



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Lía Martínez Ruiz

TUTOR/A ACADEMICO: Ana Fuentes López
COTUTOR/A: José Manuel Barat Baviera
DIRECTOR EXPERIMENTAL: David Tomás Fornés

Curso Académico: 2020/2021

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2021

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES FRENTE A *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

Lía Martínez Ruiz, Ana Fuentes López¹, José Manuel Barat Baviera¹, David Tomás Fornés

RESUMEN

El género *Alicyclobacillus* representa un grupo de bacterias termófilas, acidófilas y formadoras de esporas. Estas características lo convierten en un importante agente de deterioro en zumos comerciales pasteurizados y concentrados de frutas, produciendo sabores y aromas anómalos que afectan a su calidad, ya que las técnicas de pasteurización no consiguen la inactivación de sus endosporas, por lo que es interesante para la industria buscar alternativas a los tratamientos térmicos convencionales que inhiban el crecimiento y/o la germinación de estas. Dentro del género *Alicyclobacillus*, destaca la especie *A. acidoterrestris*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos de aceites esenciales (timol, carvacrol, eugenol y vainillina) frente a *A. acidoterrestris*, como agente alterante de zumos y bebidas azucaradas. Para ello se ha evaluado la actividad antimicrobiana de estos compuestos en medio de cultivo. El timol fue el compuesto que mayor efectividad presentó frente a *A. acidoterrestris*. La capacidad de este compuesto para inhibir el crecimiento, esporulación y germinación de las esporas del microorganismo se estudió en muestras reales de zumo de manzana y una bebida de té frío. La aplicación de timol permitió evitar la germinación y la esporulación, así como prevenir la producción de guayacol en el producto final. Los resultados obtenidos indican que el empleo de timol podría ser una alternativa al uso de tratamientos térmicos y aditivos químicos, para mantener la calidad microbiológica del producto.

PALABRAS CLAVE: actividad antimicrobiana, aceite esencial, compuesto bioactivo, esporas, zumos, derivados de fruta

RESUM

El gènere *Alicyclobacillus* representa un grup de bacteries termòfiles, acidòfiles i formadores d'espores. Aquestes característiques les converteixen en un important agent de deteriorament en sucs comercials pasteuritzats i concentrats de fruites, produïnt sabors i aromes anòmals que afecten la seua qualitat, ja que les tècniques de pasteurització no aconseguen la inactivació de les seues endòspores, pel que és interessant per a la indústria buscar

¹Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

alternatives als tractaments tèrmics convencionals que inhibisquen el creixement i / o la germinació d'aquestes. Dins el gènere *Alicyclobacillus*, destaca l'espècie *A. acidoterrestris*. L'objectiu d'aquest estudi va ser avaluar l'activitat antimicrobiana de diferents compostos d'olis essencials (timol, carvacrol, eugenol i vainillina) davant de *A. acidoterrestris*, com a agent alterant de sucs i begudes ensucrades. Per a això s'ha avaluat l'activitat antimicrobiana d'aquests compostos en medi de cultiu. El timol va ser el compost que major efectivitat va presentar davant de *A. acidoterrestris*. La capacitat d'aquest compost per inhibir el creixement, esporulació i germinació de les espores del microorganisme es va estudiar en mostres reals de suc de poma i una beguda de te fred. L'aplicació de timol va permetre evitar la germinació i l'esporulació, així com previndre la producció de guaiacol en el producte final. Els resultats obtinguts indiquen que l'ocupació de timol podria ser una alternativa a l'ús de tractaments tèrmics i additius químics, per mantindre la qualitat microbiològica del producte.

PARAULES CLAU: activitat antimicrobiana, oli essencial, compost bioactiu, espores, sucs, derivats de fruita

ABSTRACT

The genus *Alicyclobacillus* is a group of thermophilic, acidophilic, and spore-forming bacteria. These characteristics make it an important spoilage agent in commercial pasteurized juices and fruit concentrates. *Alicyclobacillus* can produce anomalous flavors and aromas that affect their quality. Pasteurization techniques do not inactivate their endospores. Industry is looking for alternatives to conventional heat treatments to inhibit their growth and / or germination. Within the genus *Alicyclobacillus*, the species *A. acidoterrestris* stands out. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different essential oil compounds (thymol, carvacrol, eugenol and vanillin) against *A. acidoterrestris*, as an altering agent in juices and sugary drinks. For this, the antimicrobial activity of these compounds in culture medium has been evaluated. Thymol was the most effective compound against *A. acidoterrestris*. The ability of this compound to inhibit the growth, sporulation, and germination of the spores of this microorganism was studied in real samples of apple juice and a cold tea drink. The application of thymol allowed avoiding germination and sporulation, as well as preventing the production of guaiacol in the final product. The results obtained indicate that the use of thymol could be an alternative to replace the use of heat treatments and chemical additives and to maintain the microbiological quality of the product.

KEY WORDS: antimicrobial activity, essential oil, bioactive compound, spores, juices, fruit derivatives

1. INTRODUCCIÓN

El sector de zumos y néctares es uno de los sectores estratégicos dentro de la industria alimentaria española. Para garantizar la seguridad y prolongar el tiempo de vida útil de los zumos comerciales se emplean tratamientos térmicos que consiguen inactivar enzimas e inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos y los responsables del deterioro (Aneja *et al.*, 2014). Entre los microorganismos que tienen una mayor relevancia en la industria de zumos destacan las especies del género *Alicyclobacillus*, las cuales se han asociado con diferentes episodios e incidencias que han originado considerables pérdidas económicas (Pettipher *et al.*, 1997; Jensen y Whitfield, 2003; Gouws *et al.*, 2005; Walker y Phillips, 2005).

El género *Alicyclobacillus*, cuyo nombre se debe a la presencia de ácidos grasos alicíclicos en la membrana celular, como son el ω -ciclohexano y el ω -cicloheptano, son un grupo de bacterias gram positivas, aerobias, termófilas, acidófilas y formadoras de esporas. Las bacterias pertenecientes a este género son capaces de crecer entre 20 y 70 °C y en un intervalo de pH entre 2,5 y 5,8. Su alta resistencia y tolerancia al pH y a la temperatura se atribuye a la presencia de ácidos grasos alicíclicos empaquetados que se combinan con los hopanoides de la membrana, formando una cubierta que protege a la bacteria e influyendo así en su permeabilidad y densidad (Van Luong *et al.*, 2021; Pornpukdeewattana *et al.*, 2020). Las esporas soportan las temperaturas de pasteurización y germinan y crecen tras ella si las condiciones son favorables (Sokołowska *et al.*, 2020).

Entre las diferentes especies de *Alicyclobacillus*, destaca especialmente *Alicyclobacillus acidoterrestris* (da Silva *et al.*, 2020; Sokołowska *et al.*, 2020). *A. acidoterrestris* se ha aislado de diferentes zumos y concentrados, incluyendo manzana, naranja, pera, cereza, pomelo, mango, tomate, uva blanca, aloe vera, piña, limón, maracuyá, crema de coco, arándano, granada, fresa, grosella negra, frambuesa, sandía, tomate, plátano y kiwi; además de encontrarse también en bebidas como el té frío o el vino (Sokołowska *et al.*, 2020; Pornpukdeewattana *et al.*, 2020). *A. acidoterrestris* puede estar presente en una amplia variedad de materiales utilizados para empaquetar y transportar la fruta, que además se puede contaminar si es recogida del suelo, almacenada en contacto con este, en contacto con fruta dañada o en presencia de polvo. La frecuencia con la que se cambia el agua de lavado, que a su vez puede contener *Alycyclobacillus*, también influye en la reducción o eliminación de la contaminación de la fruta (EFJA, 2008). La presencia de *A. acidoterrestris* en los zumos de frutas provoca sabores desagradables y turbidez, debido a la producción de guayacol, 2,6-dibromofenol y 2,6 biclorofenol (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020). En los tratamientos de pasteurización de los zumos, que consisten en un tratamiento a 95°C durante 2 min, se consigue la destrucción de bacterias acidófilas, levaduras y algunos tipos de mohos. Sin embargo, estas condiciones de procesado no consiguen la inactivación de las esporas de *Alicyclobacillus*, las cuales pueden germinar y crecer provocando el deterioro del producto (da Silva *et al.*, 2020). El uso de tratamientos térmicos que impliquen el uso de temperaturas superiores para garantizar la inactivación de las esporas no resulta viable en este tipo de

producto ya que provocan degradación del sabor, color y olor en los zumos, además de pérdida de nutrientes (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2002).

Con el objetivo de evitar los problemas asociados a la presencia de *A. acidoterrestris* en zumos, se han empleado tratamientos no térmicos como son las altas presiones hidrostáticas (HHP), la homogeneización a altas presiones (UHPH), la irradiación, las sondas ultrasónicas y de microondas, o el calentamiento óhmico y tratamientos químicos como el ozono o la aplicación de conservantes de síntesis, como el sorbato de potasio o benzoato de sodio. Sin embargo, la demanda por parte de los consumidores de alimentos frescos o mínimamente procesados y libres de aditivos ha llevado a la industria alimentaria a buscar nuevas alternativas naturales que garanticen la calidad de estos productos (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Los antimicrobianos naturales se están convirtiendo en una alternativa viable a los tratamientos de conservación convencionales y al uso de aditivos químicos, para disminuir los riesgos para la salud y las pérdidas económicas ocasionadas por la contaminación de los alimentos por microorganismos (Pisoschi *et al.*, 2018). Se trata de compuestos bioactivos con actividad inhibitoria frente a diversos microorganismos y que se pueden obtener de diversas fuentes de la naturaleza. Estos antimicrobianos naturales pueden ser de origen vegetal, como son los aceites esenciales y otros compuestos bioactivos extraídos de plantas; de origen animal, entre los que podemos encontrar ciertas enzimas, polímeros y ácidos grasos libres; y de origen microbiano, como las bacteriocinas, que son péptidos de origen bacteriano que presentan actividad antimicrobiana frente a otras cepas microbianas (Weiss *et al.*, 2009). Entre los antimicrobianos naturales de origen vegetal destacan los aceites esenciales y sus principales compuestos bioactivos (Hyldgaard *et al.*, 2012). Los aceites esenciales presentan demostrada actividad antimicrobiana y antioxidante (Chouhan *et al.*, 2017), entre los que se encuentran los aceites esenciales de tomillo, clavo y orégano, mientras que entre sus compuestos bioactivos de mayor interés destacan el timol, el eugenol y el carvacrol respectivamente (Burt, 2004).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos de aceites esenciales (timol, carvacrol, eugenol y vainillina) frente a *A. acidoterrestris*, como agente alterante de zumos y bebidas azucaradas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

A. Acidoterrestris (CECT-7094T) fue obtenido de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). La cepa fue suministrada liofilizada y se recuperó según las instrucciones dadas por la CECT. Para el crecimiento de la bacteria se utilizó BAT agar y BAT caldo (Merck, Alemania). Los componentes de aceites esenciales empleados como compuestos antimicrobianos fueron timol, eugenol, carvacrol y vainillina, y fueron

suministrados por Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, USA), al igual que los discos estériles (6 mm) y el dimetilsulfóxido (DMSO). Para la determinación cromatográfica de guayacol se empleó el ácido vanílico ($\geq 97,0\%$) y el guayacol, suministrados por Sigma-Aldrich Ltd, y el ácido fórmico y el acetonitrilo, utilizados para la preparación de las fases móviles, que fueron suministrados por Scharlab (España). Como materia prima para la preparación de los ensayos in vivo se utilizó zumo de manzana y té frío comercial (Carrefour).

2.2 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a *A. acidoterrestris*.

2.2.1 Método del antibiograma disco-placa

En primer lugar, se realizó una evaluación de la susceptibilidad del microorganismo a los compuestos bioactivos seleccionados (timol, eugenol, carvacrol y vainillina) mediante el ensayo disco-placa, que consiste en enfrentar a la bacteria a la sustancia a evaluar impregnada en discos estériles, provocando que esta difunda radialmente y forme una zona de inhibición tras 24 h de incubación.

Para la realización del ensayo se preparó un inóculo equivalente a la escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL). A continuación, se realizó la siembra en placa utilizando un hisopo y se colocaron los discos estériles con 10 μ L de cada compuesto. Se emplearon discos control con 10 μ L de vancomicina como control negativo (C-) y con 10 μ L de DMSO como control positivo (C+). Las placas se dejaron incubar a 47 °C durante 24 h. Tras el periodo de incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición empleando un pie de rey.

2.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los diferentes compuestos bioactivos

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de cada compuesto bioactivo frente a *A. acidoterrestris* se realizó el ensayo de macrodilución, ya que el antibiograma disco-placa no permite una lectura directa del valor de la CMI. Ambos ensayos están descritos en los métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos de los Procedimientos en Microbiología Clínica (García *et al.*, 2000).

En este ensayo, la preparación del inóculo de *A. Acidoterrestris* se realizó mediante el método de suspensión directa de colonias, para lo cual se tomó una colonia de la placa del cultivo fresco y se transfirió a un tubo de 9 mL de caldo BAT, que se incubó a 47 °C durante 24 h.

Se utilizó una batería de tubos de microcentrífuga de 2 mL en los que se añadió 1 mL de caldo BAT estéril, y para conseguir las concentraciones de compuesto deseadas, al primer tubo se le añadió 1 mL de la disolución madre del antimicrobiano, que corresponde con la concentración más alta a estudiar. Tras mezclar adecuadamente, se pasó 1 mL al siguiente tubo, obteniéndose

así la mitad de la concentración, y se repitió tantas veces como concentraciones se quisieron estudiar. Las concentraciones de los compuestos de aceites esenciales evaluadas se muestran en la TABLA 1. Una vez realizadas las diluciones, todos los tubos se inocularon con 20 µL del inóculo (10⁸ UFC/mL), para conseguir una concentración en el tubo de 10⁶ UFC/mL. Los tubos se incubaron a 47°C durante 24 h, y tras la incubación se realizó la siembra en placa siguiendo el método de detección y enumeración de bacterias termoacidófilas formadoras de esporas causantes de deterioro (*Alicyclobacillus* spp.) de la Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas (IFU, 2019). Las placas fueron incubadas a 47°C durante 24 h. Tras el periodo de incubación se realizó el recuento directo de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, y los valores se transformaron logarítmicamente y fueron expresados como log UFC/mL.

TABLA 1. Concentraciones de timol, carvacrol, eugenol y vainillina evaluadas frente a *A. acidoterrestris*.

Compuesto	Ensayo	Concentraciones evaluadas (ppm)
Timol	I	25, 50, 100, 200, 400
	II	250, 375, 500, 750, 1000, 500, 2000, 3000, 4000
	III	500, 550, 600, 650, 700, 750, 800
Eugenol	I	25, 50, 100, 200, 400
	II	250, 375, 500, 750, 1000, 500, 2000, 3000, 4000
	II	3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000
Carvacrol	I	25, 50, 100, 200, 400
	II	250, 375, 500, 750, 1000, 500, 2000, 3000, 4000
	III	3000, 4000, 5000, 6000, 7000
Vainillina	I	25, 50, 100, 200, 400
	II	250, 375, 500, 750, 1000, 500, 2000, 3000, 4000
	III	3000, 4000, 5000, 6000, 7000

Los valores de CMI y CMB se calcularon considerando el valor de la CMI como la concentración más baja de un agente antimicrobiano capaz de prevenir el crecimiento bacteriano visible y el valor CMB como el punto en el que sobrevive menos del 0,1% de la carga microbiana inicial (Cai *et al.*, 2019a).

2.3 Ensayo *in vivo* para evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a *A. acidoterrestris* en las diferentes matrices alimentarias

2.3.1 Caracterización fisicoquímica de las muestras

En el estudio *in vivo* para evaluar la efectividad de los antimicrobianos naturales para evitar el deterioro ocasionado por *A. acidoterrestris* se ha empleado zumo de manzana y una bebida de té frío. En la caracterización de las muestras se determinaron los valores de pH y la concentración en sólidos solubles (CSS). Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro Crison microPH2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España). La concentración de sólidos solubles de las muestras se determinó a partir de la medida de °Brix empleando un refractómetro (Bellingham and Stanley mod.

RFM300+, Kent, Reino Unido). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en cada uno de los envases empleados en los diferentes ensayos.

2.3.2. Diseño experimental

Tal y como se ha indicado anteriormente, *A. acidoterrestris* es capaz de formar esporas que no son eliminadas mediante los tratamientos de pasteurización que se aplican en la industria de bebidas. Es por ello, que en el presente trabajo se evaluó la capacidad de los antimicrobianos naturales para inhibir el crecimiento de las células vegetativas, así como su efecto sobre la esporulación y germinación de las esporas bacterianas en algunos de los alimentos líquidos donde la presencia de este microorganismo supone un reto industrial. En estos ensayos se empleó como compuesto antimicrobiano el timol, ya que los resultados obtenidos en los ensayos previos demostraron que este compuesto era el más efectivo para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*.

Para la realización de los ensayos, se inocularon 10 tubos de 9 mL de caldo BAT con una colonia del cultivo fresco y se dejó en incubación a 45 °C durante 6 días, garantizando bajo estas condiciones el 90% de la esporulación. Para la recuperación de las esporas generadas, se siguió el protocolo descrito por Cai *et al.* (2019a) con algunas modificaciones. La concentración de esta disolución fue de 10⁶ esporas/mL. De los 5 mL obtenidos, 2,5 mL fueron reservados para su inoculación directa en el alimento (B+E) y los 2,5 mL restante se introdujeron en un baño a 80°C durante 10 min para provocar la muerte de las células vegetativas y obtener una disolución de esporas (E). Ambas disoluciones se emplearon para la inoculación de las bebidas empleadas como matriz alimentaria. Este procedimiento se repitió para cada producto y condición de ensayo.

El protocolo de preparación de las muestras se muestra en la FIGURA 1. Las concentraciones empleadas del compuesto antimicrobiano en el zumo y en el té fueron la Concentración Mínima Bactericida (CMB) calculada en la fase anterior del estudio y una concentración 4 veces superior a la CMB (4xCMB). El producto con el antimicrobiano incorporado se dividió en 2 lotes, uno de ellos se inoculó con 10 µL de la disolución B+E (L1) y el otro lote con 10 µL de la disolución de esporas (E) (L2). Estos lotes se incubaron a 37 °C durante 0, 3, 6 y 24 h. En cada punto de muestreo se tomaron 2 tubos de cada lote, la mitad se sometieron a un tratamiento térmico de 80 °C durante 10 min e inmediatamente se enfriaron en un baño con hielo hasta alcanzar temperatura ambiente (25 °C) (muestras T-L1 y T-L2 a cada tiempo). La otra mitad de las muestras se analizó directamente, sin tratamiento térmico (muestras L1 y L2 a cada tiempo). Asimismo, se realizó un control positivo (zumo/té inoculados sin antimicrobiano), de la misma manera, con y sin tratamiento térmico, para establecer el crecimiento de los microorganismos en ausencia del compuesto bioactivo a cada tiempo de muestreo y un control negativo (zumo/té sin inocular ni antimicrobiano). Los análisis microbianos realizados a cada muestra correspondieron a la siembra en placa, empleando el mismo procedimiento descrito anteriormente (IFU, 2019).

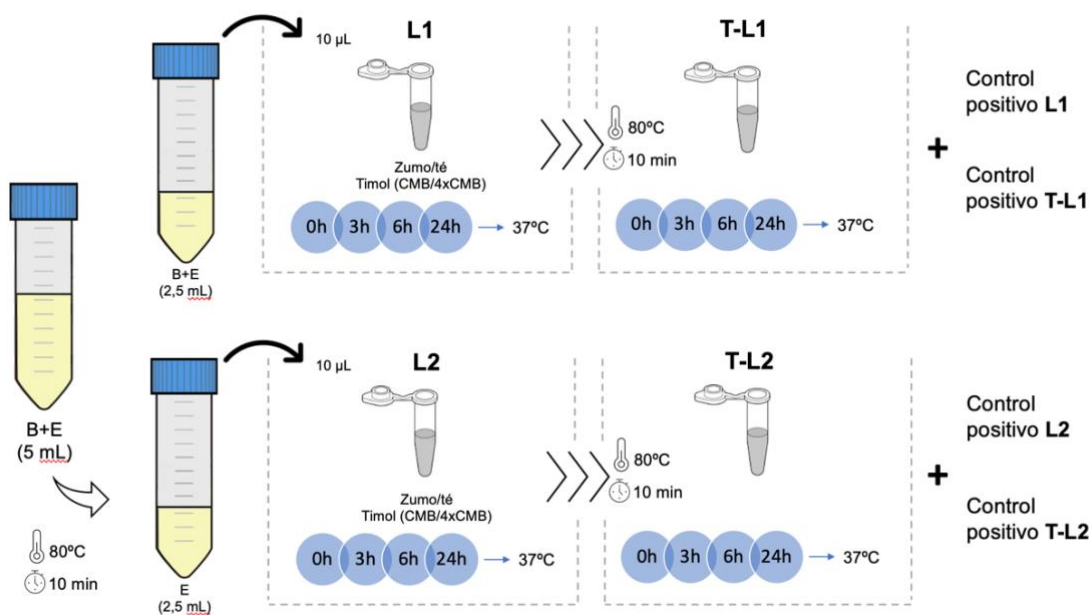


FIGURA 1. Diseño experimental

Además, se evaluó la capacidad del compuesto bioactivo para inhibir la esporulación de *A. acidoterrestris*. Para ello, se calculó el índice de inhibición (I.I.) empleado la siguiente ecuación:

$$I.I. = \frac{N_c - N_s}{N_c} \times 100$$

Donde N_c corresponde al logaritmo del número de esporas (log UFC/mL) en la muestra de control, y N_s al del número de esporas (log UFC/mL) en las muestras con el antimicrobiano (Bevilacqua *et al.*, 2008b).

2.3.3 Determinación cromatográfica del guayacol

Se llevó a cabo la determinación de guayacol en las muestras de zumo de manzana inoculadas con un 1% de la disolución de esporas de *A. acidoterrestris*, con el objetivo de evaluar el efecto del compuesto bioactivo sobre la capacidad de la bacteria para la generación de guayacol. Para ello, se analizaron muestras de zumo control, zumo inoculado con la disolución de esporas (E) de *A. acidoterrestris*, zumo inoculado e incorporando ácido vanílico (500 µM) como precursor de la generación de guayacol y finalmente zumo inoculado, con ácido vanílico y timol (a una concentración igual a CMB). Las muestras se incubaron a 47°C y se midió la producción de guayacol a los 4 y 20 días.

La determinación del guayacol se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el protocolo descrito por Cai *et al.* (2019a). Las muestras fueron analizadas en un equipo HPLC Hitachi Ltd. (Japón) con una columna C18 150x4.6 mm (Scharlab, España). Las fases móviles empleadas fueron ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua y acetonitrilo,

utilizando una elución isocrática del 30% (v/v) del acetonitrilo a un caudal de 1 mL/min y monitorizando la señal a una longitud de onda de 275 nm.

2.4 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVIII (Manugistics, Rockville, USA). Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVAS simples, empleando el procedimiento LSD (Least Significant Difference) a un nivel de significación $\alpha=0,05$. En el caso del método del antibiograma disco-placa, se consideró como variable el diámetro del halo de inhibición y como factor el compuesto bioactivo. Para el resto de determinaciones microbiológicas se consideraron como variables los recuentos microbianos y como factor la concentración del compuesto bioactivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a *A. acidoterrestris*

3.1.1 Método del antibiograma disco-placa

Para determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos de aceites esenciales frente a *A. acidoterrestris*, se empleó en primer lugar la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de antibiograma disco-placa. Este método nos permite categorizar el microorganismo según su sensibilidad al agente antimicrobiano, en función del diámetro del halo de inhibición que aparecer alrededor de cada disco. La TABLA 2 recoge los resultados obtenidos en esta prueba. La presencia del halo de inhibición confirma que los compuestos bioactivos utilizados fueron efectivos frente al microorganismo. El timol y el carvacrol presentaron halos de inhibición similares, siendo en ambos casos superiores a 40 mm, mientras que la prueba realizada con eugenol y vainillina dio lugar a un halo de inhibición de 16 y 13 mm, respectivamente. El timol y el carvacrol son isómeros y presentan una estructura química similar, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, lo que ha llevado a establecer semejanzas en su actividad antimicrobiana y mecanismo de acción frente a diferentes microorganismos (García-García *et al.*, 2008). La diferencia entre ellos radica que el carvacrol contiene un grupo hidroxilo en la posición orto del anillo de benceno, mientras que el timol contiene un grupo hidroxilo en la posición meta. Carvacrol y timol son componentes importantes de los aceites esenciales de orégano y tomillo. Numerosos estudios han demostrado la elevada efectividad de estos isómeros para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas, atribuyendo su potente efecto antibacteriano a su capacidad para producir la ruptura de la membrana bacteriana que conduce a la lisis de la bacteria y a la fuga de contenido intracelular produciendo así su muerte. Tienen la capacidad de disolverse en la membrana del citoplasma alineándose entre las cadenas de ácidos grasos,

aumentando la permeabilidad pasiva de la membrana del citoplasma (Lambert *et al.*, 2001). Otros mecanismos propuestos de acción antibacteriana incluyen la inhibición de las bombas de eflujo, la prevención en la formación y alteración de biopelículas, la inhibición de la motilidad bacteriana y la inhibición de las ATPasas de membrana (Kachur y Suntres, 2020). Por otro lado, Cai *et al.* (2019b) emplearon también el método de difusión disco-placa para evaluar el efecto del ácido clorogénico y del ácido cinámico frente a *A. acidoterrestris*, obteniendo valores de los diámetros de inhibición de 20,4 mm y 14,5 mm, respectivamente. Para ambos compuestos, estos autores consideraron que ambos compuestos eran potentes inhibidores del crecimiento de *A. acidoterrestris*.

TABLA 2. Halos de inhibición (media (SD)), incluyendo el diámetro del disco (6 mm) tras 24h de incubación.

Compuesto	Halo (mm)
<i>Timol</i>	42 (11) ^a
<i>Carvacrol</i>	43 (8) ^a
<i>Eugenol</i>	16,3 (0,8) ^b
<i>Vainillina</i>	13,1 (1,6) ^b
<i>Vancomicina (C-)</i>	46,1 (1,0) ^a

Letras diferentes en una misma columna indican la existencia de diferencias significativas a un nivel de significación $p < 0,001$.

3.1.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los diferentes compuestos bioactivos

A partir de los resultados del ensayo anterior se confirmó que los compuestos bioactivos eran capaces de inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*. La efectividad de diferentes sustancias antimicrobianas naturales para inhibir el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. ha sido analizada en diferentes estudios. El efecto del ácido ascórbico ha demostrado aumentar la susceptibilidad de este microorganismo a los tratamientos térmicos y por tanto contribuir a la reducción en los valores D del tratamiento (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020). El empleo de aditivos conservantes como el sorbato potásico o benzoato de sodio ha sido también estudiado frente a *A. acidoterrestris*. Ambos aditivos están autorizados, solos o combinados, dentro de la UE como conservadores en diferentes alimentos, entre los que se encuentran los zumos, néctares y otras bebidas aromatizadas (Reglamento (CE) 1333/2008). Walker y Phillips (2008) evitaron el crecimiento de *A. acidoterrestris* empleando ambos aditivos cuando la carga inoculada fue baja (10^1 UFC/mL), mientras que a concentraciones de inóculo mayores (10^4 UFC/mL) únicamente las concentraciones de aditivos más altas (500-1500 ppm) consiguieron evitar el desarrollo de la bacteria, no siendo ninguna de las concentraciones estudiadas letales para las formas vegetativas ni para las esporas. El uso de antimicrobianos naturales, especialmente el empleo de bacteriocinas, también ha sido investigado como estrategia para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*. Aunque hay diferentes investigaciones relacionadas con el empleo de la nisina, la enterocina AS-18, la bificina C6165

y otras bacteriocinas como esporicidas, los resultados no son concluyentes, precisándose más estudios sobre su aplicación real en el sector (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020).

Los aceites esenciales, extractos de plantas aromáticas y sus compuestos bioactivos también han sido investigados como estrategia para evitar el desarrollo y esporulación *in vitro* (medio de cultivo) de *A. acidoterrestris*. Entre los aceites esenciales y extractos investigados se encuentran los aceites esenciales de diferentes especies de eucalipto, aceite esencial de limón y los extractos de romero y menta, obteniendo resultados muy dispares. Takahashi *et al.* (2004) obtuvieron valores de CMI entre 7 y 31 g/L para las variedades de eucalipto más efectivas. En el caso del aceite esencial de limón, un valor de 1,6 g/L fue considerado para la inhibición de esporas (Maldonado *et al.*, 2013), mientras que valores de CMI en el caso de extractos etanólicos de romero de dos variedades diferentes fueron de 7,8 y 3,9 ppm (Piskernik *et al.*, 2016). En el presente trabajo, con el objetivo de identificar el compuesto bioactivo con una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* se determinó el valor de CMI y CMB de cada una de las sustancias en estudio (TABLA 3).

TABLA 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de timol, carvacrol, eugenol y vainillina frente a *A. acidoterrestris*.

Compuesto	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>Timol</i>	500	650
<i>Carvacrol</i>	750	1000
<i>Eugenol</i>	3000	3000
<i>Vainillina</i>	3000	4000

Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que el compuesto más efectivo fue el timol, con un valor de CMI y CMB inferior al resto de compuestos analizados, seguido por el carvacrol. Su próxima eficacia se justifica tal y como se ha descrito en el ensayo anterior. Otros trabajos también han demostrado una actividad antimicrobiana similar de ambos compuestos frente a otros microorganismos esporulados como *Bacillus cereus* (Periago *et al.*, 2001).

El compuesto con menor efectividad frente a *A. acidoterrestris* fue la vainillina, con un valor de CMI 6 veces superior al compuesto más efectivo. La vainillina posee en la posición meta un grupo metoxi y en la posición para un grupo hidroxilo, al igual que el eugenol (Quintana, 2013; Rupasinghe *et al.*, 2006). Fitzgerald *et al.* (2004) estudiaron la efectividad de la vainillina frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua*, y observaron que provocaba un nivel máximo de inhibición del 52% añadiendo 40 mmol/L (6086 ppm) y que además no detenía la producción de ATP, lo cual provoca que cause un daño menos severo sobre la bacteria en comparación a otros compuestos como el carvacrol. Esto puede justificar que no funcione en el presente estudio. La efectividad de diferentes compuestos bioactivos presentes en plantas también ha sido estudiada frente a *A. acidoterrestris*. Bevilacqua *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del

cinamaldehído, eugenol y limoneno frente a *A. acidoterrestris*. Entre estos compuestos bioactivos, el cinamaldehído fue el que mayor actividad antimicrobiana demostró, consiguiendo inhibir completamente la germinación de las esporas de *A. acidoterrestris* durante 13 días a una concentración de 500 ppm, siendo esta efectividad confirmada en estudios posteriores (Bevilacqua *et al.*, 2010). Entre estos compuestos, el limoneno fue el compuesto con menor actividad antimicrobiana frente a *A. acidoterrestris*. Estos resultados podrían justificar los obtenidos por Maldonado *et al.* (2013) los cuales encontraron únicamente efectividad del aceite esencial de limón a elevadas concentraciones. El limoneno es uno de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de cítricos, especialmente en el aceite esencial de limón empleado en dicho trabajo, donde supuso un 67% de su composición. En otro estudio, Cai *et al.* (2019a) estudiaron el efecto del timol frente a las células vegetativas y esporas de *A. acidoterrestris*. En este estudio se obtuvieron valores de CMI para células vegetativas de 250 ppm y para esporas de 500 ppm, mientras que el valor de CMB se estableció en 1000 ppm, siendo próximos a los obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo se emplearon para establecer las concentraciones a utilizar en los ensayos *in vivo* empleando zumo de manzana y una bebida de té frío comerciales.

3.2 Ensayo *in vivo* para evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a *A. acidoterrestris* en las diferentes matrices

3.2.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

La composición y propiedades fisicoquímicas del producto influyen en el desarrollo de *A. acidoterrestris*. El deterioro de zumos concentrados de fruta por *Alicyclobacillus* spp. no es probable cuando el contenido en sólidos solubles es superior a 20 °Brix, ya que se inhibe la germinación de endosporas (Splittstoesser *et al.*, 1994; Chang y Kang, 2004). Sin embargo, estas endosporas conservan su viabilidad en el concentrado de fruta que, tras su dilución para la obtención de zumo a partir de concentrado, se multiplican hasta alcanzar valores elevados, causando el deterioro del producto final (Borlinghaus y Engel, 1997). Los valores de pH y sólidos solubles del producto ejercen un papel importante sobre la resistencia de *Alicyclobacillus* a los tratamientos térmicos. En este sentido, un aumento en el contenido en sólidos solubles totales se ha relacionado con una mayor resistencia térmica del microorganismo al calor (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020; Smit *et al.*, 2011), al igual que sucede con los valores de actividad de agua (a_w) del producto. Silva *et al.* (1999) indicaron que el parámetro de a_w debería ser empleado para evaluar la resistencia térmica de *Alicyclobacillus*, en lugar del contenido en sólidos solubles, ya que los distintos azúcares presentes en el alimento afectan de manera diferente a los valores de a_w y, por tanto, afectarían a la efectividad del tratamiento térmico aplicado. Por otro lado, los estudios que han evaluado el efecto del pH sobre la resistencia de *Alicyclobacillus* spp. ofrecen datos en algunas ocasiones contradictorios. Silva *et al.* (1999)

encontraron una relación lineal entre el pH y los valores D del tratamiento térmico, al contrario que Murakami *et al.* (1998), los cuales no encontraron relación entre el pH y la resistencia térmica del microorganismo; mientras que Bevilacqua *et al.* (2010) establecieron un efecto no lineal del pH sobre el desarrollo de este microorganismo, estableciendo un valor umbral entre 4 y 4,5 sobre la prolongación de la fase de latencia, de manera que valores por encima o por debajo de este rango aumentan la duración de la fase de latencia de la bacteria, pero no son letales para la bacteria.

Los valores de pH y de la concentración de sólidos solubles del zumo de manzana y la bebida de té frío empleadas como materias primas en el presente estudio se muestran en la TABLA 4.

TABLA 4. Valores de pH y CSS del zumo de manzana y la bebida de té frío (media (SD)).

	<i>pH</i>	<i>Sólidos Solubles (°Brix)</i>
Zumo de manzana	3,915 (0,008)	8,22 (0,04)
Té frío	3,333 (0,005)	5,4 (0,01)

Los valores obtenidos en la caracterización de las bebidas empleadas se encuentran dentro de los valores habituales para este tipo de producto y dentro de las condiciones que permiten el crecimiento de *Alicyclobacillus* spp. Splittstoesser *et al.* (1994), Bahçeci y Acar (2007) y Ceviz *et al.* (2009) obtuvieron valores similares para el zumo de manzana y Boumgart *et al.* (1997) para la bebida de té frío. Con el objetivo de evaluar el efecto del timol sobre el desarrollo y esporulación de *A. acidoterrestris* se inocularon muestras de zumo de manzana y una bebida de té frío que contenían el compuesto bioactivo a una concentración igual a su CMB (650 ppm) y 4 veces superior a la CMB (2600 ppm) con células vegetativas y esporas de este microorganismo, tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. La evolución de las muestras durante 24 h de exposición al compuesto bioactivo se muestra a continuación.

3.2.2 Efecto del timol sobre *A. acidoterrestris* en zumo de manzana

Los valores obtenidos en las determinaciones microbiológicas realizadas a las diferentes muestras a lo largo del periodo de estudio se muestran en la FIGURA 2.

Los valores de los recuentos de *A. acidoterrestris* empleando timol disminuyeron respecto a las muestras control tras 24h de exposición (FIGURA 2a), no encontrándose diferencias significativas al finalizar el periodo de estudio entre las diferentes concentraciones de timol evaluadas (datos ANOVA no mostrados). En ambos casos, tanto inoculando con la suspensión B+E (L1) como con la suspensión E (L2), se observó como el compuesto bioactivo afectó a la germinación de las esporas, no permitiendo que esta se produjera, ya que no aumenta el número de bacterias presentes. Además, el timol a concentraciones elevadas (2600 ppm) combinado con el tratamiento de 80°C durante 10 minutos e inmediato enfriamiento, tanto en las muestras de zumo inoculadas con células vegetativas y esporas (FIGURA 2b) como en

las inoculadas únicamente con la disolución esporas (FIGURA 2d), fue capaz de inhibir la esporulación de *A. acidoterrestris*, ya que se observa como el número de esporas disminuye significativamente. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y las muestras de zumo con 650 ppm de timol en ninguno de los casos.

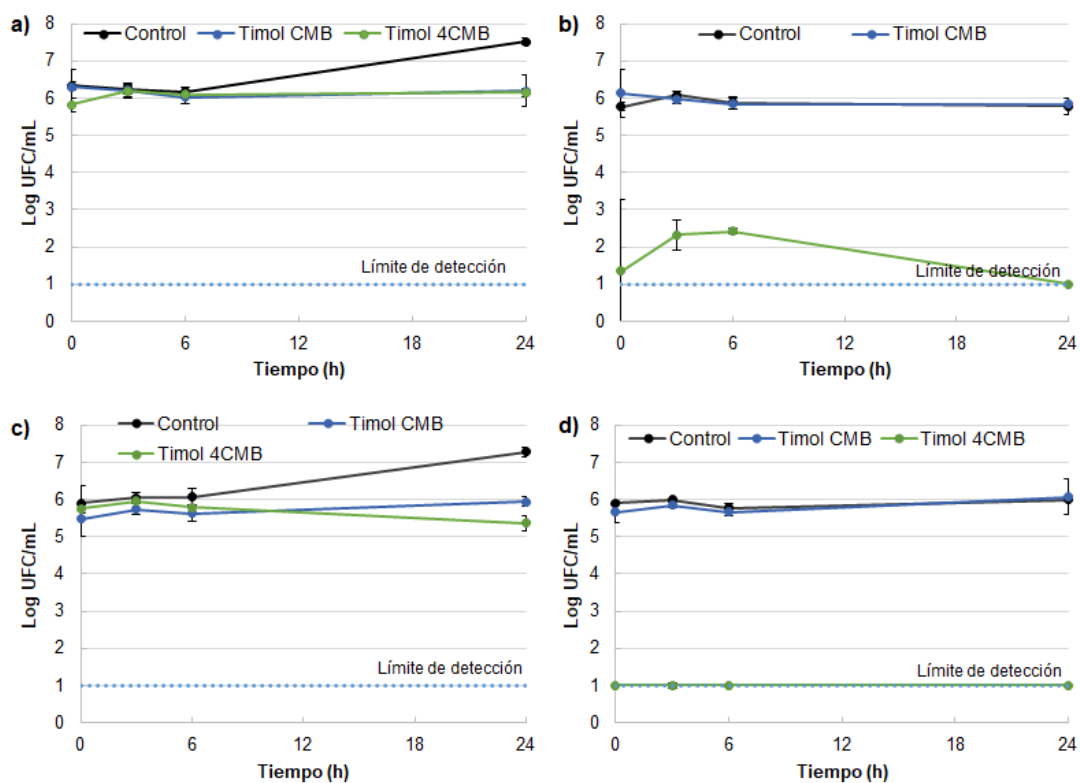


FIGURA 2. Cinéticas de crecimiento de *A. acidoterrestris* en zumo de manzana (a: L1, b: T-L1, c: L2, d: T-L2).

Los valores de índice de inhibición (I.I.) de las muestras de zumo de manzana inoculadas se muestran en la FIGURA 3. El timol fue efectivo para inhibir completamente la esporulación de *A. acidoterrestris* a una concentración igual a 2600 ppm tras 24h de exposición, mientras que cuando el compuesto bioactivo era empleado a una concentración de 650 ppm no afectó a la formación de esporas, siendo mínimo el porcentaje de inhibición. Bevilacqua *et al.* (2008) obtuvieron valores de inhibición tras 13 días de exposición empleando cinamaldehído y eugenol a una concentración igual a 100 ppm del 97 y 55%, respectivamente. Por otro lado, Piskernik *et al.* (2016) observaron como los porcentajes de inhibición se vieron afectados no solo por la concentración del extracto bioactivo, sino también por las características del medio, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores del índice de inhibición en función de si se realizaron las pruebas en medio de cultivo, zumo o zumo diluido.

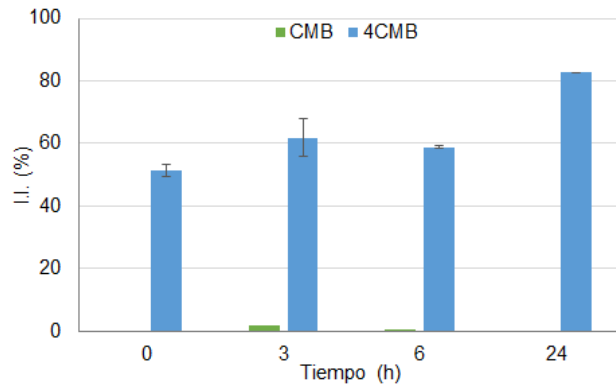


FIGURA 3. Índice de inhibición (I.I.) de *A. acidoterrestris* en zumo de manzana.

3.2.3 Efecto del timol sobre *A. acidoterrestris* en una bebida de té frío

Los valores obtenidos en las determinaciones microbiológicas realizadas a las diferentes muestras de la bebida de té frío a lo largo del periodo de estudio se muestran en la FIGURA 4.

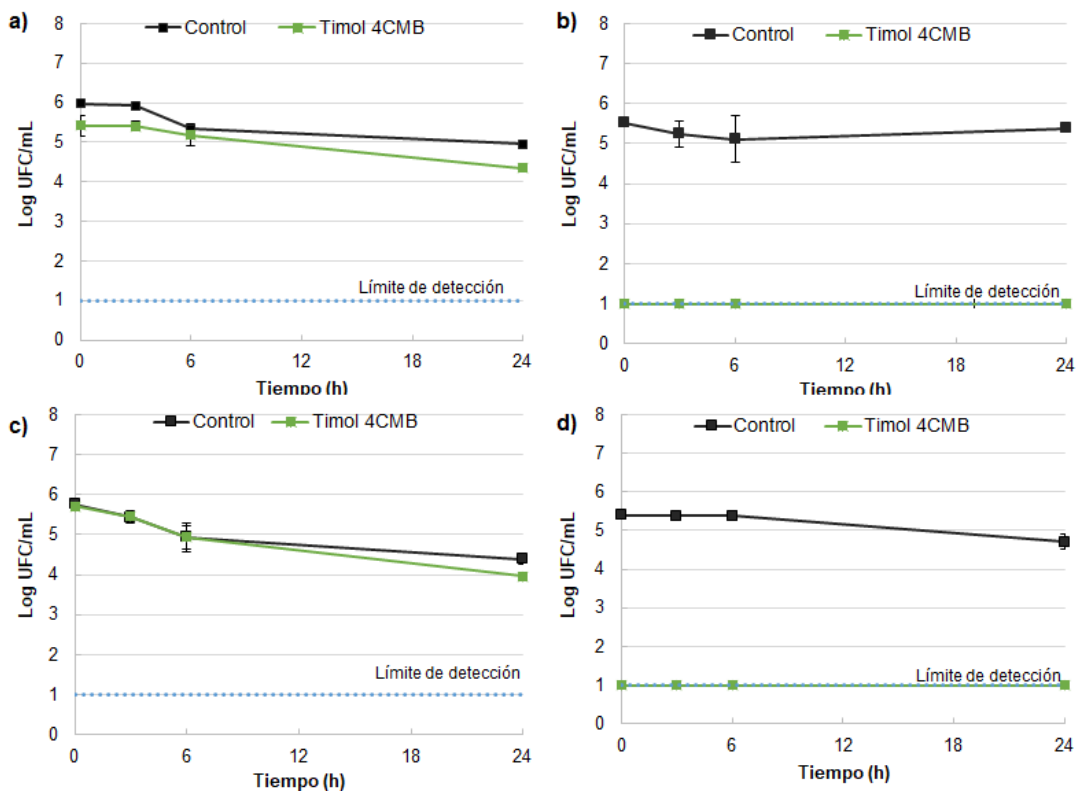


FIGURA 4. Cinéticas de crecimiento de *A. acidoterrestris* en una bebida de té frío (a: L1, b: T-L1, c: L2, d: T-L2).

De manera similar a lo observado en el caso del zumo de manzana, el timol adicionado en la bebida de té frío a una concentración 4xCMB fue capaz de inhibir la esporulación de *A. acidoterrestris*. Sin embargo, en este caso, se alcanzó el 100% de la inhibición de las esporas en todos los tiempos

evaluados al combinar el antimicrobiano con el choque térmico (FIGURA 4b y 4d), lo que mostraría una mayor efectividad del compuesto bioactivo en este tipo de producto.

Al comparar la supervivencia de *A. acidoterrestris* en el zumo de manzana y en la bebida de té se pudo observar una mayor supervivencia del microorganismos en el zumo de manzana, lo que podría estar relacionado con su mayor contenido en sólidos solubles y en unos valores de pH más cercanos a los de óptimo crecimiento de este microorganismo (4,0 – 4,5). Grande *et al.* (2005) observaron una mayor supervivencia de las células vegetativas de *Alicyclobacillus* en zumo de pera que en zumo de piña. Además, es interesante considerar que la composición y pH del alimento también podrían influir sobre la efectividad del compuesto antimicrobiano empleado. Bevilacqua *et al.* (2010) observaron que se necesitaban cantidades mayores de los compuestos antimicrobianos naturales evaluados (eugenol y cinamaldehído) para inhibir el crecimiento de *Alicyclobacillus* en el zumo de manzana que en medio de cultivo. Estos resultados indicarían la importancia de la composición y características del medio para establecer una adecuada estrategia de control.

3.3.4 Efecto del timol sobre la formación de guayacol por *A. acidoterrestris*

La formación de guayacol es la principal característica del deterioro en zumo de frutas causado por algunas bacterias dentro del género *Alicyclobacillus* (Cai *et al.*, 2015), siendo *A. acidoterrestris* la especie que mayores cantidades de guayacol produce. La presencia de guayacol confiere a los zumos un olor “medicinal”, siendo el límite sensorial de este compuesto extremadamente bajo, de 2 mg/L (Molva y Baysal, 2016). El mecanismo de producción de guayacol ha sido dilucidado por diferentes autores (Peleg *et al.*, 1992) y puede deberse a una reacción oxidativa o bien por metabolismo del ácido ferúlico, vainillina o ácido vanílico. Existen estudios que confirman que la vainillina y el ácido vanílico son precursores del guayacol (Smit *et al.*, 2011).

Con el objetivo de evidenciar si la incorporación de timol en el zumo permitía evitar la formación guayacol, se inocularon con *A. acidoterrestris* (10^6 UFC/mL) muestras de zumo fortificadas con ácido vanílico para asegurar el aporte del compuesto precursor de la reacción. Se determinó la concentración de guayacol presente en las muestras de zumo a los 4 y 20 días de la inoculación (TABLA 5).

Los resultados obtenidos muestran que el timol fue capaz de inhibir la producción de guayacol a pesar de garantizarse la presencia de las sustancias precursoras de la reacción durante al menos 20 días de almacenamiento. Bahçeci *et al.* (2005) observaron que *A. acidoterrestris* comenzaba a producir guayacol a partir de vainillina si la concentración celular excedía el nivel crítico de 10^4 UFC/mL. Pettipher *et al.* (1997) detectó sensorialmente guayacol en zumo de naranja que contenía concentraciones de 10^5 UFC/mL de *A. acidoterrestris*. Mientras, en este mismo estudio, se estableció que una carga microbiana de 10^6 UFC/mL en zumo de manzana, era capaz de producir guayacol, siendo detectado sensorialmente a una concentración de 17,3 ppb

alcanzada tras 6 días de incubación a 35 °C. Orr *et al.* (2000) obtuvieron una concentración de 11,8 µg/L de guayacol en un zumo de manzana inoculado con 10² UFC/mL.

TABLA 5. Concentración de guayacol (ppb) en muestras de zumo de manzana durante 4 y 20 días de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento	Muestra	Concentración guayacol (ppb)
4 días	Control	nd
	Zumo Q	nd
	Zumo inoculado	nd
	Zumo inoculado + ácido vanílico	62,8(2,8)
	Zumo inoculado + ácido vanílico + timol	nd
20 días	Control	nd
	Zumo Q	nd
	Zumo inoculado	nd
	Zumo inoculado + ácido vanílico	55,01(12,13)
	Zumo inoculado + ácido vanílico + timol	nd

n.d.: valor por debajo del límite de detección del método (0,5 ppb)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el timol fue capaz de controlar el desarrollo de *A. acidoterrestris* por debajo de los valores que pueden favorecer la acumulación de guayacol, y por tanto podría ser utilizado como estrategia para prevenir el deterioro comercial del zumo. Sin embargo, el fuerte impacto sensorial que tienen los aceites esenciales y sus principales compuestos, hacen necesario buscar alternativas que permitan reducir su efecto sobre los atributos sensoriales del producto. Entre estas estrategias tiene lugar la inmovilización de estos compuestos en soportes inorgánicos, como sílice amorfa, MCM-41 y sílice pirogénica, para desarrollar sistemas de filtración para la eliminación de microorganismos no deseados en alimentos. Ruiz-Rico *et al.* (2021) evaluaron estos sistemas de filtración empleando vino blanco inoculado con *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus plantarum*, *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*, observando una reducción de 3 ciclos logarítmicos para los microorganismos evaluados y sin afectar a los parámetros fisicoquímicos del vino blanco. Estos sistemas también han sido eficaces para la inhibición de *Escherichia coli* en zumo de manzana (Peña-Gómez *et al.*, 2019).

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha evaluado el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural, como son el timol, el carvacrol, el eugenol y la vainillina, para el control de la germinación y esporulación de *A. Acidoterrestris* y su consecuente producción de guayacol, como alternativa a tratamientos térmicos y al uso de conservantes sintéticos. Los resultados muestran que los cuatro compuestos estudiados, especialmente el timol y el carvacrol, son capaces de inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris* en medio de cultivo. En

muestras reales, zumo de manzana y una bebida de té frío, la aplicación de timol es una estrategia viable para evitar la germinación y la esporulación de este microorganismo, así como prevenir la producción de guaiacol en el producto final. El empleo de timol puede ser una alternativa al uso de tratamientos térmicos y aditivos químicos, para mantener la calidad microbiológica del producto; sin embargo, el potente sabor y aroma de estas sustancias antimicrobianas hacen necesario realizar posteriores estudios en los que se planteen estrategias para reducir su impacto en el del producto final.

5. REFERENCIAS

- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. (2014). Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International Journal of Microbiology*, 2014.
- 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(3), 266-273.
- Bahçeci, K. S., Gökmen, V., & Acar, J. (2005). Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. *European Food Research and Technology*, 220(2), 196-199.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2008). Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(7), 1271-1275.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, 21(2), 172-177.
- Borlinghaus, A. (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies-method development and validation. *Fruit processing*, 7, 262-266.
- Boumgart, J., Husemann, M., & Schmid, C. (1997). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: vorkommen, bedeutung und nachweis in getranken und getrankegrundstoffen. *Flüssiges Obst*, 64(4), 178-180.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Cai, R., Miao, M., Yue, T., Zhang, Y., Cui, L., Wang, Z., & Yuan, Y. (2019b). Antibacterial activity and mechanism of cinnamic acid and chlorogenic acid against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in apple juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(5), 1697-1705.
- Cai, R., Yuan, Y., Wang, Z., Guo, C., Liu, B., Liu, L., Wang, Y., & Yue, T. (2015). Precursors and metabolic pathway for guaiacol production by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 48-53.
- Cai, R., Zhang, M., Cui, L., Yuan, Y., Yang, Y., Wang, Z., & Yue, T. (2019a). Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. *LWT-Food Science & Technology*, 105, 377-384.
- Ceviz, G., Tulek, Y., & Con, A. H. (2009). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(9), 1770-1777.
- Chang, S. S., & Kang, D. H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical reviews in microbiology*, 30(2), 55-74.
- Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils— Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3).
- da Silva, D. A. M., Fernandes, M. S., Endo, E. H., Vital, A. C. P., Britta, E. A., Favero, M. E., & de Abreu Filho, B. A. (2021). Control of the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in

- industrialized orange juice using rosemary essential oil and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, 72(1), 41-52.
- European Fruit Juice Association. (2008). A guideline for the reduction and control of thermophilic, sporeforming bacteria (*Alicyclobacillus* species, ACB) in the production, packing and distribution of fruit juices, juice concentrates purees and nectars.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Nisbaid, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 104-113.
- García, J.A., Cantón, R., García, J. E., Gómez, M.L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- García-García, R. M., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2 (2), 41-51.
- Gouws, P. A., Gie, L., Pretorius, A., & Dhansay, N. (2005). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(7), 789-792.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N. B., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E. & Gálvez, A. (2005). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 289-297.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3 (12).
- IFU, Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas (2019). Método de análisis N.º 12. Método de detección y enumeración de bacterias termoacidófilas formadoras de esporas causantes de deterioro (*Alicyclobacillus* spp.)
- 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(1), 9-14.
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol y thymol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3042-3053.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Maldonado, M. C., Aban, M. P., & Navarro, A. R. (2013). Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 1133-1137.
- Molva, C., & Baysal, A. H. (2016). The effect of sporulation medium on *Alicyclobacillus acidoterrestris* guaiacol production in apple juice. *LWT-Food Science & Technology*, 69, 454-457.
- Murakami, M., Tedzuka, H., & Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology*, 15(6), 577-582.
- 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 of Food Protection*, 63(11), 1517-1522.
- Peleg, H., Naim, M., Zehavi, U., Rouseff, R. L., & Nagy, S. (1992). Pathways of 4-vinylguaiacol formation from ferulic acid in model solutions of orange juice. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 40(5), 764-767.
- Peña-Gomez, N., Ruiz-Rico, M., Fernandez-Segovia, I., & Barat, J. M. (2019). Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalised with essential oil components. *Food Control*, 106, 106749.
- Periago, P. M., Palop, A., & Fernandez, P. S. (2001). Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science & Technology International*, 7(6), 487-492.
- Pettipher, G. L., Osmundson, 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(3), 185-189.
- Pisoschi, A. M.; Pop, A.; Georgescu, C.; Turcuş, V.; Olah, N. K.; Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935.
- Piskernik, S., Klančnik, A., Demšar, L., Možina, S. S., & Jeršek, B. (2016). Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. *Food Control*, 60, 205-214.
- Pornpukdeewattana, S., Jindaprasert, A., & Massa, S. (2020). *Alicyclobacillus* spoilage and control—a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 60(1), 108-122.
- Quintana, Y. M. T. (2013). Farmacocinética y toxicología del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en modelos in vivo. Doctorado, Universidad de Oriente. Centro de Biofísica Médica.
- Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea L*, 354, 16-33.
- Ruiz-Rico, M., García-Ríos, E., Barat, J. M., & Guillamón, J. M. (2021). Microbial stabilisation of white wine by filtration through silica microparticles functionalised with natural antimicrobials. *LWT- Food Science & Technology*, 111783.
- Rupasinghe, H. V., Boulter-Bitzer, J., Ahn, T., & Odumeru, J. A. (2006). Vanillin inhibits pathogenic and spoiler microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International*, 39(5), 575-580.
- Silva, F. M., Gibbs, P., Vieira, M. C., & Silva, C. L. (1999). Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3), 95-103.
- Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., & Witthuhn, R. C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation—A review. *Food Microbiology*, 28(3), 331-349.
- Sokołowska, B., Połaska, M., & Dekowska, A. (2020). *Alicyclobacillus*—Still Current Issues in the Beverage Industry. *Safety Issues in Beverage Production*, 18, 105-146.
- Splittstoesser, D. F., Churey, J. J., & Lee, C. Y. (1994). Growth characteristics of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of food protection*, 57(12), 1080-1083.
- Takahashi, T., Kokubo, R., & Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 60-64.
- Van Luong, T. S., Moir, C., Bowman, J. P., & Chandry, P. S. (2021). Heat resistance and genomics of spoilage *Alicyclobacillus* spp. Isolated from fruit juice and fruit-based beverages. *Food Microbiology*, 94, 103662.
- Vieira, M. C., Teixeira, A. A., Silva, F. M., Gaspar, N., & Silva, C. L. (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(1-2), 71-81.
- Walker, M., & Phillips, C. A. (2005). The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(5), 557-562.
- Walker, M., & Phillips, C. A. (2008). The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control*, 19(10), 974-981.
- Weiss, J.; Gaysinsky, S.; Davidson, M.; McClements, J. (2009). Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. *Global Issues in Food Science & Technology*, 24, 425-479.