

## **ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS – WZROST I WYTWARZANIE ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH W SOKU JABŁKOWYM**

**Barbara Sokółowska, Sylwia Skąpska, Barbara Sionek,  
Jolanta Niezgoda, Marta Chotkiewicz**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego  
Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

### **Streszczenie**

Potwierdzono zdolność ośmiu wybranych szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* do wzrostu w soku jabłkowym. Zmętnienie soku obserwowano po 2–11 dniach inkubacji w temperaturze 45°C, w zależności od poziomu inokulum i szczepu. Nietypowy zapach „dojrzałego sera” pojawiał się łącznie ze wzrostem bakterii lub kilka dni później. Dwa szczepy *A. acidoterrestris* powodowały zepsucie (zmętnienie i nietypowy zapach) po szesnastu dniach inkubacji w 25°C.

W soku jabłkowym wzbogaconym kwasem wanilinowym badane szczepy wytwarzały gwajakol w ilościach wykrywanych sensorycznie i techniką HPLC po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 45°C. W soku jabłkowym z dodatkiem kwasu wanilinowego inkubowanym w temperaturze 25 °C wzrost dwóch szczepów *A. acidoterrestris* obserwowano dopiero po dziesięciu i trzydziestu czterech dniach inkubacji w temperaturze 25°C, natomiast gwajakol wytwarzany był w tych warunkach tylko przez jeden z badanych szczepów.

**Słowa kluczowe:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sok jabłkowy, gwajakol, kwas wanilinowy

## **ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS – GROWTH AND PRODUCTION OF ODOUR COMPOUNDS IN APPLE JUICE**

### **Summary**

The ability of growth of eight chosen *Alicyclobacillus acidoterrestris* strains in apple juice was confirmed. Haze formation in the juice was observed after 2-11 days of incubation at 45°C, depending on the inoculum level and strain. Unusual “mature cheese” odour appeared during the bacterial growth or several days later. Two *A. acidoterrestris* strains

caused spoilage (turbidity and unusual odour) after sixteen days incubation at 25°C.

Tested strains produced guaiacol in apple juice enriched with vanillic acid, in amounts that can be detected sensorically and with HPLC method, after two days of incubation at 45°C. Growth of two *A. acidoterrestris* strains, after ten and thirty four days incubation, at 25°C, apple juice enriched with vanillic acid was observed, whereas guaiacol was produced at this conditions only by one of tested strains.

**Key words:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, apple juice, guaiacol, vanillic acid

## WPROWADZENIE

W 1982 roku stwierdzono pierwszy przypadek zepsucia aseptycznie pakowanego soku jabłkowego przez kwasolubne, termofilne bakterie przetrwalnikujące [Cerny i in. 1984]. Bakterie te zostały wprowadzone do nomenklatury w roku 1992, jako nowy rodzaj *Alicyclobacillus* [Wisotzkey i in. 1992]. Niekorzystne zmiany sensoryczne soków i napojów spowodowane są wytwarzanymi przez bakterie *Alicyclobacillus* związkami nadającymi tym produktom zapach określany jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny. Związki te to przede wszystkim 2-metoksyfenol (gwajakol) oraz 2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol [Pettipher i in. 1997; Baumgart i in. 1997; Borlinghaus, Engel 1997; Orr i in. 2000; Jensen, Whitfield 2003; Gocmen i in. 2005; Niwa 2005]. Są to związki o stosunkowo silnym zapachu. W soku jabłkowym próg wyczuwalności węchowej gwajakolu, wg różnych źródeł, wynosił 0,57 µg/dm<sup>3</sup> [Siegmund, Pöllinger-Zierler 2006], 0,91 µg/dm<sup>3</sup> [Eisle, Semon 2005] i 2 µg/dm<sup>3</sup> [Pettipher i in. 1997], a próg rozpoznania: 2 µg/dm<sup>3</sup> [Siegmund, Pöllinger-Zierler 2006] lub 2,23 µg/dm<sup>3</sup> [Orr i in. 2000].

Spośród aktualnie znanych dwudziestu gatunków bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* [www.bacterio.cict.fr] cztery: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus herbarius*, *Alicyclobacillus acidiphilus* oraz niektóre szczepy z gatunku *Alicyclobacillus hesperidum* są zdolne do wytwarzania gwajakolu. W zepsutych sokach i napojach owocowych zawartość gwajakolu rzędu od kilku do kilkudziesięciu µg/dm<sup>3</sup> była oznaczana za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), po uprzedniej ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi lub na mikrowłóknach (SPME) [Pettipher i in. 1997; Orr i in. 2000]. Nie wykazano jednoznacznie korelacji pomiędzy liczbą komórek a ilością wytwarzanego gwajakolu. Analityka związków zapachowych wytwarzanych przez bakterie

*Alicyclobacillus* stale się rozwija – stosowane są takie techniki jak połączenie chromatografii gazowej z olfaktometryczną detekcją eluatów (GC-O) i spektrometrią mas – GC-MS [Gocman i in. 2005; Danyluk i in. 2011] czy tzw. „elektroniczny nos” [Gobi i in. 2010].

Zgodnie ze szlakiem syntezy zaproponowanym przez Niwę i Kawamoto (2003), gwajakol powstaje z kwasu ferulowego, poprzez wanilinę i kwas wanilinowy. Związki te występują naturalnie w sokach owocowych. Reakcja przebiega pod wpływem dekarboksylazy kwasu wanilinowego, enzymu którego indukcja następuje w obecności kwasu wanilinowego [Niwa, Kawamoto 2003]. W warunkach suplementacji kwasem wanilinowym wytwarzane ilości gwajakolu, rzędu od kilku do kilkudziesięciu mg/dm<sup>3</sup>, mogą być oznaczane bezpośrednio w soku techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub po przeprowadzeniu gwajakolu w związek barwny tetragwajakol – spektrofotometrycznie, a nawet wzrokowo [Niwa, Kawamoto 2003; Bahçeci, Acar 2007; Smit 2009]. Ostatnie badania Witthuhn i in. (2011) wykazały, że szczep *A. acidoterrestris* FB2 wytwarzał gwajakol z waniliny i kwasu wanilinowego, natomiast nie wytwarzał gwajakolu z kwasu ferulowego. Minimalna zawartość waniliny lub kwasu wanilinowego w soku, na poziomie 10 mg/l, jest czynnikiem niezbędnym do wytworzenia takich ilości gwajakolu, które będą wyczuwalne węchowo.

Celem pracy była ocena zdolności wybranych szczepów bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* do wytwarzania gwajakolu w pożywce, w soku jabłkowym i w soku jabłkowym z dodatkiem kwasu wanilinowego.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

### Szczepy bakterii

Do badań zastosowano osiem szczepów *A. acidoterrestris* wyizolowanych w IBPRS [Sokołowska i in. 2010a]:

- 1) szczep TO-29/4/02 wyizolowany w 2002 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 2) szczep TO-117/02 wyizolowany w 2002 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 3) szczep TO-57/01/04 szczep wyizolowany w 2004 r. z emulsji do produkcji napojów,
- 4) szczep TO-224/1/05 wyizolowany w 2005 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 5) szczep U-44/25/06 wyizolowany w 2006 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 6) szczep TO-41/06 wyizolowany w 2006 r. z napoju pomarańczowego,
- 7) szczep TO-169/06 wyizolowany w 2006 r. z zagęszczonego soku jabłkowego,
- 8) szczep TO-27/2/07 wyizolowany w 2007 r. z zagęszczonego soku pomarańczowego.

Izolację szczepów *Alicyclobacillus* sp. przeprowadzono metodą z przednamnażaniem

w pożywce płynnej i/lub metodą filtracji membranowej, wg IFU Method No 12. Szczepy zidentyfikowano do gatunku *A. acidoterrestris* na podstawie ich zdolności do wytwarzania kwasu z erytritolu [Baumgart 2003].

#### **Ocena zdolności wybranych szczepów *A. acidoterrestris* do wytwarzania gwajakolu**

Wyizolowane z badanych próbek szczepy *Alicyclobacillus* sp. przesiewano na pożywkę YSG–agar. Inkubowano od 24 h do 48 h lub maksymalnie 72 h w temperaturze  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , tak aby przetrwalniki nie zdążyły się uformować. Do  $2\text{ cm}^3$  pożywki Va-YSG-bulion dodawano komórki *Alicyclobacillus* sp. do uzyskania końcowej liczebności ok.  $10^8$  jtk/cm<sup>3</sup>. Inkubowano w temperaturze  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , przez 3–4 godziny. Następnie zgodnie z instrukcją producenta testu Guaiacol Detection Kit (firma Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd. Japan) dodawano  $1\text{ cm}^3$  50 mM buforu ftalanowego, 20  $\mu\text{l}$  1,3-proc. roztworu  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 20  $\mu\text{l}$  peroksydazy chrzanowej w buforze fosforanowym. Wytwarzanie brązowego tetra-gwajakolu obserwowano natychmiast lub w ciągu kilku minut po dodaniu odczynników (producent dopuszcza odczyt maksymalnie do 10 minut po dodaniu odczynników).

#### **Ocena wzrostu *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym**

Badania potwierdzające zdolność do wzrostu i psucia soku jabłkowego ośmiu wybranych szczepów *A. acidoterrestris* przeprowadzono w temperaturze  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  – odpowiadającej warunkom przechowywania soków w magazynach i sklepach – oraz w temperaturze  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  – optymalnej dla wzrostu tych bakterii. Do próbek klarownego, pasteryzowanego handlowego soku jabłkowego (zawartość ekstraktu 11,2%, pH 3,40) z dodatkiem kwasu wanilinowego w ilości  $100\text{ mg/dm}^3$  lub bez tego dodatku wprowadzano zawiesinę przetrwalników *A. acidoterrestris* [Sokołowska i in. 2010] do uzyskania końcowej liczebności  $10^3$  jtk/cm<sup>3</sup> lub  $10^5$  jtk/cm<sup>3</sup> soku. Przed inkubacją próbki soku poddawano szokowi termicznemu ( $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut) w celu aktywacji przetrwalników. Badania wykonano w dwóch powtórzeniach. Odnotowywano czas (w dniach), po którym w inkubowanych próbkach soku obserwowano zmętnienie i pojawianie się obcego zapachu w porównaniu z równolegle inkubowaną próbką kontrolną (próbka soku, do której nie dodano przetrwalników *A. acidoterrestris*).

#### **Oznaczanie zawartości gwajakolu w próbkach soku jabłkowego**

Z hodowli, w których stwierdzono wzrost dodanego szczepu i obcy zapach, pobierano próbki o objętości  $2\text{ cm}^3$ , w których oznaczano zawartość gwajakolu techniką HPLC [Sokołowska i in. 2010].

#### **Szacowanie progu wyczuwalności węchowej gwajakolu oraz progu rozpoznania**

wykonano wg PN-ISO 5496.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Jak wynika z wieloletnich badań prowadzonych od 2004 roku przez Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych IBPRS, bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* sp. obecne były w ponad 60% przebadanych próbek zagęszczonych soków owocowych (głównie jabłkowych). Większość wyizolowanych szczepów stanowiły szczepy z gatunku *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Ponad 200 szczepów zakwalifikowano do gatunku *Alicyclobacillus acidoterrestris* na podstawie ich zdolności do wytwarzania kwasu z erytritolu [Baumgart 2003] oraz do wytwarzania gwajakolu w pożywce z kwasem wanilinowym Va-YSG [Niwa, Kawamoto 2003].

W temperaturze 25°C obserwowano wzrost jedynie dwóch spośród ośmiu badanych szczepów *A. acidoterrestris*. Zmętnienie próbek soku nastąpiło po szesnastu dniach inkubacji szczepu TO-169/06 przy inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup> oraz szczepu TO-27/2/07 przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 7, 8). W próbkach tych stwierdzono obcy zapach pojawiający się łącznie z objawami wzrostu. Zapach ten scharakteryzowano jako zapach „dojrzałego sera”. Nie wyczuwano natomiast zapachu dezynfekcyjnego, fenolowego, typowego dla gwajakolu bądź 2,6-dibromofenolu i 2,6-dichlorofenolu. Gwajakolu nie wykryto również techniką HPLC. Granica wykrywalności tej metody wynosiła 90 µg/dm<sup>3</sup>. Próg wyczuwalności gwajakolu w soku jabłkowym wynosił 10 µg/dm<sup>3</sup>, natomiast próg rozpoznania, w zależności od oceniającego, wynosił od 20 µg/dm<sup>3</sup> do 30 µg/dm<sup>3</sup>.

W sokach jabłkowych inkubowanych w temperaturze 45°C pierwsze objawy wzrostu *A. acidoterrestris* obserwowano już po dwóch dniach inkubacji (szczep TO-224/1/05, przy wprowadzonym inokulum przetrwalników 5 log jtk/cm<sup>3</sup> oraz szczepy TO-117/02 i U-44/25/06, zarówno przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> jak i przy inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup>) (tabela 2, 4, 5). Początkowo obserwowano zmętnienie, a następnie w części próbek powstawanie osadu. Najwolniej rosnącym w tych warunkach szczepem *A. acidoterrestris* był TO-169/06. Objawy wzrostu w soku jabłkowym zaobserwowano po 11 dniach inkubacji w temperaturze 45°C przy obu poziomach liczebności inokulum (tabela 7). Nie stwierdzono natomiast zmętnienia soku jabłkowego po dwudziestu dniach inkubacji, po zaszczepieniu przetrwalnikami szczepu TO-224/1/05 w liczbie 3 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 4). Zmętnienie soku jabłkowego możliwe do zaobserwowania wizualnie było związane z osiągnięciem liczebności *A. acidoterrestris* ok. 6 log jtk/cm<sup>3</sup>.

W próbkach soku inkubowanych w temperaturze 45°C wyczuwano obcy zapach

„dojrzałego sera” pojawiający się łącznie z objawami wzrostu lub kilka dni później. Nie wyczuwano natomiast zapachu dezynfekcyjnego, fenolowego. Gwajakolu nie wykryto również techniką HPLC (tabele 1–8).

W literaturze dostępne są publikacje [Pettipher i in. 1997; Komitopoulou i in. 1999; Orr i in. 2000; Walls i Chuyate 2000] dotyczące psucia się soków i powstawania dezynfekcyjnego zapachu. Jednakże stwierdzone w cytowanych pracach ilości gwajakolu rzędu od kilku do kilkudziesięciu  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  były oznaczane techniką GC-MS i były poniżej granicy wykrywalności zastosowanej w niniejszej pracy techniki HPLC. W pracy Pettipher i in. (1997) wykazano, że wykrywalne sensorycznie i chromatograficznie (GC-MS) ilości gwajakolu tworzyły się po 6 dniach inkubacji szczepu *A. acidoterrestris* DSM 2498 w soku jabłkowym, w temperaturze 44°C i 35°C oraz po 10 dniach inkubacji w temperaturze 25°C. Zawartość gwajakolu wynosiła odpowiednio 32,3, 17,3 i 11,6  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  soku. Według autorów niezbędnym warunkiem wytwarzania gwajakolu było namnożenie komórek co najmniej rzędu  $10^5$  jtk/cm<sup>3</sup>, przy czym nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczbą komórek a ilością wytwarzanego gwajakolu. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach [Sokołowska i in. 2010] nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczebnością komórek *A. acidoterrestris* DSM 2598, *A. acidiphilus* DSM14558 oraz *A. herbarius* DSM 13609 a ilością wytwarzanego gwajakolu. Z kolei w badaniach Komitopoulou i in. (1999), dotyczących wzrostu przetrwalników *A. acidoterrestris* Z CRA 7182 między innymi w soku jabłkowym, pojawianie się dezynfekcyjnego zapachu obserwowano po czterech dniach inkubacji w temperaturze 30°C, po osiągnięciu poziomu namnożenia 5 log jtk/cm<sup>3</sup>. Natomiast w temperaturze 25°C dezynfekcyjny zapach stwierdzano po 8 dniach inkubacji i osiągnięciu poziomu namnożenia 4–5 log jtk/cm<sup>3</sup>.

Walls i Chuyate (2000) obserwowały kiełkowanie i wzrost przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym (11,6°Brix, pH 3,47) po 1–2 tygodniach inkubacji w 35°C przy inokulum 1 log jtk/cm<sup>3</sup> - 4 log jtk/cm<sup>3</sup> soku. W badanych próbkach stwierdzano obecność „medycznego” zapachu i osad. Wzrostu nie stwierdzono podczas 12-tygodniowej inkubacji soku jabłkowego w temperaturze 20°C i 23°C. W badaniach Chen i in. (2006) zmętnienie soku jabłkowego zanieczyszczonego komórkami wegetatywnymi 19 szczepów *A. acidoterrestris* w ilości 100 jtk/cm<sup>3</sup> obserwowano już po czterech dniach inkubacji w 37°C. Tylko jeden z badanych szczepów powodował zmętnienie po pięciu dniach inkubacji. Od piątego dnia inkubacji obserwowano pojawianie się osadu (trzy szczepy) i dezynfekcyjnego zapachu (dwa szczepy). Po 12 dniach inkubacji wszystkie szczepy wytwarzały dezynfekcyjny zapach, którego intensywność była proporcjonalna do ilości

osadu.

Zapach „serowy” stwierdzono w sokach ananasowym i mango po 14 dniach inkubacji próbek zaszczipionych *A. acidoterrestris* [Danyluk i in. 2011]. Kwasy 2-metylomasłowy i 3-metylomasłowy oraz metyl-3(metyltio)-propionian i etyl-3(metyltio)-propionian zostały zidentyfikowane jako odpowiedzialne za ten zapach. Według autorów szczepy *A. acidoterrestris* mogą posiadać system enzymów umożliwiający im wytwarzanie związków zapachowych innych niż gwajakol i halogenowane fenole.

W przeciwieństwie do większości cytowanych powyżej pozycji literaturowych w niniejszej pracy nie stwierdzono sensorycznie powstawania dezynfekcyjnego zapachu w soku jabłkowym w czasie inkubacji ośmiu szczepów *A. acidoterrestris* w temperaturach 25°C i 45°C. Przyczyną niepojawiania się dezynfekcyjnego zapachu w sokach jabłkowych (produkowanych z zagęszczonych soków), pomimo obserwowanego wzrostu komórek *A. acidoterrestris*, może być, oprócz braku aktywności dekarboksylazy wanilinowej, brak wystarczającej ilości substratów do wytworzenia gwajakolu (kwasu ferulowego, waniliny i kwasu wanilinowego) oraz maskowanie związkami o intensywnym zapachu dojrzałego sera.

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono, dodając do soku jabłkowego 100 mg/dm<sup>3</sup> kwasu wanilinowego, indukującego syntezę dekarboksylazy wanilinowej, enzymu niezbędnego do wytworzenia gwajakolu z kwasu ferulowego poprzez wanilinę i kwas wanilinowy [Niwa 2005].

W temperaturze 25°C obserwowano objawy wzrostu dwóch szczepów z gatunku *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym z dodatkiem kwasu wanilinowego. Zmętnienie próbek nastąpiło po 10 dniach inkubacji szczepu TO-169/06 przy inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 7) oraz po 34 dniach inkubacji szczepu TO-27/2/07 przy inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 8). Zmętnieniu soku jabłkowego w temperaturze 25°C towarzyszył dezynfekcyjny zapach tylko w hodowli jednego szczepu - TO-27/2/07, a techniką HPLC stwierdzono zawartość 2,92 mg gwajakolu/dm<sup>3</sup> soku (tabela 8).

W temperaturze 45°C objawy wzrostu szczepów *A. acidoterrestris* w postaci zmętnienia soku z dodatkiem kwasu wanilinowego pojawiały się pomiędzy drugim (szczep TO-224/1/05 przy wprowadzonym inokulum przetrwalników 5 log jtk/cm<sup>3</sup>, tab. 4) a 16. dniem (TO-169/06 przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup>, tabela 7) inkubacji. Nie stwierdzono natomiast, podobnie jak w doświadczeniu bez dodatku kwasu wanilinowego, zmętnienia soku jabłkowego po dwudziestu dniach inkubacji, po zaszczipieniu przetrwalnikami szczepu TO-224/1/05 przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 4).

W soku z dodatkiem kwasu wanilinowego zapach dezynfekcyjny stwierdzano



jednocześnie z objawami wzrostu, tj. po dwóch dniach inkubacji w temperaturze 45°C (TO-224/1/05, tabela 4) lub z kilkudniowym opóźnieniem. Badane szczepy z gatunku *A. acidoterrestris* wytwarzały gwajakol w ilościach od 0,65 mg/dm<sup>3</sup> soku – szczep TO-224/1/05 przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> soku do 67,60 mg/dm<sup>3</sup> – szczep TO-57/1/04 przy inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabele 1–8).

W soku jabłkowym z dodatkiem kwasu wanilinowego stwierdzono wytwarzanie gwajakolu przez trzy badane szczepy *Alicyclobacillus acidoterrestris*, mimo iż nie obserwowano ich wzrostu w postaci zmętnienia. Szczep TO-224/1/05 wytwarzał 0,65 mg gwajakolu /dm<sup>3</sup> soku z dodatkiem kwasu wanilinowego, po 20 dniach inkubacji w temperaturze 45°C przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 4).

Po 34 dniach inkubacji w temp. 25°C szczep TO-117/02 wytwarzał gwajakol w ilości 0,60 mg/dm<sup>3</sup> soku z dodatkiem kwasu wanilinowego, przy zastosowanym inokulum 5 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 2), a szczep TO-41/06 0,54 mg przy inokulum 3 log jtk/cm<sup>3</sup> (tabela 6).

Podobne wyniki, tzn. wytwarzanie gwajakolu bez wzrostu liczebności komórek *A. acidoterrestris* w stosunku do wprowadzonego inokulum, stwierdzono w pracy Orr i in. (2000). Sensorycznie wyczuwano obecność gwajakolu (panel 19-osobowy) w soku jabłkowym po ośmiu dniach inkubacji w temperaturze 21°C i 37°C, przy inokulum na poziomie ok. 10<sup>3</sup> jtk/cm<sup>3</sup> złożonym z mieszaniny pięciu różnych szczepów *A. acidoterrestris*; stężenie gwajakolu, oznaczone techniką GC-MS, wynosiło odpowiednio 8,1 µg/dm<sup>3</sup> i 11,4 µg/dm<sup>3</sup>.

Bahçeci i in. (2005) stwierdzili obecność gwajakolu w stężeniu powyżej 10 mg/dm<sup>3</sup> już po 24 godzinach inkubacji soku jabłkowego, zawierającego 100 mg/dm<sup>3</sup> waniliny, w temperaturze 46°C, przy inokulum przetrwalników *A. acidoterrestris* 5,0 log jtk/cm<sup>3</sup>. Po czterech dniach praktycznie cała wanilina została przekształcona w gwajakol. Końcowe stężenie gwajakolu po 10 dniach wynosiło 59,18 mg/dm<sup>3</sup>, podczas gdy liczebność komórek wzrosła jedynie o jeden cykl logarytmiczny. Wytwarzanie gwajakolu było zależne od stężenia waniliny oraz od liczebności przetrwalników *A. acidoterrestris* i temperatury. Krytyczną wartością liczebności przetrwalników, konieczną do szybkiego wytwarzania gwajakolu w soku jabłkowym, było 4 log jtk/cm<sup>3</sup>, a optymalna temperatura wynosiła 46°C. W temperaturze 25°C, mimo iż obserwowano spadek zawartości waniliny, powstawały niewielkie ilości gwajakolu – ok. 2 mg/dm<sup>3</sup>. Także Smit (2009) wykazała, że gwajakol był wykrywany w soku jabłkowym po osiągnięciu liczebności 4–5 log jtk/ml, a optymalną temperaturą dla jego wytwarzania było 45°C.

Tabela 1. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym  
Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

Szczep / Strain <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		TO-29/4/02					
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (6)	+ <sup>1</sup> (7)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
	5,0	+ (6)	+ <sup>1</sup> (7)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice + 100 mg/dm<sup>3</sup> vanillic acid</i>	3,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	30,62 (4)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	38,71 (4)	- (34)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Tabela 2. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym  
Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

Szczep / Strain <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		TO-117/02					
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (2)	+ <sup>1</sup> (2)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
	5,0	+ (2)	+ <sup>1</sup> (2)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	31,80 (4)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	36,63 (4)	- (34)	- (34)	0,6 (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

Tabela 3. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

Szczep / Strain <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		TO-57/1/04					
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (5)	+ <sup>1</sup> (8)	nw (8)	- (33)	- (33)	nb
	5,0	+ (5)	+ <sup>1</sup> (8)	nw (8)	- (33)	- (33)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (7)	27,95 (7)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	67,60 (5)	- (34)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek  
*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Tabela 4. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym

Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

Szczep / Strain <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		TO-224/1/05					
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	- (20)	- (20)	nw (20)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (2)	+ <sup>1</sup> (2)	nw (13)	- (34)	- (34)	nw (34)
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice</i> + <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	- (20)	- (20)	0,65 (20)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+(2)	+ <sup>2</sup> (7)	25,05 (2)	- (34)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Tabela 5. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym  
Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

Szczep / Strain	U-44/25/06
-----------------	------------

<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>							
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>		45°C			25°C		
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unusual odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]						
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (2)	+ <sup>1</sup> (2)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
	5,0	+ (2)	+ <sup>1</sup> (2)	nw (7)	- (22)	- (22)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	32,80 (4)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	47,84 (4)	- (34)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

*acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym

Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Tabela 6. Wzrost *Alicyclobacillus*

Szczep / <i>Strain</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	TO-41/06
---	----------

<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>							
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (8)	+ <sup>1</sup> (13)	nw (13)	- (33)	- (33)	nb
	5,0	+ (5)	+ <sup>1</sup> (8)	nw (13)	- (33)	- (33)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+(3)	+ <sup>2</sup> (7)	26,96 (7)	- (34)	- (34)	0,54 (34)
	5,0	+(3)	+ <sup>2</sup> (7)	26,29 (7)	- (34)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

Tabela 7. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym

Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Szczep / <i>Strain</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	TO-169/06
--	-----------

Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C			25°C		
	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (11)	+ <sup>1</sup> (13)	nw (13)	- (33)	- (33)	nb
	5,0	+ (11)	+ <sup>1</sup> (13)	nw (13)	- (33) + (16)	+ <sup>1</sup> (16)	nw (16)
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+ sł (16)	+ <sup>2</sup> (16)	28,54 (17)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (4)	+ <sup>2</sup> (4)	62,90 (5)	+ (10)	- (34)	nw (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

Tabela 8. Wzrost *Alicyclobacillus acidoterrestris* i wytwarzanie gwajakolu w soku jabłkowym

Growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and production of guaiacol in apple juice

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

Szczep / <i>Strain</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	TO-27/2/07		
Pożywka <i>Medium</i>	Temperatura inkubacji <i>Incubation temperature</i>	45°C	25°C



	Inokulum [log jtk/cm <sup>3</sup> ] <i>Inoculum</i> [log cfu/cm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]	Wzrost <i>Growth</i>	Nietypowy zapach <i>Unususal odour</i>	Gwajakol [mg/dm <sup>3</sup> ] <i>Guaiacol</i> [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sok jabłkowy <i>Apple juice</i>	3,0	+ (5)	+ <sup>1</sup> (8)	nw (8)	- (33) + (16)	+ <sup>1</sup> (16)	nw (16)
	5,0	+ (5)	+ <sup>1</sup> (8)	nw (8)	- (33)	- (33)	nb
Sok jabłkowy + 100 mg/dm <sup>3</sup> kwasu wanilinowego <i>Apple juice +</i> <i>100 mg/dm<sup>3</sup></i> <i>vanillic acid</i>	3,0	+ (3)	+ <sup>2</sup> (6)	26,29 (7)	- (34)	- (34)	nw (34)
	5,0	+ (3)	+ <sup>2</sup> (6)	26,16 (7)	+sł (34)	+ <sup>2</sup> (34)	2,92 (34)

Czas inkubacji w dniach podany w nawiasach stanowi średnią z dwóch próbek

<sup>1</sup> zapach „dojrzałego sera”

<sup>2</sup> zapach dezynfekcyjny

nw – nie wykryto

nb – nie badano

*Incubation time in days given in the bracket is the average of two samples*

<sup>1</sup> „cheese” odour

<sup>2</sup> disinfectant odour

nw – not detected

nb – not tested

## WNIOSKI

1. Niektóre z badanych szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* były zdolne do wzrostu w sokach jabłkowych w trakcie przechowywania w temperaturze 25°C. Wszystkie badane szczepy były zdolne do wzrostu w sokach jabłkowych przechowywanych w temperaturze 45°C. Objawom wzrostu towarzyszył „zapach dojrzałego sera”.
2. Obecność kwasu wanilinowego w soku jabłkowym indukowała biosyntezę gwajakolu przez jeden szczep *Alicyclobacillus acidoterrestris* w temperaturze 25°C oraz przez wszystkie badane szczepy w temperaturze 45°C.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baumgart J. (2003). Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In: Handbook of culture media for food microbiology. Progress in industrial microbiology vol. 37. Ed. by J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird. Amsterdam: Elsevier, 161-166
2. Baumgart J., Husemann M., Schmidt C. (1997). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. Fluss. Obst, 64(4), 178-180
3. Bahçeci K.S., Gökmen V., Acar J. (2005). Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study. Eur. Food Res. Technol., 220, 196-199
4. Bahçeci K.S., Acar J. (2007). Determination of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by using HPLC and spectrofotometric methods, and mathematical modeling of guaiacol production. Eur. Food Res. Technol., 225, 873-878
5. Borlinghaus A., Engel R. (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies and validation. Fruit Process., 7(7), 262-266
6. Cerny G., Hennlich W., Poralla K. (1984). Fruchtsaftverderb durch bacillen isolierung und charakterisierung des verderbserregers. Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch., 179, 224-227
7. Chen S., Tang Q., Zhang X., Zhao G., Hu X., Liao X., Chen F., Wu J., Xiang H. (2006). Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. Food Microbiol., 23, 439-445
8. Danyluk M.D., Friedrich L.M., Jouquand C., Goodrich-Schneider R., Parish M.E., Rouseff R. (2011). Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. Food Microbiol., 28, 472-477

9. Eisle T.A., Semon M.J. (2005). Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. *J. Food Sc.*, 70, 267-269
10. Gobi E., Falasconi M., Concina I., Mantero G., Bianchi F., Mattarozzi M., Musci M. (2010). Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool. *Food Control*, 21, 1374-1382
11. Gocmen D., Elston A., Williams T., Parish M., Housett R.L. (2005). Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40, 172-177
12. IFU Method No 12, September 2004/revised March 2007. Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices.
13. Jensen N., Whitfield F.B. (2003). Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 9-14
14. 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. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34, 81-85
15. Niwa M. (2005). Control of hazardous bacteria in acidic beverages by using a guaiacol detection kit (peroxidase method). *Fruit Process.*, 15(6), 388-392
16. Niwa M., Kawamoto A. (2003). Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. *Fruit Process.*, 13(2), 102-107
17. Orr R.V., Shewfelt R. L., Huang C.J., Tefera S., Beuchat L.R. (2000). Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spore and vegetative cell populations. *J. Food Protect.*, 11, 1517-1522
18. Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett Appl. Microbiol.*, 24, 185-189
19. PN-ISO 5496 Analiza sensoryczna. Metodologia. Wprowadzenie i szkolenie oceniających w wykrywaniu i rozpoznawaniu zapachów.
20. Siegmund B., Pöellinger-Zierler B. (2006). Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5984-5989

21. Sokołowska B., Skąpska S., Sionek B., Niezgoda J., Bytońska M. (2010). Wytwarzanie gwajakolu z kwasu wanilinowego przez bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* – badania modelowe w soku jabłkowym, Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż., 65, 39-46
22. Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Frankiel A. (2010a). Bioróżnorodność szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*, Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż., 65, 29-32
23. Smit Y. (2009). Growth and guaiacol production of species of *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolated from the South African fruit processing environment. Thesis MSc Food Sc., [<http://scholar.sun.ac.za/bitstream/handle/10019.1/2245/Smit,%20Y.pdf?...>]
24. Walls I., Chuyate R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia, 52 (7), 286-288
25. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K. (1992). Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 42(2), 263-269
26. Witthuhn R.C., van der Merwe E., Venter P., Cameron M. (2012). Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanilic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Inter. J. Food Microbiol., 157, 113-117