高压热杀菌结合葡萄糖对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭效果

章 中，张变飞，尚彬玲，毕 可，杨 杰，刘 月，辛伟山
（宁夏大学 食品科学与工程学院，宁夏 银川 750021）

摘要：作者研究了葡萄糖结合高压热杀菌（HPTS）处理对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭效果及其内膜的影响，通过平板计数法、电导率测定、流式细胞术分析及傅里叶变换红外光谱分析等对枯草芽孢杆菌芽孢的灭菌效果、离子释放量、内膜通透性及膜结构稳定性进行了研究。结果表明：在600 MPa、75 ℃条件下，芽孢死亡量达到4.64个对数值，而在添加了质量分数60%的葡萄糖溶液后，芽孢的死亡量减少了约2个对数值。随着葡萄糖质量分数的升高，芽孢的离子释放量显著下降（$P<0.05$）；流式细胞术结果显示在600 MPa、75 ℃结合质量分数60%葡萄糖溶液处理下样品的阳性区域（M2）占比为92.88%，这表明芽孢内膜通透性显著增加（$P<0.05$）；通过分析样品在3 000~2 800 cm^{-1}波段的傅里叶变换红外光谱，发现与单独HPTS处理相比，添加葡萄糖可以使芽孢内膜的—CH_2/—CH_3官能团吸收峰明显减弱，葡萄糖可有助于维持芽孢内膜结构的稳定性。由此可知，葡萄糖质量分数对HPTS灭活枯草芽孢杆菌芽孢的效果有重要影响。

关键词：高压热杀菌；芽孢；细胞膜；葡萄糖
中图分类号：TS 201.3　**文章编号**：1673-1689(2023)05-0088-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.05.012

Effects of High Pressure Thermal Sterilization Combining with Glucose on the Sterilization of *Bacillus subtilis*

ZHANG Zhong, *ZHANG Bianfei*, *SHANG Binling*, *BI Ke*, *YANG Jie*, *LIU Yue*, *XIN Weishan*
(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The effects of high pressure thermal sterilization (HPTS) combined with glucose on the sterilization effect and the impact on the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores were investigated. The sterilization effect, ion release, intimal permeability, and membrane structure stability of *Bacillus subtilis* spores were studied through plate counting, conductivity measurement, flow cytometry analysis, and Fourier transform infrared spectroscopy analysis. The results showed that the lg value of inactivation rate of spores reached 4.64 with HPTS treatment of 600 MPa and 75 ℃, while the addition of 60% mass fraction glucose reduced the lg value of inactivation rate of spores by 2. As the mass concentration of glucose increased, the ion release of spores decreased significantly ($P<0.05$). The result of flow cytometry showed that the proportion of the positive region (M2) in the sample under 600 MPa and 75 ℃ with 60% mass fraction glucose treatment was 92.88%, indicating a significant increase in the intimal permeability of spores($P<0.05$). By analysis of infrared

收稿日期：2021-09-28
基金项目：国家自然科学基金项目（31760474，31460410）。
作者简介：章 中（1977—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事非热加工技术研究。 E-mail：zhangzhong99@126.com

spectroscopy in the 3 000~2 800 cm^{-1} band, it was found that compared to the HPTS treatment alone, HPTS combining with glucose resulted in a significant reduction in the absorption peak intensity of the characteristic functional group —CH_2/—CH_3 in the inner membrane of spores. Glucose contributed to the stability of inner membrane structure of spores. Therefore, the mass concentration of glucose has an important influence on the inactivation effects of HPTS on *Bacillus subtilis* spores.

Keywords: high pressure thermal sterilization, spore, cell membrane, glucose

细菌芽孢的极端抗性与其特有结构是紧密相关的,芽孢的结构远远比细菌营养细胞复杂,芽孢从外到里有 7 层结构,分别是:孢外壁、芽孢衣、外膜、皮层、细胞壁、内膜、核心[1]。其中芽孢衣主要抵抗化学杀菌物质,内膜也有抵抗化学杀菌物质的作用;芽孢的皮层是维持芽孢休眠状态的一层特有关键结构,主要由肽聚糖构成,是芽孢抗压的一层关键结构[2]。同时,芽孢对热、压力、干燥、辐射和化学试剂都有一定程度的抗性[3],常温常压下芽孢内膜具有极端不通透性,水分子难以自由通过,这种通透屏障是芽孢难以被杀灭的原因之一。芽孢的失活是食品灭菌的主要目的[4]。残留的芽孢迅速萌发生长,造成食物变质,引发人类疾病[5]。HPTS 是使细菌芽孢失活的有效方法[6],被美国食品药品监督管理局(FDA)公认为食品杀菌的前景技术[7-8]。HPTS 可以减少对食物感官和营养成分的影响,提高产品的稳定性[9]。与传统的热灭菌相比,HPTS 通常所用压力为 400~900 MPa,所用温度为 50~100 ℃,实现商业灭菌所需的时间更短[10],但关于 HPTS 结合葡萄糖对芽孢的杀灭作用的报道很少。

据报道,糖是食品中常见的成分,高浓度糖能够使细胞的原生质部分脱水,防止蛋白质凝结,使得细胞处于更稳定的状态,且高浓度的糖能够降低介质中的水分活度,减少微生物生长活动所能利用的自由水分,借助渗透压导致细胞质分离,抑制微生物的生长活动[11]。因此,作者在高压热灭菌的基础上结合葡萄糖处理,通过平板计数、电导率、流式细胞术及傅里叶变换红外光谱对枯草芽孢杆菌芽孢进行研究,并探讨了葡萄糖结合 HPTS 对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭效果以及对果汁灭菌的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,编号 As 1.433):中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)提供;营养琼脂、硫酸锰(分析纯):天津市大茂化学试剂厂产品;DPH:上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品;无水乙醇(分析纯):天津市天力化学试剂有限公司产品;碘化丙啶(propidium iodide,PI)、TSA-YE 培养基:北京索莱宝科技有限公司产品[12];葡萄、猕猴桃、梨(产地宁夏):购于当地新百超市。

1.2 仪器与设备

DSX-280B 型高压灭菌锅:上海申安医疗器械厂产品;TGL-10B 型离心机:上海安亭科学仪器厂产品;LRH 系列生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司产品;METTLER TOLEDO pH 酸度调节计:梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品;LB-32T 手持式糖度计:广州市速为电子科技有限公司产品;超高压设备(5 L HPP 600 MPa):包头科发高压科技有限公司产品;CyFlow Cube 8 流式细胞仪:日本 Sysmex(希森美康)株式会社产品;Spectrum Two 型傅里叶变换衰减全反射红外光谱仪:美国 PerkinElmer 公司产品[12]。

1.3 方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液的制备 芽孢的制备参照文献[13]的方法,将活化后的枯草芽孢杆菌芽孢接种至锰盐培养基,37 ℃条件下划线培养 7 d,重复 3 次。然后将芽孢用无菌去离子水振荡洗涤后收集到离心管,离心洗涤(4 ℃、9 000 r/min、15 min)3 次。洗涤后的芽孢重悬在无菌水中,然后测定吸光度。在4 ℃保存,一个月内使用,使用前调节芽孢浓度约为1.5×10^8 CFU/mL。

1.3.2 葡萄糖结合 HPTS 对枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液的处理 芽孢悬浮液在实验前于 80 ℃水浴加热 15 min 以杀死芽孢中残存的营养体,离心纯化,收集芽孢,调节悬浮液芽孢浓度为 1.0×10^8 CFU/mL[12]。将50 mL 的芽孢悬浮液离心后,倒掉上清液,然后在

离心后的菌泥中加入 50 mL 的葡萄糖质量分数分别为 15%、30%、60%的溶液，涡旋振荡充分混匀。将处理好的菌悬液用无菌的聚乙烯真空袋真空包装，将样品置于超高压加压釜中，以水作为压力传递介质对样品加压[13-14]。压力参数设置为 600 MPa，处理温度为 25、65、75 ℃，保压时间为 20 min，在加压过程中，通过 K 型热电偶测量压力容器中介质的温度。卸压后，将样品立即冷却，计数前在 4 ℃下保存6 h[12]。

1.3.3 枯草芽孢杆菌芽孢平板计数方法 将处理前后的芽孢悬浮液用无菌水以 10 倍递增进行梯度稀释，加入 1 mL 稀释后的菌液在平板上，并倒入 15~20 mL TSA-YE 培养基，待冷却凝固后于 37 ℃下的培养箱倒置培养 24~48 h，记录菌落数[12]。计算公式如下：

$$I=-\lg\ (N_t/N_0)$$

式中：I 为芽孢死亡量对数值，N_0 为开始灭菌（t=0）时原有的活菌数，N_t 为经一定时间 t 处理后残存的活菌数。

1.3.4 果汁的制备 将葡萄、猕猴桃、梨清洗干净后切块，放入螺旋榨汁机榨汁，随后用 4 层纱布过滤，得到果汁浊汁。将得到的果汁浊汁放置于-20 ℃冷库中，并于 12 h 内进行下一步操作；使用前将冷冻在-20 ℃的果汁取出放在 4 ℃冷库中解冻 24 h，之后在室温下离心(9 000 r/min、5 min)，离心结束后将上清液放入灭菌锅，121 ℃灭菌 20 min 后冷却备用。将上一步得到的菌悬液重悬于灭菌后的果汁中，然后将处理好的样品暂时存放于 4 ℃冷库等待 HPTS 处理，处理后立即将一部分样品置于冰水中冷却，测定样品中芽孢的存活率[15]。

1.3.5 电导率的测定 将处理前后枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液于 4 ℃、9 000 r/min 离心 15 min，上清液为工作液，以去离子水为空白对照，测定电导率[16-17]。

1.3.6 流式细胞仪检测枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性 将处理前后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液菌液浓度稀释为 1.0×10^6~1.0×10^7 CFU/mL，然后进行 PI 单染，在 1 mL 芽孢悬浮液中加入 0.75 μL 20 mmol/L 的 PI 染色液，在室温下孵育 15 min，染色在避光条件下进行。染色结束后，离心清洗 2 次除去过量的染色剂，重新悬浮，用流式细胞仪检测前向散射光(FSC)、侧向散射光(SSC)、荧光通道 FL2。样品在染色完成到上机时间间隔控制在 1 h 以内，采用 488 nm 激发光，PI 标记细胞在 615 nm 处发红色荧光(FL2)，数据采集后用 FSC Express Version 3.0 软件分析[18]。

1.3.7 FTIR 光谱分析葡萄糖对芽孢内膜的影响 将处理前后的枯草芽孢杆菌芽孢悬浮液离心后进行真空冷冻干燥，将干燥好的样品利用傅里叶变换衰减全反射红外光谱仪进行检测，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描波长为 400~4 000 cm^{-1}，扫描 64 次[19]。所得光谱数据用 Omnic 软件进行分析，对基线进行校正和平滑，并归一化处理后进行分析，利用 Origin 2018 对红外数据进行二阶求导[19]。

1.3.8 统计分析 所有实验至少重复 3 次，实验结果以平均值±标准差表示。用 Origin 2018 软件对实验结果进行作图，用 SPSS 进行统计分析。不同字母表示相关数据差异性显著(P<0.05)[18]。

2 结果与分析

2.1 HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对枯草芽孢杆菌芽孢灭活效果的影响

HPTS(600 MPa 结合 25、65、75 ℃，保压 20 min)结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对枯草芽孢杆菌芽孢的灭活情况如图 1 所示。结果表明，葡萄糖对 HPTS 作用下的枯草芽孢杆菌芽孢具有一定的保护作用，且葡萄糖质量分数越大，对其保护作用越强。HPTS 对芽孢具有很好的灭活效果，从图 1 可以看出，同一压力下，温度越高，芽孢死亡量越大。单独的 HPTS 处理效果最好的是 600 MPa、75 ℃，在此条件下，芽孢的死亡数量达到 4.64 个对数值，且质量分数 15%、30%、60%的葡萄糖溶液结合 HPTS 处理，使芽孢死亡量分别达到了 4.19、3.91、2.63 个对数值，与单独的 HPTS 处理相比较，质量分数 60%的葡萄糖溶液对芽孢灭活的削弱作用达到了约 2 个对数值。因此，低质量分数糖溶液对于芽孢的耐热性影响较少，而随着糖质量分数升高，能够增强细菌芽孢的耐热性，使得芽孢提高了对高压和热的抵抗性[20]。由此可见，随着葡萄糖质量分数的增加，对于芽孢的杀灭影响越大。

2.2 HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对果汁中芽孢的杀灭效果影响

此次实验选取了葡萄、猕猴桃、梨 3 种含糖质量分数不同的果蔬汁(见表 1)，为了除去果汁本身

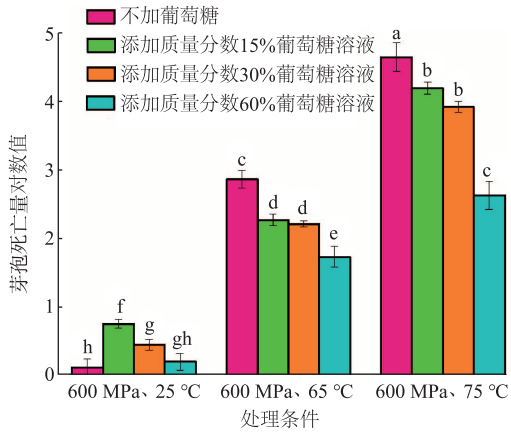


图 1　HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对枯草芽孢杆菌芽孢灭菌效率的影响

Fig. 1　Effect of HPTS combined with different concentrations of glucose on the sterilization efficiency of *Bacillus subtilis* spore

糖的影响，以原始的果蔬汁作为对照组，添加质量分数15%的葡萄糖溶液作为处理组来进行实验，将这 3 种果汁进行 HPTS 处理，结果如图 2 所示。从图中可以看出，处理组和对照组相比，在 3 种果汁中对枯草芽孢杆菌芽孢的杀菌效果均有所减弱，处理组的芽孢死亡量最多减少了 1.13 个对数值，说明葡萄糖在果汁中也能够对芽孢起到保护作用。同时发现，在对照组中，葡萄汁较猕猴桃汁和梨汁对芽孢的保护效果更好，在 600 MPa、75 ℃条件下，猕猴桃汁和梨汁中芽孢死亡量分别达到了 3.73 和 3.72 个对数值，而葡萄汁中达到了 3.34 个对数值；对比添加葡萄糖以后，猕猴桃汁、梨汁、葡萄汁中芽孢死亡量分别减少了 1.02、1.05、1.13 个对数值。因此，不同果汁中，提高糖质量分数，都会减弱 HPTS 杀灭芽孢的效果。

表 1　鲜果汁 pH 和糖度

Table 1　pH and brix of fresh fruit juice

果汁	pH	糖质量分数/%
葡萄汁	4.23	19
猕猴桃汁	3.76	11
梨汁	5.37	10

2.3　HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对枯草芽孢杆菌芽孢电导率的影响

细菌的细胞膜是一种具有高度选择性的渗透性屏障，隔离细菌和外界环境，控制细胞内外物质交换[21]。HPTS 处理后，导致芽孢离子释放，表现为芽

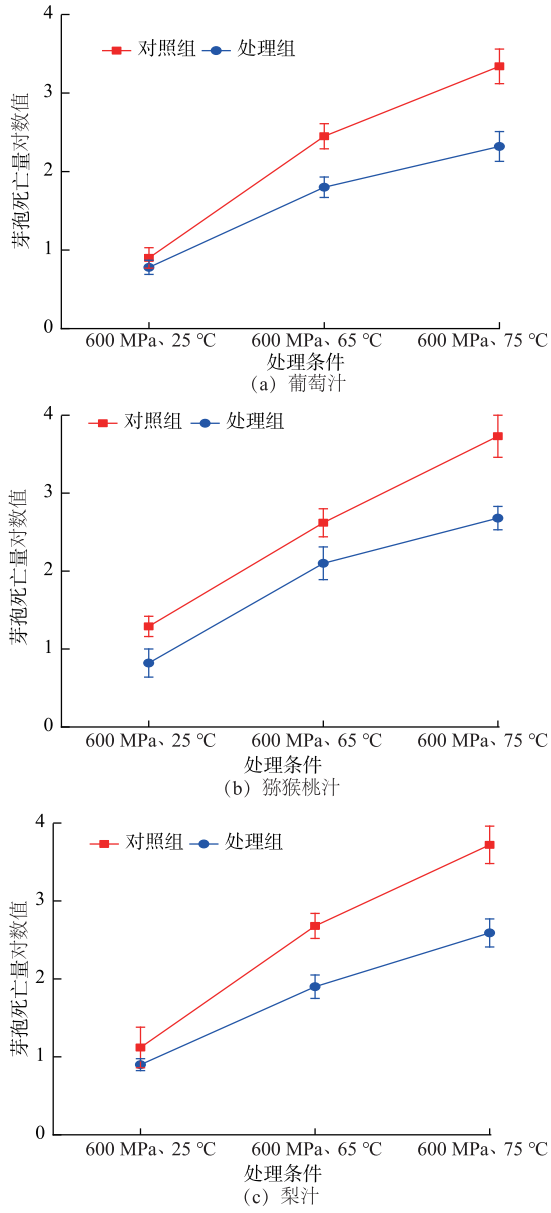


图 2　HPTS 处理对果汁杀菌效果的影响(600 MPa)

Fig. 2　Effect of HPTS on the sterilization effect of fruit juice (600 MPa)

孢悬浮液电导率的增大，HPTS 结合葡萄糖处理后芽孢悬浮液的电导率如表 2 所示。可以看出，未添加葡萄糖溶液的处理组，随着温度的增大，电导率也随之增大，说明芽孢中释放的离子浓度增加。添加葡萄糖溶液处理后，随着葡萄糖质量分数的升高，电导率下降，说明芽孢离子的释放在缓慢下降，可能是随着葡萄糖质量分数的升高，芽孢离子在葡萄糖溶液中的溶解度变低，不利于芽孢内的离子释放到葡萄糖溶液中去。

表 2　HPTS 结合不同质量分数的葡萄糖溶液处理后芽孢悬浮液电导率

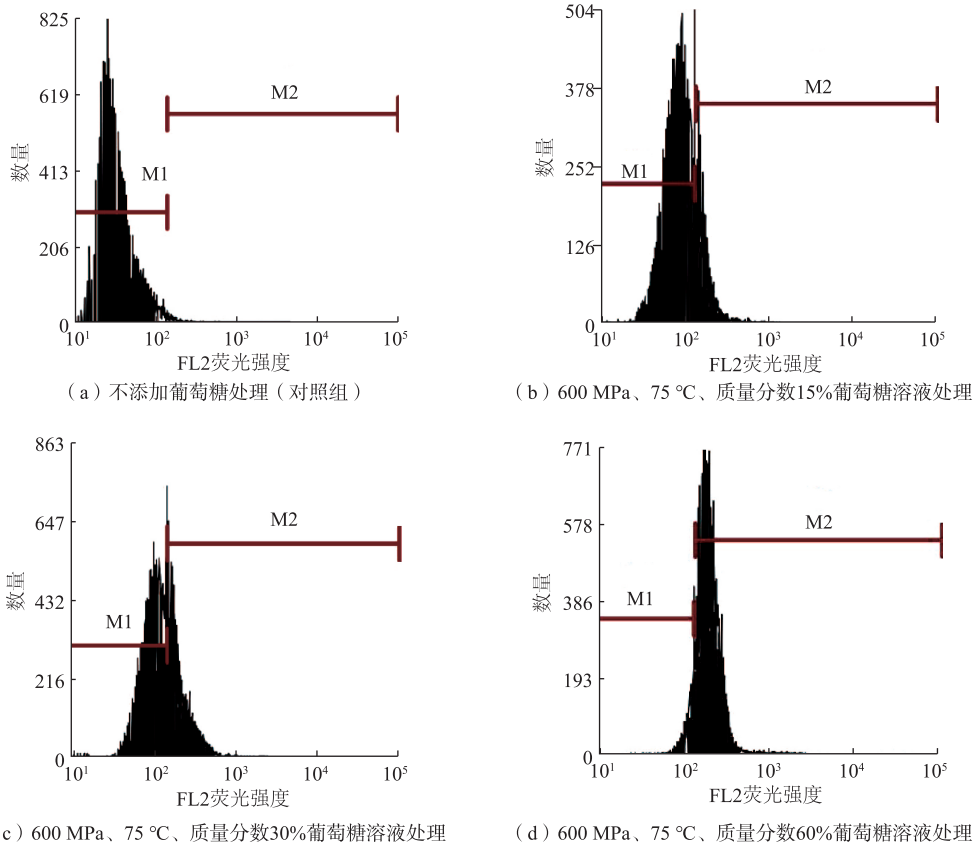
Table 2　Conductivity values of spore suspension treated under HPTS combined with different mass fraction of glucose

单位：μS/cm

处理条件	未添加葡萄糖	添加质量分数 15% 葡萄糖溶液	添加质量分数 30% 葡萄糖溶液	添加质量分数 60% 葡萄糖溶液
常温常压	9.120±0.002	14.490±0.001	11.220±0.003	10.350±0.001
600 MPa、25℃	12.510±0.002	22.800±0.005	15.530±0.002	11.510±0.003
600 MPa、65℃	21.400±0.003	16.340±0.002	12.790±0.001	12.390±0.004
600 MPa、75℃	25.600±0.002	9.200±0.001	3.100±0.002	2.980±0.001

2.4　HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液对枯草芽孢杆菌芽孢细胞膜损伤的流式细胞仪检测

细胞膜作为细胞结构的边界，能够使得细胞具有一个相对稳定的内环境，而且作为细胞和环境之间进行物质和能量交换的场所，在信息的传递过程中起着决定性的作用[22]。关于高压热对芽孢杀灭的机理中，认为膜的损伤和变化是引起芽孢死亡的主要原因[23]。通过荧光染色结合流式细胞仪进行观察，了解细胞膜的通透性变化，判断 HPTS 结合葡萄糖在处理过程中枯草芽孢杆菌芽孢发生的变化。PI 是常用的荧光染料，能够透过破损的细胞膜进入死细胞后嵌入双链 DNA，产生红色荧光[24]，而 PI 是大分子染料只有在膜透性增大的时候才能穿过并与核酸结合发出荧光，故可通过 PI 染色检测细胞膜的受损程度[25]。枯草芽孢杆菌芽孢经 HPTS（600 MPa、75 ℃）结合葡萄糖处理后流式细胞仪检测结果如图 3 所示，直方图分为两个区域 M1 和 M2，M1 为阴性区域，M2 为阳性区域。600 MPa、75 ℃结合不同质量分数的葡萄糖溶液处理，随着葡萄糖质量分数的增加荧光分布向 M2 区域移动，说明随着葡萄糖质量



（a）不添加葡萄糖处理（对照组）　（b）600 MPa、75 ℃、质量分数15%葡萄糖溶液处理

（c）600 MPa、75 ℃、质量分数30%葡萄糖溶液处理　（d）600 MPa、75 ℃、质量分数60%葡萄糖溶液处理

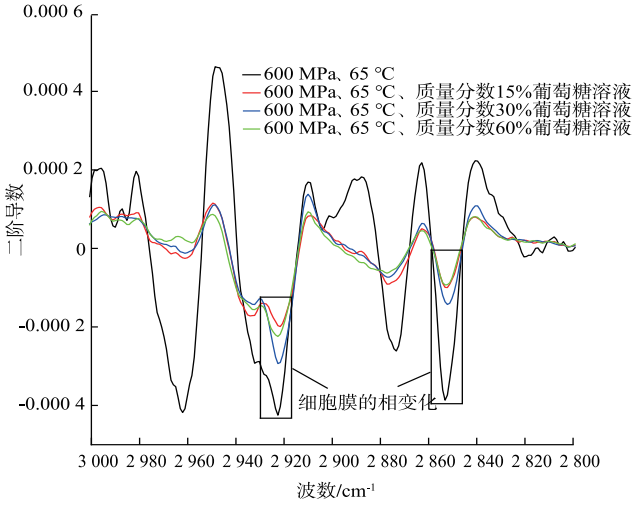
图 3　HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理对枯草芽孢杆菌芽孢内膜通透性的影响

Fig. 3　Effect of HPTS combined with different mass fraction of glucose on the intimal permeability of *Bacillus subtilis*

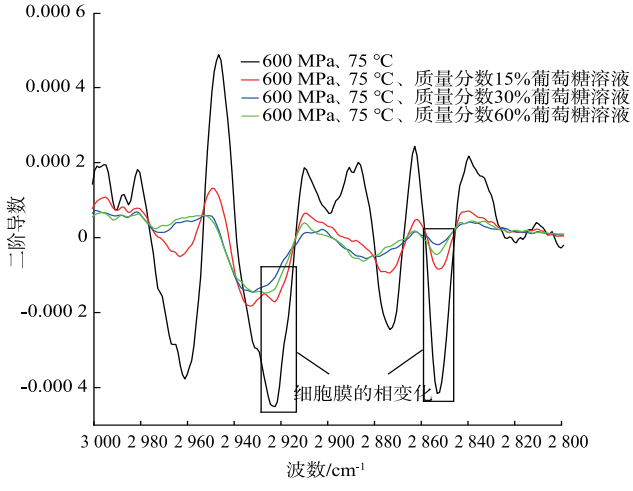
分数的增加，芽孢内膜的通透性增加。与对照组相比，葡萄糖（质量分数 15%、30%、60%）处理后，阳性区域变化分别为 33.12%、49.28%、92.88%。质量分数60%葡萄糖溶液处理后，荧光分布向 M2 移动的程度最大，说明 HPTS 结合不同质量分数葡萄糖溶液处理后，荧光分布向 M2 移动，芽孢内膜通透性增加，使芽孢内膜受到一定程度的损伤。

2.5　HPTS 处理前后枯草芽孢杆菌芽孢的红外光谱二阶导分析

3 000~2 800 cm^{-1} 波段主要表征膜脂质的变化情况，波数在 2 872 cm^{-1} 和 2 957 cm^{-1} 附近主要代表—CH_3 的对称和反对称伸缩振动，波数在 2 919 cm^{-1} 和 2 852 cm^{-1} 附近主要代表—CH_2 的对称和反对称伸缩振动[26-27]，它们的位移能够反映膜脂质的性质，—CH_2 发生的规律性位移则在一定程度上反映细胞膜脂质次甲基链的堆积特征和脂质双层的有序或无序性质[28]。HPTS 引起细胞膜脂肪酰基链的变化，如果脂肪酰基链被“融化”而达到高度构象紊乱，则峰向高波峰移动[29]。通过观察—CH_3 和—CH_2 官能团拉伸振动的位置和形状变化[29-30]，可分析膜的结构变化。HPTS 结合葡萄糖处理前后枯草芽孢杆菌芽孢在 3 000~2 800 cm^{-1} 的二阶导数红外光谱如图 4 所示。HPTS 结合葡萄糖处理后，与未添加葡萄糖的处理相比，2 852 cm^{-1} 波段的峰基本没有发生位移，2 919 cm^{-1} 发生了变化，与未处理的枯草芽孢杆菌芽孢相比，添加葡萄糖后 600 MPa、65 ℃处理峰基本没有发生位移，而 600 MPa、75 ℃向高波数段位移，但位移的间距很小，说明 HPTS 结合葡萄糖处理对芽孢的细胞膜磷脂分子疏水尾链的混乱情况影响很小。添加葡萄糖处理后，发现红外光谱各波段特征官能团吸收峰强度显著减弱，有效地维护了芽孢内膜结构—CH_2/—CH_3 官能团的稳定性。



（a）HPTS（600 MPa、65 ℃）结合葡萄糖处理前二阶导数红外光谱



（b）HPTS（600 MPa、75 ℃）结合葡萄糖处理前后二阶导数红外光谱

图 4　HPTS 结合葡萄糖处理前后枯草芽孢杆菌芽孢在 3 000~2 800 cm^{-1} 的二阶导数红外光谱图

Fig. 4　Second-derivative ATR-FTIR spectra of *Bacillus subtilis* spores at 3 000-2 800 cm^{-1} before and after HPTS combined with glucose

3　结　语

HPTS 结合葡萄糖处理能够削弱 HPTS 对芽孢的杀灭效果，600 MPa、75 ℃结合质量分数 60%葡萄糖溶液处理后，芽孢死亡量减少了约 2 个对数值，3 种果汁在不同质量分数的葡萄糖溶液条件下，对枯草芽孢杆菌芽孢的杀菌效果均有减弱，处理组的灭活数量最多减少了 1.13 个对数值，说明葡萄糖在果汁中也能对枯草芽孢杆菌起到保护作用。HPTS 结合葡萄糖处理后，芽孢电导率都呈现下降趋势，说明芽孢离子释放量减少。流式细胞术测定结果显示，600 MPa、75 ℃、质量分数 60%葡萄糖溶液处理后，阳性区域变化最显著（P<0.05），芽孢内膜通透性变化最大。傅里叶变换红外光谱结果表明，添加葡萄糖后，红外光谱各波段特征官能团—CH_2/—CH_3 吸收峰强度显著减弱，有效维护了芽孢内膜结构的稳定性，说明葡萄糖对芽孢内膜离子的释放、内膜通透性及稳定性均有影响。

参考文献:

[1] 易建勇,章中,胡小松,等. 超高压处理对灭活细菌芽孢影响的研究进展[J]. 中国食品学报,2011,11(2):152-157.

[2] 徐娴,谢承佳,何冰芳. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及高效表达[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(5):75-78.

[3] 刘冬梅,吴停,李理,等. 干酪乳杆菌抑制大豆奶酪中的金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(3):73-78.

[4] GUPTA I,CHAKRABORTY J,ROY S,et al. Nanocarbon immobilized membranes for generating bacteria and endotoxin free water via membrane distillation[J]. **Separation and Purification Technology**,2020,259:118-133.

[5] FAN L,HOU F,MUHAMMAD A I,et al. Synergistic inactivation and mechanism of thermal and ultrasound treatments against *Bacillus subtilis* spores[J]. **Food Research International**,2019,116:1094-1102.

[6] MATSER A M,KREBBERS B,BERG R,et al. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2004,15(2):79-85.

[7] LIANG D,ZHANG L,WANG X,et al. Building of pressure-assisted ultra-high temperature system and its inactivation of bacterial spores[J]. **Frontiers in Microbiology**,2019,10:1275-1280.

[8] REDDY N R,PATAZCA E,MORRISSEY T R,et al. Thermal and pressure-assisted thermal destruction kinetics for spores of type A *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* PA3679[J]. **Journal of Food Protection**,2016,79(2):253-262.

[9] LOPEZ B G,MESA A,PEREZ V F,et al. Continuous system and procedure of sterilization and physical stabilization of pumpable fluids by means of an ultra-high pressure homogenization:US20130243644 A1[P]. 2013-09-19.

[10] DOONA C J,FEEHERRY F E,ROSS E W,et al. Chemical kinetics for the microbial safety of foods treated with high pressure processing or hurdles[J]. **Food Engineering Reviews**,2016,8(3):1-20.

[11] WUYTACK E Y,MICHIELS C W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2001,64(3):333-341.

[12] EVELYN,SILVA F V M. Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria,moulds and yeasts spores in foods:log reductions and mathematical models[J]. **Trends in Food Science and Technology**,2019,88:143-156.

[13] ZHANG Z,JIANG B,LIAO X,et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining high-pressure thermal sterilization and ethanol[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2012,160(2):99-104.

[14] SHI L,XIONG G,YIN T,et al. Effects of ultra-high pressure treatment on the protein denaturation and water properties of red swamp crayfish(*Procambarus clarkia*)[J]. **LWT– Food Science and Technology**,2020,133:1-7.

[15] ZULUETZ A,ESTEVE M J,FRASQUET I,et al. Vitamin C,vitamin A,phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain[J]. **Food Chemistry**,2007,103(4):1365-1374.

[16] BEVILACQUA A,PETRUZZI L,SINIGAGLIA M,et al. Effect of physical and chemical treatments on viability,sub-lethal injury,and release of cellular components from *Bacillus clausii* and *Bacillus coagulans* spores and cells[J]. **Foods**,2020,9(12):1-12.

[17] REINEKE K,SCHLUMBACH K,BAIER D,et al. The release of dipicolinic acid--the rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2013,162(1):55-63.

[18] AMOR K B,BREEUWER P,VERBAARSCHOT P,et al. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable,injured,and dead bifidobacterium cells during bile salt stress[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2002,68(11):5209-5216.

[19] MCCRAE K C,RAND T,SHAW R A,et al. Analysis of pulmonary surfactant by Fourier-transform infrared spectroscopy following exposure to *Stachybotrys chartarum*(atra) spores[J]. **Chemistry & Physics of Lipids**,2001,110(1):1-10.

[20] OPSTAL I V,VANMUYSEN S,MICHIELS C W. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system[J]. **International Journal of Food Microbiology**,2003,88(1):1-9.

[21] GUO F，QIAN K，ZHANG L，et al. Anisotropic conductivity for single-cell electroporation simulation with tangentially dispersive membrane[J]. **Electrochimica Acta**，2021，385：1-10.

[22] SETLOW P. Spores of *Bacillus subtilis*：their resistance to and killing by radiation，heat and chemicals[J]. **Journal of Applied Microbiology**，2010，101(3)：514-525.

[23] DRIKS A. Maximum shields：the assembly and function of the bacterial spore coat[J]. **Trends in Microbiology**，2002，10(6)：251-254.

[24] NAKAGAWA M，KAWANO Y，AKASAKA Y，et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments[J]. **Digestive Endoscopy**，2003，16(1)：84-87.

[25] SPANO M，BARTOLESCHI C，CORDELLI E，et al. Flow cytometric assessment of trophosphamide toxicity on mouse spermatogenesis[J]. **Cytometry**，2015，24(2)：174-180.

[26] CELIK S，OZKOK F，OZEL A E，et al. Synthesis，FT-IR and NMR characterization，antibacterial and antioxidant activities，and DNA docking analysis of a new vanillin-derived imine compound[J]. **Journal of Molecular Structure**，2021，1236(8)：1-12.

[27] NABEDRYK E，BRETON J，ALLEN J P，et al. Hydrogen bonding to the primary electron donor in reaction centers from RB. *Sphaeroides*：FTIR characterization of a series of mutants at residue M160[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997：107-108.

[28] 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 Microbiology**，2014，41：8-18.

[29] 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.

[30] HO T M，ZHU J，BANSAL N，et al. Effect of pH and heat treatment on physicochemical and functional properties of spray-dried whey protein concentrate powder[J]. **International Dairy Journal**，2021，119：1-10.