

高压热杀菌技术灭活细菌芽胞机理研究进展

申瑾, 郭家俊, 陈翔, 吴珊, 包军鹏, 章中*

(宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021)

摘要 高压热杀菌技术(High-pressure Thermal Sterilization, HPTS)是一种重要的新型食品杀菌技术,可杀灭细菌芽胞。目前对HPTS杀灭芽胞的效果和动力学的研究较多,但关于HPTS杀灭芽胞机理研究却较少并缺少总结分析。深入完整地综述了有关HPTS灭活细菌芽胞机理的文献报道,着重从HPTS对2,6-吡啶二羧酸(2,6-Pyridinedicarboxylic acid, DPA)释放、小分子酸溶性蛋白(Small acid-soluble protein, SASP)的降解、皮层裂解酶活力、芽胞内膜的损伤和皮层的水解等方面的作用阐述其杀灭细菌芽胞的机理。

关键词 高压;热;细菌;芽胞;杀菌

中图分类号 Q93-31

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)02-0101-07

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.02.013

Advances in the Mechanism of High Pressure Thermal Sterilization Technology to Inactivate Bacterial Spores

SHEN Jin, GUO Jia-jun, CHEN Xiang, WU Shan, BAO Jun-peng, ZHANG Zhong

(Coll. of Agric., Ningxia Uni., Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750021)

Abstract HPTS (high-pressure thermal sterilization) is an important new food sterilization technology that could eliminate bacterial spores. At present, there are many studies on the effects and kinetics of HPTS sterilization; however, there are few studies on the mechanism of HPTS killing spores and lack of summary analysis. This paper made intensively and completely summary on the literature reporting the mechanism of HPTS eliminating bacterial spores, stressed on the release of 2,6-pyridine dicarboxylic acid (DPA), degradation of small acid-soluble protein (SASP), activity of cortical lysozyme, damage of spore intima, hydrolysis of cortex, and the effects of other aspects that acting the mechanism of HPTS eliminating bacterial spores.

Keywords high pressure; heat; bacteria; spores; sterilization

1 HPTS 技术简介

高压热杀菌技术(High-pressure Thermal Sterilization, HPTS)是指将静态超高压和热耦合起来用于杀菌,通常所用压力为400~900 MPa,通常所用温度为50~90℃。HPTS杀菌技术比传统热杀菌技术的热处理强度低,可以生产出质量更高的食品^[1]。随着消费者对天然、新鲜、安全和最少加工食品的需求日益增长,HPTS引起了人们极大

的兴趣。HPTS是一种新兴的生产货架稳定、低酸食品的技术,能灭活细菌芽胞,并使食品具有较好的感官和营养品质^[2]。目前,HPTS还没有广泛地应用于食品工业中,部分原因是由于其杀灭细菌芽胞的机理尚不为人知。

2 芽胞对食品保藏与安全的影响

芽胞是细菌营养体在缺乏营养的环境条件下形成的休眠态,可以休眠几万年以上而复活,对各

基金项目:国家自然科学基金项目(31760474);国家自然科学基金项目(31460410)

作者简介:申瑾 女,硕士研究生。主要研究方向为非热加工技术。E-mail:992953710@qq.com

* 通讯作者。男,副教授,博士。主要研究方向为非热加工技术。E-mail:zhangzhong99@126.com

收稿日期:2019-09-04

种杀菌处理(如辐照、超高压、热、超声波、微波、化学物质等)有最强的耐受能力。在食品工业中,常因为杀菌强度不够而发生由芽胞导致的食物腐败和食物中毒问题^[3]。高抗性芽胞的杀灭是低酸性食品安全的一个关键问题^[4]。芽胞萌发后迅速生长而引起低酸性食物腐败。有数据显示,每年有35%的果汁污染与嗜酸芽胞杆菌有关,欧洲果汁协会2011年的调查发现,45%的果汁生产企业发生过脂环酸芽胞杆菌污染引起的腐败事件^[5]。美国佛罗里达州市售的180种热带和亚热带的水果浓缩汁中,6.1%的样品存在脂环酸芽胞杆菌污染现象^[6]。有报道分析了新西兰乳业超过10年的数据,证实乳粉中嗜热芽胞的数量有时 <10 个/g,有时可 $>10^5$ 个/g,对乳粉造成了很大损害^[7]。同时芽胞也在对人体造成危害,芽胞杆菌和梭状芽胞杆菌的芽胞可导致多种食源性疾病,从轻微的呕吐到危及生命的毒素中毒。据报道地衣芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌与某些食源性疾病的暴发有关^[8-9]。

3 细菌芽胞的结构及其杀菌抗性

芽胞的极端杀菌抗性与其特殊结构紧密相关^[8,10-12]。芽胞的结构与其营养体非常不同。芽胞从外到里有七层结构,分别是孢外壁、芽胞衣、外膜、皮层、细胞壁、内膜、内核^[13]。孢外壁是芽胞的最外层,由碳水化合物和蛋白质组成,不同类型的芽胞,孢外壁的大小差异很大,而且这层结构与芽胞的抗性没有任何作用^[14]。芽胞衣主要由蛋白质构成,它使得芽胞对许多化学物质有抗性,也能保护芽胞免受外源皮层裂解酶的攻击。芽胞衣之下是外膜,它之下是芽胞的皮层(cortex)。皮层占芽胞体积36%~60%,皮层的渗透压为2.0 MPa左右,含水量70%,略低于营养细胞(80%),但比芽胞整体的平均含水量高出许多,芽胞的皮层对其抗压性有关键影响。皮层之下是芽胞的细胞壁,由肽聚糖构成,接下来是芽胞的内膜,它是完整的,是生长中的细胞胞质膜的类似物,具有很强的渗透性屏障,阻碍了损伤DNA的化学物质进入,芽胞萌发后内膜成为营养体的细胞膜。

芽胞内核的一个重要生物化学特性就是其水分含量极低,仅有25%~50%,而营养体细胞水分含量为80%左右,芽胞核心含水量低是导致其

休眠和耐热性的关键因素之一^[11]。皮层通过挤压核心来促进水分的流失,这伴随着DPA的积累。芽胞中的DPA含量高,DPA含量约占内核干重的20%,其钙盐是细菌芽胞杀菌抗性的原因之一^[15]。小分子酸溶性蛋白(Small acid-soluble protein, SASP)占芽胞内核总蛋白的3%~6%。缺乏 α/β SASP的突变芽胞对紫外线、热、过氧化物、电离辐射和其他杀菌处理的敏感性提高。

4 HPTS对细菌芽胞的杀灭作用

4.1 HPTS对细菌芽胞的杀灭效果

Ahn等^[16]报道了HPTS处理下牛奶中嗜硬脂热芽胞的数量减少了6个对数值。Ates等^[17]报道HPTS(650 MPa, 65 °C, 10 min)能杀灭4.5个对数值的枯草芽胞杆菌芽胞。Evelyn等^[18]报道HPTS处理下牛肉泥中蜡样芽胞杆菌芽胞减少了4.9个对数值。Evelyn等^[19]研究了芽胞对热、高压热处理和单独热处理的抗性差异的比较发现HPTS(600 MPa, 75 °C)处理蜡样芽胞杆菌芽胞具有显著效果。Izabela等^[20]发现在300 MPa、50 °C、15 min条件下处理苹果汁,能有效杀灭苹果汁中的酸土脂环酸芽胞杆菌芽胞,且苹果汁浓度会影响杀灭效果。随着杀菌压力和温度的升高,芽胞萌发和失活也在增强。L. Reverter-Carrióna等^[21]发现在压力为200、300 MPa,温度为50、70 °C都能有效杀灭芽胞。Maier MB等^[22]报道HPTS(600 MPa, 100 °C)处理下肉毒梭状芽胞杆菌减少了6个对数值。

4.2 HPTS处理下细菌芽胞灭活动力学

预测HPTS灭活芽胞的数学模型可以让制造商预测和控制食品的安全性和货架稳定性。Zhu等^[23]研究了HPTS杀灭生芽胞梭状芽胞杆菌PA3679芽胞的动力学,对于压力从700 MPa到900 MPa、温度为80 °C时,D值为15.8到7.0 min。Gao等^[24]研究了食品成分对HPTS处理下嗜热脂肪芽胞杆菌芽胞死亡程度的影响,建立了二次模拟方程来预测食品成分和pH值对HPTS处理下芽胞死亡的影响。得出大豆蛋白质、豆油等和食品的pH值能显著地影响该菌芽胞对HPTS的抗性。Silva等^[25]用一阶Bigelow模型很好地描述了HPTS对酸土脂环酸芽胞杆菌芽胞的杀灭效果。Wang等^[26]报道嗜热脂肪芽胞杆菌芽

胞对 HPTS 的耐受力比凝结芽胞杆菌芽胞强,Log-logistic 模型对芽胞死亡曲线的拟合效果最好,Weibull 模型次之。Luu-Thi 等^[27]报道 HPTS(300 ~ 600 MPa、60 ~ 100 °C)能杀灭蜡样芽胞杆菌芽胞,HPTS 处理下芽胞死亡初期较快、后期较慢,但两个阶段均可用一级动力学模型描述。Evelyn 等^[28]报道 HPTS(400 ~ 600 MPa、70 °C)能杀灭牛奶中的蜡样芽胞杆菌芽胞,Weibull 模型能很好地描述芽胞死亡动力学。Uchida^[29]报道 HPTS(600 MPa、65 °C)能杀灭酸土脂环酸芽胞杆菌芽胞,随着芽胞悬浮液中可溶性固形物浓度升高,杀菌动力学曲线的 D 值增大。

5 HPTS 杀灭芽胞的机理

目前,HPTS 对细菌芽胞的良好杀灭作用已得到公认,但对 HPTS 杀灭芽胞的机理尚不完全明确。当前主要有两种观点,第一种观点认为 HPTS 直接破坏了芽胞结构或钝化了芽胞的酶,从而杀灭芽胞。第二种观点认为 HPTS 先导致芽胞萌发,芽胞萌发后失去极端抗性而被杀灭。

5.1 HPTS 直接破坏芽胞结构或钝化芽胞内源酶

曾庆梅等^[30]研究了 HPTS 对枯草杆菌芽胞超微结构的影响,采用透射电镜进行观察,观察结果表明:超高压处理后枯草芽胞杆菌的营养体细胞壁皱缩,出现缺口,胞浆泄漏,结构层次感消失,出现大片透电子区;其芽胞外壳被破坏,出现缺口,芽胞内含物结构紊乱,泄漏,出现部分透电子区,甚至内含物质完全泄漏,出现细胞壁或孢子外壳残留,芽胞大量被杀灭。高瑀珑等^[31]采用比色法研究了 HPTS 对枯草芽胞杆菌与嗜热脂肪芽胞杆菌芽胞的影响,结果表明,HPTS 处理芽胞能够显著提高芽胞 DPA 的泄漏率($P < 0.05$),能够破坏芽胞的结构,芽胞内膜通透性屏障被破坏,显著提高了芽胞 DPA 的泄漏率,实验结果说明 HPTS 杀灭枯草芽胞杆菌与嗜热脂肪芽胞杆菌芽胞的原因可能是其物理结构被破坏。刘洁等^[32]使用了 HPTS 处理芽胞,研究了连续式施压和间歇式施压两种不同方式对枯草杆菌芽胞的灭活作用。结果表明,经扫描电镜观察,芽胞外壳出现凹陷、皱褶等形态变化,这种间歇式的施压产生强烈的机械剪切力,造成芽胞结构损伤及内容物的泄漏,甚至死亡。Black 等^[33]研究高压和 nisin 对牛乳中芽

胞杆菌芽胞萌发和灭活的共同作用,经过透射电镜观察,发现 HPTS 处理后,芽胞的结构有明显损坏,出现凹陷和空洞,并且核心内容物似乎不存在。2013 年章中等人研究乙醇协同 HPTS 处理后枯草芽胞杆菌芽胞,通过透射电镜观察发现,未经处理的芽胞光滑且圆润,皮层清晰,皮层和芽胞核区都没有电子透射区,在 HPTS 处理后,有些芽胞的皮层被水解,芽胞内出现了大面积的电子透射区,芽胞被压垮,芽胞的核心出现紊乱。Wang 等^[34]研究高压和微酸性电解水对蜡样芽胞杆菌芽胞结构的影响,采用扫描电镜、透射电镜、超分辨多光子共聚焦显微镜等研究了芽胞的生理反应,结果表明,HPP-SAEW 处理蜡样芽胞杆菌,芽胞形态有部分损伤,芽胞壁不完整,芽胞表面有不规则的突起,甚至有严重的变形。芽胞的杀灭主要是不依赖于萌发,而是直接被杀灭。Akasaka 等^[35]首次将高分辨率高压核磁共振光谱应用于枯草芽胞杆菌芽胞悬浮液中,并直接实时监测了 DPA 在 200 MPa、20 °C 压力下的泄漏过程。发现在 200 MPa、20 °C 下,三分之一的 DPA 立即泄漏,其余的只有在减压时才缓慢泄漏,而且一旦 DPA 从内核中耗尽,在 80 °C 左右,它们的蛋白质很容易变性,且芽胞衣、内外膜和皮层等芽胞特有结构基本被破坏,从而导致芽胞失活。

5.2 HPTS 导致芽胞萌发而被杀灭

芽胞萌发是指在某种条件下芽胞从休眠态转变成营养体细胞的过程。芽胞一旦萌发后杀菌抗性就会大大降低^[36-38]。Setlow^[39]报道芽胞萌发被划分为两个阶段,第一阶段会有阳离子释放、DPA 释放、芽胞核心的部分水化、部分杀菌抗性的散失。第二阶段会有皮层的水解、芽胞核心的进一步水化、芽胞核心的膨胀、杀菌抗性的完全散失。两阶段完成后,芽胞的新陈代谢开始恢复,SASP 被降解,大分子物质开始合成,新的营养体细胞从芽胞衣中脱离出来。很多报道称芽胞萌发过程中杀菌抗性的散失与以下因素有关,即 DPA 的释放、芽胞内膜通透性的增加,SASP 的降解和皮层的水解等。

5.2.1 HPTS 处理下芽胞 DPA 释放导致其萌发进而被杀灭 许多报告认为 DPA 释放是在 HPTS 条件下灭活细菌芽胞的关键步骤。Paidhungat 等^[40]发现 550 MPa 的压力处理打开了芽胞 DPA

的释放通道而导致芽胞萌发。Margosch 等^[41]研究了细菌芽胞的杀菌抗性,得出在 600 ~ 800 MPa 和 60 °C 以上的温度下,DPA 主要是通过物理化学过程而不是生理过程释放的,发现 HPTS 处理下芽胞的灭活和 DPA 的释放密切相关。Clery-Barraud 等^[42]将突变衍生体 RP42 菌株的炭疽杆菌芽胞暴露于 HPTS 处理下(280 ~ 500 MPa、10 ~ 360 min、20 ~ 75 °C),测定芽胞的失活动力学,研究表明,HPTS 能完全杀灭炭疽杆菌芽胞,可能是 HPTS 处理下 DPA 释放,而诱导了芽胞萌发,萌发后的炭疽杆菌芽胞杀菌抗性降低。Black 等^[43]发现枯草芽胞杆菌芽胞在 500 MPa、50 °C 下能快速萌发,这个过程是通过超高压直接引起 DPA 的释放,随后引起芽胞的萌发而不是通过作用于芽胞的营养萌发受体引起芽胞萌发。得出诱导芽胞释放 DPA 并萌发的最佳温度约 60 °C。并推测 VHP 可能作用于芽胞内膜而导致 DPA 释放,但作用靶点尚不明确。黄娟等^[44]以凝结芽胞杆菌芽胞、嗜热脂肪芽胞杆菌芽胞为研究对象,研究了 HPTS 的对其失活、萌发、损伤方面的影响,研究表明,当较低压力(≤ 300 MPa)和初温(≤ 60 °C)时能有效诱导两种细菌芽胞的萌发;当较高压力(≥ 500 MPa)和较高温度(≥ 80 °C)时,两种芽胞的失活率趋于接近。此外,对比常压热处理与 HPTS 处理对芽胞的不同影响发现,HPTS 对芽胞的萌发、失活影响明显大于常压热处理,但热仍是造成芽胞损伤的一个重要因素。Vercammen 等研究了 HPTS 对番茄酱中凝结芽胞杆菌和脂环酸芽胞杆菌芽胞萌发和失活的影响,发现在 600 ~ 800 MPa 下,芽胞的萌发与温度关系极大,在 60 °C 时,在所有处理压力和时间条件下观察到芽胞灭活,并且灭活程度几乎等于萌发程度。Reineke 等^[45]通过研究芽胞特有物质 DPA 释放和芽胞热敏感性增加的情况,认为 HPTS 杀灭芽胞的机制涉及三个步骤:①休眠②激活③杀灭。随着处理强度的增加,芽胞的灭活程度大大增加,当压力超过一定阈值时,温度成为影响芽胞萌发的主导因素。Hofstetter 等^[46]对 HPTS 与 reutericyclin 或 Nisin 联合处理下嗜热杆菌芽胞内膜流动性进行了原位测定。结果表明,在不改变内膜高度有序状态的情况下,芽胞可以被 HPTS 灭活,而且, reutericyclin 和 Nisin 对芽胞内膜流动性的不同影响有助于研究 HPTS 诱导

芽胞释放 DPA 和失活。Erika Georget 等^[47]采用原位红外光谱(FT-IR)和荧光光谱法研究了硬脂酸杆菌芽胞在 HPTS 处理下萌发和失活的机理,芽胞内膜用 Laurdan 荧光染料染色。在 HPTS 处理下,原位记录了红外光谱和荧光光谱。发现在 200 MPa 和 55 °C 条件下,芽胞 DPA 快速且全部释放,HPTS 导致了芽胞萌发,萌发率可达 3 个对数值,从而杀灭芽胞。Robert Sevenich 等^[48]采用平板计数法、高效液相色谱法和流式细胞仪(FCM)检测 HPTS 处理对 DPA 释放、芽胞灭活及芽胞内膜的影响,发现 DPA 的释放对 HPTS 处理下的芽胞失活至关重要,DPA 的释放是芽胞灭活的限速步骤,而芽胞内膜可能是 HPTS 作用于芽胞的靶结构。

5.2.2 HPTS 导致芽胞内膜通透性增加而被杀灭

芽胞萌发时其内膜通透性会增加。HPTS 会导致芽胞内膜通透性增加而将其杀灭,主要是由于 HPTS 处理下水分子穿透内膜屏障并进入芽胞内核,使芽胞的抗性降低而将其杀灭。Mathys 等^[49]使用流式细胞仪研究了 HPTS 对地衣芽胞杆菌芽胞的杀灭机理,采用 SYTO16 和碘化吡啶对 HPTS 处理后的芽胞进行染色,研究芽胞内膜通透性变化,提出了一种包含三个步骤的 HPTS 杀灭芽胞机理,依次为芽胞皮层水解和芽胞萌发、一个未知步骤、芽胞内膜被破坏而失活。Zhang 等^[50]研究了 HPTS 结合不同浓度乙醇对枯草芽胞杆菌芽胞的杀灭作用。乙醇协同 HPTS 处理后芽胞的内膜通透性大大增加并严重受损,随着乙醇浓度的提高和水分的减少,HPTS 杀灭芽胞的效果降低,进一步表明水分子进入芽胞内核对 HPTS 杀灭芽胞有至关重要的作用。章中^[51]通过透射电镜观察 HPTS 处理前后的枯草杆菌芽胞,发现未经 HPTS 处理的芽胞内核颜色很深、内容物致密紧凑,而经 HPTS 处理的芽胞内核颜色变浅,这个现象说明经 HPTS 处理后,芽胞内膜水分子通透屏障受损,水分子进入芽胞内核,发生了水合现象。Sevenich 等^[48]用氯化钠和蔗糖调节芽胞悬浮液的水分活度,发现随着水分活度的降低,水分通过芽胞内膜进入芽胞内核的量越少,HPTS 对芽胞的灭活能力下降。Rozali 等^[52]采用扫描电镜对 HPTS 处理前后芽胞的形态进行观察,发现芽胞具有不可逆的体积和形状变化。细菌芽胞的失活被认为

是从芽胞内膜受损开始的,而芽胞内膜通透性的增加会促进芽胞内核 DPA 的释放和含水量的增加,进而导致芽胞死亡。

5.2.3 HPTS 导致芽胞 SASP 降解或皮层水解而杀灭芽胞 SASP 是一个多基因族的产物,这个多基因族仅在出芽后期表达。SASP 仅存在于芽胞的核心,占芽胞总蛋白含量的 5%。SASP 的关键功能是和芽胞 DNA 结合在一起,这种结合使得芽胞 DNA 更为稳定并免受许多物理损害,芽胞萌发后期 SASP 会降解^[53]。芽胞的皮层主要由肽聚糖构成,在芽胞萌发早期就被降解。目前认为 HPTS 处理下芽胞皮层肽聚糖水解机理仅有两种可能性,其一是 HPTS 激活皮层裂解酶,其二是 HPTS 导致皮层肽聚糖的非酶水解。在休眠的芽胞中,皮层裂解酶不表现出活性,但在芽胞萌发而转变成营养体的过程中,皮层裂解酶通过某种机制被激活并将皮层肽聚糖水解,然后导致芽胞核心的完全水化,这是芽胞萌发过程中的一个重要步骤^[13]。Mathys 等^[54]认为,HPTS 处理下芽胞内部的 DPA 的释放可能会激活皮层裂解酶,从而将芽胞皮层水解,进而导致芽胞死亡。Reineke 等^[55]报道 HPTS 很可能会影响皮层裂解酶的活性,在某些压力和温度条件下,皮层裂解酶可能会被激活,导致芽胞皮层水解而萌发,进而使得芽胞结构被破坏。章中^[51]研究乙醇协同 HPTS 处理后枯草杆菌芽胞的透射电镜观察,高浓度的乙醇抑制了芽胞皮层裂解酶的活性,皮层肽聚糖未能被水解,而肽聚糖水解是芽胞萌发的一个关键步骤,这一步骤被抑制导致芽胞萌发过程受阻,乙醇协同 HPTS 处理下芽胞仍然有抗热抗压性,其内部结构受影响小,不易被 HPTS 杀灭。

6 展 望

HPTS 能杀灭食品中的所有微生物,包括最难被杀灭的细菌芽胞,使得食品能在常温下长期贮藏,和传统高温热杀菌相比,HPTS 使用的温度较低、时间较短,能更好地保持食品原有的色、香、味、质构、营养素和功能性成分,受到国内外食品科学家的广泛关注。细菌芽胞需要高强度的杀菌处理以确保食品安全和保藏效果,芽胞的杀灭是食品杀菌的关键任务。HPTS 作为一种新型杀菌技术,其优点鲜明,然而其杀灭芽胞的机理却远不

够清楚,研究报道较少。HPTS 仍会对食品的营养和感官品质造成一定的影响,加深对 HPTS 杀灭芽胞机理的理解可有利于降低这种不利影响。通过研究,希望在杀灭食品中各种芽胞的同时尽可能地保持食品原有的营养和感官品质。

目前对 HPTS 杀灭细菌芽胞机理的研究主要集中在处理前后芽胞结构和关键物质的变化上,而对芽胞结构和关键物质在 HPTS 处理下的实时动态变化研究少之又少。芽胞内膜通透性屏障的损伤是 HPTS 杀灭芽胞的一个关键原因,未来我们可以采用金刚石对顶砧技术结合拉曼光谱法、傅里叶变换红外光谱法、落射荧光单分子显微术、荧光分光光度法、X 射线衍射、核磁共振等技术,以芽胞内膜磷脂大分子为研究切入点,通过实时动态研究 HPTS 处理下芽胞内膜磷脂分子侧向热运动、相态和分子间氢键作用的变化规律,从多个层次和不同角度阐明 HPTS 微物理场中芽胞内膜流动性变化的原因,最终揭示 HPTS 微物理场中芽胞内膜水分子通透屏障受损的分子机理,进一步夯实 HPTS 杀菌技术的理论基础,推动 HPTS 技术在食品工业中的应用。

参考文献:

- [1] Sevenich R, Rauh C, Knorr D. A scientific and interdisciplinary approach for high pressure processing as a future toolbox for safe and high quality products: A review[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, 38: 65-75.
- [2] Sevenich R, Mathys A. Continuous versus discontinuous ultra-high-pressure systems for food sterilization with focus on ultra-high-pressure homogenization and high-pressure thermal sterilization: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 646-662.
- [3] Sadiq FA, Flint S, He G. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria[J]. *Int Dairy J*, 2018, 85: 159-168.
- [4] Lopes RP, Mota MJ, Gomes AM, et al. Application of high pressure with homogenization, temperature, carbon dioxide, and cold plasma for the inactivation of bacterial spores: a review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(3): 532-555.
- [5] Danyluk MD, Friedrich LM, Jouquand C, et al. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 472-477.
- [6] Danyluk MD, Friedrich LM, Jouquand C, et al. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp.

- in tropical and subtropical fruit juice concentrates[J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 472-477.
- [7] 李妍, 张梦娇, 刘冠辰, 等. 乳粉中嗜热菌污染研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(08): 1593-1598.
- [8] Voundi SO, Nyegue M, Lazar I, et al. Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria[J]. Foodborne Pathog Dis, 2015, 12(6): 551-559.
- [9] Borch-Pedersen K, Mellegard H, Reineke K, et al. Effects of high pressure on *Bacillus licheniformis* spore germination and Inactivation[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(14): 13.
- [10] Paul C, Filippidou S, Jamil I, et al. Bacterial spores, from ecology to biotechnology[J]. Adv Appl Microbiol, 2019, 106: 79-111.
- [11] Bressuire-Isoard C, Broussolle V, Carlin F. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*; evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms[J]. FEMS Microbiol Rev, 2018, 42(5): 614-626.
- [12] Abhyankar WR, Wen J, Swarge BN, et al. Proteomics and microscopy tools for the study of antimicrobial resistance and germination mechanisms of bacterial spores[J]. Food Microbiol, 2019, 81: 89-96.
- [13] Black EP, Setlow P, Hocking AD, et al. Response of spores to high-pressure processing[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007, 6(4): 103-119.
- [14] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 514-525.
- [15] Mishra A, Krishnamoorthy A, Rajak P, et al. Free energy of hydration and heat capacity of calcium dipicolinate in *Bacillus* spore cores[J]. Appl Phys Lett, 2018, 113(11): 5.
- [16] Ahn J, Lee HY, Balasubramaniam VM. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores in low-acid foods by pressure-assisted thermal processing[J]. J Sci Food Agric, 2015, 95(1): 174-178.
- [17] Ates MB, Skipnes D, Rode TM, et al. Comparison of spore inactivation with novel agitating retort, static retort and combined high pressure-temperature treatments[J]. Food Control, 2016, 60: 484-492.
- [18] Evelyn, Silva FVM. Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores in beef slurry by 600 MPa HPP combined, with 38-70 degrees C: Comparing with thermal processing and estimating the energy requirements[J]. Food Bioprod Process, 2016, 99: 179-187.
- [19] Evelyn, Silva FVM. Differences in the resistance of microbial spores to thermosonication, high pressure thermal processing and thermal treatment alone[J]. J Food Eng, 2018, 222: 292-297.
- [20] Porebska I, Sokołowska B, Skąpska S, et al. Treatment with high hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice[J]. Food Control, 2017, 73: 24-30.
- [21] Reverter-Carrión L, Saucedo-Gálvez JN, Codina-Torrella I, et al. Inactivation study of *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Aspergillus niger* spores under Ultra-High pressure homogenization, UV-C light and their combination[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 48: 258-264.
- [22] Maier MB, Schweiger T, Lenz CA, et al. Inactivation of non-proteolytic *Clostridium botulinum* type E in low-acid foods and phosphate buffer by heat and pressure[J]. PLoS One, 2018, 13(7): 15.
- [23] Zhu S, Naim F, Marcotte M, et al. High-pressure destruction kinetics of *Clostridium* sporogenes spores in ground beef at elevated temperatures[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 126(1-2): 86-92.
- [24] Gao YL, Ju XR. Modelling the effects of food ingredients and pH on high-pressure processing inactivation of *Bacillus cereus* spores: a laboratorial study[J]. Int J Food Sci Technol, 2010, 45(9): 1862-1869.
- [25] Silva FVM, Tan EK, Farid M. Bacterial spore inactivation at 45-65 degrees C using high pressure processing: Study of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice[J]. Food Microbiol, 2012, 32(1): 206-211.
- [26] Biao-Shi W, Bian-Sheng LI, Qing-Xiao Z, et al. Inactivation effects of *Coprinus comatus* inoculated with bacterial spores by high-pressure thermal processing[J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2010, 24(2): 136-142.
- [27] Luu-Thi H, Grauwet T, Vervoort L, et al. Kinetic study of *Bacillus cereus* spore inactivation by high pressure high temperature treatment[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2014, 26: 12-17.
- [28] Evelyn, Silva FVM. High pressure processing of milk: modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores at 38-70 degrees C[J]. J Food Eng, 2015, 165: 141-148.
- [29] Uchida R, Silva FVM. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation by high pressure combined with mild heat: modeling the effects of temperature and soluble solids[J]. Food Control, 2017, 73: 426-432.
- [30] 曾庆梅, 谢慧明, 潘见, 等. 超高压处理对枯草芽胞杆菌超微结构的影响[J]. 高压物理学报, 2006, (1): 83-87.
- [31] 高瑀珑, 鞠兴荣, 吴定. 微热协同超高压处理杀灭芽胞杆菌芽胞效果的研究[J]. 食品科学, 2007, (3): 59-63.
- [32] 刘洁, 林影, 吴晓英, 等. 高静压对枯草杆菌芽胞灭活作用的研究[J]. 工业微生物, 2008, (4): 35-39.
- [33] Black EP, Linton M, McCall RD, et al. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(1): 78-87.
- [34] Wang L, Xia Q, Li Y. The effects of high pressure processing and slightly acidic electrolysed water on the structure of *Bacillus*

- cereus* spores[J]. Food Control, 2017, 79: 94-100.
- [35] Akasaka K, Maeno A, Yamazaki A. Direct high-pressure NMR observation of dipicolinic acid leaking from bacterial spore: A crucial step for thermal inactivation[J]. Biophys Chem, 2017, 231: 10-14.
- [36] 梁栋, 陈芳, 胡小松. 芽胞萌发研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 221-228.
- [37] Wells-Bennik MHJ, Janssen PWM, Klaus V, et al. Heat resistance of spores of 18 strains of *Geobacillus stearothermophilus* and impact of culturing conditions[J]. Int J Food Microbiol, 2019, 291: 161-172.
- [38] Rao L, Feeherry FE, Ghosh S, et al. Effects of lowering water activity by various humectants on germination of spores of *Bacillus* species with different germinants [J]. Food Microbiol, 2018, 72: 112-127.
- [39] Setlow P. Spore germination[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(6): 550-556.
- [40] Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, et al. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 3172-3175.
- [41] Margosch D, Ganzle MG, Ehrmann MA, et al. Pressure inactivation of *Bacillus* endospores [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12): 7321-7328.
- [42] Clery-Barraud C, Gaubert A, Masson P, et al. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 635-637.
- [43] Black EP. Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(1): 65-76.
- [44] 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胞的作用[J]. 食品科学, 2008, (6): 90-95.
- [45] Reineke K, Mathys A, Knorr D. The impact of high pressure and temperature on bacterial spores; inactivation mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa[J]. J Food Sci, 2011, 76(3): 189-197.
- [46] Hofstetter S, Winter R, McMullen LM, et al. In situ determination of *Clostridium* endospore membrane fluidity during pressure-assisted thermal processing in combination with nisin or rutericyclin[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(6): 2103-2106.
- [47] Georget E, Kapoor S, Winter R, et al. In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure[J]. Food Microbiol, 2014, 41: 8-18.
- [48] Sevenich R, Reineke K, Hecht P, et al. Impact of different water activities (a_w) adjusted by solutes on high pressure high temperature inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 689.
- [49] Mathys A, Chapman B, Bull M, et al. Flow cytometric assessment of *Bacillus* spore response to high pressure and heat[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2007, 8(4): 519-527.
- [50] Zhang Z, Jiang B, Liao X, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining high-pressure thermal sterilization and ethanol[J]. Int J Food Microbiol, 2012, 160(2): 99-104.
- [51] 章中. 热和化学因素辅助超高压对枯草杆菌芽胞的灭活研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [52] Rozali SNM, Milani EA, Deed RC, et al. Bacteria, mould and yeast spore inactivation studies by scanning electron microscope observations[J]. Int J Food Microbiol, 2017, 263: 17-25.
- [53] Dittmann C, Han HM, Grabenbauer M, et al. Dormant *Bacillus* spores protect their DNA in crystalline nucleoids against environmental stress[J]. J Struct Biol, 2015, 191(2): 156-164.
- [54] Mathys A, Reineke K, Heinz V, et al. High pressure thermal sterilization-development and application of temperature controlled spore inactivation studies[J]. High Pressure Research, 2009, 29(1): 3-7.
- [55] Reineke K, Mathys A, Heinz V, et al. Mechanisms of endospore inactivation under high pressure[J]. Trends Microbiol, 2013, 21(6): 296-304.