

# Sporogeneza bakterii w aspekcie procesów biotechnologicznych

Zdzisława Libudziś<sup>1</sup>  
Helena Stobińska<sup>1</sup>  
Elżbieta Ołtuszak<sup>1</sup>  
Jan Iciek<sup>2</sup>

## 1. Wprowadzenie

Jałowość surowców i produktów spożywczych, a także środowisk fermentacyjnych decyduje o możliwości ich przechowywania oraz wykorzystania w procesach biotechnologicznych. Efekt wyjaławiania można uzyskać stosując metody sterylizacji termicznej bądź metody mechaniczne, takie jak filtracja czy też baktofugacja. Do sterylizacji żywności oraz środowisk fermentacyjnych najczęściej są stosowane metody termiczne.

Obróbka termiczna oddziałuje jednakże niszcząco nie tylko na drobnoustroje, lecz również na składniki chemiczne podłoża. Uzyskanie warunków pozwalających zniszczyć drobnoustroje zanieczyszczające środowisko, przy jednoczesnym zachowaniu jego pierwotnych właściwości odżywczych, wymaga zastosowania odpowiedniej temperatury i ściśle określonego czasu jej działania. Parametry te dla każdego procesu technologicznego muszą być wyznaczone indywidualnie. Dla doboru właściwych warunków obróbki termicznej konieczna jest znajomość kinetyki destrukcji drobnoustrojów oraz degradacji składników chemicznych sterylizowanych środowisk. Badania takie bardzo ułatwia znajomość fizjologii drobnoustrojów, a szczególnie bakterii przetrwalnikujących oraz zakresu ich oporności na wysoką temperaturę w zależności od składu chemicznego i natury fizycznej wyjaławianych środowisk.

Celem prezentowanego przeglądu literatury jest analiza czynników warunkujących ciepłooporność przetrwalników bakteryjnych w aspekcie optymalizacji warunków sterylizacji termicznej.

## 2. Sporogeneza i sporulacja

Zdolność tworzenia przetrwalników jest charakterystyczna dla bakterii należących między innymi do rodzajów *Bacillus* i *Clostridium*. Jest to cecha kodowana genetycznie, spowodowana aktywacją genów odpowiedzialnych za

<sup>1</sup> Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ

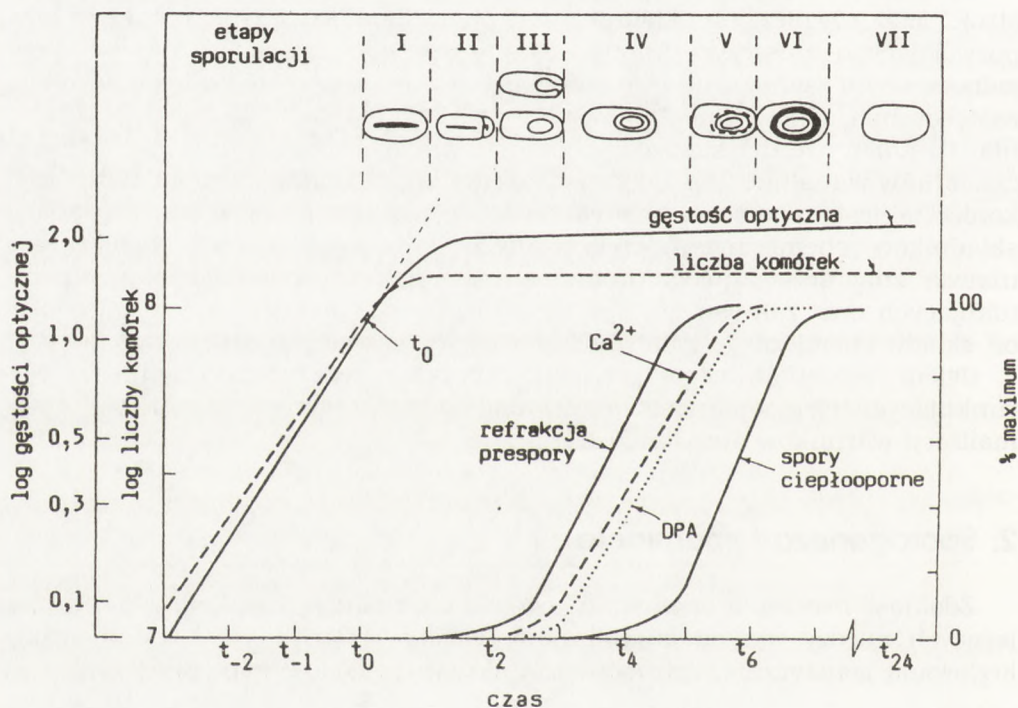
<sup>2</sup> Instytut Chemicznej Technologii Żywności PŁ

tę formę procesu różnicowania (15, 35, 38). Przetrwalniki są wytwarzane w normalnym cyklu życiowym tych bakterii, szczególnie intensywnie gdy występuje niedobór łatwo przyswajalnych składników pokarmowych (C, N, P) oraz nagromadzenie produktów przemiany materii (11, 15, 22, 39).

Czynnikami stymulującymi sporulację są ponadto temperatura i pH środowiska o wartościach zbliżonych do optymalnych dla komórki wegetatywnej, a także obecność w podłożu wzrostowym jonów manganu w ilości mniejszej niż 30 ppm oraz nieznaczna, ok. 0,05% zawartość glukozy (18, 34, 42). Stopień sporulacji *Bacillus stearothermophilus* może być podwyższony przez odpowiednie natlenienie środowiska hodowlanego (31, 35).

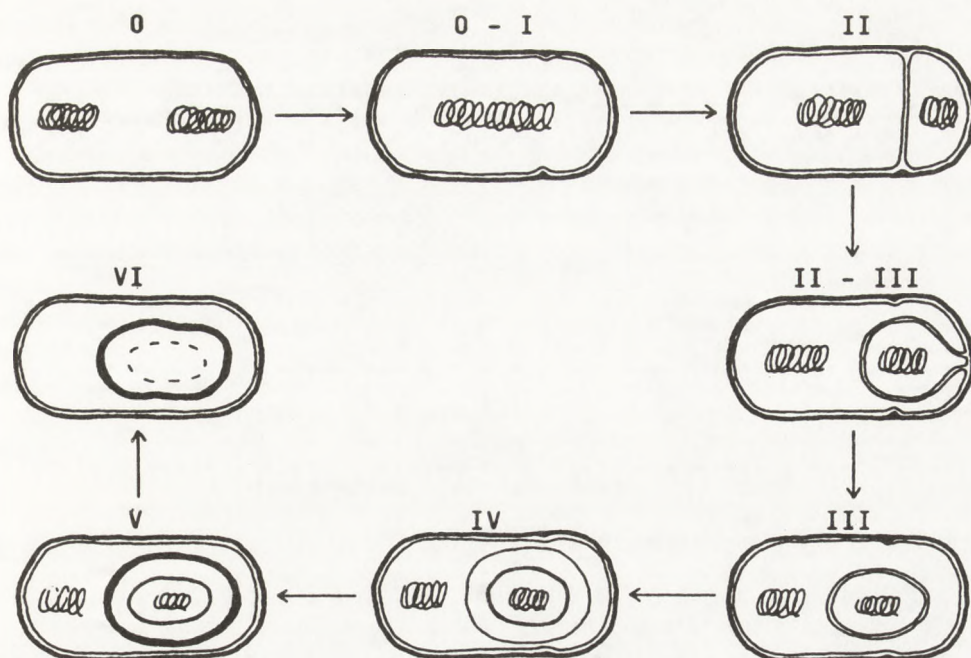
Sporulacja jest procesem złożonym. Obejmuje zmiany morfologiczne komórki, syntezę nowych struktur oraz specyficzne przemiany biochemiczne (33, 35). W procesie sporulacji wyróżnia się stadia morfologiczne obejmujące kolejno: tworzenie prespory, rozwój zewnętrznych osłon przetrwalnika oraz dojrzewanie przetrwalnika (15, 21, 33).

Proces sporulacji najdokładniej został zbadany dla bakterii rodzaju *Bacillus*. Po zakończeniu wzrostu wykładniczego i procesu replikacji DNA, komórka wchodzi w swoiste stadium sporulacji w tzw. „etap zerowy”. Nie podlega dalszemu podziałowi, lecz przestawia się na proces różnicowania. Indukowane



Rys. 1. Cykl rozwojowy i stadia przetrwalnikowania *Bacillus sp.* (wg 33).





Rys. 2. Zmiany morfologiczne w procesie sporulacji (wg 35).

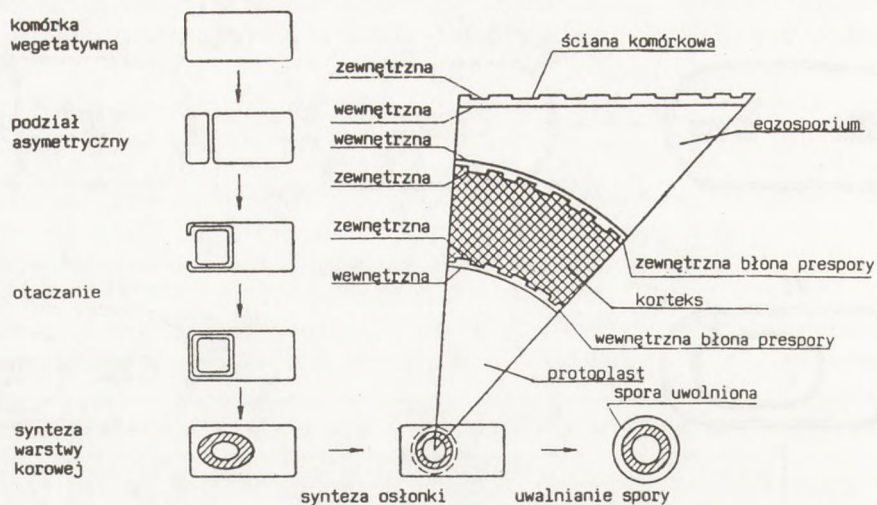
są wówczas enzymy cyklu Krebsa, a powstający acetylo-CoA, po całkowitym utlenieniu do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ , dostarcza komórce energię niezbędną dla procesu sporulacji (19, 23).

Kolejne stadia tworzenia przetrwalników przedstawiono na rys. 1 i 2.

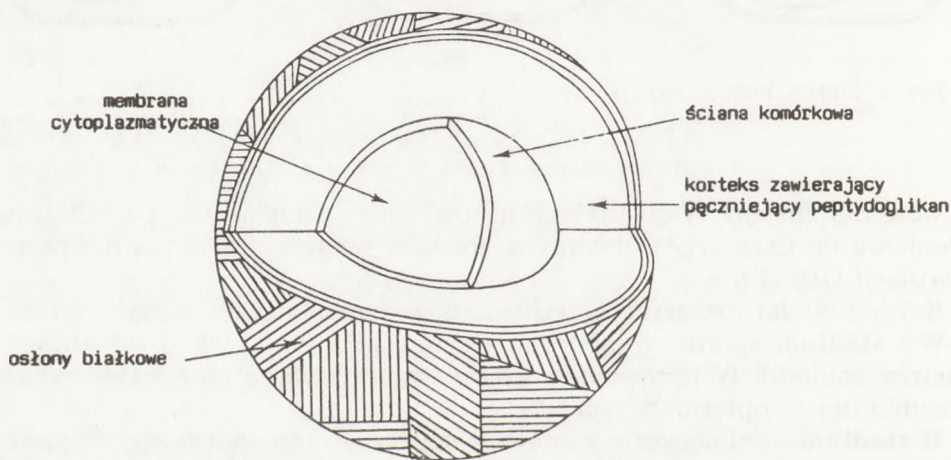
W **I stadium** sporulacji membrana cytoplazmatyczna lekko wpukła się do wnętrza komórki. W formowaniu przesłony uczestniczą mezosomy związane z membraną cytoplazmatyczną.

**II stadium** morfologiczne stanowi specyficzny etap sporulacji. W tym czasie DNA dzieli się na dwie części dając: genofor sporangium oraz genofor prespory — zlokalizowany w pobliżu bieguna komórki. Ultrastruktura powstałych genoforów odpowiada strukturze nukleoidu komórek znajdujących się w stadium zerowym. Wraz z pogłębiającą się inwaginacją membrany cytoplazmatycznej następuje podział komórki na presporę i sporangium.

W **III stadium** sporulacji, po wytworzeniu asymetrycznej przesłony, kończy się formowanie otoczenia genoforów. DNA prespory wraz z częścią cytoplazmy zostaje otoczony podwójną membraną, która całkowicie wydziela presporę na obszarze sporangium (rys. 2 i 3). Genofor skupiony w centrum protoplastu prespory składa się z luźno ułożonych włókienek DNA o długości 2 – 5 nm, podobnie jak w komórkach wegetatywnych (2).



Rys. 3. Schemat powstawania przetrwalnika (wg 21).



Rys. 4. Budowa przetrwalnika (wg 21).

W **IV i V stadium** sporulacji są wytwarzane koncentryczne, zewnętrzne osłony (rys. 3 i 4):

- 1) korteks — specyficzna, bezpostaciowa osłona o grubości około  $0,1 \mu\text{m}$ , zlokalizowana pomiędzy ścianą komórkową a wewnętrzną osłoną prespory,
- 2) ściana komórkowa otaczająca błonę cytoplazmatyczną przetrwalnika,
- 3) wewnętrzna i zewnętrzna osłona endospory zawierająca często blaszkowate struktury,



4) egzosporium — najbardziej zewnętrzna warstwa przylegająca do przetrwalnika lub u niektórych gatunków *Bacillus* po uwolnieniu przetrwalnika pozostająca w formie pustego woreczka (33).

W **V stadium** sporulacji materiał jądrowy znajduje się w pobliżu membrany przetrwalnika. Genofor jest bardziej uporządkowany niż w III stadium.

W **VI stadium** sporulacji przetrwalnik dojrzewa. W jego osłonach zachodzą charakterystyczne przemiany, z którymi wiąże się swoista oporność na niekorzystne czynniki środowiskowe. Przetwalnik staje się nieprzepuszczalny dla rozcieńczonych barwników zasadowych, silnie załamuje światło i odznacza się ciepłoopornością. W tym czasie ustają przemiany metaboliczne, co w konsekwencji prowadzi do stanu anabiozy. Dojrzewający przetrwalnik zawiera prawie homogeną cytoplazmę z nukleoidem umieszczonym w pobliżu membrany cytoplazmatycznej.

**VII etap** sporulacji jest zakończony lizą sporangium i uwolnieniem przetrwalnika.

### 3. Budowa chemiczna przetrwalników

Skład chemiczny przetrwalników znacznie różni się od składu chemicznego form wegetatywnych. Przetwalniki zawierają o ok. 40% więcej białka i prawie 4-krotnie mniej węglowodanów.  $\beta$ -hydroksymaślan mogący stanowić w komórkach wegetatywnych do 28,5% s.m. nie występuje w przetrwalnikach. Charakterystyczna dla przetrwalników jest natomiast obecność dipikolinianu wapnia w ilościach średnio 15% s.m. (tab. 1).

TABELA 1

SKŁAD CHEMICZNY KOMÓREK WEGETATYWNYCH I PRZETRWAŁNIKÓW *BACILLUS MEGATERIUM* (WG 43)

| Składniki               | Komórki wegetatywne<br>(% s.m.) | Przetwalniki<br>(% s.m.) |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| $\beta$ -hydroksymaślan | 28,5                            | 0                        |
| węglowodany             | 18,2                            | 4,84                     |
| białka (N x 6,25)       | 39,4                            | 68,0                     |
| dipikolinian Ca         | brak                            | 15,0                     |
| popiół                  | 9,1                             | 8,0                      |

Otoczające przetrwalnik osłony stanowią około 50% objętości i 40 – 60% s.m. (28, 30). Zbudowane są z 2 lub 3 warstw, których podstawowymi składnikami chemicznymi są białka. Zależnie od gatunku bakterii zawartość białek może wahać się od 35% (u *Bacillus megaterium*) (30) do 80% (u *Bacillus licheniformis*) (4). Osłony składają się ponadto z 1 – 3% popiołu, 0,3 – 2,8%



fosforu oraz zmiennych, od 0,9 do 7,2%, ilości lipidów (33). Białka osłon zawierają aż 20,2  $\mu\text{g}$  S (cystyna + cysteina)/mg N, a zatem podobne ilości jak keratyna włosów czy wełny. Ściana komórkowa form vegetatywnych zawiera zaledwie 10  $\mu\text{g}$  S (cysteina + cystyna)/mg N (28). Osłony są odporne na wiele substancji chemicznych, takich jak: 8 M mocznik, 8 M LiBr, 2 M  $\text{CaCl}_2$ , 98% kwas mrówkowy, 5% kwas trójchlorooctowy, jak również na substancje powierzchniowo czynne. Ta odporność wskazuje na obecność w ich strukturach stosunkowo stabilnych wiązań kowalencyjnych (44).

Osłony przetrwalników są ponadto odporne na działanie wielu enzymów proteolitycznych, lipolitycznych, lizozymu i fosfatazy (20, 28, 37, 44).

Warstwa korowa (korteks) przetrwalników, stanowiąca najgrubszą osłonę, zbudowana jest głównie z peptydoglikanu, w skład którego wchodzi zazwyczaj kwas diaminopimelinowy oraz kwas glutaminowy, alanina i acetyloheksozoamina (tab. 2).

TABELA 2  
SKŁAD PEPTYDOGLIKANU KORTEKSU BAKTERII Z RODZAJU *BACILLUS* (WG 33)

| Składniki   | Zawartość (proporcje molowe)       |                            |                          |                           |
|---|------------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus coagulans</i> |
| kwas $\alpha$ ,<br>$\epsilon$ -diamino-pimelinowy | 1                                  | 1                          | 1                        | 1                         |
| kwas glutaminowy                                  | 0,82                               | 0,91 - 1,18                | 1                        | 0,98                      |
| alanina   | 2,6                                | 2,2 - 3,1                  | 2,4                      | 2,5                       |
| heksozoaminy                                      | 1,9                                | 2,1                        | 2,4                      | nd                        |
| glicyna   | 0,08                               | 0,2                        | 0,26                     | 0,03 - 0,05               |

Korteks, podobnie jak osłony, jest odporny na działanie wielu enzymów i substancji chemicznych (45). Ściana komórkowa przetrwalników stanowiąca zewnętrzną błonę protoplastu jest zbudowana z peptydoglikanu i po wykiełkowaniu przetrwalnika staje się ścianą komórkową formy vegetatywnej. Protoplast przetrwalnika jest miejscem lokalizacji aparatu genetycznego komórki, RNA oraz licznych enzymów, w tym unikatowej syntetazy kwasu dipikolinowego. Rozpuszczalna frakcja protoplastu zawiera od 10 do 26% kwasu dipikolinowego (45). Zawartość DNA w przetrwalniku stanowi około 1% s.m., a zatem podobnie jak w komórce vegetatywnej. Zawartość RNA jest natomiast w przetrwalniku od 15 do 50% niższa (33). Jest to przyczyną podwyższenia proporcji DNA do RNA od 0,2 do 0,8, zależnie od gatunku bakterii. W komórkach vegetatywnych relacje te sięgają 0,05 - 0,4 (36). RNA przetrwalnika występuje w postaci rRNA (około 65%) i tRNA (około 35%). W dojrziałych przetrwalnikach nie stwierdza się obecności mRNA (3).



Przetrwalniki ponadto gromadzą znaczne ilości jonów, z których szczególnie istotne są jony  $\text{Ca}^{2+}$ , występujące z kwasem dipikolinowym w stosunku molowym 1 : 1.

#### 4. Ciepłooporność przetrwalników bakteryjnych

Przetrwalniki bakteryjne są wyjątkowo odporne na warunki środowiskowe, promieniowanie UV czy działanie substancji chemicznych. Najbardziej czułym miernikiem stopnia odporności przetrwalników jest jednak ich ciepłooporność. Do tej pory nie ma w pełni precyzyjnego wyjaśnienia mechanizmów powodujących zwiększenie oporności przy przejściu komórki ze stadium wegetatywnego do formy przetrwalnej, jak i przyczyn dużego zakresu stopnia ciepłooporności różnych gatunków i szczepów bakterii (16).

Wegetatywne komórki bakterii *Clostridium botulinum* typ E giną już w temperaturze  $45^{\circ}\text{C}$ , podczas gdy dla *Bacillus stearothermophilus* optymalna temperatura rozwoju wynosi  $50 - 55^{\circ}\text{C}$ , a maksymalna ok.  $75^{\circ}\text{C}$ . Znacznie drastyczniej różni się ciepłooporność przetrwalników tych bakterii. W środowisku o aktywności wodnej 0,9 – 1,0 wartość czasu decymalnej redukcji (D) w temperaturze  $110^{\circ}\text{C}$  jest dla przetrwalników *Bacillus stearothermophilus* o ok. 90 000 razy wyższa niż dla *Clostridium botulinum* E (33). Zazwyczaj gatunki termofilne tworzą przetrwalniki o wyższej ciepłooporności niż gatunki bakterii mezofilnych.

Wśród teorii wyjaśniających zasady ciepłooporności przetrwalników bakteryjnych obecnie największe uznanie zyskuje hipoteza kurczliwości korteksu. Współdecydującymi czynnikami jest obecność w cytoplazmie dipikolinianu wapnia oraz specyficznych ciepłoopornych białek enzymatycznych.

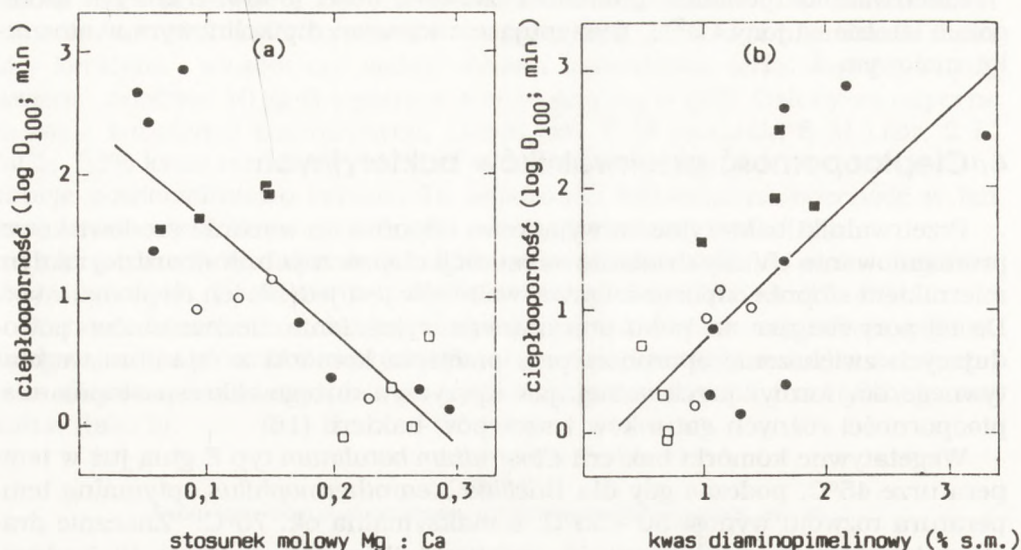
Zgodnie z tą teorią stan fizyczny, a więc obkurczanie i rozprężanie się warstwy korowej reguluje zawartością wody w protoplaście. Skład polimeru peptydoglikanu warstwy korowej z wieloma grupami karboksylowymi, jego rozgałęzienie i usieciowanie nadają mu charakter typowego jonowymieniacza zdolnego do pęcznienia i obkurczania się (16, 20, 33). Różnice w ciepłooporności pomiędzy poszczególnymi drobnoustrojami wynikają zatem z odmiennej budowy chemicznej peptydoglikanu. Potwierdzeniem tej teorii jest ścisła zależność pomiędzy zawartością kwasu diaminopimelinowego i stosunkiem  $\text{Mg}/\text{Ca}$  a ciepłoopornością drobnoustrojów (rys. 5).

Wykazano ponadto, że w sporach nienaruszonych korteks w stadium rozprężenia stanowi warstwę o grubości  $> 0,2 \mu\text{m}$ , podczas gdy w stadium obkurczania  $< 0,1 \mu\text{m}$  (33).

Zaletą tej teorii jest dostarczenie jednolitego wyjaśnienia nie tylko wzrostu oporności cieplnej przy przejściu komórki wegetatywnej w przetrwalną, lecz również różnic w ciepłooporności poszczególnych gatunków bakterii.

Bezpośrednia funkcja kwasu dipikolinowego nie jest w dalszym ciągu w pełni wyjaśniona. Znane są bowiem szczepy (mutanty), których przetrwalniki, pomimo iż nie zawierają kwasu dipikolinowego, są w pełni odporne na





Rys. 5. Zależność ciepłooporności i chemicznego składu przetrwalników *Bacillus sp.* (wg 33).

podwyższoną temperaturę (24). Uważa się jednakże, że zadaniem tego związku jest ochrona białek protoplastu przed denaturacją dzięki tworzeniu usieciowanej żelowej struktury z wapniem (16, 33). Spełnia on ponadto funkcje buforujące oraz magazynowania jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Podczas kiełkowania, gdy przetrwalniki stają się wrażliwe na temperaturę, wapń jest przemieszczany do warstwy korowej, gdzie zobojętnia ujemne grupy peptydoglikanu powodując obniżenie ciśnienia osmotycznego i uwodnienie protoplastu (20).

## 5. Czynniki warunkujące ciepłooporność przetrwalników

Stopień ciepłooporności przetrwalników bakteryjnych warunkują 4 grupy czynników:

- właściwości szczepu oraz warunki otrzymania przetrwalników,
- sposób przechowywania zawiesiny,
- parametry procesu ogrzewania,
- metoda pomiaru ilości przeżywających przetrwalników.

Do najbardziej ciepłoopornych należą przetrwalniki bakterii *Bacillus stearothermophilus*. Dla większości szczepów tego gatunku wartości  $D_{121}$  wynoszą od 200 – 400 s (5) i są znacznie wyższe niż dla innych bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* (tab. 3). Równie duże różnice ciepłooporności stwierdza się wśród szczepów należących do tego samego gatunku.



TABELA 3  
CIEPŁOOPORNOŚĆ PRZETRWAŁNIKÓW BAKTERII Z RODZAJU *BACILLUS* I *CLOSTRIDIUM* (WG 5)

| Gatunek i szczep                   | Zawieszalnik    | D <sub>121</sub> (s) | Metoda pomiaru      |
|------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> |                 |                      |                     |
| ATCC 7953                          | woda            | 31                   | kapilary            |
| NCDO 1096                          |                 | 562                  | kapilary            |
| 1518                               |                 | 281                  | kapilary            |
| FS 7954                            | bufor           | 50                   | proces ciągły       |
| FS 1518                            |                 | 441                  | kapilary            |
| ATCC 7953                          | mleko           | 31                   | kapilary            |
| NCDO 1096                          |                 | 181,372              | kapilary            |
| FS 1518                            |                 | 132,324              | skala pilot.<br>UHT |
| ATCC 7953                          | białka mleka    | 214                  | butelki             |
| ATCC 7953                          | białka soi      | 218                  |                     |
| FS 1518                            | ekstrakt sojowy | 98                   |                     |
| <i>Bacillus subtilis</i>           |                 |                      |                     |
| ATCC 786                           | woda            | 19,9                 | kapilary            |
| ATCC 7060                          | mleko           | 6,3                  | kapilary            |
| 786                                |                 | 20                   | kapilary            |
| 17                                 |                 | 19,9                 | kapilary            |
| 115                                |                 | 19,9                 | kapilary            |
| 25                                 |                 | 19,9                 | kapilary            |
| ATCC 7060                          |                 | 6,3                  | kapilary            |
| <i>Bacillus coagulans</i>          |                 |                      |                     |
| WH9                                | mleko           | 18                   | kapilary            |
| 604                                |                 | 60                   | kapilary            |
| 604                                | bufor           | 100                  | kapilary            |
| <i>Bacillus cereus</i>             | mleko           | 3,8                  | kapilary            |
| <i>Clostridium sporogenes</i>      |                 |                      |                     |
| PA 3679                            | mleko           | 4,3                  | kapilary            |
| <i>Clostridium botulinum</i>       |                 |                      |                     |
| NCTC                               |                 | 3,2                  | kapilary            |

Ciepłoporność przetrwalników w dużym stopniu zależy od chemicznego składu podłoża, w którym zachodzi proces sporulacji. Większą ciepłopornością odznaczają się spory wytwarzane w podłożach zawierających dwuwartościowe kationy, a szczególnie magnez i wapń (1, 9). Podobny efekt obserwuje się przy odpowiednim stężeniu fosforanów i kwasów tłuszczowych w podłożu. Nienasycone kwasy tłuszczowe powodują znaczny wzrost cieplnej oporności przetrwalników laseczek beztlenowych *Clostridium botulinum* (40). Nie tylko

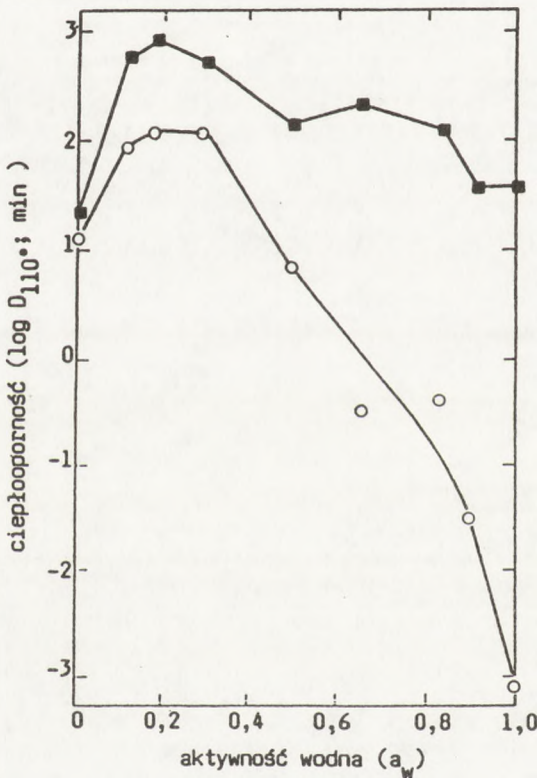


skład podłoża, ale również temperatura sporulacji wywiera istotny wpływ na ciepłooporność przetrwalników. Cook i Gilbert (9) zaobserwowali wzrost wartości  $D_{115}$  z 12,2 min do 24,4 min dla *Bacillus stearothermophilus* po zwiększeniu temperatury hodowli bakterii z 50 do 60°C.

Poza czynnikami zewnętrznymi duży wpływ na ciepłooporność komórek ma również ich dojrzałość fizjologiczna. Młode komórki, jak również młode przetrwalniki wykazują większą wrażliwość na ogrzewanie.

Dla badania ciepłooporności spor pewne znaczenie mają warunki przechowywania przygotowanej zawiesiny. Najczęściej stosuje się zawiesiny przetrwalników przechowywane od 6 tygodni do 6 miesięcy w temperaturze 4°C. Davies (10) stwierdził, że zawiesina przechowywana 6 miesięcy daje bardziej powtarzalne wyniki badań w porównaniu ze świeżą zawiesiną przetrwalników. Jednakże zbyt długie przechowywanie spor może obniżyć ich oporność cieplną (8).

Istotne znaczenie wywierają również parametry obróbki cieplnej. Jednym z decydujących czynników jest skład chemiczny środowiska, w którym spory są ogrzewane. Marshall i wsp. (32) stwierdzili, że maksymalna oporność cieplna przetrwalników występuje przy aktywności wodnej środowiska ( $a_w$ ) wynoszącej 0,2 – 0,3, co odpowiada zawartości wody 5 – 7%. Uwodnienie środowiska powoduje wyraźne zwiększenie wrażliwości przetrwalników na temperaturę, w różnym jednak stopniu dla różnych gatunków (rys. 6). Pobieranie



wody przez spory następuje bardzo szybko. Na przykład przetrwalniki *Bacillus megaterium* przeniesione ze środowiska o  $a_w = 0,3$  do środowiska o  $a_w = 0,9 - 1,0$ , już po 20 – 30 s zaczynają ginąć w stopniu charakterystycznym dla tej aktywności wodnej. Dla porównania wartości  $D_{110}$  wynoszą odpowiednio 20 godz (przy  $a_w = 0,3$ ) i 18 s ( przy  $a_w = 0,9 - 1,0$ ) (33). Niemały wpływ na ciepłooporność przetrwalników bakteryjnych wywiera obecność soli mineralnych w środowisku.

Badania Khalila i Villota (29) wykazały, że podwyższenie stężenia chlorku sodu z 1% do 6% zwiększa wrażliwość przetrwalników *Bacillus stearothermophilus*

Rys. 6. Wpływ aktywności wodnej ( $a_w$ ) na ciepłooporność przetrwalników *Clostridium botulinum* (o) oraz *Bacillus stearothermophilus* (■) (wg 33).



na ogrzewanie. Przy 1% stężeniu NaCl wartość  $D_{100}$  wynosi 144 min, natomiast po wzroście stężenia do 6%  $D_{100} = 113$  min. Podwyższone stężenie NaCl powoduje zmianę ciśnienia osmotycznego środowiska oraz denaturację rybosomalnych polipeptydów, co może powodować obniżenie ciepłoporności przetrwalników. W dostępnej literaturze spotyka się bardzo rozbieżne informacje na temat wpływu kationów o różnej wartościowości na ciepłoporność przetrwalników (21, 29).

Tłuszcze, białka i cukry są substancjami chroniącymi drobnoustroje przed działaniem wysokich temperatur. Zawiesiny przetrwalników *Bacillus subtilis* w bulionie ulegają zabiciu po 10 min ogrzewania w temperaturze 150°C, natomiast w tłuszczach zwierzęcych po 1 godz.

Decydujący wpływ ma również pH środowiska, w którym drobnoustroje są poddawane działaniu wysokiej temperatury. Przetrwalniki bakterii są bardziej odporne na temperaturę, kiedy wartość pH podłoża jest w pobliżu punktu neutralnego (9, 29). Przy niższych i wyższych wartościach pH obumieranie następuje szybciej, przy czym obniżenie poziomu pH w większym stopniu prowadzi do obumierania komórek niż podwyższenie.

Nie wszystkie przetrwalniki są jednakowo wrażliwe na zmiany pH. Największą ciepłoporność spory *Bacillus anthracis* wykazują przy pH = 8, a spory *Clostridium perfringens* są najbardziej odporne przy pH = 5 (17, 29).

Na ciepłoporność przetrwalników bakteryjnych pewien wpływ wywiera ich gęstość w zawiesinie (17).

Wzrost oporności przetrwalników w zawiesinach o wyższej gęstości wynika prawdopodobnie z występowania większej liczby bardziej ciepłopornych komórek w jednostce objętości. Uważa się ponadto, że biopolimery wydostające się z zabitych komórek spełniają funkcje ochronne w stosunku do komórek żywych.

Bardzo istotnym problemem jest ponadto sposób pomiaru destrukcji przetrwalników. Dotychczas nie opracowano idealnej metody liczenia ginących drobnoustrojów. Efekt działania temperatury na przeżywalność zawiesiny mikroorganizmów może być tylko oceniany przez pomiar zdolności przeżywających organizmów do rozwoju w odpowiednich podłożach w hodowli płytkowej. Metoda płytkowa nie pozwala jednakże na określenie liczby organizmów w populacjach, które są zdolne tylko do ograniczonej liczby podziałów.

Typ regeneracyjnego podłoża (7), jak również temperatura inkubacji (36) mają zatem bardzo istotny wpływ na pomiar ilości spor uszkodzonych temperaturą. Bogate, kompleksowe podłoże daje wyższy odzysk komórek, niż podłoże ubogie. Niektóre przetrwalniki udaje się pobudzić do kiełkowania przez mechaniczne lub enzymatyczne uszkodzenie zewnętrznych osłon, bądź działanie nieswoistych substancji powierzchniowo-czynnych (41).

Niekiedy stan uśpienia przetrwalników można przełamać stosując ciepłą aktywację, czyli ogrzanie do temperatury 75 – 115°C odpowiednio od 60 – 2 min (6, 13, 18).



## 6. Podsumowanie

Podczas sterylizacji termicznej żywności oraz podłoży fermentacyjnych należy stosować takie warunki aby uzyskać wystarczającą jałowość oraz zminimalizować destrukcyjny wpływ temperatury na skład chemiczny i wartość odżywczą podłoża. Z literatury i własnych danych doświadczalnych (25, 26, 27) wynika, że najlepsze efekty można osiągnąć stosując wysoką temperaturę (w zakresie 135 – 150°C) i krótki czas jej działania (2 – 30 s). Dobór konkretnych warunków sterylizacji musi być dla każdego przypadku wyznaczony indywidualnie.

Dla ustalenia odpowiednich warunków sterylizacji niezbędna jest znajomość mechanizmów niszczenia drobnoustrojów oraz parametrów wpływających na ich ciepłooporność. Przedstawiona w pracy analiza materiału literaturowego pozwala stwierdzić, że ciepłooporność przetrwalników zależy od ich stanu fizjologicznego oraz stopnia uśpienia czy też stadium aktywacji. Uzależniona jest także istotnie od pH środowiska i obecności w nim substancji ochraniających drobnoustroje przed działaniem wysokiej temperatury lub ułatwiających jej oddziaływanie. Na podkreślenie zasługuje fakt istnienia w literaturze rozbieżnych opinii dotyczących wpływu kationów na ciepłooporność przetrwalników.

Ważnym problemem jest również sprawa aktywacji przetrwalników. Poprzedzenie procesu sterylizacji fazą aktywacji pozwala złagodzić warunki obróbki termicznej, niezbędne dla uzyskania jałowości środowiska i w ten sposób zminimalizować destrukcyjne działanie temperatury na zawarte w medium składniki odżywcze. W Polsce zagadnienia te nie były dotąd doceniane zarówno przez teoretyków jak i praktyków.

W klasycznych rozwiązaniach, realizacji sterylizacji metodą okresową, szczególnie szkodliwy jest wydłużony czas obróbki cieplnej spowodowany długimi okresami dogrzewania i schładzania medium do wymaganej technologii temperatury. Te negatywne efekty nie występują przy zastosowaniu metody sterylizacji ciągłej.

Precyzyjne uzyskanie i utrzymanie zaleconych parametrów, a także ich zindywidualizowany dobór uwzględniający specyficzny skład i właściwości podłoża są możliwe do zrealizowania jedynie w procesie ciągłym. W tych warunkach w znacznie mniejszym stopniu zmienia się podczas sterylizacji skład chemiczny i wartość odżywcza podłoża. Ma to zasadnicze znaczenie dla przebiegu wielu procesów biosyntezy (27).

## Literatura

1. Amaha M., Ordal Z.J., (1957), *J. Bacteriol.*, 74, 596 – 604.
2. Baillie E., Germaine G.R., Murrell W.G., Ohye D.F., (1974), *J. Bacteriol.*, 120, 516 – 523.
3. Balassa G., Contesse G., (1965), *Ann. Inst. Past.*, 109, 683 – 705.
4. Bernlohr R.W., Sievert C., (1962), *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 9, 32 – 45.
5. Burton H., (1988), *Ultra-high temperature processing of milk and milk products*, 13 – 43, Elsevier, New York.



6. Busta F., (1967), *Appl. Microbiol.*, 15, 640 – 645.
7. Cook A.M., Gilbert R.J., (1968), *J. Fd. Technol.*, 3, 285 – 294.
8. Cook A.M., Gilbert R.J., (1968), *J. Pharm. Pharmacol.*, 20, 626 – 629.
9. Cook A.M., Gilbert R.J., (1968), *J. Fd. Technol.*, 3, 295 – 302.
10. Davies F.L., Underwood H.M., Perkin A.G., Burton H., (1977), *J. Fd. Technol.*, 12, 115 – 129.
11. Dawes J.W., Thornley J.H.M., (1970), *J. Gen. Microbiol.*, 62, 49 – 66.
12. Dawes J.W., Maldernstan J., (1970), *J. Bacteriol.*, 103, 528 – 535.
13. Desrosier N.W., Heiligman F., (1956), *Food Res.*, 21, 54 – 62.
14. Dessler H., Broda E., (1965), *Nature Lond.*, 206, 1270 – 1276.
15. Dobrica S.W., (1980), *Uspiechy Mikrobiologii*, 15, 197 – 223.
16. Dworkin M., (1985), *Developmental biology of the bacteria*, 22 – 49, The Benjamin Cummings Publ. Comp., New York.
17. Farrell J., Rose A.H., (1967), *Thermobiology*. Ed. A.H. Rose, 186 – 213, Ac. Press, London.
18. Finley N., Fields M., (1962), *Appl. Microbiol.*, 10, 231 – 236.
19. Freese E., (1972), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 7, 85 – 124.
20. Gould G.W., Hitchins A.D., (1963), *J. Gen. Microbiol.*, 33, 413 – 423.
21. Gould G.W., (1977), *J. Appl. Bacteriol.*, 42, 297 – 309.
22. Grelet N., (1957), *J. Appl. Bacteriol.*, 20, 315 – 324.
23. Hanson R.S., Peterson J.A., Yousten A.A., (1970), *Ann. Rev. Microbiol.*, 24, 53 – 90.
24. Hanson R.S., Curry M.V., Garner J.V., Halvorson H.O., (1972), *Can. J. Microbiol.*, 18, 1139 – 1143.
25. Iciek J., (1990), *Biotechnologia*, 4, 4 – 11.
26. Iciek J., Cywińska U., Stobińska H., Stolarek P., (1990), *Biotechnologia*, 4, 51 – 60.
27. Iciek J., Cywińska U., Stolarek P., (1991), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 35, 1 – 2.
28. Kadota H., Iijima K., Uchida A., (1965), *Agric. Biol. Chem.*, 29, 870 – 877.
29. Khalil H., Villota R., (1986), *Food engineering and process applications*, 1, eds.: M. Le Maguer, P. Jelen, 583-594, Elsevier, London.
30. Kondo M., Foster J.W., (1965), *Bacteriol. Proc.* 36 – 41.
31. Long S.K., Williams O.B., (1960), *J. Bacteriol.*, 79, 625 – 628.
32. Marshall B.J., Murrell W.G., Scott W.J., (1963), *J. Gen. Microbiol.*, 31, 451 – 460.
33. Murrell W.G., (1967), *Advances in microbial physiology*. Ed. A. H. Rose, 133 – 251, Ac. Press, London.
34. Ordall Z.J., (1961), *Spores*, Ed. H. O. Halvorson, 18-26, Am. Inst. Biol. Sci., Washington.
35. Piggot P.J., Coote J.G., (1976), *Bacteriol. Rev.*, 40, 908 – 962.
36. Prentice V.A., Clegg L.F.L., (1974), *J. Appl. Bact.*, 37, 501 – 513.
37. Salton M.R.J., Marshall B., (1959), *J. Gen. Microbiol.*, 21, 415 – 420.
38. Schaeffer P., (1969), *Bacteriol. Rev.*, 33, 48 – 71.
39. Schaeffer P., Millet J., Aubert J.P., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 54, 704 – 711.
40. Sugiyama H., (1951), *J. Bacteriol.*, 62, 81 – 96.
41. Suzuki Y., Rode L.J., (1969), *J. Bacteriol.*, 98, 238 – 245.
42. Thompson P.J., Thames O.A., (1967), *Appl. Microbiol.*, 15, 975 – 979.
43. Tinelli R., (1955), *Ann. Inst. Past.*, 88, 212 – 219.
44. Warth A.D., Ohye D.F., Murrell W.G., (1963), *J. Cell Biol.*, 16, 579 – 592.
45. Warth A.D., Ohye D.F., Murrell W.G., (1963), *J. Cell Biol.*, 16, 593 – 609.

## Bacteriae sporogenesis in the aspect of biotechnological processes

### Summary

The process of thermal sterilization is very important for both: food processing technology and for many biotechnological processes. It should be carried out in such a way as to efficiently destroy microorganisms and to restrict the decrease of nutritive value of the sterilized media.



The paper presents physiological and biochemical conditions of thermal resistance of spores. Special attention has been paid to environmental factors which either protect or enhance the thermal destruction of spores.

**Key words:**

food processing, spores, thermal resistance, thermal sterilization.

*Adres dla korespondencji:*

Zdzisława Libudzisz, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego przez KBN nr 300979101 pt.: „Warunki i kinetyka ciągłej sterylizacji termicznej cieczy oraz zawiesin”.