



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Θερμοοξέφιλα βακτήρια σε χυμούς φρούτων
και η αντιμετώπισή τους»

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Α. ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ

Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής ΠΕ

Λάρισα, 2025



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Θερμοοξέφιλα βακτήρια σε χυμούς φρούτων
και η αντιμετώπισή τους»**

**" Thermophilic Acidophilic Bacteria (TAB) in fruit juices and
their control"**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Α. ΜΙΧΑΗΛΙΔΟΥ

Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής ΠΕ

Λάρισα, 2025

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2) **Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη**, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) **Ελένη Ν. Μαλισσιόβα**, Καθηγήτρια, Ποιότητα, Ασφάλεια και Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στην μητέρα μου, τον Αριστοτέλη και στα δύο μας παιδιά
Δημήτρη & Αναστασία
για την αμέριστη υποστήριξη και αγάπη τους*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Θερμοοξεόφιλα βακτήρια σε χυμούς φρούτων και η αντιμετώπισή τους» αποτελεί την ολοκλήρωση των σπουδών μου στο ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή», στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συγγραφή της παρούσας εργασίας αποτέλεσε για εμένα μια ουσιαστική εμπειρία μάθησης, με πολλές προκλήσεις αλλά και σημαντικά εφόδια. Η επιλογή του θέματος βασίστηκε τόσο στο προσωπικό μου ενδιαφέρον για τη μικροβιολογία τροφίμων όσο και στην αυξανόμενη σημασία της διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας σε όξινα προϊόντα, όπως οι χυμοί φρούτων. Εύχομαι η συμβολή της να φανεί χρήσιμη σε ερευνητικό και επαγγελματικό επίπεδο για όσους δραστηριοποιούνται στον τομέα της ασφάλειας τροφίμων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη καθοδήγηση, τη συνεχή υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής την κα Φωτεινή Παρλαπάνη και την κα Ελένη Μαλισσιόβα για το ενδιαφέρον τους και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους, οι οποίες συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη αγάπη, κατανόηση και ηθική στήριξη που μου προσέφερε σε όλα τα στάδια των σπουδών μου.

Τέλος, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στον σύζυγό μου για την υπομονή του, καθώς και σε όλους εκείνους που με εμπύχωσαν στις στιγμές που το χρειαζόμουν περισσότερο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* αποτελούν τα τελευταία χρόνια απειλή για τις βιομηχανίες τροφίμων επιφέροντάς τους οικονομικές απώλειες. Πρόκειται για σποριογόνους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς που απαντώνται στις πρώτες ύλες των χυμών φρούτων. Η θερμοανθεκτικότητα τους, η αντοχή τους σε όξινα περιβάλλοντα είναι οι παράγοντες που δυσκολεύουν την βιομηχανία χυμών να τους αντιμετωπίσει. Η αυξανόμενη ζήτηση παραγωγής ασφαλών τροφίμων, σταθερής ποιότητας καθ' όλη την διάρκεια ζωής τους, καθιστά αναγκαία την εύρεση αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης των μικροοργανισμών αυτών. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η σύνθεση δεδομένων της βιβλιογραφίας τόσο για την κατανόηση της φύσης των μικροοργανισμών αυτών όσο και για τις μεθόδους με τις οποίες μπορούν είτε να θανατωθούν είτε να ανασταλεί η ανάπτυξή τους. Βάσει ανασκόπησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, από όλα τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* ξεχωρίζει το *Alicyclobacillus acidoterrestris* αποτελώντας το πιο σημαντικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό στους χυμούς φρούτων και ειδικότερα στον χυμό μήλου. Η θερμική επεξεργασία ως μέθοδος αντιμετώπισης των ειδών αυτών δεν είναι αρκετά αποτελεσματική, δεδομένου της φύσης των μικροοργανισμών αυτών. Η θερμοανθεκτικότητα τους απαιτεί την επίτευξη υψηλότερων θερμοκρασιών κατά την εμπορική παστερίωση όμως αυτό εγκυμονεί τον κίνδυνο για υποβάθμιση τόσο της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος όσο και της διατροφικής του αξίας. Μη θερμικές διεργασίες όπως η χρήση ομογενοποίησης υπέρ υψηλής πίεσης (Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH)) , η επεξεργασία μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) , η χρήση πρόσθετων ουσιών (χημικών και φυσικών), η προσθήκη βακτηριοσινών (νισίνης και εντεροκίνης) καθώς και ο συνδυασμός μεταξύ κάποιων από αυτές τις μεθόδους αποτελούν αποτελεσματικές λύσεις αντιμετώπισης των αλικυκλοβάκιλων στην βιομηχανία τροφίμων.

Λέξεις-Κλειδιά: σποριογόνα βακτήρια θερμοανθεκτικότητα, αλλοίωση, χυμοί φρούτων

ABSTRACT

Species of the genus *Alicyclobacillus* have posed a threat to food industries in recent years, causing them economic losses. These are spoilage microorganisms found in the raw materials of fruit juices. Their heat resistance, their tolerance to acidic environments and their sporogenic activity are the factors that make it difficult for the juice industry to deal with them. The increasing demand for the production of safe foods, of consistent quality throughout their lifespan, makes it necessary to find effective methods of dealing with these microorganisms. The aim of this postgraduate thesis was to synthesize data from the literature both for understanding the nature of these microorganisms and for the methods by which they can either be killed or their growth inhibited. Based on the data collected, from all species of the genus *Alicyclobacillus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* stands out as the most important spoilage microorganism in fruit juices and especially in apple juice. Heat treatment as a method of dealing with these species is not sufficiently effective, given the nature of these microorganisms. Their heat resistance requires the achievement of higher temperatures during commercial pasteurization, however, this carries the risk of degradation of both the quality of the produced product and its nutritional value. Non-thermal processes such as the use of Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH), ultraviolet (UV) treatment, the use of additives (chemical and physical), the addition of bacteriocins (nisin and enterocin) as well as the combination of some of these methods are effective solutions for dealing with alicyclobacilli in the food industry.

Keywords: spore-forming bacteria heat resistance, spoilage fruit juices

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (Springer Nature, n.d.)	13
Εικόνα 2. Διαδικασία Α: Απευθείας απαρίθμηση αποικιών μέσω τεχνικής ενσωμάτωσης (Pour Plate Technique). New IFU Method No. 12:2019 (Sigma-Aldrich, n.d.)	17
Εικόνα 3. Διαδικασία Β: Απευθείας απαρίθμηση με τεχνική φιλτραρίσματος (Filtration Technique) IFU Method No. 12:2019 (Sigma-Aldrich, χ.χ.)	17
Εικόνα 4. Διαδικασία Γ: Ανίχνευση μέσω της μεθόδου εμπλουτισμού (Enrichment). New IFU Method No. 12:201 (Sigma-Aldrich, n.d.).....	17
Εικόνα 5. Φωτογραφίες των спорίων <i>A. acidoterrestris</i> (Lee et al.,2002)	20

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας Ι. Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά των <i>Alicyclobacillus spp</i>	3
Πίνακας ΙΙ. Γονοτυπικά χαρακτηριστικά των ειδών <i>Alicyclobacillus</i>	7
Πίνακας ΙΙΙ. Η θερμοανθεκτικότητα των спорίων <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> σε διάφορα προϊόντα φρούτων υψηλής οξύτητας	12
Πίνακας ΙV. Απομονώσεις ειδών <i>Alicyclobacillus</i> από τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης και από λοιπά περιβάλλοντα.	36
Πίνακας V. Μέθοδοι αντιμετώπισης των <i>Alicyclobacillus</i>	41

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vii
ABSTRACT.....	viii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	ix
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	ix
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των <i>Alicyclobacillus</i>	1
1.1.1 Φαινοτυπικά και Γονοτυπικά Χαρακτηριστικά των <i>Alicyclobacillus</i>	1
1.1.2 Χαρακτηριστικά του <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	9
1.2 <i>Alicyclobacillus</i> και Βιομηχανία Τροφίμων	11
1.3 Ανίχνευση <i>Alicyclobacillus</i> σε τρόφιμα.....	14
1.3.1 Μέθοδος IFU No. 12 για <i>Alicyclobacillus</i>	16
1.4 Μέθοδοι Αντιμετώπισης <i>Alicyclobacillus</i> Στη Βιομηχανία Τροφίμων	18
1.4.1 Αντιμετώπιση <i>Alicyclobacillus</i> Μέσω θερμικής επεξεργασίας	19
1.4.2 Αντιμετώπιση <i>Alicyclobacillus</i> μέσω μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας ..	20
1.4.3 Αντιμετώπιση <i>Alicyclobacillus</i> spp. μέσω προσθήκης πρόσθετων ουσιών...	24
1.4.4 Αντιμετώπιση <i>Alicyclobacillus</i> μέσω προσθήκης βακτηριοσινών	28
1.5 Ανακεφαλαίωση	32
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
3.1 Συλλογή πληροφοριών.....	34
3.2 Πίνακες δεδομένων- Ανάλυση Δεδομένων	34
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
4.1 Απομονώσεις ειδών του <i>Alicyclobacillus</i> από τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης και λοιπά περιβάλλοντα	35
4.2 Αποτελεσματικότητα Μεθόδων Αντιμετώπισης	38
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία των ειδών του γένους <i>Alicyclobacillus</i> στα τρόφιμα, και ιδιαίτερα στους χυμούς φρούτων, αποτελεί σημαντική πηγή αλλοίωσης και, κατ' επέκταση, οικονομικής ζημίας για τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Οι τρόποι επιμόλυνσης είναι ποικίλοι και δύναται να προκύψουν σε όλα τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας: από την πρωτογενή παραγωγή (π.χ. χώμα, φλοιούς φρούτων κατά τη συγκομιδή) (Willem et al., 2008), μέχρι την επεξεργασία (π.χ. ανεπαρκής καθαρισμός, εξοπλισμός) και την αποθήκευση ή μεταφορά των προϊόντων υπό συνθήκες ευνοϊκές για τη μικροβιακή ανάπτυξη (Wang et al., 2010). Η επιλογή κατάλληλων και στοχευμένων μεθόδων ελέγχου σε κάθε στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων και να μειώσει σημαντικά τις απώλειες. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την εκτεταμένη παρουσία των <i>Alicyclobacillus</i> spp., κυρίως σε όξινα	

τρόφιμα, όπως οι χυμοί φρούτων. Από τον Πίνακα IV προκύπτει ότι η συχνότερη απομόνωση εντοπίζεται στους χυμούς μήλου, ενώ ακολουθούν άλλοι τύποι όπως ο χυμός αχλαδιού, σταφυλιού, ακτινιδίου, ροδάκινου και πορτοκαλιού (Gobbi et al., 2010; Polaska et al., 2021; Goto et al., 2003). Αξιοσημείωτες είναι επίσης οι απομονώσεις από περιβάλλοντα όπως το έδαφος οπωρώνων, ο αέρας αποθηκών, η λάσπη λυμάτων και γεωθερμικές πηγές (Guo et al., 2009; Wang et al., 2010; Goto et al., 2007).	46
Η βιβλιογραφία αναδεικνύει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων αντιμετώπισης, προσαρμοσμένων στα διάφορα στάδια της βιομηχανικής διαδικασίας. Οι τεχνικές αυτές διακρίνονται σε θερμικές και μη θερμικές διεργασίες, χρήση χημικών και φυσικών προσθέτων, καθώς και εφαρμογή βακτηριοσινών, όπως η νισίνη και η εντεροκίνη. Στα αρχικά στάδια παραγωγής, τα φρούτα ενδέχεται να εισέρχονται ήδη επιμολυσμένα. Ο επαρκής καθαρισμός τους, με τη χρήση ειδικών χημικών ουσιών, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός στη μείωση του μικροβιακού φορτίου και την καταστροφή των σπορίων (Lee et al., 2004; Torlak, 2014). Σε επόμενες φάσεις, η εφαρμογή σύγχρονων τεχνολογιών, όπως η υπέρ υψηλή πίεση (UHPH) ή η υπεριώδης ακτινοβολία, συμβάλλει περαιτέρω στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των μικροοργανισμών.	46
Ειδικότερα, το είδος <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> , λόγω της υψηλής θερμοανθεκτικότητας και της παραγωγής μεταβολιτών όπως η γουαϊακόλη, αποτελεί τον σημαντικότερο στόχο για τον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία. Αν και πολλές από τις τεχνικές καταπολέμησης παραμένουν σε πειραματικό στάδιο, παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για μελλοντική εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα. Η παρούσα εργασία συνέβαλε στη συνοπτική και συστηματική καταγραφή των ιδιοτήτων των <i>Alicyclobacillus</i> spp. και των πιθανών μεθόδων αντιμετώπισής τους, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση των τεχνολογιών αυτών σε πραγματικές συνθήκες παραγωγής.	46
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά των *Alicyclobacillus*

1.1.1 Φαινοτυπικά και Γονοτυπικά Χαρακτηριστικά των *Alicyclobacillus*

Το γένος *Alicyclobacillus* ανήκει στην οικογένεια των Alicyclobacillaceae και αποτελείται από μια ομάδα θερμοόξινων, αυστηρά αερόβιων, ετερότροφων και σποριογόνων βακτηρίων. Αρχικά, οι αλικυκλοβάκιλλοι ταξινομήθηκαν στο γένος *Bacillus*, καθώς μοιράζονται με τους βάκιλλους το χαρακτηριστικό του σχηματισμού ενδοσπορίων. Ωστόσο, η φυλογενετική ανάλυση που βασίζεται σε συγκρίσεις αλληλουχίας του 16S rRNA έδειξε ότι τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* ανήκουν σε άλλο είδος εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης γουανίνης και κυτοσίνης (G + C). Επιπλέον είναι θετικά κατά Gram⁺ βακτήρια με κοινά χαρακτηριστικά με τα προαιρετικά αυτότροφα είδη *Sulfobacillus* spp. Ως εκ τούτου, το 1992 κατανεμήθηκαν σε ένα νέο γένος που ονομάζεται *Alicyclobacillus* λόγω της παρουσίας ω-κυκλοεξυλ- ή ω-κυκλοεπυλ-λιπαρών οξέων ως κύρια συστατικά λιπιδίων της μεμβράνης τους. Αυτά τα ω-αλεικυκλικά λιπαρά οξέα έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την θερμοανθεκτικότητα και την αντίσταση στα οξέα περιβάλλοντα που παρουσιάζουν τα είδη του γένους *Alicyclobacillus*. Το χαρακτηριστικό αυτό της μεμβράνης προσδίδει στα είδη του γένους αυτού, την ικανότητα επιβίωσης κατά τις συνθήκες παστερίωσης στην βιομηχανία τροφίμων για την παρασκευή χυμών φρούτων. Το γένος ενώ αρχικά πιστευόταν ότι αποτελούνταν από τρία είδη, τα *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestis* και *A. cycloheptanicus*, πλέον έχουν ταυτοποιηθεί από 22 είδη απομονωμένα από διάφορα υποστρώματα (Sourri et al., 2022).

Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος όρος για την αναφορά στα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Alicyclobacillus* είναι η ονομασία «Thermo Acidophilic Bacilli» ή η συντομογραφία «TAB». Η ονομασία που υιοθετείται στα Ιαπωνικά είναι ισοδύναμη με το «Θερμοανθεκτικοί Οξεόφιλοι Βάκιλοι (ή Βακτήρια)», που επίσης συντομογραφείται ως TAB. Μερικά θερμοφιλά οξεόφιλα βακτήρια όπως ο *Bacillus fumarioli* περιλαμβάνονται στη συντομογραφία, TAB, με μια ευρύτερη έννοια. Άλλες συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται συνήθως διεθνώς είναι το AAT για τον *Alicyclobacillus acidoterrestis* και το BAT, το προηγούμενο όνομά του *Bacillus acidoterrestis*. Το τελευταίο χρησιμοποιείται ως ονομασία στα μέσα καλλιέργειας. Το ATSB θεωρείται μερικές φορές ως συντομογραφία του «Acido-thermophilic Spore-forming Bacteria», αλλά χρησιμοποιείται σπάνια στην Ιαπωνία. Το ACB είναι μία συντομογραφία που έχει χρησιμοποιηθεί ως συντομογραφία του *Alicyclobacillus* παγκοσμίως. Οι παραπάνω συντομογραφίες χρησιμοποιούνται συνήθως κατά τον ποιοτικό έλεγχο και τους ελέγχους διασφάλισης ποιότητας. Όταν ένα όνομα είδους ή/και στελέχους προσδιορίζεται ή χρησιμοποιείται για τεχνικούς σκοπούς, υιοθετείται η επιστημονική ονομασία του μικροοργανισμού (Goto et al., 2007).

Τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* μπορεί να υπάρχουν στις επιφάνειες των φρούτων έχοντας μολυνθεί από το έδαφος και κατά την συγκομιδή ή ακόμα και κατά την παραγωγική διαδικασία. Η απομόνωση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* και του *Alicyclobacillus acidocaldarius* από έδαφος οπωρώνα και κατ' επέκταση η παρουσία αυτών των οργανισμών στο έδαφος υποδηλώνει μία πιθανή πηγή μόλυνσης ενός τελικού προϊόντος παραγωγής όπως χυμό φρούτων, το συμπύκνωμα ή τον πολτό (Groenewald et al., 2007). Στους χυμούς φρούτων διαφορετικών περιεκτικοτήτων, αυτοί οι μικροοργανισμοί βρίσκουν ευνοϊκό περιβάλλον για βλάστηση, ανάπτυξη οδηγώντας στην αλλοίωσή τους.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η παρουσία των λιπαρών οξέων στην μεμβράνη των ειδών του *Alicyclobacillus* είναι αυτή που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντίζοα περιβάλλοντα. Δώδεκα είδη *Alicyclobacillus*, συγκεκριμένα *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. hesperidum*, *A. acidiphilus*, *A. sendaiensis*, *A. disulfidooxidans*, *A. tolerans*, *A. fastidiosus*, *A. sacchari*, *A. vulcanis*, *A. cellulositicus* και *A. dauci*, περιέχουν λιπαρά οξέα ω-κυκλοεξανίου, ενώ τα *A. cycloheptanicus*, *A. kakegawensis*, *A. Shizoukensis*, *A. herbarius*, και το *A. tengchongensis* περιέχουν λιπαρά οξέα ω-κυκλοεπτανίου.

Πρόσφατες μελέτες επισήμαναν την έλλειψη αυτών των λιπαρών οξέων στα *A. aeris*, *A. ferrooxydans*, *A. pomorum*, *A. macrosporangioides* και *A. contaminans*. Αυτά τα είδη έχουν επίσης πολλά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διαφορετικά από τα κλασικά χαρακτηριστικά των *Alicyclobacillus*, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας ανάπτυξης, των πηγών άνθρακα, της παραγωγής οξέων, της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται χημειοαυτοτροφικά χρησιμοποιώντας δισθενή σίδηρο, στοιχειακό θείο και τετραθεινικό ως δότες ηλεκτρονίων. Ωστόσο, η γονοτυπική ανάλυση έδειξε ότι σχετίζονταν φυλογενετικά με μέλη του γένους *Alicyclobacillus*.

Ο ρόλος των ω-κυκλικών λιπαρών οξέων και των οπανοειδών στη λειτουργία της μεμβράνης των *Alicyclobacillus* φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας. Την συσχέτιση των ω-αλεικυκλικών λιπαρών οξέων του *Alicyclobacillus* με την ισχυρή αντίσταση στη θερμότητα και σε όξινα περιβάλλοντα μελέτησαν οι Poralla et al., αποδεικνύοντας ότι τα λιπίδια, που περιέχουν ω-κυκλοεξάνιο λιπαρό οξύ, συσσωρεύονται πυκνά, ως αποτέλεσμα τη χαμηλότερη διάχυση σε υψηλές θερμοκρασίες (Poralla, et al., 1984). Επιπλέον οι Wisotzkey et al. ισχυρίστηκαν ότι αυτή η ιδιότητα αποτελεί πλεονέκτημα των μικροοργανισμών αυτών σε υψηλές θερμοκρασίες ή χαμηλό pH (Wisotzkey, et al., 1992). Έτσι αποδεικνύεται πως αυτά τα λιπαρά οξέα μπορεί να συμβάλλουν στη θερμική αντίσταση του *Alicyclobacillus* σχηματίζοντας μια προστατευτική επικάλυψη με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς. Αυτοί οι υδρόφοβοι δεσμοί μπορεί να σταθεροποιήσουν και να μειώσουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ακραία όξινα και υψηλών θερμοκρασιών περιβάλλοντα (Poralla, et al., 1984).

Πίνακας Ι. Φαινοτυπικά Χαρακτηριστικά των *Alicyclobacillus* spp

Είδος	Θερμοκρασία ανάπτυξης (°C)	pH	ω- λιπαρά οξέα	Σχόλια	Αναφορά
<i>A.acidiphilus</i>	20-55 / 50	2.5-5.5 / 3.0	ω-cyclohexane	Χαμηλό pH ανάπτυξης	Matsubara, et al. (2002)
<i>A. acidocaldarius</i>	35-70 / 55-60	2.5-6.0 / 4.5	ω-cyclohexane	Πολύ θερμοφίλο	Wisotzkey, et al.(1992) Gobbi, et al. (2010) Durak, et al. (2010)
<i>A.acidoterrestris</i>	20-55 / 40-50	2.0-6.0 / 3.5-4.5	ω-cyclohexane	Κυρίαρχο αλλοιογόνο είδος	Wisotzkey, et al. (1992) Zhang, et al. (2013) Połaska, et al.(2021) Gobbi, et al.(2010) Durak, et al. (2010) Nakano, et al.(2015)
<i>A. aeris</i>	25-35 / 30	2.0-6.0 / 3.5	κανένα	Χωρίς ω-λιπαρά	Guo, et al.(2009)
<i>A. cellulositicus</i>	40,0-67,5 / 55	3.5-6.5 / 4.8	ω-cyclohexane	Η ικανότητά του να διασπά κυτταρίνη, όπως φανερώνει και η ονομασία του, το καθιστά ενδιαφέρον για περιβαλλοντικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές.	Kusube, et al. (2014)
<i>A. contaminans</i>	35-60 / 50-55	3.0–6.0 / 4.0-4.5	κανένα	Χωρίς ω-λιπαρά	Goto, et al.(2007) Wang et al. (2010)
<i>A. cycloheptanicus</i>	30-55 / 50	3.0–5.5 / 4.0	ω-cycloheptane	Λιγότερο συχνό, η παρουσία ω- cycloheptane λιπαρών οξέων στη μεμβράνη του χαρακτηριστικό που το	Wisotzkey, et al. (1992) Zhang, et al.(2013)

				διαφοροποιεί βιοχημικά από τα περισσότερα είδη του γένους που φέρουν ω-cyclohexane	
<i>A. dauci</i>	20-50 / 40	3.0–6.0 / 4.0	ω-cyclohexane	Η ονομασία του προέρχεται από το είδος <i>Daucus carota</i> (καρότο), από το οποίο απομονώθηκε αρχικά, καταδεικνύοντας τη δυνατότητα επιμόλυνσης νωπών φυτικών πρώτων υλών	Nakano, et al. (2015)
<i>A. disulfidooxidans</i>	4-40 / 35	0.5–6.0 / 1.5-2.5	ω-cyclohexane	Το πολύ χαμηλό pH ανάπτυξης (έως και 0,5) και η θερμοανθεκτικότητα του το καθιστούν ιδιαίτερο από περιβαλλοντικής και βιοτεχνολογικής άποψης	Karavaiko, et al. (2005)
<i>A. fastidiosus</i>	20-55 / 40-45	2.0–5.5 / 4.0-4.5	ω-cyclohexane	ο Χαρακτηρισμός "fastidiosus" αποδίδεται στις ιδιαίτερες διατροφικές απαιτήσεις του	Goto, et al. (2007) Połaska, et al. (2021) Nakano, et al. (2015)
<i>A. ferrooxydans</i>	17-40 / 28	2.0–6.0 / 3.0	κανένα	Χωρίς ω-λιπαρά	Jiang, et al., (2008)
<i>A. herbarius</i>	35-65 / 55-60	3.5–6.0 / 4.5-5.0	ω-cycloheptane	Επιβιώνει σε όξινα φυτικά υγρά περιβάλλοντα, χρήση ω-cycloheptane λιπαρών οξέων, διαφοροποιώντας το από τα περισσότερα είδη του γένους	Goto, et al. (2002) Zhang, et al. (2013)
<i>A. hesperidum</i>	35-60 / 50-53	2.5–5.5 / 3.5-4.0	ω-cyclohexane	Το όνομά του παραπέμπει στα εσπεριδοειδή. Λόγω της θερμοανθεκτικότητας και της οξεόφιλης φύσης του, θα μπορούσε να συμμετέχει σε επιμολύνσεις με αισθητή υποβάθμιση της ποιότητας χωρίς	Albuquerque, et al. (2000)

				απαραίτητα την μείωση της ασφάλειας	
<i>A. kakegawensis</i>	40-60 / 50-55	3.0–6.5 / 4.0-4.5	ω-cyclohexane	pH 4.0-4.5 ιδανικό	Goto, et al. (2007)
<i>A. macrosporangiidus</i>	35-60 / 50-55	3.0–6.5 / 3.0	κανένα	Χωρίς ω-λιπαρά	Goto, et al. (2007)
<i>A. pomorum</i>	30-60 / 45-50	2.5–6.5 / 4.5-5.0	κανένα	Χωρίς ω-λιπαρά	Goto, et al. (2003)
<i>A. sacchari</i>	30-55 / 45-50	2.0–6.0 / 3.5-4.0	ω-cyclohexane	Η χρήση ω-cyclohexane λιπαρών οξέων στον κυτταρικό του φάκελο το εντάσσει βιοχημικά στην κλασική ομάδα των θερμοφίλων οξεόφιλων Alicyclobacillus, με χαρακτηριστικά αντοχής σε συνθήκες οξύτητας και θερμότητας.	Goto, et al. (2007)
<i>A. sendaiensis</i>	40-65 / 55	2.5–6.5 / 4.0-4.5	ω-cyclohexane	Ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια έρευνας για την αναζήτηση βακτηρίων που παράγουν θερμοσταθερή κολλαγενάση	Tsuruoka, et al. (2003)
<i>A. shizuokaensis</i>	35-60 / 45-50	3.0–6.5 / 4.0-4.5	ω-cycloheptane		Goto, et al. (2007)
<i>A. tengchongensis</i>	30-50 / 45	2.0–6.0 / 4.0-4.5	ω-cycloheptane	Απομονώθηκε από το χώμα	Kim, et al. (2014)
<i>A. tolerans</i>	20-55 / 37-42	1.5–5.0 / 5.5	ω-cyclohexane	Ενδιαφέρον οι χαμηλότερες τιμές ανάπτυξης θερμοκρασίας και pH	Karavaiko, et al. (2005)
<i>A. vulcanalis</i>	35-65 / 55	2.0–6.0 / 4.0-4.5	ω-cyclohexane	Βιοτεχνολογικές χρήσεις τα ένζυμά του.	Simbahan, et al. (2004)

Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς ανέφεραν ότι η παρουσία ω-κυκλοεξυλ λιπαρών οξέων δεν είναι απαραίτητη για την προστασία των αλικυκλοβακίλλων από τις υψηλές θερμοκρασίες και το χαμηλό pH, επειδή υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως το *Curtobacterium pusillum* και το *Propionibacterium cyclohexanicum*, που διαθέτουν επίσης ω-αλεικυκλικά οξέα και δεν είναι ούτε θερμοφιλά ούτε οξεόφιλα (το *Propionibacterium cyclohexanicum* είναι ένα βακτήριο ανεκτικό σε οξύ). Μία πιθανή εξήγηση που δικαιολογεί την προσαρμογή των αλικυκλοβακίλλων σε ακραία περιβάλλοντα μπορεί να είναι η παρουσία χοπανοειδών στα κύτταρά τους. Το χαμηλό ιξώδες της μεμβράνης που προκαλείται από τη διακλαδισμένη αλυσίδα λιπαρών οξέων αντισταθμίζεται από την παρουσία υψηλότερης συγκέντρωσης οπανοειδών, οδηγώντας σε μια πιο σταθερή μεμβράνη (Poralla et al., 1980).

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Alicyclobacillus*

Πίνακας II. Γονοτυπικά χαρακτηριστικά των ειδών *Alicyclobacillus*

Είδος <i>Alicyclobacillus</i>	G + C (%) (Γουανίνη+ Κυτοσίνη %)	Ομοιότητα 16S rRNA (%)	Σχόλια	Αναφορά
<i>A. acidiphilus</i>	54.1	<i>A. acidoterrestris</i> (96.6%)	Στενή φυλογενετική σχέση με <i>A. acidoterrestris</i>	Matsubara, et al. (2002)
<i>A. acidocaldarius</i>	61.89	<i>A. acidoterrestris</i> (98.8%)	Πολύ θερμοφίλο – υψηλό G+C	Mavromatis, et al. (2010)
<i>A. cidoterrestris</i>	51.5	<i>A. acidocaldarius</i> (98.8%)	Κυρίαρχο είδος – χαμηλό G+C	Wisotzkey, et al. (1992)
<i>A. aeris</i>	51.2	<i>A. ferrooxydans</i> (94.2%)		Guo, et al. (2009)
<i>A. cellulositicus</i>	60.8	<i>A. macrosporangiidus</i> (91.9%)	Πιο απομακρυσμένη φυλογενετική σχέση σε σχέση με τα αλλοιογόνα είδη	Kusube, et al. (2014)
<i>A. contaminans</i>	61.1 - 61.6	Είδη του <i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)	Μετρίως στενή φυλογενετική σχέση, αλλά ικανή να δικαιολογήσει τον χαρακτηρισμό του ως διακριτού είδους	Goto, et al. (2007)
<i>A. cycloheptanicus</i>	57.2	<i>Alicyclobacillus</i> (92.7%–93.2%)	Εξαιτίας του ποσοστού γενετικής ομοιότητας υποδεικνύεται ενδιάμεσος φυλογενετικό δεσμό	Wisotzkey, et al. (1992)
<i>A. dauci</i>	49.6	<i>A. acidoterrestris</i> (97.4%) and <i>A. fastidiosus</i> (97.3%)	Στενή φυλογενετική συγγένεια	Nakano, et al. (2015)
<i>A. disulfidooxidans</i>	53	<i>A. tolerans</i> (92.6%)	Σχετικά απομακρυσμένη γενετική συγγένεια	Karavaiko G. I., et al. (2005)
<i>A. fastidiosus</i>	53.9	Με είδη <i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)	Ενδιάμεση φυλογενετική σχέση	Goto, et al. (2007)
<i>A. ferrooxydans</i>	48.6	<i>A. pomorum</i> (94.8%)	Είδος με χαμηλό G+C	Jiang, et al. (2008)

<i>A. herbarius</i>	56.2	<i>Alicyclobacillus</i> (91.3%–92.6%) and <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> (84.7%)	Συγγένεια με <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , ιδιαίτερη ταξινομική θέση, εξελικτικά πρώιμη ή ενδιάμεση θέση εντός του γενεαλογικού δέντρου του γένους	Goto, et al. (2002)
<i>A. hesperidum</i>	60.3	<i>Alicyclobacillus</i> (97.7%–98%)	Κατατάσσεται μεταξύ των γενετικά συγγενών αλλά διακριτών ειδών	Albuquerque, et al. (2000)
<i>A. kakegawensis</i>	61.3-61.7	<i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)		Goto, et al. (2007)
<i>A. macrosporangiidus</i>	62.5	<i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)	Το όνομά του υποδηλώνει την ικανότητα παραγωγής ενδοσπορίων	Goto, et al.(2007)
<i>A. pomorum</i>	53.1	<i>Alicyclobacillus</i> (92.5%–95.5%)		Goto, et al. (2003)
<i>A. sacchari</i>	56.6	<i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)	Αρχικά απομονώθηκε από μελάσα ζαχαροκάλαμου, γεγονός που εξηγεί και την ονομασία του.	Goto, et al. (2007)
<i>A. sendaiensis</i>	62.3	<i>A. vulcanis</i> (96.9%)		Simbahan, et al. (2004)
<i>A. shizuokaensis</i>	60.5	<i>Alicyclobacillus</i> (92.3%–94.6%)		Goto, et al. (2007)
<i>A. tengchongensis</i>	53.7	<i>Alicyclobacillus</i> (90.3%–92.8%)		Kim, et al. (2014)
<i>A. tolerans</i>	48.7	<i>Alicyclobacillus</i> (92.1%–94.6%) and <i>S. thermosulfidooxidans</i> (87.7%)	Είδος με πολύ χαμηλό G+C %	Karavaiko, et al. (2005)
<i>A. vulcanalis</i>	62	<i>A. acidocaldarius</i> (97.8%)	Γονιδιακά συγγενές με <i>A. acidocaldarius</i>	Simbahan, et al. (2004)

1.1.2 Χαρακτηριστικά του *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Το γένος περιλαμβάνει διαφορετικά είδη και υποείδη όμως το *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι το πιο συχνά απαντώμενο είδος που ευθύνεται για την αλλοίωση των χυμών φρούτων και λοιπών προϊόντων παραγόμενων από φρούτα. Αυτά τα στελέχη αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με τιμές pH μεταξύ 2,5 και 6,0 και σε θερμοκρασία πάνω από 20 °C. Το *A. acidoterrestris* μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος θερμοκρασίας από 26°C έως 55°C και σε pH από 2,5 έως 6,0. Από όλα τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* το *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι αυτό που απασχολεί την βιομηχανία τροφίμων περισσότερο από όλα. Αυτό αποδεικνύεται από πολλές μελέτες οι οποίες απομόνωσαν τον μικροοργανισμό από τα περισσότερα δείγματα ελέγχου τους. Το *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι ένα θετικό κατά Gram⁺, θερμοοξεόφιλο, μη παθογόνο, αλλοιογόνο βακτήριο που σχηματίζει σπόρους και αλλοιώνει τους εμπορικούς παστεριωμένους χυμούς φρούτων. (Moshe Shemesh, 2013)

Ως εκ τούτου, μπορεί να επιβιώσει σε χυμούς φρούτων καθώς και να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 20°C, έχοντας τη δυνατότητα να αλλοιώσει τα σταθερά στο ράφι προϊόντα κατά την αποθήκευσή τους. Αρκετές περιπτώσεις αλλοίωσης έχουν αναφερθεί στην Ιαπωνία, την Ευρώπη και την Αμερική κατά τη δεκαετία του 1990. Ο έλεγχος της ανάπτυξης των ειδών του γένους *Alicyclobacillus* είναι υψίστης σημασίας προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα και η εκτεταμένη διάρκεια ζωής τροφίμων.

Είδη του γένους *Alicyclobacillus* δεν έχουν απομονωθεί μόνο από τρόφιμα με χαμηλό pH. Έχουν απομονωθεί και από χόμα και από οπωρώνες και από βιομηχανικό εξοπλισμό. Έτσι μέσω των σπορίων οι μικροοργανισμοί μπορούν να επιμολύνουν τα προϊόντα καθ' όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Τα σπόρια έχει αποδειχθεί πως είναι ανθεκτικά και στις διαδικασίες παστερίωσης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή και την ανασύσταση συμπυκνωμένου χυμού πορτοκαλιού. Μετά την παστερίωση, τα σπόρια μπορεί να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν, επηρεάζοντας επομένως τα αισθητήρια χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, όπως η οσμή και η γεύση και, περιστασιακά, οδηγούν στο σχηματισμό ιζημάτων και θολότητας (V.M Silva & Gibbs, 2001). Είναι δύσκολο να εξαλειφθεί ο *Alicyclobacillus* στους χυμούς φρούτων, επειδή τα σπόριά τους επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες όπως αυτές της παστερίωσης και μπορούν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν υπό κατάλληλες συνθήκες κατά την αποθήκευση των τελικών προϊόντων. Ορισμένα είδη *Alicyclobacillus*, όπως το *A. acidoterrestris* και το *A. acidocaldarius*, μπορούν επίσης να προσδώσουν αντισηπτική οσμή στα προϊόντα λόγω του σχηματισμού γουαϊακόλης (Gocmen et al., 2005).

Τα βακτήρια *Alicyclobacillus* θεωρήθηκαν ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί στη βιομηχανία χυμών φρούτων, καθώς μπορούν να επιφέρουν οικονομικές απώλειες. Η αλλοίωση των χυμών εκδηλώνεται κυρίως μέσω του σχηματισμού δυσάρεστων γεύσεων και οσμών που προκύπτουν από την εμφάνιση χημικών ενώσεων, όπως η γουαϊακόλη και οι αλοφαινόλες, που παράγονται από αυτά τα βακτήρια. Η αλλοίωση του χυμού φρούτων από τον *Alicyclobacillus acidoterrestris* χαρακτηρίζεται από μια ξεχωριστή φαρμακευτική ή αντισηπτική οσμή που αποδίδεται στη γουαϊακόλη, ένα μεταβολικό υποπροϊόν του βακτηρίου. Η παρουσία βανιλίνης ή βανιλικού οξέος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή γουαϊακόλης (Cai, et al., 2015). Ωστόσο έχει αποδειχθεί

ότι η περιεκτικότητα σε γουαϊακόλη σε χυμό μήλου που έχει εμβολιαστεί με *A. acidoterrestris* δεν συσχετίζεται πάντα με τον αριθμό των κυττάρων (R V Orr, 2000). Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης με βάση το 5' άκρο του γονιδίου 16S rRNA έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα παραγωγής γουαϊακόλης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των στελεχών. Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων παραγωγής γουαϊακόλης και της φυλογενετικής συγγένειας που βασίζεται στο γονίδιο 16S rRNA (Goto, et al., 2008).

Η αλλοίωση των χυμών φρούτων εξαρτάται κυρίως από τους βαθμούς °Brix του χυμού, τη θερμοκρασία αποθήκευσής του, τον τύπο του χυμού καθώς και το φορτίο των σπορίων. Υπό ιδανικές συνθήκες, τα χαμηλά επίπεδα σπορίων (περίπου 1 σπόριο ανά 10 mL χυμού) έχει αποδειχθεί πως είναι επαρκή για να προκαλέσουν αλλοίωση στο χυμό μήλου και σε χυμό λευκού σταφυλιού. Στις ΗΠΑ έχει παρατηρηθεί αλλοίωση κυρίως στον χυμό μήλου, αλλά και σε χυμό αχλαδιού, χυμό πορτοκαλιού, χυμούς χυμών και σε κονσέρβες ντοματών σε κύβους (Isabel Walls, 2000). Στον χυμό μήλου, η παρουσία δυσάρεστης γεύσης είναι μία από τις πιο συχνές αιτίες απόρριψης των καταναλωτών και, κατά συνέπεια, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τους παραγωγούς χυμού μήλου. Οι *Alicyclobacillus acidoterrestris* και *Actinomycetes* είναι ικανοί να προσδίδουν άρωμα μέσω παραγωγής δραστικών ενώσεων που συχνά περιγράφονται ως μούχλα-χόμα ή ακόμα και σαν φάρμακο έστω κι αν υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο τρόφιμο (Barbara Pöllinger-Zierler, 2004). Η βακτηριακή αλλοίωση από τον *Alicyclobacillus acidoterrestris* μπορεί να μην είναι ορατά ανιχνεύσιμη (Thomas A. Eisele, 2006).

Μία μελέτη που αποδεικνύει την υψηλή συχνότητα εμφάνισης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι αυτή του Durak και των συνεργατών του. Συγκεκριμένα, εξέτασαν συνολικά 141 απομονώσεις από χυμούς, ποτά, συστατικά και περιβαλλοντικά δείγματα που ταυτοποιήθηκαν ως *Alicyclobacillus* με ανάλυση του 16S rRNA και το πιο συχνά απομονωμένο είδος βρέθηκε να είναι *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Η πλειονότητα των θερμοανθεκτικών σποριογόνων που απομονώθηκαν από τους χυμούς και τα συμπυκνώματα μήλου βρέθηκε να είναι το *A. acidoterrestris* (24 από τα 36 συνολικά προϊόντα απομόνωσης μήλων). Το *A. acidoterrestris* έχει συσχετιστεί και με τα εσπεριδοειδή, τα συμπυκνώματα εσπεριδοειδών και τα σχετικά περιβάλλοντα, από όπου έχει απομονωθεί ο μικροοργανισμός από το Πανεπιστήμιο της Φλόριντα (UF) (15 από τα συνολικά 28 προϊόντα απομόνωσης δείγματα εσπεριδοειδών) (Durak et al., 2010).

Μία ακόμα μελέτη προσδιόρισε τον επιπολασμό του *A. acidoterrestris* σε 150 ισπανικούς παστεριωμένους και επεξεργασμένους με επεξεργασία υψηλής πίεσης (High Pressure Processing ,HPP) χυμούς φρούτων που αγοράστηκαν από supermarket ενώ κάποιοι παραλήφθηκαν από τους ίδιους τους παρασκευαστές. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης του *A. acidoterrestris* (18,0 %) στους αναλυθέντες χυμούς. Το 44,4 % των απομονώσεων προερχόταν από μείγματα χυμών φρούτων. Μέσα στα μείγματα χυμών, 9 χυμοί περιείχαν χυμό μήλου μεταξύ των συστατικών τους. Αυτό αντιπροσωπεύει το 18,8 % της επίπτωσης σε σχέση με το σύνολο των ανάμεικτων χυμών με μήλο. Παρατηρήθηκε επίσης υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε μονοποικιλιακούς χυμούς μήλου (3 στα 14 δείγματα). Όπως αποδεικνύεται, υπάρχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης του *A. acidoterrestris* σε χυμούς και ενδιάμεσα προϊόντα που διατίθενται στο εμπόριο παρά τις μεθόδους επεξεργασίας που ελήφθησαν (παστερίωση ή HPP). Κάτω από ^{ευνοϊκές} συνθήκες για την ανάπτυξη αυτού του μικροοργανισμού, η παραγωγή γουαϊακόλης είναι αρκετή ώστε να υποβαθμίσει τους

χυμούς πριν την κατανάλωσή τους (Neggazi I. et al., 2023). Έτσι προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των χυμών φρούτων είναι απαραίτητο να βρεθούν οι κατάλληλες μεθόδους για την μείωση και την εξάλειψη του *A. acidoterrestris* στα τελικά προϊόντα χυμών φρούτων.

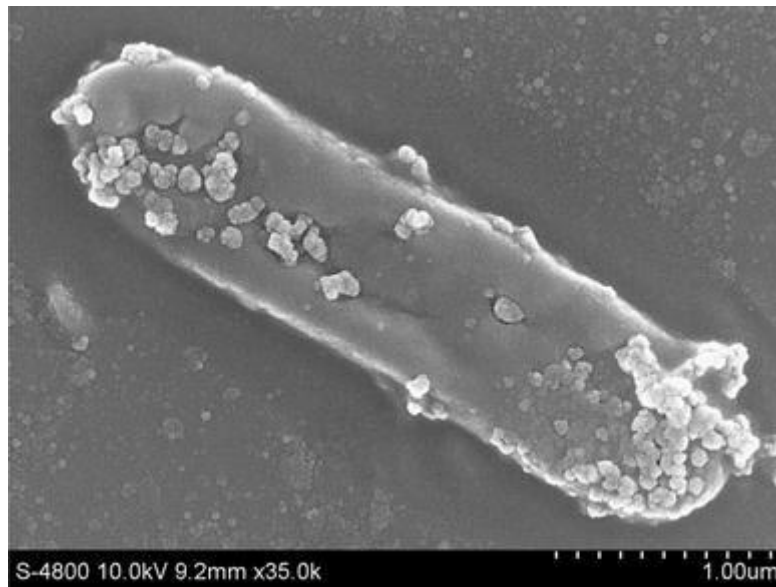
Τέλος μία ακόμα μελέτη απέδειξε ότι το *A. acidoterrestris* μπορεί να παράγει 2,6-DBP και 2,6-DCP (2,6-διβρωμοφαινόλης (2,6-DBP) και του 2,6 -διχλωροφαινόλη (2,6-DCP) σε χυμούς που διατίθενται στο ράφι. Αποδεικνύοντας ότι το *A. acidoterrestris* μπορεί να παράγει 2,6-DCP στα τρόφιμα. Ο έλεγχος των θερμοκρασιών αποθήκευσης (έως < 20°C) αμέσως μετά την επεξεργασία μπορεί να αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέτρο ελέγχου για τη βιομηχανία χυμών φρούτων για την πρόληψη της αλλοίωσης από το *A. acidoterrestris* (N Jensen & Whitfield, 2003). Στον χυμό μήλου, η παρουσία δυσάρεστης γεύσης είναι μία από τις πιο συχνές αιτίες απόρριψης των καταναλωτών και, κατά συνέπεια, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τους παραγωγούς χυμού μήλου. Ο *Alicyclobacillus acidoterrestris* και οι μεταβολίτες του ευθύνονται για την παραγωγή ενώσεων που προσδίδουν άρωμα που υποβαθμίζει την ποιότητα των χυμών. Μέσω της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας μετά την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) για τις ενώσεις αυτές και εντοπίστηκαν στο εύρος 0,08–7,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το LOD και 0,27–25 $\mu\text{g L}^{-1}$ για το LOQ, ανάλογα με την ένωση (Pöllinger-Zierler, Siegmund, & Pfannhauser, 2004). Όπως αναφέρουν οι Roth et al. (2024), η παρουσία του γονιδίου *vdcC* φαίνεται να συνδέεται με την παραγωγή γουαϊακόλης από τα *Alicyclobacillus* spp., κάτι που έχει επιβεβαιωθεί μέσω RT-PCR και GC-MS. Η βιομηχανία τροφίμων αναγνωρίζει τον *Alicyclobacillus acidoterrestris* ως το κύριο είδος που παράγει γουαϊακόλη (Roth K et al., 2024).

1.2 *Alicyclobacillus* και Βιομηχανία Τροφίμων

Η αλλοίωση των τροφίμων από τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* αποτελεί πρόβλημα για τη βιομηχανία χυμών από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, αφού αναφέρθηκε για πρώτη φορά ως η αιτία μιας ασυνήθιστης αλλοίωσης ενός παστεριωμένου χυμού μήλου. Αυτός ο μικροοργανισμός ταξινομήθηκε για πρώτη φορά ως *Bacillus acidoterrestris* και ανακατανεμήθηκε το 1992 σε ένα νέο γένος, τον *Alicyclobacillus*, λόγω της παρουσίας του ω-κυκλοεξανικού λιπαρού οξέος ως το κύριο φυσικό συστατικό λιπιδίου της μεμβράνης. Το 1994, κατά τη διάρκεια του ασυνήθιστα ζεστού καλοκαιριού στην Ευρώπη, ορισμένες βιομηχανίες εντόπισαν στους χυμούς φρούτων, χαρακτηριστική μυρωδιά που είχε προκληθεί από *Alicyclobacillus*. Η μυρωδιά αυτή είχε το χαρακτηριστικό φαρμακευτικής ή χημικής οσμής λόγω του σχηματισμού γουαϊακόλης (2-μεθοξυ φαινόλη) και αλοφαινόλων υποβαθμίζοντας τα προϊόντα (Yamazaki, et al., 1996).

Πίνακας III. Η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε διάφορα προϊόντα φρούτων υψηλής οξύτητας

ΠΡΟΪΟΝ	pH	Θερμοκρασία ανάπτυξης (°C)	°Brix	D- value (min)	z- value (°C)	ΑΝΑΦΟΡΑ
Χυμός πορτοκαλιού	4.1	95	5.3	5.3	9.5	Baumgart, et al. (1997)
Χυμός φρούτων	3.5	95	4.8	5.2	10.8	
Νέκταρ φρούτων	3.5	95	6.1	5.1	9.6	
Χυμός μήλου	3.5	85 90 95	11.4	56 23 2.8	7.7	Splittstoesser, et al. (1994)
Χυμός σταφυλιού	3.3	85 90 95	15.8	57 16 2.4	7.2	
Χυμός πορτοκαλιού	3.5	85 91	11.7	66 12	7.8	Silva, et al. (1999)
Χυμός πορτοκαλιού	3.2	85 90 95	9.0	50-95 10-21 2.5- 8.7	7.2- 11.3	Eiroa, et al. (1999)
Χυμός πορτοκαλιού	3.9	85 91	NR	54 10 3.6	12.9	Komitopoulou, et al. (1999)
Χυμός μήλου	3.5	85 90 95	NR	41 7.4 2.3	12.2	
Εκχύλισμα <i>Cyruaçu</i>	3.6	85 91 95 97	11.3	18 5.4 2.8 0.57	9.0	Silva, et al. (1999)
Χυμός γκρέιπφρουτ	3.4	80 90 95	NR	38 6.0 1.9	11.6	Komitopoulou, et al. (1999)
Χυμός μούρων	3.5	88 91 95	NR	11 3.8 1.0	7.2	Walls, (1997)
Κρασί	NR	75 85	NR	33 0.57	10.5	Splittstoesser, et al. (1997)
Συμπύκνωμα φραγκοστάφυλλου	2.5	91	58.5	24	NR	
Συμπύκνωμα μαύρης σταφίδας	2.5	91	26.1	3.8	NR	Silva et al. (1999)



Εικόνα 1. *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Springer Nature, n.d.)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί κύριο χαρακτηριστικό των ειδών του γένους *Alicyclobacillus* είναι ότι είναι σποριογόνα και ότι διακρίνονται λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται κάτω από ένα ευρύ φάσμα χαμηλών τιμών pH, που κυμαίνεται από 2.0 έως 6.0 (Goto, et al.,2003). Τα σπόρια του *Alicyclobacillus* μπορούν να επιβιώσουν στις συνθήκες παστερίωσης των χυμών (στους 92°C για 10 δευτερόλεπτα). Τα βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται καλά μεταξύ 42°C και 60°C (και μπορεί οι τιμές να κυμαίνονται μεταξύ 12°C και 80 °C) και σε υποστρώματα ή προϊόντα με εύρος τιμών pH 3.5–4.5 . Επιπλέον τα σπόρια αν και για την ανάπτυξή τους απαιτούν περιβάλλοντα με υψηλότερη περιεκτικότητα νερού, μπορούν να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε συμπυκνώματα φρούτων ή και παρόμοια περιβάλλοντα. Η σποριογόνος ιδιότητα των βακίλλων αυτών, τα καθιστά υψηλό κίνδυνο για την βιομηχανία τροφίμων.

Η ποιότητα του τρόφιμου μπορεί να ελέγχεται και να αξιολογείται με διάφορους τρόπους από τους παραγωγούς τροφίμων ομοίως και τις μεταβολές που προκύπτουν σε αυτά πριν ακόμα επέλθει περάτωση της ημερομηνίας λήξης του προϊόντος. Οι τελευταίες μπορούν να γίνονται αντιληπτές και να αξιολογούνται ως ένα βαθμό και από τους καταναλωτές. Ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφίμων από τους μικροοργανισμούς μπορεί να συμβεί στα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας του ,αλλοιώνοντας οποιοδήποτε ή ακόμα και όλα τα χαρακτηριστικά του, καθιστώντας το τελικό προϊόν μη αποδεκτό.

Τα *Alicyclobacillus* αν και δεν θεωρούνται κίνδυνος για την ασφάλεια των τροφίμων, αποτελούν οργανισμό-στόχο της βιομηχανίας τροφίμων, για την διατήρηση της ποιότητας τους, λόγω των μεταβολών που μπορεί να επιφέρουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων όπως στο άρωμα και την γεύση. Ως εκ τούτου την υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων τροφίμων. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και η παρουσία τους στη βιομηχανία χυμών φρούτων έχουν οδηγήσει στην

ανάπτυξη πολλών μεθόδων απομόνωσης και ταυτοποίησης που βασίζονται στην ανίχνευση των κυττάρων (μέθοδοι καλλιέργειας, ELISA, κυτταρομετρία ροής), ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (PCR και 16S rRNA) και μέτρηση των μεταβολιτών τους (HPLC, Electronic nose) είναι κάποιες από αυτές (Sourri et al., 2022).

Τα είδη *Alicyclobacillus* και ειδικότερα το *Alicyclobacillus acidoterrestris*, είναι από τους πιο γνωστούς μικροοργανισμούς που αποτελεί κίνδυνο μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων στη βιομηχανία χυμών φρούτων. Η θερμική αντίσταση των σπορίων του είναι εξαιρετικά υψηλή (Borlinghaus A & Engel R, 1997). Τα σπόρια του γένους αυτού μπορούν να επιβιώσουν σε θερμικές επεξεργασίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Η εξάλειψή τους από τα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο της αποτελεσματικότητας οποιουδήποτε πρωτοκόλλου επεξεργασίας για την μείωση της πιθανότητας μόλυνσης των τελικών προϊόντων. Το *Alicyclobacillus acidoterrestris* μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως κυτταρομετρία ροής, PCR, ανίχνευση λιπαρών οξέων, ριβοτυποποίηση (PCR ribotyping) και καλλιεργητικές μεθόδους με βιοχημικές ταυτοποιήσεις. Η έγκαιρη ανίχνευση είναι μια μεγάλη πρόκληση που μπορεί να μειώσει τις οικονομικές απώλειες στον κλάδο, ενώ η ανάπτυξη μεθόδων ελέγχου που στοχεύουν στην αδρανοποίηση των *Alicyclobacillus* είναι επίσης υψίστης σημασίας.

1.3 Ανίχνευση *Alicyclobacillus* σε τρόφιμα

Προκειμένου να βρεθεί τρόπος που θα επιφέρει μικροβιολογική σταθερότητα στους χυμούς φρούτων ειδικότερα με την παρουσία των *Alicyclobacillus*, οι Martin και οι συνεργάτες του εξέτασαν χυμούς φρούτων/λαχανικών (από συμπυκνωμένους πολτούς, χυμούς διαυγασμένους και μη) που διατέθηκαν στο εμπόριο στην Αργεντινή μεταξύ των χρονολογιών 1996 και 2009. Η παρουσία του *Alicyclobacillus* προσδιορίστηκε σε συνολικά 8556 δείγματα χυμών φρούτων και λαχανικών (μήλο, αχλάδι, σταφύλι, ροδάκινο, μείγμα από χυμούς, μανταρίνι, ανανά, πορτοκάλι, μάνγκο, δαμάσκηνο, γκουάβα, βερίκοκο, λεμόνι, μπανάνα, ακτινίδιο, καρότο, φράουλα, γκρέιπφρουτ και παντζάρια) που συλλέχθηκαν από επτά επαρχίες της Αργεντινής. Εκτός από το ακτινίδιο και το πορτοκάλι, ο *Alicyclobacillus* βρέθηκε σε χυμούς από όλες τις αξιολογηθείσες πρώτες ύλες. Το υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων βρέθηκε για τους χυμούς παντζαριού, φράουλας, μπανάνας, ροδάκινου, μάνγκο, καρότου και δαμάσκηνου (Martin, et al., 2011).

Αλικοβάκιλλοι έχουν απομονωθεί εκτός από χυμούς φρούτων και από χόμα οπωρώνων. Η παρουσία αυτών, στο έδαφος υποδηλώνει την πιθανή πηγή μόλυνσης για τον τελικό χυμό φρούτων, το συμπύκνωμα ή τον πολτό που θα παραχθεί. Οι Willem και οι συνεργάτες του απομόνωσαν, από χόμα που συλλέχτηκε από ένα αγρόκτημα μήλων και αχλαδιών στο Elgin, στη Νότια Αφρική, το *Alicyclobacillus acidoterrestris* και το *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές ειδικούς για το γένος και την αλληλουχία γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) (Willem, et al., 2008). Επιπλέον και οι Groenewald et al. αναφέρουν για πρώτη φορά την απομόνωση του *A. acidoterrestris* τόσο από νερό πλύσης όσο και από χόμα έξω από μονάδα επεξεργασίας

φρούτων, καθώς και την απομόνωση του *A. acidocaldarius* από μύγες ξυδιού (*Drosophila melanogaster*) (Groenewald, et al.,2009).

Μία ακόμα απομόνωση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* πραγματοποιήθηκε από χυμό πορτοκαλιού, χυμό μήλου και φρεσκοστυμμένου χυμού πορτοκαλιού σε θερμοκρασίες 25°C-44°C βαθμών Κελσίου, παράγοντας και αυξημένα επίπεδα (1-100 ppb) γουαϊακόλης, με την χρήση του DuPont RiboPrinter, αποδεικνύοντας την παρουσία του μικροοργανισμού στους χυμούς φρούτων (Pettipher, et al., 1997). Το *Alicyclobacillus acidoterrestris*, έχει βρεθεί ότι αποτελεί αλλοιωγόνο μικροοργανισμό και για όξινα ποτά στην Ιαπωνία (Koji Yamazaki, et al.,1996).

Η παρουσία των *Alicyclobacillus* σε εμπορικούς χυμούς φρούτων στη Δυτική Αφρική επιβεβαιώθηκε από τους Osopale et al. ,που εξέτασαν συνολικά 225 προϊόντα χυμών φρούτων. Η προέλευση των δειγμάτων ήταν από τη Γκάνα (n = 39) και τη Νιγηρία (n = 186), εμπλουτίστηκαν με ζωμό μαγιάς-άμυλο-γλυκόζης (YSG) (pH 3,7) μετά από θερμικό σοκ στους 80 °C για 10 λεπτά. Οι Αλικυκλοβάκιλλοι ανιχνεύθηκαν στο 11,6% (26) των δειγμάτων. Τα απομονωμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μέσω PCR ταυτοποιώντας 16 *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Επιπλέον, αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) απέδειξαν τη δραστηριότητα της αποκαρβοξυλάσης βανιλικού οξέος (vdc) σε όλα τα στελέχη απομόνωσης *A. acidoterrestris* λόγω της παραγωγής γουαϊακόλης από βανιλικό οξύ (Babasola Adewunmi Osopale,et al.,2016). Μία ακόμα μελέτη απέδειξε πως το γονίδιο vdcC ήταν παρόν σε όλους τους *Alicyclobacillus* που παράγουν γουαϊακόλη, αλλά απουσίαζε από τα στελέχη που δεν παράγουν γουαϊακόλη εκτός από το *A. fastidiosus* DSM 17978. Με βάση τη γονιδιακή αλληλουχία του vdcC, σχεδιάστηκε ένα ζεύγος εκκινητών ειδικό για το *A. acidoterrestris* και μέσω PCR πραγματικού χρόνου ποσοτικοποιήθηκε το όριο ανίχνευσης του σε χυμό μήλου και βρέθηκε να είναι $2,6 \times 10^1$ CFU/mL. Ανιχνεύοντας έτσι τον *A. acidoterrestris* σε 36 τεχνητά μολυσμένα δείγματα χυμού μήλου (Zhouli Wang,et al., 2021).

Η παραπάνω αναφορά στην χρήση υποστρώματος μαγιάς-άμυλο-γλυκόζης (YSG) για την ανίχνευση αλικυκλοβακίλλων δεν είναι τυχαία καθώς επιβεβαιώνεται η καταλληλότητά του κι από τους Henczka et. al.. Συγκεκριμένα συγκρίναν τα αποτελέσματα της εφαρμογής τεσσάρων τύπων μέσων ανάπτυξης (BAT άγαρ, YSG άγαρ, K άγαρ και SK άγαρ) σχετικά με την ανάκτηση και την απαρίθμηση των σπορίων *A. acidoterrestris*. Η ακρίβεια της ανίχνευσης και της απαρίθμησης των σπορίων του *A. acidoterrestris* διερευνήθηκε με βάση την επίδραση του τύπου του εφαρμοζόμενου μέσου ανάπτυξης, των συνθηκών θερμικού σοκ, της θερμοκρασίας επώασης, του χρόνου επώασης, και της παρουσίας χυμού μήλου στο δείγμα. Μεταξύ των τεσσάρων μέσων που εξετάστηκαν, το άγαρ YSG αποδείχθηκε πως είναι το πιο ευαίσθητο μέσο και η χρήση του επιφέρει τον υψηλότερο βαθμό ανάκτησης των σπορίων του *A. acidoterrestris*, ενώ το άγαρ K και το άγαρ BAT πως είναι τα λιγότερο κατάλληλα μέσα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχική θερμική επεξεργασία των δειγμάτων στους 80°C για 10 λεπτά, ο συνδυασμός των δειγμάτων επίστρωσης με διήθηση σε άγαρ YSG, και η επώασή τους στους 46°C για 3 ημέρες αποτελούν τις βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση και την απαρίθμηση των σπορίων του *A. acidoterrestris* (Henczka, et al., 2013).

1.3.1 Μέθοδος IFU No. 12 για *Alicyclobacillus*

Από το 1982, όταν πρώτο εμφανίστηκαν περιστατικά μόλυνσης λόγω του *Alicyclobacillus*, έχουν αναπτυχθεί παγκοσμίως περισσότερες από 40 διαφορετικές μέθοδοι δοκιμών για την ανίχνευση του *Alicyclobacillus*. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των θερμοφίλων και οξεόφιλων χαρακτηριστικών του *Alicyclobacillus* που καθιστούν την *in vitro* καλλιέργεια των βακτηρίων δύσκολη. Η ευαισθησία και η ακρίβεια ποικίλλουν στις διάφορες μεθόδους. Οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των δοκιμών που λαμβάνονται κατά την διαδικασία παραγωγής και εκείνων που λαμβάνονται μετά την παραγωγή του προϊόντος, έχουν δημιουργήσει προβλήματα στις βιομηχανίες τροφίμων και ο οικονομικός αντίκτυπος τέτοιων περιστατικών είναι αρκετά υψηλός.

Η Διεθνής Ένωση Επεξεργασίας και Παραγωγής Χυμών Φρούτων και Λαχανικών (International Fruit and Vegetable Juice Association, IFU) ξεκίνησε, το 2001 διεθνείς συνεργατικές προσπάθειες για την τυποποίηση των μεθόδων για την ανίχνευση θερμοοξεόφιλων βακτηρίων (*Alicyclobacillus*) (Ph.D., 2007). Αυτές οι προσπάθειες κατέληξαν στη δημοσίευση της πρώτης τυποποιημένης μεθόδου IFU για την ανίχνευση αλικυκλοβάκιλλων σε χυμούς φρούτων τον Απρίλιο του 2003. Η IFU δημοσίευσε ένα αναθεωρημένο πρότυπο Μεθόδου No. 12 για την ανίχνευση και την απαρίθμηση θερμοοξίνων βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρους, των *Alicyclobacillus*, το 2019.

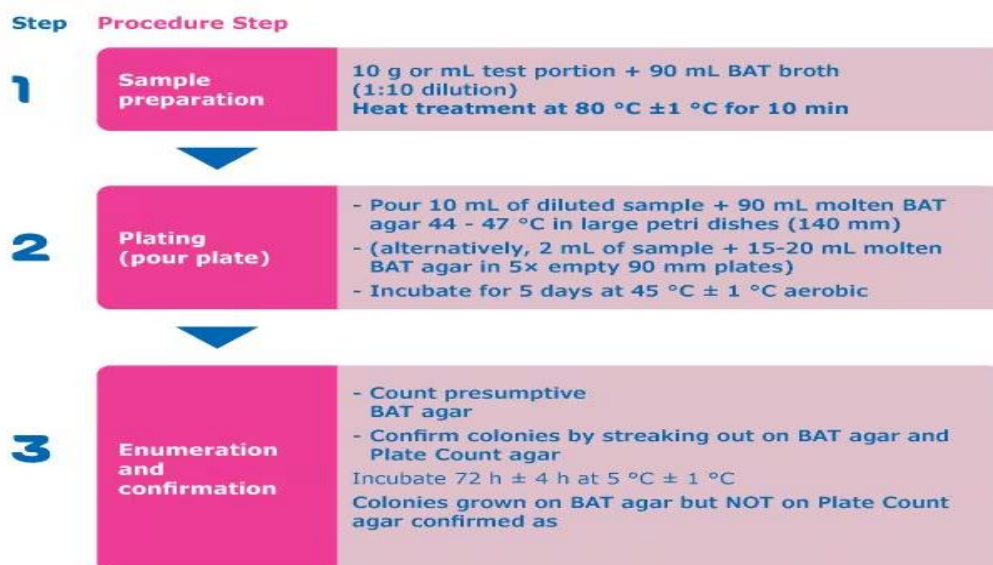
Αυτή η τρίτη έκδοση από το 2019 ακυρώνει και αντικαθιστά τη δεύτερη έκδοση της μεθόδου IFU No. 12: 2007, η οποία έχει αναθεωρηθεί τεχνικά. Οι κύριες αλλαγές που εισήχθησαν στην τρίτη έκδοση, σε σύγκριση με τη μέθοδο IFU No. 12:2007, θεωρούνται σημαντικές. Η μέθοδος IFU αρ. 12 είναι πλέον πιο ακριβής και πιο δομημένη. Περιλαμβάνει βελτιωμένα σκευάσματα μέσω καλλιέργειας και κριτήρια απόδοσης που συμφωνούν με τις διαδικασίες ISO.

Αλλαγές στη μέθοδο IFU No. 12

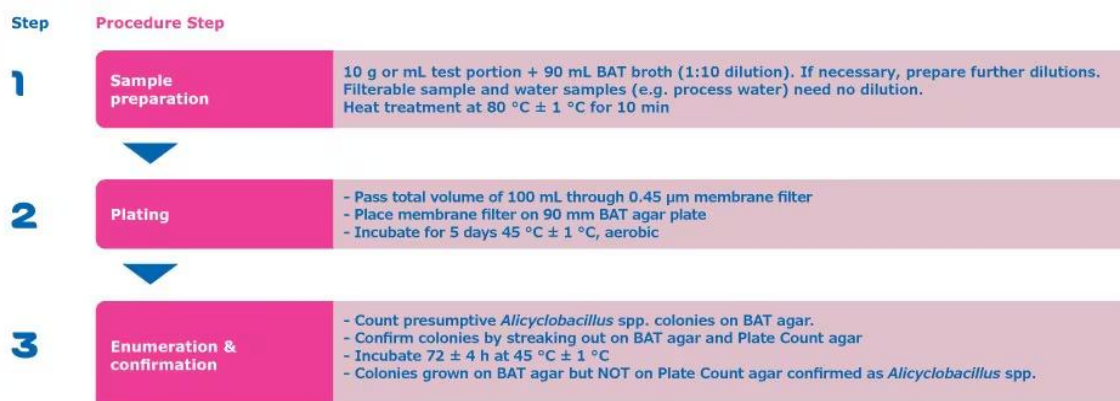
Πραγματοποιήθηκε επικύρωση συμβατή με το ISO στο πλαίσιο της Ομάδας Μικροβιολογικής Εργασίας IFU, διασφαλίζοντας μια φιλική προς τον χρήστη εργαστηριακή εφαρμογή. Οι κύριες αλλαγές, σε σύγκριση με τη μέθοδο IFU αρ. 12:2007, είναι οι εξής:

- Ο τίτλος της μεθόδου αλλάζει σε «Μέθοδος για την ανίχνευση και την απαρίθμηση των θερμοοξίνων βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρια (*Alicyclobacillus*)»
- Η προαιρετική χρήση πολλών μέσων αλλάζει στη χρήση ενός υγρού (ζωμός BAT) και ενός στερεού μέσου (άγαρ BAT)
- Εισάγεται μια νέα μέθοδος έκχυσης για απαρίθμηση σε δείγμα 1 g
- Προστίθεται δοκιμή απόδοσης για τη διασφάλιση ποιότητας των μέσων καλλιέργειας

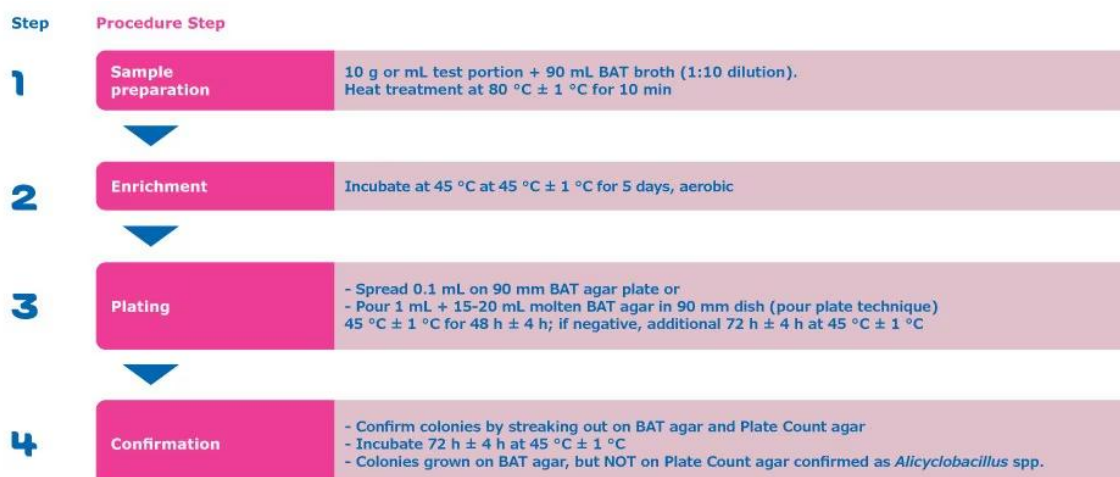
Στο παράρτημα Ε προστέθηκε προαιρετική προεπώαση συσκευασμένων έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων,



Εικόνα 2. Διαδικασία Α: Απευθείας απαρίθμηση αποικιών μέσω τεχνικής ενσωμάτωσης (Pour Plate Technique). New IFU Method No. 12:2019 (Sigma-Aldrich, n.d.)



Εικόνα 3. Διαδικασία Β: Απευθείας απαρίθμηση με τεχνική φιλτραρίσματος (Filtration Technique) IFU Method No. 12:2019 (Sigma-Aldrich, χ.χ.)



Εικόνα 4. Διαδικασία Γ: Ανίχνευση μέσω της μεθόδου εμπλουτισμού (Enrichment). New IFU Method No. 12:201 (Sigma-Aldrich, n.d.)

1.4 Μέθοδοι Αντιμετώπισης *Alicyclobacillus* Στη Βιομηχανία Τροφίμων

Περιπτώσεις αλλοίωσης από *Alicyclobacillus* των παστεριωμένων προϊόντων χυμού φρούτων έχουν αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Προς το παρόν, η πηγή μόλυνσης από χυμούς φρούτων παραμένει ασαφής. Ωστόσο, καθώς τα μέλη του γένους *Alicyclobacillus* είναι μικροοργανισμοί που μεταδίδονται και στο έδαφος, πιστεύεται ότι τα μολυσμένα φρέσκα φρούτα που εισάγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας χωρίς κατάλληλο πλύσιμο οδηγούν σε μόλυνση και επακόλουθη αλλοίωση (Pontius, et al., 1998). Τα σπόρια του *A. acidoterrestris* μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες θερμικής παστερίωσης που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία φρούτων και την παραγωγή χυμού φρούτων απαιτεί το σχεδιασμό εναλλακτικών τεχνικών για τη μείωση της βακτηριακής μόλυνσης (Orr & Beuchat, 2000).

Η χρήση μη συμβατικών προσεγγίσεων για τον έλεγχο των αλικυκλοβακίλλων θα μπορούσε να θεωρηθεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη βιομηχανία χυμών. Ωστόσο, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας αναφέρονται κυρίως σε μεθόδους και μέσα επεξεργασίας που εφαρμόζονται σε επίπεδο εργαστηρίου. Μια μελλοντική στρατηγική θα ήταν η κλιμάκωση όλων αυτών των εργαστηριακών τεχνικών σε βιομηχανικό επίπεδο, προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν οι σχεδιασμένες μέθοδοι θα επιφέρουν σημαντικά αποτελέσματα όταν εφαρμοστούν σε ένα πραγματικό σύστημα επεξεργασίας και παραγωγής τροφίμων (Ciuffreda, et al., 2015). Υπάρχει συνεχής πίεση στη βιομηχανία χυμών να βελτιώσει την ποιότητα των συμπυκνωμένων προϊόντων φρούτων, προκειμένου τα ανασυσταθέντα φρουτοποτά να ανταγωνιστούν τους φρέσκους χυμούς φρούτων. Τα τελευταία χρόνια, οι *Alicyclobacillus* αποτελούν σημαντικό κίνδυνο στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών παγκοσμίως, αφού οι απομονώσεις και οι ταυτοποιήσεις των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών αυτών από τρόφιμα υψηλής οξύτητας είναι πολλές (Steyn, et al., 2011).

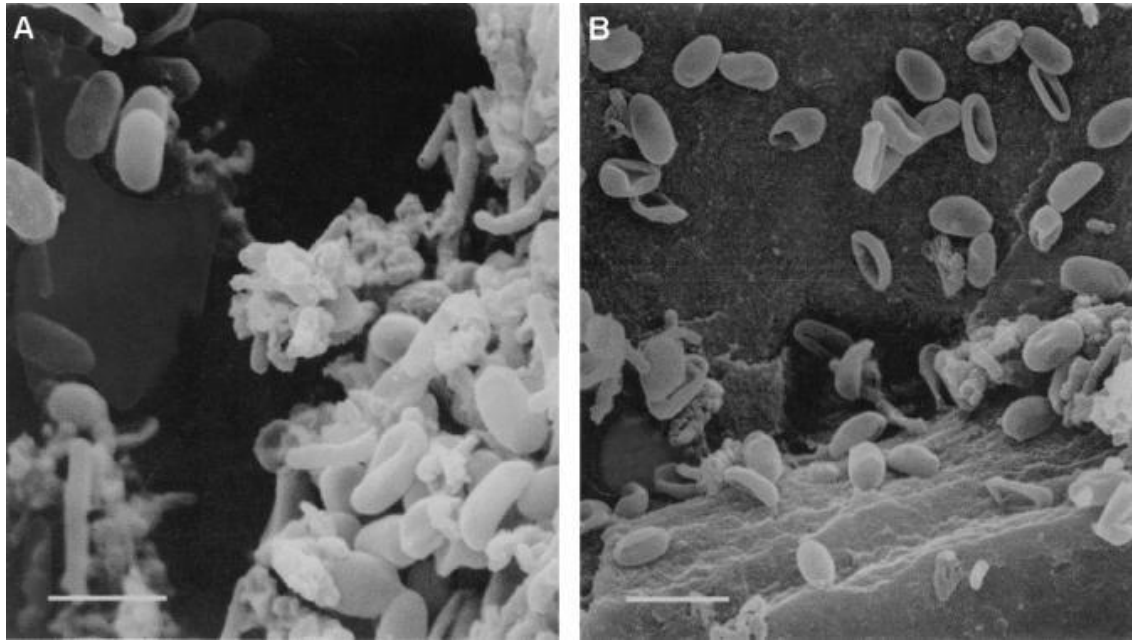
Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η θερμική επεξεργασία θεωρούνταν ο μόνος τρόπος μείωσης του αρχικού αριθμού σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* και πρόληψης της αλλοίωσης των όξινων τροφίμων. Νέες μέθοδοι, ωστόσο, έχουν προταθεί από τη βιβλιογραφία για τον έλεγχο της βλάστησης των σπορίων τόσο σε εργαστηριακά μέσα όσο και στα πραγματικά συστήματα της βιομηχανίας τροφίμων. Παρακάτω ακολουθεί μία βιβλιογραφική ανασκόπηση καινοτόμων προσεγγίσεων για την αναστολή ή ακόμα και για τον έλεγχο της βλάστησης των σπορίων. Τόσο η χρήση κάποιων φυσικών ενώσεων όσο και ορισμένων χημικών ουσιών, συμβατικών (όπως βενζοϊκό νάτριο, οργανικά οξέα και διοξειδίο του χλωρίου) ή μη συμβατικών (διοξειδίο του χλωρίου ως αέριο) φαίνεται πως έχουν θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Τέλος καινοτόμες μέθοδοι, μη θερμικές για τη μείωση του αρχικού αριθμού σπορίων όπως είναι η χρήση υψηλής υδροστατικής πίεσης και η ακτινοβολία φαίνεται πως δρουν ανασταλτικά (Bevilacqua, et al., 2008).

1.4.1 Αντιμετώπιση *Alicyclobacillus* Μέσω θερμικής επεξεργασίας

Οι τυπικές διαδικασίες παστερίωσης που χρησιμοποιούν θερμοκρασίες μεταξύ 85°C και 95 °C, χρησιμοποιούνται συνήθως για την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Escherichia coli* O157:H7 και η σαλμονέλα και δεν είναι αποτελεσματικές έναντι των θερμοανεκτικών βακτηρίων αλλοίωσης που σχηματίζουν σπόρους (Orr & Beuchat, 2000).

Οι τιμές των θερμοκρασιών παστερίωσης που μπορούν να επηρεάσουν τα σπόρια του *Alicyclobacillus* δεν είναι εφικτές καθώς είναι δυνητικά επιβλαβείς για την ποιότητα του προϊόντος, υποβαθμίζοντας τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Τα σπόρια του στελέχους του *A. acidocaldarius* είναι πολύ ανθεκτικά στη θερμότητα και μπορούν εύκολα να επιβιώσουν σε οποιαδήποτε θερμική επεξεργασία που εφαρμόζεται για την παστερίωση των χυμών φρούτων (A Palor, 2000). Η χρήση υψηλών θερμοκρασιών για τη παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων βασίζεται στις καταστροφικές επιπτώσεις που έχει στους μικροοργανισμούς. Με τον όρο υψηλές θερμοκρασίες εννοούνται όλες οι θερμοκρασίες πάνω από αυτή του περιβάλλοντος. Όσον αφορά τη συντήρηση των τροφίμων, υπάρχουν δύο κατηγορίες θερμικής επεξεργασίας: η παστερίωση και η αποστείρωση. Η παστερίωση με τη χρήση θερμότητας συνεπάγεται είτε την καταστροφή όλων των μικροοργανισμών που παράγουν ασθένειες (για παράδειγμα, την παστερίωση του γάλακτος) είτε την καταστροφή ή τη μείωση του αριθμού των οργανισμών που προκαλούν αλλοίωση σε ορισμένα τρόφιμα (Jay, 2000).

Ο συνδυασμός της θερμικής επεξεργασίας με άλλη μέθοδο αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου για την αποτελεσματική μείωση του *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Ένας ακόμη αποτελεσματικός συνδυασμός είναι αυτός της θερμικής επεξεργασίας δειγμάτων και της διήθησης με μεμβράνη σε προϊόντα και σε επιφάνειες εξοπλισμού με σκοπό την ανίχνευση και την απαρίθμηση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Pettipher & Osmundson, 2000). Η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού της επεξεργασίας μέσω υψηλής πίεσης και μέσω θερμικής επεξεργασίας με σκοπό τη μείωση των επιπέδων των σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε παστεριωμένο χυμό μήλου του εμπορίου έχει μελετηθεί. Τα σπόρια του μικροοργανισμού στο χυμό μήλου καταστράφηκαν επιτυχώς μέσω αυτού του συνδυασμού με την χρήση μέσης και υψηλής τιμής θερμοκρασίας (45, 71 ή 90 βαθμούς C).



Εικόνα 5. Φωτογραφίες των σπορίων *A. acidoterrestris* (Lee et al., 2002)

(Α) Σπόρια πριν την επεξεργασία (κοντές ράβδοι).

(Β) Σπόρια που συνθλίβονται και καταστρέφονται με συνδυασμένη επεξεργασία υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας. Τα σπόρια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 207 MPa για 5 λεπτά στους 45°C. Μπάρες = 3,0 μm.

1.4.2 Αντιμετώπιση *Alicyclobacillus* μέσω μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας

Στις μέρες μας, οι πιο συνηθισμένοι τρόποι επεξεργασίας των τροφίμων είναι οι μέθοδοι με βάση τη θερμότητα, οι θερμικές διεργασίες. Ωστόσο, η παραμονή του τροφίμου σε υψηλές τιμές θερμοκρασιών για ορισμένα χρονικά διαστήματα έχει αρνητικές επιπτώσεις τόσο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και στην διατροφική του αξία π.χ. αλλαγές χρώματος, μείωση της γεύσης και του αρώματος και απώλεια βιταμινών (Lynn H. Choi, 2005). Έχουν μελετηθεί νέες μέθοδοι μη θερμικής επεξεργασίας όπως η ομογενοποίηση υπερυψηλής πίεσης (Ultra-High Pressure Homogenization, UHPH) και η ακτινοβολία υπεριώδους φωτός C (Ultraviolet-C Light, UV-C) και προτείνεται ως εναλλακτική λύση επεξεργασίας τροφίμων για την μικροβιολογική τους σταθερότητα (Butz & Tauscher, 2002).

1.4.2.1 Ομογενοποίηση Υπέρ Υψηλής Πίεσης, Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH)

Η ομογενοποίηση υπέρ υψηλής πίεσης (UHPH) είναι μια νέα τεχνολογία με εφαρμογές στην επεξεργασία υγρών τροφίμων. Ενώ η τεχνολογία αυτή βασίζεται σε συμβατικούς ομογενοποιητές, οι βελτιώσεις στον σχεδιασμό και τα υλικά των βαλβίδων επιτρέπουν την επίτευξη πιέσεων έως 400 MPa. Τα οφέλη του UHPH περιλαμβάνουν την αύξηση της διάρκειας ζωής του τροφίμου μέσω της αδρανοποίησης των μικροοργανισμών, με ελάχιστες επιπτώσεις στη θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Θεωρείται επίσης ότι οι θερμικές επιδράσεις του UHPH είναι ελάχιστες καθώς το επεξεργασμένο ρευστό φτάνει στη μέγιστη θερμοκρασία του για λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο. Ευρωπαϊκά ερευνητικά προγράμματα υποστήριξαν πρόσφατα τις μελέτες του UHPH για εφαρμογές τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, του φυτικού γάλακτος και των χυμών φρούτων. Μέσω αυτών αξιολογούνται οι επιπτώσεις της μεθόδου UHPH σε μεγάλο αριθμό συστατικών του τροφίμου, με ιδιαίτερη έμφαση στον έλεγχο των ενζύμων. Η UHPH είναι μια βιώσιμη διαδικασία που μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό υγρών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος (αγελάδα, κατσίκια, σόγια, ρύζι και αμύγδαλο), των χυμών φρούτων (πορτοκάλι, μήλο και σταφύλι) και των βιομηχανοποιημένων προϊόντων διατροφής (γιαούρτι και τυρί) ως μια νέα διαδικασία για την παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας ασφαλών και θρεπτικών τροφίμων (Anna Zamora & Guamis, 2015).

Η UHPH είναι μια πολλά υποσχόμενη αναδυόμενη τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων καθώς προσφέρει πολλές ευκαιρίες για την ανάπτυξη νέων σταθερών υγρών τροφίμων με διάρκεια ζωής παρόμοια με αυτή που επιτυγχάνεται με τις συμβατικές θερμικές επεξεργασίες (Butz & Tauscher, 2002). Σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο, το επεξεργασμένο ρευστό ωθείται μέσω της βαλβίδας HP. Η ταχύτητα και η πίεσή του αυξάνονται λόγω της μείωσης του μεγέθους του σωλήνα και στη συνέχεια, στην έξοδο της βαλβίδας, η θερμοκρασία του υγρού αυξάνεται για λίγο για να ψυχθεί ξανά, ενώ η πίεσή του μειώνεται ξαφνικά. Στους μικροοργανισμούς, αυτά τα φυσικά φαινόμενα θα μπορούσαν να αυξήσουν τη διαπερατότητα ή τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας κυτταρικό θάνατο καθιστώντας το τρόφιμο μικροβιακά σταθερό και αυξάνοντας του την διάρκεια ζωής του (Dumay, et al., 2013).

Επιπλέον εκτός από την δράση της στο μικροβιολογικό φορτίο των τροφίμων το υψηλό δυναμικό περιβαλλοντικής βιωσιμότητας του UHPH την κατατάσει ως μια αναδυόμενη τεχνολογία συνδυασμένης αποστείρωσης και ομογενοποίησης που εφαρμόζεται σε υγρά προϊόντα. Η UHPH είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία σε πρώιμο ακόμα στάδιο ανάπτυξης, η οποία έχει τη δυνατότητα να είναι πιο ωφέλιμη για το περιβάλλον, υπό την προϋπόθεση ότι θα σχεδιαστεί κατάλληλα για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα (Smetana et al., 2015).

Αρκετές μελέτες για την εφαρμογή UHPH στη βιομηχανία τροφίμων έχουν γίνει έως και σήμερα, και πολλές από αυτές καταδεικνύουν τη μείωση των μικροβιακών φορτίων σε διαφορετικούς τύπους τροφίμων π.χ. γάλα, διαφορετικοί χυμοί φρούτων και ρυθμιστικά διαλύματα (Poliseli-Scopel, et al., 2012). Ωστόσο, μεταξύ όλων των ειδών των μικροοργανισμών που μπορούν να βρεθούν φυσικά σε τρόφιμα, τα βακτηριακά σπόρια των θετικά κατά Gram⁺ είναι τα πιο ανθεκτικά σε αυτή την τεχνολογία (Thiebaud, et al.,

2003). Λόγω της υψηλής αντοχής των βακτηριακών σπορίων στην UHPH, είναι επίσης απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν υψηλές θερμοκρασίες για την επιτυχή αδρανοποίηση των σπορίων μεσόφιλων στελεχών (Erika Georget, 2014). Οι Bevilacqua, Corbo και Sinigaglia αναφέρουν μείωση $<1 \text{LogCFU/mL}$ των σπορίων *A. acidoterrestris* μετά από μέθοδο με UHPH στα 50 και 170 MPa (Bevilacqua, et al., 2008). Ομοίως, οι Roig-Sagués et al. αναφέρουν την ανάγκη προθέρμανσης δειγμάτων γύρω στους 80°C προκειμένου να επιτευχθούν μειώσεις 5 Log για το *A. acidoterrestris* στα 300 MPa (Roig-Sagués, et al., 2015).

1.4.2.2 Υπεριώδες ακτινοβολία (UV)

Η περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος στο κενό περίπου μεταξύ 380 και 60 νανομέτρων λέγεται υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Διακρίνεται σε τρία είδη ,την υπεριώδης ακτινοβολία τύπου Α (UVA) της οποίας το μήκος κύματος κυμαίνεται μεταξύ 400-320 νανόμετρα (nm), την υπεριώδη ακτινοβολία τύπου Β (UVB με μήκος κύματος 320 – 290 nm και η υπεριώδης ακτινοβολία τύπου C (UVC) με μήκος κύματος 290 – 200 nm (Tchonkouang, et al., 2023).

Η ακτινοβολία UV είναι μία μη θερμική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την απολύμανση του αέρα, του νερού αλλά και των επιφανειών. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ αποτελεσματική για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων σε διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν μετατρέψει την τεχνολογία της υπεριώδους ακτινοβολίας UV ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις συμβατικές θερμικές επεξεργασίες για υγρά τρόφιμα (φρέσκους χυμούς, αναψυκτικά και ποτά) και την παράταση της διάρκειας ζωής των νωπών προϊόντων (Tatiana Koutchma, 2009)

Η τεχνολογία UV είναι εύκολη στη χρήση και στο εύρος μεταξύ 250 και 260 nm είναι θανατηφόρα για τους περισσότερους τύπους μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών, πρωτόζωων, μυκηλιακών μυκήτων, ζυμομυκήτων (Keyser, et al., 2008). Η δράση της μεθόδου αυτής βασίζεται στο γεγονός ότι το υπεριώδες φως απορροφάται από τα νουκλεϊκά τους οξέα. Τα 254 nm είναι το μήκος κύματος με την μέγιστη απορρόφηση. Το φως UV καταστρέφει το RNA ή το DNA όπου περιέχονται οι γενετικές πληροφορίες για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των μικροοργανισμών. Οποιαδήποτε αλλαγή στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών θα εμποδίσει την μεταγραφή και την αντιγραφή του DNA οδηγώντας στο θάνατο (E. Gayán, 2013).

Επιπλέον, η επεξεργασία μέσω της ακτινοβολίας UV είναι ικανή να αδρανοποιήσει και τα βακτηριακά σπόρια (W A M Hijnen, 2006). Ο κύριος περιοριστικός παράγοντας στην μέθοδο UV είναι η χαμηλή ικανότητα διείσδυσης σε υγρά τρόφιμα με υψηλό συντελεστή απορρόφησης που μειώνει την αποτελεσματικότητά του (Koutchma, 2009). Αυτό οφείλεται στην παρουσία χρωματικών ενώσεων, οργανικών διαλυμένων ουσιών και αιωρούμενων ουσιών.

Η επίδραση του υπεριώδους φωτός (UV) στην αδρανοποίηση των σπορίων *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε εμπορικούς παστεριωμένους χυμούς λευκού σταφυλιού και μήλου έχει αποδειχθεί να είναι ικανοποιητική. Η αδρανοποίηση των

σπορίων *A. acidoterrestris* στους χυμούς εξετάστηκε από τους Ayse Handan Baysal και τους συνεργάτες της αξιολογώντας τα αποτελέσματα της έντασης του φωτός UV (1,31, 0,71 και 0,38 mW/cm²) και του χρόνου έκθεσης (0, 3, 5, 7, 10, 12 και 15 λεπτά) σε σταθερό βάθος (0,15 cm). Η καλύτερη μείωση (5,5-log) επιτεύχθηκε στον χυμό σταφυλιού όταν η ένταση UV ήταν 1,31 mW/cm². Ως μη θερμική τεχνολογία, η επεξεργασία UV θα μπορούσε να είναι μια εναλλακτική λύση στη θερμική επεξεργασία για τους χυμούς σταφυλιών ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους συντήρησης για την παστερίωση του χυμού μήλου (Ayse Handan Baysal, et al., 2013).

Μία ακόμα μελέτη αξιολόγησε την επίδραση της ακτινοβολίας UV στη μείωση των σπορίων και στο σχηματισμό βιοφίλμ του *Alicyclobacillus* σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα και καουτσούκ χρησιμοποιώντας βιομηχανοποιημένο χυμό πορτοκαλιού ως μέσο καλλιέργειας. Τα βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus* δημιουργούν σοβαρά προβλήματα ποιότητας για τις βιομηχανίες επεξεργασίας χυμών για αυτό και η αναζήτηση αποτελεσματικών μεθόδων για την αντιμετώπισή τους είναι αναγκαία. Συγκεκριμένα διερευνήθηκαν είδη *Alicyclobacillus* σε διαφορετικές δόσεις UV. Μετά από έκθεση για 20 λεπτά (16,8 kJ/m²) στην υπεριώδη ακτινοβολία UV, τα σπόρια των *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus herbarius* και *Alicyclobacillus cycloheptanicus* μειώθηκαν δραστικά περισσότερο κατά 4 log CFU/mL. Από την άλλη τα σπόρια του *Alicyclobacillus acidocaldarius* αποδείχθηκε πως είναι πιο ευαίσθητα στην UV ακτινοβολία, αφού παρατηρήθηκε μείωση των σπορίων εντός 15 λεπτών (12,6 kJ/m²). Ακόμα παρατηρήθηκαν και μορφολογικές αλλαγές στα σπόρια του *Alicyclobacillus acidoterrestris* μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση στον σχηματισμό βιοφίλμ στις επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα και καουτσούκ μέσω έκθεσης αυτού στην UV ακτινοβολία. Οι υψηλότερες μειώσεις (περίπου 2 log CFU/mL) βρέθηκαν για το είδος *Alicyclobacillus acidocaldarius* μετά από 30 λεπτά (26,2 kJ/m²). Τέλος τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η UV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του σχηματισμού βιοφίλμ και θα μπορούσε να αποτελεί λύση για τον έλεγχο των σπορίων του *Alicyclobacillus* στον βιομηχανοποιημένο χυμό πορτοκαλιού (Prado, et al., 2019).

Είναι σαφές ότι ο συνδυασμός και των δύο παραπάνω τεχνολογιών είναι αποτελεσματικός έναντι στα *Alicyclobacillus*. Και στις δύο αυτές μεθόδους επεξεργασίας, τόσο στην UV όσο και στην UHPH, οι μηχανισμοί της μικροβιακής αδρανοποίησης ενώ είναι διαφορετικοί (φυσική αλλοίωση των κυτταρικών δομών στην περίπτωση της UHPH και βλάβη στο γονιδιωματικό υλικό των μικροοργανισμών στην περίπτωση ακτινοβολία UV), επιφέρουν σημαντικά κερδοφόρα αποτελέσματα για την βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, ο συνδυασμός και των δύο τεχνολογιών έχει συμπληρωματικό αποτέλεσμα επιτρέποντας δράση σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, αυξάνοντας τις δυνατότητες απόκτησης ενός ασφαλέστερου και ανθεκτικού προϊόντος (Reverter-Carrión, et al., 2018).

1.4.3 Αντιμετώπιση *Alicyclobacillus* spp. μέσω προσθήκης πρόσθετων ουσιών

1.4.3.2 Προσθήκη Χημικών Συστατικών

Όπως έχει αναφερθεί, τα φρέσκα φρούτα είναι δυνατόν να μολυνθούν από το έδαφος και κατά την συγκομιδή. Επαρκές πλύσιμο των φρούτων με χημικά απολυμαντικά προκειμένου να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο και ο πληθυσμός των σπορίων στην επιφάνειά τους, αποτελεί μέσο ελέγχου των αλκυκλοβάκιλων στην παραγωγική διαδικασία. Η αποτελεσματικότητα των χημικών απολυμαντικών στη θανάτωση των σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* εξαρτάται από την καταλληλότητά τους να επιτρέπουν την βλάστηση και την ανάπτυξη των σπορίων κάτω από ευνοϊκές συνθήκες. Έχει βρεθεί πως η επεξεργασία με 500 ppm χλώριο ή 1.200 ppm διαλυμάτων οξινισμένου χλωριώδους νατρίου (Acidified Sodium Chlorite (ASC)) για 1 λεπτό μειώνει σημαντικά τον αριθμό των βιώσιμων σπορίων, αλλά οι μειώσεις ήταν μικρότερες από ένα λογάριθμο. Η προσθήκη φωσφορικού τρινατρίου (Trisodium Phosphate) 8% δεν μείωσε σημαντικά τον αριθμό των βιώσιμων σπορίων. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 (2%) ήταν αναποτελεσματικό στη θανάτωση των σπορίων που απομένουν στην επιφάνεια του μήλου μετά το πλύσιμο (RV Orr & Beuchat, 2000).

Η επεξεργασία με 268 ppm χλωριούχου οξέος μείωσε απότομα τον αριθμό των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε εργαστηριακά μέσα. Οι αριθμοί σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* μειώθηκαν σημαντικά κατά περίπου 5 log μετά από 10 λεπτά επεξεργασίας σε τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες μήλων («Red Delicious», «Golden Delicious», «Gala» και «Fuji»). Δεν υπήρξε συνεργική επίδραση στη μείωση των σπορίων όταν η επεξεργασία με χλωριούχο οξύ συνδυάστηκε με θερμότητα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το χλωριούχο οξύ είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι των σπορίων του *A. acidoterrestris* στις επιφάνειες των μήλων. Το χλωριούχο οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό απολυμαντικό του χλωρίου για τον έλεγχο μόλυνσης από *A. acidoterrestris* σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας χυμού (S-Y Lee, et al., 2010).

Οι Lee και οι συνεργάτες του αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα του διοξειδίου του χλωρίου για τη μείωση του αριθμού των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε εργαστηριακά μέσα, σε μήλα. Τα σπόρια *A. acidoterrestris* σε υδατικό εναιώρημα και στις επιφάνειες μήλων τεσσάρων διαφορετικών ποικιλιών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αρκετές συγκεντρώσεις διοξειδίου του χλωρίου. Ο αριθμός των σπορίων μειώθηκε κατά $>4,8$ log με 120 ppm ελεύθερο διοξείδιο του χλωρίου μετά από επεξεργασία μόνο 1 λεπτού. Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών μήλων ($P>0,05$) στη μείωση των σπορίων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν τη μεγάλη αποτελεσματικότητα του διοξειδίου του χλωρίου στον έλεγχο των σπορίων του *A. acidoterrestris* τόσο σε υδατικό εναιώρημα όσο και στις επιφάνειες μήλων. Αποδείχθηκε όμως πως δεν υπάρχει συνεργική επίδραση στη μείωση των σπορίων όταν μετά την επεξεργασία του υδατικού εναιωρήματος με διοξείδιο του χλωρίου ακολουθήθηκε και θερμότητα (Sun-Young Lee, et al., 2004).

Το 2006 οι Lee και οι συνεργάτες του μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του αερίου διοξειδίου του χλωρίου έναντι των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε επιφάνειες μήλων. Τα σπόρια του *A. acidoterrestris* ενοφθαλμίστηκαν στις επιφάνειες μήλων και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, σε έναν καλά σφραγισμένο θάλαμο που περιείχε ένα φακελάκι παραγωγής διοξειδίου του χλωρίου, χαμηλής, μέσης ή υψηλής απελευθέρωσης, για χρόνο 30 λεπτών, για μία, δύο και τρεις ώρες αντίστοιχα. Μετά το πέρας επτά ημερών αποθήκευσης, δεν υπήρξαν σημαντικές οπτικές διαφορές ποιότητας μεταξύ των μήλων που εκτέθηκαν σε φακελάκι χαμηλής απελευθέρωσης για όλους τους χρόνους έκθεσης. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως, το αέριο διοξείδιο του χλωρίου μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά τα βιώσιμα σπόρια *A. acidoterrestris* στις επιφάνειες των μήλων. Λόγω της αποτελεσματικότητας και της εύκολης χρήσης, τα φακελάκια αερίου διοξειδίου του χλωρίου μπορεί να είναι χρήσιμα για τη διατήρηση της ποιότητας των μήλων κατά την αποθήκευση και την διανομή τους (Sun-Young Lee, et al., 2006).

Το ηλεκτρολυμένο νερό (EW) φαίνεται να είναι ένας νέος τύπος καθαριστικού και απολυμαντικού παράγοντα. Λαμβάνεται μέσω ηλεκτρόλυσης με αραιό διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Έχει χαμηλό κόστος και είναι φιλοπεριβαλλοντικό. Το EW είναι ένας ισχυρός πολυλειτουργικός αντιβακτηριακός παράγοντας με ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ιατρική, τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων (Bo-Kai Chen, 2022). Μία άλλη μελέτη εξέτασε την αποτελεσματικότητα του ουδέτερου ηλεκτρολυμένου νερού (Neutral electrolyzed water (NEW)) στη μείωση του αριθμού των σπορίων *A. acidoterrestris* σε υδατικό εναιώρημα και σε μήλα εμβολιασμένα στην επιφάνεια. Η αποτελεσματικότητά του συγκρίθηκε με εκείνη των διαλυμάτων υποχλωριώδους νατρίου σε συγκεντρώσεις ελεύθερου χλωρίου 50 και 200 mg/L. Αποδείχθηκε πως το ουδέτερο ηλεκτρολυμένο νερό είναι τρεις έως και περισσότερο από δέκα φορές πιο αποτελεσματικό από το υποχλωριώδες νάτριο στη μείωση της βιωσιμότητας των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε υδατικό εναιώρημα και σε επιφάνειες μήλων. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι το ουδέτερο ηλεκτρολυμένο νερό μπορεί να θεωρηθεί ως αποτελεσματικό απολυμαντικό για τον έλεγχο του *A. acidoterrestris* στα φρούτα (Torlak, 2014).

1.4.3.2 Προσθήκη φυσικών συστατικών

Η μικροβιακή δραστηριότητα είναι ένας πρωταρχικός τρόπος αλλοίωσης πολλών τροφίμων και συχνά ευθύνεται για την απώλεια ποιότητας και ασφάλειας. Η ανησυχία για τους παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα αυξάνεται λόγω της αύξησης των κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών και τις αυξανόμενες απαιτήσεις για πιο ασφαλή και μακράς διάρκειας προϊόντα.

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση φυσικών αντιβακτηριακών ενώσεων, όπως εκχυλίσματα βοτάνων και μπαχαρικών για τη συντήρηση των τροφίμων, καθώς έχουν μια χαρακτηριστική γεύση και μερικές φορές εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση καθώς και αντιμικροβιακή δράση. Εκτός από την ανάγκη παραγωγής ασφαλών προϊόντων για τους καταναλωτές, η δυτική κοινωνία φαίνεται να βιώνει μια τάση «πράσινου» καταναλωτισμού, επιθυμώντας λιγότερα συνθετικά πρόσθετα τροφίμων και προϊόντα με μικρότερες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Επομένως, η βιομηχανία τροφίμων

απαιτεί νέες μεθόδους παρασκευής ασφαλών τροφίμων, τα οποία έχουν την εικόνα των φυσικών προϊόντων.

Μια λύση θα μπορούσε να αποτελεί η χρήση αιθέριων ελαίων ως αντιβακτηριακών. Για αιώνες, πολλά αυτόχθονα φυτά χρησιμοποιούνταν στη βοτανοθεραπεία για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Cowan, 1999). Πρόσφατα, το ενδιαφέρον για την παραδοσιακή ιατρική ως εναλλακτική μορφή υγειονομικής περίθαλψης και η ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα διαθέσιμα αντιβιοτικά έχουν οδηγήσει πολλούς συγγραφείς να διερευνήσουν την αντιμικροβιακή δράση των φαρμακευτικών φυτών (Srinivasan, et al., 2001).

Οι κύριες φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις είναι αιθέρια έλαια που προέρχονται από φυτά (π.χ. βασιλικός, θυμάρι, ρίγανη, κανέλα, γαρύφαλλο και δεντρολίβανο), ένζυμα που λαμβάνονται από ζωικές πηγές (π. οργανικά οξέα (π.χ. σορβικό, προπιονικό, κιτρικό οξύ) και φυσικώς απαντώμενα πολυμερή (χιτοζάνη) (Jumana Mahmud, 2018). Τα μπαχαρικά και τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά πρόσθετα τροφίμων που δρουν και ως βελτιωτικά και ως συντηρητικά. Μια ποικιλία φυτικών και μπαχαρικών με βάση τα αντιμικροβιακά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξάλειψη των τροφιμογενών παθογόνων όπως η *Salmonella*, ο *Staphylococcus aureus*, η *Listeria monocytogenes*, ο *Bacillus cereus*, η *Escherichia coli*, και για την αύξηση της συνολικής ποιότητας των τροφίμων (Burt, 2004). Οι μελέτες των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων αποδεικνύουν ότι τα θετικά κατά Gram⁺ βακτήρια είναι πιο ευάλωτα από τα αρνητικά κατά Gram⁻ βακτήρια (Naseer Ahmed, et al., 2013)

Έχουν απομονωθεί πολλές ενώσεις φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων προκρινόμενου να μελετηθούν. Ειδικότερα έχουν μελετηθεί οι αντιμικροβιακές ενώσεις χιλιάδων φυτών και συστατικών. Τα αντιμικροβιακά φυτικής προέλευσης που προέρχονται από το εμπόριο παράγονται συνήθως με μεθόδους SD (απόσταξη ατμού) και HD (υδροαπόσταξη) και εναλλακτικές μεθόδους όπως SFE (εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού) από αρωματικά και πτητικά ελαιώδη υγρά από διάφορα τμήματα των φυτών και των βλασταριών τους. Η πιο κοινή πηγή αιθέριων ελαίων είναι η ρίγανη, το γαρύφαλλο, η κανέλα, το κιτράλ, το σκόρδο, ο κόλιανδρος, το δεντρολίβανο, ο μαϊντανός, το λεμονόχορτο, το φασκόμηλο και η βανιλίνη που χρησιμεύουν ως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές ενώσεις και χρησιμοποιούνται ευρέως ακόμα και σε υλικά συσκευασίας για την πρόληψη της επιφανειακής ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τρόφιμα (Jumana Mahmud, 2018).

Παρ' όλα αυτά απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις, ώστε να ,σε σχέση με την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) in vitro. Τα αιθέρια έλαια περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό συστατικών και είναι πιθανό ο τρόπος δράσης τους να περιλαμβάνει αρκετούς στόχους στο βακτηριακό κύτταρο. Τα αιθέρια έλαια εξαιτίας της υδροφοβικότητάς τους κατανέμονται στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και των μιτοχονδρίων, καθιστώντας τα διαπερατά και οδηγώντας σε λύση των κυττάρων. Αύξηση της δράσης των αιθέριων ελαίων έχει παρατηρηθεί σε περιβάλλοντα με χαμηλότερες τιμές pH, θερμοκρασίας και επίπεδων οξυγόνου. Έχει παρατηρηθεί συνέργεια μεταξύ της καρβακρόλης και της πρόδρομης ουσίας της ρ-κυμένης και μεταξύ της κινναμάλδεϋδης και της ευγενόλης. Έχει επίσης παρατηρηθεί συνέργεια μεταξύ συστατικών αιθέριων ελαίων και ήπιων μεθόδων συντήρησης. Οι ανεπιθύμητες

οργανοληπτικές επιδράσεις μπορούν να περιοριστούν με την κατάλληλη επιλογή αιθέριου ελαίου ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου (Burt, 2004).

Η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα, ορισμένων φυσικών ενώσεων (κινναμαλδεΐδη, ευγενόλη, λιμονένιο) και βενζοϊκού νατρίου έναντι δύο στελεχών *Alicyclobacillus acidoterrestris*, εξετάστηκε και από τους Bevilacqua et al. . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το λιμονένιο δεν ήταν αποτελεσματικό στην αναστολή της ανάπτυξης των спорίων του *A. acidoterrestris*. Αντίθετα η ποσότητα των 100 ppm κινναμαλδεΐδης ή βενζοϊκού νατρίου είναι ικανή να επιβράδυνει τη βλάστηση των спорίων, ενώ 500 ppm ευγενόλης αναστείλει την ανάπτυξη μικροβιακών στόχων για 13 ημέρες. Τέλος η κινναμαλδεΐδη έχει αποδειχθεί πως είναι πιο αποτελεσματική ένωση στην αδρανοποίηση των спорίων του *A. acidoterrestris* (Bevilacqua, et al., 2008).

Το βενζοϊκό νάτριο και το σορβικό κάλιο είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χημικές ενώσεις στην βιομηχανία τροφίμων εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης τους στην ανάπτυξη μικροοργανισμών και κατ' επέκταση στην μικροβιακή σταθερότητα των προϊόντων. Τόσο οι δύο ενώσεις αυτές όσο και το αιθέριο έλαιο λεμονιού ως φυσική ένωση, έχει αποδειχθεί πως δρουν ανασταλτικά στο στελέχος *A. acidoterrestris*. Τα αποτελέσματα επεσήμαναν ότι το βενζοϊκό νάτριο (500-1000-2000 ppm) και το αιθέριο έλαιο λεμονιού (0,08-0,12-0,16%) ανέστειλαν πλήρως τη βλάστηση των спорίων *A. acidoterrestris*. Το σορβικό κάλιο (600-1200 ppm) ήταν πιο αποτελεσματικό για την αναστολή της ανάπτυξης του μικροβιακού στόχου. Η επίδραση του βενζοϊκού νατρίου, του σορβικού καλίου και του αιθέριου ελαίου φαίνεται να μην επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των спорίων (Maldonado et al., 2014). Η ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* (βλαστικά κύτταρα ή σπόρια) σε χυμό πορτοκαλιού και μήλου παρεμποδίστηκε από βενζοϊκό οξύ (150 mg/L), σορβικό (300 mg/L) ή (sic) (Pettipher & Osmundson, 2000).

Ο *Alicyclobacillus acidoterrestris* μπορεί να επιβιώσει στη διαδικασία παστερίωσης, να πολλαπλασιαστεί σε παστεριωμένους χυμούς και να παράγει γουαϊακόλη που προκαλεί φαρμακευτικές ή αντισηπτικές δυσάρεστες γεύσεις. Τα χημικά συντηρητικά είναι ικανά να καταστέλλουν την ανάπτυξη των επιζώντων πληθυσμών κατά τη διάρκεια της επακόλουθης αποθήκευσης των χυμών φρούτων. Οι Rui Cai και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις επιμέρους επιδράσεις του σορβικού καλίου, του βενζοϊκού νατρίου, του μεταδιθειώδους καλίου, του δεϋδροοξικού οξέος, του 4-υδροξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα, του κινναμωμικού οξέος και της ε-πολυλυσίνης στην ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* και στην παραγωγή γουαϊακόλης αξιολογώντας αυτά σε εργαστηριακό μέσο. Από τα επτά συντηρητικά που ερευνήθηκαν, μόνο το δεϋδροοξικό οξύ, το κινναμωμικό οξύ και η ε-πολυλυσίνη ήταν αποτελεσματικά τόσο στον έλεγχο της ανάπτυξης όσο και στον σχηματισμό γουαϊακόλης από το *A. acidoterrestris*. Στη συνέχεια, αυτά τα τρία αντιμικροβιακά συστατικά εφαρμόστηκαν στο χυμό μήλου. Μέσω της προσθήκης 270 mg L⁻¹ αφυδροοξικού οξέος, 108 mg L⁻¹ κινναμωμικού οξέος ή 100 mg L⁻¹ ε-πολυλυσίνης, οι μετρήσεις του *A. acidoterrestris* μειώθηκαν κατά 3,43, 3,17 και 4,78 log μονάδα σχηματισμού αποικίας (CFU)/mL, αντίστοιχα, , και δεν ανιχνεύθηκε γουαϊακόλη μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η προσθήκη αυτών των τριών συντηρητικών δεν επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του χυμού μήλου (Rui Cai et al., 2015).

Έκτός από τα αιθέρια έλαια και άλλες φυσικές ενώσεις είναι ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris*. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί πως οι χυμοί με μείγμα ροδιού ή και ροδιού-μήλου θα μπορούσαν να αναστείλουν την ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων και των σπορίων του *A. acidoterrestris* (Celenk Molva & Ayse Handan Baysal, 2015). Επιπλέον και ο χυμός κόκκινου σταφυλιού φαίνεται να δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη οξεόφιλων μικροοργανισμών (Splittstoesser F. et al., 1994). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις αυτό παρατηρείται εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων που ως γνωστό έχουν αντιμικροβιακή δράση.

1.4.4 Αντιμετώπιση *Alicyclobacillus* μέσω προσθήκης βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν αντιμικροβιακές ουσίες, που μπορούν να οριστούν ως ριβοσωματικά συντιθέμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια ή πρωτεΐνες, τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν μετα-μεταφραστικά ή όχι. Οι βακτηριοσίνες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Η μία κατηγορία περιλαμβάνει τα πεπτίδια που υφίστανται εκτεταμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση (παραδειγματικά από τα λαντιβιοτικά νισίνη και λακτικίνη 3147), ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις παιδοκίνες π.χ. εντεροκίνη A και τις βακτηριοσίνες δύο πεπτιδίων π.χ. εντεροκίνη L50 και τις κυκλικές βακτηριοσίνες. Οι τελευταίες είναι μοναδικές γιατί το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο τους συνδέονται με έναν πεπτιδικό δεσμό. Η πρώτη κυκλική βακτηριοκίνη που χαρακτηρίστηκε ήταν η εντεροκίνη AS-48 από *Enterococcus faecalis* (Burgos, et al., 2014).

Οι βακτηριοσίνες μπορούν να βρεθούν φυσικά σε τρόφιμα όπου αναπτύσσονται τα βακτήρια παραγωγής, π.χ. σε φυσικές ζυμώσεις ή ακόμα και σε μολυσμένα και αλλοιωμένα τρόφιμα. Μια πληθώρα βακτηριοκινών που απελευθερώνονται από βακτήρια στα τρόφιμα κι έχουν μελετηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, είναι για παράδειγμα η νισίνη, οι πεδιοκίνες, οι λακτιξίνες, οι λακτοκοκίνες, οι λευκονοκίνες, οι πλανταρικίνες, οι εντεροκίνες, οι καρνοβακτηριοσίνες και άλλες. Πολλές από αυτές έχουν μελετηθεί και έχουν δοκιμαστεί σε συστήματα τροφίμων ως βιοσυντηρητικά έναντι της αλλοίωσης των τροφίμων και των παθογόνων βακτηρίων. Ως βιοσυντηρητικά, οι βακτηριοσίνες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλους συντηρητικούς παράγοντες. Το παράδειγμα των βακτηριοσινών είναι η νισίνη, η οποία είναι εγκεκριμένη ως φυσικό συντηρητικό τροφίμων και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο (Burgos, et al., 2014).

1.4.4.1 Ανασταλτική δράση της εντεροκίνης κατά των *Alicyclobacillus*

Η Enterocin AS-48 είναι μια κυκλική βακτηριοσίνη που παράγεται από τον *Enterococcus*. Περιέχει μια αλυσίδα 70 υπολειμμάτων αμινοξέων που κυκλώνεται από έναν πεπτιδικό δεσμό κεφαλής-ουράς. Η διαμόρφωση της εντεροκίνης AS-48 διατάσσεται σε πέντε άλφα-έλικες με συμπαγή σφαιρική δομή. Το Enterocin AS-48 έχει ένα ευρύ ανασταλτικό φάσμα στα θετικά κατά Gram βακτήρια. Η ευαισθησία των

αρνητικών κατά Gram⁻ βακτηρίων αυξάνεται σε συνδυασμό με μεθόδους που αυξάνουν την διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στη βακτηριοκίνη. Αυτό το κατιονικό πεπτίδιο εισάγεται στις βακτηριακές μεμβράνες και προκαλεί διαπερατότητα της μεμβράνης, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Burgos et al., 2014) .

Η Enterocin AS-48 μπορεί να καθαριστεί σε δύο στάδια ή να παρασκευαστεί ως λυοφιλοποιημένη σκόνη από καλλιέργειες σε υποστρώματα με βάση τον ορό γάλακτος. Οι πιθανές εφαρμογές της εντεροκίνης AS-48 ως βιοσυντηρητικού τροφίμων έχουν επιβεβαιωθεί έναντι τροφιμογενών παθογόνων ή/και τοξικογόνων βακτηρίων και βακτηρίων αλλοίωσης. Η αποτελεσματικότητα της εντεροκίνης AS-48 στα τρόφιμα αυξάνεται πολύ σε συνδυασμό με χημικά συντηρητικά, αιθέρια έλαια, φαινολικές ενώσεις και άλλες μεθόδους όπως θερμική επεξεργασία, παλμικά ηλεκτρικά πεδία υψηλής έντασης ή υψηλή υδροστατική πίεση (Burgos et al., 2014).

Οι εντερόκοκκοι που παράγουν εντεροκίνη, μπορεί να έχουν πιθανές εφαρμογές ως βιοσυντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητάς τους να ελέγχουν την ανάπτυξη παθογόνων ή και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Στελέχη που φέρουν πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν την εντεροκίνη αναστείλουν μεγαλύτερο αριθμό στελεχών δεικτών σε σχέση με τα στελέχη που φιλοξενούν ένα μόνο γονίδιο (Mayara Baptistucci Ogaki et al., 2016). Οι Viedma και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η εντεροκίνη AS-48 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συντηρητικό κατά βακτηρίων-στόχων σε λιγότερο όξινα ενεργειακά ποτά (Pilar Martínez Viedma et al., 2009).

Το *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι ένα αλλοιογόνο βακτήριο με πολλές μελέτες να επιβεβαιώνουν την παρουσία του στους χυμούς φρούτων. Η εντεροκίνη AS-48 του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* A-48-32 είναι δραστική έναντι των αλλικυκλοβάκιλων. Ειδικότερα έχει βρεθεί πως η εντεροκίνη AS-48 είναι δραστική έναντι του *A. acidocaldarius* και τριών στελεχών του *A. acidoterrestris*. Οι Grande et. al. εξέτασαν την δράση της εντεροκίνης AS-48, σε φυσικούς χυμούς πορτοκαλιού και μήλου, έναντι του στελέχους *A. acidoterrestris* DSMZ 2.498. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C, τα κύτταρα του *A. acidoterrestris* DSMZ 2.498 απενεργοποιήθηκαν από την εντεροκίνη AS-48 (2,5 µg/ml) και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στις επόμενες 14 ημέρες. Σε εμπορικούς χυμούς φρούτων που προστέθηκαν AS-48 (2,5 microg/ml) και εμβολιάστηκαν με βλαστικά κύτταρα ή με ενδοσπόρια του στελέχους *A. acidoterrestris* DSMZ 2.498, δεν ανιχνεύθηκαν βιώσιμα κύτταρα κατά τη διάρκεια 90 ημερών επώασης σε θερμοκρασίες 37 °C, 15 °C ή 4°C. Εκτός από τους χυμούς μήλου, ροδάκινου και γκρέιπφρουτ που εμβολιάστηκαν με κύτταρα και επώαστηκαν στους 37°C τα οποία διατηρήθηκαν αποτελεσματικά έως και 60 ημέρες. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε όλους τους εμπορικούς χυμούς φρούτων που εξετάστηκαν, δεν ανιχνεύθηκαν βιώσιμα κύτταρα ήδη 15 λεπτά μετά την επώαση με τη βακτηριοκίνη. Τα ενδοσπόρια που επώαστηκαν για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (1 λεπτό) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βακτηριοκίνης απενεργοποιήθηκαν με 2,5 µg/ml AS-48. Η εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φυτικών κυττάρων και ενδοσπόρων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με εντεροκίνη AS-48 αποκάλυψε σημαντική κυτταρική βλάβη και βακτηριακή λύση καθώς και αποδιοργάνωση της δομής των ενδοσπορίων (Ma J Grande, et al., 2005).

1.4.4.2 Ανασταλτική δράση της νισίνης κατά των *Alicyclobacillus*

Οι ανασταλτικές επιδράσεις της νισίνης στην ανάπτυξη του θερμοοξέφιλου αλλοιογόνου βακτηρίου *Alicyclobacillus acidoterrestris* έχουν διερευνηθεί από πολλούς επιστήμονες. Αρχικά οι Yamazaki και οι συνεργάτες του σε μελέτη τους το 2000, απέδειξαν πως ο βαθμός της ανασταλτικής δράσης της νισίνης έναντι των βλαστικών κυττάρων ήταν υψηλότερος από εκείνον έναντι των σπορίων. Κατά τον προσδιορισμό των επιδράσεων της νισίνης στη θερμική αντίσταση των σπορίων του *A. acidoterrestris*, η προσθήκη νισίνης συνέβαλε στη μείωση της θερμικής αντίστασης των σπορίων *A. acidoterrestris* στα όξινα ποτά. Επιπλέον, η ανάπτυξη των σπορίων του *A. acidoterrestris* φάνηκε να αναστέλλεται με την προσθήκη 25-50 IU ml⁻¹ νισίνης τόσο σε χυμούς πορτοκαλιού όσο και σε χυμούς με αναμειγμένα φρούτα. Αντίθετα η ανασταλτική δράση δεν αυξήθηκε με την προσθήκη υψηλότερου επιπέδου (600 IU ml⁻¹) σε ένα διαυγές - ρόφημα μήλου. Συμπερασματικά, προκύπτει πως η προσθήκη νισίνης για την πρόληψη της αλλοίωσης που προκαλείται από το *A. acidoterrestris* σε χυμούς φρούτων επιφέρει θετικά αποτελέσματα εκτός από τους διαυγασμένα προϊόντα μήλου (Yamazaki et al., 2000).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η θερμική αντίσταση του *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι υψηλή. Η θερμική επεξεργασία ως μοναδική μέθοδος επεξεργασίας των τροφίμων για την αναστολή του μικροοργανισμού δεν είναι αποτελεσματική. Έχει αποδειχθεί ότι η ευαισθησία στη θερμότητα αυξάνεται με τη μείωση του pH όμως αυτή η επίδραση είναι λιγότερο έντονη σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Komitopoulou et al., 2001).

Αντίθετα, ο συνδυασμός θερμικής επεξεργασίας με φυσικά αντιμικροβιακά (νισίνη, κιτράλη και λιμονένιο) φαίνεται να έχουν υψηλότερη ανασταλτική δράση. Ωστόσο, η νισίνη (1,5 mg L⁻¹) μόνη της ενώ είναι ικανή να μειώσει τον μικροοργανισμό κατά περισσότερους από δύο λογαριθμικούς κύκλους όταν προστέθηκε στο μέσο ανάπτυξης, ακόμη κι αν δεν εφαρμοστεί προηγουμένως θερμική επεξεργασία. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί νισίνης με κιτράλη στο μέσο επώασης, έδειξαν ισχυρότερη συνεργιστική δράση για το *A. acidoterrestris*. Η προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών όπως η νισίνη ή η κιτράλη, τα οποία δεν επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των χυμών, μπορεί να αποτελέσουν μέσο για τον έλεγχο του *A. acidoterrestris* (Huertas et al., 2014). Μία ακόμα συνδυαστική λύση στην αντιμετώπιση των στελεχών του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε χυμούς φρούτων έδωσαν οι Silva et. al. . Απέδειξαν πως η χρήση αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου και ο συνδυασμός του με νισίνη για την πρόληψη του πολλαπλασιασμού του *Alicyclobacillus acidoterrestris* στον χυμό πορτοκαλιού είναι αποτελεσματικός. Οι ελάχιστες ανασταλτικές και βακτηριοκτόνες συγκεντρώσεις (MIC και MBC) για το αιθέριο έλαιο ήταν και οι δύο 125 μg ml⁻¹ ενώ το αιθέριο έλαιο μαζί με την νισίνη εμφάνισαν συνεργική δράση. Η σποριοκτόνος δράση κατά των σπορίων του *A. acidoterrestris* για το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίστηκε ως σποροστατικό, ενώ για τον συνδυασμό του με την νισίνη ως σποριοκτόνο. Με την χρήση μικροσκοπίου επιβεβαιώθηκαν αυτές οι δράσεις εξαιτίας των μορφολογικών αλλαγών που

εντοπίστηκαν στη δομή του μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η χρήση του συνδυασμού αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου και νισίνης μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη του *A. acidoterrestris* στον χυμό πορτοκαλιού (Silva, et al., 2020).

Τόσο η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* όσο και η ευαισθησία του στην νισίνη, όταν αυτή προστεθεί ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη του στους χυμούς φρούτων επιβεβαιώθηκε και από τους Komitopoulou et. al. . Η παρουσία νισίνης κατά τη θέρμανση μείωσε την τιμή D έως και 40% και το MIC για τη νισίνη έναντι των σπορίων στους 25 °C ήταν μόνο 5 Διεθνείς Μονάδες (IU) ml⁻¹. Η βακτηριοκίνηση νισίνη ως συντηρητικό τροφίμων είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος ελέγχου του *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε χυμούς φρούτων και προϊόντα που περιέχουν χυμό φρούτων (Komitopoulou et al., 2001).

Η αντιμικροβιακή δράση της νισίνης μπορεί να αξιοποιηθεί είτε απευθείας από τους παραγωγούς τροφίμων κατά την παραγωγική διαδικασία είτε από τις βιομηχανίες συσκευασιών που προορίζονται για τρόφιμα. Πλέον οι ανάγκες για πιο ασφαλή και από βιοδιασπώμενα υλικά συσκευασίες τροφίμων είναι αυξημένες. Οι Wu et. al. απέδειξαν πως η νισίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό της συσκευασίας τροφίμων προσδίδοντας μακροχρόνια αντιμικροβιακή δράση, προστατεύοντας το προϊόν. Οι αμινομάδες της νισίνης μαζί με τις ομάδες αλδεϋδης των μεμβρανών οξειδωμένης κυτταρίνης δημιούργησαν μια μεμβράνη με νισίνη και φιλμ κυτταρίνης. Η νέα μεμβράνη αποδείχθηκε να έχει μια εξαιρετική διαφανή ιδιότητα άνω του 90% από τα 300 nm έως τα 800 nm και ταυτόχρονα παρεμπόδιση της μεταφοράς οξυγόνου να είναι υψηλή. Η θερμική σταθερότητα της μεμβράνης παρέμεινε εξαιρετική και επέτρεψε την ευκολότερη αποικοδόμηση από την αρχική μεμβράνη κυτταρίνης. Τέλος η νέα αυτή μεμβράνη βρέθηκε να έχει καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922T μακροπρόθεσμα, κατατάσσοντας την ως καλό υλικό συσκευασίας τροφίμων (Hao Wu et al., 2018). . Έτσι η αξιοποίηση της νισίνης ως αντιμικροβιακό συστατικό δρώντας μέσα από την επαφή του τροφίμου με την συσκευασία αποτελεί μία εναλλακτική λύση για την βιομηχανία τροφίμων.

Τέλος οι Song και οι συνεργάτες του μελέτησαν αν η χρήση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (IONPs) σε συνδυασμό με την νισίνη είναι ικανά για να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Alicyclobacillus acidoterrestris* στο χυμό μήλου. Τα αποτελέσματα απέδειξαν πως η μέθοδος είναι πολύ αποτελεσματική στη βιομηχανία χυμού μήλου για τον έλεγχο της ανάπτυξης του *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Song, et al., 2019).

1.5 Ανακεφαλαίωση

Το γένος *Alicyclobacillus* ανήκει στην οικογένεια των *Alicyclobacillaceae*, και αποτελείται από μια ομάδα θερμοόξινων, αυστηρά αερόβιων, ετερότροφων και σποριογόνων βακτηρίων και είναι θετικά κατά Gram+ βακτήρια. Η παρουσία των ω-κυκλοεξυλ ή ω-κυκλοεπτυλ λιπαρών οξέων ως κύρια συστατικά λιπιδίων της μεμβράνης των ειδών του γένους *Alicyclobacillus*. εξηγεί την θερμοανθεκτικότητα τους και την αντίσταση που παρουσιάζουν σε όξινα περιβάλλοντα. Αυτά τα λιπαρά οξέα μπορεί να συμβάλλουν στη θερμική αντίσταση. Τα οξέα αυτά σχηματίζουν μια προστατευτική επικάλυψη με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς. Αυτοί οι υδρόφοβοι δεσμοί μπορούν να σταθεροποιήσουν και να μειώσουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ακραία όξινα και υψηλών θερμοκρασιών περιβάλλοντα.

Τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* μπορεί να υπάρχουν στις επιφάνειες των φρούτων έχοντας μολυνθεί από το έδαφος και κατά την συγκομιδή ή ακόμα και κατά την παραγωγική διαδικασία. Τις περισσότερες φορές η παρουσία τους στους χυμούς φρούτων προδίδεται από μία χαρακτηριστική οσμή που προκαλείται από τον *Alicyclobacillus*. Η μυρωδιά είχε το χαρακτηριστικό φαρμακευτικής ή χημικής οσμής λόγω του σχηματισμού γουαϊακόλης και αλοφαινολών που οδηγεί στην απόρριψη του καταναλωτή. Το *Alicyclobacillus acidoterrestris* έχει ανιχνευθεί τις περισσότερες φορές στους χυμούς των φρούτων εξαιτίας της παραγωγής γουαϊακόλης. Αυτή η βακτηριακή αλλοίωση από τον *Alicyclobacillus acidoterrestris* μπορεί να μην είναι ορατά ανιχνεύσιμη.

Τα χαρακτηριστικά των αλικυκλοβακίλων και η ανίχνευσή τους σε πολλά τρόφιμα οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών μεθόδων απομόνωσης και ταυτοποίησης που βασίζονται στην ανίχνευση κυττάρων (μέθοδοι καλλιέργειας, ELISA, κυτταρομετρία ροής), ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (PCR και 16S rRNA) και μέτρηση των μεταβολιτών τους (HPLC, Electronic nose) είναι κάποιες από αυτές.

Οι τιμές των θερμοκρασιών παστερίωσης που μπορούν να επηρεάσουν τα σπόρια των *Alicyclobacillus* δεν είναι εφικτές καθώς είναι δυνητικά επιβλαβείς για την ποιότητα του προϊόντος, υποβαθμίζοντας τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και την διατροφική του αξία. Παρ' όλα αυτά ο συνδυασμός της θερμικής επεξεργασίας με άλλες μεθόδους αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου θερμικής επεξεργασίας για την αποτελεσματική μείωση του *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Από την άλλη μη θερμικές επεξεργασίες όπως η UHPH και η τεχνολογία της υπεριώδους ακτινοβολίας UV-C φαίνεται να έχουν θετικά αποτελέσματα στην παρεμπόδιση του μικροοργανισμού. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα ή ακόμα να προκαλέσουν και τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Καθιστώντας έτσι το τρόφιμο μικροβιακά σταθερό και αυξάνοντας του την διάρκεια ζωής του.

Η χρήση είτε χημικών είτε φυσικών ενώσεων με αντιβακτηριακή δράση φαίνεται να είναι ένας ακόμη αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης των αλικυκλοβακίλων στην βιομηχανία τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα των χημικών απολυμαντικών στη θανάτωση των σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris* εξαρτάται από την

καταλληλολόγητά τους να επιτρέπουν την βλάστηση και την ανάπτυξη των σπορίων κάτω από ευνοϊκές συνθήκες. Από την άλλη, η χρήση φυσικών αντιβακτηριακών ενώσεων, όπως τα εκχυλίσματα βοτάνων και των μπαχαρικών για τη συντήρηση των τροφίμων, εμφανίζουν αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Ενώ ταυτόχρονα μπορούν να βελτιώνουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων προσδίδοντάς τους άρωμα και γεύση.

Μία ακόμη μέθοδος αντιμετώπισης των αλικυκλοβάκιλων φαίνεται να είναι οι βακτηριοσίνες καθώς αποτελούν αντιμικροβιακές ενώσεις. Ως βιοσυντηρητικά, οι βακτηριοσίνες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλους συντηρητικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η εντεροκίνη AS-48 του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* A-48-32 είναι δραστική έναντι των αλικυκλοβάκιλων. Επιπρόσθετα και οι ανασταλτικές επιδράσεις της νισίνης στην ανάπτυξη του θερμοοξεόφιλου αλλοιογόνου βακτηρίου *Alicyclobacillus acidoterrestris* έχουν αποδειχθεί.

Τέλος, όλες οι παραπάνω μέθοδοι μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά ενάντια των ειδών του γένους *Alicyclobacillus* και ειδικότερα του *Alicyclobacillus acidoterrestris*, που απασχολεί περισσότερο την βιομηχανία τροφίμων τα τελευταία χρόνια, όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με άλλες μεθόδους. Τις περισσότερες φορές φαίνεται η θερμική επεξεργασία να αποτελεί μέρος του συνδυασμού. Η αποτελεσματική αντιμετώπιση αυτών των αλλοιογόνων μικροοργανισμών θα επιφέρει σημαντική μείωση των οικονομικών απωλειών των βιομηχανιών τροφίμων και ποτών.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αποσκοπεί στο να συλλεχθούν δεδομένα από την βιβλιογραφία σχετικά με τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* και πως αυτά σχετίζονται με την βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Ειδικότερα σκοπός της εργασίας αυτής είναι να εξετάσει τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών αυτών και το πως αυτά συμβάλλουν στην αλλοίωση των τροφίμων. Επίσης επιδιώκεται η κατανόηση των ειδών *Alicyclobacillus* και ειδικότερα του *Alicyclobacillus acidoterrestris* στην βιομηχανία χυμών φρούτων. Τέλος, η διατριβή αυτή στοχεύει στην ανάλυση αποτελεσμάτων επιστημονικών μελετών προκειμένου να παρουσιαστούν οι μέθοδοι ανίχνευσης των *Alicyclobacillus* spp. και οι μέθοδοι αντιμετώπισης τους στην βιομηχανία τροφίμων, στα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή πληροφοριών

Η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από τις βάσεις δεδομένων SCOPUS, PUBMED και google Scholar από δημοσιευμένα επιστημονικά άρθρα σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά. Η εύρεση των άρθρων έγινε με βάση των παρακάτω λέξεων κλειδιά: *Alicyclobacillus* , *Alicyclobacillus acidoterrestris*, ω-fatty acids, guaiacol production, control, detection, fruits juices, spoilage, identification, nisin, apple juice, thermos-acidophilic bacteria. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αφορούν: γενικά χαρακτηριστικά ειδών του γένους *Alicyclobacillus* , χαρακτηριστικά του *Alicyclobacillus acidoterrestris*, απομονώσεις ειδών από τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης, μεθόδους αντιμετώπισης έναντι βλαστικών μορφών και σπορίων.

3.2 Πίνακες δεδομένων- Ανάλυση Δεδομένων

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία έγινε σύνθεση όλων των δεδομένων που συλλέχθηκαν τόσο για την ανίχνευση ειδών *Alicyclobacillus* σε τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης όσο για αποτελεσματικές μεθόδους μείωσης ή και αναστολή της ανάπτυξής τους σε αυτά. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν σε συγκεντρωτικούς πίνακες για την καλύτερη ανάλυσή τους. Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν ποικίλουν και αποδεικνύουν πως τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στην βιομηχανία τροφίμων με την επιστημονική κοινότητα να ψάχνει να βρει τις πιο αποδοτικές λύσεις.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Απομονώσεις ειδών του *Alicyclobacillus* από τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης και λοιπά περιβάλλοντα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή από την βιβλιογραφία που μελετήθηκε προκύπτει πως τα είδη του γένους *Alicyclobacillus* όντας θερμοανθεκτικοί και οξεοανθεκτικοί και σποριογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώνουν σε περιβάλλοντα κάτω από αντίξοες συνθήκες. Τα σπόρια τους ικανά να βλαστάνουν όταν οι συνθήκες γίνονται και πάλι ευνοϊκές προκαλώντας αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Ειδικότερα οι αλικυκλοβάκιλοι απασχολούν περισσότερο την βιομηχανία τροφίμων εξαιτίας των χαρακτηριστικών τους. Ικανοί να επιζούν κάτω και από τις συνθήκες εμπορικής παστερίωσης αναπτύσσονται και αλλοιώνουν τους χυμούς φρούτων.

Πράγματι, οι περισσότερες απομονώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν τα διάφορα είδη των *Alicyclobacillus* από χυμούς φρούτων ,φρούτα, έδαφος καλλιεργούμενων φρούτων και περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα στους χυμούς φρούτων περιλαμβάνονται ο χυμός αχλαδιού, χυμός άσπρου σταφυλιού, χυμός πορτοκαλιού, χυμός μήλου, χυμός ροδάκινου, χυμός ακτινιδίου, χυμός αλόης. Ακόμα έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία τους σε ανάμεικτο χυμό φρούτων αλλοιωμένο και μη.

Αρχικό όμως πρόβλημα για την βιομηχανία χυμών θα μπορούσε να θεωρηθεί η παραλαβή πρώτων υλών, φρέσκων φρούτων, απαλλαγμένο από τους αλικυκλοβάκιλους. Με βάση τις αναφορές για απομονώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί πως οι αλικυκλοβάκιλοι απαντώνται και στο έδαφος καλλιεργειών (χώμα από οπωρώνα μήλων, οπωρώνα αχλαδιών) και στην επιφάνεια των φρούτων (μήλα, αχλάδια) και στο φύλλωμα (φύλλωμα από μηλιές). Παρατηρείται δηλαδή μία πιθανή επιμόλυνση ήδη από τον πρωτογενή τομέα παραγωγής. Ακόμα και ο αέρας θαλάμου αποθήκευσης φρούτων μπορεί να φέρει μικροβιακό φορτίο. Έτσι οι λόγοι διερεύνησης τόσο των περιβαλλόντων επιβίωσης όσο και των συνθηκών μπορούν να δώσουν λύσεις για την αντιμετώπιση αυτών των μικροοργανισμών.

Αναλύοντας τα δεδομένα, προκύπτει πως οι περισσότερες απομονώσεις που έχουν γίνει από χυμούς φρούτων αφορούν τους *A. acidocaldarius* και *A. acidoterrestris*. Το *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι το είδος που έχει ενοχοποιηθεί κυρίως για την αλλοίωση των χυμών φρούτων. Η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε εύρη υψηλών θερμοκρασιών και εύρη χαμηλών τιμών pH το καθιστούν το πλέον ιδανικό ώστε να επιζήσει κάτω από τις συνθήκες εμπορικής παστερίωσης και να αλλοιώσει χυμούς φρούτων κατά την αποθήκευσή τους. Εκτός από την απομόνωση του από τα τρόφιμα το *Alicyclobacillus acidoterrestris* φαίνεται πως υπάρχει και στις πρώτες ύλες χυμών μήλων. Σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη το *Alicyclobacillus acidoterrestris* επιμολύνει τόσο τις πρώτες ύλες όσο και τους χυμούς φρούτων για αυτό και αποτελεί βασικό κίνδυνο για την βιομηχανία τροφίμων σε αντίθεση με το *A. acidocaldarius* που απαντώνται κυρίως στους χυμούς φρούτων.

Το είδος *A. pomorum* έχει απομονωθεί από χυμό αχλαδιού, χυμό άσπρου σταφυλιού, χυμό μήλου, χυμό αλόης και από φρούτα.

Πίνακας IV. Απομονώσεις ειδών *Alicyclobacillus* από τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης και από λοιπά περιβάλλοντα.

ΕΙΔΟΣ <i>Alicyclobacillus</i>	ΠΗΓΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>A. acidiphilus</i>	Όξινα ποτά	Matsubara, et al. (2002)
<i>A. acidocaldarius</i>	Χώμα, χυμοί φρούτων, σιρόπι	Wisotzkey, et al. (1992)
	Χυμός μήλου, αχλαδιού, άσπρου σταφυλιού	Gobbi, et al. (2010)
	Χυμοί ροδάκινου, πορτοκαλιού, μήλου	Durak MZ, et al. (2010)
	Χυμοί φρούτων	
<i>A. acidoterrestris</i>	Χώμα, όξινα ποτά, χυμοί φρούτων	Wisotzkey J. et al. (1992)
	Χυμοί ακτινιδίου	Zhang, et al. (2013)
	Χυμός μήλου, αχλαδιού, άσπρου σταφυλιού και αλόης	Polaska, et al. (2021)
	Χώμα από οπωρώνα μήλων, μήλα	Gobbi, et al. (2010)
	Χυμοί ροδάκινου, πορτοκαλιού, μήλου	Durak MZ, et al. (2010)
	Χυμοί φρούτων	Nakano, et al. (2015)
	Αλλοιωμένο ανάμεικτο χυμό φρούτων	
<i>A. aeris</i>	Ορυχείο χαλκού	Guo X. , et al. (2009)
<i>A. cellulosilyticus</i>	Τσιπς τυριού τσένταρ	Kusube, et al. (2014)
<i>A. contaminans</i>	Χυμοί φρούτων	Goto, et al. (2007)
	Χώμα οπωρώνων, φύλλωμα από μηλιές, αέρα οπωρώνων, αέρας χώρου αποθήκευσης μήλων	Wang Y. , et al. (2010)

<i>A. cycloheptanicus</i>	Χώμα	(Wisotzkey J. , et al., 1992)
	Χυμοί φρούτων	(Zhang, et al., 2013)
<i>A. dauci</i>	Αλλοιωμένος χυμός φρούτων	(Nakano, et al., 2015)
<i>A. disulfidooxidans</i>	Λάσπη λυμάτων	(Karavaiko G. , et al., 2005)
<i>A. fastidiosus</i>	Χώμα, όξινα ποτά	(Goto, et al.,2007)
	Αχλάδια, οπωρώνα αχλαδιών	(Połaska, et al., 2021)
	Αλλοιωμένο ανάμεικτο χυμό φρούτων	(Nakano, et al., 2015)
<i>A. ferrooxydans</i>	Έδαφος	(Jiang, et al., 2008)
<i>A. herbarius</i>	Τσάι βοτάνων	(Goto, et al., 2002)
	Χυμοί φρούτων	(Zhang, et al., 2013)
<i>A. hesperidum</i>	Έδαφος	(Albuquerque, et al., 2000)
<i>A. kakegawensis</i>	Χώμα	(Goto, et al.,2007)
<i>A. macrosporangiidus</i>	Όξινα ποτά, περιβάλλον	(Goto, et al.,2007)
<i>A. pomorum</i>	Φρούτα	(Goto , et al., 2003)
	Χυμός μήλου, αχλαδιού, άσπρο σταφυλιού και αλόης	
<i>A. sacchari</i>	Σάκχαρα	(Goto, et al.,2007)
<i>A. sendaiensis</i>	Χώμα	(Tsuruoka, et al., 2003)
<i>A. shizuokaensis</i>	Χώμα	(Goto, et al.,2007)
<i>A. tengchongensis</i>	Χώμα από θερμή πηγή	(Kim, et al., 2014)
<i>A. tolerans</i>	Έδαφος	(Karavaiko G. , et al., 2005)
<i>A. vulcanalis</i>	Γεωθερμική πηγή	(Simbahan, et al., 2004)

4.2 Αποτελεσματικότητα Μεθόδων Αντιμετώπισης

Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την βιβλιογραφική ανασκόπηση, αρκετές μέθοδοι φαίνεται να είναι αποτελεσματικές έναντι των ειδών *Alicyclobacillus* για την αντιμετώπισή τους κατά την παραγωγική διαδικασία χυμών φρούτων. Ωστόσο πολλές από αυτές έχουν δοκιμαστεί μόνο σε εργαστηριακό επίπεδο και όχι σε βιομηχανικό χωρίς αυτό όμως να αναιρεί την αποτελεσματικότητά τους έναντι των ειδών αυτών. Μία τυπική ταξινόμηση των μεθόδων αντιμετώπισης των αλικυκλοβακίλων από τους χυμούς φρούτων τις διαχωρίζει σε θερμικές διεργασίες, μη θερμικές διεργασίες, προσθήκη πρόσθετων είτε φυσικών ενώσεων είτε χημικών ενώσεων καθώς και μέσω της προσθήκης βακτηριοσινών. Καθεμία από αυτές δρα υπό διαφορετικές συνθήκες και ενάντια σε διαφορετικό ή και ίδιο μικροοργανισμό στόχο.

Αρχικά η πιο κοινή μέθοδος για την αντιμετώπιση οποιουδήποτε μικροοργανισμού στόχου στην βιομηχανία τροφίμων είναι η θερμική επεξεργασία του παραγόμενου προϊόντος. Ωστόσο στην περίπτωση των ειδών του γένους *Alicyclobacillus* οι σύνηθες θερμοκρασίες παστερίωσης μεταξύ 85°C και 95 °C βαθμών Κελσίου φαίνεται πως δεν είναι και τόσο αποτελεσματικές. Από την μία, ενώ η χρήση μεγαλύτερων τιμών θερμοκρασιών μπορεί να θανατώσουν τα σπόρια των μικροοργανισμών αυτών, από την άλλη θα επιφέρουν υποβάθμιση τόσο της ποιότητας του τρόφιμου όσο και της διατροφικής του αξίας. Έτσι, ο συνδυασμός της θερμικής επεξεργασίας με άλλη μέθοδο μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της μεθόδου για την αποτελεσματική μείωση των αλικυκλοβάκίλων.

Επιπλέον της θερμικής επεξεργασίας, μέθοδοι μη θερμικής επεξεργασίας έχει αποδειχθεί ότι είναι αρκετά αποτελεσματικοί. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μέθοδοι της ομογενοποίησης υπέρ υψηλής πίεσης (UHPH) και αυτή της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ομογενοποίηση υπέρ υψηλής πίεσης (UHPH) αυξάνει την διάρκεια ζωής του τρόφιμου μέσω της αδρανοποίησης των μικροοργανισμών, με ελάχιστες επιπτώσεις στη θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η UHPH κρίθηκε κατάλληλη για υγρά τρόφιμα όπως αυτά των γαλακτοκομικών προϊόντων, του φυτικού γάλακτος και των χυμών φρούτων. Ωστόσο, λόγω της υψηλής αντοχής των βακτηριακών σπορίων στην UHPH, κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιούνται υψηλές θερμοκρασίες για την επιτυχή αδρανοποίηση των σπορίων μεσόφιλων στελεχών.

Από την άλλη η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται ευρέως για την απολύμανση του αέρα, του νερού αλλά και των επιφανειών. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ αποτελεσματική για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών στην βιομηχανία τροφίμων σε διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας. Αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στις μη θερμικές επεξεργασίες για υγρά τρόφιμα (φρέσκους χυμούς, αναψυκτικά και ποτά) αυξάνοντας την διάρκεια ζωής τους. Επιπλέον, η μέθοδος UV είναι ικανή να αδρανοποιήσει και τα βακτηριακά σπόρια. Η επίδραση του υπεριώδους φωτός (UV) στην αδρανοποίηση των σπορίων *Alicyclobacillus acidoterrestris* σε εμπορικούς παστεριωμένους χυμούς λευκού σταφυλιού και μήλου έχει αποδειχθεί να είναι ικανοποιητική. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση στον σχηματισμού βιοφίλμ στις επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα και

καουτσούκ μέσω έκθεσης αυτού στην UV ακτινοβολία. Τέλος τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η UV μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του σχηματισμού βιοφίλμ και θα μπορούσε να αποτελεί μια μέθοδο για τον έλεγχο των σπορίων των *Alicyclobacillus* στους βιομηχανοποιημένους χυμούς.

Η προσθήκη πρόσθετων αποτελεί μία ακόμα εναλλακτική μέθοδο για την αντιμετώπιση των αλικυκλοβάκιλων στους εμπορικούς χυμούς φρούτων. Τα πρόσθετα αυτά μπορεί να είναι είτε φυσικά συστατικά είτε χημικά και να χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας επιφέροντας επιθυμητό αποτέλεσμα. Η απομάκρυνση των σπορίων των αλικυκλοβάκιλων από τις επιφάνειες των φρούτων πριν την επεξεργασία τους είναι ύψιστης σημασίας η μείωση του μικροβιακού φορτίου της επιφάνειάς τους. Έχει βρεθεί ότι πως η επεξεργασία με 500 ppm χλώριο ή 1.200 ppm διαλυμάτων οξινισμένου χλωριώδους νατρίου για 1 λεπτό μειώνει σημαντικά τον αριθμό των βιώσιμων σπορίων, αλλά οι μειώσεις ήταν μικρότερες από ένα λογάριθμο. Όμοια, και η προσθήκη φωσφορικού τρινατρίου (Trisodium Phosphate) 8% βρέθηκε πως δεν μειώνει σημαντικά τον αριθμό των βιώσιμων σπορίων.

Επιπλέον και το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 (2%) φαίνεται να είναι αναποτελεσματικό στη θανάτωση των σπορίων που απομένουν στις επιφάνειες των μήλων μετά το πλύσιμο. Αντίθετα, η επεξεργασία με 268 ppm χλωριούχου οξέος βρέθηκε να μειώνει απότομα τον αριθμό των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε εργαστηριακά μέσα. Αυτό το καθιστά πολύ αποτελεσματικό έναντι των σπορίων του *A. acidoterrestris* στις επιφάνειες των μήλων. Επιπλέον, το ελεύθερο διοξείδιο του χλωρίου συγκέντρωσης 120 ppm μετά από επεξεργασία μόνο 1 λεπτού μειώνει κατά $>4,8 \log$ τον αριθμό των σπορίων. Αποδείχθηκε όμως πως δεν υπάρχει συνεργική επίδραση στη μείωση των σπορίων όταν μετά την επεξεργασία του υδατικού εναιωρήματος με διοξείδιο του χλωρίου ακολουθείται θερμότητα. Το αερίου διοξειδίου του χλωρίου έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικό έναντι των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε επιφάνειες μήλων. Λόγω της αποτελεσματικότητας και της εύκολης χρήσης, τα φακελάκια αερίου διοξειδίου του χλωρίου μπορεί να είναι χρήσιμα για τη διατήρηση της ποιότητας των μήλων κατά την αποθήκευση και την διανομή τους.

Το ηλεκτρολυμένο νερό (EW) αν και δεν αποτελεί πρόσθετο, λαμβάνεται μέσω ηλεκτρόλυσης με αραιό διάλυμα χλωριούχου νατρίου βρέθηκε να επιφέρει μείωση του αριθμού των σπορίων *A. acidoterrestris* σε υδατικό εναιώρημα και σε μήλα εμβολιασμένα στην επιφάνεια. Συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητά του με εκείνη των διαλυμάτων υποχλωριώδους νατρίου σε συγκεντρώσεις ελεύθερου χλωρίου 50 και 200 mg/L αποδεικνύεται πως το ουδέτερο ηλεκτρολυμένο νερό είναι τρεις έως και περισσότερο από δέκα φορές πιο αποτελεσματικό από το υποχλωριώδες νάτριο στη μείωση της βιωσιμότητας των σπορίων του *A. acidoterrestris* σε υδατικό εναιώρημα και σε επιφάνειες μήλων. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι το ουδέτερο ηλεκτρολυμένο νερό μπορεί να θεωρηθεί ως αποτελεσματικό απολυμαντικό για τον έλεγχο του *A. acidoterrestris* στα φρέσκα φρούτα.

Η χρήση φυσικών αντιβακτηριακών ενώσεων που είναι γνωστά για την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση μπορεί να δώσει λύση στην αντιμετώπιση μικροοργανισμών στόχων στην βιομηχανία τροφίμων. Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως αντιβακτηριακά εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Οι κύριες φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις είναι αιθέρια έλαια που προέρχονται από φυτά (π.χ. βασιλικός, θυμάρι, ρίγανη,

κανέλα, γαρύφαλλο και δεντρολίβανο), ένζυμα που λαμβάνονται από ζωικές πηγές (π. οργανικά οξέα (π.χ. σορβικό, προπιονικό, κιτρικό οξύ) και φυσικώς απαντώμενα πολυμερή (χιτοζάνη) που χρησιμεύουν ως αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές ενώσεις και χρησιμοποιούνται ευρέως ακόμα και σε υλικά συσκευασίας για την πρόληψη της επιφανειακής ανάπτυξης μικροοργανισμών σε τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις, προκειμένου να υπάρξει ικανοποιητικό αποτελέσματα στα τρόφιμα, σε σχέση με την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) *in vitro*. Έχει επίσης παρατηρηθεί συνέργεια μεταξύ συστατικών αιθέριων ελαίων και ήπιων μεθόδων συντήρησης. Οι ανεπιθύμητες οργανοληπτικές επιδράσεις μπορούν να περιοριστούν με την κατάλληλη επιλογή αιθέριου ελαίου ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου.

Η χρήση βακτηριοσινών (εντεροκίνη και νισίνη) αποτελούν μία ακόμη λύση στην αντιμετώπιση των αλικυκλοβάκιων στους χυμούς φρούτων. Οι εντερόκοκκοι που παράγουν εντεροκίνη, μπορεί να έχουν πιθανές εφαρμογές ως βιοσυντηρητικά στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της ικανότητάς τους να ελέγχουν την ανάπτυξη παθογόνων ή και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Είναι δραστική έναντι των αλικυκλοβάκιων και ειδικότερα έναντι του *A. acidocaldarius* και τριών στελεχών του *A. acidoterrestris*. Η αποτελεσματικότητα της εντεροκίνης AS-48 στα τρόφιμα αυξάνεται πολύ σε συνδυασμό με χημικά συντηρητικά, αιθέρια έλαια, φαινολικές ενώσεις και άλλες μεθόδους όπως θερμική επεξεργασία, παλμικά ηλεκτρικά πεδία υψηλής έντασης ή υψηλή υδροστατική πίεση. Συγκέντρωση ίση με 2,5 μg/ml εντεροκίνης AS-48 είναι ικανή για την θανάτωση των σπορίων.

Η προσθήκη νισίνης συμβάλλει στη μείωση της θερμικής αντίστασης των σπορίων *A. acidoterrestris* στα όξινα ποτά. Επιπλέον, η ανάπτυξη των σπορίων του *A. acidoterrestris* φαίνεται να αναστέλλεται με την προσθήκη 25-50 IU ml⁻¹ νισίνης σε χυμούς φρούτων. Κι ενώ η νισίνη (1,5 mg L⁻¹) μόνη της ενώ είναι ικανή να μειώσει τον μικροοργανισμό κατά περισσότερους από δύο λογαριθμικούς κύκλους όταν προστίθεται στο μέσο ανάπτυξης, ακόμη κι αν δεν εφαρμοστεί προηγουμένως θερμική επεξεργασία μέσω συνεργιστικής δράσης το αποτέλεσμα είναι μεγαλύτερο. Ειδικότερα η χρήση αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου και ο συνδυασμός του με νισίνη για την πρόληψη του πολλαπλασιασμού του *Alicyclobacillus acidoterrestris* είναι αποτελεσματική. Η σποριοκτόνος δράση κατά των σπορίων του *A. acidoterrestris* για το αιθέριο έλαιο χαρακτηρίστηκε ως σποροστατικό, ενώ για τον συνδυασμό του με την νισίνη ως σποριοκτόνο. Καλύτερα αποτελέσματα επιφέρει και ο συνδυασμός της νισίνης με την θέρμανση εξαιτίας της θερμοανθεκτικότητας των σπορίων του *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Τέλος, η νισίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό της συσκευασίας τροφίμων προσδίδοντας μακροχρόνια αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Alicyclobacillus acidoterrestris*, προστατεύοντας το προϊόν.

Πίνακας V. Μέθοδοι αντιμετώπισης των *Alicyclobacillus*

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ Σ ΣΤΟΧΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ/ΣΥΝΘΗ ΚΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΔΡΑΣΗΣ	ΣΥΝΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΆΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	ΣΠΟΡΙΑ <i>Alicyclobacillus</i>	45°C 71 °C 90 °C	Καταστροφή σπορίων	Συνδιαστικά με υψηλή πίεση (207 MPa για 5 λεπτά στους 45°C)	
Ultra-High Pressure Homogenization,UHPH	<i>A. acidoterrestris</i>	50 και 170 MPa	μείωση <1LogCFU/mL		Bevilacqua, et al. (2008)
Ultra-High Pressure Homogenization,UHPH	<i>A. acidoterrestris</i>	300 MPa	μείωση έως και 5log	Με προθέρμανση στους 80°C	Roig-Sagués, et al. (2015)
UV	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	1,31 mW/cm ² .	5,5-log	Εφαρμογή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους συντήρησης για την παστερίωση του χυμού μήλου	Ayse Handan Baysal (2013)
UV	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	20 λεπτά (16,8 kJ/m ²)	>4log CFU/mL		Prado, et al. (2019)
UV	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	15 λεπτών (12,6 kJ/m ²)			Prado, et al. (2019)
UV	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>).	μετά από 30 λεπτά (26,2 kJ/m ²	περίπου 2 log CFU/mL		Prado, et al. (2019)

Χλώριο	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	500 ppm για 1 λεπτό	<1log		RV Orr & Beuchat (2000)
Οξιτισμένο χλωριώδες νάτριο (Acidified Sodium Chlorite (ASC))	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	1.200 ppm διαλυμάτων για 1 λεπτό	<1log		RV Orr & Beuchat (2000)
Φωσφορικό τρινάτριο (Trisodium Phosphate) 8%	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		Μικρή μείωση		RV Orr & Beuchat (2000)
Υπεροξείδιο του υδρογόνου H ₂ O ₂ (2%)	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		Αποτελεσματικό στη θανάτωση των σπορίων που απομένουν στην επιφάνεια του μήλου μετά το πλύσιμο		RV Orr & Beuchat (2000)
Χλωριούχου οξέος	<i>A. acidoterrestris</i>	268 ppm μετά από 10 min	έως και 5 log	μη συνεργιτική δράση με θερμότητα	Lee S.Y., et al. (2010)
Διοξειδίου του χλωρίου	<i>A. acidoterrestris</i>	120 ppm μετά από επεξεργασία μόνο 1 λεπτού.	>4,8 log	μη συνεργιτική δράση με θερμότητα	Lee S.Y., et al. (2004)
Αέριο διοξείδιο του χλωρίου	<i>A. acidoterrestris</i> σε επιφάνειες μήλων	για 30 λεπτά, 1, 2 και 3 ώρες	αρκετά δραστικό		Lee S.Y., et al. (2006)
Ηλεκτρολυμένο νερό (EW) (μέσω ηλεκτρόλυσης με αραιό διάλυμα χλωριούχου νατρίου)	<i>A. acidoterrestris</i>		είναι τρεις έως και περισσότερο από δέκα φορές πιο αποτελεσματικό από το υποχλωριώδες νάτριο στη μείωση της βιωσιμότητας των σπορίων του <i>A. acidoterrestris</i>	3-10 φορές πιο αποτελεσματικό από το χλωριώδες νάτριο	(Torlak, 2014)

Κινναμαλδεϋδης	<i>A. acidoterrestris</i>	100 ppm	Αναστολή της βλάστησης σπορίων		Bevilacqua, et al. (2008)
Βενζοϊκό νάτριο	<i>A. acidoterrestris</i>	100 ppm	Παρεμπόδιση ανάπτυξης		Bevilacqua, et al. (2008)
Ευγενόλη	<i>A. acidoterrestris</i>	500 ppm	Αναστολή βλάστησης		Bevilacqua, et al. (2008)
Βενζοϊκό νάτριο	<i>A. acidoterrestris</i>	(500-1000-2000 ppm)	Πλήρης αναστολή με βενζοϊκό οξύ (150 mg/L)		Pettipher & Osmundson, (2000)
Αιθέριο έλαιο λεμονιού	<i>A. acidoterrestris</i>	(0,08-0,12-0,16%)	Πλήρης αναστολή		Pettipher & Osmundson, (2000)
Σορβικό κάλιο	<i>A. acidoterrestris</i>	(600-1200 ppm)	Αναστολή ανάπτυξης (σορβικό κάλιο σε 300 mg/L)		Pettipher & Osmundson, (2000)
Αφυδροοξικού οξύ	<i>A. acidoterrestris</i>	270 mg/L	Εφαρμογή σε χυμό μήλου, 3,43log μονάδα σχηματισμού αποικίας (CFU)/mL, και δεν ανιχνεύθηκε γουαϊακόλη μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης		(Rui Cai, 2015)
Κινναμωμικό οξύ	<i>A. acidoterrestris</i>	108 mg/L	Εφαρμογή σε χυμό μήλου, 3.17log μονάδα σχηματισμού αποικίας (CFU)/mL, και δεν ανιχνεύθηκε γουαϊακόλη μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης		(Rui Cai, 2015)

ε-πολυλυσίνη	<i>A.acidoterrestris</i>	100 mg/L	Εφαρμογή σε χυμό μήλου, 4.78log μονάδα σχηματισμού αποικίας (CFU)/mL, και δεν ανιχνεύθηκε γουαϊακόλη μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης		(Rui Cai, 2015)
Enterocin AS-48	<i>A.acidoterrestris</i>	2,5 µg ml ⁻¹	Εφαρμογή σε χυμούς πορτοκαλιού και μήλου, προηγήθηκε επώαση στους 37°C, απενεργοποίηση από την εντεροκίνη AS-48 (2,5 µg/ml) και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στις επόμενες 14 ημέρες.		Ma J Grande, et al. (2005)
Νισίνη	<i>A.acidoterrestris</i>	25-50 IU ml ⁻¹	Εφαρμογή σε χυμούς πορτοκαλιού όσο και σε χυμούς με αναμεμειγμένα φρούτα, η ανασταλτική δράση δεν αυξήθηκε με την προσθήκη υψηλότερου επιπέδου (600 IU ml ⁻¹) σε διαυγές - ρόφημα μήλου.		Yamazaki, et al. (2000)

Νισίνη	<i>A.acidoterrestris</i>	1,5 mg L ⁻¹	Μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού κατά περισσότερους από δύο λογαριθμικούς κύκλους	Χωρίς θερμική επεξεργασία	Huertas, et al. (2014)
Νισίνη	<i>A.acidoterrestris</i>	στους 25 °C ήταν μόνο 5 Διεθνείς Μονάδες (IU) ml ⁻¹	Ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη του στους χυμούς φρούτων	μεθερμανση μειωση τιμής D εως 40%	Komitopoulou, et al. (2001)
Αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου	<i>A.acidoterrestris</i>	125 µg ml ⁻¹	σποροστατικό	Μαζί με την νισίνη εμφάνισαν συνεργική δράση → σποριοκτόνο	Silva, et al. (2020)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία των ειδών του γένους *Alicyclobacillus* στα τρόφιμα, και ιδιαίτερα στους χυμούς φρούτων, αποτελεί σημαντική πηγή αλλοίωσης και, κατ' επέκταση, οικονομικής ζημίας για τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Οι τρόποι επιμόλυνσης είναι ποικίλοι και δύνανται να προκύψουν σε όλα τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας: από την πρωτογενή παραγωγή (π.χ. χώμα, φλοιούς φρούτων κατά τη συγκομιδή) (Willem et al., 2008), μέχρι την επεξεργασία (π.χ. ανεπαρκής καθαρισμός, εξοπλισμός) και την αποθήκευση ή μεταφορά των προϊόντων υπό συνθήκες ευνοϊκές για τη μικροβιακή ανάπτυξη (Wang et al., 2010).

Η επιλογή κατάλληλων και στοχευμένων μεθόδων ελέγχου σε κάθε στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων και να μειώσει σημαντικά τις απώλειες. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την εκτεταμένη παρουσία των *Alicyclobacillus* spp., κυρίως σε όξινα τρόφιμα, όπως οι χυμοί φρούτων. Από τον Πίνακα IV προκύπτει ότι η συχνότερη απομόνωση εντοπίζεται στους χυμούς μήλου, ενώ ακολουθούν άλλοι τύποι όπως ο χυμός αχλαδιού, σταφυλιού, ακτινιδίου, ροδάκινου και πορτοκαλιού (Gobbi et al., 2010; Połaska et al., 2021; Goto et al., 2003). Αξιοσημείωτες είναι επίσης οι απομονώσεις από περιβάλλοντα όπως το έδαφος οπωρώνων, ο αέρας αποθηκών, η λάσπη λυμάτων και γεωθερμικές πηγές (Guo et al., 2009; Wang et al., 2010; Goto et al., 2007).

Η βιβλιογραφία αναδεικνύει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων αντιμετώπισης, προσαρμοσμένων στα διάφορα στάδια της βιομηχανικής διαδικασίας. Οι τεχνικές αυτές διακρίνονται σε θερμικές και μη θερμικές διεργασίες, χρήση χημικών και φυσικών προσθέτων, καθώς και εφαρμογή βακτηριοσινών, όπως η νισίνη και η εντεροκίνη. Στα αρχικά στάδια παραγωγής, τα φρούτα ενδέχεται να εισέρχονται ήδη επιμολυσμένα. Ο επαρκής καθαρισμός τους, με τη χρήση ειδικών χημικών ουσιών, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός στη μείωση του μικροβιακού φορτίου και την καταστροφή των σπορίων (Lee et al., 2004; Torlak, 2014). Σε επόμενες φάσεις, η εφαρμογή σύγχρονων τεχνολογιών, όπως η υπέρ υψηλή πίεση (UHPH) ή η υπεριώδης ακτινοβολία, συμβάλλει περαιτέρω στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των μικροοργανισμών.

Ειδικότερα, το είδος *Alicyclobacillus acidoterrestris*, λόγω της υψηλής θερμοανθεκτικότητας και της παραγωγής μεταβολιτών όπως η γουαϊακόλη, αποτελεί τον σημαντικότερο στόχο για τον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία. Αν και πολλές από τις τεχνικές καταπολέμησης παραμένουν σε πειραματικό στάδιο, παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για μελλοντική εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα. Η παρούσα εργασία συνέβαλε στη συνοπτική και συστηματική καταγραφή των ιδιοτήτων των *Alicyclobacillus* spp. και των πιθανών μεθόδων αντιμετώπισής τους, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση των τεχνολογιών αυτών σε πραγματικές συνθήκες παραγωγής.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το είδος *Alicyclobacillus acidoterrestris* αναγνωρίζεται ως το κυριότερο αλλοιογόνο είδος του γένους, με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε όξινα περιβάλλοντα (pH 2,5–4,5) και σε θερμοκρασίες παστερίωσης (70–90°C), γεγονός που το καθιστά μικροοργανισμό στόχο για τη βιομηχανία χυμών.
- Τα είδη *A. acidoterrestris*, *A. contaminans*, *A. acidocaldarius*, *A. pomorum*, *A. fastidiosus* και άλλα έχουν απομονωθεί επανειλημμένα από χυμούς φρούτων, με μεγαλύτερη συχνότητα στους χυμούς μήλου, αχλαδιού, πορτοκαλιού και ροδάκινου, επιβεβαιώνοντας τη μεγάλη προσαρμοστικότητα των μικροοργανισμών αυτών σε όξινα υποστρώματα.
- Ο Πίνακας IV της εργασίας επισημαίνει ότι οι συχνότερες απομονώσεις αφορούν τον χυμό μήλου, ενώ άλλες πηγές περιλαμβάνουν αλόη, ακτινίδιο, σταφύλι και ακόμη και τσάγια από βότανα, ενισχύοντας τη θέση ότι οι *Alicyclobacillus spp.* μπορούν να επιβιώσουν και σε μη τυπικά περιβάλλοντα.
- Σε ό,τι αφορά το περιβάλλον παραγωγής, οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν ανιχνευθεί σε εδαφικά δείγματα οπωρώνων, φύλλωμα δέντρων, αέρα αποθηκών, χόμα θερμών πηγών και γεωθερμικών περιοχών, στοιχείο που καταδεικνύει την παρουσία τους ήδη από το στάδιο της καλλιέργειας και τη μεγάλη τους διασπορά.
- Η θερμική επεξεργασία (π.χ. παστερίωση στους 85°C για 30 δευτερόλεπτα) αποδεικνύεται ανεπαρκής για την πλήρη αδρανοποίηση των σπορίων, ιδιαίτερα του *A. acidoterrestris*. Σε πειραματικές συνθήκες, τα σπόρια εμφάνισαν επιβίωση ακόμη και μετά από θέρμανση στους 95°C (Durak et al., 2010).
- Αντίθετα, μέθοδοι όπως η υπέρ υψηλή πίεση (400–600 MPa), η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), και η χρήση βακτηριοσινών όπως η νισίνη, έχουν παρουσιάσει σημαντικά αποτελέσματα στη μείωση του μικροβιακού φορτίου σε χυμούς φρούτων (Torlak, 2014; Lee et al., 2006).
- Οι μη θερμικές τεχνικές εμφανίζουν συνεργιστική δράση όταν εφαρμόζονται σε συνδυασμό με μέτρια θερμότητα (π.χ. 60°C), επιτρέποντας την επίτευξη μικροβιολογικής ασφάλειας χωρίς υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος.
- Η εφαρμογή τέτοιων συνδυαστικών τεχνολογιών φαίνεται να προσφέρει μια ελπιδοφόρα λύση για τον περιορισμό της επιμόλυνσης σε βιομηχανικό επίπεδο, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε πραγματικές γραμμές παραγωγής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147526/#&gid=article-figures&pid=fig-2-uid-1>
- (χ.χ.). Ανάκτηση από https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Ali_a.jpg
- Karavaiko, G., Bogdanova, T., Tourova, T., Kondrat'eva, T., Tsaplina, I., Egorova, M., . . . Zakharchuk, L. (2005, Mar). Reclassification of 'Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans' strain K1 as Alicyclobacillus tolerans sp. nov. and Sulfobacillus disulfidooxidans Dufresne et al. 1996 as Alicyclobacillus disulfidooxidans comb. nov., and emended description. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, σσ. 941-947.
- Wisotzkey, J., Jurtshuk Jr, P., E Fox, G., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992, Aprl). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 42(2), σσ. 263-9. doi:10.1099/00207713-42-2-263
- A Bevilacqua, F Cibelli, M R Corbo, & Sinigaglia, M. (2007, October). Effects of high-pressure homogenization on the survival of Alicyclobacillus acidoterrestris in a laboratory medium. *Letters in applied microbiology*, 45(4), σσ. 382-386. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02219.x.
- A Palop, I. A. (2000, Oct). Heat resistance of Alicyclobacillus acidocaldarius in water, various buffers, and orange juice. *Journal of food protection*, 63(10), σσ. 1377-80. doi:10.4315/0362-028x-63.10.1377.
- Albuquerque, L., Rainey, F. A., Sunna, A., Nobre, M. F., Grote, R., Antranikian, G., & Costa, M. S. (2000, Mar). Alicyclobacillus hesperidum sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), σσ. 451-457. doi:10.1099/00207713-50-2-451
- Amara, C., Kim, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017, Dec). Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. *Food Chemistry*, 1(236), σσ. 32-40. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.168
- Anna Zamora, & Guamis, B. (2015, June). Opportunities for Ultra-High-Pressure Homogenisation (UHPH) for the Food Industry. *Food Engineering Reviews*, 7(2), σσ. 130-142. doi:10.1007/s12393-014-9097-4
- Ayse Handan Baysal, C. M. (2013, Sep 16). UV-C light inactivation and modeling kinetics of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in white grape and apple juices. *International journal of food microbiology*, 166(3), σσ. 494-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.015
- Babasola Adewunmi Osopale, C. R. (2016, Jun). Culture dependent and independent genomic identification of Alicyclobacillus species in contaminated commercial fruit juices. *Food microbiology*, σσ. 21-8. doi:10.1016/j.fm.2015.11.014
- Barbara Pöllinger-Zierler, B. S. (2004, August Analytica). Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Chimica Acta*, 520(1), σσ. 3-11. doi:10.1016/j.aca.2004.03.084
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2008, July). Inhibition of Alicyclobacillus acidoterrestris spores by natural compounds. *International*

- Journal of Food Science and Technology*, 43(7), σσ. 1271-1275.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01604.x>
- Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2008, Jul). Alicyclobacillus acidoterrestris: new methods for inhibiting spore germination. *International journal of food microbiology*, 125(2), σσ. 103-110. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.030.
- Bo-Kai Chen, C.-K. W. (2022, Feb). Electrolyzed Water and Its Pharmacological Activities: A Mini-Review. *Molecules*, 27(4), σ. 1222. doi: 10.3390/molecules27041222
- Borlinghaus A, & Engel R. (1997). Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies-method development and validation. *Fruit Processing*(7), σσ. 262-266.
- Burgos, M. J., Pulido, R. P., Carmen, M. d., Aguayo, L., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014, December 8). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal Mol Sci*, 15(12), σσ. 22706-22727. doi: 10.3390/ijms151222706
- Burgos, M. J., Pulido, R. P., M. D., Antonio Gálvez, & Lucas, R. (2014, Dec). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International journal of molecular sciences*, 8(15), σσ. 22706-22727. doi:10.3390/ijms151222706.
- Burt, S. (2004, Aug). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), σσ. 223-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Butz, & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2-3), σσ. 279-284. doi:[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1)
- Butz, P. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2-3), σσ. 279-284. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1)
- Cai, R., Yuan, Y., Wang, Z., Guo, C., Liu, B., Pan, C., . . . Yue, T. (2015, December). Effects of preservatives on Alicyclobacillus acidoterrestris growth and guaiacol production. *International Journal of Food Microbiology*, 214, σσ. 145-150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.013
- Celenk Molva, & Ayse Handan Baysal. (2015, May). Effects of pomegranate and pomegranate-apple blend juices on the growth characteristics of Alicyclobacillus acidoterrestris DSM 3922 type strain vegetative cells and spores. *International journal of food microbiology*, 4(200), σσ. 52-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.019.
- Ciuffreda, E., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2015, October 10). Alicyclobacillus: New Insights on Ecology and Preserving Food Quality through New Approaches. 3(4), σσ. 625-640.
- Cowan, M. M. (1999, Oct). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), σσ. 564-82. doi:10.1128/CMR.12.4.564.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Laetitia, P., & Benzaria, A. (2013, May). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 1, σσ. 13-26. doi:10.1016/j.tifs.2012.03.005
- Durak MZ, Churey JJ, Danyluk MD, & Worobo RW. (2010). Identification and haplotype distribution of Alicyclobacillus from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*(142), σσ. 286-291.

- E. Gayán, I. A. (2013, July). Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, σσ. 140-145.
doi:10.1016/j.ifset.2013.04.007
- Eiroa, M. N., V. C., & S. F. (1999, Aug). Alicyclobacillus in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of food protection*, 62(8), σσ. 883-6.
doi:10.4315/0362-028x-62.8.883.
- Erika Georget, B. M. (2014, August 19). (Ultra) high pressure homogenization for continuous high pressure sterilization of pumpable foods – a review. *Nutrition and Food Science Technology*, 1. doi:doi.org/10.3389/fnut.2014.00015
- F SPLITTSTOESSER, D., Churey, J. J., & Lee, C. Y. (1994, Dec). Growth Characteristics of Aciduric Sporeforming Bacilli Isolated from Fruit Juices. *Journal of food protection*, 57(12), σσ. 1080-1083. doi:10.4315/0362-028X-57.12.1080.
- G. Pettipher, M. O. (1997, March 1). 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*. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00373.x
- Gobbi, E., Falasconi, M., Concina, I., Mantero, G., Bianchi, F., Mattarozzi, M., . . . Sberveglieri, G. (2010, Oct). Electronic nose and Alicyclobacillus spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control*, σσ. 1374-1382.
doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.011
- Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., & Parish, M. (2005, February). Identification of medicinal off-flavours generated by Alicyclobacillus species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), σσ. 172-7. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01636.x
- Goto , K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai , H., & Yokota, A. (2003, Sep). Alicyclobacillus pomorum sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus Alicyclobacillus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, σσ. 1537-1544.
doi:10.1099/ijs.0.02546-0
- Goto, K., Matsubara, H., Mochida, K., Matsumura, T., Hara, Y., Niwa, M., & Yamasato, K. (2002, Jan). Alicyclobacillus herbarius sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(1), σσ. 109-13.
doi:10.1099/00207713-52-1-109
- Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H., & Yokot, A. (2003, Sep). Alicyclobacillus pomorum sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus Alicyclobacillus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), σσ. 1537-1544.
doi:10.1099/ijs.0.02546-0
- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.-Y., . . . Yokota, A. (2007, Jun). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: Alicyclobacillus contaminans sp. nov., Alicyclobacillus fastidiosus sp. nov., Alicyclobacillus kakegawensis sp. nov., Alicyclobacillus macrosporangiidus sp. nov.,. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(6), σσ. 1276-1285. doi:10.1099/ijs.0.64692-0

- Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.-Y., . . . Yokota, A. (2007, Jun). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov.,. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(6), σσ. 1276-1285. doi:10.1099/ijms.0.64692-0
- Goto, K., Nishibori, A., Wasada, Y., Furuhashi, K., Fukuyama, M., & Hara, M. (2008, Mar). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Letters in applied microbiology*, 46(3), σσ. 289-94. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02307.x
- Groenewald, Willem H ; Gouws, Pieter A ; Witthuhn, R Corli. (2007, October 17). Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*(12), σσ. 159–163.
- Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2009, Feb). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food microbiology*, 26(1), σσ. 71-6. doi:10.1016/j.fm.2008.07.008.
- Guo, X., You, X., Lijun, L., & Zhang, J.-Y. (2009, Aug). *Alicyclobacillus aeris* sp nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, σσ. 2415-20. doi:10.1099/ijms.0.008870-0
- Guo, X., You, X.-Y., Liu, L.-J., Zhang, J.-Y., Liu, S.-J., & Jiang, C.-Y. (2009, Oct). *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, σσ. 2415-20. doi:10.1099/ijms.0.008870-0
- Henczka, M., Djas, M., & Filipek, K. (2013, Jan). Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Journal of microbiological methods*, 92(1), σσ. 1-8.
- Huertas, J.-P., Esteban, M.-D., Antolinos, V., & Palop, A. (2014, January). Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*, σσ. 73-78.
- Isabel Walls, R. C. (2000, July). Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia* 52(7):, 57(7), σσ. 286-288.
- Isma Neggazi, P. C.-M. (2023, Jul). Occurrence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized and high hydrostatic pressure-treated fruit juices and isolates' characterization. *International journal of food microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110197.
- Jay, J. M. (2000). High-Temperature Food Preservation and Characteristics of Thermophilic Microorganisms. Στο *Modern Food Microbiology* (σσ. 341-362).
- Jiang, C.-Y., Liu, Y., Liu, Y.-Y., You, X.-Y., Guo, X., & Liu, S.-J. (2008, Dec). *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(12), σσ. 2898-903. doi:10.1099/ijms.0.2008/000562-0
- Jumana Mahmud, R. A. (2018, November). Characterization of Natural Antimicrobials in Food System. *Advances in Microbiology*, 8(11), σσ. 894-916. doi:10.4236/aim.2018.811060
- K Goto,A Nishibori,Y Wasada,K Furuhashi,M Fukuyama,M Hara. (2008, Mar). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several

- Japanese fruit orchards. *Lett Appl Microbiol*, σσ. 289-94. doi:0.1111/j.1472-765X.2007.02307
- Kannenberg E., B. A. (1984). *Properties of ω-cyclohexane fatty acids in membranes*. (Τόμ. 172). doi:10.1016/0014-5793(84)81151-5
- Karavaiko, G. I., Bogdanova, T., Tourova, I. T., Kondrat'eva, T. F., Tsaplina, I. A., Egorova, M. A., . . . Zakharchuk, L. M. (2005, Mar). Reclassification of 'Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. thermotolerans' strain K1 as Alicyclobacillus tolerans sp. nov. and Sulfobacillus disulfidooxidans Dufresne et al. 1996 as Alicyclobacillus disulfidooxidans comb. nov., and emended description. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), σσ. 941-947. doi:10.1099/ij.s.0.63300-0
- Keiichi Goto Ph.D., Takashi Tanaka, Rie Yamamoto, Teiichi Suzuki, T., & Hajime Tokuda. (2007). *Characteristics of Alicyclobacillus*. Springer, Tokyo. doi:https://doi.org/10.1007/978-4-431-69850-0_3
- Keyser, M., Müller, I. A., Cillier, F. P., Nel, W. P., & Gouws, A. (2008, July). Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), σσ. 348-354. doi:10.1016/j.ifset.2007.09.002
- Kim, M., Lee, J.-C., Park, D.-J., Li, W.-J., & Kim, C.-J. (2014, Oct). Alicyclobacillus tengchongensis sp. nov., a thermo-acidophilic bacterium isolated from hot spring soil. *Journal of microbiology*, 52(10), σσ. 884-9. doi:10.1007/s12275-014-3625-z
- Koji Yamazaki, H. T. (1996, January 1). Isolation and Identification of Alicyclobacillus acidoterrestris from Acidic Beverages. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(3), σσ. 543-545. Ανάκτηση από https://doi.org/10.1271/bbb.60.543
- Koji Yamazaki, Hirokazu Teduka, & Haruo Shinano. (1996, January). Isolation and Identification of Alicyclobacillus acidoterrestris from Acidic Beverages. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(3), σσ. 543-545. doi:https://doi.org/10.1271/bbb.60.543
- Komitopoulou, E., Boziaris, I. S., Davies, E. A., & Delves-Broughton, J. (2001, December). Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(1), σσ. 81-85. doi:10.1046/j.1365-2621.1999.00243.x
- Koutchma, T. (2009). *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. doi:10.1201/9781420059519.ch4
- Kusube, M., Sugihara, A., Moriwaki, Y., Ueoka, T., Shimane, Y., & Minegishi, H. (2014, July). Alicyclobacillus cellulolyticus sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(7), σσ. 2257-2263. doi:10.1099/ij.s.0.061440-0
- Lee, S.-Y., R. H., & D. K. (2002, August). Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on Alicyclobacillus acidoterrestris Spores in Apple Juice. *Applied and Enviromental Microbiology*, 68(2), σσ. 4158-61. doi:10.1128/AEM.68.8.4158-4161.2002
- LYNN H. CHOI, S. S. (2005, April 26). THE EFFECTS OF THERMAL AND NONTHERMAL PROCESSING METHODS ON APPLE CIDER QUALITY AND CONSUMER ACCEPTABILITY. *Journal of food quality*, 1, σσ. 13-29.

- M Zeki Durak, J. J. (2010, Sep). Identification and haplotype distribution of Alicyclobacillus from different juices and beverages. *International journal of food microbiology*, σσ. 286-91. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.003
- Ma J Grande, Lucas, R., H. A., N Ben Omar, M Maqueda, M Martínez-Bueno, . . . Gálvez, A. (2005, Oct). Control of Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices by enterocin AS-48. *International journal of food microbiology*, 104(3), σσ. 289-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010
- Maldonado, M. C., Aban, M. P., & Navarro, A. R. (2014, Mar). Chemicals and lemon essential oil effect on Alicyclobacillus acidoterrestris viability. *Brazilian journal of microbiology*, 44(4), σσ. 1133-7. doi:10.1590/s1517-83822013000400015.
- Martin, J., Oteiza, Gastón, Ares, S, A., Sant'Ana, . . . Giannuzzi. (2011, Dec). Use of a multivariate approach to assess the incidence of Alicyclobacillus in concentrate fruit juices marketed in Argentina: results of a 14-year survey. *Internatiol journal of food microbiology*, 151(2), σσ. 229-34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.004
- Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M., & Yamasato, K. (2002). Alicyclobacillus acidiphilus sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int J Syst Evol Microbiol*, σσ. 1681-1685. doi:10.1099/00207713-52-5-1681
- Mavromatis, K., Sikorski, J., Lapidus, A., Rio, T. G., Copeland, A., Tice, H., . . . Pati, A. (2010, January 28). Complete genome sequence of Alicyclobacillus acidocaldarius type strain (104-IA). *Standards in genomic sciences*, 2(1), σσ. 9-18. doi:10.4056/sigs.591104
- Mayara Baptistucci Ogaki, K. R.-M. (2016, June). Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in Enterococcus Species. *J. Microbiol. Biotechnol*, 26(6), σσ. 1026-1034. doi:https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09020
- Moshe Shemesh, R. P. (2013, Sep). Draft Genome Sequence of Alicyclobacillus acidoterrestris Strain ATCC 49025. *Genome announcements*. doi:10.1128/genomeA.00638-13
- N Jensen, & Whitfield, F. B. (2003). Role of Alicyclobacillus acidoterrestris in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in applied microbiology*, 1(9), σσ. 9-14. doi:10.1046/j.1472-765x.2003.01251.x.
- Nakano, C., Takahashi, N., Tanaka, N., & Okada, S. (2015, Feb). Alicyclobacillus dauci sp. nov., a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(2), σσ. 716-722. doi:10.1099/ijms.0.068957-0
- Naseer Ahmed, Jagmohan Singh, Mudasir, Anisa malik, Harleen Kour, Prerna Gupta, & Harmeet Chauhan. (2013). Naturally Occurring Preservatives in Food and their Role in Food Preservation. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(1), σσ. 22-30.
- Orr, R. V., & Beuchat, L. R. (2000, Aug). Efficacy of disinfectants in killing spores of Alicyclobacillus acidoterrestris and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of food protection*, 63(8), σσ. 1117-22. doi:10.4315/0362-028x-63.8.1117.
- Orr, R., & Beuchat, L. (2000, Aug). Efficacy of disinfectants in killing spores of Alicyclobacillus acidoterrestris and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of food protection*, 63(8), σσ. 1117-22. doi:10.4315/0362-028x-63.8.1117

- Osopale, B. A., Witthuhn, C. R., Albertyn, J., & Oguntinyinbo, F. A. (2016, Jun). Culture dependent and independent genomic identification of Alicyclobacillus species in contaminated commercial fruit juices. *Food microbiology*, *σσ.* 21-8. doi:10.1016/j.fm.2015.11.014
- Patra Sourri, C. C.-J. (2022, Mar 3). Fruit Juice Spoilage by Alicyclobacillus: Detection and Control Methods—A Comprehensive Review. *Foods*, *11*(5), *σ.* 747. doi:10.3390/foods11050747
- Pettipher, G. L., Osmundson, M. E., & Murphy, J. M. (1997, Mar). Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestris and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in applied microbiology*, *24*(3), *σσ.* 185-9. doi: 10.1046/j.1472-765x.1997.00373.x
- Pettipher, G., & Osmundson, M. (2000, July). Methods for the detection, enumeration and identification of Alicyclobacillus acidoterrestris. *Food Australia*, *57*(7), *σσ.* 293-295.
- Pettipher, G., & Osmundson, M. (2000, July). Methods for the detection, enumeration and identification of Alicyclobacillus acidoterrestris. *Food Australia*, *57*(7), *σσ.* 293-295.
- Pettipher, L., Osmundson, M., & Murphy, J. (1997, Mar). Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestris and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in applied microbiology*, *24*(3), *σσ.* 185-9. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00373.x.
- Ph.D., K. G. (2007, January). Parameters for detection of Alicyclobacillus and test methods. doi:10.1007/978-4-431-69850-0_4
- Pilar Martínez Viedma, H. A. (2009, May). Journal of Food Protection. *72*(4), *σσ.* 881-4. doi:10.4315/0362-028X-72.4.881
- Pońska, M., Dekowska, A., & Sokolowska, B. (2021, May). Isolation and identification of guaiacol producing Alicyclobacillus fastidiosus strains from orchards in Poland. *Acta Biochimica Polonica*, *68*(2), *σσ.* 301-307. doi:10.18388/abp.2020_5574
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012, April). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(1), *σσ.* 42-48. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.004
- Pöllinger-Zierler, B., Siegmund, B., & Pfannhauser, W. (2004, August). Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *520*(1), *σσ.* 3-11. doi:10.1016/j.aca.2004.03.084
- Pontius, A. J., Rushing, J. E., & Foegeding, P. M. (1998, Jan). Heat resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores as affected by various pH values and organic acids. *Journal of food protection*, *61*(1), *σσ.* 41-46. doi:10.4315/0362-028x-61.1.41
- PORALLA, K., KANNENBERG, E., & BLUME, A. (1980). A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic Bacillus acidocaldarius, has a cholesterol-like function in membranes. (113), *σσ.* 107-110. doi:10.1016/0014-5793(80)80506-0

- Poralla, Karl, Thomas, Härtner, Elma, & Kannenberg. (1984, July–August). Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters*, 23(2-3), σσ. 253-25.
- Prado, D. B., Szczerepa, M. M., Capeloto, O. A., Astrath, N. G., Santos, N. C., Previdelli, I. T., . . . A, B. (2019, September 16). Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* in industrialized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 305. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238
- R V Orr, R. L. (2000, Nov). 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 Prot*, 63(11), σσ. 1517-22. doi:10.4315/0362-028x-63.11.1517.
- Reverter-Carrión, L., Saucedo-Galdez, J., Codina-Torrella, I., Hernandez-Herrero, M., Gervilla, R., & Roig-Sagues, A. (2018, August). Inactivation study of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Aspergillus niger* spores under Ultra-High Pressure Homogenization, UV-C light and their combination. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, σσ. 258-264. doi:10.1016/j.ifset.2018.06.011
- Roig-Sagués, A. X., Astó, E., Engers, I., & Hernández-Herrero, M. (2015, May). 63(2). doi:10.1016/j.lwt.2015.04.056
- Roth, K., Rana, Y. S., Worobo, R., & Snyder, A. B. (2024, November 20). *Alicyclobacillus suci* produces more guaiacol in media and has duplicate copies of *vdcC* compared to closely related *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Applied and environmental microbiology*, 11. doi:doi: 10.1128/aem.00422-24
- Rui Cai, Y. Y. (2015, Dec). Effects of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth and guaiacol production. *International journal of food microbiology*, 2(214), σσ. 145-150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.013.
- RV Orr, & Beuchat, L. R. (2000, Aug). Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of Food Protection*, 63(8), σσ. 1117-22. doi:10.4315/0362-028x-63.8.1117.
- Sigma-Aldrich*. (χ.χ.). Ανάκτηση από https://www.sigmaaldrich.com/GR/en:https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/ifu-method-no12?srltid=AfmBOoqAE_s_f2le2EQ3bIr5aJvM6y-ZITA2OR2RPLnGOIZPEKINxKKGK
- Silva, D. d., Fernandes, M., Endo, E., Vital, A., Britta, E., Faveo, M., . . . Filho, B. d. (2020, September). Control of the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in industrialized orange juice using rosemary essential oil and nisin. *Letters in Applied Microbiology*, 72(1), σσ. 41-52. doi:<https://doi.org/10.1111/lam.13385>
- Simbahan, J., Drijber, R., & Blum, P. (2004, Sep). *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), σσ. 1703-1707. doi:10.1099/ij.s.0.03012-0
- Simbahan, J., Drijber, R., & Blum, P. (2004, Sep). *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), σσ. 1703-1707. doi:10.1099/ij.s.0.03012-0

- Smetana, S., Valsasina, L., Pizzol, M., & Georget, E. (2015, Nov). Environmental sustainability of ultra high pressure homogenization application for liquid foods (milk case study). *29th EFFoST International Conference*. Athens, Greece.
- Song, Z., Wu, H., Niu, C., Wei, J., Zhang, Y., & Yue, T. (2019, Jul 30). Application of iron oxide nanoparticles @ polydopamine-nisin composites to the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. *Food chemistry*, 287, σσ. 68-75. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.044
- Sourri, P., Tassou, C. C., Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. Z. (2022, Mar 3). Fruit Juice Spoilage by *Alicyclobacillus*: Detection and Control Methods—A Comprehensive Review. *Foods*(11), σ. 747.
- Springer Nature. (χ.χ.). Ανάκτηση από https://media.springernature.com:https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs11274-013-1491-1/MediaObjects/11274_2013_1491_Fig5_HTML.jpg
- Srinivasan, D., S. N., T. S., & P. L. (2001, Mar). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), σσ. 217-20. doi:10.1016/s0378-8741(00)00345-7.
- Steyn, C. E., Cameron, M., & Witthuhn, R. C. (2011, May). Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 14(147), σσ. 1-11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.004
- Sun-Young Lee, Genisis Iris Dancer, Su-Sen Chang, Min-Suk Rhee, & Dong-Hyun Kang. (2006, May). Efficacy of chlorine dioxide gas against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apple surfaces. *International journal of food microbiology*, 108(3), σσ. 364-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.023.
- Sun-Young Lee, Peter M Gray, Richard H Dougherty, & Dong-Hyun Kang. (2004, Apr). The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. *International journal of food microbiology*, 92(2), σσ. 121-7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.09.003.
- Su-Sen Chang, & Kang, D.-H. (2004). *Alicyclobacillus* in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical reviews in microbiology*, 30(2), σσ. 55-74. doi:10.1080/10408410490435089.
- S-Y Lee, S., S-R Ryu, & D-H Kang. (2010, Aug). Treatment with chlorous acid to inhibit spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in aqueous suspension and on apples. *Letters in applied microbiology*, 51(2), σσ. 164-9. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02874.x
- Tatiana Koutchma, F. L. (2009). *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. April: CRC Press. doi:10.1201/9781420059519.ch4
- Tchonkouang, R. D., Lima, A. R., Quintino, A. C., Cristofoli, N. L., & Vieira, M. C. (2023, Aug 27). UV-C Light: A Promising Preservation Technology for Vegetable-Based Nonsolid Food Products. *Foods*, 12(17), σ. 3227. doi:10.3390/foods12173227
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., & Guiraud, J. (2003, December). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, σσ. 427-439. doi:10.1016/S0958-6946(03)00051-7
- Thomas A. Eisele, M. J. (2006, May). Best Estimated Aroma and Taste Detection Threshold for Guaiacol in Water and Apple Juice. *Journal of Food Science*, 70(4), σσ. 267-269.

- Torlak, E. (2014, Aug). Inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in aqueous suspension and on apples by neutral electrolyzed water. *International journal of food microbiology*, 185(69), σσ. 69-72. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.022.
- Tsuruoka, N., Isono, Y., Shida, O., Hemmi, H., Nakayama, T., & Nishino, T. (2003, Jul). Alicyclobacillus sendaiensis sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4), σσ. 1081-1084. doi:10.1099/ij.s.0.02409-0
- V.M Silva , F., & Gibbs, P. (2001, February). Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2), σσ. 68-74.
- W A M Hijnen, E. F. (2006, Jan). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water research*, 40(1), σσ. 3-22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030
- Walker M, & CA, P. (2008). Alicyclobacillus acidoterrestris: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science and Technology*(43), σσ. 250-260.
- Wang, Y., Yue, T., Yuan, Y., & Gao, Z. (2010, Feb). Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in china. *Journal of food protection*, 73(2), σσ. 390-4. doi:10.4315/0362-028x-73.2.390
- Wang, Z., Yue, T., Yuan, Y., Zhang, Y., Gao, Z., & Cai, R. (2021, Jan). Targeting the vanillic acid decarboxylase gene for Alicyclobacillus acidoterrestris quantification and guaiacol assessment in apple juices using real time PCR. *International journal of food microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109006
- Willem, H., Groenewald, A, P., Gouws, Corli, R., & Witthuhn. (2008, Jan). Isolation and identification of species of Alicyclobacillus from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles: life under extreme conditions*, σσ. 159-63.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk Jr, P., Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992, April). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 42(2), σσ. 263-9. doi:10.1099/00207713-42-2-263
- Wisotzkey, J., Fox, G., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA(RNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, σσ. 263-269.
- Wisotzkey, J., Jurtshuk, P., Fox, G., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). *Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rRNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, Alicyclobacillus gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* (Tόμ. 42). doi:10.1099/00207713-42-2-263
- Wu, H., Teng, C., Liu, B., Tian, H., & Wang, J. (2018, July). Characterization and long term antimicrobial activity of the nisin anchored cellulose films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, σσ. 487-493. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.194
- Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., & Matsuda, T. (2000, June). Use of nisin for inhibition of Alicyclobacillus acidoterrestris in acidic drinks. *Food Microbiology*, 17(3), σσ. 315-320. doi:https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0309

- Zhang, J., Yue, T., & Yuan, Y. (2013, Jul 2). Alicyclobacillus contamination in the production line of kiwi products in China. *PLoS One*, 8(7). doi:10.1371/journal.pone.0067704
- Zhang, J., Yue, T., & Yuan, Y. (2013, July 2). Alicyclobacillus Contamination in the Production Line of Kiwi Products in China. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067704
- Zhouli Wang, T. Y. (2021, Jan). Targeting the vanillic acid decarboxylase gene for Alicyclobacillus acidoterrestris quantification and guaiacol assessment in apple juices using real time PCR. *International journal of food microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109006