ПЕРЕРАБОТКА

УДК 579.676: 664.863

doi: 10.30766/2072-9081.2018.67.6.83-87

Выделение и идентификация бактерий рода *Alicyclobacillus* в яблочном концентрированном соке отечественного производства

М.Н. Курбанова, М.В. Тришканева, Ж.А. Семенова, А.Ю. Колоколова, М.Т. Левшенко

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Московская обл., Российская Федерация

В статье представлены результаты исследований по определению бактерий рода *Alicyclobacillus* в яблочных концентрированных соках, произведенных на перерабатывающих предприятиях Южного Федерального округа Российской Федерации. Микроорганизмы рода *Alicyclobacillus* представляют собой кислотоустойчивые термофильные, спорообразующие бактерии, которые могут вызывать порчу соковой продукции. Порча в основном проявляется как образование фенольного (лекарственного или дымного) запаха. Посторонний запах является результатом образования гваякола (2-метоксифенола) – продукта жизнедеятельности отдельных штаммов (гваякообразующих) бактерий рода *Alicyclobacillus*. Нами проведены микробиологические исследования 49 образцов концентрированного яблочного сока и 10 образцов промывных вод с оборудования, отобранных в процессе его производства. Исследования показали, что споры бактерий рода *Alicyclobacillus* могут остаться жизнеспособными во фруктовых концентрированных соках и после тепловой обработки, обычно применяемой в пищевой промышленности для микробиологической стабильности. Микробиологический анализ 49 образцов концентрированного яблочного сока показал, что 30 образцов (61% от общего числа исследованных образцов) содержали бактерии рода *Alicyclobacillus*. При идентификации бактерий рода *Alicyclobacillus* в 30 образцах яблочных концентрированных соков, содержащих эти бактерии, 25 образцов (83%) содержали гваякоположительные бактерии и 5 образцов (17%) – гваяколотрицательные. Количество бактерий в 1 см³ яблочных концентрированных соков не превысило значения 400 КОЕ/см³. Полученные результаты послужат основанием для разработки нормативов допустимого содержания бактерий *Alicyclobacillus* в яблочном концентрированном соке.

Ключевые слова: соковая продукция, контаминация микробная, гваякол

Контроль качества пищевых продуктов является неотъемлемой частью программы обеспечения безопасности населения. Основное внимание в этой программе уделено контролю микробиологической контаминации пищевых продуктов, сырья и полуфабрикатов.

Яблочные концентрированные соки (ЯКС) традиционно считаются стойкими к микробиологической порче в силу их физико-химических характеристик. Эти характеристики включают высокую pH 3,5-4,0, низкую активность воды за счет высокой концентрации растворимых сухих веществ (как правило, более 60°Brix) и высокую вязкость [1, 2].

В последнее время отдельные производители соковой продукции в список контролируемых показателей качества концентрированных соков включают наличие бактерий рода *Alicyclobacillus*. Порчу, вызванную бактериями этого рода, трудно обнаружить визуально. Испорченный сок кажется нормальным или имеет небольшой осадок без газообразования. Часто единственным доказательством порчи служит лекарственный аромат. Химическое вещество, создающее этот аромат, было иден-

тифицировано как гваякол (2-methoxyphenol) и является продуктом жизнедеятельности гваякообразующих видов бактерий рода *Alicyclobacillus*. К гваякообразующим относят следующие виды: *A. acidoterrestris*, *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus*, *A. cycloheptanicus* [3, 4].

Причиной заражения соковой продукции бактериями рода *Alicyclobacillus* является недостаточное качество подготовки сырья к переработке (плохо вымытые яблоки), загрязненная вода, используемая в технологическом процессе переработки яблок.

Впервые бактерии рода *Alicyclobacillus* sp. были описаны в 1982 году при исследовании порчи яблочного сока [2, 5]. В дальнейшем было доказано, что присутствие бактерий рода *Alicyclobacillus* может привести к существенной микробиологической порче соковой продукции [6, 7].

В Российской Федерации вопросы контроля бактерий рода *Alicyclobacillus* в соковой продукции пищевая отрасль поставила перед собой относительно недавно. В 2013-2014 годах был разработан и утвержден ГОСТ 33163 «Продукция соковая. Определение бактерий рода *Alicyclobacillus*», который описывает мето-

ды обнаружения и идентификации данных видов бактерий. Однако на сегодняшний день в Российской Федерации не установлены допустимые нормы наличия бактерий рода *Alicyclobacillus* в сырье и готовой соковой продукции.

Alicyclobacillus – аэробные, ацидофильные, термофильные бактерии, живущие в почве с оптимальным диапазоном температуры 42-60°C и значения pH 2,0-6,0. *Alicyclobacillus* не является патогенным микроорганизмом и отвечает за плоско-кислый тип порчи и производство гваякола [8-10]. При этом использование высокотемпературной тепловой обработки соковой продукции не всегда обеспечивает гарантированное ингибирование бактерий рода *Alicyclobacillus*. Споры рода *Alicyclobacillus* могут пережить типовые режимы стерилизации, примененные во время производства сока. Кроме того, высокотемпературная тепловая обработка приводит к образованию повышенного количества 5-оксиметилфурфурола (ОМФ), содержание которого является нормируемым показателем для соковой продукции детского питания [11].

Цель исследований – качественное и количественное определение бактерий рода *Alicyclobacillus* в концентрированных яблочных соках отечественных производителей и технологической воде, используемой в производстве, как в возможном источнике заражения для последующей разработки нормативов допустимой обсемененности соковой продукции бактериями рода *Alicyclobacillus*.

Материал и методы. В качестве объектов исследований были взяты 49 образцов концентрированного яблочного сока от трех отечественных производителей ($n = 3$) и 10 образцов воды, полученной при санитарной обработке технологического оборудования для концентрирования сока.

Исследования проводили по ГОСТ 33163 «Продукция соковая. Определение бактерий рода *Alicyclobacillus*», применяя метод мембранной фильтрации для осветленной продукции (21 образец ЯКС) и метод прямого посева для неосветленной (28 образцов ЯКС). При определении наличия бактерий рода *Alicyclobacillus* методом прямого посева анализировали пробы объемом 1 см³ ЯКС с использованием в качестве плотных питательных сред YSG и BAT агаров. При определении наличия бактерий методом мембранной фильтрации анализировали пробы объемом 10 см³ ЯКС с использованием фильтровальной установки «HIBLOV MV-1580V» и YSG и BAT агаров.

Для выявления спор бактерий рода *Alicyclobacillus* и подтверждения их принадлежности к роду *Alicyclobacillus* проводили прогрев проб соковой продукции (тепловой удар) при 80°C в течение 10 минут. Это стимулировало образование спор у бактерий рода *Alicyclobacillus*. Для установления наличия спор бактерий проводили просмотр нативного препарата с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Для определения способности исследуемых микроорганизмов образовывать гваякол проводили пероксидазный тест, который основан на изменении цвета среды YSG с ванилиновой кислотой после реакции окисления пероксидом водорода. Обработку результатов, полученных на плотных питательных средах, проводили по ГОСТ ISO 7218 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям».

Результаты и их обсуждение. Примеры роста культуры на плотных питательных средах представлены на рисунке 1.

Рис. 1. Фотографии колоний бактерий рода *Alicyclobacillus* на плотной среде, полученные: а – методом прямого посева, б – методом мембранной фильтрации

Микробиологический анализ 49 образцов концентрированного яблочного сока показал, что 30 образцов ЯКС (61% от общего числа исследованных) содержали бактерии рода

Alicyclobacillus, а в 10-ти исследованных образцах технологической воды бактерии отсутствовали. Результаты исследований ЯКС и воды представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования образцов на присутствие бактерий рода *Alicyclobacillus*

Наименование образца	Объем пробы	Количество образцов	
		общее	с обнаруженными бактериями
Концентрированный яблочный сок (ЯКС)	10 мл	21	8
	1 мл	28	22
Технологические смывы	10 мл	6	Не обнаружены
	1 мл	4	Не обнаружены

Данные, приведенные в таблице 1, показали, что оба метода позволяют обнаруживать бактерии рода *Alicyclobacillus* в исследованных образцах. При этом доля образцов с обнаруженными бактериями в осветленном ЯКС составила 38,0%, в неосветленном – 78,5%.

В образцах ЯКС, содержащих бактерии рода *Alicyclobacillus*, определяли наличие и количество жизнеспособных бактерий и их спор в каждой пробе. По пероксидазному тесту на гваякол определяли, относятся ли выделенные микроорганизмы к гваяколообразующим (гваяколоположительным) видам или гваяколотрицательным (табл. 2 и 3).

Таблица 2

Количество выявленных бактерий рода *Alicyclobacillus* в 1 см³ пробы неосветленного ЯКС методом прямого посева (n = 3)

Номер образца	Количество КОЕ/ см ³	Тест на гваякол
1	3,0x10 ²	+
2	8,0x10 ¹	+
3	0,4 x10 ¹	-
4	7,8x10 ¹	+
5	1,4 x 10 ²	+
6	4,0x10 ²	+
7	7,5x10 ¹	+
8	5,0x10 ¹	-
9	5,0x10 ¹	+
10	3,5 x10 ¹	+
11	6,5x10 ¹	+
12	5,0x10 ¹	+
13	2,9x10 ¹	+
14	1,2x10 ²	+
15	1,1x10 ¹	-
16	3,4x10 ¹	-
17	7,0x10 ¹	+
18	2,5x10 ²	+
19	1,3x10 ¹	+
20	1,4x10 ²	+
21	1,7x10 ¹	+
22	1,7x10 ¹	+

(+) – гваякол обнаружен; (–) – гваякол не обнаружен

Согласно данным таблицы 2, максимальное количество бактерий в 1 см³ неосветленного ЯКС не превысило значения 400 КОЕ/см³, среднее значение составило 92 КОЕ/см³.

Таблица 3

Количество выявленных бактерий рода *Alicyclobacillus* в 10 см³ пробы осветленного ЯКС методом мембранной фильтрации (n = 3)

Номер образца	Количество КОЕ/ 10 см ³	Тест на гваякол
23	1,6x10 ¹	+
24	0,5 x10 ¹	+
25	0,4 x10 ¹	+
26	0,2 x10 ¹	+
27	0,4 x10 ¹	+
28	0,3 x10 ¹	-
29	3,6x10 ²	+
30	1,0x10 ³	+

При идентификации бактерий рода *Alicyclobacillus* в 30 образцах ЯКС, содержащих эти бактерии, 25 образцов (83%) содержали гваяколоположительные бактерии и 5 образцов (17%) – гваяколотрицательные. В образцах с содержанием бактерий рода *Alicyclobacillus* в количестве 100 и более КОЕ/см³ наблюдались признаки порчи в виде небольшого лекарственного аромата. Полученные результаты определения количества гваяколоположительных бактерий *Alicyclobacillus* в исследованных образцах ЯКС могут быть использованы для накопления данных при разработке нормативов по допустимому содержанию бактерий *Alicyclobacillus* в соковой продукции.

Выводы. 1. Микробиологический анализ 49 образцов концентрированного яблочного сока показал, что 30 образцов ЯКС (61% от общего числа исследованных) содержали бактерии рода *Alicyclobacillus*. При идентификации бактерий рода *Alicyclobacillus* в 30 образцах ЯКС, содержащих эти бактерии, 25 об-

разцов (83%) содержали гваяколоположительные бактерии и 5 образцов (17%) – гваяколотрицательные.

2. Среднее количество обнаруженных бактерий *Alicyclobacillus* в 1 см³ осветленного ЯКС составило 92 КОЕ/см³, в неосветленном ЯКС – 17 КОЕ/см³. При этом в образцах с содержанием бактерий рода *Alicyclobacillus* в количестве 100 и более КОЕ/см³ наблюдались признаки порчи в виде небольшого лекарственного аромата.

3. Полученные результаты определения количества гваяколоположительных бактерий *Alicyclobacillus* в исследованных образцах ЯКС могут быть использованы для накопления данных при разработке нормативов по допустимому содержанию их в соковой продукции.

Список литературы

1. Шобингер У. Фруктовые и овощные соки: научные основы и технологии: Пер. с нем. / под общ. науч. ред. А.Ю. Колеснова, Н.Ф. Берестеня и А.В. Орещенко. СПб: Профессия, 2004. 640 с.

2. Tayefe M., Zade A.N., Asl M.S., Hashemi S.A. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Commercial Spoiled apple Juice and Study on some Influence Parameters on its Growth in Apple Juice // Biological Forum – An International Journal. 2014. №6(2), pp. 41-45. DOI: 10.15515/abr.0976-4585.5.2.138142.

3. Yokota A., Fujii T., Goto K. *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli, Springer Science & Business Media, 2008. pp. 15-21.

4. Bahçeci K.S., Gokmen V., Acar J. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study // Europe-

an Food Research and Technology. 2005. №220 (2), pp. 196-199. DOI: 10.1007/s00217-004-1018-y.

5. Aneja K. R., Dhiman R., Kumar N. A., Aneja A. Review Article. Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices // International Journal of Microbiology. 2014. P. 14. Article ID 758942, DOI: 10.1155/2014/758942/.

6. Филиппова Р.Л., Колеснов А.Ю., Мухамеджанова Т.Г. Бактерии рода *Alicyclobacillus* – возбудители порчи фруктовых соков и напитков // Пиво и напитки. 2004. №3. С. 30-32.

7. Филиппова Р.Л., Мухамеджанова А.А., Колеснов А.Ю. Идентификация бактерий рода *Alicyclobacillus* во фруктовых соках и пути предотвращения их порчи // Пиво и напитки. 2004. №4. С. 66-69.

8. M. Zeki Durak a, John J. Churey a, Michelle D. Danyluk b, Randy W. Worobo Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus spp.* from different juices and beverages // International Journal of Food Microbiology Vol. 142. 2010. pp. 286-291.

9. Xiao-Chen Huang, Ya-Hong Yuan, Chun-Feng Guo, Vassilis Gekas *Alicyclobacillus* in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control // Food Reviews International. Vol. 31. 2015. pp. 91-124. DOI: 10.1080/87559129.2014. 974266.

10. Osopale B. A., Witthuhn C.R., Albertyn J., Oguntinyinbo F.A. Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus spp.* in contaminated commercial fruit juices // Food Microbiology Vol. 56. 2016. pp. 21-28.

11. Bevilacqua A., Sinigaglia M., Corbo M.R. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination // International Journal of Food Microbiology. 2008. №125. С. 103-110. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.030.

Сведения об авторах:

Курбанова Мадина Насрудиновна, кандидат биол. наук, ст. научный сотрудник,
Тришканева Марина Валерьевна, кандидат хим. наук, ведущий научный сотрудник, ученый секретарь,
Семенова Жанна Александровна, научный сотрудник,
Колоколова Анастасия Юрьевна, кандидат техн. наук, вед. научный сотрудник,
Левшенко Михаил Трифонович, ст. научный сотрудник

Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, ул. Школьная, д. 78, г. Видное, Московская обл., Российская Федерация, 142703, e-mail: vniitek@vniitek.ru

Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka, 2018. Vol. 67, no. 6, pp. 83-87.

doi: 10.30766/2072-9081.2018.67.6.83-87

Isolation and identification of *Alicyclobacillus* genus bacteria in domestically produced apple juice concentrates

M.N. Kurbanova, M.V. Trishkaneva, Zh.A. Semenova, A.Yu. Kolokolova, M.T. Levshenko

All-Russian Research Institute of Canning Technology – Branch of V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS, Moscow region, Russian Federation

The article provides the results of studies on the identification of *Alicyclobacillus* genus bacteria in apple juice concentrates produced at the processing enterprises of the Southern Federal District of the Russian Federation. Microorganisms of the genus *Alicyclobacillus* are acid resistant, thermophilic, spore-forming bacteria that can cause

juice products spoilage. Spoilage mainly appears as the formation of a phenolic (medicinal or smoky) smell. An alien odor is the result of the formation of guaiacol (2-methoxyphenol), the product of the vital activity of separate strains (guaiacol-forming) bacteria of *Alicyclobacillus* genus. Microbiological studies of 49 samples of sterilized apple juice concentrates and 10 samples of washing water from the equipment, selected in the process of apple juice concentrate producing were carried out. The studies have shown that spores of *Alicyclobacillus* genus bacteria can remain viable in juice concentrates after the heat treatment commonly used in the food processing industry for microbiological stability. Microbiological analysis of 49 samples of apple juice concentrates showed that 30 samples (61% of the total number of examined samples) contained bacteria of the genus *Alicyclobacillus*. When identifying bacteria of *Alicyclobacillus* genus in 30 samples of apple juice concentrates containing these bacteria, 25 samples (83%) contained guaiacol-positive bacteria and, accordingly, 5 samples (17%) contained guaiacol-negative bacteria. The number of bacteria in 1 cm³ of apple juice concentrates did not exceed 400 CFU/cm³. The results of the research can serve as the basis for the development of standards concerning the allowable content of *Alicyclobacillus* bacteria in apple juice concentrate.

Key words: juice products, microbial contamination, guaiacol

References

1. Shobinger U. *Fruktovye i ovoshchnye soki: nauchnye osnovy i tekhnologii*. [Fruit and vegetable juice: scientific bases and technologies]. Saint-Petersburg: *Professiya*, 2004. 640 p.
2. Tayefe M., Zade A.N., Asl M.S., Hashemi S.A. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Commercial Spoiled apple Juice and Study on some Influence Parameters on its Growth in Apple Juice. *Biological Forum – An International Journal*. 2014. no. 6(2). pp. 41-45. DOI: 10.15515/abr.0976-4585.5.2.138142.
3. Yokota A., Fujii T., Goto K. *Alicyclobacillus*: Thermophilic Aci-dophilic Bacilli. Springer Science & Business Media, 2008. pp. 15-21.
4. Bahçeci K.S., Gokmen V., Acar J. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. *European Food Research and Technology*. 2005. no. 220(2), pp. 196-199. DOI: 10.1007/s00217-004-1018-y.
5. Aneja K. R., Dhiman R., Kumar N. A., Aneja A. Review Article. Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices. *International Journal of Microbiology*. 2014. pp. 14. Article ID 758942. DOI: 10.1155/2014/758942/.
6. Filippova R.L., Kolesnov A.Yu., Mukhamedzhanova T.G. *Bakterii roda Alicyclobacillus - vzbuditeli porchi fruktovykh sokov i napitkov*. [Bacteria of *Alicyclobacillus* genus are pathogens of spoilage of fruit juices and beverages]. *Pivo i napitki*. 2004. no. 3. pp. 30-32.
7. Filippova R.L., Mukhamedzhanova A.A., Kolesnov A.Yu. *Identifikatsiya bakteriy roda Alicyclobacillus vo fruktovykh sokakh i puti predotvrascheniya ikh porchi*. [Identification of bacteria of *Alicyclobacillus* genus in fruit juices and the ways to prevent product spoilage]. *Pivo i napitki*. 2004. no. 4. pp. 66-69.
8. M. Zeki Durak a, John J. Churey a, Michelle D. Danyluk b , Randy W. Worobo Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. Vol. 142. pp. 286-291.
9. Xiao-Chen Huang , Ya-Hong Yuan , Chun-Feng Guo , Vassilis Gekas *Alicyclobacillus* in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control // *Food Reviews International*, Vol. 31. 2015. pp. 91-124. DOI: 10.1080/87559129.2014.974266.
10. Osopale B. A., Witthuhn C. R., Albertyn J., Oguntinyinbo F. A. Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* spp. in contaminated commercial fruit juices. *Food Microbiology*. 2016. Vol. 56. pp. 21-28.
11. Bevilacqua A., Sinigaglia M., Corbo M.R. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*. 2008. no. 125. pp. 103-110. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.030.

Information about authors:

M.N. Kurbanova, PhD in Biology, senior researcher, the Laboratory of food quality and safety,
M.V. Trishkaneva, PhD in Chemical sciences, leading researcher, scientific secretary,
Zh.A. Semenova, researcher,
A.Yu. Kolokolova, PhD in Engineering, leading researcher,
M.T. Levshenko, senior researcher

All-Russian Research Institute of Canning Technology – Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS, Shkolnaya str., 78, Vidnoe, Moscow region, Russian Federation, 142703,
e-mail: vniitek@vniitek.ru