

**WPŁYW LIZOZYMU I NIZYNY NA PRZEŻYWALNOŚĆ  
PRZETRWAŁNIKÓW *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS*  
PODDANYCH DZIAŁANIU WYSOKIEGO CIŚNIENIA  
HYDROSTATYCZNEGO I TEMPERATURY**

**Barbara Sokołowska<sup>1</sup>, Sylwia Skąpska<sup>1</sup>, Jolanta Niezgoda<sup>1</sup>, Agnieszka Dekowska<sup>1</sup>,  
Monika Fonberg-Broczek<sup>2</sup>**

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

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

**Streszczenie**

Acidotermofilne bakterie przetrwalnikujące (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) są przyczyną psucia soków owocowych i warzywnych. Przetrwalniki *A. acidoterrestris* wykazują wysoką oporność na działanie czynników fizycznych i chemicznych.

Celem pracy była ocena wpływu lizozymu i nizyny na przeżywalność przetrwalników *A. acidoterrestris* poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i temperatury.

Scharakteryzowano wpływ ciśnienia 200 MPa i 300 MPa w temperaturze 50°C na przeżywalność przetrwalników dwóch szczepów *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym oraz w soku jabłkowym z dodatkiem lizozymu lub nizyny. Dodatek lizozymu w stężeniu 0,05 i 0,1 mg/ml przy ciśnieniu 300 MPa nie wpływał na przeżywalność przetrwalników obu szczepów. Jednakże dodatek tej substancji w stężeniu 0,05 mg/ml soku ciśnieniowanego w 200 MPa spowodował dodatkową inaktywację przetrwalników o ok. 1 log po 10 min procesu.

Dodatek nizyny w stężeniach 500, 750 i 1000 IU/ml spowodował zwiększoną redukcję przetrwalników szczepu TO-29/4/02 o ok. 1 log podczas całego procesu prowadzonego w ciśnieniu 300 MPa przez 30 min, natomiast w przypadku szczepu TO-117/02 dodatkową redukcję stwierdzono tylko w początkowym etapie ciśnieniowania.

W procesie ciśnieniowania prowadzonym w 200 MPa w soku jabłkowym z dodatkiem 250 IU nizyny/ml obserwowano wyraźny wpływ bakteriocyny na stopień inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris*. Już po 10 min ciśnieniowania dodatkowa redukcja

wynosiła około 1,3 log, a po 45 min dodatkowe zwiększenie redukcji wynosiło 1,9–2,3 log w zależności od szczepu.

**Słowa kluczowe:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, nizyna, lizozym, sok jabłkowy

## **EFFECT OF LYSOZYME OR NISIN ON SURVIVAL OF *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* SPORES TREATED WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND TEMPERATURE**

### **Summary**

*Alicyclobacillus acidoterrestris*, thermoacidophilic and spore-forming bacteria, can cause spoilage of fruit and vegetable juices. *A. acidoterrestris* spores show high resistance to physical and chemical treatments.

The aim of the study was to evaluate the effect of lysozyme or nisin on survival of *A. acidoterrestris* spores treated with high hydrostatic pressure and temperature.

The effects of pressure of 200 MPa and 300 MPa at 50°C on the survival of spores of two *A. acidoterrestris* strains in apple juice or in apple juice with lysozyme or nisin addition have been characterized. The addition of lysozyme at concentration of 0.05 and 0.1 mg/ml did not affect the survival of the spores of both strains, when 300 MPa was used. However, the addition of this compound at concentration 0.05 mg/ml of juice resulted in additional spores inactivation of approx. 1 log after 10 min pressurization at 200 MPa.

The addition of nisin at concentrations of 500, 750 and 1000 IU/ml resulted in increase in the reduction of TO-29/04/02 strain spores, of approx. 1 log, during the whole process carried out at 300 MPa for 30 min, but for spores of TO-117/02 strain the additional reduction was observed only at the initial stage of pressurization.

In apple juice supplemented with 250 IU of nisin/ml pressurized at 200 MPa the pronounced effect on inactivation of *A. acidoterrestris* spores, due to the bacteriocin addition was noted. Already after 10 min pressurization additional reduction of about 1.3 log was achieved, and after 45 min the additional reduction was 1.9–2.3 log, depending on the strain.

**Key words:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, high hydrostatic pressure, nisin, lysozyme, apple juice

## WPROWADZENIE

Naturalnymi substancjami konserwującymi, akceptowanymi przez konsumentów, są związki przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez bakterie – bakteriocynty. Do najlepiej poznanych i najszerzej badanych bakteriocyn należą te, które syntetyzowane są przez bakterie fermentacji mlekowej, w tym nizyna wytwarzana przez niektóre szczepy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Amerykańska agencja FDA (Food and Drug Administration) w 1988 roku nadała nizinie status substancji GRAS (*generaly recognized as safe*), stąd duże zainteresowanie tym związkiem jako biokonserwantem. Nizyna wykazuje stabilność w wysokich temperaturach (pasteryzacja i sterylizacja) przy niskim pH.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nizyny obejmuje szeroki zakres bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Brochotrix*, *Enterococcus*, *Listeria* i *Mycobacterium*, jak również przetrwalniki i komórki wegetatywne *Clostridium*, *Bacillus* i *Alicyclobacillus*. Wykazuje również aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym *Escherichia coli* i *Salmonella* [Gwiazdowska, Trojanowska 2005; Thomas i in. 2005; Walczak 1998]. Aktywność przeciwbakteryjna nizyny jest głównie efektem tworzenia porów w błonie komórkowej, ponadto hamuje ona biosyntezę składników ściany komórkowej oraz rozwój przetrwalników, wpływa także na aktywność enzymów autolitycznych. Doniesienia literaturowe potwierdzają również skuteczność nizyny w ograniczaniu wzrostu *Alicyclobacillus acidoterrestris* w sokach owocowych [Yamazaki i in. 2000] oraz wskazują na możliwość obniżania w jej obecności ciepłooporności przetrwalników tego gatunku [Komitopoulou i in. 1999; Peña i in. 2009; Yamazaki i in. 2000].

Inną substancją naturalną o działaniu konserwującym jest lizozym (muramidaza, EC 3.2.1.17). Jest to enzym hydrolityczny, rozkładający peptydoglikany ściany komórkowej bakterii. Hydrolizuje wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozoaminą. Lizozym wykazuje działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii Gram-dodatnich [Gao i in. 2002]. Bakterie Gram-ujemne są bardziej odporne na jego działanie. FDA w 1998 roku nadała lizozymowi status substancji GRAS.

Zanieczyszczenie soków bakteriami z rodzaju *Alicyclobacillus* spp. jest w ostatnich latach jednym z ważniejszych problemów w branży sokowniczej [Sokołowska 2014]. Niekorzystne zmiany sensoryczne soków, nektarów i napojów spowodowane wytwarzanymi przez te bakterie metabolitami, nadającymi tym produktom zapach określany jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny [Baumgart i in. 1997; Gocmen i in. 2005; Jensen i Withfield 2003; Orr

i in. 2000; Pettipher i in. 1997], są przyczyną wycofywania z rynku gotowych produktów, a tym samym znacznych strat ekonomicznych. Z uwagi na nieskuteczność procesu pasteryzacji w ograniczaniu wzrostu bakterii *Alicyclobacillus* spp. podejmowane są badania nad nowymi metodami ich inaktywacji. Jednym z kierunków badań jest zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Jednak, jak do tej pory, akceptowalna w procesie produkcyjnym inaktywacja była możliwa przy użyciu wysokiego ciśnienia > 400 MPa i temperatury > 90°C [Lee i in. 2002; Lee i in. 2006; Vercammen i in. 2012; Sokołowska i in. 2013], co może mieć niekorzystny wpływ na cechy sensoryczne i wartość żywieniową soków. Stąd poszukiwane są metody skojarzone, umożliwiające skuteczną inaktywację przetrwalników przy łagodniejszych warunkach procesu.

Synergistyczny efekt działania ciśnienia hydrostatycznego i nizyny [Capellas i in. 2000; Gao i Yu 2008; Masschalack i in. 2001; Qi i in. 2010] lub lizozymu prezentowano w wielu doniesieniach literaturowych [Kalchayanand i in. 1998; Malinowska-Pańczyk, Kołodziejska 2009; Masschalack i in. 2000; Yuste i in. 2000]. Potwierdzono skuteczność takich złożonych procesów dla szczepów *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* i przetrwalników *Clostridium botulinum*. Ten synergistyczny efekt jest spowodowany prawdopodobnie przez subletalne uszkodzenia komórek zachodzące pod wpływem wysokiego ciśnienia. Uszkodzone komórki stają się bardziej wrażliwe na działanie lizozymu lub nizyny [Kalchayanand i in. 1998]. Wysokie ciśnienia, powodując permeabilizację zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, umożliwiają, wchłanianie lizozymu lub nizyny [Masschalack i in. 2000; Masschalack i in. 2001].

We wcześniejszych badaniach [Sokołowska i in. 2012] wyznaczono minimalne stężenie hamujące MIC (Minimal Inhibitory Concentration) nizyny oraz lizozymu w pożywce hodowlanej dla szczepów *A. acidoterrestris*. MIC nizyny w odniesieniu do przetrwalników wynosiło od 100 IU/ml do 1500 IU/ml pożywki, a dla form wegetatywnych od 50 IU/ml do 1250 IU/ml pożywki, w zależności od szczepu. Lizozym hamował kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* przy stężeniach od 0,005 mg/ml do 0,2 mg/ml pożywki, natomiast rozwój komórek wegetatywnych został zahamowany przy stężeniach od 0,05 mg/ml do 0,2 mg/ml pożywki.

Celem pracy była ocena wpływu lizozymu i nizyny na przeżywalność przetrwalników *A. acidoterrestris* poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego i temperatury.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono z zastosowaniem przetrwalników dwóch szczepów *A. acidoterrestris* wyizolowanych w IBPRS w 2002 r., były to szczepy: TO-29/4/02 i TO-117/02 pochodzące z próbek zagęszczonego soku jabłkowego. Wybrane szczepy charakteryzowały się wysoką opornością na działanie temperatury, kwasów organicznych, konserwantów i ciśnienia hydrostatycznego [Sokołowska i in. 2008; Sokołowska i in. 2009; Sokołowska i in. 2010; Skąpska i in. 2012].

W celu uzyskania przetrwalników szczepy 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.

Do badań zastosowano nizinę z *Lactococcus lactis* – producent: SIGMA-ALDRICH; o aktywności 1,0 x 10<sup>6</sup> IU/g. Roztwór podstawowy o aktywności 5,0 x 10<sup>4</sup> IU/ml przygotowano w 0,02 M HCl. Następnie roztwór ten wirowano przez 15 min z prędkością 3000 obr./min; supernatant wyjaławiano metodą filtracji membranowej (Millipore 0,2 µm) [Komitopoulou i in. 1999] i przechowywano w temp. 2–8°C.

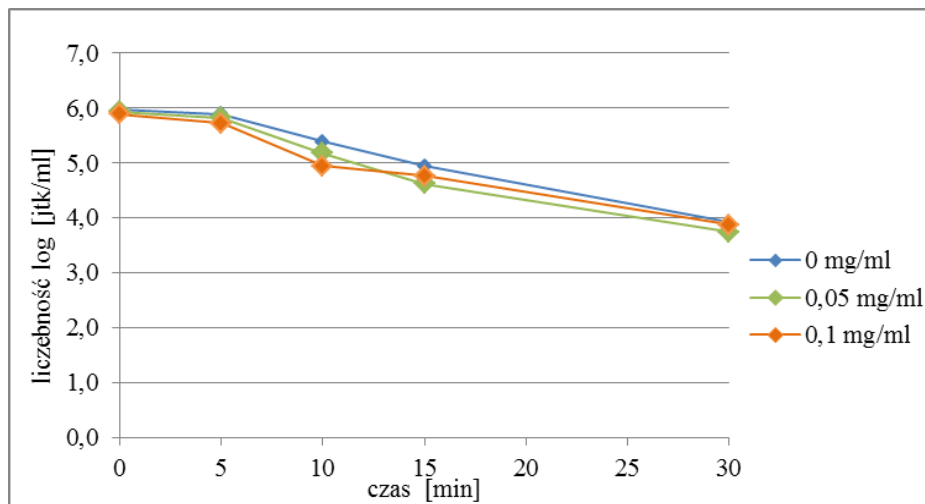
Lizozym krystaliczny (z białka jaja kurzego) EC 3.2.1.17, o aktywności 50 000 U/mg, zakupiono w firmie Merck (nr kat. 1.05281). Roztwór podstawowy o stężeniu 50 mg/ml sporządzono w jałowej wodzie destylowanej.

Przetrwalniki *A. acidoterrestris* w liczbie powyżej 10<sup>6</sup> jtk/ml wprowadzono do próbek handlowego soku jabłkowego (pH 3,4, ekstrakt 11,2°Bx) lub soku jabłkowego z dodatkiem nizyny lub lizozymu i rozlewano po ok. 13 ml do polietylenowych probówek (Sarstedt). Próbkę poddawano skojarzonemu działaniu ciśnienia hydrostatycznego 200 lub 300 MPa oraz temperatury 50°C w komorze wysokociśnieniowej typu tłok-cylinder o objętości roboczej 1,5 litra, wyposażonej w mierniki ciśnienia i temperatury (w Instytucie Wysokich Ciśnień PAN w Warszawie). Ciśnienie w komorze jest wytwarzane przy użyciu prasy hydraulicznej o nacisku 1000 ton. Komora jest wyposażona w zewnętrzny płaszcz termostatujący, pozwalający na stosowanie temperatury 0–50°C. Jako medium przenoszące ciśnienie zastosowano mieszaninę wody z glikolem polipropylenowym (1:1). Wszystkie doświadczenia wykonano co najmniej w dwóch powtórzeniach. Liczbę przetrwalników przeżywających

proces ciśnieniowania i zdolnych do wzrostu oznaczano metodą płytkową na BAT-agarze (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45°C.

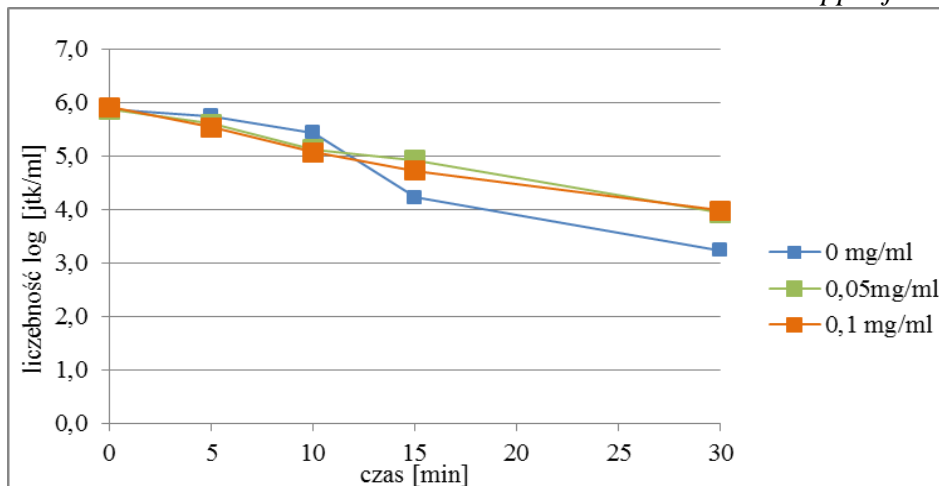
## WYNIKI I DYSKUSJA

Dodatek lizozymu do soku jabłkowego w stężeniu 0,05 i 0,1 mg/ml nie wpływał na przeżywalność przetrwalników obu badanych szczepów w trakcie 30-minutowego procesu ciśnieniowania w 300 MPa, w temp. 50°C (rysunek 1 i 2). Maksymalna inaktywacja przetrwalników, uzyskana po 30 min procesu, wynosiła 1,9–2,5 log.



**Rysunek 1.** Wpływ dodatku lizozymu na inaktywację przetrwalników szczepu TO-29/4/02 poddanych działaniu ciśnienia 300 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym

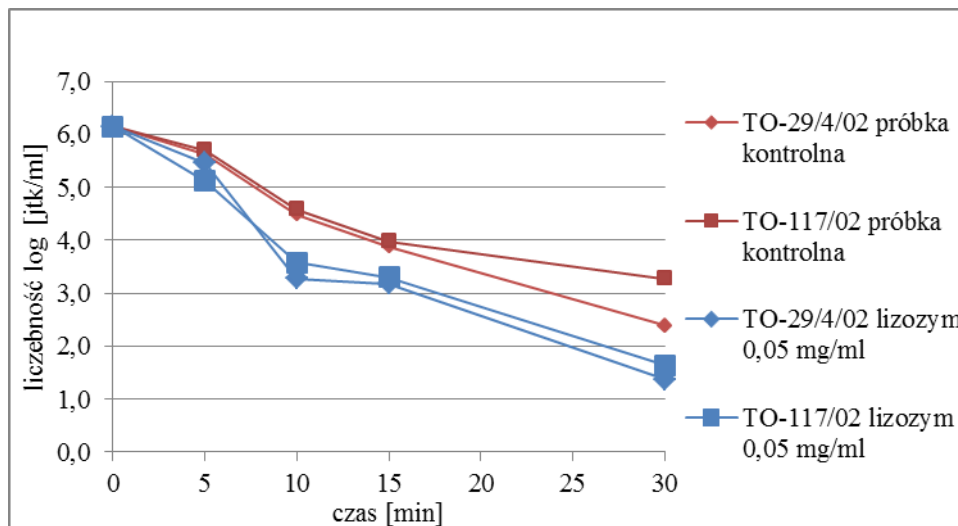
*Impact of the addition of lysozyme on inactivation of spores of TO-29/4/02 strain treated with 300 MPa at 50°C in apple juice*



**Rysunek 2.** Wpływ dodatku lizozymu na inaktywację przetrwalników szczepu TO-117/02 poddanych działaniu ciśnienia 300 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym

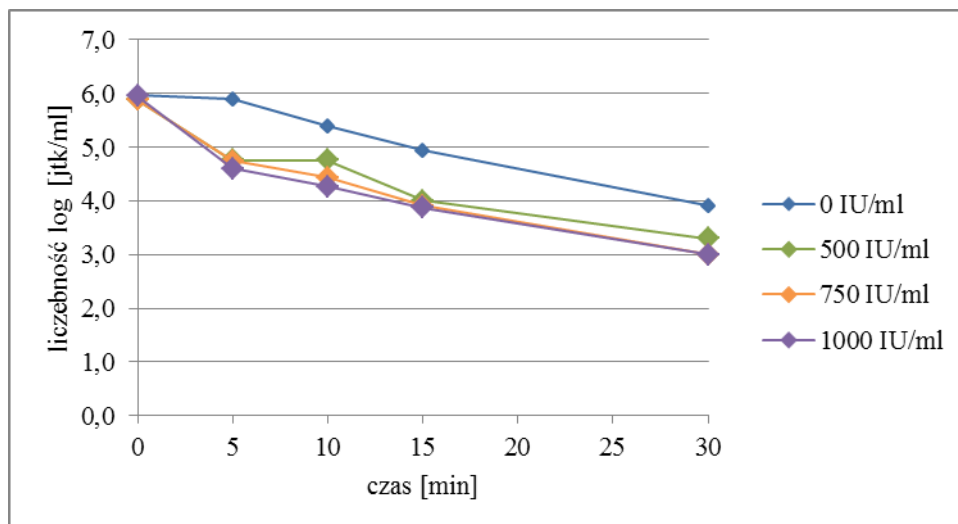
*Impact of the addition of lysozyme on inactivation of spores of TO-117/02 strain treated with 300 MPa at 50°C in apple juice*

Ciśnienie 200 MPa połączone z działaniem temperatury 50°C (rysunek 3) powodowało większą inaktywację przetrwalników dwóch badanych szczepów *A. acidoterrestris* niż ciśnienie 300 MPa. Po 30 min działania ciśnienia inaktywacja wynosiła, w zależności od szczepu, 2,8 log (szczep TO-117/02) i 3,5 log (szczep TO-29/4/02). Ponadto w tych samych warunkach stwierdzono zwiększoną redukcję przetrwalników *A. acidoterrestris* w próbkach soku z dodatkiem 0,05 mg/ml lizozymu w porównaniu z próbkami kontrolnymi (rysunek 3). Największy wpływ lizozymu obserwowano po 10 min procesu i powodował on dodatkową redukcję o 1,22 log i 1,01 log odpowiednio dla przetrwalników szczepów TO-29/4/02 i TO-117/02.

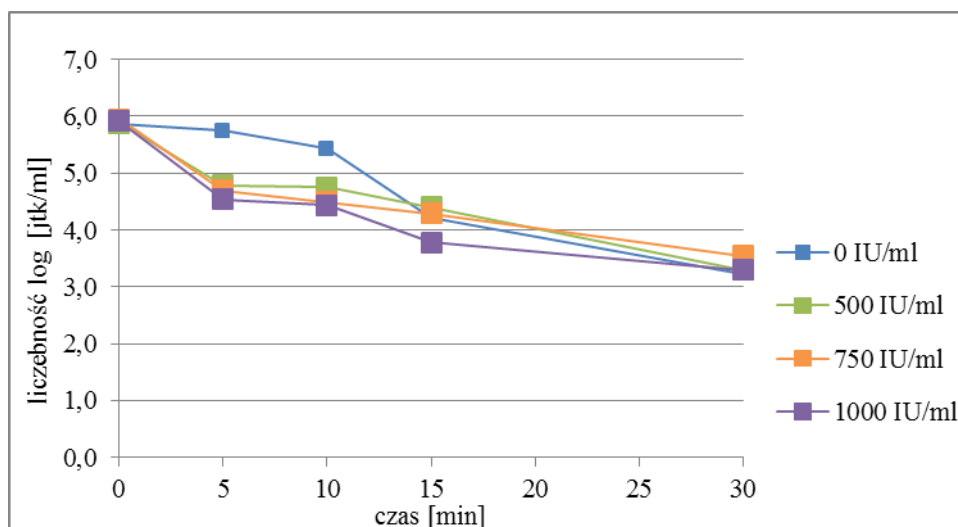


**Rysunek 3.** Wpływ dodatku lizozymu na inaktywację przetrwalników szczepów TO-29/4/02 i TO-117/02 poddanych działaniu ciśnienia 200 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym  
*Impact of the addition of lysozyme on inactivation of spores of TO-29/4/02 and TO-117/02 strains treated with 200 MPa at 50°C in apple juice*

Dodatek nizyny w stężeniach 500, 750 i 1000 IU/ml powodował zwiększenie redukcji przetrwalników szczepu TO-29/4/02 o ok. 1 log podczas całego procesu prowadzonego w ciśnieniu 300 MPa przez 30 min (rysunek 4). Jednakże w przypadku szczepu TO-117/02 dodatkową redukcję przetrwalników spowodowaną dodatkiem nizyny obserwowano tylko w początkowym etapie ciśnieniowania (rysunek 5).



**Rysunek 4.** Wpływ dodatku nizyny na inaktywację przetrwalników szczepu TO-29/4/02 poddanego działaniu ciśnienia 300 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym  
*Impact of the addition of nisin on inactivation of spores of TO-29/4/02 strain treated with 300 MPa at 50°C in apple juice*

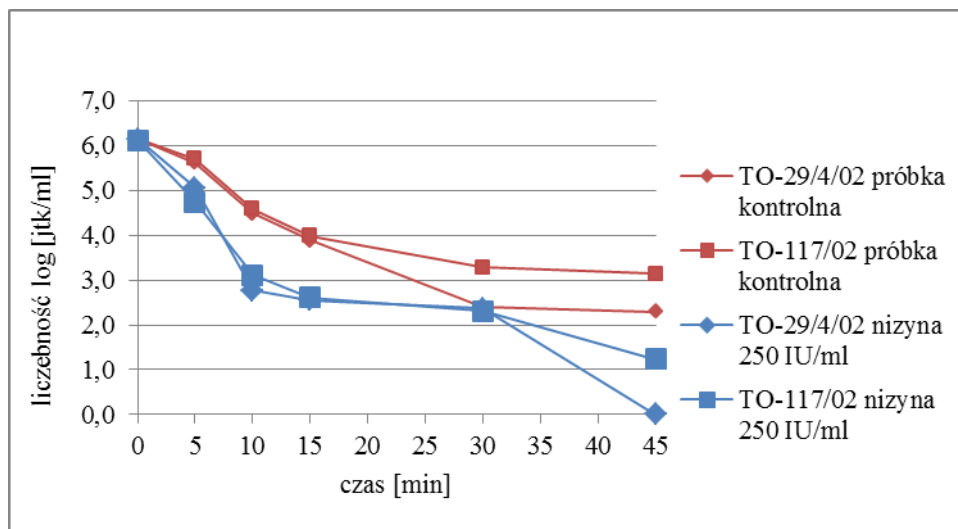


**Rysunek 5.** Wpływ dodatku nizyny na inaktywację przetrwalników szczepu TO-117/02 poddanego działaniu ciśnienia 300 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym  
*Impact of the addition of nisin on inactivation of spores of TO-117/02 strain treated with 300 MPa at 50°C in apple juice*

Natomiast w procesie ciśnieniowania prowadzonym w 200 MPa, w temp. 50°C w soku jabłkowym z dodatkiem 250 IU nizyny / ml obserwowano wyraźny wpływ bakteriocyny na stopień redukcji przetrwalników *A. acidoterrestreis*. Po 10 min ciśnieniowania dodatkowa redukcja wynosiła 1,34 log i 1,37 log odpowiednio dla szczepów TO-29/4/02 i TO-117/02.



Nieco lepsze efekty uzyskano po 15 min ciśnieniowania – dodatkowa redukcja wynosiła 1,72 log dla przetrwalników szczepu TO-29/4/02 i 1,46 log dla TO-117/02 (rysunek 6). Po 30 min ciśnieniowania wyraźny wpływ 250 IU/ml dodatku nizyny na stopień redukcji był widoczny jedynie w przypadku przetrwalników szczepu TO-117/02 i wynosił ok. 1 log. Z kolei po 45 min ciśnieniowania w 200 MPa efekt działania dodatku nizyny był wyraźnie widoczny dla obu szczepów. Dodatkowe zwiększenie redukcji wynosiło 2,3 log dla przetrwalników szczepu TO-29/4/02 i 1,92 log dla przetrwalników szczepu TO-117/02.



**Rysunek 6.** Wpływ dodatku nizyny na inaktywację przetrwalników szczepów TO-29/4/02 i TO-117/02 poddanych działaniu ciśnienia 200 MPa i temperatury 50°C w soku jabłkowym  
*Impact of the addition of nisin on inactivation of spores of TO-29/4/02 and TO-117/02 strains treated with 200 MPa at 50°C in apple juice*

W wielu pracach badawczych opisano skojarzone działanie ciśnienia hydrostatycznego i nizyny lub lizozymu. Uzyskane efekty były zależne od rodzaju badanego drobnoustroju, medium i parametrów procesu. W świeżym serze z mleka koziego z dodatkiem 13,4 mg/kg nizyny osiągnięto redukcję liczby *Staphylococcus carnosus* o ok. 8 log (500 MPa, 5 min w temp. 10°C i 25°C) oraz redukcję populacji bakterii tlenowych mezofilnych o ok. 50% (2 log), podczas gdy w serze bez dodatku nizyny redukcja wynosiła odpowiednio 0,96 i 0,54 log [Capellas i in. 2000]. W badaniach Gao i Yu [2008], dotyczących wpływu ciśnienia, temperatury i dodatku nizyny na inaktywację przetrwalników *C. botulinum* stwierdzono, że optymalne parametry procesu pozwalające na skuteczną redukcję o 6 log to: ciśnienie 545 MPa, temperatura 51°C, czas 13,3 min i stężenie nizyny 129 IU/ml. Połączenie działania nizyny (200 IU/ml) i HHP (300 MPa) dawało efekt synergistyczny w procesie ciśnieniowania

*B. subtilis* [Qi i in. 2010]. Wykazano także znaczną redukcję drobnoustrojów w MOM drobiowym (mięso oddzielane mechanicznie), z dodatkiem nizyny w ilości 200 mg/kg, poddanym działaniu ciśnienia 450 MPa w temp. 20°C. Redukcja mikroflory mezofilnej wynosiła 5,3 log, a psychrofilnej ponad 7,5 log. W pracy tej nie stwierdzono synergistycznego efektu działania HPP i lizozymu [Yuste i in. 2000]. Jednakże w badaniach Masschalack i in. 2000, obserwowano zwiększenie redukcji *E. coli* o 1,1 do 3,2 log pod wpływem lizozymu lub nizyny w zależności od stosowanego ciśnienia.

### WNIOSKI

Umiarkowane ciśnienie w wysokości 200 MPa połączone z działaniem temperatury 50°C powodowało większą inaktywację przetrwalników dwóch badanych szczepów *A. acidoterrestris* niż ciśnienie 300 MPa.

Nizyna skutecznie zwiększała stopień inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* poddanych działaniu ciśnienia hydrostatycznego i temperatury. Wpływ lizozymu na redukcję przetrwalników przy ciśnieniu 300 MPa był nieistotny, natomiast przy ciśnieniu 200 MPa obserwowano zwiększenie inaktywacji przetrwalników *A. acidoterrestris* poddanych działaniu ciśnienia i temperatury.

*Praca finansowana ze środków MNISW jako projekt badawczy N N312 429337.*

### PIŚMIENNICTWO

1. Baumgart J., Husemann M., Schmidt C. (1997). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. Fluss. Obst, 64, 178-180
2. Capellas M., Mor-Mur M., Gervilla R., Yuste J., Guamis B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. Food Microbiol., 17, 633-641
3. Gao Y. L., Ju X. R. (2008). Exploiting the combined effect of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. J. Microbiol. Methods, 72, 20-28
4. Gao Y. C., Zhang G., Krentz S., Darius S., Power J., Lagarde G. (2002). Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. Australian Journal of Grape and Wine Research, 8 (1), 76-83

5. 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
6. Gwiazdowska D., Trojanowska K. (2005). Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 1 (68), 114-130
7. 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
8. Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C. P., Ray B. (1998). Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.*, 15, 207-214
9. 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
10. Lee S. Y., Chung H. J., Kang D. H. (2006). Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *J. Food Protect.*, 69 (5), 1056-1060
11. 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
12. Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I. (2009). Effect of lysozyme or nisin on survival of some bacteria treated with high pressure at subzero temperature. *Braz. J. Microbiol.*, 40 (4), 767-777
13. Masschalack B., Garcia-Graells C., Van Haver E., Michiels C. (2000). Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Inn. Food Sci. Emer. Tech.*, 1, 39-47
14. Masschalack B., Van Houdt R., Michiels C. W. (2001). High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 325-332
15. 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

16. Peña W. E. L., Massaguer P. R., Teixeira L. Q. (2009). Microbial modeling of thermal resistance *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA spores in concentrated orange juice with nisin addition. *Braz. J. Microbiol.*, 40 (3), 601-611
17. 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
18. Qi W. M., Qian P., Yu J. Y., Zhang X. J., Lu R. R. (2010). Combine effect of high hydrostatic pressure and nisin on loss of viability, membrane damage and release of intracellular contents of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Engin.*, 6, doi: 10.2202/1556-3758.1873
19. Skąpska S., Sokołowska B., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Chotkiewicz M., Dekowska A. (2012). Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (82), 187-196
20. Sokołowska B. (2014). *Alicyclobacillus* – termofilne kwasolubne bakterie przetrwalnikujące – charakterystyka i występowanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (95), 5-17
21. Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M. (2008). Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 12, 22-27
22. Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M. (2009). Wpływ kwasów organicznych na kiełkowanie i wzrost populacji szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 64, 66-76
23. Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M. (2010). Wpływ konserwantów na rozwój *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 4, 18-20
24. Sokołowska B., Niezgoda J., Chotkiewicz M. (2012). Wpływ nizyny i lizozymu na wzrost szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* oraz możliwość zastosowania tych związków jako biokonserwantów w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (83), 44-54
25. 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 Res.*, 33 (1), 73-82
26. Thomas L. V., Delves-Broughton J. (2005). Nisin. W: Davidson P. M., Sofos J. N, Branen A. L., red. *Antimicrobials in food*. 3-rd ed. Taylor & Francis Group, 237-274
27. Vercammen A., Vivijs B., Lurguin I., Michels C. (2012). Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *Int. J. Food Microbiol.*, 152 (3), 162-167
28. Walczak P. (1998). Podstawy genetyczne produkcji bakteriocyn przez bakterie fermentacji mlekowej. W: Libudzisz Z., Walczak P., Bardowski J., red. *Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie*. Wyd. Politechniki Łódzkiej
29. Yamazaki K., Murakami M., Kawai Y., Inoue N., Matsuda T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol.*, 17, 315-320
30. Yuste J., Mor-Mur M., Guamis B., Pla R. (2000). Combination of high pressure with nisin or lysozyme to further process mechanically recovered poultry meat. *High Pressure Res.*, 19, 85-90