

## WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNEGO NA DYNAMIKĘ PROCESU KIEŁKOWANIA PRZETRWAJNIKÓW *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* W SOKU JABŁKOWYM

Izabela Porębska<sup>1</sup>, Jolanta Niezgoda<sup>1</sup>, Małgorzata Rutkowska<sup>2</sup>, Barbara Sokółowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego, Zakład Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

<sup>2</sup>Institut Wysokich Ciśnień PAN  
Laboratorium Biomateriałów  
ul. Sokołowska 29/37, 01-142 Warszawa  
porebska@ibprs.pl

### Streszczenie

*Alicyclobacillus acidoterrestris* jest gram-dodatnią, przetrwalnikującą, termoacidofilną bakterią, powodującą zepsucie soków owocowych, warzywnych i konserw owocowych. Przetrwalniki tych bakterii mają zdolność przeżywania w typowych warunkach stosowanych przy pasteryzacji, która dodatkowo je aktywuje do kiełkowania i wzrostu. W pracy podjęto próbę oceny dynamiki kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem zastosowania innowacyjnej metody do utrwalania żywności – wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.

Zbadano wpływ ciśnienia hydrostatycznego 200, 300, 400 i 500 MPa, w temperaturach 4, 20 i 50°C, w czasie 5, 10 i 15 min na dynamikę kiełkowania przetrwalników szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* w odtworzonym soku jabłkowym. Do oszacowania udziału skiełkowanych przetrwalników po procesie ciśnieniowania zastosowano metodę oznaczania wartości gęstości optycznej przy długości fali 660 nm ( $OD_{660}$ ).

Zastosowane w pracy parametry wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, a przede wszystkim czas i temperatura miały wpływ na dynamikę kiełkowania przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

**Słowa kluczowe:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, przetrwalniki, kiełkowanie, gęstość optyczna

## IMPACT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE DYNAMICS OF GERMINATION OF *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* SPORES IN APPLE JUICE

### Summary

*Alicyclobacillus acidoterrestris* is a gram-positive, sporeforming and thermoacidophilic, bacteria, causing spoilage of fruit juices, vegetables and canned fruit. The spores of these bacteria have the ability to survive in the typical conditions used for pasteurization, which also enables them to germinate and grow. The study attempts to assess the dynamics of germination of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* subjected to innovative methods of food preservation – high hydrostatic pressure treatment.

The effect of hydrostatic pressure 200, 300, 400 and 500 MPa at temperatures 4, 20 and 50°C for 5, 10 and 15 min on the dynamics germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in the reconstituted apple juice was studied. To estimate the share of germinated spores after the pressurization process, the method of determining the optical density at a wavelength of 660 nm ( $OD_{660}$ ) was used.

Hydrostatic pressure parameters used in this work, mainly time and temperature, affected the dynamics of germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in the reconstituted apple juice.

**Key words:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, high hydrostatic pressure, spore germination, optical density

### WSTĘP

Bakterie z rodzaju *Alicyclobacillus* są termofilne, kwasolubne i przetrwalnikujące, dlatego też stanowią bardzo istotny i wciąż aktualny problem, głównie w przetwórstwie owocowo-warzywnym. Ponadto badania wskazują, iż przetrwalniki bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus* mają zdolność przeżywania w typowych warunkach stosowanych przy pasteryzacji soków owocowych [Bahceci i Acar 2007; Baumgart i Menje 2000; Maldonado i in. 2008; Sokołowska i in. 2008]. Jedną z kluczowych negatywnych cech *Alicyclobacillus* jest wytwarzanie pewnych związków, m.in. 2-metoksyfenolu (gwajakol), 2,6-dibromofenolu i 2,6-dichlorofenolu, które są powodem niekorzystnych zmian organoleptycznych głównie soków i napojów, nadając im zapach tzw. dezynfekcyjny, dymny. Aktualnie znanych jest 20 gatunków bakterii z rodzaju *Alicyclobacillus*, jednakże badania wskazują, iż cztery: *A. acidoterrestris*, *A. herbarius*, *A. acidiacidophilus* oraz

niektóre szczepy z gatunku *A. hesperidum* mogą wytwarzać gwajakol [Groenewald i in. 2009; Niwa i Kawamoto 2003; Niwa 2005; Orr i in. 2000; Pettipher i in. 1997].

Standardowe procedury produkcyjne, nawet w połączeniu z dodatkowymi metodami dezynfekcji, często nie są wystarczające, aby otrzymać produkt wolny od przetrwalników. Ponadto głęboko uśpione przetrwalniki bakteryjne charakteryzują się wysoką odpornością na czynniki stresogenne w środowisku, w związku z czym bardzo trudno jest je zniszczyć w produktach spożywczych, nie wpływając negatywnie na ich jakość i walory odżywcze. Niestety nawet najbardziej popularne metody fizyczne, czyli chłodzenie, zamrażanie, pasteryzacja czy suszenie, a także stosowanie różnego rodzaju środków konserwujących, np. kwasu benzoowego używanego przy produkcji pulp i przecierów owocowych oraz kwasu siarkawego w moszczach owocowych oraz przy produkcji soków owocowych przeznaczonych na syropy, nie są skuteczne w inaktywacji przetrwalników. Dlatego też należy szukać nowych alternatywnych metod, takich jak np. stosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych [Paidhungat i in. 2002; Skąpska i in. 2012; Sokołowska i in. 2012]. Nowoczesne technologie utrwalania żywności bazują na koncepcji „minimalnego przetwarzania”. Badania wskazują, iż metoda wysokiego ciśnienia hydrostatycznego HPP (ang. *High Pressure Processing*) jest innowacyjna ze względu na minimalne przetwarzanie żywności. Pozwala to na uzyskanie wysokiej jakości zdrowotnej i trwałości produktów, a także zachowanie naturalnych walorów odżywczych i sensorycznych w porównaniu z produktami utrwalonymi metodami klasycznymi. Warunkiem jest jednak zastosowanie odpowiednich parametrów procesu.

Dane literaturowe wskazują, iż w etapie cyklu rozwojowego przetrwalników nazywanego kiełkowaniem znacząco zwiększa się ich wrażliwość na dezaktywację czynnikami fizycznymi lub chemicznymi, a aktywność metaboliczna utrzymuje się jeszcze na niezmienionym (niewykrywalnym) poziomie [Pontius i in. 1998; Setlow 2003]. W warunkach naturalnych czynnikiem pobudzającym powrót do formy wegetatywnej jest dostępność substancji odżywczych, np. L-alaniny [Terano i in. 2005], i biochemicznych – adenozy, tyrozyny [Ireland i Hanna 2002], ale może być on także inicjowany przez inne czynniki, m.in. zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych [Vercammen i in. 2011]. Zjawisko to stwarza możliwość niszczenia przetrwalników bakteryjnych w łagodniejszych warunkach i tym samym chroni produkt przed niekorzystnymi zmianami oraz umożliwia oszczędność energii [Sokołowska i in. 2013].

Celem pracy była ocena wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kiełkowanie przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w odtworzonym soku

jabłkowym (11,2°Brix, pH 3,4), a także obserwacja dynamiki tego procesu po zastosowaniu HHP z wykorzystaniem metody pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 660 nm ( $OD_{660}$ ).

### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem przetrwalników szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* wyizolowanego z zagęszczonego soku jabłkowego (szczep oznakowany TO-117/02), który charakteryzuje się największą opornością na HHP spośród 8 innych szczepów badanych w IBPRS [Skąpska i in. 2012]. Szczep *Alicyclobacillus* został wyizolowany według metody zalecanej przez Internationale Fruchtsaft Union [IFU Method]. Na podstawie zdolności do wytwarzania kwasu z erytritolu [Baumgart 2003; Baumgart i in. 2000], a także do produkowania gwajakolu w pożywce YSG z kwasem wanilinowym [Niwa 2005; Niwa i Kawamoto 2003; Niwa i Kuriyama 2003] szczep zakwalifikowano do gatunku *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

W celu uzyskania przetrwalników szczep inkubowano w temp. 45°C przez 10 dni na podłożu PDA (Oxoid) o pH 4,0. Biomasa bakterii zmywano z powierzchni agaru jałową wodą redestylowaną, a następnie wirowano przez 10 min przy 17 000 x g w temp. 4°C. Osad przemywano trzykrotnie jałową wodą redestylowaną. Przygotowaną zawiesinę przechowywano w temp. 5°C. Obecność przetrwalników w zawieszynie potwierdzano w preparatach mikroskopowych, barwionych metodą Schaeffera-Fultona w modyfikacji Wirtza. Liczbę przetrwalników oznaczano metodą płytkową na BAT-agarze (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45°C.

Po wprowadzeniu przetrwalników *A. acidoterrestris* do odtworzonego soku jabłkowego (11,2°Brix, pH 3,4) w ilości powyżej  $10^6$  jkt/ml, próbki doświadczalne poddawano działaniu ciśnienia hydrostatycznego oraz temperatury w Instytucie Wysokich Ciśnień PAN, w komorze wysokociśnieniowej U4000/65. Objętość komory jest równa 0,95 l, natomiast maksymalne ciśnienie, jakie można w niej uzyskać, to 600 MPa. Ponadto komora jest wyposażona w zewnętrzny płaszcz termostatujący, dzięki czemu można zastosować temperaturę w zakresie od -10°C do +80°C. Jako medium w procesie ciśnieniowania zastosowano mieszaninę wody z glikolem polipropylenowym (1:1).

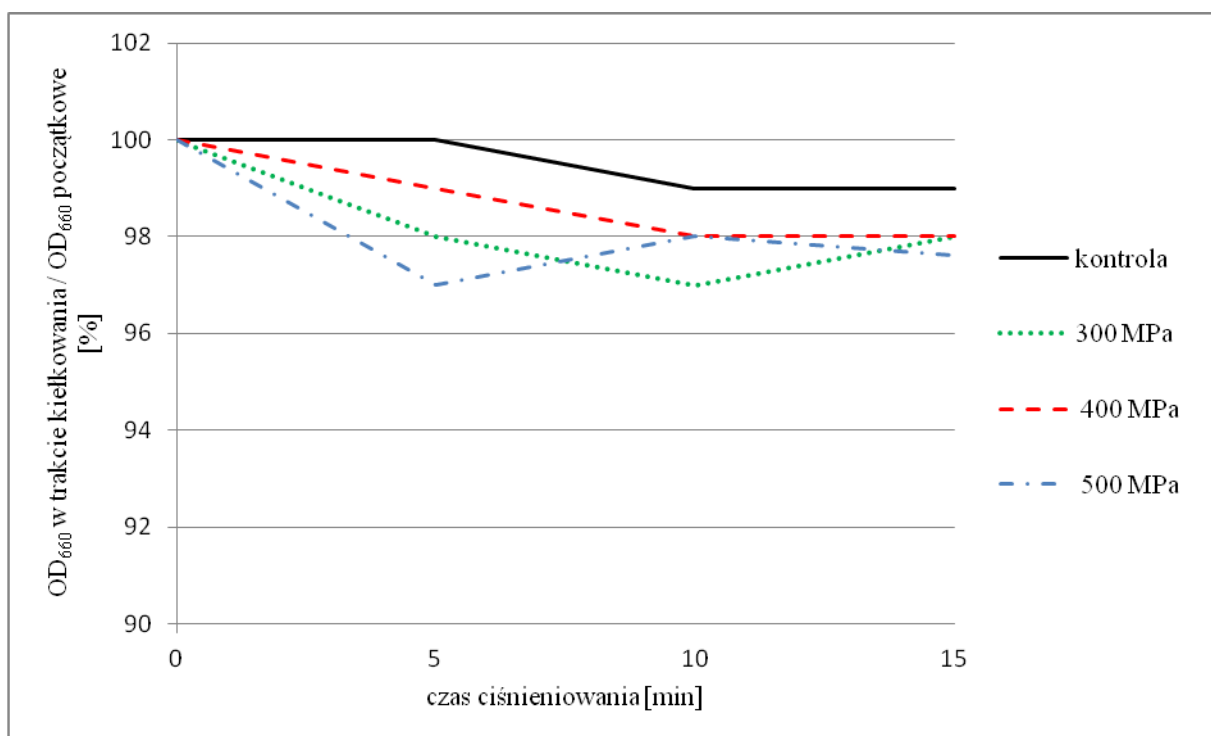
Próbki zawiesin w soku (ok. 13 ml każda próbka) utrwalono metodą HPP z zastosowaniem zróżnicowanych parametrów procesu kompresji (ciśnienie/czas/temperatura/medium), przy czym czas, w którym uzyskano wskazane ciśnienie, i czas dekompresji nie są wliczone w czasy ciśnieniowania. Ciśnienia 200, 300,

400, 500 MPa stosowano w sposób ciągły. Procesy przeprowadzono w czasie: 5, 10, 15 min w temperaturze: 4, 20, 50°C. Wszystkie doświadczenia powtórzono co najmniej dwa razy.

W próbkach oznaczano gęstość optyczną przy długości fali 660 nm ( $OD_{660}$ ). Oznaczenia gęstości optycznej wykonywano po procesie ciśnieniowania, w odstępie 1 h po HHP, po inkubacji w temperaturze pokojowej przez 4 godziny oraz po nocnej inkubacji tych samych próbek w 45°C (optymalna temperatura wzrostu). W pracy zastosowano specyficzną metodę pomiaru gęstości  $OD_{660}$  [Terano i in. 2005; Bevilacqua i in. 2014]. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano fakt, że w momencie, kiedy przetrwalniki zaczynają kiełkować, gęstość optyczna  $OD_{660}$  początkowo spada, a po jakimś czasie zaczyna wzrastać. Można więc wnioskować, że proces ten jest objawem rozpoczęcia się kolejnej fazy rozwoju przetrwalników, zwanej „out growth”. Dane literaturowe wskazują, iż współczynnik spadku gęstości optycznej, wyrażony jako  $(OD_{660} \text{ w trakcie kiełkowania} / OD_{660} \text{ początkowe}) \times 100$ , umożliwia oszacowanie dynamiki i udziału skiełkowanych przetrwalników.

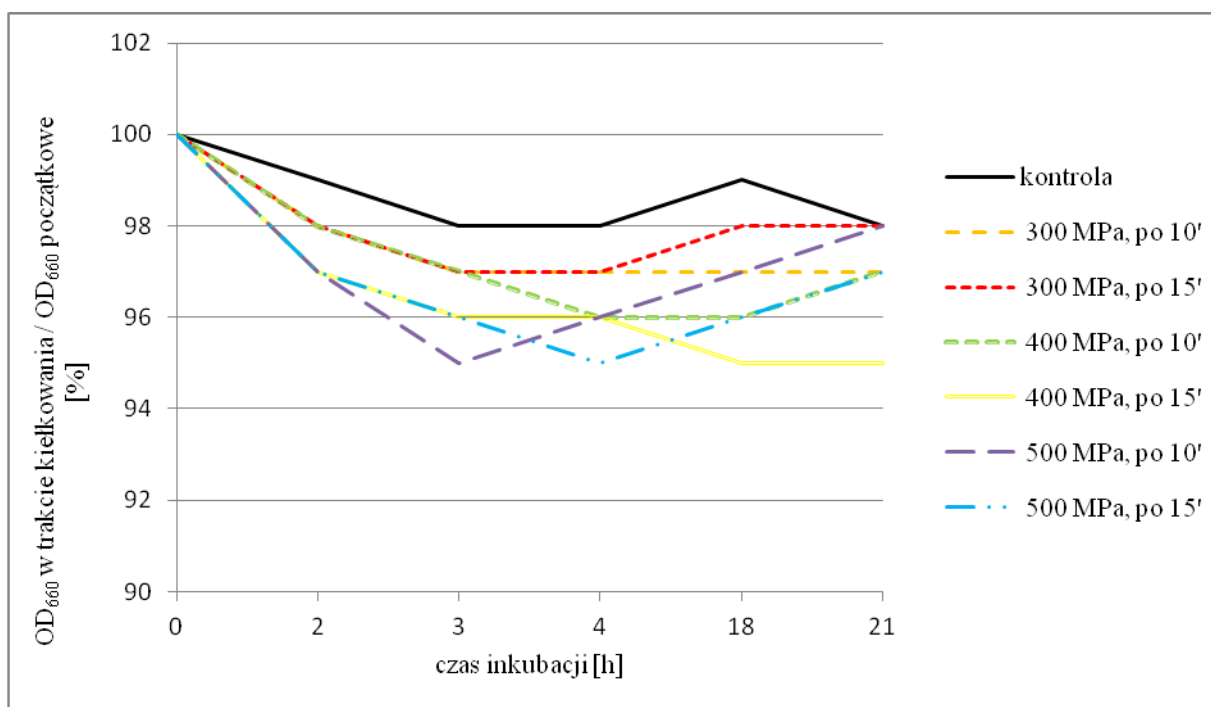
## **WYNIKI I DYSKUSJA**

Wpływ czasu ciśnieniowania na kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* przedstawiono na rysunkach 1, 3, 5. Natomiast na rysunkach 2, 4, 6 przedstawiono dynamikę kiełkowania przetrwalników inkubowanych w 45°C po działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.



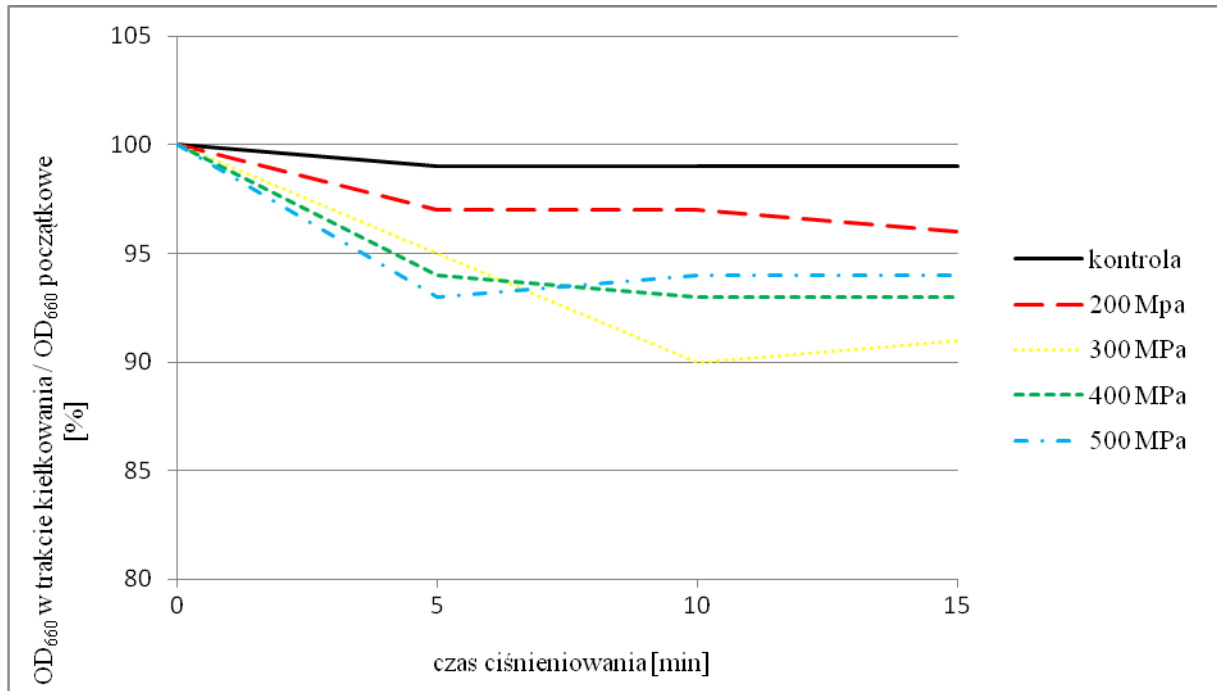
**Rysunek 1.** Wpływ czasu ciśnieniowania w temperaturze 4°C na kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym  
*Influence of time of pressurization at 4°C on germination of A. acidoterrestris spores in apple juice*

W temperaturze 4°C parametry użyte w doświadczeniu, tj. czas trwania procesu ciśnieniowania oraz wysokość zastosowanego ciśnienia, nie wpływały istotnie na kiełkowanie przetrwalników (rysunek 1). Dalsza inkubacja w 45°C również nie powodowała znaczącego ich kiełkowania w porównaniu z próbkami kontrolnymi, które nie były poddane procesowi ciśnieniowania (rysunek 2). Proces ciśnieniowania w temp 4°C w zakresie zastosowanych ciśnień nie inicjował procesu kiełkowania i dalszego wzrostu przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym.



**Rysunek 2.** Dynamika kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym po działaniu ciśnienia hydrostatycznego w temperaturze 4°C  
*The dynamics of germination of A. acidoterrestris spores in apple juice after pressurization at 4°C*

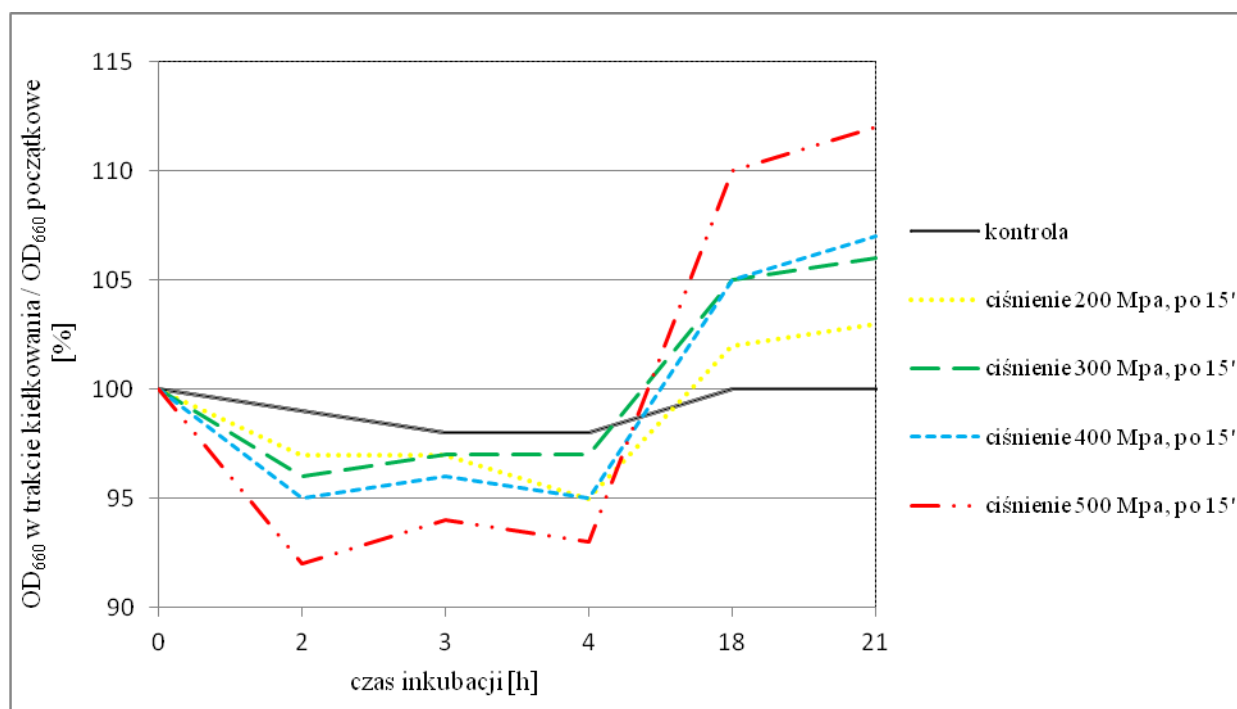
Proces ciśnieniowania w temperaturze 20°C powodował istotne zmiany gęstości optycznej badanych próbek. Już po czasie ciśnieniowania wynoszącym 5 min obserwowano spadek gęstości optycznej w porównaniu z próbką kontrolną. Przedłużenie czasu ciśnieniowania do 15 min nie spowodowało dalszych istotnych różnic w wartości tego parametru. Ponadto zastosowanie ciśnienia o wartości 300 MPa w tej temperaturze pozwoliło na zaobserwowanie zmian i spadku OD<sub>660</sub> o 10% po 10 min ciśnieniowania (rysunek 3).



**Rysunek 3.** Wpływ czasu ciśnieniowania w temperaturze 20°C na kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym  
*Influence of time of pressurization at 20°C on germination of A. acidoterrestris spores in apple juice*

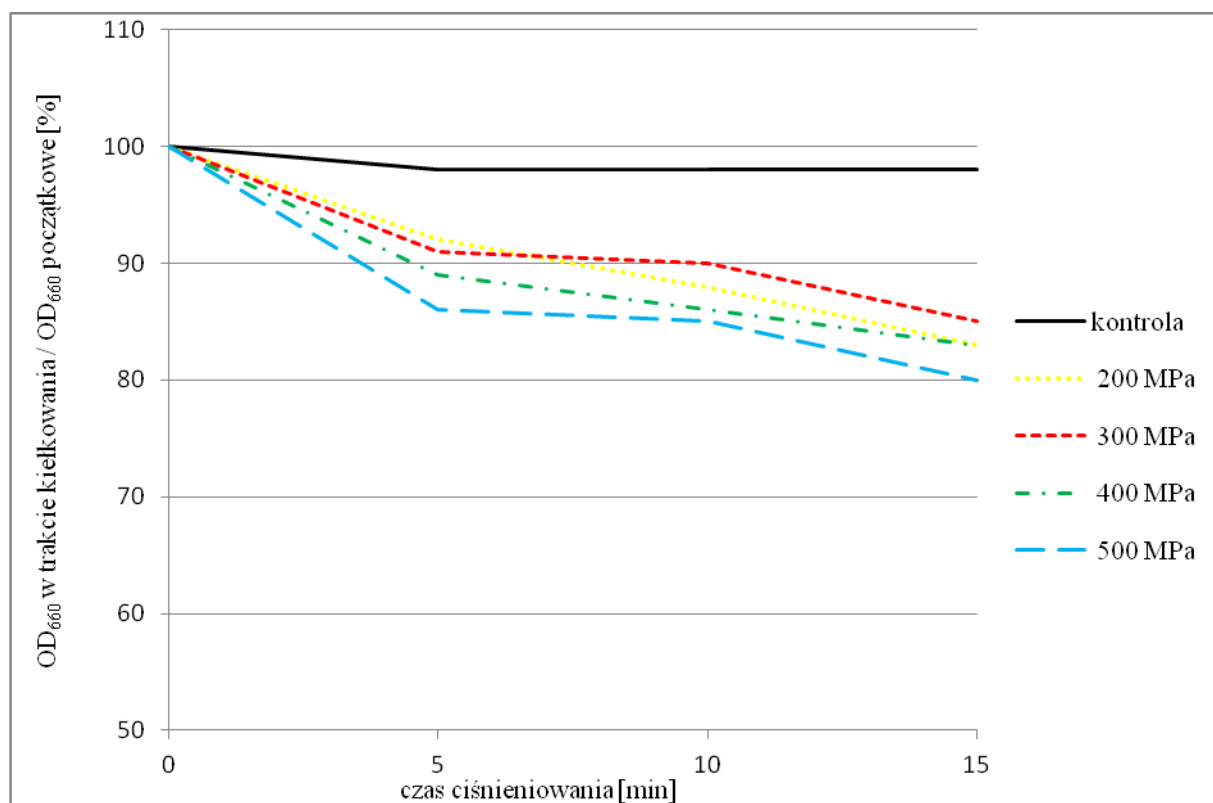
W czasie inkubacji przetrwalników po procesach ciśnieniowania w 20°C (rysunek 4) początkowo zaobserwowano istotny spadek gęstości optycznej, a od 2 godziny inkubacji jej wzrost, co może świadczyć o rozpoczęciu się kolejnej fazy rozwoju przetrwalników. Inkubacja w 45°C powodowała dalszy wzrost skielkowanych przetrwalników. Po całonocnej inkubacji w 45°C wszystkie próbki wykazywały większą gęstość optyczną niż próbka kontrolna. Zastosowanie ciśnienia hydrostatycznego w zakresie 200–500 MPa w temp. 20°C zainicjowało proces kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym.





**Rysunek 4.** Dynamika kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym po działaniu ciśnienia hydrostatycznego w temperaturze 20°C  
*The dynamics of germination of A. acidoterrestris spores in apple juice after pressurization at 20°C*

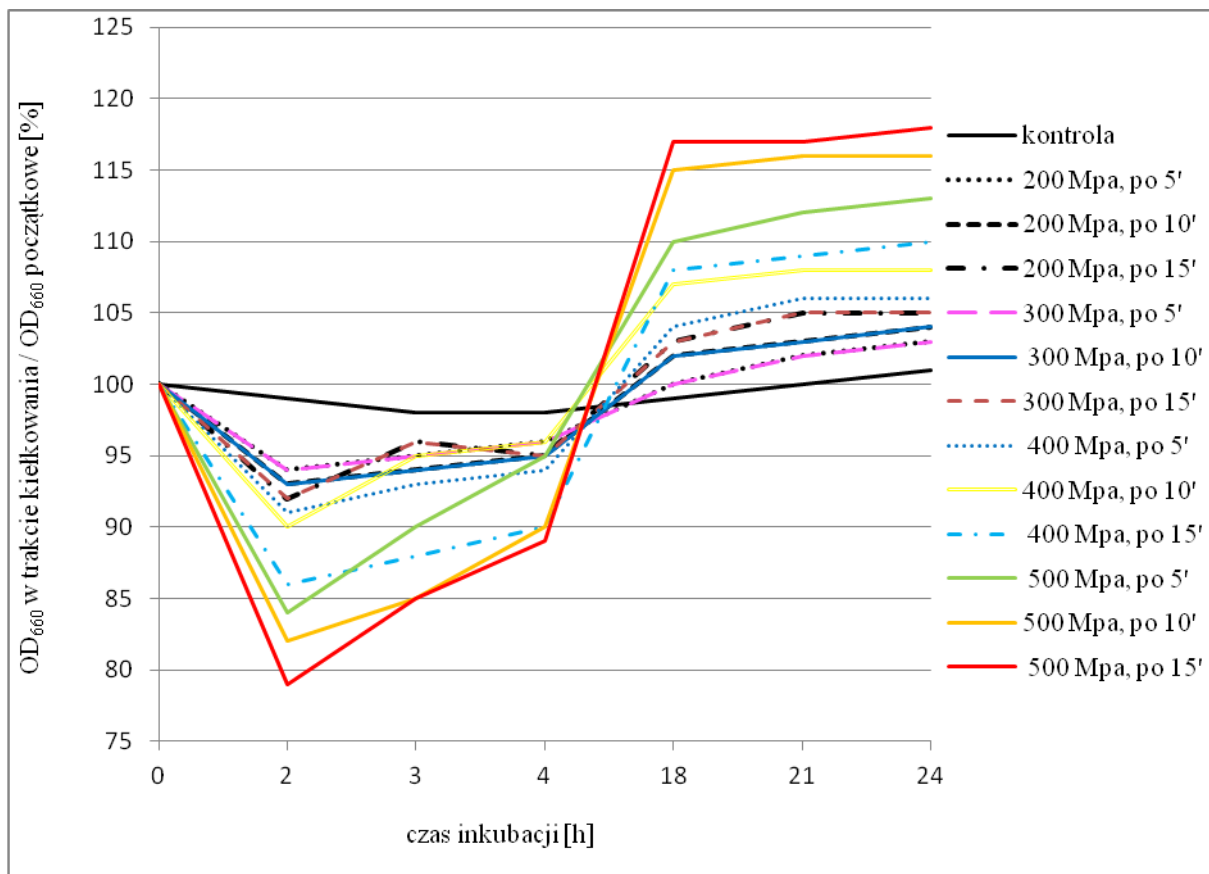
Dane literaturowe wskazują, iż proces inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym zachodzi pod wpływem połączenia działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i temperatury [Lee i in. 2002; Vercammen i in. 2011]. W naszym doświadczeniu podwyższenie temperatury ciśnieniowania do 50°C stworzyło warunki do inicjowania procesu kiełkowania przetrwalników już po 5 min działania ciśnienia, natomiast bardziej istotne różnice, nawet do 20% spadku gęstości optycznej, były obserwowane po czasie ciśnieniowania wynoszącym 15 minut (rysunek 5).



**Rysunek 5.** Wpływ czasu ciśnieniowania w temperaturze 50°C na kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestis* w soku jabłkowym  
*Influence of time of pressurization at 50°C on germination of *A. acidoterrestis* spores in apple juice.*

Istotne zmiany gęstości optycznej stwierdzono w trakcie inkubacji przetrwalników poddanych procesom ciśnieniowania w temp 50°C (rysunek 6).

Obserwowano spadek gęstości optycznej nawet o 21% po 2 godzinach po zastosowaniu ciśnienia 500 MPa przez 15 min, a następnie jej wzrost, co świadczy o następowaniu kolejnej fazy rozwoju przetrwalników, tzw. „out growth”. Dalsza inkubacja w 45°C powodowała zwiększenie liczebności skielkowanych przetrwalników. Po 18 godzinach inkubacji próbek soków poddanych działaniu ciśnienia 500 MPa przez 15 min stwierdzono wzrost gęstości optycznej nawet o ok. 17% w porównaniu z próbką kontrolną, która zachowywała stałą poziom wartości OD<sub>660</sub> w czasie 24-godzinnej inkubacji.



**Rysunek 6.** Dynamika kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym po działaniu ciśnienia hydrostatycznego w temperaturze 50°C  
*The dynamics of germination of A. acidoterrestris spores in apple juice after pressurization at 50°C*

Otrzymane wyniki wskazują na potrzebę uwzględnienia przy projektowaniu procesów technologicznych zaistniałego procesu kiełkowania przetrwalników w odpowiednich warunkach i przejścia ich w stan wegetatywny, w którym są one bardziej podatne na działanie czynników takich jak ciśnienie, temperatura czy dodatek konserwantów. Znacznie bardziej efektywny proces inaktywacji przetrwalników uzyskuje się w czasie prowadzenia złożonego, tzw. pulsacyjnego procesu ciśnieniowania w celu pobudzenia kiełkowania przetrwalników, a następnie ich inaktywacji.

## WNIOSKI

1. Pomiar gęstości optycznej jest szybką i skuteczną metodą do oszacowania stopnia skielkowania przetrwalników i obrazowania dynamiki tego procesu.
2. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego o odpowiednich parametrach, połączonego z działaniem temperatury, inicjuje proces kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* i ich dalszy rozwój w soku jabłkowym, co może mieć ogromne znaczenie dla jakości mikrobiologicznej soków.
3. Stopień wykiełkowania przetrwalników badanego szczepu *A. acidoterrestris* po zastosowaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego był zależny od parametrów ciśnienia, temperatury oraz czasu tego procesu.
4. Znaczne różnice w wartości parametru gęstości optycznej były obserwowane po zastosowaniu wyższych ciśnień: 400 MPa oraz 500 MPa oraz w wyższej temperaturze: 50°C.
5. Zaobserwowano istotne zmiany w dynamice kiełkowania przetrwalników *A. acidoterrestris* po dłuższej inkubacji w temp. 45°C, optymalnej do wzrostu szczepu.
6. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono spadek gęstości optycznej po procesie ciśnieniowania, a następnie wzrost tego parametru po inkubacji w temp. 45°C. Świadczy to o rozpoczęciu kolejnej fazy wzrostu „out growth” przetrwalników badanego szczepu i może mieć związek z istnieniem szeregu mechanizmów regulujących kiełkowanie przetrwalników.

## PIŚMIENICTWO

1. Bahçeci K.S., Acar J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Int. J. Food Microbiol., 120(3), 266-273
2. Baumgart J. (2003). Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. W: Handbook of Culture Media for Food Microbiology. Progress in industrial microbiology, vol. 37. J.E.L. Corry, G.D.W Curtis, R.M. Baird, red. Amsterdam: Elsevier, 161-166
3. Baumgart J., Menje S. (2000). The impact of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on the quality of juices and soft drinks. Fruit Process., 10(7), 251-254
4. Bevilacqua A., Ciuffreda E., Sinigaglia, Corbo M.R. (2014). Effects of lysozyme on *Alicyclobacillus acidoterrestris* under laboratory conditions. Int. J. Food Sci. Tech., 49,

224-229

5. Groenewald W.H., Gouws P.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 Microbiol.*, 26, 71-76
6. IFU Method No 12, September 2004/revised march 2007. Method on the detection of taint produc-ing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices.
7. Irelnad J.A.W., Hanna P.C. (2002). Amino Acid- and Purine Ribonucleoside-Induced Germination of *Bacillus anthracis* - Sterne Endospores: *gerS* Mediates Responses to Aromatic Ring Structures. *J. Bacteriol.*, 184, 1296-1303
8. Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang D.H. (2002). Inhibitory effect of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4158-4161
9. Maldonado M.C., Belifiore C., Navarro A.R. (2008). Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 141-144
10. Niwa M. (2005). Control of hazardous bacteria in acidic beverages by using a guaiacol detection kit (peroxidase method). *Fruit Process.*, 15(6), 388-392
11. 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
12. Niwa M., Kuriyama A. (2003). *A. acidoterrestris* rapid detection kit. *Fruit Process.*, 13(5), 328-331
13. 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
14. Paidhungat M., Setlow B., Daniels W. B., Hoover D., Papafragkou E., Setlow P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3172-3175
15. 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
16. Pontius A.J., Rushing J.E., Foegeding P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus*

- acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. J. Food Protect., 1, 41-46
17. Setlow P. (2003). Spore germination. Curr Opin Biotechnol., 6, 550-556
  18. Skąpska S., Sokołowska B., Dekowska A., Chotkiewicz M., Fonberg-Broczek M. (2012). Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. Żywność Nauka Technol. Jakość, 3(82), 187-196
  19. Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2008). Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 12, 22-27
  20. Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S. (2012). The combined effect of high pressure and nisin or lysosyme on the inactivation *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. High Pressure Res., 32, 119-27
  21. Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A., Rzoska S.J. (2013). Factors influencing the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores exposed to high hydrostatic pressure in apple juice. High Pressure Research, 33, 73-82
  22. Terano H., Takahashi K., Sakakibara Y. (2005). Characterization of spore germination of a thermoacidophilic spore-forming bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69, 1217-1220
  23. Vercammen A., Vивиjs B., Lurquin I., Michiels C.W. (2011). Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. Int. J. Food Microbiol., 136, 95-100