

Gyümölcslevek aktuális mikrobiológiai kérdései

Motto: A mikrobák alkalmazkodóképessége és változékonysága határtalan

Tabajdiné dr. Pintér Veronika

Összefoglaló

A szerző rövid irodalmi áttekintést ad a gyümölcslevek aktuális mikrobiológiai kérdéseiről, az utóbbi évtizedben előforduló romlási jelenségekről. Beszámol arról a vizsgálati módszerről, amelyet részben az irodalom áttekintése, részben saját vizsgálatai alapján megfelelőnek tart az *Alicyclobacillus acidoterrestris* kimutatására, amellyel a gyümölcslevek és sűrítmények felhasználás előtti minősítése elvégezhető.

A klasszikus mikrobiológia tanítása szerint a gyümölcslevek nem tartoztak a mikrobiológiai szempontból veszélyes termékek közé, mivel a baktériumok többsége 4,5 pH alatt nem képes szaporodni. Az ilyen termékek mikroflóráját élesztőgombák, penészgombák és néhány spórárt nem képző baktérium (pl. *Lactobacillus plantarum*) alkotja. A spórárt nem képző mikroorganizmusok már enyhe hőkezeléssel, vagy tartósítószer adagolásával könnyen féken tarthatók.

Már a hetvenes évek végén kiderült azonban, hogy vannak olyan élesztőgombák, amelyek nemhogy nem pusztíthatók el káliumszorbát adagolásával, de szénforrásként fel is tudják azt használni. Ezt követően a mikrobiológusok kidolgozták vizsgálati módszereiket a savas tartósítószerrel szemben rezisztens élesztőgombák kimutatására, amely egy dúsításból és egy APRY (acid preservative resistant yeast) agarra való szélesztésből áll.

Mind a tartósítószerrel szembeni ellenérzés, mind a biztonság szempontjából a termékek pasztörözése került előtérbe. A fent említett mikroflórának a hatástalanítása "hot fill and hold" pasztörözéssel megoldható. Ezzel a módszerrel a gyümölcslevet 90-95°C-on 15-20 másodpercig történő hőkezelés, 82-84°C-ra való hűtés, töltés, majd 2 perces hőntartás után hűtéssel gyártják

A 80-as években azonban a gyümölcslevegőgyártók újabb komoly problémával találták szembe magukat. Fogyasztói panaszok voltak minőségmegőrzési időtartamon belül megromlott gyümölcslevekkel kapcsolatban. A panaszok zöme íz- és színváltozásokról szólt. Mivel

gázképződés nem kísérte a jelenséget, így először kémiai szennyeződésre gondoltak, de idővel mikrobaszaporodást fedeztek fel a dolgok háttérében. Olyan, valószínűleg spórás mikrobát kellett keresni, amely a gyümölcslevek savasságát is jól tűri. Kezdetben a *Bacillus coagulans*-ra gondoltak, amely jól ismert paradicsomsűrítmények és levek romlásokozójaként.

Almalevekből azonban egy új típusú romlást okozó spórás baktériumot izolált Cerny (1984), melyet Deinhard (1987) nevezet el *Bacillus acidoterrestris*-nek. Később Yamazaki (1996) új génusként, mint *Alicyclobacillus* különítette el a savtűrő spórás baktériumokat. Ebbe a génusba tartozó mikrobák az *Alicyclobacillus acidoterrestris*, az *Alicyclobacillus acidocaldarium* és az *Alicyclobacillus heptanicus*. Összetartozásukat a sejtmembránjukban jelenlévő ω -aliciklusos zsírsav jelenti, mivel ez a felelős ezeknek a mikrobáknak a savtűréséért.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* simasavanyító romlást okozó baktérium, amely széles pH tartományban (2,5-6,0) és hőmérséklettartományban (25-60 °C) képes szaporodni.

Általában a spórák hőrezisztenciája nagyobb a semlegeshez közeli pH estén. Általában a hőrezisztens spórák rezisztenciájának gyengítését hőkezelés és pH csökkentés együttes alkalmazásával érik el. Nem igaz ez azonban az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spóráira.

Általában igaz, hogy a spórák hőrezisztenciáját a dehidratált állapottal, a dipikolinsav tartalommal, a hőstabil fehérjék jelenlétével, és az ásványi anyag tartalommal magyarázzák. Ez utóbbi változtatható a spórák esetében, így pl. Ca és Mn bevitel csökkenti a spórák hőrezisztenciáját.

A Ca^{++} fontos szerepet játszik az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák hőrezisztenciájának stabilizálásában a dipikolinsavval való kelátképzése által. Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák alacsony pH mellett erősen kötésben tartják a Ca és Mn ionokat, erősebben, mint más baktériumok (pl. *B.subtilis*). A Ca és a dipikolinsav állandó mennyisége és erős kötődése okozza a speciális hőrezisztenciát.

A felismerés után számos kutató vizsgálta a különböző savak (citromsav, borkősav, malonsav) hatását az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák hőrezisztenciájára, de nem találtak szignifikáns különbséget 91-100°C közötti intervallumban. A vízdoldható szárazanyag (Brix) koncentráció viszont fontos hatással bír a szaporodásra Splittstoesser D.F. és mtsai (1994). Fehér szőlőlé estében a 19,2°Brix gátolta a szaporodást, míg a 18,2 °Brix még optimális a szaporodásra. Silva F.M. és mtsai (1999) kifejlesztett egy prediktív modellt a D-

értékre, amelyet a pH, vízdoldható szárazanyagtartalom és a környezeti hőmérséklet függvényében írt le.

Pontius A.J. és mtsai (1998) egy ajánlást dolgozott ki gyümölcslevekben előforduló savtűrő spórák elleni hőkezelés tervezésére. Ez az ajánlás egy olyan optimalizáláson alapul, amely során a romlást okozó savtűrő spóra úgy inaktiválódik, hogy közben a termék minősége nem változik meg kedvezőtlenül.

Vieira M.C. és mtsai(2002) kinetikai paramétereiket és kísérleti módszert ajánl tropikus gyümölcsnektárok hőkezelési folyamatainak tervezésére *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák inaktiválására. Nektárokra a hőkezelési műveletet 5D értékre javasolja méretezni HTST (high temperature short time principle) technikát alkalmazva, mivel a savtűrő spórák elpusztítása mellett csak így őrizhető meg a termék vitamin és hasznos anyag tartalma.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* kimutatására szolgáló módszert Pettipher G.L.(1997) dolgozta ki. A pasztörözést túlélő *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák szaporodni képesek narancslevekben, almalevekben és az ezeket tartalmazó "csendes" italokban és sűrítvényekben is 25-44°C-on, miközben a termék romlását okozzák és 1-100 ppb guajakolt (o-hidroxi anizol) termelnek.

Az ízbeli tulajdonság változást 10^5 /ml-nél érzékelték. Ebben az esetben 2-100 ppb guajakolt mértek a termékekben. a szűrt levekben ennél a mikrobaszámnál még nincs látható elváltozás a termékben.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórái túlélnek a 95°C-on 30 s-os hőkezelést és romlást tudnak okozni gyümölcslevekben.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* a pasztörözéssel szemben rezisztens, széles hőmérséklet és pH tartományban képes szaporodni, és guajakolt és egyéb romlást előidéző vegyületeket termel. Erre a baktériumra érzékenyek a friss, pasztörözött, vagy tartósítószer nélküli termékek szobahőmérsékleten való tároláskor. Az üzemeknek tehát szükségük van olyan módszerre, amellyel kimutatható az *Alicyclobacillus acidoterrestris* a különféle gyümölcslevekből és koncentrátumokból, hogy a romlási veszélyt redukálni tudják.

Öt táptalajt hasonlítottak össze: nutrient agar, BAM (bacteriological analytical method) módszer, SM táptalaj, PDA (burgonya glükóz agar) és az OSA (narancs szérum agar). Mivel az *Alicyclobacillus acidoterrestris* 25 és 44 °C között jól szaporodik, a kísérő mikroflóra kizárása miatt a magasabb hőmérséklet értékeket választották.

Táptalajok:

<p>BAM táptalaj.</p> <p>0,25 g/l CaCl₂.2H₂O 0,50 g/l MgSO₄.7H₂O 0,20 g/l (NH₄)SO₄ 3,00 g/l KH₂PO₄ 1,00 g/l élesztőkivonat 5,00 g/l glükóz 1, 0 ml nyomelem oldat (Farrand) pH: 4,0</p>	<p>SM táptalaj</p> <p>0,25 g/l CaCl₂.2H₂O 0,50 g/l MgSO₄.7H₂O 0,20 g/l (NH₄)SO₄ 3,00 g/l KH₂PO₄ 3,00 g/l élesztőkivonat 5,00 g/l glükóz 1, 0 ml nyomelem oldat (Farrand) pH: 4,3</p>
<p>PDA (potato dextrose agar)</p> <p>Burgonyafőzet (200g burgonyából) 4,0 g</p> <p>Glükóz 20 g</p> <p>Agar 15 g pH: 5,6</p>	<p>OSA (orange serun agar)</p> <p>Kazein pepton 10 g Élesztőkivonat 3,0 g Narancskivonat 5,0 g Glükóz 4,0 g K₂HPO₄ 3,0 g Agar 17,0 g pH: 5,5</p>

Szám meghatározás esetében a legjobb visszanyerést az OSA agaron találták, amely esetében a szélesztéses módszer jobbnak bizonyult, mint a lemezöntéses módszer. A javasolt módszer tehát:

0,2 ml minta szélesztése OSA tápagarra

inkubálás: 44°C hőmérsékleten 48 óra

telepszámlálás (feltételezeten *Alicyclobacillus acidoterrestris* szám)

kimutatási határ: 5 sejt/ml

(A baktérium a nutrient és a tripton szója agaron nem növekedett.)

Jelenlét/hiány próba esetében is a legjobb visszanyerést az OSA táptalaj biztosította a következő eljárással: a termék inkubálása 44°C hőmérsékleten 48 órán át

10 µl szélesztése OSA agarra

inkubálás: 44°C hőmérsékleten 48 óra
a kifejlődött telepek feltételezeten *Alicyclobacillus acidoterrestris-ek*
megerősítő vizsgálatok (ha szükséges): Gram festés, API 50 CHB,
(API kód: 102-232-5-6), Ribo Printer

Spóráképzés vizsgálat: az OSA táptalajon 44°C hőmérsékleten 7 napig tartó inkubálás után a sejtek 90%-a spóra.

A módszerek értékelése:

- ⇒ A dúsításos vizsgálatához 4 napra, a szám meghatározáshoz 2 napra van szükség.
- ⇒ A szám meghatározási módszer nem tud különbséget tenni azok között a baktériumok között, amelyek csak túlélők (pl. spórák), és azok között, amelyek a termékben szaporodni is képesek.
- ⇒ A jelenlét/hiány próba ezért jobb indikátora az *Alicyclobacillus acidoterrestris* okozta elváltozások prognosztizálására
- ⇒ A tenyészetek jellegzetes sonka aromát árasztanak (a guajakol termeléssel összefüggésben) az OSA táptalajon, ami egy jól alkalmazható indikátora a potenciális romlásnak.
- ⇒ A módszer a hosszú vizsgálati idő ellenére is lehetővé teszi, hogy a nyersanyagok és a sűrítmények felhasználás előtti minősítését elvégezzük, és kimutatás esetén ezekből a gyümölcs anyagokból csak erőteljesebb tartósítási technológiával (pl. UHT vagy fagyasztás) állítsuk elő a terméket.

A FoodMicro Kft Mikrobiológiai Laboratóriumában is végeztünk vizsgálatokat a BAM táptalaj és az OSA táptalaj összehasonlítására, amely során szintén az OSA bizonyult jobbnak. Ezzel a módszerrel sikerült kimutatni almasűrítmény mintákból feltételezeten *Alicyclobacillus acidoterrestris-t*.

Irodalomjegyzék

- Silva F.M.** és mtsai (1999) *Thermal inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes.* International Journal of Food Microbiology 51, 95-103.
- Pontius A.J.** és mtsai (1998) *Heat resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores as affected by various pH values and organic acids* Journal of Food Protection 61 (1), 41-46.
- Vieira M.C** és mtsai (2002) *Alicyclobacillus acidoterrestris spores as a target for Cupuacu nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods* International Journal of Food Microbiology 77. 71-82.
- Cerny G.** és mtsai(1984) *Fruchtsaftverderb durch bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbseregers.* Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 179, 224-227
- Deinhard G.** és mtsai (1987) *Bacillus acidoterrestris sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils.* Systematic and applied Microbiology 10,47-53
- Splittstoesser D.F.** és mtsai (1994) *Growth characteristics of aciduric sporeforming Bacilli isolated from fruit juices* Journal of Food Protection 57 (12), 1080.
- Walls I. és Chuyate R.** (1998) *Alicyclobacillus. Historical perspective and preliminary characterisation study* Dairy, Food and Environmental Sanitation 18 (8), 499-503.
- Yamazaki K.** és mtsai (1996) *Isolation and identification of Alicyclobacillus acidoterrestris from acidic beverages.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 60 (3), 543-545
- Yamazaki K.** és mtsai (1997) *Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores* Letters in Applied Microbiology 25, 153-156
- Pettipher G.L.** és mtsai (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

Gyümölcslevek aktuális mikrobiológiai kérdései (Tabajdiné 2002)

Motto: A mikrobák alkalmazkodóképessége és változékonysága határtalan

A klasszikus mikrobiológia tanítása szerint a gyümölcslevek nem tartoztak a mikrobiológiai szempontból veszélyes termékek közé, mivel a baktériumok többsége 4,5 pH alatt nem képes szaporodni. Az ilyen termékek mikroflóráját élesztőgombák, penészgombák és néhány spórát nem képző baktérium (pl. *Lactobacillus plantarum*) alkotja. A spórát nem képző mikroorganizmusok már enyhe hőkezeléssel, vagy tartósítószer adagolásával könnyen féken tarthatók.

A 80-as években azonban a gyümölcslégyártók újabb komoly problémával találták szembe magukat. Fogyasztói panaszok voltak minőségmegőrzési időtartamon belül megromlott gyümölcslevekkel kapcsolatban. A panaszok zöme íz- és színváltozásokról szólt. Mivel gázképződés nem kísérte a jelenséget, így először kémiai szennyeződésre gondoltak, de idővel mikrobaszaporodást fedeztek fel a dolgok hátterében. Olyan, valószínűleg spórás mikrobát kellett keresni, amely a gyümölcslevek savasságát is jól tűri.

Almalevekből azonban egy új típusú romlást okozó spórás baktériumot izoláltak, melyet új génusként, mint *Alicyclobacillus* különítettek el. Ebbe a génusba tartozó mikrobák az *Alicyclobacillus acidoterrestris*, az *Alicyclobacillus acidocaldarium* és az *Alicyclobacillus heptanicus*. Összetartozásukat a sejtmembránjukban jelenlévő ω -aliciklusos zsírsav jelenti, mivel ez a felelős ezeknek a mikrobáknak a savtűréséért.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* simasavanyító romlást okozó baktérium, amely széles pH tartományban (2,5-6,0) és hőmérséklettartományban (25-60 °C) képes szaporodni

A spórák hőrezisztenciáját a dehidratált állapottal, a dipikolinsav tartalommal, a hőstabil fehérjék jelenlétével, és az ásványi anyag tartalommal magyarázzák. Ez utóbbi változtatható a spórák esetében, így pl. Ca és Mn bevitel csökkenti a spórák hőrezisztenciáját.

A Ca^{++} fontos szerepet játszik az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák hőrezisztenciájának stabilizálásában a dipikolinsavval való kelátképzése által.

A pasztörözést túlélő *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórák szaporodni képesek narancslevekben, almalevekben és az ezeket tartalmazó "csendes" italokban és sűrítvényekben is 25-44°C-on, miközben a termék romlását okozzák és 1-100 ppb guajakolt (o-hidroxi anizol) termelnek.

Az ízbeli tulajdonság változást $10^5/\text{ml}$ -nél érzékelték. Ebben az esetben 2-100 ppb guajakolt mértek a termékekben. A szűrt levekben ennél a mikrobaszámnál még nincs látható elváltozás a termékben.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórái túlélnek a 95°C-on 30 s-os hőkezelést és romlást tudnak okozni gyümölcslevekben.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* a pasztörözéssel szemben rezisztens, széles hőmérséklet és pH tartományban képes szaporodni, és guajakolt és egyéb romlást előidéző vegyületeket termel. Erre a baktériumra érzékenyek a friss, pasztörözött, vagy tartósítószer nélküli termékek szobahőmérsékleten való tároláskor.