse las dos cadenas cuando alcanzan la T_m se produce una disminución de la fluorescencia, que puede medirse y asociarse a cada producto de reacción (Ririe et al., 1997). De esta forma se asegura la identificación del producto amplificado que ha sido detectado (Hernández et al., 2003).

Esta aproximación es más conveniente que el análisis mediante electroforesis, al evitar operaciones manuales post-amplificación.

6.4.2. Sondas de hidrólisis.

Las sondas de hidrólisis se basan en el fenómeno de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia o tecnología FRET (Clegg, 1995). Las sondas de hidrólisis TaqMan® (Holland et al., 1991) son las más utilizadas en los métodos descritos de PCR en tiempo real. La tecnología TaqMan® está basada en la actividad 5'→3' de la Taq polimerasa y en la utilización de una sonda doblemente marcada. Las sondas son secuencias de oligonucleótidos cortas marcadas con una molécula fluorescente en su extremo 5' y otra molécula apantalladora de fluorescencia en 3', cuyos espectros de excitación y emisión solapan, por lo que cuando están próximas producen el fenómeno de extinción de fluorescencia o *quenching* por FRET. De esta forma, cuando la sonda está intacta no se produce la emisión de fluorescencia, sin embargo, cuando hibrida con su molde de ADN complementario y es hidrolizado por la actividad exonucleásica 5'→3' de la Taq polimerasa en su avance para generar el producto de amplificación, se emitirá fluorescencia (**Figura 15**).

El incremento de la fluorescencia estará en relación directa con la aparición del producto amplificado (Heid et al., 1996). Los protocolos habituales para el uso de las sondas TaqMan® en el PCR en tiempo real, requieren que su T_m , esté 10 °C por encima de la T_m de los cebadores. Para cumplir este requisito, la sonda debe alcanzar aproximadamente 27 nucleótidos. Esto puede suponer una dificultad que obstaculiza el uso de la sonda para la discriminación de grupos de microorganismos, ya que puede ser difícil encontrar una región conservada de ADN en la que se den todos los requisitos para los cebadores y la sonda, y se encuentren espaciados adecuadamente. Una forma de eludir el uso de sondas de hidrólisis largas es la utilización de oligonucleótidos modificados por unión de moléculas, que aumentan la afinidad por el surco menor del ADN (sondas MGB, del inglés *minor groove binding*), permitiendo reducir el tamaño de la sonda hasta tamaños de 13 a 16 nucleótidos (Afonina et al., 1997).

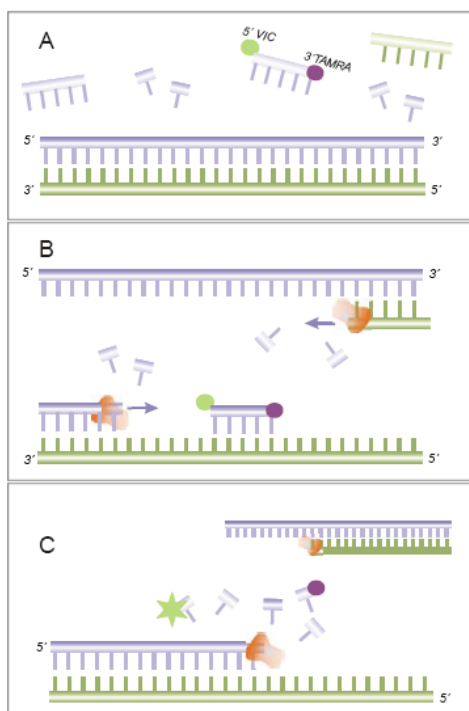


Figura 15. Mecanismo de acción de sondas de hidrólisis tipo TaqMan® en el PCR en tiempo real. **A.** La reacción contiene inicialmente los cebadores, nucleótidos y la sonda marcada en 5' con un fluorocromo (VIC) y en 3' con un amortiguador de fluorescencia (TAMRA). **B.** La sonda y los cebadores se unen al ADN diana y se inicia la síntesis de la cadena de ADN. **C.** La actividad 5'→3' exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza la sonda en su avance para generar el producto de amplificación. Al separarse los fluoróforos se produce la consiguiente emisión de fluorescencia. Como consecuencia, el número de moléculas que emiten fluorescencia aumenta en la misma medida que se produce la amplificación del ADN diana.

6.4.3. Sondas de hibridación en tándem.

Las sondas de hibridación tipo tándem (Heid et al., 1996; Wittwer et al., 1997b), están constituidas por dos oligonucleótidos complementarios al ADN diana en regiones adyacentes en disposición cabeza-cola marcados cada uno con fluorocromos cuyos espectros de emisión y excitación solapan (**Figura 15**). Cuando ambos se unen al ADN diana en la etapa del PCR de la hibridación de los cebadores, el donador es excitado por una fuente de luz externa pasando al fluorocromo aceptor adyacente parte de su energía mediante interacciones dipolo-dipolo, y la emisión se registrará a una longitud de onda distinta. La cantidad de luz emitida será proporcional al número

de sondas unidas al ADN complementario, que se incrementa con cada ciclo de PCR (Heid et al., 1996).

6.4.4 Sondas de horquilla (Molecular Beacons).

Las sondas con estructura de horquilla (Molecular Beacons), poseen secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos permitiendo que formen una estructura de horquilla por complementariedad de las regiones invertidas (Tyagi y Kramer, 1996; Abravaya et al., 2003; Tan et al., 2004). Esta estructura secundaria lleva unidos de manera covalente en cada extremo, un fluorocromo y una molécula apantalladora de fluorescencia o quencher, produciéndose entre ellos el fenómeno FRET. La zona del tallo tiene secuencias que hibridan para mantener la estructura, y la zona del bucle presenta la secuencia específica del ADN diana. La unión de la sonda al ADN es dependiente de la temperatura, de forma que a la temperatura de fusión, si está presente en la muestra la secuencia diana del bucle de la sonda, ésta sufrirá un cambio de conformación despegando su tallo y uniéndose a su ADN complementario. Al alejarse el fluorocromo del *quencher* se registrará un aumento de fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado. Al igual que las sondas FRET, en las sondas horquilla la ADN polimerasa empleada no presenta actividad 5'→3' ni 3'→5' exonucleasa. Su principal ventaja es que el sistema es altamente específico (las dianas han de ser exactamente complementarias) ya que al ser competitivo entre dos secuencias que dan lugar a distintas conformaciones, se ha de producir un cambio conformacional para la hibridación con la secuencia específica. Además, ofrecen la posibilidad de combinarlas con distintos agentes fluorescentes para identificar varias secuencias diana en la misma reacción (Múltiplex). Sin embargo, tienen el inconveniente de requerir secuencias largas y tener una gran dependencia de la temperatura de hibridación.

Se han desarrollado otras variantes basadas en estructura de horquilla, como el sistema ScorpionTM, que utiliza cebadores que incorporan en el extremo 5' un bucle que mantiene próximos a un fluorocromo y un quencher. El cebador se diseña de forma que, en parte del lazo, contiene una secuencia complementaria a la región 3' de la misma cadena en el ADN diana, de manera que, una vez extendida la secuencia por la polimerasa se forma una estructura de bucle extendido que aleja el fluorocromo del quencher, registrándose la fluorescencia (Whitcombe et al., 1999). El sistema AmplifluorTM (Nazarenko et al., 1997; Uehara et al., 1999) usa una aproximación similar con un cebador en estructura de horquilla que contiene el fluorocromo y el

quencher, pero no requiere situar una secuencia complementaria en la región de la horquilla, ya que es la propia progresión de la síntesis de la cadena complementaria a partir del segundo cebador la que da lugar a la pérdida de la estructura y el alejamiento de las moléculas fluorescentes. Se han realizado varios estudios comparativos con estos sistemas de detección de amplificación en tiempo real (Josefsen et al., 2009; Gasparic et al., 2010) y, si bien los resultados pueden ser excelentes en todos ellos, los métodos basados en sondas o cebadores en horquilla pueden plantear algunas dificultades debido a la complejidad del diseño de las secuencias y su dependencia de un ajuste muy exacto de la temperatura de hibridación y de lectura de fluorescencia. En la **Figura 16** se muestra un esquema-resumen de los sistemas de detección de fluorescencia en PCR en tiempo real.

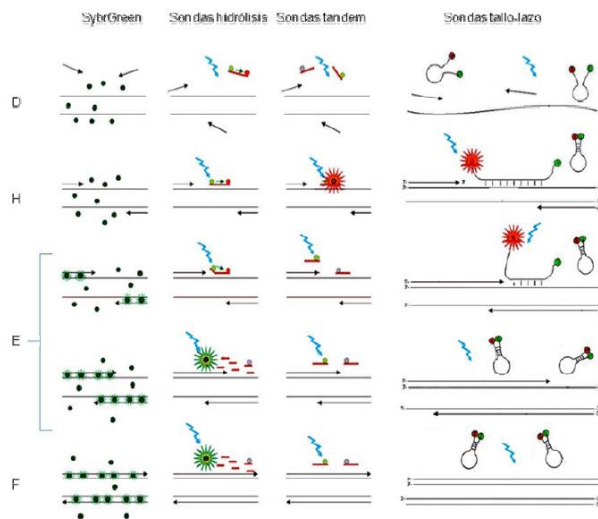


Figura 16. Comparación de las fases de ciclo de amplificación (D: desnaturalización; H: hibridación; E: extensión; F: final tras el ciclo) y detección de fluorescencia en los sistemas de PCR en tiempo real más utilizados. SYBR[®] Green; Sondas de hidrólisis; Sondas Tandem: marcadas con fluoróforos aceptor y donante respectivamente, se unen durante la etapa de la hibridación de los cebadores. El fluoróforo donador es excitado por una fuente de energía externa transfiriendo parte de su energía de excitación al fluoróforo aceptor adyacente que emite la señal fluorescente; Sondas Tallo-Lazo: sus extremos 5' y 3' se encuentran unidos covalentemente a un fluoróforo y a un inhibidor próximo. En la etapa de la hibridación, en presencia de la secuencia complementaria, se despliega alejándose el fluoróforo del inhibidor e iniciando su fluorescencia.

6.4.5. Cuantificación.

La principal ventaja del uso del PCR en tiempo real es la posibilidad de cuantificar el ADN de partida gracias al registro del aumento de fluorescencia por la hidrólisis de la sonda en el transcurso de los ciclos de PCR. La cuantificación se realiza comparando el número de ciclo, C_T , en el cual la muestra problema alcanza un mismo nivel de fluorescencia que una muestra patrón, cuya concentración inicial o número de copias de ADN es conocida. Si en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas y, por tanto, la fluorescencia registrada, el valor C_T debe ser proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra. En la **Figura 17** se muestra el incremento en fluorescencia registrado durante el progreso de un PCR en tiempo real y la relación entre los valores de C_T de dos muestras que parten de distinto número de copias de ADN diana.

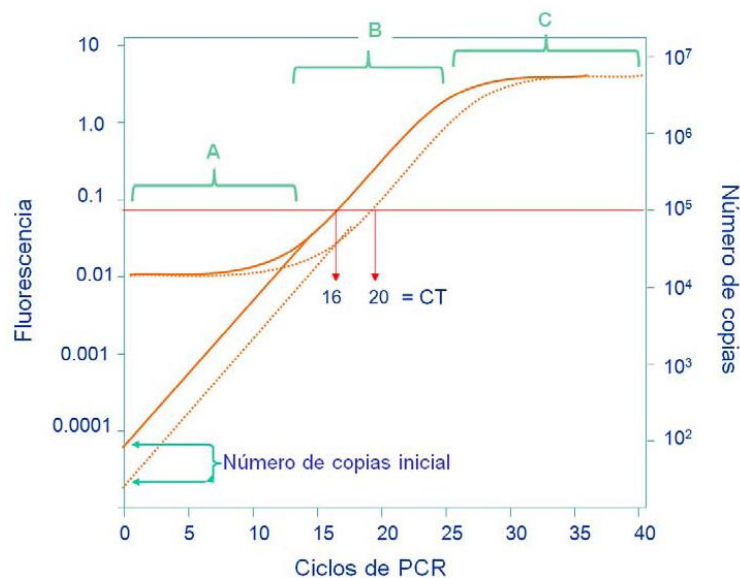


Figura 17. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En A sólo se detecta fluorescencia de fondo. En los ciclos incluidos en B se observa incremento exponencial de fluorescencia y es posible realizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas. En C la reacción ha llegado a saturación o agotamiento de los reactivos, el nivel de fluorescencia se iguala independientemente de la cantidad de ADN de partida y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). Para la medida cuantitativa de ADN en dos muestras (líneas — y ---), se establece un nivel de fluorescencia de referencia (línea —). El C_T de cada muestra es el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el nivel de referencia, y es proporcional al número de copias iniciales de ADN en la reacción.

El número de copias de ADN cuando se alcanza el nivel de fluorescencia de referencia, N_{CT} , será proporcional al número de copias inicial, N_i , según la ecuación:

$$N_{CT} = N_i \times 2^{CT}$$

Donde N_{CT} es el número de copias de ADN cuando se alcanza la fluorescencia de referencia y N_i es el número de copias de ADN diana inicial. Se puede obtener una representación lineal rescribiendo la ecuación (Higuchi et al., 1993):

$$\log N_{CT} - \log N_i = C_T \log 2$$

$$C_T = -(1/\log 2) \log N_i + \log N_{CT}/\log 2$$

de forma que la representación de cada obtenido con una cantidad N_i de ADN debe producir una recta cuya pendiente es $-1/\log 2$ y el punto de corte con el eje C_T es $\log N_{CT}/\log 2$. Dado que, experimentalmente, la cantidad de ADN producida en cada ciclo puede no ser exactamente el doble de la presente en el ciclo previo, se puede proponer una forma más general de la ecuación anterior:

$$C_T = -(1/\log E) \log N_i + \log N_{CT}/\log E$$

En la que E es la eficiencia de la reacción de PCR, es decir, el número de copias medio de producto de reacción por ciclo de PCR. Las eficiencias del PCR en tiempo real pueden ser calculadas experimentalmente a partir del dato de la pendiente en una representación de C_T frente al logaritmo de la cantidad de ADN inicial, en una serie de reacciones realizadas con diferentes cantidades del mismo ADN diana haciendo diluciones seriadas. El cálculo de la eficiencia de PCR es importante en los métodos de cuantificación, ya que permite realizar comparaciones entre datos obtenidos a partir de amplicones distintos. E se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

El método de cuantificación elegido depende de la secuencia diana que se pretende amplificar, el intervalo esperado de cantidad de ADN presente, el grado de exactitud requerido, y el tipo de cuantificación que se vaya a utilizar. En general, dos tipos de cuantificación son posibles: la cuantificación absoluta y la relativa, en la cual se obtiene una relación del número de copias de un ADN diana respecto a otro que se utiliza de referencia. El uso de una u otra aproximación depende de los requerimientos de cada aplicación.

6.4.5.1. Cuantificación absoluta.

La cuantificación absoluta proporciona una valoración de la cantidad de ADN diana presente en la muestra. Para su cálculo es necesario realizar una curva de calibración con ADN de referencia cuantificado por un método independiente para relacionar la señal obtenida de la muestra con el número de copias fijo de la curva estándar. Aunque en ocasiones se indica como cuantificación absoluta un resultado obtenido en unidades de masa de ADN, en sentido estricto, mediante PCR en tiempo real, sólo es posible cuantificar el número de copias de ADN diana presente al inicio de la reacción. Por tanto, la cuantificación absoluta debe expresarse en número de copias del ADN diana (Morrison et al., 1998). El problema fundamental de la cuantificación absoluta es que proporciona una valoración del número de copias de ADN diana en la muestra, pero no cuantifica la cantidad de material presente, ya que el contenido en ADN por unidad de masa puede variar dependiendo de la naturaleza del material utilizado (tejidos, órganos, etc.). Además, requiere un método independiente para conocer el número de copias de ADN diana por unidad de masa en el patrón para realizar la recta de calibración. Esto no siempre es sencillo, ya que requiere conocer con precisión el tamaño de la molécula de ADN. Frecuentemente se recurre a la construcción de plásmidos que contienen el fragmento de ADN a detectar clonado para disponer de un dato más preciso para el cálculo del peso molecular, lo que se traduce en un coste adicional para la realización de este tipo de ensayos.

Para usar las curvas de calibración es necesario comprobar que las eficiencias del ADN estándar y el de la muestra sean comparables (Ferre, 1992; Souza et al., 1996). El diseño de las curvas estándar, su preparación, la determinación exacta de sus concentraciones, su estabilidad a largo plazo y su almacenamiento son factores que pueden afectar a los resultados, ya que la cuantificación del ADN en el PCR en tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2008). Entre los principales tipos de estándares utilizados, se demostró como

los números de copia variaban durante el almacenaje (de 0 a 14 días), siendo las secuencias clonadas más estables que los productos de PCR. Por tanto, es conveniente analizar rutinariamente los estándares utilizados ya que de lo contrario, podrían conducir a la variación sustancial en los resultados (Dhanasekaran et al., 2010).

Los métodos de cuantificación absoluta se utilizan en aplicaciones que requieren conocer el número de copias del ADN diana, como es el caso de la cuantificación de carga viral/bacteriana o la presencia y cuantificación de transgénicos en alimentos (Cattori and Hofmann-Lehmann, 2008; Workenhe et al., 2008). Esta cuantificación por PCR en tiempo real, usualmente pretende la determinación del porcentaje del material investigado dentro del conjunto que constituye la muestra a analizar. En el caso de transgénicos los resultados se expresan como porcentaje de material transgénico (construcción específica) frente a no transgénico de la misma especie (European Commission, 2004). Para ello, se realizan dos rectas de calibrado con materiales de referencia, una para el transgén y otra para un gen endógeno de la misma especie, con cantidades conocidas de ADN en número de copias. Extrapolando los valores de C_T para ambos detectores obtenidos con la muestra problema, y conociendo el número de copias por genoma del transgén en el evento, es posible conocer la relación de material transgénico frente al no transgénico en la muestra.

6.4.5.2. Cuantificación relativa.

La cuantificación relativa compara la cantidad de ADN presente en una muestra en relación a la cantidad de otro ADN que se utiliza como referencia (Raeymaekers, 1993). No es necesario conocer las cantidades absolutas ni las concentraciones de ninguno de los ADNs que se analizan. Las rectas de calibración se utilizan para establecer las eficiencias de amplificación de los dos detectores que se comparan, pero no se utilizan para extrapolar las cantidades de ADN en la muestra. La cuantificación relativa tiene un uso extendido en aplicaciones de expresión génica, donde se utilizan genes constitutivos para la normalización de las medidas realizadas (She et al., 2009). Estos genes suelen codificar proteínas esenciales para el funcionamiento de las células, por lo que su expresión es menos variable que la de otros genes, pudiéndose considerar como constante en las condiciones en las que se pretende realizar la medida de expresión génica (Thellin et al., 1999). De forma general, la relación R de la expresión de un gen X en dos condiciones (A y B) se obtiene con la expresión:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Donde $\Delta\Delta C_T$ es igual a $(C_T \text{ referencia condición A} - C_T \text{ gen X condición A}) - (C_T \text{ referencia condición B} - C_T \text{ gen X condición B})$.

Un caso particular, que toma elementos de la cuantificación absoluta y relativa, es la obtención de datos semi-cuantitativos para realizar determinaciones del tipo presencia/ausencia. En este caso, lo que se pretende es determinar si el contenido de un microorganismo en la muestra supera o no una cantidad o porcentaje determinado. Los resultados se emiten como positivo o negativo junto con un valor que especifica el límite de detección. Así, si el límite de detección se establece en un 5%, toda muestra que contenga menos del 5% del microorganismo analizado se calificará como negativa y si supera ese nivel se calificará como positiva. La metodología de RTi-PCR se puede adaptar fácilmente a esta situación, tanto mediante medidas de fluorescencia en la fase exponencial como a tiempo final. Los sistemas se validan con muestras que contienen el microorganismo a analizar en el entorno del umbral, y se establecen unos valores de ΔC_T que, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada, permitan diferenciar entre las dos situaciones. Este tipo de aproximación se usa rutinariamente en la detección de eventos transgénicos que superan el 0,9% en alimentos en Europa.

7. Otras metodologías de detección de *Alicyclobacillus* spp.

De acuerdo a bibliografía existen otras metodologías de detección de *Alicyclobacillus* sp., tales como:

- Detección de *Alicyclobacillus* spp. en zumo de frutas a partir de un chip microarray de ADN genómico aleatorio (Jun et al., 2011).
- Determinación indirecta de *Alicyclobacillus* spp. en zumo de naranja a partir de la cuantificación y umbrales sensoriales de guayacol por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS) y su correlación con *Alicyclobacillus* spp. (Perez-Cacho et al., 2011).
- Desarrollo de ensayos indirectos inmuno-enzimático basados en anticuerpos policlonales para la detección de cepas de *Alicyclobacillus* en zumo de manzana (Zhouli et al., 2012).

- Uso de nariz electrónica en la investigación de *Alicyclobacillus* spp. y *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas (Gobbi et al. 2010; Hartyani et al., 2013).
- Detección de *Alicyclobacillus* spp. en zumo de manzana por combinación de la técnica de separación inmunomagnética (IMS) y ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Zhouli et al., 2013).
- Rápida detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de manzana a partir de ensayos inmunoenzimáticos empleando anticuerpos doble sándwich ELISA (DAS-ELISA) (Jianke et al., 2013; Jianke Li et al., 2014).
- Detección en bebidas de zumo de frutas por lengua electrónica (Er-hu Li et al., 2014).
- Diferenciación entre aislados de *Bacillus* y *Alicyclobacillus* en zumo de manzana a través de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en combinación con análisis multivariados (Al-Holy et al., 2015).

CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

1. Descripción de muestras.

Las muestras empleadas en los ensayos que abarcan la presente Tesis Doctoral corresponden a productos comerciales suministrados en cisternas isotermas o bidones congelados a -18 °C, que constituyen la materia prima empleada en la elaboración de bebidas refrescantes a base de frutas, zumos y néctares de frutas.

Todos estos productos deben estar de acuerdo con los requisitos que se les exige en cuanto a la definición de origen, variedad y procesado, descritos en el “Code of Practice” de AIJN, y conformes a las normas para productos alimenticios de la UE (Unión Europea). Son productos libres de conservantes, azúcares añadidos, colorantes y otras sustancias extrañas, así como de alérgenos y OGM’S (Organismos Modificados Genéticamente).

Las muestras utilizadas han sido:

- Zumo concentrado de uva.
- Zumo concentrado de manzana.
- Zumo concentrado de piña.
- Zumo concentrado de naranja.
- Cremogenado de melocotón–nectarina.
- Cremogenado de pera.
- Zumo puro de naranja.

A continuación se describen brevemente los diagramas de flujo de las distintas muestras.

1.1. Zumo concentrado de uva.

El zumo concentrado de uva empleado en este estudio consiste en un producto comercial de 65° Brix mínimo y parámetros físico-químicos y microbiológicos de acuerdo con la Guía de Referencia para zumo de uva de AIJN (Rev. May 2011) que define los parámetros de aceptabilidad del producto. Se caracteriza por un aspecto líquido muy fluido, con la consistencia de un jarabe. Limpio y exento de materias extrañas, sin restos de semillas ni piel, ni tartratos precipitados. En cuanto a características organolépticas presenta color miel y ligeramente acaramelado con aroma casi neutro, típico del mosto y sabor típico a uva. El proceso de elaboración queda esquematizado en la **Figura 18**.

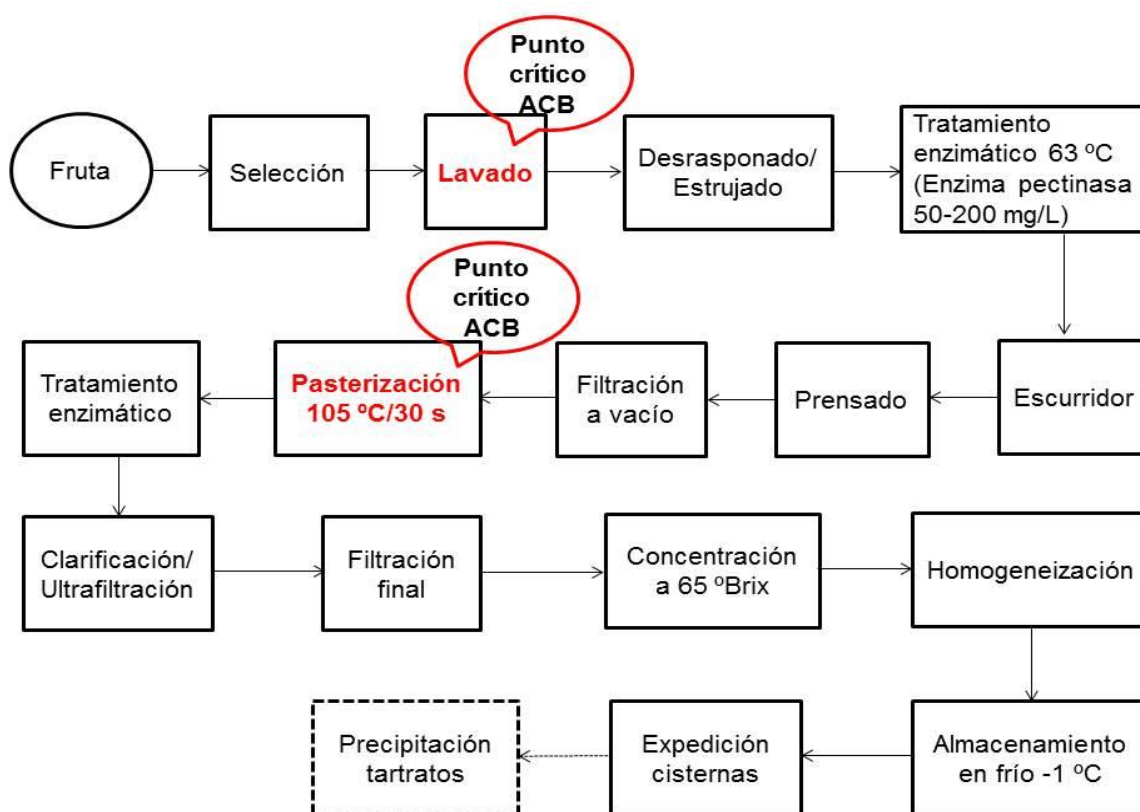


Figura 18. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de uva.

1.2. Zumo concentrado de manzana.

El zumo concentrado de manzana es un producto que se caracteriza por parámetros físico-químicos definidos en la Guía de Referencia para zumo de manzana de AIJN (Rev. May 2011), adquirido normalmente con 70° Brix mínimo para la fabricación de zumos y néctares. Se trata de un producto líquido transparente, con la consistencia de un jarabe, no demasiado viscoso. Limpio y libre de componentes extraños. Color miel claro sin aspecto tostado. Aroma y sabor limpio y característico de fruta madura con ausencia de tonos extraños debido al proceso de elaboración que se detalla en la **Figura 19**.

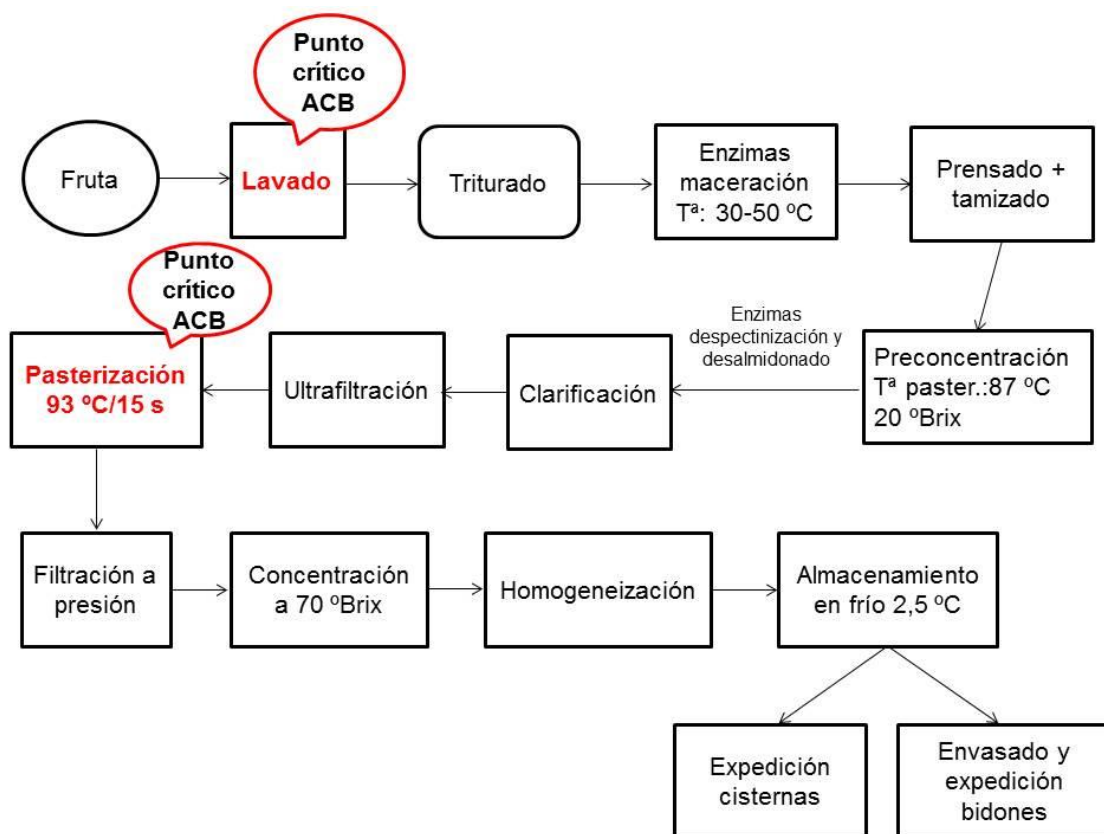


Figura 19. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de manzana.

1.3. Zumo concentrado de piña.

El zumo concentrado de piña es un producto que se comercializa con las características de 60 °Brix mínimo y una relación °Brix/acidez mínimo 20,0 para la fabricación de bebidas, zumos y néctares de frutas, que cumple los parámetros físico-químicos de la Guía de Referencia de AIJN (Rev. May 2011), que determina los parámetros de la aceptabilidad de este producto de acuerdo a requerimientos de calidad y de autenticidad e identidad del producto. Es un producto líquido viscoso, limpio y exento de materias extrañas, sin restos de hojas o piel de piña. Tiene color amarillo dorado característico, sin aspecto dorado. Los aromas y sabor son limpios característicos de la fruta madura con ausencia de tonos extraños debido al proceso de elaboración, el cual se describe en la **Figura 20**.

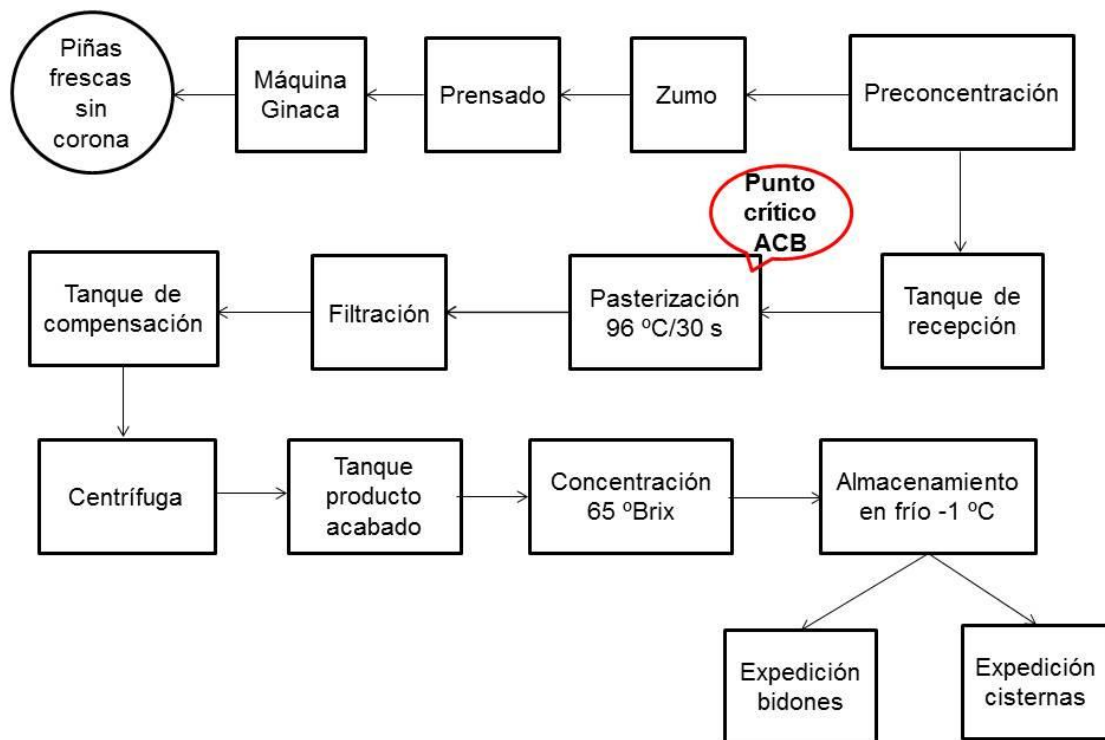


Figura 20. Diagrama de flujo de elaboración de zumo concentrado de piña.

1.4. Zumo concentrado de naranja.

El zumo concentrado de naranja es comercializado según especificaciones de 65 °Brix mínimo y relación °Brix/acidez que oscila entre 12,0 y 15,0 generalmente, cumpliendo los parámetros físico-químicos definidos en la Guía de Referencia para zumo de naranja de AIJN (Rev. May 2011) para requerimientos de calidad y autenticidad e identidad del producto. Es un producto viscoso, limpio y exento de materiales extraños. Su color es naranja característico con valor OJ4/OJ5 según escala de colores USDA (United States Department of Agriculture). Presenta aroma y sabor pronunciado y agradable, propio de naranjas maduras, con ausencia de tonos amargos u otros originados por el proceso de elaboración que se esquematiza en la **Figura 21.**

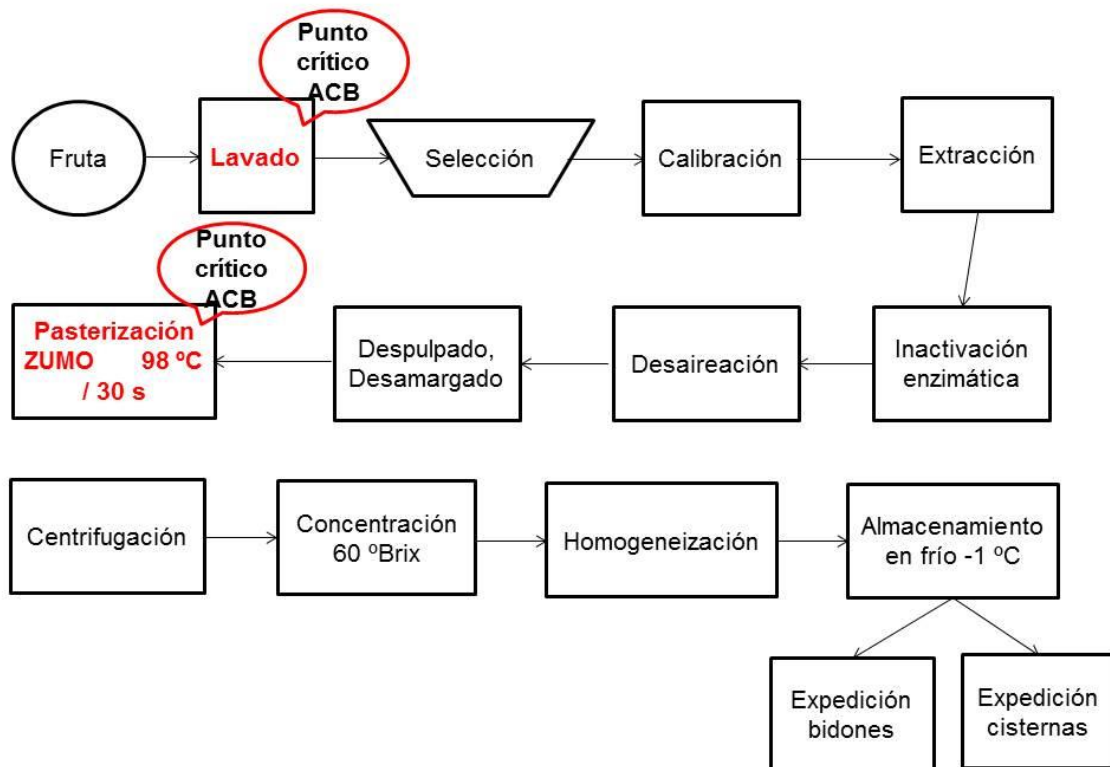


Figura 21. Diagrama de flujo de procesado de zumo concentrado de naranja.

1.5. Cremogenado de melocotón-nectarina.

Se trata de una mezcla de cremogenados de melocotón y nectarina generalmente recepcionada en cisternas isoterma de uso alimentario para el consumo en producciones de zumos, bebidas y néctares que contengan esta fruta. Presenta aspecto de crema homogénea, densa y limpia, sin puntos oscuros y sustancias extrañas y con tamaño de partícula inferior a 0,5 mm. Es un producto con parámetros de calidad y autenticidad descritos en la Guía de Referencia para zumo/puré de melocotón. Color es amarillo-naranja propio de la fruta madura. Su aroma y sabor es pronunciado y agradable, típico de fruta madura con ausencia de tonos impropios debido a su proceso de elaboración, el cual es descrito en la **Figura 22**.

1.6. Cremogenado de pera.

Es una crema blanca, homogénea, densa y limpia sin puntos negros y materias extrañas, con un tamaño de partícula igual o inferior a 0,3 mm. Aroma y sabor típico de la fruta madura con ausencia de sabores extraños debido al proceso de elaboración. Suele comercializarse con un valor mínimo de 12,0 °Brix en cisternas isotemas o envasada en barriles asépticos para la producción de zumos y néctares de frutas, cumpliendo los parámetros físico-químicos y de identidad definidos en la Guía de Referencia para puré/zumo de pera de AIJN (Rev. May 2011). Las etapas de producción para el cremogenado de pera son las mismas que para el cremogenado de melocotón-nectarina indicadas en la **Figura 22**.

1.7. Zumo puro de naranja.

El zumo puro de naranja 100% exprimido sin concentrar suele comercializarse con valores de 11,0 °Brix mínimo y ratio (relación °Brix/acidez) 14 aproximadamente, para su envasado directo a través de una línea aséptica o para la elaboración de zumos y bebidas de frutas. Cumple en cuanto a criterios de calidad y autenticidad de acuerdo con la Guía de Referencia para zumo de naranja de AIJN (Rev. May 2011). Presenta un color naranja característico de la fruta sin tonos marrones de oxidación, con aroma y sabor pronunciados, frescos y agradables sin presencia de tonos ajenos originados en el proceso de elaboración, sin tonos amargos y restos de semillas pequeñas. El exprimido se realiza conforme a la reglamentación vigente en la

Comunidad Europea y la Reglamentación Técnico Sanitaria de zumos (RD 781/2013). En la **Figura 23** se muestran las etapas de proceso de fabricación de zumo puro de naranja.



Figura 22. Diagrama de flujo de producción de cremogenado de melocotón-nectarina y cremogenado de pera.

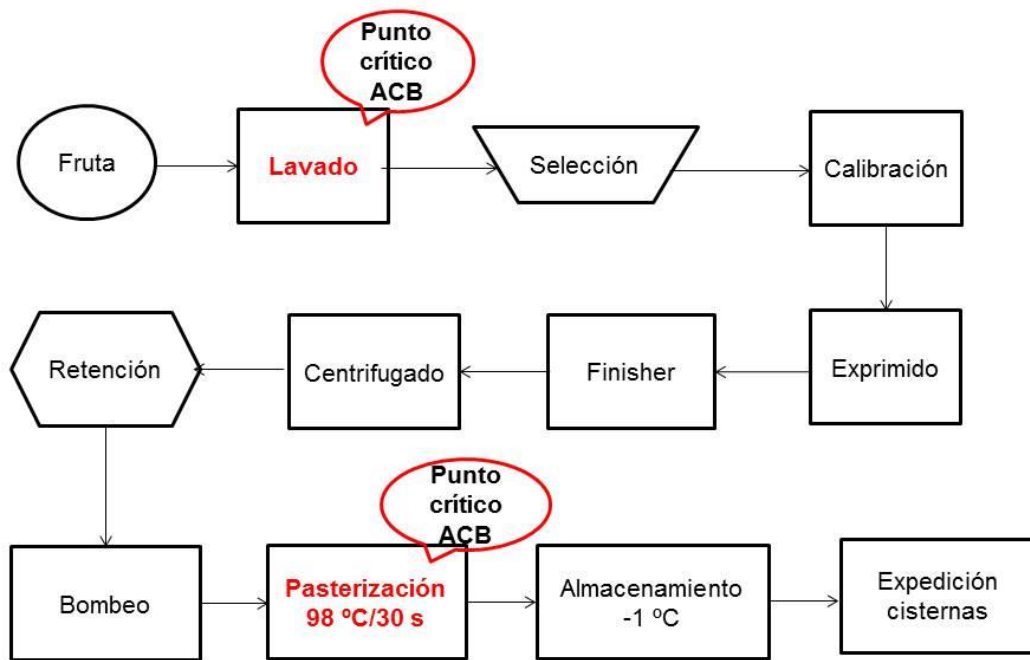


Figura 23. Etapas del proceso de producción de zumo puro de naranja.

2. Diseño experimental.

Para la obtención del objetivo general y de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral, las tareas de investigación fueron diseñadas en 5 experiencias que se describen a continuación.

- Experiencia 1: Selección del tratamiento térmico más adecuado en la activación de esporas de *Alicyclobacillus* spp. en zumo concentrado de manzana.

- Experiencia 2: Estudio de la técnica de impedancia eléctrica más adecuada para la detección de *Alicyclobacillus* spp. en zumo concentrado de manzana.

- Experiencia 3: Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta en concentrados, cremogenados y zumos de frutas destinados a la elaboración de zumos y bebidas de frutas.

- Experiencia 4: Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por PCR en concentrados, cremogenados o purés y zumos de frutas empleados en la fabricación de zumos y bebidas de frutas.

- Experiencia 5: Análisis químico y caracterización de muestras para establecer como las características químicas de las distintas materias primas pueden influir en el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp.

2.1. Experiencia 1. Selección del tratamiento térmico más adecuado en la activación de esporas de *Alicyclobacillus* spp. en zumo concentrado de manzana.

Para el estudio de esta primera experiencia, las muestras utilizadas correspondieron a muestras comerciales de zumo concentrado de manzana, reconstituidas con agua destilada al contenido de sólidos solubles de 11,2 °Brix, indicados en el código AIJN (Asociación Europea de Productores de Zumos de Frutas) para el correspondiente zumo comercial elaborado a partir de su concentrado.

Las esporas de *Alicyclobacillus* spp. utilizadas en la presente tesis doctoral fueron aisladas a partir de un zumo de melocotón y uva comercial, pasteurizado a 98 °C/30 segundos y envasado asépticamente, el cual contenía una carga de 10^2 ufc/mL de este microorganismo. La investigación se realizó por amplificación y secuenciación de ADN ribosómico correspondiente al gen 16S resultando *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

La suspensión de esporas a utilizar fue incubada en 50 mL caldo BAT (*Bacillus Acidoterrestris*) a 45 ± 1 °C durante 7 días. El nivel de inóculo fue determinado por recuento de células viables en placa con medio de cultivo BAM Agar (*Bacillus Acidoterrestris* Medium) por siembra en superficie a partir del asa de Digrasky incubada a 45 ± 1 °C durante 72 horas obteniendo una concentración de 4×10^6 ufc/mL.

El experimento consistió en la inoculación de 15 muestras de 10 mL de zumo a base de concentrado de manzana reconstituido a 11,2 °Brix con alícuotas de suspensión de esporas para lograr una concentración final en el zumo de 10 ufc/mL, 10^2 ufc/mL, 10^3 ufc/mL, 10^4 ufc/mL y 10^5 ufc/mL respectivamente.

Después de la adición de esporas, 5 muestras de zumo fueron sometidas a los tratamientos térmicos 80 °C/10 minutos, 70 °C/20 minutos y 60 °C/30 minutos respectivamente, seguido de un enfriamiento inmediato hasta 45 °C aproximadamente.

Posteriormente, los niveles de inóculo fueron confirmados por recuento de esporas viables en el zumo inoculado, incubado durante 72 horas a 45 ± 1 °C en BAM Agar, inmediatamente después del enfriamiento. La **Figura 24** corresponde a un esquema del estudio realizado en la experiencia 1.

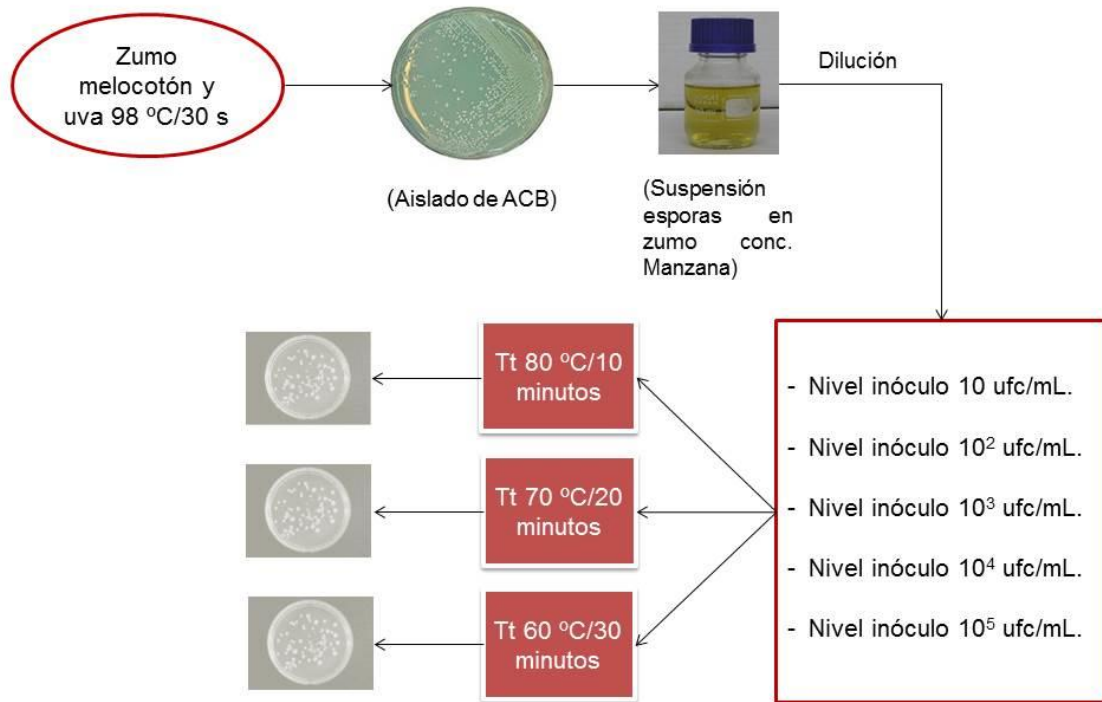


Figura 24. Etapas de activación de esporas de *Alicyclobacillus* spp a diferentes tratamientos térmicos.

2.2. Experiencia 2. Estudio de la técnica de impedancia eléctrica más adecuada para la detección de *Alicyclobacillus* spp. en zumo concentrado de manzana.

Para la desarrollo de esta experiencia se emplearon las dos técnicas existentes de impedancia eléctrica, la directa, basada en la medida directa del cambio de la conductividad eléctrica del medio, y la indirecta, basada en la valoración de CO₂ a través de la inmersión de los electrodos en una solución de KOH.

El experimento de detección de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica directa, resumido esquemáticamente en la **Figura 25**, consistió en realizar diluciones decimales de zumo concentrado de manzana, esterilizado previamente en autoclave (121 °C/20 minutos), en caldo BAT (alícuotas 10 mL de zumo concentrado de manzana y 90 mL de medio BAT). Posteriormente, las diluciones decimales fueron inoculadas con diferentes volúmenes de inóculo con concentración de 4×10^6 ufc/mL de *Alicyclobacillus* spp., añadiendo para ello, 1; 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} y 10^{-5} mL de inóculo, respectivamente. Cada una fue sometida a tratamiento térmico de 80 °C/10 minutos en un baño de agua para la germinación de esporas e inmediatamente enfriadas hasta 45 °C aproximadamente.

De cada alícuota tratada térmicamente e inoculada con cada uno de los volúmenes indicados arriba, se adicionó a una celdilla de medida directa estéril (SY-LAB) con caldo BAT y a otra celdilla que contenía medio de cultivo líquido Bi Media 002 A (SY-LAB). Se introdujeron las celdillas en el sistema de incubación por impedancia 4300 Bactrac e incubaron a 45 ± 1 °C.

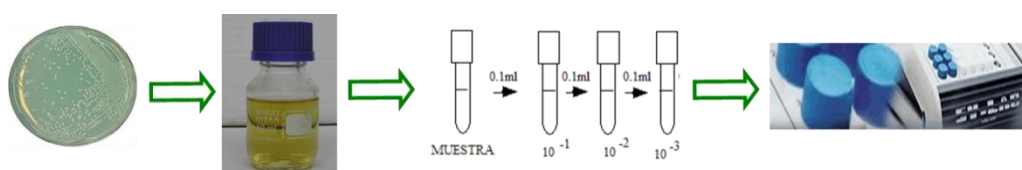


Figura 25. Etapas de detección de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica directa.

El equipo registró en función del tiempo los cambios de los valores de M y E, siendo los dos parámetros que detectan los cambios en la conductividad del medio de cultivo inducido por el crecimiento microbiano, M determinando la impedancia del Medio y E la impedancia del electrodo. Este método midió directamente el crecimiento

de los microorganismos viables en el medio. En la **Figura 26** se muestra un gráfico con curvas de crecimiento microbiano medido el tiempo de detección por impedancia eléctrica directa.

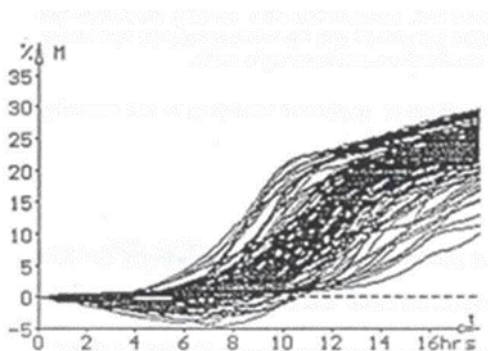
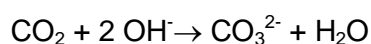


Figura 26. Curvas de crecimiento microbiano detectadas por impedancia eléctrica directa.

El estudio de detección de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta, representado en la **Figura 27** consistió, igualmente que en el caso anterior, en la preparación de diluciones decimales (1:10) de zumo concentrado de manzana esterilizado previamente en autoclave (121 °C/20 minutos) en caldo BAT, que fueron inoculadas con diferentes volúmenes de inóculo, el cual contenía una concentración de 4×10^6 ufc/mL de *Alicyclobacillus* spp., adicionando así alícuotas de 1 mL; 0,1 mL; 0,01 mL; 0,001 mL, 0,0001 mL y 0,00001 mL, respectivamente. Posteriormente, cada una se sometió a tratamiento térmico de 80 °C/10 minutos en un baño de agua para la activación de esporas e inmediatamente se enfriaron hasta 45 °C aproximadamente. Cada alícuota inoculada con cada uno de los volúmenes indicados y tratada térmicamente, de forma paralela, se adicionó a un vial estéril con caldo BAT y a otro vial que contenía medio de cultivo líquido Bi Media 002 A (SY-LAB).

Los viales se introdujeron en celdillas de medida indirecta (SY-LAB) que contenía KOH 0,2%. Posteriormente, estas celdillas se incubaron en el sistema de medición por impedancia 4300 Bactrac a 45 ± 1 °C. El sistema registró en continuo los cambios de los valores de M en función del tiempo. Este método de impedancia eléctrica indirecta se diferencia del anterior porque registra la medida de CO₂ producido durante el crecimiento de los microorganismos, reaccionando con el KOH y generando la siguiente reacción:



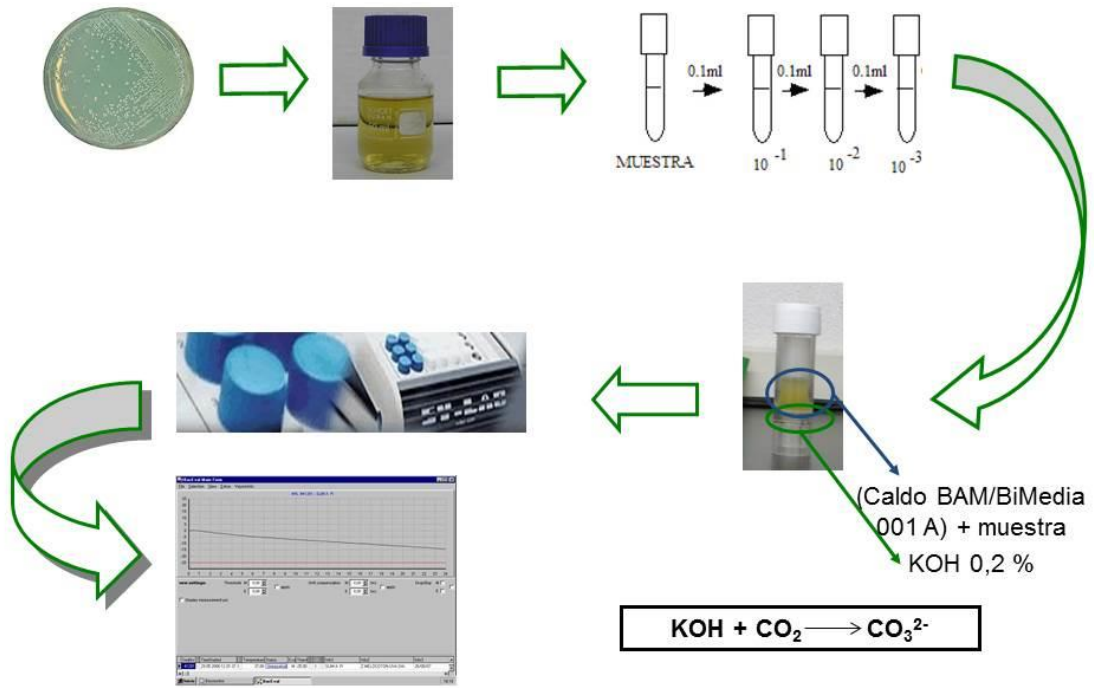


Figura 27. Etapas de detección de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta.

2.3. Experiencia 3. Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta en concentrados, cremogenados y zumos destinados a la elaboración de zumos y bebidas de frutas.

Para llevar a cabo esta experiencia se utilizaron muestras de zumos concentrados de uva blanca, manzana, piña y naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y pera, y zumo puro de naranja comerciales de uso industrial destinados a la fabricación de zumos, néctares y bebidas de frutas, definidos en el apartado “descripción de muestras”.

Para la elaboración del método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta se tomaron alícuotas de los zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja, que fueron previamente esterilizadas a 121 °C/20 minutos para eliminar la flora microbiana posible. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales con cada uno de ellos diluyendo 10 mL de la materia prima en 90 mL de caldo BAT.

Las esporas de *Alicyclobacillus* spp. utilizadas en la inoculación para el desarrollo de esta experiencia, se aislaron de un zumo comercial de melocotón y uva pasteurizado a 98 °C/30 segundos y envasado asépticamente, empleando como medio de cultivo BAM Agar. Fueron identificadas por amplificación y secuenciación de ADN ribosómico correspondiente al gen 16S, como *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Una vez identificadas las esporas, fueron incubadas en porciones de 50 mL de caldo BAT a 45 ±1 °C durante un mínimo de 7 días, comprobando el nivel de inóculo por recuento de células viables en placa, empleando como medio de cultivo BAM Agar y la técnica de siembra en superficie a partir del asa de Digrasky e incubadas a 45 ± 1 °C durante 72 horas obteniendo una concentración de 4×10⁶ ufc/mL.

Las inoculaciones de cada una de las diluciones realizadas para cada tipo de producto se realizaron con diferentes volúmenes del inóculo con el fin de utilizar para la construcción del método concentraciones desde 10⁶ hasta 1 ufc/mL.

A continuación se indican en la **Tabla 11** las cantidades añadidas de inóculo, muestra y caldo BAT.

Tabla 11. Esquema de cantidades a añadir de muestra, caldo BAT e inóculo para el desarrollo del método de cuantificación de *Alicyclobacillus* por impedancia eléctrica indirecta.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)
10	80	10
10	85	5
10	88	2
10	89	1
10	89,2	0,8
10	89,25	0,75
10	89,4	0,6
10	89,5	0,5
10	89,6	0,4
10	89,75	0,25
10	89,8	0,2
10	89,9	0,1
10	90	0,08
10	90	0,075
10	90	0,06
10	90	0,05
10	90	0,025
10	90	0,02
10	90	0,01
10	90	0,008
10	90	0,0075
10	90	0,006
10	90	0,005
10	90	0,0025
10	90	0,002
10	90	0,001
10	90	0,0008
10	90	0,00075
10	90	0,0006
10	90	0,0005
10	90	0,00025
10	90	0,0002
10	90	0,0001
10	90	0,00008
10	90	0,000075
10	90	0,00005
10	90	0,000025
10	90	0,00002
10	90	0,00001

Seguidamente, las diluciones inoculadas indicadas en la **Tabla 11** se sometieron a tratamiento térmico 80 °C/10 minutos en un baño de agua para la activación de esporas, enfriando inmediatamente las muestras hasta un rango de temperatura entre 40-45 °C. Cada muestra inoculada y por triplicado se incubó en el sistema de medición de impedancia Bactrac 4300 SY-LAB a 45 ± 1 °C empleando la técnica indirecta, obteniendo así la variable tiempo en horas.

De forma paralela, cada una de las muestras incubadas en impedancia fue analizada por microbiología clásica, empleando la técnica de siembra en superficie con un asa de siembra Digrafsky e incubando a 45 ± 1 °C durante 72 horas, con el fin de lograr valores de ufc/mL ligados a cada valor de detección en horas por el sistema de impedancia. Con las diferentes diluciones del inóculo sembrado en agar conseguimos construir la recta patrón para la determinación cuantitativa de *Alicyclobacillus* spp. en las materias primas mencionadas obteniendo la ecuación de la recta:

$$y = a x + b$$

donde,

y = log ufc/mL y x=tiempo en horas.

2.4. Experiencia 4. Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por PCR en concentrados, cremogenados y zumos empleados en la fabricación de zumos y bebidas de frutas.

En primer lugar, se prepararon los cultivos para la inoculación. Se partió en todos los casos de cultivos líquidos obtenidos con esporas de *Alicyclobacillus* spp., que corresponden a una cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CECT 7094; Deinhard et al. 1988; Wisotzkey et al., 1992). La suspensión de esporas fue incubada en 50 mL de caldo BAT a 45 ± 1 °C durante 7 días. El nivel de inóculo fue determinado por recuento de células viables en placa a partir de la técnica de siembra en superficie con el asa de Digrasky, utilizando como medio de cultivo BAM agar e incubando a 45 ± 1 °C durante 72 horas, obteniendo una concentración final de 2×10^6 ufc/mL.

La especificidad de los cebadores y sonda utilizados se comprobó mediante RTi-PCR frente a microorganismos presentes habitualmente en zumos de fruta. Para ello se utilizó como diana el ADN procedente de 9 cepas (6 de *Alicyclobacillus* y 3 de *Bacillus*): *A. acidoterrestris*; *A. acidocaldarius*; *A. acidiphilus*; *A. contaminans*; *A. fastidiosus*; *A. pomorum*; *B. subtilis*; *B. brevis*; *B. licheniformis*; suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), evaluando en cada caso la amplificación o no, tras el proceso de PCR.

Para abordar la cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y evaluar la sensibilidad y eficiencia de la RTi-PCR, se construyeron curvas patrón partiendo del inóculo. Para ello, se tomaron alícuotas de 10 mL del cultivo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a una concentración de 2×10^6 ufc/mL, de la que se hicieron 5 diluciones seriadas en agua ultrapura estéril, hasta llegar a una concentración de $1,6 \times 10^1$ ufc/mL. A continuación, se tomaron 5 mL de cada dilución y tras centrifugar (10 minutos a 6.000 g), se extrajo el ADN, (según método descrito en el apartado de métodos analíticos), que fue amplificado mediante RTi-PCR. La concentración de la mayor dilución de *Alicyclobacillus acidoterrestris* que dio un resultado positivo (CT < 40), se definió como límite detección.

Para evaluar las prestaciones del método de RTi-PCR puesto a punto, se contaminaron artificialmente zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja, que constituyen la materia prima a partir de la cual se fabrican los zumos, néctares y bebidas a base de frutas. Tras esterilizarlas en autoclave a 121 °C durante 20 minutos

para destruir la carga microbiana viable que pudieran contener, se elaboraron las correspondientes diluciones decimales (1:10) añadiendo 10 mL de cada materia prima a 90 mL de caldo BAT previamente esterilizado. Las diluciones (1:10) fueron inoculadas posteriormente con distintos volúmenes de microorganismo tal como se muestra en la **Tabla 12**, para conseguir concentraciones adecuadas (desde 10^4 hasta 1 ufc/mL) y evaluar las prestaciones del método de análisis y el posible efecto de la matriz.

Tabla 12. Volúmenes de muestra, caldo BAT e inóculo empleados en la elaboración del método de determinación de *Alicyclobacillus* por PCR.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)
10	90	0
10	89	1
10	89,9	0,1
10	90	0,01
10	90	0,001
10	90	0,0001
10	90	0,00001

Las diluciones inoculadas indicadas en la **Tabla 12**, fueron sometidas a un tratamiento térmico (80 °C/10 minutos) en un baño de agua para la activación de esporas, enfriando inmediatamente después hasta 45 °C aproximadamente. Cada muestra inoculada fue destinada por un lado, a la extracción de ADN y por otro, al recuento de esporas viables a través del cultivo por la técnica de siembra en superficie con un asa de siembra Digrafsky e incubando a 45 ± 1 °C durante 72 horas, para la obtención de valores de ufc/mL relacionados con la concentración de ADN extraído y determinado por RTi-PCR para cada una de ellas, consiguiendo de esta manera la recta de calibración para la cuantificación absoluta de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en las materias primas estudiadas.

La reacción de amplificación mediante RTi-PCR se llevó a cabo en un equipo StepOne Plus, que consta de un termociclador con bloque térmico peltier de 96 pocillos junto a un sistema de detección fluorimétrica, utilizando el siguiente programa térmico: un ciclo de desnaturalización de 20 segundos a 95 °C (se activa la Taq

Polimerasa) y 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto (extensión) a 60 °C.

La fluorescencia se midió en el canal 1 (FAM). Para cada una de las muestras, el ciclo umbral (C_T) se determinó mediante el software del termociclador, utilizando como fluorescencia umbral (*threshold*) un valor de 0,1. Los valores de amplificación obtenidos a valores de $C_T < 40$ se consideraron como resultados positivo, mientras que la no amplificación o amplificación obtenida a valores de $C_T \geq 40$, se consideraron como negativos (Galán et al., 2011). Las curvas de calibrado se obtuvieron representando los valores de C_T en función del logaritmo de la concentración de *A. acidoterrestris* adicionado a las muestras.

La curva estándar (amplificando cada una de las concentraciones por triplicado mediante RTi-PCR), se utilizó para cuantificar *A. acidoterrestris* en muestras. En todas las reacciones de PCR, se incluyó un control positivo (ADN de *A. acidoterrestris*) y un control negativo (agua ultrapura estéril). El coeficiente de correlación (R^2) se utilizó para verificar el ajuste de la línea de tendencia a la puntos de la curva (Fu et al., 2005). La eficiencia de amplificación (E) se calculó mediante la fórmula: $[E = 10^{-1 / s} - 1]$, donde s es la pendiente de la curva estándar (Fontaine y Guillot, 2003).

2.5. Experiencia 5. Análisis químico y caracterización de muestras.

En esta experiencia se realizaron los análisis físico-químicos de las muestras utilizadas en la presente Tesis Doctoral, con la finalidad de estudiar la posible influencia de alguno de los parámetros analizados en la supervivencia y el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp.

Los parámetros físico-químicos analizados en los zumos concentrados de uva y de manzana se detallan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Parámetros físico-químicos analizados en los zumos concentrados de uva y de manzana.

ÁCIDOS	AZÚCARES		
CÍTRICO	GLUCOSA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	° BRIX
D-ISOCÍTRICO	FRUCTOSA	COMPUESTOS FENÓLICOS	pH
L-MÁLICO	SACAROSA	FLAVONOIDES LIBRES	
TARTÁRICO			
FUMÁRICO			

Mientras que los análisis físico-químicos realizados en muestras de zumos concentrados de piña y de naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja se indican en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Parámetros físico-químicos analizados en zumos concentrados de piña, de naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja.

ÁCIDOS	AZÚCARES		
CÍTRICO	GLUCOSA	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	° BRIX
D-ISOCÍTRICO	FRUCTOSA	COMPUESTOS FENÓLICOS	pH
L-MÁLICO	SACAROSA	FLAVONOIDES LIBRES	
TARTÁRICO		PECTINAS SOLUBLES EN AGUA	
FUMÁRICO			

Los métodos analíticos utilizados están descritos y referenciados en el siguiente apartado.

3. Métodos analíticos.

En este apartado se describen todas las técnicas analíticas empleadas en el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral.

3.1. Determinación de *Alicyclobacillus* spp. por microbiología clásica.

La metodología empleada está basada en el método IFUMB12 (IFU, 2007) “Method on the detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices”, desarrollado por IFU Working Group of Microbiology y aceptado internacionalmente para la detección de *Alicyclobacillus* spp. en zumos de frutas.

3.1.1 Equipos y aparatos.

- Autoclave Raypa AES-75 (Barcelona, España).
- Cabina de flujo laminar Telstar AV-100 (Barcelona, España).
- Estufa de cultivo Binder BD 53 (Tuttlingen, Alemania)
- Balanza analítica Mettler AJ150 (Barcelona, España).
- Balanza Mettler PR300 (Barcelona, España).
- Baño de agua tª regulable Selecta Precistern (Barcelona, España).
- Termómetro XS Instruments modelo TEMP5 (Vernon Hills, USA).
- Agitador excéntrico Ovan modelo VM3 E (Barcelona, España).

3.1.2. Medios de cultivo y reactivos.

- Ácido sulfúrico 0,5 mol/L (1N) SV (Panreac, Barcelona, España).
- Diluyente Solución Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, France). **Tabla 15.**

Tabla 15. Composición de Diluyente Solución Ringer ¼.

Composición (g/L)	
Cloruro de sodio	2,250
Cloruro de potasio	0,105
Cloruro de calcio	0,120
Hidrógeno carbonato de sodio	0,050

- Caldo BAT (Scharlau, Barcelona, Spain). **Tabla 16.**

Tabla 16. Composición de caldo BAT.

Composición (g/L)	
Extracto levadura	2,00
Dextrosa	5,00
Hidrógeno fosfato de potasio	3,00
Cloruro de calcio	0,25
Sulfato de magnesio	0,50
Sulfato de amonio	0,20
Sulfato de zinc	0,00018
Sulfato de cobre	0,00016
Sulfato de manganeso	0,00015
Cloruro de cobalto	0,00018
Ácido bórico	0,00010
Molibdato de sodio	0,00030

pH final 4,0 ± 0,2 a 25 °C.

- BAM AGAR: Solución A + Solución B + Solución C. **Tabla 17.**

Tabla 17. Composición de BAM Agar.

Solución A	
Extracto levadura, BD, (Becton Dickinson and Company, France)	2,00 g
Cloruro de calcio 2-hidrato (Panreac, Barcelona, España).	0,25 g
Sulfato magnesio 7-hidrato PRS-Codex (Panreac, Barcelona, España).	0,50 g
Di hidrógeno fosfato de potasio PRS-Codex(Panreac,(Barcelona, España).	3,00 g
D(+)-Glucosa anhidra PA-ACS, (Panreac, Barcelona, España).	5,00 g
Sulfato de amonio ACS, ISO (Panreac, Barcelona, España).	0,20 g
Agua destilada ACS (Panreac, Barcelona, España).	500 mL

pH final 4,0 ± 0,2 a 25°C

Solución B	
Cloruro de cobre (II) 2-hidrato (Panreac, Barcelona, España).	0,01 g
Cloruro de níquel (II) 6-hidrato (Scharlau, Barcelona, España).	0,02 g
Cloruro de cobalto (II) 6-hidrato (Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania).	0,20 g
Molibdato de sodio 2-hidrato (BP, Ph. Eur) PRS-Codex (Panreac, Barcelona, España).	0,03 g
Ácido bórico (RFE, USP-NF, BP, Ph. Eur) PRS-Codex (Panreac, Barcelona, España).	0,30 g
Cloruro de manganeso (II) 4-hidrato PRS (Panreac, Barcelona, España).	0,03 g
Sulfato de zinc 7-hidrato PA-ACS (Panreac, Barcelona, España).	0,10 g
Agua destilada ACS (Panreac, Barcelona, España).	1000 mL
Solución C	
Agar Industrial (Conda, Madrid, España).	15,00 g
Agua destilada ACS (Panreac, Barcelona, España).	500 mL

3.1.3. Preparación de medios de cultivo.

- Caldo BAT.

Suspender 11 gramos de polvo en 1 litro de agua destilada y distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar hasta 40-45°C y ajustar el pH a $4,0 \pm 0,2$ añadiendo H_2SO_4 1N y repartir en botellas estériles.

- BAM Agar.

Preparar las soluciones A, B y C respectivamente y por separado. Esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Dejar enfriar hasta 40-45°C. Ajustar el pH de la **solución A** a $4,0 \pm 0,2$ con H_2SO_4 1N y mezclar bien con las **soluciones B y C** en un recipiente estéril. Repartir sobre 15 mL de medio de cultivo en placas Petri 90 mm y dejar solidificar en posición horizontal. Conservar en frigorífico.

3.1.4. Preparación de la muestra.

Tomar 10 mL de la muestra a analizar (zumo concentrado, cremogenado o zumo) y diluir en 90 mL de caldo BAT en una botella estéril (suspensión 1:10). Introducir en un baño de agua calentada a 80 °C y realizar un choque térmico a 80 °C durante 10 minutos, enfriar inmediatamente en agua con hielo hasta 40-45°C.

Dependiendo de la concentración de inóculo, añadir 1 mL de la suspensión 1:10 a un tubo que contenga 9 mL de diluyente estéril, agitar la mezcla en agitador excéntrico durante 30 segundos. De esta mezcla se toma 1 mL y se añade a un nuevo tubo conteniendo 9 mL del diluyente estéril, solución Ringer ¼, repitiendo la operación en 5-6 tubos. De esta forma se obtiene la “serie de diluciones decimales” que comienza en 10^{-1} y continúa con 10^{-2} , 10^{-3} , etc.

3.1.5. Procedimiento.

Partiendo de la serie de diluciones decimales, y por triplicado, se transfiere 0,1 mL de cada una de las diluciones a placas con BAM Agar. El inóculo se disemina por toda la superficie del agar, a partir de un asa de Digrafsky estéril. Una vez que el inóculo sea absorbido se incuban las placas en la estufa de cultivo regulada a 45 ± 1 °C en posición invertida. El período de incubación es de 72 horas. Transcurrida la incubación, se realiza el recuento de las colonias en las placas donde estén perfectamente aisladas, y en aquellas placas en las que el número de colonias esté comprendido entre 30 y 300. El número total de colonias contadas se multiplicará por el factor de dilución de elegido y se expresará como ufc/mL.

3.2. Determinación de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica directa e indirecta.

La detección de microorganismos, concretamente, *Alicyclobacillus* spp., por impedancia eléctrica puede realizarse por las dos formas existentes, impedancia eléctrica directa, que mide directamente los cambios de conductividad provocados por el crecimiento del microorganismo, e impedancia eléctrica indirecta, donde el crecimiento microbiano es detectado a partir del descenso de impedancia originado por la formación de CO₂ generado del metabolismo microbiano.

3.2.1. Equipos y aparatos.

- Sistema incubador impedancia Bactrac modelo 4300 SY-LAB (Neupurkersdorf, Austria).
- Autoclave Raypa AES-75 (Barcelona, España).
- Cabina de flujo laminar Telstar AV-100 (Barcelona, España).

- Balanza analítica Mettler AJ150 (Barcelona, España).
- Balanza Mettler PR300 (Barcelona, España).
- Baño de agua tª regulable Selecta Precistern (Barcelona, España).
- Termómetro XS Instruments modelo TEMP5 (Vernon Hills, USA).
- Celdillas de medida directa de 10 mL cristal esterilizables SY-LAB (Neupurkersdorf, Austria).
- Celdillas de medida indirecta de 10 mL desechables SY-LAB (Neupurkersdorf, Austria).
- Viales plástico estériles SY-LAB (Neupurkersdorf, Austria).

3.2.2. Medios de cultivo y reactivos.

- Ácido sulfúrico 0,5 mol/L (1N) SV (Panreac, Barcelona, España).
- Hidróxido sódico 85% lentejas, ACS, ISO (Panreac, Barcelona, España).
- BiMedia 002 A Total Viable Count Medium SY-LAB (Neupurkersdorf, Austria).
- Caldo BAT (Scharlau, Barcelona, España).

3.2.3. Preparación de medios de cultivo y reactivos.

- Caldo BAT

Suspender 11 gramos de polvo en 1 litro de agua destilada y distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar hasta 40-45°C y ajustar el pH a $4,0 \pm 0,2$ añadiendo H₂SO₄ 1N y repartir en botellas estériles.

- BiMedia 002 A

Disolver 15 g/L de polvo en agua destilada y distribuir en envases apropiados. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final es $7,0 \pm 0,2$ a 25 °C. Enfriar y conservar en frigorífico.

- Hidróxido potásico 0,2%

Pesar 0,235 g de lentejas de KOH (85%) y disolver en agua destilada hasta 100 g disolución. Conservar en frigorífico.

3.2.4. Preparación de la muestra.

Tomar 10 mL de la muestra a analizar (zumo concentrado, cremogenado o zumo) y añadir en 90 mL de caldo BAT en un recipiente estéril. Introducir en un baño de agua calentada a 80 °C y someter a choque térmico a 80 °C durante 10 minutos, enfriar inmediatamente en agua con hielo hasta 40-45 °C.

3.2.5. Procedimiento impedancia eléctrica directa.

Adicionar 1 mL de la muestra ya preparada y tratada térmicamente, por triplicado, a un celdilla de medida directa, previamente esterilizada en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos y conteniendo 9 mL de caldo BAT. Por otro lado, de forma paralela adicionar 1 mL de la misma muestra, también por triplicado, a una celdilla de medida directa esterilizada en autoclave a 121 °C durante 20 minutos que contenga 9 mL de BiMedia 002 A. Incubar las celdillas en el sistema analizador Bactrac a 45 ± 1 °C un tiempo mínimo de 24 horas. El incubador atemperará las celdillas a la temperatura seleccionada durante 1 hora y registrará en continuo a través de ciclos de chequeo cada 10 minutos los cambios del valor de M (valor de impedancia del Medio) en función del tiempo. Así se generará un gráfico del tipo reflejado en la **Figura 28**.

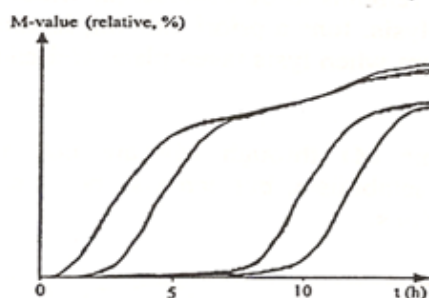
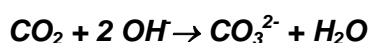


Figura 28. Detección de crecimiento microbiano por Impedancia eléctrica directa.

3.2.6. Procedimiento impedancia eléctrica indirecta.

Añadir 2 mL de la muestra a un vial estéril con 2 mL de caldo BAT, posteriormente introducirlo en una celdilla de medida indirecta que contenga 2 mL de KOH 0,2%. Realizarlo por triplicado. Paralelamente y también por triplicado, adicionar 2 mL de la misma muestra a un vial estéril con 2 mL de BiMedia 002A, introducir en una celdilla de medida indirecta que lleve 2 mL de KOH 0,2%. Introducir las celdillas en el incubador Bactrac 4300 a 45 ± 1 °C durante al menos 24 horas. El sistema calentará las celdillas durante 1 hora hasta alcanzar la temperatura establecida y posteriormente medirá en continuo a través de ciclos de reconocimiento de 10 minutos los cambios del valor de M en función del tiempo. Esta técnica se diferencia de la anterior, en que registra la medida de CO₂ producido por la fermentación provocada por los microorganismos, reaccionando con el KOH y dando la siguiente ecuación:



El tipo de gráfico generado es mostrado en la **Figura 29**.

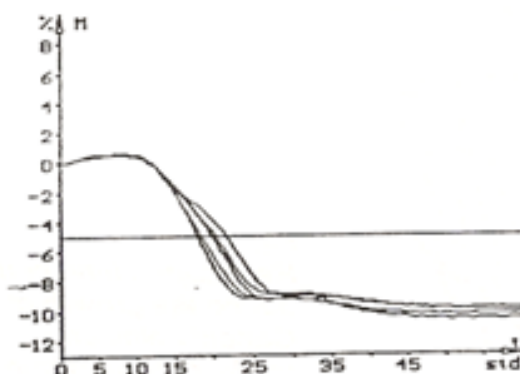


Figura 29. Detección de crecimiento microbiano por impedancia eléctrica indirecta.

3.3. Extracción y cuantificación por PCR de ADN de *Alicyclobacillus* spp.

La extracción de ADN de *Alicyclobacillus* spp. se realiza a partir de un kit de extracción de ADN bacteriano preparado para PCR de la marca Real (Durviz), ref. RBMEGS03, a partir de medios de pre-enriquecimiento o enriquecimiento de muestras de alimentos tal y como se establece en las normas ISO, utilizando MicroSpin columns con membranas de fibra de vidrio que unen selectivamente el ADN.

Para ello, las muestras serán lisadas con las enzimas y tampón de lisis adecuados y los ácidos nucleicos serán lavados para eliminar sales, proteínas y otras impurezas que puedan ser inhibidores de la PCR y se unirán a la matriz de fibra de vidrio empaquetada en las Spin microcolumnas utilizadas, siendo a su vez eluidos.

3.3.1 Equipos y aparatos.

- Termociclador StepOne Plus Applied Biosystem (Madrid, España).
- Baño agua Selecta“Precisdig”, J.P. Selecta (Barcelona, España).
- Microcentrífuga Galaxy 14D máx. 14.000 rpm VWR International (Alemania).
- Mezclador 100-2.400 1/min VWR International (Alemania).
- Micropipeta (2-20 μ L) autoclavable Nichipet EX, Nichiryo (Japón).
- Micropipeta (100-1.000 μ L) Finnpipette Thermo Scientific (USA).
- Micropipeta (20-200 μ L) Finnpipette Thermo Scientific (USA).
- Microtubos 1,5 mL Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Spin columnas REAL (Valencia, España).
- Tubos de recogida REAL (Valencia, España).
- Placas de plástico de 96 pocillos (Applied Biosystems, Madrid, España).

3.3.2. Reactivos.

- Agua ultrapura (libre de nucleasas) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).
- Etanol 100% para biología molecular Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).
- Isopropanol Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

El Kit de extracción contiene los reactivos:

- Tampón de lisis/unión.
- Lisozima: disolver la lisozima en 1,10 mL de agua libre de nucleasas. Conservar a -20 °C.
- Proteinasa K: disolver en 1,0 mL de agua libre de nucleasas. Conservar a -20 °C.

- Tampón de reacción de la lisozima.
- Tampón de desinhibición: adicionar 10 mL de etanol 100%.
- Tampón de lavado: añadir 40 mL de etanol 100%.
- Tampón de elución. Precalear a 70 °C antes de su uso.
- Master mix [Life Taqman universal TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG; (n. 4364341)], que contiene los nucleótidos, polimerasa, metales y tampones (2X) (Applied Biosystems, Madrid, España).
- Cebadores y la sonda (Applied Biosystems, Madrid, España).

3.3.3. Procedimiento de extracción.

3.3.3.1. Preparación de las muestras.

Porciones de 10 mL de muestras de zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja, cremogenados de melocotón-nectarina y pera y zumo puro de naranja son diluidas en 90 mL de caldo BAM e inoculadas con diferentes inóculos de *Alicyclobacillus* spp. para ser posteriormente tratadas térmicamente a 80 °C/10 minutos para la germinación de esporas. Inmediatamente después del tratamiento térmico son enfriadas hasta 45 °C aproximadamente. Con esto conseguimos el medio de enriquecimiento necesario para la extracción de ADN bacteriano.

3.3.3.2. Extracción de ADN en las muestras inoculadas.

Transferir 1 mL de medio de enriquecimiento a un microtubo de 1,5 mL e introducirlo en la microcentrífuga para centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm-14.000 rpm. Desechar el líquido sobrenadante.

Añadir 300 µL del Tampón de reacción Lisozima y 20 µL de Lisozima y mezclar bien. Incubar en el baño de agua a 37 °C durante 30 minutos.

Adicionar 300 µL del Tampón de Lisis/unión y 20 µL de Proteinasa K, homogeneizar e incubar en un baño de agua durante 10 minutos a 70 °C.

Añadir 150 µL de isopropanol, mezclar bien y centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.

Coger el sobrenadante con una micropipeta de 100-1.000 μL y llevarlo al reservorio de la Spin microcolumna con su tubo de recogida para centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm. Posteriormente eliminar el tubo de recogida.

Colocar la Spin microcolumna en un nuevo tubo de recogida y añadir al reservorio 500 μL de Tampón de Desinhibición, centrifugar de nuevo a 8.000 rpm durante 1 minuto. Eliminar el líquido.

Adicionar 500 μL de Tampón de Lavado al reservorio de la Spin microcolumna y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tirar el líquido.

Realizar un segundo lavado añadiendo de nuevo 500 μL de Tampón Lavado en el reservorio de la Spin microcolumna y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto. Después retirar el líquido.

Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 minutos para eliminar el etanol residual. Eliminar el tubo de recogida e insertar la Spin microcolumna en un microtubo de 1,5 mL. Añadir 100 μL de Tampón de elución (previamente precalentado a 70 $^{\circ}\text{C}$) en el reservorio de la Spin microcolumna y dejar incubar 1 minuto.

Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto, desechar la Spin microcolumna, conteniendo así el microtubo de 1,5 mL el ADN bacteriano.

Para estimar la concentración y pureza del ADN extraído, se utilizó un método fluorimétrico comercial "Fluorescent ADN Quantitation Kit" y el espectrofluorímetro VersaFluor[®] (Bio-Rad). La cuantificación se basa en la utilización del fluorocromo bis Benzimida (Hoechst 33258) que presenta la capacidad de unirse específicamente al surco menor del ADN de doble cadena, preferentemente a las secuencias A-T. Al unirse al ADN, el fluorocromo cambia su conformación y emite fluorescencia. La variación de fluorescencia se mide utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 460 nm.

3.3.4. Cuantificación de ADN por PCR.

Para la cuantificación, se construyó una recta patrón utilizando concentraciones conocidas de ADN de timo de ternera. Dicha recta patrón se utilizará para interpolar los valores de fluorescencia obtenidos para las muestras problema de ADN. Este sistema permite la cuantificación del ADN de doble cadena entre 10 ng/mL y 5 pg/mL.

3.3.4.1. Selección de cebadores y sonda.

Para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por PCR específica se realizó en primer lugar una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los cebadores previamente utilizados y como resultado, se seleccionaron los cebadores: Forward: 5'-TGAGTAACACGTGGGCAATCTG-3' y Reverse: 5'-CTACCCGTGTATTATCCGGCAT-3, diseñados por Wang et al. (2014), dirigidos a la región 16S rADN del genoma de *A. acidoterrestris* y la sonda: 5'-CTTTCAGACTGGAATAAC-3' (FAM-MGB).

Los cebadores y la sonda fueron sintetizados por (Applied Biosystems, Madrid, España).

3.3.4.2.1 PCR en tiempo real.

La amplificación por RTi-PCR con sondas TaqMan[®] se llevó a cabo en placas de plástico de 96 pocillos. El master mix [Life Taqman universal TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG; (n. 4364341)], que contiene los nucleótidos, polimerasa, metales y tampones (2X) fue suministrado por Applied Biosystems. El volumen de reacción fue 25 µL, conteniendo cada pocillo 12,5 µL del master mix (2X), 0,5 µL de cada primer (300 nM), 1,0 µL de la sonda (200 µM), 2,0 µL de ADN de cada muestra (a partir de 20 ng) y 8,5 µL de agua ultrapura estéril.

3.4. Determinación de grados BRIX.

En el estudio y control de zumos concentrados, cremogenados y zumos de frutas este parámetro es de gran importancia, ya que nos indica el porcentaje de sacarosa en el producto.

3.4.1. Equipos y aparatos.

- Refractómetro Anton Paar, modelo Abbemat HP, (Alemania).

3.4.2. Patrones.

- Sacarosa, pack de soluciones (14,9%; 19,4%; 23,8%) Vinikit (Panreac, Barcelona, España).

3.4.3. Procedimiento.

Para cuantificación de los sólidos solubles, expresados como grados Brix, se empleó un refractómetro digital con sistema Peltier para compensación de Tª, adicionando unas gotas de muestra homogeneizada al dispositivo de medida del equipo.

3.5. Determinación de pH.

Para esta determinación se utilizó la medida directa del pH de las muestras sin diluir.

3.5.1. Equipos y aparatos.

- pH-metro Thermo Cientific Orion Star A211, (Países Bajos).

3.5.2. Patrones.

- Solución tampón pH 7,00 ± 0,02 (20 °C) ST (Panreac, Barcelona, España).
- Solución tampón pH 4,00 ± 0,02 (20 °C) ST (Panreac, Barcelona, España).

3.5.3. Procedimiento.

La medición de pH se realizó con un pH-metro introduciendo directamente el electrodo en la muestra previamente homogeneizada.

3.6. Determinación de ácidos tartárico, L-málico y fumárico.

El contenido de los ácidos tartárico, málico y fumárico en zumos de frutas se determina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con los métodos IFUMA 65, (IFU, 2013) "Tartaric acid in grape juice" y IFUMA 72 (IFU, 1998) "Fumaric acid".

3.6.1 Equipos y aparatos.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución compuesto por:
 - Bomba Merck-Hitachi Chromaster Pump 5110 (Darmstadt, Alemania).
 - Inyector automático Merck-Hitachi PM 1210 (Darmstadt, Alemania).
 - Detector ultravioleta, Merck-Hitachi Priamide PM 1410 (Darmstadt, Alemania).
 - Horno termostatzado, Merck-Hitachi PM 1310 (Darmstadt, Alemania).
 - Columna HPLC LiChrospher 100 RP 18 (5 µm), (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
- Filtros de membrana 0,45 micras Chromafil Macherey-Nagel (Düren, Alemania).

3.6.2. Reactivos.

- Agua destilada, (UV-HPLC) PAI-ACS (Panreac, Barcelona, España).
- Solución de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) (Panreac, Barcelona, España).

3.6.3. Patrones.

- Ácido tartárico (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido L-málico (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido fumárico (Panreac, Barcelona, España).

3.6.4. Procedimiento.

3.6.4.1. Preparación de las muestras ensayo.

Los zumos son diluidos en una proporción (1:20) y los concentrados a (1:100) con agua destilada, después se pasa por filtración por membrana y se mide directamente por HPLC. En el caso de zumo concentrado de uva se debe tener la precaución de disolver (por calentamiento) los cristales de ácido tartárico que puedan haber precipitado durante el almacenamiento de las muestras en refrigeración.

3.6.4.2. Preparación de las soluciones patrón.

Disolver una cantidad conocida de ácido tartárico en agua doble destilada para dar una solución estándar de aproximadamente 500 mg/L. Posteriormente, esta solución estándar de ácido tartárico es diluida con agua doble destilada para conseguir estándares de calibración con ácido tartárico en el rango de 100 mg/L hasta 500 mg/L. La solución patrón de ácido L-málico se prepara de la misma forma e igual concentración que el ácido tartárico. Para el patrón de ácido fumárico se disuelve una cantidad conocida de éste en agua doble destilada para dar una solución estándar de aproximadamente 100 mg/L. Se realizarán diluciones a partir de la solución estándar para conseguir estándares de calibración con ácido fumárico en el rango de 1 mg/L hasta 10 mg/L.

3.6.4.3. Condiciones del equipo HPLC.

- Eluyente: solución ácido sulfúrico (0,005 mol/L).
- Columna: LiChrospher 100 RP 18 (5 µm).
- Temperatura columna: 40 °C.
- Flujo: aproximadamente 0,6 mL/min. Para evitar la acumulación de alta presión, el flujo se debe aumentar lentamente de 0,2 mL/min a 0,6 mL/min durante el equilibrado de la columna con el eluyente.
- Longitud de onda de detección: 210 nm.
- Volumen de inyección constante de 15 µL aproximadamente.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.

Tiempo retención		
Ácido tartárico	Ácido L-málico	Ácido fumárico
10 minutos	11 minutos	14 minutos

3.6.5. Cálculo y expresión de resultados.

El contenido de los ácidos tartárico, L-málico y fumárico se calculan a partir de la media de la altura del pico medio de al menos tres inyecciones de muestra, usando la relación determinada entre la altura de pico y contenido de los ácidos tartárico, L-málico y fumárico de las soluciones de calibración (recta de calibración o relación matemática determinada empíricamente), en la **Figura 30** se muestra un

cromatograma en donde los picos de color verde corresponden a los patrones y los picos con línea azul a los ácidos analizados en un zumo concentrado de uva blanca.

Se debe tener en cuenta el factor de dilución para el cálculo. El contenido de ácido tartárico y L-málico es expresado en g/L con dos cifras decimales, el contenido de ácido fumárico se expresa con una cifra decimal.

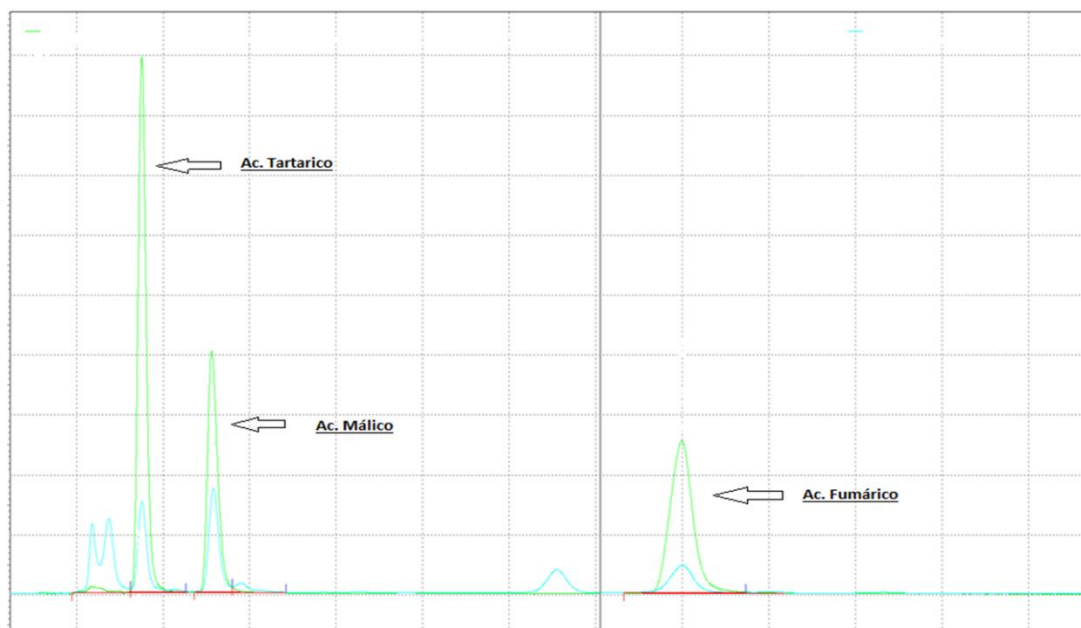


Figura 30. Cromatograma de determinación de ácidos tartárico, málico y fumárico en zumo concentrado de uva blanca.

3.7. Determinación de glucosa, fructosa y sacarosa.

La determinación de azúcares se realiza basándose en el método IFUMA 67, (IFU, 2005) "Determination of sugars and sorbitol". Para ello, los azúcares (poli, di y monosacáridos) son separados por cromatografía en una columna de resina de intercambio catiónico (polímero de poliestireno divinilbencenosulfonado en forma iónica Ca^{2+}) por elución isocrática usando una solución de Ca-EDTA en agua como fase móvil y detectados por medio de un detector de índice de refracción (RI).

3.7.1. Equipos y aparatos.

- Centrífuga Hermle modelo Z326 (Wehingen, Germany).
- Sistema HPLC compuesto por:

- Bomba Merck-Hitachi Chromaster Pump 5110 (Darmstadt, Alemania).
- Horno termostático Merck-Hitachi Chromaster 5310 (Darmstadt, Alemania).
- Sistema de detección Índice de refracción Merck-Hitachi Chromaster 5450 (Darmstadt, Alemania).
- Columna de LiChrospher 100 NH2 (5 µm) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
- Filtros de membrana (0,45 µm) Chromafil Macherey-Nagel, (Düren, Alemania).
- Jeringa microlitros Hamilton (Suiza).
- Ultrasonidos Elma modelo E-180 H (Singen, Alemania).

3.7.2. Reactivos.

- Agua des-ionizada (UV-HPLC) PAI-ACS (Panreac, Barcelona, España).
- Ca-EDTA (Panreac, Barcelona, España).

3.7.3. Patrones.

- Glucosa anhidra (Panreac, Barcelona, España).
- Fructosa purísima (Scharlau, Barcelona, España).
- Sacarosa (Panreac, Barcelona, España).

3.7.4. Procedimiento.

3.7.4.1. Preparación de las muestras ensayo.

Diluir 2 mL de zumo de fruta con agua destilada des-ionizada en una proporción (1:5), centrifugar 15 minutos a 1.400 g y filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 µm.

3.7.4.2. Preparación de las soluciones patrón.

Una solución que contiene glucosa, fructosa y sacarosa en agua des-ionizada se prepara de acuerdo con la concentración prevista en el jugo de fruta. (Por ejemplo, 1 g de glucosa, 1 g de fructosa y 1 g de sacarosa en 100 mL de agua des-ionizada es adecuado en el caso de zumo de naranja).

3.7.4.3. Condiciones del equipo HPLC.

- La columna debe mantenerse a 90 °C.
- Disolvente: Ca-EDTA (0,1 mmol/L) disuelto en agua des-ionizada después de ultrasonidos.
- Flujo: 0,5 mL/min.
- Detector índice de refracción.
- Área del pico integrado.
- Volumen inyectado 10 µL.

El método debe ser revisado para cada inyección individual de los azúcares simples. Comprobar especialmente la ausencia de inversión de sacarosa a altas temperaturas (85-90 °C). La **Figura 31** muestra un cromatograma de azúcares de un zumo concentrado de manzana.

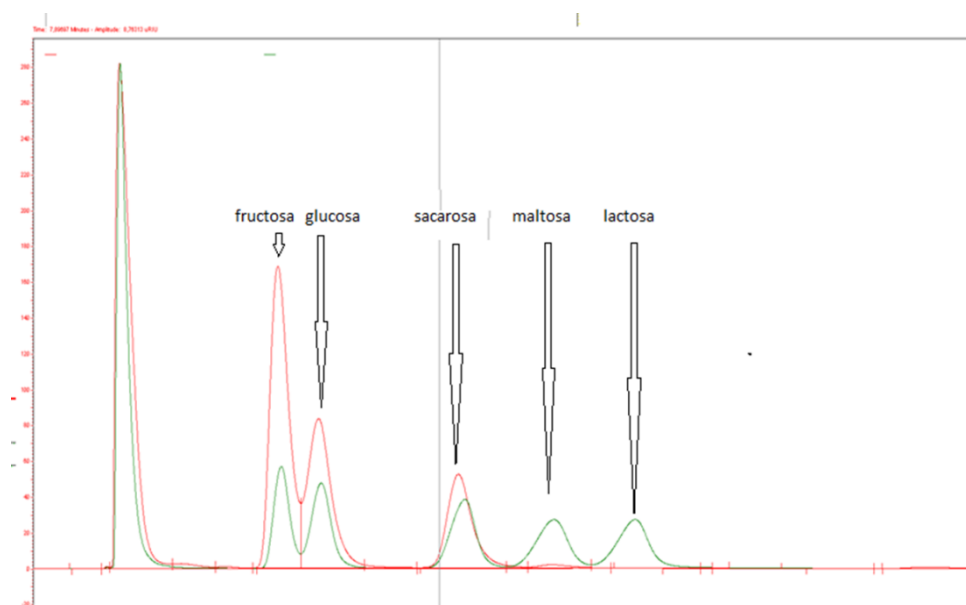


Figura 31. Cromatograma de determinación de glucosa, fructosa y sacarosa de un zumo concentrado de manzana.

4. Cálculo y expresión de resultados.

Las concentraciones de azúcares en las muestras examinadas se calculan por comparación del área del pico de cada azúcar de la muestra con el área del pico de los azúcares correspondientes de las soluciones estándares. Se debe tener en cuenta el factor de dilución.

3.8. Determinación de pectinas solubles en agua.

Las sustancias pécticas son analizadas de acuerdo con el método IFUMA 26, (IFU, 2012) "Determination of Pectin". Son diferenciadas como pectinas (soluble en agua), pectato de calcio (oxalato soluble) y protopectina (soluble en álcali). Estos pueden ser separados uno de otro mediante disolventes apropiados y determinados individual o conjuntamente.

3.8.1. Equipos y aparatos.

- Espectrofotómetro Macherey-Nagel modelo Nanocolor 500D (Düren, Alemania).
- Centrífuga Hermle modelo Z326 (Wehingen, Alemania).
- Baños de agua controlada por termostato, 85 °C y 20 °C Ovan modelo B120 E (Barcelona, España).
- Agitador magnético Ika-Werke (Staufen, Alemania).
- Desecador de vacío Vidrio Pyrex (Instrumentación Científica Técnica, S.L., La Rioja, España).
- Papel de filtro, Filtros Anolia (Barcelona, España).

3.8.2. Reactivos.

- Etanol 95%, análisis grado (Sigma, St. Louis, USA).
- Solución oxalato de amonio (0,75%) (Sigma, st. Louis, USA).
- Hidróxido sódico 1 mol/L SV (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido sulfúrico concentrado, PA (Panreac, Barcelona, España).
- Carbazol (Scharlau, Barcelona, España).

- Pentóxido de fósforo (P₂O₅) (Scharlau, Barcelona, España).

3.8.3. Patrones.

- Ácido galacturónico monohidrato (Sigma, St. Louis, USA).

3.8.4. Procedimiento.

3.8.4.1. Preparación de reactivos.

- Etanol 63%: 100 mL de agua destilada es mezclada con 200 mL de etanol (95%).
- Solución etanólica carbazol (0,1%): disolver 0,1g carbazol en 100 mL etanol purificado. Un ensayo en blanco que contenga 1mL de agua, 0,5 mL de solución carbazol y 6 mL ácido sulfúrico concentrado debe ser transparente. (Para cada curva estándar la solución de carbazol debe ser nueva).

3.8.4.2. Precipitación de sustancias pécticas.

Mezclar 15 mL de zumo ó 4 g de concentrado con 12 mL de agua en un tubo de centrífuga de 50 mL graduado con extremo cónico. Llenar hasta 40 mL con etanol 95% caliente a 75 °C, y calentar durante 10 minutos en un baño de agua a 85 °C con agitación ocasional con una varilla de vidrio. Posteriormente, completar con etanol 95% hasta alcanzar un volumen de mezcla de 50 mL. Centrifugar durante 15 minutos a 3.700 rpm durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante por decantación. Lavar el precipitado con etanol 63% con agitación ocasional durante 10 minutos en el baño a 85 °C, centrifugar de nuevo y desechar el sobrenadante.

3.8.4.3. Extracción de sustancias pécticas solubles en agua.

Añadir 5 mL de agua destilada al precipitado obtenido anteriormente en un tubo de centrífuga, suspender el residuo con la ayuda de la varilla de vidrio con punta de goma. Después de enjuagar con agua destilada hasta conseguir un volumen de 35 mL y agitar vigorosamente durante 10 minutos en el agitador mecánico. Posteriormente, lavar con 5 mL de agua destilada y centrifugar durante 15 minutos a 3.700 rpm. Tras la centrifugación decantar el líquido sobrenadante a través de un filtro colocado en un

matraz aforado de 100 mL. Lavar un par de veces con 20 mL de agua y añadiendo los sobrenadantes al mismo matraz aforado. A continuación se adicionan 5 mL de NaOH (1mol/L) y completar la solución hasta el enrase.

3.8.4.4. *Determinación colorimétrica.*

Pipetear 1 mL del extracto obtenido en 2 tubos de ensayo, añadir 0,5 mL de solución etanólica de carbazol 0,1% a la muestra y 0,5 mL de etanol 95% a la muestra comparación. Se formará un precipitado blanco floculento en la muestra ensayo. Posteriormente adicionar 6 mL de H₂SO₄ con agitación vigorosa. Colocar los tubos de ensayos inmediatamente en un baño de agua a 85 °C durante 5 minutos, después enfriar durante 15 minutos a 20 °C en un baño con agitación. Medir la absorbancia a 525 nm de la muestra una vez transcurridos 20 minutos frente a la solución de comparación. Para eliminar posibles errores asociados con la solución de carbazol, debe ser tenida en cuenta por su absorbancia en blanco. Así 4 soluciones deben configurarse (como se indica anteriormente) y medir uno contra el otro:

- a) 1mL de extracto + 0,5 mL de solución carbazol + 6 mL de H₂SO₄.
- b) 1mL de extracto + 0,5 mL de etanol + 6 mL de H₂SO₄.
- c) 1mL de agua + 0,5 mL de solución de carbazol + 6 mL de H₂SO₄.
- d) 1mL de agua + 0,5 mL de etanol + 6 mL de H₂SO₄.

a) Se mide contra b) [Absorbancia x] y c) contra d) [Absorbancia y] y la diferencia x-y se evalúa a partir de la curva estándar.

3.8.4.5. *Preparación de la curva estándar.*

Pesar exactamente 120,5 mg de ácido galacturónico (GA) monohidrato, transferir a un matraz aforado de 1 litro, añadir 0,5 mL de NaOH (1mol/L) y completar la solución con agua destilada hasta el enrase. Después de mezclar, dejar reposar durante la noche. Esta solución patrón contiene ácido galacturónico anhidro 100 ug (GA) por mL. A partir de éste, alícuotas de 10-70 mL (en muestras de 10 mL) se enrasan hasta 100 mL para obtener concentraciones de ácido galacturónico en un rango comprendido entre 10 y 70 ug/mL. Emplear alícuotas de 1mL de estas soluciones para la realización de la curva de calibración siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior.

3.8.5. Cálculo y expresión de resultados.

El contenido de GA puede ser calculado a partir de cantidades en μg GA para 1 mL de extracto obtenido de la curva estándar.

En zumos:

$$\text{mg GA/L} = \frac{\mu\text{g GA} \cdot 100}{15}$$

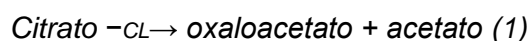
En concentrados:

$$\text{mg GA/kg} = \frac{\mu\text{g GA} \cdot 100}{4}$$

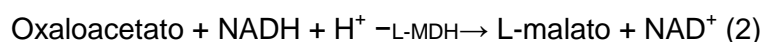
El contenido de pectina se expresa en GA mg por litro (mg/L) o en GA mg por kilogramo (mg/kg) sin decimales.

3.9. Determinación de ácido cítrico.

La determinación de ácido cítrico se realiza mediante un kit enzimático empleado en alimentos de la marca Biopharm, Cat. No 10 139 076 035, basado en el método IFUMA 22 (IFU, 2005) "Determination of Citric Acid, Enzymatic", que consiste en las reacciones explicadas a continuación: El ácido cítrico (citrato) es convertido a oxaloacetato en la reacción catalizada por la enzima Citrato Liasa (CL).



En presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), el oxaloacetato y su producto de descarboxilación, piruvato, se reducen a L-malato y L-lactato respectivamente, por medio de nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH).



La cantidad de NADH oxidado en las reacciones (2) y (3) es estequiométrico con la cantidad de citrato. El NADH es medido mediante absorbancia a 340 nm.

3.9.1. Equipos y aparatos.

- Espectrofotómetro UVmini-1240 Shimadzu (Kioto, Japón).
- Cubetas cuarzo 100-OS, Hellma Analytics (Müllheim, Alemania).
- Pipeta pipet-lite XLS Rainin, Mettler Toledo (Barcelona, España).
- Micropipeta (10-100 µL) Handrop (España).

3.9.2. Reactivos.

- Solución 1: 1,4 g de liofilizado conteniendo:

Tampón glicil-glicina	pH 7,8
L-malato deshidrogenasa	136 U aprox.
L-lactato deshidrogenasa	280 U aprox.
NADH	12 U aprox.

- Solución 2: 50 mg de citrato liasa liofilizada, aprox. 12U.

3.9.3. Patrones.

- Solución 3: solución estándar de ácido cítrico para control del ensayo (su medición es necesaria para el cálculo de resultados).

3.9.4. Procedimiento.

3.9.4.1. Preparación de los reactivos.

Solución 1: disolver el contenido de la botella en 12 mL de agua bidestilada. La solución es estable 2 semanas a 2-8 °C ó 4 semanas entre -20 °C a -25 °C. Atemperar la solución a T^a ambiente antes de su utilización.

Solución 2: disolver el contenido de la botella en 0,3 mL de agua bidestilada. Esta solución es estable 1 semana a 2-8°C ó 4 semanas entre -20 °C y -25 °C.

3.9.4.2. Medición de la muestra.

Diluir el concentrado a los valores indicados en AIJN, en caso de zumos utilizar directamente.

Pipeteo en la cubeta	Blanco	Muestra
Solución tampón 1	1,00 mL	1,00 mL
Solución de muestra	-	0,20 mL
Agua bidestilada	2,00 mL	1,80 mL

Mezclar y después de que la reacción haya finalizado (unos 5 minutos) leer absorbancias de las soluciones (A_1). Después iniciar la reacción de:

Solución 2	0,02 mL	0,02 mL
------------	---------	---------

Mezclar y leer absorbancias (A_2) al finalizar la reacción (aprox. 5 minutos).

Determinar la diferencia de absorbancias ($A_1 - A_2$) para el blanco y las muestras. Restar la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia de la muestra correspondiente.

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

3.9.5. Cálculo y expresión de resultados.

De acuerdo a la ecuación general del cálculo de las concentraciones:

$$C = \frac{V \times MW}{E \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/L)}$$

$V =$ volumen final (mL) = 3,020

$v =$ volumen de muestra (mL) = 0,2

$MW =$ peso molecular de la sustancia a ensayar = 192,1 g/mol

$d =$ paso de luz (cm) = 1

$\epsilon =$ coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = 6,3 (L x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

Quedando para el ácido cítrico (calculado como ácido cítrico anhidro) y expresado en g/L.

$$C = 0,460 \times \Delta A$$

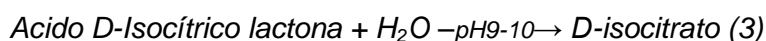
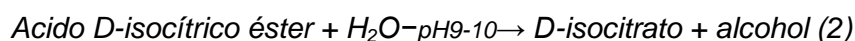
3.10. Determinación de ácido isocítrico.

Para la determinación de ácido D-isocítrico se emplea un kit enzimático destinado al análisis del ácido como tal y sus ésteres en alimentos, de la marca Biopharm, Cat. No. 10 414 433 035, basado en el método de análisis IFUMA 54 (IFU, 2005) "Determination of D-Isocitric Acid, Enzymatic, que consta de las siguientes reacciones:

El ácido D-isocítrico (D-isocitrato) es descarboxilado por oxidación a través de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) en presencia de la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (1).



La cantidad de NADPH formado en la reacción (1) es estequiométrica respecto de la cantidad de D-isocitrato. El NADPH se determina por absorbancia a 340 nm. El ácido D-isocítrico unido (ésteres, lactonas) se determina después de una hidrólisis alcalina (2,3) de acuerdo al mismo principio (1).



3.10.1. Equipos y aparatos. Equipos y aparatos.

- Espectrofotómetro UVmini-1240 Shimadzu (Kioto, Japón).
- Cubetas cuarzo 100-OS, Hellma Analytics (Müllheim, Alemania).
- Pipeta pipet-lite XLS Rainin, Mettler Toledo (Barcelona, España).
- Micropipeta (10-100 µL) Handrop (España).

3.10.2. Reactivos.

- Solución 1: Buffer imidazol, pH 7,1 aproximadamente.
- Solución 2: 60 mg de liofilizado compuesto por:

NADP	45 mg
Sulfato manganeso	0,075 M

- Solución 3: enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) liofilizada, 5 U aproximadamente.

3.10.3. Procedimiento.

3.10.3.1. Preparación de los reactivos.

- Solución A: disolver el contenido de la solución 2 con todo el contenido de la solución 1. Esta solución es estable a 2-8 °C durante 4 semanas o 2 meses entre - 15 °C y - 25 °C.
- Solución B: disolver el contenido de la solución 3 con 1,8 mL de agua bidestilada. Conservar durante 4 semanas máximo a 2-8 °C ó 2 meses entre -15 °C y -25 °C.

3.10.3.2. Medición de la muestra.

Diluir la muestra con agua bidestilada el zumo concentrado a los valores indicados en AIJN, en caso de cremogenados y zumos utilizar directamente. Enjuagar la punta de la pipeta con solución de muestra antes de dispensarla en la cubeta.

Pipeteo en la cubeta	Blanco	Muestra
Solución A	1,00 mL	1,00 mL
Solución de muestra	-	0,10 mL
Agua bidestilada	2,00 mL	1,90 mL

Mezclar y después de que la reacción haya finalizado (unos 3 minutos) leer absorbancias de las soluciones (A_1). Después iniciar la reacción por adición de :

Solución B	0,05 mL	0,05 mL
-------------------	---------	---------

Mezclar y leer absorbancias (A_2) al finalizar la reacción (aprox. 10 minutos). Si la reacción no se ha detenido después de 10 minutos continuar leyendo las absorbancias a intervalos de 2 minutos hasta que el aumento de las mismas sea constante durante 2 minutos.

Determinar la diferencia de absorbancias (A_1-A_2) para el blanco y las muestras. Restar la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia de la muestra correspondiente.

$$\Delta A = (A_1-A_2)_{\text{muestra}} - (A_1-A_2)_{\text{blanco}}$$

3.10.4. Cálculo y expresión de resultados.

Según la ecuación general del cálculo de las concentraciones:

$$C = \frac{V \times MW}{E \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/L)}$$

V = volumen final (mL) = 3,050

V = volumen de muestra (mL) = 0,1

MW = peso molecular de la sustancia a ensayar = 192,1 g/mol

D = paso de luz (cm) = 1

ϵ = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = 6,3 (L x mmol⁻¹ x cm⁻¹)

Quedando para el ácido D-isocítrico (calculado como ácido cítrico anhidro) y expresado en g/L.

$$C = 0,930 \times \Delta A$$

3.11. Determinación de la actividad antioxidante basada en el método ORAC.

La determinación de la actividad antioxidante en los concentrados, cremogenados y zumo se llevó a cabo según la técnica descrita por Prior et al., (2003). El método Oxigen Radicals Absorption Capacity (ORAC) se basa en la pérdida de fluorescencia sódica en presencia de radicales peroxilo generados a partir de la descomposición térmica del 2,2'-azobis (2-amidino-propano) diclorohidrato (AAHP) a 37 °C. Los resultados vienen expresados en equivalentes de Trolox (análogo de la vitamina E, soluble en agua).

3.11.1. Equipos y aparatos.

- Multi-Detection Microplate Reader. SynergyTM HT (Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Alemania).
- Homogenizador (Ika-Werke, Staufen, Alemania).

3.11.2. Material para análisis

- Microplaca de 96 pocillos para análisis (Costar, New York, USA).
- Tubos de fondo cónico graduados de 50 mL (tubos Falcom), (Deltalab S.L., Barcelona, España).
- Tubos de fondo cónico graduados de 15 mL (tubos Falcom), (Deltalab S.L., Deltalab, Barcelona, España).
- Filtros de nylon de 0,45 μm (Whatman, Clifton. NJ, USA).

3.11.3. Reactivos.

- Tampón fosfato salino pH 7,0 [4,384 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 8,567 g de K_2HPO_4 en 1 L de agua].
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Alemania).
- K_2HPO_4 (Scharlau, Barcelona, España).
- Fluroesceína sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- 2,2'-azobis (2-amidino-propano) diclorohidrato 98% (Acrós Organics, Geel, Bélgica).

3.11.4. Patrones.

- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromán-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Se utilizó el Trolox como antioxidante de referencia o patrón, preparándose una solución madre de 500 μM a partir de 0,0125 g de Trolox llevado a 100 mL con tampón fosfato salino. Diariamente se prepararon 5 patrones de concentraciones 0,0125, 0,0250, 0,0500, 0,1 y 0,1250 mM diluyendo la solución madre con tampón fosfato salino. A partir de éste se preparan los siguientes patrones recogidos en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Patrones de Trolox empleados en la determinación de la actividad antioxidante.

Patrones	Concentración TROLOX	Dilución	µl TROLOX	µl Tampón fosfato
P1	6,25 µM	1:80	12,5	987,5
P2	12,5 µM	1:40	25	975
P3	25 µM	1:20	50	950
P4	50 µM	1:10	100	900

3.11.5. Procedimiento.

3.11.5.1. Preparación de los reactivos.

- Solución de fluoresceína.

Esta solución requiere de 2 soluciones madre, solución stock 1 formada por 0,0225 g de sal sódica de fluoresceína disuelta en 50 mL de tampón fosfato y solución stock 2 compuesta por 50 µL de solución stock 1 disuelta en 10 mL de tampón fosfato. Estas soluciones se conservan a -20 °C repartidas en varios eppendorfs. Y solución de trabajo constituida por 800 µL de la solución stock 2 depositados en un matraz aforado de 50 mL y enrasado hasta su volumen con tampón fosfato. Atemperar antes de su utilización a 37 °C en un baño.

- Solución AAPH.

Pesar 0,216 g de AAPH en un matraz de 10 mL y enrasar con tampón fosfato. Esta solución es sensible a la luz y debe mantenerse el menor tiempo posible fuera del frigorífico para evitar su degradación, por lo tanto, o bien sacarlo de refrigeración justo cuando vaya a ser adicionado o colocar en un vaso de precipitado con hielo.

3.11.5.2. Preparación de la muestra.

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC las muestras de zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja son previamente diluidas a los grados Brix correspondientes indicados en AIJN, en los cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y en el zumo puro de naranja este parámetro es determinado directamente. Centrifugar la muestra a 5.000 rpm durante 5-10 minutos y separar el sobrenadante de la pulpa precipitada.

Realizar las diluciones con tampón fosfato de (1:250) para los zumos concentrados de uva, manzana y piña, dilución (1:100) para los cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y la dilución (1:500) para el zumo concentrado de naranja y zumo puro de naranja.

3.11.5.3. Preparación de la muestra.

Para esta determinación la microplaca que se utiliza debe ser de color negro para evitar interacciones de lectura entre los pocillos. Los bordes se llenan con 200 µL de agua destilada para evitar el denominado “efecto borde”, mientras que el resto se completa con los patrones, el blanco y las muestras en las siguientes cantidades indicadas en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Volúmenes de reactivos adicionados a la microplaca para la determinación de capacidad antioxidante por ORAC.

Fluoresceína	AAPH	B (borde)	b (Blanco)	P1 a P4 (Trolox)	M (muestra)
200 µL	20 µL	200 µL	20 µL	6,25 a 50 µL	20 µL

Posteriormente la placa se coloca en el lector de placas y el programa ejecuta lecturas cada minuto durante 1,5 horas para determinar la pérdida de fluorescencia midiendo la absorbancia en excitación con una longitud de onda de 485 nm y en emisión con longitud de onda de 528 nm.

3.12. Determinación de compuestos fenólicos totales.

La cuantificación de los fenoles totales de las muestras estudiadas en la presente Tesis Doctoral se realizó, tras la hidrólisis ácida y alcalina de la muestra, y mediante la técnica espectrofotométrica basada en la utilización del método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965), modificado y adaptado a muestras de tomate por Gahler et al. (2003).

3.12.1 Aparatos y equipos.

- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (Inglaterra).

- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Alemania).

3.12.2. Reactivos.

- Solución de Na_2CO_3 (Aldrich, Steinheim): pesar 15 g de Na_2CO_3 y llevarlos a 200 mL con agua.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Fluka, Buschs, Switzerland): Diluirlo (1:10) en agua.
- HCl 1 M.
- Solución 2M de NaOH (Scharlau, España) en metanol al 75%: 16 g de NaOH en 50 mL de agua más 150 mL de metanol.
- Solución de ácido metafosfórico (MPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 0,75 M: 14,7 g de MPA en 200 mL de agua.
- Mezcla de acetona (Quemical, Barcelona, España) /agua 1+1 (v/v).

3.12.3. Patrones.

Solución madre de ácido gálico 0,558 mM: pesar 10,5 mg y llevarlos a 100 mL con agua. Se reparte la solución madre en alícuotas de 1 mL en viales y se congela a -30 °C hasta su uso. A partir de esta solución se preparan los diferentes patrones que constituyen la recta de calibrado, comprendidos entre 0 y 100 mg/L.

3.12.4. Procedimiento.

3.12.4.1. Preparación de la muestra.

Para la determinación de fenoles totales se tomaron 2 gramos de cada muestra, pesados en un tubo de centrifuga. A continuación se le adicionó 1 mL de HCl 1M, agitándose durante 1 minuto e incubándose en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrida la primera hidrólisis (ácida), se retiró del baño, se agitó la muestra durante 1 minuto en vórtex y se adicionó 1 mL de NaOH (2M en 75% de MeOH), agitándose durante 1 minuto e incubándose de nuevo durante 30 minutos a 37 °C (en agitación). Tras la hidrólisis alcalina se adicionó 1 mL de MPA (0,75M), se agitó y centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos. Una vez concluido el proceso, se separaron las fases, de forma que el sobrenadante se llevó a un matraz de 10 mL y el

precipitado se volvió a disolver con 1 mL de Acetona:Agua (1+1), para volver a ser centrifugado a 5.000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente, se unieron los sobrenadantes y se volvió a centrifugar (5.000 rpm durante 30 minutos). Finalmente se recogió de nuevo el sobrenadante y se llevó a un volumen final de 10 mL con la solución de Acetona:Agua. Las muestras se almacenaron en congelación a -30 °C hasta su análisis.

3.12.4.2. Medición de la muestra.

Para cuantificar los compuestos fenólicos totales se realizó la reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido, pipeteando en las microcubetas de plástico los volúmenes recogidos en la **Tabla 20**.

Posteriormente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia a 750 nm realizando el autocero frente al aire sin cubeta. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/kg de peso fresco, de acuerdo a la recta patrón elaborada con las diferentes soluciones patrones, tal y como se muestra en la siguiente **Figura 32**.

Tabla 20. Procedimiento de cuantificación de los compuestos fenólicos totales.

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	Muestra
C (mg/L de ác. Gálico)	0	20	40	60	80	100	--
Solución de ác. Gálico	--	20 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	--
Agua	100 µL	80 µL	60 µL	40 µL	20 µL	--	--
Muestra	--	--	--	--	--	--	100 µL
Folin-Ciocalteu (1:10)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Solución de Na₂CO₃	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL

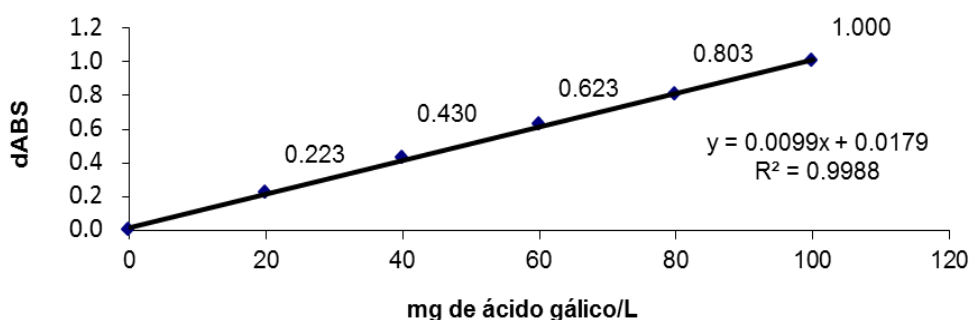


Figura 32. Recta patrón de los compuestos fenólicos.

3.13. Determinación de flavonoides libres.

La cuantificación de los flavonoides en las diferentes muestras empleadas se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Dewanto et al. (2002) para la determinación de flavonoides en tomates.

3.13.1. Aparatos y equipos.

- Espectrofotómetro ThermoScientific UV-Visible modelo Evolution 300 (Inglaterra).
- Agitador de tubos Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Centrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5804 R (Hamburg, Alemania).

3.13.2. Reactivos.

- Solución de NaNO_2 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) al 5%.
- $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Solución de NaOH (Scharlau, España) 1M.
- (+)-Catequina (Sigma, St. Louis, USA).

3.13.3. Patrón.

La (+)-Catequina fue usada como estándar usando las siguientes soluciones: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L para obtener la recta patrón que aparece en la **Figura 33**.

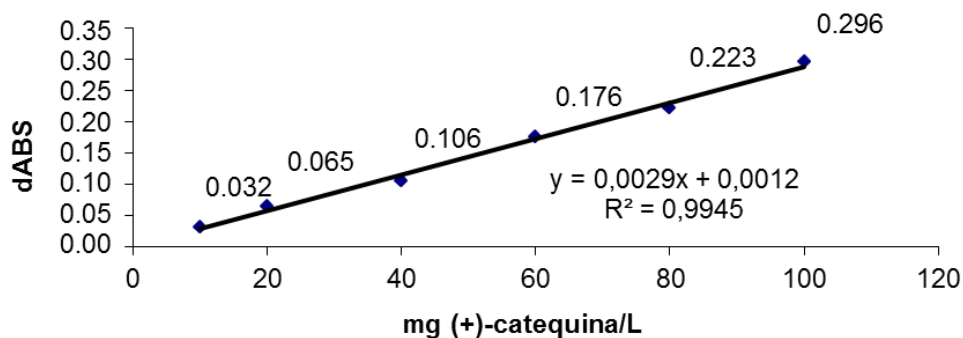


Figura 33. Recta patrón flavonoides.

3.13.4. Procedimiento.

Para la determinación de los flavonoides libres se tomó una alícuota de 200 μL de un extracto acuoso de las diferentes muestras, que fue preparada mezclando 2 g de muestra con 10 mL de agua destilada, separando el sobrenadante mediante centrifugación. Posteriormente, el volumen del extracto fue mezclado con 1,25 mL de agua destilada adicionando seguidamente 75 μL de NaNO_2 al 5%. Pasados 6 minutos, se añadieron 160 μL de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se dejó durante 5 minutos antes de añadir 500 μL de NaOH 1M. Finalmente, la mezcla se llevó a un volumen de 2,5 mL con agua destilada agitando en un agitador de tubos hasta conseguir la completa homogenización. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro a 510 nm, inmediatamente después del blanco y los patrones. El contenido total de flavonoides se cuantifica de acuerdo a la recta patrón (**Figura 33**) y es expresado como mg equivalentes de catequina (CE) por kg de producto (Dewanto et al., 2002).

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

1. Experiencia 1. Selección del tratamiento térmico más adecuado para la activación de esporas de *Alicyclobacillus* spp.

La **Tabla 21** muestra los valores de concentración expresada en log (ufc/mL) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* empleado en la inoculación del zumo concentrado de manzana, reconstituido a 11,2 °Brix, para la aplicación de los tratamientos térmicos. Para ello, las esporas utilizadas en la inoculación se aislaron de un zumo de melocotón y uva comercial pasteurizado a 98 °C/30 segundos, y envasado asépticamente. Estas esporas fueron identificadas como *A. acidoterrestris* tras la investigación por amplificación y secuenciación de ADN ribosómico correspondiente al gen 16S. La concentración de inóculo para el estudio fue de 4×10^6 ufc/mL, y se utilizaron dos técnicas de análisis: 1) La siembra en superficie adicionando 0,1 mL de cada una de las diluciones decimales del inóculo sobre una placa Petri con el medio de cultivo BAM Agar y extendiendo el inóculo con un asa de siembra llamada de Digrasky; y 2) La siembra en masa, añadiendo 1 mL de cada una de las diluciones decimales del inóculo a una placa Petri estéril vacía, adicionando unos 20 mL de medio de cultivo BAM Agar atemperado a 45 °C aproximadamente y girando la placa en el mismo sentido y sentido contrario a las agujas del reloj para mezclar el inóculo y el medio de cultivo. Las placas cultivadas por ambas técnicas se incubaron durante 72 horas a 45 ± 1 °C. Los resultados recogidos por siembra en superficie fueron más satisfactorios que los obtenidos por siembra en masa o en profundidad. A la vista de los resultados obtenidos y de acuerdo con estudios realizados por Yokota et al. (2007), al tratarse de una bacteria aerobia, la técnica de siembra en masa y en profundidad inhibe ligeramente el crecimiento microbiano y el desarrollo de colonias.

En las **Tabla 22 y Tabla 23** se muestran los resultados obtenidos en el ensayo para la activación de las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. En este ensayo se emplearon muestras de zumo concentrado de manzana reconstituido a 11,2 °Brix que fueron inoculadas con distintos volúmenes de inóculo de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, con una concentración de 4×10^6 ufc/mL. Tras la aplicación de los tres

tratamientos térmicos seleccionados, se confirmó la concentración del microorganismo por recuento de esporas viables, mediante la incubación durante 72 horas a 45 ± 1 °C en BAM Agar.

La **Tabla 22** recoge el recuento de microorganismo expresado en log (ufc/mL) obtenido en los tres tratamientos térmicos de activación de esporas y en las distintas diluciones del inóculo, observando que no hay diferencias significativas en los recuentos de acuerdo a las condiciones de temperatura y tratamiento aplicadas en el ensayo. Estos datos fueron comparados con las ufc/mL esperados o teóricos no existiendo diferencias con los datos experimentales obtenidos.

En la **Tabla 23** se muestran los resultados de recuperación de las esporas, cuando las alícuotas de concentrado de zumo reconstituido a 11,2 °Brix inoculadas con diferentes volúmenes del inóculo fueron tratadas térmicamente. De acuerdo a los resultados obtenidos, tras someter cada muestra a los tratamientos de shock térmico seleccionados conseguimos porcentajes de recuperación de esporas elevados, observando resultados similares en los tres tratamientos térmicos, que oscilaron entre 75% y 100%, sin mostrar un comportamiento asociado con la concentración de inóculo.

Los tratamientos que hemos aplicados en este estudio fueron seleccionados de acuerdo a investigaciones realizadas por otros autores. Splittstoesser et al. (1998) observaron un 100% de recuperación cuando las esporas eran tratadas térmicamente a 60 °C durante 30 minutos. Eiroa et al. (1999) obtuvieron una alta recuperación de microorganismo cuando trataban las muestras térmicamente a 70 °C durante 20 minutos. Walls y Chuyate (2000) observaron que cuando inoculaban la muestra con niveles bajos de *Alicyclobacillus* spp., el shock térmico a 80 °C durante 10 minutos mostraba recuentos más altos que aplicando tratamientos térmicos de 60 °C durante 30 minutos o de 100 °C durante 5 minutos.

Hay que destacar que en nuestro estudio no hemos observado diferencias de acuerdo a las condiciones de tratamiento térmico aplicados, coincidiendo con los resultados publicados por Chang y Kang (2004), quienes describieron que en inóculos con alta concentración de *Alicyclobacillus* spp. (10^3 esporas/mL) no existen diferencias significativas entre los tratamientos térmicos de activación de las esporas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó en el presente estudio el tratamiento a 80 °C durante 10 min como el método más adecuado para aplicar el shock térmico para la activación de las esporas, resultando más rápido al emplear menor tiempo en la determinación de este microorganismo.

Tabla 21. Recuentos expresados en log (ufc/mL) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por las técnicas de siembra en superficie y en masa¹.

Dilución inóculo	Siembra superficie	Siembra en masa
0	> 2,48	> 2,48
1×10 ⁻¹	> 2,48	> 2,48
1×10 ⁻²	4,59 ± 0,03	4,24 ± 0,05
1×10 ⁻³	3,59 ± 0,02	3,38 ± 0,01
1×10 ⁻⁴	2,60 ± 0,02	2,19 ± 0,04
1×10 ⁻⁵	1,61 ± 0,04	0,90 ± 0,05
1×10 ⁻⁶	0,59 ± 0,11	n.d.
1×10 ⁻⁷	n.d.	n.d.

¹Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 22. Recuentos en log (ufc/mL) de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en BAM Agar tras inocular un zumo concentrado de manzana con distintos volúmenes de inóculo y tras aplicar diferentes tratamientos térmicos.¹

Volumen inóculo (mL)	Volumen muestra (mL)	log (ufc/mL) teórica	80 °C/10 min	70 °C/20 min	60 °C/30 min
1	9,0	5,60	5,56 ± 0,02	5,54 ± 0,03	5,56 ± 0,02
0,1	9,9	4,60	4,50 ± 0,02	4,51 ± 0,03	4,51 ± 0,04
0,01	10,0	3,60	3,58 ± 0,01	3,49 ± 0,01	3,52 ± 0,01
0,001	10,0	2,60	2,50 ± 0,02	2,52 ± 0,04	2,54 ± 0,02
0,0001	10,0	1,60	1,59 ± 0,01	1,56 ± 0,01	1,57 ± 0,01

¹Los datos vienen reflejados como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 23. Porcentaje de recuperación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en medio BAM Agar en diferentes diluciones del inóculo la tras aplicación de choques térmicos.

Volumen inoculo (mL)	Volumen muestra (mL)	% Recuperación		
		80 °C/10 min	70 °C/20 min	60 °C/30 min
1	9,0	92%	86%	93%
0,1	9,9	78%	82%	90%
0,01	10,0	95%	78%	80%
0,001	10,0	78%	83%	84%
0,0001	10,0	98%	92%	92%

2. Experiencia 2. Estudio de la técnica de Impedancia Eléctrica más adecuada para la detección de *Alicyclobacillus* spp.

En la segunda experiencia evaluamos la técnica de impedancia más adecuada como método rápido de análisis para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos concentrados, cremogenados y zumos destinados a la elaboración de zumos y bebidas de frutas. Para ello, se estudiaron las dos técnicas existentes, impedancia eléctrica directa e impedancia eléctrica indirecta.

La **Tabla 24** recoge los resultados obtenidos con la técnica de impedancia eléctrica directa, que fue evaluada comparando, por un lado el recuento de esporas viables en placa en BAM Agar, incubadas a 45 ± 1 °C durante 72 horas, en alícuotas de 10 mL de zumo concentrado de manzana reconstituido a 11,2 °Brix que fueron inoculadas con distintos volúmenes de inóculo con una concentración de 4×10^6 ufc/mL, sometidas al tratamiento de choque térmico seleccionado en la experiencia 1, de 80 °C durante 10 minutos; y por otro lado la incubación paralela en el equipo de impedancia Bactrac, a 45 ± 1 °C, utilizando dos medios de cultivo, BiMedia 002 A (ajustado a pH 4,00) y caldo BAT, caldo más apropiado para el desarrollo de este microorganismo.

Los resultados obtenidos muestran que no hubo crecimiento del microorganismo tras la medición por esta técnica rápida, al no registrar cambios en la impedancia del medio, por lo que se procedió a ensayar el método indirecto. Los resultados obtenidos pueden deberse a los medios de cultivo empleados, ya que, por un lado, el caldo BAT como medio de cultivo selectivo para el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* no sea apropiado para la detección por impedancia eléctrica directa, debido principalmente al contenido de sales que contiene (Owens et al., 1989; Bolton, 1990; Blivet et al., 1998); y por otro lado, a que este microorganismo no sea capaz de desarrollarse en el medio de cultivo genérico de aerobios totales BiMedia 002 A, acidificado a pH 4,00 (Silva et al., 1999; Silva, 2000a; Silva et al., 2000b; Murray et al., 2007).

En la **Tabla 25** se exponen los resultados del estudio tras la aplicación de la técnica de impedancia eléctrica indirecta para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* empleando volúmenes de 10 mL de zumo concentrado de manzana, diluido a 11,2 °Brix, inoculadas con distintos volúmenes de inóculo (4×10^6 ufc/mL),

tratadas térmicamente a 80 °C/10 minutos. Las incubaciones se llevaron a cabo de manera paralela, en el incubador mediante impedancia Bactrac a 45 ± 1 °C empleando dos medios de cultivo, caldo BAM y BiMedia 002 A ajustado a pH 4,00, y en placa en BAM Agar durante 72 horas a 45 ± 1 °C.

Tabla 24. Detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica directa.¹

Volumen inóculo (mL)	Volumen muestra	Recuento en placa log (ufc/mL)		
		BAM Agar	Caldo BAT	Caldo BiMedia 002 A
1	9	5,10 ± 0,09	n.d.	n.d.
0,1	9,9	4,03 ± 0,02	n.d.	n.d.
0,01	10	3,29 ± 0,01	n.d.	n.d.
0,001	10	2,29 ± 0,03	n.d.	n.d.
0,0001	10	1,04 ± 0,04	n.d.	n.d.
0,00001	10	0,00	n.d.	n.d.

¹Los datos están expresados como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 25. Detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica indirecta¹.

Volumen inóculo (mL)	Volumen muestra	Recuento en placa (log ufc/mL) Tiempo de detección impedancia eléctrica indirecta (horas)		
		BAM Agar	Caldo BAT	Caldo BiMedia 002 A
1	9	5,26 ± 0,02	10,96 ± 0,17	n.d.
0,1	9,9	4,25 ± 0,05	14,84 ± 0,26	n.d.
0,01	10	3,27 ± 0,03	18,79 ± 0,32	n.d.
0,001	10	2,21 ± 0,04	22,51 ± 0,19	n.d.
0,0001	10	1,26 ± 0,04	25,89 ± 0,11	n.d.
0,00001	10	0,00	28,47 ± 1,36	n.d.

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

El estudio de detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en un principio se llevó a cabo mediante la técnica de impedancia eléctrica directa, ya que por las características de este microorganismo estudiadas por Goto et al. (2006), durante el metabolismo de los azúcares se produce formación de ácidos sin producción de gas. Por lo tanto, era de esperar obtener resultados satisfactorios al producirse cambios en la impedancia del medio. Sin embargo, no observamos crecimiento a las diferentes concentraciones de inóculo ensayadas. Por el contrario, en la determinación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica indirecta obtuvimos una respuesta favorable, detectando crecimiento de esta bacteria de manera eficaz, y con una proporcionalidad inversa, variando el tiempo de detección en función de la concentración de microorganismo detectada. Es decir, que a mayor concentración de bacteria el sistema es capaz de detectar la presencia del microorganismo en menor tiempo, resultando un coeficiente de correlación de -0,982 y varianza corregida R^2 de 0,964, coincidiendo con las investigaciones realizadas por autores (Cady et al., 1978; Eden y Eden, 1984). En la **Figura 34** se muestra el análisis de regresión entre el logaritmo de unidades formadoras de colonias y el tiempo de detección empleando la técnica de impedancia eléctrica indirecta para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que la técnica de impedancia eléctrica indirecta es la más adecuada para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, ya que es capaz de mostrar cambios en la conductividad del medio debido a la formación de CO_2 y en consecuencia provocar variaciones en la impedancia del medio, medida por el parámetro “%M”.

De aquí deducimos que a pesar de que el *Alicyclobacillus acidoterrestris* no produce gas como consecuencia de su actividad metabólica sobre los azúcares, la formación de guayacol a partir de la ruta de descarboxilación del ácido ferúlico hacia la formación de vainillina y ácido vainílico, va acompañada de la formación de CO_2 (Peleg et al., 1992; Pettipher et al., 1997; Goto, 2000; Witthuhn et al., 2012). El CO_2 liberado en la síntesis de guayacol, reacciona con el KOH que contiene el vial de medida empleado en este método de análisis, dando lugar a hidrógeno carbonato potásico según la siguiente reacción, aumentando la conductividad eléctrica y causando una disminución en los valores de impedancia: $2 \text{KOH} + 2 \text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{KHCO}_3$.

En esta experiencia obtuvimos resultados similares a los descritos por otros autores como Silley y Forsythe (1996), Owens et al. (1989), Ribeiro et al. (2003), que determinaron la presencia de actividad microbiana a partir de la absorción de CO_2 producido por la actividad metabólica de levaduras en zumos de frutas y *Escherichia*

coli en agua potable, que crecen en un medio de cultivo, a medida que el CO₂ es absorbido por una solución alcalina de KOH, produciendo una disminución en los valores de impedancia.

En la **Figura 35** se muestra el gráfico con las curvas de detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica indirecta obtenidos en este estudio para la técnica de impedancia eléctrica indirecta debemos destacar que el medio de cultivo idóneo para el desarrollo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* es el caldo BAT, que además es detectado por esta técnica, a pesar de su composición. Observamos que cuando empleamos el medio de cultivo genérico para detección de recuento total de microorganismos viables, específico de este equipo, acidificado hasta pH 4,00 para favorecer la proliferación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* no aparece ninguna señal de crecimiento bacteriano en el equipo. Sin embargo, la incubación en el equipo de impedancia utilizando como medio de cultivo el caldo BAT se detecta desarrollo de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Esto puede ser debido a que las trazas de elementos y concentración de glucosa de este medio, son adecuados para promover el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Jensen, 2005).

Como resultado de esta experiencia queda demostrado que la técnica por impedancia eléctrica indirecta, empleando como medio de cultivo caldo BAT, es la más apropiada para la determinación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas, pues es capaz de detectar crecimiento a partir de la formación de CO₂ provocando una disminución en la impedancia proporcional a la concentración de microorganismo. Además es capaz de detectar la presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a concentraciones bajas, dentro del rango que se pueden encontrar en las materias primas empleadas habitualmente en la industria alimentaria. Pettipher et al. (1997) detectó guayacol en zumo de naranja y zumo de manzana que contenían concentraciones de 10⁵ ufc/mL de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Komitopoulou et al. (1999) también obtuvieron resultados similares, *A. acidoterrestris* se desarrolló en zumo de manzana, zumo de naranja y zumo de pomelo después de 8 días conservados a 30 °C incrementando más de 4 unidades logarítmicas hasta alcanzar concentraciones de 10⁶-10⁷ ufc/mL. En todos los casos estudiados, el deterioro de los zumos de frutas es detectado por el mal sabor originado por el guayacol después de 4 días, alcanzando *A. acidoterrestris* concentraciones de 10⁵ ufc/mL (Chang y Kang, 2004; Witthuhn et al., 2013).

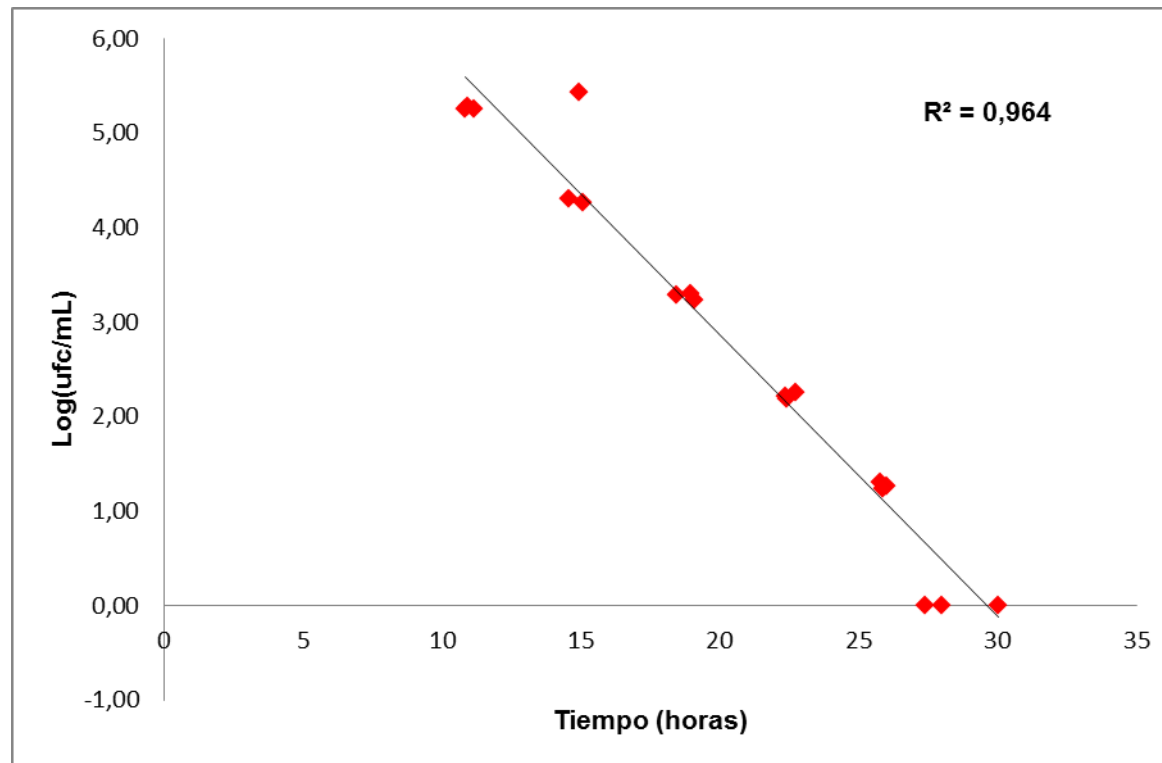


Figura 34. Representación gráfica de la correlación obtenida entre el tiempo de detección medido por impedancia eléctrica indirecta y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de microbiología clásica empleando medio BAM Agar para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestis*.

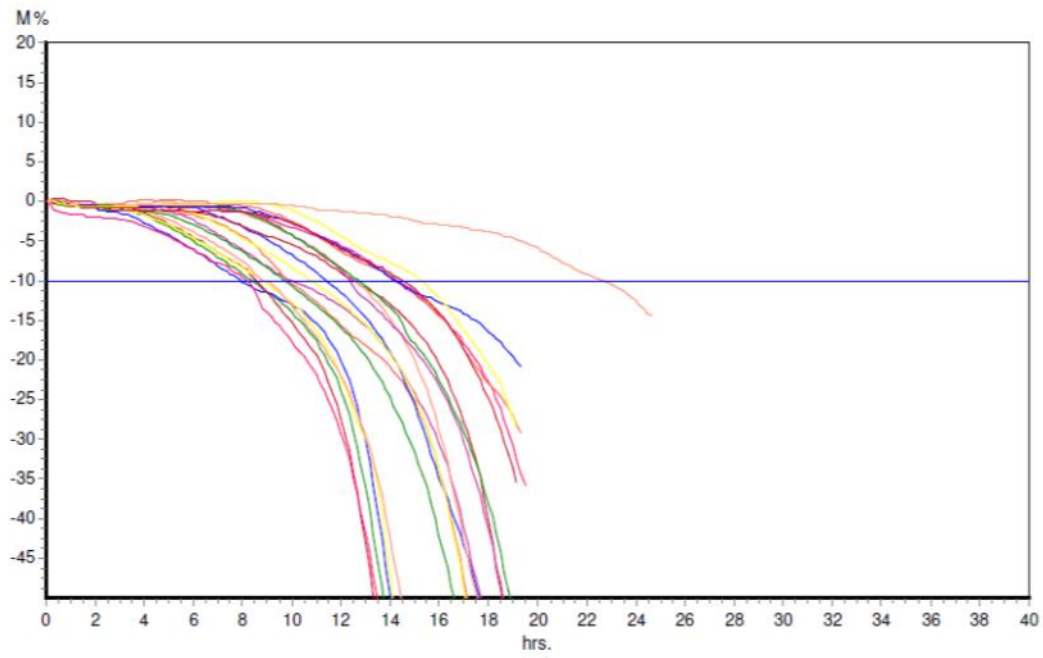


Figura 35. Curvas de crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica indirecta, donde se representa el tiempo de ensayo frente al porcentaje de cambio de impedancia en el medio de cultivo.

3. Experiencia 3. Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por impedancia eléctrica indirecta en concentrados, cremogenados y zumos destinados a la elaboración de zumos y bebidas de frutas.

En esta experiencia se llevó a cabo el desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante la técnica de impedancia eléctrica indirecta para cada una de las materias primas comerciales elegidas en este estudio, destinadas a la elaboración de zumos y otras bebidas a base de frutas, como son los zumos concentrados de uva, manzana, naranja y piña, los cremogenados de melocotón-nectarina y de pera, y zumo puro de naranja, todos previamente esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos para eliminar la posible carga microbiana que pudieran contener.

El desarrollo del método se realizó de forma individual para cada uno de los zumos concentrados, cremogenados y zumo, a partir de diluciones decimales (1:10) formadas por 10 mL de muestra y 90 mL de caldo BAM, e inoculadas con diferentes volúmenes de inóculo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (4×10^6 ufc/mL), con el fin de lograr concentraciones desde 10^6 hasta 1 ufc/mL. El inóculo de este microorganismo empleado en el estudio fue aislado de un zumo de melocotón y uva comercial pasteurizado a 98 °C/30 segundos e identificado por amplificación y secuenciación de ADN ribosómico correspondiente al gen 16S, como *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Las diluciones (1:10) inoculadas fueron tratadas térmicamente con el shock térmico seleccionado en la experiencia 1, 80 °C durante 10 minutos. Para la construcción de la recta de calibración cada una de las diluciones, enfriadas hasta 45 °C aproximadamente tras sufrir el choque térmico, fueron analizadas paralelamente por microbiología clásica sembrando 0,1 mL en una placa Petri de BAM Agar por la técnica de siembra en superficie e incubando a 45 ± 1 °C durante 72 horas, y por el sistema de impedancia adicionando 2 mL de la dilución y 2 mL de caldo BAT en viales que fueron introducidos en celdillas de medida con 2 mL de KOH (0,2%) e incubados en el equipo de impedancia Bactrac modelo 4300, a 45 ± 1 °C.

De esta manera se consigue la recta de calibración para determinar la concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a través de la ecuación:

$$\log (\text{ufc/mL}) = a \times t + b$$

Obteniendo la variable logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) a través del recuento en placa y la variable tiempo de detección en horas (t) a partir de las mediciones en el sistema de impedancia eléctrica indirecta.

La **Tabla 26**, **Tabla 27**, **Tabla 28** y **Tabla 29 (Anexo)** muestran los resultados del logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) y el tiempo de detección en horas a partir de la técnica de impedancia eléctrica indirecta fijando como valor de Impedancia del Medio (%M =-10) utilizados para la elaboración del método de determinación de *A. acidoterrestris* en zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña y zumo concentrado de naranja respectivamente. Los resultados obtenidos, siguiendo el mismo procedimiento, para el cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, se muestran en la **Tabla 30**, **Tabla 31** y **Tabla 32 (Anexo)**.

De acuerdo a los resultados observamos que el método desarrollado es válido para medir la concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en los zumos concentrados de uva, manzana y naranja, con unos coeficientes de correlación de -0,953, -0,969, y -0,978, respectivamente, mientras que para el zumo concentrado de piña se obtuvo un coeficiente de correlación de -0,829 (**Tabla 33**). Estos resultados reflejan la existencia de una correlación entre la concentración de inóculo y la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por el sistema de impedancia indirecta, existiendo una proporcionalidad inversa entre ellos, ya que una mayor concentración de microorganismo se corresponde con un menor tiempo de detección, puesto que una mayor generación de CO₂ produce más rápidamente un cambio en la impedancia del medio.

De igual manera este procedimiento es válido para la cuantificación de *A. acidoterrestris* en cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja obteniendo una ecuación lineal con unos coeficientes de correlación de -0,962 para cremogenado de melocotón-nectarina, -0,981 para cremogenado de pera y -0,978 para zumo de naranja (**Tabla 33**), mostrando igualmente esa relación inversamente proporcional entre la cantidad ufc/mL y el tiempo de detección.

La relación inversa existente entre la concentración de microorganismos y el tiempo necesario para detectar los cambios en la impedancia, ha sido descrita en investigaciones de otros autores en diferentes tipos de alimentos y para distintos tipos de microorganismos. Deak y Beuchat (1993) establecieron la determinación de 7 tipos distintos de levaduras en zumo de manzana, con una correlación satisfactoria lograda

entre la población de levaduras viables y el tiempo de detección mediante la técnica impedimétrica indirecta. Ribeiro et al. (2003) obtuvieron resultados altamente reproducibles y correlacionados entre el tiempo de detección y la concentración de inóculos, para concentraciones de *E. coli* en judías verdes enlatadas y *Saccharomyces cerevisiae* en puré de manzana, mediante la técnica de impedancia eléctrica indirecta por liberación de CO₂. Sawai y Yoshikawa (2003) establecieron el método de cuantificación por impedancia eléctrica indirecta para hongos obteniendo un valor de $R^2 > 0,98$. Priego et al. (2011) obtuvieron coeficientes de correlación superiores a -0,90 para la cuantificación de bacterias coliformes, Enterobacterias y bacterias ácido lácticas en salchichón durante la fase de secado. Johnson et al. (2014) realizaron un estudio de determinación y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en puré de calabacín mediante impedancia eléctrica indirecta obteniendo como resultado una fuerte relación lineal entre el número de células viables y el tiempo de detección logrando un valor para $R^2 > 0,9$, coincidiendo con nuestros resultados.

En las figuras, **Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39, Figura 40, Figura 41 y Figura 42** se muestran el análisis de regresión entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonias y el tiempo de detección empleado para determinar el crecimiento y concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante la técnica impedimétrica recogidos de los estudios de cada una de las materias primas como son, zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón–nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, respectivamente.

La linealidad obtenida entre las dos variables, log ufc/mL y el tiempo de detección queda reflejada con los valores de la varianza explicada R^2 que se muestra para todas las matrices estudiadas en la **Tabla 33** y las figuras correspondientes (**Figura 36, 37, 38, 39, 40, 41, y 42**). En todos los casos, excepto para el zumo concentrado de piña, con el método de impedancia indirecta podemos cuantificar la cantidad de microorganismo mediante la aplicación de una ecuación lineal dependiente del tiempo de detección, obteniendo unos valores de $R^2 \geq 0,9$, para todas las matrices o muestras estudiadas (**Tabla 33**).

Tabla 33. Ecuación lineal, coeficiente de regresión y varianza explicada obtenidas para la cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* para cada matriz a partir de (log ufc/mL) y tiempo de detección en horas.

Muestra	Ecuación	R ²	r
Zumo concentrado de uva	$y = -0,4454 x + 9,7937$	0,909	-0,953
Zumo concentrado de manzana	$y = -0,2834 x + 8,4792$	0,939	-0,969
Zumo concentrado de piña	$y = -0,2234 x + 8,2228$	0,688	-0,829
Zumo concentrado de naranja	$y = -0,1855 x + 8,2641$	0,962	-0,978
Cremogenado de melocotón-nectarina	$y = -0,3116 x + 8,8795$	0,935	-0,962
Cremogenado de pera	$y = -0,4104 x + 9,0659$	0,963	-0,981
Zumo puro de naranja	$y = -0,205 x + 7,7279$	0,957	-0,978

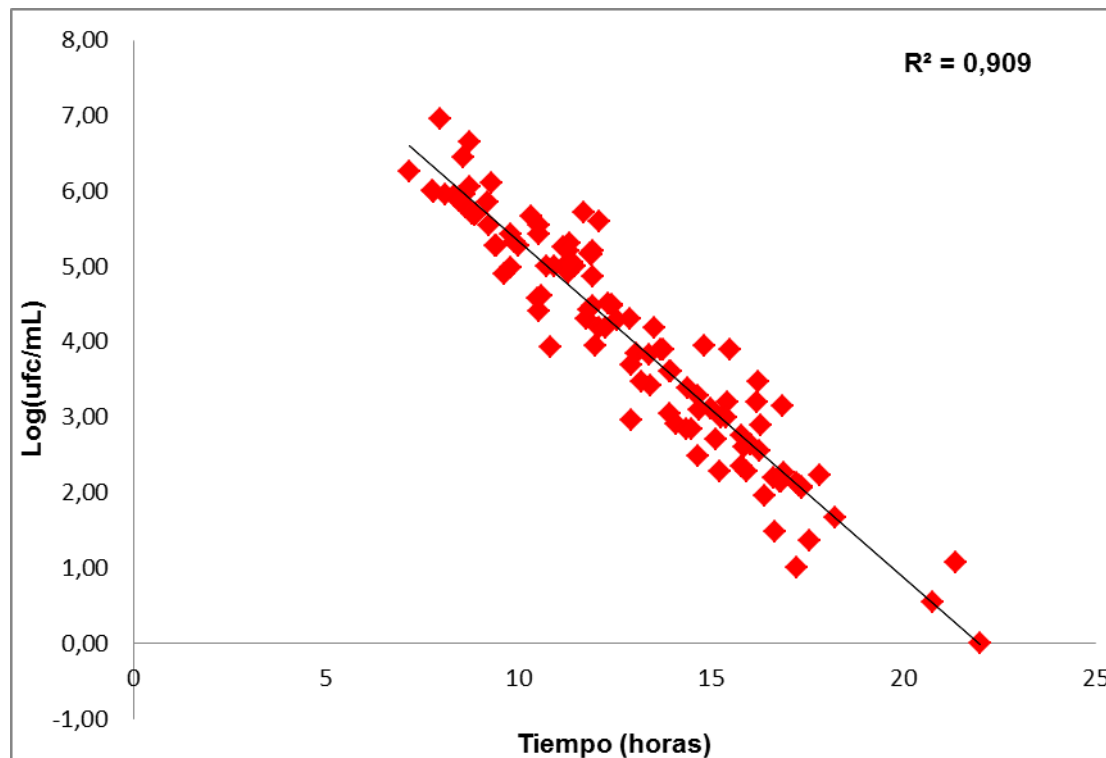


Figura 36. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de uva

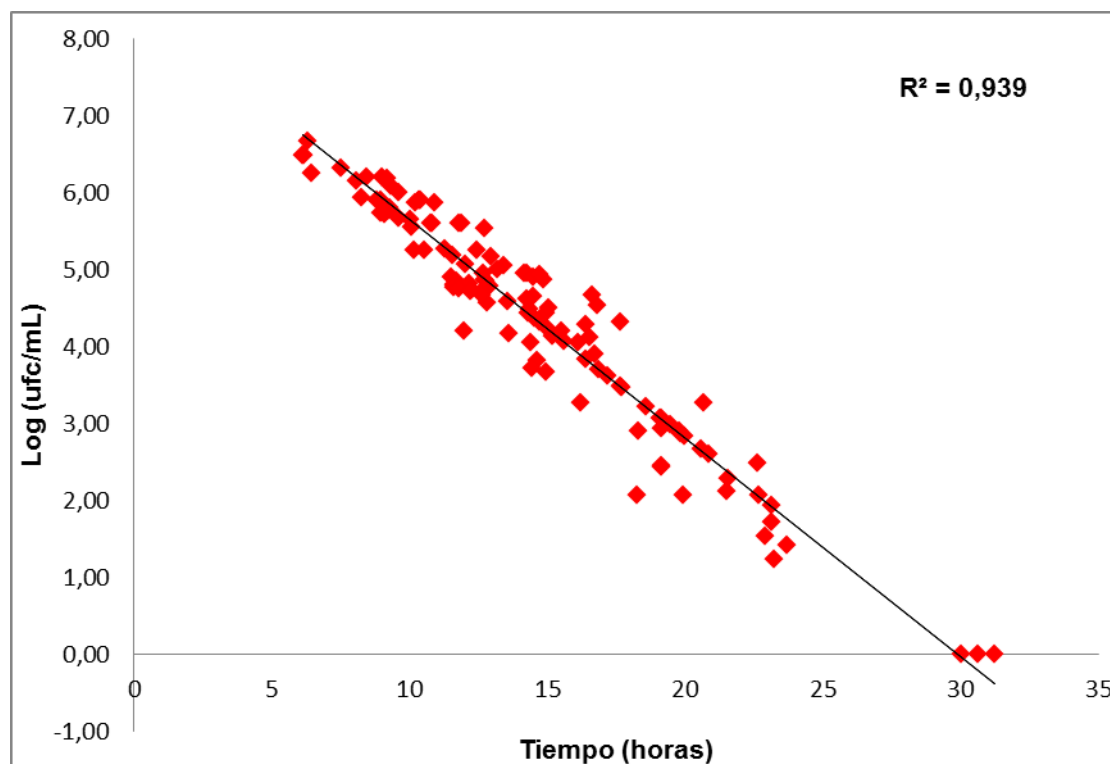


Figura 37. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de manzana.

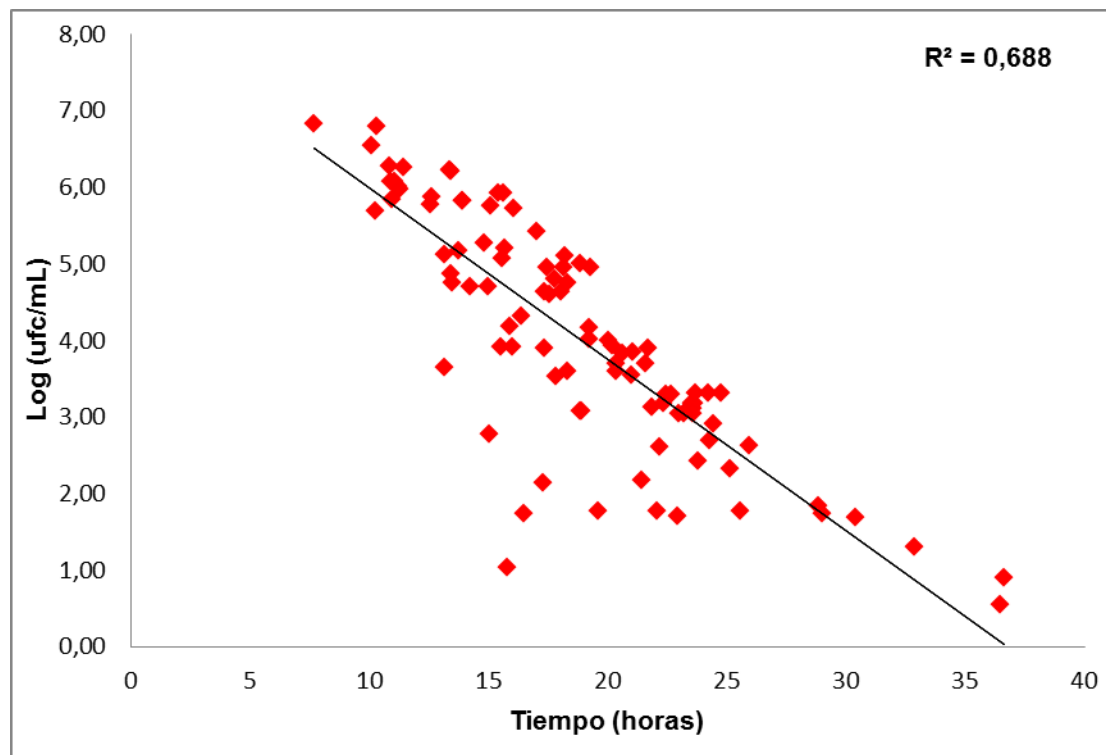


Figura 38. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de piña.

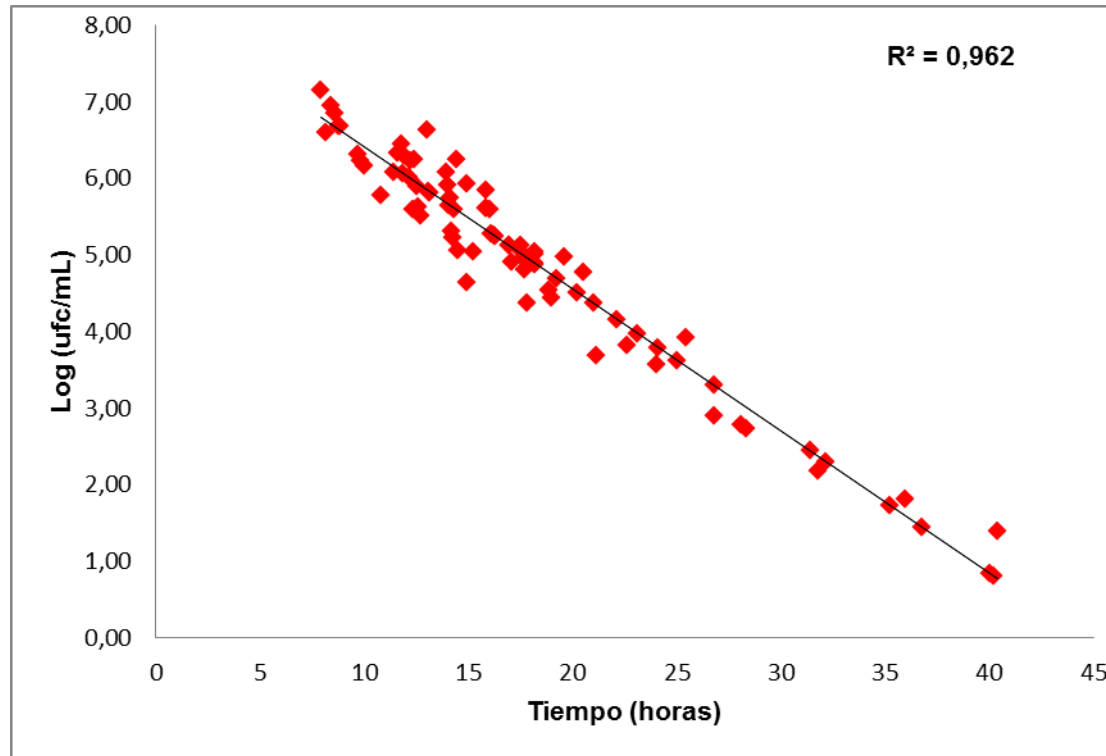


Figura 39. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo concentrado de naranja.

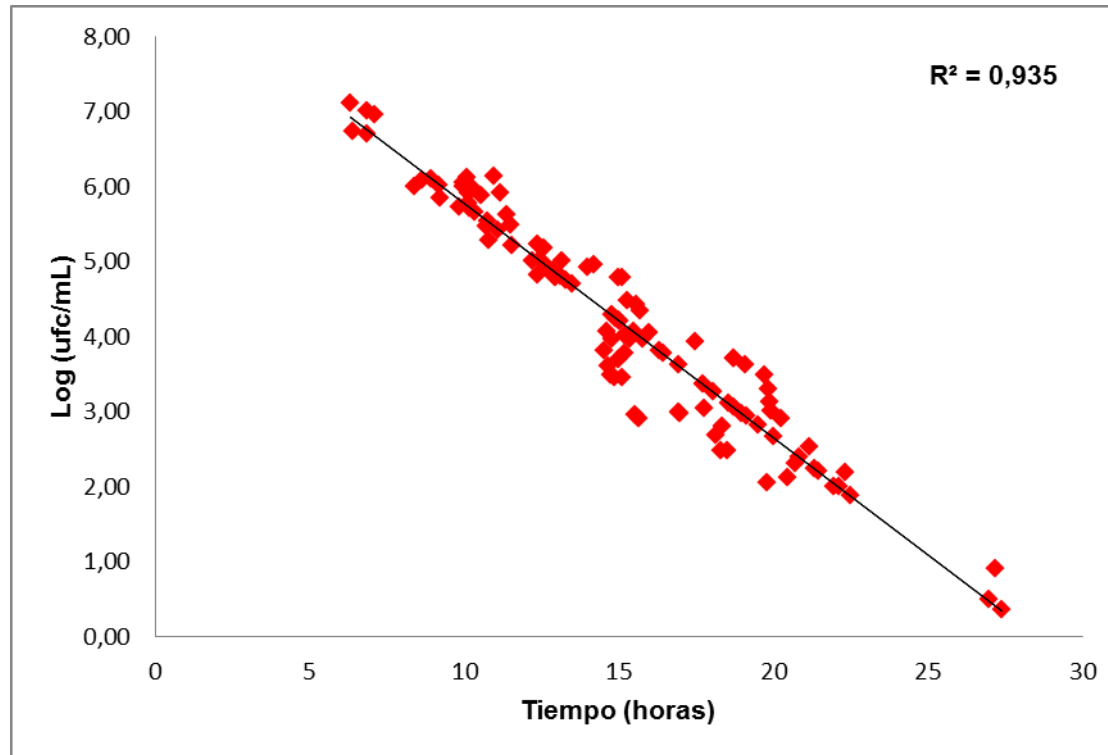


Figura 40. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para cremogénado de melocotón-nectarina.

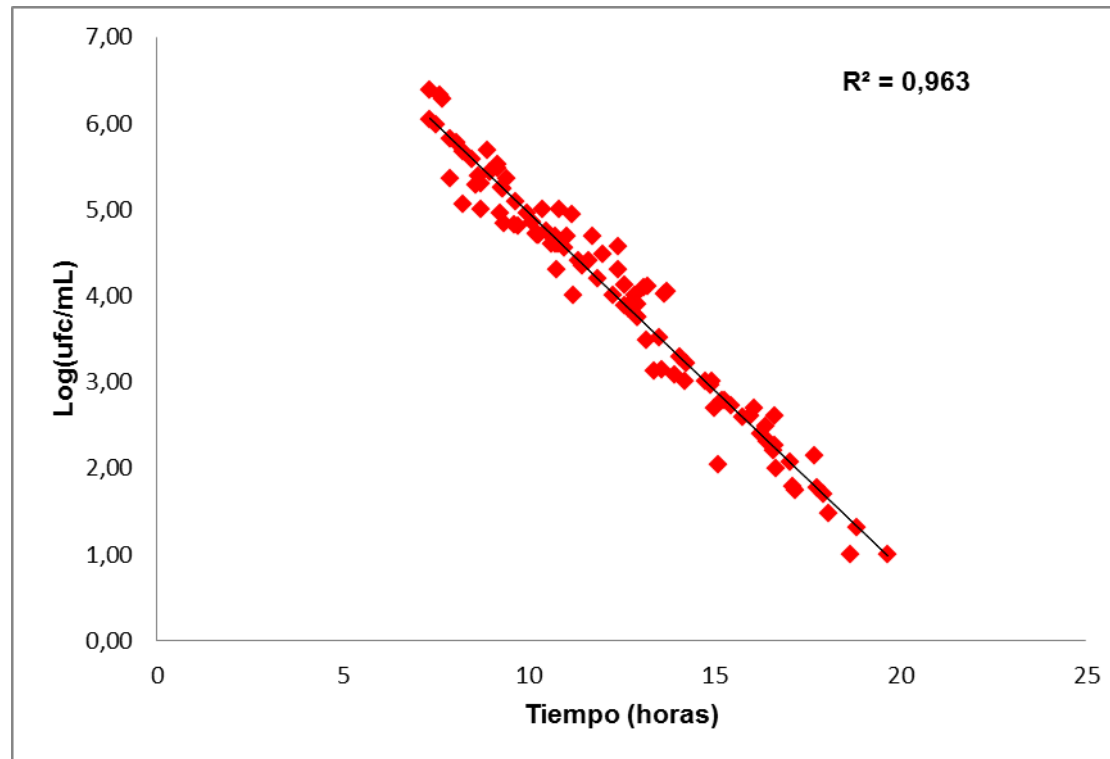


Figura 41. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para cremogenado de pera.

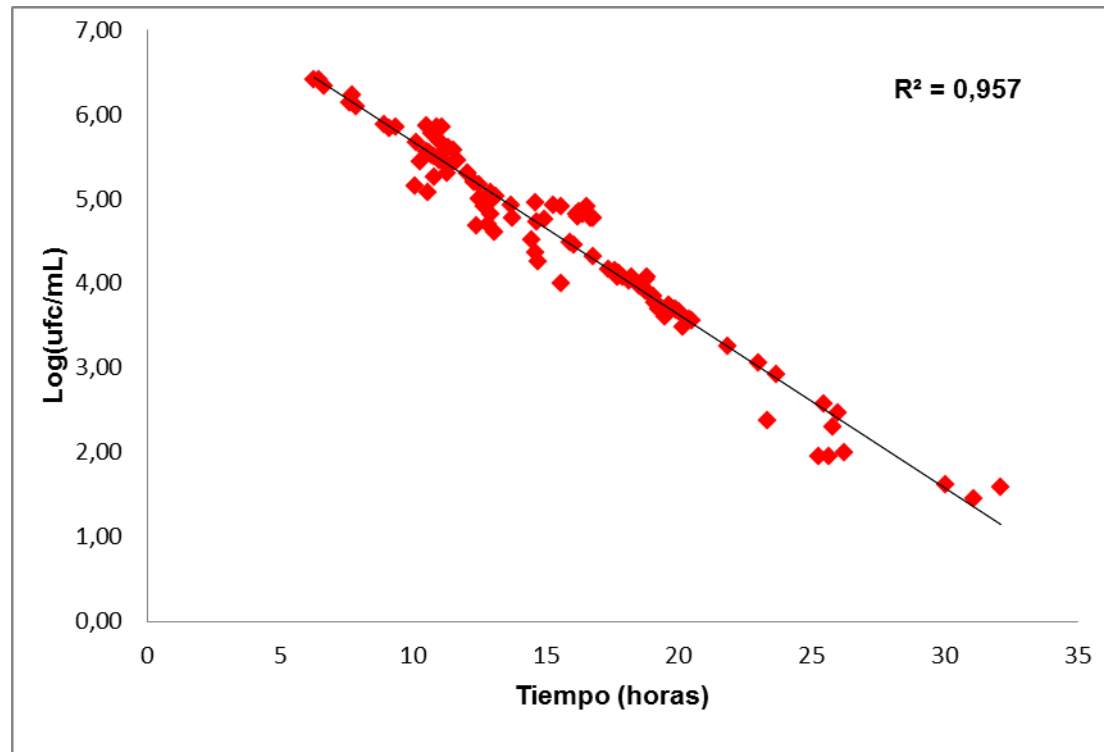


Figura 42. Representación gráfica de la recta de calibrado para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para zumo puro de naranja.

Debido a que el desarrollo de los métodos de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* para las diferentes matrices empleadas en el estudio se realizó utilizando colonias del microorganismo aisladas de un zumo de melocotón y uva comercial pasteurizado a 98 °C/30 segundos, este experimento fue repetido siguiendo las mismas pautas de trabajo empleando una cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CECT 7094; Deinhard et al. 1988; Wisotzkey et al., 1992). Las diluciones decimales preparadas con 10 mL de cada muestra y 90 mL de caldo BAM fueron inoculadas con diferentes volúmenes de microorganismo y se sometieron a tratamiento térmico de 80 °C durante 10 minutos. Una vez enfriadas hasta 45 °C aproximadamente se analizaron por métodos clásicos de análisis mediante siembra en superficie en placa de BAM Agar e incubación a 45 ± 1 °C durante 72 horas, y por la técnica de impedancia eléctrica indirecta empleando una celdilla con 2 mL de KOH 0,2% en la que se introduce un vial de medida impedimétrica con 2 mL de la dilución y 2 mL de caldo BAM.

De la misma manera obtenemos la recta de calibración para cuantificar *Alicyclobacillus acidoterrestris* a través de la ecuación:

$$\log (\text{ufc/mL}) = a \times t + b$$

Consiguiendo la variable logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) a través del recuento en placa y la variable tiempo de detección en horas (t) mediante las medidas en el sistema impedimétrico indirecto Bactrac 4300. El valor de Impedancia del Medio (%M) fijado es -10%.

En las tablas, **Tabla 34**, **Tabla 35**, **Tabla 36**, **Tabla 37**, **Tabla 38**, **Tabla 39** y **Tabla 40 (Anexo)** se exponen los resultados del logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) y el tiempo de detección en horas a partir de la técnica de impedancia eléctrica indirecta utilizados para la elaboración del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, respectivamente. Comparando los resultados obtenidos de los coeficientes de correlación empleando la cepa de referencia y los coeficientes de correlación del desarrollo de las rectas de calibración utilizando la cepa aislada de un zumo comercial observamos que existe similitud, y en ambos estudios la relación entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonias y el tiempo de detección por impedancia eléctrica indirecta están inversamente correlacionados con un valor de coeficiente de correlación alto, indicando la buena relación entre las dos variables, concentración de

inóculo y tiempo de detección para todas las matrices encontradas a excepción del zumo concentrado de piña.

En la **Tabla 41** se muestran los resultados de la ecuación de la recta, la varianza explicada y el coeficiente de regresión obtenidos del estudio realizado para cada una de las matrices inoculadas con la cepa de referencia.

Tabla 41. Ecuación de la recta, varianza explicada y coeficiente de correlación obtenidos a partir de log (ufc/mL) y el tiempo de detección en horas empleando una cepa de referencia.

Muestra	Ecuación	R ²	r
Zumo concentrado de uva	$y = -0,401 x + 10,257$	0,958	-0,979
Zumo concentrado de manzana	$y = -0,1926 x + 6,5901$	0,857	-0,926
Zumo concentrado de piña	$y = -0,1727 x + 6,4902$	0,430	-0,655
Zumo concentrado de naranja	$y = -0,2463 x + 8,5248$	0,911	-0,955
Cremogenado de melocotón-nectarina	$y = -0,2298 x + 8,4945$	0,957	-0,978
Cremogenado de pera	$y = -0,2997 x + 8,9808$	0,902	-0,950
Zumo puro de naranja	$y = -0,3118 x + 9,5608$	0,961	-0,982

En las figuras, **Figura 43, Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47, Figura 48 y Figura 49** se exponen la relación entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonias y el tiempo de detección mediante una recta de regresión para evaluar el método de cuantificación desarrollado para cada una de las matrices empleadas inoculadas con una cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que existe linealidad entre la concentración de microorganismo expresada como logaritmo decimal y el tiempo de detección logrando unos coeficientes de correlación elevados similares a los

conseguidos en el estudio realizado con la cepa aislada de un zumo. Así, los coeficientes de correlación fueron para el zumo concentrado de uva de -0,979, para el zumo concentrado de manzana de -0,926, en zumo concentrado de naranja -0,954, en cremogenado de melocotón-nectarina -0,978, en cremogenado de pera -0,950 y en zumo puro de naranja -0,982. Por el contrario no encontramos linealidad entre las variables estudiadas para el zumo concentrado de piña, obteniendo un coeficiente de correlación bajo, siendo -0,655.

En la **Tabla 42** se muestra un resumen de los coeficientes de correlación obtenidos para cada muestra obtenidos con *Alicyclobacillus acidoterrestris* aislado de un zumo de melocotón y uva comercial y con la cepa de referencia. Por lo tanto, las rectas de calibrado obtenidas con la cepa aislada del zumo para cada una de las materias primas utilizadas, exceptuando el zumo concentrado de piña, quedan validadas como un método rápido de cuantificación para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Tabla 42. Comparativa de los coeficientes de correlación obtenidos con la cepa aislada a partir de un zumo de melocotón y uva comercial y una cepa de referencia de *A. acidoterrestris*.

Tipo producto	Coefficiente correlación cepa aislada (r)	Coefficiente correlación cepa referencia (r)
Zumo concentrado de uva	-0,953	-0,979
Zumo concentrado de manzana	-0,969	-0,926
Zumo concentrado de piña	-0,829	-0,655
Zumo concentrado de naranja	-0,978	-0,955
Cremogenado de melocotón-nectarina	-0,962	-0,978
Cremogenado de pera	-0,981	-0,950
Zumo puro de naranja	-0,978	-0,982

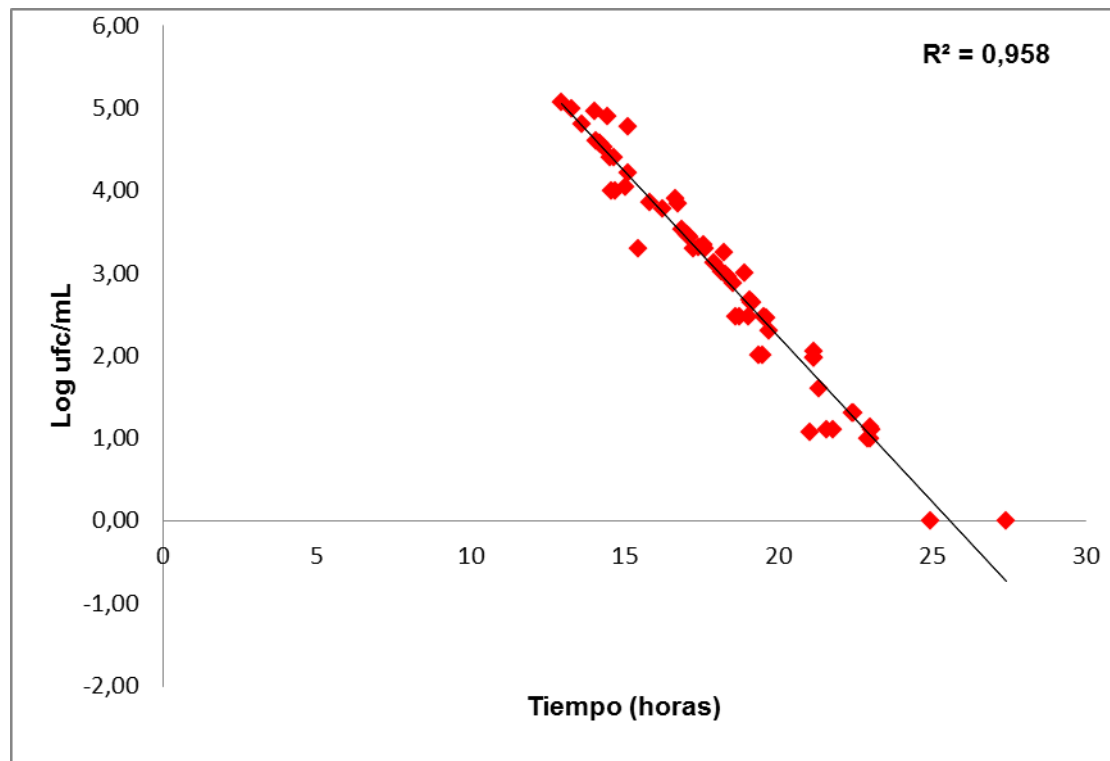


Figura 43. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de uva empleando una cepa de referencia.

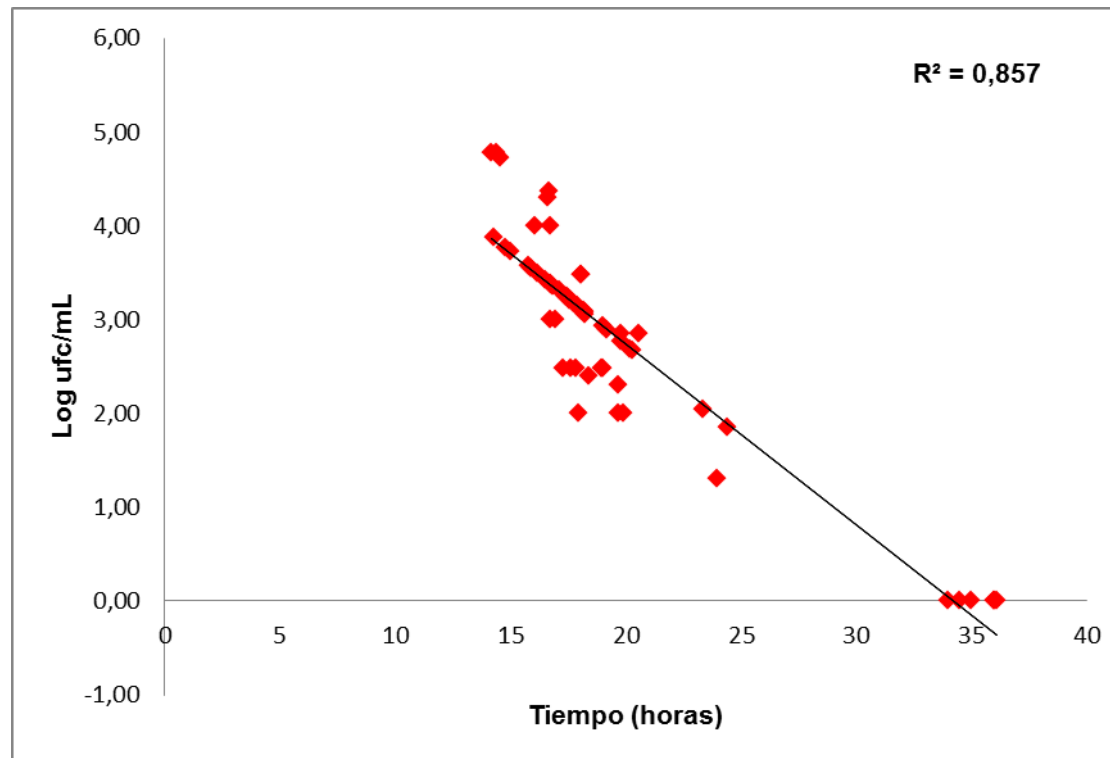


Figura 44. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de manzana empleando una cepa de referencia.

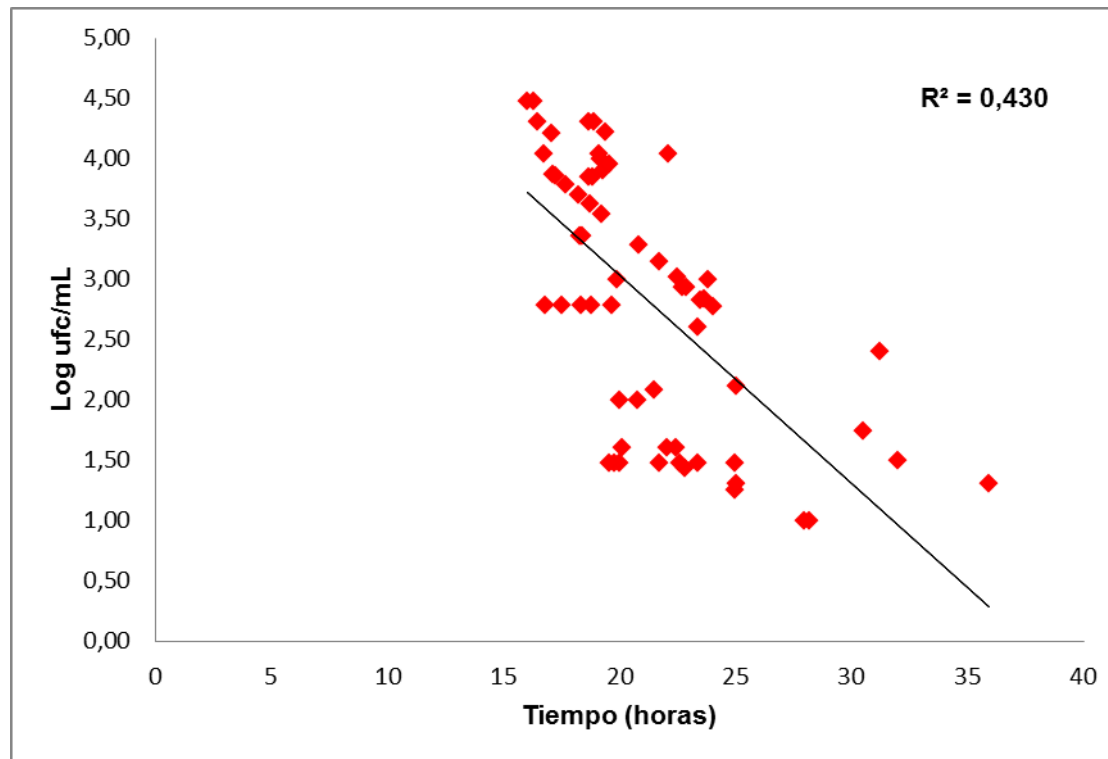


Figura 45. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de piña empleando una cepa de referencia.

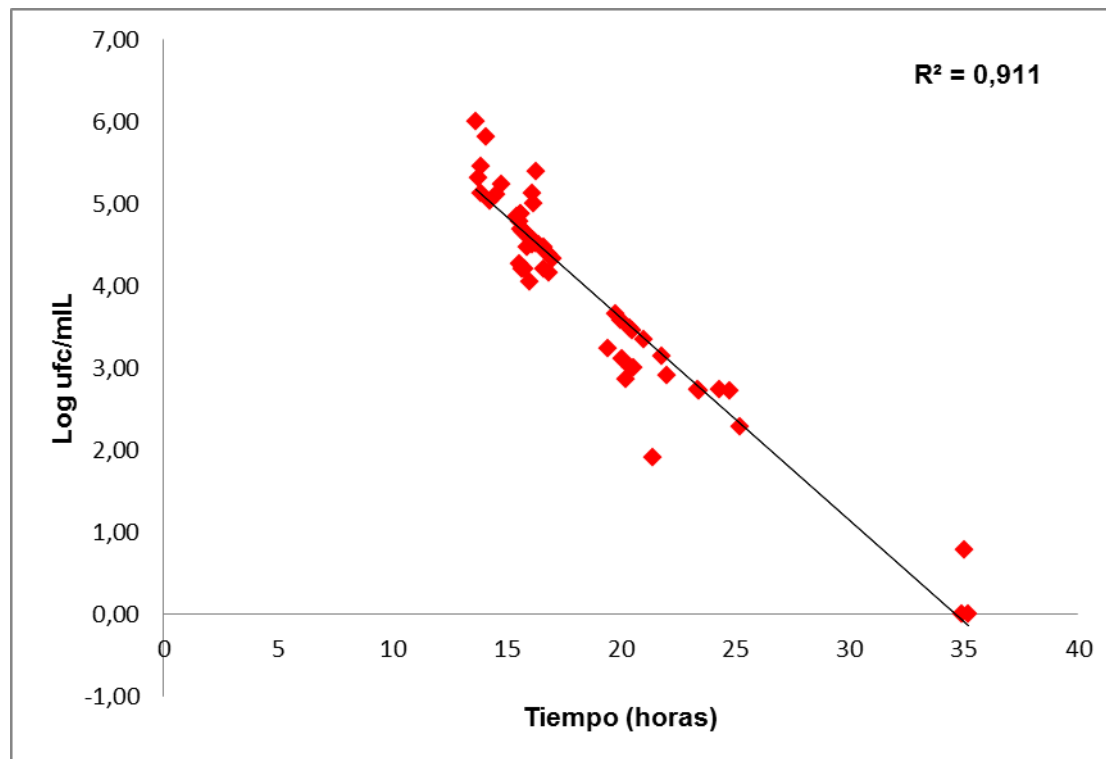


Figura 46. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo concentrado de naranja empleando una cepa de referencia.

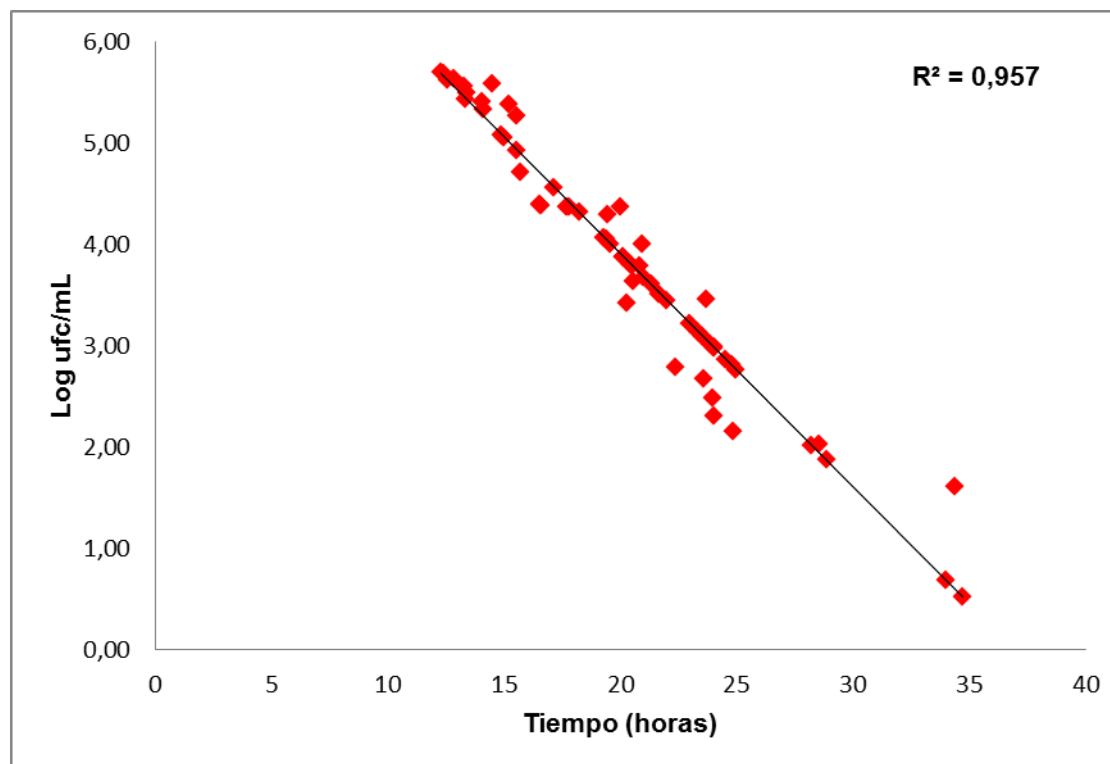


Figura 47. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en cremogenado de melocotón-nectarina empleando una cepa de referencia.

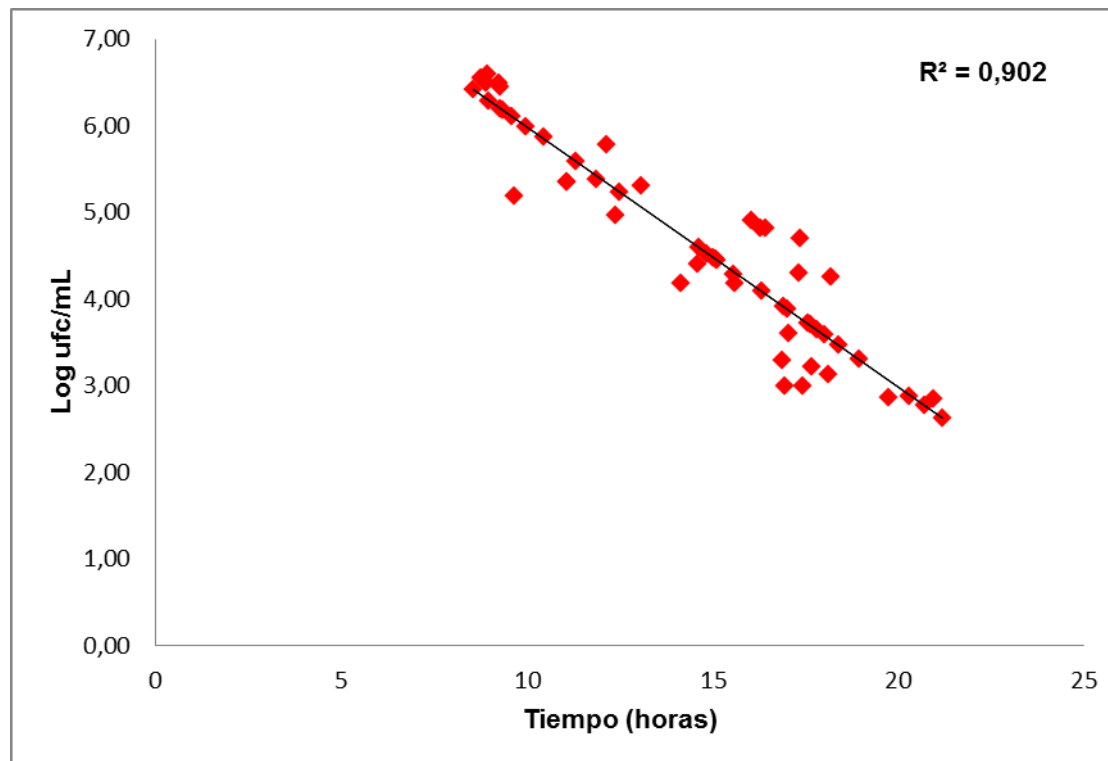


Figura 48. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en cremogenado de pera empleando una cepa de referencia.

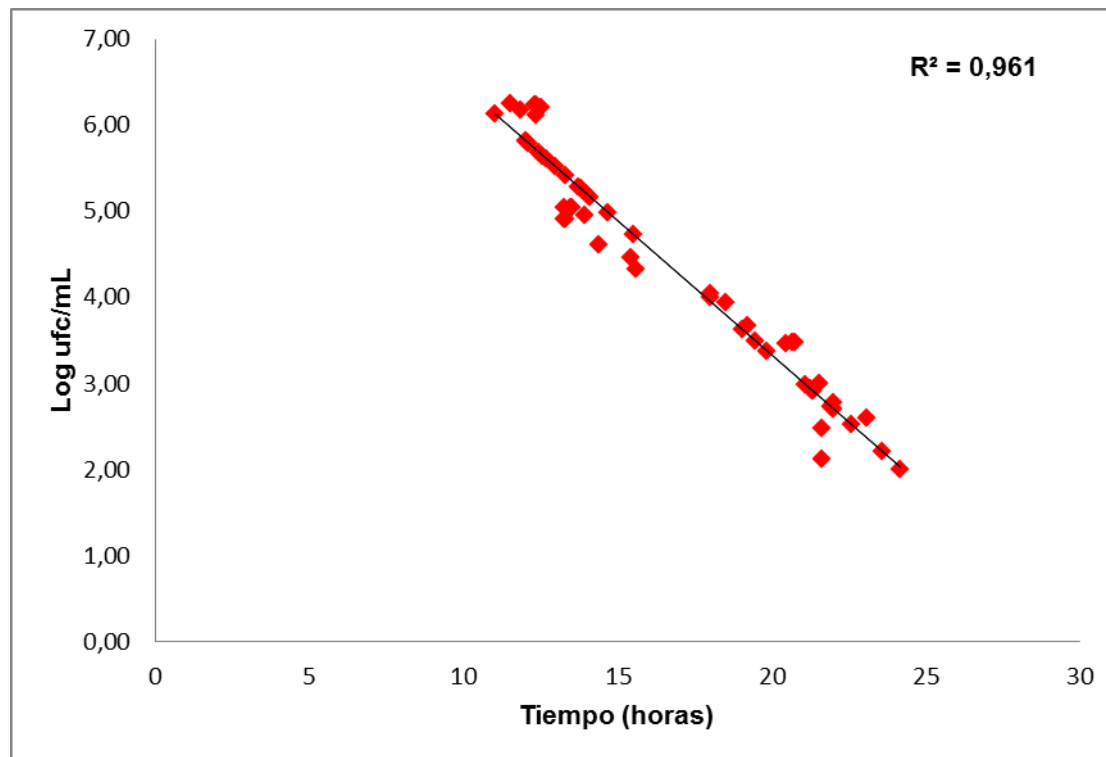


Figura 49. Representación gráfica de la recta de correlación para *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenida entre el tiempo de detección determinado con Bactrac y el logaritmo decimal de las ufc/mL a partir de métodos clásicos de microbiología con BAM Agar para en zumo puro de naranja empleando una cepa de referencia.

Una vez establecida la relación existente entre el tiempo de detección y la concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en las muestras estudiadas, para la cepa aislada de un zumo y la cepa de referencia, procedimos al estudio comparativo con la técnica de microbiología clásica. Las figuras, **Figura 50**, **Figura 51**, **Figura 52**, **Figura 53**, **Figura 54**, **Figura 55** y **Figura 56** exponen la relación entre el número de unidades formadoras de colonias de *Alicyclobacillus acidoterrestris* determinadas por el método de incubación en placa de BAM Agar y las determinadas según ecuación lineal obtenida para el método impedimétrico indirecto utilizando el Bactrac en las matrices estudiadas. La **Tabla 43** muestra la relación existente entre estos dos métodos al recoger la ecuación de la recta, la varianza explicada (R^2) y el coeficiente de correlación (r).

Tabla 43. Comparación del log (ufc/mL) obtenido mediante microbiología clásica con siembra en superficie en BAM Agar y el log (ufc/mL) obtenido aplicando cada ecuación lineal por el método de impedancia indirecta.

Muestra	Ecuación	R^2	r
Zumo concentrado de uva	$y=1,0988 x - 0,1435$	0,946	0,973
Zumo concentrado de manzana	$y=1,0551 x - 0,1563$	0,989	0,994
Zumo concentrado de piña	$y=1,0864 x - 0,2289$	0,366	0,605
Zumo concentrado de naranja	$y=1,2387 x - 1,6472$	0,936	0,967
Cremonado de melocotón-nectarina	$y=1,015 x - 0,1855$	0,949	0,974
Cremonado de pera	$y=0,9333 x + 0,3518$	0,982	0,991
Zumo puro de naranja	$y=1,3385 x - 2,0294$	0,913	0,956

Observamos que para todas las matrices, a excepción del zumo concentrado de piña, existe una relación lineal para las ufc/mL expresadas en logaritmo, mediante los dos métodos de análisis. La varianza explicada y el coeficiente de correlación fueron de 0,946 y 0,973 en zumo concentrado de uva, 0,989 y 0,994 en zumo concentrado de manzana, 0,936 y 0,967 en zumo concentrado de naranja, 0,949 y 0,974 en cremogenado de melocotón-nectarina, 0,982 y 0,991 en cremogenado de pera y 0,913 y 0,956 en zumo puro de naranja. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta experiencia observamos que la técnica de impedancia eléctrica indirecta es una buena alternativa a los métodos clásicos de detección y cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en materia prima destinada a la fabricación de zumos y bebidas de frutas, con exclusión del zumo concentrado de piña, ya que permite detectar una carga microbiana baja en torno a 1-10 ufc/mL en 21 horas en el caso de zumo concentrado de uva y cremogenado de pera, 30 horas aproximadamente para el zumo concentrado de manzana y zumo puro de naranja, 40 horas en zumo concentrado de naranja y 27 horas para el cremogenado de melocotón-nectarina, lo que reduce significativamente los tiempos de incubación y obtención de resultados por los métodos clásicos.

Sin embargo, para el zumo concentrado de piña los valores para estas dos funciones estadísticas fueron de 0,366 y 0,605, lo que nos indica que en esta matriz no existe una buena linealidad entre ambos métodos. Por lo tanto, no es un método que se puede aplicar para la cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de piña, al no lograr buena linealidad entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) y el tiempo de detección en horas, tanto en el ensayo realizado con el inóculo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* aislado del zumo de melocotón y uva comercial, como en el estudio realizado empleando la cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, además de no mostrar correlación con los resultados obtenidos por impedancia eléctrica y con los métodos de microbiología clásica empleando BAM Agar. Según los datos de las (**Tabla 28**) y (**Tabla 37**) observamos que un mayor valor de tiempo de detección por impedancia va asociado a un mayor número de logaritmo de unidades formadoras de colonias log (ufc/mL), cuando lo esperado sería que a mayor tiempo de detección obtuviéramos menor valor de unidades formadoras de colonias en forma logarítmica. Dado que la variable “tiempo” en impedancia la conseguimos a partir de la generación de CO₂, que es producido en la síntesis de guayacol, que depende del crecimiento y concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el zumo, podemos deducir que la mayor o menor

formación de guayacol, y por consiguiente producción de CO₂ se ve afectada por sustancias presentes en el zumo concentrado.

De acuerdo a algunos estudios se ha demostrado la incapacidad que presenta *Alicyclobacillus acidoterrestris* para sobrevivir y crecer en zumos de piña o bebidas que contengan esta fruta, observando disminución de la población de este microorganismo (Splittstoesser et al., 1998; Walls y Chuyate, 2000).

McIntyre et al. (1995) y Splittstoesser et al. (1998) observaron que a pesar de que el concentrado de piña reconstituido a zumo presenta un valor de pH y contenido en sólidos solubles favorables para el desarrollo de *Alicyclobacillus*, posee inhibidores naturales tales como el benzaldehído y compuestos fenólicos que pueden afectar a la supervivencia de *Alicyclobacillus* spp. presente en el zumo. Concretamente, estos autores describieron que la sustancia inhibidora era la enzima bromelina, mostrando un efecto antimicrobiano contra *Alicyclobacillus* spp. McKnight et al. (2010) llevó a cabo un estudio de aislamiento, caracterización genotípica y resistencia al calor de *Alicyclobacillus* spp. en zumos de frutas exóticas como maracuyá y piña, no observando crecimiento de este microorganismo en las muestras de zumo piña ensayadas, coincidiendo con estudios realizados por otros investigadores (Previdi et al., 1995; Eiroa et al., 1999; Pinhatti et al., 1997; Walls y Chuyate, 2000; Spinelli et al., 2009; Tribst et al., 2009), quienes observaron que los zumos de estas frutas inoculados no presentaban signos de deterioro por la generación de malos olores, como el guayacol, a pesar de tener condiciones experimentales adecuadas de T^a y pH para el crecimiento de este grupo microbiano.

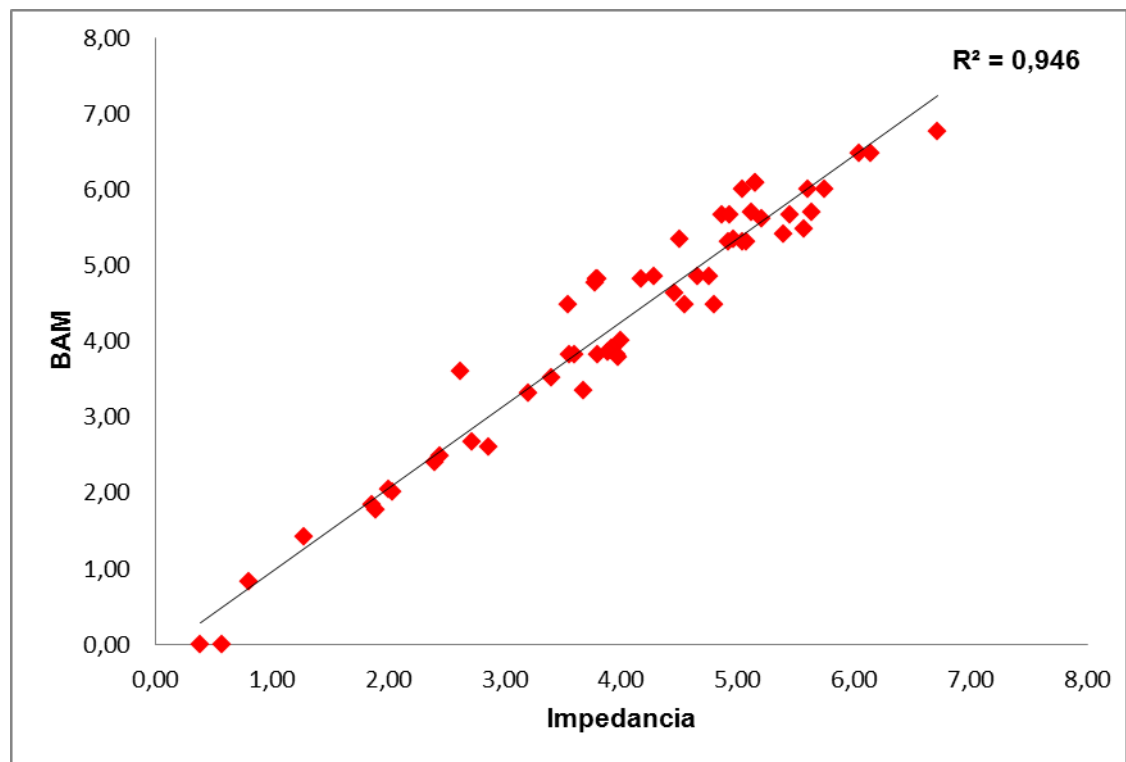


Figura 50. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de uva.

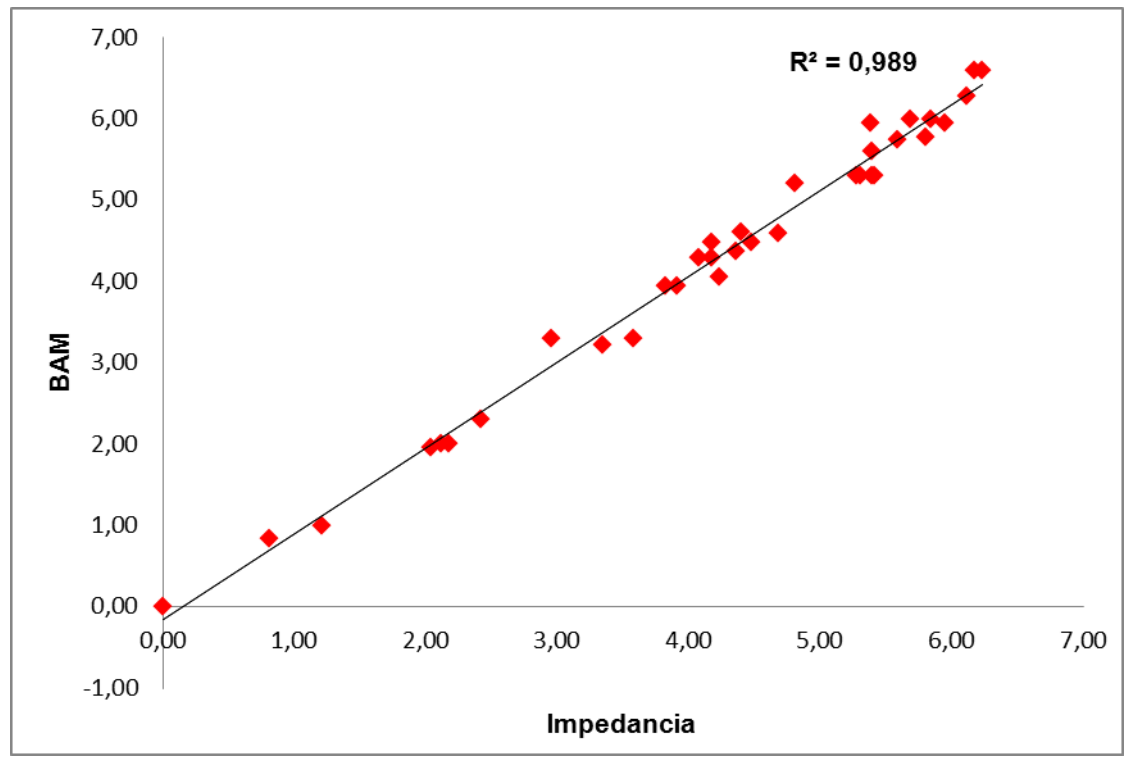


Figura 51. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de manzana.

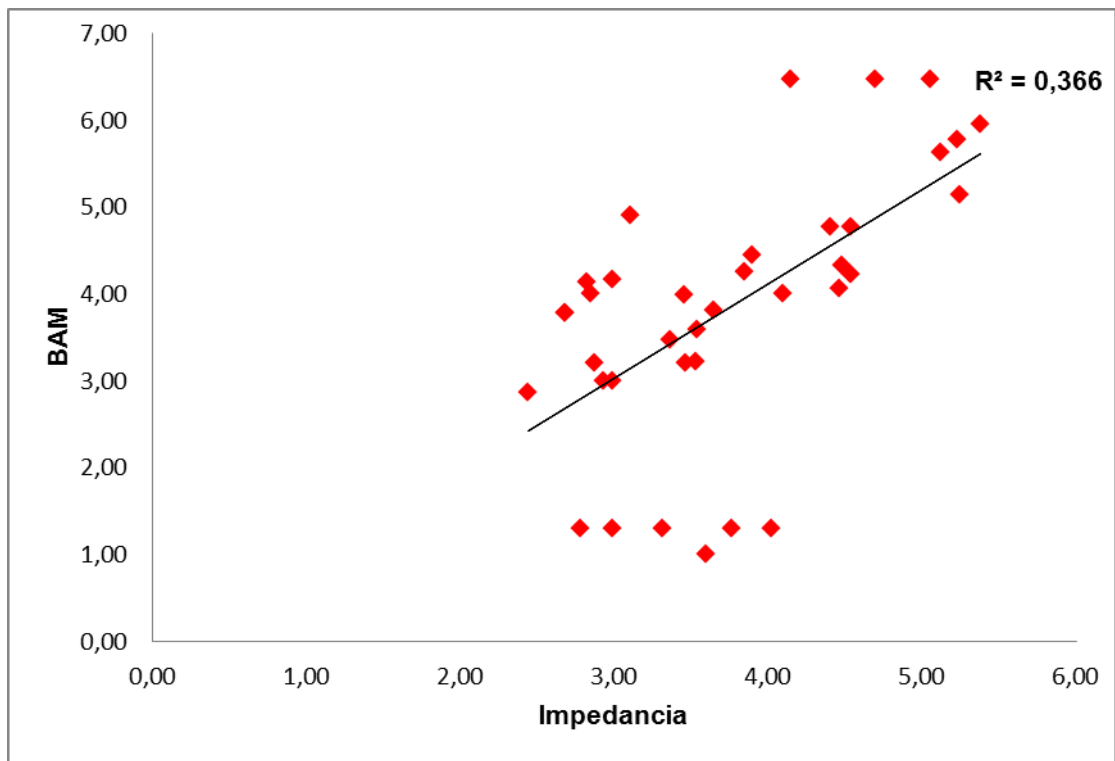


Figura 52. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de piña.

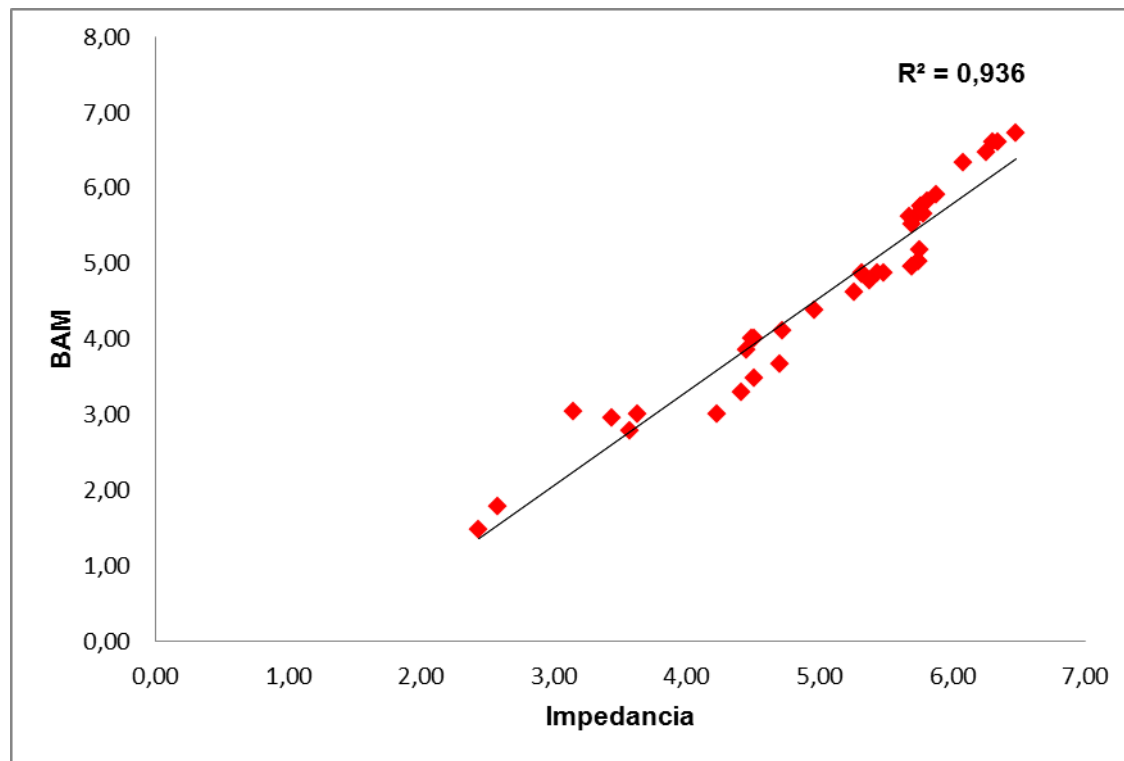


Figura 53. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo concentrado de naranja.

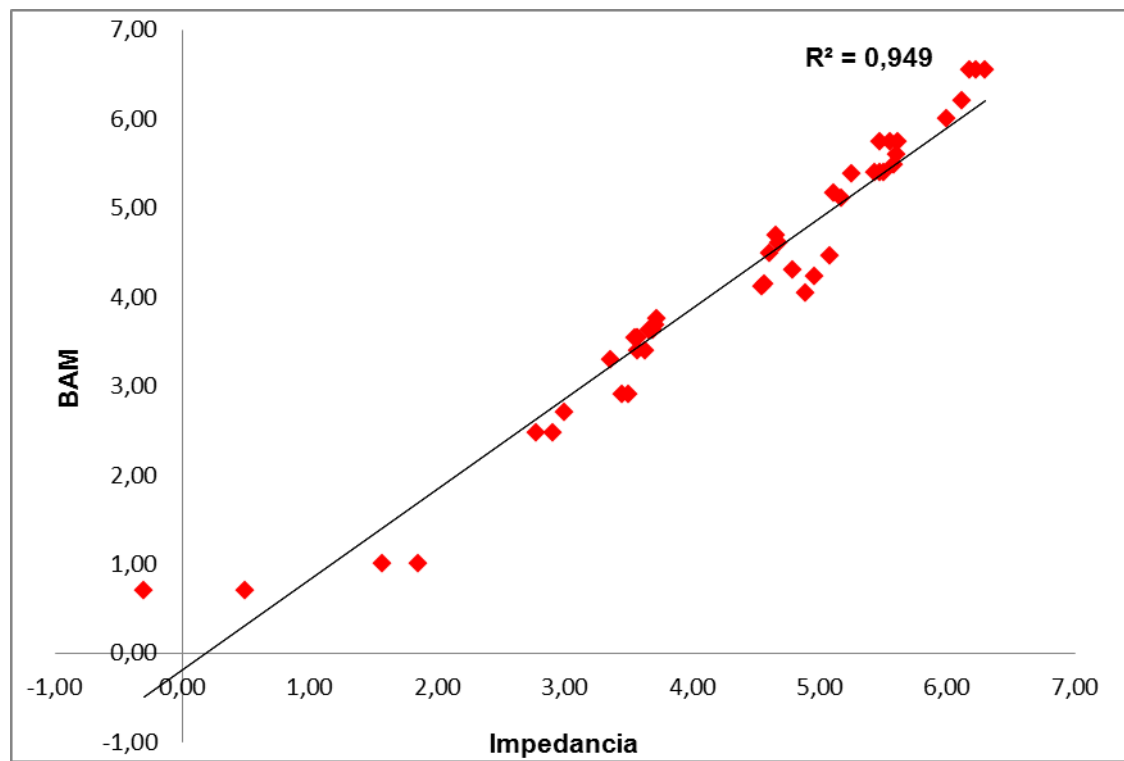


Figura 54. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para cremogenado de melocotón-nectarina.

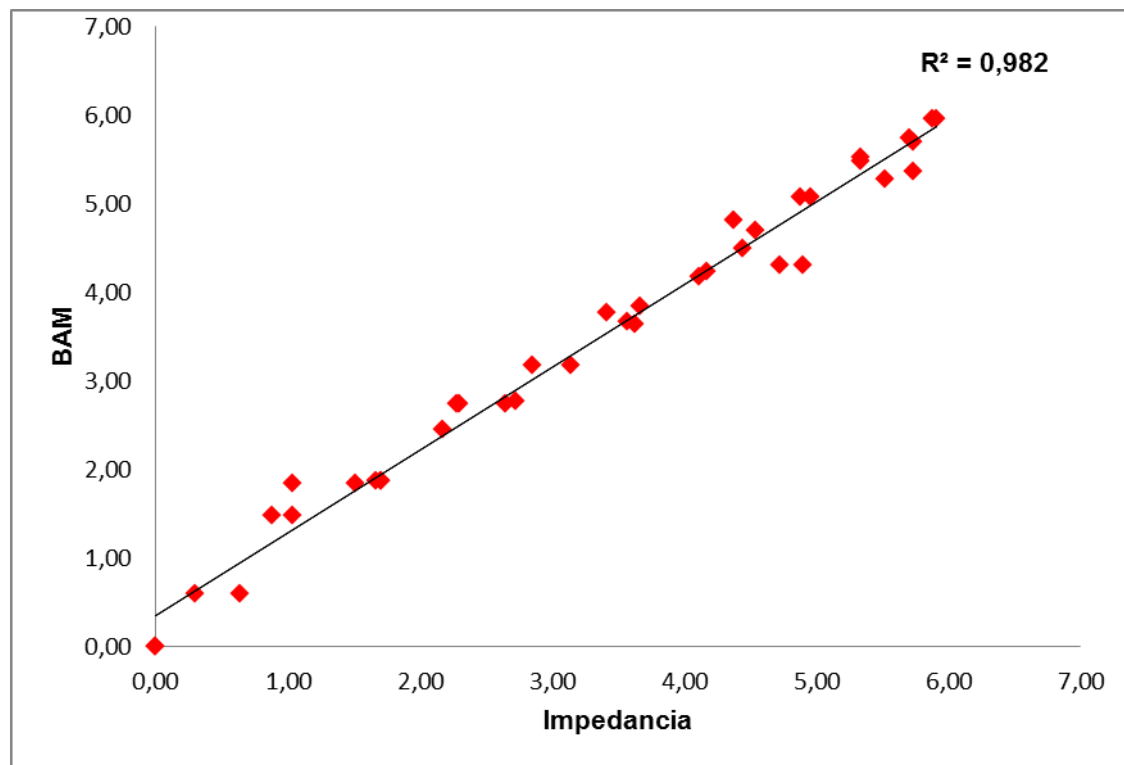


Figura 55. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para cremogenado de pera.

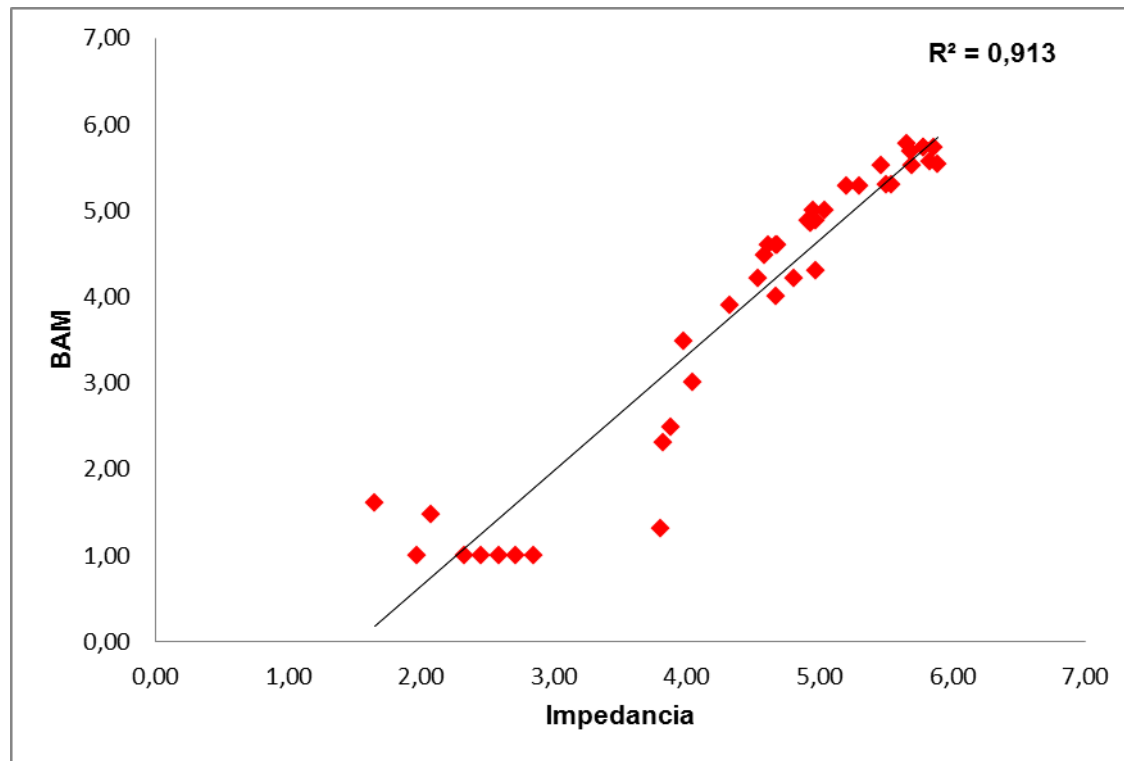


Figura 56. Representación gráfica entre log (ufc/mL) determinados por el método clásico de microbiología con BAM Agar comparado con el método de impedancia eléctrica indirecta para zumo puro de naranja.

4. Experiencia 4. Desarrollo de un método de cuantificación de *Alicyclobacillus* spp. por PCR en concentrados, cremogenados y zumos destinados a la elaboración de zumos y bebidas de frutas.

El objetivo de esta experiencia fue desarrollar un método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por RTi-PCR (PCR a tiempo real) para las materias primas seleccionadas en este estudio: zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, todas ellas destinadas a la elaboración de zumos y bebidas de frutas.

Se evaluó la especificidad de los cebadores seleccionados: Forward: 5'-TGAGTAACACGTGGGCAATCTG-3' y Reverse: 5'-CTACCCGTGTATTATCCGGCAT-3, en primer lugar mediante PCR convencional en 9 cepas (6 de *Alicyclobacillus* y 3 de *Bacillus*) *A. acidoterrestris*; *A. acidocaldarius*; *A. acidiphilus*; *A. contaminans*; *A. fastidiosus*; *A. pomorum*; *B. subtilis*; *B. brevis*; *B. licheniformis* amplificando sólo la cepa de *Alicyclobacillus acidoterrestris* para la que fueron diseñados. La especificidad se ensayó a continuación en modo TaqMan, utilizando la sonda y las condiciones de reacción descritas por Wang et al. (2014), obteniendo una reacción específica para la cual el único pico de amplificación fue el correspondiente a *Alicyclobacillus acidoterrestris* con una $T_m = 70$ °C, siendo la única cepa que presentó señal de fluorescencia.

El resto de cepas ensayadas no mostró un anclaje adecuado de cebadores y sonda en esa región, ya que sólo la presenta *Alicyclobacillus acidoterrestris*, no dando en consecuencia reactividad cruzada. Así, los resultados indicaron que en condiciones adecuadas, la combinación de las secuencias de los tres oligonucleótidos sólo distinguen (amplifican) *A. acidoterrestris*, siendo específicos para este microorganismo.

La sensibilidad de la reacción de RTi-PCR se evaluó en diluciones seriadas inoculadas con *Alicyclobacillus acidoterrestris* (2×10^6 - 2×10^1 ufc/mL), en agua ultrapura estéril. A continuación, se tomaron 5 mL de cada dilución y tras centrifugar (10 minutos a 6000 g), se extrajo el ADN como se describe en la experiencia 4 (apartado de materiales y métodos), que fue amplificado mediante RTi-PCR a las condiciones optimizadas. La concentración de la mayor dilución de *Alicyclobacillus acidoterrestris*

que dio un resultado positivo ($C_T < 40$), se definió como límite de detección. Los resultados se muestran en la **Figura 57**.

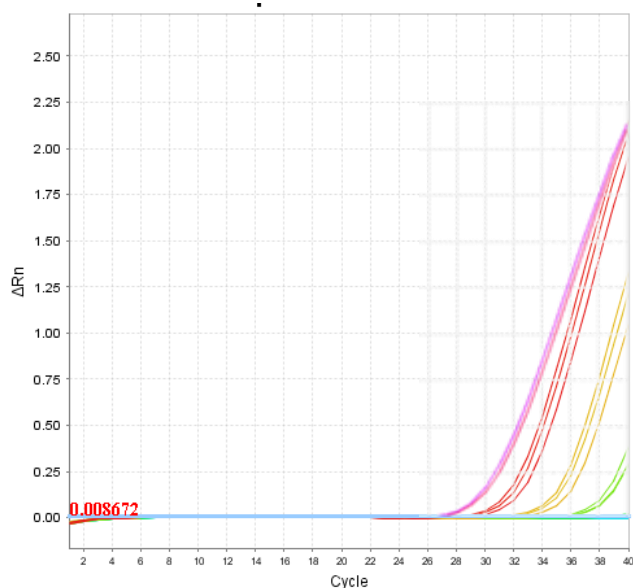


Figura 57. Curvas de amplificación obtenidas en el ensayo de sensibilidad.

En la **Tabla 44**, se muestran los resultados obtenidos del logaritmo de las unidades formadoras de colonias $\log(\text{ufc/mL})$ y los valores de C_T por RTi-PCR, a partir de 3 réplicas, para las distintas concentraciones adicionadas del inóculo al agua ultrapura estéril, que además fueron cuantificadas por recuento en placa de BAM Agar mediante microbiología clásica.

Para la construcción de las curvas patrón se representaron los valores medios de C_T en función del logaritmo de las concentraciones ensayadas con la cepa de referencia, calculando las rectas de regresión asociadas a los puntos, así como el coeficiente de correlación y la varianza explicada para cada una de ellas. La **Figura 58** muestra la recta de calibrado conseguida considerando las diluciones seriadas de la cepa de referencia con una concentración inicial de 2×10^6 , para obtener el número de C_T a través de la PCR y la **Figura 59** refleja la recta de calibración obtenida a partir de los valores de unidades formadoras de colonias en forma de logaritmo tras el recuento en placa en BAM Agar por método microbiológico clásico de las diluciones decimales seriadas de la cepa de referencia. En ambos casos, los valores de las pendientes oscilaron entre -2,87 y -2,84, valores cercanos a -3,32, considerado como el valor óptimo teórico (Higuchi et al., 1993). La eficiencia de la reacción según la fórmula $E = (10^{-1/s} - 1)$ descrita por Knutsson et al., (2002) calculada a partir de los

valores de la pendiente (s), oscila entre 1,23 (123%) y 1,24 (124%). Los valores de varianza explicada, R^2 , confirman la linealidad de la reacción ya que en ambos casos fueron superiores a 0,98. Así, el límite de detección para *A. acidoterrestris* (criterio: $C_T < 40$), se estableció en 200-330 ufc/mL.

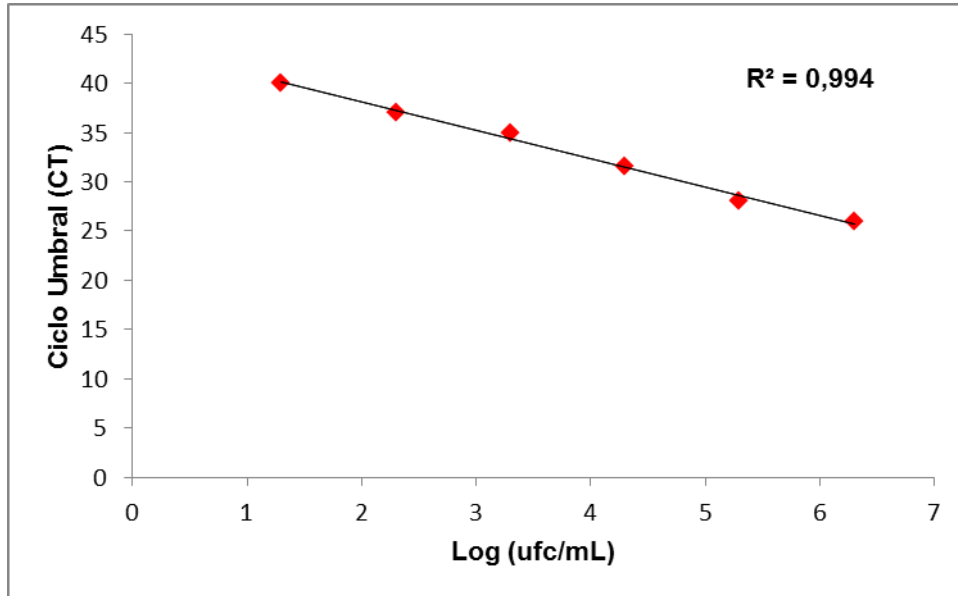


Figura 58. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón obtenido en agua ultrapura estéril, cuantificado el logaritmo decimal de unidades formadoras de colonias por fluorescencia.

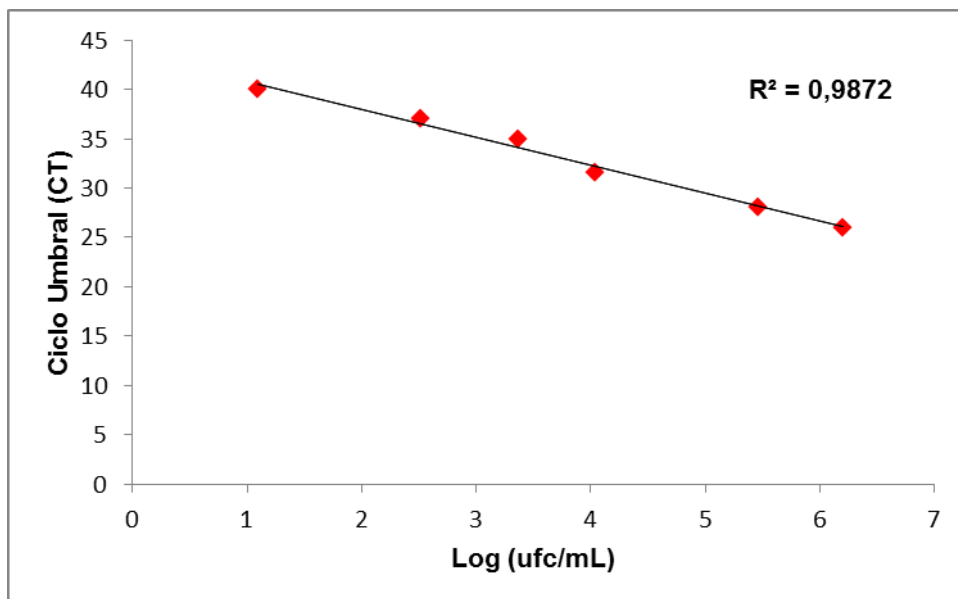


Figura 59. Análisis de regresión para los valores de las rectas patrón obtenido en agua ultrapura estéril, cuantificadas las unidades formadoras de colonias en logaritmo decimal por recuento en placa de BAM Agar.

Las prestaciones del método de RTi-PCR optimizado y el posible efecto de la matriz, se evaluó en el zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, inoculadas con *A. acidoterrestris* a concentraciones desde 10^4 hasta 1 ufc/mL, para la construcción de las rectas de calibrado en cada una de las matrices. Para ello, se representaron los valores medios de C_T obtenidos a partir de PCR en función del logaritmo de las unidades formadoras de colonias de las diluciones ensayadas por microbiología clásica empleando BAM Agar. A partir de estos datos se calcularon las rectas de regresión asociadas a los puntos así, como el coeficiente de correlación y la varianza explicada para cada una de ellas. Las tablas, **Tabla 45**, **Tabla 46**, **Tabla 47**, **Tabla 48**, **Tabla 49**, **Tabla 50** y **Tabla 51** muestran los resultados obtenidos del logaritmo de las unidades formadoras de colonias log (ufc/mL) obtenidas por fluorescencia y por microbiología clásica en placa de BAM Agar y los valores de C_T obtenidos por RTi-PCR, a partir de 3 réplicas, para las distintas concentraciones adicionadas del inóculo a zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja.

Las figuras, **Figura 60**, **Figura 61**, **Figura 62**, **Figura 63**, **Figura 64**, **Figura 65** y **Figura 66** muestran las rectas de regresión obtenidas para el zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña y zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, de forma individual, considerando el número de C_T de las diluciones seriadas para cada una de las muestras mediante PCR y el valor obtenido de logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro mediante fluorescencia.

Tabla 44. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR en la construcción de la recta de calibrado para el método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de la cepa de referencia¹.

Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
0	10	26	6,3 ± 0,39	6,2 ± 0,14
9	1	28	5,3 ± 0,28	5,46 ± 0,02
9,9	0,1	31,5	4,3 ± 0,67	4,04 ± 0,06
10	0,01	35	3,3 ± 0,42	3,37 ± 0,32
10	0,001	37	2,3 ± 0,63	2,52 ± 0,03
10	0,0001	40	-∞	1,10 ± 0,02

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 45. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de uva¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	31	4,3 ± 0,15	4,45 ± 0,21
10	89,9	0,1	33	3,3 ± 0,12	3,50 ± 0,03
10	90	0,01	38	2,3 ± 0,32	2,60 ± 0,00
10	90	0,001	40	n.d.	1,50 ± 0,71
10	90	0,0001	40	n.d.	1,04 ± 0,06
10	90	0,00001	40	n.d.	0

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 46. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de manzana¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	30,5	4,3 ± 0,25	4,66 ± 0,26
10	89,9	0,1	32,5	3,3 ± 0,41	3,83 ± 0,18
10	90	0,01	37	2,3 ± 0,17	3,02 ± 0,03
10	90	0,001	40	n.d.	2,45 ± 0,21
10	90	0,0001	40	n.d.	1,50 ± 0,09
10	90	0,00001	40	n.d.	0,15 ± 0,09

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 47. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de piña¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	31	4,3 ± 0,38	4,74 ± 0,06
10	89,9	0,1	33	3,3 ± 0,29	3,39 ± 0,12
10	90	0,01	37	2,3 ± 0,55	2,00 ± 0,30
10	90	0,001	40	n.d.	1,02 ± 0,03
10	90	0,0001	40	n.d.	0,39 ± 0,12
10	90	0,00001	40	n.d.	-∞

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 48. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de naranja¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	30	4,3 ± 0,08	4,54 ± 0,09
10	89,9	0,1	33	3,3 ± 0,22	3,87 ± 0,04
10	90	0,01	36	2,3 ± 0,29	2,54 ± 0,09
10	90	0,001	40	n.d.	1,02 ± 0,03
10	90	0,0001	40	n.d.	0,70 ± 0,00
10	90	0,00001	40	n.d.	-∞

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 49. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado de melocotón-nectarina¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	31,5	4,3 ± 0,11	4,93 ± 0,04
10	89,9	0,1	34	3,3 ± 0,41	3,45 ± 0,20
10	90	0,01	38	2,3 ± 0,28	2,39 ± 0,12
10	90	0,001	40	n.d.	1,34 ± 0,08
10	90	0,0001	40	n.d.	0,85 ± 0,21
10	90	0,00001	40	n.d.	-∞

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3) n.d.: no detectado.

Tabla 50. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado de pera¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	33	4,3 ± 0,07	4,24 ± 0,09
10	89,9	0,1	35	3,3 ± 0,34	3,30 ± 0,43
10	90	0,01	38	2,3 ± 0,19	2,54 ± 0,09
10	90	0,001	40	n.d.-	1,09 ± 0,12
10	90	0,0001	40	n.d.	0,26 ± 0,08
10	90	0,00001	40	n.d.	-∞

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

Tabla 51. Valores de log (ufc/mL) y ciclos de detección por RTi-PCR para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo puro de naranja¹.

Volumen muestra (mL)	Volumen BAT (mL)	Volumen inóculo (mL)	C _T	log (ufc/mL) _{Fluorescencia}	log (ufc/mL) _{Placa}
10	90	0	n.d.	n.d.	n.d.
10	89	1	30	4,3 ± 0,10	4,60 ± 0,05
10	89,9	0,1	33	3,3 ± 0,30	3,48 ± 0,10
10	90	0,01	35	2,3 ± 0,21	2,09 ± 0,12
10	90	0,001	40	n.d.	1,54 ± 0,09
10	90	0,0001	40	n.d.	0,54 ± 0,09
10	90	0,00001	40	n.d.	-∞

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3). n.d.: no detectado.

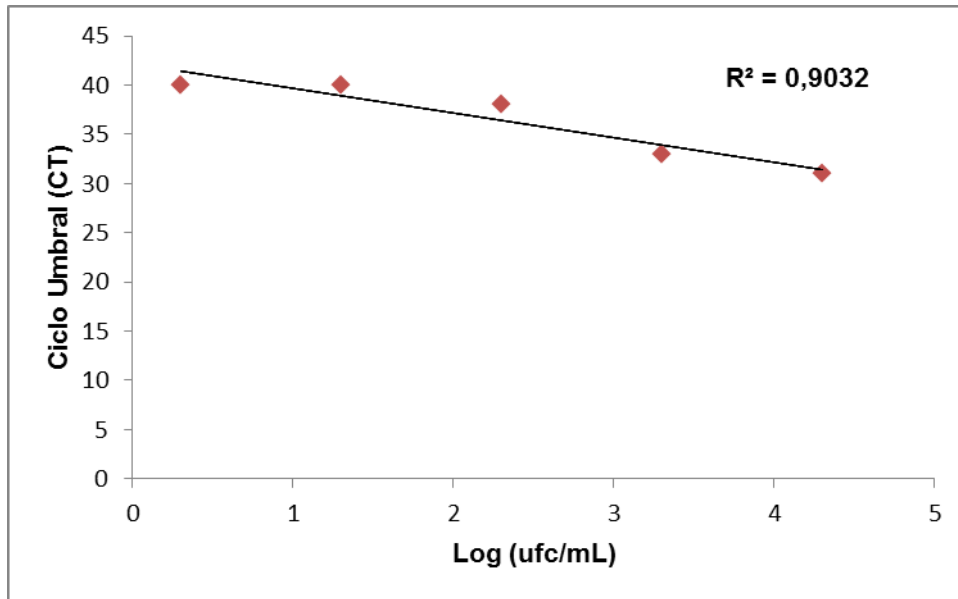


Figura 60. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestris* obtenida entre el número de ciclos C_T y \log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de uva.

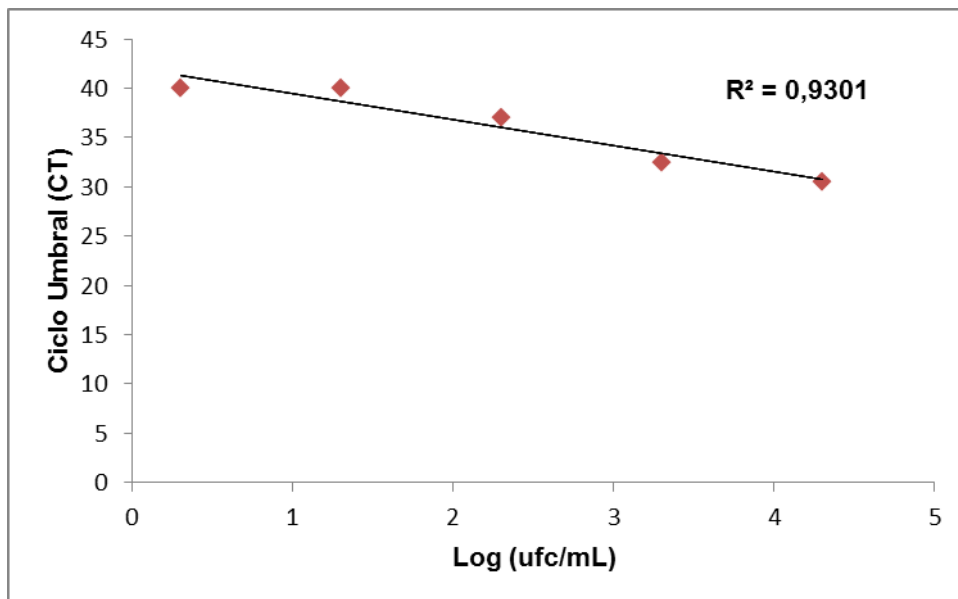


Figura 61. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestris* obtenida entre el número de ciclos C_T y \log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de manzana.

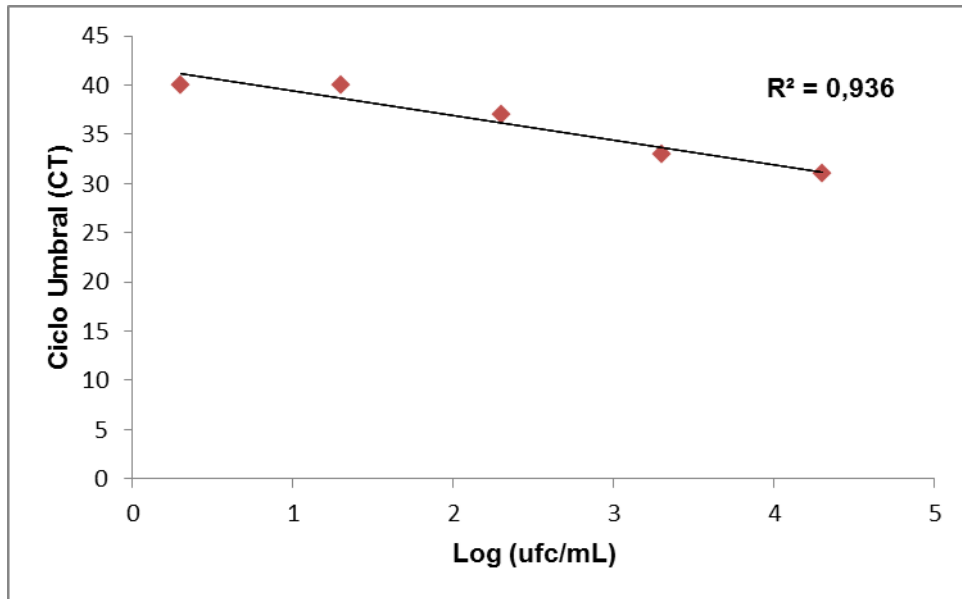


Figura 62. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestris* obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de piña.

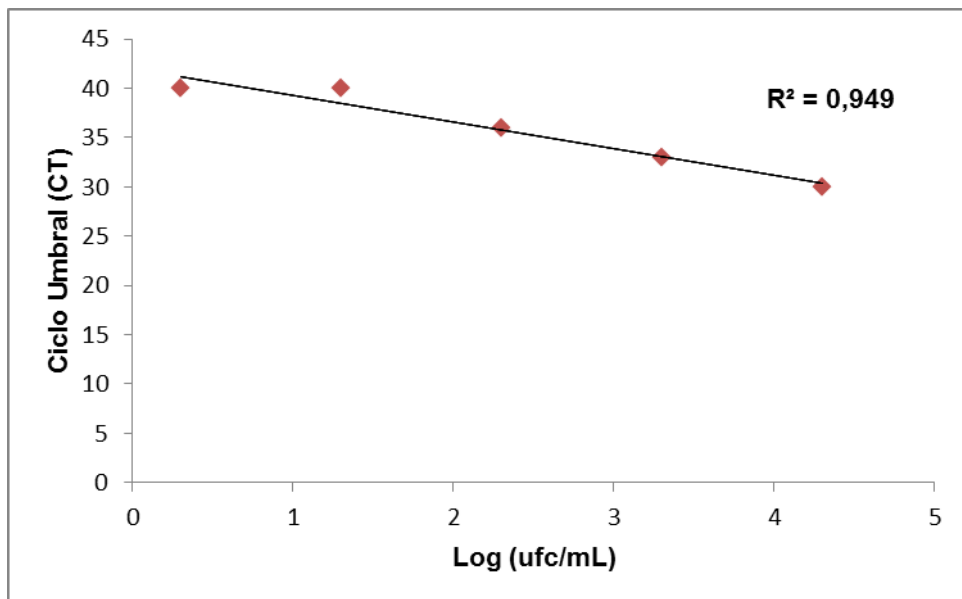


Figura 63. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestris* obtenida entre el número de ciclos C_T y log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo concentrado de naranja.

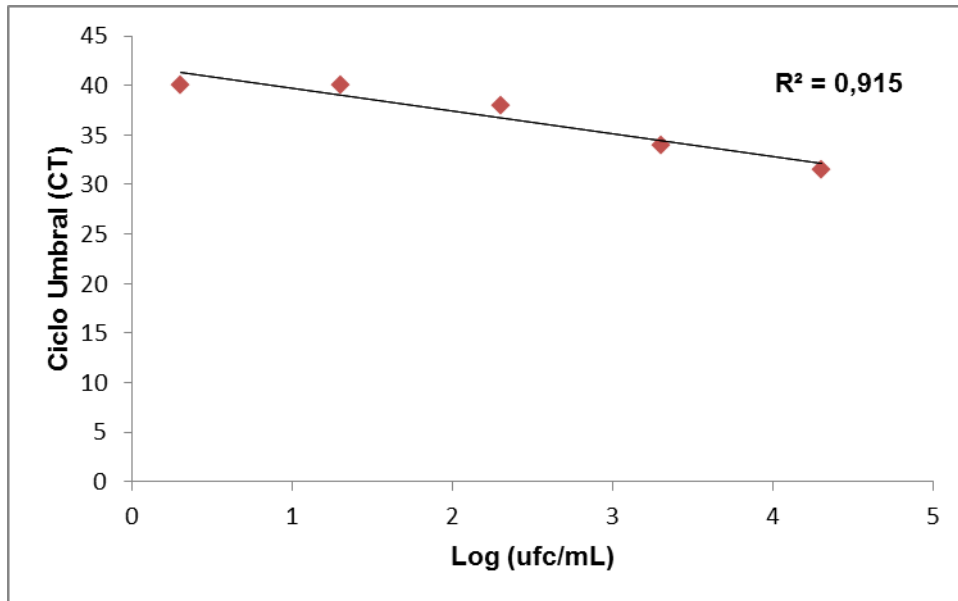


Figura 64. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestis* obtenida entre el número de ciclos C_T y \log (ufc/mL) por fluorescencia para cremogenado de melocotón-nectarina.

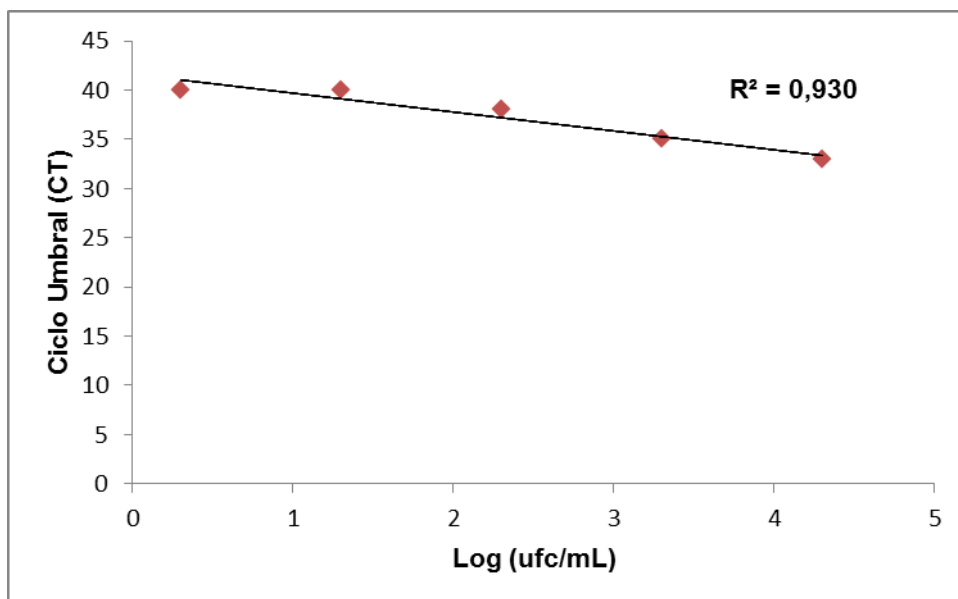


Figura 65. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestis* obtenida entre el número de ciclos C_T y \log (ufc/mL) por fluorescencia para cremogenado de pera.

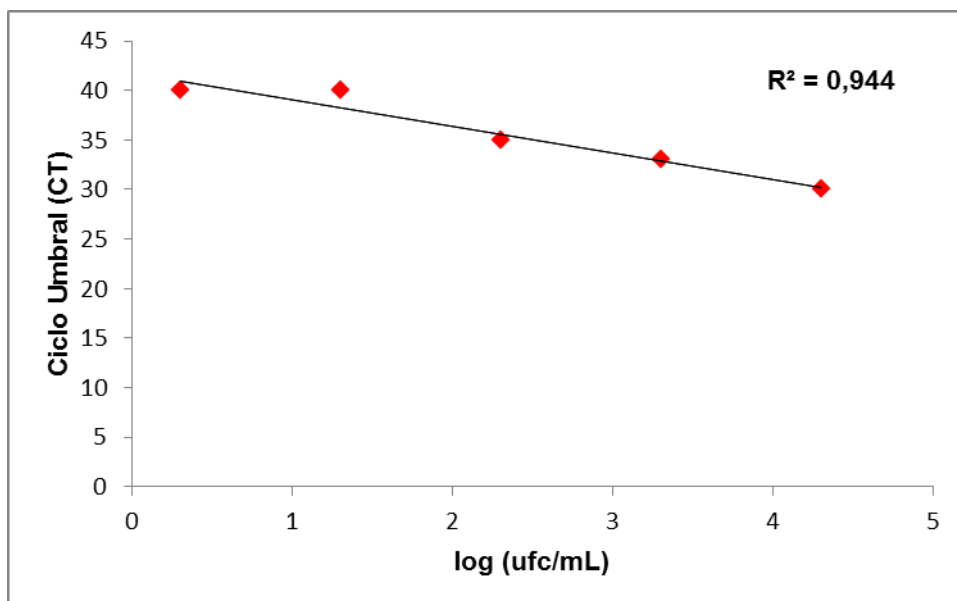


Figura 66. Representación gráfica de la recta de correlación para *A. acidoterrestris* obtenida entre el número de ciclos C_T y \log (ufc/mL) por fluorescencia para zumo puro de naranja.

En la **Tabla 52** se reflejan los resultados de la ecuación de la recta, la varianza explicada y el coeficiente de regresión conseguidos en el estudio realizado para cada una de las matrices a partir de \log (ufc/mL) por fluorescencia representado en la coordenada x, y el número de ciclos C_T como variable representada en la coordenada y.

Observamos que para los zumos concentrados de uva, manzana y piña, los valores de las pendientes fueron -2,5 y -2,65 y -2,5, respectivamente y la eficiencia 150%. De acuerdo a los valores de varianza explicada obtenidos, R^2 , se confirma la buena linealidad de la reacción, siendo para el zumo concentrado de uva 0,903; 0,930 para el zumo concentrado de manzana y 0,936 para el zumo concentrado de piña. En el caso del zumo concentrado de naranja, la pendiente fue de -2,7, con una eficiencia de 1,3 (130%), más cercana a 1, valor considerado como óptimo, y un valor de varianza explicada de 0,949. El valor de la pendiente para el cremogenado de melocotón-nectarina fue -2,3, superior al obtenido en cremogenado de pera, -1,9; condicionando la eficiencia de la reacción, 150% en el caso del cremogenado de melocotón-nectarina y 235% para el cremogenado de pera. Los valores de la varianza explicada, R^2 , demuestran la linealidad de la reacción siendo el valor obtenido en melocotón-nectarina de 0,915 y de 0,930 en el cremogenado de pera. Para puro zumo de naranja los valores de la pendiente y la eficiencia de la reacción fueron -2,7 y 134%, respectivamente. La varianza explicada, R^2 , fue 0,944.

Tabla 52. Ecuación de la recta, varianza explicada y coeficientes de correlación obtenidos a partir de log (ufc/mL) por fluorescencia y el número de ciclos (C_T).

Muestra	Ecuación	R ²	r
Zumo concentrado de uva	$y = -2,5 x + 42,15$	0,903	-0,950
Zumo concentrado de manzana	$y = -2,65 x + 42,095$	0,930	-0,964
Zumo concentrado de piña	$y = -2,5 x + 41,95$	0,936	-0,967
Zumo concentrado de naranja	$y = -2,7 x + 42,01$	0,949	-0,974
Cremogenado de melocotón-nectarina	$y = -2,3 x + 41,99$	0,915	-0,957
Cremogenado de pera	$y = -1,9 x + 41,57$	0,930	-0,964
Zumo puro de naranja	$y = -2,7 x + 41,81$	0,944	-0,971

Una vez determinada la relación entre el número de ciclos (C_T) mediante RTi-PCR y el logaritmo decimal de las unidades formadoras de colonias por fluorescencia [log (ufc/mL)], realizamos un estudio comparativo con los resultados obtenidos con el método de microbiología clásica.

En las figuras, **Figura 67**, **Figura 68**, **Figura 69**, **Figura 70**, **Figura 71**, **Figura 72** y **Figura 73** se muestran los gráficos correspondientes a las rectas de regresión construidas a partir del logaritmo de las unidades formadoras de colonias de las distintas diluciones para cada matriz por microbiología clásica con placa de BAM Agar frente a las conseguidas mediante la técnica de RTi-PCR. Así, los valores de varianza explicada y coeficiente de correlación para los zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja fueron 0,963 y 0,981; 0,982 y 0,991; 0,926 y 0,962; y 0,937 y 0,968 respectivamente. Para los cremogenados de melocotón-nectarina y pera fueron de 0,960 y 0,980; y 0,986 y 0,993 respectivamente, y para el zumo puro de naranja, 0,976 y 0,988. La **Tabla 53** indica la relación existente entre estos dos métodos mostrando la ecuación de la recta, la varianza explicada (R²) y el coeficiente de correlación (r).

De acuerdo a los resultados encontrados, observamos que existe una buena linealidad entre las ufc/mL expresadas como logaritmo, obtenidas con los dos métodos de análisis. Por lo tanto, con esta experiencia queda demostrada que la técnica de RTi-PCR es una buena opción a los métodos clásicos de detección y cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en la materia prima destinada a la fabricación de zumos

y bebidas de frutas, ya que permite determinar la concentración de *A. acidoterrestris*, con un límite de detección establecido en 200 ufc/mL (criterio: $C_T < 40$), no encontrado interferencias de los ingredientes de todas las matrices utilizadas en el estudio, incluyendo el zumo concentrado de piña.

Tabla 53. Relación entre log (ufc/mL) obtenido mediante microbiología clásica con BAM Agar y log (ufc/mL) obtenido mediante RTi-PCR.

Muestra	Ecuación	R ²	r
Zumo concentrado de uva	$y = 0,8951 x + 0,5627$	0,963	0,981
Zumo concentrado de manzana	$y = 0,7989 x + 1,2004$	0,982	0,991
Zumo concentrado de piña	$y = 1,227 x - 0,6725$	0,926	0,962
Zumo concentrado de naranja	$y = 0,9655 x + 0,4725$	0,937	0,968
Cremogenado de melocotón-nectarina	$y = 1,206 x + 0,3899$	0,960	0,980
Cremogenado de pera	$y = 0,8616 x + 0,5169$	0,986	0,993
Zumo puro de naranja	$y = 1,2166 x + 0,6249$	0,976	0,988

Los resultados conseguidos en este experimento son comparables a los descritos por otros autores como, Luo et al. (2004) que detectaron mediante PCR a tiempo real valores inferiores a 10 ufc/mL de *A. acidoterrestris* en zumo de manzana, que comparados con cultivos en PDA no obtuvieron diferencias significativas, confirmando que los ingredientes propios del zumo no provocaban inhibición en la PCR. Connor et al. (2005) desarrollaron un método por PCR a tiempo real para la detección rápida de *Alicyclobacillus* spp. en zumos de frutas, concretamente en zumo de naranja, comprobando que, por un lado los componentes intrínsecos del zumo no interferían en los resultados y, por otro lado, sin diferencias apreciables de los recogidos por recuento en placa empleando como medio de cultivo OSA. Postollec et al. (2010) detectaron e identificaron bacterias formadoras de esporas en diversas matrices de alimentos mediante PCR logrando un límite de detección de 1 espora/25 g. Wang et al. (2014) desarrollaron un método de detección de *A. acidoterrestris* mediante IMS-PCR en zumos de kiwi y manzana, detectando valores inferiores a 10

ufc/mL y no encontrando diferencias significativas con los recuentos obtenidos por microbiología clásica.

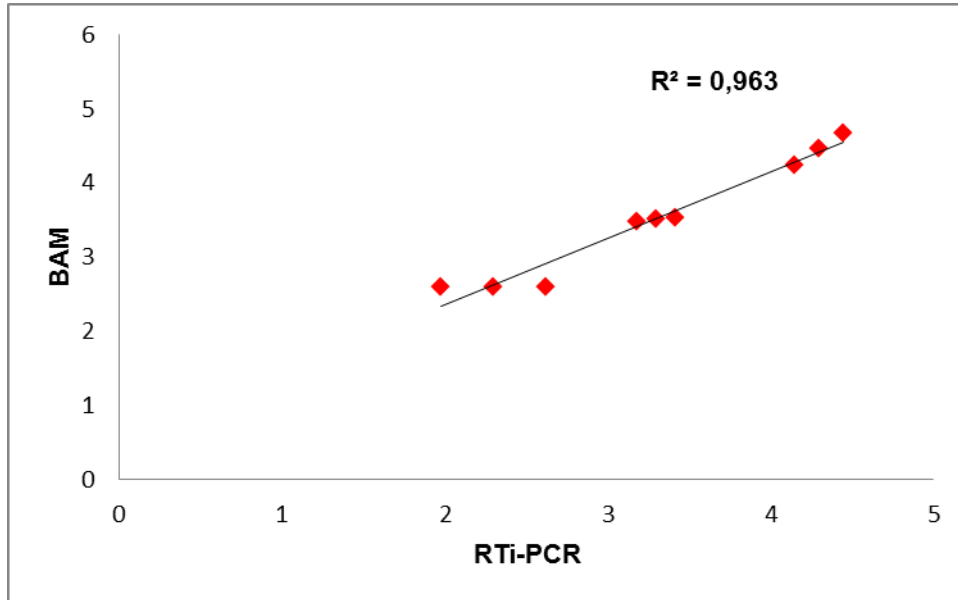


Figura 67. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de uva.

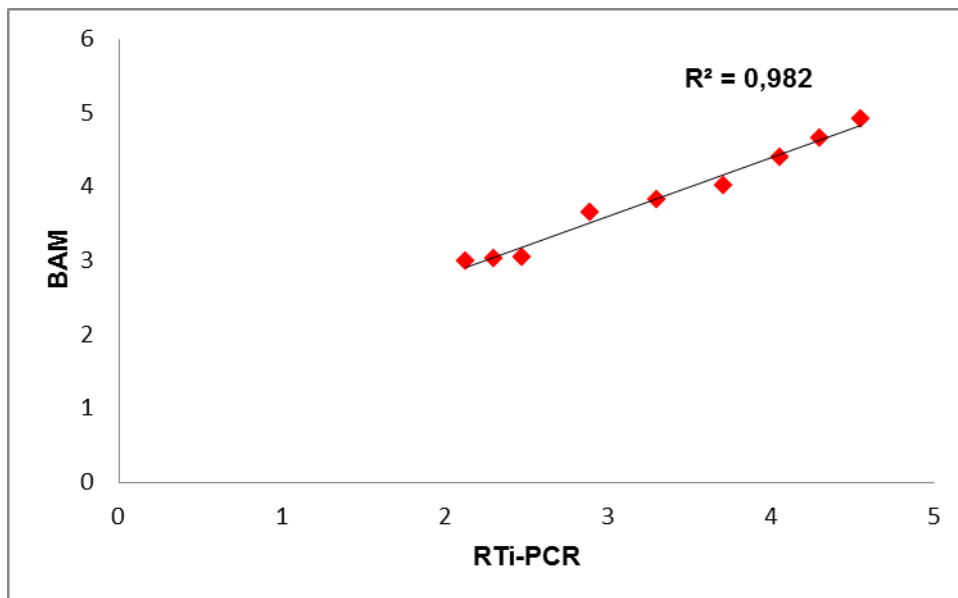


Figura 68. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de manzana.

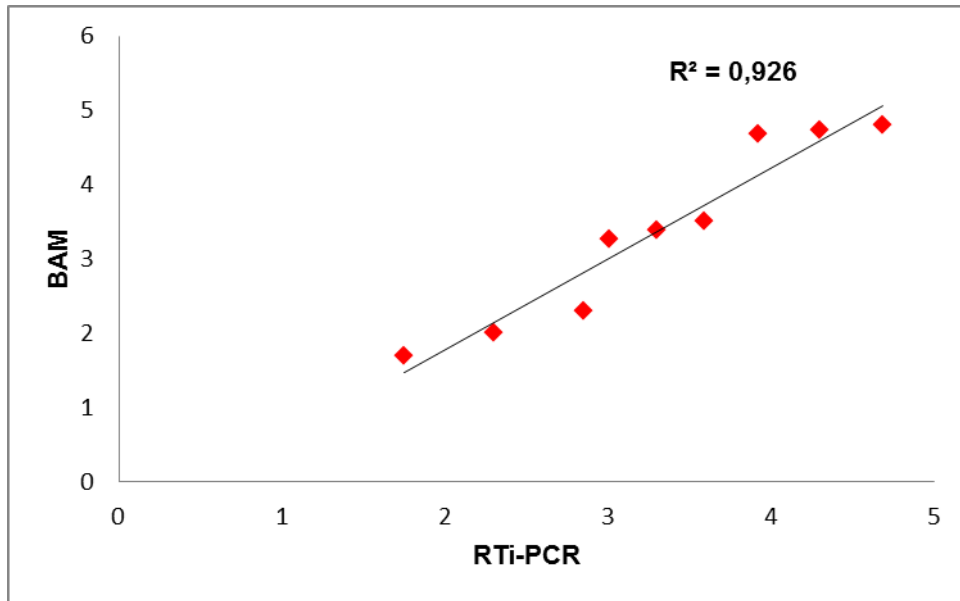


Figura 69. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de piña.

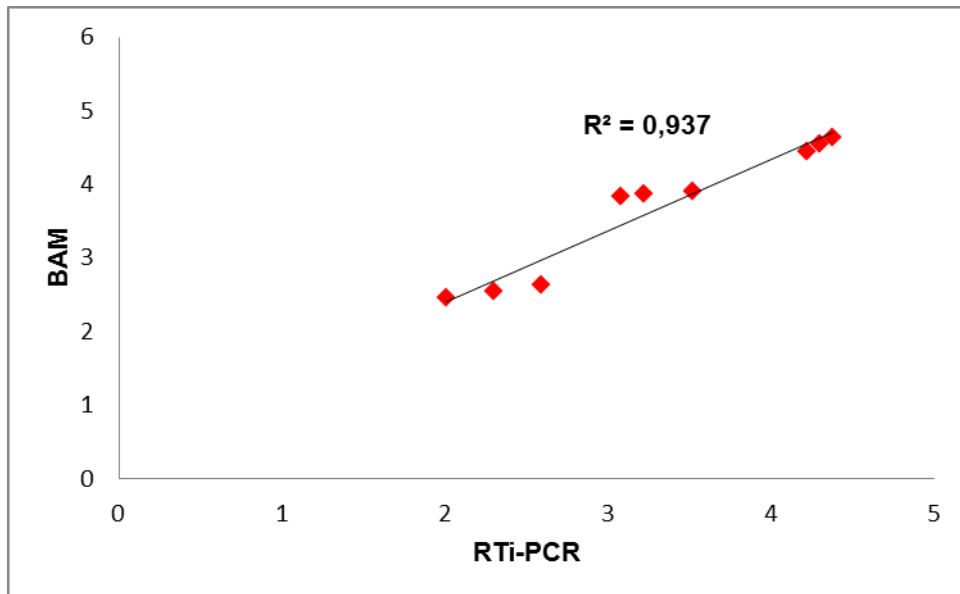


Figura 70. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo concentrado de naranja

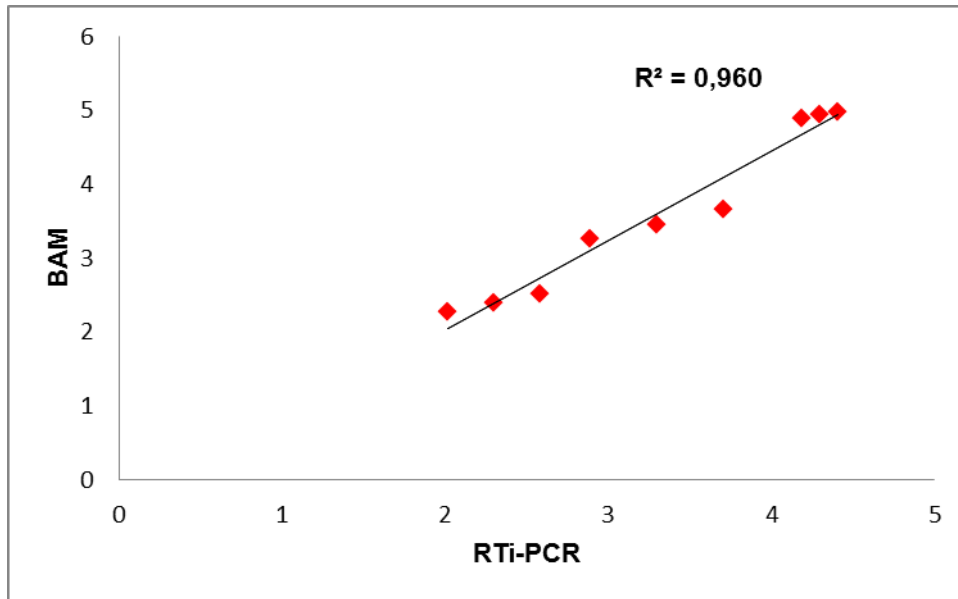


Figura 71. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en cremogenado de melocotón-nectarina.

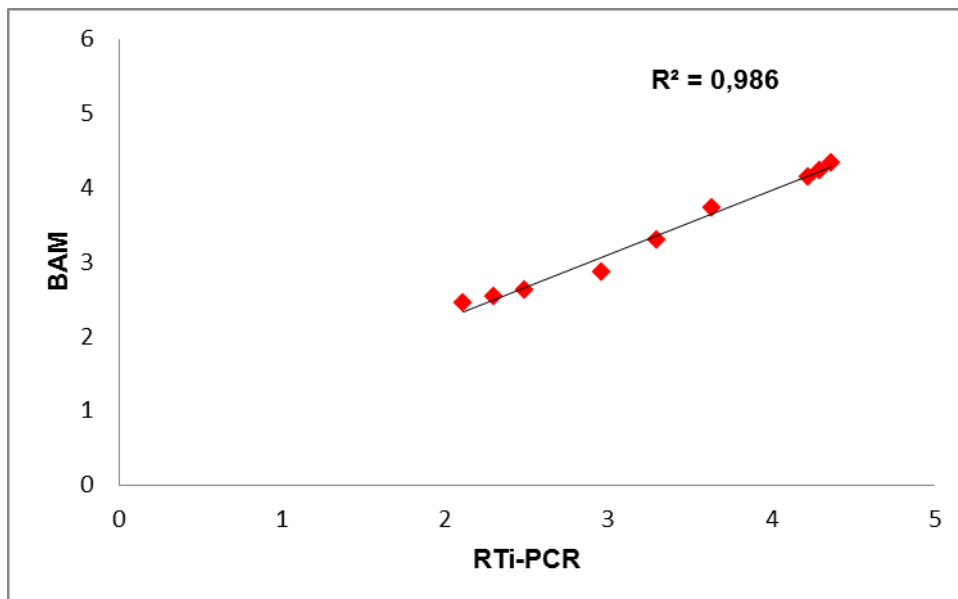


Figura 72. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en cremogenado de pera.

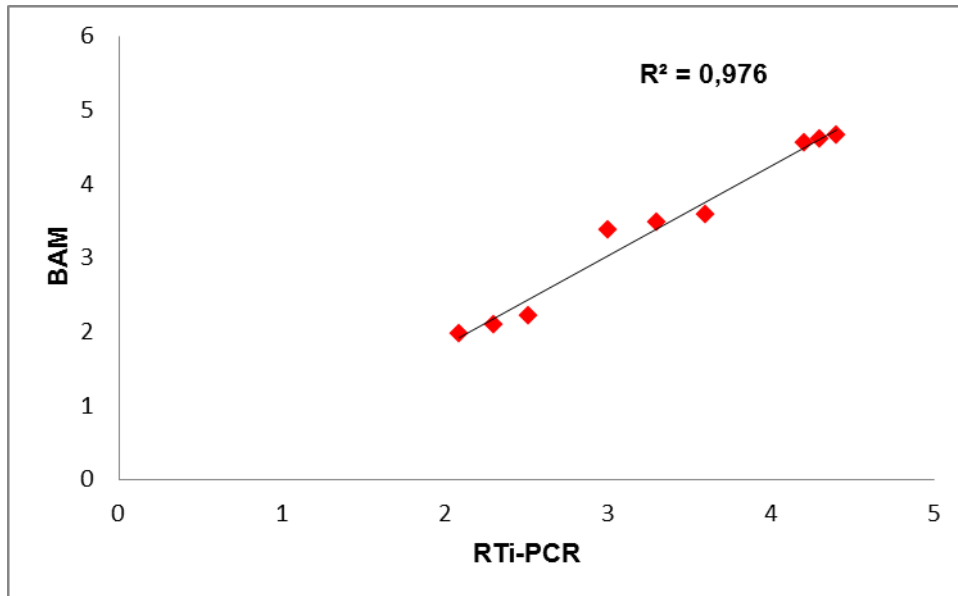


Figura 73. Representación gráfica entre log (ufc/mL) obtenido por microbiología clásica con BAM Agar comparado con log (ufc/mL) determinado a partir de la técnica de RTi-PCR en zumo puro de naranja.

5. Experiencia 5. Análisis y caracterización de muestras.

Los distintos estudios publicados sobre la presencia de *Alicyclobacillus* spp. en los zumos de frutas y bebidas han puesto de manifiesto que su incidencia es alta debido a la alta termorresistencia de las endoesporas a los tratamientos térmicos aplicados en la industria de zumos (Smit et al., 2011). La presencia de las diferentes especies de este género en los zumos está asociada con las malas prácticas higiénicas, debido a la utilización de fruta que ha caído al suelo y a la reutilización del agua de concentración (Steyn et al., 2011). La información existente sobre el crecimiento y las características fisiológicas de *Alicyclobacillus* spp., han puesto de manifiesto que en los zumos las endoesporas muestran una mayor termorresistencia que cuando se ensayan en soluciones experimentales, con características físico-químicas similares a las de los zumos (Bahçeci y Acar, 2007, Steyn et al., 2011). Este hecho es debido a que la combinación de factores intrínsecos del zumo determinan el crecimiento microbiano, como son el contenido de sólidos solubles, el pH y el potencial oxido-reducción (Steyn et al., 2011).

El objetivo de esta experiencia fue analizar los parámetros físico-químicos de los concentrados, cremogenados y zumos de frutas que pueden ejercer alguna influencia en el desarrollo de *Alicyclobacillus* spp. Para ello, se realizaron las determinaciones de °Brix, pH, contenido de los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, isocítrico, L-málico, fumárico y tartárico), concentración de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), contenido de pectinas solubles en agua, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante, factores que pueden determinar la termorresistencia de las endoesporas y pueden inhibir el crecimiento de este microorganismo.

Los determinaciones indicadas en los zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja se realizaron diluyendo el concentrado a los °Brix referenciados en AIJN (European Fruit Juice Association), los cuales son 16 °Brix, 11,2 °Brix, 12,8 °Brix y 11,2 °Brix, respectivamente. Para el resto de muestras, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja las analíticas se realizaron directamente.

Los datos correspondientes a los ácidos cítrico, isocítrico, fumárico, L-málico, tartárico, glucosa, fructosa, sacarosa y pectinas solubles en agua han sido verificados con las recomendaciones de las Guías de AIJN, con la finalidad de contrastar la

calidad y el cumplimiento de estándares definidos internacionalmente para estos productos. Los datos que indica AIJN para cada una de las matrices se reflejan en la **Tabla 54**.

La **Tablas 55, 56, 57, 58, 59, 60 y 61** muestran la composición química de las muestras analizadas en la presente Tesis Doctoral. El orden de presentación de los datos es el siguiente: zumo de concentrado de uva, zumo de concentrado de manzana, zumo de concentrado de piña, zumo de concentrado de naranja, cremogenado de melocotón–nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja.

Tabla 54. Valores de AIJN de los parámetros de ácidos cítrico, isocítrico, fumárico, L-málico, tartárico, fructosa, glucosa, sacarosa y pectinas solubles en agua para las materias primas empleadas en el estudio.

	Zumo concentrado de uva referido a 16 °Brix ¹	Zumo concentrado de manzana referido a 11,2 °Brix ²	Zumo concentrado de piña referido a 12,8 °Brix ³	Zumo concentrado de naranja referido a 11,2 °Brix ⁴ y zumo puro de naranja ⁵	Cremonogenado de melocotón-nectarina ⁶	Cremonogenado de pera ⁷
Ácido cítrico	<0,5 g/L	50-150 mg/L	3-11 g/L	6,3-17 g/L	1,5-5 g/kg	<4,0 g/kg
Ácido isocítrico	--	--	80-250 mg/L	65 -200 mg/L	30-160 mg/kg	<40 mg/kg
Ácido fumárico	--	<50 mg/L	--	--	--	--
Ácido L-málico	2,0-7,0 g/L	>3,0 g/L	1-4 g/L	0,8-3,0 g/L	2-6 g/kg	0,8-4,0 g/kg
Ácido Tartárico	2,0-7,0 g/L	--	--	--	--	--
Fructosa	60-110 g/L	45-85 g/L	15-40 g/L	20-35 g/L	10-32 g/kg	50-90 g/kg
Glucosa	60-110 g/L	15-35 g/L	15-40 g/L	20-35 g/L	7,5-25 g/kg	10-35 g/kg
Sacarosa	Trazas	5-30 g/L	25-80 g/L	10-50 g/L	12-60 g/kg	Trazas-15 g/kg
Pectinas solubles en agua	--	--	<450 mg/L	200-500 mg/L	--	--

¹Guía de referencia AIJN para uva, Rev. 2011. ²Guía de referencia de AIJN para manzana, Rev. 2011. ³Guía de referencia de AIJN para piña, Rev. 2011, ^{4,5}Guía de referencia AIJN para naranja, Rev. 2011. ⁶Guía de referencia de AIJN para melocotón, Rev. 2011. ⁷Guía de referencia AIJN para pera, Rev.2011

Tabla 55. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de uva¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	65,17 ± 0,01
pH	3,74 ± 0,04
Polifenoles Totales (mg/L)	1.189,56 ± 25,30
Flavonoides Totales (mg/L)	198,54 ± 9,89
<i>Parámetros referidos a 16 °Brix según AIJN para concentrado de uva.</i>	
Ácido cítrico (mg/L)	0,15 ± 0,05
Ácido Isocítrico (mg/L)	<20,00
Ácido Fumárico (mg/L)	1,6 ± 0,1
Ácido L-málico (g/L)	1,55 ± 0,05
Ácido Tartárico (g/L)	1,15 ± 0,05
Fructosa (g/L)	75,63 ± 0,45
Glucosa (g/L)	74,43 ± 0,25
Sacarosa (g/L)	<2,0
Polifenoles Totales (mg/L)	328,27 ± 36,76
Flavonoides Totales (mg/L)	79,09 ± 3,10
Actividad antioxidante (mM eq. Trolox)	9,70 ± 0,50

¹Los datos se indican como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 56. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de manzana¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	70,19 ± 0,15
pH	3,37 ± 0,04
Polifenoles Totales (mg/L)	5.215,36 ± 153,91
Flavonoides Totales (mg/L)	2.034,70 ± 12,03
<i>Parámetros referidos a 11,2 °Brix según AIJN para concentrado de manzana.</i>	
Ácido cítrico (mg/L)	75,37 ± 4,00
Ácido Isocítrico (mg/L)	<20,00
Ácido Fumárico (mg/L)	1,82 ± 0,90
Ácido L-málico (g/L)	3,20 ± 0,20
Ácido Tartárico (g/L)	<2,00
Fructosa (g/L)	55,90 ± 2,51
Glucosa (g/L)	28,07 ± 1,40
Sacarosa (g/L)	14,87 ± 1,50
Polifenoles Totales (mg/L)	1.449,69 ± 155,57
Flavonoides Totales (mg/L)	257,10 ± 59,86
Actividad antioxidante (mM eq. Trolox)	7,08 ± 0,21

¹Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 57. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de piña¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	59,93 ± 0,06
pH	3,52 ± 0,10
Polifenoles Totales (mg/L)	4.690,47 ± 158,86
Flavonoides Totales (mg/L)	554,96 ± 15,57
<i>Parámetros referidos a 12,8 °Brix según AIJN para concentrado de piña.</i>	
Ácido cítrico (g/L)	5,6 ± 0,58
Ácido Isocítrico (mg/L)	142 ± 24,16
Ácido Fumárico (mg/L)	<1,00
Ácido L-málico (g/L)	1,70 ± 0,30
Ácido Tartárico (g/L)	<0,20
Fructosa (g/L)	30,00 ± 0,3
Glucosa (g/L)	32,97 ± 0,25
Sacarosa (g/L)	41,40 ± 0,90
Pectinas solubles en agua (%)	0,03
Polifenoles Totales (mg/L)	1.950,68 ± 122,60
Flavonoides Totales (mg/L)	73,00 ± 2,28
Actividad antioxidante (mM eq. Trolox)	7,30 ± 0,52

¹Los datos vienen indicados como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 58. Parámetros físico-químicos de zumo concentrado de naranja¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	65,49 ± 0,21
pH	3,63 ± 0,01
Polifenoles Totales (mg/L)	7.131,9 ± 473,62
Flavonoides Totales (mg/L)	2.721,08 ± 219,54
<i>Parámetros referidos a 11,2 °Brix según AIJN para concentrado de naranja.</i>	
Ácido cítrico (g/L)	8,96 ± 0,43
Ácido Isocítrico (mg/L)	93,80 ± 26,90
Ácido Fumárico (mg/L)	<1,00
Ácido L-málico (g/L)	1,15 ± 0,05
Ácido Tartárico (g/L)	<0,20
Fructosa (g/L)	22,30 ± 0,10
Glucosa (g/L)	20,00 ± 0,20
Sacarosa (g/L)	43,13 ± 0,15
Pectinas solubles en agua (%)	0,06
Polifenoles Totales (mg/L)	1.358,13 ± 15,33
Flavonoides Totales (mg/L)	722,47 ± 47,88
Actividad antioxidante	11,20 ± 0,05

¹Los datos vienen reflejados como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 59. Parámetros físico-químicos de cremogenado de melocotón-nectarina¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	11,73 ± 0,46
pH	3,84 ± 0,03
Polifenoles Totales (mg/L)	928,96 ± 14,50
Flavonoides Totales (mg/L)	513,11 ± 3,33
Ácido cítrico (g/kg)	1,18 ± 0,24
Ácido Isocítrico (mg/kg)	87,33 ± 6,23
Ácido Fumárico (mg/kg)	4,07 ± 0,06
Ácido L-málico (g/kg)	2,90 ± 0,20
Ácido Tartárico (g/kg)	<0,20
Fructosa (g/kg)	16,97 ± 0,65
Glucosa (g/kg)	18,30 ± 1,91
Sacarosa (g/kg)	48,87 ± 2,80
Pectinas solubles en agua (%)	0,18
Actividad antioxidante (Mm eq. Trolox)	14,02 ± 1,03

¹Los datos se recogen como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 60. Parámetros físico-químicos de cremogenado de pera¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	13,64 ± 0,08
pH	3,92 ± 0,07
Polifenoles Totales (mg/L)	1.358,13 ± 15,32
Flavonoides Totales (mg/L)	941,85 ± 11,39
Ácido cítrico (g/kg)	1,07 ± 0,08
Ácido Isocítrico (mg/kg)	39,00 ± 0,50
Ácido Fumárico (mg/kg)	0,80± 0,00
Ácido L-málico (g/kg)	2,17 ± 0,15
Ácido Tartárico (g/kg)	<0,20
Fructosa (g/kg)	64,77 ± 2,15
Glucosa (g/kg)	29,17 ± 3,45
Sacarosa (g/kg)	20,60 ± 0,20
Pectinas solubles en agua (%)	0,22
Actividad antioxidante (mM eq. Trolox)	11,13 ± 0,46

¹Los datos vienen reflejados como media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 61. Parámetros físico-químicos de zumo puro de naranja¹.

PARÁMETROS	VALOR
°Brix	11,85 ± 0,03
pH	3,54 ± 0,13
Ácido cítrico (g/L)	10,31 ± 0,13
Ácido Isocítrico (mg/L)	122,8 ± 1,11
Ácido Fumárico (mg/L)	<1,0
Ácido L-málico (g/L)	0,77 ± 0,06
Ácido Tartárico (g/L)	<0,20
Fructosa (g/L)	25,50 ± 1,60
Glucosa (g/L)	24,90 ± 1,90
Sacarosa (g/L)	40,17 ± 3,65
Pectinas solubles en agua (%)	0,03
Polifenoles Totales (mg/L)	1410,12 ± 86,95
Flavonoides Totales (mg/L)	897,33 ± 45,67
Actividad antioxidante (mM eq. Trolox)	10,89 ± 0,19

¹Los datos se recogen como media ± desviación estándar (n=3).

Todos los parámetros físico-químicos analizados en las diferentes muestras empleadas en esta Tesis Doctoral, pueden influir en el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. En primer lugar, el contenido en sólidos solubles, °Brix, limita el crecimiento existiendo grandes variaciones entre los zumos concentrados, zumos y cremogenados. Así, para el zumo concentrado de uva el valor medio obtenido fue de 65,17 °Brix, para el zumo concentrado de manzana de 70,19 °Brix, para el zumo concentrado de piña de 59,93 °Brix y para el zumo concentrado de naranja de 65,49 °Brix (**Tablas 55, 56, 57 y 58**). Estudios realizados por Splittstoesser et al. (1994) y Chang y Kang (2004) indicaron que los concentrados de frutas con un contenido en

sólidos solubles superior a 20 °Brix la germinación de esporas de *Alicyclobacillus* no es probable, evitando así su deterioro, es por ello, por lo que en los concentrados utilizados como materia prima, la posibilidad de crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. es improbable, aunque este hecho no indicaría la inexistencia de esporas, las cuales podrían estar presentes debido a una manipulación higiénica inadecuada en alguna de las etapas del proceso de fabricación.

Siguiendo los procesos habituales en este tipo de industria, los concentrados fueron diluidos hasta los valores de 16 a 11,2 °Brix, valores recomendados para su comercialización como zumos y bebidas de frutas, y posteriormente analizados los correspondientes zumos. Borlinghaus y Engel (1997) estudiaron el deterioro de los concentrados de frutas tras la dilución a zumo alcanzando este microorganismo concentraciones elevadas tras la germinación de esporas que son capaces de sobrevivir en el zumo concentrado. Este hecho es importante ya que en ocasiones los controles se hacen sobre la materia prima y no sobre el producto diluido, pudiendo obtener datos erróneos en la evaluación de la calidad microbiológica.

Para el cremogenado de melocotón-nectarina y el cremogenado de pera los valores medios de sólidos solubles fueron de 11,73 y 13,64 °Brix, respectivamente; mientras que para el zumo puro de naranja el valor medio fue de 11,85 °Brix. El contenido de sólidos solubles que contienen los cremogenados de melocotón-nectarina y pera, y el zumo puro de naranja favorece la proliferación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, por lo que son susceptibles de deteriorarse más rápidamente que los otros zumos concentrados estudiados, ya que la concentración de sólidos solubles permitiría la germinación de las esporas.

Además de la concentración total de sólidos solubles, se estudió el perfil de azúcares simples en todas las muestras. Los azúcares más comunes en las frutas fueron analizados en esta experiencia: los monosacáridos fructosa y glucosa, y el disacárido sacarosa. La proporción de cada uno de estos azúcares varió en función del tipo de fruta.

Así, para el zumo concentrado de uva encontramos principalmente glucosa y fructosa con unos valores de $75,63 \pm 0,45$ y $74,43 \pm 0,25$ g/L, respectivamente siendo el contenido en sacarosa inferior a 2,0 g/L (**Tabla 55**). En el zumo concentrado de manzana, la fructosa es el azúcar mayoritario presentando un valor de $55,90 \pm 2,51$ g/L, seguido de la glucosa con una cantidad de $28,07 \pm 1,40$ g/L y sacarosa en una concentración de $14,87 \pm 1,50$ g/L (**Tabla 56**). En el zumo concentrado de piña encontramos como azúcar principal la sacarosa siendo su contenido de $41,40 \pm 0,90$

g/L y manteniendo una proporcionalidad aproximadamente 1:1 en la concentración de glucosa y fructosa, ya que presenta valores de $32,97 \pm 0,25$ g/L para la glucosa y $30,00 \pm 0,3$ g/L para la fructosa (**Tabla 57**).

Considerando en la naranja paralelamente los valores de azúcares en el zumo concentrado y zumo puro observamos que existe una proporcionalidad entre sacarosa: glucosa: fructosa de 2:1:1 siendo los valores para sacarosa de $43,13 \pm 0,15$ g/L en el concentrado y $40,17 \pm 3,65$ g/L en el zumo, de fructosa un contenido de $22,30 \pm 0,10$ g/L para el concentrado y $25,50 \pm 1,60$ g/L para el zumo puro y de glucosa una concentración de $20,00 \pm 0,20$ g/L y $24,90 \pm 1,90$ g/L en zumo concentrado y zumo puro, respectivamente (**Tablas 58 y 61**).

El azúcar principal en el cremogenado de melocotón-nectarina es la sacarosa con una concentración de $48,87 \pm 2,80$ g/L, presentado un porcentaje similar para la glucosa y fructosa, siendo sus contenidos de $18,30 \pm 1,91$ g/L y $16,97 \pm 0,65$ g/L, respectivamente (**Tabla 59**). Los resultados que observamos de azúcares en el cremogenado de pera (**Tabla 60**) muestran una similitud con la manzana en lo que respecta a la proporcionalidad entre ellos, siendo sus valores de $20,60 \pm 0,20$ g/L, $64,77 \pm 2,15$ g/L y $29,17 \pm 3,45$ g/L para sacarosa, fructosa y glucosa, respectivamente.

Como en el estudio de inoculación todas las muestras se ensayaron utilizando las materias primas diluidas hasta la concentración de sólidos solubles de los zumos comerciales, oscilando entre 16 y 11,2 °Brix, los resultados obtenidos para la germinación y crecimiento del *A. acidoterrestris*, tras la inoculación experimental, fueron similares en todas las materias primas sin encontrar diferencias en los ensayos realizados con aislamiento por microbiología clásica o impedancia indirecta, a excepción de la muestra de zumo concentrado de piña.

Otro parámetro importante para el desarrollo de *Alicyclobacillus* spp. fueron los valores de pH del alimento o del medio en el que se encuentra. Al ser una bacteria esporulada ácido-resistente es capaz de crecer en un rango de pH comprendido entre 2,5 y 6,0 (Pettipher et al., 1997; Walls y Chuyate, 1998; Orr et al., 2000; Yamazaki et al., 2000 y Chang y Kang, 2004), rango que comprende los valores de pH que encontramos en las materias de estudio, que oscilaron entre 3,37 y 3,92. Por tanto, estos valores permitieron el desarrollo de *Alicyclobacillus* spp. dadas sus características.

Los **ácidos orgánicos** constituyen el segundo componente más abundante después del contenido en sólidos solubles, siendo los componentes responsables del

bajo valor de pH característico de las frutas. Típicamente los ácidos orgánicos representan el 1% del peso total de un zumo de fruta, siendo los ácidos mayoritarios el cítrico y málico. Tanto la cantidad como los tipos de ácidos orgánicos difieren bastante dependiendo del tipo de fruta. Para el zumo concentrado de uva los ácidos orgánicos predominantes fueron el ácido L-málico con un valor de $1,55 \pm 0,05$ g/L y el ácido tartárico con una concentración de $1,15 \pm 0,05$ g/L, presentando un valor muy bajo para el ácido cítrico, $0,15 \pm 0,05$ mg/L e inferior a 20,00 mg/L para el ácido isocítrico. La cantidad de ácido fumárico fue de $1,6 \pm 0,1$ mg/L (**Tabla 55**).

En el zumo concentrado de manzana principalmente el ácido orgánico que destacó fue el ácido L-málico con un valor de $3,20 \pm 0,20$ g/L, seguido de éste presentó una concentración de ácido cítrico de $75,37 \pm 4,00$ mg/L. Sin embargo, sus contenidos en ácido tartárico y ácido isocítrico fueron inferiores a 2,00 g/L y a 20,00 mg/L, respectivamente. En ácido fumárico se obtuvo una concentración de $1,82 \pm 0,90$ mg/L (**Tabla 56**).

En el zumo concentrado de piña los principales ácidos orgánicos fueron el ácido cítrico, presentando un valor de $5,6 \pm 0,58$ g/L, ácido isocítrico con un valor de $142 \pm 24,16$ mg/L y ácido L-málico con una concentración de $1,70 \pm 0,30$ g/L. Sus ácidos orgánicos minoritarios fueron el ácido tartárico con un valor inferior a 0,20 g/L y ácido fumárico inferior a 1,00 mg/L (**Tabla 57**).

Para la naranja, considerándo tanto el zumo concentrado como el zumo puro, el ácido orgánico destacable fue el ácido cítrico, constituyendo alrededor del 90% del total de ácidos orgánicos, y su contenido fue de $9,86 \pm 0,43$ g/L en el caso de concentrado y de $10,31 \pm 0,13$ g/L en el zumo. Otro ácido importante de esta fruta fue el ácido isocítrico que presentó una concentración de $93,80 \pm 26,90$ mg/L en el concentrado y $122,8 \pm 1,11$ mg/L en el zumo. Así, que el cociente de ácido cítrico y ácido isocítrico es ampliamente utilizado como indicador de la autenticidad de calidad, confirmando la posible adulteración por la adición de ácido cítrico (Cámara et al., 2011). Como ácidos orgánicos minoritarios fueron el ácido L-málico con unos valores de $1,15 \pm 0,05$ g/L y $0,77 \pm 0,06$ g/L para concentrado y zumo, respectivamente. Para el ácido fumárico, la concentración en las dos formas de presentación de la naranja, concentrado y zumo fue inferior a 1,00 mg/L y en el caso de ácido tartárico presentó un valor menor a 0,20 g/L en ambos casos (**Tablas 58 y 61**).

En el cremogenado de melocotón-nectarina los ácidos orgánicos mayoritarios fueron el ácido cítrico con un valor de $1,18 \pm 0,24$ g/kg y ácido L-málico con una concentración de $2,90 \pm 0,20$ g/kg. Además se obtuvo un contenido en ácido isocítrico

de $87,33 \pm 6,23$ mg/kg. Sus ácidos minoritarios fueron el ácido fumárico con un valor de $4,07 \pm 0,06$ mg/kg y ácido tartárico inferior a 0,20 g/kg (**Tabla 59**).

Para el cremogenado de pera los ácidos orgánicos más destacables fueron el ácido L-málico y cítrico con unas concentraciones de $2,17 \pm 0,5$ g/kg y $1,07 \pm 0,08$ g/kg, respectivamente. Como ácidos en menor proporción fueron el ácido isocítrico con un valor de $39,00 \pm 0,50$ mg/kg, ácido fumárico con un contenido de 0,80 mg/kg y ácido tartárico inferior a 0,20 g/kg (**Tabla 60**).

No encontramos en nuestro estudio una asociación entre el pH o la presencia de ácidos orgánicos y el crecimiento de *A. acidoterrestris*, ya que una vez realizadas las inoculaciones experimentales, en todas las muestras se consiguió el crecimiento de las células vegetativas tras el choque térmico, sin observar diferencias en función del pH. Aunque, para la cantidad de ácidos orgánicos analizados podemos encontrar una mayor variación entre muestras, los valores del pH oscilaron menos de una unidad para las distintas materias primas. Nuestros resultados coinciden con las investigaciones realizadas por otros autores, que describen que el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. no se ve afectado por los ácidos orgánicos presentes en la fruta (Yamashita, 2006), así como por otros estudios publicados en los que se determinaron los efectos de cada tipo de fruta en el desarrollo de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, obteniendo resultados positivos para los zumos de manzana, uva blanca, piña y naranja entre otros (Splittstoesser et al., 1994; Wisse y Parish, 1998; Silva y Gibbs, 2001; Tokuda, 2007).

Ya que el crecimiento de *A. acidoterrestris* en las muestras inoculadas se observó tras la aplicación de las técnicas de microbiología clásica e impedancia eléctrica indirecta, podemos decir que las condiciones de pH y concentración de ácidos orgánicos no influyeron en la cuantificación.

El contenido de **pectinas solubles en agua** solo fue analizado en los zumos concentrados de piña y naranja, en los cremogenados de melocotón-nectarina y en el zumo puro de naranja. No se analizaron en los concentrados de uva y manzana porque estos productos han sufrido un proceso de clarificación, por lo que se han eliminado las pectinas solubles. El porcentaje de pectinas solubles se muestra en la **Tabla 57** observando que el zumo concentrado de piña contiene un 0,03%, en zumo concentrado y zumo puro de naranja encontramos un porcentaje de 0,06% y 0,03% respectivamente (**Tablas 58 y 61**). El cremogenado de melocotón - nectarina contiene un 0,18% de acuerdo a los valores indicados en la **Tabla 59**. Según la **Tabla 60** el valor de pectinas solubles en agua para el cremogenado de pera fue de 0,22%.

Como otros componentes a analizar en los zumos a base de concentrado, cremogenados y zumo puro de naranja se cuantificó por técnicas espectrofotométricas los polifenoles totales, los flavonoides totales y la actividad antioxidante. Para todas las muestras analizadas los valores obtenidos para los polifenoles totales y flavonoides totales, se encontraron dentro de los valores de referencia que aparecen recogidos en la base de datos "Phenol Explorer" (Neveu et al., 2010; Rothwell et al., 2012; Rothwell et al., 2013). Estos datos están científicamente contrastados, aunque existe una gran variabilidad en función del tipo de fruta, de la variedad y la forma de presentación. Además, hay que tener en cuenta que en el caso de estos compuestos muchas de las variaciones están asociadas a las condiciones agronómicas y climatológicas durante el cultivo de esos productos (Neveu et al., 2010; Rothwell et al., 2012; Rothwell et al., 2013). En las muestras de concentrado también se determinaron los polifenoles totales y flavonoides totales, observando una concentración muy elevada como consecuencia de la alta concentración de estas materias primas vegetales.

Otros investigadores como Walls y Chuyate (2000) y Goto (2007) estudiaron también que las características de crecimiento de cepas de *A. acidoterrestris* dependen del tipo de zumo y la fuente de aislamiento, creando cada zumo de forma individual un ambiente idóneo para la germinación de esporas y el desarrollo de las células vegetativas, provocando el deterioro de los mismos. Estos autores observaron crecimiento en los zumos de manzana, tomate, uva blanca, pera, pomelo, naranja, pero no en los zumos de arándano-manzana y en los de piña. La explicación del crecimiento y el deterioro en unos zumos específicos no está claro, pero se cree que las distintas materias primas empleadas pueden contener diferentes concentraciones de compuestos precursores de guayacol (Walls y Chuyate, 2000). En este sentido el perfil polifenólico de los zumos puede ser interesante a la hora de determinar la mayor o menor síntesis de guayacol y la aparición de esos sabores desagradables que son los que afectan a la calidad.

Además, diferentes estudios han puesto de manifiesto que el mayor o menor contenido de compuestos polifenólicos podría influir en el crecimiento de este grupo de microorganismo. Splittstoesser et al. (1994) e Ikegami et al. (1996) mostraron que el desarrollo de *Alicyclobacillus* era posible en zumo de uva blanca, mientras que era inhibido en zumo de uva tinta, inhibición que fue atribuida a la presencia de componentes fenólicos. En investigaciones llevados a cabo por Oita y Koyama (2002), se extrajeron distintos polifenoles de la uva para estudiar su efecto inhibitor en *Alicyclobacillus* spp., obteniendo como resultados una concentración mínima inhibitora entre 150 y 200 mg/L para los ácidos ferúlico y cumárico.

El perfil de compuestos fenólicos no fue analizado en las muestras pero basándonos en la información de la base de datos, la composición varía entre las muestras. Así en concentrado de uva podemos encontrar como principal característica la presencia de estilbenos. Para el concentrado de manzana mayoritariamente encontramos flavonoides de casi todos los grupos y ácidos hidroxicinámicos. En el caso del concentrado de piña es característico el alto contenido en lignanos. Para el concentrado de naranja y el zumo puro de naranja hay que destacar la presencia de flavanonas, y en el caso de los cremogenados de melocotón-nectarina y pera, destacan sobre todo los flavanoles y flavonoles (Phenol Explorer: Neveu et al., 2010; Rothwell et al., 2012; Rothwell et al., 2013).

Actualmente existen estudios basados en la búsqueda de antimicrobianos naturales para la inhibición de bacterias y hongos en alimentos mejorando así su calidad y vida útil (Aleksic y Knezevic, 2014). En la literatura científica, la investigación de actividad antimicrobiana de componentes de frutas frente a *A. acidoterrestris* es bastante limitada. Molva y Baysal (2015) han publicado recientemente la inhibición de la germinación de las esporas y del crecimiento de las células vegetativas de *A. acidoterrestris* en zumo de manzana, tras la adición de un extracto comercial de granada conteniendo > 30% de punicalgina, < 5% de ácido elágico y trazas de ácido gálico. En este estudio el efecto antimicrobiano fue conseguido por la adición de compuesto polifenólicos diferentes a los que se encuentran de forma natural en el zumo, es decir incrementando la cantidad natural de estos compuestos. En este sentido numerosos estudios han puesto de manifiesto este efecto antimicrobiano de los extractos fenólicos de granada, tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Gyawali y Ibrahim, 2014).

Si comparamos los resultados obtenidos en el crecimiento del *A. acidoterrestris* en las distintas muestras estudiadas, no encontramos relación con la presencia de compuestos fenólicos, ya que en todas las muestras se observaron resultados similares en el crecimiento del microorganismo. Solo en el caso del zumo concentrado de piña la baja correlación encontrada, por un lado entre la siembra en placa con el medio BAM Agar y el método de impedancia eléctrica indirecta, y por otro lado, las obtenidas en el desarrollo del método de cuantificación tanto con la cepa aislada de un zumo como con la cepa de referencia, basado en la determinación de CO₂ a partir de la formación de guayacol, podría estar relacionado con la mayor cantidad de compuestos fenólicos precursores de este compuesto en esta materia prima. Así el guayacol se produce durante el metabolismo del ácido ferúlico siendo el primer paso la decarboxilación a 4-vinil-guayacol (Peleg et al., 1992; Mathew et al., 2007) y el

componente abundante y mayoritario de la lignina y extensamente metabolizado por hongos y bacterias a vainillina y ácido vainílico (Henderson, 1961; Ishikawa et al., 1963; Toms y Wood, 1970; Tadasa, 1977; Sutherland et al., 1983; Herrmann, 1989; Rosazza et al., 1995; Karmakar et al., 2000). Por otra parte debemos destacar el gran contenido en lignanos de este zumo concentrado, que podría estar relacionado con los resultados obtenidos, ya que de acuerdo a los datos recogidos en el Phenol Explorer: Neveu et al., 2010; Rothwell et al., 2012; Rothwell et al., 2013) sobre los tipos de lignanos presentes en el zumo de piña, encontramos como lignanos mayoritarios secoisolariciresinol y pinoresinol, a los cuales se le han atribuido, según investigaciones llevadas a cabo por Kulik et al. (2014) un efecto inhibitor de crecimiento de algunos microorganismos como *Fusarium graminearum*. Además, Matendra y Singh (2015) realizaron un estudio y evaluaron la capacidad antimicrobiana de los lignanos del sésamo encontrando que actuaban como antibacterianos contra patógenos de origen alimentario con una concentración mínima inhibitora (CMI) de 2 mg/mL presentes en el cultivo.

El potencial redox del alimento también influye como factor de resistencia del *Alicyclobacillus* spp. a los tratamientos térmicos y por lo tanto en la supervivencia y en su presencia en las materias primas empleadas en la industria. El potencial redox de una sustancia también determina su capacidad para actuar como atrapador (quelante) de metales, especialmente de metales con valencia +2, tales como el cobre, el zinc y el hierro, todos de importante relevancia fisiológica y también poderosos oxidantes de lípidos, proteínas y de ácidos nucleicos. Por ello medimos la capacidad antioxidante de los zumos como otro de los factores intrínsecos que podría estar relacionado con el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En cuanto a la capacidad antioxidante de los zumos de frutas y derivados, esta característica está determinada por una gran variedad de sustancias químicas que pueden actuar captando radicales libres, entre las que se encuentran principalmente los compuestos polifenólicos, las vitaminas antioxidantes (C y E) y los carotenoides. Para las muestras estudiadas los valores de capacidad antioxidante medido con la técnica ORAC osciló entre 7,08 y 14,02 mM equivalente Trolox para el zumo de concentrado de manzana y el cremogenado de melocotón-nectarina, respectivamente.

Aunque, en las frutas frescas y en los zumos recién exprimidos el principal compuesto que contribuye a la capacidad antioxidante es la vitamina C, distintos estudios revelan que los concentrados de frutas una vez reconstituidos y tratados térmicamente por los procesos habituales aplicados en la industria de zumos y bebidas de frutas provocan la degradación de la vitamina C (García-Alonso et al.,

2009; Bevilacqua y Corbo, 2011). Para contrarrestar este efecto y aportar parte de las cantidades diarias recomendadas de vitamina C en los zumos de frutas, el ácido ascórbico es generalmente adicionado a los productos finales, a la vez que es utilizado como aditivo antioxidante, pudiendo desarrollar también una acción antimicrobiana (Ray, 1996). Cerny et al. (2000) reportaron que la adición de 100 mg/L de ácido ascórbico en zumo de manzana estimulaba el crecimiento de *A. acidoterrestris*, mientras que concentraciones iguales o superiores a 150 mg/L de ácido ascórbico lo inhibían. Posteriormente, Bahçeci y Acar (2007) no obtuvieron resultados claros o significativos de su estudio sobre el efecto del ácido ascórbico en la resistencia al calor de *A. acidoterrestris*, y por lo tanto sobre el papel que puede jugar en la supervivencia de este microorganismo en las materias primas empleadas en la industria alimentaria. En nuestro estudio no se analizó el ácido ascórbico en las muestras estudiadas porque al proceder de concentrados o cremogenados, a excepción del zumo puro de naranja, los procesos tecnológicos de tratamiento térmico degradan este compuesto, por lo que es habitual que el producto final que va a ser envasado para consumo se enriquezca con vitamina C, con la finalidad de obtener un beneficio tecnológico y nutricional.

La capacidad antioxidante estaría determinada sobre todo por los compuestos fenólicos, ya que se determinó la capacidad del extracto hidrofílico y los contenidos de vitamina C serían muy bajos en las muestras estudiadas. Aunque muchos compuestos fenólicos tienen una actividad antimicrobiana reconocida en alimentos, no podemos relacionar el posible efecto o capacidad antioxidante con la inhibición del crecimiento del *Alicyclobacillus* spp. No obstante, si se sabe que la existencia de cationes divalentes, como calcio y magnesio, en los alimentos proporcionan termorresistencia a las endoesporas al mineralizarlas (Bender y Marquis, 1985), estabilizándolas antes los tratamientos térmicos y favoreciendo su persistencia. En este caso podríamos decir que en zumos con una mayor capacidad antioxidante, por el contenido de compuestos fenólicos, estos podrían interferir en la mineralización de las esporas ya que muchos de los compuestos fenólicos son también capaces de unir cationes divalentes (Chang y Kang, 2004; Jay et al., 2005b), proporcionando cierta actividad antimicrobiana al reducir la resistencia de las esporas al tratamiento térmico. No obstante, esta hipótesis tendría que ser contrastada, ya que el efecto esperado es distinto en cada zumo en función de su perfil polifenólico.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son:

- 1º El tratamiento de 80 °C/10 min se ha seleccionado como tratamiento adecuado para la germinación de las esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a formas vegetativas, al requerir un tiempo de tratamiento menor, reduciendo así el tiempo de análisis de *Alicyclobacillus spp.* empleado en los métodos de microbiología clásica.
- 2º La técnica de impedancia eléctrica directa no es válida para la determinación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, por no detectar cambios en la variable impedancia del medio.
- 3º Con la técnica de impedancia eléctrica indirecta sí se producen cambios en la impedancia del medio, a partir de la generación de CO₂ en la síntesis de guayacol producido por *Alicyclobacillus*, resultando una correlación inversa entre el tiempo de detección por impedancia y la concentración de microorganismo expresada en log (ufc/mL) obtenida del método clásico de microbiología.
- 4º El medio de cultivo seleccionado para la técnica de impedancia eléctrica fue caldo BAT, ya que con el empleo del medio de cultivo genérico Bi Media 002 A (pH 4,00) no se obtuvo crecimiento de *Alicyclobacillus*.
- 5º La técnica de impedancia eléctrica indirecta es un método rápido de análisis para la detección y cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en el zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón–nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, al obtener una buena correlación inversa entre la concentración de microorganismo expresada en logaritmo decimal de unidades formadoras de colonias y el tiempo de detección, tanto para la cepa aislada como para la de referencia.
- 6º La cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por el método de impedancia eléctrica indirecta mostró una buena correlación con la cuantificación del microorganismos por el método de microbiología clásica con BAM Agar.

- 7º Sin embargo, impedancia eléctrica indirecta no resultó ser un método útil para la determinación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de piña, ya que no conseguimos correlación entre los resultados por impedancia eléctrica indirecta y los obtenidos por microbiología clásica con BAM Agar, por lo que este método de microbiología rápido no puede aplicarse en la industria alimentaria para la cuantificación de este microorganismo en esta matriz.
- 8º Con la técnica de RTi-PCR podemos cuantificar *Alicyclobacillus acidoterrestris* en todas las matrices estudiadas, zumos concentrados de uva, manzana, piña y naranja, respectivamente, cremogenados de melocotón-nectarina y de pera y zumo puro de naranja al lograr una buena linealidad entre el número de ciclos de PCR determinado por fluorescencia y el recuento en placa expresado como logaritmo de unidades formadoras de colonias, fijando un límite de detección de $C_T < 40$.
- 9º A diferencia de la técnica de impedancia, la técnica de RTi-PCR es válida para el zumo concentrado de piña, ya que al cuantificar el ADN del microorganismo presente en el concentrado, no interfiere ningún factor intrínseco que pueda afectar a la cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
- 10º Los parámetros intrínsecos de las materias primas utilizadas en el estudio no influyeron en el desarrollo de las técnicas aplicadas ya que no afectaron al crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, incluso la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos, excepto en el zumo concentrado de piña, que de acuerdo a la bibliografía consultada, es rico en lignanos, los cuales inhiben el crecimiento microbiano.

CAPITULO VII. RESUMEN

Resumen

Alicyclobacillus acidoterrestris es una bacteria termoacidófila, formadora de esporas que crece a una temperatura entre 26 y 60 °C (con un rango óptimo de temperatura 42-53 °C) y en un rango de pH de 2,0 a 6,0 con valores óptimos entre 3,5 y 5,0. Es una bacteria termorresistente que puede crecer en alimentos ácidos, incluyendo zumos y bebidas de frutas, y supone un gran problema para la industria de este sector, ya que el deterioro del zumo por este microorganismo no es perceptible en el producto final al crecer sin formación de gas, pero origina sabores desagradables que alteran el producto, como un “sabor a medicina”. Su detección, plantea dificultades en los departamentos de calidad ya que son necesarios varios días para la obtención de resultados por los métodos microbiológicos clásicos tradicionales. Por ello, es de gran importancia el desarrollo de métodos rápidos que permitan el control de *Alicyclobacillus* en las materias primas empleadas en la industria alimentaria garantizando así la ausencia de este microorganismo en los productos finales, zumos y bebidas de frutas.

En la presente Tesis Doctoral el objetivo general ha sido estudiar la aplicación de dos métodos rápidos (impedancia eléctrica y RTi-PCR) para la detección de *Alicyclobacillus spp.* en distintas materias primas empleadas en la industria de zumos. Para ello se inocularon las materias primas (zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de piña, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja) con esporas *Alicyclobacillus acidoterrestris* aisladas a partir de un zumo de melocotón y uva, y con una cepa de referencia del mismo.

En la primera experiencia se ensayaron distintos tratamientos térmicos (80 °C/10 minutos, 70 °C/20 minutos y 60 °C/30 minutos) para la germinación de esporas a formas vegetativas, no existiendo diferencias significativas en los recuentos de *Alicyclobacillus* a las distintas concentraciones de inóculos, ni en los porcentajes de recuperación. Es por ello que se seleccionó el tratamiento térmico de 80 °C/10 minutos para emplear así menos tiempo de análisis.

La técnica de impedancia eléctrica válida para la detección de *Alicyclobacillus acidoterrestris* fue el método indirecto, que registró los cambios en la impedancia del medio (%M) a través de la formación de CO₂ derivado de la ruta metabólica del guayacol por *Alicyclobacillus*, siendo el medio de cultivo más adecuado para la

determinación de este microorganismo el caldo BAT. Por el contrario, no detectamos crecimiento por impedancia eléctrica directa.

Para cada una de las materias primas, zumo concentrado de uva, zumo concentrado de manzana, zumo concentrado de naranja, cremogenado de melocotón-nectarina, cremogenado de pera y zumo puro de naranja, se desarrolló un método válido para la detección y cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* por impedancia eléctrica indirecta para un valor de %M = -10, logrando unos coeficientes de correlación y varianza corregida elevados, superiores al 0,8 tanto para el experimento realizado con una cepa aislada de un zumo de melocotón y uva comercial e identificada como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, como el efectuado con una cepa de referencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. La validación de este método comparando con el método de microbiología clásica con BAM Agar resultó satisfactoria con valores de $R^2 > 0,9$ para cada una de las matrices mencionadas.

Sin embargo, para el zumo concentrado de piña este método no permitió una adecuada cuantificación, ya que se obtuvo baja correlación entre las variables tiempo de detección por impedancia y logaritmo de las unidades formadoras de colonias cuantificadas por siembra tradicional en placa con BAM Agar, tanto para el estudio realizado con la cepa aislada como en el realizado con la cepa de referencia. Además, este método tampoco pudo ser validado con el método clásico de microbiología con BAM Agar por obtener un valor muy bajo de varianza explicada, $R^2 = 0,366$.

Con la técnica de RTi-PCR es posible determinar la concentración de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en todas las materias primas utilizadas en este estudio destinadas a la elaboración de zumos y bebidas de frutas, obteniendo unos valores de coeficientes de correlación y varianza corregida superiores a 0,9; y estableciendo un límite de detección, cuantificado por fluorescencia, de $C_T < 40$ que corresponde a un límite de detección de 200 ufc/mL en recuento en placa, para todos los casos, incluso en el zumo concentrado de piña a diferencia de la técnica por impedancia eléctrica.

Las características intrínsecas de composición química analizadas en las muestras: °Brix, pH, glucosa, fructosa, sacarosa, pectinas solubles en agua, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavonoides no influyeron en el crecimiento de *Alicyclobacillus spp.*, al no observar diferencias en el crecimiento del microorganismo entre las muestras, a excepción del zumo concentrado de piña. En el caso del zumo de piña, los resultados obtenidos en el método de impedancia eléctrica indirecta, pueden estar relacionados con la composición fenólica de este zumo que se caracteriza por un alto contenido en lignanos, compuestos considerados como

antimicrobianos de hongos y algunas bacterias patógenas, que pudiera inhibir el crecimiento de *Alicyclobacillus* y por consiguiente la síntesis de guayacol y formación de CO₂.

CAPITULO VIII. SUMMARY

Summary

Alicyclobacillus acidoterrestris is a thermoacidophilic, spore-forming bacterium that grows to a temperature between 26 and 60 °C (with an optimal rank of temperature 42-53 °C) and in a pH rank of 2,0 to 6,0 with optimal values between 3,5 and 5,0. It is a thermoresistant bacterium that can grow in acidic food, including fruit juices and drinks, and it means a great problem for the industry of this sector, since the deterioration in the juices by this microorganism is not noticeable on the final product as it grows without gas formation but it originates unpleasant tastes modifying the product, like "a taste of medicine". Its detection gives rise to difficulties at the quality departments, given that several days are necessary for the obtaining of results by the traditional microbiological methods. For that reason, it is highly important the development of quick methods which allow to control *Alicyclobacillus* in the raw materials used in the food industry, guaranteeing in this way the absence of this microorganism on the final products, fruit juices and drinks.

At the present Doctoral Thesis the general aim has been to study the application of two quick methods (electrical impedance and RTi-PCR) for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in different raw materials used in the juice industry. For that, the raw materials (concentrated grape juice, concentrated apple juice, concentrated pineapple juice, concentrated orange juice, peach-nectarine purée, pear purée and orange pure juice) were inoculated with spores *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolated from a peach and grape juice, and with a reference strain of the same.

At the first experience, different heat treatments were tried out (80 °C/10 minutes, 70 °C/20 minutes and 60 °C/30 minutes) for the spore germination to vegetative forms, with no significant differences in the *Alicyclobacillus* counts to the different concentrations of inocula nor in the recovery percentages. It is for that reason that it was selected the heat treatment of 80 °C/10 minutes in order to employ in this way less time of analysis.

The electrical impedance technique valid for *Alicyclobacillus acidoterrestris* detection was the indirect method, which registered the changes in the impedance of the environ (%M) via the transformation of CO₂ derived from the metabolic pathway of the guaiacol by *Alicyclobacillus*, being the BAT broth the most adequate culture medium for the determination of this microorganism. On the contrary, it was not detected growth by direct electrical impedance.

For each one of the raw materials, concentrated grape juice, concentrated apple juice, concentrated orange juice, peach-nectarine purée, pear purée and orange pure juice, it was developed a valid method for the detection and quantification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by indirect electrical impedance for a value of %M = -10, achieving high correlation coefficients and corrected variance, higher to the 0,8, not only for the experiment carried out with an isolated strain from a commercial peach and grape juice and identified as *Alicyclobacillus acidoterrestris*, but also for that one carried out with a reference strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. The validation of this method compared to the method of classical microbiology with BAM Agar resulted satisfactory with values of $R^2 > 0,9$ for each one of the matrixes mentioned.

However, for the concentrated pineapple juice this method didn't allow an adequate quantification, as it was obtained low correlation between the variables detection time by impedance and logarithm of the colony-forming units quantified by traditional plating with BAM Agar, as for the study carried out with the isolated strain as in that one carried out with the reference strain. In addition to this, this method either could be validated with the classical method of microbiology with BAM Agar for obtaining a very low value of variance, $R^2 = 0,366$.

With the RTi-PCR technique is possible to determine the concentration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in all the raw materials used in this study and destined to the manufacturing of fruit juices and drinks, obtaining values of $R^2 > 0,9$ with an established value of $C_T < 40$ and with a detection limit of 200 ufc/mL in all the cases, even in that of the concentrated pineapple juice, as opposed to the technique by electrical impedance.

The intrinsic characteristics of chemical composition analysed in the samples: °Brix, pH, glucose, fructose, sacarose, water soluble pectins, organic acids, phenolic compounds and flavonoids, had no influence in the growth of *Alicyclobacillus spp.*, not observing differences in the growth of the microorganism among the samples, with the exception of the concentrated pineapple juice. In the case of the pineapple juice, the results obtained in the indirect electrical impedance method could be related to the phenolic composition of this juice that is characterized by a high content in lignans, compound considered as fungi antimicrobial and some pathogenic bacteria, which could inhibit the growth of *Alicyclobacillus* and, therefore, the synthesis of guaiacol and the CO₂ formation.

CAPITULO XIX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abravaya, K., Huff, J., Marshall, R., Merchant, B., Mullen, C., Schneider, G., Robinson, J. (2003). Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41: 468-474.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., Meyer, R.B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research* 25: 2657-2660.
- AFNOR (2000). Microbiologie des aliments: principes de base de l'impédancemétrie appliquée aux examens microbiologiques. AFNOR NF V08-105 (Revised 2000) www.afnor.org.
- AFNOR (2002). Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages: technique indirecte par impédancemétrie indirecte. AFNOR NF V08-106 (Revised 2001). <http://www.afnor.org>.
- AIJN (2008). ACB Best Practice Guideline. (Revised July 2008). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Apple juice. 6.3 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Grape juice. 6.4 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Orange juice. 6.1 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Peach puree/juice. 6.15 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Pear puree/juice. 6.8 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- AIJN (2011). Reference Guideline for Pineapple juice. 6.5 (Revised 2011). <http://www.aijn.org>.
- Albuquerque, L., Rainey, F.A., Chung, A.P., Sunna, A., Nobre, M.F., Grote, R., Antranikian, G., da Costa, M.S. (2000). *Alicyclobacillus hesperidium* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 451-457.
- Aleksic, V., Knezevic, P. (2014). Anti microbial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis*. *L. Microbiological Research*, 169 (4): 240-254.
- Al-Holy, M.A., Mengshi Lin, Alhaj, O.A., Abu-Goush, M.H. (2015). Discrimination between *Bacillus* and *Alicyclobacillus* isolates in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science* 80 (2): M399-M404.
- American Public Health Association. (1976). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Assoc., Washington, D.C.
- American Public Health Association, (1978). Standard methods for the examination of dairy products, 14th ed., American Public Health Assoc., Washington, D.C.
- Anonymous. (2009). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. (German collection of microorganisms and cell cultures) (DSMZ) Bacterial Nomenclature Up-to Date. *Alicyclobacillus*.

http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=ALICYCLOBACILLUS andshow_all_details=1 24 September 2009.

Ayyadevara, S., Thaden, J.J., Shmookler Reis, R.J. (2000). Discrimination of Primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 284: 11-18.

Bahçeci, K.S., Acar, J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* 120: 266-273.

Blackstone, G.M., Nordstrom, J.L., Vickery, M.C.L., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 53 (2): 149-155.

Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F., Colin, P. (1998). Development of a new culture medium for the rapid detection of *Salmonella* by indirect conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology* 84: 399-404.

Bolton, F.J. (1990). An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria. *Journal of Appl Bacteriology* 69: 655-661.

Borlinghaus, A., Engel, R. (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC)- supplies-method development and validation . *Fruit Processing* 7: 262-266.

Brodman, P.D., Ilg, E.C., Berthoud, H. Herrmann, A. (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize

Bender, G.R., Marquis, R.E. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 50: 1414-1421.

Bevilacqua, A. Corbo, M.R. (2011). Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Heat Resistance and implications for tomato juice. *Journal of Food Science* 76 (2): M130-M136.

Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M. M., Musci, M., Concina, I., Gobbi, E. (2010). Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Chemistry* 123: 653-658.

DNA content in food. *Journal of AOAC International* 85 (3): 646-653.

Brodmann, P.D., Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Science* 65: 599-607.

Brooks, J.D. (1986). Impedance microbiology. *Food Technology Australia* 38: 338-340.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34: 597-601.

Butler, J.N. (1982). CO₂ Equilibria and their Application. Addison-Wesley: Reading, Mass.

Cady, P., Dufour, S.W., Lawless, P., Nunke, B., Kraeger, S.J. (1978). Impedimetric screening for bacteriuria. *Journal Clinical Microbiology* 43: 301-306.

Cámara, M., Pérez, M.L., López, R., Martí, N., Saura, N.D., Mico, V. (2011). Capítulo 6, *Nutrición y Salud en: El libro del zumo.*

- Asozumos, Asociación Española de Fabricantes de Zumos.
- Carminati, D., Neviani, E. (1991). Application of the conductance measurement technique for detection of *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophiles* phages. *Journal of Dairy Science* 74: 1472-1476.
- Cattori, V., Hofmann-Lehmann, R. (2008). Absolute quantitation of feline leukemia virus proviral DNA and viral RNA loads by TaqMan real-time PCR and RT-PCR. *Methods in Molecular Biology* 429: 73-87.
- Cerny, G., Duong, H.-A., Hennlich, W., Miller, S. (2000). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. *Food Australia* 52 (7): 289-291.
- Cerny G., Hennlich, W., Poralla, K. (1984). Fruchtsaftverderb durch Bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserregers. *Zeitschrift fuer Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung* 179: 224-227.
- Chang, S.S., Kang, D.H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 55-74.
- Chang, S., Kang, D.-H. (2005). Development of novel *Alicyclobacillus* spp. isolation medium. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1051-1060.
- Clegg, R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 103-110.
- Colquhoun, K.O., Timms, S., Fricker, C. (1996). Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology. *Journal of Microbiological Methods* 26: 125-132.
- Connor, C.J., Luo H., Brian, B., Gardener, M., Wang, H.H. (2005). Development of a real-time PCR based system targeting the 16S r RNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. *International Journal of Food Microbiology* 99 (3): 229-235.
- Darland, G., Brock, T.D. (1971): *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic sporeforming bacterium. *Journal of General Microbiology* 67: 9-15.
- Deak, T., Beuchat, L.R. (1993). Evaluation of the indirect conductance method for the detection of yeasts in laboratory media and apple juice. *Food Microbiology* 10: 255-262.
- Deák, T. (2008). Yeasts in specific types of foods, 2nd ed.: Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 117-173.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E. (1987a). *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*. 10: 47-53.
- Deinhard, G., Saar, J., Krichske, W., Poralla, K. (1987b). *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. *Systematic and Applied Microbiology* 10: 68-73.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3010-3014.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods* 354: 34-39.
- DIN (1999). Grundlagen des Nachweises und der Bestimmung von Mikroorganismen mittels Impedanz-Verfahren Titel (In deutsch). DIN 10115:1999-04 (Revised 1999). <http://www.din.de/en>.

- DIN (2001). Detecting Salmonella in foodstuffs using impedance methods. DIN 10120:2001 (Revised 2001). <http://www.din.de/en>.
- DIN (2005). Analysis of foodstuffs - Enumeration of microorganisms by means of impedance-method - Determination of aerobic mesophile bacterial count. DIN 10122:2005-09. (Revised 2005). <http://www.din.de/en>.
- Donaghy, J.A., Kelly, P.F., McKay, A. (1999). Conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by yeasts isolated from pasteurised apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 453-456.
- Druggan, P., Forsythe, S.J., Silley, P. (1993). Indirect impedance for microbial screening in the food and beverage industries. In: (Eds. R.G. Kroll, A. Gilmour and M. Sussman). *New Techniques in Food and Beverage Microbiology*, Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 31. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M., Guay, R. (1996). *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 1056-1064.
- Durak M.Z., Churey J.J., Danyluk M.D., Worobo R.W. (2010). Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology* 142: 286-291.
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 18: 3739-3744.
- Eden, R., Eden, G. (1984). *Impedance Microbiology*. Letchworth, UK: Research Studies Press.
- Edlin, D.A.N., Narband, A., Dickinson, J.R., Lloyd, D. (1995). The bio-transformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters* 125: 311-316.
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications* 3: S65-S75.
- Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F.L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 62: 883-886.
- Er-hu Li, Jia-jie Feng, Can Xu, Si-yi Pan. (2014). Detection of *Alicyclobacillus* sp. spoilage of commercial fruit juice beverages by electronic tongue. *Food Science, China*. 35(22): 141-145.
- Esteve, M.J., Farré, R., Frígola, A., López, J.C., Romera, J.M., Ramírez, M., Gil, A. (1995). Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chemistry* 52: 99-102.
- Euguchi, S.Y., Gilson, P., Marcia, M., Pinhatti, E.C., Azuma, E.H., Variane, S. (1999). Colecao de Culturas Tropical (CCT) Fundacao Andre Tosello and ABECitrus, Report of Research Project: Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices. Detection methods, ecology and involvement in the deterioration of fruit juices. (in Japanese and Protégés).
- European Commission (2004). Commission Recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1831/2003. 2004/787/EC, Official Journal of the European Union, 24.11.2004, Vol L348 pp. 18-26.

- Evancho, G.M., Walls, I. (2001). Aciduric flat sour sporeformers, In: Pouch Downes, F., Ito, K. (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Fourth edition. American Public Health Association, Washington, D.C.: 239-243.
- Farrand, S.G., Linton, J.D., Stephenson, R.J., MarCarthy, W.V. (1983). The use of response surface analysis to study growth of *Bacillus acidocaldarius* throughout the growth range of temperature and pH. Archives of Microbiology 135: 272-275.
- Ferre, F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. PCR Methods and Applications 2: 1-9.
- Firstenberg-Eden, R. (1983). Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. Food Technology 37: 64-70.
- Firstenberg-Eden, R., Eden, G. (1984). Impedance Microbiology Wiley, Letch worth.
- Flint, S.H., Brooks, J.D. (2001). Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using impedance-splitting. Journal of Microbiological Methods 44: 205-208.
- Fontaine, M., Guillot, E. (2003). An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. Journal of Microbiological Methods 54: 29-36.
- Fortin, n., Pauss, A., Lebeault, J.M. (1996). Detection, specific activity and microbial growth recording by indirect impedancemetry in heterogenous samples. International Biodeterioration & Biodegradation 37: 255.
- Franken, A.A.J.M., van der Zouwen, P.S. (1993). Direct and indirect conductimetry for identification and detection of plant pathogenic bacteria. Journal of Applied Bacteriology 74: 234-242.
- Friedman, M., Henika, P.R. Mandrell, R.E. (2003). Antibacterial activities pf phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 66 (10): 1811-1821.
- Fu, Z., Rogelj, S., Kieft, T.L. (2005). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 99: 47-57.
- Gahler, S., Otto, K., Böhm, V. (2003). Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. Food Chemistry 51: 7962-7968.
- Galan, A.M.G., Brohée, M., de Andrade Silva, E., van Hengel, A.J., Chassaingne, H. (2011). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. Food Chemistry 127: 834-841.
- García – Alonso, F.J., Bravo, S., Casas, J., Pérez – Conesa, D., Jacob, K., Periago, M.J. (2009). Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 6815-6822.
- Gasparic, M.B., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Zel, J., Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396: 2023-2029.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. Food Control 46: 412-429.
- Gobbi, E., Falasconi, M., Concina, I., Mantero, G., Bianchi, F., Mattarozzi, M., Musci, M.,

- Sberveglieri, G. (2010). Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control* 21 (10): 1374–1382.
- Gocmen, D., Elston, A., Willians, T., Parish, M., Rouseff, R.L. (2005). Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology* 40: 127-177.
- Golovacheva R.S., Karavaiko G.I. (1979). *Sulfobacillus* – a new genus of spore-forming thermophilic bacteria. *Microbiology (English translation of Mikrobiologiya)* 47: 658-665.
- Gong, X.-D. Chen, F. (1997). Rapid detection of heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* using indirect conductimetry. *Biotechnology Techniques*, 11: 841-844.
- Goto, K. (2000). Kouonsei kousansei gahou keisei saikin: *Alicyclobacillus* zoku saikin. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents* 28: 499-508 (in Japanese).
- Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Mochida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H., Inagaki, K. (2002a). Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles* 6: 333-340.
- Goto, K., Matsubara, H., Mochida, K., Matsumura, T., Hara, Y., Niwa, M., Yamasato, K. (2002b). *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 109-113.
- Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. (2003). *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1537-1544.
- Goto, K. (2003). Tainetsusei kousansei kin (*Alicyclobacillus* zoku saikin) no kensa kanbetsuhou ni tsuite. *Nihon Kaju-Kyokai* (in Japanese).
- Goto, K. (2003). Tainetsusei kousanseikin no kensahou – Bunseki hou touitsu to hatten no doukou <Tainetsusei kousanseikin touitsu kensahou no kensaseido oyobi Q & A>. *Kaju Kyoukai Hou* 10: 1-16 (in Japanese).
- Goto, K. (2003). Saishin tainetsusei kousansei kin no kiso chishiki to sono taisakuhuo. *Tainetsusei kousansei kin shinpojumu ILSI JAPAN* (in Japanese).
- Goto, K. (2005). Orenji jusu niokeru guaiakoru seisei ni itarumadeno jidousanka to biseibutukoso no kanyo. *Heisei 17nendo Kaju gijutu kenkyu happyokai* (in Japanese).
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Ozawa, C., Kasai, H., Yokota, A. (2006). Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Microbiological Culture Collections* 22: 1-14.
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.-Y., Kasai, H., Yokota, A. (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangioides* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1276-1285.

- Goto, K. (2007). Parameters for detection of *Alicyclobacillus* and test methods. In: Yokota, A., Fujii, T., Goto, K., (Eds.), *Alicyclobacillus*. Springer, Japan: 49-78.
- Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn R.C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology* 26: 71-76.
- Haidari, M., Ali, M., Ward Casscells, S., 3rd Madjid, M. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 16 (12): 1127-1136.
- Hall, T.S., Pancoska, P., Riccelli, P.V., Mandell, K., Benight, A.S. (2001). Sequence context and thermodynamic stability of a single base pair mismatch in short deoxyoligonucleotide duplexes. *Journal of the American Chemical Society* 123: 11811-11812.
- Hardy, D., Kraeger, S.J., Dufour, S.W., Cady, P. (1977). Rapid detection of microbial contamination in frozen vegetables by automated impedance measurements. *Applied and environmental Microbiology*, Julio.14.
- Hartyani, P., Dalmadi, I., Knorr, D. (2013). Electronic nose investigation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculated apple and orange juice treated by high hydrostatic pressure. *Food Control* 32 (1): 262-269.
- Hays. (1952). Florida State Horticultural. Society 54: 135.
- Hays, G.L., Riestler, D.W. (1952). The control of "off-odor" spoilage in frozen concentrated orange juice. *Food Technology* 6: 386-389.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Reserch* 6: 968-994.
- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., Wagner, M. (2006). Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: an alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods* 66: 538-547.
- 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: 1-8.
- Henderson, M.E.K. (1961). The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some hyphomycetes and yeastlike fungi of soil. *Journal of General Microbiology*, 26: 155-165.
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., Pla, M. (2003). Developmetn of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry* 323: 164-170.
- Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 28: 315-347.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: realtime monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030.
- Hill M., Witsenboer H., Zabeau M., Vos P., Kesseli R., Michelmore R. (1996). PCR-based finger printing using AFLP as a tool for studying genetic relationships in *Lettuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1202–1210
- Hippchen, B., Röhl, A., Poralla, K. (1981). Occurrence in soil of thermoacidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology*. 129: 53-55.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific

- polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 7276-7280.
- Huang, Z., Dostal, L., Rosazza, J.P.N. (1993). Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 23954-23958.
- Huang, S.K., Yi, M., Palmer, E., Marsh, D.G. (1995). A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *Journal of Immunology* 154: 6157-6162.
- IFU (1998). Fumaric Acid. IFUMA 72. Revised 1998. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2005). Determination of Citric Acid, Enzymatic. IFUMA 22. Revised 2005. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2005). Determination of D-Isocitric Acid, Enzymatic. IFUMA 54. Revised 2005. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2005). Determination of Sugars and Sorbitol (HPLC). IFUMA 67. Revised 2005. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2007). Method on the Detection of Taint Producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices. IFUMB12. Revised 2007. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2012). Determination of Pectin. IFUMA 26. Revised 2012. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- IFU (2013). Tartaric Acid in Grape Juice. IFUMA 72. Revised 2013. <http://www.ifu-fruitjuice.com/ifu-methods>.
- Ikegami, Y., Enda, M., Matsui, C., Nakagawa, K. (1996). *Barenshia orenji jusu chu ni okeru kousansei kin no zoushoku*. Toyo Shokuhin Kogyo College/Toyo Shokuhin Laboratories, Kenkyu Hokokusho 21: 117-122 (in Japanese).
- Innis, M., Gelfand, D., Michael, A.I., David, H.G., John, J.S. (1999). Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In PCR Applications San Diego, Academic Press, pp. 3-22.
- Ismail, T., Sestili, P., Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (2): 397-405.
- ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. UNE-EN ISO 16140:2003 (Revised 2003). <http://www.iso.org>.
- JFJA (2003). The unified detection method of thermoacidophilic bacteria (TAB) in raw materials of fruit juice. *Kajuu-Kyokai-Hou*, April Issue, vol. 536: 19-27.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005a). Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganism, 7th ed. *Modern Food Microbiology*. Springer Science + Business Media, Inc., New York: 415-441.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005b). Intrinsic and extrinsic parameters of food that affect microbial growth. 7th ed. *Modern Food Microbiology*. Springer Science + Business Media, Inc., New York: 39-59.
- Jensen, N. (1999). *Alicyclobacillus* – a new challenge for the food industry. *Foods Australia* 51: 33-36.
- Jensen, N. (2000). *Alicyclobacillus* in Australia. *Foods Australia* 52: 282-285.
- Jensen, N., Whitfield, F.B. (2003). Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable

- fruit juice. *Letters in Applied Microbiology* 36: 9-14.
- Jensen, N. (2005). Evaluation of detection methods for *Alicyclobacilli* in fruit juice concentrates in Australia. 14th International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) Congress, Beijing, Chin: 14-18 August 2005.
- Jianke, L., Kai, X., Chaozhou, Y. (2013). Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Control* 30 (1): 251-254.
- Jianke L, Ruirui H., Kai X., Liu L. (2014). Double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *Food Control* 40: 172-176.
- Johnson, N., Chang, Z., Bravo Almeida, C., Michel, M., Iversen, C., Callanan, M. (2014). Evaluation of indirect impedance for measuring microbial growth in complex food matrices. *Food Microbiology* 42: 8-13.
- Josefsen, M.H., Löfström, C., Sommer, H.M., Hoorfar, J. (2009). Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. *Molecular and Cellular Probes* 23: 201-203.
- Josephson, K.L., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (1993). Polymerase chain reaction of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3513-3515.
- Jun, H. J., Sun-Joong K., Bo, H. Y., Jee-Hoon R., Man, B. G., Hyo-Ihl C. (2011). Detection of *Alicyclobacillus* species in fruit juice using a random genomic DNA microarray chip. *Journal of Food Protection* 74 (6): 933-938.
- Kannerberg, E., Blume, A., Poralla, K. (1984). Properties of ω -cyclohexane fatty acids in membrane. *FEBS* 172: 331-334.
- Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.I., Tourova, T.P., Kondrat'eva T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., Krasil'nikova, E.N., Zakharchuk, L.M. (2005). Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 941-947.
- Karmakar, B., Vohra, R.M., Nandanmar, H., Sharma, P., Gupta, K.G., Sobti, R.C. (2000). Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal Biotechnology* 80: 195-202.
- Kidd, I.M., Clark, D.A., Emery, V.C. (2000). A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. *Journal of Virological Methods* 87: 177-181.
- Kleppe K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic ADN's as catalyzed by ADN polymerases. *Journal of Molecular Biology* 56: 341-361.
- Knutsson, R., Blixt, Y., Grage H., Borch, E., Rådström, P. (2002). Evaluation of selective enrichment PCR procedures for *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology* 73 (1): 35-46.
- Kocher, T.D., Wilson, A.C. (1991). DNA amplification by the polimerase chain reaction. In *Essential Molecular Biology* vol 2, T.A. Brown, ed., Oxford University Press, pp. 187-209.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and

- its control by nisin. *International Journal of Food Science & Technology* 34: 81-85.
- Krischke, W., Poralla, K. (1990). Properties of *Bacillus acidocaldarius* mutants deficient in ω -cyclohexyl fatty acid biosynthesis. *Archives of Microbiology* 153: 463-469.
- Kulik, T., Buško M., Pszczółkowska, A., Perkowski, J., Okorski, A. (2014). Plant lignans inhibit growth and trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Letters in Applied Microbiology* 59 (1): 99-107.
- Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M., Yamasato, K. (1997). *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant ω -cyclohexyl fatty acid-containing propionibacterium isolated from spoiled orange juice. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 825-831.
- Kusano, K., Niwa, M., Yamasato. (1997) Kaju yori bunnri sareta tainetsusei kousanseikin no bunrui. *Nihon-Seiryoinryo-Kenkyukai, Dai-6-kai Kenkyu Hapuyokai*.
- Kwok, S., Kellog, D.E., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18: 999-1005.
- Latrille, E., Picque, D., Perret, B., Corrieu, G. (1992). Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74: 32-38.
- Le Den, N. (1995). Conductancemétrie indirecte: Detection des gaz bactériens; Application au suivi des paramètres de croissance de *Shewanella putrefaciens* (in French). PhD thesis, Université Paris XI, Paris.
- Lee, S.Y., Chang, S.S., Shin, J.H., Kang, D.H. (2007). Membrane filtration method for enumeration and isolation of *Alicyclobacillus* spp. from apple juice. *Letters in Applied Microbiology* 45: 540-546.
- Lee, S.Y., Dougherty, R.H. Kang, D.-H. (2002). Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4158-4161.
- Ling, L.L., Keohavong, P., Dias, C., Thilly, W.G. (1991). Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods and Applications* 1: 63-69.
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G. (2000a). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11: 67-77.
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G. (2002). Intron variability in a actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Science* 61 (2): 163-168.
- Luo, H., Yousef, A., Wang, H. (2004). A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Letters in Applied Microbiology* 39: 376-382.
- Lusardi, C., Previdi, M.P., Colla, F., Barbieri, G., Bolzoni, L. (2000). Ability of *Alicyclobacillus* strains to spoil juices and nectars. *Industria conserve* 75: 151-161.
- Madden, R.H., Espie, W.E., McBride, J. (1996). Benefits of indirect impedimetry, using Rappaport-Vassiliadis broth, for the detection of *Salmonella* in processed animal protein. *International Journal of Food Microbiology* 29: 387-390.
- Mahendra, K., Singh, S.A. (2015). Bioactive lignans from sesame (*Sesamum indicum* L.): evaluation of their antioxidant and antibacterial effects for food applications. *Journal of Food Science and Technology* 52(5): 2934-2941.

- Martínez, A., Rodrigo, M. (1987). Métodos rápidos en el análisis microbiológico de alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*: 27.1.
- Martins, S.B., Selby, M.J. (1980). Evaluation of rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 518-524.
- Mathew, S., Abraham, T.E., Sudheesh, S. (2007). Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44: 48-52.
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., Yamasato, K. (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1681-1685.
- McIntyre, S., Ikawa, J.Y., Parkinson, N., Haglund, J., Lee, J. (1995). Characterization of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *Journal of Food Protection* 58: 319-321.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. & Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infections Disease* 5: 607-625.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, P.M., Bramley, C.A., Rice-Evans. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Febs Letters* 384 (3): 240-242.
- Mitsuda, H. (2003). Tainetsusei kousanseikin no kensahou – Bunseki hou touitsu to hatten no doukou < Kensahou touitsu he no ugoki>. *Kaju Kyokai Hou* 11: 1-8 (in Japanese).
- Molva, C., Baysal, A.H. (2015). 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.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-958, 960, 962.
- Motohiro, N., Hiroko, S. (1994). Selective culture medium for detecting thermotolerant acid-fast bacillus and its detection. Patent application number 06-283459, Japanese Patent Office.
- Murdock, D.I., Folinozzo, J.F., Troy, S.V. (1952). Evaluation of plating media for citrus concentrates. *Food Technology*. 6: 181-185.
- Murray, M.B., Gurtler, J.B., Ryu, J., Harrison, M.A., Beuchat, L.R. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* 115: 59-69.
- Myers, T.W., Gelfand, D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* 30: 7661-7666.
- Nakano, C., Takahashi, N., Tanaka, N., Okada, S. (2015). *Alicyclobacillus dauci* sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (2): 716-722.
- Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K., Hohman, R.J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research* 25: 2516-2521.
- Nazareth, A., Mavinkurve, S. (1986). Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani*. *Sacc. Canadian Journal of Microbiology* 32: 494-497.

- Neveu, V., Perez – Jiménez J., Vos, F., Crespy, V., Chaffaut, L. du, Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., Scalbert, A. (2010). Phenol – Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, Article ID bap024.
- Nicolaus, B., Improta R., Manca C.M., Lama L., Esposito E., Gambacorta A. (1998). Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. Polar Biology 19: 133-141.
- Nieuwenhof, F.F.J. (1984). Use of the bactometer for the estimation of the acid-producing capacity (activity) of dairy starter cultures. Antonie Leeuwenhoek 50: 207-208.
- Niwa, M. (2003). *A. acidoterrestris* Rapid Detection Kit. Fruit Processing 13: 328-331.
- Niwa, M. (2004). Guaiakoru kensyutu kitto (Peruokishi daze hou) niyuru sansei inryou yuugai kin no kanri. Japan Food Science, 43: 23-28 (in Japanese).
- Norris, P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse, S. (1996). Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. Microbiology 142: 775-783.
- Oita, S. and Koyama, N. (2002). Antibacterial effect of grape polyphenols against thermoacidophilic bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 48: 555-558 (in Japanese).
- Orr, R.V., Beuchat, L.R. (2000). Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. Journal of Food Protection 63: 1117-1122.
- Orr, R.V., Shewfelt, R.L., Huang, C.J., Tefera, S., Beuchat, L.R. (2000). Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. Journal Food of Protection 63: 1517-1522.
- Owens, J.D., Thomas, D.S., Thompson, P.S., Timmerman, J.W. (1989). Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. Letters in Applied Microbiology 9: 245-249.
- Park, J.H., Kim, J.S., Kwon, S.-T., Lee, D.-S. (1993). Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. European Journal of Biochemistry 214: 135-140.
- Peleg, H., Naim, M., Zehavi, J., Rouseff, R.L., Nagy, S. (1992). Pathways of 4-vinylguaiacol formation from ferulic acid in model solutions of orange juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40(5): 764-767.
- Perez-Cacho, P.R., Danyluk, M.D., Rouseff, R. (2011). GS-MS quantification and sensory thresholds of guaiacol in orange juice and its correlation with *Alicyclobacillus* spp. Food Chemistry 129 (1): 45-50.
- Periago, M.J., Almeida, G., Monteiro, M. J. (1996). Determinación rápida de coliformes y *E. coli* en corizo mediante procedimientos impedimétricos. Alimentaria, Septiembre: 115-119.
- Persing, D.H. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. Journal of Clinical Microbiology 29 (7): 1281-1285.
- Pettipher, G.L. Osmundson, M.E. (2000). Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia 52: 293-295.
- Pettipher, G.L. Osmudson, M.E., Murphy, J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of

- taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology* 24: 185-189.
- Pfaffl, M.W. (2008). Gene-quantification info. <http://www.gene-quantification.de/>
- Phenol Explorer, Database on polyphenol contents in foods, <http://phenol-explorer.eu/>
- Pinhatti, M.E.M.C., Variane, S., Eguchi, S.Y., Manfio, G.P. (1997). Detection of acidothermophilic *Bacilli* in industrialized fruit juices. *Fruit Processing* 7: 350-353.
- Pless, P., Futschik, K. and Schopf, E. (1994). Rapid detection of Salmonellae by Means of a New Impedance – Splitting Method. *Journal of Food Protection* 57: 369-376.
- Pometto, A.L. III., Sutherland, J.B., Crawford, D.L. (1981). *Streptomyces setonii*: catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol. *Canadian Journal Microbiology* 27: 636-638.
- Pontius, A.J., Rushing, J.E., Foegeding, P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of Food Protection* 61: 41-46.
- Poralla, K., Kannenberg, E., Blume, A. (1980). A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has cholesterol-like function in membranes. *FEBS* 113: 107-110.
- Porralla, K., König W.A. (1983). The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus. *FEMS Microbiology Letters* 16: 303-306.
- Postollec, F., Bonilla, S., Baron, F., Jan, S., Gautier, M., Mathot, A.G., Hallier-Soulier, S., Pavan S., Sohier D. (2010). A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. *International Journal of Food Microbiology* 142: 78-88.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *28 (5)*: 848-861.
- Previdi, M.P., Colla, P., Vicini, E. (1995). Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore-forming thermophilic acidophilic bacterium. *Industria Conserve* 70: 128-132.
- Priego, R., Medina, L.M. Jordano, R. (2011). Bactometer System versus Traditional Methods for Monitoring Bacteria Populations in Salchicón during its Ripening Process. *Journal of Food Protection*, 74: 145-148.
- Prior, R.L., Hoang, H.A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3273–3279.
- Raeymaekers, L. (1993). Quantitative PCR: Theoretical Considerations with Practical Implications. *Analytical Biochemistry* 214: 582-585.
- Rahouti, M., Murandi, E.S., Steinman, R., Erikson, K.E. (1989). Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2391-2398.
- Ray, B. (1996). *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, ashington, p.173.
- Rennie, C., Noyes, H.A., Kemp, S.J., Hulme, H., Brass, A., Hoyle, D.C. (2008). Strong position-dependent effects of sequence mismatches on signal ratios measured using long oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 9: 317.
- Ribeiro, T., Romestant, G., Depoortere, J., Paus, A. (2003). Development, validation, and

- applications of a new laboratory-scale indirect impedancemeter for rapid microbial control. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 35-41.
- Ririe, K.M., Rasmunssen, R.P., Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Rosazza, J.P.N., Huang Z., Dostal, L., Volm, T., Rousseau, B. (1995). Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal Industrial Microbiology* 15: 457-471.
- Rothwell, A., Urpi-Sarda, M., Boto – Ordoñez, M., Knox, C., Llorach, R., Eisner, R., Cruz, J., Neveu, V., Wishart, D., Manach C., Andres – Lacueva, C., Scalbert, A. (2012). Phenol – Explorer 2.0: a major update of the Phenol – Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database*, Vol. 2012, Article ID bas031.
- Rothwell, J., Perez – Jimenez, J., Neveu, V., Medina – Remón, A., M'Hiri, N., García – Lobato, P., Manach C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D.S., Scalbert, A. (2013). *Database*, Vol. 2013, Article ID bat070.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.T., Higuchi, R., Horn, C.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sawai, J., Doi, R., Maekawa, Y., Yoshikawa, T., Kojima, H. (2002). Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29: 296-298.
- Sawai, J., Yoshikawa, T. (2003). Measurement of fungi by an indirect conductimetric assay. *Letters in Applied Microbiology* 37: 40-44.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14: 579-583.
- She, X., Rohl, C.A., Castle, J.C., Kulkarni, A.V., Johnson, J.M., Chen, R. (2009). Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes. *BMC Genomics* 10: 269.
- Silley, P., Forsythe, S. (1996). Impedance microbiology – a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 233-243.
- Silva, F.M., Gibbs, P., Vieira, M.C., Silva, C.L.M. (1999). Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology* 51: 95-103.
- Silva, F.V.M. (2000a). Design and optimization of pasteurization conditions for cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) fruit pulp, pH. D tesis, *Escuela Superior de Biotecnología, Universidad Católica Portuguesa, Portugal*.
- Silva, F.M., Gibbs, P., Silva, C.L.M. (2000b). Establishing a new pasteurization criterion based in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores for shelf-stable high-acidic fruit products. *Fruit processing* 10: 138-141.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes, review. *Trends Food Science Technology* 12: 68-74.

- Silva, F.V.M., Gibbs, P. (2004). Target selection in designing pasteurisation processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 353-360.
- Silverman, M.P., Munoz, E.F. (1979). Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Applied Environmental Microbiology* 37: 521-526.
- Simbahan, J., Drijber, R., Blum, P. (2004). *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Spring, California, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1703-1707.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144–158.
- Sinigaglia M., Corbo M.R., Altieri C., Campaniello D., D'Amato D., Bevilacqua A. (2003). Combined effects of temperature, water activity and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Food Protection* 63: 2216-21.
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., Witthuhn, R.C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – A review. *Food Microbiology* 28: 331-349.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W., Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21: 280-285.
- Spinelli, A.C.N., Sant'Ana, A.S., Rodrigues-Junior, S., Massaguer, P.R. (2009). Influence of different storage temperatures on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 growth in hot-filled orange juice. *Applied and Environmental Microbiology* 137: 295-298.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal Food of Protection* 57: 1080-1083.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J. (1996). Unique spoilage organisms of musts and wines, in *Wine spoilage microbiology conference*, Toland, T. and Fugelsang, K.C., Edes., California State University, Fresno 36.
- Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., & Churey, J.J. (1998). Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 18: 585-587.
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H., Schutten, M. (2009). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 12: 109-117.
- Steyn, C.E., Cameron, M., Witthuhn, R.C. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment- a review. *International Journal of Food Microbiology* 147: 1-11.
- Sun, X.-W., Ferenczy, A., Johnson, D., Koulos, J.P., Lungu, O., Richart, R.M., Wright T.C. (1995). Evaluation of the Hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *American Journal Obstetrics & Gynecology* 3: 1432–1437.
- Sutherland, J.B., Crawford, D.L., Pometto, A.L. (1983). Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric and ferulic acid by *Streptomyces setonii*. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 1253-1257.
- Suzuki, K., Saito, K., Kawaguchi, A., Okuda, S., Koamgata, K. (1981). Occurrence of ω -cyclohexyl fatty acids in *Curtobacterium pusillum* strains. *Journal of General and Applied Microbiology* 27: 261-266.
- Svensson, U.K. (1994). Starter culture characterization by conductance methods. *Journal of Dairy Science* 77: 3516-3523.

- Sy-Lab (2008). Detección de *Alicyclobacillus acidiphilus* mediante sistema Bactrac (Sy-Lab). Creado 2008. www.gomensoro.net.
- Szita, G., Gyenes, M., Soós, L., Rétfalvi, T., Békési, L., Csikó, G. and Bernáth, S. (2007). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples using a novel synthetic medium and impedimetric technology. *Letters in Applied Microbiology* 45: 42-46.
- Tadasa, K. (1977). Degradation of eugenol by a microorganism. *Agricultural and Biological Chemistry* 41: 925-929.
- Tan, X., Sun, X., Gonzalez, C.F., Hsueh, W. (1994). PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: Quantitative analysis by competitive PCR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1215: 157-162.
- Tanimoto, Y., Inagaki, K., Tanaka, H. (1996). Screening, isolation and characterization of thermophilic and acidophilic bacteria (in Japanese). *Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ.* 85: 15-21.
- Teletchea, F., Maudet, C., Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology* 23: 359-366.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75: 291-295.
- Tindall, K.R., Kunkel, T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* 27: 6008-6013.
- Tokuda, H. (2007). Growth profile of *Alicyclobacillus* in fruit juices. In: Yokota, A., Fujii, T., Goto, K. (Eds.), *Alicyclobacillus*. Springer, Japan: 92-105.
- Toms, A., Wood, J.M. (1970). The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*, *Biochemistry* 9: 337-343.
- Tribs, A.A.L., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R. (2009). Review: microbiological quality and safety of fruit juices: past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 310-339.
- Tsai, K.P. and Luedecke, L.O. (1989). Impedance measurement of changes in activity of lactic cheese starter culture after storage at 4°C. *Journal of Dairy Science* 72: 2239-2241.
- Tsuruoka N, Isono Y, Shida O, Hemmi H, Nakayama T, Nishino T. (2003). *Alicyclobacillus sendaiesis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1081-1084.
- Tyagi, S., Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14: 303-308.
- Uehara, H., Nardone, G., Nazarenko, I., Hohman, R.J. (1999). Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *Biotechniques* 26: 552-558.
- Ur, A.M.D., Brown, D.F.J. (1975). Impedance monitoring of bacterial activity. *Journal of Medical Microbiology* 8: 19-28.
- Vicuña, R., González, B., Mozuch, M.D., Kirk. (1987). Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol β -aryl ether type by *Pseudomonas acidovorans* D₃. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2605-2609.
- Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, F.M., Gaspar, N., Silva, C.L.M. (2002). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental

- methods. *International Journal of Food Microbiology* 77: 71-81.
- Waes, G.M., Bossuyt, R.G. (1984). Impedance measurements to detect bacteriophage problems in Cheddar cheesemaking. *Journal of Food Protection* 47: 349-351.
- Walker M, Phillips CA. (2005). The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 557-62.
- Walker, M., Phillips, C.A. (2008). Original article *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology* 43: 250-260.
- Walls, I., Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus* – Historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18: 499-503.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Austria* 52: 286-288.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International* 83: 1115-1120.
- Wang, Z., Cai, R., Yuan, Y., Niu, C., Hu, Z., Yue, T. (2014). An immunomagnetic separation-real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products. *International Journal of Food Microbiology* 175: 30-35.
- Wawerla, M., Stolle, A., Schalch, B., Eisgruber, H. (1999). Impedance microbiology: applications in food hygiene. *Journal of Food Protection* 62: 1488-1496.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* 17: 804-807.
- Whitfield, F.B., Last, J.H., Shaw, K.J., Tindale, C.R. (1988). 2, 6-Dibromophenol: The cause of an iodoform-like off-flavour in some Australian crustacean. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 46: 29-42.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (10): 3471-3751.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshurk, P., Fox, G.E., Deinhard, G., Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16SrRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 263-269.
- Wisse, C.A., Parish, M.E. (1998). Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18: 504-509.
- Witthuhn, R.C., Duvenage, W., Gouws, P.A. (2007). Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. *Letters in Applied Microbiology* 45: 224-229.
- Witthuhn, R.C., Smit, Y., Cameron, M., Venter, P. (2013). Guaiacol production by *Alicyclobacillus* and comparison of two guaiacol detection methods. *Food Control* 30 (2): 700-704.
- Witthuhn, R.C., Smit, Y., Cameron, M., Venter, P. (2011). Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters. *International Journal of Food Microbiology* 146: 63-68.
- Witthuhn, R.C., Van der Merwe, E., Venter, P., Cameron, M. (2012). Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by

- Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Microbiology 157: 113-117.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997a). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22: 134-138.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Goudry, R.A., Balis, U. (1997b). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22: 176-181.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39: 75-85. Yamashita, M. 1996. Arukoru rui no biseibutsu ni taisuru sayuo. Boukin Boubai 24: 25-49 (in Japanese).
- Workenhe, S.T., Kibenge, M.J., Iwamoto, T., Kibenge, F.S. (2008). Absolute quantitation of infectious salmon anaemia virus using different real-time reverse transcription PCR chemistries. Journal of Virological Methods 154: 128-134.
- Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 60: 543-545.
- Yamazaki, K., Isoda, C., Tezuda, H., Kawai, H., Shinano, H. (1997). Sansei inryou henpai kin *Alicyclobacillus acidoterrestris* no tainetsusei to sono seigyō. Nihon Syokuhin Kagaku Kougakukaishi 44: 905-911 (in Japanese).
- Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., Matsuda, T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiology 17: 315-320.
- Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N., Shinano, H. (1997). Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. Letters in Applied Microbiology 25: 153-156.
- Yokota, A., Fujii, T., Goto, K. (2007). *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli, parameters for detection of *Alicyclobacillus* and test methods. Springer Science + Business Media, Shinano Inc., Japan: 49-78.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., Arnheim, N. (1992). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proceedings National Academy of Science of the USA 89: 5847-5851.
- Zhouli, W., Tianli, Y., Yahong, Y., Rui, C., Caixia, G., Xin, W., Chen, N. (2012). Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus* strains in apple juice. Journal of Food Science, 77 (11): M643-M649.
- Zhouli, W., Tianli, Y., Yahong, Y., Rui, C., Chen, N., Caixia, G. (2013). Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. International Journal of Food Microbiology 166(1): 28-33.

CAPITULO X. ANEXO

Tabla 26. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de uva¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	8,50 ± 0,63	6,24 ± 0,62
10	85	5	8,26 ± 0,41	5,91 ± 0,07
10	88	2	8,59 ± 0,55	5,87 ± 0,18
10	89	1	8,64 ± 0,09	6,35 ± 0,35
10	89,2	0,8	9,47 ± 0,53	5,49 ± 0,20
10	89,25	0,75	9,72 ± 0,86	5,55 ± 0,14
10	89,4	0,6	9,77 ± 1,11	5,32 ± 0,64
10	89,5	0,5	9,87 ± 2,44	5,61 ± 0,58
10	89,6	0,4	10,36 ± 0,38	4,64 ± 0,24
10	89,75	0,25	10,83 ± 0,98	4,91 ± 0,46

10	89,8	0,2	11,28 ± 0,10	5,17 ± 0,10
10	89,9	0,1	11,31 ± 0,78	5,19 ± 0,12
10	90	0,08	11,58 ± 0,32	4,93 ± 0,07
10	90	0,075	11,88 ± 0,91	4,30 ± 0,33
10	90	0,06	12,12 ± 0,44	5,20 ± 0,79
10	90	0,05	12,21 ± 0,62	4,36 ± 0,04
10	90	0,025	12,47 ± 0,52	4,07 ± 0,19
10	90	0,02	13,22 ± 1,07	3,82 ± 0,19
10	90	0,01	13,28 ± 0,64	3,80 ± 0,66
10	90	0,008	13,42 ± 2,01	4,02 ± 0,94
10	90	0,0075	13,28 ± 0,64	3,80 ± 0,66
10	90	0,006	13,84 ± 0,08	3,71 ± 0,16
10	90	0,005	14,00 ± 1,38	3,93 ± 0,20
10	90	0,0025	14,38 ± 0,28	2,74 ± 0,23
10	90	0,002	14,43 ± 1,46	2,80 ± 0,18

10	90	0,001	14,87 ± 1,38	3,24 ± 0,16
10	90	0,0008	15,04 ± 0,45	2,84 ± 0,47
10	90	0,00075	15,26 ± 0,55	2,81 ± 0,41
10	90	0,0006	15,90 ± 1,07	2,47 ± 0,71
10	90	0,0005	15,92 ± 0,13	2,56 ± 0,25
10	90	0,00025	16,31 ± 0,31	2,68 ± 0,23
10	90	0,0002	16,63 ± 0,33	2,59 ± 0,77
10	90	0,0001	16,72 ± 0,49	1,63 ± 0,54
10	90	0,00008	17,16 ± 0,24	1,78 ± 0,68
10	90	0,000075	17,24 ± 0,37	2,20 ± 0,90
10	90	0,00005	17,81 ± 0,44	1,99 ± 0,29
10	90	0,000025	21,37 ± 0,63	0,62 ± 0,43
10	90	0,00002	21,53 ± 0,12	0,58 ± 0,16
10	90	0,00001	21,86 ± 0,15	0,45 ± 0,20

¹Los valores se indican como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 27. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de manzana¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	6,30 ± 0,16	6,47 ± 0,21
10	85	5	8,50 ± 2,09	6,10 ± 0,39
10	88	2	8,92 ± 0,45	6,16 ± 0,07
10	89	1	9,29 ± 0,33	5,73 ± 0,06
10	89,2	0,8	9,54 ± 1,12	5,80 ± 0,17
10	89,25	0,75	9,83 ± 1,42	5,68 ± 0,34
10	89,4	0,6	10,38 ± 0,04	5,98 ± 0,01
10	89,5	0,5	11,13 ± 2,08	5,72 ± 0,29
10	89,6	0,4	11,28 ± 0,36	5,30 ± 0,55
10	89,75	0,25	11,60 ± 1,91	5,36 ± 0,30
10	89,8	0,2	11,61 ± 0,09	4,85 ± 0,05
10	89,9	0,1	12,02 ± 0,23	4,85 ± 0,19

10	90	0,08	11,60 ± 1,91	5,36 ± 0,30
10	90	0,075	12,32 ± 2,92	4,71 ± 0,63
10	90	0,06	12,72 ± 0,11	4,71 ± 0,15
10	90	0,05	12,80 ± 0,13	4,86 ± 0,09
10	90	0,025	13,40 ± 2,24	5,07 ± 0,33
10	90	0,02	13,84 ± 3,17	4,77 ± 0,97
10	90	0,01	13,94 ± 0,66	4,81 ± 0,29
10	90	0,008	14,31 ± 0,69	4,27 ± 0,14
10	90	0,0075	14,55 ± 0,16	4,45 ± 0,45
10	90	0,006	14,72 ± 0,26	3,90 ± 0,35
10	90	0,005	14,88 ± 0,23	3,68 ± 0,56
10	90	0,0025	15,55 ± 2,95	4,55 ± 0,24
10	90	0,002	15,64 ± 2,99	3,99 ± 0,73
10	90	0,001	16,03 ± 0,94	4,20 ± 0,27

10	90	0,0008	16,45 ± 4,41	3,78 ± 1,43
10	90	0,00075	16,65 ± 0,24	4,07 ± 0,52
10	90	0,0006	17,18 ± 1,99	3,40 ± 0,88
10	90	0,0005	17,70 ± 1,47	3,30 ± 1,50
10	90	0,00025	19,12 ± 0,83	2,41 ± 0,57
10	90	0,0002	19,16 ± 2,11	2,93 ± 1,63
10	90	0,0001	19,48 ± 0,33	2,78 ± 0,29
10	90	0,00008	19,87 ± 0,74	2,82 ± 0,14
10	90	0,000075	19,97 ± 1,74	2,50 ± 0,97
10	90	0,00005	20,61 ± 2,18	2,66 ± 0,22
10	90	0,000025	22,92 ± 0,23	1,85 ± 0,28
10	90	0,00002	23,02 ± 0,15	1,69 ± 0,18
10	90	0,00001	30,64 ± 0,62	0,00

¹Los valores se están expresados como la media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 28. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de piña¹.

Vol. Muestra (mL)	Vol. Caldo BAT (mL)	Vol. Inoculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	9,00 ± 1,89	6,82 ± 0,02
10	85	5	10,46 ± 0,54	6,41 ± 0,19
10	88	2	11,07 ± 0,18	6,05 ± 0,04
10	89	1	11,27 ± 1,20	5,77 ± 0,08
10	89,2	0,8	12,22 ± 1,31	5,55 ± 0,61
10	89,25	0,75	12,74 ± 1,15	6,23 ± 0,03
10	89,4	0,6	13,48 ± 0,73	5,84 ± 0,03
10	89,5	0,5	14,23 ± 0,75	4,72 ± 0,03
10	89,6	0,4	15,21 ± 0,56	5,18 ± 0,14
10	89,75	0,25	15,53 ± 2,92	4,74 ± 0,19
10	89,8	0,2	15,55 ± 0,16	5,93 ± 0,01
10	89,9	0,1	15,64 ± 1,93	3,75 ± 0,20

10	90	0,08	16,00 ± 3,13	5,14 ± 0,05
10	90	0,075	16,07 ± 0,97	5,64 ± 0,18
10	90	0,06	17,56 ± 2,37	4,10 ± 0,11
10	90	0,05	17,67 ± 0,44	4,85 ± 0,18
10	90	0,025	17,84 ± 0,17	4,22 ± 0,50
10	90	0,02	18,05 ± 0,26	4,73 ± 0,08
10	90	0,01	18,56 ± 1,90	4,16 ± 0,16
10	90	0,008	19,08 ± 0,28	4,98 ± 0,03
10	90	0,0075	19,56 ± 1,95	2,52 ± 0,31
10	90	0,006	20,30 ± 1,76	3,31 ± 0,08
10	90	0,005	20,31 ± 2,55	3,64 ± 0,45
10	90	0,0025	20,33 ± 2,50	3,07 ± 0,02
10	90	0,002	20,63 ± 0,45	3,87 ± 0,06
10	90	0,001	21,06 ± 1,20	3,53 ± 0,21

10	90	0,0008	21,50 ± 3,70	2,18 ± 0,50
10	90	0,00075	22,97 ± 0,62	3,09 ± 0,08
10	90	0,0006	23,03 ± 0,52	3,20 ± 0,14
10	90	0,0005	23,44 ± 9,86	1,71 ± 0,04
10	90	0,00025	23,60 ± 0,04	3,15 ± 0,04
10	90	0,0002	24,23 ± 0,53	3,31 ± 0,02
10	90	0,0001	24,46 ± 0,67	2,55 ± 0,31
10	90	0,00008	24,55 ± 2,13	2,06 ± 0,49
10	90	0,000075	25,02 ± 0,23	2,43 ± 0,18
10	90	0,00005	28,95 ± 0,12	1,79 ± 0,07
10	90	0,000025	32,89 ± 0,13	1,39 ± 0,12
10	90	0,00002	33,25 ± 0,19	0,80 ± 0,30
10	90	0,00001	36,58 ± 0,11	0,73 ± 0,25

¹Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 29 Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de naranja¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	9,72 ± 2,84	6,76 ± 0,47
10	85	5	8,61 ± 0,36	6,65 ± 0,05
10	88	2	10,67 ± 1,59	6,34 ± 0,21
10	89	1	11,52 ± 0,68	6,04 ± 0,28
10	89,2	0,8	11,96 ± 0,22	6,25 ± 0,19
10	89,25	0,75	12,48 ± 0,59	6,12 ± 0,25
10	89,4	0,6	12,81 ± 1,52	6,08 ± 0,18
10	89,5	0,5	13,00 ± 0,29	5,83 ± 0,24
10	89,6	0,4	13,14 ± 1,07	5,57 ± 0,05
10	89,75	0,25	13,33 ± 0,81	5,58 ± 0,26
10	89,8	0,2	14,39 ± 0,47	5,77 ± 0,14
10	89,9	0,1	15,30 ± 1,09	5,78 ± 0,16

10	90	0,08	15,81 ± 1,63	5,02 ± 0,06
10	90	0,075	16,01 ± 0,24	5,49 ± 0,21
10	90	0,06	16,73 ± 2,38	4,93 ± 0,43
10	90	0,05	17,14 ± 1,06	5,02 ± 0,22
10	90	0,025	17,72 ± 1,52	4,91 ± 0,30
10	90	0,02	17,77 ± 0,38	5,03 ± 0,09
10	90	0,01	17,87 ± 0,37	5,04 ± 0,09
10	90	0,008	17,92 ± 0,98	4,87 ± 0,30
10	90	0,0075	18,04 ± 0,20	4,72 ± 0,30
10	90	0,006	19,43 ± 1,18	4,91 ± 0,12
10	90	0,005	19,54 ± 4,04	4,27 ± 0,41
10	90	0,0025	21,16 ± 0,95	4,12 ± 0,41
10	90	0,002	24,07 ± 0,94	3,72 ± 0,22
10	90	0,001	25,12 ± 0,31	3,02 ± 0,21

10	90	0,0008	25,45 ± 1,35	3,67 ± 0,33
10	90	0,00075	25,96 ± 0,23	2,89 ± 0,15
10	90	0,0006	27,77 ± 0,81	2,80 ± 0,09
10	90	0,0005	28,00 ± 0,19	2,65 ± 0,11
10	90	0,00025	28,45 ± 0,23	2,39 ± 0,19
10	90	0,0002	28,96 ± 0,30	2,13 ± 0,22
10	90	0,0001	30,52 ± 0,21	1,89 ± 0,16
10	90	0,00008	31,25 ± 0,45	2,45 ± 0,21
10	90	0,000075	31,79 ± 0,38	2,31 ± 0,13
10	90	0,00005	32,51 ± 0,23	1,85 ± 0,25
10	90	0,000025	36,01 ± 0,79	1,66 ± 0,20
10	90	0,00002	36,58 ± 0,11	0,73 ± 0,25
10	90	0,00001	40,23 ± 0,21	1,01 ± 0,33

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 30. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado melocotón-nectarina¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	6,75 ± 0,41	7,02 ± 0,08
10	85	5	7,68 ± 1,86	6,39 ± 0,57
10	88	2	8,93 ± 0,30	6,01 ± 0,14
10	89	1	9,19 ± 0,79	6,02 ± 0,02
10	89,2	0,8	10,19 ± 0,11	5,92 ± 0,21
10	89,25	0,75	10,34 ± 0,21	5,81 ± 0,14
10	89,4	0,6	10,70 ± 0,65	6,01 ± 0,11
10	89,5	0,5	10,74 ± 0,63	5,64 ± 0,12
10	89,6	0,4	10,85 ± 0,37	5,55 ± 0,24
10	89,75	0,25	11,10 ± 0,40	5,45 ± 0,03
10	89,8	0,2	11,56 ± 0,80	5,23 ± 0,03
10	89,9	0,1	12,86 ± 0,12	4,85 ± 0,07

10	90	0,08	12,88 ± 0,29	5,01 ± 0,16
10	90	0,075	12,89 ± 0,96	4,98 ± 0,06
10	90	0,06	13,16 ± 0,94	4,86 ± 0,09
10	90	0,05	13,29 ± 0,19	4,75 ± 0,05
10	90	0,025	14,76 ± 0,23	3,92 ± 0,32
10	90	0,02	14,90 ± 0,28	4,10 ± 0,12
10	90	0,01	15,00 ± 0,21	3,98 ± 0,22
10	90	0,008	15,04 ± 0,07	4,59 ± 0,34
10	90	0,0075	15,50 ± 0,21	4,29 ± 0,22
10	90	0,006	15,79 ± 0,21	4,14 ± 0,24
10	90	0,005	16,30 ± 0,67	3,22 ± 0,50
10	90	0,0025	16,43 ± 1,07	3,89 ± 0,11
10	90	0,002	16,45 ± 0,17	3,41 ± 0,27
10	90	0,001	16,49 ± 2,90	3,41 ± 0,10

10	90	0,0008	16,57 ± 2,93	3,35 ± 0,31
10	90	0,00075	16,93 ± 1,41	3,12 ± 0,43
10	90	0,0006	17,74 ± 0,80	2,94 ± 0,44
10	90	0,0005	18,31 ± 0,25	2,95 ± 0,41
10	90	0,00025	18,73 ± 0,01	3,49 ± 0,38
10	90	0,0002	18,98 ± 0,84	2,56 ± 0,48
10	90	0,0001	19,13 ± 1,35	2,69 ± 0,51
10	90	0,00008	19,49 ± 0,38	3,18 ± 0,41
10	90	0,000075	19,99 ± 0,29	3,01 ± 0,42
10	90	0,00005	21,15 ± 0,30	2,37 ± 0,16
10	90	0,000025	21,34 ± 0,64	2,18 ± 0,16
10	90	0,00002	22,32 ± 0,19	2,02 ± 0,15
10	90	0,00001	27,19 ± 0,20	0,58 ± 0,29

¹Los resultados vienen expresados como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 31. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado de pera¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	7,53 ± 0,19	6,21 ± 0,21
10	85	5	7,63 ± 0,27	6,07 ± 0,25
10	88	2	8,26 ± 0,34	5,44 ± 0,21
10	89	1	8,50 ± 0,41	5,68 ± 0,10
10	89,2	0,8	8,65 ± 0,38	5,16 ± 0,24
10	89,25	0,75	9,01 ± 0,18	5,08 ± 0,19
10	89,4	0,6	9,30 ± 0,04	5,01 ± 0,21
10	89,5	0,5	9,31 ± 0,13	5,38 ± 0,14
10	89,6	0,4	9,74 ± 0,99	5,14 ± 0,36
10	89,75	0,25	9,68 ± 0,05	4,91 ± 0,16
10	89,8	0,2	9,88 ± 1,03	4,87 ± 0,38
10	89,9	0,1	10,29 ± 0,45	4,80 ± 0,18

10	90	0,08	10,51 ± 0,22	4,71 ± 0,04
10	90	0,075	10,78 ± 0,40	4,86 ± 0,19
10	90	0,06	10,99 ± 0,23	4,29 ± 0,28
10	90	0,05	11,15 ± 0,45	4,45 ± 0,14
10	90	0,025	11,88 ± 0,14	4,45 ± 0,25
10	90	0,02	12,02 ± 0,84	4,46 ± 0,30
10	90	0,01	12,61 ± 0,33	3,93 ± 0,06
10	90	0,008	12,69 ± 1,07	4,10 ± 0,27
10	90	0,0075	12,81 ± 0,37	4,13 ± 0,15
10	90	0,006	12,95 ± 0,26	3,91 ± 0,19
10	90	0,005	12,95 ± 0,23	3,71 ± 0,22
10	90	0,0025	13,53 ± 0,13	3,55 ± 0,45
10	90	0,002	14,09 ± 0,13	3,12 ± 0,15
10	90	0,001	14,27 ± 0,66	3,10 ± 0,13

10	90	0,0008	15,11 ± 0,35	2,59 ± 0,50
10	90	0,00075	15,73 ± 0,72	2,58 ± 0,23
10	90	0,0006	15,79 ± 0,84	2,73 ± 0,23
10	90	0,0005	16,16 ± 0,82	2,33 ± 0,40
10	90	0,00025	16,24 ± 0,15	2,53 ± 0,15
10	90	0,0002	17,06 ± 0,64	2,17 ± 0,12
10	90	0,0001	17,13 ± 0,64	1,95 ± 0,30
10	90	0,00008	17,98 ± 0,74	1,41 ± 0,38
10	90	0,000075	18,05 ± 0,25	1,30 ± 0,20
10	90	0,00005	18,52 ± 0,18	1,22 ± 0,23
10	90	0,000025	18,75 ± 0,15	1,16 ± 0,16
10	90	0,00002	18,83 ± 0,87	1,33 ± 0,35
10	90	0,00001	18,96 ± 0,12	1,05 ± 0,12

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 32. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo puro de naranja¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	80	10	6,45 ± 0,21	6,38 ± 0,05
10	85	5	7,71 ± 0,12	6,15 ± 0,07
10	88	2	9,13 ± 0,21	5,85 ± 0,02
10	89	1	10,52 ± 0,25	5,41 ± 0,15
10	89,2	0,8	10,56 ± 0,48	5,30 ± 0,32
10	89,25	0,75	10,70 ± 0,59	5,50 ± 0,19
10	89,4	0,6	10,78 ± 0,29	5,74 ± 0,20
10	89,5	0,5	10,89 ± 0,56	5,48 ± 0,23
10	89,6	0,4	10,90 ± 0,30	5,60 ± 0,22
10	89,75	0,25	11,01 ± 0,29	5,61 ± 0,16
10	89,8	0,2	11,36 ± 0,32	5,50 ± 0,14
10	89,9	0,1	11,70 ± 0,60	5,37 ± 0,11

10	90	0,08	12,29 ± 0,75	5,26 ± 0,29
10	90	0,075	12,68 ± 0,22	5,05 ± 0,13
10	90	0,06	12,75 ± 0,33	4,66 ± 0,05
10	90	0,05	13,13 ± 0,63	4,94 ± 0,14
10	90	0,025	13,69 ± 0,77	4,75 ± 0,21
10	90	0,02	14,66 ± 0,04	4,45 ± 0,25
10	90	0,01	15,79 ± 1,05	4,90 ± 0,05
10	90	0,008	15,88 ± 0,31	4,73 ± 0,22
10	90	0,0075	16,03 ± 0,77	4,72 ± 0,24
10	90	0,006	16,42 ± 2,06	4,22 ± 0,46
10	90	0,005	16,51 ± 0,19	4,63 ± 0,16
10	90	0,0025	16,71 ± 0,78	4,59 ± 0,38
10	90	0,002	17,33 ± 0,58	4,18 ± 0,12
10	90	0,001	17,74 ± 1,05	4,32 ± 0,39

10	90	0,0008	18,14 ± 0,46	4,02 ± 0,06
10	90	0,00075	18,49 ± 0,28	4,03 ± 0,06
10	890	0,0006	19,25 ± 0,35	3,79 ± 0,08
10	90	0,0005	19,47 ± 0,43	3,71 ± 0,13
10	90	0,00025	19,68 ± 0,32	3,69 ± 0,03
10	90	0,0002	20,13 ± 0,28	3,58 ± 0,11
10	90	0,0001	20,48 ± 1,37	3,53 ± 0,26
10	90	0,00008	23,34 ± 0,33	2,79 ± 0,36
10	90	0,000075	23,56 ± 0,23	2,50 ± 0,21
10	90	0,00005	23,85 ± 0,21	2,21 ± 0,33
10	90	0,000025	25,44 ± 0,19	2,16 ± 0,36
10	90	0,00002	26,00 ± 0,23	2,25 ± 0,23
10	90	0,00001	31,08 ± 1,05	1,55 ± 0,09

¹Los resultados vienen reflejados como la media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 34. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de uva empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	14,03 ± 1,08	4,75 ± 0,46
10	89,2	0,8	14,09 ± 0,47	4,60 ± 0,21
10	89,25	0,75	14,20 ± 0,92	4,79 ± 0,21
10	89,5	0,5	14,34 ± 0,14	4,67 ± 0,21
10	89,75	0,25	14,66 ± 0,07	4,13 ± 0,23
10	89,9	0,1	15,44 ± 0,39	3,83 ± 0,48
10	90	0,08	16,68 ± 0,45	3,70 ± 0,25
10	90	0,075	16,88 ± 0,14	3,62 ± 0,20
10	90	0,05	17,25 ± 0,17	3,36 ± 0,08
10	90	0,025	17,90 ± 0,33	3,24 ± 0,11

10	90	0,01	18,27 ± 0,66	3,09 ± 0,18
10	90	0,008	18,62 ± 0,45	2,72 ± 0,28
10	90	0,0075	18,74 ± 0,38	2,69 ± 0,24
10	90	0,005	19,06 ± 0,50	2,61 ± 0,23
10	90	0,0025	19,39 ± 0,24	2,36 ± 0,33
10	90	0,001	19,60 ± 0,11	2,25 ± 0,23
10	90	0,0008	21,08 ± 0,06	2,80 ± 0,32
10	90	0,00075	21,17 ± 0,01	2,00 ± 0,05
10	90	0,0005	21,33 ± 0,28	1,26 ± 0,29
10	90	0,00025	22,40 ± 0,60	1,18 ± 0,10
10	90	0,0001	22,98 ± 0,07	1,04 ± 0,06

¹Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 35. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de manzana empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	14,28 ± 0,13	4,48 ± 0,52
10	89,2	0,8	14,80 ± 0,23	4,07 ± 0,57
10	89,25	0,75	16,13 ± 0,35	3,67 ± 0,30
10	89,5	0,5	16,68 ± 0,46	3,60 ± 0,36
10	89,75	0,25	16,70 ± 0,80	3,71 ± 0,58
10	89,9	0,1	16,72 ± 0,08	3,69 ± 0,53
10	90	0,08	16,84 ± 0,11	3,12 ± 0,21
10	90	0,075	17,40 ± 0,67	3,37 ± 0,11
10	90	0,05	17,44 ± 0,17	2,73 ± 0,44
10	90	0,025	17,90 ± 0,15	3,27 ± 0,18

10	90	0,01	17,90 ± 0,35	2,92 ± 0,39
10	90	0,008	17,96 ± 0,31	2,75 ± 0,66
10	90	0,0075	18,21 ± 0,17	2,86 ± 0,40
10	90	0,005	18,99 ± 0,03	2,63 ± 0,26
10	90	0,0025	19,73 ± 0,55	2,62 ± 0,30
10	90	0,001	19,79 ± 0,10	2,26 ± 0,44
10	90	0,0008	20,19 ± 0,41	2,79 ± 0,10
10	90	0,00075	22,00 ± 0,80	1,95 ± 0,52
10	90	0,0005	23,90 ± 0,53	1,73 ± 0,39
10	90	0,00025	34,50 ± 0,50	0,00
10	90	0,0001	36,03 ± 0,06	0,00

¹Los resultados vienen expresados como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 36. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de piña empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	17,17 ± 0,07	3,98 ± 0,20
10	89,2	0,8	17,56 ± 0,78	2,78 ± 0,01
10	89,25	0,75	17,70 ± 1,23	4,13 ± 0,30
10	89,5	0,5	18,06 ± 1,54	4,26 ± 0,24
10	89,75	0,25	18,24 ± 1,92	4,20 ± 0,29
10	89,9	0,1	18,36 ± 0,08	3,36 ± 0,09
10	90	0,08	18,75 ± 0,08	3,77 ± 0,13
10	90	0,075	19,24 ± 0,44	3,03 ± 0,44
10	90	0,05	19,34 ± 2,66	4,04 ± 0,02
10	90	0,025	19,56 ± 1,30	3,65 ± 0,34

10	90	0,01	19,82 ± 0,22	1,48 ± 0,02
10	90	0,008	20,77 ± 0,73	2,03 ± 0,05
10	90	0,0075	21,71 ± 1,78	2,99 ± 0,16
10	90	0,005	22,46 ± 0,40	1,54 ± 0,10
10	90	0,0025	22,58 ± 2,44	1,44 ± 0,18
10	90	0,001	22,71 ± 0,20	2,96 ± 0,05
10	90	0,0008	23,36 ± 1,63	148 ± 0,01
10	90	0,00075	23,85 ± 0,21	2,87 ± 0,12
10	90	0,0005	24,20 ± 1,17	2,36 ± 0,35
10	90	0,00025	31,24 ± 0,75	1,88 ± 0,46
10	90	0,0001	32,08 ± 5,47	1,26 ± 0,24

¹Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 37. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo concentrado de naranja empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	13,89 ± 0,22	5,64 ± 0,46
10	89,2	0,8	14,28 ± 0,51	5,19 ± 0,15
10	89,25	0,75	14,66 ± 0,79	5,13 ± 0,30
10	89,5	0,5	15,63 ± 0,01	4,81 ± 0,11
10	89,75	0,25	15,75 ± 0,04	4,37 ± 0,27
10	89,9	0,1	15,85 ± 0,29	4,63 ± 0,14
10	90	0,08	15,94 ± 0,11	4,56 ± 0,08
10	90	0,075	16,03 ± 0,28	4,40 ± 0,32
10	90	0,05	16,18 ± 0,05	4,89 ± 0,30
10	90	0,025	16,23 ± 0,65	4,31 ± 0,20

10	90	0,01	16,32 ± 0,49	4,80 ± 0,52
10	90	0,008	16,63 ± 0,23	4,35 ± 0,15
10	90	0,0075	16,67 ± 0,38	4,43 ± 0,10
10	90	0,005	19,77 ± 0,29	3,33 ± 0,28
10	90	0,0025	20,23 ± 0,20	3,31 ± 0,39
10	90	0,001	20,53 ± 0,06	3,15 ± 0,26
10	90	0,0008	21,40 ± 0,40	2,79 ± 0,77
10	90	0,00075	23,41 ± 1,36	2,78 ± 0,10
10	90	0,0005	24,35 ± 0,89	2,57 ± 0,26
10	90	0,00025	24,45 ± 0,86	2,45 ± 0,56
10	90	0,0001	35,08 ± 0,16	0,26 ± 0,45

¹Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (n=3).

Tabla 38. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado de melocotón-nectarina empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	12,55 ± 0,27	5,64 ± 0,04
10	89,2	0,8	13,35 ± 0,05	5,49 ± 0,06
10	89,25	0,75	13,52 ± 0,98	5,47 ± 0,19
10	89,5	0,5	15,00 ± 0,53	5,29 ± 0,27
10	89,75	0,25	15,23 ± 0,33	5,12 ± 0,24
10	89,9	0,1	16,28 ± 0,48	4,49 ± 0,19
10	90	0,08	17,02 ± 0,64	4,81 ± 0,23
10	90	0,075	17,70 ± 0,54	4,41 ± 0,13
10	90	0,05	19,30 ± 1,52	4,07 ± 0,29
10	90	0,025	19,47 ± 0,09	4,11 ± 0,15

10	90	0,01	20,29 ± 0,16	3,69 ± 0,24
10	90	0,008	20,49 ± 0,48	4,05 ± 0,29
10	90	0,0075	20,57 ± 0,44	3,72 ± 0,13
10	90	0,005	21,65 ± 0,35	3,51 ± 0,08
10	90	0,0025	22,98 ± 0,62	2,88 ± 0,29
10	90	0,001	23,69 ± 0,31	3,18 ± 0,24
10	90	0,0008	23,95 ± 0,10	2,82 ± 0,30
10	90	0,00075	24,02 ± 0,50	2,75 ± 0,37
10	90	0,0005	24,87 ± 0,09	2,57 ± 0,37
10	90	0,00025	28,54 ± 0,33	1,97 ± 0,09
10	90	0,0001	34,36 ± 0,37	0,93 ± 0,59

¹Los datos se exponen como la media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 39. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en cremogenado de pera empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inóculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	8,93 ± 0,37	6,40 ± 0,20
10	89,2	0,8	8,98 ± 0,25	6,51 ± 0,03
10	89,25	0,75	9,29 ± 0,30	6,28 ± 0,17
10	89,5	0,5	9,68 ± 0,32	5,79 ± 0,52
10	89,75	0,25	11,31 ± 0,85	5,75 ± 0,15
10	89,9	0,1	11,53 ± 0,76	5,22 ± 0,22
10	90	0,08	12,49 ± 0,61	5,31 ± 0,07
10	90	0,075	14,83 ± 0,19	4,53 ± 0,06
10	90	0,05	15,09 ± 0,50	4,38 ± 0,09
10	90	0,025	15,11 ± 0,95	4,51 ± 0,37

10	90	0,001	16,03 ± 0,42	4,93 ± 0,26
10	90	0,008	16,32 ± 0,73	3,96 ± 0,31
10	90	0,0075	16,70 ± 0,59	4,78 ± 0,07
10	90	0,005	16,92 ± 0,05	3,40 ± 0,47
10	90	0,0025	17,33 ± 0,31	3,96 ± 0,31
10	90	0,001	17,68 ± 0,12	3,53 ± 0,27
10	90	0,0008	17,75 ± 2,40	2,94 ± 0,09
10	90	0,00075	18,20 ± 0,19	3,77 ± 0,42
10	90	0,0005	18,94 ± 0,81	3,10 ± 0,23
10	90	0,00025	20,95 ± 0,25	2,75 ± 0,11
10	90	0,0001	21,53 ± 0,60	2,56 ± 0,23

¹Los datos se muestran como la media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 40. Valores de log (ufc/mL) y detección de tiempo en horas para la construcción del método de cuantificación de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumo puro de naranja empleando una cepa de referencia¹.

Vol. muestra (mL)	Vol. caldo BAT (mL)	Vol. inculo (mL)	Impedancia(horas)	log (ufc/mL)
10	89	1	11,53 ± 0,51	6,06 ± 0,23
10	89,2	0,8	12,11 ± 0,25	6,02 ± 0,21
10	89,25	0,75	12,31 ± 0,26	5,89 ± 0,30
10	89,5	0,5	12,44 ± 0,08	6,04 ± 0,31
10	89,75	0,25	13,25 ± 0,55	5,30 ± 0,28
10	89,9	0,1	13,30 ± 0,04	5,07 ± 0,29
10	90	0,08	13,48 ± 0,50	5,25 ± 0,24
10	90	0,075	13,74 ± 0,20	5,09 ± 0,17
10	90	0,05	14,39 ± 0,31	4,92 ± 0,29
10	90	0,025	15,52 ± 0,10	4,50 ± 0,20

10	90	0,01	17,45 ± 0,25	4,12 ± 0,23
10	90	0,008	18,18 ± 0,29	3,99 ± 0,05
10	90	00075	19,46 ± 0,41	3,49 ± 0,13
10	90	0,005	19,90 ± 0,23	3,69 ± 0,09
10	90	0,0025	20,22 ± 0,87	3,54 ± 0,11
10	90	0,001	21,24 ± 0,78	3,06 ± 0,36
10	90	0,0008	21,53 ± 0,43	2,90 ± 0,16
10	90	0,00075	21,62 ± 0,30	2,71 ± 0,22
10	90	0,0005	21,64 ± 0,35	2,58 ± 0,41
10	90	0,00025	23,10 ± 0,50	2,44 ± 0,21
10	90	0,0001	24,19 ± 0,30	2,01 ± 0,09

¹Los datos se indican como la media ± desviación estándar (n=3)

