

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA WYDZIELANIE KWASU DIPIKOLINOWEGO Z PRZETRWAŁNIKÓW *ALICYCLOBACILLUS* *ACIDOTERRESTRIS* PODDANYCH DZIAŁANIU WYSOKIEGO CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNEGO

Izabela Porębska¹, Barbara Sokołowska^{1,2}, Łukasz Woźniak¹

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

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

Streszczenie

Alicyclobacillus acidoterrestris należy do bakterii gram-dodatnich przetrwalnikujących, termoacidofilnych. Jest odpowiedzialna za psucie się pasteryzowanych soków owocowych i napojów. Alternatywna, nietermiczna metoda do utrwalania żywności – wysokie ciśnienie hydrostatyczne – może wpływać na kiełkowanie i inaktywację bakterii, a także wywoływać proces uwalniania kwasu dipikolinowego (DPA) z przetrwalników, związku pełniącego ważną rolę w odporności przetrwalników na czynniki zewnętrzne.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu parametrów wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na wydzielanie kwasu dipikolinowego z przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Zbadano wpływ ciśnienia hydrostatycznego 300 i 500 MPa w temperaturach 20, 50, i 75°C w czasie 15 min na ilość uwalnianego DPA z przetrwalników dwóch szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris* w odtworzonym soku jabłkowym i buforach pH 4 i pH 7. Do określenia ilości uwalnianego DPA zastosowano metodę HPLC.

Zastosowane w niniejszej pracy parametry wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, a przede wszystkim ciśnienie i temperatura, miały znaczący wpływ na ilość uwalnianego DPA z przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* w zależności od użytego szczepu i zastosowanego medium.

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, przetrwalniki, kiełkowanie, kwas dipikolinowy

FACTORS INFLUENCING THE RELEASE OF DIPICOLINIC ACID FROM *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* SPORES EXPOSED TO HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

Summary

Alicyclobacillus acidoterrestris belongs to the gram-positive, spore-forming, acidothermotrophic bacteria. It is responsible for spoilage of pasteurized fruit juices and beverages. An alternative, non-thermal method of food preservation – high hydrostatic pressure – can affect germination and inactivation of bacteria and cause the process of release of dipicolinic acid (DPA) from the spores. DPA plays an important role in spore resistance to external factors.

The aim of this study was to evaluate the influence of parameters of high hydrostatic pressure on the release of dipicolinic acid from the spores of two strains of *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

The effect of hydrostatic pressure of 300 and 500 MPa at temperature of 20, 50, and 75°C applied for 15 min on the amount of DPA released from the spores of two strains of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a reconstituted apple juice and buffers pH 4 and pH 7 was studied. To determine the amount of the released DPA HPLC method was used.

Parameters of high hydrostatic pressure used in this work, in particular pressure and temperature, significantly affected the amount of DPA released from the *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, depending on the strain and the medium used.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, high hydrostatic pressure, spore germination, dipicolinic acid

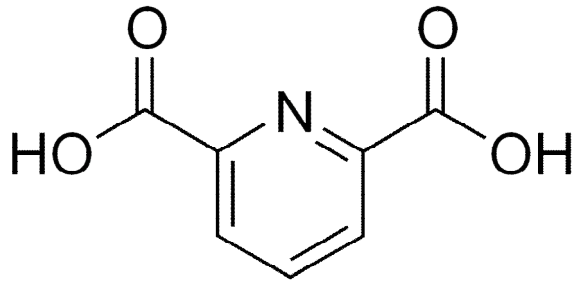
WSTĘP

Alicyclobacillus acidoterrestris (AAT) jest drobnoustrojem odpowiedzialnym za psucie się soków owocowych i warzywnych. Należy do bakterii termofilnych, kwasolubnych i przetrwalnikujących. Izolowany jest m.in. z gleby, powierzchni owoców, wody z mycia owoców, wody z koryt transportowych, kondensatów z wyparek oraz soków zagęszczonych. Mikroorganizm ten od wielu lat stanowi przedmiot zainteresowania naukowców i producentów, ponieważ wywołuje negatywne zmiany zapachu w sokach. Produkuje związki, m.in. 2-metoksyfenol (gwajakol), 2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol, które są przyczyną powstawania zapachu medycznego, dezynfekcyjnego, dymnego [Gocmen i in. 2005]. Może również wytwarzać w produktach biały osad.

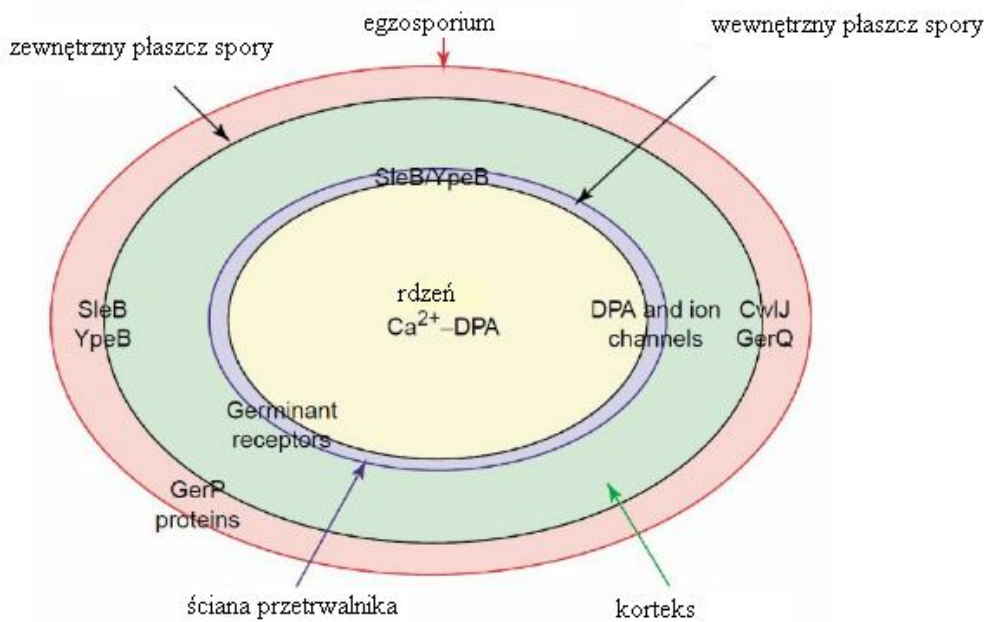
Wysoka ciepłooporność przetrwalników AAT oraz wykazane i wciąż badane przypadki zepsucia soków pasteryzowanych wskazują na nieskuteczność przemysłowego procesu pasteryzacji, ponieważ przetrwalniki bakterii przeżywają w typowych warunkach stosowanych przy pasteryzacji soków owocowych. Dlatego też zachodzi konieczność intensywnej obróbki cieplnej, tzw. UHT (ang. *Ultra-High Temperature processing*) w celu inaktywacji przetrwalników AAT w soku przed rozlewem do butelek. Obróbka ta wpływa niekorzystnie na walory smakowe, zapachowe, kolor, wartości odżywcze i dodatkowo może być kosztowna i energochłonna. W związku z tym poszukuje się innowacyjnych nietermicznych metod ograniczenia wzrostu tych bakterii. Taką metodą może być zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (ang. *High Hydrostatic Pressure*, HHP).

AAT jest bakterią wytwarzającą przetrwalniki, które mogą kiełkować pod wpływem czynników zewnętrznych, m.in. HHP. W procesie kiełkowania dochodzi do hydrolizy materiałów zapasowych i osłon przetrwalnika. Utrata cech ciepłooporności zachodzi dzięki uwalnianiu kwasu dipikolinowego – DPA (rysunek 1), który występuje tylko w formach przetrwalnych i stanowi około 15% s.m. przetrwalnika. Kwas dipikolinowy jest związkiem swoistym tylko dla przetrwalników, umiejscowionym w ich rdzeniu, nie występuje natomiast w komórkach wegetatywnych. Chelatuje jony wapnia (Ca^{2+}), tworząc dipikolinian wapnia (Ca-DPA) [Setlow 2003; Setlow i in. 2006; Parades-Sabja i in. 2011; Reineke i in. 2013].

W przetrwalnikach występują także ciepłooporne enzymy, np. katalaza czy rybozydaza (rozkładająca adenozyne do adeniny i rybozy). Enzymy te nie występują w stanie wolnym, ale są związane z kompleksem białkowym. Wykazano, że kompleks ten zawiera poza enzymem jeszcze peptyd, kation wapniowy i polimer kwasu dipikolinowego. Utrata ciepłooporności przetrwalnika jest zawsze związana z utartą tego związku. Duże stężenie dipikolinianu wapnia w rdzeniu przetrwalnika (rysunek 2) wraz z warstwami gęsto upakowanej mureiny i białek tworzących płaszcz stabilizuje skład chemiczny przetrwalnika. Wykazano, że kompleks wapń – kwas dipikolinowy obecny w płaszczu odgrywa istotną rolę w oporności przetrwalników na promieniowanie ultrafioletowe, przez co przetrwalniki są, w zależności od szczepu, od 5 do 50 razy mniej wrażliwe na UV w porównaniu z komórkami wegetatywnymi. Przetwalniki, które w wyniku zmian mutacyjnych nie zawierają tego związku, są znacznie bardziej wrażliwe na ultrafiolet, szczególnie na część UV-B jego spektrum [Slieman i Nicholson 2001].



Rysunek 1. Kwas dipikolinowy
Dipicolinic acid



Rysunek 2. Schemat budowy przetrwalnika [na podstawie Setlow 2003]

A schematic illustration of a bacterial spore [based on Setlow 2003]

Badając zmiany zachodzące podczas kiełkowania przetrwalników bakteryjnych, należy uwzględnić ich specyficzną budowę i mechanizmy mające wpływ na ten proces. Mianowicie w przetrwalnikach nie przebiegają żadne wykrywalne procesy metaboliczne, mimo to monitorują one swoje otoczenie i bardzo szybko reagują na obecność odpowiednich substancji odżywczych, co prowadzi do ich kiełkowania i przekształcenia w komórkę wegetatywną. Badania wskazują, iż oporność przetrwalników wytwarzanych przez ten sam gatunek bakterii zależy od warunków, w których doszło do zaindukowania ich powstania. Na przykład, jeśli proces sporulacji odbywał się w warunkach podwyższonej temperatury, oporność termiczna powstałych endospor jest większa [Huang i in. 2007].

Zmiany dynamiki procesu kiełkowania i inaktywacji przetrwalników AAT pod wpływem działania temperatury i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego mogą być badane klasyczną

metodą płytkową [Black i in. 2007; Vercammen i in. 2012; Sokołowska i in. 2013; Sokołowska i in. 2015] lub za pomocą pomiaru gęstości optycznej [Terano i in. 2005; Porębska i in. 2015]. Szybkość i ilość uwalnianego kwasu dipikolinowego z przetrwalników w czasie kiełkowania może być również wykorzystywana do analizy tego procesu. [Black i in. 2007a; Huang i in. 2007; Magge i in. 2008; Reineke i in. 2013; Bevilacqua i in. 2015].

Na uwagę zasługuje fakt, że w literaturze nie ma dostępnych wyników badań dotyczących uwalniania DPA z przetrwalników AAT pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu parametrów wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na wydzielanie kwasu dipikolinowego z przetrwalników dwóch szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestis* w odtworzonym soku jabłkowym (11,2°Brix, pH 3,4) i buforach o pH 4 i pH 7.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał do badań stanowiły zawiesiny przetrwalników dwóch szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestis*, które zostały wyizolowane z zagęszczonego soku jabłkowego, szczep oznakowany TO-117/02 oraz szczep oznakowany TO-169/06. Na podstawie wyników dotychczasowych badań stwierdzono, że szczep TO-117/02 charakteryzuje się największą opornością na HHP, natomiast szczep TO-169/06 najmniejszą opornością na czynniki zewnętrzne, w tym HHP [Sokołowska i in. 2008; Sokołowska i in. 2012; Skąpska i in. 2012].

Przetrwalniki szczepów TO-169/06 oraz TO-117/02 uzyskane zgodnie z metodą opisaną przez Sokołowską i in. (2012) wprowadzano do odtworzonego soku jabłkowego (11,2°Brix, pH 3,4) i buforu McIlvaina o pH 4,0 oraz pH 7,0, w ilości 10⁹ jkt/ml. Próbki, w polietylenowych probówkach o pojemności ok. 13 ml (Sarstedt), poddawano działaniu ciśnienia hydrostatycznego oraz podwyższonej temperatury w Instytucie Wysokich Ciśnień PAN w komorze wysokociśnieniowej U4000/65. Objętość komory jest równa 0,95 l, maksymalne ciśnienie, jakie można w niej uzyskać, wynosi 600 MPa. Komora jest wyposażona w zewnętrzny płaszcz termostatu, dzięki czemu można zastosować temperaturę w zakresie od -10°C do +80°C. Jako medium w procesie z zastosowaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego użyto mieszaninę wody z glikolem polipropylenowym (1:1). Ciśnienia 300 i 500 MPa stosowano w sposób ciągły. Procesy przeprowadzano w czasie 15 min w temperaturze: 20, 50, 75°C. Czas, w którym uzyskano odpowiednie ciśnienie, i czas dekompresji nie są wliczone w czas ciśnieniowania. Wszystkie doświadczenia

przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Wszystkie próbki przed analizą HPLC przechowywano w temperaturze -70°C .

Oznaczenia ilość uwolnionego DPA przeprowadzono z użyciem techniki HPLC [Warth 1979]. Analizy wykonano, stosując aparat Waters 2695 z detektorem diodowym Waters 2996 w następujących warunkach: kolumna SunFire C8, średnica ziaren $5\ \mu\text{m}$, wymiary $4,6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ z prekolumną SunFire C8, średnica ziaren $5\ \mu\text{m}$, wymiary $4,6\ \text{mm} \times 20\ \text{mm}$.

W celu uwolnienia całkowitej ilości DPA zawartej w przetrwalnikach, $3\ \text{ml}$ próbki w $0,05\ \text{M}$ buforze PBS o pH 7 poddano autoklawowaniu w temperaturze 121°C przez 20 minut [Reineke i in. 2013].

Próbki do analizy HPLC zawieszano w $0,2\ \text{M}$ fosforanie potasu, pH 1,75, następnie wirowano przy $17000\ \text{g}$ przez 10 minut w temperaturze 4°C i przesączono przez filtr membranowy $0,45\ \mu\text{m}$. Czas jednej analizy wynosił 12 minut, natomiast objętość nastrzyku na kolumnę była równa $10\ \mu\text{l}$. Elucję prowadzono za pomocą $1,5\%$ alkoholu amyłowego (2-metylo-2-butanol) w $0,2\ \text{M}$ buforze fosforanowym o pH 1,75, przemywanie izokratyczne prowadzono z prędkością $1,0\ \text{ml/min}$ w temperaturze 25°C . Absorbancję mierzono przy długości fali $271\ \text{nm}$.

WYNIKI I DYSKUSJA

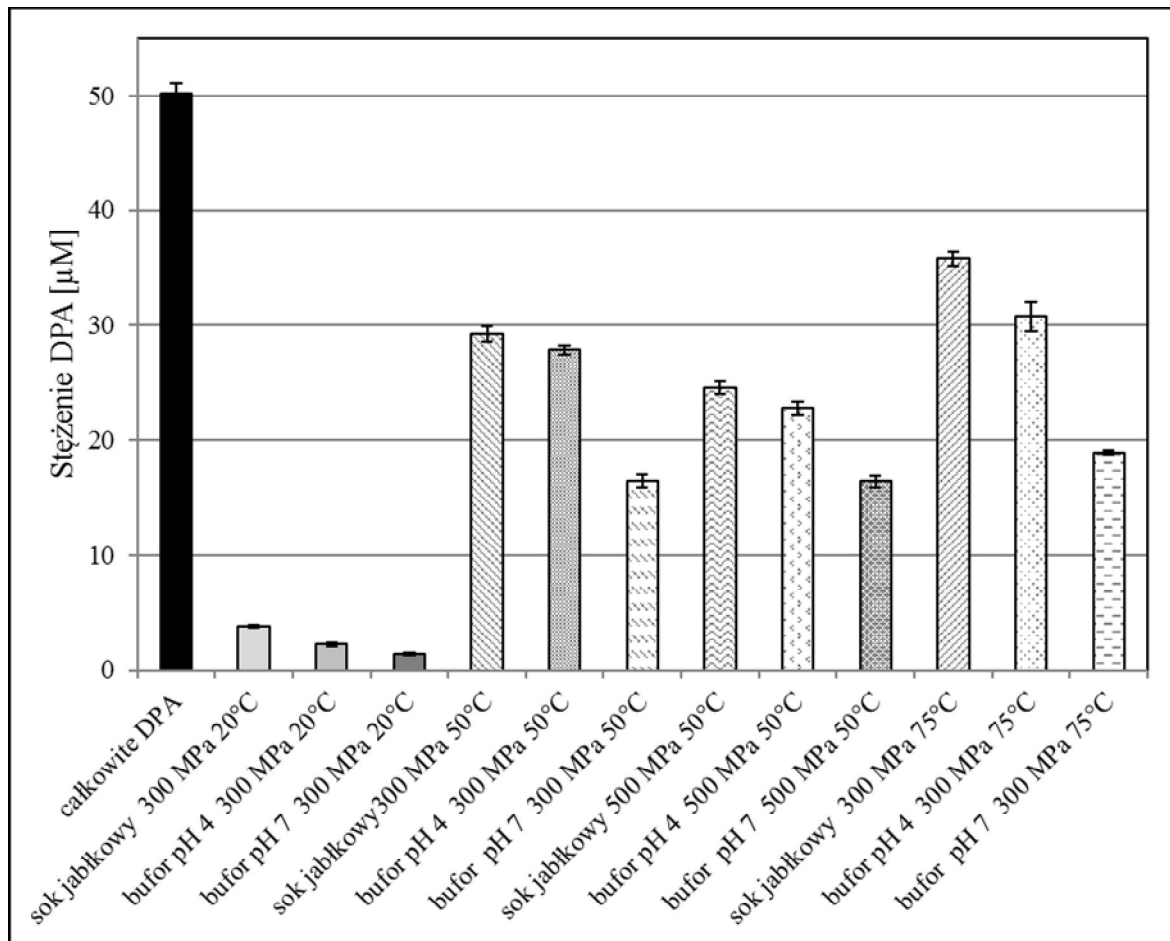
Wcześniejsze badania [Porębska i in. 2015] wykazały, że zmiany ciśnienia, temperatury i czasu istotnie wpływają na dynamikę procesu kiełkowania *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Stwierdzono także istotną korelację ($R^2 = 0,89$) pomiędzy kiełkowaniem przetrwalników i ilością uwalnianego DPA. Całkowita ilość DPA uwolnionego z przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* wynosiła $50,32\ \mu\text{M}$ dla szczepu TO-169/06 (rysunek 3), i $42,71\ \mu\text{M}$ dla szczepu TO-117/02 (rysunek 4).

W trakcie prowadzenia procesu dla szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* TO-169/06, w temperaturze 20°C przy ciśnieniu $300\ \text{MPa}$ w soku jabłkowym ilość uwolnionego DPA była nieznaczna i wynosiła $3,83\ \mu\text{M}$. Przy tym samym ciśnieniu, ale w podwyższonej do 50°C temperaturze, ilość uwolnionego DPA wzrosła do $29,27\ \mu\text{M}$, co odpowiada $58,17\%$ całkowitej zawartości DPA, natomiast największą ilość – $35,81\ \mu\text{M}$ uzyskano w temperaturze 75°C ($71,16\%$ całkowitego DPA). Podwyższenie ciśnienia nie wpłynęło na zwiększenie wydzielania DPA z przetrwalników. Zastosowanie ciśnienia $500\ \text{MPa}$ w temperaturze 50°C spowodowało uwolnienie $24,59\ \mu\text{M}$ DPA ($48,88\%$ całkowitego DPA).

W buforze pH 4 zaobserwowano podobne tendencje w ilości wydzielanego DPA jak w soku jabłkowym, co wynikało prawdopodobnie z właściwości kwasolubnych *Alicyclobacillus acidoterrestris*. W temperaturze 20°C przy ciśnieniu $300\ \text{MPa}$ ilość

uwolnionego DPA była równa 2,25 μM , po podwyższeniu temperatury do 50°C wynosiła 27,89 μM (55,43% całkowitego DPA), natomiast w 75°C uzyskano 30,76 μM , co stanowiło 61,11% całkowitej zawartości DPA w przetrwalnikach. W efekcie podwyższenia ciśnienia do 500 MPa ilość uwolnionego DPA z przetrwalników wynosiła 22,74 μM (45,19% całkowitego DPA).

Wraz ze wzrostem pH zaobserwowano znaczne zmniejszenie ilości uwalnianego DPA z przetrwalników. W buforze pH 7 w temperaturze 20°C ilość uwolnionego w procesie ciśnieniowania DPA była równa 1,39 μM , w 50°C wynosiła 16,42 μM (32,63% całkowitego DPA), a w najwyższej zastosowanej temperaturze 75°C uzyskano 18,91 μM uwolnionego DPA (37,58% całkowitego DPA). W procesie przeprowadzonym w ciśnieniu 500 MPa i w temperaturze 50°C uzyskano 16,38 μM DPA, co stanowiło 32,55% całkowitego DPA zawartego w przetrwalnikach (rysunek 3).

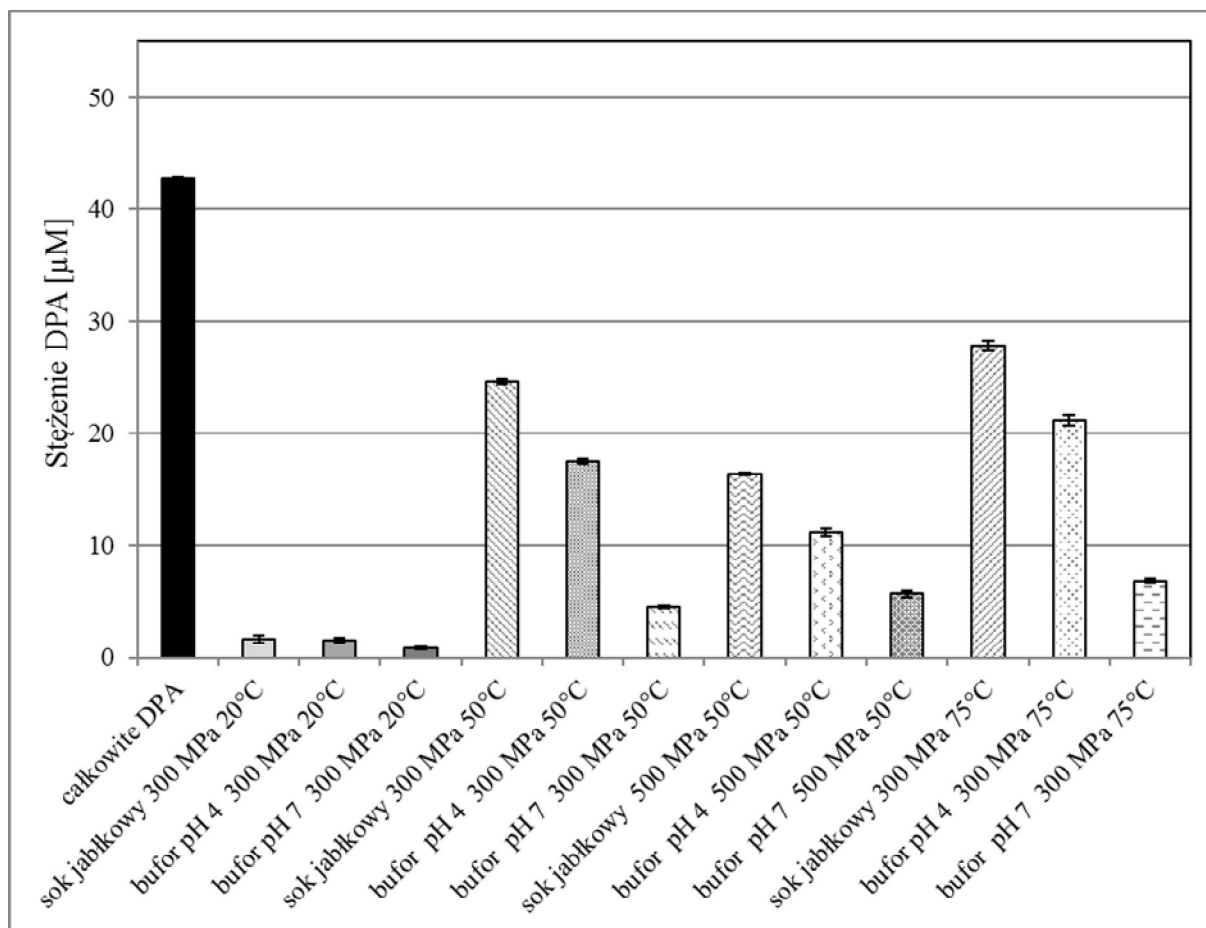


Rysunek 3. DPA uwolniony z przetrwalników *A. acidoterrestis* TO-169/06 po 15 minutach działania HHP
DPA released from the TO-169/06 A. acidoterrestis spores after 15 minutes of HHP treatment

Dla porównania identyczne doświadczenie zostało przeprowadzone dla przetrwalników drugiego szczepu *Alicyclobacillus acidoterrestris* TO-117/02. W soku jabłkowym przy ciśnieniu 300 MPa i temperaturze 20°C uzyskano 1,68 µM DPA, a w temperaturze podwyższonej do 50°C ilość wydzielonego DPA była równa 24,63 µM (57,67% całkowitego DPA). Najwięcej uwolnionego DPA 27,83 µM (65,16%) zaobserwowano przy najwyższej stosowanej temperaturze procesu wynoszącej 75°C. Podobnie jak dla przetrwalników pierwszego badanego szczepu (TO-169/06) podwyższenie ciśnienia nie spowodowało wydzielania większych ilości DPA. Po procesie przeprowadzonym w 500 MPa w temperaturze 50°C uzyskano 16,42 µM DPA (38,45% całkowitego DPA).

Również w przypadku tego szczepu przy zmianie medium na bufor o pH 4 zaobserwowano podobne tendencje jak w soku jabłkowym. W temperaturze 20°C ilość uwolnionego DPA była równa 1,54 µM, w temperaturze 50°C uzyskano 17,51 µM (DPA 45,19%), natomiast w temperaturze 75°C uzyskano 21,20 µM DPA (49,64% całkowitego DPA). Po podwyższeniu ciśnienia do 500 MPa ilość uwolnionego DPA wynosiła 11,09 µM (25,97% całkowitego DPA).

Po zmianie medium i przeprowadzeniu doświadczenia w buforze o pH 7 zaobserwowano znacznie mniejsze ilości uwalnianego DPA. W temperaturze 20°C ilość uwolnionego DPA była równa 0,83 µM, w temperaturze 50°C wydzielano się 4,50 µM, natomiast w temperaturze 75°C uzyskano 6,83 µM. DPA. Po zastosowaniu ciśnienia 500 MPa i temperatury 50°C uzyskano 5,75 µM uwolnionego z przetrwalników DPA (rysunek 4).



Rysunek 4. DPA uwolniony z przetrwalników *A. acidoterrestres* TO-117/02 po 15 minutach działania HHP

DPA released from the TO 117/02 A. acidoterrestres spores after 15 minutes of HHP treatment

Podsumowując, największą ilość uwalnianego kwasu dipikolinowego zaobserwowano przy zastosowaniu temperatury 75°C i ciśnienia 300 MPa. Bevilacqua i wsp. (2015) również zaobserwowali znaczący wpływ temperatury na proces uwalniania kwasu dipikolinowego w przypadku *A. acidoterrestres*. Ponadto wyniki uzyskane w pracy wskazują na zróżnicowanie w obrębie gatunku *A. acidoterrestres* pod względem reakcji przetrwalników na wysokie ciśnienie. Podobne rezultaty uzyskali Huang i wsp. (2007), którzy wykazali zmienność poziomu uwalnianego DPA z przetrwalników różnych gatunków *Bacillus*. Jednym z możliwych wyjaśnień jest założenie, że mogą występować znaczące różnice w wielkości przetrwalników w danej populacji. Carrera i wsp. (2007) zaobserwowali, że w przypadku *B. anthracis* większe przetrwalniki zawierają więcej kompleksu Ca-DPA, natomiast inne

szczyepy wytwarzają przetrwalniki o mniejszej wielkości, które zawierają mniejszą ilość tego związku w rdzeniu.

Znaczne zróżnicowanie w obrębie gatunku *A. acidoterrestris* wskazuje na potrzebę uwzględnienia tego faktu przy projektowaniu procesów technologicznych i odpowiednim doborze parametrów procesów utrwalania soków owocowych i warzywnych.

WNIOSKI

1. Proces uwalniania kwasu dipikolinowego z przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris* pod wpływem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego był zależny od szczepu, pH medium oraz zastosowanych parametrów procesu, głównie ciśnienia i podwyższonej temperatury.
2. Wraz ze wzrostem pH zaobserwowano obniżenie ilości uwalnianego kwasu dipikolinowego, zawartość składników odżywczych w soku jabłkowym prawdopodobnie dodatkowo spowodowała wzrost ilości uwalnianego DPA w stosunku do roztworu buforowego o zbliżonym pH.
3. Zróżnicowanie oporności szczepów *A. acidoterrestris* na HHP może być związane z różną zawartością kwasu dipikolinowego w przetrwalnikach i ilością tego związku uwalnianego z przetrwalników w trakcie procesu.

PIŚMIENICTWO

1. Bevilacqua A., Ciufureda E., Sinigaglia M., Rosario Corbo M. (2015). Spore inactivation and DPA release in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under stress conditions. *Food Microbiol.* 46, 299-306
2. Black E., Setlow P., Hocking A. D., Stewart C. M., Kelly A. L., Hoover D. G. (2007). Response of spores to high – pressure processing. *Com. Rev. Food Sci. Food Safety*, 6, 103-119
3. Black E., Wei J., Atluri S., Cortezzo D. E., Koziol-Dube K., Hoover D. G., Setlow P., (2007a). Analysis of factor influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 65-76
4. Carrera M., Zandomeni R. O., Fitzgibbon J., Sagripanti J. L. (2007). Difference between the spore sizes of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 303-312

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. Huang S., Chen D., Pelczar P., Vepachedu V. R., Setlow P., Li Y. (2007). Levels of Ca^{2+} – dipicolinic acid in individual *Bacillus* spores determined using microfluidic raman tweezers. *J. Bacteriol.*, 189 (13), 4681-4687
7. Magge A., Granger A. C, Wahome P. G, Setlow B., Vepachedu V. R., Loshon Ch. A., Peng L., Chen D., Li Y., Setlow P. (2008). Role of dipicolinic acid in the germination, stability and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 190 (14), 4798-4807
8. Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.*, 19 (2), 85-94
9. Porębska I., Rutkowska M., Sokołowska B. (2015). Decrease in optical density as a results of germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under high hydrostatic pressure. *High Pressure Research*, 35 (1), 89-97
10. Reineke K., Schlumbach K., Baier D., Mathys A., Knorr D. (2013). The release of dipicolinic acid--the rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *Int. J. Food Microbiol.*, 162, 55-63
11. Setlow P. (2003). Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 550-556
12. Setlow B., Atluri S., Kitchel R., Koziol-Dube K., Setlow P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β -type small acid-soluble proteins. *J Bacteriol*, 188 (11), 3740 -3747
13. Skąpska S., Sokołowska B., Dekowska A., Chotkiewicz M., Fonberg-Broczek M. (2012). Zastosowanie pasteryzacji wysokociśnieniowej do inaktywacji *Alicyclobacillus acidoterrestris* w soku jabłkowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3 (82), 187-196
14. Slieman T. A. Nicholson W. L. (2000). Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1274-1279
15. Sokołowska B., Niezgoda J., Bytońska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2008). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 12, 22-27
16. 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 (1), 119-127
17. 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), 73-72
 18. Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Porębska I., Dekowska A., Rzoska S. J. (2015). Germination and inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores induced by moderate hydrostatic pressure. Polish J. Microbiol., w druku
 19. 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
 20. Vercammen A., Vivijis B., Lurquin I, Michiels C. W. (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
 21. Warth A. D. (1979). Liquid Chromatographic Determination of Dipicolinic Acid from Bacterial Spores. Appl. Environ. Microbiol., 38, 1029-1033