



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΠΜΣ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη

*Αξιολόγηση της παρουσίας και ανάπτυξης του *Alicyclobacillus* spp. σε φυσικό χυμό πορτοκάλι*

Κατσάρη Α. Βασιλική

Επιβλέπων καθηγητής: Νυχάς Γ.Ι., Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2017



Μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη

*Αξιολόγηση της παρουσίας και ανάπτυξης του *Alicyclobacillus spp.* σε φυσικό χυμό πορτοκάλι*

Κατσάρη Α. Βασιλική

Επιβλέπων καθηγητής: Νυχάς Γ.Ι., Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη εξεταστικής επιτροπής :

Πανάγου Ε., Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Σκανδάμης Π., Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ευχαριστίες

Η παραπάνω πτυχιακή διατριβή έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Νυχά Γ.Ι. Η συμβολή του κ. Νυχά στην καθοδήγηση και ολοκλήρωση της εργασίας ήταν πολύ σημαντική και θέλω να τον ευχαριστήσω επίσης για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου να αναλάβω μια πειραματική μελέτη στο εργαστήριό του.

Ακόμα ευχαριστώ την κ. Αλεξάνδρα Λιανού που χωρίς τη βοήθεια της η επίτευξη αυτής της πτυχιακής μελέτης θα ήταν αδύνατη. Η συνεργασία μας ήταν καθοριστική καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων και κυρίως την κ. Αγάπη Δουλγεράκη, την κ. Πάτρα Σουρρή, την κ. Ελένη Λαμπρινέα και την κ. Παρασκευή Μερκούρη για τη σημαντική συμβολή τους την πραγμάτωση αυτής της μελέτης. Το κλίμα εντός του εργαστηρίου ήταν ιδιαίτερα φιλικό που με βοήθησε στην ήρεμη και αποδοτική πραγμάτωση του πειραματικού έργου.

Ευχαριστώ, τέλος, την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ψυχολογική υποστήριξη και την υπομονή τους μέχρι την κατάθεση και παρουσίαση της παρούσας μελέτης.

Περίληψη

Το γένος *Alicyclobacillus* περιλαμβάνει είδη σπορογόνων βακτηρίων τα οποία έχουν συσχετισθεί με την αλλοίωση και ποιοτική υποβάθμιση χυμών φρούτων και αναψυκτικών. Παρά το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα προϊόντα δεν θεωρούνται ιδιαιτέρως ευπαθή στη βακτηριακή αλλοίωση, κυρίως λόγω της υψηλής οξύτητάς τους, από το 1982, οπότε και απομονώθηκε το πρώτο είδος *Alicyclobacillus* από παστεριωμένο χυμό μήλου, μέχρι και σήμερα, ο έλεγχος αλλοιογόνων βακτηρίων του συγκεκριμένου γένους έχει αναχθεί σε σημαντικό θέμα για την παγκόσμια βιομηχανία χυμών και αναψυκτικών. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν 58 δείγματα 100% φυσικού χυμού πορτοκαλιού, μικρής και μακράς διάρκειας, για την παρουσία *Alicyclobacillus* spp., και ακολούθησε ταυτοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων με μοριακές τεχνικές. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα εμβολιασμός θρεπτικού ζωμού και χυμού με μίγμα δύο στελεχών *Alicyclobacillus acidoterrestris*, και αξιολογήθηκε η ανάπτυξη του βακτηρίου στους 25 και 45°C για 10 ημέρες και 72 h, αντίστοιχα. Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις του ζωμού και του χυμού, οι οποίες πραγματοποιούνταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους στις παραπάνω θερμοκρασίες, έλαβε χώρα και προσδιορισμός του ποσοστού οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα με τη χρήση ειδικών αισθητήρων, ούτως ώστε να διερευνηθεί η συσχέτιση των ποσοστών αερίων με αυτή της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris*. Οι αισθητήρες O₂ και CO₂ είχαν τοποθετηθεί τόσο εντός του ζωμού/χυμού όσο και πάνω από την επιφάνεια του υγρού (μεσοδιάστημα υγρού-καπάκι περιέκτη). Παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις και τις μετρήσεις αερίων, πραγματοποιούνταν και μετρήσεις των τιμών pH, ενώ επίσης λήφθηκαν δείγματα από κάθε περίπτωση (υπόστρωμα ανάπτυξης και θερμοκρασία επώασης) για χημική ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με στόχο την ανίχνευση γουαϊακόλης. Σύμφωνα με τα ληφθέντα πειραματικά δεδομένα, από τα δείγματα χυμών που εξετάστηκαν απομονώθηκαν συνολικά 23 αποικίες εν δυνάμει *Alicyclobacillus*. Μέσω της μεθόδου IFU για την επιβεβαίωση των πιθανών *Alicyclobacillus* που βασίζεται στη διενέργεια δοκιμών ανάπτυξης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και τη χρήση μοριακών τεχνικών 16S rDNA PCR- RFLP επιβεβαιώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 8 δείγματα εκ των οποίων τα 4 πρόκειται για *Alicyclobacillus acidoterrestris* και τα υπόλοιπα 4 για *Alicyclobacillus hesperidium*. Η χρήση αισθητήρων O₂ και CO₂ έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την συσχέτιση με την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και συγκεκριμένα όταν οι αισθητήρες O₂ είχαν τοποθετηθεί εντός του ζωμού/χυμού και οι αισθητήρες CO₂ πάνω από την επιφάνεια του υγρού. Τόσο στους 25°C όσο και στους 45°C τα ποσοστά O₂ ακολούθησαν φθίνουσα πορεία, ενώ το CO₂ εκθετική κατά την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και παρέμειναν στάσιμα όταν σταθεροποιήθηκε και ο πληθυσμός του βακτηρίου. Τέλος, κατά την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή γουαϊακόλης στα δείγματα που επωάστηκαν τόσο στους 25 όσο και στους 45°C.

Λέξεις- κλειδιά : *Alicyclobacillus* spp, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, γουαϊακόλη, μέθοδος IFU, 16S rDNA PCR- RFLP, αισθητήρες O₂, αισθητήρες CO₂.

Abstract

Alicyclobacillus is a genus of spoilage bacteria causing contamination of juices and other beverage products that cannot easily be contaminated by other microbes because of their high acid contents. During the last decades since the first species of *Alicyclobacillus* was isolated from pasteurized apple juice in 1982, *Alicyclobacillus* has become a major concern and challenge to the global juice and beverage industries of its detection and control. In this study, 58 samples of 100% natural orange juice, short and long lasting, were tested for the presence of *Alicyclobacillus* spp., followed by identification of bacterial isolation by molecular techniques. Then, broth and juice vaccination was carried out with a mixture of two strains of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and growth of the bacterium was assessed at 25 and 45°C for 10 days and 72 h, respectively. Alongside with the microbiological analyzes of the broth and the juice, which were performed at regular intervals during their maintenance at the above temperatures, oxygen and carbon dioxide were determined using specific sensors to investigate the correlation of percentages of oxygen and carbon dioxide with that of *A. acidoterrestris* growth. Oxygen and carbon dioxide sensors were placed both inside the broth / juice and above the liquid surface (liquid-container interval). Alongside with microbiological analyzes and gas measurements, pH measurements were also realized while samples were taken from each case (growth substrate and incubation temperature) for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis to detect guaiacol. According to the received experimental data, a total of 23 colonies of potential *Alicyclobacillus* were isolated from the juice samples tested. Via the IFU method for the confirmation of possible *Alicyclobacillus* based on the growth assays at different temperatures and the use of 16S rDNA PCR-RFLP molecular techniques, 8 samples were confirmed and identified, of which 4 were *Alicyclobacillus acidoterrestris* and the remaining 4 were *Alicyclobacillus hesperidium*. The use of O₂ and CO₂ sensors gave encouraging results as for the correlation with the growth of *A. acidoterrestris* and concretely when O₂ sensors were placed inside the broth / juice and CO₂ sensors above the surface of the liquid. Both while being at 25°C and 45°C the percentages of O₂ followed declining course, while those of CO₂ followed an exponential course during the growth of *A. acidoterrestris* and they remained stagnant when the population of bacteria was stabilized. Finally, during the high performance liquid chromatography, production of guaiacol in the samples which were incubated both 25 and 45°C was not detected.

Keywords: *Alicyclobacillus* spp, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, guaiacol, IFU method, 16S rDNA PCR- RFLP, O₂ sensors, CO₂ sensors.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	7
1.Θεωρητικό μέρος	8
1.1. <i>Alicyclobacillus</i>	8
1.2.Συντμήσεις για το <i>Alicyclobacillus</i> spp.	8
1.3. Ιστορικά στοιχεία, πηγή μόλυνσης, αλλοίωση και παραγωγή γουαϊακόλης.	9
1.3.1. Ιστορικά στοιχεία	9
1.3.2. Πηγή	10
1.3.3. Αλλοίωση.....	10
1.3.4. Παραγωγή γουαϊακόλης	11
1.4. Ταξινόμηση των <i>Alicyclobacillus</i>	13
1.5. Σπόρια	14
1.6. Παθογένεια	15
1.7. Χυμός φρούτων	15
1.7.1. Μικροβιακή μόλυνση.....	15
1.7.2. Η παστερίωση του χυμού φρούτων.....	16
1.8. Παράμετροι και μέθοδοι ανίχνευσης του <i>Alicyclobacillus</i> spp	17
1.8.1. Επισκόπηση	17
1.8.2. Παράμετροι ανίχνευσης	17
1.9. Ενιαία μέθοδος για την ανίχνευση των θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων	20
1.10. Διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των ειδών <i>Alicyclobacillus</i>	20
1.11. Χρήση αισθητήρων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα.....	20
2.Υλικά και μέθοδοι	21
2.1. Δείγματα, στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	21
2.2. Μικροβιολογική ανάλυση χυμών και ανίχνευση <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	21
2.3. Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση <i>Alicyclobacillus</i> spp. με τη χρήση μοριακών τεχνικών, 16S rDNA PCR- RFLP	23
2.4. Ανάλυση μεταβολής διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου με τη χρήση σενσόρων	24
2.5. Προσδιορισμός γουαϊακόλης με τη χρήση HPLC.....	25
3.Αποτελέσματα και συζήτηση	26
3.1. Ανίχνευση και απομόνωση <i>Alicyclobacillus</i> spp.....	26

3.2. Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση <i>Alicyclobacillus</i> spp. με 16S rDNA PCR- RFLP.....	26
3.3.Ανάλυση μεταβολής διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου με τη χρήση σευσόρων	28
3.4.Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	35
Βιβλιογραφία	44

Εισαγωγή

Η παραγωγή χυμού φρούτων αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της παγκόσμιας βιομηχανίας ποτών (Blanco, 2005). Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού επιδιώκει την κατανάλωση υγιεινών, φυσικών προϊόντων. Οι χυμοί φρούτων και προϊόντα με βάση τα φρούτα αποτελούν ένα σημαντικό μέρος στην αγορά των τροφίμων. Επειδή, αυτά τα προϊόντα θεωρούνται θρεπτικά και υγιεινά, οι καταναλωτές έχουν αναπτύξει μεγαλύτερες προσδοκίες όσον αφορά στην ποιότητα ασφάλειά τους (Foster et al., 2003).

Μέχρι πρόσφατα πιστευόταν ότι όξινα προϊόντα, όπως οι χυμοί φρούτων και προϊόντα με βάση τα φρούτα, ήταν ευαίσθητα στην αλλοίωση από ζύμες, μύκητες και βακτήρια γαλακτικού οξέος, λόγω του χαμηλού τους pH ($pH < 4.00$) (Jay et al., 2005). Πράγματι, το χαμηλό pH, αλλά και η επεξεργασία παστερίωσης αυτών των προϊόντων συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία τους έναντι μικροβιακής, και ειδικά βακτηριακής, αλλοίωσης (Silva et al., 2001). Παρόλα αυτά, ένα κρούσμα μόλυνσης παστεριωμένου χυμού μήλου που σημειώθηκε το 1982 στη Γερμανία είχε ως αποτέλεσμα την αμφισβήτηση της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης σε όξινα προϊόντα (Cerny et al., 1984; Yokota, 2007). Η αιτία αλλοίωσης σε αυτό το περιστατικό αποδόθηκε στο είδος *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Wisotzkey et al., 1992). Αυτό ήταν το πρώτο περιστατικό όπου το συγκεκριμένο βακτήριο συσχετίστηκε με αλλοίωση τροφίμου, αφού μέχρι τότε οι απομονώσεις του *Alicyclobacillus* spp. ήταν σχεδόν αποκλειστικά από το έδαφος (Chang et al., 2004).

Τα μέλη του γένους *Alicyclobacillus* είναι θερμο-οξεόφιλα, σπορογόνα βακτήρια και είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε ένα μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασίας (Baumgart, 2000). Βακτήρια του συγκεκριμένου γένους αποτελούν ένα εν δυνάμει πρόβλημα για τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων, καθώς ακόμα η παστερίωση δεν είναι δυνατόν να εξασφαλίσει την πλήρη αδρανοποίησή τους σε αυτά τα προϊόντα (Splittstoesser et al., 1998).

Η παρουσία του *Alicyclobacillus* spp. δεν σημαίνει ότι πάντα θα επιφέρει αλλοίωση του προϊόντος, αλλά μια σειρά από παράγοντες συμβάλλουν στην τελική έκβαση, όπως το περιβάλλον (π.χ. θερμοκρασία), το στέλεχος, αλλά και ο τύπος, τα συστατικά και τα ενδογενή χαρακτηριστικά του προϊόντος (Pettipher et al., 1997; Pinhatti et al., 1997). Η αλλοίωση αφορά στη γεύση ή και στην οσμή των προϊόντων, και αποδίδεται κυρίως στην παραγωγή της χημικής ένωσης γουαϊακόλη (Walls et al., 2000), αν και η οσμή έχει αποδοθεί και στις αλογονοφαινόλες 2,6-διχλωροφαινόλη (2,6-DCP) και 2,6-διβρωμοφαινόλη (2,6-DBP) (Jensen, 2000; Jensen et al., 2003). Το μεγαλύτερο ποσοστό αλλοίωσης έχει προκληθεί από το είδος *A. acidoterrestris* (Walls et al., 1998; Jensen, 2000; Jensen et al., 2003).

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση και ο χαρακτηρισμός της παρουσίας *Alicyclobacillus* spp. σε φυσικό χυμό πορτοκάλι, καθώς η αξιολόγηση της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* με παράλληλη χρήση αισθητήρων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Η διερεύνηση της συσχέτισης των μεταβολών των συγκεντρώσεων των παραπάνω αερίων με εκείνες των επιπέδων του *A. acidoterrestris* είχε ως στόχο την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων αισθητήρων ως μέσων ταχείας ανίχνευσης της ανάπτυξης και παρουσίας του αλλοιογόνου βακτηρίου σε χυμούς φρούτων, προσέγγιση ενδεχομένως χρήσιμη μελλοντικά στη βιομηχανία χυμών.

1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του *Alicyclobacillus* spp.

Το *Alicyclobacillus* spp. είναι ένα Gram-θετικό, μη-παθογόνο, υποχρεωτικά αερόβιο, θερμόφιλο και οξεόφιλο σπορογόνο βακτήριο (Walls et al., 2000). Πρόκειται για ένα ραβδόμορφο βακτήριο με διαστάσεις μήκους 2.9-4.3 μm και πλάτους 0.9-1.0 μm, ενώ τα σπόρια του έχουν οβάλ σχήμα με μήκος 1.5-1.8 μm (Walker and Phillips, 2008).

Το *Alicyclobacillus* spp. μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα εύρος pH από 2.2 έως 5.8 καθώς και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από τους 23 έως 55 °C (Baumgart, 2000). Η ικανότητά του να επιβιώνει σε υψηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλά επίπεδα pH έχει αποδοθεί στη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης που περιέχει ω-κυκλοεξανονικά λιπαρά οξέα (Murakami et al., 1998; Alpas et al., 2003). Όλα τα *Alicyclobacillus* spp. έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν σάκχαρα με ακόλουθη παραγωγή οργανικών οξέων (Takahashi, 2007). Η ενεργότητα νερού (a_w) που απαιτεί για την ανάπτυξη του είναι πάνω από 0,9. Ορισμένα είδη έχουν αναφερθεί να αναπτύσσονται σε χυμό φρούτων με έως και 18.2 °Brix (Splittstoesser et al., 1994). Πάνω από 20 διαφορετικά είδη *Alicyclobacillus*, απομονωθέντα από διάφορες πηγές, έχουν συσχετιστεί με την αλλοίωση χυμών φρούτων και λαχανικών υψηλής οξύτητας (αλλά και ποτών), συμπεριλαμβανομένων των ειδών *A. acidiphilus*, *A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. pomorum*, *A. hesperidium*, *A. acidocaldarius*, *A. cyclohaptanicus*, *A. fastidius*, με το μεγαλύτερο ποσοστό αλλοίωσης αυτών των προϊόντων, ωστόσο, να αποδίδεται στο *A. acidoterrestris* (Matsubara et al., 2002; Goto et al., 2002; Goto et al., 2003).

Το είδος *A. acidoterrestris* έχει αναδυθεί ως ένα νέο αλλοιογόνο βακτήριο για τους εμπορικούς χυμούς και αποτελεί μέρος ανησυχίας για τη βιομηχανία χυμών φρούτων, λόγω της αλλοίωσης εμπορικών παστεριωμένων χυμών φρούτων, εμφιαλωμένων τσαγιών, ισοτονικών ποτών και άλλων προϊόντων ραφιού με χαμηλό pH (Chang et al., 2004; Sapers et al., 2005). Τέτοια φαινόμενα αλλοίωσης οφείλονται στο ότι τα σπόρια του συγκεκριμένου βακτηρίου μπορούν να επιβιώσουν κατά τη διαδικασία της παστερίωσης και, ως εκ τούτου, το βακτήριο *A. acidoterrestris* έχει προταθεί ως ο μικροοργανισμός στόχος για το σχεδιασμό μιας θερμικής επεξεργασίας για τους χυμούς φρούτων (Chang et al., 2004). Λόγω των οικονομικών ζημιών που σχετίζονται με την αλλοίωση από *Alicyclobacillus*, πολυάριθμες μελέτες έχουν επίκεντρο τη συχνότητα εμφάνισης του σε φυσικούς και παστεριωμένους χυμούς (Walls and Chuyate, 2000; Groenewald et al., 2009; Durak et al., 2010; Danyluk et al., 2011; Steyn et al., 2011). Αντίθετα, ελάχιστες πληροφορίες έχουν βρεθεί σχετικά με τη συχνότητα της παρουσίας του *Alicyclobacillus* σε υποπροϊόντα χυμών, όπως αρώματα και αιθέρια έλαια, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή προϊόντων με βάση τα φρούτα (Bicas et al., 2011).

1.2. Συντμήσεις για το *Alicyclobacillus* spp.

Η σύντμηση TAB (Thermo Acidophilic Bacilli or Bacteria) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για να ορίσουμε τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Alicyclobacillus*. Άλλες συντμήσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διεθνές επίπεδο είναι το AAT για το *Alicyclobacillus acidoterrestris* και το BAT ως το αρχικό όνομα για *Bacillus acidoterrestris*. Το BAT εξακολουθεί να χρησιμοποιείται για ορισμένες ονομασίες όπως και για τα μέσα

καλλιέργειας. Πρόσφατα, το ACB έχει χρησιμοποιηθεί ως συντομογραφία του *Alicyclobacillus* παγκοσμίως. Αυτές οι συντμήσεις χρησιμοποιούνται συνήθως στη γλώσσα που σχετίζονται με την ασφάλεια και τον ποιοτικό έλεγχο.

1.3. Ιστορικά στοιχεία, πηγή μόλυνσης, αλλοίωση και παραγωγή γουαϊακόλης

1.3.1. Ιστορικά στοιχεία

Οι χυμοί και τα αναψυκτικά, λόγω των χαμηλών pH τους (συνήθως <5.0, αλλά σε ορισμένα προϊόντα ακόμα και <4.0), δεν είναι ιδιαίτερος επιρρεπή προϊόντα στην μικροβιακή αλλοίωση. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλά είδη μικροβίων που μπορούν να επιβιώσουν στο όξινο περιβάλλον τους και να προκαλέσουν αλλοίωση, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων αερόβιων, όπως *Bacillus coagulans* και *Bacillus megaterium*, μερικά αναερόβια σποριογόνα, όπως *Clostridium butyricum* και *Clostridium pasteurianum* (παραγωγή αερίου και οσμές βουτύρου) (Silva and Gibbs, 2004), ορισμένα γαλακτικά βακτήρια, όπως *Lactobacillus brevis* και *Leuconostoc mesenteroides* (προκαλώντας γεύση ξυδιού και δυσάρεστες οσμές βουτυρογάλακτος) και κάποιοι μύκητες ανθεκτικοί στη θερμότητα, όπως *Byssochlamys nivea* και *Talaromyces flavus* (Steyn et al., 2011).

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, θεωρούνταν ασήμαντη η ύπαρξη και η μόλυνση τροφίμων με χαμηλό pH από Gram-θετικά σπορογόνα βακτήρια, διότι πίστευαν ότι τα σπόρια των βακτηρίων αυτών δεν θα μπορούσαν να εκβλαστήσουν και να αναπτυχθούν σε επίπεδα pH κάτω από 4,5 (Sapers et al., 2005). Το 1982, στη Γερμανία σημειώθηκε κρούσμα μόλυνσης παστεριωμένου χυμού μήλου το οποίο πήρε μεγάλες διαστάσεις και αποδόθηκε αρχικά στο μικροοργανισμό *Bacillus acidocaldarius*. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η αιτία ήταν το βακτήριο *A. acidoterrestris* (Chang and Kang, 2004; Yokota, 2007). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1989, ένα περιστατικό υποβάθμισης ενός όξινου προϊόντος χυμού αναφέρθηκε στην Ιαπωνία. Ο αιτιολογικός παράγοντας βρέθηκε να είναι παρόμοιος με το βακτήριο που προσδιορίστηκε στη Γερμανία. Μετά από αρκετά περιστατικά αλλοίωσης όξινων προϊόντων χυμού το 1990 σε Ευρώπη, Ιαπωνία και Η.Π.Α, το γένος *Alicyclobacillus* αναγνωρίστηκε ως κύριος αιτιολογικός παράγοντας των παραπάνω περιστατικών αλλοίωσης και η σοβαρότητα της κατάστασης αυτής άρχισε να εκτιμάται (Sapers et al., 2005 ; Splittstoesser et al., 1994 ; Jensen, 2000).

Το 1990 έγινε αναφορά ανάπτυξης και ανίχνευσης δυσάρεστης οσμής στο 40% δειγμάτων χυμού μήλου στην Αυστραλία, η οποία δεν οφειλόταν σε τυχόν πρόσθετα ή συντηρητικά, αλλά στην μικροβιακή μόλυνση. Ο Splittstoesser και οι συνεργάτες του (1994) ανέφεραν ότι το στέλεχος που απομονώθηκε από παστεριωμένο χυμό μήλου το 1990, ήταν ένα θερμο- και οξυ-ανθεκτικό βακτήριο. Αυτή ήταν η πρώτη αναφορά απομόνωσης του μικροοργανισμού από μολυσμένο χυμό φρούτων στις Η.Π.Α. (Yokota, 2007). Αν και η αλλοίωση από *Alicyclobacillus* spp., το οποίο πήρε την επίσημη ονομασία του από τους Wisotzkey et al (1992), είχε προηγουμένως θεωρηθεί ως σποραδική, η έρευνα της NFPA (National Food Processors Association) το 1998 έδειξε ότι η αλλοίωση των χυμών φρούτων σε μεγάλη κλίμακα συνδέεται με αυτό το βακτηριακό γένος (Chang et al., 2004),

Η ικανότητα των σπορίων του *A. acidoterrestris* να εκβλαστάνουν κάτω από εξαιρετικά όξινες συνθήκες τον καθιστά ένα καλό υποψήφιο για την αλλοίωση χυμών φρούτων και

ποτών στο ράφι. Επιπλέον, πολλά προϊόντα διατροφής είχαν αναφερθεί ότι είχαν υποστεί αλλοίωση από *A. acidoterrestris*, συμπεριλαμβανομένων ισοτονικού νερού, λεμονάδας (Yamazaki et al., 1996), ανθρακούχων φρουτοποτών, πολτών φρούτων, παγωμένων τσαγιών από χυμό μούρων (Duong και Jensen, 2000), αλλά και ψυλοκομμένων ντοματών σε κονσέρβα (Walls and Chuyate, 1998).

Σήμερα, οι απαιτήσεις για την διάθεση ασφαλών και υψηλής ποιότητας χυμών και ποτών συνεχίζουν να αυξάνονται με ταχείς ρυθμούς σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, η μόλυνση από *Alicyclobacillus* spp. αποτελεί μια σημαντική ανησυχία και πρόκληση, για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται συνεχώς μελέτες και έρευνες για την ενίσχυση των ήδη υπαρχόντων αλλά και την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για τον έλεγχο αυτών των βακτηρίων.

1.3.2. Πηγή

Η κύρια πηγή της απομόνωσης των *Alicyclobacillus* spp. είναι το χύμα, αν και συνδέονται με διάφορες επιφάνειες φρούτων, χυμών, όξινων ποτών και διάφορα άλλα αφεψήματα, όπως τσάι (Smit et al., 2011; Oteiza et al., 2014). Μελέτες έχουν δείξει ότι η μόλυνση των χυμών είναι πιο πιθανό να προκαλείται από τα φρούτα που έχουν μολυνθεί από το έδαφος κατά τη διάρκεια της συγκομιδής ή από ανεπαρκή πλύση των φρούτων. Επίσης, εκτός του εδάφους και του νερού, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας έχουν επίσης προταθεί ως πηγή μόλυνσης (Chang και Kang, 2004; Steyn et al., 2011). Οι McIntyre et al. (1995) απομόνωσαν ένα στέλεχος του *Alicyclobacillus* από χαλασμένο προϊόν χυμού και βρήκαν το ίδιο στέλεχος σε δείγμα νερού από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας.

Δεδομένου της σημαντικότητας της μόλυνσης από βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus*, αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας στρατηγικών για τη μείωση ή εξάλειψη των σπορίων των βακτηρίων αυτών σε πρώτες ύλες (Pinhatti et al., 1997). Επιπλέον, μελέτες έχουν γίνει για να αποφευχθεί η εκβλάστηση των σπορίων *Alicyclobacillus* κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και εμπορίας των τελικών προϊόντων (Bevilacqua et al., 2008; Spinelli et al., 2010). Ο επιπολασμός των *Alicyclobacillus* spp. ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του χυμού, την εποχή επεξεργασίας, τις πρακτικές συγκομιδής και άλλους παράγοντες (Danyluk et al., 2011; Pinhatti et al., 1997).

1.3.3. Αλλοίωση

Τα είδη *Alicyclobacillus* αποτελούν σημαντικό παράγοντα ανησυχίας για τις βιομηχανίες, διότι ως αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές οικονομικές απώλειες στη βιομηχανία τροφίμων. Τα περισσότερα σπορογόνα βακτήρια δεν μπορούν να εκβλαστήσουν σε χαμηλό pH, και ως εκ τούτου δεν δημιουργούν μεγάλο κίνδυνο αλλοίωσης όξινων τροφίμων. Ωστόσο, τα σπόρια *A. acidoterrestris*, λόγω της ικανότητάς τους να εκβλαστώνουν σε χαμηλό pH (Black et al, 2007; Splittstoesser et al, 1994) δημιουργούν μια νέα πρόκληση για τη βιομηχανία χυμών φρούτων.

Στις μέρες μας, οι καταναλωτές έχουν γίνει αρκετά απαιτητικοί ως προς την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων και διακατέχονται πλέον από αυξημένες προσδοκίες. Η αλλοίωση των προϊόντων χυμού από το συγκεκριμένο βακτήριο συμβαίνει πολύ πριν από την ημερομηνία λήξης (Chang et al., 2004). Η αλλοίωση από *Alicyclobacillus* δεν προκαλεί απώλεια θρεπτικών συστατικών. Η υποβάθμιση των χυμών από *Alicyclobacillus* είναι

δύσκολο να ανιχνευθεί, λόγω του ότι το βακτήριο δεν προξενεί ορατές αλλαγές, όπως η παραγωγή αερίου που θα οδηγήσει σε πρώιμη διόγκωση στις συσκευασίες (Silva and Gibbs, 2004; Durak et al., 2010). Οι μόνες αλλαγές οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν ένα προϊόν χυμού χαλάσει από *Alicyclobacillus* είναι η δυσάρεστη οσμή και γεύση, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί επίσης να λάβει χώρα σχηματισμός ιζήματος, θολότητας ή αποχρωματισμός. Παράπονα και καταγγελίες καταναλωτών προέρχονται μετά το άνοιγμα της συσκευασίας, όπου αντιλαμβάνονται γεύση και οσμή από το προϊόν που την χαρακτηρίζουν «φαρμακευτική» ή «καπνώδη» (Chang et al., 2004). Η υποβάθμιση των προϊόντων που συνδέεται με τις δυσάρεστες οσμές είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού της γουαϊακόλης (2-μεθοξυφαινόλη) και αλογονοφαινολικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων 2,6-διβρωμοφαινόλης (2,6-DBP) και 2,6-διχλωροφαινόλης (2,6-DCP) (Steyn et al., 2011; Witthuhn et al., 2007). Τα πιο συχνά γνωστά είδη *Alicyclobacillus* που προκαλούν αλλοίωση είναι τα *A. acidoterrestris*, *A. contaminans* (Zhang et al., 2013), *A. acidiphilus*, *A. acidocaldarius*, *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius*, *A. hesperidum* και *A. pomorum* (Goto et al. 2003, 2008).

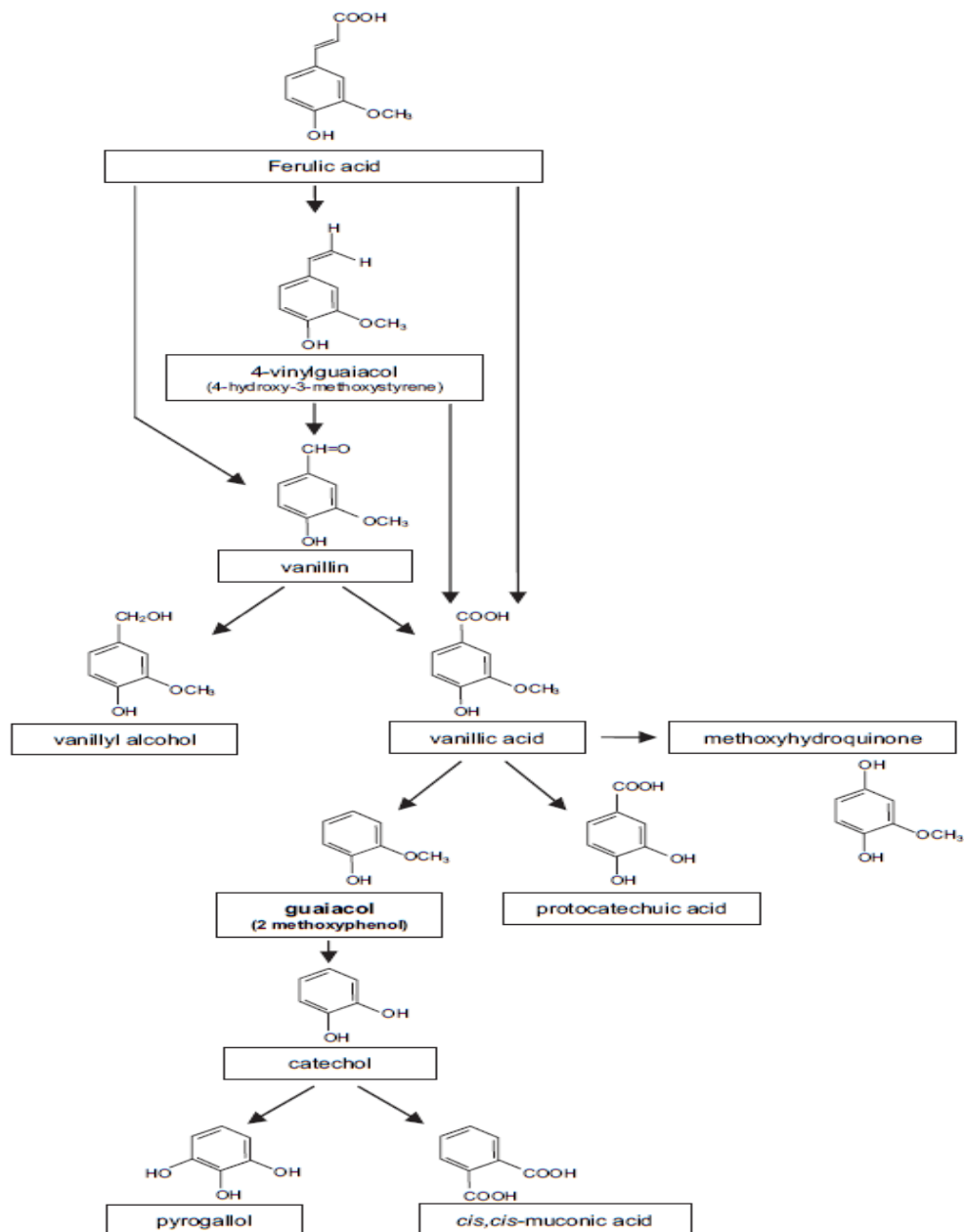
1.3.4. Παραγωγή γουαϊακόλης

Ο κυρίαρχος μεταβολίτης που σχετίζεται με την αλλοίωση από τον *Alicyclobacillus* είναι η γουαϊακόλη (2-μεθοξυφαινόλη) (Orr et al., 2000). Η γουαϊακόλη συμβάλλει στην καπνιστή γεύση των προϊόντων, όπως αυτή του καπνιστού σολομού (Varlet et al., 2006) και οσμές που σχετίζονται με το *Alicyclobacillus* που σχετίζονται με την αλλοίωση συνήθως περιγράφονται ως "καπνώδεις", "φαρμακευτικές" ή "αντισηπτικές". Συνδέεται με την αλλοίωση γεύσης σε προϊόντα όπως το κρασί (Álvarez-Rodriguez et al, 2003), η σοκολάτα γάλακτος (Jensen et al., 2001), το παγωτό σοκολάτα (Saxby, 1996) και οι χυμοί φρούτων (Cerny et al., 1984; Splittstoesser et al., 1994; Walls and Chuyate, 1998). Οι χημικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για αυτές τις οσμές εκτός της γουαϊακόλης είναι οι αλογονοφαινόλες 2,6-διβρωμοφαινόλη και 2,6-διχλωροφαινόλη (Yamazaki et al, 1996; Pettipher et al., 1997; Splittstoesser et al., 1998).

Η παρουσία της γουαϊακόλης σε προϊόντα μπορεί να οφείλεται είτε σε θερμική αποσύνθεση των προδρόμων γουαϊακόλης, όπως συμβαίνει σε καβουρδισμένα προϊόντα (Mayer et al., 1999), ή μπορεί να είναι ένα προϊόν μικροβιακού μεταβολισμού (Chang et al., 2004). Αν και η ακριβής μεταβολική οδός παραγωγής γουαϊακόλης σε *Alicyclobacillus* δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, η πιο κοινή υπόθεση είναι ότι η γουαϊακόλη παράγεται κατά τη διάρκεια μεταβολισμού του φερουλικού οξέος (Εικόνα 1.1). Στους περισσότερους μικροοργανισμούς το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού του φερουλικού οξέος είναι η αποκαρβοξυλίωση του προς 4-βινυλογουαϊακόλη (Rahouti et al., 1989 ; Torakas et al, 2003; Mathew et al., 2007), αν και μπορεί να μετασχηματιστεί απευθείας σε βανιλίνη (Peleg et al., 1992) ή βανιλικό οξύ (Huang et al., 1993). Η βανιλίνη μεταβολίζεται γρήγορα μέσω οξειδωσης ή αναγωγής προς βανιλικό οξύ ή βανιλλυλοαλκοόλη, αντίστοιχα. Το βανιλικό οξύ που σχηματίζεται μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε έναν αριθμό προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων της μεθοξυυδροκινόνης, του πρωτοκατεχουϊκού οξέως και της γουαϊακόλης. Η γουαϊακόλη είναι παράγωγο βανιλικού οξέος μέσω μη-οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης και μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε άλλα προϊόντα, κυρίως σε

κατεχόλη (Crawford et al., 1978; Rahouti et al., 1989; Topakas et al., 2003). Ο *A. acidoterrestris* είναι σε θέση να παράγει γουαϊακόλη από βανιλίνη (Bahçeci et al., 2007) και βανιλλικό οξύ (Niwa et al., 2003). Η μετατροπή βανιλλικού οξέος προς γουαϊακόλη είναι ταχύτερη από αυτή της βανιλίνης.

Η σχέση μεταξύ *Alicyclobacillus* και αλογονοφαινολών είναι πιο διαφορούμενη σε σχέση με αυτή μεταξύ της αλλοιογόνου επίδρασης αυτών των βακτηρίων και της παραγωγής γουαϊακόλης (van Rée, 1996). Η γουαϊακόλη είναι μια φαινολική ένωση και το νερό που χρησιμοποιείται στις εγκαταστάσεις μια βιομηχανίας μπορεί να περιέχει οξειδωτικά χλωριωμένα χημικά κατάλοιπα, όπως χλώριο και υποχλωριώδες νάτριο (Kowal et al., 1986). Είναι πιθανό ότι η παρουσία της γουαϊακόλης συνεισφέρει στη χημική παραγωγή των αλογονοφαινολών. Μελέτες έδειξαν ότι φαινολικές ενώσεις που εκτίθενται σε υποχλωριώδες νάτριο, 99,7% της γουαϊακόλης μετατρέπεται σε διάφορα παράγωγα χλωρίου υπό όξινο pH (pH 4.0), συμπεριλαμβανομένου της 2-χλωροφαινόλης, 2,4-διχλωροφαινόλης, τετραχλωροφαινόλης, πενταχλωροφαινόλης, 4,5,6-τριχλωροφαινόλης και τετραχλωρογουαϊακόλης (Michalowicz et al., 2007).



Εικόνα 1.1. Μεταβολική οδός παραγωγής γουαϊακόλης και άλλων προϊόντων μέσω μεταβολισμού του φερουλικού οξέος.

1.4. Ταξινόμηση των *Alicyclobacillus*

Ο Wisotzkey και οι συνεργάτες του (1992) επικεντρώθηκαν στην ορθή ταξινόμηση των *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* και *B. cycloheptancius* χρησιμοποιώντας το 16S rRNA για ανάλυση αλληλουχίας. Διαπιστώθηκε ότι τα *B. acidocaldarius* και *B. acidoterrestris* είναι σχεδόν ταυτόσημα (ομοιότητα 98,8%) και ανήκουν σαφώς στο ίδιο γένος. Αντίθετα, το *B. cycloheptancius* ήταν πιο αποστασιοποιημένο από λοιπά βακτηριακά είδη (παρουσιάζοντας ομοιότητα 93,2% και 92,7% με το *B. acidocaldarius* και *B. acidoterrestris*, αντίστοιχα). Οι δευτερεύουσες δομές του 16S rRNA των τριών παραπάνω μικροοργανισμών εξετάστηκαν και βρέθηκε να είναι ταυτόσημες ή παρόμοιες μεταξύ τους,

αλλά διέφεραν από αυτές άλλων ειδών (Wisotzkey et al., 1992). Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, προσδιορίστηκε ότι οι *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* και *B. cycloheptancius* πρέπει να καταταχθούν ως γένος *Alicyclobacillus*. Η ανακατάταξη αυτή στηρίχτηκε στην ασυνήθιστη παρουσία των ω-αλεικυκλικών λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη τους (Wisotzkey et al., 1992). Η παρουσία των ω-αλεικυκλικών λιπαρών οξέων πιστεύεται ότι συμβάλλει στην ικανότητα αυτών των οργανισμών να επιβιώνουν υπό συνθήκες υψηλής οξύτητας και υψηλών θερμοκρασιών (Yokota, 2007). Πάνω από το 80% των ειδών *Alicyclobacillus* περιέχουν ω-αλεικυκλικά λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, τα είδη *Alicyclobacillus* στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν ω-κυκλικά λιπαρά οξέα είναι τα *A. consociatus*, *A. contaminans*, *A. ferrooxydans*, *A. macrosporangioides* (Yokota et al., 2007), *A. rohlii* και *A. pomorum* (Goto et al., 2003). Ο Kannenberg και οι συνεργάτες του (1984) απέδειξαν ότι το ω-κυκλοεξανικό λιπαρό οξύ περιέχει πυκνό λιπιδιακό φάκελο, με αποτέλεσμα τη χαμηλή διάχυση σε υψηλές θερμοκρασίες. Ο Wisotzkey και οι συνεργάτες του (1992) πρότειναν ότι αυτή η ιδιότητα προσφέρει ένα πλεονέκτημα όταν οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες ή χαμηλό pH. Τα λιπίδια που περιέχουν λιπαρά οξέα με ένα δακτύλιο κυκλοεξανίου σχηματίζουν μία προστατευτική επικάλυψη για την κυτταρική μεμβράνη που συμβάλλει στην αντοχή του *Alicyclobacillus* spp. σε όξινες συνθήκες και υψηλές θερμοκρασίες (Chang et al., 2004). Συνεπώς, τα ω-κυκλοεξάνια μπορεί να είναι μια πτυχή της θερμοοξέφιλης προσαρμογής των βακτηριακών μεμβρανών (Chang et al., 2004).

1.5. Σπόρια

Οι περισσότεροι σπορογόνοι μικροοργανισμοί είναι μικροοργανισμοί του εδάφους και κοινώς σχετίζονται με τις περισσότερες τροφές (Black et al., 2007). Η αντοχή τους στο στρες, σε συνδυασμό με την παρουσία των σπορίων στο περιβάλλον, δημιουργεί αλλοιώσεις στα τρόφιμα, αλλά κάποιοι από αυτούς προκαλούν και τροφιμογενή νοσήματα (Setlow, 2006). Τα σπόρια σχηματίζονται από ορισμένα βακτήρια ως μία διαδικασία απόκρισης στις σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες (Black et al., 2007). Τα σπόρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς θρεπτικά συστατικά, είναι μεταβολικά αδρανή, περιέχουν ελάχιστους ή καθόλου φορείς χημικής ενέργειας, όπως ATP και NADH, δεν μεταβολίζουν ενδογενείς ή εξωγενείς ενώσεις και παρουσιάζουν ελάχιστη ή και καμία ενζυμική δραστηριότητα (Setlow, 2006).

Τα σπόρια του *A. acidoterrestris* έχουν αργό κύκλο ανάπτυξης (πάνω από 5 ημέρες) και η ανάπτυξη αυτών έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση προϊόντων φρούτων. Οι βιομηχανίες δύσκολα ανιχνεύουν τέτοιες περιπτώσεις ανάπτυξης και συνήθως οι αλλοιώσεις των προϊόντων είναι εμφανείς όταν φτάσουν ήδη στα χέρια των καταναλωτών (Walls and Chuyate, 1998). Τα σπόρια είναι εξαιρετικά ανθεκτικά σε δυνητικά θανατηφόρες διεργασίες όπως η έκθεση σε υγρή και ξηρή θερμότητα, υπεριώδη και γ-ακτινοβολία, και σε τοξικές χημικές ουσίες που καταστρέφουν τα κύτταρα (Black et al., 2007; Setlow, 2006). Από μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι η τιμή D δεν επηρεάζεται από οργανικά οξέα, όπως μηλικό ή κιτρικό οξύ (Pontius et al.), όπως και η επίδραση του pH και των διαλυτών στερεών φαίνεται να μην επηρεάζονται από την θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για θερμική απενεργοποίηση των σπορίων (Komitoroulou et al., 1999; Silva et al., 1999).

Τα σπόρια του *A. acidoterrestris* μπορούν να εκβλαστήσουν και τα βλαστικά κύτταρα αυτού να αναπτυχθούν σε pH μικρότερο από 4.0 και έχουν ισχυρή αντοχή στη θερμότητα,

ιδιότητες οι οποίες καθιστούν τον έλεγχό του συγκεκριμένου βακτηρίου μια σημαντική πρόκληση για τις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Η τιμή D του *A. acidoterrestris* σε χυμούς στους 95 °C κυμαίνεται από 0.06 έως 5.3min και η τιμή z από 7.2 έως 12.9 °C (Smit, 2011; Silva and Gibbs, 2001).

1.6. Παθογένεια

Οι Wall και Chuayate (2000) εξέτασαν την παθογένεια του *A. acidoterrestris* σε ποντίκια και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία ένδειξη ασθένειας ή θανάτου στα πειραματόζωα. Συνεπώς, αν και το *A. acidoterrestris* μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα αλλοίωσης σε συγκεκριμένες κατηγορίες προϊόντων, δεν τίθεται θέμα ανησυχίας όσον αφορά στην ασφάλεια των τροφίμων και ποτών (Wall and Chuayate, 2000).

1.7. Χυμοί φρούτων

Χυμός φρούτων ορίζεται ως το ζυμώσιμο αλλά μη ζυμωθέν προϊόν που λαμβάνεται από το βρώσιμο τμήμα υγιών και ώριμων φρούτων, ενός ή πολλών ειδών, νωπών ή διατηρημένων με ψύξη ή κατάψυξη και έχει το χρώμα, το άρωμα και τη χαρακτηριστική γεύση των χυμών των φρούτων από τα οποία προέρχεται (ΟΔΗΓΙΑ 2001).

Οι χυμοί φρούτων καταναλώνονται ευρέως σε όλο τον κόσμο, κυρίως επειδή θεωρούνται ως ένα προϊόν φυσικής προέλευσης θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, η υψηλή ενεργότητα νερού και υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες μαζί με άλλα θρεπτικά συστατικά των φρούτων ευνοούν την ανάπτυξη μικροβίων. Η μικροβιακή επιμόλυνση των χυμών έχει συσχετιστεί με αρκετές περιπτώσεις τροφιογενών νόσων που έχουν ως αποτέλεσμα την απειλή της ανθρώπινης υγείας, αλλά και περιπτώσεις μικροβιακής αλλοίωσης και ποιοτικής υποβάθμισης προϊόντων που έχουν οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες.

1.7.1. Μικροβιακή επιμόλυνση

Τα κρούσματα των ασθενειών που σχετίζονται με την κατανάλωση χυμών φρούτων έχουν ανοδική πορεία για τη δημόσια υγεία από τις αρχές του 1900. Αρχικά θεωρήθηκε ότι το pH του χυμού είναι ανασταλτικός παράγοντας για την επιβίωση των παθογόνων βακτηρίων. Ωστόσο, το 1991, μια επιδημία με *Escherichia coli* O157: H7 σε παστεριωμένο χυμό μηλίτη οδήγησε σε ουραιμικό αιμολυτικό σύνδρομο (Montville et al., 2010).

Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (U.S. Centres for Disease Control and Prevention), υπάρχουν πολλά περιστατικά τροφιογενών λοιμώξεων που έχουν συσχετιστεί με την κατανάλωση χυμών. Οι αιτιολογικοί παράγοντες επιδημικών κρίσεων που έχουν αναγνωριστεί περιλαμβάνουν τα βακτήρια *E. coli* O157: H7, *E. coli* O111, *Salmonella enterica*, καθώς και παράσιτα του γένους *Cryptosporidium*.

Δεδομένων των περιστατικών τροφιογενών ασθενειών, ο Φορέας Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (U.S. FDA), προέβη το 2001 στη δημοσίευση κανονισμού που αφορά στην ανάπτυξη και εφαρμογή συστημάτων ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου στη βιομηχανία χυμών (HACCP Juice Regulation) (FDA, 2001). Ωστόσο, όπως είναι αναμενόμενο, ο κανονισμός HACCP για τους χυμούς ισχύει μόνο για παθογόνους μικροοργανισμούς και δεν υπάρχει κανένας κανονισμός σχετικά με την αλλοίωση.

Συνεπώς, οι βιομηχανίες χυμών και ποτών είναι εκείνες οι οποίες οφείλουν να λαμβάνουν τα κατάλληλα μέτρα για τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων τους.

1.7.2. Η παστερίωση του χυμού φρούτων

Η παστερίωση και η αποστείρωση των τροφίμων είναι φυσικές διεργασίες στις οποίες το τρόφιμο θερμαίνεται σε επαρκώς υψηλή θερμοκρασία και για επαρκές χρονικό διάστημα ώστε να καταστραφούν οι μικροοργανισμοί και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα που τυχόν υπάρχουν. Κατά τη διάρκεια όμως αυτών των διεργασιών εξελίσσονται ταχείες μεταβολές στα χημικά συστατικά και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας του τροφίμου. Έτσι, οι τεχνολογικές εξελίξεις στις θερμικές κατεργασίες συντήρησης στοχεύουν στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και παράλληλα στον περιορισμό της ποιοτικής υποβάθμισης που προκαλείται από τη θέρμανση.

Η παστερίωση είναι ήπια θερμική κατεργασία που στοχεύει στην καταστροφή μέρους των μικροοργανισμών, συχνά των παθογόνων, που υπάρχουν στο τρόφιμο και επομένως η περαιτέρω επεξεργασία και οι συνθήκες αποθήκευσης πρέπει να ελαχιστοποιούν την μικροβιακή ανάπτυξη. Η παστερίωση έχει σχεδιαστεί για να αδρανοποιηθούν τα βλαστικά κύτταρα των παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βλαστικών κυττάρων σπορογόνων βακτηρίων. Το FDA δεν έχει ορίσει κάποια συγκεκριμένη μέθοδο παστερίωσης, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών των διαφόρων τύπων και ειδών χυμών (FDA, 2001).

Ο χυμός παραδοσιακά παστεριωνόταν στους 63-65° C για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτή η μέθοδος αντικαταστάθηκε σταδιακά και ο πλέον συνήθης τύπος θερμικής επεξεργασίας είναι η HTST (High Temperature/Short Time) παστερίωση που ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες δράσεις της ποιοτικής υποβάθμισης, λόγω της πολύ μικρής διάρκειας θερμικής επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, στους χυμούς πορτοκάλι γίνεται παστερίωση στους 90-95° C για 15-30 sec (Walls, 2000).

Στους χυμούς φρούτων, τα διαλυτά στερεά, που εκφράζονται σε ° C Brix, είναι μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους, δεδομένης της επιρροής τους στην μικροβιακή αντοχή σε πίεση και θερμότητα (Basak et al., 2002; Palou et al., 1998). Η απενεργοποίηση των σπορίων του *A. acidoterrestris* από την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (High Pressure Processing, HPP) και υπερυψηλής πίεσης παρουσία θερμότητας (High Pressure Thermal Processing, HPTP) σε φυσικούς και συμπυκνωμένους χυμούς φρούτων δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

Το βακτήριο *A. acidoterrestris* είναι δυνατόν να επιβιώσει της παστερίωσης των 2 min στους 95° C, και έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των προϊόντων με τον σχηματισμό της γουαϊακόλης και αλογονοφαινολών. Τα ενδοσπόρια του βακτηρίου έχουν τιμές D που κυμαίνονται από 1.5 έως 8.7 min στους 95° C, μεγαλύτερες δηλαδή από αυτές που εφαρμόζονται κατά την παστερίωση των φρουτοχυμών στη βιομηχανία (Steyn et al., 2011; Evelyn and Silva, 2016).

1.8. Παράμετροι και μέθοδοι ανίχνευσης του *Alicyclobacillus* spp.

1.8.1. Επισκόπηση

Από το 1982, όπου σημειώθηκε το πρώτο κρούσμα αλλοίωσης από *A. acidoterrestris* στη Γερμανία, αξιολογήθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο πάνω από 40 διαφορετικές μέθοδοι για την ανίχνευση του βακτηρίου (Cerny, 1984). Η δυσκολία ανάπτυξης μιας αποτελεσματικής μεθόδου ανίχνευσής του μπορεί εν μέρει να αποδοθεί στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Το γεγονός ότι είναι θερμοφίλα και οξεόφιλα προξένησε δυσκολία στην *in vitro* καλλιέργεια των βακτηρίων *Alicyclobacillus*. Η ευαισθησία και η ακρίβεια ποικίλλει μεταξύ των μεθόδων. Υπήρξαν αρκετές εμπορικές διενέξεις και διαφορές στις αντιλήψεις μεταξύ των χωρών σχετικά με τα θερμο-οξεόφιλα βακτήρια και την εμπορική ζημία που προκαλείται από αυτά. Το 2001, η Διεθνής Ομοσπονδία Παραγωγών χυμών φρούτων στο Παρίσι (IFU), επιχείρησε συνεταιριστικές προσπάθειες σε διεθνές επίπεδο για ένα ενιαίο πρότυπο μεθόδων για την ανίχνευση θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων (*Alicyclobacillus*). Οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν στη δημοσίευση του εγχειριδίου "Πρώτο Πρότυπο IFU-μέθοδος για την ανίχνευση *Alicyclobacillus* σε χυμούς" τον Απρίλιο του 2003. Αργότερα, μια αναθεώρηση της μεθόδου IFU, με τίτλο "Μέθοδος για την ανίχνευση της οσμής που παράγει ο *Alicyclobacillus* στους χυμούς" δημοσιεύθηκε το Σεπτέμβριο του 2004 (IFU Εγχειρίδιο Μικροβιολογικές μέθοδοι, Μέθοδος Νο.12)(IFU, 2003, 2004).

1.8.2. Παράμετροι ανίχνευσης

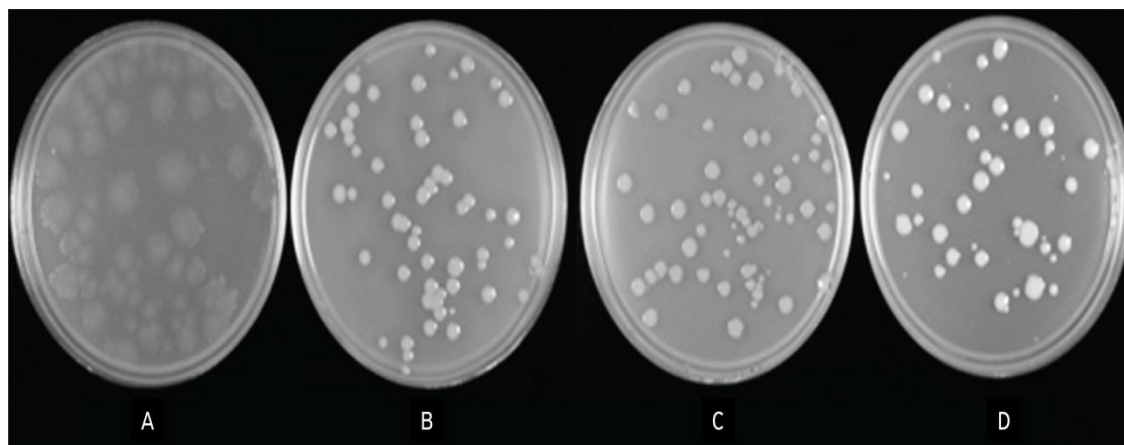
Εκτός από τις συνήθεις παραμέτρους της καλλιέργειας όπως το θρεπτικό μέσο, τη θερμοκρασία, την περίοδο ανάπτυξης, το pH, ουσιαστικό ρόλο στην ανίχνευση των βακτηρίων του γένους *Alicyclobacillus* διαδραματίζουν το θερμικό σοκ, το είδος του φρούτου και η συγκέντρωσή του στο χυμό (Danyluk, 2011).

Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Όπως έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές, το *Alicyclobacillus* spp. δεν αναπτύσσεται σε μέσα όπως τα trypticase soy, brain heart infusion (BHI) και veal infusion agars ή τους αντίστοιχους ζωμούς (broths), ακόμα και αν το μέσο υποστεί όξυνση σε pH 3.5 (Chang et al., 2004). Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* είναι το yeast starch glucose (YSG) και το BAT. Ακολουθούν το Modified Plate Count Agar (mPCA), orange serum agar (OSA), potato dextrose agar (PDA) και K-agar (Walls et al., 2000; Chang et al., 2004; Pettipher et al., 2000) (Εικόνα 1.2).

Γενικά, υπάρχουν αρκετές διαφωνίες μεταξύ ερευνητών για την επιλογή και την καταλληλότητα των θρεπτικών μέσων. Μερικοί ερευνητές (Pettipher et al., 1997; Pettipher and Osmundson, 2000) διαπίστωσαν ότι τα PDA και OSA υποστηρίζουν αρκετά καλά την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και το OSA δίνει υψηλότερα ποσοστά ανάκαμψης. Σύμφωνα με τον Jensen (2005), το BAT agar ήταν πιο αποτελεσματικό στην ανάκτηση του *A. acidocaldarius*, ενώ η χρήση του K-agar έδωσε καλά αποτελέσματα στη περίπτωση του *A. acidoterrestris*. Επίσης, η τεχνική της επιφανειακής επιστρωσης φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Alicyclobacillus* από αυτήν της

ενσωμάτωσης (Murray et al., 2007; Pettipher et al., 1997). Παρόλα αυτά, ο Jensen (2000) διαπίστωσε ότι και οι δύο τεχνικές οδήγησαν σε παρόμοια ανάκτηση ειδών *Alicyclobacillus* κατά τη διάρκεια επώασης χυμού πορτοκάλι σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Ωστόσο, σε περιβάλλον με χαμηλό οξυγόνο, φάνηκε ότι η τεχνική της ενσωμάτωσης έδωσε υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης των βακτηρίων από αυτή της επιφανειακής επίστρωσης (Jensen, 2000).



Εικόνα 1.2. Αποικίες του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε: (A) K- άγαρ, (B) OSA, (C) YSG και (D) BAT άγαρ μετά από 72 h στους 45°C.

Θερμοκρασία ανάπτυξης

Το εύρος θερμοκρασίας και το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη των *Alicyclobacillus* διαφέρουν μεταξύ των στελεχών. Σύμφωνα με μέθοδο IFU (2003), η θερμοκρασία επώασης για την ανίχνευση θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων είναι οι 45°C, θερμοκρασία η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των ειδών μέσα σε 3-5 ημέρες.

Διαθεσιμότητα οξυγόνου

Από την στιγμή που τα περισσότερα είδη *Alicyclobacillus* είναι αερόβια, το διαθέσιμο οξυγόνο στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει την ανάπτυξη του. Παρόλο όμως που έχει παρατηρηθεί ότι με τη μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου, δεν επηρεάζεται η παραγωγή οσμών (Walker et al., 2005; Siegmund et al., 2007).

Περίοδος επώασης

Ικανοποιητική αύξηση παρατηρείται όταν μια μεγάλη ποσότητα κυττάρων εμβολιάζονται σε YSG υγρό μέσο και επάζονται στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για 24h. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση του εμβολίου είναι πολύ χαμηλή, η ανάπτυξη μπορεί να μην ανιχνευθεί μετά από 24 h. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τη μέθοδο IFU(2003), για την

ανίχνευση των θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων συνίσταται η πρόβλεψη για 5 ημέρες εμπλουτισμού.

pH

Το βέλτιστο pH του *Alicyclobacillus* είναι μεταξύ των τιμών 3.5 και 4.5. Το pH του θρεπτικού μέσου YSG ρυθμίζεται με βάση το pH του επιλεγμένου χυμού. Η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* επηρεάζεται από τον τύπο του οξέος που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του pH. Αναχαίτιση έχει παρατηρηθεί με την χρήση οξικού, αδιπινικού, γαλακτικού και ηλεκτρικού οξέος. Η ανάπτυξη δεν επηρεάζεται σημαντικά από το θειικό, φουμαρικό, L-ασκορβικό, L-μηλικό ή κιτρικό οξύ.

Θερμικό σοκ

Το θερμικό σοκ εφαρμόζεται για να ληφθεί μία ομοιόμορφη εκβλάστηση των σπορίων *Alicyclobacillus*. Μια θερμική επεξεργασία των 80°C για 10 min έχει αποδειχθεί ως η βέλτιστη για την ενεργοποίηση των σπορίων (Walls and Chuyate, 1998). Με το θερμικό σοκ εκτός από την ανάπτυξη επιτυγχάνεται και η εξάλειψη μικροβιακών μολυντών, όπως ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων (Previdi et al., 1997).

Συγκέντρωση και τύπος χυμού

Ο τύπος του χυμού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του *Alicyclobacillus*. Ο Splitstoeser και οι συνεργάτες του μελέτησαν την ανάπτυξη δύο στελεχών του *A. acidoterrestris* σε διαφορετικούς τύπους χυμών φρούτων. Αυτά τα στελέχη αναπτύχθηκαν πολύ καλά σε χυμό μήλου, χυμό ντομάτας και σε χυμό λευκού σταφυλιού, ενώ αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε χυμό από κόκκινο σταφύλι, στο οποίο παρατηρήθηκε ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης τους (Goto et al., 2002). Ο Goto και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη συμπεριφορά ανάπτυξης αρκετών στελεχών του *A. acidoterrestris* σε μια ποικιλία χυμών φρούτων και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συμπεριφορά των στελεχών εξαρτάται από τον τύπο του χυμού και επίσης από την πηγή απομόνωσης των στελεχών.

Η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* επηρεάζεται επίσης από τη συγκέντρωση του χυμού. Τα μέλη της εταιρίας "Japan Fruit Juice Association" (JFJA) διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ των χαρακτηριστικών συγκέντρωσης χυμού με το προφίλ ανάπτυξης των βακτηρίων σε διάφορους χυμούς φρούτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε μια ισχυρή συσχέτιση με τον τύπο του χυμού. Ωστόσο, ακόμη και με το χυμό πορτοκαλιού, η οποία έδειξε καλή προώθηση της ανάπτυξης, υπήρχε μια τάση προς πλήρη αναστολή της ανάπτυξης, όταν η συγκέντρωση του χυμού ήταν πάνω από 50-60%. Για τους χυμούς με υψηλά ποσοστά πολυφαινόλων, όπως χυμός από κόκκινο σταφύλι, η ανίχνευση του *Alicyclobacillus* ήταν δύσκολη ακόμη και όταν η συγκέντρωση του χυμού ήταν πάνω από 10-20% (Steyn et al., 2011).

1.9. Ενιαία μέθοδος για την ανίχνευση των θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων

Μια ενιαία μεθοδολογία για την ανίχνευση θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων έχει σχεδιαστεί από κοινού από δέκα εταιρείες αναψυκτικών και τη JFJA. Αυτή η μέθοδος συνιστά τη χρήση YSG θρεπτικού μέσου (pH 3.7 ± 1) και επώαση κοντά στη θερμοκρασία κοινής ανάπτυξης για *Alicyclobacillus* (45 °C). Στα δείγματα που είναι κατάλληλα για μια τέτοια μέθοδο, μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος ανίχνευσης που κάνει χρήση διήθησης με χρήση μεμβράνης (Membrane Filtration Method), ενώ για όλα τα υπόλοιπα δείγματα μπορούν να εφαρμοστούν οι τεχνικές ενσωμάτωσης και επιφανειακής επίστρωσης. Σε κάθε περίπτωση, δοκιμές οι οποίες μπορούν επίσης να φανούν χρήσιμες για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus* είναι αυτές της υπεροξειδάσης και της ανίχνευσης γουαϊακόλης, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν ανεξάρτητα ή συμπληρωματικά (π.χ. συγκεκριμένα βακτήρια τα οποία παράγουν γουαϊακόλη είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με τη δοκιμή υπεροξειδάσης). Εναλλακτικά, η διαφοροποίηση των βακτηριακών απομονώσεων μπορεί να επιτευχθεί με τη διενέργεια δοκιμών ανάπτυξης σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

1.10. Διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των ειδών *Alicyclobacillus*

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τη διαφοροποίηση και την ταυτοποίηση των *Alicyclobacillus*. Μερικές από αυτές είναι η μέθοδος υπεροξειδάσης, η μέθοδος ανάπτυξης με βάση διαφορετικές θερμοκρασίες, 16S rDNA αλληλουχία, ribotyping, ανάλυση κυκλικών λιπαρών οξέων, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method κ.α. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να έχουμε μια σαφή ιδέα του επιθυμητού στόχου πριν από την επιλογή της αναλυτικής μεθόδου που θα εφαρμοστεί. Η διαδικασία απομόνωσης μπορεί να καταστεί δύσκολη όταν άλλοι μικροοργανισμοί είναι παρόντες, όπως από δευτερογενή επιμόλυνση μετά το άνοιγμα του περιέκτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αν τα σπόρια είναι ακόμα βιώσιμα, για την επιλεκτική ανάκτηση τους επιλέγουμε την μεταχείριση του θερμοκρασιακού σοκ. Αν τα σπόρια είναι νεκρά, ο καλύτερος τρόπος για να αξιολογήσουμε το δείγμα είναι να εντοπίσουμε τα συστατικά αρώματος (γουαϊακόλη και άλλα φαινολικά συστατικά) στο προϊόν, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υπεροξειδάσης ή της αέριας χρωματογραφίας.

1.11. Χρήση αισθητήρων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα

Ραγδαία είναι η εξέλιξη και χρήση αισθητήρων, διαφόρων λειτουργιών, τα τελευταία χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων. Πλέον υπάρχουν και χρησιμοποιούνται ευρέως αισθητήρες μηχανικής όρασης οι οποίοι χωρίζονται σε: αισθητήρες θερμοκρασίας, αισθητήρες αναγνώρισης χρώματος, αισθητήρες αναγνώρισης κωδικών επάνω σε συσκευασίες, αισθητήρες αναγνώρισης ξένων υλών μέσα στο προϊόν, αισθητήρες ελέγχου συσκευασίας και άλλοι.

Οι αισθητήρες οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη βασίζονται σε μια νέα τεχνολογία που ελέγχεται απόλυτα από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με τον οποίο συνδέονται και έτσι μεταφέρεται το αποτέλεσμα της μέτρησης μέσω πολύ λεπτών οπτικών ινών. Καθώς δεν υπάρχει καμία ανάγκη για

δειγματοληψία, ο κίνδυνος μόλυνσης μειώνεται στο ελάχιστο. Επιπλέον, το σήμα των οπτικών αισθητήρων είναι ανεξάρτητο της ταχύτητας ροής του δείγματος. Τα κύρια πλεονεκτήματα των μικροαισθητήρων οπτικών ινών οξυγόνου είναι η υψηλή χωρική ανάλυση τους (<50 μm) και ο γρήγορος χρόνος απόκρισης (<3 sec).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Δείγματα, στελέχη βακτηρίων και θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Δείγματα: Τα δείγματα τα οποία αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την παρουσία και ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* spp. αφορούσαν αποκλειστικά 100% φυσικούς χυμούς πορτοκάλι.

Βακτηριακά στελέχη: Τα στελέχη *Alicyclobacillus acidoterrestris* τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ανάπτυξή τους μετά από εμβολιασμό, τόσο σε θρεπτικό ζωμό όσο και σε χυμό πορτοκάλι, ήταν τα *A. acidoterrestris* B-457 (ATCC 49025) και B-458 (DSMZ 2498) τα οποία και ελήφθησαν από την τράπεζα μικροοργανισμών του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Οργανισμού ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας: Τα εργαστηριακά θρεπτικά υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (ζυμοί και στερεά υποστρώματα) ήταν τα Plate Count Agar (Biolife, Milan, Italy), de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Biolife), Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) agar (LAB M Limited, Lancashire, United Kingdom), Κ Άγαρ, ΒΑΤ Άγαρ (Merck, Darmstadt, Germany) και ο ζωμός Yeast Starch Glycose (YSG).

2.2. Μικροβιολογική ανάλυση χυμών και ανίχνευση *Alicyclobacillus* spp.

Αρχικά έγινε έρευνα αγοράς για 100% φυσικούς χυμούς πορτοκάλι. Ακολούθησε αγορά τέτοιου τύπου χυμών από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης της Αττικής. Η επιλογή των χυμών, εκτός από τα διαφορετικά σημεία πώλησης, βασίστηκε και στο να επιλεγθούν τόσο χυμοί μακράς διάρκειας (ραφιού) όσο και μικρής διάρκειας ζωής (ψυγείου). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 27 χυμοί ψυγείου και 31 χυμοί ραφιού. Επίσης, έγινε προσπάθεια να γίνει ισομερισμός των διαφορετικών εμπορικών προϊόντων. Η επιλογή χυμών με την ίδια επωνυμία είχε διαφορετική ημερομηνία λήξεως και αριθμό παρτίδας.

Μετά το πρώτο στάδιο της έρευνας αγοράς και αγοράς χυμών, ακολούθησε η επιστροφή ποσότητας σε θρεπτικά υποστρώματα PCA, MRS , RBC και Κ/BAT agar υπό ασηπτικές συνθήκες, αλλά και η μέτρηση pH των χυμών. Η επιλογή αυτών θρεπτικών υλικών έγινε με βάση την παρουσία ζυμών, μυκήτων και γαλακτικών που εντοπίζονται συχνά σε χυμούς.

Η χρήση του PCA (Plate Count Agar, Tryptic Glucose Yeast Agar) αφορά την καταμέτρηση Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX). Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 30°C για 72 ώρες.

Η χρήση του RBC (Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base) με προσθήκη αντιβιοτικού αφορά την καταμέτρηση ζυμών και μυκήτων. Η επώαση των τρυβλίων γίνεται στους $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 2-5 ημέρες.

Η χρήση του MRS αφορά την καταμέτρηση γαλακτικών βακτηρίων και η επώαση των τρυβλίων γίνεται στους 30°C για 72 ώρες ± 3 ώρες. Στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού MRS έγινε οξίνιση του μέσου σε τελικό pH 4.5 ± 0.2 με π. HCl πριν την αποστείρωση. Το K και BAT agar αφορά την καταμέτρηση των *Alicyclobacillus*. Στο BAT agar έγινε προσαρμογή του pH στο 4 ± 0.2 με προσθήκη π. θεικού οξέος (π. H_2SO_4), ενώ στο K agar έγινε προσαρμογή του pH στο 3.7 ± 0.2 με προσθήκη L-μηλικού οξέος ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$). Η οξίνιση και των δύο μέσων έγινε μετά την αποστείρωση. Η επώαση των τρυβλίων γίνεται στους $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 3-5 ημέρες.

Επίσης, έγινε επίστρωση από τα δείγματα χυμών σε K agar, αφού πρώτα είχε προηγηθεί θερμικό σοκ των δειγμάτων στους 80°C για 12 λεπτά για την ενεργοποίηση των спорίων *Alicyclobacillus*, αλλά για την εξάλειψη μικροβιακών μολυντών, όπως ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων σε περίπτωση που υπήρχαν.

Ακολούθησε παρατήρηση και καταγραφή των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση εμφάνισης αποικιών στο θρεπτικό υλικό K agar που υποδηλώνει την παρουσία εν δυνάμει *Alicyclobacillus* ακολούθησε το δεύτερο στάδιο, η μέθοδος IFU για την επιβεβαίωση πιθανών *Alicyclobacillus*, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Από τα 58 δείγματα χυμών ακολούθησε η επιβεβαίωση των *Alicyclobacillus* spp. σε όσα δείγματα σημειώθηκε εν δυνάμει ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου, σύμφωνα με την IFU μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Τα βήματα της μεθόδου IFU για την επιβεβαίωση πιθανών *Alicyclobacillus* είναι τα εξής :

Εξετάστηκαν οι αποικίες που είχαν αναπτυχθεί στο K agar, YSG ή BAT agar. Επιλέχθηκε ένας αντιπροσωπευτικός αριθμός από κάθε τύπο αποικιών για να πραγματοποιηθούν τα τεστ επιβεβαίωσης.

Σημείωση: Τα θρεπτικά υποστρώματα YSG και BAT agar υποστηρίζουν την ανάπτυξη όλων των γνωστών ειδών *Alicyclobacillus*.

Απομονώθηκαν αποικίες από K agar και από YSG ή BAT agar και έγινε επίστρωση κάθε επιλεγμένης αποικίας σε ένα τρυβλίο K agar και σε ένα τρυβλίο agar με ουδέτερο pH (PCA, TSA, BHI), τα οποία επώαστηκαν στους $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 3-5 μέρες. Επίσης, έγινε επίστρωση κάθε επιλεγμένης αποικίας σε δύο τρυβλία YSG agar, όπου το ένα επώαστηκε στους $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ και το άλλο τρυβλίο YSG στους $65\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Έπειτα, έγινε έλεγχος ανάπτυξης σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια:

- Δεν πρέπει να υπάρχει αύξηση στο θρεπτικό μέσο με το ουδέτερο pH. Αν η ανάπτυξη παρατηρείται σε αυτό το μέσο, καταγράφεται το αποτέλεσμα ως αρνητικό για *Alicyclobacillus*.

- Θετικό αποτέλεσμα σημειώνεται για την ανάπτυξη αν υπάρχουν ορατές αποικίες στο K agar, όπου πραγματοποιείται περαιτέρω διαδικασία παρασκευάσματος με phase contrast για την παρουσία спорίων με μικροσκόπιο ή χρώση спорίων. Εάν δεν υπάρχει ανάπτυξη στο K agar, θα πρέπει να παρατηρηθεί και η ανάπτυξη στο YSG agar. Η παραγωγή спорίων μπορεί να μη συμβεί στο YSG agar, οπότε μπορεί να απαιτείται σπορογένεση σε επιπλέον

θρεπτικό υλικό όπως το BAT agar με pH<4.0, για να αποφευχθούν άλλα ανθεκτικά σε οξυάντοχα σπορογόνα βακτήρια, όπως ο *Bacillus coagulans*.

- Αρνητικό αποτέλεσμα σημειώνεται για τον αλλοιογόνο *Alicyclobacillus* αν υπάρχει ανάπτυξη στο YSG agar στους 65°C.

- Καταγράφονται οι αποικίες που παράγουν σπόρια σε pH 3.7 και δεν αναπτύσσονται σε pH>6 σαν πιθανές *Alicyclobacillus*. Αυτές που δεν αναπτύσσονται στους 65°C είναι πιθανές για αλλοιογόνοι *Alicyclobacillus* (IFU, 2003, 2004).

Σημείωση:

Τα 8 δείγματα που επιβεβαιώθηκαν με την IFU μέθοδο αποθηκεύτηκαν σε YSG broth, στο οποίο είχε γίνει ρύθμιση του pH στο 3.7 με την χρήση υδροχλωρικού οξέος (HCL) 1 N, με 2 % γλυκερόλη.

Για την ανακαλλιέργεια απαιτείται εμβολιασμός σε YSG broth και επώαση στους 45±1°C για 2 ημέρες.

2.3. Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση *Alicyclobacillus* spp. με τη χρήση μοριακών τεχνικών, 16S rDNA PCR- RFLP

Εξαγωγή DNA και PCR: Πραγματοποιήθηκε μια προεργασία παραλαβής βιομάζας τόσο των 8 δειγμάτων, αλλά και δύο στελεχών 457 και 458 από την τράπεζα του ΕΘ.ΙΑΓ.Ε.

Ακολούθησε διαδικασία με βάση το πρωτόκολλο της εξαγωγής DNA και χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές: P1 5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC-3' και P4 5'-ATCTACGCATTTACCGCTAC-3'. Αυτοί οι εκκινητές στοχεύουν στις περιοχές του γονιδίου του βακτηριακού 16S rRNA στη θέση V1 και V3 αντίστοιχα. Για την PCR χρησιμοποιήθηκε μια αντίδραση όγκου των 25 ml που περιείχε περίπου 2 mmol DNA, 1 mmol dNTP (Neb), 5 x ρυθμιστικό διάλυμα, 0.5 mmol του εκάστοτε εκκινητή, 1mmol MgCl (x 50) και 2.5U Taq DNA πολυμεράση.

Οι συνθήκες των θερμικών κύκλων PCR περιελάμβανε 94°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους των 94°C για 1 λεπτό, 42°C για 1 λεπτό, και 72°C για 2 λεπτά. Τέλος, η αντίδραση διατηρήθηκε στους 72°C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση (Applied Biosystems) σε 1% αγαρόζη και οπτικοποιήθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο υπό υπεριώδες φως.

Ανάλυση θραυσμάτων περιορισμού: Δείγματα (5 ml) των προϊόντων PCR υπέστησαν πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες 5U HINF, PSA, Hha I, Hae III, MSE I και Bsp 1286I ανά αντίδραση αντίστοιχα (Neb). Τα δείγματα που υπέστησαν πέψη αναλύθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε 3% αγαρόζη στα 100V επί 2 ώρες και φωτογραφήθηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο κάτω από υπεριώδες φως.

Αλληλούχιση DNA: Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων της PCR και τα δείγματα στάλθηκαν σε εξωτερικό εξειδικευμένο εργαστήριο για την επίτευξη της αλληλούχισης του DNA των δειγμάτων.

2.4. Αξιολόγηση της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* και παρακολούθηση των μεταβολών της συγκέντρωσης οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα

Η ανάπτυξη μίγματος των στελεχών *A. acidoterrestris* B-457 και B-458 αξιολογήθηκε μετά από εμβολιασμό ($\approx 2 \log \text{ cfu/ml}$) τόσο θρεπτικού ζωμού YSG όσο και 100% φυσικού χυμού πορτοκάλι. Στο YSG broth είχε προηγηθεί όξυνση του μέσου στο pH 3.7 με την χρήση πυκνού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 1N. Μεταξύ των εμπορικών προϊόντων τα οποία είχαν αξιολογηθεί σε προγενέστερο στάδιο ως προς τη μικροβιολογική τους κατάσταση, στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί χυμός χωρίς ιδιαίτερα μεγάλη περιεκτικότητα σε ίνες ούτως ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη επίδραση αυτών στις μετρήσεις των αισθητήρων. Επίσης, τα προϊόντα χυμού ελέγχθηκαν ως προς την αρχική μικροβιολογική τους κατάσταση, ενώ μετρήθηκε και το pH αυτών χρησιμοποιώντας ψηφιακό μετρητή pH (Thermo Scientific Russell RL150, Corporation, Beverly, MA, USA).

Με το μίγμα των στελεχών *A. acidoterrestris* εμβολιάστηκαν έξι δείγματα χυμού και έξι δείγματα θρεπτικού ζωμού YSG broth (Εικόνα 2.2). Δύο δείγματα από χρησιμοποιήθηκαν για μικροβιολογική ανάλυση, δύο δείγματα για μέτρηση οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα με τη χρήση ειδικών σενσόρων (Εικόνα 2.1), ένα δείγμα για μέτρηση pH και τέλος ένα δείγμα για χημικές αναλύσεις (HPLC). Όλα τα εμβολιασμένα δείγματα επώαστηκαν στους 25 και 45°C για συνολικό διάστημα 10 ημερών και 72 h, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία των 25°C επιλέχθηκε για να προσομοιάσει την πραγματική θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων χυμού (θερμοκρασία περιβάλλοντος), ενώ αυτή των 45°C αντικατοπτρίζει μια θερμοκρασία η οποία, όντας η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *A. acidoterrestris*, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως θερμοκρασία για διενέργεια δοκιμών πρόκλησης (challenge tests) από τη βιομηχανία χυμών. Κατά την επώαση στους 25°C, οι δειγματοληψίες και οι αντίστοιχες μετρήσεις (μικροβιολογικές αναλύσεις, μετρήσεις αερίων με αισθητήρες, μετρήσεις pH και λήψη δειγμάτων για HPLC) λάμβαναν χώρα ανά 24 h, ενώ κατά την επώαση στους 45°C, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 3, 6, 9, 12, 24, 32, 48 και 72 h. Για την παρακολούθηση και αξιολόγηση της ανάπτυξης του βακτηρίου μέσω μικροβιολογικών αναλύσεων, στα προαναφερθέντα χρονικά διαστήματα και σε κάθε μία από τις δύο θερμοκρασίες επώαση κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων (ζωμού/χυμού) επιστρώνονταν επιφανειακά σε BAT agar (pH=4 \pm 0.2). Οι πληθυσμοί του βακτηρίου προσδιορίζονταν με απαρίθμηση των αναπτυχθέντων αποικιών (colony forming units, cfu) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 45°C για 3-5 ημέρες και, τελικά, τα συλλεχθέντα μικροβιολογικά δεδομένα εκφράστηκαν σε log cfu/ml ζωμού ή χυμού.



Εικόνα 2.1. Αισθητήρας οξυγόνου (A) και διοξειδίου του άνθρακα (B) (PreSens, Regensburg, Germany).



Εικόνα 2.2. Τοποθέτηση του αισθητήρα για μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα στο αυτοκόλλητο (κίτρινο) που βρίσκεται επιφανειακά του χυμού (A), και τοποθέτηση του αισθητήρα για μέτρηση του οξυγόνου στο αυτοκόλλητο (ροζ) εσωτερικά του χυμού (B).

2.5. Προσδιορισμός γουαϊακόλης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλύμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Η HPLC ανάλυση των δειγμάτων χυμού διεξήχθη με το μοντέλο Agilent Technologies 1200 series ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων υν-(UV-DAD). Τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου 0.45 μm Millipore και εγχύθηκαν στην HPLC. Η ένεση έγινε με τη βοήθεια ενός εγχυτήρα με 20 μL . Η αναλυτική στήλη έχει διαστάσεις 250 mm \times 4 mm. Η HPLC έκλυση διεξήχθη στους 25°C. Χρησιμοποιήθηκε μίγμα φορμικού οξέος και νερού (5:95, v / v), και μεθανόλη. Το προφίλ έκλυσης ήταν σε έναν ρυθμό ροής 1,0 mL / min, 60% φορμικό και

νερό και 40% μεθανόλη. Τα χρωματογραφήματα παρακολουθήθηκαν ταυτόχρονα σε 210, 276 και 310 nm. Ταυτοποίηση των ατομικών ενώσεων διεξήχθη συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και των φασματικών δεδομένων με εκείνα των προτύπων γουαϊακόλης.

Πριν την διαδικασία HPLC ανάλυσης προηγήθηκε καθαρισμός των δειγμάτων με την χρήση φίλτρων 0.45 μm (Chromafil GF/P – 45/25) και φυγοκέντρησης. Όπως προαναφέρθηκε κατά την επώαση στους 25°C, οι δειγματοληψίες και οι αντίστοιχες μετρήσεις (микροβιολογικές αναλύσεις, μετρήσεις αερίων με αισθητήρες, μετρήσεις pH και λήψη δειγμάτων για HPLC) λάμβαναν χώρα ανά 24 h, ενώ κατά την επώαση στους 45°C, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 3, 6, 9, 12, 24, 32, 48 και 72 h. Κατά την HPLC, αναλύθηκαν όλα τα δείγματα, ώστε να διαπιστωθεί αν σημειώνεται παραγωγή γουαϊακόλης.

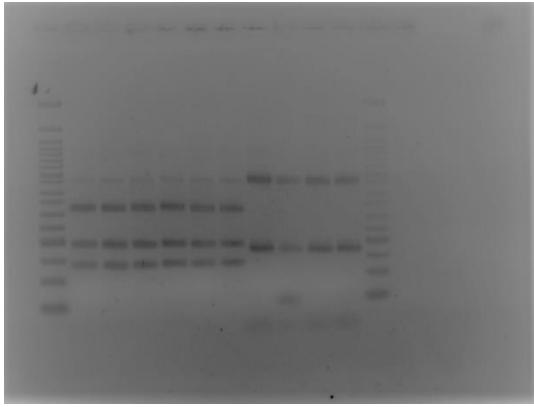
3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1. Ανίχνευση και απομόνωση *Alicyclobacillus* spp.

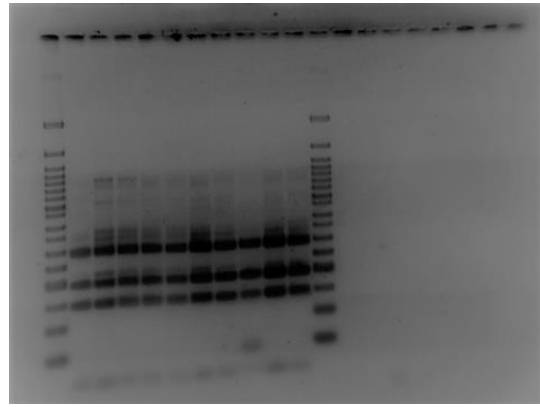
Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι απομονώθηκαν από τα δείγματα χυμού που εξετάστηκαν ήταν Gram-θετικά, υποχρεωτικά αερόβια, θερμο-οξεόφιλα και σπορογόνα βακτήρια. Από τα 58 δείγματα χυμών που εξετάστηκαν συνολικά, σε 12 από αυτά παρουσιάστηκε βακτηριακή ανάπτυξη σε K agar. Από αυτά τα 12 δείγματα χυμών, απομονώθηκαν συνολικά 23 αποικίες εν δυνάμει *Alicyclobacillus* spp. και τελικά, μετά την εφαρμογή της μεθόδου IFU, οχτώ από αυτές τις αποικίες έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και ως εκ τούτου επιβεβαιώθηκαν φαινοτυπικά ως πιθανές αποικίες βακτηρίων του παραπάνω γένους. Οι βακτηριακές απομονώσεις αυτές (n=8) είχαν εύρος ανάπτυξης σε pH από 2.2 έως 5.8 και σε θερμοκρασία από 23 έως 55°C .

3.2. Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση *Alicyclobacillus* spp. με 16S rDNA PCR- RFLP.

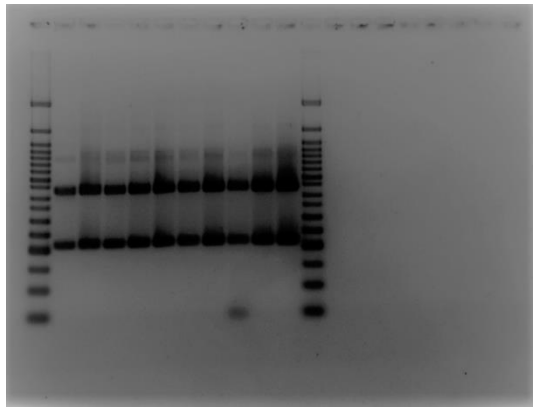
Ανάλυση γονιδίων 16s rRna PCR - RFLP: Τα 16s rRna *A. acidoterrestris* 457 ATCC 49025 και *A. acidoterrestris* 458 DSMZ 2498 και των 8 θερμο-οξεόφιλων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τους χυμούς πορτοκάλι χρησιμοποιήθηκαν στη PCR με τους εκκινητές που προαναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2.3. Τα θραύσματα DNA των δειγμάτων αναλύθηκαν με RFLP. Τα αποτελέσματα από την PCR και από την δράση των περιοριστικών ενζύμων HINF, PSA, Hitha I, Hae III, MSE I και Bsp 1286I παρατίθενται στις Εικόνες 3.1-3.6. Οι περιοριστικές ενδουκλεάσες MSE I και Bsp 1286I δεν λειτούργησαν. Από την αλληλούχιση του DNA των δειγμάτων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 4 δείγματα πρόκειται για *Alicyclobacillus acidoterrestris* και τα υπόλοιπα 4 για *Alicyclobacillus hesperidium*.



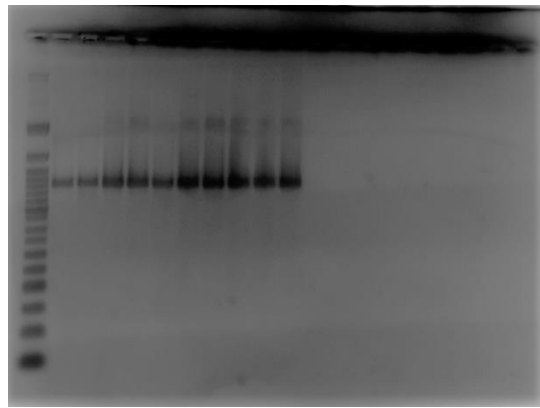
Εικόνα 3.1. Περιοριστικό ένζυμο Hha I.



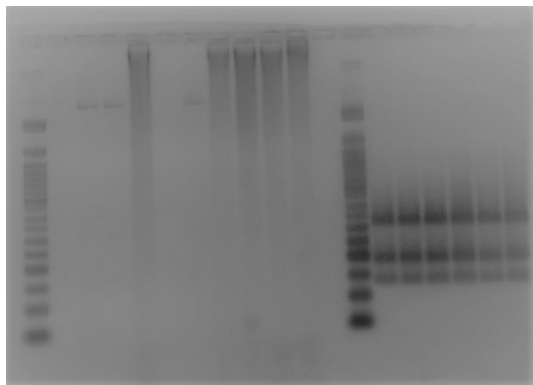
Εικόνα 3.2. Περιοριστικό ένζυμο Hinf I.



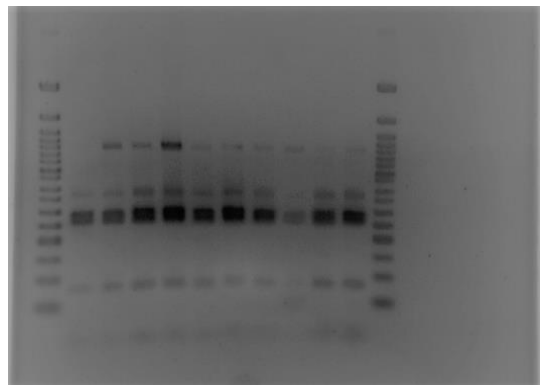
Εικόνα 3.3. Περιοριστικό ένζυμο Pst I.



Εικόνα 3.4. Περιοριστικό ένζυμο Mse I.



Εικόνα 3.5. Περιοριστικό ένζυμο Hae III.



Εικόνα 3.6. RFLP gel 16S gene.

3.3. Αξιολόγηση της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* και των μεταβολών της συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου σε θρεπτικό ζωμό και φυσικό χυμό πορτοκάλι

Το *Alicyclobacillus* όπως προαναφέρθηκε είναι ένα υποχρεωτικό αερόβιο βακτήριο με αποτέλεσμα να μπορούμε να προβλέψουμε την ανάπτυξη του μέσα σε ζωμό ή χυμό ανάλογα με το διαθέσιμο οξυγόνο.

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αναφέρεται ότι το ποσοστό ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) επηρεάζει τη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Το ασκορβικό οξύ σε υδατικά διαλύματα οξειδώνεται εύκολα από το οξυγόνο του αέρα, αντίδραση η οποία καταλύεται από ιχνοποσότητες ιόντων διαφόρων μετάλλων (κυρίως Cu^{2+}) και ευνοείται σε ουδέτερα και αλκαλικά διαλύματα. Σε όξινα διαλύματα η αντίδραση με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο είναι αρκετά αργή. Συγκεκριμένα, σε χυμό μήλο που έγινε προσθήκη ασκορβικού οξέος, φάνηκε ότι μια συγκέντρωση της τάξης των 15 mg/100 ml είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* (Cerny et al., 2000). Εν μέρει αυτό επιβεβαιώθηκε και από την συγκεκριμένη μελέτη όπου, όπως προαναφέρθηκε, έγιναν αναλύσεις σε διαφορετικά εμπορικά προϊόντα χυμών και το *Alicyclobacillus* spp. εντοπίστηκε σε εκείνα με τα χαμηλότερα ποσοστά ασκορβικού οξέος. Η αναστολή ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* φαίνεται όμως να μην επηρεάζει την παραγωγή γουαϊακόλης (Siegmond et al., 2007).

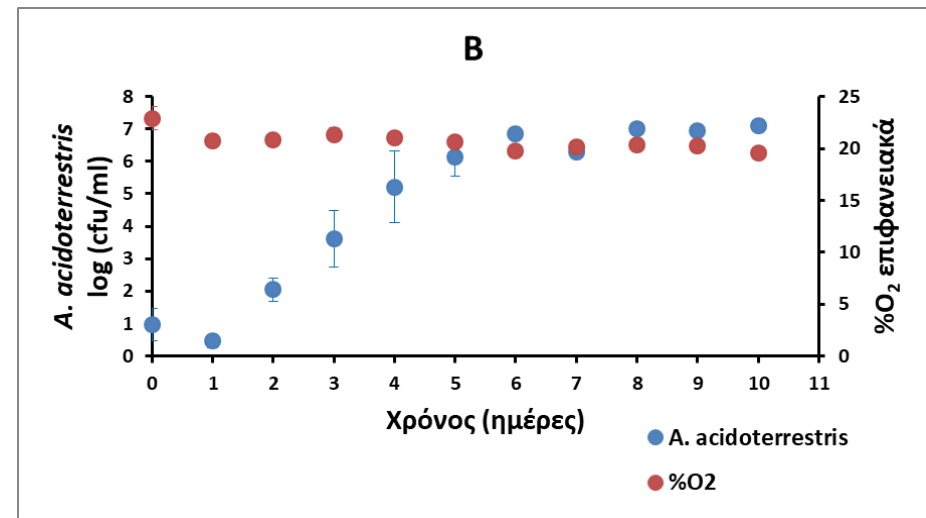
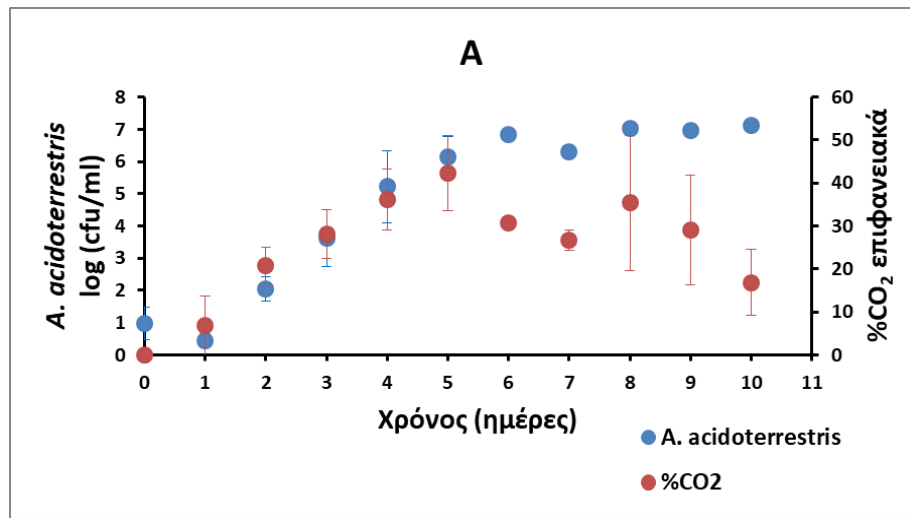
Το *A. acidoterrestris*, κατά την επώαση στους 25°C, αναπτύχθηκε καλύτερα στο θρεπτικό ζωμό από ότι στο χυμό, τόσο σε επίπεδο ρυθμού ανάπτυξης όσο και τελικού μέγιστου βακτηριακού πληθυσμού (Γράφηματα 3.1 και 3.2). Ο τελικός βακτηριακός πληθυσμός στους 25°C στο ζωμό ήταν περίπου 7 log cfu/ml, ενώ στο χυμό ο αντίστοιχος πληθυσμός ήταν 5 log cfu/ml. Στην περίπτωση επώασης στους 45°C, οι παρατηρούμενες διαφορές ήταν μικρότερες, με το βακτήριο να προσεγγίζει στο ζωμό τους 7 log cfu/ml και στο χυμό τους 6 log cfu/ml.

Κατά την επώαση των δειγμάτων ζωμού και χυμού στους 25°C παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης (%) αερίου και μικροβιακής ανάπτυξης, ενώ στα επίπεδα ποσοστού CO_2 δεν σημειώθηκε διαφορά ανάμεσα σε ζωμό και χυμό. Η μόνη διαφορά η οποία παρατηρήθηκε ήταν ότι μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ημέρας σημειώθηκε μείωση του CO_2 , ενώ την 8^η ημέρα παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του αερίου ενώ τα επίπεδα του βακτηριακού πληθυσμού παρέμειναν σταθερά (Γράφημα 3.1.A). Όσον αφορά στα επίπεδα O_2 πάλι υπήρξε καλή συσχέτιση αν και δεν σημειώθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις σε αυτό το αέριο, με τις συγκεντρώσεις αυτού να κυμαίνονται μεταξύ 18 και 23 % (Γράφηματα 3.1.B και 3.2.B).

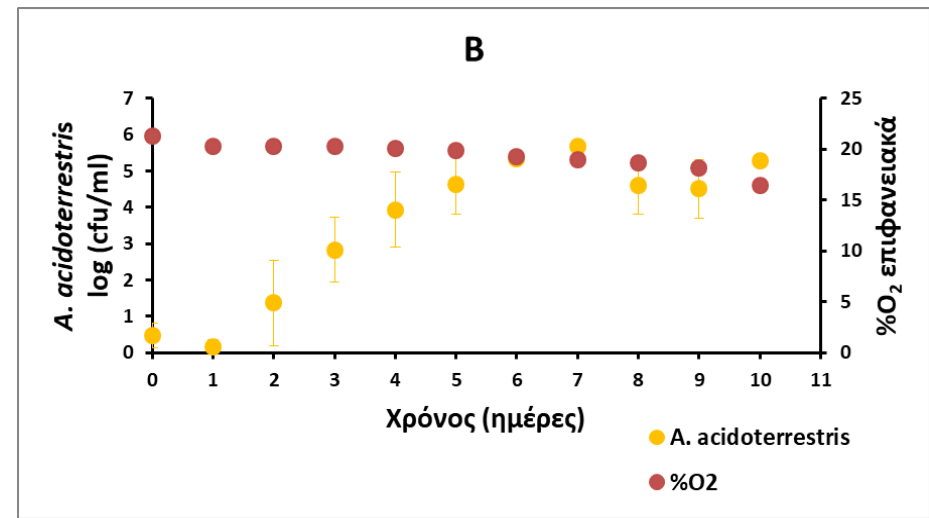
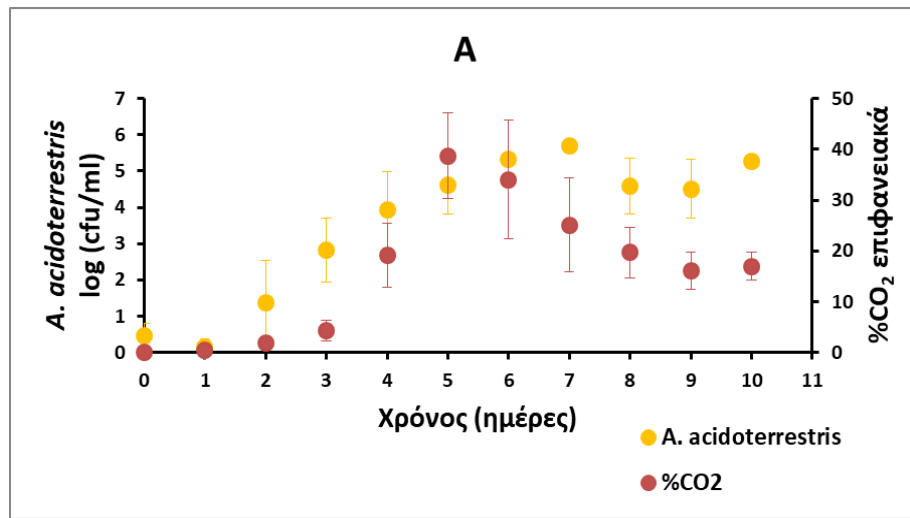
Στους 45°C στο ζωμό δεν υπήρχαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του βακτηρίου σε σχέση με τους 25°C, ενώ η συγκέντρωση του CO_2 έφτασε μέχρι 25% (Γράφημα 3.3.A), σε αντίθεση με τους 25°C που η μέγιστη συγκέντρωση του αερίου ήταν 40% (Γράφημα 3.1.A). Στο χυμό τα επίπεδα του CO_2 , έφτασαν μέχρι το 65% (Γράφημα 3.5.A). Στην περίπτωση της επιφανειακής συγκέντρωσης του οξυγόνου κατά τη διάρκεια της επώασης του ζωμού στους 45°C (Γράφημα 3.4.A), σημειώθηκε καλή συσχέτιση αυτής με τη βακτηριακή ανάπτυξη, και δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του αερίου όπως συνέβη στους 25°C (Γράφημα 3.1.B). Στο χυμό επίσης παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση, όμως μεταξύ 9 και 24 ωρών, οπότε και έλαβε χώρα αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού κατά 4 log cfu/ml, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αλλαγή στα επίπεδα του O_2 , ενώ στις 32-72 ώρες

το O₂ αρχίζει να μειώνεται όπου στις 72 ώρες αγγίζει το 0,1% (Γράφημα 3.6.A). Γενικά, οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης O₂ μεταξύ ζυμού και χυμού ήταν παραπλήσιες.

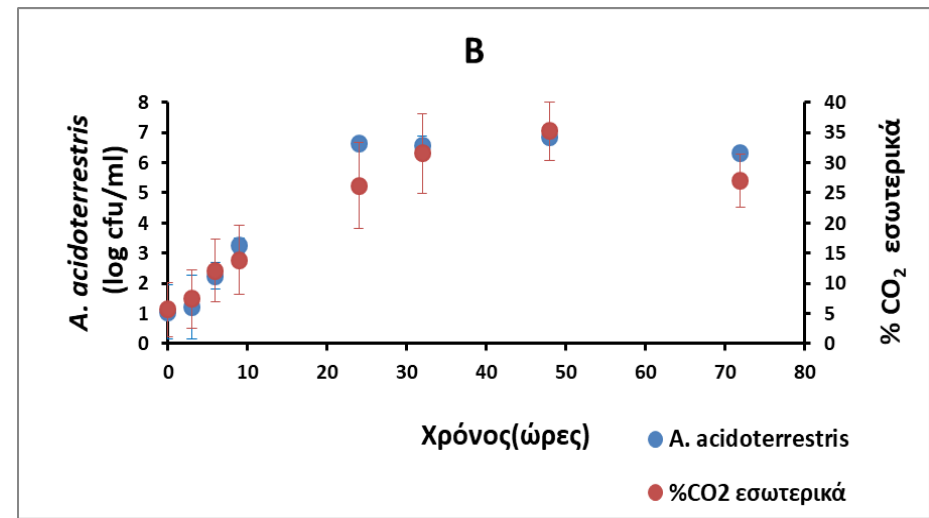
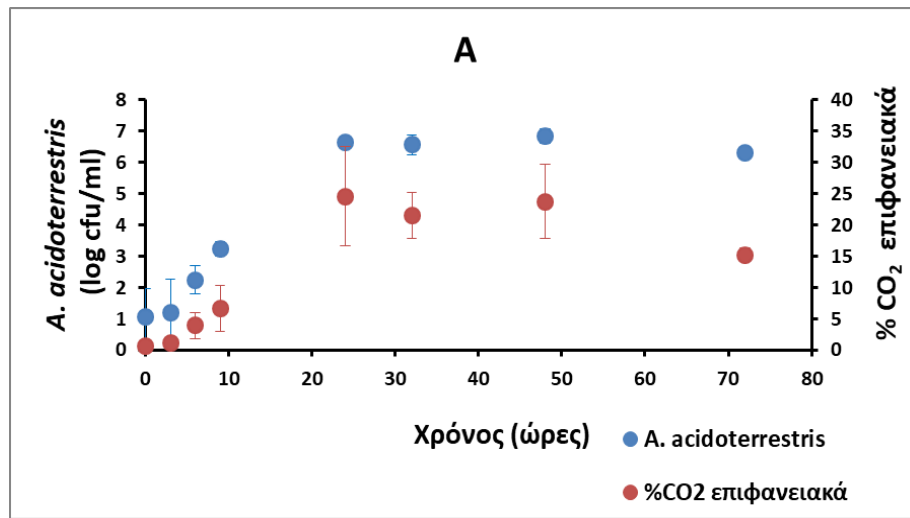
Στην περίπτωση που ο αισθητήρας τοποθετήθηκε εσωτερικά του ζυμού και του χυμού (45°C) διαπιστώθηκαν διαφορές σε σχέση με τα ποσοστά των αερίων τα οποία καταγράφηκαν επιφανειακά. Συγκεκριμένα, στο ζυμό το CO₂ έφτασε το 35,22 %, ενώ στο χυμό συνέχισε να αυξάνεται και μετά τις 48 ώρες, όπου ο *A. acidoterrestris* φαίνεται να βρίσκεται στη στατική φάση, αγγίζοντας το 60 % (Γράφημα 3.3.B). Στην περίπτωση του O₂ στο εσωτερικό (Γράφημα 3.4.B) φαίνεται ότι τα αποτελέσματα είναι αρκετά αξιόπιστα και να σημειώνεται καλύτερη συσχέτιση με τα μικροβιολογικά δεδομένα σε σχέση με την αντίστοιχη επιφανειακή συγκέντρωση του αερίου (Γράφημα 3.4.A). Τόσο στο ζυμό όσο και στο χυμό, παρατηρούμε ότι κατά την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* παρατηρείται μείωση του O₂ (Γράφημα 3.3 και 3.4) και από τις 24 ώρες όπου τα επίπεδα του βακτηρίου είναι στάσιμα, στάσιμο είναι και το O₂. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι όταν το ποσοστό οξυγόνου, τόσο σε ζυμό όσο και σε χυμό, ήταν <7 % τότε σταθεροποιήθηκε ο πληθυσμός του βακτηρίου, εισερχόμενος πιθανότατα στη φάση στασιμότητας της βακτηριακής καμπύλης ανάπτυξης. Για τη συγκεκριμένη παρατήρηση ενδεχομένως, εν μέρει, να ευθύνεται το CO₂ το οποίο δύναται να λειτουργήσει ως βακτηριοστατικό με συνεργιστική δράση. Επίσης, παρατηρούμε ότι οι τιμές O₂ στην επιφάνεια είναι υψηλότερες από αυτές στο εσωτερικό του χυμού (Γράφημα 3.6) , σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις οι οποίες έγιναν για το ζυμό όπου η επιφανειακή συγκέντρωση του αερίου δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ενώ η εσωτερική συγκέντρωσή του μειώθηκε από 25 % (αρχική συγκέντρωση) σε 4 % (τελική συγκέντρωση) (Γράφημα 3.4).



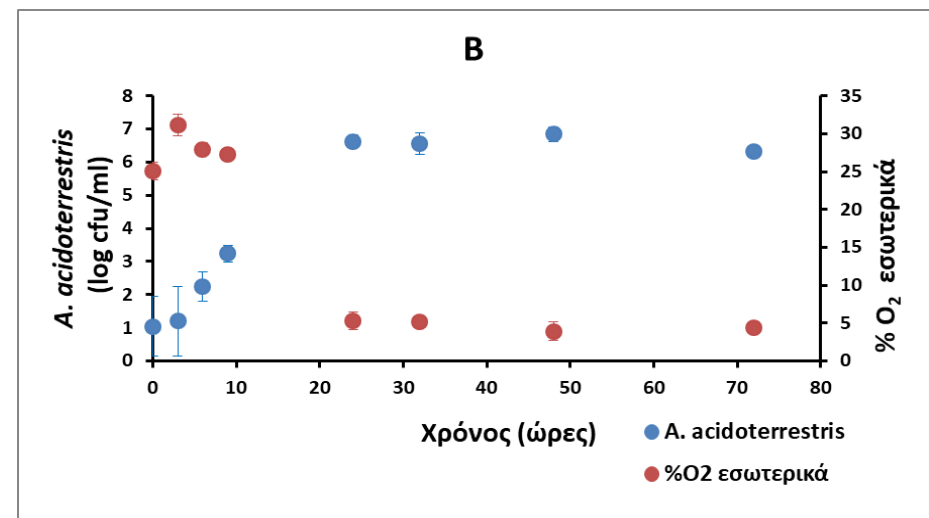
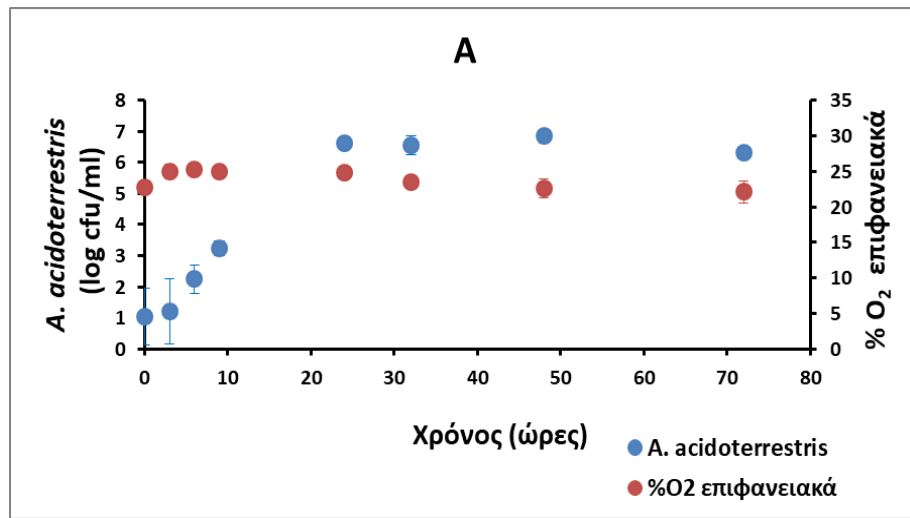
Γράφημα 3.1. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *A. acidoterrestris* σε θρεπτικό ζωμό YSG στους 25°C με την επιφανειακή συγκέντρωση (%) του CO₂ (A) και του O₂ (B).



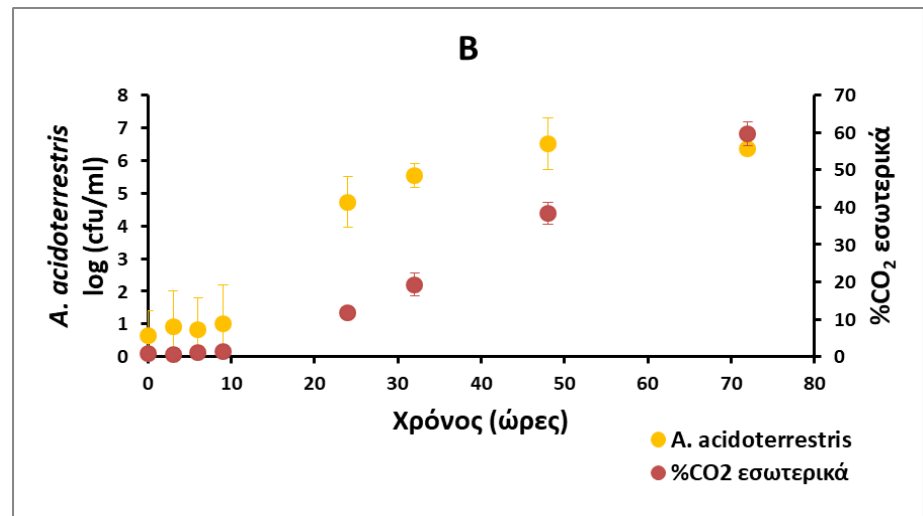
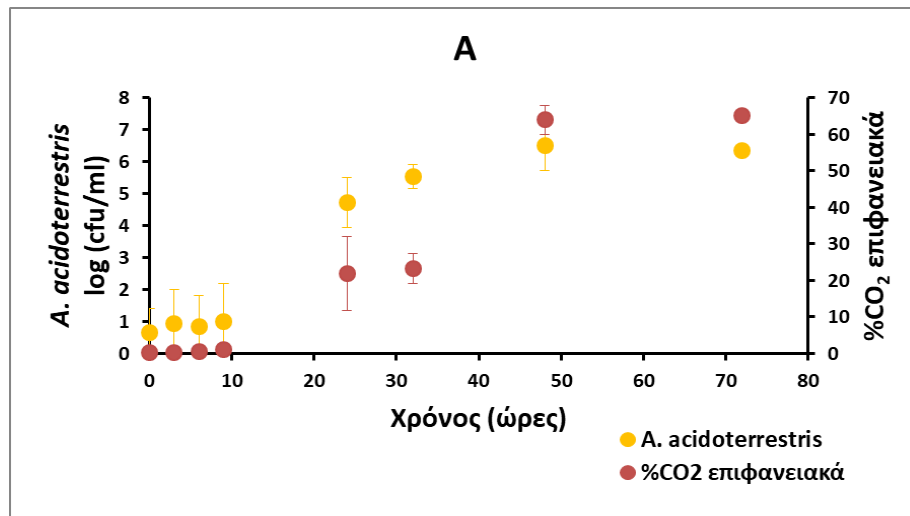
Γράφημα 3.2. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε φυσικό χυμό πορτοκάλι στους 25°C με την επιφανειακή συγκέντρωση (%) του CO₂ (A) και του O₂ (B).



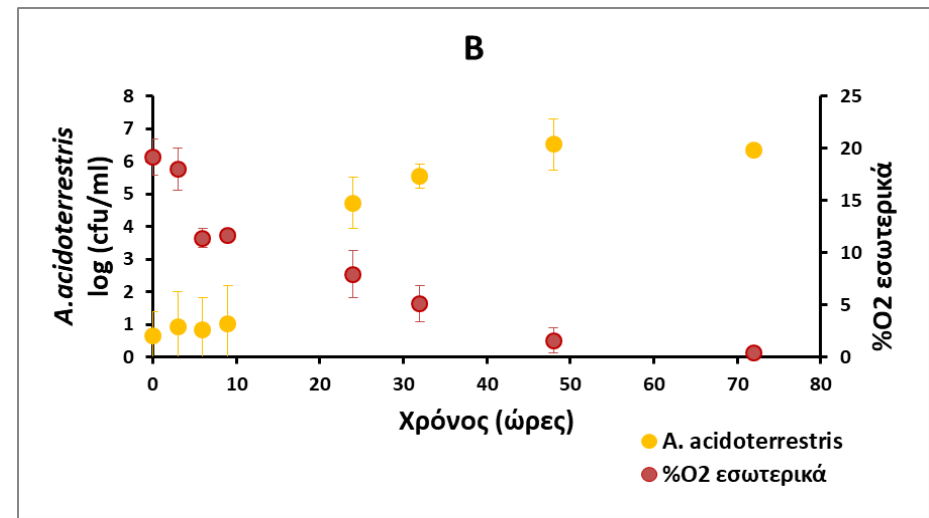
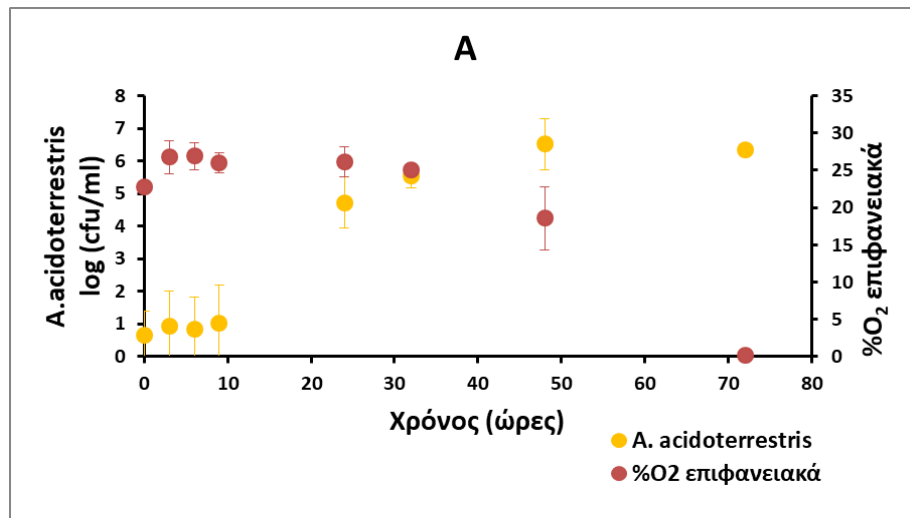
Γράφημα 3.3. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε θρεπτικό ζυμό YSG στους 45°C με την επιφανειακή (A) και την εσωτερική (B) συγκέντρωση (%) του CO₂.



Γράφημα 3.4. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε θρεπτικό ζυμό YSG στους 45°C με την επιφανειακή (A) και την εσωτερική (B) συγκέντρωση (%) του O₂.



Γράφημα 3.5. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε φυσικό χυμό πορτοκάλι στους 45°C με την επιφανειακή (A) και την εσωτερική (B) συγκέντρωση (%) του CO₂.



Γράφημα 3.6. Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε φυσικό χυμό πορτοκάλι στους 45°C με την επιφανειακή (A) και την εσωτερική (B) συγκέντρωση (%) του O₂.

3.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

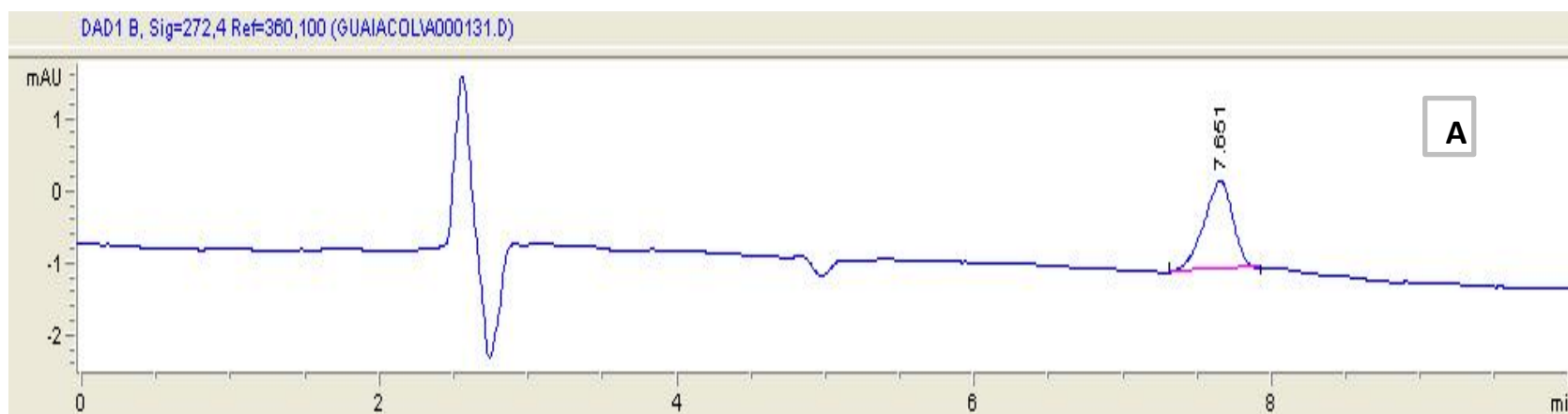
Στόχος της HPLC ανάλυσης ήταν να διερευνήσουμε αν στα δείγματα χυμού που είχαν εμβολιαστεί με το μίγμα των στελεχών *A. acidoterrestris* ήταν δυνατή η παραγωγή γουαϊακόλης. Εξετάστηκαν όλα τα δείγματα χυμών που είχαν επωαστεί τόσο στους 25°C όσο και στους 45°C. Τα αποτελέσματα έδειξαν όπως φαίνεται και στα παρακάτω χρωματογραφήματα (Εικόνα 11-14) ότι δεν είχαμε παραγωγή γουαϊακόλης. Γνωρίζαμε εξ αρχής ότι το στέλεχος *A. acidoterrestris* B-457 είναι ικανό να παράγει γουαϊακόλη, ενώ το B-458 όχι.

Η ταυτοποίηση γίνεται με βάση το χρόνο ανάσχεσης της κορυφής ή με τον συντελεστή κατακράτησης που λαμβάνεται κατά την ανάλυση δείγματος και προτύπου της καθαρής ουσίας (Εικόνα 11). Είναι απαραίτητο, προκειμένου η αντιστοίχιση να είναι έγκυρη, η ανάλυση των δειγμάτων και προτύπου να διεξαχθεί υπό τις ακριβώς ίδιες πειραματικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει χρησιμοποιώντας την ίδια στήλη (σε ό, τι αφορά στα τεχνικά χαρακτηριστικά της, συμπεριλαμβανομένου και του πληρωτικού υλικού), ίδια σύσταση και ροή κινητής φάσης, καθώς και ίδια θερμοκρασία ανάλυσης. Επίσης, ο χρόνος έκλουσης δεν μεταβάλλεται με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας. Η απουσία εμφάνισης νέας κορυφής και παράλληλα η ενίσχυση της υπάρχουσας κορυφής του συστατικού με διατήρηση της συμμετρίας της, επιβεβαιώνει την ταυτότητα της κορυφής κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις συγκεκριμένες αναλύσεις. Παρατηρούμε ότι στην αρχή του χρωματογραφήματος στα δείγματα εμφανίζονται ουσίες, οι οποίες δεν συγκρατούνται και η εικόνα είναι παρόμοια σε όλα τα δείγματα, όπως και ο χρόνος ανάσχεσης σε σύγκριση με το πρότυπο (Γράφημα 3.7 - 3.10).

Για να επιβεβαιώσουμε την αρχική ένδειξη από τα χρωματογραφήματα με βάση το χρόνο ανάσχεσης ότι δεν παράγεται γουαϊακόλη, επιχειρήσαμε και τον ποσοτικό προσδιορισμό, παρόλο που δεν υπήρχε ανίχνευση της ουσίας. Η ποσοτικοποίηση στις χρωματογραφικές αναλύσεις έγινε βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής, το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας, μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Επίσης, έγινε και σύγκριση των εμβαδών μεταξύ των δειγμάτων μετά τα 4 min, δηλαδή των διάφορων ουσιών-συστατικών που εμφανίζονται κατά την HPLC ανάλυση. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι δεν υπήρχαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων από τον αρχικό εμβολιασμό με *A. acidoterrestris* μέχρι και την τελευταία μέρα επώασης. Σημειώνεται ότι μονάδα μέτρησης του εμβαδού στην περίπτωση ανιχνευτή UV/Vis είναι η μονάδα mAU·min (Τα αποτελέσματα εμβαδού επιφάνειας των κορυφών δεν δίνονται).

Μία πιθανή εξήγηση είναι η παρεμπόδιση παραγωγής λόγω μίγματος, αλλά και το γεγονός ότι δεν έγινε προσθήκη κάποιου υποστρώματος. Η παρουσία του *Alicyclobacillus* spp. που έχουν την ικανότητα να παράγουν γουαϊακόλη, καθώς επίσης και τα υποστρώματα που απαιτούνται για την παραγωγή γουαϊακόλης σε χυμούς φρούτων είναι προαπαιτούμενα για την αλλοίωση του χυμού φρούτων από γουαϊακόλη (Witthuhn R. et al., 2012). Οι πιθανές πρόδρομες ουσίες της γουαϊακόλης είναι το φερουλικό οξύ, η βανιλίνη και το βανιλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται στη φύση. Το φερουλικό οξύ είναι αρωματική φαινολική ένωση, το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί σε βανιλίνη και βανιλικό οξύ από διάφορα βακτήρια (Sutherland et al., 1983) και μύκητες (Henderson, 1961; Toms

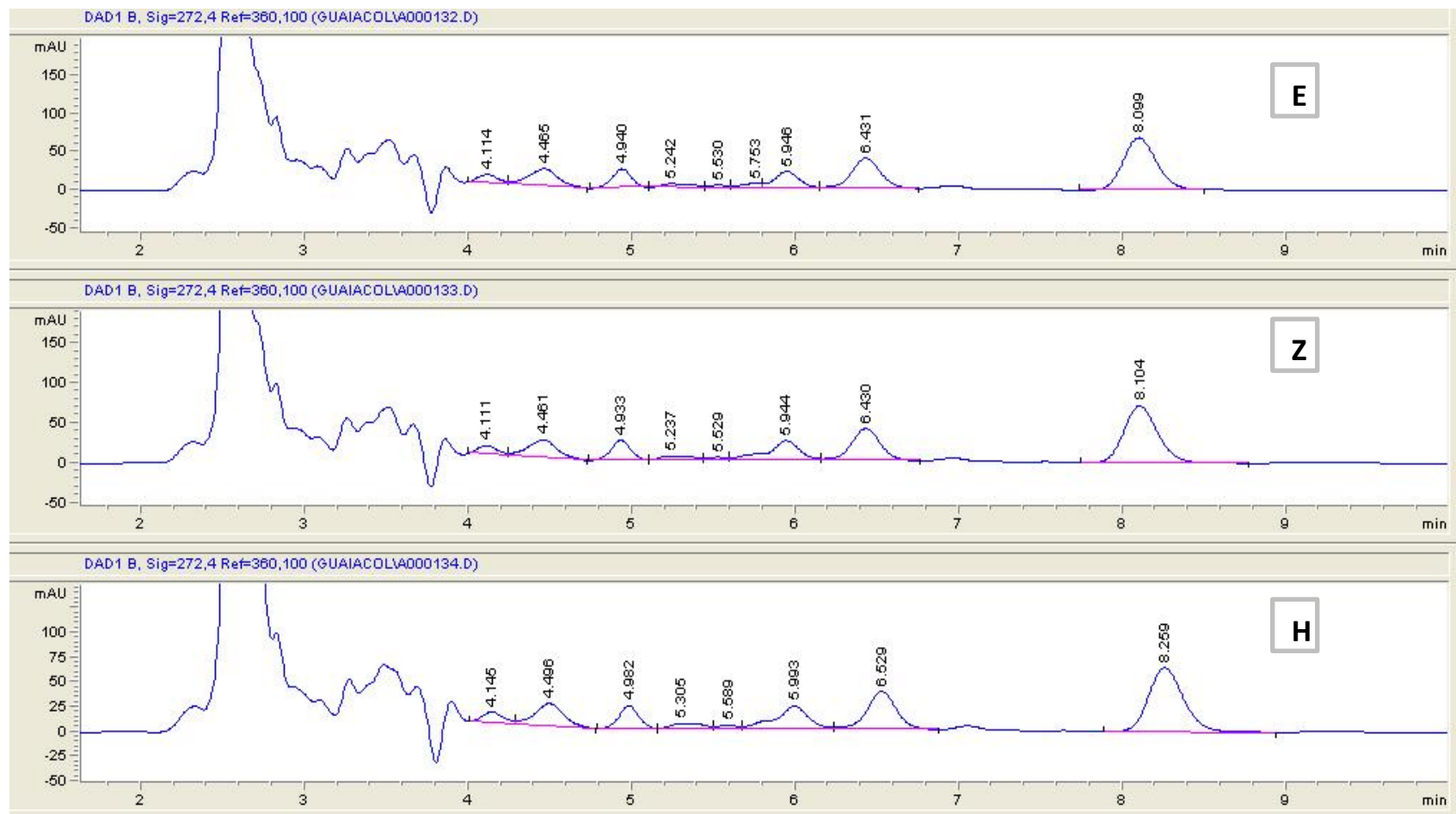
and Wood, 1970). Το βανιλικό οξύ μπορεί φυσικά να υπάρχει στο χυμό φρούτων ως παράγωγο του λιγνίνης ή ως μεταβολίτης διαφόρων μικροβίων (Chang and Kang, 2004) και η βανιλίνη είναι παράγωγο του φερουλικού οξέος που υπάρχει σε διάφορα προϊόντα φρούτων και φρούτων (Goodner et al., 2000). Ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί η μεταβολική οδός για την παραγωγή της γουαϊακόλης και ποια πρόδρομη ουσία ευθύνεται. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι το φερουλικό οξύ στους χυμούς φρούτων μπορεί να είναι ένας πιθανός πρόδρομος της παραγωγής γουαϊακόλης. Σε άλλες μελέτες, διάφορες συγκεντρώσεις φερουλικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί εάν το φερουλικό οξύ ήταν πρόδρομο για την παραγωγή γουαϊακόλης από τον *A. acidoterrestris*, υποδεικνύοντας ότι το φερουλικό οξύ δεν επηρεάζει το δυναμικό αλλοίωσης του χυμού φρούτων (Witthuhn R. et al., 2012). Οπότε ίσως στην συγκεκριμένη περίπτωση που δεν ήταν ικανή η ανίχνευση γουαϊακόλης, ίσως με τη χρήση προτύπων πρόδρομων μορίων να είχαμε θετικά αποτελέσματα ανίχνευσης αυτών.



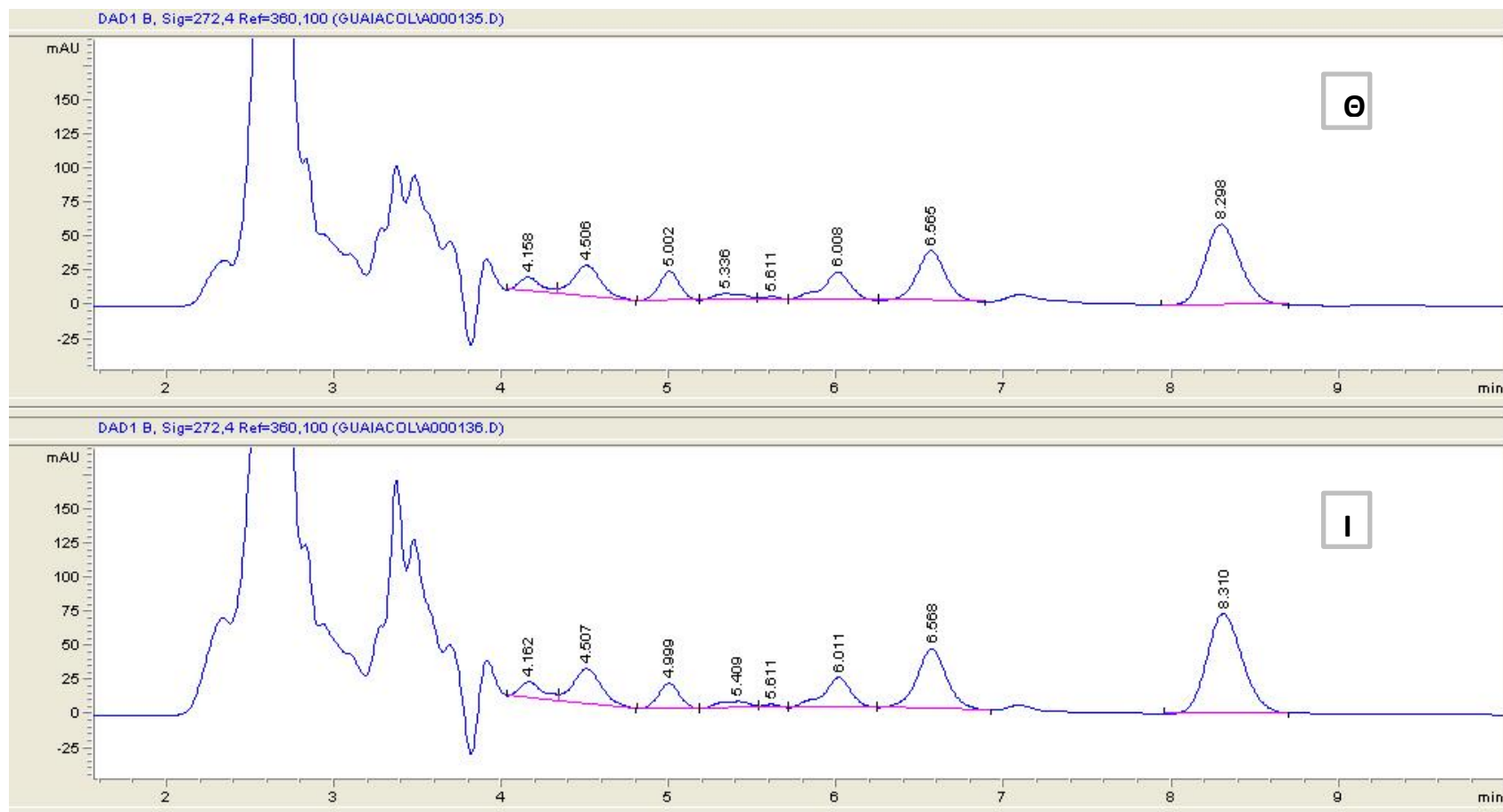
Γράφημα 3.7. Χρωματογράφημα που λαμβάνεται κατά την ανάλυση προτύπου γουαϊακόλης με χρόνο ανάσχεσης της κορυφής της γουαϊακόλης ($t_R = 7.65$ min).



Γράφημα 3.8. Χρωματογραφήματα που λήφθηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων χυμού που είχαν επωαστεί στους 25°C. Το χρωματογράφημα Β αντιστοιχεί στην στιγμή εμβολιασμού, το Γ στην 4^η μέρα επώασης και το Δ στην 9^η μέρα επώασης.



Γράφημα 3.9. Χρωματογραφήματα που λήφθηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων χυμού που είχαν επωαστεί στους 45°C. Το χρωματογράφημα E αντιστοιχεί στην στιγμή εμβολιασμού, το Z στις 9 ώρες επώασης και το H στις 24 ώρες επώασης.



Γράφημα 3.10. Χρωματογραφήματα που λήφθηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων χυμού που είχαν επωαστεί στους 45°C. Το χρωματογράφημα Θ αντιστοιχεί στις 48 ώρες επώασης και το Ι στις 72 ώρες επώασης.

Εν κατακλείδι, το γένος *Alicyclobacillus* spp πρόκειται για ένα θερμο-οξεόφιλο, αυστηρά αερόβιο και σπορογόνο βακτήριο (Wisotzkey et al., 1992). Κυρίως δύο είδη, τα *A. acidoterrestris* και *A. acidocaldarius* έχουν κατηγορηθεί για την αλλοίωση των χυμών με την ένδειξη δυσάρεστων οσμών και θολερότητας (Walls and Chuyate, 2000).

Ουσίες όπως τα λίπη, οι πρωτεΐνες και τα σάκχαρα που υπάρχουν σε ένα παστεριωμένο περιβάλλον έχουν ως επί το πλείστον προστατευτικές ιδιότητες. Η προσθήκη άλλων ουσιών όπως οργανικά οξέα, βενζοϊκό νάτριο ή κάλιο σε περιβάλλον που υπόκειται σε αυξημένη θερμοκρασία προκαλεί μείωση του αριθμού ανθεκτικών στη θερμότητα σπορίων και εμποδίζει την ανάπτυξη επιζώντων κυττάρων κατά την αποθήκευση. Η επιβίωση των σπορίων που διατηρούνται σε θερμοκρασία παστερίωσης εξαρτάται τόσο από τις φυσικές όσο και από τις χημικές παραμέτρους του περιβάλλοντος στο οποίο αναστέλλονται. Αυτές οι παράμετροι περιλαμβάνουν: τη θερμοκρασία και το χρόνο έκθεσης σε αυτή τη θερμοκρασία, την ενεργότητα του νερού, το pH και την παρουσία μεταλλικών αλάτων και άλλων ουσιών. Η οξίνιση των τροφίμων χρησιμοποιείται συχνά ως μέθοδος για την αναστολή του πολλαπλασιασμού της μικροχλωρίδας και ιδιαίτερα των ανθεκτικών στη θερμότητα μικροοργανισμών, επειδή το χαμηλό pH μειώνει σημαντικά τη θερμική αντίσταση και πολλά είδη σπορίων δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε τέτοιες συνθήκες. Σε μελέτη για όξινα ποτά (pH=3), η χρήση υψηλών θερμοκρασιών στη διαδικασία παστερίωσης (90-95°C) δεν ανέστειλε επαρκώς την ανάπτυξη των οξεόφιλων στελεχών όπως το *A. acidoterrestris* για την πρόληψη της αλλοίωσης του χυμού (Chmal-Fudali et al., 2011). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η θερμική αντίσταση των σπορίων του *A. acidoterrestris* επηρεάστηκε από θερμοκρασία (85-97°C), ακολουθούμενη από τα (5-60°C) και pH (2.5-6.0) με τη τιμή D να μειώνεται με την αύξηση θερμοκρασίας, την μείωση των διαλυτών στερεών και του pH. Όμως αυτές οι συσχετίσεις είχαν καλά αποτελέσματα σε ζυμό, αλλά όχι σε χυμούς φρούτων (Silva F., et al., 1998). Υπάρχουν πολλές αποκλίσεις όσον αφορά την επίδραση του pH, καθώς και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία αδρανοποίησης των σπορίων *A. acidoterrestris* περιλαμβάνουν την περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία και τη σύνθεση του περιβάλλοντος που αναλύεται. Η υπερβολική θερμική επεξεργασία οδηγεί σε δυσμενείς αλλαγές στα επεξεργασμένα τρόφιμα και η ανάλυση των διαφόρων δυνατοτήτων καταστροφής των σπορίων είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα. Για τη βιομηχανία, ιδιαίτερη σημασία έχει η γνώση σχετικά με τις συνθήκες της διαδικασίας παστερίωσης, ώστε το τελικό προϊόν να είναι απολύτως ασφαλές. Ενώ τα σπόρια *Geobacillus stearothermophilus* ή *Clostridium botulinum* χρησιμοποιούνται συχνά για τον προσδιορισμό των σωστών παραμέτρων αποστείρωσης, στην περίπτωση της παστερίωσης τα σπόρια του *Alicyclobacillus acidoterrestris* δεν έχουν αναγνωρισθεί ως βιολογικός δείκτης για αυτή τη διαδικασία. Η χρήση των αντισυμβατικών μεθόδων έχει αποδειχθεί πιο επιτυχημένη στη μείωση του βαθμού μόλυνσης με βακτήρια *Alicyclobacillus acidoterrestris*, αλλά έχουν διεξαχθεί μελέτες κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα. Θα ήταν σημαντικό να εφαρμοστούν νέες τεχνολογίες σε βιομηχανική κλίμακα προκειμένου να εξακριβωθεί εάν οι προτεινόμενες λύσεις μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία σε πραγματικές συνθήκες και συστήματα. Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα, που δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως, είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συνιστωσών του δοκιμασμένου περιβάλλοντος (Chmal-Fudali et al., 2011).

Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται ως αναγωγικό μέσο για τη διατήρηση του χρώματος, και επίσης έχει αντιμικροβιακή δράση. Οι Cerny et al. (2000) ανέφεραν ότι η

προσθήκη 100 mg / l ασκορβικού οξέος σε χυμό μήλου διεγείρει την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris*, ενώ 150 mg / l ή υψηλότερη συγκέντρωση προσθήκης ασκορβικού οξέος εμποδίζει την ανάπτυξη. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για το προσδιορισμό των αποτελεσμάτων υψηλότερης συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος στη θερμική αντίσταση, δεδομένου ότι μερικοί από τους άλλους χυμούς φρούτων, όπως στο χυμό πορτοκαλιού στον οποίο παρατηρούνται επίσης πολύ αλλοιώσεις περιέχει συνήθως υψηλή ποσότητα ασκορβικού οξέος (μέσος όρος 350 mg / l)(Bahçeci et al.,2007).

Στην παρούσα μελέτη, 8 στελέχη *Alicyclobacillus* απομονώθηκαν και μελετήθηκαν από χυμούς πορτοκάλι. Η απομόνωση αυτών έγινε από χυμούς πορτοκάλι ψυγείου, δηλαδή μικρότερης διάρκειας ζωής. Η επιβεβαίωση έγινε με βάση την ανάπτυξη τους και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Η ταυτοποίηση έγινε με μια γρήγορη μέθοδο αναγνώρισης της 16S rDNA PCR- RFLP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους χυμούς αφορούσαν το *A.acidotterrestris* και *A. hesperidium*.

Επειδή η επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των *Alicyclobacillus* απαιτεί χρόνο και αποτελεί σοβαρή ανησυχία για τις βιομηχανίες χυμών και αναψυκτικών, έγινε χρήση αισθητήρων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα και προσπάθεια συσχέτισης των ποσοστών αυτών των αερίων με την μικροβιολογική ανάπτυξη των *Alicyclobacillus*. Μέχρι στιγμής υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στο απαιτούμενο ποσοστό οξυγόνου για την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και συγκεκριμένα η πρώτη ήταν το 2000 από τους Cerny et al. και έπειτα ακολούθησε μελέτη από τους Kinnouchi et al. το 2013. Τα αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ειδικά στην περίπτωση την τοποθέτησης των αισθητήρων οξυγόνου στο εσωτερικό των περιεκτών και στις δύο θερμοκρασίες και αντίστοιχα των αισθητήρων του διοξειδίου του άνθρακα στην επιφάνεια αυτών. Το *A. acidoterrestris*, κατά την επώαση στους 25°C όσο και στους 45°C, αναπτύχθηκε καλύτερα στο θρεπτικό ζωμό από ότι στο χυμό, τόσο σε επίπεδο ρυθμού ανάπτυξης όσο και τελικού μέγιστου βακτηριακού πληθυσμού. Όπως ήταν αναμενόμενο η ίδια διαπίστωση έγινε και από τους Kinnouchi et al. το 2013 σε χυμό μήλο, αλλά το πείραμα τους διεξήχθη μόνο στους 45°C, αφού ο ζωμός δεν περιέχει συστατικά τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου. Οι Kinnouchi et al. παρατήρησαν ότι τόσο στο ζωμό όσο και στο χυμό όταν περιέχεται 0 mg οξυγόνο δεν παρατηρείται ανάπτυξη του *A. acidoterrestris*, ενώ στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι αυτό συμβαίνει όταν το οξυγόνο εσωτερικά μικρότερο ή ίσο του 5 %. Επίσης, άλλη μια παρατήρηση της μελέτης των Kinnouchi et al. ήταν ότι η ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* ήταν μικρότερη σε σχέση με το ζωμό παρά το γεγονός ότι το ποσοστό κατανάλωσης οξυγόνου και στις δύο περιπτώσεις ήταν το ίδιο και αυτό το ερμήνευσαν εξαιτίας των συστατικών που υπάρχουν στο χυμό, όπως ασκορβικό οξύ ή πολυφαινόλες που καταναλώνουν το διαθέσιμο οξυγόνο, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα του για το *A. acidoterrestris*. Στο πείραμα μας παρατηρήσαμε ότι το οξυγόνο εσωτερικά στο ζωμό κατά τις 0-12 h στους 45°C κυμαινόταν σε ποσοστά 25-30%, ενώ υπήρξε απότομη πτώση από το 25 στο 5 % ανάμεσα στις 12 με 24 h, όπου μετά παραμένει σταθερό όπως και η ανάπτυξη του βακτηρίου. Από την άλλη στο χυμό υπήρξε ομαλή και σταδιακή πτώση του οξυγόνου όπου τελικά έφτασε το 0.36% . Στην περίπτωση του CO₂ εσωτερικά στο ζωμό παρατηρείται καλή συσχέτιση, όμως στο χυμό ενώ το *A.acidotterrestris* βρίσκεται στη στατική φάση το ποσοστό CO₂ συνεχίζει να αυξάνεται, ενώ στην περίπτωση που οι αισθητήρες τοποθετούνται επιφανειακά η συσχέτιση είναι καλή. Αντίθετα, καλή συσχέτιση ποσοστού O₂ και βακτηριακής ανάπτυξης τόσο στο χυμό όσο και

στο ζυμό, όπου κατά την ανάπτυξη του *A.acidoterrestis* παρατηρείται μείωση του O₂ και όταν τα επίπεδα του βακτηρίου είναι στάσιμα, στάσιμο παραμένει και το O₂.

Η χρήση αυτών των ειδικών αισθητήρων για την ένδειξη ανάπτυξης *Alicyclobacillus* στην βιομηχανία χυμών και ποτών αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο δίνοντας άμεσα αποτελέσματα. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετά πειράματα. Τέλος, η χρήση των αισθητήρων, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, απαιτεί μεγάλη προσοχή στην τοποθέτηση αυτών υπό ασηπτικές συνθήκες και το κόστος είναι ιδιαίτερα υψηλό, καθώς δεν ενδείκνυται η επαναχρησιμοποίηση των αισθητήρων οξυγόνου και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην απολύμανση των αισθητήρων διοξειδίου του άνθρακα.

Τέλος όσον αφορά στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) για την ανίχνευση γουαϊακόλης είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος, αλλά επειδή η ακριβής μεταβολική οδός παραγωγής γουαϊακόλης σε *Alicyclobacillus* δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, υπάρχουν υπόθεσεις ότι η γουαϊακόλη παράγεται κατά τη διάρκεια μεταβολισμού του φερουλικού οξέος ή πιθανές άλλες πρόδρομες ουσίες της γουαϊακόλης να είναι η βανιλίνη και το βανιλικό οξύ. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελλοντικά η περαιτέρω μελέτη, ώστε να αξιολογηθεί η ανάπτυξη του *Alicyclobacillus* και η δυνατότητα αλλοίωσης σε χυμούς φρούτων από πρόδρομες ουσίες γουαϊακόλης που περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις βανιλίνης, βανιλικού ή και φερουλικού οξέος. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο αριθμός των κυττάρων *Alicyclobacillus* ικανών να παράγουν γουαϊακόλη πάνω από κατώφλι ανίχνευσης του ανθρώπου μπορεί να είναι κάτω από την οπτική ανίχνευση αλλοίωσης. Επίσης η σχέση μεταξύ ανάπτυξης του *Alicyclobacillus* και παραγωγής γουαϊακόλης δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα πλήρως. Είναι πιθανό ότι η λογαριθμική ανάπτυξη των κυττάρων *Alicyclobacillus* μπορεί να παράγει περιορισμένες ποσότητες γουαϊακόλης, ενώ η παραγωγή μπορεί να ενεργοποιηθεί στη στατική φάση ή σε κάποια έκθεση του σε στρες (Orr et al., 2000).

Βιβλιογραφία

1. Alpas, H., Alma, L., & Bozoglu, F. (2003). Inactivation of *acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure. *World J Microbiol Biotechnol* 19:619–23.
2. Álvarez-Rodríguez, M.L., Belloch, C., Villa, M., Uruburu, F., Larriba, G., Coque, J.-J.R. (2003). Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 49-55.
3. Bahçeci, K.S., & Acar, J. (2007). Determination of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by using HPLC and spectrophotometric methods, and mathematical modeling of guaiacol production. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 873-878.
4. Bahçeci, K.S., & Acar J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis*. *International Journal of Food Microbiology* 120, 266–273.
5. Basak, S., Ramaswamy, H.S., & Piette, J.P.G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(3), 223-231.
6. Baumgart, J., & S. Menje. (2000). The role of *acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks. *Fruit Process.* 7, 251-254.
7. Baumgart, J., Husemann, M., & Schimdt, C. (1997). *acidoterrestris*: occurrence, importance, and detection in beverages and raw materials for beverages. *Flussiges Obst.* 64, 178–180.
8. Bevilacqua, A., Corbo, M.R., & Sinigaglia, M. (2008). Inhibition of *acidoterrestris* spores by natural compounds. *Intl J Food Sci Technol*, 43:1271–5.
9. Bicas, J.L., Molina, G., Dionísio, A.P., Barros, F.F.C., Wagner, R., Maróstica, M.R., & Pastore, G.M. (2011). Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Res. Int.* 44, 1843–1855.
10. Black, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A.L., & Hoover, D.G. (2007). Response of Spores to High-Pressure Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6:103-119.

11. Blanco, A.M., Masini, G., Petracchi, N., & Bandoni, J.A. (2005). Operations management of a packaging plant in the fruit industry. *Journal of Food Engineering* 70.
12. Cerny G., Duong H.A., Hennlich W., & Miller S. (2000). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: influence of oxygen content on growth in fruit juices. *Food Australia* 52:289-291.
13. Cerny, G., Hennlich, W., & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by *bacilli*: isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 179: 224–227.
14. Chang, S.S., & Kang, D.H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol* 30:55–74.
15. Chmal-Fudali, E., & Papiewska, A. (2011). The possibility of thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit and vegetable juices. *Biotechnology Food Science*, 75 (1), 87-96.
16. Crawford, R.L., Olson, P.P. (1978). Microbial catabolism of vanillate: decarboxylation to guaiacol. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 539-543
17. Danyluk, M.D., Friedrich, L.M., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M.E., & Rouseff, R. (2011). Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. *Food Microbiol* 28:472–477.
18. Duong, H. A., & Jensen, N. (2000). Spoilage of iced tea by . 52, 292.
19. Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., & Worobo, R.W. (2010). Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 286–291.
20. Evelyn, & Silva, F. V. M. (2016). High pressure processing pretreatment enhanced the thermosonication inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice. *Food Control*, 62, 365-372.
21. FDA, (2001). Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice: final rule (21 CFR Part 120) *Federal Register*. 66:6137-6202.
22. Fellows, P.J. (2000). *Food processing technology-Principles and practice*. 2nd edn. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp. 241-249.

23. Foster, T., & Vasavada, C. (2003). Beverage quality and safety. CRC Press, Institute of food technologists.
24. Goodner, K.L., Jella, P., Rouseff, R., (2000). Determination of vanillin in orange, grapefruit, tangerine, lemon, and lime juices using GC–olfactometry and GC–MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2882–2886.
25. Goto, K., Nishibori, A., Wasada, Y., Furuhashi, K., Fukuyama, M., & Hara, M. (2008). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Lett Appl Microbiol* 46:289–94.
26. Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., & Yokota, A. (2003). *pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus . *Intl J Syst Evol Microbiol* 53:1537–44.
27. Goto, K., Tanimoto, Y., Tamura, T., Mochida, K., Arai, D., Asahara, M., Suzuki, M., Tanaka, H., & Inagaki, K. (2002). Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan. *Extremophiles* 6:333–40.
28. Groenewald, W.H., Gouws, P.A., & Witthuhn, R.C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol.* 26, 71–76.
29. HACCP Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice: Final Rule Federal Register January 19, 2001.
30. Heldman, D.R., & Beverloo, W.A. (1997). Principles of food processing. Chapman and Hall, New York, pp.34-53.
31. Henderson, M.E.K., (1961). The metabolism of aromatic compounds related to lignin by some hyphomycetes and yeastlike fungi of soil. *Journal of General Microbiology* 26, 155–165.
32. Huang, Z., Dostal, L., Rosazza, J.P.N. (1993). Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J. Biol. Chem.* 268, 23954-23958.
33. IFU Method on the Detection of taint producing in Fruit Juices, revision 1, September 2004 (IFU Handbook Microbiological Methods, Method No.12).
34. IFU Working Group Microbiology: First Standard IFU-Method on the Detection of *Alicyclobacillus* in Fruit Juices. (April 2003).

35. Jay, J.M., Loessner, M.J., & Golden, D.A. (2005). Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. In: *Modern Food Microbiology*, 7th ed. Pp. 39-59. New York: Springer Science and Business Media, Inc.
36. Jensen, N. (1999). -a new challenge for the food industry. *Food Aust.* 51, 33-36.
37. Jensen, N. (2000). in Australia. *Food Australia.* 52, 282-285.
38. Jensen, N. (2005). Evaluation of detection methods for *Alicyclobacillus* in fruit juice concentrates in Australia. In: 14th International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) Congress, Beijing, China. 14-18 August 2005.
39. Jensen, N., & Whitfield, F.B. (2003). Role of *acidoterrestis* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology* 36, 9-14.
40. Jensen, N., Varelis, P., Whitfield, F.B. (2001). Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacterium *Rahnella aquatilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 339-343.
41. Kinouchi, T., Komeda, T., Nakanishi, K., Fujita, Y., & Deuchi, K. (2013). Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestis* in the hypoxic environment of bottled fruit juice. *Biocontrol Science*, Vol. 19, No. 2, 85-88.
42. Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., & Adams, M. R. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestis* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science Technology*, 34, 81–85.
43. Kowal, L., Mackiewicz, J., & Swiderska-Broz, M. (1986). The projects of the systems of water purification. PWR, Wroclaw. (In Polish).
44. Mathew, S., Abraham, T.E., Sudheesh, S. (2007). Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 44, 48-52
45. Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., & Yamasato, K. (2002). *acidophilus* sp., a novel thermo-acidophilic, ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Intl J Syst Evol Microbiol* 52:1681–5.
46. Mayer, F., Czerny, M., Grosch, W. (1999). Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 242-250.

47. McIntyre, S., J. Ikawa, J.Y., Parkinson, N., Haglund, J., & Lee, J. (1995). Characteristics of an acidophilic strain isolated from shelf-stable juices. *Journal of Food Protection*. 58: 319-321.
48. Michalowicz, J., Duda, W., & Stufka-Olczyk, J. (2007). Transformation of phenol, catechol, guaiacol, and syringol exposed to sodium hypochlorite. *Chemosphere*. 66, 657-663.
49. Montville, T.J., Matthews, K.R. (2010). Μικροβιολογία τροφίμων. Εκδόσεις Ίων. 135-148.
50. Murakami, M., Tedzuka, H., & Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *acidoterrestris* spores in different buffers and pH. *Food Microbiol* 15:577–82.
51. Murray, M.B., Gurtler, J.B., Ryu, J., Harrison, M.A., & Beuchat, L.R. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* 115, 59–69.
52. Niwa, M., Kawamoto, A. (2003). Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. *Fruit Processing* 13, 102-107.
53. 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. *J. Agr. Food Chem.* 40, 764-767.
54. Pettipher, G. L., Osmundson, M. E., & Murphy, J. M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett. Appl. Bacteriol.* 24, 185-187.
55. 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. *J. Food Protect* 63, 1517-1522.
56. Oteiza, J. M., Soto, S., Ortiz Alvarenga, V., Sant'Ana, A. S., & Giannuzzi, L. (2014). Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 119-124.
57. Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V., Welte-Chanes, J., Davidson, P. M., & Swanson, B. G. (1998). Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *Byssochlamys nivea* ascospores suspended in fruit juice concentrates. *Letters in Applied Microbiology*, 27(6), 375-378.
58. Pettipher, G.L., & Osmundson, M.E. (2000). Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, 52, 293-295.

59. Pettipher, G.L., & Osmundson, M.E. (2000). Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Aust* 52:293–295.
60. 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, 185–189.
61. Pinhatti, M., Variante, S., Eguchi, S.Y., & Manfio, G.P. (1997). Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Process* 9:350–3.
62. Pontius, A. J., Rushing, J. E., & Foegeding, P. M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. *J. Food Prot.*, 61, 41–46.
63. Previdi, M. P., Quintavalla, S., Lusardi, C., & Vicini, E. (1997). Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. *Indust. Conserve*, 72, 353–358.
64. Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Eriksson, K.E. (1989). Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2391-2398.
65. Sapers, G.M., Gorny, J.R., & Yousef, A.E. (2005). *Microbiology of fruits and vegetables*. CRC, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL p.160.
66. Sapers, G.M., Gorny, J.R., & Yousef, A.E. (2005). *Microbiology of fruits and vegetables*. CRC, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL p.160.
67. Saxby, M.J. (1996). A survey of chemicals causing taints and off-flavours in food. In: Saxby, M.J. (Ed.), *Food Taints and Off-flavours*, second ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 45-46.
68. Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101:514-525.
69. Siegmund, B., & Pöllinger-Zierler, B. (2007). Growth behavior of off-flavor-forming microorganisms in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6692-6699.
70. Silva, F. M., Gibbs, P., Vieira, M. C., & Silva, C. L. M. (1999). Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 95–103.

71. Silva, F.V.M., & Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science and Technology* 12:68–74.
72. Silva, F.V.M., & Gibbs, P. (2004). Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 353–360.
73. Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., & Witthuhn, R. C. (2011). *Alicyclobacillus* spoilage and isolation e a review. *Food Microbiology*, 28, 331-349.
74. Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., & Witthuhn, RC. (2011). spoilage and isolation–A review. *Food Microbiology* 28: 331–349.
75. Spinelli, ACNF., Sant’Ana¹, A.S., Pacheco-Sanchez, C.P., & Massaguer, P.R. (2010). Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice stored at 35 °C. *Intl J Food Microbiol* 137:295–8.
76. Splittstoesser, D. F., Churey, J.J., & Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J. Food Prot.* 57, 1080-1083.
77. Splittstoesser, D. F., Lee, C. Y., & Churey, J. J. (1998). Control of in the juice industry. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18, 585-587.
78. Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., & Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *J Food Protection* 57:1080-1083.
79. Steyn, C., Cameron, M., & Witthuhn, R. (2011). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment – a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol.147, no.1: 1-11.
80. Sutherland, J.B., Crawford, D.L., Pometto, A.L., (1983). Metabolism of cinnamic, p-coumaric and ferulic acid by *Streptomyces setonii*. *Canadian Journal of Microbiology* 29, 1253.
81. Takahashi, K., Goto, K., Tanaka, T., Tanada, S., Sawaki, T., & Yamamoto, R. (2007). Factors of spoilage caused by and prevention measures. In: Yokota A, Fujii T, Goto K, editors. *Alicyclobacillus*. Tokyo, Japan: Springer Science and Business Media. p. 117–48.
82. Topakas, E., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. (2003). Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Lebensm. Wiss. Technol.* 36, 561-565.

83. Van Pée, K. H. (1996). Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu Rev. Microbiol.* 50, 375-399.
84. Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C., Serot, T. (2006). Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *J. Agr. Food Chem.* 54, 3391-3401.
85. Walker, M., & Phillips, C.A. (2008). The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control*, 19, 974-981.
86. Walker, M., & Phillips, C. A. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: An increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*, 43(2), 250-260.
87. Walls, I., & Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18, 1-5.
88. Walls, I., & Chuyate, R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia* 52:286-288.
89. Western Farm Press. Fruit and vegetable juice market steadily increasing <http://www.westernfarmpress.com/orchard-crops/fruit-and-vegetable-juice-market-steadily-increasing>
90. Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, G. E. Fox Jr., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNS (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.
91. Witthuhn, R. C., Merwe, E., Venter P., & Cameron M.(2012). Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* 157, 113-117.
92. Worobo, R.W., & Splittstoesser, D. F. (2005). *Microbiology of Fruit Products*, p. 261-284.
93. Yamazaki, K., Teduka, H., & Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 543-545.
94. Yokota, A., Fujii, T., & Goto, K. (2007). Characteristics of *Alicyclobacillus*: Thermophilic acidophilic bacilli. Springer, Japan, p. 9-10, 14.
95. Yokota, A., Fujii, T., & Goto, K. (2007). Characteristics of , p. 9-10, 14 *In* : Thermophilic acidophilic bacilli. Springer, Japan.

96. Zhang, J., Yue, T., & Yuan, Y. (2013). contamination in the production line of kiwi products in China. PLOS ONE 8:67704. doi:10.1371/journal.pone.0067704.
97. Βιβλίο Τεχνολογίας Τροφίμων, Νασοπούλου Κων/να, Νικολάου Σπύρος, Ζαμπετάκης Γιάννης, Εκδόσεις Αθ.Σταμούλη.
98. ΟΔΗΓΙΑ 2001/112/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 20ής Δεκεμβρίου 2001.