

Wpływ połączonego działania wysokiego ciśnienia i innych czynników na mikroorganizmy*)

EDYTA MALINOWSKA-PAŃCZYK, ILONA KOŁODZIEJSKA

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,
ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I.

Combined effect of high pressure and other antimicrobial factors on inactivation of microorganisms

Summary

High pressure can be used as an alternative for inactivation of microorganisms to traditional, thermal methods. A high pressure technique has been already applied in the food industry, primarily to preserve acidic food products such as fruit juices and jams. However, this method does not guarantee a complete inactivation of microorganisms at moderate temperature in food with pH close to neutral. Therefore the possibility of using high pressure in connection with other antimicrobial factors has been studied, mainly with lysozyme, bacteriocins and CO₂. High pressure increases the bacteriostatic effect of bacteriocins on different vegetative cells of gram-negative and gram-positive bacteria and vice versa, the bacteriocins enhance the sensitivity of microorganisms to high pressure. Such increased inactivation of bacteria occurs also when the cells are treated by high pressure in the presence of pediocin AcH, but the degree of inactivation significantly depends on the species of microorganisms. A synergistic lethal effect in relation to gram-positive bacteria as well as to gram-negative bacteria has been observed due to the combined action of high pressure and lysozyme; however, the reduction in the number of viable cells was not higher than 1-2 log cycles. For inactivation of bacteria, bacterial spores, and fungi, treatment with CO₂ under pressure can be used. An increase in temperature and pressure favors the penetration of CO₂ through the cell membranes and lowers the internal pH, thereby inactivating the key enzymes participating in cell metabolism and in regulating processes. High pressure and ionizing radiation can be used to reduce the irradiation dose and thus prevent undesirable changes of food components.

Keywords: high pressure, microorganisms

Wysokie ciśnienie może być wykorzystane do inaktywacji mikroorganizmów jako alternatywna metoda do dotychczas stosowanych do tego celu tradycyjnych termicznych technik. Wpływ wysokiego ciśnienia na komórki drobnoustrojów jest złożony, a efekt działania ciśnienia zależy od wielu czynników, w tym od właściwości drobnoustrojów. Bakterie Gram-dodatnie i komórki znajdujące się w stacjonarnej fazie wzrostu są bardziej odporne na działanie podwyższonego ciśnienia niż bakterie Gram-ujemne i komórki będące w logarytmicznej fazie wzrostu. Różnice we wrażliwości pojawiają się już także pomiędzy szczepami w obrębie tego samego gatunku. Stopień inaktywacji mikroorganizmów pod wpływem wysokiego ciśnienia zależy również od jego wielkości i czasu działania, temperatury, w której odbywa się proces, a także od pH i składu chemicznego środowiska, w którym znajdują się drobnoustroje (2, 19, 27, 31).

Mikroorganizmy poddane działaniu wysokiego ciśnienia w żywności są bardziej odporne niż te znajdujące się w buforach. Wynika to z ochronnego efektu białek,

polisacharydów i lipidów, jaki wywierają te składniki na komórki mikroorganizmów. Przeżywalność mikroorganizmów w żywności traktowanej wysokim ciśnieniem wzrasta również w miarę obniżania aktywności wody, natomiast zwiększanie kwasowości potęguje bakteriobójcze działanie ciśnienia (2, 24, 26, 30). Z tego względu technika wysokociśnieniowa jest praktycznie wykorzystywana przede wszystkim do utrwalania żywności o kwaśnym odczynie, m.in. soków owocowych i dżemów. Nie gwarantuje ona natomiast w umiarkowanej temperaturze pełnej inaktywacji mikroorganizmów w produktach, których pH jest zbliżone do obojętnego. W związku z tym prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania do tego celu połączonego działania wysokiego ciśnienia z innymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi, m.in. z bakteriocynami, lizozymem, dwutlenkiem węgla bądź promieniowaniem jonizującym. Wysokie ciśnienie poprzez uszkodzenie ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej zwiększa wrażliwość komórek na różne czynniki chemiczne obecne w środowisku, na które mikroorganizmy normalnie nie reagują w warunkach ciśnienia atmosferycznego (5, 7, 8, 17-19, 21).

*) Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2003-2006 jako projekt badawczy.

Bakteriocyny

Wzbudzają one ciągle duże zainteresowanie jako naturalne substancje hamujące rozwój mikroorganizmów. Bakteriocyny są związkami białkowymi o masie cząsteczkowej od kilku do kilkudziesięciu kDa, wytwarzanymi przez wiele gatunków bakterii. Większość z nich działa jedynie na bakterie blisko spokrewnione z wytwarzającymi je organizmami. Niemniej jednak, niektóre bakteriocyny są zdolne także do antagonistycznego oddziaływania na bakterie niespokrewnione z tymi, które je syntetyzują (17, 18).

Większość bakteriocyn nie działa na bakterie Gram-ujemne, drożdże i pleśnie. Wykazano, że wysokie ciśnienie poszerza spektrum działania bakteriocyn w stosunku do różnych bakterii wegetatywnych i odwrotnie, bakteriocyny powodują wzrost wrażliwości mikroorganizmów na działanie wysokiego ciśnienia (13, 17, 18).

Najlepiej poznaną bakteriocyną jest nizyna, którą wytwarzają szczepy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Bakteriocyna ta skutecznie niszczy wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich i działa jak kationowe związki powierzchniowo czynne. Uszkadza ona błonę komórkową mikroorganizmów i w ten sposób prowadzi do utraty przez nie znacznych ilości jonów potasu, kwasu glutaminowego, lizyny oraz ATP. Nizyna nie wykazuje działania przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii Gram-ujemnych i drożdży. Dodatek nizyny do zawiesiny bakteryjnej zwiększa jednakże efekt letalny wysokiego ciśnienia zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, przede wszystkim jednak wówczas, gdy proces jest prowadzony w temperaturze poniżej 15°C (33). Na przykład połączone działanie ciśnienia 200 MPa i nizyny w stężeniu 0,5 µg/ml na szczep *Lactobacillus plantarum* w temp. 10°C zmniejsza liczbę komórek o ok. 5 rzędów wielkości, podczas gdy samo ciśnienie nie wywiera żadnego wpływu na przeżywalność tych bakterii, a sama nizyna powoduje obniżenie liczby komórek jedynie o ok. 0,5 rzędu wielkości (33). Dane te wskazują na znaczący efekt synergiczny, gdy te dwa czynniki stosowane są łącznie. Wykazano również, że inaktywacja drobnoustrojów na skutek działania wysokiego ciśnienia i dodatku nizyny jest większa w pH 4-5 niż w pH 6-7 (30).

Spotęgowany efekt letalny występuje również w przypadku połączonego działania ciśnienia i pediocyny AcH, przy czym zależy on znacząco od gatunku bakterii. Komórki *Staphylococcus aureus* oraz *Leuconostoc mesenteroides* w obecności pediocyny AcH w stężeniu powyżej 3000 AU/ml nie były wykrywane po 5 min. działania ciśnienia 345 MPa w 25 i 50°C. W tych warunkach stopień inaktywacji bakterii *E. coli*, *Lactobacillus sake*, *Listeria monocytogenes* był mniejszy i wynosił tylko odpowiednio o ok. 0,5; 1,1 i 2,1 rzędu wielkości więcej w porównaniu z efektem, jakie wywoływało działanie samego ciśnienia. Wyższy

poziom inaktywacji uzyskano przy użyciu wysokiego ciśnienia oraz mieszaniny nizyny i pediocyny AcH (19).

Skuteczność połączonego działania wysokiego ciśnienia i bakteriocyn jest mniejsza w produktach żywnościowych, co jest spowodowane ochronnym działaniem białek, lipidów i innych składników odżywczych oraz wiązaniem się przeciwdrobnoustrojowych substancji z tymi składnikami (11).

Enzymy przeciwdrobnoustrojowe

Lizozym. Według Düring i wsp. (4), lizozym działa na komórki mikroorganizmów w dwojaki sposób, zależny od tego, w jakiej formie się on znajduje: natywnej lub zdenaturowanej. Aktywność enzymatyczna niezdenaturowanego lizozymu polega na oddziaływaniu z peptydoglikanem, co prowadzi do lizy lub w przypadku komórek w trakcie podziału do hamowania biosyntezy ściany komórkowej. Bakterie Gram-ujemne są z reguły odporne na działanie tego enzymu w warunkach ciśnienia atmosferycznego, ponieważ warstwa peptydoglikanu, będącego substratem dla lizozymu, jest osłonięta zewnętrzną błoną zbudowaną z białek, lipopolisacharydów i hydrofobowych peptydów. Zniszczenie bądź rozluźnienie tej zewnętrznej warstwy np. przez EDTA lub proteiny zazwyczaj czyni bakterie Gram-ujemne wrażliwe na działanie lizozymu. Zwiększenie przepuszczalności zewnętrznej błony, pozwalające na swobodne przenikanie enzymu do warstwy mureinowej, możliwe jest również poprzez działanie na komórki podwyższonym ciśnieniem.

Przeciwdrobnoustrojowa, nieenzymatyczna aktywność lizozymu ujawnia się po jego częściowej denaturacji (4, 20, 22, 25). Jest ona nawet wyższa od tej, jaką wykazuje natywny lizozym działający jako enzym (4, 25). Przeciwdrobnoustrojowe działanie zdenaturowanego lizozymu związane jest z amfipatycznym charakterem jednego z czterech peptydów (α 4), znajdującego się w C-końcu cząsteczki lizozymu. Dzięki zmianom konformacyjnym fragment ten wnika do wnętrza błon, gdzie jego dodatnio naładowane reszty aminokwasów reagują z ujemnie naładowanymi składnikami tych błon. W konsekwencji reakcje te prowadzą do ich uszkodzenia i śmierci komórki.

Zastosowanie wysokiego ciśnienia w obecności lizozymu zwiększa efekt letalny zarówno w przypadku bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, ale tylko o ok. 1-2 rzędy wielkości (13, 23, 25, 26). Jednakże nie można wykluczyć, że rozwój drobnoustrojów może być hamowany podczas ich dalszego przechowywania.

Laktoperoksydaza. Jest to jeden z naturalnych enzymów mleka o szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowej aktywności. Sposób jej oddziaływania na komórki mikroorganizmów jest odmienny niż bakteriocyn czy lizozymu. Laktoperoksydaza katalizuje reakcję utlenienia tiocyjanianów (SCN^-) przez nadtlenki w nietrwałe, reaktywne związki, np. OSCN^- , które

następnie utleniają wiele biocząsteczek. Inaktywacja mikroorganizmów za pomocą laktoperoksydazy prawdopodobnie jest spowodowana utlenianiem enzymów i innych białek posiadających odsłonięte grupy tiolowe, w tym znajdujących się w błonach komórkowych. Reakcje te prowadzą do zakłóceń w prawidłowym funkcjonowaniu komórki wskutek zmian pH, utraty jonów K^+ , zahamowania transportu składników odżywczych, takich jak glukoza i aminokwasy. Stwierdzono, że laktoperoksydaza w mleku działa bakteriostatycznie na wiele bakterii, lecz nie powoduje inaktywacji *E. coli* i *Listeria innocua* (12). Z kolei w przypadku zastosowania ciśnienia 350 MPa w obecności laktoperoksydazy badane szczepy *L. innocua* były inaktywowane całkowicie, podczas gdy prawie wszystkie szczepy *E. coli* przeżywały w tych warunkach. Zatem efekt działania laktoperoksydazy i wysokiego ciśnienia może zależeć od gatunku mikroorganizmów, a ponadto, jak wykazali Garcia-Graells i wsp. (12), od składu środowiska, jego pH oraz od temperatury.

Dwutlenek węgla

Podwyższone ciśnienie w atmosferze dwutlenku węgla można stosować do inaktywacji bakterii i grzybów oraz do zwiększania stopnia zniszczenia przetrwalników. Krzywa inaktywacji pod wpływem podwyższonego ciśnienia i jednoczesnego działania CO_2 , zarówno w przypadku bakterii vegetatywnych, jak i przetrwalników przebiega w dwóch fazach. Wczesna faza charakteryzuje się powolną inaktywacją wynikającą z rozpuszczania cząsteczek CO_2 w fosfolipidach błony komórkowej. W drugiej fazie CO_2 przenika również do cytoplazmy, następuje silne zakwaszenie środowiska wewnątrz komórki, przez co przeżywalność mikroorganizmów drastycznie zmniejsza się. Wzrost ciśnienia lub temperatury skraca czas trwania pierwszej fazy i prowadzi do spotęgowania poziomu inaktywacji bakterii w fazie drugiej (1, 5, 7-9, 14, 32). Jest to wynikiem zwiększenia szybkości przenikania gazu do komórek. Ponadto wzrost temperatury zwiększa płynność błony komórkowej, ułatwiając tym samym penetrację CO_2 . Wysokie ciśnienie, podwyższając rozpuszczalność CO_2 , ułatwia jego kontakt z komórkami bakteryjnymi (5, 7, 8, 15, 16).

Zakwaszenie komórki wywołuje inaktywację wielu kluczowych enzymów potrzebnych do prawidłowego metabolizmu komórki i przebiegu procesów regulacji, tj. glikolizy, transportu aktywnego jonów lub przenoszenia protonów (5-7). Stwierdzono także, że po działaniu CO_2 pod ciśnieniem część magnezu i potasu zostaje uwolniona z komórek do środowiska (16). Z kolei Spilimbergo i wsp. (32) uważają, że powstające wewnątrz komórki jony CO_3^{2-} reagują z jonami wapnia i magnezu, tworząc nierozpuszczalne sole, co, według autorów, prowadzi do inaktywacji drobnoustrojów. CO_2 pod zwiększonym ciśnieniem może również ekstrahować z błon i ścian komórkowych istotne związki, m.in. fosfolipidy i związki hydrofobowe, za-

kłócając równowagę w systemie biologicznym i tym samym powodując inaktywację drobnoustrojów bez rozerwania ścian komórkowych (15, 16).

Mechanizm prowadzący do śmierci mikroorganizmów w warunkach podwyższonego ciśnienia i CO_2 nie jest jeszcze całkowicie poznany, gdyż samo zakwaszenie środowiska komórki nie zawsze jest odpowiedzialne za efekt letalny. Niektóre mikroorganizmy, w tym bakterie kwasu mlekowego, są zdolne do tolerowania niskiego pH przez długi czas i do przywracania homeostazy w komórce (15, 16).

Łączne działanie ciśnienia i CO_2 zwiększa stopień inaktywacji przetrwalników *Bacillus subtilis* i askospor *Byssoschlamys fulva* w temperaturze $80^\circ C$ oraz konidii *Aspergillus niger* w $50^\circ C$. Poniżej tych temperatur ciśnienie i CO_2 nie wywierają takiego wpływu na te formy mikroorganizmów (1). Podwyższona temperatura jest niezbędna do aktywacji kiełkowania przetrwalników i askospor, w wyniku czego stają się one wrażliwe na CO_2 penetrujący do komórek. Askospory *B. fulva* w atmosferze CO_2 tracą zdolność wytwarzania kwasów organicznych, takich jak kwas fumarowy lub mlekowy, odpowiedzialnych za ich ciepłooporność, co w konsekwencji jest przyczyną ich inaktywacji. Krzywa inaktywacji askospor *B. fulva* ma przebieg prostoliniowy, a szybkość inaktywacji wzrasta wraz ze wzrostem temperatury (1).

Promieniowanie jonizujące

Celem napromieniowania jest zwiększenie trwałości oraz zwiększenie bezpieczeństwa zdrowotnego żywności w wyniku zniszczenia szkodników, pasożytów i drobnoustrojów, zarówno patogennych, jak i powodujących psucie się żywności.

Prawie wszystkie formy vegetatywne bakterii patogennych są wrażliwe na promieniowanie. Nawet niewielkie dawki promieniowania – ok. 3 kGy – są wystarczające do ich zabicia. Jednak przetrwalniki bakterii nie są niszczone w tych warunkach. W celu całkowitej inaktywacji przetrwalników konieczne jest zastosowanie promieniowania od 10 do 50 kGy. Zbyt duże dawki sterylizacyjne obniżają jednak jakość napromienianych produktów poprzez wywoływanie niekorzystnych zmian chemicznych i sensorycznych (10, 29). Połączone działanie promieniowania i wysokiego ciśnienia pozwala zmniejszyć parametry w porównaniu do tych, które należałoby stosować w przypadku przeprowadzenia tylko jednego z tych procesów. W ten sposób pogorszenie cech sensorycznych, przede wszystkim smaku i zapachu, w utrwalonym produkcie może być zminimalizowane (3, 29). Paul i wsp. (28) stwierdzili, że bakterie z rodzaju *Staphylococcus* wprowadzone do mięsa baraniego w liczbie $10^4/g$ zostały zredukowane tylko o 1 rząd wielkości po zastosowaniu promieniowania 1 kGy lub ciśnienia 200 MPa. W przypadku łącznego zastosowania takiego ciśnienia i promieniowania cała populacja tych bakterii ulegała inaktywacji. Działanie wysokiego ciśnienia i pro-

mieniowania wpływało niszcząco także na przetrwalniki *Clostridium sporogenes* w mięsie kurcząt. Po podaniu tego mięsa tylko działaniu ciśnienia 690 MPa przez 20 min. liczba przetrwalników zmniejszyła się o ok. 5 rzędów wielkości. Ciśnienie powyżej 690 MPa nie powodowało dalszego zwiększenia stopnia inaktywacji. Z kolei po działaniu promieniowania 6 kGy liczba przetrwalników zmniejszyła się o ok. 1,5 rzędu wielkości. Zastosowanie promieniowania 6 kGy, a następnie ciśnienia ok. 690 MPa w temp. 80°C przez 20 min. spowodowało całkowitą inaktywację przetrwalników. Podobny efekt występował, gdy zawieszinę przetrwalników poddano najpierw działaniu ciśnienia, a następnie promieniowania (3).

Podsumowanie

Zastosowanie wysokiego ciśnienia i innych czynników przeciwdrobnoustrojowych pozwala na zwiększenie efektu letalnego wobec mikroorganizmów, chociaż nawet w takich warunkach trudno jest osiągnąć całkowitą ich inaktywację w umiarkowanych temperaturach. Przy ustalaniu parametrów procesu ciśnieniowej inaktywacji należy mieć na uwadze, że mikroorganizmy są znacznie mniej wrażliwe na niekorzystne warunki, gdy znajdują się w środowisku żywności oraz że nawet pomiędzy szczepami w obrębie jednego gatunku występuje duże zróżnicowanie ich wrażliwości. Z tego względu rozważyć należy wszystkie czynniki mogące mieć wpływ na przeżywalność mikroorganizmów, tj. zarówno skład jakościowy i ilościowy naturalnej mikroflory, jak również skład i odczyn produktu żywnościowego. Istotna jest też znajomość przeżywalności drobnoustrojów podczas przechowywania produktu utrwalonego przy użyciu połączonego działania ciśnienia i innego czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Uszkodzone przez ciśnienie komórki mogą bowiem być szczególnie wrażliwe na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowej również po zakończonym procesie i obumierać z czasem przechowywania produktu. Istnieje więc potencjalna możliwość doboru takich warunków, które pozwolą na pełną inaktywację mikroorganizmów w produkcie przy wykorzystaniu umiarkowanie podwyższonego ciśnienia i temperatury oraz optymalnej zawartości substancji przeciwdrobnoustrojowej.

Piśmiennictwo

1. Ballestra P., Cuq J. L.: Influence of pressurized carbon dioxide on the thermal inactivation of bacterial and fungal spores. *Lebens. Wissen. Tech.* 1998, 31, 84-88.
2. Cheftel J. C.: Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* 1995, 1, 75-90.
3. Crawford Y. J., Murano E. A., Olson D. G., Shenoy K.: Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *J. Food Prot.* 1996, 59, 711-715.
4. Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W.: The non-enzymatic microbial activity of lysozymes. *FEBS Lett.* 1999, 449, 93-100.
5. Erkmén O.: Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide. *Food Microbiol.* 2000a, 17, 225-232.
6. Erkmén O.: Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods. *Food Microbiol.* 2000b, 17, 589-596.
7. Erkmén O.: Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. *Lebens. Wissen. Tech.* 2000c, 33, 514-519.
8. Erkmén O., Karaman H.: Kinetic studies on the high pressure carbon dioxide inactivation of *Salmonella typhimurium*. *J. Food Eng.* 2001, 50, 25-28.
9. Erkmén O.: Kinetic analysis of *Listeria monocytogenes* inactivation by high pressure carbon dioxide. *J. Food Eng.* 2001, 47, 7-10.
10. Farkas D. F., Hoover D. G.: High pressure processing. Supplement. Kinetics of microbial inactivation for alternative food. Processing technologies. *J. Food Sci.* 2000, 1, 47-64.
11. Garcia-Graells C., Masschalck B., Michiels C.: Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high hydrostatic pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J. Food. Prot.* 1999, 62, 1248-1254.
12. Garcia-Graells C., Valckx C., Michiels C.: Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 4173-4179.
13. Hauben K. J. A., Bartlett D. H., Carine C., Soontjens F., Cornelis K., Wuytack E. Y., Michiels Ch. W.: *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 945-950.
14. Hekken Van D. L., Rajkowski K. T., Tomasula P. M., Tunick M. H., Holsinger V. H.: Effect of carbon dioxide under high pressure on survival of cheese starter cultures. *J. Food Prot.* 2000, 63, 758-762.
15. Hong S.-I., Park W.-S., Pyun Y.-R.: Inactivation of *Lactobacillus* sp. from kimchi by high pressure carbon dioxide. *Lebens. Wissen. Tech.* 1997, 30, 681-685.
16. Hong S.-I., Pyun Y.-R.: Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 63, 19-28.
17. Kalchayanand N., Frethem C., Dunne P., Sikes T., Ray B.: Hydrostatic pressure and bacteriocins – triggered cell walls lysis of *Leuconostoc mesenteroides*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2002, 3, 33-40.
18. Kalchayanand N., Sikes T., Dunne C. P., Ray B.: Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 4174-4177.
19. Kalchayanand N., Sikes T., Dunne C. P., Ray B.: Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 1998, 61, 425-431.
20. Kijowski J., Leśniewski G.: Separation, polymer formation and antibacterial activity of lysozyme. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 1999, 8, 3-16.
21. Knorr D.: Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* 1993, 47, 156-161.
22. Leśniewski G., Kijowski J.: Aktywność enzymatyczna lizozymu i jej wykorzystanie do utrwalania żywności. *Przem. Spoż.* 1995, 49, 116-119.
23. Lopez-Pedemonte T. J., Roig-Sagues A. X., Trujillo A. J., Capellas M., Guamis B.: Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 3075-3081.
24. Maggi A., Gola S., Rovere P., Miglioli L., Dall'Aglio G., Lonneborg N. G.: Effects of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. *Ind. Conserve* 1996, 71, 8-14.
25. Masschalck B., Garcia-Graells C., Van Haver E., Michiels C. W.: Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innov. Food Emerg. Technol.* 2000, 1, 39-47.
26. Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E., Michiels Ch.: Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denaturated lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 339-344.
27. Patterson M. F., Quinn M., Simpson R., Gilmour A.: Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food. Prot.* 1995, 58, 524-529.
28. Paul P., Chawala S., Thomas P., Kesavan P.: Effect of hydrostatic pressure and temperature, gamma-irradiation and combined treatments on the microbiological quality of lamb meat during chilled storage. *J. Food Safety* 1997, 16, 263-271.
29. Porzucek H.: Zastosowanie fizycznych metod nietermicznych do przedłużania trwałości żywności. *Przem. Ferment. Owocowo-Warzywny* 1998, 9, 24-27.
30. Roberts C. M., Hoover D. G.: Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *J. Appl. Bacteriol.* 1996, 81, 363-368.
31. Smelt J. P. P. M.: Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, 152-158.
32. Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucco A.: Microbial inactivation by high-pressure. *J. Supercrit. Fluids* 2002, 22, 55-63.
33. Steegter P. F., Hellemons J. C., Kok A. E.: Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure and reduced temperature on bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4148-415.

Adres autora: dr hab. inż. Iona Kołodziejka, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; e-mail: i.kolodziejka@chem.pg.gda.pl