

张艺林,刘静飞,任梦梦,等.微高压 CO₂ 对 *Pseudomonas deceptionensis* CM2 的杀菌效应研究[J].轻工学报, 2022,37(5):24-31.

ZHANG Y L,LIU J F,REN M M,et al. The bactericidal effect of *petit*-high pressure CO₂ on *Pseudomonas deceptionensis* CM2[J]. Journal of Light Industry, 2022,37(5):24-31. DOI:10.12187/2022.05.003



微高压 CO₂ 对 *Pseudomonas deceptionensis* CM2 的杀菌效应研究

张艺林¹,刘静飞¹,任梦梦¹,牛力源^{1,2,3},张志坚^{1,2,3}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室,河南 郑州 450001;
3. 食品生产与安全河南省协同创新中心,河南 郑州 450001

摘要:以分离自腐败鸡肉的 *Pseudomonas deceptionensis* CM2 为对象,研究微高压 CO₂(*p*-HPCD) 杀菌技术在不同压力、保压时间下对 *P. deceptionensis* CM2 的杀菌效果。结果表明:*p*-HPCD 能够有效杀灭 *P. deceptionensis* CM2,且杀菌效果随 CO₂ 压力的增加和保压时间的延长而逐渐增强;经 *p*-HPCD 在 1.3 MPa、25 °C 条件下分别处理 2 h、4 h 和 6 h 后,*P. deceptionensis* CM2 活菌数分别降低 1.48 log₁₀ CFU/mL、3.11 log₁₀ CFU/mL 和 3.55 log₁₀ CFU/mL;经 *p*-HPCD 在 1.3 MPa、25 °C 条件下处理 4 h 后,*P. deceptionensis* CM2 细胞表面出现明显皱缩和裂痕,胞外核酸和蛋白发生渗漏,细胞膜通透性和细胞膜电位也发生显著改变。

关键词:微高压 CO₂ 杀菌技术;*Pseudomonas deceptionensis* CM2; 杀菌效应

中图分类号:TS201.1 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2022)05-0024-08

0 引言

食品加工环节中的杀菌技术分为热杀菌和非热杀菌。热杀菌是一种常用的杀菌方式,但高温会破坏维生素等热敏性营养成分及风味物质,易对食品营养和感官品质造成不良影响^[1-3]。超高压、紫外线、加压 CO₂ 等非热杀菌技术具有处理温度低、节能、杀菌效果好等优点,近年来在食品保鲜领域受到广泛关注^[4-5]。

CO₂ 具有化学惰性及无腐蚀性、高挥发性、价格低廉等优点,单独作用即可抑制微生物生长^[6],但

不足以杀死微生物,若将其与压力结合,则能达到更好的杀菌效果,加压 CO₂ 杀菌技术在果蔬、肉制品、谷物、液体食品的加工、贮藏与保鲜中的应用已有广泛研究^[7-9]。根据压力的不同,加压 CO₂ 杀菌技术分为高压 CO₂(High Pressure Carbon Dioxide, HPCD) 杀菌技术和微高压 CO₂(*petit*-High Pressure Carbon Dioxide, *p*-HPCD) 杀菌技术。其中, HPCD 杀菌技术中的 CO₂ 压力通常处于亚临界状态(2.00 ~ 7.38 MPa)^[10] 甚至超临界状态(>7.38 MPa)^[11-12], 而 *p*-HPCD 杀菌技术中的 CO₂ 压力通常为 0.15 ~ 1.30 MPa^[13]。由于 *p*-HPCD 杀菌技术对 CO₂ 压力

收稿日期:2021-10-21;修回日期:2022-03-21

基金项目:国家自然科学基金项目(32001801);郑州轻工业大学博士科研基金资助项目(13501050059);大学生创新创业训练计划项目(S202110462055)

作者简介:张艺林(1996—),女,河南省南阳市人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品加工与安全控制。E-mail:18567159787@163.com

通信作者:张志坚(1967—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为免疫学(细胞移植与免疫重建)。E-mail:zhangzhij@zzu.edu.cn

需求较小,因此具有诸多优势:1)比冷藏技术的抑菌效果好;2)可有效减少加工设备的资金投入;3)可在 *p*-HPCD 状态下运输食品,减少运输安全隐患^[13]。

目前,关于 *p*-HPCD 杀菌技术的相关研究主要集中在日本清酒、传统腌渍食品等生产加工领域^[14-15],其对肉制品中常见腐败菌的杀灭效果及作用机制尚不清楚。*Pseudomonas deceptionensis* CM2 是谢美娟等^[16]从鸡胸肉中分离出的一株具有较强致腐力的细菌,本文以其为目标菌株,研究 *p*-HPCD 杀菌技术在不同压力、保压时间下对 *P. deceptionensis* CM2 的杀菌效果及作用机制,以期为 *p*-HPCD 杀菌技术在肉制品安全控制领域的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

P. deceptionensis CM2 菌株,分离自腐败鸡胸肉,由郑州轻工业大学实验室分离鉴定并保存,已经分子生物学鉴定为 *P. deceptionensis*;高纯 CO₂ (纯度为 99.9%),购自河南迎众化工产品有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基、琼脂粉,购自青岛海博生物技术公司;体积分数为 2.5%的戊二醛(AR)、碘化丙啶(PI)、双(1,3-二丁基巴比妥酸)三次甲基氧杂菁(DiBAC₄(3))、乙酸异戊酯(AR),购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

OST-200 ML 型微高压 CO₂ 杀菌实验装置,西安欧士特仪器科技有限公司产;20049C 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器责任有限公司产;3K15 型台式高速冷冻离心机,德国 SIGMA 实验室离心机公司产;SW-CJ-1FD 型超净工作台,苏州净化设备有限公司产;MQD-S2R 型恒温振荡培养箱,上海曼泉仪器有限公司产;MERLIN Compact 型场发射扫描电镜(FE-SEM),德国 Zeiss 公司产;HUS-5GB 型真空蒸镀仪,日本日立公司产;NanoReady 型超微量紫外可见分光光度计,杭州遂真生物技术有限公司产;LDZM-60KCS 型立式压力灭菌锅,上海申安医疗器械厂产;Tecan Spark 20 M 型多功能酶标

仪,瑞士 Tecan 公司产;Eclipse 80i 型荧光显微镜,日本尼康(Nikon)产。

1.3 实验方法

1.3.1 菌悬液制备 将冻存的 *P. deceptionensis* CM2 菌株接种至 TSB 培养液中,于 25 °C 条件下振荡培养 2~3 d,然后接种至 TSA(在 TSB 中加入琼脂粉制得)固体培养基,于 25 °C 恒温培养箱中培养 3 d。取单个菌落接种至新鲜 TSB 培养液中,于 25 °C 条件下振荡培养,并测定菌液在 600 nm 处的吸光度(OD_{600}),培养至 OD_{600} 为 0.9~1.0,备用。

1.3.2 *p*-HPCD 处理 加压 CO₂ 装置示意图如图 1 所示,其中,1 为 CO₂ 气瓶,2 为减压阀,3 为压力显示器,4 为温度显示器,5 为 CO₂ 反应釜,6 为恒温水浴锅。将加压 CO₂ 反应釜预热至 25 °C,将 *P. deceptionensis* CM2 菌悬液加入无菌离心管中,打开离心管口并置于反应釜中;通入高纯 CO₂,加压至实验所需压力(0.5 MPa、0.9 MPa 和 1.3 MPa),保压一定时间(2 h、4 h 和 6 h)后,打开减压阀,从反应釜中取出样品进行后续实验分析。每个处理均重复 3 次。

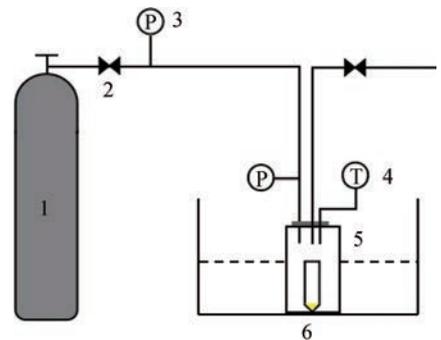


图 1 加压 CO₂ 装置示意图

Fig. 1 Schematic of pressurized CO₂ setup

1.3.3 微生物菌落计数 将 *p*-HPCD 处理后的菌液用磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液,0.01 mol/L)进行 10 倍稀释,选择合适的稀释度并吸取 0.1 mL 稀释样品滴于 TSA 平板上,使用涂布玻璃棒涂布均匀。于 25 °C 条件下培养 2~3 d 后,进行菌落计数,结果以 log₁₀ CFU/mL 表示。

1.3.4 菌体细胞形态观察 取 1 mL 菌悬液,于 4 °C、3500 r/min 条件下离心 15 min,弃上清液,加入 PBS 缓冲液漂洗细胞 2 次,然后重悬浮于 PBS 缓冲液中。参考 Q. S. Xiang 等^[17]的方法,采用 FE-

SEM 观察 *p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞形态的影响。在 25 °C、1.3 MPa 条件下,将 *P. deceptionensis* CM2 菌液经 *p*-HPCD 分别处理 0 h、2 h、4 h 和 6 h 后,于 4 °C、8000 r/min 条件下离心 5 min,收集菌体;用 PBS 缓冲液 (pH 值为 7.2~7.4) 清洗菌体 3 次,于 4 °C、8000 r/min 条件下离心 5 min,收集菌体;在菌体中加入 1 mL 预冷的 2.5% 戊二醛,于 4 °C 冰箱中避光放置 4 h 后,用 PBS 缓冲液清洗菌体 3 次;分别用体积分数为 30%、50%、70%、80%、90% 和 95% 的乙醇溶液对菌体进行梯度洗脱 15 min,再用乙醇洗脱 2 次,乙酸异戊酯置换 2 次,每次 20 min,于 4 °C、8000 r/min 条件下离心 5 min,收集菌体;将菌体滴加在干净的硅片上,于 50 °C 烘箱中烘干,采用真空蒸镀仪喷金 150 s,采用 FE-SEM 进行观察,加速电压为 20 kV。

1.3.5 胞外核酸和蛋白渗漏量的测定 在 25 °C、1.3 MPa 条件下,将悬浮于 PBS 缓冲液中的 *P. deceptionensis* CM2 经 *p*-HPCD 分别处理 0 h、2 h、4 h 和 6 h 后,取出样品,于 3500 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液,使用超微量紫外可见分光光度计测定其在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度,计算胞外核酸和蛋白渗漏量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.3.6 细胞膜完整性的测定 参考相启森等^[18]的方法,将悬浮于 PBS 缓冲液中的 *P. deceptionensis* CM2 经 *p*-HPCD 于 25 °C、1.3 MPa 条件下分别处理 0 h、2 h、4 h 和 6 h 后,加入终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI 染液,在 37 °C 黑暗处孵育 15 min 的菌悬液于 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min,用 PBS 缓冲液清洗菌体 2 次后重悬浮于 PBS 缓冲液中,立即用多功能酶标仪在 535 nm 激发波长和 605 nm 发射波长处检测菌悬液的荧光强度,以 63 °C 处理 30 min 的细菌细胞作为阳性对照。PI 的相对荧光强度 (F_{PI}) 计算公式如下。

$$F_{\text{PI}} = F_1/F_0 \times 100\%$$

式中: F_1 为 *p*-HPCD 处理组细胞荧光强度, F_0 为阳性对照组细胞荧光强度。

参考相启森等^[18]的方法,利用荧光显微镜对 PI 染色的细菌进行观察。将悬浮于 PBS 缓冲液中的 *P. deceptionensis* CM2 经 *p*-HPCD 于 25 °C、1.3 MPa

条件下处理 6 h 后,加入终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI 染液,在 37 °C 黑暗处孵育 15 min。将染色后的细菌彻底清洗以除去游离探针,使用适当激发/发射过滤器的荧光显微镜观察并拍照。

1.3.7 细胞膜电位的测定 参考 L. Y. Niu 等^[19]的方法,将悬浮于 PBS 缓冲液中的 *P. deceptionensis* CM2 经 *p*-HPCD 于 25 °C、1.3 MPa 条件下分别处理 0 h、2 h、4 h 和 6 h。用 PBS 缓冲液制备 EDTA 溶液 (4 mmol/L),以其为稀释液将 DiBAC₄(3) 染液稀释至质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,取 50 μL 稀释后的 DiBAC₄(3) 染液加入菌悬液中并使 DiBAC₄(3) 染液终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$,将该菌悬液在 37 °C 黑暗处孵育 15 min,然后于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 PBS 缓冲液清洗菌体 2 次后重悬浮于 PBS 缓冲液中,立即用多功能酶标仪在 490 nm 激发波长和 516 nm 发射波长处检测细菌悬浮液的荧光强度,DiBAC₄(3) 的相对荧光强度 ($F_{\text{DiBAC}_4(3)}$) 计算公式如下。

$$F_{\text{DiBAC}_4(3)} = F_1/F_0 \times 100\%$$

参考相启森等^[18]的方法,利用荧光显微镜对 DiBAC₄(3) 染色的细菌进行观察。将悬浮于 PBS 缓冲液中的 *P. deceptionensis* CM2 经 *p*-HPCD 于 25 °C、1.3 MPa 条件下处理 6 h 后,加入终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DiBAC₄(3) 染液,在 37 °C 黑暗处孵育 15 min。将染色后的细菌彻底清洗以除去游离探针,使用适当激发/发射过滤器的荧光显微镜观察并拍照。

1.4 统计分析

每个实验均重复 3 次,数据结果以(平均值 \pm 标准差)表示。使用 IBM SPSS 20.0 软件,通过单因素方差分析(ANOVA)、Duncan's 多重比较法对实验数据进行差异显著性分析。以 5% 的比较错误率作为差异显著的标准($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 不同压力和保压时间对 *p*-HPCD 杀菌效果的影响分析

不同压力和保压时间下,*p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 的杀菌效果如图 2 所示。由图 2 可

以看出,*p*-HPCD 能够有效杀灭 *P. deceptionensis* CM2, 且杀菌效果与压力和保压时间有关。在 25 °C 条件下, 经 0.5 MPa、0.9 MPa 和 1.3 MPa 处理 2 h 后, *P. deceptionensis* CM2 活菌数分别降低了 0.66 log₁₀ CFU/mL、1.04 log₁₀ CFU/mL 和 1.48 log₁₀ CFU/mL。在相同的保压时间下, *p*-HPCD 的杀菌效果与压力呈正相关, 这与沈培奇^[20]观察到的结果一致, 即在 25 °C 条件下使用加压 CO₂ (1~7 MPa) 处理生理盐水中的大肠杆菌 60 min, 大肠杆菌的失活率随 CO₂ 压力的升高而增加。这是因为压力会影响 CO₂ 在液态介质中的溶解速率及溶解度: CO₂ 压力的升高会导致反应体系中 CO₂ 密度增大, 溶解速率及溶解度也随之增加, 而较高密度的 CO₂ 会破坏细胞膜的结构和功能, 使 CO₂ 更易渗透进入微生物细胞, 引起胞内 pH 值下降、代谢紊乱等, 进而导致微生物失活^[21]。

保压时间是影响 *p*-HPCD 杀菌效果的另一个重要因素。在 1.3 MPa 条件下, 经 *p*-HPCD 分别处理 2 h、4 h 和 6 h 后, *P. deceptionensis* CM2 数量与处理前相比分别减少了 2.49 log₁₀ CFU/mL、2.52 log₁₀ CFU/mL 和 3.65 log₁₀ CFU/mL。同样地, 在 0.5 MPa 和 0.9 MPa 条件下, 经 *p*-HPCD 处理后的细菌失活率也随保压时间的延长呈现相同趋势。F. Y. Xu 等^[22]也报道了相似的结果, HPCD 在 25 MPa、40 °C 条件下对 *Vibrio parahaemolyticus* 分别处理 10 min 和 40 min 后, 其活菌数分别降低 5.69 log₁₀ CFU/mL 和 7.02 log₁₀ CFU/mL。

由此可见, CO₂ 压力和保压时间是影响 *p*-HPCD 对 *P. deceptionensis* CM2 杀菌效果的重要因素。此

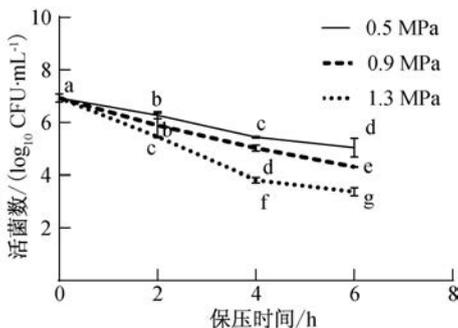


图2 *p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 的杀菌效果

Fig. 2 Bactericidal effect of *P. deceptionensis* CM2 after *p*-HPCD treatment

外, 处理温度、处理基质、细菌初始浓度等也可能对 *p*-HPCD 杀灭 *P. deceptionensis* CM2 的效果产生影响, 需要后续进一步深入研究。

2.2 *p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞形态的影响分析

在 25 °C、1.3 MPa 条件下, 经 *p*-HPCD 处理后 *P. deceptionensis* CM2 的 FE-SEM 图像如图 3 所示。由图 3a) 可以看出, 未经 *p*-HPCD 处理的 *P. deceptionensis* CM2 细胞具有完整的细胞结构, 呈表面光滑的棒状; 由图 3b) 可以看出, *p*-HPCD 于 1.3 MPa 处理 2 h 后, *P. deceptionensis* CM2 细胞表面出现轻微皱缩; 由图 3 c) 和 d) 可以看出, 随着保压时间的延长, 细胞表面皱缩加重, 细胞膜出现裂痕, 甚至出现细胞外膜与质膜分离, 而这可能会导致细胞内物质流出, 影响 *P. deceptionensis* CM2 细胞的正常代谢。由 FE-SEM 观察到的 *p*-HPCD 对 *P. deceptionensis* CM2 细胞的损伤进程与上述杀菌效果结论一致。周先汉等^[23]也发现, 与 HPCD 处理前相比, 经 HPCD 处理的大肠杆菌细胞表面出现了许多细密的小坑, 表面也变得更加粗糙。

2.3 *p*-HPCD 处理对细胞膜通透性的影响分析

通过测定胞外核酸和蛋白渗漏量可评价 *p*-HPCD 处理对细胞膜通透性的影响^[24]。*p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜通透性的影响如图 4 所示。由图 4 可以看出, 未处理组细胞的胞

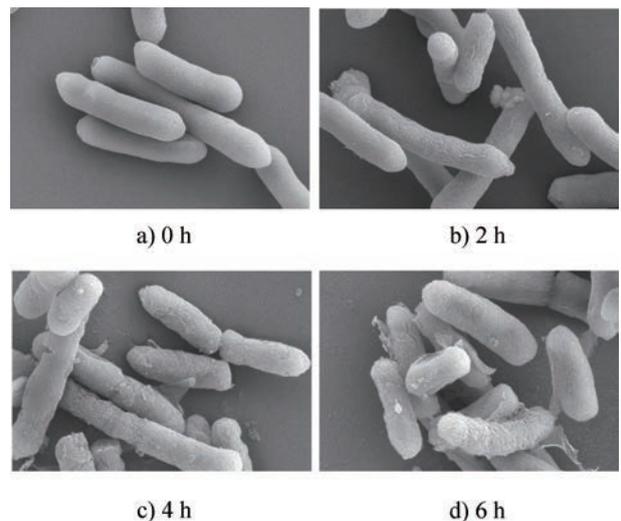


图3 *p*-HPCD 处理后 *P. deceptionensis* CM2 的 FE-SEM 图像

Fig. 3 FE-SEM images of *P. deceptionensis* CM2 after *p*-HPCD treatment

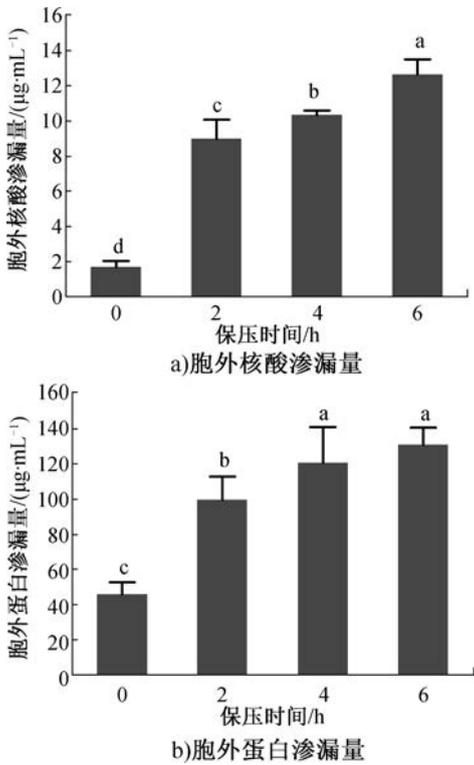


图4 *p*-HPCD处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜通透性的影响

Fig. 4 The effects of *p*-HPCD treatment on cell membrane permeability of *P. deceptionensis* CM2

外核酸和蛋白的渗透量分别为 $1.71 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $46.67 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。然而,在 1.3 MPa 条件下经 *p*-HPCD 处理会导致胞外核酸和蛋白渗透量随保压时间的延长而增加。经 *p*-HPCD 处理 6 h 后,胞外核酸和蛋白的渗透量分别增加了 $10.95 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $83.83 \mu\text{g}/\text{mL}$,这与 *P. deceptionensis* CM2 失活率增加的结论一致。如前所述,通过 FE-SEM 观察到了随着保压时间的延长,细胞膜损伤加重(图 2),损伤程度与胞外核酸和蛋白渗透量的增加相符合。结合 FE-SEM 结果可以推断,细胞膜是 *p*-HPCD 杀灭 *P. deceptionensis* CM2 的主要靶点之一。S. R. Kim 等^[25]也发现,随着 HPCD 保压时间的延长,菌悬液在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度均显著增加。这可能是因为 CO_2 分子具有亲脂性、低黏度和高扩散率,因此在压力的作用下可能会扩散到细胞膜的脂质双分子层中,从而改变 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜的结构和功能,并对其通透性产生影响^[26]。

2.4 *p*-HPCD 处理对细胞膜完整性的影响分析

PI 是一种疏水性的荧光染料,当细胞膜通透性

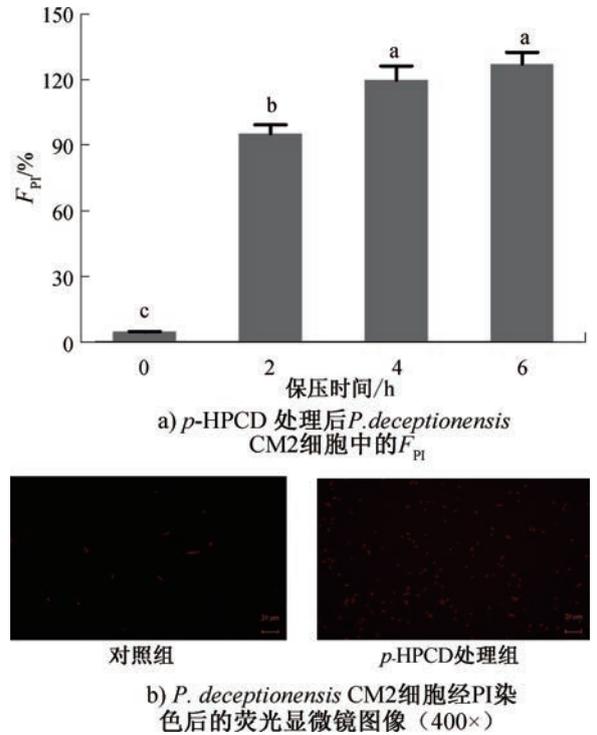


图5 *p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜完整性的影响

Fig. 5 The effects of *p*-HPCD treatment on cell membrane integrity of *P. deceptionensis* CM2

增强时,它能够进入细胞,与细胞内的遗传物质结合并发射出红色荧光^[27]。*p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜完整性的影响如图 5 所示。由图 5a)可以看出,*P. deceptionensis* CM2 中的 F_{PI} 随着保压时间的延长而增强。与未处理细胞相比,*p*-HPCD (1.3 MPa) 保压 2 h、4 h 和 6 h 后,*P. deceptionensis* CM2 细胞中的 F_{PI} 分别显著增加了 90.58% 、 114.98% 和 122.23% ($P < 0.05$)。这表明 *p*-HPCD 处理可诱导 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜通透性增加,证实了 FE-SEM 观察到的细胞形态改变。由图 5b)可以看出,在具有完整细胞膜的细胞中,PI 阳性细胞数量很少。而 *p*-HPCD 处理 6 h 后,红色荧光细胞的比例增加,这表明细胞膜的完整性受到破坏。H. Li 等^[28]也发现,在 HPCD 处理后,细菌失活率与 F_{PI} 呈正相关。*P. deceptionensis* CM2 细胞膜完整性的破坏会导致胞内核酸和蛋白渗漏,进而影响细胞的正常生长和代谢,最终导致微生物死亡。

2.5 *p*-HPCD 处理对细胞膜电位的影响分析

细胞膜电位是存在于活细胞细胞膜两侧的电

位差,是细胞膜通透性变化的先兆。细胞膜电位在细菌的能量转化、pH 稳态、主动转运、环境感知等生理行为的调节中起着重要作用^[29]。DiBAC₄(3)是一种膜电位敏感的染料,能够进入去极化细胞并通过与胞内蛋白结合表现出增强的荧光^[30]。*p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜电位的影响如图 6 所示。由图 6a)可以看出,*P. deceptionensis* CM2 细胞经 *p*-HPCD (1.3 MPa) 处理不同保压时间后,细胞中的 $F_{\text{DiBAC}_4(3)}$ 随着保压时间的延长而增强。经 *p*-HPCD 处理 2 h、4 h 和 6 h 后,胞内 $F_{\text{DiBAC}_4(3)}$ 分别增加至 106.09%、110.66% 和 111.94%,与 *P. deceptionensis* CM2 胞内的 F_{PI} 逐渐增强的趋势相似。L. Y. Niu 等^[31] 研究发现,*p*-HPCD (1.3 MPa, 30 °C) 处理 *S. typhimurium* 3 h 后,细胞中的 $F_{\text{DiBAC}_4(3)}$ 显著强于未处理组。荧光显微镜观察证实了上述结果(见图 6b)),*p*-HPCD 处理后绿色荧光细胞比例明显多于未处理细胞,胞内 DiBAC₄(3) 累积量的增加表明 *p*-HPCD 处理导致细胞膜电位发生了去极化,膜内外离子梯度发生的变化影响了细胞的正常代谢活动,从而导致细胞活性降低。

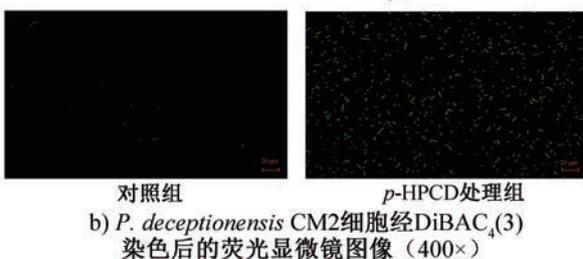
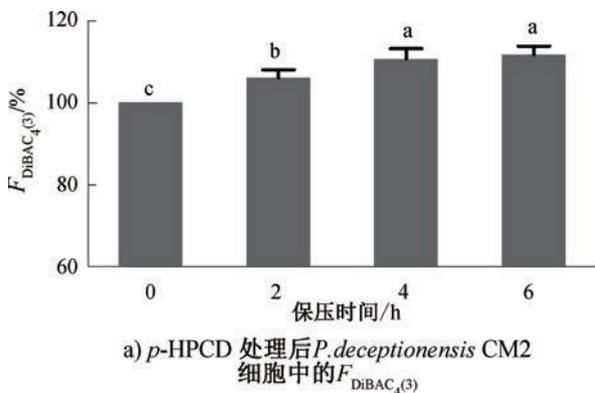


图 6 *p*-HPCD 处理对 *P. deceptionensis* CM2 细胞膜电位的影响

Fig. 6 The effects of *p*-HPCD treatment on cell membrane potential of *P. deceptionensis* CM2

3 结论

本文以 *P. deceptionensis* CM2 为目标菌株,通过 FE-SEM、荧光显微镜等,研究了 *p*-HPCD 杀菌技术在不同压力、保压时间下对 *P. deceptionensis* CM2 的杀菌效果,并对其杀菌机制进行了初步探索。结果表明,经 *p*-HPCD 在 1.3 MPa、25 °C 条件下分别保压 2 h、4 h 和 6 h 后,*P. deceptionensis* CM2 活菌数分别降低了 1.48 log₁₀ CFU/mL、3.11 log₁₀ CFU/mL 和 3.55 log₁₀ CFU/mL。*p*-HPCD 在 1.3 MPa、25 °C 条件下保压 4 h 后,*P. deceptionensis* CM2 细胞表面发生明显的皱缩,出现了裂痕,胞外核酸和蛋白渗漏量升高,细胞膜通透性及细胞膜电位发生了改变,而这些都可能是 *p*-HPCD 杀灭 *P. deceptionensis* CM2 的重要机制。该结果为 *p*-HPCD 杀菌技术在食品加工、贮藏和保鲜中的应用提供了理论依据。在今后的研究中,可将 *p*-HPCD 与其他技术相结合,在最大限度保持食品品质的同时,缩短杀菌时间,提高杀菌效率,从而推动 *p*-HPCD 杀菌技术在食品工业中的广泛应用。

参考文献:

- [1] 刘育颖. 非热杀菌技术在鲜榨果汁加工中的应用研究[J]. 食品科技, 2019, 44(8): 87-90.
- [2] 刘悦, 贺雅非, 李洪军, 等. 非热杀菌技术在肉及肉制品中的应用研究进展[J]. 肉类研究, 2020, 34(10): 88-95.
- [3] KUSTYAWATI M E, PRATAMA F, RIZAL S, et al. Quality and shelf life of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processed with High-pressure carbon dioxide (HPCD) at subcritical and supercritical states[J]. Journal of Food Quality, 2021, 2021: 6649583.
- [4] 吴志东, 高安平, 任彩霞, 等. 非热杀菌技术在乳制品加工中的应用研究进展[J]. 中国乳业, 2021(1): 53-55.
- [5] XIANG Q S, FAN L M, LI Y F, et al. A review on recent advances in plasma-activated water for food safety: Current applications and future trends

- [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020(3):1-19.
- [6] YU T H, NIU L Y, IWAHASHI H. High-pressure carbon dioxide used for pasteurization in food industry[J]. Food Engineering Reviews, 2020, 12(1):364-380.
- [7] ZONG W, DUAN J, ZHAO G Y. Effects of dense phase-CO₂ treatments on microflora, enzymes and browning of Chinese winter jujube juice [J]. Advance Journal of Food Science & Technology, 2015, 7(9):681-684.
- [8] 廖红梅, 周林燕, 廖小军, 等. 高密度二氧化碳对牛初乳的杀菌效果及对理化性质影响[J]. 农业工程学报, 2009, 25(4):260-264.
- [9] 史智佳, 李兴民, 刘毅, 等. 高压二氧化碳杀菌技术及在鲜肉中应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3):330-333.
- [10] MARSZALEK K, SKAPSKA S, WOZNIAK L, et al. Application of supercritical carbon dioxide for the preservation of strawberry juice: Microbial and physicochemical quality, enzymatic activity and the degradation kinetics of anthocyanins during storage[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 32:101-109.
- [11] CAPPELLETTI M, FERRENTINO G, ENDRIZZI I, et al. High pressure carbon dioxide pasteurization of coconut water: A sport drink with high nutritional and sensory quality [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 145:73-81.
- [12] NIU L Y, NOMURA K, IWAHASHI H, et al. Urea cycle is enhanced by *petit*-high pressure carbon dioxide stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. High Pressure Research, 2017, 37(1):70-77.
- [13] SPILIMBERGO S, DEGHANI F, BERTUCCO A, et al. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO₂ at low temperature[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(1):118-125.
- [14] KOBAYASHI F, ODAKE S. Intracellular acidification and damage of cellular membrane of *Saccharomyces pastorianus* by low-pressure carbon dioxide microbubbles [J]. Food Control, 2017, 71:365-370.
- [15] 楠部真崇. 微高压炭素ガス殺菌と無添加調味梅干しの開発[J]. 食品と容器, 2015, 56:736-742.
- [16] 谢美娟, 何向丽, 杜娟, 等. 冷鲜鸡胸肉中2种优势腐败菌的分离鉴定[J]. 食品科技, 2018(8):330-335.
- [17] XIANG Q S, LIU X F, LI J G, et al. Effects of dielectric barrier discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* and quality of apple juice [J]. Food Chemistry, 2018, 254:201-207.
- [18] 相启森, 张嵘, 杜桂红, 等. 等离子体活化水对沙门氏菌的灭活作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8):138-143.
- [19] NIU L Y, WU Z H, YANG L R, et al. Antimicrobial effect of UVC light-emitting diodes against *Saccharomyces cerevisiae* and their application in orange juice decontamination [J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(1):139-146.
- [20] 沈培奇. 加压 CO₂ 在生理盐水中的杀菌效果研究[J]. 食品安全导刊, 2015(30):43.
- [21] ALPAS H. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9):4248-4251.
- [22] XU F Y, FENG F M, SUI X, et al. Inactivation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* via supercritical carbon dioxide treatment [J]. Food Research International, 2017, 100:282-288.
- [23] 周先汉, 邹旭鹏, 曾庆梅, 等. 高压 CO₂ 杀灭大肠杆菌的杀菌机理研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19):11-16.
- [24] 刘骁, 李云菲, 王雯雯, 等. 紫外发光二极管对 *P. deceptionensis* CM2 杀菌作用及机制[J]. 食

- 品工业,2021,42(8):150-154.
- [25] KIM S R, RHEE M S, KIM B C, et al. Modeling of the inactivation of *Salmonella typhimurium* by supercritical carbon dioxide in physiological saline and phosphate-buffered saline[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(1):132-141.
- [26] 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(1):1-28.
- [27] SAMANTA A, PAUL B K, GUCHHAIT N. Photophysics of DNA staining dye propidium iodide encapsulated in biomimetic micelle and genomic fish sperm DNA[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2012, 109:58-67.
- [28] LI H, XU Z Z, ZHAO F, et al. Synergetic effects of high-pressure carbon dioxide and nisin on the inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33:180-186.
- [29] BOIX-LEMONCHE G, LEKKA M, SKERLAVAJ B. A rapid fluorescence-based microplate assay to investigate the interaction of membrane active antimicrobial peptides with whole Gram-positive bacteria[J]. Antibiotics, 2020, 9(2):92-107.
- [30] KIM D K, KIM S J, KANG D H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts [J]. Food Research International, 2017, 97:280-287.
- [31] NIU L Y, ZHANG Y L, JIE M S, et al. Synergetic effect of petit-high pressure carbon dioxide combined with cinnamon (*Cinnamomum cassia*) essential oil against *Salmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(5):2954-2967.

The bactericidal effect of *petit*-high pressure CO₂ on *Pseudomonas deceptionensis* CM2

ZHANG Yilin¹, LIU Jingfei¹, REN Mengmeng¹, NIU Liyuan^{1,2,3}, ZHANG Zhijian^{1,2,3}

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China;

3. Collaborative Innovation Center of Food Production and Safety of He'nan Province, Zhengzhou 450001, China

Abstract: This paper aimed to investigate the bactericidal effect of *petit*-high pressure carbon dioxide (*p*-HPCD) against *Pseudomonas deceptionensis* CM2 isolated from chicken as a function of CO₂ pressure or process time. The results showed that the bactericidal effect of *p*-HPCD on *P. deceptionensis* CM2 gradually enhanced with increasing CO₂ pressure or prolonging process time. After *p*-HPCD treatment under 1.3 MPa at 25 °C for 2 h, 4 h and 6 h, the populations of *P. deceptionensis* CM2 were decreased by 1.48 log₁₀ CFU/mL, 3.11 log₁₀ CFU/mL and 3.55 log₁₀ CFU/mL, respectively. *p*-HPCD treatment under 1.3 MPa at 25 °C for 4 h resulted in obvious shrinkage and cracks on the surface of *P. deceptionensis* CM2 cells. Moreover, *p*-HPCD treatment caused the leakage of nucleic acids and proteins from *P. deceptionensis* CM2 cells. Cell membrane permeability and membrane potential also significantly changed after *p*-HPCD treatment.

Key words: *petit*-high pressure CO₂ bactericidal technology; *Pseudomonas deceptionensis* CM2; bactericidal effect

(责任编辑:杨晓娟)