

溶菌酶协同高压 CO₂ 对酸土脂环酸杆菌芽孢的致死效果

周先汉¹, 吴克平^{1,*}, 曾庆梅², 邹旭鹏¹, 林秀峰¹

(1.合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009;

2.合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要:以芽孢致死率为评价指标, 通过单因素和正交试验考察溶菌酶添加量、压力、温度和时间在高压 CO₂ 处理过程中对酸土脂环酸杆菌芽孢致死效果的影响, 并优化杀菌条件。结果显示: 溶菌酶添加量、压力和温度对芽孢致死效果的影响均显著($P < 0.05$), 在溶菌酶添加量 0.10g/kg、压力 25MPa、温度 55℃、时间 60min 的优化条件下芽孢致死率可达到 5.47 个数量级。另对此条件下处理后的样品进行高效液相色谱(HPLC)和扫描电子显微镜(SEM)检测, 结果显示: 芽孢核心物质 2,6-吡啶二羧酸(DPA)发生大量泄露, 且部分芽孢完全破裂, 溶菌酶对高压 CO₂ 杀灭芽孢的协同效果显著($P < 0.05$)。

关键词: 高压 CO₂; 溶菌酶; 酸土脂环酸杆菌; 芽孢致死率; 2,6-吡啶二羧酸(DPA); 扫描电子显微镜(SEM)

Effects of Various Treatment Conditions on Efficacy of High Pressure Carbon Dioxide in Coordination with Lysozyme for Inactivating *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores

ZHOU Xian-han¹, WU Ke-ping^{1,*}, ZENG Qing-mei², ZOU Xu-peng¹, LIN Xiu-feng¹

(1.College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2.Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: One-factor-at-a-time and orthogonal array design methods were used to optimize four treatment conditions including lysozyme dose, pressure, temperature and treatment time that influence the bactericidal activity (evaluated by death rate of spores) of lysozyme in coordination with high pressure carbon dioxide against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. The results showed that lysozyme dose, pressure and temperature had a significant effect on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores ($P < 0.05$). The death rate of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores reached 5.47 orders of magnitude under the optimized conditions: lysozyme dose 0.10 g/kg, pressure 25 MPa, temperature 55 °C and treatment time 60 min. The HPLC analysis and observation under scanning electron microscopy (SEM) of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores treated under these conditions indicated large amounts of 2,6-pyridine dicarboxylic acid (DPA) leakage and complete rupture of partial spores. In conclusion, lysozyme has a significantly synergistic effect on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure carbon dioxide ($P < 0.05$).

Key words: high pressure carbon dioxide; lysozyme; *Alicyclobacillus acidoterrestris*; death rate of spores; 2,6-pyridine dicarboxylic acid (DPA); scanning electron microscopy (SEM)

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0001-05

酸土脂环酸杆菌是导致苹果汁、橘汁等热敏性果汁腐败的主要菌种^[1-2]。该菌是一类产芽孢的嗜酸耐热菌, 其孢子有很强的抗逆性, 能经受 95℃、2min 的灭菌处

理存活下来, 并可在 pH < 4 的果汁中萌发生长而导致其腐败, 热处理须在 121℃ 条件下至少 15min 才能将其彻底杀灭^[3], 这势必会对果汁的品质和营养造成极大破坏。

收稿日期: 2011-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871739; 30571304); 国家“863”计划项目(2011AA100801);

安徽省教育厅重点科研项目(KJ2007A099)

作者简介: 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

* 通信作者: 吴克平(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: crystal_1024@126.com

高压 CO₂ 技术(high pressure carbon dioxide, HPCD) 是一种新型的冷杀菌技术, 杀菌条件温和、低成本、无毒无残留, 在热敏性果汁杀菌领域有着巨大前景^[4]。目前, 高压 CO₂ 杀菌方法在压力低于 50MPa, 温度低于 60℃ 时能杀灭大约 5~12 个对数的营养细胞^[5], 而对于细菌芽孢, 单纯采用高压 CO₂ 在温和条件下难以达到理想的杀菌效果^[6-7]。因此, 为了减少芽孢对果汁的不利影响, 实现在温和条件下有效杀灭芽孢, 有必要采取有效措施来协同高压 CO₂ 杀菌。根据 GB2760—2011《食品添加剂使用标准》, 溶菌酶是一种天然抗菌免疫蛋白, 具有无毒、易分解、无残留等优点, 可用于食品的防腐保鲜, 而且其化学性质稳定, 在酸性条件下热稳定性强, 能适应果汁的酸性环境^[8]。曾庆孝等^[9]对溶菌酶协同高压静压杀灭嗜热脂肪杆菌芽孢的研究表明, 溶菌酶有助于提高芽孢对压力的敏感性。目前有关溶菌酶协同高压 CO₂ 灭菌效果的研究还未见报道。本研究将调查研究溶菌酶用于协同高压 CO₂ 对芽孢的致死效果, 并通过电镜观察和芽孢内容物的检测, 初步推测芽孢的致死过程, 旨在为高压 CO₂ 杀菌技术的进一步研究及其应用提供可靠的依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris* 10374)、CICC403[#] 液体培养基 中国工业微生物菌种保藏中心。

Na₂HPO₄、柠檬酸 无锡展望化工试剂有限公司; 溶菌酶(20000U/mg) 上海源聚生物科技有限公司; CO₂ 气体(纯度 99.99%) 合肥恒隆气体制造有限公司; 2,6-吡啶二羧酸(色谱纯) 上海晶纯试剂有限公司。

CICC403[#] 液体培养基配方(pH4.0, 固体培养基为在液体培养基中添加琼脂 15g): CaCl₂·2H₂O 0.25g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、(NH₄)₂SO₄ 0.2g、KH₂PO₄ 3.0g、葡萄糖 5.0g、酵母膏 2.0g、蒸馏水 1L。所用培养基试剂均为分析纯; 缓冲溶液(pH3.74)包括: 0.1mol/L Na₂HPO₄、0.2mol/L 柠檬酸。

1.2 仪器与设备

HA121-50-01-C 超临界 CO₂ 萃取装置 江苏南通华安超临界萃取有限公司; TDL-50B 台式离心机 上海安亭科学器械厂; SWO-CJ-1F 超净工作台 苏州净化设备有限公司; SYQ-DSX-Z898 手提式蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; YY0027-90 电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; ACQUITY UPLC-LCT Premier XE 液相色谱仪 美国 Waters 公司; JSM-6490LV 扫描电子显微镜 日本电子公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备^[10]

用接种环将酸土脂环酸杆菌从斜面接种至液体培养基中, 置于 45℃ 摇床中活化培养 24h。取适量活化菌液至固体培养基上, 于 45℃ 恒温培养箱中培养 3d, 置室温中培养 4~5d, 镜检芽孢数达到 90%~95% 时, 在无菌条件下用无菌蒸馏水洗脱菌苔; 4℃、5000r/min 离心 15min, 弃上清液, 用无菌蒸馏水清洗离心 2 次后, 沉淀倒入无菌蒸馏水, (85 ± 1)℃ 水浴 30min 杀死营养体, 制成 10⁹~10¹⁰CFU/mL 菌悬液, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 活菌数的检验

采用平板菌落计数法。将实验处理前后菌液稀释至一定浓度后, 涂布于 CTCC403[#] 固体培养基上, 45℃ 培养 48h 后计数, 计数方法参照 GB4789.21—2003《食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验》。

1.3.3 溶菌酶协同高压 CO₂ 处理

以 10mL 芽孢菌悬液加入到 190mL 无菌缓冲溶液中配成的 200mL 菌液作为处理基质。重复 3 次, 取平均值。

单因素试验: 分别考察以下 4 个因素对芽孢致死率的影响。

1) 溶菌酶添加量: 分别添加 0.00、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10g/kg 溶菌酶后, 立即将菌液倒入高压 CO₂ 萃取釜, 在 30MPa、50℃ 条件下处理 60min。

2) 处理压力: 将溶菌酶(前一组优化得到的最佳添加量)加入菌液中, 保持温度为 50℃, 分别在 10、15、20、25、30、35MPa 处理 60min。

3) 处理温度: 固定其他条件(取前两组优化得到的溶菌酶添加量和处理压力), 分别在 25、35、40、50、60、70℃ 条件下处理 60min。

4) 处理时间: 固定其他条件(取前三组优化得到的溶菌酶添加量、处理压力和温度), 分别处理 20、30、40、50、60、90min。

正交试验: 依据单因素试验结果, 选取 L₉(3⁴) 正交试验表, 进一步优化杀菌条件。

1.3.4 芽孢致死率的测定

将处理后的菌液立即进行梯度稀释后涂布, 45℃ 培养 48h 后计数, 并按下式计算芽孢致死率。

$$\text{芽孢致死率} = \lg \frac{\text{处理前的活菌数}}{\text{处理后的活菌数}}$$

1.3.5 2,6-吡啶二羧酸(DPA)的检测

取高压 CO₂ 处理后的菌液 40mL, 4℃、10000r/min 离心 10min, 取上清液抽滤后进行真空浓缩, 然后用

0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 进行 HPLC 分析, 色谱条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(50mm × 2.1mm, 1.7 μm); 流动相: 体积比 5:95 的乙腈 - 水(10mmol/L 乙酸铵 + 0.1% 甲酸)溶液; 流速: 0.3mL/min; 进样量: 标准品 0.5 μL, 样液 1 μL; 柱温: 40℃; 样品室温度: 10℃; 进样周期: 5 min。

1.3.6 芽孢的电子显微镜制样方法^[11]

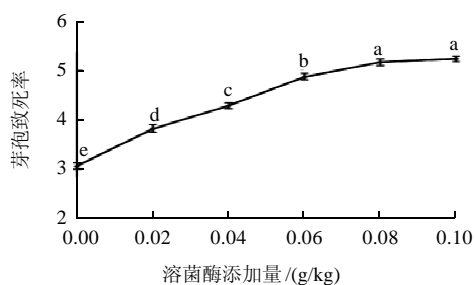
将盖玻片裁成 4 块, 洗净灭菌, 样品面做好标记。将 1%Formvar 氯仿溶液滴在作好标记的玻璃片上, 30s 后吸干多余的液体, 置于 60℃烘箱 30min 后使用。将一定浓度菌悬液滴在制备好的载玻片上, 静置 10 ~ 15min, 多余液体用滤纸吸干。待菌液刚蒸发完毕, 加入 0.1% 戊二醛预固定 1h, 再用 0.5% 戊二醛置换固定 2h。固定好的样品用 0.1mol/L 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 5 ~ 10min。将样品依次置于 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇中脱水置换, 每级置换时间为 10 ~ 15min。将上述制备的样品在超低温冰箱中冷冻结晶后, 于冷冻干燥机中 -20℃干燥约 20h, 即可在电子显微镜下观察。

1.4 数据处理

利用 Excel 2003 软件处理实验数据。

2 结果与分析

2.1 不同溶菌酶添加量对杀菌效果的影响



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 溶菌酶添加量对芽孢致死率的影响

Fig.1 Effect of lysozyme dose on the death rate of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores

由图1可知, 在 30MPa、50℃条件下处理 60min, 随着溶菌酶添加量的增加, 芽孢致死率显著升高($P < 0.05$), 添加量在 0.06~0.10g/kg 之间时, 与不添加溶菌酶时相比, 其芽孢致死率至少提高了 2 个对数级, 协同效果显著, 添加量为 0.10g/kg 时达到最大; 添加量在 0.06~0.08g/kg 时, 差异显著($P < 0.05$), 而在 0.08~0.10g/kg 时, 差异不显著($P > 0.05$)。故选择溶菌酶添加量在 0.08g/kg 左右为宜。

2.2 不同压力对杀菌效果的影响

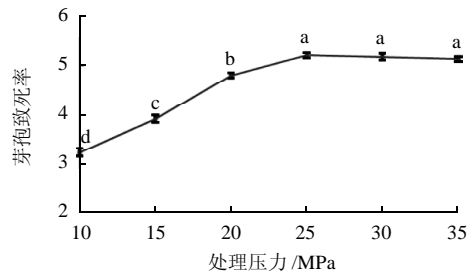


图2 处理压力对芽孢致死率的影响

Fig.2 Effect of pressure on the death rate of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores

由图2可知, 在溶菌酶添加量 0.08g/kg, 温度 50℃处理 60min 的条件下, 压力在 10~25MPa 之间对杀菌效果影响显著($P < 0.05$), 随着压力的逐渐增大, 芽孢致死率逐渐升高, 压力升至 25MPa 时达到最大, 这可能与压力致 CO₂ 渗透性提高和物理性伤害增强有关。但随着压力的继续升高, 杀菌效果未见增强, 可能是压力过高, 导致了芽孢的部分聚集, 抗压性相对增强, 从而削弱了杀菌效果^[12]。故选择处理压力在 25MPa 左右为宜。

2.3 不同温度对杀菌效果的影响

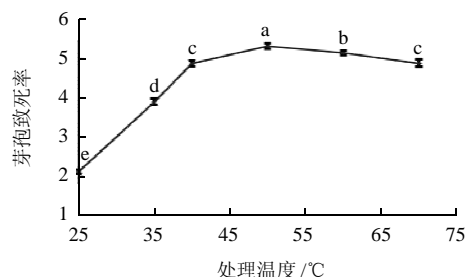


图3 处理温度对芽孢致死率的影响

Fig.3 Effect of temperature on the death rate of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores

由图3可知, 在溶菌酶添加量 0.08g/kg、压力 25MPa 处理 60min 的条件下, 随着处理温度的升高, 芽孢致死率呈先增后减趋势, 温度在 25~50℃之间时芽孢致死率显著升高($P < 0.05$), 温度为 50℃时致死率达到最大。这一变化可能与溶菌酶的活性有较大关系, 据报道溶菌酶作用的最适温度为 45~50℃^[13]; 温度较低时, 酶活性较弱, 随着温度逐渐升高, 酶活性逐渐提高, 协同杀菌效果也随之增强, 而温度达到 60℃以后, 酶可能部分失活, 使杀菌效果有所减弱。故选择处理温度在 50℃左右为宜。

2.4 不同时间对杀菌效果的影响

由图4可知, 在溶菌酶添加量 0.08g/kg、压力 25MPa、温度 50℃的条件下, 随着处理时间的延长, 芽孢致死率逐渐升高($P < 0.05$), 在 50min 以后趋势逐渐

平缓, 处理时间 90min 与 60min 时相比, 致死率仅提高约 0.1 个对数, 可能是由于芽孢激活的是可逆的, 处理时间的延长可能使已被激活的芽孢重新变成休眠状态^[14], 而且溶菌酶的活性随着时间的延长也会逐渐降低, 这些因素都可能影响杀菌效果。故选择处理时间在 50min 左右为宜。

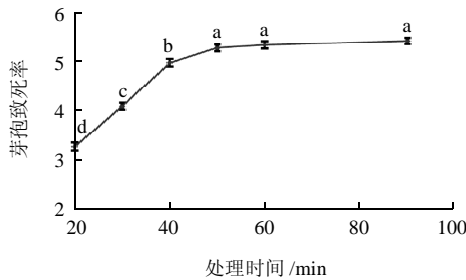


图4 处理时间对芽孢致死率的影响

Fig.4 Effect of treatment time on the death rate of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores

2.5 正交试验设计和结果分析

在单因素试验基础上, 对芽孢致死率影响均显著 ($P < 0.05$) 的溶菌酶添加量、高压 CO_2 处理压力、处理温度、处理时间 4 因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 因素水平和结果见表 1、2。

表1 正交试验设计及结果

Table 1 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

试验号	因素				芽孢致死率				
	A(溶菌酶/ g/kg)	B(温 度/ $^{\circ}\text{C}$)	C(时间/ min)	D(压力/ MPa)	1	2	3	合计	平均值
1	1(0.06)	1(45)	1(40)	1(20)	4.79	4.65	4.68	14.12	4.71
2	1	2(50)	2(50)	2(25)	5.04	4.96	5.01	15.01	5.00
3	1	3(55)	3(60)	3(30)	4.95	4.98	5.03	14.96	4.99
4	2(0.08)	1	2	3	5.22	5.17	5.18	15.57	5.19
5	2	2	3	1	5.18	5.11	5.09	15.38	5.13
6	2	3	1	2	5.35	5.27	5.33	15.95	5.32
7	3(0.10)	1	3	2	5.37	5.45	5.37	16.19	5.40
8	3	2	1	3	5.31	5.28	5.37	15.96	5.32
9	3	3	2	1	5.32	5.28	5.23	15.83	5.28
K_1	44.09	45.88	46.03	45.33					$T = 138.97$
K_2	46.90	46.35	46.41	47.15					$CT = 715.28$
K_3	47.98	46.74	46.53	46.49					
SS _j	0.896	0.041	0.015	0.189					

由表 1 可知, 影响芽孢致死率的因素主次顺序为 $A > D > B > C$, 获得高芽孢致死率的因素水平组合为 $A_3B_3C_3D_2$, 此组合与正交表中芽孢致死率最高的 7 号试验组合 $A_3B_1C_3D_2$ 同时进行验证实验, 验证结果显示, $A_3B_3C_3D_2$ 组合的芽孢致死率为 5.47, 略高于 7 号试验组合 $A_3B_1C_3D_2$ 的结果, 故确定 $A_3B_3C_3D_2$ 为最佳杀菌方案。

表2 正交试验方差分析表

Table 2 Analysis of variance for the experiment results of orthogonal array design

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	显著性
A	0.896	2	0.448	205.387	**
B	0.041	2	0.021	9.445	**
C	0.015	2	0.008	3.470	*
D	0.189	2	0.094	43.239	**
误差	0.039	18	0.002		

注: **· 差异极显著 ($P < 0.01$); *· 差异显著 ($P < 0.05$); $F_{0.01(2,18)} = 6.01$, $F_{0.05(2,18)} = 3.55$, $F_{0.10(2,18)} = 2.62$ 。

表 2 方差分析的结果显示, 溶菌酶添加量、处理温度、处理压力均是影响芽孢致死率为极显著因素, 而处理时间为显著性因素。综上所述, 溶菌酶协同高压 CO_2 杀灭芽孢的最佳条件为溶菌酶 0.10g/kg、处理压力 25MPa、处理温度 55°C 、处理时间 60min。

2.6 DPA 检测结果对比

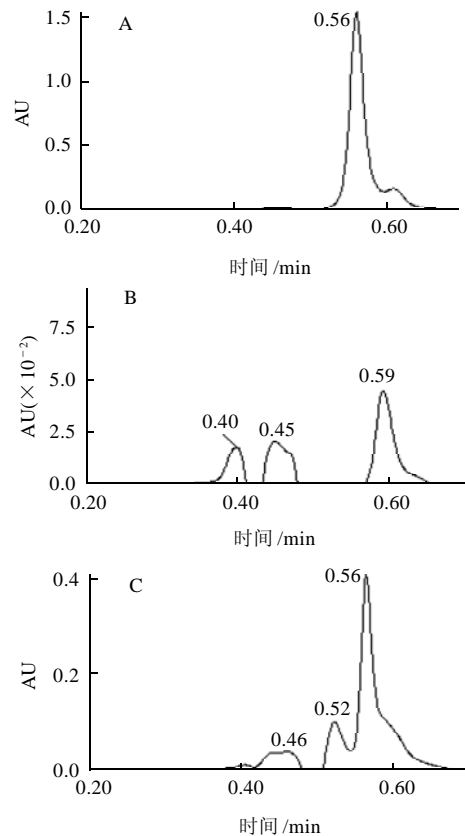


图5 DPA 标准品(A)、高压 CO_2 单独处理后的菌液(B)以及溶菌酶协同高压 CO_2 处理后的菌液(C)的高效液相色谱图

Fig.5 HPLC profiles of DPA standard and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores treated with high pressure carbon dioxide alone or combined with lysozyme

DPA 是细菌芽孢中特有的物质, 存在于芽孢的核心部位, 约占芽孢干质量的 10%, 它的一个重要功能是降低芽孢核心区的水分, 通过保护芽孢核内的蛋白质、DNA 来提高芽孢的抗性^[15], DPA 的泄露量可反映

芽孢的受损情况。实验对最优杀菌方案(图 5C)下添加和未添加(图 5B)溶菌酶的高压 CO₂ 处理液中的 DPA 泄露情况进行了 HPLC 分析, 结果如图 5 所示。添加和未添加溶菌酶的高压 CO₂ 处理液中都检测到了 DPA(保留时间分别为 0.56min 和 0.59min, 基本一致), 与未添加溶菌酶的处理液相比, 添加了溶菌酶的处理液中 DPA 含量显著增加。高瑀琰等^[16]研究认为, 芽孢通透性屏障受损, 物理结构被破坏, 从而引起了芽孢 DPA 的泄露, 因此, 以上结果说明在溶菌酶协同高压 CO₂ 作用下对芽孢通透性破坏程度较大, 也可能发生了彻底的破裂, 才会导致芽孢最核心的物质 DPA 发生较多渗漏。

2.7 扫描电子显微镜图对比

在优化的最佳杀菌条件下, 分别对添加和未添加溶菌酶的高压 CO₂ 处理菌液进行电子显微镜制样及观察, 结果如图 6 所示。

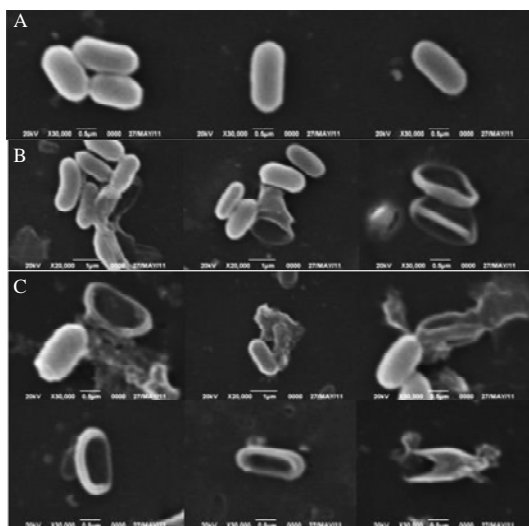


图 6 未处理(A)、高压 CO₂ 单独处理后的菌液(B) 以及溶菌酶协同高压 CO₂ 处理后的菌液(C)的芽孢扫描电子显微镜图

Fig.6 SEM images of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores before and after treatment with high pressure carbon dioxide alone or combined with lysozyme

由图 6A 可知, 未经处理的酸土脂环酸杆菌的芽孢形态结构完整, 为短杆的椭球形; 由图 6B 可知, 单独高压 CO₂ 处理后的芽孢大部分表面形态较完整, 有少数发生凹陷、破裂、细胞内容物渗漏, 推测主要是压力作用和 CO₂ 高渗透性产生的萃取作用导致了芽孢壁通透性的改变, 芽孢内容物发生渗漏, 生理代谢失衡, 从而造成了芽孢的死亡; 但同时发现处理后芽孢大部分产生聚集, 削弱了压力和 CO₂ 的作用, 这可能是导致芽孢致死率低的原因之一。而由图 6C 可明显看到, 经过溶菌酶协同处理的芽孢在形态和结构上发生了较大变化, 可观察到一些细胞完全破裂, 胞内物质渗漏和

一些细胞壁空壳。可以推断溶菌酶对芽孢壁成分产生了某种分解作用(芽孢皮层和芽孢壁主要由肽聚糖组成, 溶菌酶对肽聚糖分子具有破坏作用^[17]), 使得在压力作用下, CO₂ 更容易渗透到芽孢内部, 在卸压过程中 CO₂ 迅速扩散, 使芽孢瞬间胀裂, 崩溃。这一结果也进一步验证了图 5C 中 DPA 泄露量较大的原因。

3 结 论

采用溶菌酶协同高压 CO₂ 处理优化的最佳杀菌条件为溶菌酶 0.10g/kg、处理压力 25MPa、处理温度 55℃、处理时间 60min, 能使芽孢致死率达到 5.47 个数量级, 与高压 CO₂ 单独处理(芽孢致死率为 3.00 个数量级左右)相比, 提高了大约 2.47 个数量级。另外, 由处理后样品的高效液相色谱和扫描电镜检测结果判定, 溶菌酶对高压 CO₂ 杀菌的协同效果显著, 两者共同作用导致了芽孢很大程度地受损和核心物质 DPA 的大量泄露, 从而造成芽孢大量死亡。

参考文献:

- [1] LEE S Y, CHUNG H J, KANG D H. Combined treatment of high pressure and heat on killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate[J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(5): 1056-1060.
- [2] WALKER M, PHILLIPS C A. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43(2): 250-260.
- [3] BAE Y Y, LEE H J, KIM S A, et al. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 136(1): 95-100.
- [4] 曾庆梅, 周先汉. 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.
- [5] DAMAR S, BALABAN M O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(2): 1-11.
- [6] 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.
- [7] 周先汉, 张安, 曾庆梅, 等. 超临界 CO₂ 杀灭芽孢工艺条件的优化[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(17): 9201-9203.
- [8] 薛源, 桂芬琦, 孙志健, 等. 高压 CO₂ 技术杀菌灭酶效果及其机理研究进展[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(3): 203-205.
- [9] 曾庆孝, 阮征. 高静压与其它因子对嗜热脂肪芽孢杆菌的作用[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 1998, 26(11): 62-67.
- [10] 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.
- [11] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2006: 129.
- [12] ENOMOTO A, NAKAMURA K, HAKODA M, et al. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(3): 305-307.
- [13] 马正智, 胡国华, 方国生. 我国溶菌酶防腐剂的研发与应用进展[J]. *中国食品添加剂*, 2007, 23(2): 177-182.
- [14] ZHANG Jian, DALAL N, MATTHEWS M A. Supercritical carbon dioxide and hydrogen peroxide cause mild changes in spore structures associated with high killing rate of *Bacillus anthracis*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(3): 442-451.
- [15] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 51-57.
- [16] 高瑀琰, 鞠兴荣, 吴定. 微热协同超高压处理杀灭芽孢杆菌芽孢效果的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(3): 59-63.
- [17] 张勇, 胡其标. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. *粮油加工与食品机械*, 2004, 26(3): 64-65.