

JAN ICIEK, ILONA BŁASZCZYK, AGNIESZKA PAPIEWSKA

INAKTYWACJA SPOR *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* W OBECNOŚCI WYBRANYCH KWASÓW ORGANICZNYCH

Streszczenie

W pracy podjęto analizę wpływu kwasu cytrynowego lub octowego na termiczną inaktywację spor *Geobacillus stearothermophilus*. Przetrwalniki zawieszano w roztworze tryptonu lub w soku z buraków ćwikłowych. Roztwór tryptonu (naturalne pH - 7,1) zakwaszono kwasem organicznym do wartości pH: 6,0; 5,0 i 4,0, natomiast sok z buraków ćwikłowych (naturalne pH - 5,8) do pH: 5,0 i 4,0. Termiczną sterylizację prowadzono w zakresie temperatury 115-125°C.

Stwierdzono, że w roztworze tryptonu wpływ obu kwasów na szybkość inaktywacji przetrwalników jest podobny, natomiast w soku z buraków ćwikłowych ma znaczenie rodzaj kwasu. Obecność kwasu octowego oddziaływała silniej niż kwasu cytrynowego.

Potwierdzono, że często występuje trójetażowy charakter krzywych przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* obecnych w środowiskach, co powoduje, że wyznaczenie czasu ich dziesięciokrotnej redukcji jest utrudnione.

Słowa kluczowe: sterylizacja termiczna, *Geobacillus stearothermophilus*, kwasy organiczne

Wprowadzenie

Konsumenci wymagają od producentów żywności o przedłużonym terminie przydatności do spożycia i wygodnej w użyciu. W celu otrzymania produktów spełniających te cechy odpowiednią metodą utrwalania jest proces sterylizacji termicznej. Nowe metody utrwalania żywności, takie jak: promieniowanie jonizujące, wysokie ciśnienie, pulsujące pole elektryczne wysokiego napięcia, ultradźwięki nie zastąpią metody cieplnej. Wymienione metody mogą znaleźć zastosowanie jedynie do uzyskania efektu pasteryzacji ograniczonej grupy produktów żywnościowych.

Sterylizacja cieplna pozwala na zniszczenie przetrwalnych form mikroorganizmów, które stwarzają największe trudności w uzyskaniu jałowych produktów. Do

wyjątkowo opornych na działanie temperatury należą przetrwalniki termofilnych bakterii *Geobacillus stearothermophilus* i dlatego jest to najczęściej stosowany organizm testowy przy doborze warunków termicznej sterylizacji żywności [1, 7, 8, 9, 10]. Inaktywacja wysoce ciepłoopornych spor *Geobacillus stearothermophilus* zapewnia efektywne przeprowadzenie procesu sterylizacji, co z kolei gwarantuje bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności poddanej obróbce cieplnej.

Przebieg termicznej inaktywacji populacji drobnoustrojów jest procesem złożonym. Na jego szybkość wpływają parametry obróbki cieplnej (temperatura, czas) oraz skład surowca utrwalanego metodą cieplną. Niektóre składniki środowiska poddanego działaniu wysokiej temperatury mogą modyfikować przebieg procesu inaktywacji drobnoustrojów. Szczególnie ważna jest analiza możliwości wykorzystania substancji, które wpływają na obniżenie ciepłooporności spor, powodując przyspieszenie ich destrukcji. Takie składniki można wykorzystać w celu zmniejszenia dawki ciepła i ograniczenia negatywnych zmian środowiska, wywołanych działaniem wysokiej temperatury.

Zabiegiem często wykorzystywanym w przemyśle żywnościowym, który ułatwia proces termicznego niszczenia mikroorganizmów, jest dokwaszenie środowiska poddanego utrwalaniu. Obniżenie wartości pH żywności pozwala na zmniejszenie dawki ciepła, z jednoczesnym zachowaniem efektu skutecznej sterylizacji. Przyspieszenie inaktywacji mikroorganizmów spowodowane spadkiem wartości pH medium poddanego działaniu podwyższonej temperatury wykazano zarówno w środowiskach modelowych (bufory [6] i roztworach tryptonu z dodatkiem kwasu [5]), jak i w specjalnie sporządzonych mieszankach. Skład tych mieszanin korelował ze składem chemicznym wybranych produktów spożywczych [1, 7, 8, 9, 10].

W literaturze przedmiotu spotyka się opinię, że również rodzaj kwasu znajdującego się w sterylizowanym środowisku nie pozostaje bez znaczenia. Lynch i Potter [7] określili wpływ typu kwasu na tempo termicznej inaktywacji spor *Bacillus coagulans* zawieszonych w mieszance mięsnej dokwaszonej różnymi kwasami. Analizy prowadzili w temperaturze 105°C. Autorzy uporządkowali wpływ kwasów użytych do dokwaszenia według następującej kolejności: octowy > mlekowy > jabłkowy > cytrynowy. Wpływ kwasów na przebieg termicznej inaktywacji przetrwalników podczas sterylizacji żywności jest oceniany najczęściej na podstawie czasu dziesięciokrotnej redukcji komórek danej populacji [5, 7]. Parametr ten, określający ciepłooporność spor bakteryjnych, wyznaczany jest z prostoliniowego odcinka krzywej ich śmierci cieplnej. Autorzy prezentowanych badań uważają, że w przypadku krzywoliniowych przebiegów krzywych przeżycia, parametr ten nie jest wystarczający. Złożony charakter krzywych śmierci cieplnej jest efektem termicznej inaktywacji populacji spor zawierającej osobniki o różnym poziomie ciepłooporności [3]. W takim przypadku wyznaczenie czasu sterylizacji jedynie na podstawie czasu dziesięciokrotnej redukcji jest błędne.

W literaturze brak jest opinii dotyczących wpływu składu środowiska na działanie kwasów w procesie termicznej inaktywacji ciepłoopornych spor bakterii z jednoczesnym uwzględnieniem występowania w populacji osobników o różnorodnej wrażliwości termicznej. Wpływ kwasów na inaktywację przetrwalników jest oczywisty, ale jednocześnie nie jest poznane ich oddziaływanie na etap aktywacji spor uśpionych i na opóźnioną aktywację spor „głęboko uśpionych” nazywaną „ogonowaniem” krzywych przeżycia.

Wyznaczono następujące cele badań:

- analiza wpływu środowiska na oddziaływanie kwasów organicznych na termiczną inaktywację ciepłoopornych przetrwalników, z uwzględnieniem wszystkich zjawisk zachodzących w tym procesie, szczególnie poszukiwano warunków eliminujących zjawisko „ogonowania” na krzywej przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus*,
- porównanie wpływu dwóch kwasów organicznych na przebieg termicznej inaktywacji przetrwalników,
- wykazanie, że parametr D nie jest w pełni wystarczającym narzędziem do ustalania warunków sterylizacji.

Materiały i metody badań

Materiałem biologicznym stosowanym w badaniach był szczep *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149. Przetrwalniki otrzymano stosując procedurę opisaną przez Kim i Naylor [4], uzyskując zawiesinę o gęstości 10^8 przetrwalników w 1 cm^3 . Formy wegetatywne komórek niszczone przez ogrzewanie zawiesiny w temp. 80°C przez 10 min. Tak otrzymaną zawiesinę przetrwalników przechowywano w temp. 4°C przez okres prowadzenia eksperymentów.

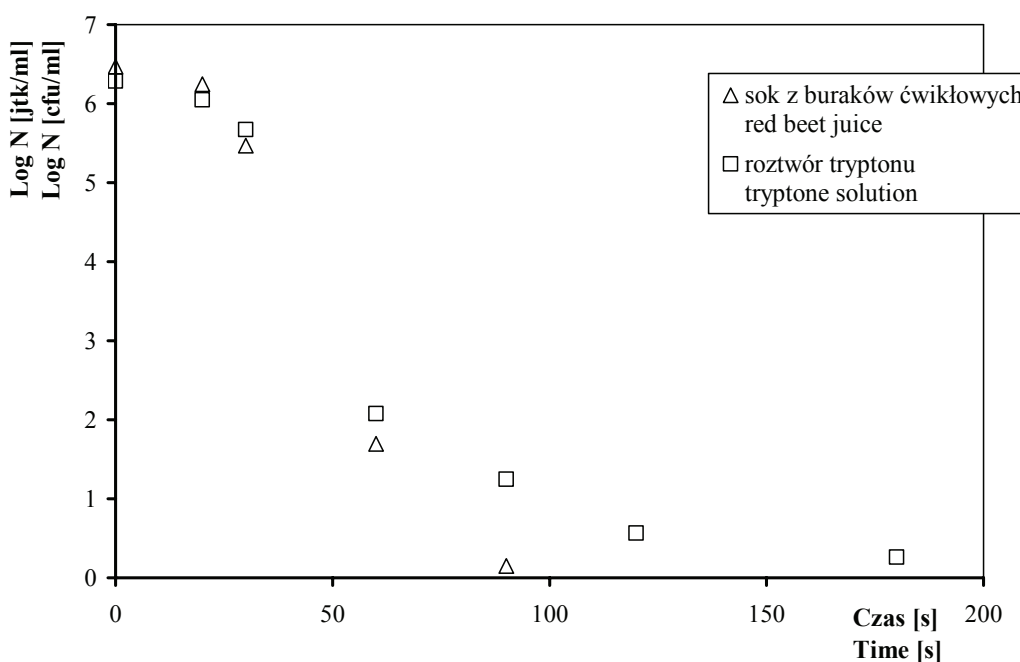
W celu zbadania przeżywalności przetrwalników badanego szczepu zawieszano je w 5% roztworze tryptonu o znacznych właściwościach buforujących oraz w soku z buraków ćwikłowych. Początkowa wartość pH roztworu tryptonu i soku z buraków ćwikłowych wynosiła odpowiednio 7,1 oraz 5,8. W zależności od wymaganego w eksperymencie poziomu pH, roztwór tryptonu zakwaszono kwasem cytrynowym lub kwasem octowym do wartości pH: 6,0; 5,0 i 4,0 natomiast sok z buraków ćwikłowych do pH: 5,0 i 4,0.

Obróbkę cieplną realizowano w kapilarach szklanych, w zakresie temp. $110\text{--}125^\circ\text{C}$.

Liczbę przeżywających spor (N) oznaczano metodą płytkową na pożywce regeneracyjnej, wykonując jednocześnie od 4 do 6 posiewów w poszczególnych punktach czasowych ogrzewania.

Wyniki i dyskusja

Wykonane eksperymenty potwierdziły, że skład środowiska, w którym zawieszono przetrwalniki wywierał bardzo istotny wpływ na przebieg ich inaktywacji. Na podstawie krzywych przeżycia wykreślonych w skali półlogarytmicznej stwierdzono, że roztwór tryptonu powoduje opóźnienie procesu destrukcji przetrwalników w porównaniu ze środowiskiem soku z buraków ćwikłowych. Porównywalny poziom spor przeżyjących w temp. 125°C przy wartości pH 4,0 (kwas octowy) uzyskano w przypadku analiz przeprowadzonych w soku buraczanym w czasie prawie dwukrotnie krótszym w porównaniu z próbami wykonanymi z użyciem roztworu tryptonu (rys. 1). Takie wydłużenie procesu inaktywacji przetrwalników zawieszonych w roztworze tryptonu było najprawdopodobniej wynikiem znacznej ilości substancji białkowych obecnych w tym środowisku, działających ochronnie na przeżycie mikroorganizmów podczas sterylizacji.



Rys. 1. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* w temp. 125°C w środowiskach zakwaszonych kwasem octowym do pH 4,0.

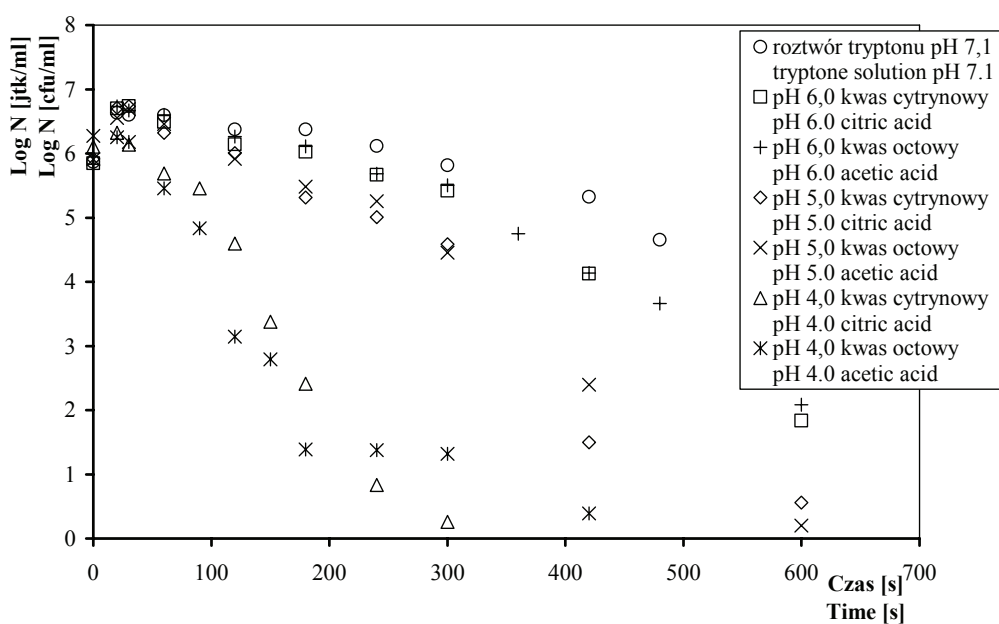
Fig. 1. Survivor curves for *Geobacillus stearothermophilus* spores at the temperature 125°C in the media acidified with acetic acid to pH 4,0.

Szybszy przebieg procesu inaktywacji spor w dokwaszonym soku z buraków ćwikłowych w porównaniu z zakwaszonym roztworem tryptonu (np. 125°C, pH 4,0) dowodzi, że niezbędna jest weryfikacja wyników badań w środowisku naturalnym.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że skład środowiska, w którym obecne są przetrwalniki wywiera wpływ na charakter krzywej śmierci cieplnej. Trój etapowy przebieg krzywych przeżycia zaobserwowano szczególnie w przypadku analiz przeprowadzonych w roztworze tryptonu (rys. 1). Na analizowany proces składają się: aktywacja przetrwalników w stanie uśpionia, destrukcja osobników już zaktywowanych oraz opóźniona inaktywacja spor głęboko uśpionych tzw. „ogonowanie” krzywych przeżycia (ang. curve tailing).

Złożony (krzywoliniowy) przebieg inaktywacji przetrwalników powoduje, że znajomość jedynie czasu ich dziesięciokrotnej redukcji może nie być wystarczająca do ustalenia prawidłowych warunków sterylizacji wymaganych do uzyskania skuteczności tego procesu.

Zaobserwowano, że zastosowanie kwasu octowego lub cytrynowego powodowało podobny przebieg termicznej inaktywacji spor bakterii *Geobacillus stearothermophilus* w środowisku modelowym, którym był roztwór tryptonu w zakresie temp. 115–125°C i przy różnej wartości pH 6,0; 5,0 i 4,0 (rys. 2).



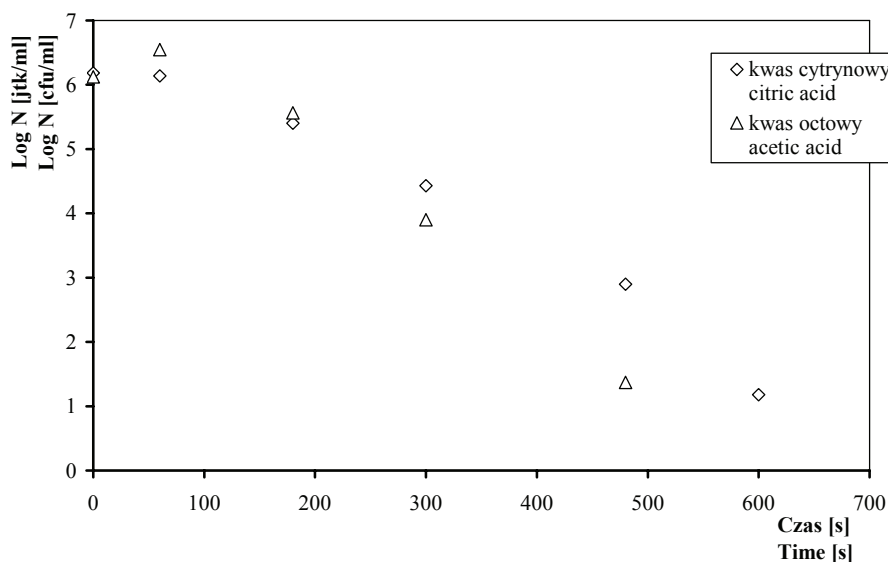
Rys. 2. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* przetrzymywanych w temp. 121°C w roztworze tryptonu o różnym poziomie pH.

Fig. 2. Survivor curves for *Geobacillus stearothermophilus* spores kept at the temperature 121°C in tryptone solution at different pH level.

Analiza wpływu typu kwasu na termiczną inaktywację przetrwalników w warunkach soku z burków ćwikłowych wykazała, że kwas octowy powodował przyspieszenie tego procesu w porównaniu z kwasem cytrynowym (rys. 3).

Na przykład poddawanie sterylizacji w temp. 115°C soku buraczanego dokwaszonego kwasem cytrynowym do pH 4,0 zredukowało po 8 min procesu liczbę spor do poziomu 10^2 jednostek tworzących kolonie, a w obecności kwasu octowego do poziomu 10^1 jtk. W literaturze przedmiotu panuje pogląd, że w żywności dokwaszonej różnymi kwasami, czynnikiem odpowiedzialnym za obniżanie ciepłoodporności spor *Geobacillus stearothermophilus* jest niezdysocjowana forma kwasu [7].

Badania własne potwierdziły tę tezę wykazując większą skuteczność termicznej inaktywacji przetrwalników w przypadku zastosowania kwasu octowego w porównaniu z cytrynowym, służących do zakwaszania środowiska naturalnego.



Rys. 3. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* w temp. 115°C w soku z buraków ćwikłowych dokwaszonym kwasem organicznym do pH 4,0.

Fig. 3. Survivor curves for *Geobacillus stearothermophilus* spores at 115°C in red beet juice acidified with organic acid to pH 4,0.

Wnioski

1. Wyniki badań prowadzonych w środowiskach modelowych wymagają weryfikacji w warunkach środowisk naturalnych np. w soku z buraków ćwikłowych.
2. Modyfikacja składu środowiska (np. dokwaszenie soku z buraków ćwikłowych) może ułatwiać aktywację spor „głęboko uśpionych”, co z kolei pozwoli eliminować zjawisko „ogonowania” w procesie sterylizacji.

3. Czas dziesięciokrotnej redukcji wyznaczany z odcinka prostoliniowego trójetapowych krzywych przeżycia przetrwalników zawieszonych w roztworze tryptonu nie odzwierciedla całego złożonego charakteru przebiegu inaktywacji spor i tym samym nie może być podstawą do ustalania warunków sterylizacji.
4. Skuteczniejszym dodatkiem jest kwas octowy w porównaniu z cytrynowym w soku z buraków ćwikłowych, co potwierdza pogląd przedstawiony w literaturze dotyczącej ułatwienia inaktywacji termicznej spor bakteryjnych pod wpływem niedysocjowanych cząsteczek kwasu.

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego Nr 2 P06T 016 30 realizowanego w latach 2006-2007.

Praca była prezentowana podczas XXXVII Ogólnopolskiej Sesji Komitetu Nauk o Żywności PAN, Gdynia 26-27.IX.2006.

Literatura

1. Fernandez P.S., Ocio M.J., Sanchez T., Martinez A.: Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract. J. Food Prot. 1994, **57** (1), 37-41.
2. Horubała A.: Nowoczesne metody utrwalania żywności – tendencje rozwojowe. Konf. Nauk. PTTŻ, Warszawa 1997.
3. Iciek J., Papiewska A., Molska M.: Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. J. Food Eng. 2006, **77**, 406-410.
4. Kim J., Naylor H.B.: Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Microbiol. 1966, **14** (4), 690-691.
5. Leguerinel I., Mafart P.: Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. Int. J. Food Microbiol., 2001, **63**, 29-34.
6. López M., González I., Condón S., Bernardo A.: Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. Int. J. Food Microbiol. 1996, **28**, 405-410.
7. Lynch D.J., Potter N.N.: Effects of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry. J. Food Prot. 1988, **51** (6), 475-480.
8. Rodrigo F., Fernández P.S., Rodrigo M., Ocio M.J., Martínez A.: Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* heated at high temperatures in different substrates. J. Food Prot. 1997, **60** (2), 144-147.
9. Rodrigo F., Rodrigo C., Fernández P.S., Rodrigo M., Martínez A.: Effect of acidification and oil on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in food substrate. Int. J. Food Microbiol. 1999, **52**, 197-201.
10. Tejedor W., Rodrigo M., Martínez A.: Modeling the combined effect of pH and temperature on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in multicomponent food extract. J. Food Prot. 2001, **64** (10), 1631-1635.

INACTIVATION OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPORES IN THE PRESENCE OF SELECTED ORGANIC ACIDS**S u m m a r y**

The effect of citric or acetic acid on thermal inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores is analyzed in this study. The spores were suspended in a tryptone solution or in red beet juice. The tryptone solution (natural pH – 7.1) was acidified with organic acid to the pH values of 6.0, 5.0, 4.0, while the red beet juice (natural pH – 5.8) to the pH values of 5.0 and 4.0. Thermal processing was performed in glass capillaries at the temperature ranging from 115 to 125°C.

It was found that the influence of both acids on the rate of spore inactivation in the tryptone solution was similar, while the type of acid was significant in the red beet juice and the presence of acetic acid had a stronger effect than citric acid.

It was confirmed that frequently three-stages were observed in the survivor curves for *Geobacillus stearothermophilus* present in the media which made the determination of decimal reduction time difficult.

Key words: thermal sterilization, *Geobacillus stearothermophilus*, organic acids ☒