

## 高压二氧化碳对人冠状病毒(hCoV-229E)的消杀效果

宁 鹏, 杨 东, 廖小军, 魏凡华, 饶 雷, 毕玉海

### Disinfection Effect of High-pressure Carbon Dioxide on Human Coronavirus (hCoV-229E)

NING Peng, YANG Dong, LIAO Xiaojun, WEI Fanhua, RAO Lei, and BI Yuhai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010273>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 高压二氧化碳处理对鲜切荸荠褐变的影响

Effect of High-pressure Carbon Dioxide Processing on Fresh-cut Chinese Water Chestnut Browning

食品工业科技. 2021, 42(15): 283-288 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100062>

#### 不同二氧化碳浓度气调包装对生鲜鸡翅贮藏过程中挥发性有机物的影响

Effects of Different Carbon Dioxide Ratio on Volatile Organic Compounds in Fresh Chicken Wings During Storage

食品工业科技. 2021, 42(17): 217-224 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020095>

#### 利用低场核磁共振技术研究二氧化碳气调贮藏下蛋清水分变化

Using LF-NMR to study the changes of moisture content of egg white under carbon dioxide modified atmosphere storage

食品工业科技. 2017(02): 313-318 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.052>

#### 射频杀菌对PE、PP包装材料外观及力学性能的影响

Effect of Radio Frequency Sterilization on Macroscopic and Mechanical Properties of PE and PP Packaging Materials

食品工业科技. 2019, 40(19): 205-208,215 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.19.034>

#### 不同包装材料对娃娃菜贮藏过程中品质指标的影响

Effect of Different Packaging Materials on Quality Indices of *Brassica campestris* during Storage

食品工业科技. 2020, 41(3): 270-276,284 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.03.045>

#### 苦瓜挥发油超临界二氧化碳萃取工艺优化及其抗炎活性研究

Volatile Oil Extracting Process Optimization from *Momordica charantia* L. by Supercritical CO<sub>2</sub> and Its Anti-inflammatory Activity

食品工业科技. 2019, 40(4): 153-158 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.04.025>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

宁鹏, 杨东, 廖小军, 等. 高压二氧化碳对人冠状病毒(hCoV-229E)的消杀效果 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 293–298. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010273

NING Peng, YANG Dong, LIAO Xiaojun, et al. Disinfection Effect of High-pressure Carbon Dioxide on Human Coronavirus (hCoV-229E)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 293–298. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010273

· 食品安全 ·

# 高压二氧化碳对人冠状病毒 (hCoV-229E) 的消杀效果

宁 鹏<sup>1,2</sup>, 杨 东<sup>3</sup>, 廖小军<sup>3</sup>, 魏凡华<sup>1,\*</sup>, 饶 雷<sup>3,\*</sup>, 毕玉海<sup>2,4,\*</sup>

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021;

2. 中国科学院流感研究与预警中心, 中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101;

3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 国家果蔬加工工程技术研究中心, 农业农村部果蔬加工重点实验室, 食品非热加工北京市重点实验室, 北京 100083;

4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘 要:**目的: 探究高压二氧化碳 (HPCD) 对人冠状病毒 229E (hCoV-229E) 的消杀效果。方法: 采用 HPCD 在不同温度 (10、25、37 °C)、压力 (6.3、10 MPa) 和时间 (15、30 min) 条件下, 对 hCoV-229E 进行消杀处理。结果: 与不加压相同温度处理的对照组相比, HPCD 在 10 °C、6.3 MPa 条件下对 50 mL 离心管中的病毒液处理 30 min 后, 病毒滴度显著降低 ( $P < 0.05$ ); 在 37 °C、10 MPa 条件下对 50 mL 离心管中的病毒液处理 15 min 后, 病毒滴度极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 在 37 °C、10 MPa 条件下对表面含有病毒的三文鱼肉、虾壳、聚乙烯类包装材料处理 15 min, 病毒滴度显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论: HPCD 在 37 °C、10 MPa 条件下处理 15 min, 可以有效消杀食品 (三文鱼肉和虾壳) 及聚乙烯类包装材料表面的 hCoV-229E。

**关键词:** 高压二氧化碳, 人冠状病毒, 食品表面, 包装材料, 消杀

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)02-0293-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010273

本文网刊:



## Disinfection Effect of High-pressure Carbon Dioxide on Human Coronavirus (hCoV-229E)

NING Peng<sup>1,2</sup>, YANG Dong<sup>3</sup>, LIAO Xiaojun<sup>3</sup>, WEI Fanhua<sup>1,\*</sup>, RAO Lei<sup>3,\*</sup>, BI Yuhai<sup>2,4,\*</sup>

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. CAS Key Laboratory of Pathogen Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Center for Influenza Research and Early-warning (CASCIRE), Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, National Engineering Research Center for Fruit & Vegetable Processing, Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key Laboratory for Food Non-thermal Processing, Beijing 100083, China;

4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Objective: Exploring the disinfection effect of high-pressure carbon dioxide (HPCD) on human coronavirus 229E

收稿日期: 2022-02-10

基金项目: 北京市科技计划 (Z201100009420002); 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB29010102); 国家自然科学基金项目 (32041010); 中国科学院青年创新促进会 (Y2021034); 国家科技资源共享服务平台 (国家病原微生物资源库-NPRC-32)。

作者简介: 宁鹏 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 病原微生物安全防控, E-mail: 939232523@qq.com。

\* 通信作者: 魏凡华 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 流感病毒致病机理, E-mail: weifanhua999@163.com。

饶雷 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品非热加工, E-mail: rao.lei@cau.edu.cn。

毕玉海 (1981-), 男, 博士, 研究员/教授, 研究方向: 病毒跨种传播机制与生物安全防控, E-mail: beeyh@im.ac.cn。

(hCoV-229E). Methods: The human coronavirus 229E (hCoV-229E) was treated by HPCD at different temperatures (10, 25, and 37 °C) and pressures (6.3 and 10 MPa) for different time (15 and 30 min). Result: Compared with the control groups under the corresponding temperatures, the virus titer in 50 mL tube treated with HPCD at 10 °C and 6.3 MPa for 30 min was significantly decreased ( $P<0.05$ ). The virus titer was also significantly reduced after treatment with HPCD at 37 °C and 10 MPa for 15 min ( $P<0.01$ ). Moreover, the virus titers inoculated on the surfaces of salmon meat, shrimp shell, and polyethylene packing materials were all significantly decreased after HPCD treatment at 37 °C and 10 MPa for 15 min as compared with the corresponding control groups ( $P<0.05$ ). Conclusion: HPCD treatment at 37 °C and 10 MPa for 15 minutes could effectively disinfect hCoV-229E on the surface of food (salmon meat and shrimp shell) and polyethylene packaging materials.

**Key words:** high-pressure carbon dioxide; human coronavirus; food surfaces; packaging materials; disinfection

2019 新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 自出现以来, 至今仍在全球大流行<sup>[1]</sup>。截至 2022 年 6 月 13 日, 造成全球约 5.3 亿人感染, 630 余万人死亡(<https://covid19.who.int/>)。随着病毒的广泛传播, SARS-CoV-2 不断发生突变, 德尔塔及奥密克戎等变异毒株层出不穷, 病毒感染力和致病力不断变化<sup>[2-5]</sup>, 严重威胁人类健康及公共卫生安全。

冠状病毒是有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四个属。目前可以感染人的冠状病毒有人冠状病毒 229E (human coronavirus 229E, hCoV-229E)、OC43 (human coronavirus OC43, hCoV-OC43)、NL63 (human coronavirus NL63, hCoV-NL63)、HKU1 (human coronavirus HKU1, hCoV-HKU1) 及严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 和 SARS-CoV-2 等 7 种冠状病毒, 其中 hCoV-229E、hCoV-NL63 为  $\alpha$  属, hCoV-OC43、hCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 为  $\beta$  属<sup>[6-9]</sup>。所有冠状病毒在复制、形态结构等方面都存在相似之处, 但感染后的潜伏期和致病力有所差别<sup>[10]</sup>。

有研究表明, 新冠肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 患者呼吸系统和消化系统均可排毒, 且消化系统排毒时间更长<sup>[11]</sup>; 而 SARS-CoV-2 可以通过消化系统感染实验动物<sup>[12-13]</sup>, 表明 SARS-CoV-2 存在粪口传播的风险。同时, 在冷链温度条件下 (4 和 -20 °C), SARS-CoV-2 可以在三文鱼、牛肉和猪肉表面存活一段时间<sup>[14]</sup>; 而在我国进口的冷链运输食品包装表面检测出 SARS-CoV-2 核酸并分离到活病毒, 提示 SARS-CoV-2 存在冷链传播途径<sup>[15-17]</sup>。此外, 海洋中多种鱼类血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 受体与人 ACE2 受体的氨基酸序列同源性较高, 存在感染 SARS-CoV-2 的风险<sup>[18]</sup>。以上研究结果表明, 在“新冠肺炎”疫情防控工作中不仅要防止“人传人”, 还要防止“物传人”, 需要加强对冷链食品及外包装的消杀工作。

冠状病毒结构较简单, 易受温度、紫外线辐射、

pH 和渗透压等环境因素影响, 诱导病毒结构蛋白构象发生变化, 破坏病毒囊膜或降解病毒核酸, 影响病毒稳定性或丧失感染性<sup>[19]</sup>。研究表明, 冠状病毒在 56 °C 的条件下 30 min 即可灭活; 在 70% 乙醇作用 10 min、丙醇作用 90 s 或 0.5% 戊二醇作用 2 min 即可丧失感染性<sup>[20]</sup>。由于食品中严禁添加非食用成分, 常规的消毒剂无法在食品表面使用, 而传统的巴氏杀菌、高温杀菌等热杀菌技术对冷链食品处理后, 会引起食品中营养物质流失、食品颜色改变, 影响食品口感及风味<sup>[21-23]</sup>。高压二氧化碳 (high-pressure carbon dioxide, HPCD) 是一种新型非热杀菌技术, 可有效克服传统热杀菌技术的弊端, 在较低压力 (<50 MPa) 和较低温度 (5~60 °C) 条件下利用 CO<sub>2</sub> 对食品进行处理, 可实现杀菌钝酶效果, 同时保留食品原有风味、口感及营养成分<sup>[24-26]</sup>。HPCD 处理过程温度低、杀菌效果好, 泄压过程 CO<sub>2</sub> 吸热产生的冷冻效应可实现对冷冻产品品质的维持, 使其在冷链食品消杀方面具有较好的应用潜力。

由于 SARS-CoV-2 需要在生物安全三级实验室中进行操作, 受试验条件限制; 而 hCoV-229E 的稳定性等生物学特性与 MERS-CoV、SARS-CoV 等冠状病毒较为相近<sup>[27]</sup>, 并可以在生物安全二级实验室进行操作。因此, 本研究选用 hCoV-229E 作为 SARS-CoV-2 的替代毒株, 探究 HPCD 对冠状病毒的消杀效果, 为 HPCD 应用于冷链食品及包装的消杀提供理论依据, 为疫情常态化防控中冷链食品的消毒和管理措施提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

三文鱼肉、虾壳、聚乙烯类包装材料 中国农业大学食品科学与营养工程学院提供; 人肝癌细胞 (Huh-7) 中国医学科学院基础医学研究所; 人冠状病毒 229E (毒株名: VR-740) 赵金存教授惠赠, 实验室培养保存; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) GIBCO 公司; 青霉素钠、硫酸链霉素 山东鲁抗医药股份有限公司; 生理盐水 山东华鲁制药有限公司; 二氧化碳 (纯度  $\geq 99.5\%$ ) 河南沂之源气体销售有限公司。

CAU-HPCD-1 间歇式 HPCD 杀菌装置 中国农

业大学专利产品(专利号 ZL200520132590.X); 5424R 高速冷冻离心机 Eppendorf 公司; ME-E 涡旋仪 大龙兴创实验仪器有限公司; MCO-170AICUVL-PC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 普和希株式会社; LEICA DMi1 倒置显微镜 德国徕卡公司。

1.2 实验方法

1.2.1 hCoV-229E 病毒增殖 取 100 μL hCoV-229E 病毒液加入 Huh-7 细胞中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 恒温培养箱中孵育 1 h, 孵育结束后对细胞培养瓶中补充细胞维持液(DMEM 培养基中含终浓度为 100 U/mL 的青霉素和 100 μg/mL 的链霉素、2% FBS), 于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 恒温培养箱中继续培养。每 24 h 观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况; 当细胞出现 80% 以上 CPE 时收获病毒培养液<sup>[20]</sup>。

1.2.2 HPCD 对 hCoV-229E 消杀条件的研究 50 mL 离心管中加入 5×10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> 的 hCoV-229E 病毒液(总体积 5 mL, 生理盐水稀释); 在不同的消杀条件下(见表 1)使用 HPCD 对 hCoV-229E 进行处理, 每组进行三次重复试验。消杀处理方法如下: 试验组标记后放入预热(预冷)的间歇式 HPCD 杀菌装置反应釜中, 关闭反应釜通入 CO<sub>2</sub>, 加压至预设压力后进行保压、保温, 到达保压时间后对反应釜泄压, 完成后取出置于冰上; 将不加压、相同温度处理的对照组放入反应釜, 不通入 CO<sub>2</sub>, 使用间歇式 HPCD 杀菌装置对样品进行热处理; 所有样品处理完成后进行 TCID<sub>50</sub> 测定。

表 1 HPCD 对 hCoV-229E 的处理条件  
Table 1 Treatment conditions of HPCD for hCoV-229E

| 实验分组 | 样品分组              | 处理温度(℃) | 处理压力(MPa) | 保压时间(min) |
|------|-------------------|---------|-----------|-----------|
| 组A   | 试验组A              | 10      | 6.3       | 15        |
|      | 对照组A              | 10      | —         | 15        |
| 组B   | 试验组B              | 25      | 6.3       | 15        |
|      | 对照组B              | 25      | —         | 15        |
|      | 试验组C <sub>1</sub> | 37      | 6.3       | 15        |
| 组C   | 试验组C <sub>2</sub> | 37      | 10        | 15        |
|      | 对照组C              | 37      | —         | 15        |
| 组D   | 试验组D              | 10      | 6.3       | 30        |
|      | 对照组D              | 10      | —         | 30        |

1.2.3 HPCD 对食品及聚乙烯类包装材料表面 hCoV-229E 的消杀效果 三文鱼肉、虾壳、聚乙烯类包装材料表面滴加 10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> 的 hCoV-229E 病毒液(滴加病毒液的总体积为 100 μL), 根据 1.2.2 确定的 HPCD 最佳消杀条件, 对三文鱼肉、虾壳、聚乙烯类包装材料等样品(三文鱼肉边长为 1 cm×1 cm×1 cm, 为块状; 虾壳、聚乙烯类包装材料边长为 1 cm×1 cm, 为片状)进行消杀处理, 同时设立相对应不加压的相同温度处理的对照组; 每组三次重复试验, 试验操作方法同 1.2.2。HPCD 对样品消杀后, 向盛放样品的离心管中加入 900 μL 病毒稀释液(DMEM 培养

基中含终浓度为 100 U/mL 的青霉素和 100 μg/mL 的链霉素), 涡旋振荡 2 min, 回收上清液后在高速冷冻离心机中 7000 r/min 离心 10 min, 取离心后的上清液使用 0.22 μm 滤器过滤, 然后滴定 TCID<sub>50</sub><sup>[18]</sup>。TCID<sub>50</sub> 计算方法如下:

待滴定样品的不同稀释度稀释液加入 96 孔板细胞后, 培养至 120 h, 显微镜观察并记录 96 孔细胞培养板中的细胞病变情况, 按照 Reed-Muench 法<sup>[28]</sup> 计算病毒的 TCID<sub>50</sub>, 计算公式如下:

$\text{Log}_{10} \text{TCID}_{50}$  = 高于 50% 感染率的病毒稀释度对数 + 相应距离比 × 稀释系数的对数

相应距离比 = 
$$\frac{\text{高于50\%的阳性百分数} - 50\%}{\text{高于50\%的阳性百分数} - \text{低于50\%的阳性百分数}}$$

1.3 数据处理

本试验所有数据使用 GraphPad Prism 8 进行统计, 使用 *T*-test 对数据进行统计学分析, 当 *P*<0.05 时具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 hCoV-229E 在 Huh-7 细胞中增殖

如图 1 所示, 接种病毒 24 h 后, 与对照 Huh-7 细胞(图 1a)相比, 接种 hCoV-229E 的细胞(图 1b)无明显细胞形态差异; 接种病毒 96 h 后, 与对照 Huh-7 细胞(图 1c)相比, 接种 hCoV-229E 的 Huh-7 细胞(图 1d)出现细胞皱缩、脱落等典型细胞病变。

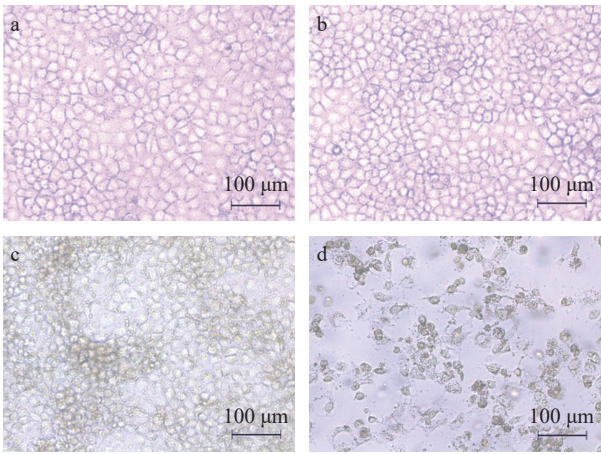


图 1 hCoV-229E 接种 Huh-7 细胞后细胞病变观察结果(200×)

Fig.1 Cytopathic effects of the hCoV-229E infected Huh-7 cells (200×)

注: 培养 24 h 后对照组(a)和感染组(b)Huh-7 细胞的形态; 培养 96 h 后对照组(c)和感染组(d)Huh-7 细胞的形态。

2.2 HPCD 对 hCoV-229E 的最佳消杀条件

HPCD 在 6.3 MPa 压力和不同的温度(10、25 及 37 ℃)条件下, 分别对 5×10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> 的 hCoV-229E 病毒液处理 15 min。由图 2 可知: 试验组 A、试验组 B 及试验组 C<sub>1</sub> 之间病毒滴度无显著差异(*P*>0.05), 与对应的相同温度处理对照组相比, 各试

验组经 HPCD 处理后 hCoV-229E 病毒滴度有下降趋势, 但无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 在 6.3 MPa 压力、10 °C 条件下(试验组 D)对  $5\times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> 的 hCoV-229E 病毒液进行 30 min 处理, 发现试验组与对照组差异显著 ( $P<0.05$ ); 在相同压力和相同温度 (10 °C) 消杀条件下, 试验组 A(处理 15 min) 和试验组 D(处理 30 min) 之间的病毒滴度没有显著差异 ( $P>0.05$ ), 提示在 10 °C 低温条件下延长 HPCD 处理时间不是 HPCD 消杀 hCoV-229E 的主要因素; 在 37 °C 处理 15 min 条件下, 提高 HPCD 处理压力, 由 6.3 MPa(试验组 C<sub>1</sub>) 提升至 10 MPa(试验组 C<sub>2</sub>), 结果显示提高压力后试验组 C<sub>2</sub> 的病毒滴度较试验组 C<sub>1</sub> 显著下降 ( $P<0.05$ ), 较对照组 C 相比极显著下降 ( $P<0.01$ )。试验结果表明, 提高 CO<sub>2</sub> 的压力会提升 HPCD 对 hCoV-229E 的消杀效果。综上, HPCD 对 hCoV-229E 的最佳消杀条件为 37 °C、10 MPa 消杀 15 min。

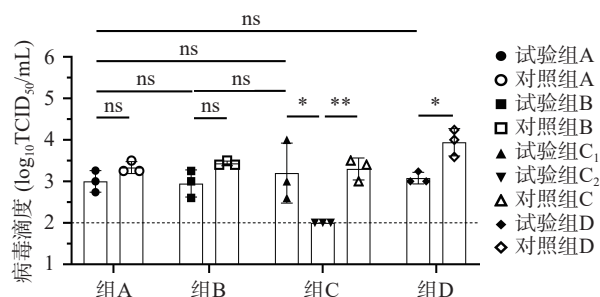


图2 不同的 HPCD 处理条件对 hCoV-229E 滴度的影响  
Fig.2 Effects of different HPCD treatment conditions on virus titers of hCoV-229E

注: \*表示  $P<0.05$ ; \*\*表示  $P<0.01$ ; ns 表示  $P>0.05$ 。

### 2.3 HPCD 对食品及包装材料表面 hCoV-229E 消杀效果

HPCD 在 37 °C、10 MPa 的条件下, 对表面含  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> hCoV-229E 的三文鱼肉、虾壳及聚乙烯类包装材料处理 15 min。结果如图 3 所示: 与不加压的温度处理对照组相比, 三文鱼肉试验组的病毒滴度显著下降 ( $P<0.05$ ), 虾壳及聚乙烯类包装材料试验组病毒滴度极显著下降 ( $P<0.01$ )。说明 HPCD 在

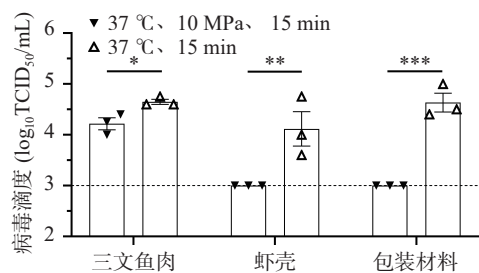


图3 HPCD 对表面含有 hCoV-229E 的食品及包装材料的消杀效果  
Fig.3 Disinfection effects of HPCD against hCoV-229E virus on the surface of food and packaging materials

注: \*表示  $P<0.05$ ; \*\*表示  $P<0.01$ ; \*\*\*表示  $P<0.001$ 。

37 °C、10 MPa 的条件下对表面含有 hCoV-229E 的三文鱼肉、虾壳和聚乙烯类包装材料处理 15 min 后, 对 hCoV-229E 具有一定的消杀效果; 同时, 相同 HPCD 的处理条件对虾壳及包装材料表面 hCoV-229E 的消杀效果要强于对三文鱼肉表面病毒的消杀效果, 原因可能是由于三文鱼肉蛋白质含量较高<sup>[29]</sup>, 影响 HPCD 对三文鱼肉中 hCoV-229E 病毒的消杀效果。

### 3 讨论与结论

HPCD 是一种绿色环保、无毒无害的杀菌方式, 对微生物具有良好的杀菌作用, 广泛应用于食品中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌及孢子等微生物的消杀<sup>[30-33]</sup>。温度和压力是影响 HPCD 消杀微生物的主要因素<sup>[34]</sup>。有研究发现, 提高 HPCD 消杀的处理温度、压力及延长消杀时间可有效提高对微生物的消杀效果<sup>[35-36]</sup>。本研究发现, HPCD 在 6.3 MPa 和处理 15 min 的条件下, 提高处理温度 (10、25 和 37 °C) 并不能显著提高消杀效果 ( $P>0.05$ ), 表明在 6.3 MPa 处理 15 min 条件下温度不是影响 HPCD 对 hCoV-229E 消杀效果的主要因素。此外, 在 10 °C、6.3 MPa 的条件下, 延长 HPCD 的保压处理时间 (由 15 min 延长至 30 min) 后发现, 病毒滴度差异不显著 ( $P>0.05$ ), 提示在该条件下处理时间也不是 HPCD 对 hCoV-229E 消杀的主要因素。

在本研究中, 使用 37 °C 和 10 MPa 的试验条件对样品处理 15 min, 获得了较好的消杀效果。可能是由于相比气态的 CO<sub>2</sub>, 超临界状态下 ( $T_c=31.1$  °C;  $P_c=7.38$  MPa) 的 CO<sub>2</sub> 具有较低表面张力, 可以更好地渗透到微孔中, 对微生物具有更高的杀灭作用<sup>[21,37]</sup>。Werren 等研究也证实超临界的 CO<sub>2</sub> 相比于气态的 CO<sub>2</sub> 对牛奶中的微生物具有更好的杀灭作用<sup>[38]</sup>。此外, 食品中蛋白质含量也是影响 HPCD 消杀效果的另一个因素, 对脂肪含量较高的食品的消杀效果较差<sup>[29]</sup>。本研究也发现, 超临界状态的 CO<sub>2</sub> 对三文鱼肉样品表面的 hCoV-229E 有一定消杀效果, 对虾壳和聚乙烯类包装材料表面病毒的消杀效果更佳。

冠状病毒对 pH 敏感, 不同的 pH 条件会影响冠状病毒的刺突蛋白结构, 进而影响刺突蛋白与受体结合能力。研究发现冠状病毒在 25 °C、pH=1 或 37 °C、pH=3 条件下放置 1 h 可完全被灭活<sup>[39]</sup>。而 CO<sub>2</sub> 可以在水中溶解形成碳酸, 降低水溶液的 pH<sup>[40]</sup>。Spilimbergo 等研究发现, 使用 HPCD 在 8 MPa、30 °C 的条件下处理 5 min, 可以使枯草芽孢杆菌悬液的 pH 降低至 3.3, 表明含水溶液经 HPCD 处理后, pH 会明显降低<sup>[41]</sup>; 因此, HPCD 引起水溶液中 pH 的降低是对冠状病毒消杀的重要因素。

综上, 本研究以人冠状病毒 (hCoV-229E) 为研究对象, 优化确定了 HPCD 对人冠状病毒的最佳消杀条件为 37 °C、10 MPa 处理 15 min, 发现消杀压力是 HPCD 消杀冠状病毒的重要因素。本研究得到的

消杀参数可以应用于食品包装表面的消杀。对于冷链食品消杀,可以考虑进一步提高处理压力,一方面实现消杀效果的提升,另一方面利用泄压过程 CO<sub>2</sub> 吸热产生的冷冻效应实现对产品品质的维持。此外,为应对实际生产应用需求,未来需要开发处理容积大、自动化程度高、稳定性好的商业化设备,实现在中央厨房、大型食品生产工厂、生鲜食品集散地及海关进出口食品检测等场景推广应用,为疫情常态化防控形势下保障冷链食品安全起到一定作用。在后续研究中,将继续探究 HPCD 对冠状病毒的消杀机制,进一步完善 HPCD 对病毒的消杀理论。

### 参考文献

- [1] LI D D, LI Q H. SARS-CoV-2: Vaccines in the pandemic era[J]. *Military Medical Research*, 2021, 8(2): 15.
- [2] ARNAUD F, BRIGITTE A, BRUNO L, et al. SARS-CoV-2 variants and ending the COVID-19 pandemic[J]. *The Lancet*, 2021, 397(10278): 952–954.
- [3] LUO C H, MORRIS C P, SACHITHANANDHAM J, et al. Infection with the SARS-CoV-2 delta variant is associated with higher infectious virus loads compared to the alpha variant in both unvaccinated and vaccinated individuals[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021: ciab986.
- [4] KARIM S S A, KARIM Q A. Omicron SARS-CoV-2 variant: A new chapter in the COVID-19 pandemic[J]. *The Lancet*, 2021, 398(10317): 2126–2128.
- [5] SHUAI H P, CHAN J F W, HU B J, et al. Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B. 1.1. 529 Omicron[J]. *Nature*, 2022, 603(7902): 693–699.
- [6] SU S, WONG G, SHI W F, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(6): 490–502.
- [7] WU Y, WANG F R, SHEN C G, et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2[J]. *Science*, 2020, 368(6496): 1274–1278.
- [8] ZHOU H, JI J K, CHEN X, et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses[J]. *Cell*, 2021, 184(17): 4380–4391.
- [9] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annual Review of Virology*, 2016, 3(1): 237–261.
- [10] KESHEH M M, HOSSEINI P, SOLTANI S, et al. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2022, 32(2): e2282.
- [11] ZHANG N, GONG Y H, MENG F P, et al. Comparative study on virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients[J]. *Science China-Life Sciences*, 2021, 64(3): 486–488.
- [12] SUN S H, CHEN Q, GU H J, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis[J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 28(1): 124–133.
- [13] LI J, LI H Y, XU J W, et al. The gastrointestinal tract is an alternative route for SARS-CoV-2 infection in a nonhuman primate model[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5): 1647–1661.
- [14] FENG X L, LI B, LIN H F, et al. Stability of SARS-CoV-2 on the surfaces of three meats in the setting that simulates the cold chain transportation[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(5): 1069–1072.
- [15] 张玮珊, 胡新玲, 律娜, 等. 新型冠状病毒对冷链运输食品质量安全的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6735–6742. [ZHANG W S, HU X L, LÜ N, et al. Influence of SARS-CoV-2 on the quality and safety of cold chain transportation food[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(17): 6735–6742.]
- [16] 王艺菲, 谢婧荷, 厉曙光, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情影响下进口冷链食品的风险防控[J]. *上海预防医学*, 2021, 33(5): 397–403. [WANG Y F, XIE J H, LI S G, et al. Risk management of imported cold-chain foods during the COVID-19 pandemic[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2021, 33(5): 397–403.]
- [17] 李婉, 黄毅, 凌伟, 等. 海鲜水产品可能是新型冠状病毒滋生重要“培养基”[J]. *医学争鸣*, 2021, 12(3): 55–59. [LI W, HUANG Y, LING W, et al. Seafood and aquatic products might be an important culture medium for SARS-CoV-2[J]. *Negative*, 2021, 12(3): 55–59.]
- [18] MATHAVARAJAH S, STODDART A K, GAGNON G A, et al. Pandemic danger to the deep: The risk of marine mammals contracting SARS-CoV-2 from wastewater[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 760: 143346.
- [19] FUMAGALLI M J, CAPATO C F, CASTRO-JORGE L A, et al. Stability of SARS-CoV-2 and other airborne viruses under different stress conditions[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(1): 183–187.
- [20] RABENAU H F, CINATL J, MORGENSEGGER B, et al. Stability and inactivation of SARS coronavirus[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2005, 194(1–2): 1–6.
- [21] 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.
- [22] YU T H, NIU L Y, HITOSHI I. High-pressure carbon dioxide used for pasteurization in food industry[J]. *Food Engineering Reviews*, 2020, 12(3): 364–380.
- [23] 李靖, 王嘉祥, 陈欢, 等. 超高压与热杀菌对刺梨汁贮藏期品质影响的比较[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 101–108. [LI J, WANG J X, CHEN H, et al. Comparison of the effects of ultra-high pressure and thermal processing on quality changes of *Rosa roxburghii* juice during storage[J]. *Food Science*, 2022, 43(15): 101–108.]
- [24] ZHOU L Y, BI X F, XU Z H, et al. Effects of high-pressure CO<sub>2</sub> processing on flavor, texture, and color of foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(6): 750–768.
- [25] 侯志强, 赵凤, 饶雷, 等. 高压二氧化碳技术的杀菌研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2015, 17(5): 40–48. [HOU Z Q, ZHAO F, RAO L, et al. Research progress on pasteurization and sterilization using high pressure carbon dioxide technology[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(5): 40–48.]
- [26] RAO L, BI X F, ZHAO F, et al. Effect of high-pressure CO<sub>2</sub> processing on bacterial spores[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(11): 1808–1825.

- [ 27 ] BLONDIN-BROSSEAU M, HARLOW J, DOCTOR T, et al. Examining the persistence of human coronavirus 229E on fresh produce[J]. *Food Microbiol*, 2021, 98: 103780.
- [ 28 ] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493-497.
- [ 29 ] ERKMEN O. Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Staphylococcus aureus* in broth and milk[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1997, 30(8): 826-829.
- [ 30 ] RAO L, LIANG Z, WANG Y T, et al. Mechanism of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO<sub>2</sub> at high temperature[J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 36-45.
- [ 31 ] ZHAO L, QIN X, WANG Y T, et al. CO<sub>2</sub>-assisted high pressure processing on inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 2017, 22: 53-62.
- [ 32 ] RAO L, XU Z Z, WANG Y T, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO<sub>2</sub> with high temperature[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 205: 73-80.
- [ 33 ] FERRENTINO G, BRUNO M, FERRARI G, et al. Microbial inactivation and shelf life of apple juice treated with high pressure carbon dioxide[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2009, 3: 3.
- [ 34 ] HATA C, KUMAGAI H, NAKAMURA K. Rate analysis of the sterilization of microbial cells in high pressure carbon dioxide[J]. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 1996, 2(4): 229-233.
- [ 35 ] 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(12): 7124-7129.
- [ 36 ] ERKMEN O. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide[J]. *Food Microbiology*, 2000, 17(2): 225-232.
- [ 37 ] RIBEIRO N, SOARES G, SANTOS-ROSALES V, et al. A new era for sterilization based on supercritical CO<sub>2</sub> technology[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2020, 108(2): 399-428.
- [ 38 ] WERENB B G, HOTCHKISS J H. Continuous flow nonthermal CO<sub>2</sub> processing: The lethal effects of subcritical and supercritical CO<sub>2</sub> on total microbial populations and bacterial spores in raw milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(3): 872-881.
- [ 39 ] DARNELL M E R, SUBBARAO K, FEINSTONE S M, et al. Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 121(1): 85-91.
- [ 40 ] 廖红梅, 廖小军, 胡小松. 高压二氧化碳杀菌机理研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(19): 387-390, 395. [ LIAO H M, LIAO X J, HU X S. Research progress in inactivation mechanisms of high pressure carbon dioxide[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(19): 387-390, 395. ]
- [ 41 ] SPILIMBERGO S, BERTUCCO A, BASSO G, et al. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO<sub>2</sub> treatment[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92(4): 447-451.