

BARBARA SOKOŁOWSKA

## ***ALICYCLOBACILLUS* – TERMOFILNE KWASOLUBNE BAKTERIE PRZETRWAJNIKUJĄCE – CHARAKTERYSTYKA I WYSTĘPOWANIE**

### Streszczenie

W latach 80. XX w. po raz pierwszy zaobserwowano, że termofilne kwasolubne bakterie przetrwalnikujące powodują psucie się soków owocowych, dlatego *Alicyclobacillus* spp. zostały uznane za drobnoustroje niepożądane w przemyśle sokowniczym, mogące generować straty ekonomiczne. Wymienione bakterie powodują wady pochodzenia mikrobiologicznego. Psucie się soków przejawia się głównie w powstawaniu przykrego zapachu i smaku, wynikających z obecności wytwarzanych przez bakterie związków chemicznych, takich jak gwajakol czy halofenole. Przetrwalniki *Alicyclobacillus* spp. przeżywają przez długi czas w koncentratkach owocowych i w podobnych środowiskach, jednak do wzrostu wymagają środowiska o większej zawartości wody.

Trudność związana z inaktywacją *Alicyclobacillus* spp. w sokach owocowych polega na tym, że przetrwalniki tych bakterii przeżywają w wysokiej temperaturze, a po pasteryzacji są w stanie wykiełkować i namnażać się w sprzyjających warunkach. Najpowszechniej występującym gatunkiem odpowiedzialnym za psucie soków i produktów pokrewnych jest *A. acidoterrestris*. Szczepy tego gatunku rosną w środowisku o pH od 2,5 do 6,0 i w temperaturze powyżej 20 °C.

**Słowa kluczowe:** *Alicyclobacillus* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris*, soki, gwajakol, ciepłooporność przetrwalników

### Wprowadzenie

Zanieczyszczenie soków bakteriami z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. jest jednym z ważniejszych problemów w branży sokowniczej. Niekorzystne zmiany sensoryczne soków, nektarów i napojów spowodowane wytwarzanymi przez bakterie *Alicyclobacillus* spp. metabolitami, nadającymi tym produktom zapach określany jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny, są przyczyną wycofania z rynku gotowych produktów, a tym samym znacznych strat ekonomicznych.

Polska jest znaczącym producentem soków i nektarów owocowych, których roczna produkcja wynosi ponad 700 tys. ton. W produkcji zagęszczonego soku jabłkowego Polska przoduje, zajmując drugie miejsce na świecie (po Chinach) z produkcją wynoszącą ok. 200 tys. ton rocznie.

Na podstawie wieloletnich badań, prowadzonych od 2002 roku przez Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych IBPRS, obecność przetrwalników *Alicyclobacillus* spp. stwierdzono w ponad 66,8 % przebadanych próbek zagęszczonego soku jabłkowego (n = 996).

### Rodzaj *Alicyclobacillus*

Kwasolubne, termofilne bakterie przetrwalnikujące zostały po raz pierwszy wyizolowane w 1967 r. z gorących źródeł w okolicach jeziora Tazawa w Japonii [57]. Bakterie te nazwano *Bacillus acidocaldarius* (z łac. *bacillus* – laseczka, pałeczka, *acidum* – kwas, *caldarius* – odnoszący się do gorącej wody) z powodu ich wzrostu w środowisku o wysokiej temperaturze i niskim pH. Kolejne doniesienie o wyizolowaniu kwasolubnych, termofilnych bakterii przetrwalnikujących, tym razem z gleby (ogrodowej, z lasu dębowego, z lasu jodłowego i wrzosowiska) pochodzą z 1981 r. [25]. W 1982 r. kwasolubne, termofilne bakterie przetrwalnikujące zostały wyizolowane z zepsutego, aseptycznie pakowanego soku jabłkowego [8]. Bakterie te charakteryzowały się podobnymi cechami biochemicznymi jak bakterie wyizolowane z gleby [25]. Sklasyfikowano je jako *Bacillus acidoterrestris* [11] (łac. *terra* – ziemia).

Nazwę systematyczną bakterii zaproponowali w 1992 r. Wisotzkey, Jurtshuk, Fox, Deinhard i Poralla [62], którzy na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA dokonali reklasyfikacji bakterii *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus acidocaldarius* i *Bacillus cycloheptanicus* na *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* i *Alicyclobacillus cycloheptanicus*. Nazwę rodzaju *Alicyclobacillus* zaproponowano ze względu na obecność ω-alicyklicznych kwasów tłuszczowych w ścianach komórkowych tych bakterii, przy czym dwa pierwsze gatunki zawierają w swojej ścianie komórkowej kwasy ω-cykloheksylowe, natomiast trzeci kwasy ω-cykloheptylowe.

Aktualnie znanych jest dwadzieścia gatunków z rodzaju *Alicyclobacillus*: *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus aeris*, *Alicyclobacillus contaminans*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus disulfidooxydans*, *Alicyclobacillus fastidiosus*, *Alicyclobacillus ferrooxydans*, *Alicyclobacillus herbarius*, *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus kakegawensis*, *Alicyclobacillus macrosporangioides*, *Alicyclobacillus pohliae*, *Alicyclobacillus pomorum*, *Alicyclobacillus sacchari*, *Alicyclobacillus sendaiensis*, *Alicyclobacillus shizuokensis*, *Alicyclobacillus tolerans*, *Alicyclobacillus vulcanalis* oraz dwa podgatunki *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* i *Alicyclobacillus*

*acidocaldarius* subsp. *rittmannii* [2, 18, 19, 20, 26, 28, 30, 33, 36, 48, 56, 62, 65]. Gatunki te wyizolowano głównie z gleby, zepsutych soków owocowych lub ze źródeł geotermalnych. Gatunkiem najczęściej izolowanym z zepsutych soków jest *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

### Gatunek *Alicyclobacillus acidoterrestris*

*Alicyclobacillus acidoterrestris* to Gram dodatnie, katalazo (+) i oksydazo (-) tlenowe laseczki o długości od 2,9 do 4,3  $\mu\text{m}$  i szerokości od 0,6 do 0,8  $\mu\text{m}$ , wytwarzające owalne przetrwalniki o długości od 1,5 do 1,8  $\mu\text{m}$  i szerokości od 0,9 do 1,0  $\mu\text{m}$ , ułożone terminalnie lub subterminalnie [11].

Szczepy *A. acidoterrestris* wykazują zdolność do wzrostu w zakresie pH od 2,5 do 6,0, z optimum 3,5 ÷ 4,5 i w temp. od 20 do 55 °C, z optimum w zakresie 40 ÷ 53 °C [5, 11, 22, 43, 53]. Najniższa temperatura, w której obserwowano wzrost *A. acidoterrestris*, wynosiła 19,5 °C [27], a najwyższa – 60 °C [4]. *A. acidoterrestris* po sześciu dniach inkubacji w temp. 50 °C, na pożywce BAM rosną w postaci okrągłych, kremowych lub białych kolonii, półprzezroczystych lub nieprzezroczystych, o średnicy 3 do 5 mm [11]. Starsze hodowle bakterii wykazują nieco ciemniejszą barwę niż młode [22, 53].

Trzecim czynnikiem warunkującym wzrost *A. acidoterrestris* jest zawartość ekstraktu. Maksymalna zawartość ekstraktu w soku jabłkowym, przy której obserwowano wzrost przetrwalników wynosiła 20 °Brix [60]. W badaniach modelowych [49] stwierdzono, że największy wzrost *A. acidoterrestris* następuje przy zawartości ekstraktu 12,5 °Brix ( $a_w = 0,992$ ), w temp. 43 °C i przy pH 4,5.

### Występowanie *Alicyclobacillus* spp. w środowisku naturalnym i produkcyjnym

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. występują we wszystkich regionach świata. Izolowano je z gorących źródeł w Japonii [57], z gleby wulkanicznej i z gorących źródeł na Hawajach, w Parku Yellowstone [10], z geotermalnych basenów na pustyni Mojave w Kalifornii [48], z gleby geotermalnej na Antarktydzie [26, 36], z gleby wulkanicznej na Azorach [2], z gleby sadów w Południowej Afryce [24] oraz w Japonii [21] i w Chinach [61].

Obecność *Alicyclobacillus* spp. oznaczano w sokach i napojach otrzymywanych z różnych surowców: w pomarańczowym, jabłkowym, grejpfrutowym, gruszkowym, z białych winogron, aloesowym, bananowym, morelowym, śliwkowym, ananasowym, pomidorowym, cytrynowym, brzoskwińowym, mandarynkowym, marchwiowym, z mango, w mleczku kokosowym, soku z marakuji, czarnych jagód, granatów i kiwi [5, 8, 9, 15, 23, 34, 35, 40, 42, 43, 50, 55, 60, 63]. Laseczki izolowano także z zagęszczonych soków: wiśniowego, z czarnych porzeczek, truskawkowego, malinowego, z czerwonych buraków [55] oraz z innych napojów [55, 66], a także z „Ice tea” [5, 12].

Pionierskie badania dotyczące metod oznaczania występowania *Alicyclobacillus* na różnych etapach produkcji zagęszczonego soku pomarańczowego oraz wpływu na jakość soków gotowych przeprowadziła w latach 1995-1999 grupa brazylijskich naukowców finansowana przez Brazilian Association of Citrus Processors (ABECitrus) [14, 15, 16]. Przebadano próbki ziemi ogrodowej, liści i pomarańcz różnych odmian, z różnych rejonów kraju oraz próbki z poszczególnych etapów produkcji zagęszczonego soku. Obecność bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. stwierdzono we wszystkich próbkach gleby ( $10^4 \div 10^7$  jtk/kg), na liściach (od  $<10$  jtk/kg do  $4,3 \times 10^2$  jtk/kg) oraz na owocach. W próbkach pomarańcz zbieranych po deszczu lub w deszczowym sezonie stwierdzono mniejszą liczbę komórek *Alicyclobacillus* spp. Badania procesu produkcyjnego wykazały obecność *Alicyclobacillus* spp. na owocach przed i po myciu, w pulpach, w sokach świeżych i zagęszczonych, w wodzie kondensacyjnej, a nawet w esencji cytrusowej. W wyrobach końcowych (zagęszczony sok pomarańczowy, 66 °Brix) pochodzących z trzech różnych zakładów stwierdzono obecność *Alicyclobacillus* spp. na poziomie  $70 \div 3,4 \times 10^3$  jtk/cm<sup>3</sup> [14, 15, 16].

Przeprowadzono także badania dotyczące wpływu różnych technologii na występowanie *Alicyclobacillus* spp. na różnych etapach cyklu produkcyjnego soku jabłkowego [3]. Tradycyjny proces otrzymywania soku z etapami depektynizacji, klarowania i zagęszczania nie pozwala na całkowitą eliminację bakterii *A. acidoterrestris*. Możliwa jest redukcja od 2 log jtk/cm<sup>3</sup> do 3 log jtk/cm<sup>3</sup> w stosunku do wyjściowego zanieczyszczenia soku surowego. Ponadto podwyższenie temperatury depektynizacji soku surowego z 25 do 50 °C (optymalna temperatura procesu) skutkowało podwyższeniem liczby *A. acidoterrestris* w soku. Zastosowanie ultrafiltracji (graniczna rozdzielczość membrany  $20 \cdot 10^3$  Da i  $50 \cdot 10^3$  Da) przy małym zanieczyszczeniu wyjściowego soku surowego ( $10^3$  jtk/cm<sup>3</sup>) umożliwiało uzyskanie soku pozbawionego *A. acidoterrestris* ( $< 1$  jtk/100 cm<sup>3</sup>). Przy zanieczyszczeniu soku surowego na poziomie  $10^6$  jtk/cm<sup>3</sup>, po depektynizacji i ultrafiltracji stwierdzono obecność *A. acidoterrestris* w produkcie końcowym w ilości od 3 jtk/100 cm<sup>3</sup> do 300 jtk/100 cm<sup>3</sup> w zależności od temperatury, w jakiej prowadzono depektynizację i od rozdzielczości membrany. Również przy ocenie płyt lub modułów filtracyjnych stosowanych na skalę przemysłową [29] stwierdzono zależność skuteczności filtracji od poziomu zanieczyszczenia filtrowanego koncentratu lub półkoncentratu.

W badaniach oceniających częstotliwość występowania *Alicyclobacillus* spp. na powierzchni pomarańcz z Florydy [41] stwierdzono, że 48 % owoców przeznaczonych do produkcji niepasteryzowanych surowych soków jest zanieczyszczonych *Alicyclobacillus* spp. (zgodnie z wymaganiami HACCP w USA do produkcji soków niepasteryzowanych nie wolno przeznaczać owoców zbieranych z ziemi). Proces mycia redukował ilość zanieczyszczonych pomarańcz do 5 %. Obecność *Alicyclobacillus* spp. stwierdzono na 84 % owoców przeznaczonych do produkcji zagęszczonego soku pomarańczowe-

go. Proces mycia nie wpływał na obniżenie zanieczyszczenia, ponieważ do mycia stosowano wodę kondensacyjną odzyskiwaną w czasie zagęszczania soku, która była zanieczyszczona bakteriami *Alicyclobacillus* spp.

W 2008 r. AIJN European Fruit Juice Association [1] wydała *Alicyclobacillus* Best Practice Guideline – wytyczne dotyczące obniżania i kontrolowania termofilnych bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Alicyclobacillus* w procesach produkcji, pakowania i dystrybucji soków owocowych, zagęszczonych soków, przecierów i nektarów. W przewodniku przedstawiono 12 krytycznych punktów kontrolnych mających na celu ograniczenie występowania bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* w produkcji końcowym poprzez nadzorowanie jakości wody, warunków transportu, przyjęcia i składowania, mycia i sortowania owoców, filtracji soku, jakości środków pomocniczych i opakowań, rozlewu (temperatura napełniania i chłodzenia, przechowywania i dystrybucji, mycia i dezynfekcji linii rozlewniczej).

### Wytwarzanie związków zapachowych przez szczepy z rodzaju *Alicyclobacillus*

Spośród aktualnie znanych 20 gatunków z rodzaju *Alicyclobacillus* cztery: *Alicyclobacillus acidoterrestris* [37, 39, 42], *Alicyclobacillus herbarius*, *Alicyclobacillus acidiphilus* oraz niektóre szczepy z gatunku *Alicyclobacillus hesperidum* [37], są zdolne do syntezy gwajakolu. W literaturze opisano wytwarzanie 2,6-dibromofenolu przez szczepy *Alicyclobacillus acidoterrestris* [5, 7, 17, 27] i *Alicyclobacillus cycloheptanicus* [17] oraz 2,6-dichlorofenolu przez *Alicyclobacillus acidoterrestris* [27], *Alicyclobacillus hesperidum* i *Alicyclobacillus cycloheptanicus* [17].

Związki te charakteryzują się zapachem określanym jako "medyczny", "środka odkażającego", zapach gwajakolu określany jest również jako "dymny". Są to związki o stosunkowo silnym zapachu i smaku. W soku jabłkowym próg wyczuwalności węchowej gwajakolu, według różnych źródeł, wynosił 0,57  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [45] i 0,91  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [13], a próg rozpoznania: 2  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [45] lub 2,23  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [39]. Próg wykrywalności smakowej gwajakolu wynosił 0,24  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [13] i 2  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [42]. Próg wyczuwalności smakowej halogenowanych węglowodorów był wielokrotnie niższy i wynosił: 0,5  $\text{ng}/\text{dm}^3$  dla 2,6-dibromofenolu i 6,2  $\text{ng}/\text{dm}^3$  dla 2,6-dichlorofenolu, zapach obu związków w tym stężeniu był wyczuwalny i rozpoznawalny jako dezynfekcyjny [27]. Spośród trzech omawianych związków gwajakol jest głównym metabolitem związanym z zepsuciem soków owocowych przez *Alicyclobacillus* spp. i był wykrywany we wszystkich produktach wykazujących specyficzny, dezynfekcyjny zapach (tab. 1).

Tabela 1. Związki zapachowe wytwarzane przez *Alicyclobacillus acidoterrestris* w zepsutych sokach owocowychTable 1. Aromatic compounds produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in spoilage fruit juice

Rodzaj soku Kind of juice	Warunki inkubacji [°C/dni] Incubation conditions [°C/days]	Liczba bakterii [jtk/cm <sup>3</sup> ] Count of bacteria [cfu/cm <sup>3</sup> ]	Składnik zapachowy – ilość Odour-active compound – amount	Źródło Source	
Sok pomarańczowy Orange juice	25 °C/6 dni	$6,0 \times 10^5$	gwajakol – 14,1 µg/dm <sup>3</sup>	[42]	
	35 °C/6 dni	$1,0 \times 10^6$	gwajakol – 13,3 µg/dm <sup>3</sup>		
	44 °C/6 dni	$6,0 \times 10^6$	gwajakol – 1,2 µg/dm <sup>3</sup>		
Sok jabłkowy Apple juice	25 °C/10 dni	$2,0 \times 10^7$	gwajakol – 11,6 µg/dm <sup>3</sup>		
	35 °C/6 dni	$3,0 \times 10^6$	gwajakol – 17,3 µg/dm <sup>3</sup>		
	44 °C/6 dni	$2,0 \times 10^7$	gwajakol – 33,7 µg/dm <sup>3</sup>		
Napój owocowy Fruit drink	35 °C/3 dni	$1,0 \times 10^5$	gwajakol – 32,3 µg/dm <sup>3</sup>		
	44 °C/3 dni	$1,0 \times 10^6$	gwajakol – 100,8 µg/dm <sup>3</sup>		
Ice tea Ice tea	-	$4,1 \times 10^5$	2,6-dibromofenol – 5 ng/dm <sup>3</sup>		[5]
Zepsuty mieszany sok owocowy Spoiled mixed fruit juice	-	$3,0 \times 10^1$ - $8,0 \times 10^1$	2,6-dibromofenol – 2 ng/dm <sup>3</sup> do 4 ng/dm <sup>3</sup>		[27]
	-	$3,0 \times 10^1$ - $8,0 \times 10^1$	2,6-dichlorofenol – 16 ng/dm <sup>3</sup> do 20 ng/dm <sup>3</sup>		
Mieszany sok owocowy Mixed fruit juice	1 dzień	$1,0 \times 10^5$	2,6-dibromofenol – 20 ng/dm <sup>3</sup>		
			2,6-dichlorofenol – 20 ng/dm <sup>3</sup>		
Sok jabłkowy Apple juice	21 °C/8 dni	$7,5 \times 10^2$	gwajakol – 8,1 µg/dm <sup>3</sup>	[39]	
	37 °C/8 dni	$1,8 \times 10^2$	gwajakol – 11,4 µg/dm <sup>3</sup>		

Gwajakol powstaje z kwasu ferulowego poprzez wanilinę i kwas wanilinowy [38]. Związki te występują naturalnie w sokach owocowych. Reakcja przebiega pod wpływem dekarboksylazy kwasu wanilinowego, enzymu którego indukcja następuje w obecności kwasu wanilinowego. Witthuhn i wsp. [64] wykazali, że szczep *A. acidoterrestris* FB2 wytwarzał gwajakol z waniliny i kwasu wanilinowego, natomiast nie wytwarzał gwajakolu z kwasu ferulowego. Minimalna zawartość w soku – 10 mg/l waniliny lub kwasu wanilinowego była niezbędna do wytworzenia takich ilości gwajakolu, które wyczuwano węchowo.



Danyluk i wsp. [9] wskazują, że szczepy *A. acidoterrestris* mogą mieć system enzymów umożliwiający wytwarzanie związków zapachowych innych niż gwajakol i halogenowane fenole. W sokach ananasowym i mango po 14 dniach inkubacji próbek zaszczipionych *A. acidoterrestris* stwierdzono zapach „serowy”. Związki, które zidentyfikowano jako odpowiedzialne za ten zapach, to kwasy 2-metylomasłowy i 3-metylomasłowy oraz metyl-3(metyltio)-propionian i etyl-3(metyltio)-propionian. Zapach „serowy” stwierdzono także w soku jabłkowym zaszczipionym szczepami *A. acidoterrestris* [54].

### Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Przetrwalniki *A. acidoterrestris* charakteryzują się zdolnością przeżywania w temperaturze stosowanej do pasteryzacji soków owocowych [5, 47, 50]. Temperatura powoduje szok termiczny przetrwalników, który jest niezbędny do kiełkowania. W pasteryzowanych sokach, nektarach i napojach owocowych, w handlowych opakowaniach, przechowywanych w temperaturze otoczenia, bakterie mają dogodne warunki do namnażania. Przetrwalniki *A. acidoterrestris* wykazują wysoką ciepłooporność zależną od rodzaju soku, zawartości ekstraktu oraz pH. Przykładowe, cytowane w literaturze wartości parametrów D i z przedstawiono w tab. 2. Wartość D to czas w minutach, niezbędny do dziesięciokrotnego zmniejszenia liczby żywych komórek drobnoustrojów, a wartość z jest stałą wskazującą o ile stopni Celsjusza należy zwiększyć temperaturę ogrzewania, aby czas ogrzewania skrócić dziesięciokrotnie.

Skuteczną redukcję liczby przetrwalników *A. acidoterrestris* osiągnięto w procesie prowadzonym w temp. 115 °C przez 8 s [58].

Tabela 2. Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w różnych sokach owocowych.

Table 2. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in various fruit juices.

Rodzaj medium Kind of medium	pH	Zawartość ekstraktu [%] Content of extract [%]	T [°C]	D [min]	z [°C]	Źródło Source
Sok jabłkowy Apple juice	3,5	11,4	85 95	56 2,8	7,7	[50]
Sok winogronowy Grape juice	3,3	15,8	85 95	57 2,4	7,2	
Napój pomarańczowy Orange drink	4,1	5,3	95	5,3	9,5	[5]
Ice Tea jabłkowa Apple Ice Tea	3,5	4,8	95	5,2	10,8	
Nektar owocowo witaminowy Fruit and vitamin nectar	3,5	6,1	95	5,1	9,6	

Ekstrakt z owoców cupuaçu Cupuaçu fruit extract	3,6	11,3	85 97	17,5 0,57	9,0	[46]
Sok pomarańczowy Orange juice	3,5	11,7	85 91	65,6 11,9	7,8	
Zagęszczony sok z czarnych porzeczek Concentrated blackcurrant juice	2,5	26,1 58,5	91 91	3,84 24,1	-	
Sok jabłkowy Apple juice	3,5	-	80 95	41,2 2,30	12,2	[31]
Sok pomarańczowy Orange juice	3,9	-	80 95	54,3 3,59	12,9	
Sok grejpfrutowy Grapefruit juice	3,4	-	80 90 95	37,9 5,95 1,85	11,6	
Sok jabłkowy Apple juice	3,68	12,2	90 96 100	11,1 2,1 0,7	8,5	[4]
Nektar jabłkowy Apple nectar	2,97	14,0	90 96 100	14,4 3,3 1,2	9,2	
Nektar jabłkowy z kwasem askorbinowym - 250 mg/dm <sup>3</sup> Apple nectar with ascorbic acid - 250 mg/dm <sup>3</sup>	2,95	14,0	90 96 100	14,1 3,1 1,0	8,8	
Zagęszczony sok cytrynowy Concentrated lemon juice	2,28 ÷ 4,0	50,0 (klarowany clarified)	82 86 92 95	17,36 ÷ 33,66 18,06 ÷ 68,95 7,60 ÷ 23,19 6,2 ÷ 12,63	-	[32]
	2,28 ÷ 4,0	68,0 (nieklarowny non-clarified)	82 86 92 95	15,50 ÷ 50,50 14,54 ÷ 95,15 8,81 ÷ 85,29 8,55 ÷ 23,33		
Sok jagodowy Berry juice	3,5	-	88 95	11 1	7,2	[59]
Sok jabłkowy Apple juice	3,40	11,2	95	3,4 ÷ 15,1	5,4 ÷ 12,8	[52]
Zagęszczony sok jabłkowy Concentrated apple juice	3,12	70,0	95	5,3 ÷ 29,8	4,9 ÷ 14,2	
Sok pomidorowy Tomato juice	4,4	12,0	85 90 95	40,65 9,47 1,5	7,0	[6]

### Podsumowanie

Przetrwalnikujące bakterie z rodzaju Alicyclobacillus spp. pochodzą z gleby, skąd łatwo są przenoszone na owoce. Proces pasteryzacji stosowany do utrwalania soków nie



powoduje inaktywacji ich przetrwalników. W sprzyjających warunkach przetrwalniki mogą kiełkować i rozwijać się, powodując zepsucie soku, polegające na wytwarzaniu związków o charakterystycznym zapachu, określanym jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny. Metabolity odpowiedzialne za te zmiany to gwajakol, 2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol. Gatunkiem najczęściej izolowanym z zepsutych soków jest *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Jak dotąd nie stwierdzono żadnego związku pomiędzy spożywaniem soków i innych produktów spożywczych zanieczyszczonych bakteriami z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. a zagrożeniem zdrowia ludzkiego.

Wykazana w wielu badaniach wysoka ciepłooporność przetrwalników *A. acidoterrestris* oraz stwierdzone przypadki zepsucia handlowych soków pasteryzowanych wskazują na nieskuteczność procesu pasteryzacji, a tym samym na konieczność poszukiwania innych metod ograniczenia wzrostu tych bakterii.

### Literatura

- [1] AIJN, Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union, *Alicyclobacillus* Best Practice Guideline, Rue de la Loi 221 box 5, B-1040 Brussels 2008.
- [2] Albuquerque L., Rainey F.A., Chung A.P., Sunna A., Nobre M.F., Grote R., Antranikian G., Costa M.S.: *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, **50**, 451-457.
- [3] Bahçeci K.S., Gökmen V., Serpen A., Acar J.: The effect of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestris* during apple juice production. *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, **217**, 249-252.
- [4] Bahçeci K.S., Acar J.: Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **120** (3), 266-273.
- [5] Baumgart J., Husemann M., Schmidt C.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. *Fluss. Obst*, 1997, **64**, 178-180.
- [6] Bevilacqua A., Corbo M.R.: Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: heat resistance and implications for tomato juice. *J. Food Sci.*, 2011, **76** (2), M130-M136.
- [7] Borlinghaus A., Engel R.: *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies and validation. *Fruit Process.*, 1997, **7** (7), 262-266.
- [8] Cerny G., Hennlich W., Poralla K.: Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderberregers. *Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch.*, 1984, **179**, 224-227.
- [9] Danyluk M.D., Friedrich L.M., Jouquand C., Goodrich-Schneider R., Parish M.E., Rouseff R.: Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. *Food Microbiol.*, 2011, **28**, 472-477.
- [10] Darland G., Brock T.D.: *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.*, 1971, **67**, 9-15.
- [11] Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E.: *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1987, **10**, 47-53.
- [12] Duong H.A., Jensen N.: Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia*, 2000, **52** (7), 292.
- [13] Eisle T.A., Semon M.J.: Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. *J. Food Sci.*, 2005, **70**, 267-269.

- [14] Eguchi S.Y., Manfio G.P., Pinhatti M.E., Azuma E., Variane S.F.: Acido-thermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices – Report of the Research Project, Part I. *Fruit Process.*, 2001, **11 (1)**, 12-18.
- [15] Eguchi S.Y., Manfio G.P., Pinhatti M.E., Azuma E., Variane S.F.: Acido-thermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices – Report of the Research Project, Part II. *Fruit Process.*, 2001, **11 (2)**, 55-62.
- [16] Eguchi S.Y., Manfio G.P., Pinhatti M.E., Azuma E., Variane S.F.: Acido-thermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices – Report of the Research Project, Part III. *Fruit Process.*, 2001, **11 (3)**, 95-101.
- [17] Gocmen D., Elston A., Williams T., Parish M., Housett R.L.: Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2005, **40**, 172-177.
- [18] Goto K., Matsubara H., Mochida K., Matsumura T., Hara Y., Niwa M., Yamasato K.: *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, **52**, 109-113.
- [19] Goto K., Mochida K., Asahara M., Suzuki M., Kasai H., Yokota A.: *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, **53**, 1537-1544.
- [20] Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara M., Fujita R., An S.Y., Kasai H., Yokota A.: Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov., and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007, **57**, 1276-1285.
- [21] Goto K., Nishibori A., Wasada Y., Furuhashi K., Fukuyama M., Hara M.: Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Lett. Applied. Microbiol.*, 2008, **46**, 289-294.
- [22] Goto K., Tanaka T., Yamamoto R., Tokuda H.: Characteristics of *Alicyclobacillus*. In: *Alicyclobacillus Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Ed. by Yokota A., Fujii T., Goto K. Springer, 2007, pp. 9-48.
- [23] Gouws P.A., Gie L., Pretorius A., Dhansay N.: Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2005, **40**, 789-792.
- [24] Groenewald W.H., Gouws P.A., Witthuhn R.C.: Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*, 2008, **12**, 159-163.
- [25] Hippchen B., Roll A., Poralla K.: Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli processing  $\omega$ -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Arch. Microbiol.*, 1981, **129**, 53-55.
- [26] Imperio T., Viti C., Marri L.: *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, **58**, 221-225.
- [27] Jensen N., Whitfield F.B.: Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **36**, 9-14.
- [28] Jiang C.Y., Liu Y., Liu Y.Y., You X.Y., Guo X., Liu S.J.: *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 2008, **58**, 2898-2903.
- [29] Junker R.: Termofilny "szkodnik" soku owocowego – pełne oddzielenie przez filtrację sterylą. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2002, **46 (7 - 8)**, 12-13.
- [30] Karavaiko G.I., Bogdanova T.I., Tourova T.P., Kondrateva T.F., Tsaplina I.A., Egorova M.A., Krasilnikova E.N., Zakharchuk L.M.: Reclassification of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans* strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Du-

- fresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfooxidans* comb. nov., and emended description of the genus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2005, **55**, 941-947.
- [31] Komitopoulou E., Boziaris I.S., Davies E.A. Delves-Broughton J., Adams M. R.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. Int. J. Food Sci. Technol., 1999, **34**, 81-85.
- [32] Maldonado M.C., Belifiore C., Navarro A.R.: Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. J. Ind Microbiol. Biotechnol., 2008, **35**, 141-144.
- [33] Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Yamasato K.: *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. Int. J. System. Evol. Microbiol., 2002, **52**, 1681-1685.
- [34] McKnight I.C., Eiroa M.N.U., Sant'Ana A.S., Massagué P.R.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance, Food Microbiol., 2010, **27**, 1016-1022.
- [35] McNamara C.J., Wiebe D., Gomez M.: Recovery of *Alicyclobacillus* from inhibitory fruit juices concentrates. J. Food Prot., 2011, **74** (8), 1370-1373.
- [36] Nicolaus B., Improta R., Manca M.C., Lama L., Esposito E., Gambacorta A.: Alicyclobacilli from unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. Polar. Biol., 1998, **19**, 133-141.
- [37] Niwa M.: Control of hazardous bacteria in acidic beverages by using a guaiacol detection kit (peroxidase method). Fruit Process., 2005, **15** (6), 388-392.
- [38] Niwa M., Kawamoto A.: Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. Fruit Process., 2003, **13** (2), 102-107.
- [39] Orr R.V., Shewfelt R.L., Huang C.J., Tefera S., Beuchat L.R.: Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. J. Food Protect., 2000, **11**, 1517-1522.
- [40] Oteiza J.M., Ares G., Sant'Ana A.S., Soto S., Giannuzzi L.: Use a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. In concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. Int. J. Food Microbiol., 2011, **151**, 229-234.
- [41] Parish M.E., Goodrich R.M.: Recovery of presumptive *Alicyclobacillus* strains from orange fruit surfaces. J. Food Protect., 2005, **68** (10), 2196-2200.
- [42] Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M.: 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. Lett. Appl. Microbiol., 1997, **24**, 185-189.
- [43] Pinhatti M.E.M.C., Variante S., Eguchi S.Y., Manfio G.P.: Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. Fruit Process., 1997, **7** (9), 350-353.
- [44] Previdi M.P., Colla F., Vicini E.: Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore forming thermophilic acidophilic bacterium. Industria Conserve, 1995, **70**, 128-132.
- [45] Siegmund B., Pöellinger-Zierler B.: Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. J. Agric. Food Chem., 2006, **54**, 5984-5989.
- [46] Silva F.V.M., Gibbs P., Vieira M.C., Silva C.L.M.: Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. Int. J. Food Microbiol., 1999, **51** (2/3), 95-103.
- [47] Silva F.V.M., Gibbs P., Silva C.L.M.: Establishing a new pasteurization criterion based on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores for shelf-stable high – acidic fruit products. Fruit Process., 2000, **10** (4), 138-141.
- [48] Simbahan J., Drijber R., Blum P.: *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Spring, California, USA. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2004, **54**, 1703-1707.

- [49] Sinigaglia M., Corbo M.R., Altieri C., Campaniello D.D, Amato D., Bevilacqua A.: Combined effect of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *J. Food Protect.*, 2003, **12**, 2216-2221.
- [50] Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y.: Growth characteristic of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Protect.*, 1994, **57**, 1080-1083.
- [51] Sokołowska B.: Charakterystyka szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* izolowanych z różnych źródeł i regionów. Praca doktorska. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Wydział Nauki o Żywności, Olsztyn 2009.
- [52] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Ciepłoporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2008, **12**, 22-27.
- [53] Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Frankiel A.: Bioróżnorodność szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 2010, **65**, 29-32.
- [54] Sokołowska B., Skąpska S., Sionek B., Niezgoda J., Chotkiewicz M.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* – wzrost i wytwarzanie związków zapachowych w soku jabłkowym. *Post. Nauki Technol. Przem. Rol.-Spoż.*, 2013, **68** (1), 19-37.
- [55] Sokołowska B., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A.: Prevalence of *Alicyclobacillus* spp. in Polish concentrated apple and berry juices and the susceptibility of these juices to spoilage. *Food Microbiol.* (złożony do opublikowania)
- [56] Tsuruoka N., Isono Y., Shida O., Hemmi H., Nakayama T., Nishino T.: *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, **53**, 1081-1084.
- [57] Uchino F., Doi S.: Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *J. Agric. Biol. Chem.*, 1967, **31**, 817-822.
- [58] Vieira M.C., Teixeira A.A., Silva F.V.M., Gaspar N., Silva C.L.M.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, **77**, 71-81.
- [59] Walls I.: *Alicyclobacillus* – an overview, Session 36-1 presented at 1997 Institute of Food Technologists Annual Meeting in Orlando, FL, 14–18 June 1997.
- [60] Walls I., Chuyate R.: Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, 2000, **52** (7), 286-288.
- [61] Wang Y., Yue T., Yuan Y., Gao Z.: Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in China. *J. Food Protect.*, 2010, **73** (2), 390-394.
- [62] Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992, **42** (2), 263-269.
- [63] Witthuhn R.C., Duvange W., Gouws P.A.: Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from South African fruit juices and concentrates. In: *Food Micro*, 29.08 - 2.09.2006, Bologna 2006, pp. 390.
- [64] Witthuhn R.C., van der Merwe E., Venter P., Cameron M.: Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanilic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Inter. J. Food Microbiol.*, 2012, **157**, 113-117.
- [65] Euzeby J.P.: List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Alicyclobacillus* [online]. Dostęp w Internecie: [14.02.2013], [www.bacterio.cict.fr/a/alicyclobacillus.html](http://www.bacterio.cict.fr/a/alicyclobacillus.html)
- [66] Yamazaki K., Teduka H., Shinano H.: Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Acidic Beverages Biosci. Biotech. Biochem., 1996, **60** (3), 543-545.

---

**ALICYCLOBACILLUS – THERMOPHILIC ACIDOPHILIC SPORE-FORMING BACTERIA – PROFILE AND PREVALENCE****S u m m a r y**

In the 1980s, it was found for the first time that thermophilic, acidophilic spore-forming bacteria caused the fruits to spoil; therefore, *Alicyclobacillus* bacteria were regarded to be adverse micro-organisms unwanted in the fruit juice industry, since they might incur economic losses. Those bacteria cause defects of microbiological origin. The spoilage of juices is mainly manifested through the formation of off flavours and odours resulting from the occurrence of chemical compounds, such as guaiacol and halophenols, produced by those bacteria. The spores of *Alicyclobacillus* spp. survive for long periods of time in fruit concentrates and similar environments; however, for their growth, environments containing more water are required.

It is difficult to inactivate *Alicyclobacillus* spp. in fruit juices, because the spores thereof survive high temperatures and, after pasteurization, can germinate and grow under fitting conditions. *A. acidoterrestris* is the most commonly occurring species responsible for the spoilage of juices and similar products. Those strains grow in an environment showing pH between 2.5 and 6.0 and at a temperature above 20 °C.

**Key words:** *Alicyclobacillus* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris*, juices, guaiacol, heat resistance of spores

