

高压 CO₂ 处理对枯草芽孢杆菌芽孢杀灭及协同作用的影响

高媛¹, 周先汉^{1,2,*}, 曾庆梅³, 范伟¹, 孙潇雅¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 合肥工业大学分析测试中心, 安徽 合肥 230009;
3. 合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 选用枯草芽孢杆菌为研究对象, 以磷酸盐缓冲液为基质, 研究高压(5~25MPa) CO₂ 协同热处理对其芽孢杀灭作用的影响。结果表明: 20MPa 高压 CO₂ 处理前在 45℃ 预热处理 30min 时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到了 3.84 个数量级, 单纯 20MPa 高压 CO₂ 处理 30min 时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到 2.44 个数量级。采用连续式和间歇式两种不同的施压方式考查其对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活及萌发影响, 结果表明: 10MPa、50℃ 连续 30min 高压 CO₂ 处理对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭使其数量下降了 0.67 个数量级, 间歇施压 (低压 10MPa 施压 10min, 高压 30MPa 施压 10min) 循环 1 次时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到 2.55 个数量级。选择添加 3 种组合的营养发芽诱导因子考察在不同的压力条件下(10MPa 30℃、10MPa 50℃、30MPa 30℃、30MPa 50℃)与高压 CO₂ 处理相结合对芽孢发芽的影响。结果表明: 添加的营养发芽诱导因子在低压(10MPa)时的诱导作用不如高压(30MPa)时明显。

关键词: 高压 CO₂; 枯草芽孢杆菌芽孢; 萌发; 杀灭

Effect of High-pressure Carbon Dioxide Treatment on the Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores

GAO Yuan¹, ZHOU Xian-han^{1,2,*}, ZENG Qing-mei³, FAN Wei¹, SUN Xiao-ya¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China
2. Center for Analysis and Measurement, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;
3. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* spores were suspended in phosphate buffer and treated by high-pressure carbon dioxide (HPCD) at the range of 5–25 MPa combined with mild heating. The results showed that *Bacillus subtilis* spores were inactivated by 3.84 magnitude orders after heating treatment for 30 min at 45 °C followed by treatment at 20 MPa for another 30 min. HPCD treatment alone resulted in an inactivation by 2.44 magnitude orders. Continuous HPCD treatment at 10 MPa for 30 min could result in a decrease in the viable spore count of *Bacillus subtilis* by 0.67 magnitude orders. After the first cycle of intermittent HPCD treatment (held at 10 MPa for 10 min and then at 30 min for another 10 min), *Bacillus subtilis* spores were inactivated by 2.55 magnitude orders. Meanwhile, the combined effects of each of three combinations of germination inducers and different combinations of heating and subsequent HPCD treatment (30 °C plus 10 MPa or 30 MPa and 50 °C plus 10 MPa or 30 MPa) were investigated. The inducing effect of germination inducers at 10 MPa was not so obvious as at 30 MPa.

Key words: high-pressure carbon dioxide; *Bacillus subtilis* spores; germination; inactivation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0064-05

食品保鲜加工的目的之一是延长其保质期, 而杀菌是食品加工中的必需工序。传统的食品保鲜加工普遍采用的杀菌方法是热力杀菌, 如巴氏杀菌(中低温杀菌),

虽然其对食品营养成分和热敏性的风味物质损害较小, 但只有部分杀菌和抑菌作用, 不能将食品中的微生物全部杀灭, 更不可能杀灭细菌芽孢以及真菌孢子等, 处

收稿日期: 2010-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871739; 30571304); 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2007A099)

作者简介: 高媛(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品现代加工理论、方法及工程化技术。

E-mail: gaoyuany@126.com

* 通信作者: 周先汉(1959—), 男, 副教授, 学士, 研究方向为农产品深加工、食品安全。E-mail: zhxhan@163.com

理食品的保质期较短;而高温杀菌效果虽然较好,但更高层次的破坏了食品的营养成分和天然风味。随着消费者意识的增强和消费水平的提高,高营养、口感好的食品将越来越受到欢迎,为了能够满足这一标准,生产出易于储藏、热处理温度低、高品质、方便且安全的食品,“冷杀菌”技术成为替代首选^[1]。

高压 CO₂(high pressure carbon dioxide, HPCD)作为冷杀菌技术已经在液体食品中取得了良好的杀灭微生物的作用。在压力低于 50MPa, 温度 5~60℃之间进行的高压 CO₂ 处理可以实现对微生物 10²~10¹² 个的杀灭效果^[2], 至少有 12 种革兰氏阳性菌, 10 种革兰氏阴性菌, 8 种细菌芽孢以及 8 种真菌菌丝体或孢子被用来进行高压 CO₂ 杀菌的实验研究^[3], 在适当的温度和压力条件下, 单纯高压 CO₂ 处理能够显著地杀灭细菌的营养体, 然而在室温条件下, 高压 CO₂ 处理对于细菌芽孢的杀灭效果不明显^[4]。美国 Praxair 公司安装了一条处理能力为 151L/min 的鲜榨橙汁杀菌的高压 CO₂ 杀菌生产线, 产品质量达到了美国 FDA 强制执行的果汁 HACCP 规定的要求, 能够减少致病菌 10⁵ 个^[5]。但是高压 CO₂ 杀菌的方法仍然不很完美, 研究结果表明, 单纯采用高压 CO₂ 技术, 在小于 15MPa 处理压力的情况下, 要达到杀灭细菌芽孢的目的, 必须提高温度, 甚至提高到 100℃或处理时间延长至 96h^[6], 这对于热敏性果汁保鲜加工来讲处理温度太高、加压时间太长、效率太低, 明显不适合工业化应用。由于芽孢壳的结构极其致密, 使芽孢类细菌更具备了抵抗高压的能力。芽孢一旦萌发生长成为营养体后, 则与非芽孢菌的菌体相似, 抗压强度急剧降低。根据这一特点, 若利用一定的刺激手段使芽孢菌的孢子由休眠状态萌发为营养体, 在施加压力杀灭则相对较易。因此, 问题的关键在于找到一种确保食品安全的芽孢萌发刺激手段。

本实验以枯草芽孢杆菌为研究对象, 研究压力、温度及其他因素, 如施压方式、添加营养因子等对芽孢萌发的诱导效应, 并对营养体进行高压 CO₂ 杀灭处理, 选择杀菌工艺路线以及协同措施, 摸索降低压力杀灭食品中难以杀灭的芽孢的有效途径, 旨在为高压 CO₂ 杀菌的商业化推广和应用提供新途径。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC), 冻干菌种, 编号: 20622。

普通营养琼脂培养基: 氯化钠 0.5g、牛肉膏 0.3g、蛋白胨 0.5g、琼脂 2g、蒸馏水 100mL, 调 pH7.0~7.2, 混匀, 分装三角瓶中, 灭菌, 备用; 促芽孢生长培养基^[7]: 在上述普通营养琼脂培养基中加入 MnCl₂(使得

培养基中 Mn²⁺ 的质量浓度为 50mg/L), 调 pH7.0~7.2 后混匀, 分装三角瓶中, 灭菌, 备用。

1.2 仪器与设备

HA121-50-01-C 超临界萃取装置(单缸萃取容积 1L, 最高萃取压力 50MPa, 见图 1) 江苏南通华安超临界萃取有限公司; TDL-50B 台式离心机 上海安亭科学仪器有限公司; PHS-25B 型数字酸度计 上海大普仪器有限公司; 721 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

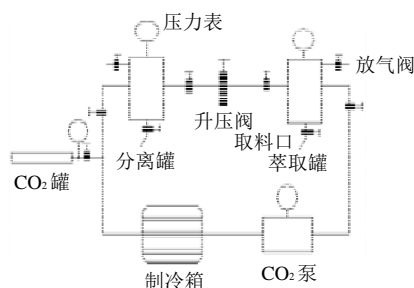


图 1 高压 CO₂ 杀菌设备工艺流程图

Fig.1 Schematic diagram of high-pressure CO₂ sterilization

1.3 方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌悬液的制备^[8]

将菌种活化后接种于斜面促芽孢生长培养基, (35 ± 1)℃ 条件下培养 5d, 之后室温培养 1~3d, 碱性复红染色, 镜检, 当产芽孢率达到 90%~95% 时, 用灭菌的载玻片把平板上的菌落刮下来, 无菌蒸馏水洗脱菌苔, (80 ± 1)℃ 水浴 10min 杀死营养体, 5000r/min 离心 15min, 弃去上清液, 用磷酸盐缓冲液制备成芽孢悬液, 调整芽孢浓度, 使起始芽孢浓度为 10⁸~10⁹CFU/mL, 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 芽孢悬液的加热处理

将按照 1.3.1 节方法制备的枯草芽孢杆菌芽孢悬液适当稀释至所需浓度, 并取 100mL 加入灭菌锥形瓶中, 按照实验设计的温度和时间要求进行加热处理。

1.3.3 芽孢悬液的高压 CO₂ 处理

将按照 1.3.1 节方法制备的枯草芽孢杆菌芽孢悬液样品适当稀释至起始芽孢数为 10⁷CFU/mL, 取 100mL 加入已进行过无菌清洗的萃取釜中。按照实验设计控制温度和压力, 进行高压 CO₂ 处理, 每一样品重复 3 次。

1.3.4 高压 CO₂ 处理与热处理相结合

实验组 I: 将枯草芽孢杆菌悬液于 45℃ 水浴 30min 后分别进行 5、10、15、20、25MPa 的高压 CO₂ 处理 30min。实验组 II: 先将枯草芽孢杆菌悬液与实验组 I 相同高压 CO₂ 条件下处理后, 在进行 45℃ 水浴 30min。

实验组III: 单独采用高压 CO₂ 在与实验组 I 相同压力条件下处理 30min。比较高压 CO₂ 处理前加热处理与高压 CO₂ 处理后加热处理的杀灭芽孢效果。

1.3.5 不同施压方式对枯草芽孢杆菌芽孢的致死作用

选取温度 50℃, 对枯草芽孢杆菌悬液进行连续式和间歇式高压 CO₂ 处理。连续式: 10~30MPa, 分别保压 30min。间歇式: 采用低压、高压组合方式, 先低压 10MPa 10min, 再高压 30MPa 10min, 分别循环 1~3 次。

1.3.6 添加营养发芽诱导因子对压力诱导芽孢发芽的影响

将按照 1.3.1 节方法制备的枯草芽孢杆菌悬液用磷酸钾缓冲液稀释, 并添加营养发芽诱导因子, 其最终浓度如表 1 所示^[9], 同时芽孢浓度为 10⁷CFU/mL, 处理压力分别为 10、30MPa, 温度分别为 30、50℃, 保压时间 30min。

表 1 添加营养发芽诱导因子的种类和浓度
Table 1 Three combinations of germination inducers

营养发芽诱导因子 浓度/(mmol/L)	葡萄糖+果糖 10+10	KCl+L- 丙氨酸 50+10	KCl+ 天门冬酰胺 50+10
-------------------------	-----------------	---------------------	---------------------

1.3.7 菌落数测定

按 GB4789.21—2003《食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验》采用平板计数法进行菌落计数, 以无菌生理盐水适当稀释处理后和未处理(对照组)的芽孢菌悬液, 于营养琼脂平板上 35℃ 培养 48h 后, 进行菌落计数。各种处理重复 3 次。杀菌效果采用失活率表示, 按公式(1)计算。

$$\text{失活率} = -\lg(N/N_0) \quad (1)$$

式中: N 为经过杀灭芽孢处理后, 芽孢在普通营养琼脂培养基上培养可见的菌浓度/(CFU/mL); N_0 为未经过杀灭芽孢处理前的菌浓度/(CFU/mL)。

$$\text{萌发率} = -\lg(N_1/N_0) \quad (2)$$

式中: N_1 为经过高压 CO₂ 或者热处理后, 样品置于 75℃ 恒温水浴锅热处理 10min, 以保证使已经发芽的芽孢全部失活后, 未被压力或者热处理诱导发芽的芽孢在普通培养基上培养可见的菌浓度/(CFU/mL); N_0 为未经过杀灭芽孢处理前的菌浓度/(CFU/mL)。

2 结果与分析

2.1 热处理与高压 CO₂ 处理协同杀灭芽孢的效果

由图 2 可见, 20MPa 高压 CO₂ 处理前 45℃ 预处理 30min 时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到了 3.84 个数量级, 同样条件下后热处理芽孢失活率为 3.48 个数量级, 而单纯 20MPa 高压 CO₂ 处理 30min 时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到 2.44 个数量级; 因此 45℃、30min 的热处

理有助于高压 CO₂ 的杀灭芽孢作用, 且高压 CO₂ 与预处理结合的杀灭芽孢效果比后续热处理与高压 CO₂ 结合的灭芽孢效果好, 原因可能是温度是芽孢萌发的重要因素, 预处理可以促进芽孢发芽, 而当芽孢萌发变成营养细胞的过程中, 芽孢特有的耐热性逐渐下降, 通透率增加, 因而更容易被杀灭^[10]。高压 CO₂ 处理时并不是压力越高越好, 当压力在 0~20MPa 时, 随着压力的增加, 杀灭效果逐渐上升, 但当压力上升到 25MPa 时, 杀灭效果反而略有下降。理论上压力越高 CO₂ 渗透性越好, 同时对细胞的物理性伤害也越大, 但当压力过大时, 有可能使得孢子产生相应的聚集, 从而抵抗了高压 CO₂ 的杀菌作用^[11]。

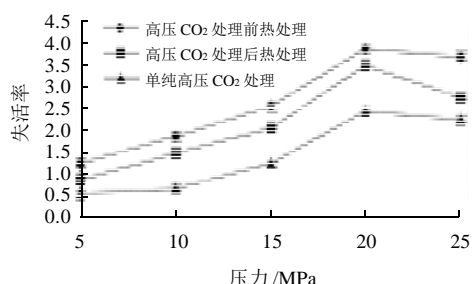


图 2 不同压力条件下高压 CO₂ 处理前热处理和高压 CO₂ 处理后热处理对枯草芽孢杆菌芽孢的致死作用

Fig.2 Inactivating effects of HPCD treatment alone or sequentially combined with heating on *Bacillus subtilis* spores

为了选择合适的预处理温度及时间, 选择在 30、40、50、60、70、80、90℃ 分别对枯草芽孢杆菌芽孢悬液处理 15、30、45min 和 60min, 以 10mL/L 的接种量接入 LB 液体培养基中, 摇瓶装液量 250mL, (30 ± 1)℃、250r/min 培养 30min 后常规涂片镜检, 萌发的芽孢经碱性复红染色后呈红色, 未萌发的芽孢不能着色^[12], 重复 3 次, 采用 LSD 法进行统计分析, 计算芽孢萌发率, 结果如图 3 所示。

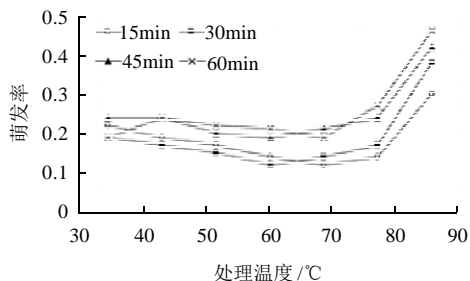


图 3 枯草芽孢杆菌芽孢悬液经不同温度预处理不同时间芽孢的萌发率

Fig.3 Effects of heating temperature and time on the germination rate of *Bacillus subtilis* spores

由图 3 可见, 在 30~60℃ 范围内, 同一温度, 活

化处理 30min, 芽孢的萌发率最高, 相对于其他时间活化处理, 萌发率可提高 0.04~0.09 个数量级。在 70~90℃ 范围内, 同一温度, 活化处理 15min 芽孢的萌发率最高, 在 60℃ 和 70℃ 时孢子悬液活化处理不同时间, 萌发率均较高, 60℃ 处理 30min 和 70℃ 处理 15min 时芽孢萌发率均能达到 0.12 个数量级; 而经 90℃ 活化处理不同时间时, 芽孢的萌发率下降, 预处理 15min 萌发率为 0.3 个数量级, 而预处理 60min 时芽孢萌发率比 15min 时下降了 0.16 个数量级。因此, 不同温度处理时最佳活化处理时间不同。若低于 60℃ 活化处理, 一般处理 30min 较好; 70℃ 和高于 70℃ 时, 以 15min 为宜。

对于高压 CO₂ 杀菌技术的研究, 高压 CO₂ 协同温度的处理方法已经证明具有良好的杀菌效果^[13]。从已报道研究结果来看, 温度和压力对于芽孢的损伤和发芽都有重要影响。当温度和压力较低时的高压 CO₂ 处理并不能有效地将芽孢杀灭, 适当提升温度具有协同作用, 有利于芽孢的萌发, 随后在对其进行杀灭^[14-16]。

然而, 在高压 CO₂ 处理与热处理协同作用下导致芽孢失活的机理尚未十分清楚。现已知, 高压 CO₂ 处理能够导致微生物细胞的形态结构、生物化学反应、基因机制(DNA 复制)及细胞膜等发生变化, 进而影响到微生物正常的生理机能, 使得原有功能被破坏或发生不可逆变化。同时, “压力诱导发芽”这一事实已经得到普遍认可, 并认为这是高压 CO₂ 处理条件下芽孢失活的主要原因之一^[17]。

2.2 不同施压方式对枯草芽孢杆菌芽孢的致死作用

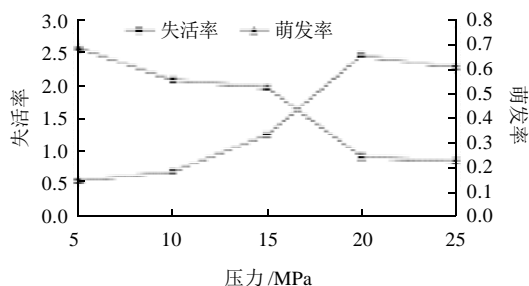


图4 50℃连续施压对枯草芽孢杆菌芽孢的致死及萌发作用

Fig.4 Effect of pressure level for continuous treatment on the germination rate and inactivation rate of *Bacillus subtilis* spores

由图4可以看出, 连续施压时, 枯草芽孢杆菌芽孢失活率随着压力的增高而增大, 在 20MPa、50℃、30min 条件下枯草芽孢杆菌芽孢的失活率可达到 2.44 个数量级, 低压(10MPa)时枯草芽孢杆菌芽孢的失活率只有 0.67 个数量级。同时也可以看出高压 CO₂ 处理对枯草芽孢杆菌芽孢也有一定的萌发作用, 低压(25MPa)处理时萌发率较高, 达到了 0.68 个数量级。

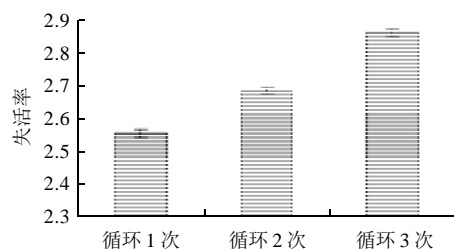


图5 间歇施压对枯草芽孢杆菌芽孢的致死作用

Fig.5 Effect of number of repeated intermittent HPCD treatment cycles on the inactivation rate of *Bacillus subtilis* spores

如图5所示, 间歇施压比连续施压大大提高了对芽孢的杀灭效果, 并且能够缩短处理时间。随着循环次数增加失活率不断增大, 循环3次的枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到 2.86 个数量级。比较图4、图5可以发现, 同样压力条件下, 采取间歇施压对芽孢的灭活效果明显优于连续施压的灭活效果, 其中 10MPa、50℃、30min 的连续施压对芽孢的失活率达到了 0.67 个数量级, 而循环1次(10MPa、50℃、10min 后 30MPa、50℃、10min)对芽孢的失活率达到了 2.55 个数量级。一方面, 由于施压同时也可以诱导芽孢发芽, 因此在采用低压到高压的循环过程中, 不断的升压、泄压可能激活芽孢萌发, 使其对压力和温度都变得比较敏感, 在随后处理过程中更容易受到损伤进而死亡^[12]; 另一方面, 间歇施压产生的机械破坏力, 剪切力等能更有效的杀灭芽孢。

2.3 营养发芽诱导因子与高压 CO₂ 处理相结合杀灭芽孢的作用

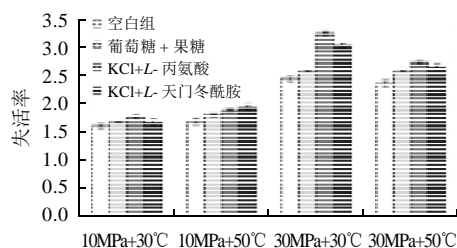


图6 不同营养发芽诱导因子与不同压力高压 CO₂ 处理相结合对枯草芽孢杆菌芽孢杀灭的影响

Fig.6 Effects of different combinations of germination inducers combined with different combinations of heating and subsequent HPCD treatment on the germination rate of *Bacillus subtilis* spores

如图6所示, 在低压(10MPa)条件下, 处理温度分别为 30℃ 和 50℃ 时, 添加的3种组合的营养发芽诱导因子对枯草芽孢杆菌芽孢的萌发率和空白组(未添加任何营养因子)相比没有明显提高。在压力 30MPa、温度 30℃ 的条件下特别是添加了 KCl+L-丙氨酸的组合, 枯草芽孢杆菌芽孢的失活率达到了 3.22 个数量级, 比空白组 2.42 个数量级提高了 0.8 个数量级。然而, 当温度升高至 50℃ 时, 添加 L-丙氨酸+KCl 组合的芽孢失活率能够达到

2.71 个数量级, 不如温度为 30℃ 时 3.22 个数量级的失活率高。说明随着温度的升高, 添加营养芽孢诱导因子对芽孢萌发的作用相对减弱。

高压 CO₂ 处理对微生物的影响非常复杂, 影响芽孢失活的因素众多而且是紧密相连、相互影响的^[18]。其中温度和压力对芽孢发芽的影响有多大, 营养诱导发芽和非营养诱导发芽的影响谁占主导等一系列问题仍然没有得到很好的解答。

3 结 论

本实验采用高压 CO₂ 处理枯草芽孢杆菌芽孢, 考查压力、温度、施压方式和营养发芽诱导因子对芽孢萌发及杀灭作用, 结果表明: 1) 预热处理与高压 CO₂ 处理相结合对枯草芽孢杆菌芽孢具有杀灭作用。采用热处理协同高压 CO₂ 的杀菌效果研究表明, 在 30~60℃ 范围内, 60℃ 活化处理 30min, 芽孢的萌发率最高, 比 90℃ 处理 60min 高出了 0.34 个数量级。在绝大多数芽孢均已萌发后对其进行高压 CO₂ 处理使得芽孢杀灭较为容易。2) 间歇施压对芽孢杀灭效果要优于连续施压, 循环次数越多, 芽孢受损越严重。3) 添加适当的营养发芽诱导因子能促进枯草芽孢杆菌芽孢发芽, 其中以添加 KCl+L- 丙氨酸效果最为明显, 添加 KCl 和天门冬酰胺的效果次之。添加的营养发芽诱导因子在温度较低时对芽孢发芽有明显的诱导作用。

参考文献:

- [1] 曾庆梅, 周先汉, 杨毅, 等. 高密度 CO₂ 杀菌机制与协同措施研究现状[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 251-257.
- [2] DAMAR S, BALABAN M O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality[J]. Food Science, 2006, 71(2): 1-11.
- [3] ZHANG Jian, DAVIS T A, MATTHEWS M A, et al. Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(5): 354-372.
- [4] ZHANG Jian, DALAL N, GLEASON C, et al. On the mechanisms of deactivation of *Bacillus atrophaeus* spores using supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(2): 268-273.
- [5] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD A H, SPILIMBERGO S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(3): 1-28.
- [6] ENOMOTO A, NAKAMURA K. Inactivation of food microorganisms by high-pressure carbon dioxide treatment with or without explosive decompression[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(5): 1133-1137.
- [7] 黄娟, 李汴生, 王标诗, 等. 高静压协同热处理的升压过程对两种细菌芽孢的作用[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 90-95.
- [8] 王标诗, 李汴生, 黄娟, 等. 超高静压协同中温对凝结芽孢杆菌芽孢灭活动力学规律的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(4): 633-638.
- [9] 武玉艳, 李汴生. 添加营养发芽诱导因子和抑制因子对压力诱导芽孢发芽的影响的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 11-14.
- [10] SPILIMBERGO S, BERTUCCO A, LAURO F M, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO₂ treatment[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 23(4): 161-165.
- [11] FURUKAWA S, WATANABE T, TAI T, et al. Effect of high pressure gaseous carbon dioxide on the germination of bacterial spores[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(13): 209-213.
- [12] ERKMEN O. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide[J]. Food Microbiology, 2000, 17(2): 225-232.
- [13] SOICHI F, TAISUKE W, TETSUYA K, et al. Inactivation of food poisoning bacteria and *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment[J]. Food Control, 2009, 20(6): 53-58.
- [14] ISABELLE V O, CATHERINE F, BAGAMBOUL A, et al. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 92(7): 227-234.
- [15] ZHANG Jian, BURROWS S, GLEASON C, et al. Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006a, 66(3): 479-485.
- [16] WATANABE T, FURUKAWA S, HIRATA J, et al. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 7124-7129.
- [17] 廖红梅, 廖小军, 胡小松, 等. 影响 DPCD 技术杀菌效果的因素与杀菌机理分析[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(2): 96-99.
- [18] RASO J, GONGORA-NIETO M M, GUSTAVO V, et al. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 44(5): 125-132.