
УДК 566.264-31, 664.8.022

ИНАКТИВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В СРЕДЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО СО₂

¹А. В. Суслов, ¹И. Н. Суслова, ¹Б. Ф. Яровой, ²А. Ю. Шадрин*,
²А. А. Мурзин, ²Н. В. Сапожникова, ²А. А. Лумпов, ²А. С. Дормидонова

¹ПИЯФ РАН им. Б. П. Константина, Гатчина, Россия

²ФГУП «НПО «Радиевый институт им. В. Г. Хлопина», Санкт-Петербург, Россия

*shadrin@atom.nw.ru

Поступила в редакцию 29.06.2008 г.

В обзоре представлены результаты исследований возможностей применения СО₂ под давлением в качестве экологичного («green»), альтернативного традиционным, стерилизующего агента. Обсуждаются предложенные в литературе механизмы инактивации микроорганизмов в среде СО₂ и зависимость ее эффективности от давления, температуры, продолжительности обработки, вида микроорганизмов, обрабатываемого материала и ряда других факторов.

Ключевые слова: сверхкритический СО₂, инактивация, стерилизация, микроорганизмы.

ВВЕДЕНИЕ

Использование СО₂ под давлением является одним из самых перспективных способов холодной пастеризации и/или стерилизации жидких и твердых материалов, которые способны полностью или частично заменить широко используемую термообработку. Несмотря на то, что способность СО₂ инактивировать микроорганизмы известна с 20-х годов прошлого века [1], только в последние 15 лет был проявлен особый научный и экономический интерес к практическому применению данного метода.

Под инактивацией понимается частичная или полная потеря биологически активным веществом или агентом его активности, в том числе пролиферация, т. е. потеря способности к размножению, и как следствие этого — потеря патогенности и способности к синтезу вредных веществ. Она является чрезвычайно важным фактором для пищевой и фармацевтической промышленностей, а также для других областей, связанных с сохранением здоровья населения. Несмотря на то, что в течение долгого времени разрабатывались новые технологии стерилизации, в том числе химические и физические методы [2], самым эффективным методом инактивации микроорганизмов до сих пор является термическая стерилизация. Следует отметить, что термообработка существенно влияет на качество продуктов, уменьшая количество витаминов, ухудшает питательные свойства, внешний вид, цвет, вкус и т. д. Поэтому в тех случаях, когда термообработка невозможна, обычно приходится использовать альтернативные нетермические методы, такие как дегидратация, холодное консервирование и брожение. Однако данные методы остаются малоэффективными в подавлении размножения микроорганизмов [3].

В последнее время вследствие беспрецедентного роста производства свежих продуктов питания и фармацевтических изделий возросла необходимость в раз-

работке более эффективных нетермических методов стерилизации, удовлетворяющих потребностям рынка. Использование высокого гидростатического давления, интенсивных пульсирующих электрических полей, радиационного облучения или сочетание этих методов — только некоторые из нетермических методов, исследованных в последнее время в качестве альтернативных термообработке [3].

Однако применение вышеуказанных методов в промышленных масштабах оказалось малопригодным по ряду объективных причин: высокие капитальные затраты, дорогостоящая эксплуатация, низкая эффективность инактивации микрофлоры и недостаточная безопасность непосредственно во время работы. Так, например, обработка при высоком гидростатическом давлении или динамическом давлении для инактивации *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* [4] и *Escherichia coli* (*E. coli*) [5] проводилась при 2000 и 6000 атм. В связи с тем, что в настоящее время требования к промышленному оборудованию не позволяют использовать давление выше 4000 атм, этот метод крайне сложно применить в промышленном масштабе [6, 7].

Влажная термообработка — еще один часто используемый метод инактивации [8]. Хотя проведение влажной термообработки при температуре ниже 100 °C (дезинфекция) [2] и приводит к разрушению ряда патогенных или других опасных микроорганизмов, споры бактерий при этом не погибают [9]. С другой стороны, этот же процесс при температурах выше 121 °C (стерилизация) [2] разрушает все формы микроорганизмов [9]. Однако столь высокие температуры влекут за собой все связанные с термообработкой недостатки, отмеченные выше [10].

В связи с этим развитие альтернативного метода обработки в среде диоксида углерода (в сверхкритическом, жидким и газообразном состояниях), который в значительной степени лишен перечисленных выше недостатков, свойственных термическим и остальным методам, представляет несомненный интерес. В настоящее время опубликовано большое число статей и обзоров на тему исследований в данной области, среди которых следует отметить обзоры Perrut [11], Spilimbergo [12], Koutchma [13].

Биологическое действие CO₂ на микроорганизмы

Диоксид углерода — это нетоксичный газ с антимикробными свойствами, который часто присутствует в пищевых продуктах и напитках [14]. Известно, что антимикробная эффективность CO₂ зависит не только от давления и температуры [15, 16], но также от его фазового состояния (газ, жидкость или сверхкритический флюид) и концентрации растворенного CO₂ в исследуемом образце [14]. Сверхкритический CO₂ (СК-CO₂) [17] обладает хорошей растворимостью и проникающей способностью, что позволяет ему проходить через клеточную оболочку и внутрь спор, где за счет образования слабой угольной кислоты понижается pH внутриклеточной среды [18–20]. Возможно даже удаление части содержимого бактериальной клетки через перфорированную СК-CO₂ клеточную стенку [21, 22].

Данные первых систематических исследований о том, что CO₂ при температуре и давлении выше критических ($T_{kp} = 31,2$ °C, $P_{kp} = 71,1$ атм) отлично защищает продукты от окисления, инактивирует вирусы и подавляет рост некоторых микроорганизмов, были представлены примерно 100 лет назад Jones [23] и Daniels [14]. Однако только благодаря экономическим факторам в последнее время наблюдается особый научный интерес к практическому применению данного метода обработки, прежде всего, пищевых материалов и медицинских препаратов.

В зависимости от фазового состояния CO₂ насыщение им исследуемого раствора может осуществляться несколькими путями:

- продувкой CO₂ емкости с образцом [24];
- подачей жидкого CO₂ в емкость с исследуемым образцом [25];
- впрыском СК-CO₂ в сосуд с исследуемым образцом [18, 19, 26]; вариантом впрыска является продувка CO₂ через микрофильтр [18, 19, 27].

Для оптимизации периодического процесса инактивации разрабатываются новые, более экономичные технологии. В работе Spilimbergo [28] инактивация проводилась в полунепрерывном режиме. Показано, что непрерывный поток флюида более эффективен, чем статический процесс [29]. Наиболее эффективны для работы в непрерывном режиме противоточные колонки или мембранны (такие как POROCRIT) [30—32]. В работах Shimoda [21] и Ishikawa [30, 33] для барботирования поступающего CO₂ на входе был установлен специальный фильтр, при этом эффективность инактивации значительно увеличилась.

За последние несколько лет опубликовано достаточно большое количество работ по инактивирующему действию CO₂ на различные микроорганизмы [34—38]. Некоторые опубликованные данные по инактивации вегетативных клеток бактерий и спор под действием CO₂ представлены в таблице.

Анализ литературных данных показал, что *E. coli* является наиболее часто используемым микроорганизмом для исследования инактивации как в суб- [17, 20, 49], так и в сверхкритических [20, 22, 31, 49—51] условиях. Так, например, Kamihira с соавторами [20] показали, что наиболее высокая эффективность инактивации, а именно в 10⁸ раз (8-log) падения выживаемости (CFU/ml — Colony Forming Unit/ml) для *E. coli*, наблюдается в физиологических растворах (PS — physiological saline) при обработке суб- или сверхкритическим CO₂ (100÷200 атм, 30÷45 °C, 25÷60 мин). Кроме того, в работе [20] не обнаружили отличий в инактивации отдельных клеток *E. coli* (не суспензии) газообразным CO₂ (40 атм, 35 °C) или жидким CO₂ (100÷200 атм, 20 °C). Однако когда условия были изменены на сверхкритические (100÷200 атм, 35 °C), инактивация *E. coli* значительно увеличилась. При этом авторам не удалось определить, что именно — двуокись углерода или более высокое давление — оказалось причиной столь высокой инактивации.

Инактивация *E. coli* при обработке пищевых продуктов менее эффективна. Так, в работе [31] показано, что при обработке апельсинового сока (200÷1000 атм, 34,5 °C, 10 мин) эффективность инактивации *E. coli* O15:H7 составила только от 2-log до 5-log. С другой стороны, Rasanayagam с соавторами [40] показали, что использование впрыска СК-CO₂ через микропористый фильтр (мембранная технология) позволяет инактивировать более чем на 6-log патогенных и непатогенных бактерий (*E. coli* K12, дрожжей, кисломолочных бактерий, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* или *L. monocytogenes*) при обработке апельсинового сока в CO₂ (79 атм, 40 °C, 2 мин).

Несмотря на то, что инактивация микроорганизмов в пищевых продуктах проходит сложнее, чем в воде и физиологических растворах, многочисленные исследования подтвердили ее эффективность. Разработаны методы и оборудование для инактивации в таких продуктах, как апельсиновый сок [8, 27, 32, 40, 47, 52], яблочный сок [7, 53—55], молоко [7, 27, 35, 48, 50], томатный сок [44, 45], кофе [27], виноградное вино [47, 56]. Меньшая, но достаточная для практического использования эффективность инактивации наблюдается и для твердых продуктов, таких как мясо, в том числе термически обработанное [45, 46], овощи [8, 46], томатная паста [47], биополимеры [29, 38]. Несмотря на то, что бактериальные споры весьма устойчивы по отношению к нагреванию, высыханию, действию радиации, химических веществ и высоких давлений (до 8270 атм при температурах ниже 35 °C), известны многочисленные успешные исследования инактивации спор в СК-CO₂.

Таблица

Воздействие СК-СО₂ на различные микроорганизмы и споры

Микроорганизмы	Температура, °C	Давление, атм	Время, мин	Среда	Ссылки
<i>E. coli</i> K12, <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	25	0; 365÷600	1	0,1 % пептон	[24]
<i>E. coli</i> K12 ATCC25253, <i>Listeria innocua</i> 137	35	300; 350; 400	0; 1,7; 3,3; 5	Вода	[25]
<i>Bacillus subtilis</i>	80; 90	5	0÷15	Раствор Рингера	[26]
<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> и др.	35; 65; 85	10; 200; 300	—	Молоко, апельсиновый сок, кофе, суп	[27]
<i>L. monocytogenes</i>	35; 45	7÷21	0÷40	Молоко (цельное, повышенной жирности, обезжиренное)	[33]
<i>Aspergillus niger</i> (споры)	44÷52	5÷19	0,25÷2,1	Физиологический раствор	[39]
<i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> и др.	40	7,9	2,4	Апельсиновый сок	[40]
<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> и др.	35; 55÷95	30	120	Вода	[27]
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	25	0÷600	15	Питательная среда, ростовая среда	[41]
<i>E. coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	20÷65	50	—	Ткань	[42]
<i>Salmonella Enteritidis</i>	58÷60	0,95	30÷35	Скорлупа от яиц	[43]
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella salford</i> , <i>Legionella dunnifii</i> и др.	25÷45	140÷210	36; 360	Полимерные материалы, медикаменты, имплантанты	[29]
<i>Bacillus subtilis</i>	7÷45	75÷150	75÷120	Томатный сок	[44]
<i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	20÷80	500÷4000	60	Жареная свинина	[45]
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium spp.</i> и др.	50	4000	30	Свинина, морковь, горох	[46]
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus genus</i> , <i>Candida</i> и др.	26; 40	80÷110	30÷55	Физиологический раствор, виноградное вино, апельсиновый сок, томатная паста	[47]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Alcaligenes Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> и др.	15; 30; 35; 40	103; 483	—	Молоко	[48]

Инактивация микроорганизмов в среде сверхкритического CO₂

[19, 20, 26, 27, 38, 39, 57, 58]. Так, например, в работе [39] показано, что обработка в СК-CO₂ позволяет инактивировать даже споры *Aspergillus niger*, которые устойчивы к другим методам воздействия.

Также известно, что после СК-CO₂ обработки семян проросшей пшеницы [52], рисовых отрубей [59, 60] последние стерильны и не требуют дополнительной обработки. Однако важно помнить, что эксперименты по инактивации микроорганизмов показали: природа обрабатываемой поверхности или среды может оказывать существенное влияние на эффективность воздействия [61–64].

Анализ опубликованных данных показывает, что с ростом давления CO₂ степень инактивации, как правило, возрастает [22, 25, 43, 52, 65]. В то же время ряд авторов показал, что аналогичные результаты получены и для субкритического CO₂ [38, 50, 52]. Не менее очевидно, что повышение температуры процесса приведет к увеличению эффективности инактивации [26, 27, 38]. Необходимо отметить, что процесс инактивации спор суб-/сверхкритическими флюидами протекает сложнее, чем у бактерий, и, по мнению многих авторов [20, 27, 38, 57], эффективная инактивация весьма устойчивых спор может быть достигнута только при сочетании высокого давления и высокой температуры. Кроме того, можно сделать вывод, что чувствительность микроорганизмов, присутствующих в среде, условия и параметры обработки необходимо определять для каждого конкретного технологического процесса.

Условия и параметры процесса

Многочисленные исследования показали [64, 66–70], что давление, температура и продолжительность обработки являются базовыми параметрами, контролирующими степень выживания микроорганизмов. В [26] Ballestra и Сиц высказано предположение, что решающее влияние на степень инактивации оказывает концентрация растворенного в воде CO₂ (dCO₂), да и сами клетки микроорганизмов содержат воду. Это предположение проверялось на примере *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, аскоспор *Bacillus fulva* и конидий *Aspergillus niger* [71, 26, 37]. Авторы достоверно показали, что концентрация растворенного CO₂ влияет на эффективность инактивации микроорганизмов. Однако математических корреляций построить не удалось, поскольку зависимость dCO₂ от температуры и давления может быть сложной.

Результаты описанных выше исследований, в сочетании с ранее обнаруженным фактором [20] малоэффективной инактивации сухих клеток *E. coli*, позволили предположить, что для эффективной инактивации необходимо присутствие воды в системе. Впоследствии более 30 публикаций подтвердили роль воды в процессах инактивации микроорганизмов (см., например, [22, 49, 72–75]).

В опубликованных статьях и патентах [21, 50, 56, 72–74, 76, 77] показано, что использование СК-CO₂ может стать более экономичным процессом при добавлении не только воды, но и этанола, метанола, перекиси водорода или других добавок. Kamihira с соавторами [20] показали, что для эффективной инактивации сухих конидий *A. niger* могут быть использованы добавки незначительных количеств этанола или уксусной кислоты. Необходимо отметить, что перекись водорода, добавленная даже в самых незначительных концентрациях, резко повышает эффективность инактивации микроорганизмов в среде CO₂ [57, 67, 78–80].

Механизмы инактивации микроорганизмов СК-CO₂

Как видно из представленных выше данных, антимикробный эффект зависит от множества факторов, таких как температура, давление, продолжительность обработ-

ки и наличие добавок, а также от вида микроорганизма и среды, что уже само по себе позволяет предположить чрезвычайно сложный механизм инактивации. И действительно, несмотря на огромное количество экспериментальных данных, до сих пор не сформирован единый взгляд на механизм антимикробного действия CO₂.

В процессе исследований гибель клеток объяснялась различными причинами: к примеру, закислением (ацидификацией) растворенным CO₂, приводящим к инактивации ключевых ферментов, определяющих ход важнейших метаболических процессов [7, 8, 10, 35, 81, 82], и экстракцией внутриклеточных субстанций, таких как гидрофобные соединения в клеточной стенке и цитоплазматической мембране, приводящей к гибели микроорганизма [20]. Разрывы клеточной оболочки при проникновении CO₂ внутрь клетки могут уменьшать ее выживаемость [21, 22], а повреждение клеточной мембранны при набухании под действием сжатого CO₂ может убивать клетки или вызывать ингибирование метаболических систем [37, 71, 78]. Исследования показали, что эффективность воздействия оказывается значительно выше при длительной обработке под высоким давлением CO₂ и быстрой декомпрессии, чем при циклической обработке и медленной декомпрессии [21]. При длительной обработке рост величины инактивации мог быть связан с взрывом мембранны при резком проникновении в клетки сжатого CO₂. Debs-Louka и сотрудники [22] не наблюдали значительного влияния скорости декомпрессии на количество выживших микроорганизмов после субкритической обработки клеток CO₂ при трех различных временах декомпрессии (0,4 с, 15 мин, 50 мин). Авторы других работ [27, 50, 51] показали, что эта зависимость существует (чем меньше время декомпрессии, тем выше инактивация). Возможно, при быстрой декомпрессии распространение CO₂ внутри клетки могло привести к разрушению последней. Однако данное предположение о механизме инактивации требует проверки.

Для объяснения действия сжатого CO₂ в ряде работ [51, 71] использовали одноударный характер зависимости кривой выживаемости клеток (зависимость логарифма числа выживших микроорганизмов от времени, температуры или давления). Однако такая одноударная зависимость хорошо описывает лишь фазу клеточной гибели на последней части кривой. Это объясняется тем, что сначала CK-CO₂ растворяется в суспензии клеток и лишь затем проникает через клеточную мембрану. Для того чтобы более четко представить зависимость кинетики гибели клеток в реальной ситуации, математические модели инактивации клеток CK-CO₂ должны учитывать обе стадии. Как сообщалось в [18, 34, 35, 81, 82], на кривых инактивации наблюдались две четкие фазы с разными скоростями инактивации всех штаммов *E. coli*, которые обрабатывались CK-CO₂. Инактивация клеток *E. coli* медленно росла на начальной стадии (фаза накопления), а затем количество жизнеспособных клеток стремительно падало (фаза гибели).

В литературе предложено несколько механизмов, связанных с подавлением клеточного деления экстракцией и окислением. Одна из первых гипотез, объясняющая инактивирующее действие CO₂, представляла собой теорию подавления, согласно которой CO₂ обедняет клетки кислородом. Однако этот механизм был позднее опровергнут, когда было обнаружено, что CO₂ инактивирует также анаэробные бактерии [14].

Согласно механизму экстракции инактивация с помощью CO₂ осуществляется за счет его проникновения сквозь клеточную мембрану, растворения в клеточной жидкости и затем экстрагирования внутриклеточного содержимого. Park с коллегами [41] измеряли количество экстрагируемого внутриклеточного материала в зависимости от роста давления и обнаружили наличие повреждений мемб-

ран инактивированных клеток. Enomoto с коллегами [19], сравнивая медленную и быструю декомпрессию, обнаружили большее количество протеинов, вышедших из клеток при быстром освобождении от CO₂, однако сочли, что скорость декомпрессии не влияет на выживаемость клеток. Это предполагает, что инактивация достигается на этапе роста давления CO₂.

Теория закисления (ацидификации) предполагает, что CO₂ реагирует с водой с образованием угольной кислоты и уменьшает pH как в окружающей среде, так и внутри клеток микроорганизмов [18]. Данная теория получила подтверждение при исследовании сырых и сухих клеток [21, 72]. Однако существуют исследования, которые показывают, что CO₂ действует и на нечувствительные к кислоте бактерии, такие как *Listeria* [24, 25]. Некоторые данные показывают, что при этом процессе не достигаются достаточно низкие значения pH, которые эффективно убивают бактерии, а важен тип кислоты [14, 83]. В [83] исследовали изменение pH буфера в яблочном соке путем добавления CO₂ или угольной кислоты и обнаружили, что кислота более эффективна, чем CO₂. Daniels с коллегами [14] пришли к заключению, что инактивация не может быть результатом только закисления. Увеличение кислотности может лишь помочь росту клеточной проницаемости, что облегчит проникновение флюида внутрь клетки [84]. Как предполагают Haas и сотрудники [70], это падение pH будет необратимо ингибировать важнейшие метаболические системы. Недавно было показано, что антимикробный эффект связан не с давлением CO₂, а с его концентрацией во внутренней среде клетки — с dCO₂ [71]. Эксперименты проводились с насыщающими концентрациями CO₂ при различных комбинациях давления и температуры.

Shimoda с соавторами [39] заключают, что лишь комбинация различных механизмов приводит к инактивации клеток. Из сказанного можно сделать вывод, что требуются дальнейшие исследования механизмов инактивации микроорганизмов CO₂ под давлением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что диоксид углерода при умеренных давлениях (до 100 atm) и температурах (до 40 °C) способен эффективно инактивировать многие микроорганизмы в водных растворах. В настоящее время интенсивные исследования взаимодействия СК-CO₂ с микроорганизмами ведутся во многих странах мира (Италия, Испания, Бельгия, Япония, США, Тайвань, Турция, Корея и др.). В работах многих исследователей показана эффективность и возможность использования этого метода в пищевой и фармацевтической промышленностях как альтернативного традиционным методам стерилизации/пастеризации.

Трудно переоценить значение возможности производства безопасных продуктов питания и напитков без применения термообработки. Однако наибольшее распространение данная технология получит лишь после достижения полного понимания механизмов инактивации микроорганизмов под действием сжатого CO₂.

Рассмотренные литературные данные показали, что работы в области инактивации микроорганизмов в среде жидкого и сверхкритического CO₂ проводятся в трех основных направлениях:

- исследование механизмов инактивации микроорганизмов;
- исследования обеззараживания различных продуктов и материалов;
- разработка методов и оборудования для промышленного использования стерилизации в среде диоксида углерода.

На сегодня можно утверждать, что низкотемпературная стерилизация жидких пищевых продуктов не только обеспечивает безопасное хранение и использование продуктов, но и не изменяет их качества. Можно добавить, что эффективность воздействия CO₂ наиболее высока для продуктов, содержащих либо природные кислоты (апельсиновый, яблочный и другие соки), либо этиловый спирт (вино, пиво, кумыс). Многие эксперты [85—88] полагают, что промышленного использования такой обработки следует ожидать в ближайшее время.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donald J.R., Jones C.L., MacLean A.R.M. Am. J. Public Health. 1924. Vol. 14. P. 122.
2. Russell A.D. Principles of antimicrobial activity, in Disinfection, sterilization, and preservation / Ed. by S.S. Block. London: Lea, 2001. P. 31.
3. Juneja V.K., Thayer D.W. Irradiation and other physically based control strategies for foodborne pathogens in Microbial Food Contamination / Ed. by C.L. Wilson, S. Droby. CRC, Boca Raton, 2000. P. FL171.
4. Tholozan T.J.L., Ritz M., Juglau F., Federighi M., Tissier J.P. J. Appl. Microbiol. 2000. Vol. 88. P. 202.
5. Tahiri I., Makhlof J., Paquin P., Fliss I. Food Res. Int. 2006. Vol. 39. P. 98.
6. Knorr D., Heinz V. Development of nonthermal methods for microbial control, in Disinfection, sterilization, and preservation / Ed. by S.S. Block. London: Lea, 2001. P. 853.
7. Sonoike K.J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 1997. Vol. 44. P. 522.
8. Walker H.W., LaGrange W.S. Sanitation in food manufacturing operations, in Disinfection, sterilization, and preservation / Ed. by S.S. Block. London: Lea, 2001. P. 791.
9. Block S.S. Definition of terms, in Disinfection, sterilization, and preservation / Ed. by S.S. Block. London: Lea, 2001. P. 19.
10. Joslyn L.J. Sterilization by heat, in Disinfection, sterilization, and preservation / Ed. by S.S. Block. London: Lea, 2001. P. 695.
11. Perrut M. Sterilization and virus inactivation by Supercritical Fluids: A review, Separex, Champigneulles. Proc. (M) 3rd International Symposium on Supercritical Fluids. Strasbourg (France), October 1994.
12. Spilimbergo S., Bertucco A. Biothec. Bioeng. 2003. Vol. 84. No. 6. P. 627.
13. Koutchma T., Murakami E. Effect of Carbon Dioxide and Pressure Processing on Microbial and Enzyme Inactivation in Food and Beverages. www.foodtech-international.com/papers/effectofcarbondioxide.htm
14. Daniels J., Krishnamurthi R., Rizvi S. J. Food Protec. 1985. Vol. 48. P. 532.
15. Isenschmid A., Marison I.W., von Stockar U. J. of Biotechnology. 1995. Vol. 39. P. 229.
16. Spilimbergo S., Dehghani F., Bertucco A., Foster N.R. Biotechnol Bioeng. Apr. 5. 2003. Vol. 82. P. 118.
17. Tomasula P.M. Supercritical fluid extraction of food // Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering / Ed. by D. Heldman. New York: Dekker, 2003.
18. Ballestra P., Da Silva A.A., Cuq J.L. J. Food Sci. 1996. Vol. 61. P. 829.
19. Enomoto A., Nakamura K., Nagai K., Hashimoto T., Hakoda M. Biosci. Biotech. Biochem. 1997. Vol. 61. No. 7. P. 1133.
20. Kamihira M., Taniguchi M., Kobayashi T. Agric. Biol. Chem. 1987. Vol. 51. P. 407.
21. Shimoda M., Yamamoto Y., Cocunubo-Castellanos J., Tonoike H., Kawano T., Ishikawa H., Osajima Y. J. Food Sci. 1998. Vol. 63. P. 709.
22. Debs-Louka E., Louka N., Abraham G., Chabor V., Allaf K. Appl. Envir. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 626.
23. Jones R., Greenfield P. Enzyme Microb. Technol. 1982. Vol. 4. P. 210.
24. Corwin H., Shellhammer T.H. J. Food Sci. 2002. Vol. 67. No. 2. P. 697.
25. Murakami E., Reddy N.R., Larkin J.W., Sizer C.E., Meneghel R., Ting E.Y., Takeuchi K., Chirtel S.J. Proc. Inst. of Food Technol. Ann. Meet. Las Vegas, July 12—16, 2004. P. 135.
26. Ballestra P., Cuq J.L. Leben.-Wissen. Technol. 1998. Vol. 31. P. 84.
27. Watanabe T., Furukawa S., Hirata J., Koyama T., Ogihara H. Appl. Envir. Microbiol. 2003. Vol. 69. No. 12. P. 7124.

Инактивация микроорганизмов в среде сверхкритического CO₂

28. Spilimbergo S., Elvassore N., Bertucco A. Ital. J. Food. Sci. 2003. Vol. 15. No. 1. P. 115.
29. US Patent 6.149.864 (2000).
30. Ishikawa H., Shimoda M., Tamaya K., Yonekura A., Kawano T., Osajima Y. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. Vol. 61. No. 6. P. 1022.
31. Kincal D., Hill W.S., Balaban M., Portier K.M., Sims C.A., Wei C.I., Marshall M.R. J. Food Sci. 2006. Vol. 71. P. 338.
32. Sims M., Estigarribia E. Proc. VI Int. Symp. on Supercrit. Fluids. 2003. Vol. 2. P. 1457.
33. Ishikawa H., Shimoda M., Shiratsuchi H., Osajima Y. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. Vol. 59. No. 10. P. 1949.
34. Erkman O. Food Microbiol. 2000. Vol. 17. P. 589.
35. Lin H.-M., Cao N., Chen L.-F. J. Food Sci. 1994. Vol. 59. P. 657.
36. Hong S-I., Park W-S., Pyun Y-R. J. Food Sci. Technol. 1999. Vol. 34. No. 2. P. 125.
37. Isenschmid A., Marison I.W., von Stockar U. J. Biotechnol. 1995. Vol. 39. No. 3. P. 229.
38. Spilimbergo S. J. Supercrit. Fluids. 2002. Vol. 22. No. 1. P. 55.
39. Shimoda M., Kago H., Kojima N., Miyake M., Osajima Y., Hayakawa I. Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. No. 8. P. 4162.
40. Rasanayagam V., Yuan J.T. Proc. Inst. Food Technol. Ann. Meet. Las Vegas, July 12–16, 2004. P. 136.
41. Park S.J., Park H.W., Park J.J. Food Sci. 2003. Vol. 68. No. 3. P. 976.
42. Cinquimani C., Boyle C., Bach E., Schollmeyer E. Inactivation of Microbes using Compressed Carbon Dioxide — an Environmentally Sound Disinfection Process. Proc. VIII Conf. on Supercrit. Fluids. Ischia (Italy), May 28–31, 2006.
43. US Patent 6,800,315 (2004).
44. Parton T., Toniolo C., Elvassore N., Bertucco A. Proc. VI Int. Symp. on Supercrit. Fluids. 2003. Vol. 2. P. 1477.
45. Moerman F., Mertens B., Demey L., Huyghebaert A. Meat Sci. 2001. Vol. 59. No. 2. P. 115.
46. Moerman F. Meat Sci. 2005. Vol. 69. No. 2. P. 225.
47. Parton T., Bertucco A., Elvassore N., Grimolizzi L. J. Food Eng. 2007. Vol. 79. No. 4. P. 1410.
48. Werner B.G., Hotchkiss J.H. Dairy Sci. 2006. Vol. 89. P. 872.
49. Dillow A.K., Dehghani F., Hrkach J.S., Foster N.R., Langer R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. No. 18. P. 10344.
50. Erkman O. Int. J. Food Microbiol. 2001. Vol. 65. P. 131.
51. Karaman H., Erkman O. Food Microbiol. 2001. Vol. 18. P. 11.
52. Gunes G., Blum L.K., Hotchkiss J.H. J. Food Protec. 2006. Vol. 69. P. 12.
53. Parton T., Elvassore N., Bertucco A., Bertoloni G. J. Supercrit. Fluids. 2007. Vol. 40. P. 490.
54. Spilimbergo S., Mantoan D., Dalser A. J. Supercrit. Fluids. 2007. Vol. 40. P. 485.
55. Spilimbergo S., Mantoan D. Int. J. Food Eng. 2006. Vol. 2. No. 1. Article 6.
56. Gunes G., Blum L.K., Hotchkiss J.H. J. Sci. Food Agric. 2005. Vol. 85. No. 14. P. 2362.
57. Zhang J., Dalal N., Matthews M.A., Waller L.N. J. Microbiol. Methods. 2007. Vol. 70. No. 3. P. 442.
58. Reddy N.R., Solomon H.M., Fingerhut G.A., Rhodehamel E.J., Balasubramaniam V.M., Palaniappan S. J. Food Safety. 1999. Vol. 19. P. 277.
59. US Patent 3,483,005 (1966).
60. Tokuda K., Ito K., Imamura T., Taniguchi M., Kobayashi T., Aki T., Hara S., Brew J. Soc. Jpn. 1986. Vol. 81. P. 194.
61. Erkman O. J. Sci. Food Agric. 2000. Vol. 80. P. 465.
62. Erkman O. Leben.-Wissen. Technol. 1997. Vol. 30. P. 826.
63. Smelt J.P.P.M., Rijke G.G.E. In: High Pressure and Biotechnology / By ed. Balny et.al. John Libbey Eurotext Ltd., 224, 1992. P. 461—463.
64. Wei C.I., Balaban M.O., Fernando S.Y., Peplow A.J. J. Food Protection. 1991. Vol. 54. No. 3. P. 189.
65. Erkman O. J. of Biosci. Bioeng. 2001. Vol. 92. No. 1. P. 39.
66. JPN Patent 62074270 (1985).
67. Stahl E., Quirin K.W., Gerard D. Dense Gases for Extraction and Refining. New York: Springer, 1986. P. 220.
68. Taniguchi M., Suzuki H., Sato M., Kobayashi T. Agric. Biol. Chem. 1987. Vol. 51. No. 12. P. 3425.
69. Ger. pat. DE 3904513, 1989.

70. Haas G.J., Prescott H.E., Dudley E., Dick R., Hintlian C., Keane L. J. Food Safety. 1989. Vol. 9. P. 253.
 71. Shimoda M., Cocunubo-Castellanos J., Kago H., Miyake M., Osajima Y., Hayakawa I. J. Appl. Microbiol. 2001. Vol. 91. P. 306.
 72. Kumagai H., Hata C., Nakamura K. Biosci. Biotech. Biochem. 1997. Vol. 61. No. 6. P. 931.
 73. Perrut M. High Pres. Biotechnol. 1992. Vol. 224. P. 401.
 74. Motta-Meira M., Arul J., Thibault J., Lavoie M. Proc. V Symp. High Pres. Food Sci. La Grande Motte (France), 1992.
 75. Venturi A., Dellaglio F., Dallacasa V., Pallado P., Bertucco A. Proc. V Conf. Supercrit. Fluids. Garda (Italy), 1999. P. 335.
 76. Kim S.R., Rhee M.S., Kim B.C., Kim K.H. Int. J. Food Microbiol. 2007. Vol. 118. No. 1. P. 52.
 77. Clifford J.R., Williams A.A. Supercritical Fluid Methods and Protocols Human Press. Totowa, New Jersey, 2000.
 78. Hong S.-I., Pyun Y.-R. J. Food Sci. 1999. Vol. 64. P. 728.
 79. Hemmer J.D., Drews M.J., LaBerge M., Matthews M.A. J. Biomed. Mat. Res. Appl. Biomat. 2007. Vol. 80B. No. 2. P. 511.
 80. Zhang J., Sarah B., Courtney G., Michael M., Michael D., Laberge M. J. Microbiol. Methods. 2006. Vol. 66. No. 3. P. 479.
 81. Hong S.I., Park W.S., Pyun Y.R. LWT-Food Sci. Technol. 1997. Vol. 30. P. 681.
 82. Erkman O. Food Microbiol. 2000. Vol. 17. P. 225.
 83. Bang W. Combined effects of CO₂, pH and high hydrostatic pressure on inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* in apple juice. Masters Thesis, Washington State Univ., 1998.
 84. Lin Ho-mu, Yang Z., Chen L.F. Chem. Eng. J. 1993. Vol. 52. P. B29.
 85. Matser A.M., Krebbers B., van den Berg R.W., Bartels P.V. Trends in Food Science & Technology. 2004. Vol. 15. P. 79.
 86. Zhang J., Dalal N., Gleason C., Matthews M.A., Waller L.N., Fox K.F., Fox A., Drews M.J. J. of Supercritical Fluids. 2006. Vol. 38. P. 268.
 87. Spilimbergo S., Bertucco A., Lauro F.M., Bertoloni G. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2003. Vol. 4. P. 161.
 88. Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A.H., Spilimbergo S., Elst K., Van Ginneken L., Debevere J., Van Impe J.F., Devlieghere F. Int. J. of Food Microbiology. 2007. Vol. 117. P. 1.
-

INACTIVATION OF MICROORGANISMS USING SUPERCRITICAL CO₂

**¹A. V. Suslov, ¹I. N. Suslova, ¹B. F. Yarovoy, ²A. Yu. Shadrin*,
²A. A. Murzin, ²N. V. Sapozhnikova, ²A. A. Lumpov, ²A. S. Dormidonova**

¹Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Gatchina, Russia

²Khlopin Radium Institute, Saint-Petersburg, Russia

The studies, in which the possibility of utilization of compressed CO₂ as an environment-friendly («green») alternative sterilizing agent is demonstrated, are reviewed. Also, suggested in literature mechanisms of inactivating action of CO₂ onto various microorganisms are analyzed as influenced by various operation factors such as pressure, temperature, duration, type of microbes, and treated material.

Key words: supercritical CO₂, inactivation, sterilization, microorganisms.