

Tolerancia a la acidez de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo concentrado de manzana

Acid tolerance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in concentrated apple juice

Soto S (1), Oteiza J (1, 2)*, Blagonich M (1)

¹Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI). Villa Regina. Río Negro. Argentina.
Tel/Fax: (54-2941) 46-2810.

²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET - Fac. Cs. Exactas.
Universidad Nacional de La Plata. Argentina Tel/Fax: (54-221) 424-9287.

* email: jmoteiza@cidca.org.ar

RESUMEN

Argentina es el segundo país en el mundo exportador de jugo concentrado de manzana. Uno de los principales problemas de estos alimentos, a nivel internacional, es la presencia de microorganismos de deterioro, principalmente del género *Alicyclobacillus*, los cuales poseen esporos que pueden tolerar los procesos de pasteurización. *Alicyclobacillus acidoterrestris* es la especie que mayor impacto presenta en la industria debido a la capacidad de producir compuestos que conllevan al deterioro del producto, modificando las propiedades de off-flavor y off-odour (como el 2-metoxifenol o guayacol). El objetivo de trabajo fue analizar la tolerancia a la acidez, de esporos de *A. acidoterrestris* inoculados en jugos concentrados de manzana. Se realizaron ensayos de inoculación sobre jugo concentrado de manzana (70° Brix, pH 3.53 y 19.64 g/kg de acidez), empleando dos cepas de *A. acidoterrestris*: una aislada de jugo de manzana, perteneciente a la colección GMCC (DMS 2498) y otra aislada y caracterizada, por el grupo de trabajo, a partir de muestras de agua de proceso industrial (SSMB 1). Se prepararon seis fracciones de jugos de manzana con valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 (obtenidos por la adición de ácido málico o NaOH), los cuales fueron inoculados individualmente con una suspensión de esporos de *A. acidoterrestris* (cepa DSM 2948 o SSMB 1) de manera de obtener recuentos iniciales de 50 esporos/10 g. Las muestras inoculadas se almacenaron a 5°C (temperatura utilizada durante el transporte y almacenamiento de jugos) y a 45°C (temperatura óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus* spp.) realizando periódicamente el recuento de esporos en función del tiempo de almacenamiento (80 días) empleando agar K y agar BAT según lo descrito por la Internacional Federation of Fruit Juice Producers. El almacenamiento refrigerado conjuntamente con la acidez del jugo no afectaría la viabilidad de *A. acidoterrestris*, ya que a 5°C, no se observó una variación en el número de esporos en función del pH y de las condiciones de almacenamiento. Asimismo, no se observaron diferencias en el empleo de agar K y agar BAT como medio de recuperación de *A. acidoterrestris*. Para el caso de las muestras almacenadas a 45°C, en las fracciones de jugo de manzana de alta acidez, (pH <3) no se observó desarrollo microbiano a partir del día 5 en comparación con el resto de las fracciones (pH >3), lo que indicaría una acción de tipo letal o sub-letal, del pH conjuntamente con la temperatura de almacenamiento. En todos los casos, no se observó diferencia en el comportamiento frente a las condiciones de acidez de los jugos de manzana para las cepas de *A. acidoterrestris* ensayadas. De estos resultados se desprende la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

ABSTRACT

Argentina is the second country in the world that export concentrated apple juice. One of the principal problems of this food, worldwide, is the presence of endospore forming spoilage microorganisms, principally of the genus *Alicyclobacillus*. The spores are highly resistant to heat and can survive during the usual pasteurization regimes used in the juice industry. *Alicyclobacillus acidoterrestris* is the species with the major impact in the food industry due to the ability to produce an undesirable off-flavor and off-odour, associated with the production of 2-metoxifenol or guaiacol. The aim of this work was to analyze the acid tolerance of *Alicyclobacillus* spores inoculated in concentrated apple juice. The tests of inoculation were realized on concentrated apple juice (70° Brix,

pH 3,53 and 19,64 g/Kg of acidity) , using two strains of *A. acidoterrestris*: DSM 2498, isolated from concentrated apple juice, and SSMB1, isolated by CIATI from water of industrial process.

Six fractions of concentrated apple juice with pH values between 3,70 and 1,55 were prepared, and then inoculated with individually suspension of *A. acidoterrestris* spores (strain DSM 2498 or SSMB1), in order to achieve a concentration of 50 spores/10g. Inoculated samples were stored at 5°C (temperature normally used in the transport and storage of fruit juices) and 45°C (optimal growth temperature of *Alicyclobacillus* spp) realizing spores counts on function of the storage time (80 days) using both K agar and BAT agar according to International Federation of Fruit Juice Producers.

The storage at low temperature together with acidity, will not affected the *A. acidoterrestris* viability, since at 5°C, was not observed a variation in the spores concentration on pH function and the storage conditions. In the same way, were not observed differences both K and BAT agar as culture media for *A. acidoterrestris*. In the case of samples that were stored at 45°C, in the fractions of apple juice of high acidity, (pH < 3) was not observed growth since 5 day compared with the other fractions (pH > 3), which could be indicate a letal or sub- letal effect, of pH together with the storage temperature.

In all cases, there was no difference in the acid tolerance between the two tested strains.

The results show the importance of the control of *A. acidoterrestris* in concentrated apple juice storage at refrigeration temperature.

PALABRAS CLAVE: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, jugo concentrado de manzana, acidez.

KEYWORDS: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, concentrated apple juice, acidity.

INTRODUCCIÓN

Argentina es el segundo país en el mundo exportador de jugo concentrado de manzana y pera. Aproximadamente exporta entre 90.000 y 100.000 toneladas/año de estos jugos. El 95% de su producción tiene como principal comprador a los EE.UU., abasteciendo algo más del 30% de dicho mercado.

Uno de los principales problemas de estos alimentos, a nivel internacional, es la presencia de microorganismos de deterioro. Es sabido que, debido al bajo pH, la microflora potencialmente presente se restringe a mohos, levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias acidófilas principalmente del género *Alicyclobacillus*.

El género *Alicyclobacillus* pertenece a un grupo de bacterias acidófilas, termófilas y esporoformadoras que pueden aislarse de frutas, vegetales, jugos simples y concentrados, purés, jarabes, té, bebidas isotónicas deportivas y otros alimentos de bajo pH (Murray y col., 2007) así como de muestras de suelo y agua (Parish y col., 2005). Son de morfología bacilar, Gram positivos o variable, aerobios estrictos, y requieren elevadas temperaturas (entre 40 a 70°C) y condiciones de bajo pH (entre 2.0 a 6.0) para su desarrollo (IFU, 2004). Dichos microorganismos poseen esporos que pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización utilizados en la industria (Eguchi y col., 1999), los cuales en algunos casos llegan a sobrevivir a temperaturas de 120°C por 15 segundos.

En el año 1984, en Alemania, se produjo el primer informe relacionado con el deterioro de néctar de manzana pasteurizado relacionado con *A. acidoterrestris* (Cerny y col, 1984). Posteriormente, varios autores informaron aislamientos de *A. acidoterrestris* a partir de jugos ácidos de fruta deteriorados por guayacol en países como EE.UU., Japón, Inglaterra y Turquía entre otros (Splittstoesser y col., 1994; Yamazaki y col., 1996; Walker y col., 2008; Savas y col., 2005).

El género *Alicyclobacillus* no ha sido aún vinculado con episodios de enfermedad o riesgo para la salud, es decir que solo es considerado como un microorganismo que causa alteración en los jugos de fruta y con esto grandes pérdidas económicas. Las características del deterioro descritas en la literatura son: presencia de off-flavor y off-odour (descrito como olor medicinal), producidas principalmente por la presencia de 2-6 dibromofenol (en ppb), 2-metoxifenol (en ppt, conocido como guayacol) (Gocmen y col., 2005). De todas las especies del género, *A. acidoterrestris* es la que mayor impacto tiene en la industria productora de jugos de distinto tipo. Trabajos realizados por Walls (1998) demostraron que la presencia de 1 a 10 esporos por ml de jugo, es suficiente para causar su deterioro.

La exigencia mundial con respecto a la presencia de *Alicyclobacillus* en los jugos concentrados es variable, sin embargo aproximadamente el 62% de los importadores exige la ausencia de dicho microorganismo en el lote de jugo adquirido. La detección de *Alicyclobacillus* en un lote de jugo de

fruta recibido en el país de origen repercute en una pérdida económica, sumado a la desconfianza que esto genera por parte de los compradores hacia los proveedores, de ahí la importancia de su control. El objetivo del presente trabajo fue analizar la tolerancia a la acidez, de esporos de *A. acidoterrestris* inoculados en jugos concentrados de manzana, determinando, si existiese, un valor crítico de pH en el cual el crecimiento de dicho microorganismo sea inhibido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del jugo

Se utilizaron 2.5 kg de jugo concentrado de manzana, cedido por la empresa JUGOS S.A. (Villa Regina, Río Negro), el cual presentaba las siguientes características físico-químicas: pH 3.53 (el cual se determinó empleando un pHmetro digital con electrodo de vidrio), acidez titulable: 19.64 g de ácido málico/kg de jugo (determinada mediante el método potenciométrico) y contenido de sólidos solubles: 70°Brix (determinado mediante el empleo de un refractómetro tipo Abbe, Bellingham).

Obtención de las fracciones de jugo

Para llevar a cabo los ensayos de inoculación y almacenamiento, se prepararon seis fracciones de 400 g jugo concentrado cada una. Los mismos fueron ajustados, mediante el agregado de ácido málico o NaOH, de manera de obtener los valores de pH final que se observan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Valores de pH de las 6 fracciones de jugo concentrado de manzana utilizadas en los ensayos de inoculación con esporos de *A. acidoterrestris*.

Jugo concentrado de manzana	Fracciones					
	1	2	3	4	5	6
pH final	3.70	3.53	3.02	2.53	2.09	1.55

Posteriormente, cada una de las fracciones preparadas, fueron inoculados individualmente con una suspensión de esporos de *A. acidoterrestris* preparada como se menciona a continuación.

Preparación de la suspensión de esporos de *A. acidoterrestris*

Se emplearon 2 cepas de *A. acidoterrestris* de diferente origen: una de ellas, la DMS 2498, perteneciente a la German Collection of Microorganisms and cell (origen jugo de fruta) y la otra, SSMB1, perteneciente a la colección CIATI (origen: agua de proceso industrial).

Los cultivos fueron mantenidos en agar *Bacillus acidoterrestris thermophilic* (BAT, Merck KGaA) a 4°C hasta el momento de su uso. Cada inóculo inicial (N_0) se preparó transfiriendo una ansada del cultivo a un tubo conteniendo 10 ml de buffer fosfato de manera de obtener un inóculo denso. El mismo fue homogeneizado en vortex para lograr una correcta distribución. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 80 °C durante 10 minutos, enfriando en baño de hielo, con el objetivo de eliminar las células en fase vegetativa procediendo a la activación de los esporos. Asimismo, se realizó una dilución 1:1000 empleando agua destilada estéril como diluyente, colocando, en condiciones de esterilidad, una alícuota de la misma en una bolsa de stomacher estéril, conteniendo 400g de jugo concentrado de manzana de diferente pH (Fracciones 1 a 6) de manera de alcanzar valores de N_0 de entre 40-50 esporos/10 g de jugo concentrado. La mezcla fue homogeneizada por 3 min. en stomacher (Model 400, Seward Medical, London, UK) logrando así una correcta distribución del inóculo en la matriz densa. En cada una de las fracciones de jugo inoculadas (Fracciones 1 a 6), se procedió al recuento inicial (N_0) de esporos, empleando: agar K (Biotrace) y agar BAT como medios de cultivo de manera de corroborar los valores reales de N_0 , así como determinar la eficiencia de recuperación de ambos medios de cultivo.

Almacenamiento de los jugos inoculados

Las diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana, previamente inoculadas, se almacenaron durante 80 días a dos temperaturas: 5°C (de refrigeración, simulando las condiciones utilizadas durante el transporte y almacenamiento de los jugos de fruta) y 45°C (de abuso térmico, la cual coincide con la T°C óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus*). Periódicamente, se realizaron recuentos de esporos (por el método de filtración por membrana, analizando 10 g de muestra en cada caso) en función del tiempo de almacenamiento, empleando dos medios de cultivo: agar K y agar BAT (45°C, 5 días); siguiendo el

protocolo descrito por la Internacional Federation of Fruit Juice Producers (IFU, 2004). Los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las diferentes fracciones de jugo de manzana inoculadas, los recuentos iniciales (N_0) de *A. acidoterrestis*, variaron entre 47 y 52 esporos/10 g de jugo. No se observaron diferencias entre dichos valores para los 2 medios de cultivo utilizados (agar BAT y agar K), así como para las 2 cepas analizadas (DMS 2498 y SSMB1).

Supervivencia de esporos de *A. acidoterrestis* en jugo concentrado de manzana almacenado a 5°C

La **Figura 1** muestra el recuento de esporos ($\text{Log } N/N_0$) de *A. acidoterrestis*, DMS 2498, inoculado en cada una de las 6 fracciones de jugo de manzana conteniendo valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 y almacenadas a 5°C durante 80 días.

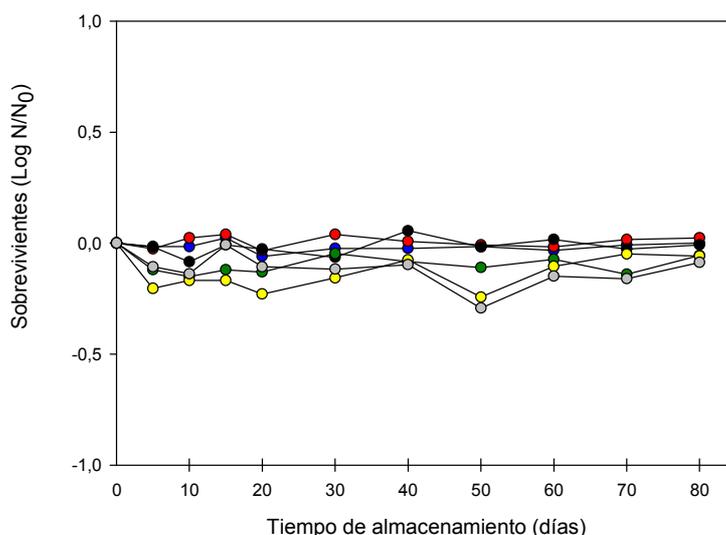


Figura 1. Recuento de esporos de *A. acidoterrestis* (DMS 2498) inoculado en diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana (1 a 6), almacenadas a 5°C durante 80 días. Medio de cultivo empleado para el recuento de sobrevivientes: agar *Bacillus acidoterrestis thermophilic* (BAT, 45°C durante 5 días). Se informan los valores medios de los recuentos. Símbolos: ● Fracción 1 (pH= 3.70); ● Fracción 2 (pH= 3.53); ● Fracción 3 (pH= 3.02); ● Fracción 4 (pH= 2.53); ● Fracción 5 (pH= 2.09); ● Fracción 6 (pH= 1.55).

En todas las condiciones experimentales analizadas, no se observaron variaciones en el número de esporos inoculados en jugo de manzana en función del tiempo de almacenamiento, manteniéndose los valores similares al N_0 . Asimismo, no se observaron diferencias en los recuentos de sobrevivientes mediante el empleo ya sea de agar K como de agar BAT como medios de recuperación de *A. acidoterrestis*.

Resultados similares fueron obtenidos para el caso de la cepa SSMB1 (datos no mostrados).

De ello se desprende, que el almacenamiento refrigerado conjuntamente con la acidez del jugo no afectarían la viabilidad de *A. acidoterrestis*.

Supervivencia de esporos de *A. acidoterrestis* en jugo concentrado de manzana almacenado a 45°C

La **Figura 2** muestra el recuento de esporos ($\text{Log } N/N_0$) de *A. acidoterrestis*, SSMB1, inoculados en cada una de las 6 fracciones de jugo de manzana conteniendo valores de pH comprendidos entre 3.70 y 1.55 y almacenadas a 45°C (considerada de abuso térmico, la cual coincide con la T°C óptima de desarrollo de *Alicyclobacillus*).

En este caso, los resultados obtenidos mostraron que en las fracciones de mayor acidez, 4, 5 y 6 (pH 2.53, 2.09 y 1.55 respectivamente) no se observó desarrollo microbiano (valores de recuento iguales a <1 esporos/10g) a partir del quinto día de almacenamiento a 45°C. Este efecto observado del pH conjuntamente con la temperatura, podría ser tanto de tipo letal como subletal (injuria).

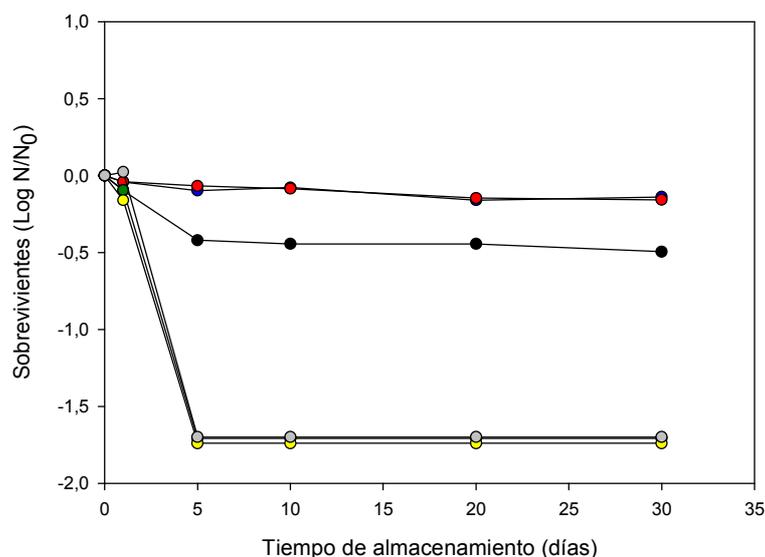


Figura 2. Recuento de esporos de *A. acidoterrestis* (SSMB1) inoculado en diferentes fracciones de jugo concentrado de manzana (1 a 6), almacenadas a 45°C. Medio de cultivo empleado para el recuento de sobrevivientes: agar *Bacillus acidoterrestis thermophilic* (BAT, 45°C durante 5 días). Se informan los valores medios de los recuentos. Símbolos: ● Fracción 1 (pH= 3.70); ● Fracción 2 (pH= 3.53); ● Fracción 3 (pH= 3.02); ● Fracción 4 (pH= 2.53); ● Fracción 5 (pH= 2.09); ● Fracción 6 (pH= 1.55).

Asimismo, en la fracción 3 (pH 3.02) se observó una disminución en el recuento de esporos a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, en comparación con las Fracciones 1 y 2 (pH 3.70 y 3.53 respectivamente) en las cuales la viabilidad de los esporos no se vio drásticamente afectada.

Comparando los resultados con los obtenidos en el almacenamiento refrigerado (**Figura 1**), se observó que a bajas temperaturas el efecto del pH sobre la viabilidad de los esporos de *Alicyclobacillus* es menor, comparado con los jugos que fueron almacenados a 45°C, en el cual dicho efecto se manifiesta a partir de jugos de manzana con valores de pH <3.02.

Por otra parte, resultados similares fueron obtenidos para el caso de la cepa DMS 2498 (datos no mostrados).

Actualmente, no existen datos bibliográficos acerca de la supervivencia de esporos de *Alicyclobacillus* en jugo concentrado de manzana. Por otra parte, son pocos los datos que existen relacionados con el efecto del pH sobre los esporos de *Alicyclobacillus* en jugos de fruta.

En Argentina, Maldonado y col (2006), analizaron el efecto del pH sobre los parámetros de resistencia térmica de esporos de *Alicyclobacillus* inoculados en jugo concentrado de limón. Dichos autores observaron que a medida que aumentaba el pH en los jugos, la resistencia térmica se veía disminuida.

Con el objetivo de profundizar acerca de si la acción observada del pH de los jugos concentrados de manzana, almacenados a 45°C, es de tipo letal o subletal, se realizaron ensayos de detección de esporos de *Alicyclobacillus* por el método de enriquecimiento (según lo descrito por la IFU), en las fracciones en las que no se observó desarrollo microbiano (Fracciones 4, 5 y 6) en función del tiempo de almacenamiento.

Para ello, se tomaron en cada caso 10 g de muestra pertenecientes a las diferentes fracciones de jugo, y se colocaron en frascos de vidrio conteniendo 90 ml de caldo BAT. Se incubó la muestra durante 5 días a 45°C permitiendo de este modo la recuperación de las posibles células dañadas por el efecto conjunto del ácido y la T°C de almacenamiento (45°C). Posteriormente se sembró una anzada del caldo enriquecido en placas conteniendo agar BAT. Las mismas fueron incubadas durante 3 días a 45°C procediendo a la lectura e interpretación de los resultados.

En todos los casos analizados, para ambas cepas, se observó la ausencia de desarrollo bacteriano en las fracciones analizadas. Dichos resultados demostrarían que el efecto observado anteriormente por parte del pH ácido, resultaría ser de tipo letal, con lo cual la exposición a la acidez conjuntamente con el calor, provocarían la muerte celular.

Es sabido que diversos microorganismos tales como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 pre-adaptadas a condiciones ácidas (cepas que tuvieron un contacto previo con un medio ácido), inoculadas en

diferentes matrices (medios de cultivo, sidra de manzana y jugos de fruta entre otros) presentan una mayor resistencia a otros factores de estrés (como el calor o el estrés osmótico), así como una mayor supervivencia en medios ácidos (jugos de fruta por ejemplo). Por otra parte, no existe bibliografía acerca de la adaptación a dicho estrés en *Alicyclobacillus*.

En el presente trabajo no se observaron diferencias en el comportamiento frente a la acidez (supervivencia) de ambas cepas empleadas, una aislada de jugo de fruta (ácido-adaptada) y otra aislada de agua de proceso industrial (no ácido-adaptada). Esto podría indicar que la tolerancia a las condiciones ácidas podría ser una característica propia del género *Alicyclobacillus* (o al menos de la especie *acidoterrestris*).

De estos resultados se desprende la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

CONCLUSIONES

1) Se determinó que tanto el agar BAT como el agar K, serían medios de cultivo apropiados para la recuperación de esporos de *A. acidoterrestris* a partir de jugos concentrados de manzana.

2) Se comprobó la tolerancia de *A. acidoterrestris* frente a la acidez de jugos concentrados de manzana. Asimismo, la acidez de los jugos de manzana, conjuntamente con el almacenamiento refrigerado (5°C) no afectaría la viabilidad de los esporos, ya que los mismos se mantuvieron sin cambios en el número por un período de al menos 80 días. Sin embargo, en jugos de manzana con valores de pH <3 almacenados a 45°C, los esporos de *A. acidoterrestris* poseen una viabilidad menor a los 5 días.

3) No se observaron diferencias en el comportamiento frente a las condiciones de acidez de los jugos de manzana de las cepas de *A. acidoterrestris* ensayadas, provenientes de diferente origen. Esto indicaría que la tolerancia a las condiciones ácidas podría ser una característica propia de la especie *acidoterrestris*.

4) Se determinó la importancia del control de *A. acidoterrestris* en jugos concentrados de manzana almacenados a temperaturas de refrigeración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución a este trabajo brindada por El Centro de Investigación y asistencia Técnica a la Industria (CIATI), así como al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cerny G, Hennlich W, Poralla K. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 179, 224–227.

Eguchi SY, Manfio GP, Pinhatti ME, Azuma E, Variante SF. 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. *Associação Brasileira dos exportadores de cítricos. ABECITRUS*. Campinas. Brasil. Report of the research project, Vol 3, 1-52.

Gocmen D, Elston A, Williams T, Parish M, Rouseff RL. 2005. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 173–177.

International Federation of Fruit Juice Producers (IFU), 2004. First standard IFU method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. IFU Method, No. 12. Revised march 2007.

Maldonado M, Belfiore C, Navarro A. 2008. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 35, 141-144.

- Murray MB, Gurtler JB, Ryu JH, Harrison MA, Beuchat LR. 2007. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 59-69.
- Parish ME, Goodrich RM. 2005. Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. *Journal of Food Protection*, 68, 2196–2200.
- Savas B, Gokmen K, Acar J. 2005. Occurrence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on apples and in apple juice concentrates and effects of process technology on *A. acidoterrestris* spores in apple juice. *Fruit Processing*, 15, 328-331.
- Splittstoesser D, Charley J, Lee C. 1994. Some factors affecting growth of aciduric sporeforming bacilli in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 57, 1080–1083.
- Walker ME, Phillips CA. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: a threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 250-260.
- Walls I, Cheater R. 1998. *Alicyclobacillus* — historical perspective and preliminary characterizations study. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 18, 499–503.
- Yamazaki K, Teduka H, Shinano, H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 543–545.