

Alicyclobacillus acidoterrestris

I. rész

A gyümölcslevek romlását okozó baktérium ismertetése (review)

Batáné Vidács Ildikó – Beczner Judit

ÖSSZEFOGLALÓ

AZ ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS THERMOACIDOFIL, NEM PATOGÉN, SPÓRAKÉPZŐ BAKTÉRIUM, AMELY AZ ELMÚLT ÉVEKBEK A PASZTÓRÖZÖTT GYÜMÖLCSLEVEK, ELSŐSORBAN ALMA- ÉS NARANCSLEVEK ESETÉBEN OKOZOTT PROBLÉMÁT. A MIKROBÁVAL KAPCSOLATOS KUTATÁSOK AZ ELMÚLT KÉT ÉVTIZEDBEN KEZDŐDTEK, FAJI BESOROLÁSA 1992-BEN TÖRTÉNT MEG. A MIKROBA MAGYARORSZÁGON IS AZ EGYIK LEGGYAKORIBB OKOZÓJA A GYÜMÖLCSLEVEK ROMLÁSÁNAK, AZONBAN ENNEK A TÉNYNEK A FELISMERÉSE OLYANNYIRA ÚJ KELETŰ, HOGY A KIMUTATÁSÁRA ÉS AZONOSÍTÁSÁRA SZABVÁNYOS MÓDSZER MÉG NEM ÁLL RENDELKEZÉSRE. A MIKROBA JELENTŐSÉGÉT AZ IS MUTATJA, HOGY SAJÁT EREDMÉNYEIKRE ÉS AZ IRODALMI ADATOKRA TÁMASZKODVA SILVA ÉS MUNKATÁRSAI 1999-BEN JAVASLATOT TETTEK ARRA, HOGY A SAVAS GYÜMÖLCSLEVEK ESETÉBEN A PASZTÓRÖZÉSI ELJÁRÁS MÉRTEZÉSÉNÉL A CÉLORGANIZMUS ENNEK A MIKROBÁNAK A SPÓRÁJA LEGYEN. ÍGY AZ ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS EZEN TERMÉKEK ESETÉBEN OLYAN FONTOSÁGÚ SZEREPHEZ JUTNA, MINT A CLOSTRIDIUM BOTULINUM A KONZERVIPARBAN. A CIKK ELSŐ RÉSZÉBEN A GYÜMÖLCSLÉ-FELDOLGOZÁS SZEMPONTJÁBÓL IGEN JELENTŐS MIKROBA TULAJDONSÁGAI T MUTATJUK BE.

INHALT

IN DEN VERGANGENEN JAHREN ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS, (THERMOACIDOPHYL, NICHT PATHOGENE, SPORENBILDENDE BAKTERIEN) VERURSACHTEN PROBLEMEN BEI DEN PASTEURISIERTEN FRUCHTSÄFTE, VOR ALLEM ÄPFEL- UND ORANGENSÄFTE WAREN BETROFFEN. DIE UNTERSUCHUNGEN DIESER BAKTERIEN SIND ERST IN DEN LETZTEN 20 JAHREN STARTET WORDEN, UND ARTGEMÄßER EINORDNEN PASSIERTE IM JAHRE 1992. IN UNGARN SIND DAS VERDERBEN DER FRUCHTSÄFTE AUCH AM HÄUFIGSTEN DURCH DIESEN MIKROBEN VERURSACHT, DA DIESE

Jellemzés

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* (1. ábra) thermoacidofil, nem patogén, spóraképző baktérium, amely az elmúlt években a pasztörözött gyümölcslevek, főként narancslé és almálé esetében okozott problémákat az élelmiszeriparban. A szakirodalomban csak az utóbbi években jelentek meg a pasztörözött, savas gyümölcslevek romlását okozó mikroorganizmusról cikkek, érthetően, hiszen 1984-ben izolálták először azt a hő- és savtűrő spóras baktériumot, amely az aszeptikusan gyártott almálé romlását (zavarosság, kellemetlen íz és illat) okozta (Cerny et al., 1984). A romlásért felelős izolált mikroorganizmust először *Bacillus acidoterrestris*-nek nevezték el (Deinhard et al., 1987). Ugyanakkor 1981-ben hasonló thermoacidofil baktériumot izoláltak Hippchen és munkatársai különböző talajmintákból, amelyekre sem a meleg, sem az aciditás nem volt jellemző. Később, 1992-ben Wisotzkey és munkatársai egy új faj, az *Alicyclobacillus* létrehozását javasolták azon jellemző alapján, hogy a természetes membrán lipid összetétel legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponensét ezeknél a mikroorganizmusoknál az ali-

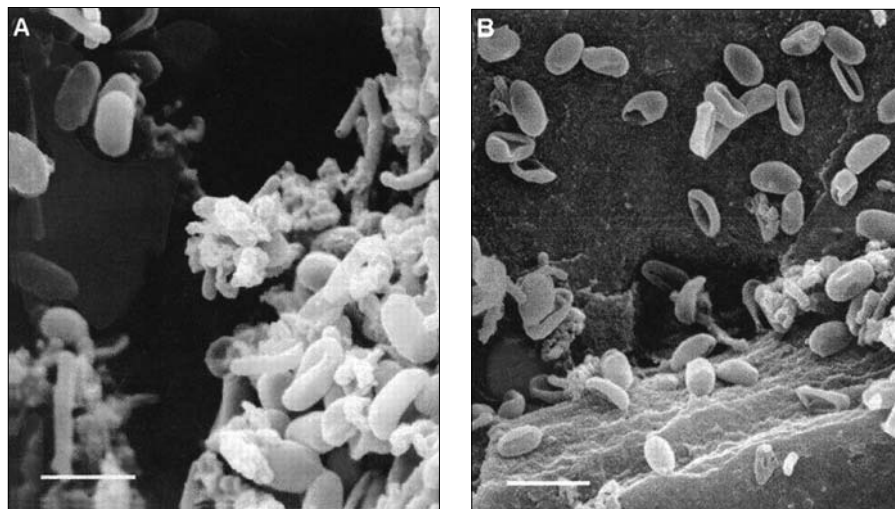
ERKENNTNISSE SIND ERST NEUE ENTDECKT, NOCH KEINE STANDARDISIERTEN NACHWEIS- UND IDENTIFIZIERUNGSMETHODEN STEHEN ZUR VERFÜGUNG.

AUF GRUND EIGENEN UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE UND AUCH LITERARISCHEN ANGABEN BEHAUPTEN SILVA UND MITARBEITERN, SEIEN DIESE MIKROBEN VON GROßEN BEDEUTUNG, DESHALB SCHLUGEN SIE VOR DIE SPOREN DIESER MIKROBE ALS ZIELORGANIZMUS, BEI BERECHNUNGEN DES PASTEURISIERUNGS- VERFAHREN VON SAUREN FRUCHTSÄFTE ZU BEACHTEN, SO WIE CLOSTRIDIUM BOTULINUM IN KONSERVIERUNGS- INDUSTRIE.

IM I. TEIL DES ARTIKELS DIE EIGENSCHAFTEN DIESEN, WEGEN FRUCHTSAFTVEARBEITUNG BEDEUTENDEN, MIKROBEN SIND DARGESTELLT.

SUMMARY

ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS IS A THERMOACIDOPHIL, NON-PATHOGENIC, SPOREFORMING BACTERIUM THAT CAUSES PROBLEMS IN PASTEURISED FRUIT – MOSTLY IN APPLE AND ORANGE – JUICES. THE RESEARCH ON THIS MICROBE HAS STARTED IN THE LAST TWO DECADES, AND IT HAS BEEN CLASSIFIED IN 1992. THE MICROBE IS RESPONSIBLE FOR THE MAJORITY OF THE SPOILAGE OF FRUIT JUICES IN HUNGARY AS WELL, BUT THE REALISATION OF THE PROBLEM IS SO RECENT THAT NO LEGISLATION ON THE DETECTION AND IDENTIFICATION IS AVAILABLE YET. THE SIGNIFICANCE OF THE MICROBE IS WELL PRESENTED BY SILVA ET AL. (1999) WHO MADE A PROPOSAL BASED ON THEIR OWN WORK AND DATA AVAILABLE IN THE LITERATURE TO USE ITS SPORES AS A TARGET MICROBE FOR SETTING THE PASTEURISATION PROCESS PARAMETERS OF ACIDIC FRUIT JUICES. THUS THE ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS WOULD PLAY THE SAME ROLE FOR THESE PRODUCTS AS CLOSTRIDIUM BOTULINUM DOES IN THE CANNED FOOD INDUSTRY. THE FIRST PART INTRODUCES THE CHARACTERISTICS AND SIGNIFICANCE OF THE MICROBE.



1. ábra. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A: kezeletlen spórák (rövid vastag pálcák) és vegetatív sejtek (vékony hosszú pálcák); B: nagy hidrosztatikus nyomás és hőkezelés kombinációjával kezelt károsodott spórák (Lee et al... (2002))

ciklusos zsírsavak alkotják. Ezeknek a zsírsavaknak köszönheti a mikroba azt a képességét, hogy túlél alacsony pH-n és magas hőmérsékleten is (Chang, 2003; Sinigaglia et al., 2003). Számos más szerző is beszámolt thermoacidofil baktériumok által okozott gyümölcsléromlásról (Baumgart et al., 1997; Borlinghaus és Engel, 1997; McIntyre et al, 1995;

Eiroa, 1999). Splittstoesser és munkatársai (1994) romlott almáléből izoláltak savas spóraképző baktériumot, amelyet később Pontius és munkatársai (1998) azonosítottak *Alicyclobacillus acidoterrestris*-ként. Yamazaki és munkatársai (1996) szintén sikeresen izolálták és azonosították a baktériumot romlott savas gyümölcslévekből. 1997-ben Pettipher

és munkatársai jelentettek spóracsírázást és szaporodást savas körülmények között, 30 °C-on tárolt alma- és narancslé esetében pedig Komitopoulou és munkatársai detektáltak szaporodást 1999-ben. Ezen beszámolók alapján Silva és munkatársai 1999-ben javaslatot tettek arra, hogy a savas gyümölcslevek esetében a pasztörözés méretezésénél a célorganizmus az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórája legyen. A pasztörözési kritériumok meghatározásának új módszerét egy cupuaçu nevű déligyümölcs pulpán tesztelték (Silva et al., 2000).

Az *A. acidoterrestris* gyümölcsle koncentrátumokban nem szaporodik, hanem elsősorban spóra formájában fordul elő. A spórákat is elpusztítani képes hőkezelés azonban károsítja a gyümölcsle koncentrátum táplálkozási és érzékszervi minőségét, kisebb mértékű kezelés esetén a túlélő spórák a sűrítmenyből készült hígított levekben gyorsan elszaporodnak (Lee et al., 2006; Bevilacqua et al., 2008).

Az *A. acidoterrestris* mozgásképes, pálcá alakú baktérium, Gram-pozitív, aerob, aerob körülmények között ovális endospórát képez, 5% w/v NaCl koncentráció felett szaporodni nem képes. A típus törzset (GD3B vagy DSM 3922 vagy NCIMB 13137 vagy ATCC 49025) 1981-ben kerti talajból izolálták Hippchen és munkatársai. Gyümölcskészítményekbe nagy valószínűség szerint a talajjal szennyezett, elégtelenül mosott gyümölcscsel kerülhet (Splittstoesser et al., 1994; Orr és Beuchat, 2000; Walls és Chuyate, 2000; Zierler et al., 2004). A DSM 2498-as törzset 1984-ben almából izolálták (Cerny et al., 1984). Az *A. acidoterrestris* növekedési határai *Bacillus acidocaldarius* tápközegben (BAM): hőmérséklet 25–60 °C, valamint pH 2.5–5.5 (Deinhard et al., 1987; Pinhatti et al., 1997; Previdi et al., 1995; Yamazaki et al., 1996). Vegetatív sejtjeinek szaporodási ciklusa gyors, exponenciális platójukat optimális pH-n 8–12 óra alatt eléri. Az *A. acidoterrestris* nem szaporodik nutrient, tripton-szója, BHI (Brain Heart Infusion) és VI (Veal Infusion) agaron, illetve táplevesben még abban az esetben sem, ha a tápközeg pH-ja 3.5 (Splittstoesser et al., 1994).

Izolálás

Previdi és munkatársai (1997) a következő módszerrel izolálták a mikroorganizmust gyümölcsléből: a gyümölcslévet, illetve hígított gyümölcslé koncentrátumot 80 °C-on 10 percig hőkezelték, majd 37 °C-on 7 napig inkubálták, hogy lehetőségét adjanak az *A. acidoterrestris* sza-

porodására. A mintát ezután 4.0-es pH-jú maláta kivonat agarra szélesztették. Pinhatti és munkatársai (1997) a fagyasztott gyümölcslé koncentrátumból tízszeres hígítást készítettek, majd 80 °C-on 10 percig hőkezelték. A mintákat 50 °C-on 24, illetve 48 órán keresztül inkubálta dúsítás céljából. Az *A. acidoterrestris* izolálását BAM agarral való lemezöntéssel végezték, a lemezeket 50 °C-on 24 órán keresztül inkubálták műanyag tasakokba zárva, hogy megakadályozzák a tápközeg kiszáradását. Számos olyan ipari gyümölcslé koncentrátumból és narancsléből sikerült kimutatniuk az *Alicyclobacillus* jelenlétét (>1.0×10² tke/ml), amelyen még a romlás jelei nem látszóttak. Azt a következtetést vonták le, hogy az *Alicyclobacillus* által okozott romlás eseti előfordulását, megfelelő szaporodási körülmények (alacsony pH, magas hőmérséklet) huzamosabb ideig történő fennállása mellett fordulhat elő.

Kimutatás és biokémiai azonosítás

A baktérium kimutatásához eleinte BAM agart használtak, hiszen Darland és Brock (1971) ezt a táptalajt alkalmazta a sav- és hőtűrő, először *Bacillus acidocaldarius*-ként meghatározott baktérium izolálására. Farland és munkatársai (1983) 1 ml nyomelem oldat hozzáadását javasolták a BAM agarhoz. Ezt használták a továbbiakban Deinhard et al. (1987), illetve Silva és munkatársai (1999) is, azzal a módosítással, hogy több glükózt (5 g/l) adtak a táptalajhoz a meghatározásnál. A tenyészetet 45 °C-on 3 napig inkubálták.

ABAM agar mellett a következő táptalajok használatosak az *A. acidoterrestris* kimutatására: agaros maláta kivonat (MEA), narancs-szérum agar (OSA, Merck, *A. acidoterrestris* 2498 kimutatására optimálva), thermoacidurans agar (TA) és burgonya dextróz agar (PDA). A baktérium spórái valóban jól csíráznak és szaporodnak 4.0-ás pH-ra beállított MEA táptalajon, OSA és TA tápközegben 37 °C-on 3–4 napig inkubálva (Previdi et al., 1995; Previdi et al., 1997). Petifer és munkatársai (1997) OSA táptalaj felületére szélesztették a mintát és 44 °C-on 48 órán keresztül inkubálták. A BAM és az OSA táptalajok hatékonyságának összehasonlítását Tabajdiné (2002) is elvégezte, az eredmények alapján az OSA bizonyult jobbnak. Mások PDA lemezen 43 °C-on 7 napig (Pontius et al., 1998; Splittstoesser et al., 1994), megint mások (Komitopoulou et al., 1999) pedig 44 °C-on 48 órán keresztül inkubálták.

Japánban az *A. acidoterrestris* detektálására a termoacidofil mikroba kimutatására kifejlesztett szelektív élesztő-keményítő-glükóz agart (YSG agar) használták (Motohiro és Hiroko, 1994). Ennek összetétele 1 l táptalajra számítva: 2 g élesztőkivonat, 2 g oldható keményítő, 1 g glükóz és 15 g agar. A pH-t 3.7-re állították. Az inkubálás 45 °C-on 3 napig tartott.

Yamazaki és munkatársai (2000) által kifejlesztett AAM (*Alicyclobacillus acidocaldarius Media*) agar összetétele: 1 g élesztő kivonat, 0.2 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g MgSO₄×7H₂O, 0.25 g CaCl₂×2H₂O, 0.6 g KH₂PO₄, 1.0 g glükóz és 1 l desztillált víz (PH = 4.0). A tenyészeteket 46 °C-on 3 napig inkubálták.

A K agar (2.5 g élesztő, 5.0 g pepton, 1.0 glükóz, 1.0 g Tween 80, 15 g agar és 1 l ionmentes víz) (Walls és Chuyate, 2000) összetételének és a tenyésztési körülmények optimalizálását Chang és Kang (2005) végezte el. Vizsgálataik alapján az optimális inkubálási hőmérséklet 43 °C volt. Nagyobb hőmérsékleten (55 °C) a telepek kisebbek voltak. A legjobb szaporodást 4.5-ös pH-n mérték, azonban ez a pH nem elegendően kicsi ahhoz, hogy a tápközeg szelektivitását biztosítsa. A kompromisszumos megoldás a 4.0-ás pH volt. Az aszkorbinsav, citromsav, sósav, tejsav, almasav és borostyánkősav közül a 10%-os borostyánkősav bizonyult legmegfelelőbbnek a tápközeg pH-jának beállítására. Egy ml Tween 80 hozzáadása javította a mikroba kimutathatóságát és növelte a telepek méretét. A kalcium, magnézium, vas, és mangán ionok hatását nézve *Alicyclobacillus* spp. szaporodására, csak a kalcium jelenléte a tápközegben okozott számottevő javulást. Az ajánlott koncentráció 0.5 g l⁻¹ Ca²⁺. Az így módosított összetétel (SK): 5.0 g pepton, 2.5 g élesztőkivonat, 1.0 g glükóz, 15 g agar, 1.0 ml Tween 80 1 l deionizált vízben sterilizelve, a 0,5 g l⁻¹ Ca²⁺ ionkoncentráció beállítása szűrővel sterilizett 10%-os (t/tf) CaCl₂-dal történt, a pH 4.0 beállítása steril 10%-os borostyánkősav oldattal történik. Az optimált tenyésztési körülmények mellett ezt az új tápközeg az eredeti K, OSA, illetve PDA közegekkel összehasonlítva 3–4-szer jobb kitenyésztést értek el.

Murray és munkatársai (2007) tíz agar megfelelőségét hasonlították össze az *A. acidoterrestris* hat, az *A. acidocaldarius* három és az *A. cycloheptanicus* egy törzse segítségével. A K agar, az *Alicyclobacillus* közeg (ALI agar), és a Termofil *Bacillus acidoterrestris* (BAT) agar eredményezte a legmagasabb spóraszámot. A Narancsszérum agar és a Hiraishi glü-

köz élesztőkivonat agar adta a legrosszabb teljesítményt. A szélesztéses módszer minden esetben megfelelőbbnek bizonyult a lemezöntésnél, a 43 °C illetve az 50 °C egyaránt megfelelő volt a spórátztásra. Az eredmények alapján a legmegfelelőbb kimutatási eljárásként a BAT agarra történő szélesztést és 43 °C-on 3 napig történő inkubálást javasolják. Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* biokémiai azonosításával számos kutató foglalkozott (Walls és Chuyate, 1998; Yamazaki et al., 1996). Az API 50 CH tesztzel történő vizsgálatok (Deinhardt et al., 1987; Previdi et al., 1995; Silva et al., 1999, 2000) eredményét Silva és Gibbs (2001) összegezte táblázatos formában: mindegyik vizsgált *A. acidoterrestris* izolátum/törzs savat képezett a következő szénhidrátokból: glicerol, erythritol, L-arabinóz, ribóz, D-xylóz, galaktóz, glükóz, fruktóz, mannóz, ramnóz, manitol, eszulin és cellobióz. Az *A. acidoterrestris*-hez nagyon hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, könnyen megkülönböztethető, mivel nem fermentálja az eritriolt (Deinhardt et al., 1987).

Alicyclobacillus spórák előállítás

Az *A. acidoterrestris* spórák előállítására Silva és munkatársai (1999) dolgoztak ki módszert, Yamazaki (Hokkaido Egyetem, Japán) spórátztató közegét felhasználva. A spórátztató tápközeg a következő két komponensből áll: (i) 1 g élesztő kivonat, 0,2 g (NH₄)₂SO₄, 0,25 g CaCl₂, 0,5 g MgSO₄, 1 g glükóz, 0,6 g KH₂PO₄ és 500 ml desztillált víz, 4,0-ás pH-ra állítva H₂SO₄ felhasználásával; (ii) 20 g agar és 500 ml desztillált víz. A két komponenst külön-külön sterilizték (121 °C-on 10 perc), 50 °C-ra lehűtötték, majd összekeverték. A tápagart 150 ml-enként 500 ml-es lapos orvosi üvegekbe (Bernard Muller, London, UK) öntötték, majd vízszintre állítva hagyták megszilárdulni. A spórátztató tápleves ugyanezen recept alapján készült az agar kihagyásával, 1000 ml desztillált víz hozzáadásával. Az *A. acidoterrestris*-t tartalmazó spórátztató táplevest egy éjszakán át 45 °C-on inkubálták. A szuszpenziót a spórátztató agar felületére szélesztették és 45 °C-on 2–3 napig inkubálták laza kupakkal, hogy ne akadályozzák a levegőcserét. Fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőrizték a spóráképződést. A spórák kinyerése: steril 2–3 mm átmérőjű üvegyöngyöket (annyit, hogy teljesen beborítsa a spórátztató agar felületét) töltöttek az üvegekbe, majd 10 ml steril desztillált víz hozzáadásával rázogatták. Ezt az el-

járást ötször megismételték, hogy biztosítsák a spórák teljes eltávolítását a felületről. A spórasuszpenziót leöntötték az üvegyöngyökről, majd lecentrifugálták (15 perc, 21.000 g, 4 °C). Leöntötték a felülúszót, a visszamaradó részt pedig 50%-os (v/v) víz és etanol eleggyel felfelfüggyalták a vegetatív sejtek elpusztítása céljából. A spórasuszpenziót 30–60 perc után újra centrifugálták, elöntötték a felülúszót és steril desztillált vízben felfelfüggyalták a visszamaradó szilárd részt (ezt az eljárást háromszor ismételték meg). A végső visszamaradó közeget steril desztillált vízben vették fel, 4 °C-on legalább egy hétig tárolták, mielőtt elvégezték a csíraszámolást hőkezeléssel (80 °C-on 10 perc) és hőkezelés nélkül is. Más szerzők MEA és PDA közegeket is használtak spórákésztéshez. MEA lemezekon 50 °C-on 4–5 napig spórátztattak (Previdi et al., 1995), PDA lemezekon pedig 43 °C-on 6 napig tartott az eljárás (Pontius et al., 1998; Splittstoesser et al., 1994).

A mikroba szaporodása

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* szaporodása lassú (akár 5 nap is lehet), de ez a mikroorganizmus felelős a forgalomban lévő gyümölcslevek esetleges mellékízéért és kellemetlen, gyógyszerre emlékeztető, szagaért. A romlás szemmel történő megállapítása nehézségekbe ütközik, ugyanis a mikroba nem termel gázt, így a tároló edényzet puffadása nem jelezheti a romlást (Walls, 1997; Silva et al., 1999; Sinigaglia et al., 2003), esetenként zavarosodás, illetve fehér üledék képződése tapasztalható. Valójában a gyártók nem is kerültek szembe ezzel a problémával egészen addig, míg a fogyasztók részéről nem érkezett panasz (Walls és Chuyate, 1998). Spórácsírázás és a mikroba felszaporodása egészen 10⁶ tke/ml koncentrációig 44 °C-on tárolt narancslében 24 óra alatt megtörténik, és 10⁵–10⁶ tke/ml *A. acidoterrestris* jelenléte narancs- és almalében már olyan mennyiségű gvajakolt termelt, amely már érzékszervileg is tapasztalható változást okozott (Pettipher et al., 1997). Ezt az izváltozást tapasztalták Komitopoulou és munkatársai (1999) 30 °C-on 4 napig tárolt alma- narancs- és grapefruitlevek esetében, ahol a csíraszám a tárolás alatt 10²-ről 10⁵ tke/ml-re emelkedett. Ugyanezt tapasztalták VF és WAC törzsek esetében 43 °C-on 2 napig tárolt almalében (pH = 3,5), paradicsomlében (pH = 4,0) és különböző fehérszőlő levekben (pH = 2,8–3,4), grapefruitban, valamint a VF törzsek növekedtek grape-

fruitlében (pH = 3,1), narancslében (pH = 3,6) és ananászlében (pH = 3,6) is (Splittstoesser et al., 1994). Az ő tapasztalataik szerint a mikroba szaporodását a nagy összes oldható szilárdanyag tartalom gátolta. Piros szőlőben nem tudtak szaporodást kimutatni, amiből arra lehet következtetni, hogy bizonyos fenolos vegyületek gátolhatják az *A. acidoterrestris* spóráinak csírázását, illetve a szaporodását. Ezt tapasztaltuk saját kísérleteinkben is, ahol a piros szőlőléhez adott vegetatív sejtek igen rövid idő alatt bespórátztak (Beczner et al., nem közölt adat).

Tovább nehezíti a mikroba kimutatását, hogy nem minden *Alicyclobacillus* termel gvajakolt (Chang, 2003). Gvajakolt jelenlétének analitikai kimutatására Zierler és munkatársai (2004) dolgoztak ki és validáltak módszert.

Jelen pillanatban nagyon sok eljárás található az irodalomban a mikroorganizmus kimutatására. Ilyen a mikroszkopikus meghatározás, amely morfológiai jellemzésen alapul, érzékszervi (illat) meghatározás (Pettipher és Osmundson, 2000), biokémiai analízis, molekuláris módszerek: PCR vagy 16S rRNS gén szekvencia analízis (Yamazaki et al., 1997b, Murakami et al., 1998), valamint membránszűréssel kombinált optimált táptalajon történő tenyésztés (Chang, 2003). Lin és munkatársai (2005) Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) segítségével tettek kísérletet almaléből izolált *Alicyclobacillus* törzsek azonosítására és annak meghatározására, hogy egy adott törzs termel-e gvajakolt.

Az *Alicyclobacillus*-ok közül azonban nemcsak az *A. acidoterrestris* jelenléte okozhat kellemetlen mellékízéket. Matsubara és munkatársai (2002) azt találták, hogy narancsléből izolált *A. acidophilus* hasonló jellegű, kellemetlen mellékízzel párosuló romlást idézett elő. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a savas italok romlását okozó mikroorganizmusok esetében a kutatást ki kell terjeszteni a *Alicyclobacillus* család minden tagjára.

A nizin hatása

Közismert, hogy a nizin (a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* által termelt antimikrobás hatású polipeptid) gátló hatással van a Gram-pozitív, spóráképző baktériumok csírázására és szaporodására. Mivel a vegyület 3-as pH-n és 115 °C-on történő hőkezelés után is megőrzi aktivitását, Yamazaki és munkatársai (2000) kísérletet tettek alacsony pH-jú italokban *A. acidoterrestris* nizzinnel történő viszszaoszorítására. Az *A. acidoterrestris* tör-

zsek érzékenysége a nizinre változó. Kis, 3,4 és 4,2 pH esetben a minimális gátló koncentráció vegetatív sejtek esetében 1,56–25 IU ml⁻¹ és 25–100 IU ml⁻¹, a spórák érzékenyebbek a nizinre, itt a gátló koncentráció az adott pH-értékeken 0,78–12,5 IU ml⁻¹ és 25–100 IU ml⁻¹ volt. Vizsgálataik alapján a 25–50 IU ml⁻¹ koncentrációban hozzáadott nizin gátolta az *A. acidoterrestris* mikroba szaporodását minden vizsgált kis pH-jú italban (narancslevek, vegyes gyümölcslevek) a szűrt almaitalok kivételével. A szűrt almalevek esetében tapasztalt kisebb hatékonyság egyik lehetséges magyarázata a szerzők szerint, hogy a szűréssel az almalé polifenol tartalma csökken, és a nizin és a polifenolok együttes hatása így nem érvényesülhetett. Walker és Phillips (2008) eredményei azt mutatják, hogy almalében 30 °C-on 0,1 mg/ml nátrium-benzoát vagy kálium-szorbát képes megakadályozni 10¹ sejt/ml koncentrációban jelenlévő *A. acidoterrestris* növekedését, 0,5 mg/ml koncentrációban a 10⁴ sejt/ml sejt koncentráció ellen is hatásos. A nizin 5–10 IU/ml koncentrációban egymagában is, de nátrium-benzoáttal vagy kálium-szorbáttal kombinálva szintén jelentős gátló hatást mutat.

A nizin alternatívája lehet az *Enterococcus faecalis* A-48-32 által termelt AS-48 bakteriocin. Grande és munkatársai (2005) megállapították, hogy már 2,5 µg/ml mennyiségben a hozzáadott bakteriocin elégségesnek bizonyult gyümölcslevekben az endospórák kihajtásának gátlására.

A nagy hidrosztatikus nyomás hatása

Alpas és munkatársai (2003) a nagy hidrosztatikus nyomás (HHP) hatását gyümölcslevekben vizsgálva kimutatták, hogy a vegetatív sejtek előre jelezhető módon 2–3 nagyságrendnyi pusztulása idézhető elő 350 és 450 MPa alkalmazásával, olyan hőmérsékleten is, amelyen normális esetben szaporodni is képes lenne a mikroba. Egy további munkájukban a nagy hidrosztatikus nyomás és az enyhe hőkezelés (35, 45 és 50 °C) hatásának matematikai modellezésével foglalkoztak *A. acidoterrestris* vegetatív sejteket használva (Buzrul et al., 2005). Az alkalmazott Weibull-modell arra is alkalmas, hogy a kapott pusztulási görbe alapján a túlélő sejtek sérülésére is következtetni lehessen (van Boekel, 2002). Ennek alapján arra következtetésre jutottak, hogy a kombinált kezelés az érzékeny, vagy egyébként is sérült sejteket elpusztította, míg a túlélő frakció rezisztens a

kezeléssel szemben. Lee és munkatársai (2006) megállapították, hogy a spórák inaktiválása általában két lépésben megy végbe HHP hatására: az első lépésben a nagy nyomás a spórák csírázását indukálja, míg a második lépésben a nagy nyomást a csírázó spórát inaktiválja. A nyomás-indukált csírázása erősen hőmérsékletfüggő – 10 °C alatt nem következik be, az optimum 40–50 °C (Wuytack et al., 2002). A cukor és a szárazanyagtartalom is befolyásolja a HHP hatását: gyümölcslel koncentrációjában (70 °Brix) esetében a nagy nyomású kezelésnek nem volt hatása (Lee et al., 2006).

A spórák hőérzékenysége

A spórák hőérzékenységét nem befolyásolja a spóráztató közeg különböző divalens kation tartalma (Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, Sr²⁺), és a spórák demineralizációja, illetve remineralizációja sem okoz változást (Yamazaki et al., 1997a). A logaritmus csírászám-változás az idő függvényében nem mutat válszakaszt, a görbe nem tér el a lineáristól (Pontius et al., 1998; Previdi et al., 1997; Silva et al., 1999). A szerves sav minősége (almasav, citromsav, borostyánkősav) jelentősen nem befolyásolta a D-értékeket (a spóra populáció tizedre csökkenési idejét) (Pontius et al., 1998). Silva és munkatársai (1999) a pH (2,5–6,0), az összes oldható szilárdanyag tartalom (5–60 °Brix) és a hőmérséklet (85–97 °C) hatását hatásfelület analízis segítségével tanulmányozták az *A. acidoterrestris* törzsek D-értékeire. Amint várható volt, legnagyobb mértékben a hőmérséklet befolyásolta a D-értékek alakulását. A D-értékek a pH és °Brix emelkedésével főleg kis hőmérsékleteken enyhén, lineárisan csökkentek, de a 97 °C-hoz közeli hőmérsékleteken ezek hatása már elhanyagolható volt. A válaszfelület analízis polinomiális modelljének alkalmazása esetén a prediktív D-értékek kisebbek voltak, mint a gyümölcsleveknél tapasztaltak, ezért a gyakorlatban próbakísérleteket kell végezni a számított D-értékek ipari bevezetése előtt. A pH D-értékre gyakorolt hatásának kérdésében ellentmondások olvashatók az irodalomban: egyesek úgy találták, hogy a 2,5–6,0-ig terjedő pH tartományban semmilyen hatás nem tapasztalható (Yamazaki et al., 1997b), míg mások jelentős különbségeket mértek alacsony hőmérsékleteken 2,8 és 4,0 pH között (Pontius et al., 1998). Az eredményeket Silva és Gibbs (2001) táblázatban foglalták össze. Általánosságban elmondható, hogy a D_{95°C}-

értékek 0,06 és 5,3 perc között, a z-értékek pedig 7,2 és 12,9 °C között mozogtak. Érdekes megfigyelés volt Vieira és munkatársai (2002) részéről, hogy a kísérletek 4 hónap, illetve 8 hónap utáni megismétlésénél, ugyanazon, –18 °C-on tárolt, szuszpenzióból kiindulva, a z-értékben jelentős (négyeszeres) növekedés volt megfigyelhető a tárolási idő függvényében. A szerzők ezt a spóraszuszpenzió fagyasztás alatti tárolása során bekövetkező öregedésével magyarázzák. Bahceci és Acar (2007) a pH, hőmérséklet és aszkorbinsav koncentráció hatását vizsgálták *A. acidoterrestris* spórák D-értékére. Silva és munkatársaihoz hasonlóan azt találták, hogy a hőmérsékletnek a pH-hoz képest háromszor akkora hatása volt a D-érték alakulására. Az almalevekben és nektárookban mért D-értékek azonos pH-n nagyobbak voltak, mint a puffertolt közegben mért értékek: 11,1 (90 °C) és 0,7 (100 °C) perc között almalében, 14,1 (90 °C) és 1,0 (100 °C) perc között aszkorbinsav hozzáadásával almanektárban és 14,4 (90 °C) és 1,2 (100 °C) perc között aszkorbinsav hozzáadása nélkül almanektárban. A spórák z-értéke 8,2 és 9,2 °C között volt, jelentős különbséget nem tapasztaltak a különböző közegekben. Ők is felhívják a figyelmet arra, hogy az iparban használatos pasztörözési eljárást az *A. acidoterrestris* spórák túlélhetik, ennek figyelembevételével kell a gyümölcslevek és nektárok hőkezelési paramétereit meghatározni.

Javaslat a gyümölcslevek pasztörözési technológiájára

Gyümölcslevek esetében a pasztörözési eljárás kidolgozásánál Silva és munkatársai (2000) az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spóráit javasolják referencia mikroorganizmusként, az alábbi megfontolásokról: (i) a többi mikroorganizmus (vegetatív, illetve spóra formában) hőrezisztenciája sokkal kisebb, (ii) az *A. acidoterrestris*-en kívül jelenleg nem ismerünk más olyan mikroorganizmust, amely csírázni, szaporodni és romlást okozni képes nagy savtartalmú gyümölcsstermékekben. A pasztörözési eljárásnál olyan P-értéket (pasztörözési érték) követelnek meg általában, amely a célorganizmus számának 2D, illetve 3D (tizedre csökkenés) csökkenését eredményezi. Tekintettel az *A. acidoterrestris* spóráinak igen nagy hőrezisztenciájára, Silva és munkatársai (2000) 1D P-értéket is elégségesnek ítélték meg cupuaçu gyümölcs pulp esetében. A termokinetikus paramétereket Vieira és munkatársai

(2002) határozták meg, illetve hasonlították össze az irodalomban megtalálható adatokat.

Irodalom

- Alpas, H., Alma, L. és Bozoglu, K. (2003): Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 619–623.
- Bahceci, K. S. és Acar, J. (2007): Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 266–273.
- Baumgart, J., Husemann, M. és Schmidt, C. (1997): *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage bases. *Flussiges Obst*, 64, 178–180.
- Beczner J., Bata-Vidács I., Ledenski J.: nem közölt adat.
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M. és Corbo, M. R. (2008): *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. A review. *Int. J. Fd Microbiol.*, doi:10.1016/j.ij. foodmicro.2008.02.030.
- Borlinghaus, A. és Engel, R. (1997): *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies – method development and validation. *Fruit Process*, 7, 262–265.
- Buzrul, S., Alpas, H. és Bozoglu (2006): Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperature. *Food Research Int.*, 38, 151–157.
- Chang, S. S. (2003): Optimisation of *Alicyclobacillus* spp. isolation procedures [Master thesis]. Pullman, WA: Washington Stone University.
- Chang, S. S. és Kang, D. H. (2005): Development of novel *Alicyclobacillus* spp. isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1051–1060.
- Cerny, G., Hennlich, W. és Poralla, K. (1984): Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. *Z. Lebensmitt. Unters. Forsch.*, 179, 224–227.
- Darland, G., és Brock, T. D. (1971): *Bacillus acidocaldarius* occurrence, importance and detection in beverages and raw materials for beverages. *Flussiges Obst*, 64, 178–180.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K. és Altan, E. (1987): *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 47–53.
- Eiroa, M. N. U., Junquera, V. C. A. és Schmidt, F. L. (1999): *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, 62, 883–886.
- Farrand, S. G., Linton, J. D., Stephenson, R. J. és MacCarthy, W. V. (1983): The use of response surface analysis to study growth of *Bacillus acidocaldarius* throughout the growth range temperature and pH. *Arch. Microbiol.*, 135, 272–275.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E. és Gálvez, A. (2005): Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. of Food. Microbiol.*, 104, 289–297.
- Hippchen, B., Röhl, A. és Poralla, K. (1981): Occurrence in soil of thermoacidophilic Bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology*, 129, 53–55.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J. és Adams, M. R. (1999): *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science Technology*, 34, 81–85.
- Lee, S. Y., Dougherty, R. H. és Kang, D. H. (2002): Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4158–4161.
- Lee, S. Y., Chung, H. J. és Kang, D. H. (2006): Combined treatment of high pressure and heat killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *J. Fd Prot.*, 69, 1056–1060.
- Lin, M., Al-Holy, M., Chang, S., Huang, Y., Gavinati, A. G., Kang, D. és Rasco, B. A. (2005): Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Microbiology*, 105, 365–376.
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M. és Yamasato, K. (2002): *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1681–1685.
- McIntyre, S., Ikawa, J. Y., Parkinson, N., Haglund, J. és Lee, J. (1995): Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *J. Food Protect.*, 58, 319–321.
- Motohiro, N. és Hiroko, S. (1994): Selective culture medium for detecting thermotolerant acid-fast bacillus and its detection. Patent application number 06–283459, *Japanese Patent Office*.
- Murakami, M., Tedzuka, H. és Yamazaki, K. (1998): Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiology*, 15, 577–582.
- Murray, M. B., Gutler, J. B., Ryu, J., Harrison, M. A. és Beuchat, L. R. (2007): Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 59–69.
- Orr, R. V. és Beuchat, L. R. (2000): Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of Food Protection*, 63, 1117–11122.
- Pettipher és Osmundson, (2000): Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Aust.*, 57, 293–295.
- Pettipher, G. L., Osmundson, M. E. és 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. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 185–189.
- Pinhatti, M. E. M. C., Variante, S., Eguchi, S. Y. és Manfino, G. P. (1997): Detection of acidothermophilic Bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing*, 7, 350–353.
- Pontius, A. J., Rushing, J. E. és Foegeding, P. M. (1998): Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. Food Prot.*, 61, 41–46.
- Previdi, M. P., Colla, P. és Vicini, E. (1995): Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore-forming thermophilic acidophilic bacterium. *Indust. Conserve*, 70, 128–132.
- Previdi, M. P., Quintavalla, S., Lusardi, C. és Vicini, E. (1997): Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. *Indust. Conserve*, 72, 353–358.
- Silva, F. M. és Gibbs, P. (2001): *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 68–74.
- Silva, F. M., Gibbs, P., Vieira, M. C. és Silva, C. L. M. (1999): Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 95–103.
- Silva, F. M., Gibbs, P. és Silva, C. L. M. (2000): Establishing a new pasteurization criterion based on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores for shelf-stable high-acid fruit products. *Fruit Processing*, 10, 138–141.
- Sinigaglia, M., Corbo, M. R., Altieri, C., Campaniello, D., D'Amato, D. és Bevilacqua, A. (2003): Combined effects of temperature, water activity, and pH on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of Food Protection*, 66, 2216–2221.
- Splittstoesser, D. F., Churey, J. J. és Lee, C. Y. (1994): Growth characteristics of aciduric spore-forming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Prot.*, 57, 1080–1083.
- Tabajdiné, P. V. (2002): Gyümölcslevek aktuális kérdései. *Ásványvíz Úditóval Gyümölcsleves Alkoholmentes Italok*, 3–4, 51–52.
- Vieira, M. C., Teixeira, A. A., Silva, F. M., Gadpar, N. és Silva, C. L. M. (2002): *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *Int. J. of Food Microbiol.*, 77, 71–81.
- Walker, M. és Phillips, C. A. (2008): The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and Propionibacterium cyclohexanicum in fruit juice. *Food Control*, 19, 974–981.
- Walls, I. (1997): *Alicyclobacillus* – an overview. In Session 36-1 presented at Institute of Food Technologists Annual Meeting, Orlando, USA, 14–18 June 1997.
- Walls, I. és Chuyate, R. (1998): *Alicyclobacillus* – historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food Environ. Sanit.*, 18, 499–503.
- Walls, I. és Chuyate, R. (2000): Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *J. AOAC Int.*, 83, 1115–1120.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., Fox, G. E., Deinhard, G. és Poralla, K. (1992): Comparative sequence analyses 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.*, 42, 263–269.
- Wisse, C. A. és Parish, M. E. (1998): Isolation and enumeration of spore-forming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy Food Environ. Sanit.*, 8, 504.
- Yamazaki, K., Tekuda, H. és Shinano, H. (1996): Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 543–545.
- Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N. és Shinano, H. (1997a): Influence on sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 153–156.
- Yamazaki, K., Isoda, C., Tedzuka, H., Kawai, Y. és Shinano, H. (1997b): Thermal resistance and prevention of spoilage bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris*, in acidic beverages. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 44, 905–911.
- Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N. és Matsuda, T. (2000): Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiology*, 17, 315–320.
- Zierler, B., Siegmund, B. és Pfannhauser, W. (2004): Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520, 3–11.

Szerző: Batáné dr. Vidács Ildikó és dr. Beczner Judit
Központi Élelmiszertudományi Kutatóintézet, Budapest