

IZABELA PORĘBSKA, BARBARA SOKOŁOWSKA,
ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

**WPLYW DITLENKU WĘGLA W STANIE NADKRYTYCZNYM
NA KIEŁKOWANIE I INAKTYWACJĘ PRZETRWAŁNIKÓW
*ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS***

Streszczenie

Przetrwalniki termofilnych kwasolubnych bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris* są odporne na działanie czynników zewnętrznych i mogą się rozwijać w sokach w czasie przechowywania. Wytwarzają związki o dezynfekcyjnym zapachu, m.in. gwajakol i prowadzą do zepsucia soków. Zwiększenie stopnia kiełkowania przetrwalników w procesie utrwalania żywności może przyczynić się do ich skutecznej inaktywacji. Celem pracy była charakterystyka przebiegu procesu kiełkowania i stopnia inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* zainicjowanego przez ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym (SCCD).

Przetrwalniki zawieszono w soku jabłkowym oraz w buforach o pH 4,0 i pH 7,0 poddawano działaniu SCCD o ciśnieniu 10 ÷ 60 MPa, w temp. 50 ÷ 75 °C, w ciągu 20 ÷ 40 min. Po 40 min działania SCCD o ciśnieniu 60 MPa w temp. 75 °C liczba skiełkowanych przetrwalników w soku jabłkowym wynosiła 3,9 log, z czego 3,4 log było inaktywowanych. W tych samych warunkach procesu, ale w buforze o pH 4,0 uzyskano niższy stopień kiełkowania (3,2 log) i inaktywacji (2,7 log). W buforze o pH 7,0 stwierdzono stopień wykiełkowania rzędu 2,5 log i inaktywację przetrwalników o 1,1 log. Stwierdzono istotną korelację pomiędzy wynikami szacowania stopnia kiełkowania uzyskanymi metodą płytkową i metodą pomiaru zmniejszania gęstości optycznej. Temperatura stosowanego SCCD okazała się czynnikiem istotnie wpływającym na stopień kiełkowania i inaktywację przetrwalników *A. acidoterrestris*. Wraz z obniżaniem pH zaobserwowano niewielkie zwiększenie stopnia kiełkowania i znaczne zwiększenie inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* poddanych działaniu SCCD, a zawartość składników odżywczych w soku jabłkowym dodatkowo zwiększała stopień wykiełkowania.

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sok jabłkowy, przetrwalniki, kiełkowanie, inaktywacja, nadkrytyczny ditlenek węgla, gęstość optyczna

Mgr inż. I. Porębska, dr inż. B. Sokołowska, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa, Laboratorium Biomateriałów, Instytut Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk, ul. Sokołowska 29, 01-142 Warszawa, prof. dr hab. Ł. Łaniewska-Trokenheim, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: porebska@ibprs.pl

Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* stanowią istotny problem związany z jakością produktów owocowo-warzywnych. W ostatnich latach obserwuje się rozwój wielu nowych i alternatywnych metod utrwalania żywności, w tym soków owocowo-warzywnych, m.in. stosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych [12, 21, 25, 28], pulsacyjnych pól elektrycznych [10], ogrzewania mikrofalowego w przepływie [9, 26] oraz nadkrytycznego ditlenku węgla [6, 17, 23, 24].

Nadkrytyczny ditlenek węgla (ang. *supercritical carbon dioxide* – SCCD) jest znany i stosowany w technologii żywności głównie do ekstrakcji wartościowych składników. W literaturze pojawiają się jednak prace związane z zastosowaniem tego czynnika zarówno w stanie nadkrytycznym, jak i w stanie gazowym pod wysokim ciśnieniem do inaktywacji mikroorganizmów: bakterii patogennych przenoszonych przez żywność, m.in. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdży, pleśni i bakterii fermentacji mlekowej w przetworach owocowo-warzywnych [4, 6, 7, 17, 27, 28,], a także do inaktywacji przetrwalników [5, 8, 29], w tym *A. acidoterrestris* [1, 3].

W literaturze jest wiele danych na temat działania temperatury [19, 27] i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na procesy kiełkowania i inaktywacji przetrwalników [11, 13, 15, 16, 18, 21, 22, 28]. Opisano także zjawisko kiełkowania przetrwalników *Bacillus coagulans* i *Bacillus licheniformis* [5] pod wpływem ditlenku węgla w stanie gazowym i pod wysokim ciśnieniem oraz *Clostridium perfringens* [8] w medium nasyconym ditlenkiem węgla. Brak jest natomiast informacji o kiełkowaniu *A. acidoterrestris* pod wpływem ditlenku węgla.

Celem pracy była charakterystyka przebiegu procesu kiełkowania i stopnia inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*, zainicjowanego przez ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym oraz określenie korelacji między wynikami pomiaru gęstości optycznej i klasycznej metody płytkowej, zastosowanymi w doświadczeniu.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły wybrane szczepy *A. acidoterrestris* wyizolowane z próbek zagęszczonych soków owocowych, oznaczone jako: TO-169/06 oraz TO-117/02. Szczepy te są przechowywane w postaci zamrożonej w Cytobankach w temp. -27 ± 3 °C. Szczepy ożywiano poprzez przesiewanie ich do pożywki BAT-bulion (Merck, Niemcy) i inkubowano w temp. 45 °C przez 3 dni. Tak przygotowane szczepy używano do sporządzania zawiesin przetrwalników stosowanych w doświadczeniu.

Przetrwalniki szczepu *A. acidoterrestris* TO-169/06 są wrażliwe na działanie temperatury [19], nizyny i lizozymu [20] oraz wysokiego ciśnienia hydrostatycznego

[18], natomiast przetrwalniki szczepu TO-117/02 są odporne na działanie tych czynników [18, 21, 22].

Przetrwalniki szczepów TO-169/06 oraz TO-117/02, uzyskane metodą opisaną przez Skąpską i wsp. [18], wprowadzono do odtworzonego soku jabłkowego (zakupionego w handlu detalicznym) o zawartości ekstraktu – 11,2 °Brix i pH = 3,4 oraz do buforów o pH 4,0 oraz pH 7,0, w ilości 10⁶ jtk/ml. Próbkę zawiesin (ok. 7 ml) poddawano działaniu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Zastosowano SCCD o ciśnieniu: 9, 30, 60 MPa i temp.: 50 i 75 °C. Procesy przeprowadzono w ciągu: 20, 30 i 40 min, przy użyciu aparatu Applied Separations Spe-ed SFE (Applied Separations, Inc., USA).

Wszystkie doświadczenia wykonano w dwóch powtórzeniach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie testem Duncana, na poziomie istotności ($p < 0,05$) przy użyciu programu StatSof[®] Statistica 7.1.

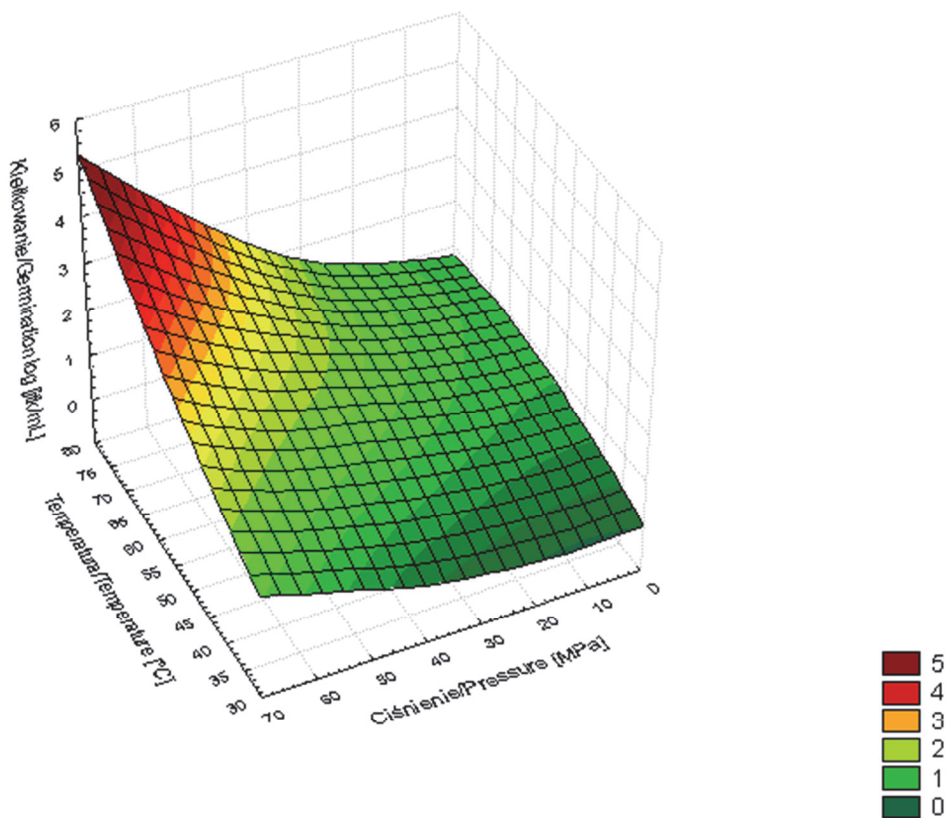
Liczbę przetrwalników, które wykiełkowały i zostały inaktywowane, oznaczano metodą hodowlaną (metoda płytek powierzchniowych) na pożywce BAT-agar (Merck, Niemcy). Inkubację prowadzono przez 5 dni w temp. 45 °C. Stopień inaktywacji przetrwalników stanowiła różnica pomiędzy wyjściową liczbą przetrwalników i liczbą przeżywającą proces działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Stopień kiełkowania przetrwalników obliczano jako różnicę pomiędzy wyjściową liczbą przetrwalników a ich liczbą po zastosowanym procesie ciśnieniowania i dodatkowym ogrzewaniu próbek w temp. 80 °C przez 10 min. Założono, że przetrwalniki, które wykiełkowały, stały się wrażliwe na zastosowaną temperaturę i uległy inaktywacji w czasie ogrzewania [11, 22, 28]. Wartości stopnia inaktywacji i kiełkowania wyrażano w log [jtk/ml].

Przebieg procesu kiełkowania przetrwalników wykonywano metodą pomiaru gęstości optycznej przy $\lambda = 660$ nm (OD_{660}) w spektrofotometrze UV/Visible Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech Ltd., Wielka Brytania). Pomiar wykonywano bezpośrednio po działaniu ditlenku węgla o ciśnieniu: 10, 30, 60 MPa i w temp.: 50 i 75 °C w ciągu: 20, 30 i 40 min, następnie podczas inkubacji w temp. 45 °C przez 4 h oraz po 18 h inkubacji tych samych próbek. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystywano zjawisko początkowego zmniejszania gęstości optycznej OD_{660} , związanego z początkiem kiełkowania przetrwalników, a po pewnym czasie ze wzrostem tej gęstości [14, 16, 27]. Współczynnik zmniejszenia gęstości optycznej wyrażony został jako: (OD_{660} w trakcie kiełkowania / OD_{660} początkowego) \times 100 [8, 15, 16, 27].

Do wyznaczenia równań regresji liniowej i obliczenia współczynnika determinacji (R^2) oraz współczynnika korelacji (r) zastosowano pakiet Microsoft Office Excel 2010.

Wyniki i dyskusja

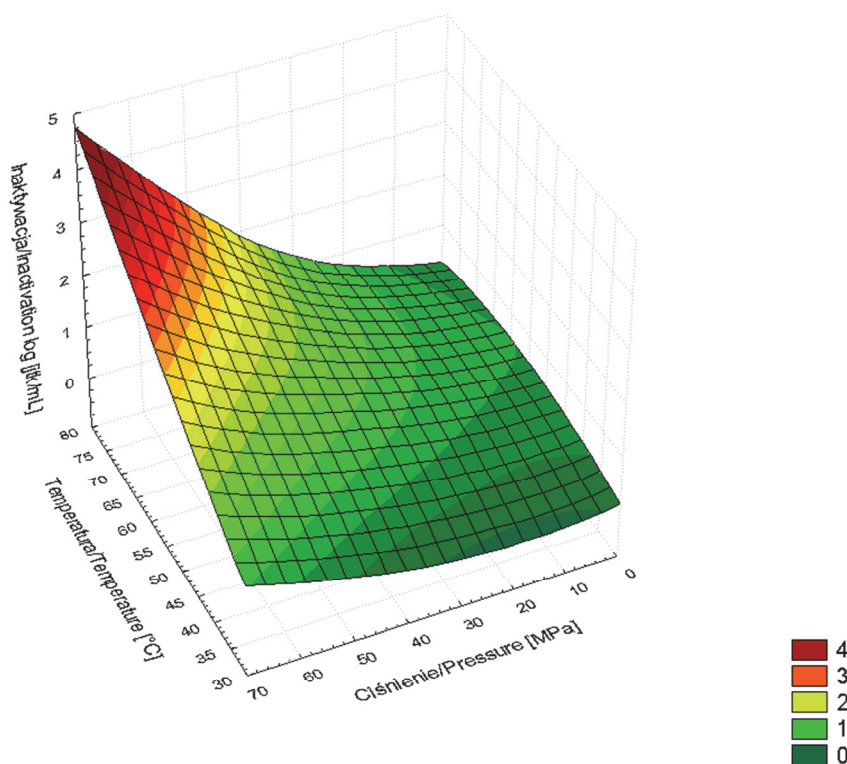
Do pobudzenia kiełkowania przetrwalników laseczek z rodzaju *Bacillus* oraz do ich inaktywacji niezbędne jest stosowanie ditlenku węgla o stosunkowo wysokiej temperaturze. W pracy zbadano wpływ SCCD o temp.: 30, 50 i 75 °C i ciśnieniu: 10, 30 i 60 MPa na stopień kiełkowania (rys. 1) oraz inaktywację (rys. 2) przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym. Liczba wykiełkowanych przetrwalników po zastosowaniu SCCD o temp. 30 °C była nieznaczna, natomiast przy podwyższeniu temperatury do 50 °C przez 40 min była równa 2 log, a inaktywacja – 1,7 log, natomiast w temp. 75 °C wykiełkowało 3,9 log przetrwalników (rys. 1), z czego 3,4 log było inaktywowanych ($p < 0,05$) (rys. 2).



Rys. 1. Kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* TO-169/06 w soku jabłkowym po 40 min działania SCCD w zróżnicowanych wartościach temperatury i ciśnienia

Fig. 1. Germination of *A. acidoterrestris* TO-169/06 spores in apple juice treated with 40 min SCCD at diversified temperature and pressure levels

Zaobserwowano znaczne różnice w kiełkowaniu i inaktywacji przetrwalników w soku jabłkowym w zależności od stosowanego ciśnienia. Uzyskano niewielkie kiełkowanie na poziomie 1,03 log po 40 min działania ciśnienia 10 MPa w temp. 75 °C i inaktywację na poziomie 0,55 log. Niewielką poprawę efektywności procesu kiełkowania do 1,5 log (rys. 1) ($p < 0,05$) zaobserwowano po przedłużeniu procesu do 40 min i zwiększeniu ciśnienia do 30 MPa. W tym procesie nastąpił także wzrost inaktywacji przetrwalników do 1,2 log (rys. 2).

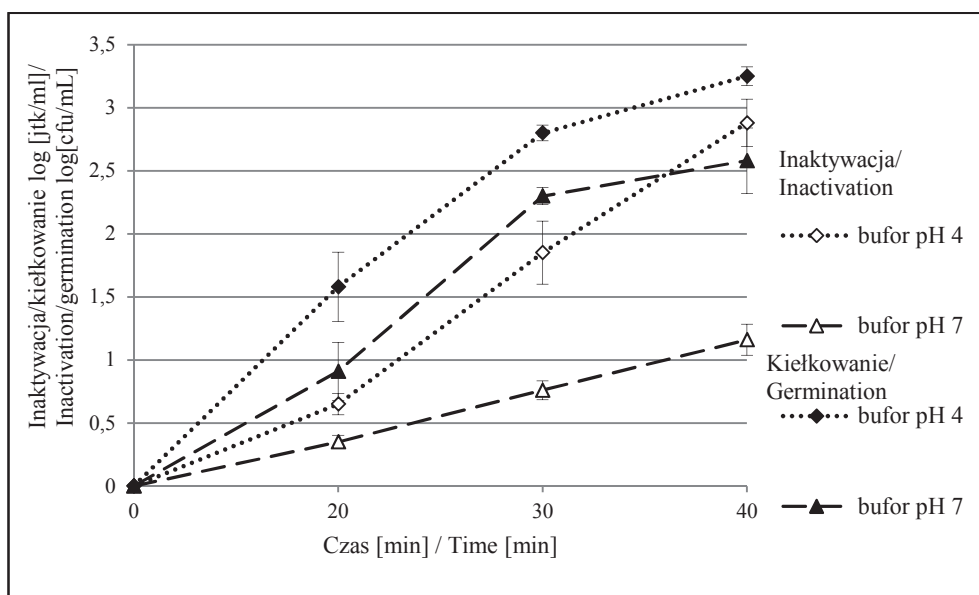


Rys. 2. Inaktywacja przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 w soku jabłkowym po 40 min działania SCCD w zróżnicowanych wartościach temperatury i ciśnienia

Fig. 2. Inactivation of *A. acidoterrestis* TO-169/06 spores in apple juice treated with 40 min SCCD at diversified pressure and temperature levels

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stopień kiełkowania i inaktywacji przetrwalników badanego szczepu *A. acidoterrestis* w soku jabłkowym, po zastosowaniu SCCD, był zależny od parametrów ciśnienia, temperatury oraz czasu tego procesu. Bae i wsp. [1] wykazali, że do inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestis* o 6 log niezbędne było podwyższenie temperatury SCCD do 70 °C, oddziałującej

w ciągu 40 min przy ciśnieniu 10 MPa. Natomiast Casas i wsp. [3] po 30-minutowym działaniu ditlenku węgla o ciśnieniu 10 MPa i temp. 30 °C uzyskali stopień inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* w przecierze jabłkowym o 4 log. Wyniki te różnią się od uzyskanych w badaniach własnych. Może to wskazywać na dużą zmienność szczepów w obrębie gatunku *A. acidoterrestris*, co wykazano również w pracy Skąpskiej i wsp. [18] oraz Sokółowskiej i wsp. [21, 22], ale także może być spowodowane różnicami w typie aparatury stosowanej w badaniach.



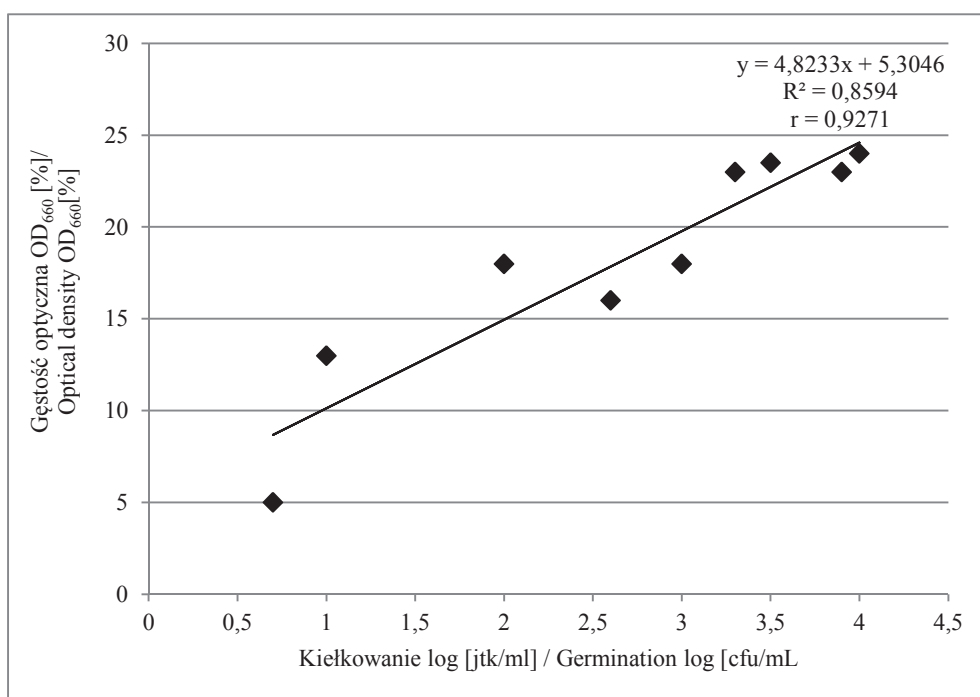
Rys. 3. Kielkowanie i inaktywacja przetrwalników *A. acidoterrestris* TO-169/06 poddanych działaniu SCCD o ciśnieniu 60 MPa i temp. 75 °C w roztworach buforowych

Fig. 3. Germination and inactivation of *A. acidoterrestris* TO-169/06 spores treated with 60 MPa SCCD at a pressure of 60 MPa and a temperature of 75 °C in buffer solutions

Sokółowska i wsp. [21, 22], Vercammen i wsp. [28] oraz Porębska i wsp. [15, 16] stwierdzili, że zarówno stopień kiełkowania, jak i inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* po działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego są zależne od rodzaju zastosowanego medium. Podobną zależność zaobserwowano w niniejszych badaniach. W odtworzonym soku jabłkowym stopień wykiełkowania i stopień inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* po 40 min działania nadkrytycznego ditlenku węgla przy ciśnieniu 60 MPa i w temp. 75 °C były najwyższe (rys. 1 i 2). W tych samych warunkach w buforze o pH 4,0 kiełkowanie przetrwalników było o 1 log mniejsze, a inaktywacja była na poziomie 2,7 log. W buforze o pH 7,0 liczba wykiełkowanych przetrwalników wynosiła 2,5 log, a redukcja przetrwalników była równa 1,1 log

(rys. 3). Wraz ze wzrostem wartości pH zaobserwowano niewielkie zmniejszenie kiełkowania przetrwalników i znaczne zmniejszenie stopnia ich inaktywacji. Podobne zależności stwierdzono w procesie kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestis* wywołanego wysokim ciśnieniem hydrostatycznym [28].

Zgodnie z informacjami dostępnymi w literaturze [27], metoda pomiaru gęstości optycznej pozwala na szybką wizualizację procesu kiełkowania przetrwalników. Wyniki uzyskane metodą pomiaru gęstości optycznej i klasyczną metodą płytkową przedstawiono na rys. 4. Zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy wynikami uzyskiwanymi tymi dwoma metodami ($r = 0,93$). W dalszych badaniach dynamiki kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestis* po działaniu SCCD zastosowano metodę pomiaru gęstości optycznej.



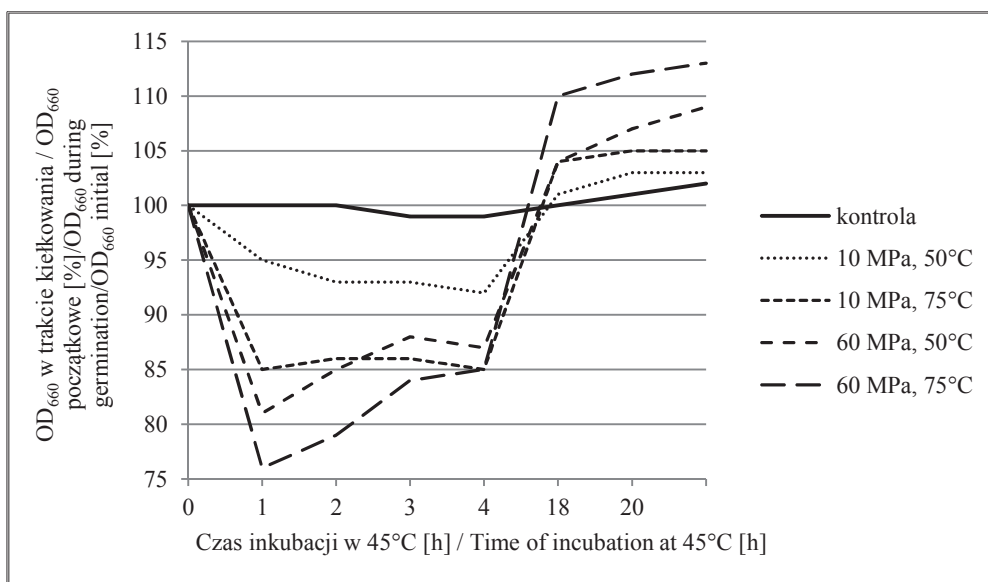
Rys. 4. Zmiany gęstości optycznej OD₆₀₀ zawiesiny przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 w wyniku kiełkowania pod wpływem SCCD

Fig. 4. Changes in OD₆₀₀ optical density of *A. acidoterrestis* TO-169/06 spore suspension resulting from SCCD-induced germination

Na rys. 5. przedstawiono dynamikę kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 po zastosowaniu SCCD o ciśnieniu 10 i 60 MPa w temp. 50 i 75 °C. Zaobserwowano zmniejszenie gęstości optycznej o 18 % w ciągu 1 h po 40 min dzia-

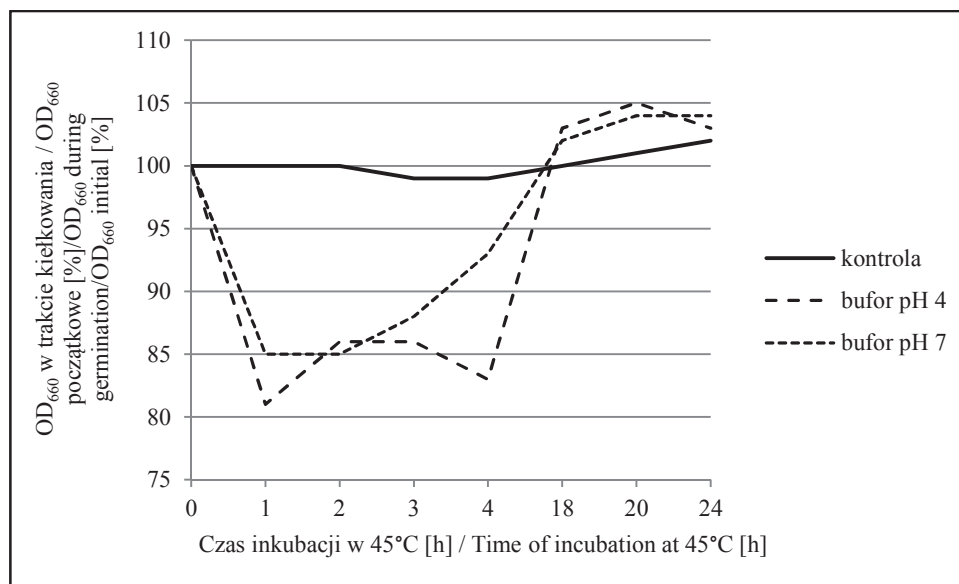
łania ciśnienia 60 MPa w temp. 50 °C. Natomiast podwyższenie temperatury do 75 °C spowodowało obniżenie wartości parametru OD₆₆₀ o 23 % ($p < 0,05$) po 1 h inkubacji, a następnie jego wzrost w czasie kolejnych 3 h inkubacji. Po dalszej inkubacji przez 18 h tych samych próbek soków w temp. 45 °C stwierdzono wzrost gęstości optycznej o ok. 10 % w temp. 50 °C i o 13 % w temp. 75 °C w porównaniu z próbką kontrolną. Przy zastosowaniu niższego ciśnienia – 10 MPa uzyskano mniej znaczące zmiany gęstości optycznej (rys. 5), jednak i w tym przypadku podwyższenie temperatury spowodowało zmniejszenie gęstości optycznej o ok. 15 %.

Zarówno wyniki uzyskane metodą płytkową (rys. 1), jak i metodą pomiaru gęstości optycznej (rys. 5), świadczą o tym, że kiełkowanie przetrwalników zależy od temperatury zastosowanego SCCD. Wyższa temperatura sprzyjała ich kiełkowaniu.



Rys. 5. Zmiany gęstości optycznej zawiesiny przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 w czasie inkubacji w temp. 45 °C w soku jabłkowym, po 40 min działania SCCD (w temp. 50 i 75 °C i o ciśnieniu 10 i 60 MPa)

Fig. 5. Changes in optical density of *A. acidoterrestis* TO-169/06 spore suspension during incubation at a temperature of 45 °C in apple juice, after 40 min SCCD treatment (at temperatures of 50 and 75 °C and at pressure of 60 MPa)

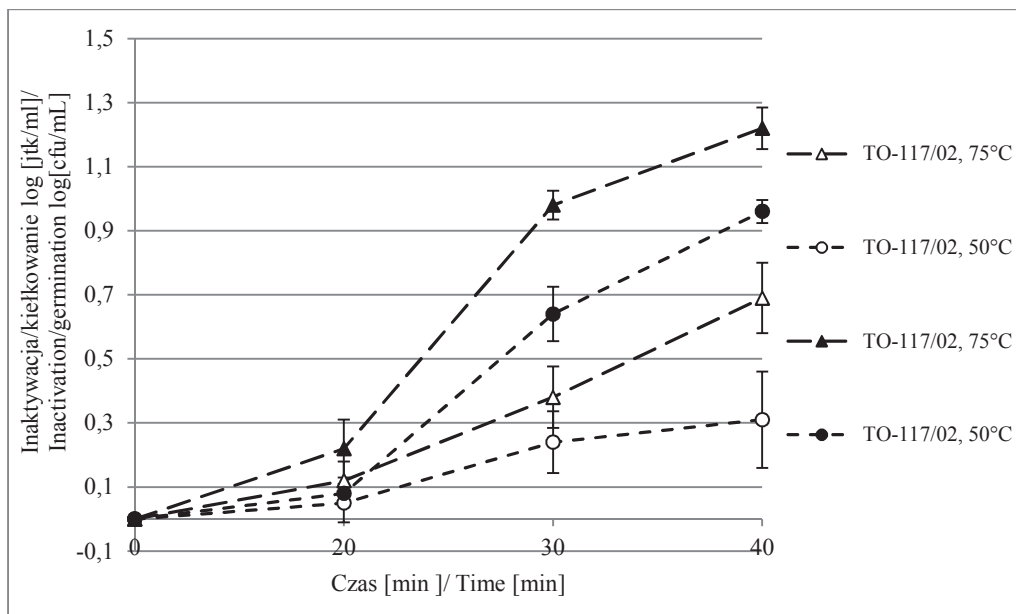


Rys. 6. Zmiany gęstości optycznej zawiesiny przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 w czasie inkubacji w temp. 45 °C po 40 min działania SCCD (w temp. 75 °C o ciśnieniu 60 MPa) w soku jabłkowym (próba kontrolna) i w roztworach buforowych

Fig. 6. Changes in optical density of *A. acidoterrestis* TO-169/06 spore suspension during incubation at a temperature of 45 °C after 40 min SCCD treatment (at temperatures of 75 °C and at pressure of 60 MPa) in apple juice (control sample) and in buffer solutions

Na rys. 6. przedstawiono zmiany gęstości optycznej zawiesiny przetrwalników *A. acidoterrestis* zawieszonych w soku jabłkowym oraz w buforach o pH 4,0 i 7,0, w czasie ich inkubacji po działaniu SCCD o ciśnieniu 60 MPa, w temp. 75 °C po 40 min procesu. Po 1 h inkubacji w buforze o pH 4,0 zaobserwowano zmniejszenie wartości OD_{660} o ok. 18 % ($p < 0,05$), natomiast w buforze o pH 7,0 – o 15 %. W soku jabłkowym obniżenie wartości parametru OD_{660} było największe i wynosiło 23 % (rys. 5). Po 18 h inkubacji w temp. 45 °C stwierdzono wzrost wartości OD_{660} , w soku – o 13 %, w buforze o pH 4,0 – o 5 %, natomiast w buforze o pH 7,0 – o 3 % w porównaniu z próbką kontrolną, którą stanowiła zawiesina przetrwalników nietraktowana SCCD (rys. 6). Zarówno wyniki uzyskane metodą płytkową (rys. 3), jak i metodą pomiaru gęstości optycznej (rys. 6) świadczą o tym, że kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestis* zależało od zastosowanego medium. Niższe wartości pH sprzyjały kiełkowaniu przetrwalników tej kwasolubnej bakterii, a zawartość składników odżywczych w soku jabłkowym prawdopodobnie dodatkowo pobudzała przetrwalniki do kiełkowania.

Podobne zależności stwierdzono w przypadku procesów kiełkowania i inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris*, zachodzących pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego [22, 28].



Rys. 7. Kiełkowanie i inaktywacja przetrwalników *A. acidoterrestris* TO-117/02 po działaniu SCCD o ciśnieniu 60 MPa w soku jabłkowym

Fig. 7. Germination and inactivation of *A. acidoterrestris* TO-117/02 spores treated with SCCD at 60 MPa pressure in apple juice

Na rys. 7. przedstawiono dynamikę procesu kiełkowania i inaktywacji przetrwalników drugiego badanego szczepu *A. acidoterrestris* TO-117/02. Stwierdzono, że rodzaj badanego szczepu *A. acidoterrestris* miał bardzo istotne znaczenie. Przetrwalniki szczepu TO-117/02 były bardziej odporne na działanie SCCD i pomimo zastosowanej wysokiej temperatury, zarówno 50 °C, jak i wyższej – 75 °C oraz ciśnienia 60 MPa, nie uzyskano istotnego kiełkowania i inaktywacji. Natomiast przetrwalniki szczepu TO-169/06 były podatne na działanie SCCD w tych samych warunkach ciśnienia, w temp. 75 °C. Osiągnięto kiełkowanie na poziomie 3,9 log i inaktywację na poziomie 3,4 log (rys. 1 i 2). Wyniki te wskazują na duże różnicowanie szczepów w obrębie gatunku *A. acidoterrestris* pod wpływem działania czynników zewnętrznych. Podobne rezultaty uzyskali Skąpska i wsp. [18] oraz Sokolowska i wsp. [19, 20, 22] w badaniu oporności szczepów *A. acidoterrestris*. Zjawisko różnicowania szczepów w obrębie gatunku *A. acidoterrestris* wykazali także Bevilacqua i wsp. [2]. Procesy te mogą być związane

z istnieniem szeregu regulacji ekspresji genów w procesie kiełkowania i sporulacji, których poziom aktywności może być odmienny w zależności od szczepu.

W zastosowanych w niniejszej pracy warunkach wykazano istotny wpływ alternatywnej metody utrwalania żywności SCCD na inaktywację przetrwalników *A. acidoterrestris*. Zaobserwowano również proces kiełkowania przetrwalników i przechodzenia w stan wegetatywny po zastosowaniu odpowiednich parametrów procesu.

Wnioski

1. Zastosowanie nadkrytycznego ditlenku węgla o odpowiednich parametrach inicjuje proces kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* oraz prowadzi do ich inaktywacji, co wskazuje na konieczność dalszego badania mechanizmów kiełkowania i uwzględnienia tej wiedzy w projektowaniu procesów technologicznych.
2. Zdolność przetrwalników do kiełkowania i inaktywacji pod wpływem SCCD była zróżnicowana w zależności od szczepu.
3. Wyniki uzyskane w pracy potwierdzają wcześniejsze dane na temat zróżnicowania oporności zastosowanych szczepów na działanie temperatury.
4. Pomiar gęstości optycznej umożliwia oszacowanie stopnia wykiełkowania przetrwalników i pozwala na zobrazowanie dynamiki tego procesu.
5. Wyższa temperatura sprzyja kiełkowaniu i inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris*.
6. Wraz ze wzrostem wartości pH zaobserwowano niewielkie zmniejszenie intensywności kiełkowania przetrwalników i znaczne zmniejszenie stopnia ich inaktywacji, natomiast niższe pH sprzyjało kiełkowaniu, a zawartość składników odżywczych w soku jabłkowym dodatkowo pobudzała przetrwalniki *A. acidoterrestris* do kiełkowania.

Literatura

- [1] Bae Y.Y., Lee H.J., Kim S.A., Rhee M.S.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **136**, 95-100.
- [2] Bevilacqua A., Cibelli F., Corbo M.R., Sinigaglia M.: Effects of high pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007, **45** (4), 382-386.
- [3] Casas J., Valverde M.T., Marin-Iniesta F., Calvo L.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO₂ in apple cream. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, **156** (1), 18-24.
- [4] Ferrentino G., Bruno M., Ferrari G., Poletto M., Balaban M.O.: Microbial inactivation and shelf life of apple juice treated with high pressure carbon dioxide. *J. Biol. Engineer.*, 2009, DOI: 10.1186/1754-1611-3-3.
- [5] Furukawa S., Watanabe T., Tai T., Hirata J., Narisawa N., Kawarai T., Ogihara H., Yamasaki M.: Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **91**, 209-213.

- [6] Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A.H., Spilimbergo S., Elst K., van Ginneken L., Debevere J., van Impe J.F., Devlieghere F.: High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **117**, 1-28.
- [7] Jung W.Y., Choi Y.M., Rhee M.S.: Potential use of supercritical carbon dioxide to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* in alfalfa sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **136**, 66-70.
- [8] Kato S., Masayama A., Yoshimura T., Hemmi H., Tsunoda H., Kihara T., Moriyama R.: Physiological role of carbon dioxide in spore germination of *Clostridium perfringens* S40. *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, **108** (6), 477-483.
- [9] Marszałek K., Mitek M.: Wpływ utrwalania mikrofalowego w przepływie na zmiany antocyjanów, witaminy C i barwy puree truskawkowego. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 2011, **566**, 135-142.
- [10] Nasiłowska J., Sokołowska B.: Zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego do utrwalania soków owocowych i warzywnych. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2014, **4**, 21-23.
- [11] Nguyen Thi Minh H., Dantigny P., Perrier-Cornet J.M., Gervais P.: Germination and inactivation of *Bacillus subtilis* spores induced by moderate hydrostatic pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, **107**, 876-883.
- [12] Oey I., Lille M., Van Loey A., Hendrickx M.: Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2008, **19**, 320-328.
- [13] Paidhungat M., Setlow B., Daniels W.B., Hoover D., Papafragkou E., Setlow P.: Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 3172-3175.
- [14] Pandey R., Beek A.T., Vischer N.O., Smelt J.P., Brul S., Manders E.M.: Live cell imaging of germination and outgrowth of individual *Bacillus subtilis* spores; the effect of heat stress quantitatively analyzed with SporeTracker. *PLoS One*, 2013, **8** (3), 1-10.
- [15] Porębska I., Niezgoda J., Rutkowska M., Sokołowska B.: Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na dynamikę kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. *Post. Nauki Technol. Przem. Rolno-Spoż.*, 2013, **63** (3), 5-18.
- [16] Porębska I., Rutkowska M., Sokołowska B.: Decrease in optical density as a results of germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under high hydrostatic pressure. *High Pressure Res.*, 2015, **35** (1), 89-97.
- [17] Sirsee U., Hsieh F., Huff H.E.: Microbial safety of supercritical carbon dioxide processes. *J. Food Process Pres.*, 1998, **22** (5), 387-403.
- [18] Skąpska S., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A.: Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **82** (3), 187-196.
- [19] Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Ciepłoporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2008, **12**, 22-27.
- [20] Sokołowska B., Niezgoda J., Chotkiewicz M.: Wpływ nizyny i lizozymu na wzrost szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* oraz możliwość zastosowania tych związków jako biokonserwantów w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, **83** (4), 44-54.
- [21] Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J.: Factors influencing the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores exposed to high hydrostatic pressure in apple juice. *High Pressure Res.*, 2013, **33** (1), 73-82.
- [22] Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Porębska I., Dekowska A., Rzoska S.J.: Germination and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores induced by moderate hydrostatic pressure. *Pol. J. Microbiol.*, 2015, **64** (4), 351-359.

- [23] Spilimbergo S., Komes D., Vojvodic A., Levaj B., Ferrentino G.: High pressure carbon dioxide pasteurization of fresh-cut carrot. *J. Supercrit. Fluid.*, 2013, **79**, 92-100.
- [24] Rawson A., Tiwari B.K., Brunton N., Brennan C., Cullen P.J., O'Donnell C.P.: Application of supercritical carbon dioxide to fruit and vegetables: Extraction, processing, and preservation. *Food Rev. J.*, 2012, **28** (3), 253-276.
- [25] Rendueles E., Omer M.K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Pietro M.: Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1251-1260.
- [26] Tajchakavit S., Ramaswamy H.S., Fustier P.: Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Res. Int.*, 1998, **31** (10), 713-722.
- [27] Terano H., Takahashi K., Sakakibara Y.: Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**, 1217-1220.
- [28] Vercammen A., Vivijis B., Lurquin I., Michiels C.W.: Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **136**, 95-100.
- [29] Watanabe T., Furukawa S., Hirata J., Koyama T., Ogihara H., Yamasaki M.: Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 7124-7129.

EFFECT OF SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE ON INACTIVATION AND GERMINATION OF *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* SPORES

Summary

The spores of thermophilic, acidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* are resistant to external factors and can develop in juices during storage. They produce compounds that smell like disinfectants, i.a., guaiacol, and lead to the spoilage of juices. The increasing of the degree of spore germination during the process of food preservation can contribute to their effective inactivation.

The objective of the research study was to characterise the course of the germination process and the inactivation degree of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores initiated by supercritical carbon dioxide (SCCD).

The spores suspended in apple juice and in buffers of pH 4.0 and pH 7.0 were treated with SCCD at a pressure of 10-60 MPa, at temperatures of 50 ÷ 75 °C, for 20 ÷ 40 min. After 40 min SCCD treatment at 60 MPa and at 75 °C, the count of spore germination in apple juice was 3.9 log, of which 3.4 log were inactivated. In the pH 4.0 buffer and under the same process conditions, a lower degree of germination (3.2 log) and inactivation (2.7log) was achieved. In the pH 7.0 buffer, the germination of 2.5 log was reported and the spore inactivation of 1.1 log. A significant correlation was found between the results of germination degree estimation that were obtained using a plate method and a method of measuring the decrease in optical density. The temperature of the SCCD applied turned out to be a factor to significantly impact the degree of germination and the inactivation of *A. acidoterrestris* spores. Along with the decrease in pH, a slight increase in the degree of spore germination was observed and a significant increase in the inactivation of the *A. acidoterrestris* spores treated with SCCD; the content of nutrients in apple juice further increased the degree of germination.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, apple juice, spores, germination, inactivation, supercritical carbon dioxide, optical density ☒