

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Matej BORNŠEK

OBVLADOVANJE BAKTERIJ VRSTE
Alicyclobacillus acidoterrestris **V SADNIH PIJAČAH**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Matej BORNŠEK

**OBVLADOVANJE BAKTERIJ VRSTE *Alicyclobacillus acidoterrestris*
V SADNIH PIJAČAH**

MAGISTRSKO DELO

**CONTROLLING OF *Alicyclobacillus acidoterrestris*
IN FRUIT BEVERAGES**

MASTER OF SCIENCE THESIS

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Senata Univerze v Ljubljani z dne 18. 4. 2011 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Barbara Jeršek.

Magistrsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v Pivovarni Union d.d. v Ljubljani.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Barbara Jeršek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Karmen Godič Torkar
Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Matej BORNŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Md
- DK UDK 579.67+579.24.08:543.2/.9:663.8(043)=163.6
- KG kvarljivci živil / *Alicyclobacillus* / sadne pijače / identifikacija bakterij / analize metode / elektronski nos / senzorična analiza / PCR v realnem času / HPLC-DAD / protimikrobna aktivnost / rastlinski ekstrakti / ekstrakt rožmarina / mlečna kislina
- AV BORNŠEK, Matej, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
- SA JERŠEK, Barbara (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
- LI 2013
- IN OBVLADOVANJE BAKTERIJ VRSTE *Alicyclobacillus acidoterrestris* V SADNIH PIJAČAH
- TD Magistrsko delo
- OP XI, 76 str., 21 pregl., 18 sl., 118 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakterije rodu *Alicyclobacillus* so kvarljivci sadnih pijač. Namen magistrske naloge je bil proučiti možnosti kontrole in nadzora bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah. V prvem delu smo uporabili alternativne metode (elektronski nos, PCR v realnem času, HPLC-DAD) določanja kvara. Rezultati analize pijač z elektronskim nosom so pokazali značilne razlike med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci pijač 1 in 2, medtem ko pri pijači 3 razlik ni bilo mogoče določiti. S PCR v realnem času smo potrdili bakterije vrste *A. acidoterrestris* v vseh kontaminiranih vzorcih sadnih pijač. Vzoredno smo opravili tudi senzorično analizo. Dobljene rezultate smo potrdili z metodo HPLC-DAD, s katero smo gvajakol kot spojino, značilno za kvar pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*, določili v vseh kontaminiranih vzorcih. V drugem delu smo testirali izbrane naravne protimikrobne snovi in določili njihovo uporabnost glede na pojav kvara in senzorične analize. Za določitev najprimernejše koncentracije ekstrakta rožmarina za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah smo uporabili senzorično analizo, metodo razredčevanja in qPCR. Rezultati so pokazali učinkovito inhibicijo rasti bakterij v vzorcih sadnih pijač 1 in 2 ob dodatku 0,04 % ekstrakta rožmarina. Hkrati smo s senzorično analizo istih vzorcev pokazali, da je ta dodatek nesprejemljiv. Manjša vsebnost dodanega ekstrakta rožmarina (0,02-0,01 %) v sadne pijače 1-4 je bila senzorično najbolj sprejemljiva za sadno pijačo 1, vendar je bila njihova protimikrobna aktivnost različna. Rezultati nadaljnjega testiranja dodatkov petih različnih komercialnih mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja v sadni pijači 1 so pokazali, da je bila komercialna mešanica B najprimernejša, medtem ko mlečna kislina (0,06 %) senzorično ni bila primeren protimikroben dodatek. Povzamemo lahko, da z izbranimi alternativnimi metodami lahko določamo prisotnost bakterij vrste *A. acidoterrestris*, vendar pa kvara ne moremo obvladovati. Uporaba naravnih protimikrobnih snovi pa daje možnosti obvladovanja kvara sadnih pijač, vendar je za vsako pijačo potrebna tudi vzoredna senzorična analiza.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 579.67+579.24.08:543.2/.9:663.8(043)=163.6
CX spoiling bacteria / *Alicyclobacillus* / fruit beverages / bacterial identification / analytical methods / electronic nose / sensory analysis / real-time PCR / HPLC-DAD / antimicrobial activity / plant extracts / rosemary extract / lactic acid
AU BORNŠEK, Matej
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology
PY 2013
TI CONTROLLING OF *Alicyclobacillus acidoterrestris* IN FRUIT BEVERAGES
DT M.Sc. Thesis
NO XI, 76 p., 21 tab., 18 fig., 118 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacteria of the *Alicyclobacillus* genus causes spoilage of fruit beverages. The aim of the thesis was to study the possibilities of control and surveillance of *A. acidoterrestris* in selected beverages. In the first part, we used some alternative methods (an electronic nose, real-time PCR, HPLC-DAD) to determine the spoilage. Results obtained with electronic nose showed significant differences between the contaminated and not-contaminated samples of the beverages 1 and 2 while for the beverage 3 the differences could not be determined. Using the real time PCR, *A. acidoterrestris* was detected in all contaminated samples of the tested beverages. In parallel we carried out a sensory analysis and the obtained results were confirmed by HPLC-DAD method. Thus, guaiacol that indicates the spoilage of beverages with *Alicyclobacillus* spp. was identified in all contaminated samples. In the second part, we tested the selected natural antimicrobial substances and determined their applicability according to the spoilage and sensory analysis. A determination of the most suitable concentration of the rosemary extract for *A. acidoterrestris* in the beverages was carried out by the sensory analysis, the macrodilution method and qPCR. The results showed effective bacterial growth inhibition in the samples of beverages 1 and 2 with the addition of 0.04% of the rosemary extract. In parallel, the results of sensory analysis of the same beverages samples showed that the additions were unacceptable. Among the tested lower concentrations of the rosemary extract (0.02-0.01%) in the beverages 1-4, addition was organoleptically acceptable only for the beverage 1 but its antimicrobial effect was different. The results of further investigation of the addition of five different commercial mixtures of extracts of rosemary, some citrus and green tea in the beverage 1 showed that the commercial mixture B was the most appropriate while lactic acid (0.06%) as antimicrobiological substance was organoleptically unacceptable. We can conclude that the selected alternative methods can be useful for detection of *A. acidoterrestris* but cannot be useful for the controlling of the spoilage. The addition of natural antimicrobials can be useful for controlling the spoilage of beverages, but for every beverage the sensory analysis should be carried out in parallel.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i>	3
2.1.1 Zgodovina in klasifikacija.....	3
2.1.2 Morfološke lastnosti	5
2.1.3 Fiziološke in biokemijske lastnosti.....	6
2.1.4 Patogenost	7
2.1.5 Toplotna odpornost	8
2.2 BAKTERIJE RODU <i>Alicyclobacillus</i> KOT KVARLJIVCI SADNIH PIJAČ ...	8
2.2.1 Viri kontaminacij sadnih pijač.....	9
2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na kvar sadnih pijač	9
2.2.3 Spremembe senzoričnih lastnosti sadnih pijač	10
2.2.3.1 Gvajakol	11
2.2.3.2 Halofenoli	14
2.3 MOŽNOSTI OBVLADOVANJA KVARA SADNIH PIJAČ, POVZROČENEGA Z BAKTERIJAMI RODU <i>Alicyclobacillus</i>	15
2.3.1 Določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i>	15
2.3.1.1 Klasične mikrobiološke metode	15
2.3.1.2 PCR.....	16
2.3.1.3 PCR v realnem času.....	16
2.3.1.4 Kvantitativni PCR v realnem času	19
2.3.1.5 Elektronski nos	19
2.3.1.6 Senzorična analiza	22
2.3.1.7 Analiza HPLC-DAD	22
2.3.2 Naravne protimikrobne snovi.....	23
2.3.2.1 Rožmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	24
2.3.2.2 Mlečna kislina	25
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA.....	27

3.1.1	Uporaba elektronskega nosu in PCR v realnem času kot alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač z bakterijami rodu <i>Alicyclobacillus</i>...	28
3.1.2	Možnosti inhibicije rasti bakterij vrste <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> z dodatkom rožmarinovitih ekstraktov in mlečne kisline.....	29
3.2	MATERIALI	30
3.2.1	Vzorci sadnih pijač	30
3.2.2	Kemikalije	30
3.2.3	Reagenti za PCR v realnem času.....	31
3.2.4	Reagenti za qPCR.....	31
3.2.5	Protimikrobne snovi.....	32
3.2.6	Bakterijski sevi.....	32
3.2.7	Mikrobiološka gojišča	33
3.2.8	Aparature in oprema.....	34
3.3	METODE	34
3.3.1	Analiza z elektronskim nosom.....	34
3.3.2	PCR v realnem času	35
3.3.3	qPCR.....	36
3.3.4	Analiza HPLC-DAD	37
3.3.5	Senzorična analiza	37
3.3.5.1	Senzorična analiza vzorcev, analiziranih z elektronskim nosom	37
3.3.5.2	Senzorična analiza vzorcev, uporabljenih pri določanju najprimernejše koncentracije ekstraktov rožmarina.....	37
3.3.6	Določanje najprimernejše koncentracije ekstrakta rožmarina in mešanic ekstraktov	38
3.3.6.1	Protimikrobna učinkovitost 0,04 % ekstrakta rožmarina	38
3.3.6.2	Protimikrobna učinkovitost 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstrakta rožmarina....	39
3.3.6.3	Protimikrobna učinkovitost mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja.....	41
3.3.7	Določanje najprimernejše koncentracije mlečne kisline	42
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	45
4.1	UPORABA ALTERNATIVNIH METOD DOLOČANJA KVARA SADNIH PIJAČ Z BAKTERIJAMI RODU <i>Alicyclobacillus</i>	45
4.1.1	Določitev kvara sadnih pijač z elektronskim nosom	45
4.1.2	Določitev bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v sadnih pijačah s PCR v realnem času.....	47
4.1.3	Določitev gvajakola v sadnih pijačah s HPLC-DAD.....	48
4.1.4	Senzorična analiza sadnih pijač	50
4.2	INHIBICIJA RASTI BAKTERIJ VRSTE <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> Z DODATKOM ROŽMARINOVITIH EKSTRAKTOV IN MLEČNE KISLINE..	52

4.2.1.1	Protimikrobna učinkovitost 0,04 % ekstrakta rožmarina	52
4.2.1.2	Protimikrobna učinkovitost 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstraktov rožmarina .	55
4.2.1.3	Protimikrobna učinkovitost mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja.....	60
4.2.2	Določanje najprimernejše protimikrobne koncentracije mlečne kisline	62
5	SKLEPI	64
6	POVZETEK (SUMMARY).....	65
6.1	POVZETEK	65
6.2	SUMMARY	66
7	VIRI	68
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Bakterije rodu <i>Alicyclobacillus</i> (Smit in sod., 2010)	5
Preglednica 2:	Vzorci sadnih pijač.....	30
Preglednica 3:	Protimikrobne snovi	32
Preglednica 4:	Sestavine gojišča ALI	33
Preglednica 5:	Sestavine tekočega gojišča BAT	33
Preglednica 6:	Aparature uporabljene pri eksperimentalnem delu	34
Preglednica 7:	Opis vzorcev za določitev protimikrobne aktivnosti 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX	38
Preglednica 8:	Opis vzorcev za določitev najprimernejše koncentracije ekstrakta rožmarina SyneROX	40
Preglednica 9:	Opis vzorcev za določitev protimikrobne aktivnosti 0,06 % mlečne kisline	43
Preglednica 10:	Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> v vzorcih sadnih pijač 1, 2 in 3	47
Preglednica 11:	Vsebnost gvajakola v kontaminiranih in nekontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1-3.	50
Preglednica 12:	Senzorična analiza vzorcev sadnih pijač 1, 2 in 3, kontaminiranih z bakterijami vrste <i>A. acidoterrestris</i>	51
Preglednica 13:	Rezultati določanja najprimernejše protimikrobne koncentracije ekstrakta rožmarina SyneROX	53
Preglednica 14:	Senzorična analiza sadnih pijač 1 in 2 z dodatkom 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX	53
Preglednica 15:	qPCR za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> v vzorcih sadnih pijač 1 in 2	55
Preglednica 16:	Protimikrobna aktivnost ekstrakta rožmarina v kontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1-4	56
Preglednica 17:	Senzorična analiza sadnih pijač 1, 2, 3 in 4 z dodatkom ekstrakta rožmarina SyneROX	58
Preglednica 18:	Protimikrobna aktivnosti mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja na bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> v sadni pijači 1	60
Preglednica 19:	Senzorična analiza sadne pijače 1 z dodatkom mešanice ekstraktov B.	61
Preglednica 20:	Protimikrobna aktivnost mlečne kisline (0,06 %) v sadnih pijačah 1 in 3	62
Preglednica 21:	Senzorična analiza sadne pijače 1 z dodatkom mlečne kisline	63

KAZALO SLIK

Slika 1:	Celice bakterij rodu <i>Alicyclobacillus</i> pod mikroskopom (A) in kolonije (B) na gojišču YSG (glukozno-škrobno-krvasni agar); od leve proti desni bakterije vrste: <i>A. pomorum</i> , <i>Alicyclobacillus</i> genomsko vrsta 1, <i>A. acidocaldarius</i> , <i>A. acidoterrestris</i> (Goto in sod., 2007).....	6
Slika 2:	Strukturna formula ω -cikloheksilne (A) in ω -cikloheptilne (B) maščobne kisline (Goto in sod., 2007).....	7
Slika 3:	Strukturna formula aliciklične maščobne kisline, izolirane iz bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> (Goto in sod., 2007).....	7
Slika 4:	Nastanek gvajakola in drugih metabolnih produktov iz ferulne kisline (Smit in sod., 2010).....	12
Slika 5:	Strukturna formula 2,6-diklorofenola (A) in 2,6-dibromofenola (B) (Jensen, 1999)	14
Slika 6:	Faze pomnoževanja tarčne molekule DNA s PCR (Wong in Medrano, 2005)	17
Slika 7:	Krivulja pomnoževanja DNA s PCR v realnem času (qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR, 2013).....	18
Slika 8:	Funkcionalne komponente elektronskega nosu (Ponzoni in sod., 2012)	20
Slika 9:	Shema eksperimentalnega dela	27
Slika 10:	Shema eksperimentalnega dela uporabe elektronskega nosu in PCR v realnem času kot alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač z bakterijami rodu <i>Alicyclobacillus</i>	28
Slika 11:	Shema eksperimentalnega dela določitve najprimernejše koncentracije protimikrobne snovi za bakterije vrste <i>A. acidoterrestris</i> . Ekstrakti A, B, C, D, E so ekstrakti rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja.	29
Slika 12:	Shema določanja protimikrobne učinkovitosti 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX	39
Slika 13:	Shema določanja protimikrobne učinkovitosti 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstrakta rožmarina SyneROX.....	41
Slika 14:	Shema določanja najprimernejše koncentracije mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja A - E.....	42
Slika 15:	Shema določanja protimikrobno najprimernejše koncentracije mlečne kisline	44
Slika 16:	Projekcija spremenljivk v ravnini, definirani z dvema glavnima komponentama PC2 in PC3, določenima z elektronskim nosom v sadni pijači 1 (a), v sadni pijači 2 (b) in v sadni pijači 3 (c).....	46
Slika 17:	Kromatogrami določitve gvajakola v vzorcih sadnih pijač 1-3 z analizo HPLC-DAD.....	49

Slika 18:	Standardna krivulja odvisnosti signala qPCR (Ct) od števila bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> (log CFU/100 μ l) (modre točke) in rezultati vzorcev sadne pijače 1 in 2 (rdeče točke).....	54
-----------	--	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAM	gojišče <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (ang. <i>A. acidocaldarius</i> Medium)
ALI	gojišče <i>Alicyclobacillus</i> (ang. <i>Alicyclobacillus</i> Medium)
BAT	gojišče <i>Bacillus acidoterrestris</i>
Brix	sladkorna stopnja
CFU	kolonijska enota
Ct	cikel, pri katerem ΔRn preseže določen prag fluorescence ozadja
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
cDNA	komplementarna DNA
Ekstrakti A-E	ekstrakti rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja označeni z A - E
GC/MS	plinska kromatografija z masnim detektorjem
HPLC-DAD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod
kNN	koeficient k-najbližjih sosedov (ang. k-Nearest Neighbor)
LDA	linearna diskriminantna analiza (ang. Linear Discriminant Analysis)
LOD	meja detekcije (ang. Limit of Detection)
OSA	gojišče oranžni agar (ang. Orange Serum Agar)
PCA	metoda glavnih komponent (ang. Principal Component Analysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PDA	gojišče krompirjev dekstrozni agar (ang. Potato Dextrose Agar)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (ang. Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina
R ²	korelacijski koeficient
SVM	metoda podpornih vektorjev (ang. Support Vector Machine)
UV	ultravijolični spekter svetlobe
VIS	vidni spekter svetlobe
YSG	gojišče glukozno-škrobno-kvasni agar
2,6-DBF	2,6-dibromofenol
2,6-DCF	2,6-diklorofenol
ΔRn	normaliziran fluorescenten signal

1 UVOD

Sadne pijače so pripravljene iz sadnih sokov, mešanice teh ali sadnih koncentratov in razredčene z navadno ali mineralno vodo. Vsebujejo veliko različnih a dovoljenih aditivov in zelo malo hranilnih snovi, kot so vitamini in minerali, čeprav jih posameznim pijačam proizvajalci dodajajo (Jorge, 2003). V sadnih pijačah, katerih je pH nižji od 4, so najpogostejši kvarljivci acidotolerantne kvasovke in plesni, medtem ko bakterijske spore v takih razmerah, z izjemo nekaterih, nimajo sposobnosti klitja in kasnejše tvorbe vegetativnih celic (Tokuda, 2007). Leta 1982 so v Nemčiji zabeležili nov tip kvara, ki se je pojavil v aseptično pakiranih jabolčnih sokovih. Kvar naj bi povzročale sporogene in acidofilne bakterije. Sprva so bili raziskovalci mnenja, da kvar povzročajo bakterije rodu *Bacillus*, vendar pa so leta 1992 ugotovili, da gre za popolnoma nov rod bakterij, ki so ga poimenovali *Alicyclobacillus* (Wisotzkey in sod., 1992). Spore omenjenih bakterij lahko najdemo v vodi, sadnih koncentratih, sladkorju in drugih surovinah, ki se uporabljajo za pripravo sadnih pijač. Ker preživijo postopek toplotne obdelave (pasterizacija), lahko pomenijo tveganje za kontaminacijo in kvar končnega proizvoda (Sawaki, 2007a). Kvar v sadnih pijačah, ki se odraža predvsem v spremenjeni aromi pijač, lahko povzročajo le nekatere vrste bakterij iz rodu *Alicyclobacillus*, od katerih so najpogostejši povzročitelji bakterije iz vrste *A. acidoterrestris* (Walls in Chuyate, 1998; Sawaki, 2007a; Smit in sod., 2010).

Na zmanjšano stopnjo kontaminacije sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* lahko pomembno vpliva tehnološki postopek priprave in polnjenja sadnih pijač. Da bi zmanjšali stopnjo kontaminacije, je na začetku procesa najpomembnejše ustrezno čiščenje oz. pranje sadja. Izpiranje mora potekati s higiensko neoporečno vodo, ki ji dodajajo različne detergente ali baktericide (natrijev hipoklorid, vodikov peroksid). Če faza čiščenja sadja ni učinkovita, lahko z bakterijami oz. njihovimi sporami kontaminiramo celoten sistem proizvodnje sadnih pijač (ekstrakcija, filtracija, centrifugiranje, koncentracije, polnjenje). Zato se kot dodatna preventivna ukrepa priporočata tudi filtracija končnega proizvoda (Takahashi in sod., 2007) in tretiranje sadnih napitkov z visokim tlakom (Lee in sod., 2002). Za sadne pijače, ki jih ni mogoče filtrirati, se priporoča uporaba sevanja z UV-žarki (Takahashi in sod., 2007).

Današnji potrošniki se vse bolj zavedajo pomena kakovosti izdelkov, s tem pa raste tudi njihovo pričakovanje po stabilnosti proizvodov. Zaradi izgube kakovosti in neobstoynosti živila lahko proizvajalci sadnih pijač utrpijo gospodarsko škodo in izgubijo ugled, ki ga je težko popraviti. Proizvajalci sadnih pijač trenutno pospešeno proučujejo tudi ustrezne protimikrobne sestavine, ki bi imele zaviralni učinek na bakterije rodu *Alicyclobacillus* in ne bi spremenile senzoričnih lastnosti že obstoječih proizvodov (Chang in Kang, 2004). Nove metode za preprečevanje vzklitja bakterijskih spor v živilu vključujejo uporabo

rastlinskih ekstraktov, eteričnih olj, bakteriocina enterocina AS-48 (Grande in sod., 2005) ter naravnih spojin lizocima (Bevilacqua in sod., 2008), nizina (Yamazaki in sod., 2000; Bevilacqua in sod., 2008), proteinov α - in β -tionina iz ječmena in pšenice (Oito, 2002). K zmanjšanemu kvaru sadnih pijač lahko prispevajo tudi dobre analitske metode za zgodnje odkrivanje začetkov kvara v živilu, saj klasične mikrobiološke analize navadno trajajo dalj časa (nekaj dni ali celo tednov) in zato niso najprimernejše za proizvajalce sadnih pijač.

1.1 CILJI NALOGE

Glede na namen magistrske naloge smo cilje združili v dva glavna sklopa:

- proučevanje uporabe alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač, ki ga povzročajo bakterije vrste *A. acidoterrestris*,
- proučevanje možnosti inhibicije rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris* z dodatkom rožmarinovit ekstraktov, mešanice ekstraktov rožmarina nekaterih citrusov in zelenega čaja ter mlečne kisline.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Raziskave v okviru magistrske naloge bodo usmerjene v proučevanje izbranih parametrov, s katerimi bi lahko obvladovali kvar sadnih pijač.

- Elektronski nos lahko uporabimo kot alternativno, hitro metodo določanja začetka kvara sadnih pijač, ki je posledica kontaminacije sadne pijače z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*.
- PCR v realnem času in qPCR omogočata specifično in hitro identifikacijo ter kvantifikacijo bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah.
- Odpornost bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah proti protimikrobnim snovem je odvisna predvsem od stopnje kontaminacije živila.
- Mlečna kislina in različni ekstrakti rožmarina bodo imeli protimikrobni učinek proti bakterijam vrste *A. acidoterrestris* v modelnih raztopinah in v sadnih pijačah.
- Dodatki mlečne kisline in različnih ekstraktov rožmarina ne bodo vplivali na senzorične lastnosti sadnih pijač.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus*

2.1.1 Zgodovina in klasifikacija

Uchino in Doi sta leta 1967 prva izolirala bakterije rodu *Alicyclobacillus* iz vzorcev vročih termalnih vrelic blizu jezera Tazawa na Japonskem. Prve mikrobiološke preiskave so pokazale, da so bili izolati veliko bolj sorodni bakterijam vrste *Bacillus coagulans* kot pa ostalim vrstam rodu *Bacillus* (Sawaki, 2007b). Bakterije vrste *Bacillus coagulans* lahko rastejo pri pH 4,2 za razliko od preostalih vrst tega rodu, ki rastejo v bolj alkalnem in nevtralnem okolju (Walls in Chuyate, 1998).

Nekaj let pozneje sta Darland in Brock (1971) bakterije izolirala iz kopenskih in vodnih vzorcev površin dveh nacionalnih parkov v ZDA, in sicer parka Yellowstone in Havajskega vulkanskega nacionalnega parka. Novo vrsto bakterij so na podlagi taksonomskega uvrščanja poimenovali *Bacillus acidocaldarius* kljub dejstvu, da se je nova vrsta razlikovala od preostalih vrst rodu *Bacillus* (Goto, 2007). Za omenjeno vrsto bakterij so bile značilne acido-termofilne lastnosti in sporogenost, od preostalih vrst bakterij rodu *Bacillus* pa se je omenjena vrsta ločila po vsebnosti ω -alicikličnih maščobnih kislin in hopanoidov, ki so bili prisotni le v celični membrani nove vrste bakterij (Sawaki, 2007b; Walls in Chuyate, 1998). Te maščobne kisline naj bi igrale pomembno vlogo pri višji odpornosti bakterij rodu *Alicyclobacillus* proti visokim temperaturam in nizkemu pH (Chang in Kang, 2004).

Bakterije vrste *A. acidoterrestris* so leta 1984 prvi opisali Cerny in sod., ki so ugotovili, da so te bakterije povzročile kvar jabolčnih sokov v Nemčiji leta 1982. Kasneje so isto vrsto bakterij izolirali tudi iz pokvarjenih sokov drugje po svetu (Velika Britanija, Avstralija, Japonska, ZDA) (Chang in Kang, 2004). Do kvara je sicer prihajalo že prej, vendar te vrste bakterij niso poznali. Sprva so domnevali, da gre za vrsto *Bacillus acidocaldarius*, vendar pa so na podlagi kasnejših preiskav ugotovili, da gre za vrsto *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Chang in Kang, 2004; Sawaki, 2007a; Smit in sod., 2010).

Cerny in sod. (1984) so prvi izolirali bakterije z vsebnostjo ω -alicikličnih maščobnih kislin iz ne-termalnega vira (vroči vreli in izviri). Bakterije so izolirali iz pokvarjenega jabolčnega sadnega soka, ki je imel neprijeten vonj. Tudi Hippchen s sod. (1981) je podobne bakterije izoliral iz vzorcev zemlje, v kateri niso veljale termofilne in acidofilne razmere, so bili pa izolati bakterij podobni tistim, ki so povzročili kvar jabolčnega soka. Kljub dejstvu, da genetska povezava obeh novih vrst bakterij, ki so jih izolirali iz zemlje in jabolčnega soka, v primerjavi z vrsto *B. acidocaldarius* ni bila dokazana (razmerje gvanin-

citozin ni bilo določeno), je prisotnost ω -alicikličnih maščobnih kislin in hopanoidov kazala na njihovo sorodnost. Novi vrsti so Deinhard in sod. (1987) zaradi drugačne sestave celične membrane poimenovali bakterije vrst *B. acidoterrestris* in *B. cycloheptanicus*. Celična membrana bakterij vrste *B. acidocaldarius* je bila namreč v večjem delu sestavljena iz ω -cikloheksilnih maščobnih kislin, medtem ko je bila pri obeh novih vrstah celična membrana sestavljena iz ω -cikloheptilnih maščobnih kislin. Razlike med omenjenimi vrstami je pokazala tudi sekvenčna analiza 16S rRNA. Primarne primerjave sekvenc so pokazale, da sta vrsti *B. acidoterrestris* in *B. acidocaldarius* skoraj enaki (98,8 %) in da spadata v isti rod. Vrsta *B. cycloheptanicus* je bila drugima dvema vrsta manj podobna (93,2 % in 92,7 %). Sekundarne primerjave sekvenc 16S rRNA so pokazale podobnost vseh treh vrst in drugačnost od preostalih vrst rodu *Bacillus*. Zaradi omenjenih ugotovitev so Wisotzkey in sod. (1992) vse tri vrste, torej *B. acidocaldarius*, *B. acidoterrestris* in *B. cycloheptanicus*, preimenovali v *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* in *A. cycloheptanicus*.

V zadnjih dveh desetletjih je bilo odkritih veliko primerov kvara sadnih sokov, ki so ga povzročile bakterije rodu *Alicyclobacillus*. Splittstoesser in sod. (1994) so omenjene bakterije izolirali iz pokvarjenega jabolčnega soka v ZDA. Yamazaki in sod. (1996) so bakterije vrste *A. acidoterrestris* izolirali iz pokvarjenega sadnega soka na Japonskem. Isto vrsto so izolirali iz pokvarjenega ledenega čaja (Duong in sod., 2000) in ostalih sadnih sokov na Japonskem (Yamazaki in sod., 1996), v Avstraliji (Sawaki, 2007b), Južnoafriški republiki (Groenewald in sod., 2009) in Braziliji (McKnight in sod., 2010).

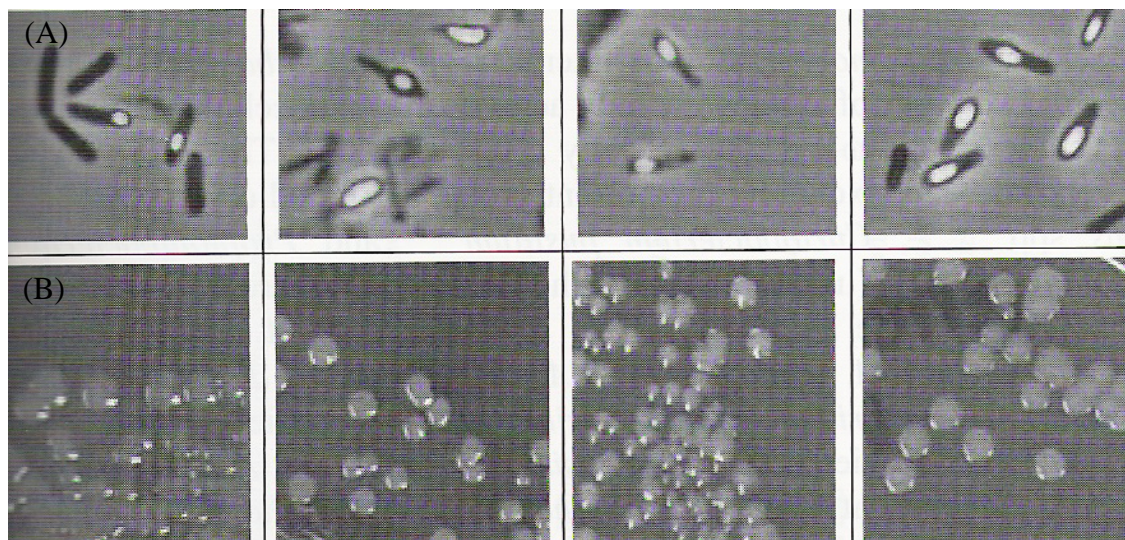
Poleg že odkritih vrst so bile opravljene tudi nove raziskave, katerih rezultati so bili tudi odkritje novih vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Tako so Albuquerque in sod. (2000) iz vzorcev vulkanske zemlje izolirali bakterije vrste *A. hesperidum*. Goto in sod. (2002) so iz vzorcev zeliščnega čaja hibiskusa (pripravljen iz posušenih listov hibiskusa) izolirali bakterije vrste *A. herbarius*. Slednje so bolj sorodne bakterijam vrste *A. cycloheptanicus*, saj je celična membrana pretežno grajena iz ω -cikloheptilnih maščobnih kislin. Nekateri avtorji (Goto in sod., 2003; Matsubara in sod., 2002) so iz vzorcev kislh pijač izolirali bakterije vrste *A. acidiphilus*, iz vzorcev mešanega sadnega soka (jabolka, maline, ananas, mango in pomaranča) pa bakterije vrste *A. pomorum*, za katere je značilno, da njihova celična membrana ni sestavljena iz ω -alicikličnih maščobnih kislin, kot je bilo to ugotovljeno pri ostalih. Imperio in sod. (2008) so iz vzorcev geotermalne zemlje na Antarktiki izolirali bakterije vrste *A. pohliae*. Tudi bakterije, ki so bile sprva uvrščene v rod *Sulfobacillus*, so bile zaradi dodatnih preiskav (analiza sekvenc 16S rRNA) preimenovali v rod *Alicyclobacillus* (Karavaiko in sod., 2005). V rod *Alicyclobacillus* je trenutno uvrščenih devetnajst vrst, dve podvrsti in dve genomski vrsti (Preglednica 1) (Smit in sod., 2010).

Preglednica 1: Bakterije rodu *Alicyclobacillus* (Smit in sod., 2010)
Table 1: Species of bacteria in *Alicyclobacillus* genus (Smit et al., 2010)

<i>A. acidiphilus</i>	<i>A. acidocaldarius</i>	<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>A. contaminans</i>
<i>A. cycloheptanicus</i>	<i>A. disulfidooxidans</i>	<i>A. fastidiosus</i>
<i>A. ferrooxydans</i>	<i>A. genomsk</i> a vrsta 1 (<i>A. mali</i>)	<i>A. genomsk</i> a vrsta 2
<i>A. herbarius</i>	<i>A. hesperidum</i>	<i>A. kakegawensis</i>
<i>A. macrosporangiidus</i>	<i>A. pohliae</i>	<i>A. pomorum</i>
<i>A. sacchari</i>	<i>A. sendaiensis</i>	<i>A. shizuokensis</i>
<i>A. tolerans</i>	<i>A. vulcanalis</i>	

2.1.2 Morfološke lastnosti

Vegetativne celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* so paličaste oblike z terminalnimi ali subterminalnimi sporami (Slika 1), 0,7-1 μ m široke in 3-5 μ m dolge (Goto in sod., 2007; Chang in Kang, 2004). Vse celice se na začetku kulture obarvajo grampozitivno, razen celice vrste *A. sendaiensis*, ki so gramnegativne. Proti koncu kulture je večina celic gram-variabilnih ali gramnegativnih, kar je posledica različnih dejavnikov, kot so: starost kulture, čas razbarvanja in zgradba celične stene (Smit in sod., 2010). Velikost kolonij je odvisna od rastnega medija, vendar običajno v premeru merijo 2-5 mm (Goto, 2007). Kolonije na gojišču BAM (gojišče *Bacillus acidocaldarius* medium) so praviloma okrogle oblike, kremno bele barve, ravne, prosojne ali neprosojne (Chang in Kang, 2004). Morfologija kolonije je odvisna od seva, s starostjo pa postajajo temnejše (Goto, 2007).



Slika 1: Celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* pod mikroskopom (A) in kolonije (B) na gojišču YSG (glukožno-škrobno-krvasni agar); od leve proti desni bakterije vrste: *A. pomorum*, *Alicyclobacillus* genomski vrsta 1, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* (Goto in sod., 2007)

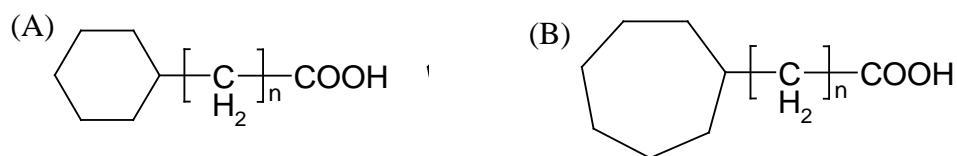
Figure 1: The cells of *Alicyclobacillus* spp. under the microscope (A) and the colonies (B) on YSG medium (glucose-yeast-starch agar), from left to right *A. pomorum*, *Alicyclobacillus* genomic specie 1, *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* (Goto et al., 2007)

2.1.3 Fiziološke in biokemijske lastnosti

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* rastejo v temperaturnem območju med 20-70 °C (Chang in Kang, 2004), z izjemo bakterij vrst *A. disulfidooxidans*, *A. tolerans* (Karavaiko in sod., 2005) in *A. ferrooxydans*, ki lahko rastejo tudi pri temperaturi pod 20 °C (Jiang in sod., 2008). Optimalna temperatura rasti je med 35-60 °C (Smit in sod., 2010). Čeprav gre za striktno aerobe, lahko te bakterije preživijo tudi v mikroaerofilnih razmerah (delež 0,1 % kisika še omogoča rast), vendar se rast celic ustavi, ko se zaloge kisika izčrpajo, kljub prisotnosti hranljivih snovi. Na tej stopnji celice sporulirajo. Imajo sposobnost prevrevanja različnih sladkorjev in proizvajajo kisline, vendar pri tem ne tvorijo plina. Snovi, kot so NaCl, organske kisline, polifenoli in alkoholi, lahko inhibitorno vplivajo na njihovo rast (Goto in sod., 2007).

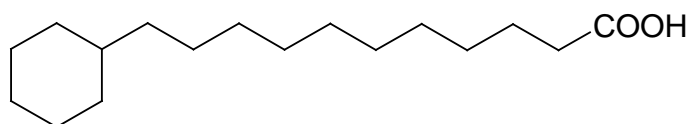
Ker bakterije rodu *Alicyclobacillus* spadajo v acidofilno skupino bakterij, je za njih značilno, da rastejo pri pH nižjem od 7 in sicer v območju med 2,0-6,5 (Chang in Kang, 2004; Smit in sod., 2010) in optimalnim pH rasti 3,0-5,5 (Matsubara in sod., 2002). Izjemo predstavljata le vrsti *A. disulfidooxidans* in *A. tolerans*, ki lahko rastejo pri pH nižjem od 1,5 (Karavaiko in sod., 2005).

Z izjemo vrste *A. pomorum* je posebnost večine vrst bakterij rodu *Alicyclobacillus* prisotnost ω -alicykličnih maščobnih kislin (ω -cikloheksilne in ω -cikloheptilne; Slika 2 in Slika 3) v celični membrani (Goto, 2003; Chang in Kang, 2004; Smit in sod., 2010). Te maščobne kisline naj bi zaradi svoje tesne krožne razporejenosti tvorile zaščitni plašč celične membrane in tako prispevale k večji odpornosti proti visokim temperaturam in nizkim pH vrednostim (Chang in Kang, 2004). ω -alicyklične maščobne kisline so zelo redke in jih lahko najdemo le še v celičnih membranah bakterij rodu *Sulfobacillus*, vrst *Curtobacterium pusillum* in *Propionibacterium cyclohexanicum* (Goto in sod., 2007). Celično membrano iz ω -cikloheksilnih maščobnih kislin imajo zgrajene naslednje vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*: *A. acidocaldarius*, *A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius*, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*, *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. disulfidooxidans*, *Alicyclobacillus* genomski vrsta 1 (*A. mali*), *Alicyclobacillus* genomski vrsta 2, *A. hesperidum*, *A. sendaiensis*, *A. tolerans* in *A. vulcanalis*. Bakterije vrst *A. cycloheptanicus*, *A. herbarius*, *A. kakegawensis* in *A. shizuokensis* imajo celično membrano zgrajeno pretežno iz ω -cikloheptilnih maščobnih kislin (Smit in sod., 2010).



Slika 2: Strukturna formula ω -cikloheksilne (A) in ω -cikloheptilne (B) maščobne kisline (Goto in sod., 2007)

Figure 2: Structural formula of ω -cyclohexyl (A) and ω -cycloheptyl (B) fatty acids (Goto et al., 2007)



Slika 3: Strukturna formula aliciklične maščobne kisline, izolirane iz bakterij vrste *A. acidoterrestris* (Goto in sod., 2007)

Figure 3: Structural formula of alicyclic fatty acid derived from *A. acidoterrestris* (Goto et al., 2007)

2.1.4 Patogenost

O toksikoloških in patogenih značilnosti bakterij rodu *Alicyclobacillus* je na voljo relativno majhno število informacij. Walls in Chuyate (2000) sta naredila test patogenosti pri bakterijskih vrstah *A. acidoterrestris* in *A. acidocaldarius*. S kontaminiranim jabolčnim sokom (št. celic 5×10^6 CFU/ml) sta hranila morske prašičke in v obeh primerih po enem tednu ni bilo ugotovljenih nobenih simptomov bolezni ali smrti. Tudi novejša raziskava kažejo, da bakterije rodu *Alicyclobacillus* sodijo med za človeka in živali ne-patogene bakterije (Mavromatis in sod., 2010).

2.1.5 Toplotna odpornost

Toplotno odpornost bakterijskih vegetativnih celic in njihovih spor merimo z decimalnim redukcijskim časom (D-vrednost). D-vrednost je čas v minutah, ki je potreben, da se neka bakterijska populacija v določenem okolju in pri določeni temperaturi zmanjša za desetino njene začetne vrednosti. Kaže torej hitrost odmiranja bakterij pri določeni temperaturi. Za oceno inaktivacije mikroorganizmov pri različnih temperaturah se izračunava z-vrednost. Z-vrednost izraža toplotno odpornost mikroorganizmov ob različnih temperaturah toplotne obdelave (Bizjak in Bem, 2003). Za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v sadnih sokovih iz jabolk, grozdja, jagod, pomaranč, limon in grenivk so bile vrednosti $D_{95^{\circ}\text{C}}$ od 1,00 do 9,98 minut, z-vrednosti pa od 6,90 do 21,27 °C (Smit in sod., 2010). Na toplotno odpornost vplivajo pH, temperatura, vsebnost suhe snovi (Silva in Gibbs, 2001; Chang in Kang, 2004), vodna aktivnost, vrsta bakterij, prisotnost ali odsotnost bivalentnih kationov in protimikrobnih snovi (Smit in sod., 2010).

2.2 BAKTERIJE RODU *Alicyclobacillus* KOT KVARLJIVCI SADNIH PIJAČ

Kvar sadnih sokov in drugih živil z nizkim pH prvotno ni bil določen kot posledica prisotnosti bakterijskih spor (Splittstoesser in sod., 1994). Rast termofilnih in nekaterih sporogenih bakterij je namreč možno omejiti z nizkim pH živila. Tako npr. spore bakterij vrste *Clostridium botulinum* niso sposobne kliti in tvoriti toksina pri pH nižjem od 4,6. Bakterije vrste *Bacillus stearothermophilus*, ki prav tako spadajo v skupino kvarljivcev, ne morejo rasti pri pH nižjem od 5,3 (Chang in Kang, 2004). Vrednost pH sadnih sokov je naravno nižja od 4,6, kar zavira rast mnogih bakterij, kvasovk in nekaterih plesni. S pasterizacijskim postopkom toplotne obdelave v živilih uničimo toplotno občutljive mikroorganizme, kot so mlečnokislinske bakterije, kvasovke in nekatere vrste plesni. Kljub temu nekateri mikroorganizmi take razmere lahko preživijo v obliki spor (Eiroa in sod., 1999).

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* lahko rastejo v kislem okolju, preživijo toplotno obdelavo v obliki spor in kasneje povzročajo kvar pasteriziranih sadnih sokov. Kvar živila, ki ga je bilo težko vizualno opaziti, se je odražal v obliki spremenjene arome proizvoda, ki ga opisujejo kot »medicinski« ali pa »razkužilen« vonj, z ali brez tvorbe sedimenta, in se je pojavil predvsem v obdobju poletnih mesecev v sadnih sokovih (Duong in Jensen, 2000). Najpogosteje se je kvar pojavil v jabolčnem soku, ki predstavlja 24 % tržni delež prodaje vseh sokov v svetu (Chang in Kang, 2004). Leta 1999 so ugotovili, da spremenjeno aromo lahko povzročajo le nekatere vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Sawaki, 2007b).

2.2.1 Viri kontaminacij sadnih pijač

Sadje, ki se uporablja kot surovina pri pripravi sadnih sokov, je lahko kontaminirano s primarno ali sekundarno mikrofloro. V primarno mikrofloro spadajo mikroorganizmi, ki naravno naseljujejo zunanje površine sadja (Chang in Kang, 2004). V sekundarno mikrofloro pa spadajo mikroorganizmi, ki preko zemlje, prahu, insektov, ptičev ali drugih prenašalcev lahko kontaminirajo površino sadja (Jensen, 1999). Zemlja predstavlja najpogostejši vir bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Bakterije vrste *A. acidocaldarius* so izolirali iz zemlje sadovnjakov z jablanami in hruškami v južni Afriki (Smit in sod., 2010). Stopnja okužbe sadja preko zemlje je v sušnih obdobjih višja, saj veter lažje prenaša zemljo z mikroorganizmi kot v deževnem obdobju. V primeru, da zemlja pride v stik z povrhnjico sadja in tekom tehnološkega procesa le-ta ni dovolj očiščena, lahko bakterije pridejo v proizvodnjo s površine neopranega ali slabo opranega sadja in kasneje povzročijo kvar končnega proizvoda (Chang in Kang, 2004). Vir okužbe pa je lahko tudi človek, ki zemljo z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* prenese v proces proizvodnje sadnih sokov (Smit in sod., 2010). Z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* sta lahko okužena tudi voda (McIntyre in sod., 1995; Walls in Chuyate, 1998) in sladkorni sirup (Goto in sod., 2006).

2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na kvar sadnih pijač

Izmed predhodno naštetih so najpogostejši povzročitelji kvara sadnih pijač bakterije iz vrste *A. acidoterrestris* (Walls in Chuyate, 1998; Sawaki, 2007; Smit in sod., 2010). Kvar lahko povzročajo tudi bakterije iz vrst *A. acidiphilus* (Matsubara in sod., 2002), *A. pomorum* (Goto in sod., 2003), *A. hesperidum*, *A. herbarius*, *A. cyclohepanicus* in *A. acidocaldarius* (Smit in sod., 2010). Glede na vrsto sadnega soka in temperaturo shranjevanja pri 50-60 °C lahko kvar sadnih sokov povzročajo tudi bakterije vrste *A. mali* (Tokuda, 2007).

Goto in sod. (2007) navajajo, da vegetativne celice bakterij rodu *Alicyclobacillus* lahko rastejo le v okolju z visoko a_w in sicer mora biti $a_w > 0,9$. V primeru sadnih sokov je delež suhe snovi, pri katerem celice bakterij še lahko rastejo, 10 °Brix. Splittstoesser in sod. (1994, 1998) so opravili preiskave različnih sadnih sokov in njihove občutljivosti na kvar zaradi bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Ugotovili so, da na rast teh bakterij v živilu poleg temperature in pH vplivata tudi koncentracija sladkorja in topnih kislin. Rast bakterij so zasledili v soku iz jabolka, pomaranča in ananasa (pH 2,9 in 12,8 °Brix), v soku iz grenivke (pH 3,2 in 10,4 °Brix), v soku iz pomaranča (pH 3,6 in 12,0 °Brix) in v soku iz ananasa (pH 3,3 in 13,4 °Brix). Medtem ko v soku iz brusnic (pH 2,4 in 14 °Brix), iz jabolka in grozdja (pH 2,8-3,7 in 12,2-14,8 °Brix), iz jabolka, grozdja in češenj (pH 3,7 in 12,4 °Brix) in iz sliv (pH 3,7 in 18,8 °Brix) rasti niso opazili. Ugotovili so, da bakterije ne rastejo v sadnem soku, v katerem je delež suhe snovi večji od 18 °Brix. Inhibitorno naj bi na rast bakterij

vplivale tudi fenolne komponente, saj niso opazili kvara v sokovih, ki so vsebovali rdeče sadje (slive, brusnice,...). Pettipher in sod. (1997) so z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* umetno kontaminirali različne vrste sokov (pomarančni, jabolčni,...) in jih inkubirali pri različnih temperaturah, da bi ugotovili vpliv temperature na rast. Ugotovili so, da je bila rast inhibirana pri temperaturi 4 °C. V primeru inkubacije vzorcev pri 25 °C, 35 °C in 45 °C je prišlo do povečanja števila celic za 100-1000 krat pri 35 °C in 45 °C, medtem ko pri temperaturi 25 °C rasti niso opazili tudi po dvajsetih dnevih inkubacije. Skladiščenje in transport pasteriziranih končnih proizvodov do potrošnika pri temperaturi pod 20 °C bi lahko preprečilo klitje spor in kasnejši kvar proizvoda, vendar bi za proizvajalce to pomenilo dodaten strošek. Druga, bolj enostavna rešitev bi bila lahko uporaba sterilizacijskega postopka toplotne obdelave, vendar pa bi bile s tem spremenjene organoleptične lastnosti proizvoda, kar pa za proizvajalce in potrošnike ni sprejemljivo (Jensen in Whitfield, 2003).

Na rast bakterij v sadnem soku vplivata tudi količina raztopljenega kisika in redoks potencial soka. Askorbinska kislina, ki jo večinoma dodajajo v sadne sokove, vpliva na znižanje redoks potenciala. Rast bakterij v soku je inhibirana pri koncentraciji 15 mg askorbinske kisline/100 ml soka. Na delež raztopljenega kisika v soku vpliva njegova koncentracija v prostoru, ki se nahaja v embalažnem materialu med tekočino in pokrovčkom. V kolikor ta kisik nadomestimo z drugim plinom (CO₂, N₂), je rast bakterij inhibirana. Prav tako na delež raztopljenega kisika v soku vpliva embalažni material zaradi možnosti migracije kisika iz zunanosti preko embalaže v živilo. Vendar kljub temu na rast bakterij v soku najbolj vpliva kisik, ki je bil vnesen v sok tekom tehnološkega postopka polnjenja (Tokuda, 2007). Rast vegetativnih celic je inhibirana ob prisotnosti 6 % etanola (Splittstoesser in sod., 1996), vendar pa ta koncentracija ni imela vpliva na preživetje spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Goto in sod., 2007).

2.2.3 Spremembe senzoričnih lastnosti sadnih pijač

Kvar sadnih pijač, ki so kontaminirane z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*, se odraža predvsem v tvorbi sedimenta, spremenjeni aromi in motnosti pijače (Borlinghaus in Engel, 1997). Spremenjena aroma sadne pijače je posledica sproščanja snovi imenovane gvajakol, ki ga tvorijo bakterije iz vanilina. Vanilin je naravna komponenta mnogih arom. Neprijetna aroma sadne pijače ima zaradi gvajakola močan »medicinski« in fenolni vonj. Poleg gvajakola se lahko v neustrezni aromi sadne pijače nahajajo tudi drugi halofenoli, kot sta spojini 2,6-DBF (2,6-dibromofenol) (Jensen, 2000) in 2,6-DCF (2,6-diklorofenol) (Jensen in Whitfield, 2003), ki lahko v pokvarjenih sadnih sokovih nastajajo na dva načina. Prvi je lahko posledica mikrobiološke kontaminacije sadnih pijač z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, drugi pa je lahko posledica kemičnega onesnaženja (Chang in Kang, 2004). Koncentracija gvajakola v živilu lahko doseže vrednost 10-200 ppb (ang. parts per

billion; sl. delcev na milijardo), medtem ko znaša vrednost 2,6-DBF in 2,6-DCF v živilu do 10 ng/l. Te koncentracije ne predstavljajo tveganja za zdravje potrošnika (Goto in sod., 2007).

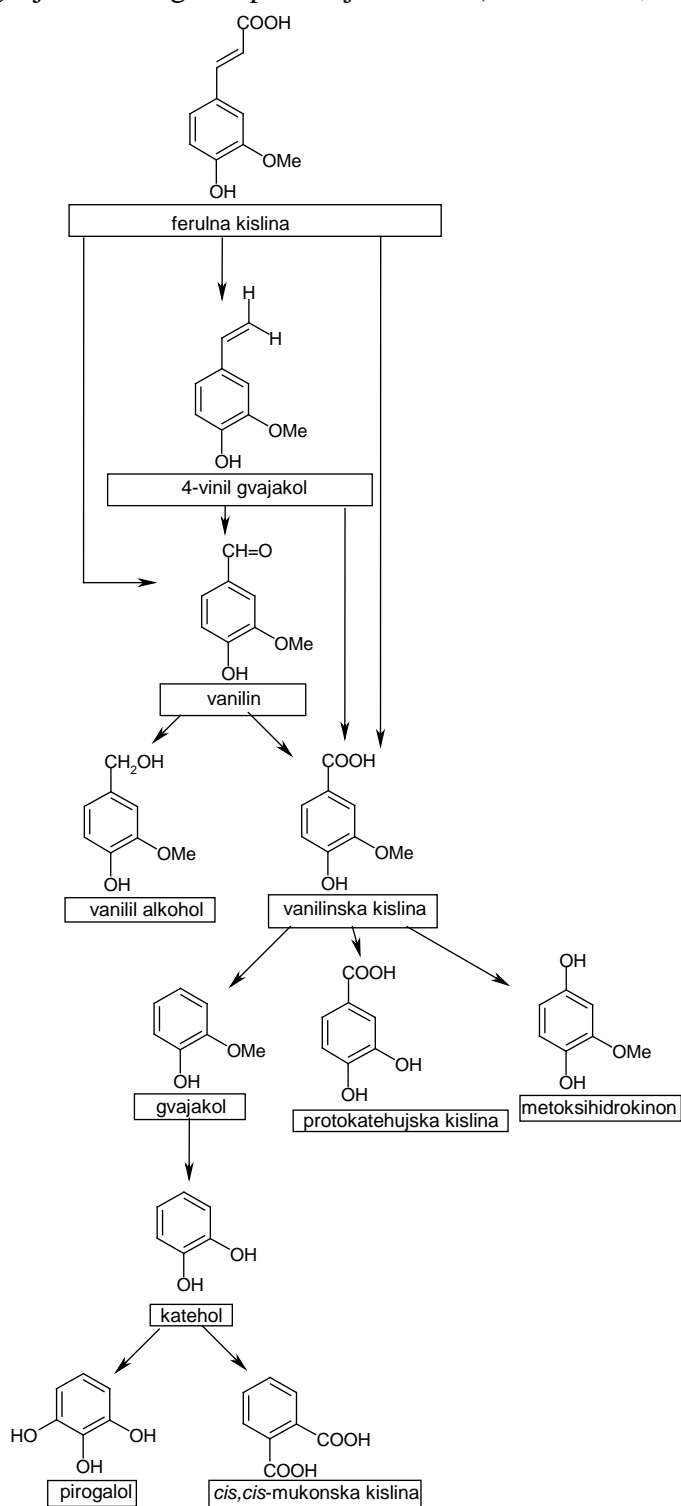
Spremenjene arome nastanejo kot posledica kvara, ki ga povzročajo bakterije vrste *A. acidoterrestris* in nekatere druge vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Na spremenjeno aromo ne vpliva le gvajakol, 2,6-DBF in 2,6-DCF, ampak tudi drugi metabolni produkti. Bakterije vrste *A. acidocaldarius* so bile prisotne v pokvarjenih živilih iz nekoncentriranih paradižnikov, vendar pa v njihovi spremenjeni aromi niso našli gvajakola. V spremenjeni aromi so z metodo plinske kromatografije z masnim detektorjem (GC-MS) določili spojino 2-metiltetrahidrotiofen-3-en.

2.2.3.1 Gvajakol

Gvajakol (2-metoksifenol) je naravna organska spojina z molekulsko formulo $C_7H_8O_2$. Ta spojina je sestavina arome mnogih živil (Chang in Kang, 2004). Gvajakol je mogoče odkriti v aromi pražene slanine (Chang in Kang, 2004), arabske kave (Smit in sod., 2010) in ječmenovega slada (Chang in Kang, 2004). Nastaja tudi kot produkt pirolize lesa iz lignina. Zanj je značilen sladek in pražen vonj, zato ga v živilski industriji pogosto uporabljajo kot sintetično aromo (Chang in Kang, 2004). Kljub temu je velikokrat bolj poznan kot neprijetna aroma vin (Chang in Kang, 2004; Smit in sod., 2010), čokoladnega mleka (Jensen, 2001), čokoladnega sladoleda (Smit in sod., 2010), vanilijevega jogurta (Chang in Kang, 2004) in sadnih sokov (Splittstoesser in sod., 1994; Yamazaki in sod., 1996; Walls in Chuyate, 1998; Duong in Jensen, 2000).

Tvorba gvajakola v živilu je lahko posledica toplotne razgradnje fenolnih prekurzorjev gvajakola (Chang in Kang, 2004; Smit in sod., 2010) ali pa produkt metabolizma mikroorganizmov, kot so bakterije rodu *Alicyclobacillus*, vrst *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas acidovorans*, *Streptomyces setonii* in kvasovk vrste *Rhodotorula rubra* (Chang in Kang, 2004; Goto in sod., 2007). Meja detekcije gvajakola v pokvarjenem sadnem soku je 2 ppb, kar pomeni, da se v milijardi delcev snovi nahajata 2 delca snovi gvajakola (Chang in Kang, 2004). Koncentracija gvajakola lahko variira od 10 do 200 ppb in je odvisna od vrste bakterij in rastnih razmer. Goto in sod. (2007) so sprva domnevali, da tvorijo gvajakol le bakterije vrste *A. acidoterrestris*, vendar so kasneje ugotovili, da tvorijo omenjeno spojino še bakterije vrste *A. acidiphilus* in *A. herbarius*. Kljub temu tvorijo največje koncentracije gvajakola bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Jensen (2000) navaja, da se poleg gvajakola v pokvarjenih sadnih sokovih nahajajo tudi halofenoli, vendar je njihova koncentracija veliko manjša v primerjavi s koncentracijo gvajakola. Gvajakol nastaja kot produkt metabolne aktivnosti v bakterijah vrste *A. acidoterrestris* iz vanilina (Jensen, 2000) in vanilinske kisline (Smit in sod., 2010).

Vanilinska kislina, ki nastane z oksidacijo vanilina, se v reakciji dekarboksilacije pretvori v gvajakol. Tvorbo gvajakola iz lignina prikazuje Slika 4 (Smit in sod., 2010).



Slika 4: Nastanek gvajakola in drugih metabolnih produktov iz ferulne kisline (Smit in sod., 2010)

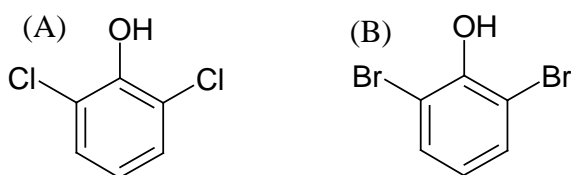
Figure 4: Production of guaiacol and other metabolic products from ferulic acid (Smit et al., 2010)

Ferulna kislina kot glavna komponenta lignina se pretvori v vanilin oz. 4-vinil-gvajakol v reakciji dekarboksilacije. 4-vinil-gvajakol se oksidira v vanilin, ki se nato oksidira v vanilinsko kislino. Z dekarboksilacijo vanilinske kisline nastane gvajakol (Chang in Kang, 2004; Smit in sod., 2010). Vanilinska kislina se v sadnih sokovih nahaja kot posledica mikrobiološke kontaminacije ali pa nastane iz polimera lignina, ki je naravno prisoten v rastlinah (Chang in Kang, 2004). Ferulna kislina je v naravi široko razširjena, saj jo lahko najdemo v sadju, zelenjavi, žitu, semenih, oreških, travi in rastlinah (Smit in sod., 2010). Ferulna kislina, ki je glavna komponenta lignina, se v metabolizmu bakterij in kvasovk pretvori v vanilin, vanilinsko kislino in protokatehujsko kislino. V nadaljnjih reakcijah pa iz vanilinske kisline nastane vanilin alkohol, gvajakol in metoksihidrokinon (Chang in Kang, 2004). Jensen (2000) navaja, da je lahko prekurzor za nastanek gvajakola tudi aminokislina tirozin. Jabolčni sok vsebuje 4,1 μl tirozina v 1 ml soka, medtem ko so v pomarančnem soku odkrili 3,4-13,4 μl tirozina v 1 ml soka. Toplotna obdelava sokov, koncentracija kisika in temperatura skladiščenja so dejavniki, ki igrajo pomembno vlogo pri nastanku gvajakola preko aminokisline tirozin (Chang in Kang, 2004).

Dejavniki, ki vplivajo na bakterije rodu *Alicyclobacillus*, da tvorijo gvajakol so: število oz. koncentracija celic, temperatura skladiščenja, toplotna obdelava, vrsta sadne pijače in prisotnost kisika v prostoru med tekočino in pokrovčkom embalaže (Smit in sod., 2010). Pettipher in sod. (1997) so v jabolčnem in pomarančnem soku določili gvajakol, ko je bilo število bakterij rodu *Alicyclobacillus* 10^5 CFU/ml soka. Podobne rezultate so dobili tudi Komitopoulou in sod. (1999), ki so v sadnih sokovih iz jabolk, pomaranč in grenivk pri 30 °C spremljali rast bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Spremenjen vonj pijače so zasledili po 4 dnevih, ko je bilo število bakterij v sadnem soku 10^5 CFU/ml, medtem ko so bakterije dosegle stacionarno fazo rasti v 8 dneh, ko je bilo število bakterij v soku 10^6 - 10^7 CFU/ml soka. Z naraščajočo temperaturo narašča tudi tvorba gvajakola. Pettipher in sod. (1997) so spremljali vonj sadnih sokov, ki so jih inkubirali pri 21 °C in 37 °C. Ugotovili so, da je tvorba gvajakola pri 37 °C veliko hitrejša kot pri nižji temperaturi. Sposobnost tvorbe gvajakola imajo le vegetativne celice. Za aktivacijo spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* se najpogosteje le-te toplotno obdela. Walls in Chuyate (2000) navajata, da je za aktivacijo omenjenih spor najbolj primeren postopek toplotne obdelave, ki poteka 10 minut pri 80 °C. Eiroa in sod. (1999) ugotavljajo, da je bila najboljša aktivacija spor bakterij rodu *Alicyclobacillus* dosežena pri 20 minutni izpostavitvi 70 °C. Splittstoesser in sod. (1996) pa so mnenja, da spore lahko tudi izpostavimo za 30 minut 60 °C.

2.2.3.2 Halofenoli

Halofenoli, med katere uvrščamo tudi spojini 2,6-DBF in 2,6-DCF (Slika 5), v pokvarjenih sadnih sokovih nastajajo na dva načina. Prvi je lahko posledica mikrobne kontaminacije sadnih sokov z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* (Chang in Kang, 2004), drugi pa je lahko posledica kemične kontaminacije (Smit in sod., 2010). Prisotnost halofenolov v živilih je največkrat posledica kontakta živila z šibkimi halogeniranimi snovmi, ki se v živilski industriji uporabljajo kot kemična sredstva za razkuževanje procesnih linij (strojev, cevi ...) in surovin (sadja v industriji sadnih sokov). Kemična sredstva za razkuževanje delujejo na mikroorganizme na različne načine, na primer tako, da reagirajo s celično membrano ali protoplazmo njihovih celic in mikroorganizmom onemogočajo nekatere bistvene življenjske funkcije in jih s tem uničijo. V kolikor se v fazi čiščenja sadja uporabljajo halogenirane snovi je pomembno, da le-te na koncu iz sadja dobro speremo z vodo (Van Pèe, 1996). V nasprotnem primeru lahko namreč pride do tvorbe 2,6-DBF in 2,6-DCF. Ti dve spojini, ki jih lahko vidimo na sliki 5, dajeta živilu podobno kot gvajakol »medicinski« in »razkužilen« vonj (Jensen, 2000).



Slika 5: Strukturna formula 2,6-diklorofenola (A) in 2,6-dibromofenola (B) (Jensen, 1999)
Figure 5: Structural formula of 2,6-dichlorophenol (A) and 2,6-dibromophenol (B) (Jensen, 1999)

V biokemijski sintezi obeh halofenolov in s tem spremembi arome živila imajo ključno vlogo fenolni prekurzorji, H_2O_2 , halidni ioni in encim haloperoksidaza. Encim je prisoten tudi v bakterijah rodu *Alicyclobacillus* (Jensen in Whitfield, 2003; Smit in sod., 2010). Na nastanek halofenolov vpliva tudi vrsta živila, saj so spremenjene senzorične lastnosti zasledili le v sadnih sokovih, medtem ko sprememb v destilirani vodi in v vodi z nizkim pH niso ugotovili (Chang in Kang, 2004). Poleg medija ima pomembno vlogo tudi embalažni material in prostor, ki se nahaja v embalažnem materialu med tekočino in pokrovčkom. Jensen in Whitfield (2003) sta določala koncentracijo halofenolov v sadnem soku, ki je bil skladiščen 1-4 dni pri temperaturi 44-46 °C. V primeru večjega prostora med tekočino in pokrovčkom je bila tudi koncentracija halofenolov večja. Meja detekcije za 2,6-DCF v pokvarjenem sadnem soku je 0,5 ppb in 30 ppt za 2,6-DBF (Jensen, 1999).

Aktivne komponente mnogih fungicidov in algacidov so klorofenoli. Slednje v visokih koncentracijah vsebujejo tudi nekateri embalažni materiali, kar lahko kasneje vodi do spremenjenih senzoričnih lastnosti živil oz. kvara.

2.3 MOŽNOSTI OBVLADOVANJA KVARA SADNIH PIJAČ, POVZROČENEGA Z BAKTERIJAMI RODU *Alicyclobacillus*

Kot je bilo omenjeno, je zemlja najpogostejši vir bakterij *Alicyclobacillus*. Z zemljo je lahko kontaminirano sadje, ki vstopa v proces proizvodnje sadnih pijač. Da bi zmanjšali stopnjo kontaminacije, je na začetku procesa najpomembnejše ustrezno čiščenje oz. izpiranje sadja. Izpiranje mora potekati s higiensko neoporečno vodo, ki ji dodajajo različne detergente ali bakterioide (natrijev hipoklorid, vodikov peroksid). Če faza čiščenja sadja ni učinkovita, lahko z bakterijami oz. njihovimi spori kontaminiramo celoten sistem proizvodnje sadnih sokov (ekstrakcija, filtracija, centrifugiranje, koncentracija, polnjenje). Zato se kot dodaten preventivni ukrep priporoča tudi filtracija končnega proizvoda. Za pijače, ki jih ni mogoče filtrirati, se priporoča uporaba sevanja z UV-žarki. Metode, ki se uporabljajo za uničenje bakterijskih spor, so toplotna obdelava, ultra visoki tlaki, ozon in UV-sevanje (Takahashi in sod., 2007). Poleg različnih tehnoloških postopkov pa je doseganje dobre mikrobiološke kakovosti in preprečevanje kvara sadnih pijač možno tudi z zgodnjim in hitrim odkrivanjem ter identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* in uporabo ustreznih protimikrobnih snovi.

2.3.1 Določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus*

2.3.1.1 Klasične mikrobiološke metode

V začetnih fazah proučevanja bakterij rodu *Alicyclobacillus* so za izolacijo uporabljali tehniko direktne nacepovitve vzorca na gojišče, ki pa je velikokrat vodila do lažno negativnih rezultatov zaradi slabe občutljivosti metode in majhnih volumnov preiskanih vzorcev (Goto, 2007). Pozneje so ugotovili, da je za izolacijo veliko bolj primerna membranska filtracija (Chang in Kang, 2004). To je metoda, ki se uporablja za detekcijo mikroorganizmov predvsem iz tekočih vzorcev in plinov. Uporablja se na primer za določanje koliformnih bakterij, patogenih bakterij, plesni in virusov (Goto, 2007). Mehanizem membranske filtracije temelji na prestrezanju celic mikroorganizmov iz vzorca, ki se ujamejo v mrežo filtra. Velikost celic je namreč večja od velikosti por filtra, preko katerega vzorec filtriramo (Chang in Kang, 2004). Največja prednost te tehnike pred drugimi je zmožnost mikrobiološke preiskave večjih količin (volumnov) vzorca (Goto, 2007). Pred filtracijo vzorca, v katerem določamo bakterije rodu *Alicyclobacillus*, je potrebno le-tega toplotno obdelati. Toplotni šok je namenjen klitju spor, poleg tega pa pri teh temperaturah uničimo tudi ostale kvarljivce, kot so kvasovke in mlečnokislinske bakterije. Toplotna obdelava lahko poteka pri različnih temperaturah (Chang in Kang, 2004). Standardna metoda za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih sokov je IFU metoda št. 12 (IFU, 2004) in predpisuje, da je potrebno vzorec toplotno obdelati pri temperaturi 80 °C za 10 minut ali 1 uro pri 60 °C, da dosežemo enak učinek. Sledi

postopek direktne nacepitve vzorca na gojišče ali obogatitev vzorca. Lahko se uporabi tudi metoda membranske filtracije, vendar pa le-ta ni obvezna. Vzorec se filtrira preko filtra z velikostjo por 0,45 μm in aseptično prenese na gojišče. Najpogosteje uporabljena gojišča za bakterije rodu *Alicyclobacillus* so AAM (*Alicyclobacillus acidocaldarius* agar) (Goto, 2007), OSA (oranžni agar), PDA (krompirjev dekstrozni agar), YSG (glukozno-škrobno-kvasni agar) in BAT-agar. Uporaba le-teh je vezana tudi na geografsko področje, tako na primer gojišče YSG uporabljajo na Japonskem in v Braziliji, gojišče BAT v Evropi, gojišča OSA, PDA, K-agar pa v ZDA in Avstraliji (Goto, 2007). Po postopku direktne nacepitve na gojišče sledi inkubacija pri 45 °C za 3-5 dni. Optimalna rast bakterij je dosežena v petih dnevih pri 45 °C (IFU, 2004). Goto (2007) navaja, da pri slednji najhitreje rastejo bakterije vrste *A. acidoterrestris*.

Največja pomanjkljivost klasičnih mikrobioloških metod za izolacijo in identifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* je, da so dolgotrajne in neprimerne za analizo velikega števila vzorcev, saj so rezultati znani šele v 3-7 dneh (Steyn in sod., 2011).

2.3.1.2 PCR

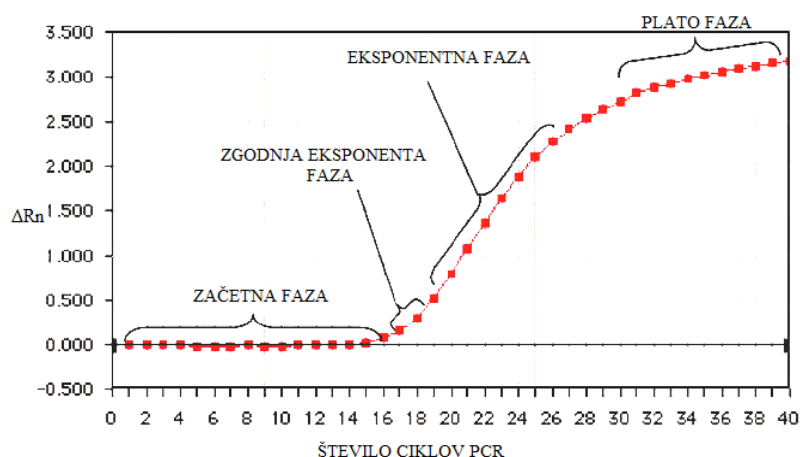
Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za encimsko pomnoževanje specifičnih sekvenc tarčne molekule DNA *in vitro*. V kratkem času dobimo več kot 10^6 kopij izbranega dela molekule DNA. Uporablja se tudi za določanje in ugotavljanje mikroorganizmov v živilih. Metoda PCR je sestavljena iz ciklov, vsak cikel pa iz ponavljajočih se faz z določenimi temperaturami:

- denaturacija dvoverižne molekule DNA v dve enoverižni molekuli DNA pri 94-95 °C,
- prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno mesto molekule DNA pri 37-70 °C,
- podaljševanje molekule DNA s pomočjo termostabilne DNA polimeraze pri 60-72 °C.

Pomnožke najbolj enostavno določimo z agarozno gelsko elektroforezo (Kuchta, 2006).

2.3.1.3 PCR v realnem času

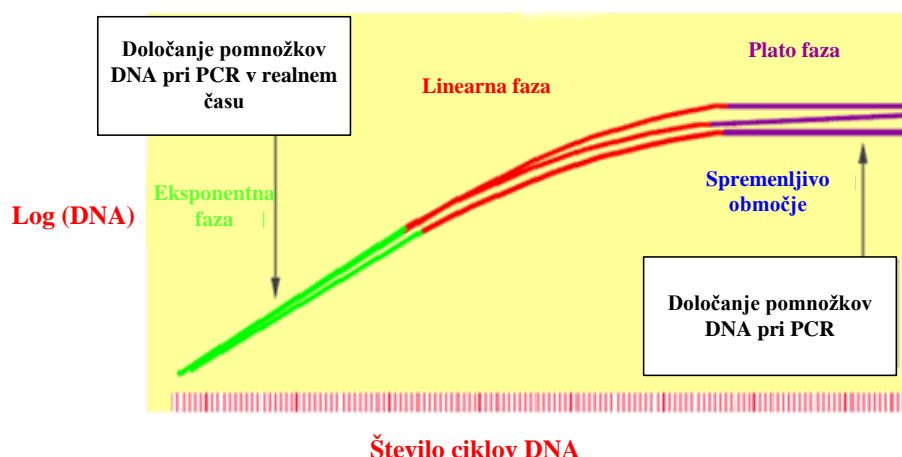
PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo klasične PCR in temelji na detekciji in kvantifikaciji pomnoženega dela DNA preko meritev nastale fluorescence (Bustin in sod., 2005; Fairchild in sod., 2006). Nastale pomnožke določimo med samo encimsko reakcijo in si s tem prihranimo material, čas in delo za določanje pomnožka z gelsko elektroforezo. PCR razdelimo v štiri faze: začetno, zgodnjo eksponentno, eksponentno in fazo platoja (Slika 6).



Slika 6: Faze pomnoževanja tarčne molekule DNA s PCR (Wong in Medrano, 2005)

Figure 6: Phases of PCR amplification of target DNA molecule (Wong and Medrano, 2005)

V začetni fazi je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja in takrat določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca preseže fluorescenco ozadja in v tej fazi določimo prag, ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je različna od fluorescence ozadja (Wong in Medrano, 2005). Vrednost Ct (ang. Threshold Cycle) oziroma presečišče (ang. Crossing Point) predstavlja število ciklov, ki so potrebni, da fluorescenca vzorca doseže prag detekcije. Normaliziran fluorescentni signal (ΔR_n) je razlika med fluorescenco vzorca v katerikoli časovni točki med pomnoževanjem in fluorescenco bazne linije oziroma razlika med fluorescenco produkta in fluorescenco pasivnega barvila (Arya in sod., 2005). Pomnoževanje poteka do plato faze, kjer se reakcija upočasni ali prekine zaradi porabe reagentov ali upada aktivnosti encima DNA-polimeraza (Wong in Medrano, 2005). Največja razlika med PCR in PCR v realnem času je v določanju pomnožka. Določanje pomnožkov pri PCR v realnem času poteka v začetku linearne faze pomnoževanja, pri klasičnem PCR pa na koncu linearne faze, zaradi česar lahko prihaja do večjih odstopanj in s tem do večjih napak (Slika 7) (Applied Biosystems, 2004).



Slika 7: Krivulja pomnoževanja DNA s PCR v realnem času (qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR, 2013)

Figure 7: Amplification curve of DNA using real-time PCR (qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR, 2013)

Glede na specifičnost fluorescentnega signala ločimo dve skupini metod za detekcijo in kvantifikacijo pomnoženega dela nukleinske kisline. Prva skupina so nespecifične metode, pri katerih uporabljamo na primer fluorescentno barvilo SYBRGreen, ki se nespecifično vgradi v vsako dvovertično molekulo DNA (Mackay in sod., 2002). Druga skupina pa so s fluorescenčnimi barvili označene sonde ali začetni oligonukleotidi, ki omogočajo bolj specifično določanje DNA (Arya in sod., 2005). PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo *TaqMan* je specifična in hitra metoda, pri kateri se sonda veže na tarčno sekvenco DNA znotraj vezavnih mest začetnih oligonukleotidov. Oligonukleotidna sonda vsebuje reportersko barvilo, ki fluorescira, in zaviralno barvilo, ki preprečuje fluorescenco prvega (FRET, fluorescentni resonančni prenos energije, ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer). Med fazo podaljševanja eksonukleazna aktivnost DNA-polimeraze odcepi fluorescentno označeno hibridizacijsko sondo, zaviralno in reportersko barvilo se ločita in zato začne reportersko barvilo fluorescirati, kar lahko zaznamo kot povečanje intenzitete fluorescence (Heid, 1996).

Z metodo PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo *TaqMan* so Luo in sod. (2004) v jabolčnem soku direktno določili vegetativne celice bakterij vrste *A. acidocaldarius* in *A. acidoterrestris*. Leto kasneje so Connor in sod. (2005) razvili metodo PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo *TaqMan* tudi za vrste *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidum*, *A. herbarius*, *A. acidiphilus* in *A. sendaiensis* v sadnih sokovih z občutljivostjo 21-76 celic/ml. Za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* se lahko uporablja PCR v realnem času (Connor in sod., 2005).

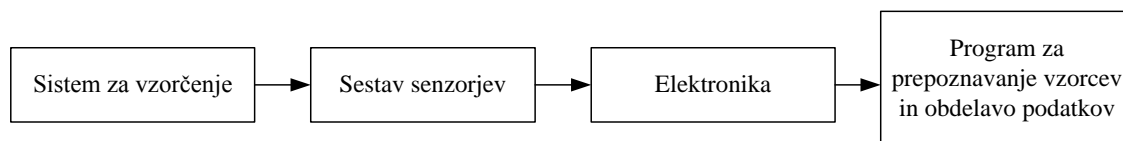
2.3.1.4 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) je metoda, s katero merimo količino tarčne molekule nukleinske kisline med vsakim ciklom pomnoževanja PCR. Tarčna molekula je lahko DNA, cDNA (komplementarna DNA) ali RNA (Applied Biosystems, 2004). Za izračun začetne količine tarčne DNA uporabljamo vrednost Ct (Cp). Absolutna kvantifikacija temelji na principu, da če je začetna koncentracija DNA v vzorcu visoka, bomo njene pomnožke zaznali v zgodnejšem ciklu pomnoževanja. Pri relativni kvantifikaciji pa določamo spremembe v količini tarčne DNA tako, da primerjamo signal tarčne sekvence s signalom notranje kontrole ali drugih referenčnih kontrol (Mackay, 2004). Po nam dosegljivih virih qPCR še ni bil uporabljen za kvantifikacijo bakterij rodu *Alicyclobacillus*.

2.3.1.5 Elektronski nos

Med senzoričnimi lastnostmi sadnih pijač je aroma ena izmed najpomembnejših. Hlapne komponente sestavljajo značilno aromo živila, ki pa se lahko tudi spreminja zaradi kemijskih procesov, ki potekajo v živilu med tehnološkim procesom izdelave ali med skladiščenjem (Cagnasso in sod., 2010). Neželena aroma je lahko posledica mikrobiološke kontaminacije s plesnimi ali bakterijami in nastane kot produkt njihovega metabolizma. Ko se v živilu pojavi neznan vonj, ga morajo šolani preskuševalci na novo določiti. Tukaj pa nastopijo težave, saj je potrebno na novo določiti deskriptor, ki ga je težko postaviti, še težje pa kasneje vzdrževati v rutini. Izbira in šolanje preskuševalcev ter njihovo stalno preverjanje je za preskuševalce stresno in dolgotrajno, za delodajalca pa povezano z visokimi stroški. Zato izhajajo vedno večje želje po razvoju alternativnih ali dopolnilnih metod, ki naj bi bile hitre, natančne in v korelaciji z rezultati senzorične analize. Med takšne metode uvrščamo analizo z elektronskim nosom (Arora in sod., 2006; Gobbi in sod., 2010).

Elektronski nos je aparat, ki je sestavljen iz niza elektronskih kemičnih senzorjev in ustreznega sistema s sposobnostjo prepoznavanja enostavnih in kompleksnih vonjev (Cagnasso in sod., 2010). Tako kot človeški nos tudi elektronski nos skuša določiti različne plinske mešanice, vendar pa za razliko od človeškega nosu elektronski nos zazna hlapne spojine z in brez vonja (Schaller in sod., 1998). Elektronski nos sestavljajo štiri funkcionalne komponente (Slika 8): sistem za vzorčenje, sestav plinskih senzorjev, sistem za zbiranje elektronskih podatkov (beleženje signala senzorja) ter program za prepoznavanje vzorcev in obdelavo podatkov (Ponzoni in sod., 2012).



Slika 8: Funkcionalne komponente elektronskega nosu (Ponzoni in sod., 2012)

Figure 8: Functional components of an electronic nose (Ponzoni et al., 2012)

Elektronski nos z oznako EOS835 (proizvajalec SACMI Scarl, Italija) spada med prve tipe elektronskih nosov, ki so bili razviti za laboratorijsko analizo hlapnih komponent iz okolja. Elektronski nos tipa EOS835 je opremljen s šestimi senzorji iz skupine MOS (ang. Semiconductor Metal Oxide), sestavljenimi iz različnih kovinskih oksidov, ki omogočajo večjo občutljivost aparature in s tem možnost merjenja širokega spektra hlapnih komponent (Dentoni in sod., 2012; Falasconi in sod., 2005). Senzor, ki je namenjen uporabi v živilski industriji, je naprava, ki da odgovor na določene lastnosti živila in prevede odgovor najpogosteje v električni signal.

Električni signal se prevede v uporabno informacijo in analizira s pomočjo različnih statističnih metod, ki so del programske opreme računalnika. Prvi korak pri analizi podatkov je izdelava podatkovne matrice, ki je sestavljena iz opazovanj ali meritev (signali senzorjev) in spremenljivk (lastnosti, ki karakterizirajo merjen vzorec) (Schaller in sod., 1998).

Najbolj pogosto uporabljene klasifikacijske tehnike za obdelavo podatkov so grafična, multivariatna in mrežna analiza. Za statistično obdelavo podatkov analize živil so zelo uporabne kemometrične metode, med katere spada tudi multivariatna analiza. Multivariatne statistične metode se uporabljajo za zmanjšanje velikega števila spremenljivk na manjše število ortogonalnih vektorjev (Szefer, 2007). Multivariatna analiza vključuje več različnih tehnik. Skupno vsem tehnikam multivariatne analize je, da temeljijo na redukciji spremenljivk iz večdimenzionalnega prostora v dve ali tri dimenzije. Faktorska analiza je metoda za redukcijo spremenljivk in vključuje različne metode, od katerih je za vizualizacijo kompleksnih podatkovnih matrik zelo primerna metoda glavnih komponent (PCA, ang. Principle Components Analysis). PCA temelji na transformaciji oz. zasuku koordinatnega sistema na osnovi statističnih podatkov, pri čemer tvorimo nove osi iz linearne kombinacije starih izhodnih podatkov. Namen te metode je poiskati koordinate, ki v danem merskem prostoru vsebujejo največji odstotek vseh informacij. Diskriminantne analize se uporabljajo za ugotavljanje podobnosti neznanega vzorca s skupinami drugih poznanih vzorcev. Sem spada tudi linearna diskriminantna analiza (LDA, ang. Linear Discriminant Analysis). Glavni princip te analize je iskanje smeri v večvariatnem prostoru, ki najbolje ločujejo posamezne skupine vzorcev (Adams, 1998).

Klasifikacijski tehniki za obdelavo podatkov, ki se pri elektronskem nosu najbolj pogosto uporabljata, sta PCA in LDA (Schaller in sod., 1998; Gutierrez-Osuna, 2002). Lahko pa se uporabljata tudi klasifikacijski metodi koeficient oz. algoritem najbližjih sosedov (kNN, ang. k-Nearest Neighbours) in metoda podpornih vektorjev (SVM, ang. Support Vector Machines) (Concina in sod., 2010). Metoda kNN je neparametrična metoda za razvrščanje spremenljivk, ki temeljijo na najbližjih primerih v funkciji prostora. V zalogi zbranih podatkov poiščemo k-takšnih vrednosti, ki so po svojih lastnostih najbližje vrednosti, katerega vrednost želimo določiti. SVM je metoda razvrščanja, ki razdeli množico predmetov v razrede tako, da je prostor brez predmetov med razredi (meja) čim širši. Gre za matematični postopek prepoznavanja vzorcev (Gutierrez-Osuna, 2002; Pardo in Sberveglieri, 2005).

Področja uporabe elektronskega nosu so številna, saj ga poleg živilske industrije uporabljajo tudi v avtomobilski industriji, medicinski diagnostiki in za okoljski monitoring (Falasconi in sod., 2005). V proizvodnji hrane in pijač lahko elektronski nos uporabljamo na različnih stopnjah procesa: vhodna kontrola surovin, spremljanje proizvodnje živila in kontrola končnega proizvoda. Elektronski nos je bil že uporabljen za odkrivanje mikrobiološke kvara pri žitih, pekovskih izdelkih, mesu, ribah, mleku in paradižniku. V zadnjem obdobju pa se vse bolj uporablja za hitro odkrivanje kvara sadnih sokov zaradi mikrobiološke kontaminacije z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* (Cagnasso in sod., 2010). Uporabljamo ga za detekcijo hlapnih komponent, ki nastanejo v zgodnji fazi kvara sadnih pijač. Ostale analitične metode temeljijo na določanju sekundarnih metabolitov (gvajakol, 2,6-DBF in 2,6-DCF), ki se pojavijo v poznejši fazi kvara sadnih pijač (Ponzoni in sod., 2012). Rezultat analize z elektronskim nosom, imenovan tudi prstni odtis, prikazuje na primer razliko med hlapnim profilom sadne pijače, ki vsebuje bakterije rodu *Alicyclobacillus*, in hlapnim profilom nekontaminirane sadne pijače. Pri analizi vzorca ni potrebne predhodne priprave, čas analize pa traja le nekaj minut (Bianchi in sod., 2010). Klasične mikrobiološke in kemijske analize vzorcev sadnih sokov so pokazale, da je tvorba gvajakola kot glavnega sekundarnega metabolita v veliki meri odvisna od stopnje okužbe oziroma števila celic bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih pijačah. Komitopoulou in sod. (1999) so v sadnih pijačah, ki so bile kontaminirane z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, določili spremenjen vonj po štirih dneh, ko je bilo število bakterij v sadnem soku 10^5 CFU/ml. Stacionarna faza rasti bakterij je bila dosežena osmi dan, ko je bilo število bakterij v sadni pijači 10^6 - 10^7 CFU/ml soka. Na drugi strani pa z elektronskim nosom lahko ločimo kontaminirane in nekontaminirane vzorce živila že pri majhni kontaminaciji. Gobbi in sod. (2010) so v breskovem in pomarančnem soku določili spremenjen vonj pri koncentraciji manjši od 10^2 CFU/ml soka. Vseeno pa ima aparat tudi določene omejitve saj spremenjene arome pri kontaminirani sadni pijači iz jabolka ni bilo mogoče določiti (Ponzoni in sod., 2012). Največkrat uporabljeni metodi določanja komponent arome v

živilih sta plinska kromatografija z masno selektivnim detektorjem (GC/MS) (Cagnasso in sod., 2010) in tekočinska kromatografija z UV/VIS fluorescenčnim detektorjem (Bahçeci in sod., 2007). Metodi omogočata natančno analizo hlapnih komponent, ki lahko nastanejo kot posledica kemijske ali mikrobiološke kontaminacije. V primerjavi z elektronskim nosom je pri obeh kromatografskih metodah čas priprave vzorcev daljši, strošek analize pa veliko večji, zato sta metodi namenjeni bolj za področji raziskav in razvoja in manj za rutinske preiskave.

2.3.1.6 Senzorična analiza

Senzorična analiza je znanstvena disciplina, ki jo uporabljamo za oceno kakovosti hrane in pijače in ugotavljanje njihove senzorične sprejemljivosti. Pri razvoju novih živilskih izdelkov senzorična analiza pove pomembne podatke za določanje roka uporabnosti izdelka in tudi možnost zmanjšanja ali odpravljanja neuspešne prodaje. S senzorično analizo merimo, analiziramo in interpretiramo tiste značilnosti živil, ki jih lahko zaznamo s petimi osnovnimi čuti. To so vid, okus, vonj, sluh in tip. Človeška čutila oči, nos, usta in ušesa pa pri senzorični analizi služijo kot merilni inštrumenti. V njih so nameščeni receptorji za zaznavanje videza, barve, okusa, vonja, temperature, bolečine, pookusa itd. S senzorično analizo ugotovimo stopnjo odličnosti senzoričnih lastnosti hrane in pijače, stopnjo izraženosti posameznih specifičnih lastnosti, kot so videz, barva in aroma, in tudi stopnjo uglašenosti oz. harmonijo med posameznimi komponentami v enotno zaznavo živila, kot sta aroma in tekstura (Milo Ohr, 2001; Golob in sod., 2005; Arzenšek Pinter in Vomberger, 2009).

Za ustrezno senzorično oceno je nujen panel ali skupina senzoričnih preskuševalcev, ki jih je potrebno ustrezno izbrati, izšolati in preverjati. Senzorična analiza zajema različne tehnike, ki omogočajo merjenje človeškega odziva na hrano in pijačo, minimizirajo stranske učinke ocenjevanja živila oz. pijače ter zunanje učinke, ki vplivajo na preskuševalčevo zaznavo. Senzorično analizo izvajamo z različnimi vrstami testov, in sicer s potrošniškimi oz. hedonskimi testi in/ali z izšolanimi analitičnimi paneli. Potrošniški oz. hedonski način, pri katerem potrošniki pri testih izražajo pozitivne in negativne odzive na določen izdelek, se uporablja za ugotavljanje sprejemljivosti izdelka za potrošnika oz. kateri izmed izdelkov potrošniku najbolj ugaja. Analitični način pa je zahtevnejši in se deli na poskuse razlikovanja (ugotavljanje razlik med dvema ali več izdelki), poskuse z lestvicami ali razredi in na deskriptivno ali opisno metodo (Golob in sod., 2006).

2.3.1.7 Analiza HPLC-DAD

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti oz. HPLC (ang. High Performance Liquid Chromatography) je separacijska tehnika, ki omogoča ločevanje zmesi snovi na osnovi

njihovih različnih migracij preko stacionarne trdne faze v separacijski koloni. Snovi se preko kolone transportirajo v odvisnosti od tlaka in tekoče mobilne faze. Mobilna faza je lahko bodisi enokomponentna ali pa večkomponentna in jo prečrpavamo skozi kolono s pomočjo črpalke, da lahko ustrezno eluira snovi iz kolone. Vzorec injiciramo direktno v mobilno fazo pred kolono. Kolona je tanka cev iz nerjavečega jekla, napolnjena s stacionarno fazo. Med potovanjem vzorca skozi kolono pride do ločbe posameznih snovi, ki jih detektor zazna kot električni signal in jih pretvori v obliko kromatograma (elucijski diagram), ki predstavlja koncentracijo kot funkcijo časa. Kako se posamezne snovi eluirajo, je odvisno od kemijske sestave vzorca in obeh mobilnih faz (Kealey in Haines, 2002).

Komponente, ki sestavljajo sistem HPLC, so rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kromatografska kolona s stacionarno fazo, detektor in rekorder. Kolone so najpomembnejši del sistema HPLC, saj se v njej odvijajo najpomembnejši procesi separacije. So v obliki različno dolgih cevi, izdelanih iz primerne inertnega materiala. Napolnjene so z delci kromatografskega medija, ki jih imenujemo stacionarna faza. Čim manjši so delci polnila, tem večja je ločljivost kolone, močno pa se poveča upor, ki se kaže kot povratni tlak kolone. Na tlak kolone vpliva tudi dolžina kolone, daljša kot je kolona, večji je tlak. Za visoke tlake (do 700 barov) so kolone iz nerjavečega jekla, za nižje tlake pa se lahko uporabljajo steklene ali teflonske kolone (Žorž, 1991; Kealey in Haines, 2002). Snovi, ki se eluirajo iz kolone, zaznajo in merijo detektorji. Detektor z nizom diod oz. DAD-detektor (ang. diode array detector) je spektrofotometer z enim ali dvema nizoma fotodiod. Pri tem detektorju presevamo merilno celico z virom svetlobe. Po prehodu iz celice to svetlobo na ustreznem monokromatorju razklonimo na posamezne valovne dolžine. Tako razklopljena svetloba pada na svetlobno občutljive diode. Na ta način vsake 0,1 sekunde izmerimo kvantitativne odzive snovi pri vseh valovnih dolžinah, kar nam da celoten UV in/ali VIS absorpcijski spekter preiskovane snovi in tudi njeno koncentracijo (Kealey in Haines, 2002). Z metodo HPLC-DAD so nekateri avtorji določili vsebnost gvajakola v jabolčnem soku (Bahçeci in Acar, 2007).

2.3.2 Naravne protimikrobne snovi

Poleg standardnih in alternativnih metod za določanje bakterij v surovinah in živilu je ena izmed možnosti za obvladovanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* tudi uporaba naravnih protimikrobnih snovi, ki lahko onemogočijo rast in razmnoževanje bakterij v živilu in s tem preprečijo tudi kvar živila. Rastline, zelišča in začimbe ter njihovi ekstrakti vsebujejo veliko število spojin, ki lahko zavirajo metabolične aktivnosti bakterij, kvasovk in plesni. Številne izmed protimikrobnih spojin še niso povsem raziskane. Te protimikrobne spojine lahko najdemo v eteričnih oljih ali ekstraktih iz listov (rožmarina, bazilike, origana, timijana in majarona), cvetov ali cvetnih popkov (cimet), čebulic (česen, čebula), semen

(kumina, koromač) in drugih delov rastlin. Spojine s protimikrobnim delovanjem so fenolne spojine, terpeni, alifatski alkoholi, aldehidi, ketoni, kisline in izoflavoni (Tiwari in sod., 2009). Glavne protimikrobne snovi v ekstraktih rastlin družine ustnatic (*Lamiaceae*) so karnozolna kislina, rožmarinska kislina in njihovi derivati (Romano in sod., 2009). Uporaba eteričnih olj zahteva veliko znanja o njihovem načinu protimikrobnega delovanja na različne skupine mikroorganizmov, minimalni inhibitorni koncentraciji in vplivu sestave živila na protimikrobno aktivnost. (Hyltdgaard in sod., 2012). Protimikrobni učinek rastlinskih ekstraktov je odvisen od njihove kemijske sestave, prisotnih aktivnih komponent in koncentracije (Tiwari in sod., 2009; Bassolé in Juliani, 2012).

Aktivne komponente rastlinskih ekstraktov so fenolne spojine, aldehidi, ketoni, alkoholi, estri in etri. Med njimi lahko prihaja do medsebojnega vpliva in s tem do različnih vrst učinkov (Bassolé in Juliani, 2012):

- indiferentnega (ni protimikrobnega delovanja),
- aditivnega (skupni protimikrobni učinek ekstrakta je enak vsoti učinkov posameznih aktivnih komponent),
- antagonističnega (skupni protimikrobni učinek ekstrakta je manjši, kot bi bila vsota učinkov posameznih aktivnih komponent),
- sinergističnega (skupni protimikrobni učinek ekstrakta je večji, kot bi bila vsota učinkov posameznih aktivnih komponent).

Aktivne komponente rastlinskih ekstraktov lahko delujejo na celice mikroorganizmov s številnimi mehanizmi, kot so spremenjena encimska aktivnost, oviranje transporta s pomočjo protonov, delovanje na fosfolipidni dvosloj celične membrane (Tiwari in sod., 2009).

2.3.2.1 Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*), ki so eno ali večletna zelišča, polgrmi ali grmi in izvirajo s sredozemskih gričev, predvsem Portugalske in jugozahodne Španije (Sasikumar, 2004). Poleg rožmarina so najbolj znane rastline te družine še žajbelj, melisa, origano, šetraj, meta in timijan. Rožmarin je zimzelen, gostolisten grm z ozkimi suličastimi listi, ki so po vejicah razporejeni v vretencih zgoraj temnozeleni, spodaj pa so belo dlakavi (Berglez, 2002). Bledo modri ali blede vijoličasti cvetovi so na kratkih pecljih na zgornjih delih stebela. Cvetijo spomladi in zgodaj poleti (Sasikumar, 2004). Zaradi izjemne arome se njegova zelišča in olja najpogosteje uporabljajo kot začimbe ali dišave v kulinariki in živilski industriji. V zadnjem obdobju je rožmarin zanimiv zaradi svojega antioksidativnega in protimikrobnega delovanja. Na kemijsko sestavo rožmarina vplivajo genetski (sorta) in okoljski dejavniki (sestava tal,

klima ...). Sestava in aktivnost ekstrakta pa je odvisna od načina in pogojev ekstrakcije (Moreno in sod., 2006).

Najpomembnejše spojine rožmarinskih ekstraktov so (Del Campo in sod., 2000; Angioni in sod., 2004; Almela in sod., 2006; Moreno in sod., 2006):

- eterična olja (monoterpeni, alkoholi, ketoni, fenoli, estri, seskviterpeni),
- fenolne kisline (rožmarinska, ferulna in kavna kislina),
- flavonoidi (apigenin, rutin, diosmin, luteolin in derivati),
- diterpeni (karnozolna kislina, karnozol),
- triterpeni (ursolna kislina, oleanolna kislina).

Izmed naštetih spojin so za protimikrobno in antioksidativno delovanje rožmarinovega ekstrakta najbolj odgovorne rožmarinska kislina, karnozolna kislina in karnozol. Rožmarinska kislina je ester kavne in mlečne kisline. Je vodotopna sestavina in jo pridobivamo z vodno ekstrakcijo. Kot čista spojina ima dobro delovanje le na po Gramu pozitivne bakterije (Moreno in sod., 2006). Karnozolna kislina je diterpenski fenol in je topna v metanolu, etanolu, acetonu in deloma tudi v vodi. Na vsebnost karnozolne kisline v posušenih rožmarinovih listih pomembno vplivajo genetski (zrelost rastline) in okoljski (geografski) dejavniki (Del Bano in sod., 2006). Diterpeni v kloroplastu rastlin nastajajo kot odgovor na stresne razmere iz okolja (Munné-Bosch in sod., 2001). Karnozolna kislina se v oksidativnem stresu razgradi do karnozola, ki je lakton karnozolne kisline in drugih fenolnih spojin (Del Campo in sod., 2000; Moreno in sod., 2006).

2.3.2.2 Mlečna kislina

Mlečna kislina (2-hidroksipropionska kislina) je monohidroksi monokarboksilna kislina s formulo $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ (Datta in sod., 1995). Prvi jo je leta 1780 iz kislega mleka izoliral švedski kemik Scheele, ki je domneval, da je mlečna kislina naravna sestavina mleka. Leta 1857 pa je Pasteur ugotovil, da mlečna kislina nastaja kot metabolit v procesu mlečno kislinske fermentacije (Benninga in sod., 1990). 20 let kasneje je Joseph Lister izoliral prvo čisto kulturo bakterij in jo poimenoval *Bacterium lister*. Omenjena vrsta je bila leta 1909 preimenovana v *Streptococcus lactis*, danes pa jo poznamo kot *Lactococcus lactis*. Za začetek industrijske proizvodnje mlečne kisline velja leto 1881, ko so v ZDA pri podjetju Avery skušali z domačimi kalcijeveimi laktati nadomestiti uvožene tartrate, ki so jih uporabljali za proizvodnjo pecilnih praškov. Leta 1895 so v Nemčiji ustanovili prvo tovarno za proizvodnjo mlečne kisline (Teuber, 1993).

Mlečna kislina lahko nastane kot končni produkt fermentacije ali pa kemijske sinteze. Kot produkt fermentacije nastane v racematni mešanici dveh izomer D in L zaradi

nesimetričnega ogljikovega atoma. Z oznako GRAS (ang. Generally Recognized As Safe) se uporablja kot aditiv za živila, odobrena iz strani ameriške FDA (ang. Food And Drug Administration), vendar pa lahko akumulacija D izomere povzroči ledvično acidozo in dekalifikacijo, zato je L izomera mnogo bolj pomembna za človeštvo, saj jo lahko laktat dehidrogenaza razgradi (Datta in sod., 1995). Mlečna kislina je sirupasta tekočina, ki je popolnoma topna v vodotopnih organskih topilih, kot sta alkohol in aceton. Kemijska proizvodnja mlečne kisline je omejena na proizvodnjo racematnih mešanic, biotehnološko pa lahko dobimo tudi čiste L-laktate.

Najpogostejši proizvajalci mlečne kisline so mlečno kislinske bakterije, ki jih lahko razdelimo v dve skupini (Hofvendahl in Hahn-Hägerdal, 2000):

- homofermentativne mlečnokislinske bakterije, ki pretvorijo glukozo v mlečno kislino, in
- heterofermentativne mlečnokislinske bakterije, ki poleg mlečne kisline proizvajajo tudi stranske produkte: etanol, CO₂, propionsko in masleno kislino.

Metabolna pot nastanka mlečne kisline je glikoliza, nato pa razgradnja piruvata do mlečne kisline. Obseg sinteze mlečne kisline pa je odvisen od vrste bakterijskih kultur, njihove starosti in pH. Substrat za proizvodnjo predstavlja melasa, hidrolizirani škrob, glukozna, dekstroza in sirotka (Datta in sod., 1995). Mlečnokislinske bakterije vrste *Streptococcus lactis* in sorodne vrste ter bakterije rodu *Lactobacillus* so glavni proizvajalci mlečne kisline. Poleg bakterij pa lahko proizvajajo mlečno kislino tudi nekatere vrste plesni iz rodu *Rhizopus*, ki s svojim amilaznim encimskim kompleksom v aerobnih pogojih lahko razgradijo škrob direktno v L-mlečno kislino (Oda in sod., 2002).

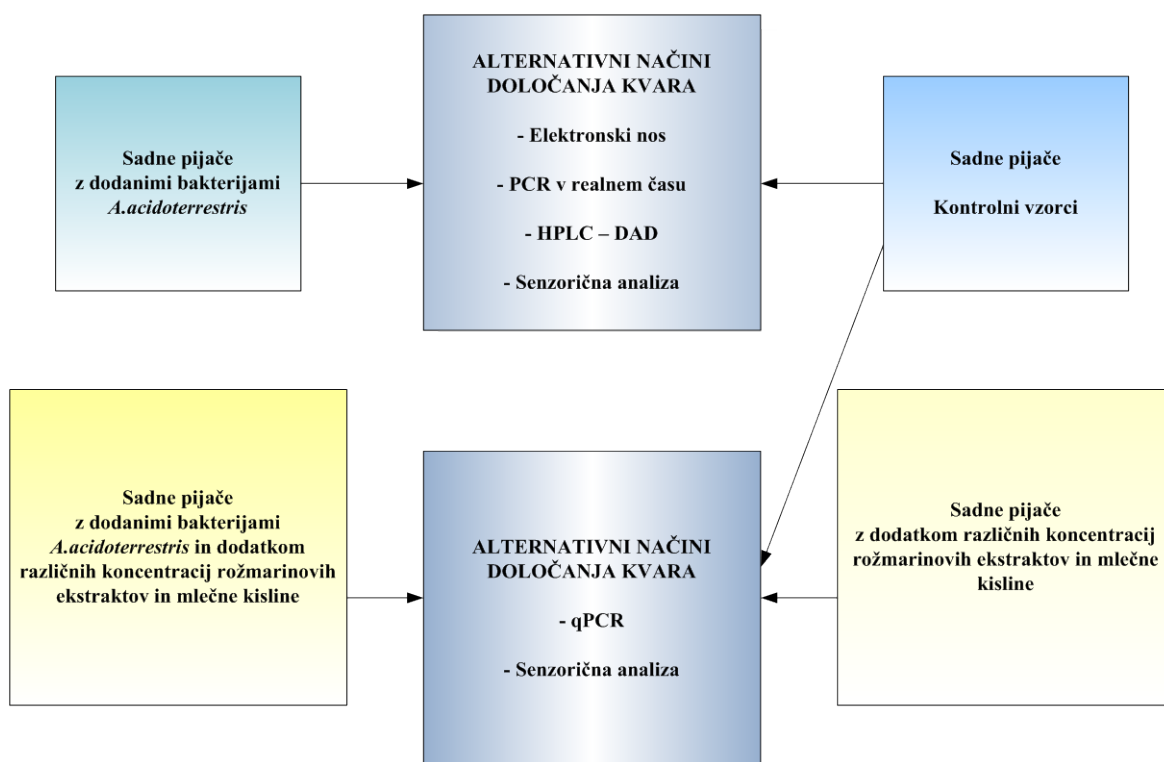
Kemijska sinteza mlečne kisline poteka iz laktonitrila, ki nastaja kot stranski produkt pri sintezi akrilnitrila. V kemijski reakciji acetaldehida in vodikovega cianida nastane laktonitril, ki ob dodatku klorovodikove ali žveplove kisline hidrolizira v mlečno kislino (Datta in sod., 1995).

Mlečna kislina se uporablja v živilski, farmacevtski, kemijski in kozmetični industriji. V živilski industriji se v mesnih izdelkih uporablja kot aditiv za izboljšanje okusa in podaljšanje obstojnosti mesnim izdelkom. Zaradi prijetno kiselkastega okusa se uporablja kot aditiv v proizvodnji pijač, sadnih sokov in sirupov. Kot sredstvo za kisanje se uporablja pri solatah, želejih in slaščicah. Za uravnavanje pH se uporablja v vinarstvu in konzervirani zelenjavi. Prijeten okus daje dresingom, majonezam in omakam. Fermentacijski produkti mlečnokislinskih bakterij dajejo živilom prijeten okus, jim povišajo hranilno vrednost, inhibirajo rast mikroorganizmov in izboljšajo ali spremenijo teksturo (Wee in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

Eksperimentalni del je potekal v dveh sklopih (Slika 9). Prvi sklop je zajemal proučevanje uporabe alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač, ki ga povzročajo bakterije vrste *A. acidoterrestris*, drugi sklop pa proučevanje možnosti inhibicije rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris* z dodatkom različnih koncentracij rožmarinovitih ekstraktov in mlečne kisline.

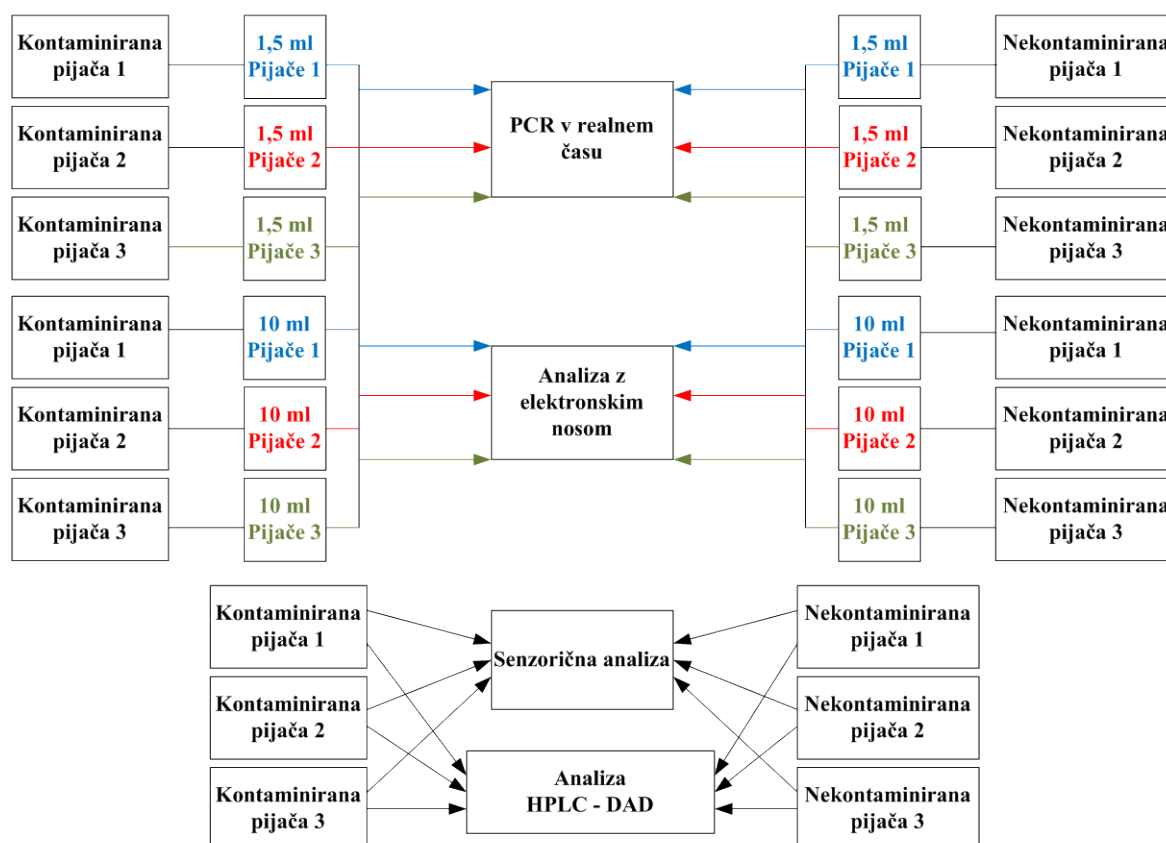


Slika 9: Shema eksperimentalnega dela

Figure 9: Scheme of experimental work

3.1.1 Uporaba elektronskega nosu in PCR v realnem času kot alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*

Z uporabo elektronskega nosu za hitro odkrivanje kvara sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* smo primerjali profil hlapnih komponent v parni fazi naravno kontaminiranih vzorcev sadnih pijač 1, 2 in 3 (Preglednica 2) ter jih primerjali z nekontaminiranimi vzorci istih sadnih pijač. Vzporedno smo opravili tudi senzorično analizo vonja teh vzorcev. Rezultate smo potrdili s PCR v realnem času in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod (HPLC-DAD), s katero smo kvantitativno določili gvajakol kot glavni sekundarni metabolit bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Slika 10). Vzorce smo analizirali v treh paralelkah. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v CNR-IDASC (it. Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Acustica e Sensoristica Orso Mario Corbino) laboratoriju za senzorično analizo živil v Bresci v Italiji.

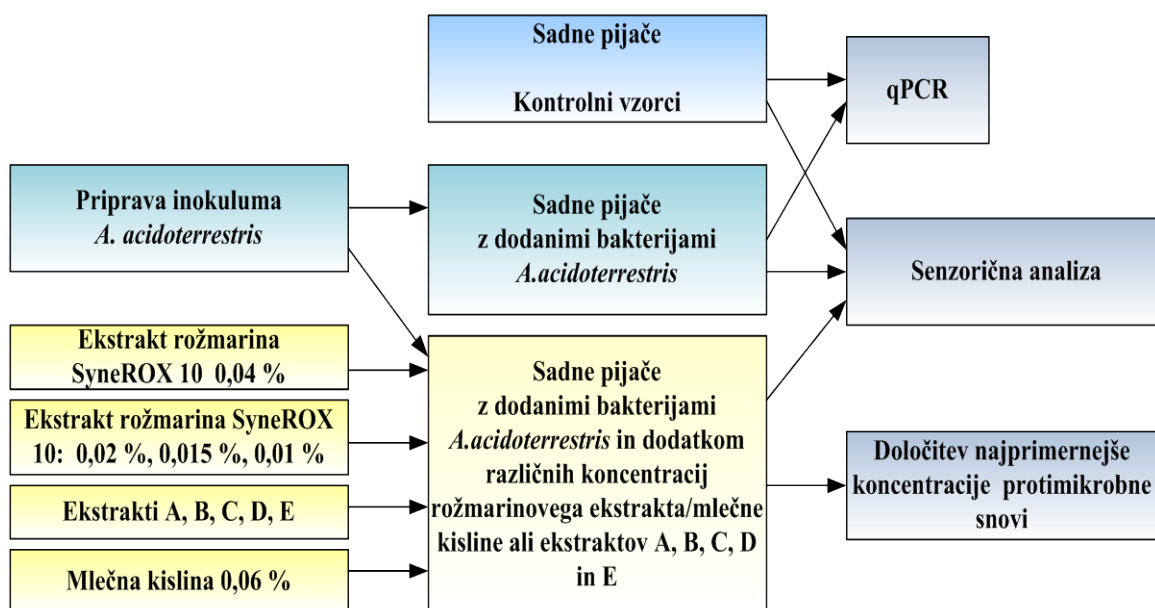


Slika 10: Shema eksperimentalnega dela uporabe elektronskega nosu in PCR v realnem času kot alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*

Figure 10: Scheme of experimental work using electronic nose and real-time PCR as alternative methods for determining spoilage of fruit drinks with *Alicyclobacillus* spp.

3.1.2 Možnosti inhibicije rasti bakterij vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris* z dodatkom rožmarinovitih ekstraktov in mlečne kisline

Za določitev najprimernejše koncentracije protimikrobne snovi (ekstrakt rožmarina in mlečna kislina) za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah smo uporabili dve metodi: senzorično analizo in metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Z izbranim izolatom bakterij vrste *A. acidoterrestris* smo umetno kontaminirali sadne pijače 1, 2, 3 in 4 (Preglednica 2) ter v njih primerjalno v različnih koncentracijah določali protimikrobni učinek ekstraktov rožmarina in mlečne kisline. Vzorce smo inkubirali pri temperaturi 45 °C in dnevno opazovali pojav motnosti kot spremembo senzoričnih lastnosti sadne pijače. Tako smo lahko določili najprimernejšo koncentracijo protimikrobne snovi, ki smo jo nato dodali nekontaminiranemu vzorcu sadne pijače in ugotavljali, ali je prišlo do spremenjenih senzoričnih lastnosti (barva, vonj in okus) te sadne pijače v primerjavi s sadno pijačo brez dodanih protimikrobnih snovi. Z najprimernejšo koncentracijo smo izvedli poskus protimikrobne aktivnosti in rezultate potrdili z metodo qPCR (Slika 11).



Slika 11: Shema eksperimentalnega dela določitve najprimernejše koncentracije protimikrobne snovi za bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Ekstrakti A, B, C, D, E so ekstrakti rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja.

Figure 11: Scheme of experimental work of determination the most appropriate concentration of the antimicrobial substance against bacteria *A. acidoterrestris*. Extracts A, B, C, D, E are extracts of rosemary, some citruses and green tea.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Vzorci sadnih pijač

Vzorci sadnih pijač, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu magistrske naloge, so opredeljeni v Preglednici 2.

Preglednica 2: Vzorci sadnih pijač
Table 2: Fruit beverage samples

Št.	Opis pijače	Sestavine	pH	Brix (%)
1	Nizkoenergijska negazirana brezalkoholna pijača z breskovim sokom in aloe vero	Voda, sladkor, zgoščeni breskov sok (sadni delež najmanj 2 %), zgoščen sok aloe vere (sadni delež najmanj 1 %), sredstvi za uravnavanje kislosti (citronska kislina, natrijev citrat), aroma	3,5 ± 0,4	4,3 ± 0,3
2	Nizkoenergijska negazirana brezalkoholna pijača s hruškovim sokom in izvlečkom melise	Voda, sladkor, zgoščeni hruškov sok (sadni delež najmanj 3 %), sredstvi za uravnavanje kislosti (citronska kislina, natrijev citrat), arome, izvleček melise (0,02 g/l)	3,5 ± 0,4	4,4 ± 0,3
3	Nizkoenergijska negazirana brezalkoholna pijača z jabolčnim sokom, obogatena z magnezijem in vitamini	Voda, sladkor, zgoščeni jabolčni sok (sadni delež najmanj 3 %), sredstvo za uravnavanje kislosti (citronska kislina), naravna aroma, magnezijev karbonat in vitamini (niacin, pantotenska kislina, vitamin B6 in folna kislina)	3,5 ± 0,4	4,6 ± 0,3
4	Nizkoenergijska negazirana brezalkoholna pijača z okusom pomaranče	Voda, sladkor, zgoščeni grozdni sok (sadni delež najmanj 3 %), sredstvo za uravnavanje kislosti (citronska kislina), naravna aroma, izvleček plodov asaj palme (0,05 g/l).	3,3 ± 0,4	4,5 ± 0,3

3.2.2 Kemikalije

Kemikalije, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu:

- fosforjeva (V) kislina (Sigma Aldrich, Nemčija),
- acetonitril (Sigma Aldrich, Nemčija),
- standard gvajakol (Sigma Aldrich, Nemčija),
- absolutni alkohol (Kefo, Slovenija),
- izopropanol (Carlo Erba, Italija)
- voda Milli-Q (Millipore, ZDA).

3.2.3 Reagenti za PCR v realnem času

Za pripravo bakterijske DNA smo uporabili komercialni komplet za izolacijo DNA Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Italija). Pri preiskavah s PCR v realnem času smo za pripravo reakcijske mešanice uporabili:

- reakcijska mešanica za PCR EXPRESS (Invitrogen, ZDA),
- začetni oligonukleotidi (VBC Biotech, Avstrija)
 - CC16S-F 5' CGTAGTTCGGATTGCAGGC 3',
 - CC16S-R 5' GTGTTGCCGACTCTCGTG 3',
- dvojno označena PCR sonda (Metabion, Nemčija)
 - CC16S-P 5' CGGAATTGCTAGTAATCGC 3'.

PCR v realnem času smo izvedli v aparatu iQ5 (Bio-rad, ZDA).

3.2.4 Reagenti za qPCR

Pri preiskavah s qPCR smo za pripravo bakterijske DNA uporabili reagent ViralXpress (Millipore, ZDA). Za reakcijsko mešanico smo uporabili komercialni komplet, ki je vseboval začetna oligonukleotida in dvojno označeno sondo (Biodiversity SpA, Italija). Analize so izvedli na Zavodu za zdravstveno varstvo, Novo mesto.

3.2.5 Protimikrobne snovi

Kot protimikrobne snovi smo uporabili ekstrakt rožmarina, mlečno kislino ter komercialne ekstrakte A - E (Preglednica 3).

Preglednica 3: Protimikrobne snovi
Table 3: Antimicrobial agents

Protimikrobna snov	Sestavine	Testirana koncentracija (%)	Proizvajalec
Ekstrakt rožmarina SyneROX 10 (302080)	Ekstrakt rožmarina in propilen glikol	0,04	Vitiva, Slovenija
		0,02	
		0,015	
		0,01	
Ekstrakt A	Ekstrakt rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja	0,02	Vitiva, Slovenija
Ekstrakt B	Ekstrakt rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja	0,01	Vitiva, Slovenija
Ekstrakt C	Ekstrakt rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja	0,02	Vitiva, Slovenija
Ekstrakt D	Ekstrakt rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja	0,05	Vitiva, Slovenija
Ekstrakt E	Ekstrakt rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja	0,01	Vitiva, Slovenija
Mlečna kislina A – PURAQ Xtend AX37	/	0,06	Purac, Nizozemska
Mlečna kislina B – Zlatol MK	/	0,06	Ecolab, Slovenija

3.2.6 Bakterijski sevi

Pri raziskovalnem delu smo uporabili dva seva:

- bakterije vrste *A. acidoterrestris*, ki so bile izolirane iz naravno kontaminirane sadne pijače,
- tipski sev bakterij vrste *A. acidoterrestris* DSM 3922^T (DSMZ, Braunschweig, Nemčija).

3.2.7 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednji gojišči:

- tekoče gojišče BAT (2.04717 Doehler, Nemčija),
- trdo gojišče ALI (Evancho in Walls, 2001).

Preglednica 4: Sestavine gojišča ALI

Table 4: Composition of medium ALI

Sestavina	Količina
Amonijev sulfat	0,20 g
Mg-sulfat heptahidrat	0,50 g
Kalcijev klorid dihidrat	0,25 g
Kalijev dihidrogen fosfat	3,00 g
Glukoza	1,00 g
Topni škrob	2,00 g
Kvasni ekstrakt	2,00 g
Voda	do 0,5 l

Priprava gojišča ALI: Sestavine v Preglednici 4 smo zmešali in umerili pH na $3,5 \pm 0,2$. Vsebino smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Ko se je vsebina ohladila, smo ji dodali 0,5 l sterilnega agarja (3,5 %) in razlili v prazne petrijeve plošče. Gojišče smo do uporabe hranili pri 4 °C.

Preglednica 5: Sestavine tekočega gojišča BAT

Table 5: Composition of medium BAT

Sestavina
Voda
Dekstroza
Minerali
Kvasni ekstrakt

Tekoče gojišče BAT (Preglednica 5) je bilo kupljeno že vnaprej pripravljeno, njegova podrobna sestava pa je poslovna skrivnost.

3.2.8 Aparature in oprema

Aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu, so navedene v Preglednici 6.

Preglednica 6: Aparature uporabljene pri eksperimentalnem delu
Table 6: Apparatus used by experimental work

Aparatura	Oznaka	Proizvajalec
Elektronski nos	EOS835	SACMI scarl, Italija
Aparat PCR	iQ5	Bio-Rad, Kalifornija
Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod	HPLC-DAD	Waters, ZDA
Centrifuga	/	Beckman Coulther, ZDA
Aparat PCR	SmartCycler II	Capheid, ZDA
Brezprašna komora	/	ISKRA, Slovenija
Inkubator	/	Persues Pbi International, Italija
Digitalni gorilnik s senzorjem	/	Schuett Phonix, Nemčija
Pipetor	Accu jet pro	BrandTech, ZDA

3.3 METODE

3.3.1 Analiza z elektronskim nosom

Z elektronskim nosom smo primerjali profil hlapnih komponent v parni fazi naravno kontaminiranih vzorcev sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* in profil hlapnih komponent v parni fazi nekontaminiranih vzorcev. Vzorci sadnih pijač, ki smo jih uporabili, so opredeljeni v Preglednici 2. Uporabili smo vzorce sadnih pijač 1, 2 in 3. Iz vsake skupine sadnih pijač je bila ena serija vzorcev naravno kontaminirana z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*, druga serija vzorcev pa ni bila kontaminirana in je služila kot negativna kontrola (Slika 10).

Elektronski nos, ki je bil sestavljen iz šestih MOS (ang. Semiconductor Metal Oxide) senzorjev, smo uporabili za detekcijo kvara sadnih pijač. Vzorčenje je bilo opravljeno z avtomatskim vzorčevalnikom (40 vzorčnih mest), ki za vzorčenje uporablja statično »headspace tehniko«. Vzorec zraka se potisne preko vzorčne enote v ohišje, kjer so nameščeni senzorji in kjer pride do interakcije med plinom in aktivnim materialom senzorjev. Temperatura v komori je bila konstantna (55 °C). Kromatografski zrak je služil kot plinska mobilna faza. Pred začetkom izvedbe analize smo vzorce dobro premešali in odpipetirali 10 ml v 20 ml vial, ki smo jih zaprli s silikonskimi pokroveci in inkubirali 10 min pri 40 °C. Vzorce smo izbrali naključno, analiza vsakega vzorca pa je bila

opravljena v dveh paralelkah. Za vsako paralelko je bilo opravljenih 40 ponovitev meritev. Čas vzpostavitve ravnotežnih pogojev in merjenje spremembe upornosti kot odgovor senzorja, ki nastane med interakcijo hlapnih spojin v nadprostoru vzorca in senzorjem, je bil 1 minuta. Čas za obnovo bazne linije je bil 28 minut. Dobljene podatke smo obdelali z multivariatno analizo. Z elektronskim nosom smo posneli različne odzive in dobili krivuljo odzivov, ki smo jo opisali s funkcijo R/R_0 . Vrednost R je bil minimalni odziv senzorja v interakciji z nadprostorom vzorca, R_0 pa odziv bazne linije. Vrednost funkcije R/R_0 je bila med 0 in 1. Vrednost 1 pomeni, da nismo zaznali nobenega odziva. Torej, vrednosti, ki so bile bližje vrednosti 0, so pomenile močnejši odziv senzorjev, vrednosti bližje 1 pa šibkejši odziv senzorjev.

Za statistično analizo podatkov smo uporabili programsko opremo za raziskovalno analizo podatkov EDA (ang. Exploratory data analysis) (proizvajalec MATLAB® pri Sensor Laboratory (Pardo in sod., 2000; Vezzoli in sod., 2008)). Programska oprema EDA je vključevala multivariatno diskriminantno analizo podatkov, metodo glavnih komponent (PCA) in program za grafično-točkovni prikaz odgovorov senzorjev (ang. Paerson correlation matrix). Programsko opremo EDA uporabljamo pri metodah raziskovanja, kjer poteka identifikacija vzorca brez predhodne informacije o naravi vzorca. Za preverjanje možnosti razlikovanja elektronskega nosu med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci smo uporabili več različnih klasifikacijskih tehnik, ki spadajajo med PARC linearne metode: koeficient najbližjih sosedov (kNN), linearno diskriminantno analizo (LDA) in metodo podpornih vektorjev (SVM).

3.3.2 PCR v realnem času

PCR v realnem času smo uporabili za detekcijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vzorcih sadnih pijač 1, 2 in 3 (Preglednica 2). Zamrznjene vzorce smo odtajali na sobni temperaturi in iz vsake plastenke odpipetirali 1,5 ml vzorca v dveh paralelkah. Da bi preverili učinkovitost ekstrakcije DNA smo v eno epruveto z vzorcem sadne pijače dodali eksogeno plazmidno DNA, ki ni bila izolirana iz bakterij rodu *Alicyclobacillus*. Za ekstrakcijo DNA smo uporabili komercialni komplet Wizard Genomic DNA Purification kit. Za vsak PCR v realnem času smo pripravili novo reakcijsko mešanico. Volumen reakcijske mešanice je z dodano DNA za posamezen vzorec vedno znašal 50 μ l (od tega 5 μ l eksogene plazmidne DNA) v dveh paralelkah. Za vsako serijo PCR v realnem času smo naredili tudi negativno kontrolo, pri kateri smo v reakcijsko mešanico dodali sterilno, deionizirano vodo brez DNA. DNA smo dodali reakcijski mešanici za PCR Express s parom začetnih oligonukleotidov CC16S-F, CC16-S in sondo CC16-P za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Connor in sod., 2005) ter kontrolno sondo in kontrolnim fragmentom za preverjanje inhibicije reakcije. Pomnoževanje smo opravili v aparatu iQ5 Bio-rad s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za 16S rRNK in sondo *Taqman* s časovno

temperaturnim programom: aktivacija DNA-polimeraze je trajala 10 min pri 95 °C; PCR je obsegala 50 ciklov sestavljenih iz:

- denaturacije DNA, ki je trajala 30 s pri 95 °C,
- prileganja specifičnih začetnih oligonukleotidov četnikov na specifične dele DNA,
- podaljševanja specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki je trajalo 60 s pri 60 °C.

Rezultate PCR v realnem času smo vrednotili kot vrednosti Ct, dobljene za posamezen vzorec. Pri vsakem PCR v realnem času smo kontrolirali inhibicijo reakcije z določitvijo vrednosti Ct za plazmidno DNA ter preverjali kontaminacijo z negativnimi kontrolnimi vzorci.

3.3.3 qPCR

Glede na rezultate poskusa protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina koncentracije 0,04 % smo iz umetno kontaminiranih sadnih pijač 1 in 2 brez dodatka ekstrakta rožmarina in sadnih pijač 1 in 2 z dodatkom ekstrakta rožmarina izolirali DNA. Vzorce (100 ml) smo prefiltrirali skozi 5 µm filter za odstranitev morebitnih motečih večjih delcev. Iz 100 µl filtrata smo izolirali DNA z reagentom ViralXpress po navodilih proizvajalca. Zmešali smo 400 µl reagenta ViralXpress in 100 µl filtrata. Zmes smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi, dodali 500 µl izopropanola, premešali in centrifugirali 10 min pri 16000 g pri sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli. Sediment smo izprali z dodatkom 400 µl 70 % etanola. Zmes smo centrifugirali 10 min pri 16000g pri sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli, sediment pa posušili na zraku, nato pa resuspendirali v 50 µl DNA/RNA proste vode. Vzorce tako dobljene DNA smo poslali na analizo qPCR na Zavod za zdravstveno varstvo, Novo mesto.

Število bakterij vrste *A. acidoterrestris* v vzorcih smo določali na osnovi vsebnosti določitve specifične DNA s qPCR. Zato smo sočasno analizirali tudi čisto kulturo bakterij vrste *A. acidoterrestris* DSM 3922 in naredili standardno krivuljo, ki je ponazarjala odvisnost signala PCR (Ct) od koncentracije celic bakterij vrste *A. acidoterrestris* DSM 3922. To smo napravili tako, da smo iz kulture *A. acidoterrestris* DSM 3922 napravili desetkratno redčitveno vrsto. Iz 100 µl posameznih redčin smo na enak način kot zgoraj izolirali DNA, enak volumen redčine pa tudi nacepili na gojišče ALI-agar v treh paralelkah. Plošče gojišča ALI-agar smo inkubirali 3 dni pri 45 °C. Po izteku inkubacije smo prešteli kolonije na ploščah. Iz rezultatov PCR redčin bakterij vrste *A. acidoterrestris* DSM 3922 smo dobili standardno krivuljo odvisnosti signala PCR reakcije (Ct) od števila bakterij vrste *A. acidoterrestris* DSM 3922T na gojišču ALI. Na tej standardni krivulji smo nato prevedli signale PCR iz vzorcev v ekvivalente števila bakterij vrste *A. acidoterrestris*.

3.3.4 Analiza HPLC-DAD

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je sestavljala kromatograf Waters Alliance 2695 in fotodetektor z nizom diod 2996 (DAD) ter analitsko kolono Supelcosil ABZ (15 cm × 4,6 mm, 5 µm). Količina injiciranega vzorca, ki smo ga predhodno filtrirali skozi 0,22 µm filter papir, je bila 40 µl. Kot mobilno fazo A smo uporabili 85 % fosforjevo (V) kislino, kot mobilno fazo B pa acetonitril. Gradient za ločitev spojin je bil naslednji: 4 min 3 % mobilne faze B, ki je nato v 10 min narasel 30 % mobilne faze B. Pretok je bil 1,5 ml/min. Gvajakol v vzorcih smo identificirali glede na retenzijski čas in UV-spekter ($\lambda = 220$ nm), kvantitativno ovrednotili pa glede na umeritveno krivuljo eksterne standarda gvajakola v območju 10-500 ppb.

3.3.5 Senzorična analiza

3.3.5.1 Senzorična analiza vzorcev, analiziranih z elektronskim nosom

Šest nešolanih preskuševalcev je opravilo senzorično analizo naslednjih vzorcev: naravno kontaminiranih in nekontaminiranih vzorcev sadnih pijače 1, 2 in 3, vodne raztopine gvajakola koncentracije 1 ppm in 4 ppb. Vsi preskuševalci pred začetkom senzorične analize niso pili, jedli in kadili vsaj 3 ure pred začetkom analize. Po senzorični analizi so preskuševalci izpolnili ocenjevalni list z besedami, ki so opisovale vonj in okus vzorca, in sicer kot medicinski, sadni, zeliščni, itd. V primeru, da vzorec ni ustrezal naštetim opisom, je preskuševalec izbral pojem dober ali slab. Po vsakem vzorcu je bil 10 minutni odmor. Pozitiven rezultat tega testa je bil v primeru, ko je preskuševalec določil spremenjene senzorične lastnosti kontaminiranih vzorcev sadne pijače 1, 2 in 3 v primerjavi z nekontaminiranimi vzorci (vonj, barva in okus) vzorcev sadnih pijač.

3.3.5.2 Senzorična analiza vzorcev, uporabljenih pri določanju najprimernejše koncentracije ekstraktov rožmarina

Vzorci sadnih pijač, ki smo jih uporabili, so opredeljeni v Preglednici 2. Senzorično analizo s triangel testom je opravilo 6 izkušenih preskuševalcev. V vsaki seriji triangel testa sta bila eden ali dva vzorca sadne pijače z dodanim ekstraktom rožmarina. Pozitiven rezultat tega testa je bil v primeru, ko dodatek ekstrakta rožmarina ni imel vpliva na senzorične lastnosti (vonj, barva in okus) vzorcev sadnih pijač.

3.3.6 Določanje najprimernejše koncentracije ekstrakta rožmarina in mešanic ekstraktov

V treh ločenih poskusih smo določili najprimernejše koncentracije ekstraktov rožmarina SyneROX in pet drugih propilen glikolnih ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja (Preglednica 3).

3.3.6.1 Protimikrobna učinkovitost 0,04 % ekstrakta rožmarina

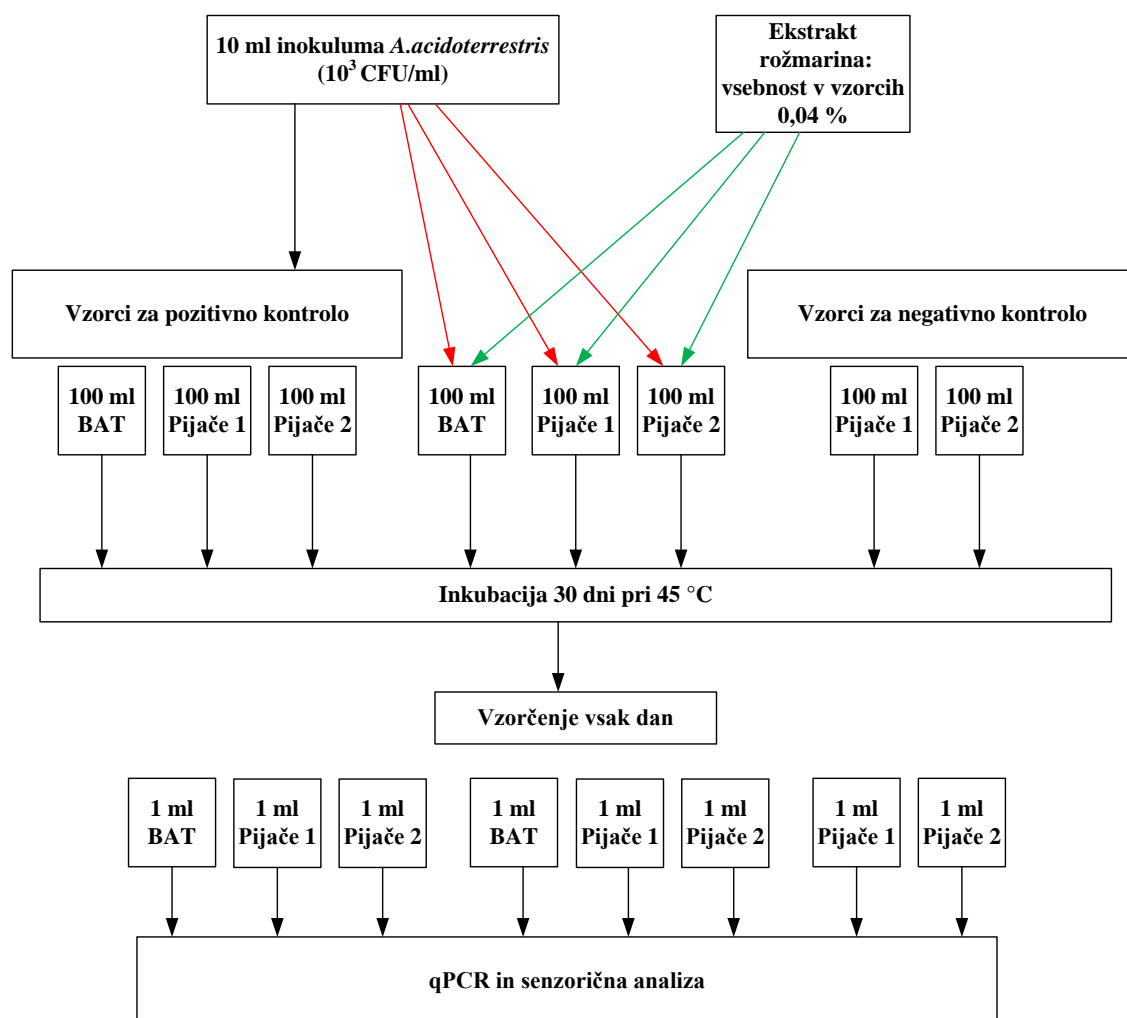
Poskus protimikrobne aktivnosti ekstrakta rožmarina SyneROX koncentracije 0,04 % smo izvedli na vzorcih sadnih pijač 1 in 2, ki smo jih umetno kontaminirali z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* s koncentracijo 10^2 CFU/ml sadne pijače (Preglednica 7). Izbrano koncentracijo ekstrakta rožmarina smo uporabili na predlog proizvajalca. Pozitivna kontrola je bila sadna pijača ali tekoče gojišče BAT z dodanimi bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, negativna kontrola pa je bila le sadna pijača ali tekoče gojišče BAT.

Preglednica 7: Opis vzorcev za določitev protimikrobne aktivnosti 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX
Table 7: Sample description for determination of antimicrobial activity of the 0.04% SyneROX rosemary extract

Vzorec (100 ml)	Koncentracija celic <i>A. acidoterrestris</i> (CFU/ml pijače)	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)
Sadna pijača 1	10^2	0,04
Sadna pijača 2	10^2	0,04
Tekoče gojišče BAT	10^2	0,04
Sadna pijača 1	10^2	/
Sadna pijača 2	10^2	/
Pozitivna kontrola 1	10^2	/
Tekoče gojišče BAT	10^2	/
Pozitivna kontrola 2	10^2	/
Sadna pijača 1	/	/
Sadna pijača 3	/	/
Negativna kontrola 1	/	/
Tekoče gojišče BAT	/	/
Negativna kontrola 2	/	/

Legenda: / brez dodatka

Vzorci smo inkubirali pri temperaturi 45 °C in en mesec dnevno opazovali pojav motnosti kot spremembo senzoričnih lastnosti sadne pijače. Potek poskusa je opredeljen na Sliki 12.



Slika 12: Shema določanja protimikrobne učinkovitosti 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX
Figure 12: The scheme of the antimicrobial activity determination of 0.04% SyneROX rosemary extract

3.3.6.2 Protimikrobna učinkovitost 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstrakta rožmarina

Z metodo razredčevanja in senzorično analizo smo določili najprimernejšo protimikrobno koncentracijo ekstrakta rožmarina SyneROX pri vzorcih sadnih pijač 1, 2, 3 in 4 (Preglednica 2). Senzorična analiza je vključevala primerjalno analizo dveh vzorcev (brez dodanega ekstrakta in z dodanim ekstraktom). Koncentracije, ki smo jih preverili, so bile: 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % (Preglednica 8). Po določitvi senzorično najprimernejše koncentracije smo opravili še poskus protimikrobne aktivnosti pri dveh različnih koncentracijah celic bakterij vrste *A. acidoterrestris* (40 CFU/ml sadne pijače in $4 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$ sadne pijače) pri tistih vzorcih sadnih pijač, ki so bile ob dodatku ekstrakta rožmarina senzorično ustrezne. Koncentracijo celic $4 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$ sadne pijače smo uporabili kot simulacijo zelo močne okužbe, ki v realni proizvodnji praktično ni mogoča.

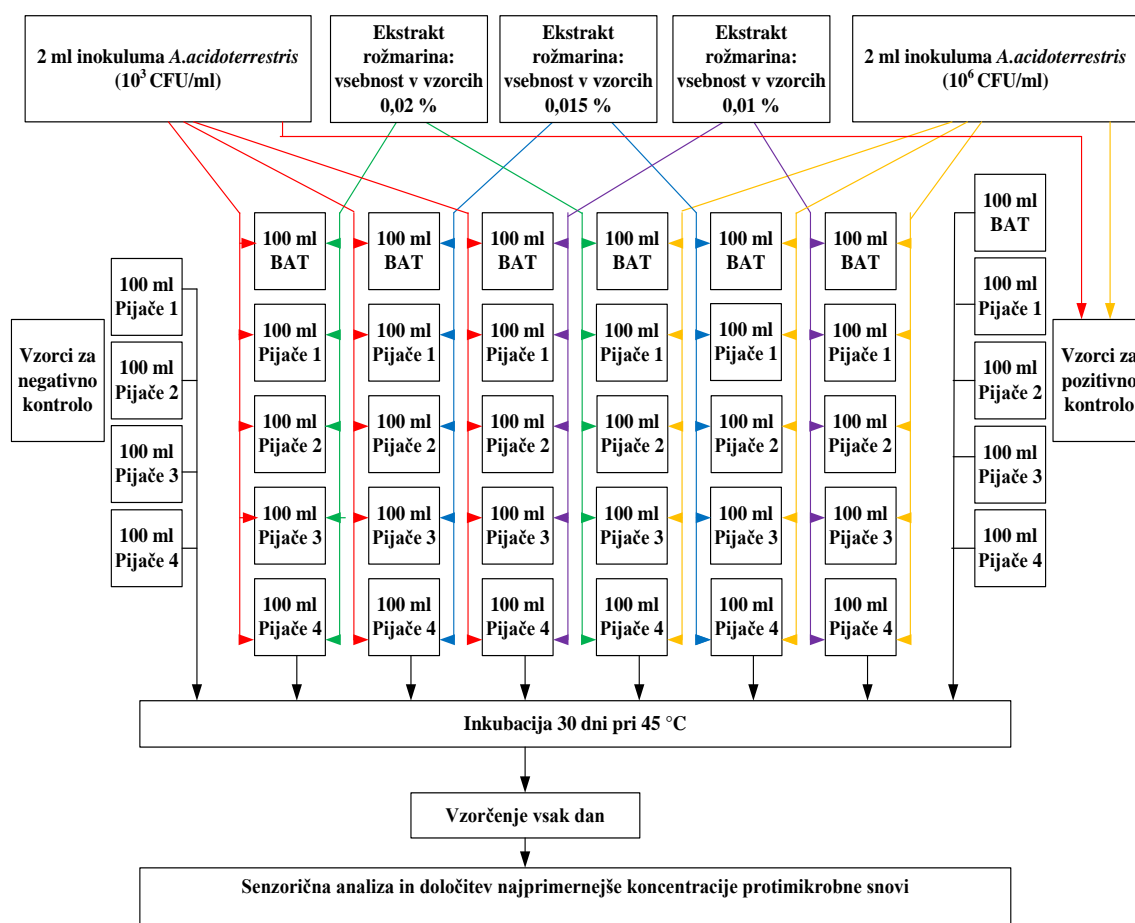
Pozitivna kontrola je bila sadna pijača ali tekoče gojišče BAT z dodanimi bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, negativna kontrola pa je bila le sadna pijača ali tekoče gojišče BAT.

Preglednica 8: Opis vzorcev za določitev najprimernejše koncentracije ekstrakta rožmarina SyneROX
Table 8: Description of samples for determination of the most appropriate antimicrobial concentration of the SyneROX rosemary extract

Vzorec	Koncentracija celic (CFU/ml pijače)	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)
Sadna pijača 1	4×10^4	0,02
Sadna pijača 2	4×10^4	0,015
Sadna pijača 3	4×10^4	0,01
Sadna pijača 4	4×10^4	0,015
Sadna pijača 1	40	0,02
Sadna pijača 2	40	0,015
Sadna pijača 3	40	0,01
Sadna pijača 4	40	0,015
Sadna pijača 1	4×10^4	/
Sadna pijača 2	4×10^4	/
Sadna pijača 3	4×10^4	/
Sadna pijača 4	4×10^4	/
Pozitivna kontrola 1		
Sadna pijača 1	40	/
Sadna pijača 2	40	/
Sadna pijača 3	40	/
Sadna pijača 4	40	/
Pozitivna kontrola 2		
Sadna pijača 1	/	/
Sadna pijača 2	/	/
Sadna pijača 3	/	/
Sadna pijača 4	/	/
Negativna kontrola		

Legenda: / brez dodatka

Vzorci smo inkubirali pri temperaturi 45 °C in en mesec dnevno opazovali pojav motnosti kot spremembo senzoričnih lastnosti sadne pijače. Potek poskusa je opredeljen na Sliki 13.

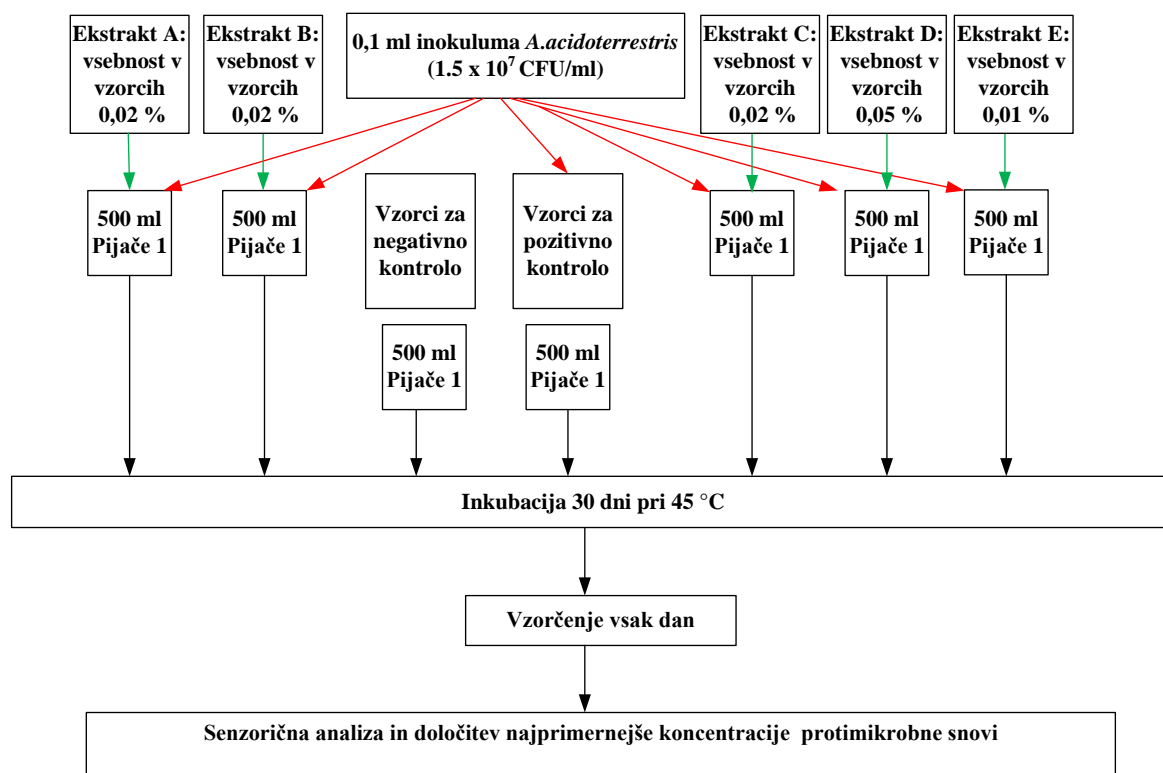


Slika 13: Shema določanja protimikrobne učinkovitosti 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstrakta rožmarina SyneROX

Figure 13: The scheme of determining antimicrobial activity of 0.02%, 0.015% and 0.01% of the rosemary extract SyneROX

3.3.6.3 Protimikrobna učinkovitost mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja

Da bi izboljšali protimikrobno učinkovitost, nam je proizvajalec ekstrakta rožmarina pripravil dodatne različice mešanic ekstraktov. Mešanice (A, B, C, D, E) so bile propilen glikolni ekstrakti rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja (Preglednica 3). Recepture mešanic so poslovna skrivnost. Pri eksperimentalnem delu smo uporabili sadno pijačo 1 in večjo koncentracijo celic bakterij vrste *A. acidoterrestris* (3×10^3 CFU/ml sadne pijače). Najprimernejšo mešanico smo določili s testom protimikrobne aktivnosti (inkubacija pri 45 °C) in s senzorično analizo primerjanja dveh vzorcev, ki sta vsebovala dodatek mešanice ekstrakta, in vzorcev, ki nista vsebovala mešanice ekstrakta (Slika 14).



Slika 14: Shema določanja najprimernejše koncentracije mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja A - E

Figure 14: The scheme of determining the most appropriate concentration of mixtures of rosemary, citrus and green tea extracts A - E

3.3.7 Določanje najprimernejše koncentracije mlečne kisline

Poskus protimikrobne aktivnosti mlečne kisline dveh različnih proizvajalcev s koncentracijo 0,06 % smo izvedli na vzorcih sadnih pijač 1 in 3. Vzorce sadnih pijač smo pripravili laboratorijsko, tako da smo zaradi dodatka mlečne kisline znižali dodatek citronske kisline, da smo ohranili nespremenjeno stopnjo kislosti sadne pijače. Tako pripravljene vzorce smo pasterizirali (20 min, 72 °C) in jih nato umetno kontaminirali z bakterijami vrste *A. acidoterrestis*, da smo dobili končno koncentracijo $1,5 \times 10^4$ CFU/ml sadne pijače (Preglednica 9). Izbrano koncentracijo protimikrobnega sredstva smo uporabili na predlog proizvajalca. Sadni pijači 1 in 3 pa smo izbrali, ker sta bili najbolj občutljivi na kvar z bakterijami vrste *A. acidoterrestis*. Pozitivna kontrola je bila sadna pijača ali tekoče gojišče BAT z dodanimi bakterijami vrste *A. acidoterrestis*, negativna kontrola pa je bila le sadna pijača ali tekoče gojišče BAT. Vzorce smo inkubirali pri temperaturi 45 °C in en mesec dnevno opazovali pojav motnosti kot spremembo senzoričnih lastnosti sadne pijače.

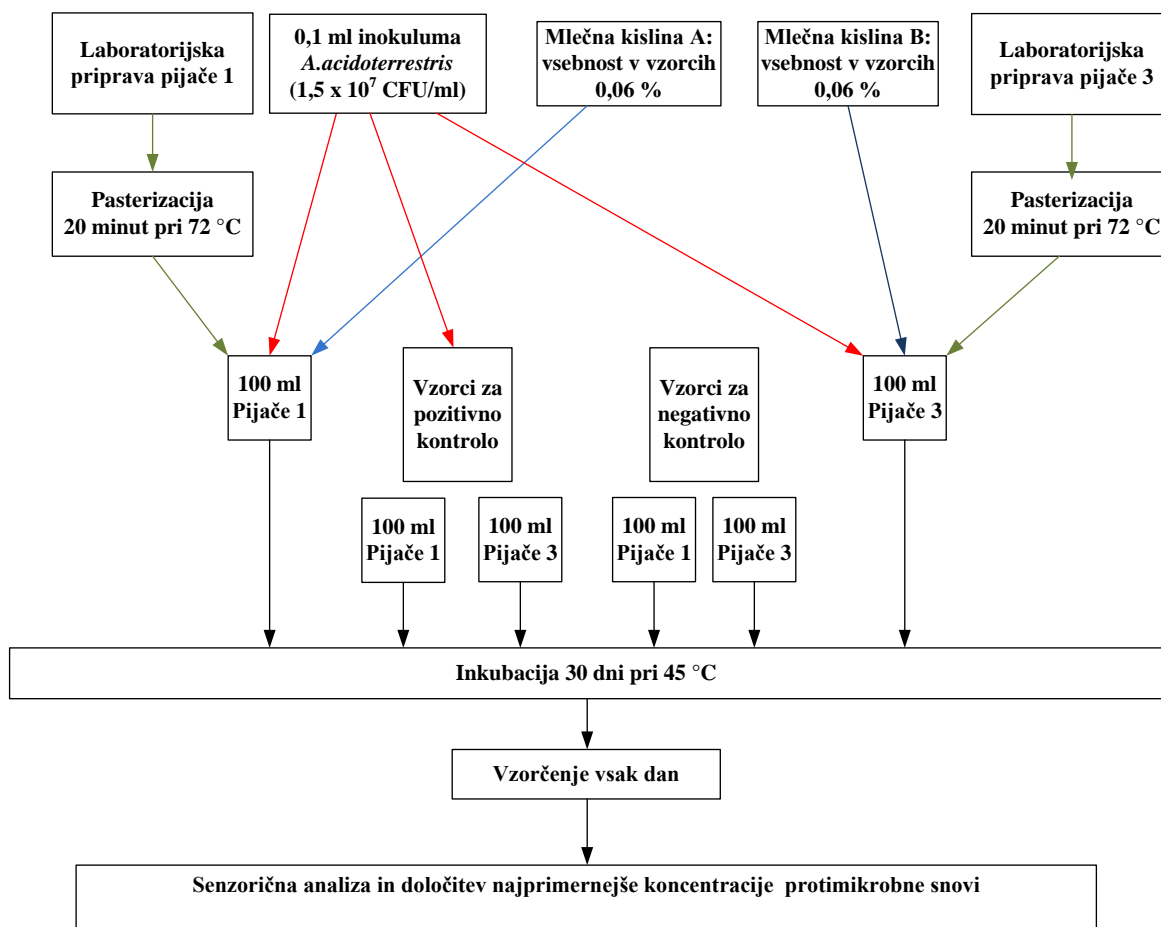
Preglednica 9: Opis vzorcev za določitev protimikrobne aktivnosti 0,06 % mlečne kisline

Table 9: Description of samples for determination antimicrobial activity of 0.06% lactic acid

Vzorec (100 ml)	Koncentracija celic <i>A. acidoterrestris</i> (CFU/ml pijače)	Koncentracija ekstrakta mlečne kisline (A in B) (%)
Sadna pijača 1	$1,5 \times 10^4$	0,06
Sadna pijača 3	$1,5 \times 10^4$	0,06
Tekoče gojišče BAT	$1,5 \times 10^4$	0,06
Sadna pijača 1	$1,5 \times 10^4$	/
Sadna pijača 3	$1,5 \times 10^4$	/
Pozitivna kontrola 1		
Tekoče gojišče BAT	$1,5 \times 10^4$	/
Pozitivna kontrola 2		
Sadna pijača 1	/	/
Sadna pijača 3	/	/
Negativna kontrola 1		
Tekoče gojišče BAT	/	/
Negativna kontrola 2		

Legenda: / brez dodatka

Vzporedno smo opravili tudi senzorično analizo s triangel testom, ki ga je opravilo 10 izkušenih preskuševalcev. V vsaki seriji triangel testa sta bila eden ali dva vzorca z dodano mlečno kislino A ali B. Pozitiven rezultat tega testa je bil v primeru, ko dodatek mlečne kisline ni imel vpliva na senzorične lastnosti (vonj, barva in okus) vzorcev sadnih pijač. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na Sliki 15.



Slika 15: Shema določanja protimikrobno najprimernejše koncentracije mlečne kisline

Figure 15: The scheme for determination of antimicrobial the most appropriate concentration of lactic acid

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Glede na namen magistrske naloge smo proučili uporabo alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač, ki ga povzročajo bakterije vrste *A. acidoterrestris*, in možnosti inhibicije rasti teh bakterij z dodatkom rožmarinovih ekstraktov in mlečne kisline. Vzorci sadnih pijač, ki smo jih uporabili, so bile nizkoenergijske negazirane brezalkoholne pijače:

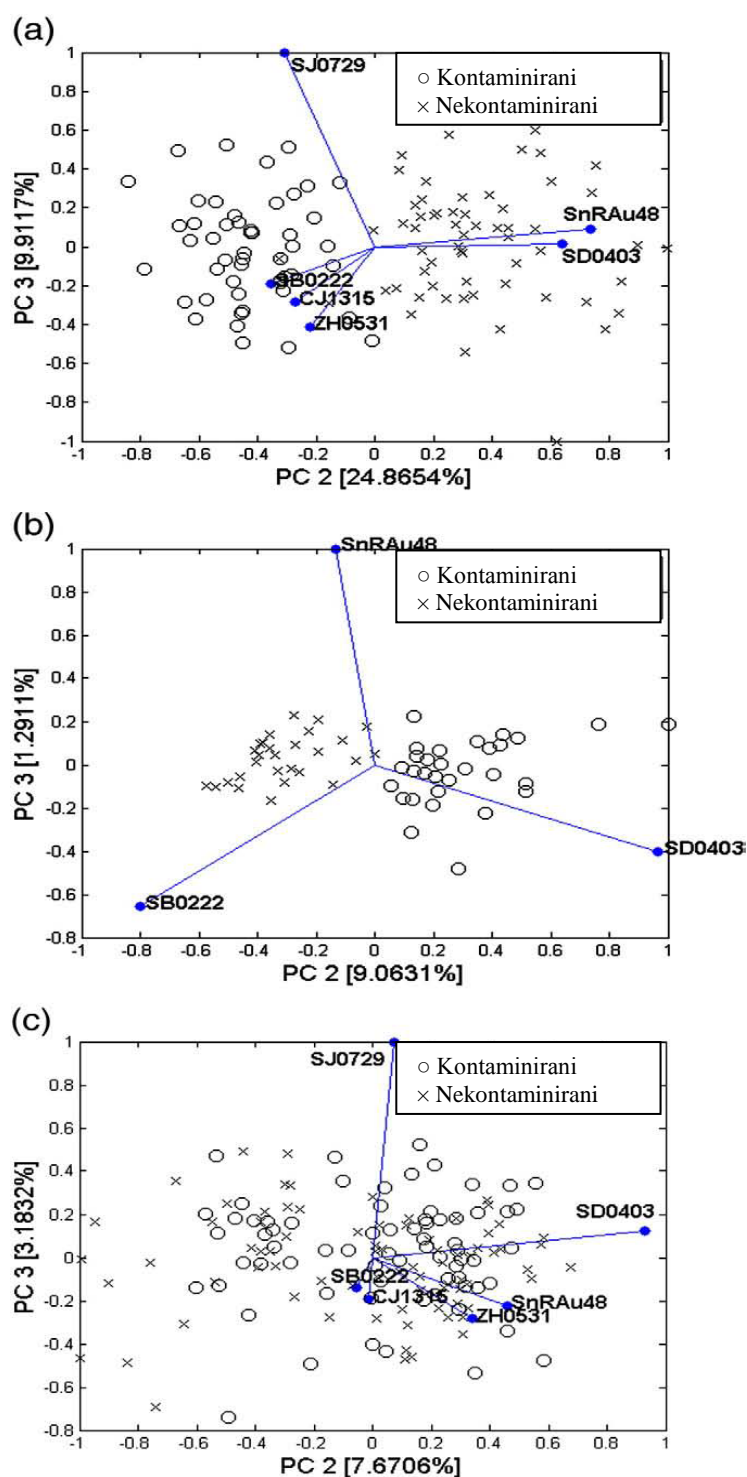
- z breskovim sokom in aloe vero (sadna pijača 1),
- s hruškovim sokom in izvlečkom melise (sadna pijača 2),
- z jabolčnim sokom, obogatena z magnezijem in vitamini (sadna pijača 3),
- z okusom pomaranče (sadna pijača 4).

4.1 UPORABA ALTERNATIVNIH METOD DOLOČANJA KVARA SADNIH PIJAČ Z BAKTERIJAMI RODU *Alicyclobacillus*

Pri proučevanju alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* smo uporabili elektronski nos kot alternativno metodo določanja kvara pri določanju začetka kvara sadnih pijač. Primerjali smo profil hlapnih komponent v parni fazi naravno kontaminiranih vzorcih sadnih pijač in jih primerjali z nekontaminiranimi vzorci. Za določitev bakterij rodu *Alicyclobacillus* v kontaminiranih vzorcih sadnih pijač smo uporabili PCR v realnem času. Rezultate smo potrdili tudi z metodo HPLC-DAD, s katero smo določali vsebnost gvajakola. Vzporedno smo opravili tudi senzorično analizo.

4.1.1 Določitev kvara sadnih pijač z elektronskim nosom

Slika 16 v obliki treh grafov prikazuje projekcijo spremenljivk v ravnini, definirani z dvema glavnima komponentama PC2 in PC3, ki sta bili določeni z elektronskim nosom v kontaminiranih in nekontaminiranih sadnih pijačah 1 (z breskovim sokom in aloe vero) (a), v sadnih pijačah 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) (b) in v sadnih pijačah 3 (z jabolčnim sokom) (c) (Concina in sod., 2010). Vsaka točka v grafu oziroma signal senzorja, ki je bil računalniško obdelan z metodo glavnih komponent (PCA - ang. principal component analysis), pomeni »prstni odtis« vzorca, ki je sestavljen iz signala niza senzorjev in nastane kot posledica interakcije hlapnih spojin nad vzorcem s senzorjem. Vsak senzor je imel v primerjavi z ostalimi različno selektivnost. Rezultati analize sadne pijače 1 z uporabo vseh šestih senzorjev (Slika 14a) so pokazali dobro ločitev med kontaminiranimi (točke v grafu označene s krogi) in nekontaminiranimi vzorci (točke v grafu označene s križci). Klasifikacijske metode, s katerimi smo testirali delovanje elektronskega nosu pri sadni pijači 1 in njegovo možnost razlikovanja med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci, so potrdile 100 % ujemanje rezultatov z metodama kNN in SVM. Za razlikovanje med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci sadne pijače 2 je zadostovalo že merjenje s tremi senzorji (Slika 14b).



Slika 16: Projekcija spremenljivk v ravnini, definirani z dvema glavnima komponentama PC2 in PC3, določenima z elektronskim nosom v sadni pijači 1 (a), v sadni pijači 2 (b) in v sadni pijači 3 (c)
Figure 16: Biplots reporting the two principal components PC2 and PC3 analysed by electronic nose in fruit beverage 1 (a); fruit beverage 2 (b) and fruit beverage 3 (c)

Klasifikacijske metode so potrdile 100 % ujemanje rezultatov z metodo kNN in 98 % ujemanje rezultatov z metodo SVM. Pri sadni pijači 3 razlik med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci ni bilo mogoče določiti (Slika 14c) kljub uporabi vseh šestih senzorjev. Vzrok temu bi lahko bila vsebnost večih različnih hlapnih komponent, ki na senzore delujejo kot »maska«, zaradi česar elektronski nos ni mogel detektirati razlike med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci (Concina in sod., 2010). Povzamemo lahko, da je elektronski nos primeren za zgodnje odkrivanje kvara z bakterijami rodu *Alicyclobacillus* pri sadni pijači 1 in 2. Pri odkrivanju kvara pri sadni pijači 3 pa metoda ni bila uspešna in bi bilo potrebno nadaljevati z raziskovanjem. Tudi drugi avtorji (Cagnasso in sod., 2010) so z uporabo elektronskega nosu potrdili razliko med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci pomarančnega soka. Prav tako so pokazali, da se elektronski nos lahko uporablja za hitro odkrivanje spremenjenih senzoričnih lastnosti pijač, saj so pozitivne rezultate detektirali že 24 ur po kontaminaciji pomarančnega soka z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, ko je bila koncentracija celic $<10^3$ CFU/ml .

4.1.2 Določitev bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih pijačah s PCR v realnem času

S PCR v realnem času smo določili bakterije rodu *Alicyclobacillus* v naravno kontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1 (z breskovim sokom in aloe vero), 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) in 3 (z jabolčnim sokom). Bakterije rodu *Alicyclobacillus* niso bile prisotne v nekontaminiranih vzorcih, medtem ko smo v naravno kontaminiranih vzorcih njihovo prisotnost potrdili (Preglednica 10).

Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vzorcih sadnih pijač 1, 2 in 3

Table 10: Real-time PCR results for detection of *Alicyclobacillus* spp. in samples of fruit beverages 1, 2 and 3

Vzorec	PCR v realnem času
Naravno kontaminirani vzorci sadne pijače 1 (n=3)	+
Naravno kontaminirani vzorci sadne pijače 2 (n=3)	+
Naravno kontaminirani vzorci sadne pijače 3 (n=3)	+
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 1 (n=3)	-
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 2 (n=3)	-
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 3 (n=3)	-
Plazmidna DNA v vzorcu sadne pijače 1 (n=2)	+
Plazmidna DNA v vzorcu sadne pijače 2 (n=2)	+
Plazmidna DNA v vzorcu sadne pijače 3 (n=2)	+
Negativna kontrola (deionizirana voda brez DNA) (n = 2)	-

Legenda: +: prisotnost bakterij rodu *Alicyclobacillus*; -: ni bilo prisotnih bakterij rodu *Alicyclobacillus*

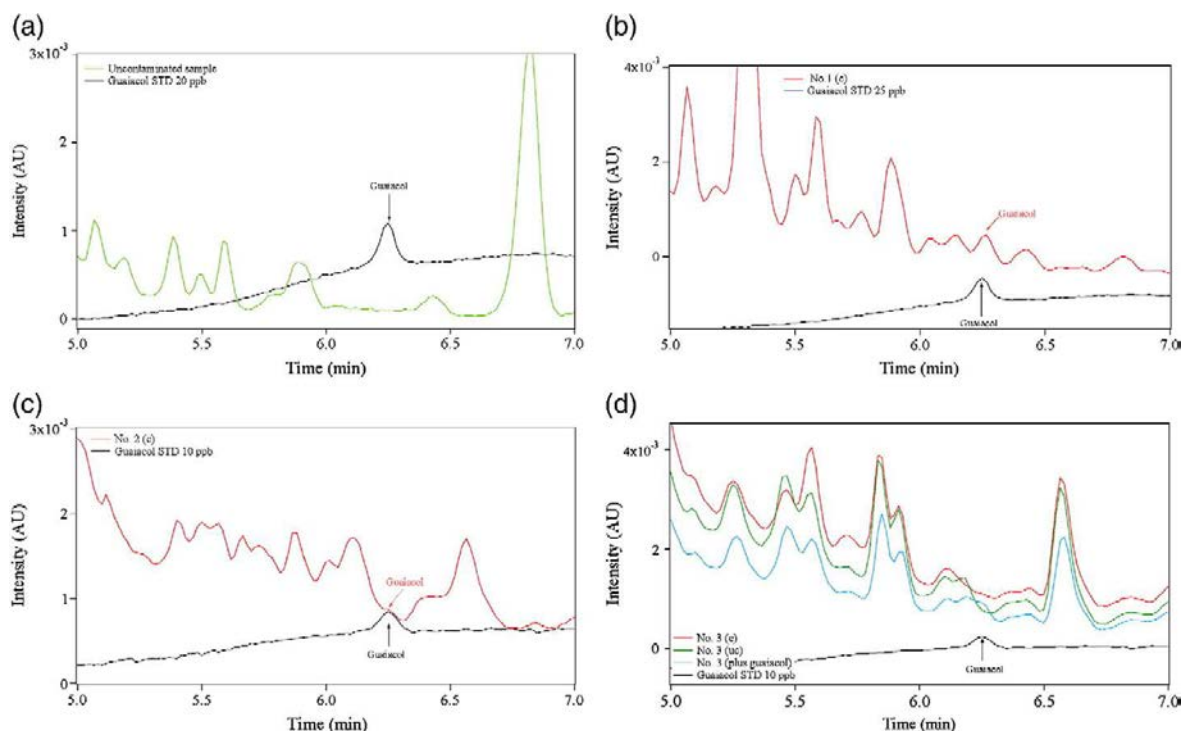
Eden izmed dejavnikov, ki pomembno vplivajo na rast bakterij rodu *Alicyclobacillus*, je tudi vrsta oz. sestava sadnih pijač (Tokuda, 2007; Smit in sod., 2010). Splittstoesser in sod. (1994, 1998) so proučili različne vrste sadnih sokov in pijač ter njihovo dovzetnost na kvarjenje z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*. Rast bakterij so opazili v različnih sadnih sokovih: jabolčnem, hruškinem, pomarančnem, ananasovem, paradižnikovem in grenivkinem soku. Rast bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih sokovih je bila inhibirana, ko je bila presežena koncentracija sladkorja 18 °Brix. Tudi v našem poskusu smo dokazali rast bakterij rodu *Alicyclobacillus* v vseh treh kontaminiranih sadnih pijačah. Vsebnost sladkorja v vseh treh pijačah ni presegla koncentracije sladkorja 18 °Brix (sadna pijača 1: $4,3 \pm 0,3$ °Brix, sadna pijača 2: $4,4 \pm 0,3$ °Brix in sadna pijača 3: $4,6 \pm 0,3$ °Brix).

4.1.3 Določitev gvajakola v sadnih pijačah s HPLC-DAD

Vsebnost gvajakola v kontaminiranih in nekontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1 (z breskovim sokom in aloe vero), 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) in 3 (z jabolčnim sokom) smo določali z metodo HPLC-DAD pri valovni dolžini 220 nm. Določili smo spodnjo mejo detekcije (LOD), ki je znašala 10 ppb. LOD je odvisna od posamezne aparature, zato so že objavljeni podatki razlikujejo od našega. Nekateri avtorji navajajo, da je meja detekcije gvajakola v vodi 20 ppb (Wassermann, 1966), pomarančnem, jabolčnem in ostalih negaziranih brezalkoholnih pijačah pa 2 ppb (Orr in sod., 2000; Pettipher in sod., 1997). Pri mnogih analitičnih aparatih je lahko meja detekcija še nižja, vendar je detekcija zelo težka in mogoča le z uporabo mikroekstrakcije v trdni fazi in masne spektrometrije. Orr in sod. (2000) navajajo, da je meja detekcije gvajakola, ki je določena s kromatografskimi metodami, višja, kot jo lahko določi človek pri senzorični analizi. Omenjeni problem sta poizkušala odpraviti Bahçeci in Acar (2007) z matematičnim modeliranjem gvajakola, ki so ga tvorile bakterije vrste *A. acidoterrestris*, vendar sta koncentracijo gvajakola določila le v enotah ppm.

Kromatogrami vzorcev sadnih pijač 1 (z breskovim sokom in aloe vero), 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) in 3 (z jabolčnim sokom) so prikazani na Sliki 15. Vsi kromatogrami zajemajo odziv posameznega vzorca in standarda gvajakola pri valovni dolžini 220 nm. V nekontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1, 2 in 3 gvajakola nismo odkrili (Slika 15a). V kontaminiranih vzorcih sadne pijače 1 (z breskovim sokom in aloe vero) smo določili 26 ppb gvajakola (Slika 15b), v vzorcih sadne pijače 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) pa je bila koncentracija gvajakola pod mejo detekcije (<10 ppb) (Preglednica 11). Koncentracija gvajakola 26 ppb, ki smo jo določili v vzorcih sadne pijače 1, je v območju koncentracij 1,20 - 100,80 ppb, ki so ga Pettipher in sod. (1997) določili v jabolčnem in pomarančnem soku ter drugih negaziranih sadnih pijačah, kjer je bila največja koncentracija gvajakola dosežena v treh dneh pri temperaturi 44 °C. Ker je bil pik gvajakola pri kontaminiranih vzorcih sadne pijače 3 (z jabolčnim sokom) nejasen (Slika

15c) zaradi prenizke koncentracije, smo njegovo prisotnost potrdili tako, da smo vzorcu dodali standard gvajakola s koncentracijo 20 ppb. Na ta način smo dokazali prisotnost gvajakola, saj se je ob njegovem dodatku obstoječi pik povečal.



LEGENDA:

- (a) nekontaminiran vzorec sadne pijače 1 (zelena črta) in standard gvajakol (črna črta),
- (b) kontaminiran vzorec sadne pijače 1 (rdeča črta) in standard gvajakol (črna črta),
- (c) kontaminiran vzorec sadne pijače 2 (rdeča črta) in standard gvajakol (črna črta),
- (d) vzorci sadne pijače 3: nekontaminiran (zelena črta), kontaminiran (rdeča črta) in kontaminiran vzorec sadne pijače z dodatkom standarda gvajakola (modra črta) in standard gvajakol (črna črta).

Slika 17: Kromatogrami določitve gvajakola v vzorcih sadnih pijač 1-3 z analizo HPLC-DAD
Figure 17: HPLC-DAD chromatograms of guaiacol presence in fruit beverages 1-3

Nizka koncentracija gvajakola v kontaminiranih vzorcih je lahko posledica nizkega števila bakterij v živilu. Bahçeci in sod. (2005) so določili gvajakol pri koncentraciji bakterij vrste *A. acidoterrestris* 10^4 CFU/ml, medtem ko so Pettipher in sod. (1997) v jabolčnem in pomarančnem soku določili gvajakol pri višji koncentraciji 10^5 CFU/ml soka. Podobne rezultate so dobili tudi Komitopoulou in sod. (1999). Z našimi rezultati smo določili koncentracijo gvajakola v naravno kontaminiranih vzorcih sadnih pijač in potrdili prisotnost bakterij vrste *A. acidoterrestris*, vendar pa števila bakterij v kontaminiranih vzorcih nismo določili. Poleg stopnje kontaminacije na tvorbo gvajakola pomembno vplivajo tudi: sestava vzorca živila oz. vrsta sadne pijače (Mielle, 1996; Pettipher in sod., 1997), temperatura skladiščenja (Mielle, 1996), toplotna obdelava (Walls in Chuyate, 2000) in vsebnost kisika v plinski fazi prostora med tekočino in pokrovom embalaže (Walker in Phillips, 2005).

Preglednica 11: Vsebnost gvajakola v kontaminiranih in nekontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1-3.

Table 11: Guaiacol content in contaminated and uncontaminated fruit beverages 1-3.

Vzorec sadne pijače	Vsebnost gvajakola (ppb)
Kontaminirani vzorci sadne pijače 1	26 ± 3
Kontaminirani vzorci sadne pijače 2	< 10
Kontaminirani vzorci sadne pijače 3	< 10
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 1	< 10
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 2	< 10
Nekontaminirani vzorci sadne pijače 3	< 10

4.1.4 Senzorična analiza sadnih pijač

Rezultati senzorične analize sadnih pijač 1-3 in vodnih raztopin gvajakola so prikazani v Preglednici 12. Pet preskuševalcev je vzorec vodne raztopine gvajakola (1 ppm) opisalo z medicinskim vonjem in vonjem po zeliščih, medtem ko so ta vonj v vzorcu vodne raztopine gvajakola (4 ppb) zaznali le štirje preskuševalci. Med naravno kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci sadnih pijač 1 (z breskovim sokom in aloe vero) in 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) sta dva preskuševalca ocenila, da imajo kontaminirani vzorci spremenjen vonj in okus. Le en preskuševalec je ocenil spremenjene senzorične lastnosti pri kontaminiranemu vzorcu sadne pijače 3 (z jabolčnim sokom).

Z analizo HPLC-DAD smo ugotovili, da je bila vsebnost gvajakola v kontaminiranem vzorcu sadne pijače 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) pod mejo detekcije (Preglednica 11), kljub temu sta spremenjene senzorične lastnosti ugotovila dva preskuševalca.

Preglednica 12: Senzorična analiza vzorcev sadnih pijač 1, 2 in 3 kontaminiranih z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*

Table 12: Sensory analysis of samples of fruit beverages 1, 2 and 3 contaminated with *A. acidoterrestris*

	Vzorec	Preskuševalac					
		1	2	3	4	5	6
Vonj	Gvajakol 1 ppm	mentol, medicinski	bolnišnični	bolnišnični	mentol, bolnišnični	/	zeliščni
	Gvajakol 4 ppb	po dimu	/	bolnišnični medicinski	rahlo po mentolu	/	bolnišnični
	Sadna pijača 1 NK	po cvetju	sadni	sadni	sadni	sadni	sadni
	Sadna pijača 1 K	bolnišnični	sadni	sadni	sadni	neprijeten	zeleno jabolko
	Sadna pijača 2 NK	sadni	po cvetju	po cvetju	zeliščni	sadni	po cvetju
	Sadna pijača 2 K	sadni, po cvetju	zeliščni	sadni, bolnišnični	sadni	sadni, mentol	zeliščni
	Sadna pijača 3 NK	sadni	vonj po cvetju	po cvetju	sadni	zeliščni	sadni
	Sadna pijača 3 K	zeleno jabolko	jabolko	po cvetju	zeliščni	sadni	medicinski
	Sadna pijača 1 NK	po cvetju	sadni	po cvetju	sadni	sadni	sadni
	Sadna pijača 1 K	bolnišnični	sadni	sadni	sadni	neprijeten	zeleno jabolko
Okus	Sadna pijača 2 NK	po cvetju	sadni	po cvetju	sadni	sadni	sadni
	Sadna pijača 2 K	po cvetju	zeliščni	sadni, medicinski	sadni	sadni, po mentolu	zeliščni
	Sadna pijača 3 NK	jabolko	po cvetju	po cvetju	sadni	zeliščni	sadni
	Sadna pijača 3 K	zeleno jabolko	jabolko	sadni, po cvetju	zeliščni	zeliščni	medicinski

NK – nekontaminiran vzorec, K – kontaminiran vzorec

Podobno so z metodo HPLC-DAD ugotovili tudi Orr in sod. (2000), ki navajajo, da je bila spodnja meja detekcije gvajakola višja od spodnje meje detekcije gvajakola, ki jo lahko zazna človek. Večina preskuševalcev (5 od 6) med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci sadne pijače 3 (z jabolčnim sokom) ni zaznala razlik, kar sicer sovпада z rezultati elektronskega nosu, vendar je senzorično analizo kontaminiranih in nekontaminiranih vzorcev sadnih pijač 1, 2 in 3 opravilo šest nešolanih preskuševalcev, zato bi bilo potrebno poskus ponoviti še s šolanimi preskuševalci.

4.2 INHIBICIJA RASTI BAKTERIJ VRSTE *Alicyclobacillus acidoterrestris* Z DODATKOM ROŽMARINOVIH EKSTRAKTOV IN MLEČNE KISLINE

Proučevanje možnosti inhibicije rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris* je zajemalo študij protimikrobne učinkovitosti različnih koncentracij ekstrakta rožmarina SyneROX, petih različnih mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja ter mlečne kisline. Metode, ki smo jih uporabili, so bile senzorična analiza, metoda razredčevanja in qPCR.

4.2.1.1 Protimikrobna učinkovitost 0,04 % ekstrakta rožmarina

Vzorci, katerim smo dodali bakterije vrste *A. acidoterrestris* - pozitivne kontrole sadne pijače 1 (z breskovim sokom in aloe vero), sadne pijače 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) in tekoče gojišče BAT, so postali motni že po dveh dneh inkubacije pri temperaturi 45 °C, torej je prišlo do rasti bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Pri višji temperaturi inkubacije pride do hitrejše tvorbe gvajakola in s tem spremenjenih senzoričnih lastnosti sadnih pijač (Smit in sod., 2010). Pettipher in sod. (1997) so določili začetek tvorbe gvajakola v sadnih sokovih po 6 dnevih inkubacije pri 25 °C. Pri 44 °C pa je do tvorbe gvajakola v sadnih sokovih prišlo že po 3 dneh. Bahçeci in sod. (2005) navajajo, da je pri kontaminiranem jabolčnem soku prišlo do spremenjenih senzoričnih lastnosti (nastanek gvajakola) že po 30 urah, ko je bila koncentracija celic 10^4 CFU/ml. Največja koncentracija gvajakola v jabolčnem soku je bila dosežena v 75 urah pri temperaturi inkubacije 46 °C, medtem ko pri 25 °C gvajakola niso določili oz. je bila koncentracija izredno nizka. V vzorcih sadne pijače 1 in vzorcih sadne pijače 2, katerim smo poleg bakterij vrste *A. acidoterrestris* dodali ekstrakt rožmarina SyneROX (0,04 %), ter v negativnih kontrolah do rasti bakterij ni prišlo, saj nismo opazili motnosti v času enomesečne inkubacije pri 45 °C. Povzamemo lahko, da je dodatek ekstrakta rožmarina v koncentraciji 0,04 % učinkovito zavrl rast bakterij v vseh vzorcih (Preglednica 13).

Preglednica 13: Rezultati določanja najprimernejše protimikrobne koncentracije ekstrakta rožmarina SyneROX

Table 13: The results of determining the most appropriate antimicrobial concentrations of SyneROX rosemary extract

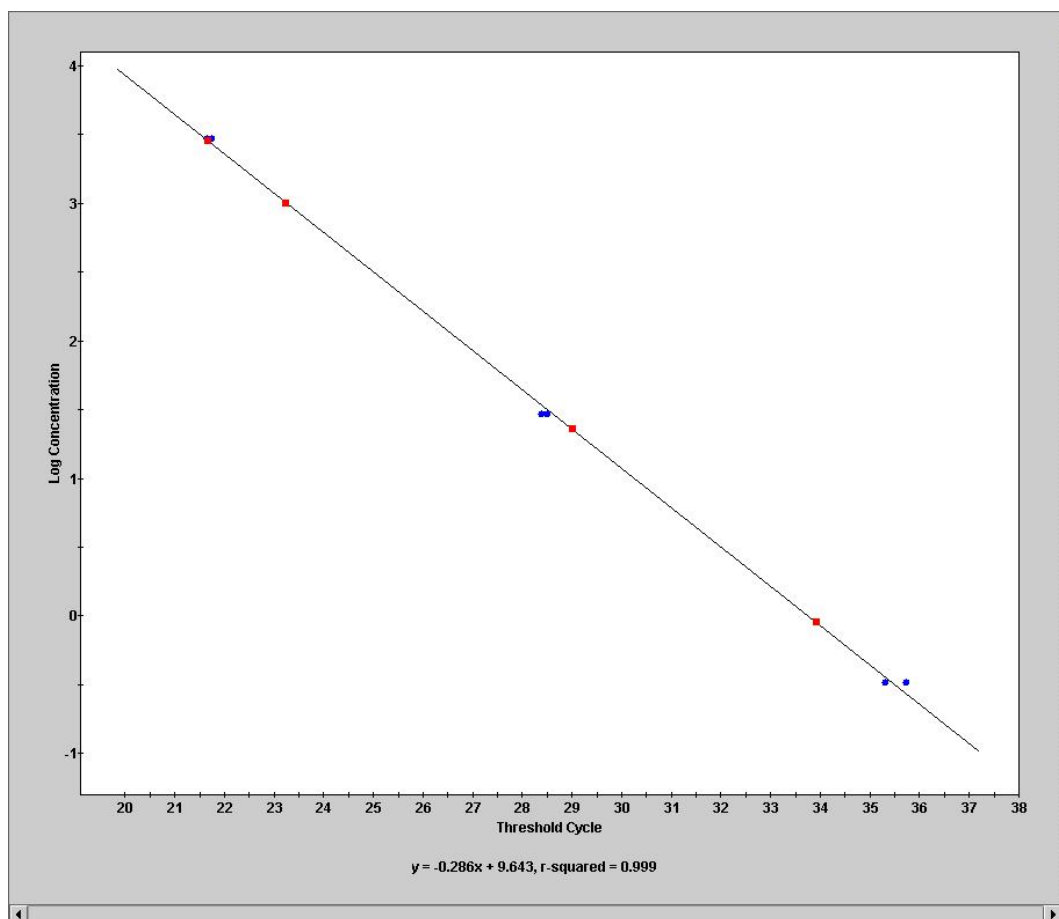
Vzorec	Dodatek bakterij vrste	Dodatek 0,04 %	Rast bakterij
	<i>A. acidoterrestris</i> 10 ² CFU/ml	ekstrakta rožmarina SyneROX	
Sadna pijača 1	-	-	-
Sadna pijača 1	+	-	+
Sadna pijača 1	+	+	-
Sadna pijača 2	-	-	-
Sadna pijača 2	+	-	+
Sadna pijača 2	+	+	-
Tekoče gojišče BAT	+	-	+
Tekoče gojišče BAT	+	+	-

Rezultati senzorične analize nekontaminiranih sadnih pijač 1 in 2 z dodatkom ekstrakta rožmarina SyneROX (0,04 %) so pokazali, da je pet od šestih preskuševalcev opazilo spremenjene senzorične lastnosti pri sadni pijači 1 (z breskovim sokom in aloe vero), pri sadni pijači 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise) pa je razliko opazilo vseh šest preskuševalcev (Preglednica 14). Najbolj opazna razlika je bila v spremenjeni aromi (vonj in okus).

Preglednica 14: Senzorična analiza sadnih pijač 1 in 2 z dodatkom 0,04 % ekstrakta rožmarina SyneROX
Table 14: Sensory analysis of fruit beverages 1 and 2 with 0.04% of rosemary extract SyneROX

Preskuševalc	Sadna pijača 1 (z breskovim sokom in aloe vero)
1	Pijača z ekstraktom je imela neprijeten vonj.
2	Pijača z ekstraktom je imela neprimeren vonj in okus.
3	Pijača z ekstraktom je imela neprimeren vonj in okus.
4	Minimalna razlika v okusu in vonju med pijačama z ekstraktom in brez.
5	Ni razlik.
6	Pijača z ekstraktom je imela neprijeten okus.
Preskuševalc	Sadna pijača 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise)
1	Pijača z ekstraktom je imela premočen vonj.
2	Pijača z ekstraktom je imela neprimeren vonj in okus.
3	Pijača z ekstraktom je imela neprimeren vonj.
4	Pijača z ekstraktom je imela neprimeren vonj.
5	Pijača z ekstraktom je imela neprijeten vonj
6	Pijača z ekstraktom je imela neprijeten vonj in okus.

V sadnih pijačah, v katerih smo preverjali protimikrobno učinkovitost ekstrakta rožmarina SyneROX (0,04 %), smo vzporedno s qPCR kvantificirali en sev bakterij vrste *A. acidoterrestris*. Standardna krivulja odvisnosti signala PCR reakcije (Ct) od števila bakterij vrste *A. acidoterrestris* (Slika 18) je imela dober koeficient korelacije R^2 (99,9 %) in dobro učinkovitosti reakcije (93 %). Zato smo lahko signale PCR vzorcev lahko prevedli v število bakterij (CFU/ml).



Slika 18: Standardna krivulja odvisnosti signala qPCR (Ct) od števila bakterij vrste *A. acidoterrestris* (log CFU/100 μ l) (modre točke) in rezultati vzorcev sadne pijače 1 in 2 (rdeče točke)

Figure 18: Standard curve of dependence of qPCR signal (Ct) from number of *A. acidoterrestris* (CFU/100 μ l) (blue dots) and results for fruit beverages 1 and 2 (red dots)

Rezultati določanja števila bakterij vrste *A. acidoterrestris* v vzorcih sadnih pijač 1 in 2 so prikazani v Preglednici 15. Prisotnost bakterij smo potrdili v vseh vzorcih. Koncentracija celic po inkubaciji 3 dni pri 45 °C v kontaminirani sadni pijači 1 je bila $2,9 \times 10^4$ CFU/ml, v sadni pijači 2 pa $1,02 \times 10^4$ CFU/ml. Podobne rezultate so dobili tudi Bahçeci in sod. (2005), ki so v kontaminiranem jabolčnem soku določili koncentracijo celic 10^4 CFU/ml. Večjo koncentracijo celic (10^5 CFU/ml) bakterij vrste *A. acidoterrestris* pa so v jabolčnem in pomarančnem soku določili Pettipher in sod. (1997). Še večjo koncentracijo celic (10^6

CFU/ml) pa so Silva in sod. (2001) določili v pomarančnem soku, ki je bil skladiščen 24 ur pri 44 °C. V jabolčnem, grenivkinem in pomarančnem soku pa so opazili spremenjen vonj po 4 dnevnem skladiščenju pri temperaturi 30 °C, ko je bila koncentracija celic 10^5 CFU/ml.

Preglednica 15: qPCR za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v vzorcih sadnih pijač 1 in 2
Table 15: qPCR for *A. acidoterrestris* in samples of fruit beverages 1 and 2

Vzorec	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)	Število bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> (CFU/ml)
Sadna pijača 1	/	$2,9 \times 10^4$
Sadna pijača 1	0,04	9
Sadna pijača 2	/	$1,02 \times 10^4$
Sadna pijača 2	0,04	230

/ ni dodatka

Razlika med kontaminiranimi sadnimi pijačami brez in z dodatkom ekstraktom rožmarina je očitna. Ponovno lahko povzamemo, da je dodatek ekstrakta rožmarina v koncentraciji 0,04 % učinkovito zavrl rast bakterij v vseh vzorcih, vendar pa v obeh primerih ni primeren za uporabo zaradi prevelikega vpliva na spremenjene senzorične lastnosti obeh sadnih pijač. Uporaba ekstraktov eteričnih olj je velikokrat lahko omejena zaradi prevelikega vpliva na spremembo vonja živila (Tiwari in sod., 2009), drugih senzoričnih lastnosti (Lucera in sod., 2012) in toksičnosti (Tiwari in sod., 2009), kar smo ugotovili tudi pri našem poskusu.

4.2.1.2 Protimikrobna učinkovitost 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstraktov rožmarina

Rezultati našega poskusa protimikrobne aktivnosti različnih koncentracij ekstrakta rožmarina SyneROX na bakterije vrste *A. acidoterrestris* so prikazani v Preglednici 16. Pri pozitivnih kontrolah (vzorci sadnih pijač 1, 2, 3, 4), to je vzorcih, ki so bili kontaminirani z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, 4×10^4 CFU/ml sadne pijače in ni bilo dodanega ekstrakta rožmarina, je prišlo do rasti (vidna motnost) po enem dnevu, pri kontaminaciji 40 CFU/ml sadne pijače pa po treh dneh. Tudi Bahçeci in sod. (2005) navajajo, da je pri kontaminiranem jabolčnem soku prišlo do tvorbe gvajakola po 30 urah, ko je bila koncentracija celic 10^4 CFU/ml. Spremenjen vonj jabolčnega, pomarančnega in grenivkinega soka so opazili tudi Silva in sod. (2001) in sicer po 4 dnevih skladiščenja sokov pri 30 °C, ko se je koncentracija celic bakterij vrste *A. acidoterrestris* povečala iz 10^2 CFU/ml na 10^5 CFU/ml. Vsi vzorci negativnih kontrol (vzorci brez dodanih bakterij in brez dodatka ekstrakta rožmarina) so ostali bistri tudi po 30 dneh. Pri večji stopnji kontaminacije (4×10^4 CFU/ml sadne pijače) je prišlo do rasti (vidna motnost) pri vzorcu

sadne pijače 3 (0,01 % raztopina ekstrakta rožmarina) po 5 dneh, pri vzorcu sadne pijače 4 (0,015 % raztopina ekstrakta rožmarina) po 7 dneh, pri vzorcu sadne pijače 2 (0,015 % raztopina ekstrakta rožmarina) in vzorcu sadne pijače 1 (0,02 % raztopina ekstrakta rožmarina) pa po 14 dneh. Pri manjši stopnji kontaminacije (40 CFU/ml sadne pijače) je prišlo do rasti (vidna motnost) pri vzorcu sadne pijače 4 (0,015 % raztopina ekstrakta rožmarina) po 9 dneh, pri vzorcu sadne pijače 3 (0,01 % raztopina ekstrakta rožmarina) po 14 dneh, pri vzorcu sadne pijače 2 (0,015 % raztopina ekstrakta rožmarina) po 16 dneh, medtem ko je vzorec sadne pijače 1 (0,02 % raztopina ekstrakta rožmarina) ostal bister tudi po 30 dneh.

Preglednica 16: Protimikrobna aktivnost ekstrakta rožmarina v kontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1-4
Table 16: Antimicrobial activity of rosemary extract samples of contaminated fruit beverages 1-4

		Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)	Začetna koncentracija bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> (CFU/ml pijače)	Pojav motnosti pri inkubaciji pri 45 °C (dan)							
				1	3	5	7	9	14	16	30
Vzorci	Sadna pijača 1	0,02	40	-	-	-	-	-	-	-	-
			4×10^4	-	-	-	-	-	+	+	+
	Sadna pijača 2	0,015	40	-	-	-	-	-	-	+	+
			4×10^4	-	-	-	-	-	+	+	+
	Sadna pijača 3	0,01	40	-	-	-	-	+	+	+	+
			4×10^4	-	-	+	+	+	+	+	+
	Sadna pijača 4	0,015	40	-	-	-	-	-	+	+	+
			4×10^4	-	-	-	+	+	+	+	+
Pozitivne kontrole	Sadna pijača 1	/	40	-	+	+	+	+	+	+	+
		/	4×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sadna pijača 2	/	40	-	+	+	+	+	+	+	+
		/	4×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sadna pijača 3	/	40	-	+	+	+	+	+	+	+
		/	4×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sadna pijača 4	/	40	-	+	+	+	+	+	+	+
		/	4×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+
Negativne kontrole	Sadna pijača 1	/	/	-	-	-	-	-	-	-	
	Sadna pijača 2	/	/	-	-	-	-	-	-	-	
	Sadna pijača 3	/	/	-	-	-	-	-	-	-	
	Sadna pijača 4	/	/	-	-	-	-	-	-	-	

- ni rasti (ni vidne motnosti), + je rast (vidna motnost)

Iz rezultatov sklepamo, da 0,02 % dodatek ekstrakta rožmarina prepreči rast bakterij vrste *A. acidoterrestris* oziroma pri zelo veliki kontaminaciji (4×10^4 celic/ml sadne pijače) upočasni kvarjenje proizvoda. Pri zniževanju vrednosti ekstrakta rožmarina do koncentracije 0,01 % je protimikrobna aktivnost manjša, vendar je iz rezultatov razvidno, da je še vedno prisotna. Uporaba ekstraktov eteričnih olj je velikokrat omejena zaradi prevelikega vpliva na spremembo vonja živila ali toksičnosti (Lucera in sod., 2012). Glede na senzorično analizo (Preglednica 17) in rezultate protimikrobne aktivnosti (Preglednica 16) je bila za dodatek ekstrakta rožmarina najbolj primerna sadna pijača 1, najmanj pa sadna pijača 3. Znanstvenih prispevkov, ki bi preučevali povezavo med kvarom, povzročenim z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*, in senzoričnimi spremembami sadnih ali drugih pijač ob dodatku ekstrakta rožmarina, nismo našli. Protimikrobna učinkovitost rožmarina in njegove sestavine karnozolne kisline pa je bila dokazana za različne vrste bakterij, kot so *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii* (Tavassoli in Emam Djomeh, 2011), *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans* in *Bacillus cereus* (Del Campo in sod., 2000), *Staphylococcus aureus* (Santoyo in sod., 2005), *Vibrio parahaemolyticus* (Tajkarimi in sod., 2010), in različne vrste bakterij rodu *Alicyclobacillus* (Arzenšek, 2009). Slednji avtor poroča, da so imeli ekstrakti rožmarina z večjo vsebnostjo karnozolne kisline boljši protimikrobni učinek na bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Pokazali so tudi, da k protimikrobnemu delovanju ekstrakta rožmarina prispevajo tudi druge spojine, kot so karnozol, ursolna, oleanolna, betulinska in rožmarinska kislina. Kljub njihovi prisotnosti v nizkih koncentracijah lahko imajo ključno vlogo v protimikrobnem delovanju ekstrakta (Burt, 2004). Ugotovili so tudi, da je protimikrobni učinek ekstraktov rožmarina odvisen od števila bakterij in koncentracije dodanega ekstrakta, kar je razvidno tudi iz naših rezultatov. Motnost se je pri večji koncentraciji (4×10^4 CFU/ml) bakterij vrste *A. acidoterrestris* pojavila hitreje kot pri nižji (40 CFU/ml). Prav tako se je motnost pojavila kasneje ob dodatku večje koncentracije ekstrakta rožmarina (0,02 %) kot pri manjši koncentraciji (0,01 %). Začetni koncentraciji bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah predstavljata šibko (40 CFU/ml) in močno (4×10^4 CFU/ml) kontaminacijo. Podobno stopnjo kontaminacije 10^4 CFU/ml so uporabili tudi Bianchi in sod. (2010) pri določanju hlapnih komponent v kontaminiranem pomarančnem soku.

Preglednica 17: Senzorična analiza sadnih pijač 1, 2, 3 in 4 z dodatkom ekstrakta rožmarina SyneROX
Table 17: Sensory analysis of fruit beverages 1, 2, 3 and 4 with the addition of the rosemary extract SyneROX

Sadna pijača 1 (z breskovim sokom in aloe vero)			
Preskuševalc	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)		
	0,02	0,015	0,01
1	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
2	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
3	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
4	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
5	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
6	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
7	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
Končna ugotovitev	Sprejemljivo	Sprejemljivo	Sprejemljivo

Sadna pijača 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise)			
Preskuševalc	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)		
	0,02	0,015	0,01
1	Z ekstraktom ima boljši vonj, brez pa boljši okus	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
2	Z ekstraktom ima boljši vonj	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
3	Z ekstraktom ima boljši okus	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
4	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
5	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
6	Z ekstraktom ima intenzivnejši vonj	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
7	Z ekstraktom ima boljši vonj	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
Končna ugotovitev	Nesprejemljivo	Sprejemljivo	Sprejemljivo

Se nadaljuje...

Nadaljevanje Preglednice 17: Senzorična analiza sadnih pijač 1, 2, 3 in 4 z dodatkom ekstrakta rožmarina SyneROX

Sadna pijača 3 (z jabolčnim sokom)

Preskuševallec	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)		
	0,02	0,015	0,01
1	Z ekstraktom ima boljši vonj	Z ekstraktom ima boljši okus	Majhna razlika med vzorcema
2	Majhna razlika med vzorcema	Z ekstraktom ima boljši vonj	Z ekstraktom ima boljši vonj
3	Z ekstraktom ima boljši vonj, brez pa boljši okus	Majhna razlika med vzorcema	Majhna razlika med vzorcema
4	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Majhna razlika med vzorcema
5	Z ekstraktom ima boljši vonj	Z ekstraktom ima boljši vonj	Majhna razlika med vzorcema
6	Z ekstraktom ima intenzivnejši vonj	Majhna razlika med vzorcema	Majhna razlika med vzorcema
7	Majhna razlika med vzorcema	Majhna razlika med vzorcema	Majhna razlika med vzorcema
Končna ugotovitev	Nesprejemljivo	Nesprejemljivo	Nesprejemljivo

Sadna pijača 4 (z okusom pomaranče)

Preskuševallec	Koncentracija ekstrakta rožmarina (%)		
	0,02	0,015	0,01
1	Majhna razlika med vzorcema	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu
2	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
3	Z ekstraktom ima boljši vonj, brez pa boljši okus	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
4	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
5	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
6	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
7	Majhna razlika med vzorcema	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
Končna ugotovitev	Nesprejemljivo	Sprejemljivo	Sprejemljivo

Rezultati senzorične analize sadne pijače 1 (z breskovim sokom in aloe vero), sadne pijače 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise), sadne pijače 3 (z jabolčnim sokom) in sadne pijače 4 (z okusom pomaranče) z in brez dodanega ekstrakta rožmarina so prikazani v Preglednici 17. Vsi preskuševalci, razen enega so ugotovili, da med vzorcema sadne pijače 1 z dodatkom ekstrakta rožmarina in brez dodatka ekstrakta rožmarina ni bilo moč zaznati razlike pri nobeni koncentraciji. Eden od preskuševalcev je pri najvišji koncentraciji (0,02 %) zaznal razliko.

Pri vzorcu sadne pijače 2 so štirje preskuševalci zaznali očitno razliko, dva sta zaznala majhne razlike, eden pa razlik ni opazil pri 0,02 % koncentraciji ekstrakta rožmarina. Ugotovili smo, da je senzorično najprimernejša sadna pijača z dodatkom ekstrakta rožmarina s koncentracijama 0,015 % in 0,01 %.

Pri vzorcu sadne pijače 3 so vsi preskuševalci pri vseh koncentracijah dodanega ekstrakta rožmarina opazili razlike, torej ta vzorec sadne pijače ni primeren za dodajanje ekstrakta. Pri vzorcu sadne pijače 4 s koncentracijo 0,015 % ekstrakta rožmarina so vsi preskuševalci razen enega opazili očitno razliko. Torej smo določili koncentracijo 0,01 % kot najprimernejšo.

4.2.1.3 Protimikrobna učinkovitost mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja

Rezultati testiranja protimikrobne aktivnosti različnih mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja (mešanice A, B, C, D, E) v sadni pijači 1 (z breskovim sokom in aloe vero) na bakterije vrste *A. acidoterrestris* s koncentracijo 3×10^3 CFU/ml sadne pijače so prikazani v Preglednici 18.

Preglednica 18: Protimikrobna aktivnosti mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja na bakterije vrste *A. acidoterrestris* v sadni pijači 1

Table 18: Antimicrobial activity of rosemary, some of citrus fruits and green tea extracts mixtures against *A. acidoterrestris* in fruit beverage 1

Mešanica	Koncentracija bakterij vrste <i>A. acidoterrestris</i> (CFU/ml pijače)	Koncentracija ekstrakta (%)	Pojav motnosti po določenem času inkubacije pri 45 °C (dan)				
			3	6	8	29	42
A	3×10^3	0,02	–	–	–	+	+
B	3×10^3	0,01	–	–	–	–	–
C	3×10^3	0,02	–	–	+	+	+
D	3×10^3	0,05	–	+	+	+	+
E	3×10^3	0,01	+	+	+	+	+
Pozitivna kontrola	/	/	+	+	+	+	+
Negativna kontrola	/	/	–	–	–	–	–

Mešanica B je imela najboljšo protimikrobno aktivnost na bakterije vrste *A. acidoterrestris*, saj je sadna pijača ostala bistra tudi po 42 dneh inkubacije pri 45 °C. Glede na te rezultate smo opravili senzorično analizo vzorca sadne pijače 1 z dodatkom ekstrakta mešanice B. Rezultati (Preglednica 19) so pokazali, da ni bilo opaženih senzoričnih sprememb s kontrolnim vzorcem (brez dodanega ekstrakta). Protimikrobna učinkovitost posameznih ekstraktov tako rožmarinovega, ekstrakta citrusov in tudi ekstrakta zelenega čaja je bila dokazana na različnih vrstah bakterij, predvsem zaradi visoke vsebnosti fenolnih spojin (Tajkarimi in sod., 2010). Bassolé in Juliani (2012) navajata, da med aktivnimi komponentami rastlinskih ekstraktov prihaja do medsebojnega sinergističnega vpliva, pri katerem ima delovanje večjega števila aktivnih komponent boljši protimikrobni učinek, kar lahko rečemo tudi v našem primeru, saj je bil ekstrakt mešanica treh različnih rastlinskih ekstraktov (rožmarin, citrusi in zeleni čaj). Prav tako so nekateri drugi avtorji (Tiwari in sod., 2009) dokazali, da so dodatki nekaterih rastlinskih ekstraktov v koncentraciji, ki je imela protimikrobni učinek, negativno vplivali na senzorične lastnosti živila.

Preglednica 19: Senzorična analiza sadne pijače 1 z dodatkom mešanice ekstraktov B

Table 19: Sensory analysis of the fruit beverages 1 with the addition of a mixture of extracts B

Prekuševalce	Sadna pijača 1 (z breskovim sokom in aloe vero)
1	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
2	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
3	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
4	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
5	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
6	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
7	Ni razlik v vonju in okusu med pijačo z in brez dodanega ekstrakta
Končna ugotovitev	Sprejemljivo

Zaključimo lahko, da je bila sadna pijača 1 (z breskovim sokom in aloe vero) najmanj senzorično občutljiva na dodatek mešanice ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja s koncentracijo 0,01 %. Ta koncentracija je bila tudi najbolj mikrobiološko učinkovita. Kot možnost realne aplikacije dodatka tega ekstrakta v sadno pijačo 1 tekom proizvodnje bi bilo glede na obstoječo tehnologijo priprave sadnih pijač primerno dodajanje v sladkorno raztopino, ki predstavlja enega izmed virov kontaminacije končnih proizvodov z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* (Goto in sod., 2006). S tem bi lahko rešili problem že na izvoru kontaminacije in bi lahko dozirali tudi večjo koncentracijo protimikrobnega sredstva (1 %), v končnem proizvodu pa bi bila koncentracija še vedno 0,01 %. Ekstrakt rožmarina nekaterih citrusov in zelenega čaja bi bilo sicer mogoče dodati tudi direktno v končni proizvod ali v sadne koncentrate.

4.2.2 Določanje najprimernejše protimikrobne koncentracije mlečne kisline

Rezultati testa protimikrobne aktivnosti 0,06 % mlečne kisline (A in B) na bakterije vrste *A. acidoterrestris* s koncentracijo $1,5 \times 10^4$ CFU/ml sadne pijače so prikazani v Preglednici 20. Obe mlečni kislini (A in B) sta imeli podobno protimikrobno aktivnost. Pri vzorcu sadne pijače 1 (z breskovim sokom in aloe vero) je prišlo do pojava motnosti po 21 dneh inkubacije pri obeh mlečnih kislinah (A in B). Pri vzorcu sadne pijače 3 (z jabolčnim sokom) se je motnost pri dodatku mlečne kisline A pojavila po 18 dneh inkubacije, pri dodatku mlečne kisline pa en dan prej.

Preglednica 20: Protimikrobna aktivnosti mlečne kisline (0,06 %) v sadnih pijačah 1 in 3
Table 20: Antimicrobial activity of lactic acid (0.06%) in fruit beverages 1 and 3

		Mlečna kislina	Čas inkubacije pri 45 °C (dan)				
			2	17	18	21	28
Vzorci	Sadna pijača 1	A	–	–	–	+	+
		B	–	–	–	+	+
	Sadna pijača 3	A	–	–	+	+	+
		B	–	+	+	+	+
Pozitivne kontrolne	Sadne pijače 1	/	+	+	+	+	+
	Sadne pijače 3	/	+	+	+	+	+
	Tekoče gojišče BAT	/	+	+	+	+	+
Negativne kontrolne	Sadne pijače 1	/	–	–	–	–	–
	Sadne pijače 3	/	–	–	–	–	–
	Tekoče gojišče BAT	/	–	–	–	–	–

– ni rasti (ni vidne motnosti); + je rast (vidna motnost)

Senzorična analiza (Preglednica 21) je pri vseh sadnih pijačah 1 in 3 pokazala razlike med vzorci z dodatkom mlečne kisline in brez. Pri sadni pijači 1 so štirje od desetih preskuševalcev ugotovili razliko med vzorcema brez in z dodatkom mlečne kisline A, medtem ko je dodatek mlečne kisline B zaznalo pet preskuševalcev. Pri sadni pijači 3 (z jabolčnim sokom) je šest preskuševalcev ugotovilo razliko med vzorcema brez in z dodatkom mlečne kisline A, medtem ko je dodatek mlečne kisline B zaznalo pet preskuševalcev. Koncentracija naravnih protimikrobnih snovi, ki je potrebna za protimikrobno delovanje, je velikokrat previsoka, da bi jo lahko uporabili kot možnost realne aplikacije v proizvodnji živil zaradi negativnega vpliva na senzorične lastnosti živila (Tiwari in sod., 2009). Dodatek mlečne kisline A in B je negativno vplival na spremenjene senzorične lastnosti sadnih pijač 1 in 3, zato lahko zaključimo, da je njuno dodajanje v obe sadni pijači neprimerno.

Dodatek mlečne kisline s koncentracijo 3-4 g/l v tekočem gojišču BAT je bil določen kot minimalna inhibitorna koncentracija na bakterije vrste *A. acidoterrestris*. Avtorji tega

prispevka (Sokołowska in sod., 2013) navajajo, da bi mlečna kislina lahko nadomestila citronsko kislino, ki se v sadnih pijačah uporablja tudi kot konzervans, vendar pa senzorične analize niso opravili.

Preglednica 21: Senzorična analiza sadne pijače 1 z dodatkom mlečne kisline

Table 21: Sensory analysis fruit beverages 1 with the addition of lactic acid

Sadna pijača 1 (z breskovim sokom in aloe vero)		
Preskuševalec	Koncentracija mlečne kisline A (%)	Koncentracija mlečne kisline B (%)
	0,06	0,06
1	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
2	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
3	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
4	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
5	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
6	Ni razlik v vonju in okusu	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
7	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
8	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
9	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
10	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
Končna ugotovitev	Nesprejemljivo	Nesprejemljivo
Sadna pijača 3 (z jabolčnim sokom)		
Preskuševalec	Koncentracija mlečne kisline A (%)	Koncentracija mlečne kisline B (%)
	0,06	0,06
1	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
2	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
3	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
4	Ni razlik v vonju in okusu	Ni razlik v vonju in okusu
5	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Ni razlik v vonju in okusu
6	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
7	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
8	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
9	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
10	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus	Z mlečno kislino ima bolj kisel okus
Končna ugotovitev	Nesprejemljivo	Nesprejemljivo

5 SKLEPI

Na podlagi zbranih podatkov in rezultatov naše naloge lahko podamo naslednje ugotovitve:

- Izbrane alternativne metode določanja bakterij vrste *A. acidoterrestris* so primerne za določanje kvara sadnih pijač:
 - z elektronskim nosom smo hitro določili začetek kvara sadnih pijač z oznako 1 (z breskovim sokom in aloe vero) in z oznako 2 (s hruškovim sokom in izvlečkom melise),
 - PCR s specifičnimi ologonukleotidnimi začetniki in sondo omogoča hitro detekcijo bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih pijačah,
 - qPCR omogoča kvantifikacijo bakterij vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah,
 - HPLC-DAD omogoča detekcijo in kvantifikacijo gvajakola, ki je značilen za kvar pijač, povzročen z bakterijami vrste *A. acidoterrestris*.

- Preizkušene naravne protimikrobne snovi so uporabne za inhibicijo rasti bakterij rodu *Alicyclobacillus* v sadnih pijačah, pri čemer:
 - je bila protimikrobna učinkovitost ekstrakta rožmarina odvisna od nivoja kontaminacije sadnih pijač z bakterijami vrste *A. acidoterrestris* in koncentracije dodanega ekstrakta,
 - je večji dodatek ekstrakta rožmarina (0,04 %) negativno vplival na senzorične lastnosti sadnih pijač, vpliv manjšega dodatka ekstrakta rožmarina (0,02-0,01 %) na senzorične lastnosti pa je bil odvisen od vrste sadne pijače,
 - so imeli ekstrakti rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja (A-E) protimikrobni učinek na bakterije vrste *A. acidoterrestris*, vendar je bil senzorično sprejemljiv le dodatek komercialne mešanice B,
 - je mlečna kislina (0,06 %) negativno vplivala na senzorične lastnosti in ni primerna za preizkušene sadne pijače.

- Pri določanju uporabnosti in sprejemljivosti posameznih ukrepov za obvladovanje bakterij rodu *Alicyclobacillus* je potrebna vzporedna senzorična analiza vzorcev sadnih pijač.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Bakterije rodu *Alicyclobacillus* lahko povzročajo kvar sadnih pijač, ki se odraža predvsem v njihovi spremenjeni aromi (Tokuda, 2007). Proizvajalci sadnih pijač trenutno pospešeno proučujejo tudi ustrezne protimikrobne sestavine, ki bi imele zaviralni učinek na te bakterije (Chang in Kang, 2004). Namen magistrske naloge je bil proučiti uporabo alternativnih metod določanja kvara sadnih pijač, ki ga povzročajo bakterije rodu *Alicyclobacillus*, in proučevanje možnosti inhibicije rasti teh bakterij z dodatkom rožmarinovitih ekstraktov in mlečne kisline. Raziskave so bile usmerjene v proučevanje izbranih parametrov, s katerimi bi lahko obvladovali kvar sadnih pijač. Vzorci sadnih pijač, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu magistrske naloge, so bili nizkoenergijske negazirane sadne pijače:

- z breskovim sokom in aloe vero (sadna pijača 1),
- s hruškovim sokom in izvlečkom melise (sadna pijača 2),
- z jabolčnim sokom, obogatena z magnezijem in vitamini (sadna pijača 3),
- z okusom pomaranče (sadna pijača 4).

Elektronski nos smo uporabili kot alternativo metodo določanja kvara pri določanju začetka kvara sadnih pijač, ki so bile posledica kontaminacije z bakterijami rodu *Alicyclobacillus*. Primerjali smo profil hlapnih komponent v parni fazi naravno kontaminiranih vzorcev sadnih pijač in jih primerjali s profili hlapnih komponent v parni fazi nekontaminiranih vzorcev. Rezultati te analize so pokazali razlike med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci sadne pijače 1 in 2. Pri sadni pijači 3 pa razlik med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci ni bilo mogoče določiti. Z metodo PCR v realnem času smo potrdili bakterije rodu *Alicyclobacillus* v kontaminiranih vzorcih sadnih pijač 1, 2 in 3. Vzporedno smo opravili tudi senzorično analizo. Med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci sadnih pijač 1 in 2 sta dva preskuševalca od šestih ocenila, da imajo kontaminirani vzorci spremenjeno aromo in okus. Le eden je ocenil spremenjene senzorične lastnosti pri kontaminiranemu vzorcu sadne pijače 3. Rezultate smo potrdili tudi z metodo HPLC-DAD pri valovni dolžini 220 nm, s katero smo določali vsebnost gvajakola (glavni sekundarni metabolit bakterij vrste *A. acidoterrestris*). V vseh kontaminiranih vzorcih sadne pijače smo potrdili prisotnost gvajakola.

Za določitev najprimernejše koncentracije protimikrobne snovi (ekstrakti rožmarina in mlečna kislina) za bakterije vrste *A. acidoterrestris* v sadnih pijačah smo uporabili senzorično analizo, metodo razredčevanja in qPCR. Rezultati qPCR in določitve protimikrobne učinkovitosti 0,04 % ekstrakta rožmarina so pokazali učinkovito inhibicijo

rasti bakterij v vseh vzorcih sadnih pijač 1 in 2, vendar je senzorična analiza pokazala občutno spremenjene senzorične lastnosti pri vzorcih z dodanim rožmarinovim ekstraktom. Rezultati senzorične analize in testiranja protimikrobne učinkovitosti 0,02 %, 0,015 % in 0,01 % ekstraktov rožmarina v sadnih pijačah 1, 2, 3 in 4 so pokazali, da je bila za dodatek ekstrakta rožmarina najbolj primerna sadna pijača 1. Raziskavo smo nadaljevali z dodatnim testiranjem protimikrobne aktivnosti petih različnih mešanic ekstraktov rožmarina, nekaterih citrusov in zelenega čaja (A-E) v sadni pijači 1 na bakterijah vrste *A. acidoterrestris*. Mešanica B je imela najboljšo protimikrobno aktivnost in ni vplivala na spremembo senzoričnih lastnosti sadne pijače 1. Rezultati testa protimikrobne aktivnosti mlečne kisline (A in B) s koncentracijo 0,06% na bakterije vrste *A. acidoterrestris* so pokazali podobno protimikrobno aktivnost. Pri obeh testiranih vzorcih sadne pijače 1 in 3 se je pojavila motnost, medtem ko pri negativnih kontrolah do pojava motnosti ni prišlo. Senzorična analiza pokazala je prav tako potrdila spremenjene senzorične lastnosti sadnih pijač ob dodatka mlečne kisline.

Povzamemo lahko, da so za določanje bakterij vrste *A. acidoterrestris* primerne alternativne metode določanja (elektronski nos, PCR, qPCR, HPLC-DAD), ker z njimi kvar določimo hitreje kot s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in ker omogočajo določitev začetka kvara. Hkrati smo tudi pokazali, da je za nadzor bakterij vrste *A. acidoterrestris* možno uporabiti naravne ekstrakte rožmarina, vendar pa je vzporedno nujno izvajanje senzorične analize vzorcev sadnih pijač.

6.2 SUMMARY

Bacteria of *Alicyclobacillus* genus can cause spoilage of fruit beverages which is primarily reflected in altered flavour (Tokuda, 2007). Current interests of fruit beverages producers are tented to studying the appropriate antimicrobial ingredients that have an inhibitory effect on these bacteria (Chang and Kang, 2004). The aim of the thesis was to investigate the use of alternative methods for determining the deterioration of fruit beverages caused by *Alicyclobacillus*, and exploring the possibility of growth inhibition of these bacteria with the addition of rosemary extracts and lactic acid. The study was directed to the investigation of selected parameters in order to control the deterioration of fruit beverages. Samples of fruit beverages used in the experimental part of the thesis were low-energy non-carbonated soft beverages:

- with peach juice and aloe vera (fruit beverage 1),
- with pear juice and lemon balm extract (fruit beverage 2),
- with apple juice, enriched with magnesium and vitamins (fruit beverage 3),
- with orange flavour (fruit beverage 4).

Electronic nose was used as an alternative method of detection of the beginning of spoilage of fruit beverages contaminated with *Alicyclobacillus*. The study included a comparison of volatile component profiles in the vapour phases between naturally contaminated and uncontaminated samples of fruit beverages. The results of the analysis proved the differences between the contaminated and uncontaminated samples of fruit beverages 1 and 2 while no differences was determined between the contaminated and uncontaminated samples of fruit beverages 3. Using real-time PCR, the presence of *Alicyclobacillus* in samples of contaminated fruit beverages 1, 2 and 3 was confirmed. In parallel, a sensory analysis was also carried out. Two of the six testers estimated modified aroma and flavour of the contaminated samples of fruit beverages 1 and 2. Only one tester evaluated changes in the sensory properties of a contaminated sample of fruit beverage 3. The results were confirmed by HPLC-DAD at a wavelength of 220 nm, which determined the presence of guaiacol (a main secondary metabolite of bacteria *A. acidoterrestris*). In all samples of contaminated fruit beverages, guaiacol occurrence was detected.

In order to determine the most appropriate concentration of antimicrobial substance (rosemary extracts and lactic acid) for *A. acidoterrestris* in the fruit beverages, sensory analysis, antimicrobial testing and qPCR were used. The results of qPCR analysis and antimicrobial testing of 0.04% rosemary extracts showed effectively inhibited growth of the bacteria in all samples of fruit beverages 1 and 2, but the sensory analysis showed significantly altered sensory properties of samples with added extracts. The results of sensory analysis and evaluation of antimicrobial activities of rosemary extracts 0.02%, 0.015% and 0.01% in fruit beverages 1, 2, 3 and 4 showed that the fruit beverage 1 was the most suitable beverage for the addition of rosemary extract. The research was continued by further testing antimicrobial activity of five different mixtures of extracts of rosemary, some citruses and green tea (A – E) in fruit beverage 1 for *A. acidoterrestris*. However, the mixture B had the best antimicrobial activity and at the same time it did not affect the sensory properties of fruit beverages 1. The results of antimicrobial activity of lactic acid (A and B) with a concentration of 0.06% on the bacteria *A. acidoterrestris* showed similar antimicrobial activities. In both of the tested fruit beverages 1 and 3, the appearance of turbidity was observed while not in the negative controls. Sensory analysis also confirmed altered sensory properties of fruit beverages with the addition of lactic acid.

We can conclude that the alternative detection methods such as electronic nose, PCR, qPCR, HPLC-DAD are suitable for detecting of *A. acidoterrestris* because they are able to determine the spoilage faster than the conventional microbiological methods and they can also determine the beginning of spoilage. Furthermore, natural rosemary extracts can be used as antimicrobial agent to control of *A. acidoterrestris* in fruit beverages, although simultaneously the sensory analysis of each fruit beverage needs to be carried out.

7 VIRI

- Adams M. J. 1998. The principles of multivariate data analysis. V: Analytical methods of food authentication. Ashurst P. R., Dennis M. J. (eds.). London, Blackie Academic and Professional: 308-336.
- Albuquerque L., Rainey F. A., Chung A. P., Sunna A., Nobre M. F., Grote R., Antranikian G., da Costa M. S. 2000. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 451-457.
- Almela L., Sánchez-Muñoz B., Fernández-López J. A., Roca M. J., Rabe V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A, 1120: 221-229.
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J. D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 3530-3505.
- Applied Biosystems. 2004. Real-time PCR systems, 7900 HT fast real-time PCR system 7300/7500/7500 fast real-time PCR systems: Chemistry guide. Carlsbad, Life Technologies: 50 str.
- Arora K., Chand S., Malhotra B. D. 2006. Recent developments in bio-molecular electronics techniques for food pathogens. Analytica Chimica Acta, 568: 259-274.
- Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R. H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics, 5: 209-219.
- Arzenšek A. 2009. Protimikrobno delovanje ekstaktov rožmarina na bakterije vrste *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 80 str.
- Arzenšek Pinter R., Vomberger B. 2009. Senzorična kakovost mesnih izdelkov ob prevzemu v obrat javne prehrane. V: Kako prepoznati kakovost živil: izbrana poglavja za zaposlene v organizirani prehrani. Zbornik, strokovni seminar, 24. marec 2009. Vomberger B., Nidirfer M. (ur.). Maribor, Izobraževalni center Piramida, Višja strokovna šola: 27-38.
- Bahçeci K. S., Acar J. 2007. Determination of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by using HPLC and spectrophotometric methods, and mathematical modelling of guaiacol production. European Food Research and Technology, 225: 873-878.
- Bahçeci K. S., Gökmen V., Acar J. 2005. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. European Food Research and Technology, 220: 196-199.
- Bassole I. H. N., Juliani H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17: 3989-4006.
- Benninga H. 1990. A history of lactic acid making: A chapter in the history of biotechnology. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-61.
- Berglez T. 2002. Določanje aktivnih učinkovin v rožmarinu. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 130 str.

- Bevilacqua A., Sinigaglia A., Corbo M. R. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new methods for inhibiting spore germination. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 103-110.
- Bianchi F., Careri M., Mangia A., Mattarozzi M., Musci M., Concina I., Gobbi E. 2010. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Chemistry*, 123: 653-658.
- Bizjak K., Bem Z. 2003. Podaljšanje obstojnosti živil. V. *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 255-288.
- Borlinghaus A., Engel R. 1997. *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate: supplies, method development and validation. *Fruit Processing*, 7: 1-5.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601.
- Cagnasso S., Falasconi M., Previdi M. P., Franceschini B., Cavalieri C., Sberveglieri V., Rovere P. 2010. Rapid screening of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage of fruit juices by electronic nose: a confirmation study. *Journal of Sensors*, 2010: ID 143173, doi:10.1155/2010/143173: 9 str.
- Cerny G., Hennlich W., Poralla K. 1984. Fruchtsaftverderb durch Bacillen: isolierung und charakterisierung des verderbserrengers. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 179: 224-227.
- Chang S., Kang D. 2004. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 55-74.
- Concina I., Bornšek M., Baccelliere S., Falasconi M., Gobbi E., Sberveglieri G. 2010. *Alicyclobacillus* spp.: detection in soft drinks by electronic nose. *Food Research International*, 43: 2108-2114.
- Connor C. J., Luo H., McSpadden Gardener B. B., Wang H. H. 2005. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 229-235.
- Darland G., Brock T. D. 1971. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic sporeforming bacterium. *Journal of General Microbiology*, 67: 9-15.
- Datta R., Tsai S. P., Bonsignore P., Moon S. H., Frank J. R. 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews*, 16: 221-231.
- Deinhard G., Blanz P., Poralla K., Altan E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolates from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 10: 47-53.
- Del Baño M. J., Castillo J., Benavente-García O., Lorente J., Martín-Gil R., Acevedo C., Alcaraz M. 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2064-2068.
- Del Campo J., Amiot M. J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63: 1359-1368.

- Dentoni L., Capelli L., Sironi S., Del Roso R., Zanetti S., Della Torre M. 2012. Development of an Electronic Nose for environment odour monitoring. *Sensors and Actuators B*, 12: 14363-14381.
- Duong H. A., Jensen N. 2000. Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia*, 52: 292-292.
- Eguchi S. Y., Manfio G. P., Pinhatti M. E., Azuma E., Variane S. F. 1999. Report of the research project: acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices study. Sao Paulo, ABECitrus: 52 str.
- Eiroa M. N., Junqueira V. C., Schmidt F. L. 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection*, 62: 883-886.
- Evancho G. M., Walls I. 2001. Aciduric flat sour sporeformers. V: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Downes F. P., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association: 239-244.
- Fairchild M. S., Lee M. D., Maurer J. J. 2006. PCR basics. V: *PCR methods in foods*. Maurer J. (ed.). Berlin, Springer: 1-26.
- Falasconi M., Pardo M., Sberveglieri G., Riccò I., Bresciani A. 2005. The novel EOS⁸³⁵ electronic nose and data analysis for evaluating coffee ripening. *Sensors and Actuators B*, 110: 73-80.
- Gobbi E., Falasconi M., Concina I., Mantero G., Bianchi F., Mattarozzi M., Musci M., Sberveglieri G. 2010. Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control*, 21: 1374-1382.
- Golob T., Jamnik M., Bertoneclj J., Doberšek U. 2005. Senzorična analiza: metode in preskuševalci. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85: 55-66.
- Golob T., Bertoneclj J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Goto K., Matsubara H., Mochida K., Matsumura T., Hara Y., Niwa M., Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov. a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 109-113.
- Goto K., Mochida K., Kato Y., Asahara K., Ozawa C., Kasai H., Yokota A. 2006. Diversity of *Alicyclobacillus* isolated from fruit juices and their raw materials, and emended description of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Microbiology and Culture Collections*, 22: 1-14.
- Goto K., Mochida K., Asahara K., Suzuki M., Kasai H., Yokota A. 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1537-1544.
- Goto K., Tanaka T., Yamamoto R., Tokuda H. 2007. Characteristics of *Alicyclobacillus*. *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 9-48.
- Goto K. 2007a. Parameters for detection of *Alicyclobacillus* and test methods. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 49-78.

- Goto K. 2007b. Differentiation and identification of *Alicyclobacillus* species. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 79-91.
- Grande M. J., Lucas R., Abriouel H., Omar N. B., Maqueda M., Martinez-Bueno M., Martinez-Canamero M., Valdivia E., Galvez A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 289-297.
- Groenewald W. H., Gouws A., Witthuhn R. C. 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, 26: 71-76.
- Gutierrez-Osuna R. 2002. Pattern analysis for machine olfaction: a review. *IEEE Sensors Journal*, 2: 189 - 202.
- Heid C. A. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Hippchen B., Rall A., Poralla K. 1981. Occurrence in soil of thermoacidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids. *Archives of Microbiology*, 129: 53-55.
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 87-107.
- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3: 12, doi: 10.3389/fmicb.2012.00012: 24 str.
- IFU. 2004. IFU Method No. 12: Method on the detection of *Alicyclobacillus* in fruit juices. First Standard IFU. Paris, International Federation of Fruit Juice Producers: 6 str.
- Imperio T., Viti C., Marri L. 2008. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 221-225.
- Jensen N. 1999. *Alicyclobacillus* – a new challenge for the food industry. *Food Australia*, 51: 33-36.
- Jensen N. 2000. *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia*, 52: 282-285.
- Jensen N., Varelis P., Whitfield F. B. 2001. Formation of guaiacol in chocolate milk by the psychrotrophic bacteria *Rahnella aquatilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 339-343.
- Jensen N., Whitfield F. B. 2003. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of disinfected taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 9-14.
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. 2. dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79str.
- Jiang C. Y., Liu Y., Liu Y. Y., You X. Y., Guo X., Liu S. J. 2008. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2898-2903.
- Jorge K. 2003. Soft drinks: Chemical composition. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. vol. 8. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam. Academic Press: 5347-5352.
- Karavaiko G. I., Bogdanova T. I., Tourova T. I., Kondrat'eva T. F., Tsapina I. A., Egorova M. A., Krasil'nikova E. N., Zakharchuk L. M. 2005. Reclassification of *Sulfobacillus*

- thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans* strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufrense et al., 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 941-947.
- Kealey D., Haines P. J. 2002. *Analytical chemistry*. Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited: 119-282.
- Komitopoulou E., Boziaris I. S., Davies E. A., Delves-Broughton J., Adams M. R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 81-85.
- Kuchta T. 2006. Polymerase chain reaction as a method of food analysis. V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuhta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (eds.). Bratislava, VUP Research Institute: 13-14.
- Lee S-Y., Dougherty R. H., Kang D.-H. 2002. Inhibitory effect of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4158-4161.
- Lucera A., Costa C., Conte A., Del Nobile M. A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3: 287, doi: 10.3389/fmicb.2012.00287: 13 str.
- Luo H., Yousef A. E., Wang H. H. 2004. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 376-382.
- Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 6: 1292-1305.
- Mackay I. M. 2004. Real time PCR in the microbiological laboratory. *Clinical Microbiology and Infections*, 10: 190-212.
- Matsubara H., Goto K., Matsumura T., Mochida K., Iwaki M, Niwa M., Yamasato K. 2002. *Alicyclobacillus acidophilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic containing ω -cycloheptane fatty acids-containing bacterium isolated from acidic beverages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1681-1685.
- Mavromatis K., Sikorski J., Lapidus A., Glavina Del Rio T., Copeland A., Tice H., Cheng J. F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Ivanova N., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y. J., Jeffries C. D., Chain P., Meincke L., Sims D., Chertkov O., Han C., Brettin T., Detter J. C., Wahrenburg C., Rohde M., Pukall R., Göker M., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Klenk H. P., Kyrpides N. C. 2010. Complete genome sequence of *Alicyclobacillus acidocaldarius* type strain (104-IA). *Standards in Genomic Science*, 2: 9-18.
- McIntyre S., Ikawa J. Y., Parkison N., Haglund J., Lee J. 1995. Characterization of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *Journal of Food Protection*, 58: 319-321.
- McKnight I. C., Eiroa M. N. U., Sant'Ana A. A., Massaguer P. R. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: isolation, genotypic characterization and heat resistance. *Food Microbiology*, 27: 1016-1022.
- Mielle P. 1996. Electronic noses: towards the objective instrumental characterization of food aroma. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 432-438.
- Milo Ohr L. 2001. Formulating with sense-product testing and standards to find the best taste. *Prepared Foods*, 170: 37-40.

- Moreno S., Scheyer T., Romano C. S., Vojnov A. A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231.
- Munné-Bosch S., Alegre L., Schwarz K. 2000. The formation of phenolic diterpenes in *Rosmarinus officinalis* L. under Mediterranean climate. *European Food Research and Technology*, 4: 263-267.
- Oda Y., Saito K., Yamauchi H., Mori M. 2002. Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*, 45: 1-4.
- Oito S. 2002. Control of thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* by barley and wheat α - and β - thionins. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for Western Region*, 1: 49-59.
- Orr R. V., Shewfelt R. L., Huang C. J., Tefera S., Beuchat L. R. 2000. Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spores and vegetative cell population. *Journal of Food Protection*, 63: 1517-1522.
- Pardo M., Niederjaufner G., Benussi G., Comini E., Faglia G., Sberveglieri G., Holmberg M., Lundstrom I. 2000. Data preprocessing enhances the classification of different brands of Espresso coffee with an electronic nose. *Sensors and Actuators B*, 69: 397-403.
- Pardo M., Sberveglieri G. 2005. Classification of electronic nose data with support vector machines. *Sensors and Actuators B*, 107: 730-737.
- Pettipher G. L., Osmundson M. E., Murphy J. M. 1997. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and juice containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 185-189.
- Ponzoni A., Comini E., Concina I., Ferroni M., Falasconi M., Gobbi E., Sberveglieri V., Sberveglieri G. 2012. Nanostructured metal oxide gas sensors, a survey of applications carried out at SENSOR lab, Brescia (Italy) in the security and food quality fields. *Sensors*, 12: 17023-17045.
- qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR. 2013. Life Technologies Corporation <http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html> (14. okt. 2013)
- Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A. A., Moreno S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115: 456-461.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibañez E., Señoráns F. J., Reglero G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68: 790-795.
- Sasikumar B. 2004. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243-255.
- Sawaki T. 2007a. Introduction. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 1-5.
- Sawaki T. 2007b. Historical background related to *Alicyclobacillus*. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 6-8.
- Schaller E., Bosseta J. O., Escherb F. 1998. Electronic noses and their application to food. *LWT - Food Science and Technology*, 31: 305-316.

- Silva F. V. M., Gibbs P. 2001. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes, review. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 68-74.
- Smit Y., Cameron M., Venter P., Witthuhn R. C. 2010. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation – a review. *Food Microbiology*, 28: 331-349.
- Sokołowska B., Niezgoda J., Chotkiewicz M. 2013. Opportunities to germinate and grow of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in the presence of organic acids. Focusing on Modern Food Industry, 2: 10-16.
- Splittstoesser D. F., Churey J. J. Lee C.Y. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection*, 57: 1080-1083.
- Splittstoesser D. F., Churey J. J. 1996. Unique spoilage organisms of musts and wines. V: Wine spoilage microbiology conference. Fresno, March 1996. Toland T., Fugelsang K. C. (eds.). Fresno, California State University: 36-41.
- Splittstoesser D. F., Churey J. J. Lee C.Y. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 18: 585-587.
- Steyn C. E., Cameron M., Witthuhn R. C. 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 1-11.
- Szefer P. 2007. Chemometric techniques in analytical evaluation. V: Mineral components in foods. Szefer P., Nriagu J.O. (eds.). Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group: 69-122.
- Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218.
- Takahashi T., Goto K., Tanaka T., Tanada S., Sawaki T., Yamamoto R. 2007. Factors of spoilage caused by *Alicyclobacillus* and prevention measures. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 117-148.
- Teuber M. 1993. Lactic acid bacteria. V: Biotechnology. Vol. 1: Biological fundamentals. Sahn H. (ed.). Weinheim, VCH Press: 325-366.
- Tavassoli S., Emam Djomeh Z. 2011. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Veterinaria*, 7: 337-341.
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O' Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5987-6000.
- Tokuda H. 2007. Growth profile of *Alicyclobacillus* in fruit juices. V: *Alicyclobacillus*, thermophilic acidophilic bacilli. Yokota A., Fujii T., Goto K. (eds.). Tokyo, Springer: 92-99.
- Van Pèe K. H. 1996. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 50: 375-399.
- Vezzoli M., Ponzoni A., Pardo M., Falasconi M., Faglia G., Sberveglieri G. 2008. Exploratory data analysis for industrial safety application. *Sensors and Actuators B*, 131: 100-109.
- Walker M., Phillips C. A. 2005. The effect of intermittent shaking, headspace and temperature on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in stored apple juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 557-562.

- Walls I., Chuyate R. 1998. *Alicyclobacillus* – Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 18: 499-503.
- Walls I., Chuyate R. 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia, 52: 282-285
- Wassermann A. E. 1966. Organoleptic evaluation of three phenols present in wood smoke. Journal of Food Science, 31: 1005-1010.
- Wee Y. J., Kim J. N., Ryu H. W. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology and Biotechnology, 44: 163-172.
- Wisotzkey J. D., Jurtshuk P., Fox G. E., Deinhard G., Porralla K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16 S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic of Bacteriology, 42: 263-269.
- Wong M. L., Medrano J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques, 39: 75-85.
- Yamazaki K., Tezuka H., Shinano H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 60: 543-545.
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 154 str.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Barbari Jeršek se iskreno zahvaljujem za pomoč, strokovne popravke, izkazano potrpljenje in večkratne preglede magistrskega dela.

Recenzentkama prof. dr. Nataši Poklar Ulrih iz Biotehniške fakultete in doc. dr. Karmen Godič Torkar iz Zdravstvene fakultete bi se rad zahvalil za koristne nasvete in strokoven pregled magistrskega dela.

Matjažu Retlju vodji mikrobiološkega laboratorija na Zavodu za zdravstveno varstvo, Novo mesto in dr. Izabeli Concini iz CNR-IDASC (it. Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Acustica e Sensoristica Orso Mario Corbino) laboratorija za senzorično analizo živil v Bresci v Italiji se iskreno zahvaljujem za trud pri izvedbi raziskave in pripravi znanstvene objave.

Duški Dimitrijević in Majdi Hadolin Kolar iz podjetja Vitiva se iskreno zahvaljujem za trud pri pripravi patenta.

Gregorju Pernetu vodji mikrobiološkega laboratorija iz Pivovarne Union se iskreno zahvaljujem za vse ideje, strokovne nasvete in poglobljene razpreve ob dobljenih rezultatih ter nenazadnje, da sva verjela v uspeh poskusa, ki smo ga na koncu tudi patentirali. Zahvalil bi se rad tudi vsem zaposlenim v podjetju, ki so kakorkoli pomagali pri izvedbi magistrskega dela.

Lini Burkan Makivić se zahvaljujem za svetovanje pri oblikovanju magistrskega dela ter dokumentacijski opremi naloge.

Nini Barlič se zahvaljujem za jezikovni pregled magistrskega dela.

Posebna zahvala gre zato moji ženi Špeli, ki mi je v težkih trenutkih ob izgubi očeta stala ob strani, me tolažila in vzpodbujala ter mi skupaj z najinim sončkom Tilmom dala moči, da sem magistrsko delo dokončal. Špela, pokazala si mi, da ni nič težko narediti tistemu, ki te ima rad.

Posebna zahvala gre tudi očetu, ki žal ni dočakal zagovora magistrskega dela a vem, da se nekje daleč veseli skupaj z nami. Magistrsko delo zato posvečam njemu in mami, ki sta mi študij omogočila, me podpirala in pomagala na poti do cilja. Iskrena hvala tudi sestri Mateji za vzpodbudne besede.