

BARBARA SOKOŁOWSKA, JOLANTA NIEZGODA, MARTA CHOTKIEWICZ

**WPLYW NIZYNY I LIZOZYMU NA WZROST SZCZEPÓW
ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS ORAZ MOŻLIWOŚĆ
ZASTOSOWANIA TYCH ZWIĄZKÓW JAKO BIOKONSERWANTÓW
W SOKU JABŁKOWYM**

Streszczenie

Acidotermofilne bakterie przetrwalnikujące *Alicyclobacillus acidoterrestris* są przyczyną psucia się pasteryzowanych soków owocowych i warzywnych.

Sprawdzono skuteczność działania nizyny oraz lizozymu jako naturalnych konserwantów zapobiegających zepsuciu soku jabłkowego przez te drobnoustroje. Dla każdego z ośmiu badanych szczepów wyznaczono minimalne stężenie hamujące MIC (Minimal Inhibitory Concentration) nizyny oraz lizozymu w pożywce hodowlanej. MIC nizyny w odniesieniu do przetrwalników wynosiło od 100 IU/cm³ do 1500 IU/cm³ pożywki, a w stosunku do form wegetatywnych od 50 IU/cm³ do 1250 IU/cm³ pożywki, w zależności od szczepu. Lizozym hamował kiełkowanie przetrwalników *A. acidoterrestris* przy stężeniach od 0,005 mg/cm³ do 0,2 mg/cm³ pożywki, natomiast rozwój komórek wegetatywnych został zahamowany przy stężeniach od 0,05 mg/cm³ do 0,2 mg/cm³ pożywki.

Stwierdzono skuteczność nizyny, w stężeniach równych MIC, w próbach trwałościowych soku jabłkowego. Rozwój siedmiu badanych szczepów *A. acidoterrestris* został zahamowany w trakcie trwającej 28 dni inkubacji. Lizozym w stężeniach równych wartościom MIC zapewniał trwałość próbek soku jedynie w okresie 7 - 21 dni.

Słowa kluczowe: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, sok jabłkowy, nizyna, lizozym

Wprowadzenie

Poszukiwanie skutecznych metod ograniczenia wzrostu ciepłoopornych i kwasolubnych bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Alicyclobacillus*, odpowiedzialnych za psucie się soków owocowych i warzywnych, od wielu lat stanowi przedmiot zainteresowań naukowców i producentów. Zmiany cech smakowo-zapachowych w zepsutych sokach, powodowane przez *Alicyclobacillus acidoterrestris*, polegają na powstawaniu zapachu określanego jako medyczny, dezynfekcyjny, dymny. Zapach ten powodują

2-metoksyfenol (gwajakol) oraz 2,6-dibromofenol i 2,6-dichlorofenol [5, 7, 9, 13, 19, 21].

Wykazana w wielu badaniach wysoka ciepłooporność przetrwalników *A. acidoterrestris* [3, 5, 14, 17, 22, 23, 26] oraz stwierdzone przypadki zepsucia soków pasteryzowanych wskazują na nieskuteczność przemysłowego procesu pasteryzacji i na konieczność poszukiwania innych niż cieplne metod ograniczenia wzrostu tych bakterii. Rozwijane są alternatywne technologie, takie jak zastosowanie wysokich ciśnień (HPP) [1, 15, 16]. Czynniki ograniczającymi wzrost *A. acidoterrestris* mogą być również kwasy organiczne i konserwanty [24, 25, 29].

Współczesny konsument coraz częściej poszukuje żywności „naturalnej”, niezawierającej żadnych syntetycznych dodatków. Naturalnymi substancjami konserwującymi, akceptowanymi przez konsumentów, mogą być substancje przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez bakterie – bakteriocynty. Do najlepiej poznanych i najszerszej 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 nizynie status substancji GRAS (*generalny recognized as safe*), stąd duże zainteresowanie tym związkem jako biokonserwantem. Nizyna wykazuje stabilność w wysokiej temperaturze (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 *E. coli* i *Salmonella* [10, 27, 28].

Nizyna jest dopuszczona do stosowania w wielu krajach świata. W niektórych krajach można ją dodawać do wszystkich produktów bez ograniczeń, w innych lista zastosowań i maksymalna dawka są ograniczone. Maksymalna dopuszczalna przez FDA dawka nizyny w produkcie końcowym wynosi 250 mg/kg [FDA 21 CFR § 184.1538]. Nizyna jest uznawana za substancję nietoksyczną – jej LD₅₀ wynosi 6,95 g/kg masy ciała [2]. Średnie dzienne pobranie (ADI) zalecane przez FAO/WHO nie powinno przekraczać 33 000 IU/kg masy ciała (co odpowiada 0,825 mg/kg masy ciała), natomiast zalecane przez FDA nie powinno przekraczać 2,9 mg/kg masy ciała [2].

Nizyna jest najczęściej stosowana jako biokonserwant w następujących produktach: mleko, sery, mrożone desery, masa jajowa, sosy, konserwy warzywne, mięso i produkty mięsne, ryby, pizza, zupy, wino, napoje alkoholowe [27].

Aktywność szczepów bakteriocynogennych i bakteriocyn w żywności często jest niższa niż w badaniach *in vitro*, gdyż ściśle zależy od różnych czynników fizycznych,

chemicznych i biologicznych, takich jak siła jonowa, pH, temperatura i typ atakowanego mikroorganizmu, dlatego ocena mikrobiologicznego działania bakteriocyn wymaga dokładnych testów [10].

Inną substancją naturalną o działaniu konserwującym jest lizozym (muramidaza, EC 3.2.1.17). Jest to enzym hydrolityczny, który rozkłada peptydoglikany ściany komórkowej bakterii. Hydrolizuje wiązania β -1,4-glikozydowe pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą. Występuje w ziarnistościach granulocytów, monocytów oraz makrofagów, jest obecny w większości płynów tkankowych, stanowiąc jeden z mechanizmów odporności. Naturalnie występuje także w białku jaja kurzego, z którego pozyskuje się go na skalę przemysłową. Lizozym wykazuje działanie przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii gram dodatnich [8]. Bakterie gram ujemne są bardziej odporne na jego działanie. Lizozym jest białkiem termostabilnym, szczególnie w środowisku kwaśnym i może być ogrzewany nawet do 100 °C bez utraty aktywności. FDA w 1998 roku nadała lizozymowi status substancji GRAS. Najczęściej jest on stosowany jako dodatek do serów, zapobiegający późnym wzdęciom wywoływanym przez *Clostridium tyrobutyricum*. Ponadto jest stosowany jako biokonserwant w następujących produktach: mięso i produkty mięsne, ryby i ich przetwory, mleko i produkty mleczarskie, świeże warzywa i owoce, wino. Produkty zawierające lizozym powinny być odpowiednio oznakowane z uwagi na możliwość występowania alergii na białko kurze.

Celem pracy było określenie skuteczności działania nizyny oraz lizozymu jako naturalnych konserwantów zapobiegających zepsuciu soku jabłkowego przez bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Material i metody badań

Badania przeprowadzono z zastosowaniem przetrwalników ośmiu szczepów *A. acidoterrestris* wyizolowanych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego:

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

Do izolacji szczepów zastosowano metodę International Federation of Fruit Juice Producers [12]. Szczepy zidentyfikowano i zaliczono do gatunku *Alicyclobacillus acidoterrestris* na podstawie ich zdolności do wytwarzania kwasu z erytrytolu [4] oraz do wytwarzania gwajakolu w pożywce YSG z dodatkiem kwasu wanilinowego [18].

W celu uzyskania przetrwalników szczepy inkubowano w temp. 45 °C przez 10 dni na podłożu PDA (Oxoid) o pH 4,0. Biomasę bakterii zebraną z powierzchni podłoża agarowego zawieszano w sterylnej wodzie redestylowanej, a następnie wirowano przez 10 min przy 14 000 obr./min w temp. 4 °C. Osad przemywano trzykrotnie: sterylną wodą redestylowaną, 50 % alkoholem etylowym i ponownie 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-agar (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45 °C.

Do przygotowania inokulum komórek wegetatywnych stosowano pożywkę BAT-bulion, do której dodawano zawiesinę przetrwalników *A. acidoterrestris* i inkubowano w temp. 45 °C przez 17 - 20 h. Czas hodowli regulowano tak, aby przetrwalniki nie zdążyły się uformować (kontrola stanu hodowli w preparatach mikroskopowych). W celu przygotowania inokulum o odpowiedniej liczebności wykonywano dziesięciokrotne rozcieńczenia w fizjologicznym roztworze peptonu (Merck). Końcową liczbę komórek wegetatywnych oznaczano metodą płytkową na BAT-agar (Merck, pH 4,0) po 5 dniach inkubacji w temp. 45 °C.

Do badań zastosowano nizinę z *Lactococcus lactis* – producent: SIGMA-ALDRICH; o aktywności: $1,0 \times 10^6$ IU/g. Roztwór podstawowy o aktywności $5,0 \cdot 10^4$ IU/cm³ 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) [14, 30] i przechowywano w temp. 2 - 8 °C.

W badaniach zastosowano lizozym krystaliczny (z białka jaja) EC 3.2.1.17, producent: Merck (nr kat. 1.05281), o aktywności: 50 000 U/mg. Roztwór podstawowy o stężeniu 50 mg/cm³ sporządzono w jałowej wodzie destylowanej.

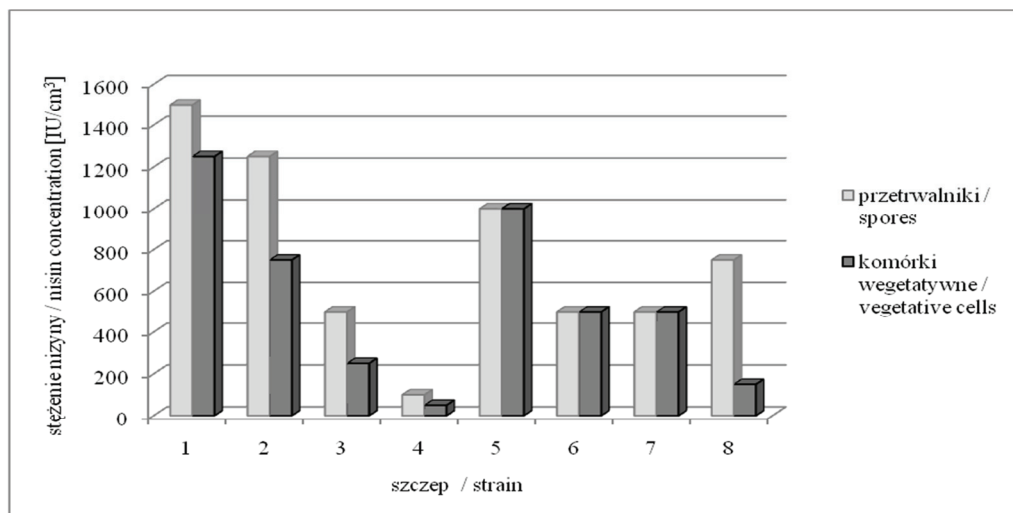
Wartość MIC (Minimal Inhibitory Concentration) nizyny i lizozymu wyznaczano w zautomatyzowanym analizatorze BacT/ALERT[®], stosując pożywkę węglowodanową LYM (bioMerieux nr kat. 259788) o pH 3,7. Zasada oznaczenia w analizatorze polegała na kolorymetrycznym pomiarze poziomu metabolitów wytwarzanych przez rosnące drobnoustroje. Zastosowano inokulum zawierające ok. 10^5 przetrwalników w 1 cm³ pożywki i inokulum komórek wegetatywnych o liczbie 10^3 do 10^4 jtk/cm³ pożywki. Do pożywki hodowlanej LYM dodawano roztwór podstawowy nizyny do uzyskania końcowego stężenia [IU]: 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 1250 i 1500 w 1 cm³ pożywki. Natomiast roztwór podstawowy lizozymu dodawano do uzyskania końcowego stężenia [mg]: 0,0025, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, i 0,5 w 1 cm³ pożywki.

Inkubację prowadzono maksymalnie przez 34 dni, w optymalnej dla bakterii *Alicyclobacillus* temp. 45 °C. Badania wykonano w 2 - 4 powtórzeniach. Za wartość MIC uznawano stężenie nizyny lub lizozymu, które całkowicie hamowało kiełkowanie przetrwalników i wzrost szczepów *A. acidoterrestris*.

Próby trwałościowe soku jabłkowego z dodatkiem nizyny lub lizozymu prowadzono w temp. 45 i 25 °C przez 28 dni. Do próbek soku jabłkowego o objętości 20 cm³ dodawano nizynę lub lizozym w stężeniach odpowiadających wyznaczonym wartościom MIC. Inokulum stanowiła zawiesina przetrwalników *A. acidoterrestris* dodawana do uzyskania końcowej liczby 10³ jtk/cm³ i 10⁵ jtk/cm³ soku. Przed inkubacją próbki soku poddawano szokowi termicznemu (80 °C /10 min) w celu aktywacji przetrwalników. Badania wykonano w trzech powtórzeniach. W trakcie inkubacji obserwowano zmętnienie soku i pojawianie się obcego zapachu.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie minimalnych stężeń nizyny hamujących kiełkowanie przetrwalników oraz rozwój komórek wegetatywnych ośmiu badanych szczepów *A. acidoterrestris*. Zaobserwowano duże różnice we wrażliwości poszczególnych szczepów na ten biokonserwant. Kiełkowanie przetrwalników zostało zahamowane przy zastosowanych stężeniach nizyny od 100 IU/cm³ (szczep nr 4) do 1500 IU/cm³ pożywki (szczep nr 1) (rys. 1). Rozwój komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* został zahamowany przy stężeniach nizyny wynoszących od 50 IU/cm³ (szczep nr 4) do 1250 IU/cm³ pożywki (szczep nr 1).

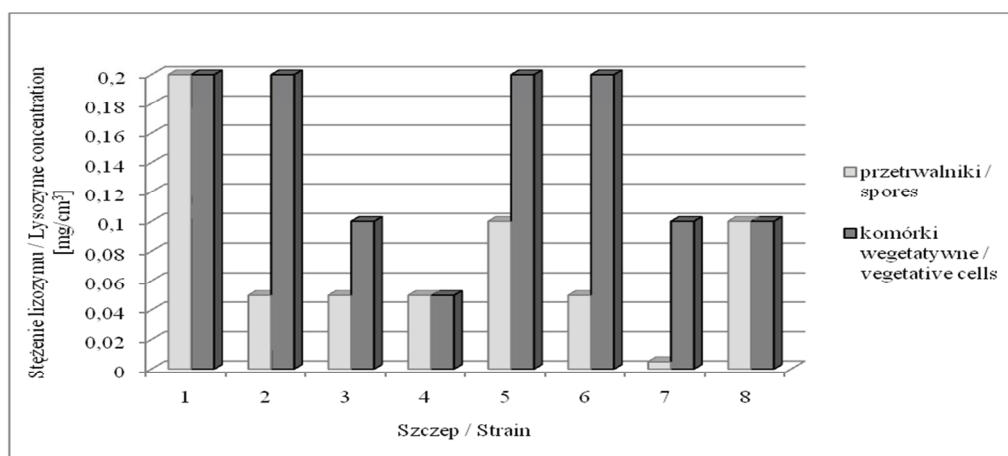


Rys. 1. MIC nizyny w pożywce hodowlanej.

Fig. 1. MIC of nisin in the culture medium.

Przedstawione powyżej wartości MIC były zdecydowanie wyższe od uzyskanych w badaniach Yamazaki i wsp. [30], w których określono minimalne stężenie hamujące MIC nizyny w stosunku do przetrwalników siedmiu badanych szczepów na poziomie od 0,78 do 12,5 IU/cm³ pożywki mYPGA (modified Yeast-Peptide-Glucose Agar) przy pH 3,4 i od 25 do 100 IU/cm³ przy pH 4,2. Komórki wegetatywne były bardziej odporne na działanie nizyny i wyznaczone wartości MIC wynosiły od 1,56 do 50 IU/cm³ pożywki mYPGA przy pH 3,4 i 25 - 100 IU/cm³ przy pH 4,2. Stwierdzone różnice w oporności na działanie nizyny polskich i japońskich szczepów *A. acidoterrestris* mogą wynikać zarówno z bioróżnorodności szczepów, jak i z różnic w składzie pożywki i jej pH oraz z rzeczywistej aktywności nizyny (przyjęto aktywność deklarowaną przez producenta).

Lizozym, w zależności od szczepu, hamował kiełkowanie przetrwalników przy stężeniach od 0,005 mg/cm³ (szczep nr 7) do 0,2 mg/cm³ pożywki (szczep nr 1) (rys. 2). Rozwój komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* został zahamowany przy zastosowaniu lizozymu w stężeniach od 0,05 mg/cm³ (szczep nr 4) do 0,2 mg/cm³ pożywki (szczepy nr 1, 2, 5, 6). Przetrwalniki okazały się bardziej wrażliwe na działanie lizozymu niż komórki wegetatywne. Badania Bevilacqua i wsp. [6] doprowadziły do takiego samego wniosku. Ponadto autorzy ci stwierdzili znaczący wpływ medium, w którym prowadzono doświadczenia: roztwór lizozymu w soli fizjologicznej o stężeniu 1 mg/cm³ skutecznie hamował wzrost komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* (redukcja liczby wyniosła ponad 5 log jtk/cm³ już po 4 h działania), podczas gdy w pożywce z wyciągiem słodowym obserwowano efekt ochronny – w tych samych warunkach liczba komórek zmniejszyła się tylko o 3 log jtk/cm³.



Rys. 2. MIC lizozymu w pożywce hodowlanej.

Fig. 2. MIC value of lysozyme in the culture medium.

W przeprowadzonych próbach trwałościowych soku jabłkowego nizyna okazała się skutecznym konserwantem (tab. 1). Uzyskano 28-dniową trwałość soków inkubowanych zarówno w temp. 45, jak i 25 °C, przy zanieczyszczeniu przetrwalnikami *A. acidoterrestris* na poziomie 10^3 i 10^5 jtk/cm³ soku. Jedynie szczep nr 7 rozwijał się w soku jabłkowym po 21 dniach inkubacji w temp. 45 °C, przy wysokim poziomie zanieczyszczenia przetrwalnikami *A. acidoterrestris* (10^5 jtk/cm³ soku).

Tabela 1

Wzrost szczepów *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym z dodatkiem nizyny i lizozymu w stężeniach równych MIC, wyznaczonym w pożywce hodowlanej.

Growth of *A. acidoterrestris* strains in apple juice with lysozyme and nisin added at concentration levels equal to MIC value as determined in the culture medium.

Szczep Strain	Inokulum Inoculum [jtk/cm ³] [cfu/cm ³]	Nizyna / Nisin		Lizozym / Lysozyme	
		Temperatura inkubacji / Incubation temperature [°C]			
		45	25	45	25
		Czas inkubacji (dni) / Incubation time (days)			
1	10 ³	- (28)	- (28)	+ (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)
2	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
3	10 ³	- (28)	- (28)	+ (21)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
4	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
5	10 ³	- (28)	- (28)	+ (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (28)	+ (28)
6	10 ³	- (28)	- (28)	+ (14)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	+ (14)	+ (28)
7	10 ³	- (28)	- (28)	+ (7)	- (28)
	10 ⁵	+ (21)	- (28)	+ (7)	+ (28)
8	10 ³	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)
	10 ⁵	- (28)	- (28)	- (28)	- (28)

Objaśnienia: / Explanatory notes:

- brak zepsucia / no spoilage; + zepsucie / spoilage.

Do zahamowania wzrostu *A. acidoterrestris* stosowano nizynę w bardzo szerokim zakresie stężeń, w zależności od rodzaju soku i szczepu. Komitopoulou i wsp. [14] wykazali hamujące działanie nizyny w stężeniu 100 IU/cm³ soku w stosunku do mieszaniny przetrwalników i komórek wegetatywnych *A. acidoterrestris* w soku jabłkowym, pomarańczowym i grejpfrutowym. Yamazki i wsp. [30], badając siedem szcze-

pów *A. acidoterrestris*, stwierdzili hamowanie wzrostu tych bakterii przez 7 dni w soku pomarańczowym i w soku mieszanym z różnych owoców z dodatkiem nizyny w stężeniu 25 IU/cm³ soku. Hamowanie wzrostu przez 12 dni obserwowano przy wyższych dawkach, wynoszących odpowiednio 50 IU nizyny/cm³ i 100 IU nizyny/cm³ wyżej wymienionych soków. Natomiast w soku jabłkowym działanie nizyny, nawet w dawce 600 IU/cm³, okazało się nieskuteczne.

Z kolei dodatek nizyny w ilości 5 IU/cm³ do soku jabłkowego i pomidorowego powodował redukcję przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5 log jtk/cm³ i zapewniał 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C. Dodatek 3 IU/cm³ powodował redukcję przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5 log jtk/cm³ w soku pomidorowym i o 4,2 log jtk/cm³ w soku jabłkowym, co zapewniało 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C [11].

Nizyna w stężeniu 70 IU/cm³ hamowała wzrost *A. acidoterrestris* w sokach jabłkowych o zawartości ekstraktu od 11 do 19 °Brix, pH w zakresie od 3,5 do 5,5 i w temp. inkubacji od 25 do 50 °C [20].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na to, że polskie szczepy *A. acidoterrestris* należą do grupy mniej wrażliwych na działanie nizyny w soku jabłkowym i do zahamowania ich rozwoju potrzebne są wysokie jej dawki, tak jak to stwierdzono w badaniach Yamazaki i wsp. [30].

Zastosowane w badaniach trwałościowych dawki lizozymu okazały się, w zdecydowanej większości, mniej skuteczne w sokach jabłkowych niż w pożywce hodowlanej. Zepsucie soków inkubowanych w temp. 45 °C obserwowano po 7 – 21 dniach w zależności od szczepu (tab. 1). Jedynie wzrost szczepu nr 8 został zahamowany w tych warunkach przez 28 dni. W temp. 25 °C wzrost trzech szczepów *A. acidoterrestris* (nr 1, nr 3 i nr 8) został zahamowany przez 28 dni, przy dawkach lizozymu odpowiadających wartościom MIC tych szczepów. Wzrost pozostałych pięciu szczepów został zahamowany, przy zastosowaniu dawki lizozymu odpowiadającej MIC, tylko przy niższym inokulum rzędu 10³ jtk/cm³. Przy wyższym inokulum rzędu 10⁵ jtk/cm³ okres trwałości wynosił 21 dni (tab. 1).

W literaturze światowej dostępne są nieliczne publikacje dotyczące zastosowania lizozymu do ograniczenia wzrostu *A. acidoterrestris* w sokach owocowych. Dodatek lizozymu w ilości 0,125 i 0,075 mg/cm³ powodował redukcję liczby przetrwalników *A. acidoterrestris* o 5,1 log jtk/cm³ w soku jabłkowym i o 4,4 log jtk/cm³ w soku pomidorowym, co zapewniało 30-dniową trwałość soków przechowywanych w temp. 43 °C. Lizozym w ilości 0,025 mg/dm³ powodował redukcję bakterii o 5,1 log jtk/cm³ w soku jabłkowym i o 3,8 log jtk/cm³ w soku pomidorowym. Soki z dodatkiem 0,025 mg/dm³ lizozymu wykazywały trwałość w okresie 30-dniowego przechowywania w temp. 43°C [11].

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na to, że polskie szczepy *A. acidoterrestris* są bardziej odporne na działanie lizozymu niż szczepy amerykańskie badane przez Hartman [11].

Z uwagi na stwierdzoną dużą bioróżnorodność szczepów *A. acidoterrestris*, w praktyce produkcyjnej należałoby stosować dawki biokonserwantów hamujące rozwój najbardziej opornych szczepów: 0,2 mg lizozymu/cm³ soku lub 1500 IU nizyny/cm³ soku, co przekracza dawkę dopuszczoną przez FDA. Dodatkowym problemem może być wyczuwalny w soku jabłkowym, przy tak wysokiej zawartości nizyny, lekko słony posmak wynikający z obecności chlorku sodu jako składnika preparatów nizyny.

Wnioski

1. Nizyna wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii *Alicyclobacillus acidoterrestris*.
2. Nizyna skutecznie ogranicza wzrost przetrwalników *A. acidoterrestris* w pasteryzowanych sokach jabłkowych w trakcie ich przechowywania, nawet w podwyższonej temperaturze.
3. Lizozym wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do przetrwalników i komórek wegetatywnych bakterii *A. acidoterrestris*, przy czym komórki wegetatywne są bardziej odporne na jego działanie.
4. Skuteczność lizozymu w soku jabłkowym jest mniejsza niż w pożywce hodowlanej, dlatego dla zapewnienia trwałości soków jabłkowych potrzebne są wyższe dawki lizozymu niż wyznaczone eksperymentalnie w pożywce wartości MIC.

Literatura

- [1] Alpas H., Alma L., Bozoglu F.: Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juice by high hydrostatic pressure. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **19**, 619-623.
- [2] Ash M., Ash I.: *Handbook of Food Additives. An international guide to more than 7,000 products by trade name, chemical, function, and manufacturer.* Published by: Gower Publishing Limited. Cornwall, England, 1995.
- [3] Bahçeci K.S., Acar J.: Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **120** (3), 266-273.
- [4] Baumgart J.: Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In: *Handbook of culture media for food microbiology. Progress in industrial microbiology vol. 37.* Ed. by J.E.L. Corry, G.D.W Curtis, R.M. Baird. Amsterdam: Elsevier, 2003, pp. 161-166.
- [5] Baumgart J., Husemann M., Schmidt C.: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: Vorkommen, Bedeutung und Nachweis in Getränken und Getränkegrundstoffen. *Fluss. Obst*, 1997, **64** (4), 178-180.
- [6] Bevilacqua A., Corbo M.R., Buonocore G.G., Del Nobile M.A., Sinigaglia M.: Antimicrobial effectiveness of lysozyme against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Adv. Food Sci.*, 2007, **29**, 47-52.

- [7] Borlinghaus A., Engel R.: Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies and validation. *Fruit Process.*, 1997, **7** (7), 262-266.
- [8] Gao Y.C., Zhang G., Krentz S, Darius S., Power J., Lagarde G.: Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian J. Grape and Wine Res.*, **8** (1), 76-83.
- [9] Gocmen D., Elston A., Williams T., Parish M. and Housett R.L.: Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Lett. in Appl. Microbiol.*, 2005, **40**, 172-177.
- [10] Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocynty – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, 2005, **1** (68), 114-130.
- [11] Hartman A.D.: The efficacy of antimicrobials for the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit and vegetable juice. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science and Technology. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blackburg, Virginia, 2003. Dost. on-line: <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-06252003-133915/unrestricted/hartmanthesis.pdf>
- [12] IFU Method No 12, September 2004/revised March 2007. Method on the Detection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juices.
- [13] Jensen N., Whitfield F.B.: Role of *Alicyclobacillus acidoterresris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **36**, 9-14.
- [14] Komitopoulou E., Boziaris I.S., Davies E.A. Delves-Broughton J., Adams M.R.: *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1999, **34**, 81-85.
- [15] Lee S.Y., Chung H.J., Kang D.H.: Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate. *J. Food Protect.*, 2006, **69** (5), 1056-1060.
- [16] Lee S.Y., Dougherty R.H., Kang D.H.: Inhibitory effect of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 4158-4161.
- [17] Maldonado M.C., Belifiore C., Navarro A.R.: Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **35**, 141-144.
- [18] Niwa M., Kawamoto A.: Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. *Fruit Process.*, 2003, **13** (2), 102-107.
- [19] Orr R.V., Shewfelt R.L., Huang C.J., Tefera S., Beuchat L.R.: 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 Prot.*, 2000, **11**, 1517-1522.
- [20] Peña W.E.L., de Messaguer P.R.: Use of artificial neural networks for modeling survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 in apple juice. 20th Intern. ICFMH Symposium Food Micro, Bologna, Italy, 2006, august 29 – september 2, p. 527.
- [21] Pettipher G.L., Osmundson M.E., Murphy J.M.: Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestis* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett Appl. Microbiol.*, 1997, **24**, 185-189.
- [22] Silva F.V.M., Gibbs P., Vieira M. C., Silva C.L.M.: Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **51** (2/3), 95-103.
- [23] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Ciepłooporność przetrwalników *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2008, **12**, 22-27.
- [24] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Wpływ kwasów organicznych na kiełkowanie i wzrost populacji szczepów *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 2009, t. **64**, 66-76.

- [25] Sokołowska B., Łaniewska-Trokenheim Ł., Niezgoda J., Bytońska M.: Wpływ konserwantów na rozwój *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2010, **4**, 18-20.
- [26] Splittstoesser D.F., Churey J.J., Lee C.Y.: Growth characteristic of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Protect., 1994, **57** (12), 1080-1083.
- [27] Thomas L.V., Delves-Broughton J.: Nisin. In: Antimicrobials in food. Ed. by Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L., 3-rd ed. Taylor & Francis Group. Boca Raton, USA, 2005, pp. 237-274..
- [28] Walczak P.: Podstawy genetyczne produkcji bakteriocyn przez bakterie fermentacji mlekowej. W: Bakterie fermentacji mlekowej. Klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie. Red. Z. Libudzisz, P. Walczak, J. Bardowski. Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź 1998.
- [29] Walker M., Phillips C.A.: The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. Food Control, 2008, **19** (10), 974-981.
- [30] Yamazaki K., Murakami M., Kawai Y., Inoue N., Matsuda T.: Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiol., 2000, **17**, 315-320.

EFFECT OF NISIN AND LYSOZYME ON GROWTH OF *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* STRAINS AND POTENTIAL TO USE THOSE COMPOUNDS AS BIO-PRESERVATIVES IN APPLE JUICE

S u m m a r y

Acidothermophilic and spore-forming bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris* can cause pasteurized fruit and vegetable juices to spoil.

The effectiveness was examined of nisin and lysozyme used as natural preservatives to prevent apple juice from being spoiled by those bacteria.

For each of the eight strains studied, a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) level of nisin and lysozyme contained in the culture medium was determined. Depending on the strain, the MIC value of nisin was from 100 IU/cm³ to 1500 IU/cm³ of medium with regard to spores, and, with regard to vegetative forms, the MIC value ranged from 50 IU/cm³ to 1250 IU/cm³ of medium. The lysozyme prevented *A. acidoterrestris* spores from growing at a concentration level from 0.005 mg/cm³ to 0.2 mg/cm³ of medium, and the growth of vegetative cells was inhibited by the lysozyme at a concentration level ranging from 0.05 mg/cm³ to 0.2 mg/cm³ of medium.

The results of the apple juice shelf life tests performed showed that the nisin was effective at the concentration levels equal to MIC. The growth of seven *A. acidoterrestris* strains was inhibited during their 28 day incubation period. The lysozyme at the concentration levels equal to MIC values guaranteed the durability of juice samples only during a period between 7 and 21 days.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, apple juice, nisin, lysozyme ☒