

真空包装食品中芽孢的危害及其控制研究进展

张园园, 李苗云, 赵莉君, 朱瑶迪, 赵改名, 梁栋, 马阳阳

(河南农业大学 食品科学技术学院, 郑州 450002)

摘要: **目的** 解决厌氧型微生物及其芽孢对真空包装食品造成的污染问题, 减少食品氧化腐败, 延长产品货架期, 为促进食品工业健康发展提供重要理论依据。**方法** 结合芽孢结构详细探讨芽孢的性质和抗性机制, 揭示芽孢具有休眠特性和抗逆性强等特点的原因; 对真空包装食品中芽孢的危害及易感染的芽孢菌进行系统概述; 全面解析控制芽孢的物理、化学方法和“先萌发后杀灭”策略, 并对芽孢的杀灭机制进行简要阐述。**结论** 芽孢是导致真空包装食品腐败变质的重要因素, 研究和开发高效杀灭芽孢的新技术, 对有效控制真空包装食品中的芽孢, 提高食品安全性具有重要意义。

关键词: 真空包装; 食品; 芽孢; 危害; 控制

中图分类号: TS206.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2021)13-0029-07

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2021.13.004

Research Progress on the Hazard and Control of Spores in Vacuum Packaged Foods

ZHANG Yuan-yuan, LI Miao-yun, ZHAO Li-jun, ZHU Yao-di,
ZHAO Gai-ming, LIANG Dong, MA Yang-yang

(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: The paper aims to verify the contamination of vacuum packaged food caused by anaerobic microorganisms and their spores, reduce the oxidation and corruption of food, extend the shelf life of products, and provide an important theoretical basis for promoting the healthy development of the food industry. In this paper, the nature and resistance mechanism of spores were discussed in detail based on the structure of spores, and the reasons for the characteristics of dormancy and strong resistance of spores were revealed; the hazard of spores in vacuum-packaged foods and the susceptible spores were systematically summarized. The physical and chemical methods of controlling spores and the strategy of "germinate first and then kill" were fully analyzed, and the killing mechanism of spores was briefly explained. It is concluded that spores are an important factor leading to the spoilage of vacuum-packaged foods. The research and development of a new technology for efficiently killing spores is of great significance for effectively controlling the spores in vacuum-packaged food and improving food safety.

KEY WORDS: vacuum packaging; food; spore; hazard; control

食品中富含蛋白质和水分, 在其加工、贮藏和
销售的过程中极易滋生微生物, 发生脂肪和蛋白质
的氧化, 导致食品的颜色、嫩度、口感和风味等发

生改变^[1-2], 严重影响产品销售外观, 降低食用品质。
真空包装是食品的重要保藏方式, 主要通过降低含氧
量来延缓需氧微生物的生长, 减少脂肪、蛋白质的氧

收稿日期: 2021-01-09

基金项目: 河南农业大学科技创新基金(KJCX2020A17); 国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37)

作者简介: 张园园(1995—), 女, 河南农业大学硕士生, 主攻肉品加工与安全控制。

通信作者: 李苗云(1976—), 女, 博士, 河南农业大学教授, 主要研究方向为肉品加工与安全控制。

化,从而保持食品原有品质,延长货架期^[3-6]。真空包装的防护性好,可有效减少食品失水,阻隔易挥发性香味溢出^[7]。食品在真空包装后会进行杀菌处理,以杀灭食品中的微生物。由于芽孢结构复杂,具有抗逆性强等特点,对高温、高压、干燥、辐照、紫外线和很多有毒化学物质都具有很强的抗性^[8-9],因此一般的食品杀菌技术将其无法杀灭。芽孢广泛分布于自然界中,常存在于空气、土壤、水、人和动物肠道以及腐败物中,在食品原辅料及其加工过程中极易引入,是引起食品腐败变质,导致食源性疾病的重要因素^[10]。真空包装食品中最易感染的产气荚膜梭菌、肉毒梭状芽孢杆菌和生孢梭菌等均为厌氧致病菌^[10-11],其芽孢在真空包装后的无氧环境下能够正常萌发、生长,产生毒性,引起食品变质和变色。若真空包装的食品中存在厌氧致病菌的芽孢,在食品后续的贮藏、运输和销售过程中,由于温度的波动会造成食品中存在的多种糖、氨基酸以及 K^+ 等物质诱导芽孢萌发成菌体,大量繁殖并产生毒素,引起食品腐败变质^[12-13]。目前市场上存在真空包装食品在贮藏一段时间后出现胀袋问题,其主要是由食品中存在的高热抗性厌氧微生物生长繁殖后产气导致,一旦食品灭菌不彻底,导致芽孢的残留或产生芽孢的二次污染,这些芽孢将会在适宜条件下萌发生长,成为食品的主要腐败菌^[14]。

近年来国内外研究学者多对芽孢的萌发机制进行相关研究,有关芽孢抗性机制的相关内容报道较少,对于真空包装食品中芽孢的安全控制也没有进行详细综述,可有效解决食品中芽孢安全问题的方法尚不完善。基于此,深入解析芽孢的抗性机制,有效控制真空包装食品中的芽孢对于减少食品腐败变质造成的经济损失起到重要作用。文中在前人工作基础上从芽孢的特性、危害和控制等 3 个方面进行详细概述,以期为保证食品安全,控制芽孢的危害提供理论依据和指导。

1 芽孢特性

1.1 芽孢的结构及性质

芽孢的抗性和休眠特性与其独特结构相关^[15],了解芽孢结构和性质对进一步解析芽孢抗性机制具有重要意义。芽孢一般具有 7 层结构,从外到内依次是孢外壁、芽孢衣、外膜、皮层、芽孢壁、内膜和内核(见图 1)。芽孢具有营养体细胞所没有的结构,包括对抵御外界不良环境起重要作用的孢外壁和芽孢衣等^[8]。孢外壁主要由脂蛋白组成,该结构只存在于部分芽孢菌属中,枯草芽孢杆菌中不存在孢外壁结构。芽孢衣位于孢外壁内侧,主要由蛋白质组成,芽孢衣中蛋白质含量占芽孢总蛋白质量的 50%~80%。芽孢衣具有 8 层结构,能够抵御外界不良环境,使芽

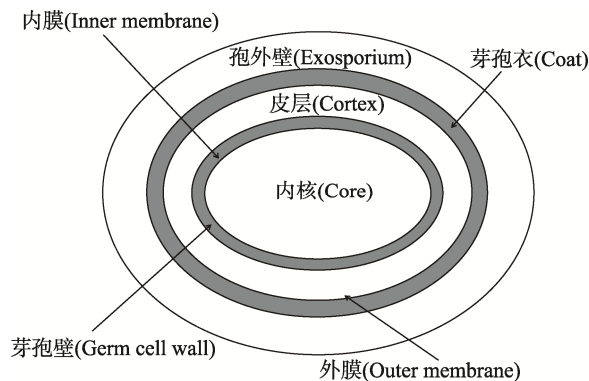


图 1 细菌芽孢结构示意图
Fig.1 Schematic structure of a bacterial spore

孢内部免受化学物质和酶的影响,对芽孢起到保护作用^[8]。同时有研究表明,芽孢衣上具有与芽孢萌发相关的蛋白:皮层降解酶(CwlJ)和消旋酶(Ala)^[16]。位于芽孢衣内侧的结构为外膜,它对热、辐照和化学物质等都不具备抗性^[17-19]。位于外膜内侧的结构是皮层肽聚糖(PG),它与营养体细胞壁中肽聚糖的结构相似^[20]。皮层以某种方式参与建立和维持核心的低含水量,同时,皮层中具有皮层水解酶,在芽孢萌发过程中能够使皮层水解^[10]。位于芽孢壁内侧的结构是由磷脂双分子层构成的具有低渗透性等特点的内膜。芽孢内膜上存在受体蛋白、通道蛋白等重要萌发蛋白,在芽孢萌发过程中起到关键作用^[21-22]。芽孢内核位于芽孢核心,其中包含 DNA、核糖体和大多数芽孢酶,其核心含水量低(湿质量的 25%~55%)是芽孢耐湿热的主要原因^[9]。内核中含有大量的芽孢特异性成分:2,6-吡啶-二羧酸(DPA)和小分子酸溶性蛋白(SASP),其中 DPA 与二价阳离子(Ca^{2+})在核心区以 1:1 结合成螯合物 Ca^{2+} -DPA^[23];SASP 在核心与 DNA 紧密结合后,可以增强芽孢对辐射、热等的抵抗力^[22]。

目前,研究学者已对许多芽孢特性进行了测定,包括芽孢核心 Ca^{2+} -DPA 的含量^[24-25];存在于芽孢孢外壁、芽孢衣、内膜和内核中的蛋白质^[26-27];皮层和生殖细胞壁的肽聚糖成分^[28];芽孢外膜、内膜的渗透性和蛋白质^[29];芽孢核心游离核苷酸、氨基酸等小分子的含量;芽孢核酸^[30-33]。

1.2 芽孢的抗性机制

芽孢形成于产孢细胞的母细胞内,在母细胞裂解时释放到环境中,对大多数环境胁迫具有极强的抵抗力,几乎没有代谢活性^[9]。目前已确定枯草芽孢杆菌的 5 种主要芽孢抗性机制^[34-35]:芽孢的低核心含水量对抵抗湿热和核心活性氧的产生很重要;芽孢核心中高含量的 Ca^{2+} -DPA 对芽孢抵抗湿热和辐射很重要;芽孢核心小分子酸溶性蛋白 SASP 与 DNA 紧密结合,保护芽孢 DNA 免受湿热、干热、

辐射、高真空和化学物质的损害；芽孢内膜渗透性低，极大地限制了许多有毒亲水化合物，特别是遗传毒性化学物质进入芽孢内核；芽孢外层，特别是芽孢衣，可以限制大分子进入芽孢内层，并与许多活性化学物质（特别是氧化剂）进行非特异性反应和解毒。

2 真空包装食品中芽孢的危害

芽孢广泛存在于自然环境，在食品加工过程中不可避免地会引入芽孢，而芽孢具有抗逆性强等特点，在食品杀菌后仍能存活，当外界条件合适时，芽孢会消耗食品中的营养成分，产生有毒代谢产物，从而引起食品腐败和食源性疾病^[36]。芽孢引起食源性疾病的方式主要有 2 种：食品中的芽孢萌发后产生毒性，消费者食用含毒素的食品后发生食源性疾病；消费者食用了含有芽孢的食品，芽孢在肠道内萌发产毒发生食源性疾病。在食品工业中，芽孢污染可导致肉制品、面制品、低酸性罐头等多种食品在贮藏期的腐败，从而引起食源性疾病^[22-37]。

真空包装食品中最易感染的芽孢菌是产气荚膜梭菌和肉毒梭状芽孢杆菌等。据报道，产气荚膜梭菌存活于动物的肠道或粪便中，在食品加工过程中污染食品的概率也非常高，可达 80% 左右^[10]。食品中由于富含蛋白质极易被污染，不合理的冷却工艺会导致产气荚膜梭菌芽孢的萌发和二次生长，从而引起食物中毒事件^[36]。产气荚膜梭菌可导致气性坏疽和 2 类食源性疾病，即相对温和的 A 型腹泻以及严重的 C 型坏死性肠炎^[38-39]。在美国及一些发展中国家，由 A 型产气荚膜梭菌引起的食物中毒事件每年约有 100 万例^[36]。肉毒梭状芽孢杆菌是真空包装食品中危害最大的目标微生物，该菌在厌氧环境下可产生肉毒毒素，而肉毒中毒是一种中毒征象最重、病死率很高的致死性神经麻痹性疾病，极微量即可导致人类死亡。肉毒毒素常在肉、蔬菜、水产品、奶类制品、水果罐头等食物中被发现，且在绝大多数家庭自制的臭豆腐、豆酱、玉米糊等发酵食品中更易产生。肉毒梭状芽孢杆菌的芽孢对真空包装食品的危害极大，必须采取相应手段从食品源头进行有效控制^[22]。

3 芽孢的控制及其杀灭机制

3.1 芽孢的控制措施

芽孢在食品中产生的毒素严重危害人类生命安全，因此控制芽孢对于保证食品安全性至关重要。目前食品企业和实验室中芽孢的主要控制措施主要分为物理控制、化学控制以及“先萌发后杀灭”策略^[10,21,23]。杀灭芽孢的方法：采用杀菌技术瞬时实现

芽孢的全杀灭，通过缩短时间最大限度地保留食品原有的营养和品质；通过诱导芽孢萌发，使芽孢自身的生理结构变化，打破其休眠下的抗性，在其形成萌发态的薄弱期实现对芽孢的杀灭，其核心是如何诱导芽孢同步快速全部萌发。

3.1.1 物理、化学法控制芽孢措施

食品中杀灭芽孢的物理方法多采用高温灭菌法、高压灭菌法、辐照杀菌和压力辅助热杀菌技术等。高温灭菌法可以有效杀灭食品中的芽孢，但对部分耐热芽孢的效果并不显著，如嗜热脂肪土芽孢杆菌、耐热芽孢杆菌等^[21]。传统的高温杀菌技术可以有效杀灭食品中存在的芽孢，保证食品安全性，但也会破坏食品的营养品质、色泽、口感等^[40-41]，食品在长时间高温加热后也会导致有毒有害物质的形成和积累，因此，能够在较低温度下杀灭芽孢且不破坏食品品质的食品杀菌技术成为了目前研究学者的研究方向。现代杀菌技术主要有高静压、高压 CO₂、脉冲电场、强磁场、超声波、欧姆加热、微波、脉冲光、紫外、冷等离子体、辐照等^[21,22,41]，这些现代杀菌技术可以保持相对较低温度，在对食品中的微生物有效杀灭的同时，还能保持食品的色泽、口感、营养等。除了微波杀菌技术外，大多现代杀菌技术仅能杀灭致病微生物，减少腐败菌，但无法杀灭芽孢，因此现代杀菌技术大多只适用于冷藏的食品，应用于食品的冷藏保鲜。目前，热处理杀菌仍是食品工业最有效、最经济、最简便和最广泛的杀菌方法，也是评价其他杀菌技术杀菌效果的基本参照。除了上述食品中常用的杀菌技术外，食品企业生产器械、公共卫生和医学器械等多采用强酸、强碱、强氧化剂来有效杀灭细菌和芽孢^[42-44]，以避免在食品加工等过程中引入有害微生物及其芽孢。

3.1.2 “先萌发后杀灭”策略

近年来，“先萌发后杀灭”策略逐渐引起学者们的广泛关注，芽孢萌发后失去休眠特性和抗性，常规的食品杀菌技术即可杀灭，是目前有效防控食品中芽孢的主要手段之一^[10]。芽孢萌发过程极其复杂，不同菌种的芽孢萌发条件各不相同，关于枯草芽孢杆菌芽孢“先萌发后杀灭”的研究最为广泛^[45-46]。影响枯草芽孢杆菌芽孢萌发的因素有很多，包括萌发剂、压力、温度和其他因子等^[22]。萌发剂包括营养萌发剂和非营养萌发剂，可以与芽孢内物质结合诱导芽孢萌发。营养萌发剂主要包括氨基酸、糖类和嘌呤核苷酸^[47]，该萌发剂作用于芽孢内膜的同源萌发受体，发生一价阳离子（H⁺，Na⁺和 K⁺）的释放、芽孢核心大剂量 Ca²⁺-DPA 的释放和水分子的进入，随后芽孢皮层水解，核心膨胀，芽孢萌发^[13,48]。非营养萌发剂主要包括 Ca²⁺-DPA 和阳离子表面活性剂十二烷基胺，该萌发剂主要通过激活营养萌发过程中的某一步骤促进芽

孢完成萌发^[49]。

目前很多研究学者采用多种物理和化学方法结合作用来诱导芽孢萌发, 最常见的诱导芽孢萌发的结合方式有6种: 超高压结合 pH^[50]; 超高压结合热处理; 超高压结合不同理化因素(酸、糖、乙醇等)^[51-52]; 超声波结合热处理; 超声波结合萌发剂^[53]; 热处理结合化学物质^[48]。通过提高芽孢萌发率, 降低杀菌条件, 能够进一步延长食品的保藏期, 提高产品质量, 对有效控制真空包装食品芽孢污染提供理论依据, 同时对食品安全和企业的发展有重要的指导意义。

3.2 芽孢杀灭的主要问题及其杀灭机制

芽孢对多种已知或潜在的杀灭芽孢条件具有抗性, 包括高温(湿或干)、高压、真空、辐照以及化学物质等。目前关于芽孢杀灭问题仍存在以下主要问题: 芽孢对于杀灭芽孢条件具有抗性的机理; 被杀灭的芽孢是已经真正死亡, 还是仅仅是萌发过程被阻断; 芽孢被真正杀灭的机制。

近年来, 人们普遍关注的是准确的芽孢杀灭机制。总结前人研究发现, 芽孢杀灭机制共分为5种^[12]: 对DNA损伤; 一些氧化剂对芽孢内膜造成损伤; 芽孢核内与芽孢生长相关的蛋白; 芽孢内膜破裂; 萌发相关蛋白的破坏^[6,44,54]。不同杀菌技术的杀灭机制存在差异。湿热杀菌主要通过灭活对芽孢生长至关重要的蛋白来杀灭芽孢^[55]; 氯酸盐、二氧化氯、臭氧主要对芽孢内膜造成损伤^[37]; 过氧化氢主要损伤核心蛋白质^[42]; OH⁻会造成芽孢无法萌发^[56]; 强酸会使芽孢内膜破裂^[56]; 紫外线、 γ 射线、干热、真空、亚硝酸盐、甲醛和一些破坏DNA的化学物质对DNA造成损伤^[6]; 高压会使芽孢萌发, 然后破坏蛋白^[57]。仅破坏芽孢萌发蛋白不会造成芽孢的真正死亡, 只是阻断了芽孢萌发过程, 因此, 在杀灭芽孢后应检测芽孢是否真的被杀灭, 还是仅是芽孢萌发过程被阻断。

4 结语

芽孢作为真空包装食品腐败变质的主要污染微生物, 已逐渐引起国内外学者的广泛关注。虽然目前已有杀灭芽孢的食品杀菌技术, 但是对于既能保证食品营养、口感、品质, 又能降低装备要求、成本和杀菌温度, 同时能高效杀灭食品中芽孢的方法仍需进一步研究。灭活真空包装食品中的芽孢仍是食品工业面临的严峻挑战。研究和开发高效杀灭芽孢的新技术, 同时将多种方法结合应用于食品企业的实际生产, 找到最适用于真空包装食品中芽孢的杀灭手段, 对有效控制芽孢对食品的污染、保障食品安全具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 薛佳祺, 王颖, 周辉, 等. 包装技术在肉制品保鲜中的研究进展[J/OL]. 食品工业科技: 1—9 [2021-01-20]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080047>.
XUE Jia-qi, WANG Ying, ZHOU Hui, et al. Research Progress of Packaging Technology in the Preservation of Meat Products[J/OL]. Food Industry Technology: 1—9[2021-01-13]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080047>.
- [2] 杨鸿博, 杨啸吟, 张一敏, 等. 包装方式对牛排贮藏期间微生物数量和演替的影响[J/OL]. 食品科学: 1—14[2021-01-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200831.1335.032.html>.
- [3] YANG Hong-bo, YANG Xiao-yin, ZHANG Yi-min, et al. The Effect of Packaging Methods on the Number and Succession of Microorganisms during Steak Storage[J/OL]. Food Science: 1—14[2021-01-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200831.1335.032.html>.
- [4] 骆双灵, 张萍, 高德. 肉类食品保鲜包装材料与技术的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(4): 220—228.
LUO Shuang-ling, ZHANG Ping, GAO De. Research Progress on Packaging Materials and Technologies for Meat Food Preservation[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(4): 220—228.
- [5] TRNGREN M A, MIANNE D, GUNVIG A, et al. Case Studies of Packaging and Processing Solutions to Improve Meat Quality and Safety[J]. Meat Science, 2018, 144: 149—158.
- [6] 董兰坤, 李宗力, 高菲, 等. 不同包装对低温肉制品的保藏研究[J]. 肉类工业, 2018(6): 48—51.
DONG Lan-kun, LI Zong-li, GAO Fei, et al. Research on the Preservation of Low-Temperature Meat Products in Different Packaging[J]. Meat Industry, 2018(6): 48—51.
- [7] 李其轩, 陈倩, 王浩, 等. 不同包装方式对高水分含量肉粉肠微生物菌群及品质特性的影响[J/OL]. 食品科学: 1—14[2021-01-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200601.1306.030.html>.
LI Qi-xuan, CHEN Qian, WANG Hao, et al. The Effects of Different Packaging Methods on the Intestinal Microflora and Quality Characteristics of High-Moisture-Content Meat Meal[J/OL]. Food Science: 1—14[2021-01-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200601.1306.030.html>.
- [8] 陈阳楼, 朱婵婵. 气调与真空包装方式对肉制品品质的影响[J]. 肉类工业, 2012(9): 31—34.
CHEN Yang-lou, ZHU Chan-chan. The Influence of Modified Atmosphere and Vacuum Packaging on the Quality of Meat Products[J]. Meat Industry, 2012(9): 31—34.
- [9] 梁栋, 陈芳, 胡小松. 芽孢萌发研究进展[J]. 中国食

- 品学报, 2018, 18(6): 221—228.
- LIANG Dong, CHEN Fang, HU Xiao-song. Research Progress on Spore Germination[J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(6): 221—228.
- [10] 程琴, 黄庶识, 陈丽梅. 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(9): 878—885.
- CHENG Qin, HUANG Shu-zhi, CHEN Li-mei. Research Progress on the Germination Mechanism of Bacillus Spores[J]. Life Science, 2010, 22(9): 878—885.
- [11] 任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 产气荚膜梭菌在食品中的危害及其控制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 352—359.
- REN Hong-rong, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, et al. The Harm of Clostridium Perfringens in Food and its Control Research Progress[J]. Food Science, 2021, 42(7): 352—359.
- [12] 杜翠荣, 李金禄. 次磷酸钠对肉制品中肉毒梭状芽孢杆菌(生孢梭菌)的抑制效果研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(1): 142—148.
- DU Cui-rong, LI Jin-lu. Study on the Inhibitory Effect of Sodium Hypophosphite on Clostridium Botulinum (Clostridium Spores) in Meat Products[J]. China Food Additives, 2019, 30(1): 142—148.
- [13] 任宏荣, 李苗云, 朱瑶迪, 等. 不同菌体肽聚糖对产气荚膜梭菌芽孢萌发的诱导作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 178—184.
- REN Hong-rong, LI Miao-yun, ZHU Yao-di, et al. Induction of Different Bacterial Peptidoglycans on Spore Germination of Clostridium Perfringens[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 178—184.
- [14] 朱瑶迪, 张佳烨, 李苗云, 等. 肽聚糖对肉制品中产气荚膜梭菌芽孢萌发率影响及预测[J]. 农业工程学报, 2020, 36(4): 287—293.
- ZHU Yao-di, ZHANG Jia-ye, LI Miao-yun, et al. Effect and Prediction of Peptidoglycan on Spore Germination Rate of Clostridium Perfringens in Meat Products[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(4): 287—293.
- [15] 马含笑. 真空包装熟肉制品中兼性厌氧污染微生物防腐技术的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2011: 34—37.
- MA Han-xiao. Research on Biological Anticorrosion Technology of Facultative Anaerobic Contaminated Microorganisms in Vacuum Packaged Cooked Meat Products[D]. Shihezi: Shihezi University, 2011: 34—37.
- [16] 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.
- [17] MCKENNEY P T, DRIKS A, EICHENBERGER P. The Bacillus Subtilis Endospore: Assembly and Functions of the Multilayered Coat[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(1): 33—44.
- [18] GERHARDT P, BLACK S H. Permeability of Bacterial Spores II: Molecular Variables Affecting Solute Permeation[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 82(5): 750—760.
- [19] HENRIQUES A O, MORAN C P. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61(1): 555—588.
- [20] RODE L J, LEWIS C W, FOSTER A J W. Electron Microscopy of Spores of Bacillus Megaterium with Special Reference to The Effects of Fixation and Thin Sectioning[J]. The Journal of Cell Biology, 1962, 13(3): 423—435.
- [21] POPHAM D L. Specialized Peptidoglycan of the Bacterial Endospore: the Inner Wall of the Lockbox[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2002, 59(3): 426—433.
- [22] 饶雷. 高压二氧化碳结合温度对枯草芽孢杆菌芽孢的杀灭效果与机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2017: 14—24.
- RAO Lei. The Killing Effect and Mechanism of High-Pressure Carbon Dioxide Combined with Temperature on Bacillus Subtilis Spores[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017: 14—24.
- [23] 张良. 高静压与温度协同杀灭芽孢的效果与机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015: 14—17.
- ZHANG Liang. Study on the Effect and Mechanism of Synergistic Killing of Spores by High Static Pressure and Temperature[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015: 14—17.
- [24] COWAN A E, KOPPEL D E, SETLOW B, et al. A Soluble Protein is Immobile in Dormant Spores of Bacillus Subtilis but is Mobile in Germinated Spores: Implications for Spore Dormancy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 4209—4214.
- [25] 黄曦, 黄荣韶, 赖钧灼, 等. 拉曼光谱测定单个细菌芽孢吡啶二羧酸浓度及机理研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(8): 2151—2156.
- HUANG Xi, HUANG Rong-shao, LAI Jun-zhuo, et al. Raman Spectroscopy to Determine the Concentration of Dipicolinic Acid in a Single Bacterial Spore and its Mechanism[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(8): 2151—2156.
- [26] 黄荣韶, 黄曦, 许兰兰, 等. 不同物态及单个杆菌芽孢中的 2,6-吡啶二羧酸的拉曼光谱特征与结构分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(3): 681—686.
- HUANG Rong-shao, HUANG Xi, XU Lan-lan, et al. Raman Spectroscopic Characteristics and Structure Analysis of 2,6-Dipicolinic Acid in Different Physical States and Single Bacillus Spores[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(3): 681—686.
- [27] NAGLER K, SETLOW P, REINEKE K, et al. Involvement of Coat Proteins in Bacillus Subtilis Spore Germination in High-Salinity Environments[J]. Ap-

- plied and Environmental Microbiology, 2015, 81(19): 6725—6735.
- [28] PEREZ-VALDESPINO A, LI Y, SETLOW B, et al. Function of the SpoVAEa and SpoVAF Proteins of *Bacillus Subtilis* Spores[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(11): 2077—2088.
- [29] 马慧娇. 枯草杆菌芽孢皮层裂解酶 CwlJ 基因的克隆表达、纯化及其水解肽聚糖产物分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2019: 29—45.
- MA Hui-jiao. Cloning, Expression, Purification and Analysis of Hydrolyzed Peptidoglycan Product of *Bacillus Subtilis* Spore Cortical Lyase Cwlj Gene[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2019: 29—45.
- [30] MICHAEL, LAUE, HONG-MEI, et al. Intracellular Membranes of Bacterial Endospores are Reservoirs for Spore Core Membrane Expansion During Spore Germination[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 11388.
- [31] SEGEV E, SMITH Y, BEN-YEHUDA S. RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores[J]. *Cell*, 2011, 148(1/2): 139—149.
- [32] BERGMAN N H, ANDERSON E C, SWENSON E E, et al. Transcriptional Profiling of the *Bacillus Anthracis* Life Cycle In Vitro and an Implied Model for Regulation of Spore Formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(17): 6092.
- [33] BETTEGOWDA C, HUANG X, LIN J, et al. The Genome and Transcriptomes of the Anti-Tumor agent *Clostridium Novyi-NT*[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(12): 1573—1580.
- [34] KEIJSER B J F, TER BEEK A, RAUWERDA H, et al. Analysis of Temporal Gene Expression during *Bacillus Subtilis* Spore Germination and Outgrowth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(9): 3624—3634.
- [35] LEGGETT M J, MCDONNELL G, DENYER S P, et al. Bacterial Spore Structures and Their Protective Role in Biocide Resistance[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(3): 485—498.
- [36] CHRISTIE G, SETLOW P. *Bacillus* Spore Germination: Knowns, Unknowns and What We Need to Learn[J]. *Cellular Signalling*, 2020, 74: 109729.
- [37] 贾珊珊, 李沛军, 陈从贵. 肉类食品中产气荚膜梭菌及其控制研究进展[J]. *肉类研究*, 2016, 30(6): 45—51.
- JIA Shan-shan, LI Pei-jun, CHEN Cong-gui. Research progress of *Clostridium Perfringens* and Its Control in Meat Products[J]. *Meat Research*, 2016, 30(6): 45—51.
- [38] 王一晓, 张海红, 章中. 理化因素诱导芽孢萌发研究进展[J]. *农业科学研究*, 2016, 37(1): 58—64.
- WANG Yi-xiao, ZHANG Hai-hong, ZHANG Zhong. Research Progress on Spore Germination Induced by Physical and Chemical Factors[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 37(1): 58—64.
- [39] BRYNESTAD S, GRANUM P E. *Clostridium Perfringens* and Foodborne Infections[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 74(3): 195—202.
- [40] CICHON A, WIECZOREK K, OSEK J. Role of *Clostridium Perfringens* Strains in Human Foodborne Infections[J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 2012, 68(8): 456—460.
- [41] 刘仁杰, 梁珊, 李哲, 等. 杀灭芽孢杆菌的方法及机理的研究综述[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 257—261.
- LIU Ren-jie, LIANG Shan, LI Zhe, et al. A Review of the Methods and Mechanisms of Killing *Bacillus*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(13): 257—261.
- [42] 白妍, 葛雨璐, 向迎春, 等. 非热杀菌技术杀灭食品中芽孢效能及机理研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 314—322.
- BAI Yan, GE Yu-jun, XIANG Ying-chun, et al. Research Progress on the Efficacy and Mechanism of Non-Thermal Sterilization Technology in Killing Spores in Food[J]. *Food Science*, 2019, 40(15): 314—322.
- [43] MELLY E, COWAN A E, SETLOW P. Studies on the Mechanism of Killing of *Bacillus Subtilis* Spores by Hydrogen Peroxide[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 93(2): 316—325.
- [44] SETLOW B, LOSHON C A, GENEST P C, et al. Mechanisms of Killing Spores of *Bacillus Subtilis* by Acid, Alkali and Ethanol[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(2): 362—375.
- [45] SETLOW B, PARISH S, ZHANG P, et al. Mechanism of Killing of Spores of *Bacillus Anthracis* in a High-Temperature Gas Environment, and Analysis of DNA Damage Generated by Various Decontamination Treatments of Spores of *Bacillus Anthracis*, *Bacillus Subtilis* and *Bacillus Thuringiensis*. [J]. *Journal of applied microbiology*, 2014, 116(4): 805—814.
- [46] SETLOW P. Spore Germination[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(6): 550—556.
- [47] PAIDHUNGAT M, SETLOW P. Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus Subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(9): 2513—2519.
- [48] MCKENNEY P T, EICHENBERGER P. Dynamics of Spore Coat Morphogenesis in *Bacillus Subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(2): 245—260.
- [49] 王一晓. 热和化学物质最佳诱导枯草杆菌芽孢萌发条件的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2016: 9—12.
- WANG Yi-xiao. Study on the Best Conditions for Inducing Germination of *Bacillus Subtilis* Spores by Heat and Chemical Substances[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2016: 9—12.
- [50] 何树祥. 运用光学新技术探究理化因子对苏云金芽孢杆菌芽孢萌发的影响[D]. 桂林: 广西师范大学, 2017: 9—11.
- HE Shu-xiang. Using New Optical Technology to Ex-

- plore the Effects of Physical and Chemical Factors on the Germination of *Bacillus Thuringiensis* Spores[D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2017: 9—11.
- [51] 郭洪伟. 超高压、pH 值对芽孢皮层裂解酶的活力及二、三级结构影响的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2019: 9—10.
- GUO Hong-wei. Study on the Effect of Ultrahigh Pressure and pH on the Activity and Secondary and Tertiary Structure of Spore Cortex Lyase[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2019: 9—10.
- [52] 章中, 孙静, 杜文斌, 等. 超高压结合化学萌发诱导剂对枯草杆菌芽孢的灭活作用[J]. 食品科技, 2016, 41(4): 319—323.
- ZHANG Zhong, SUN Jing, DU Wen-bin, et al. Inactivation of *Bacillus Subtilis* Spores by Ultrahigh Pressure Combined with Chemical Germination Inducer[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(4): 319—323.
- [53] 张津瑜. 超高压结合理化因素对芽孢皮层肽聚糖作用的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2018: 15—16.
- ZHANG Jin-yu. Study on the Effect of Ultra-High Pressure Combined with Physical and Chemical Factors on Peptidoglycan in Spore Cortex[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2018: 15—16.
- [54] 陶瑞, 史智佳, 贡慧, 等. 超声协同诱导剂对枯草芽孢杆菌芽孢致死的作用[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 95—100.
- TAO Rui, SHI Zhi-jia, GONG Hui, et al. The Lethal Effect of Ultrasonic Synergistic Inducer on *Bacillus Subtilis* Spores[J]. Food Science, 2018, 39(11): 95—100.
- [55] CHRISTOPHER J, DOONA E A. Fighting Ebola with Novel Spore Decontamination Technologies for the Military[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 663.
- [56] COLEMAN W H, CHEN D, LI Y Q, et al. How Moist Heat Kills Spores of *Bacillus Subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(23): 8458.
- [57] SETLOW P. Summer Meeting 2013-When the Sleepers Wake: the Germination of Spores of *Bacillus Species*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(6): 1251—1268.
- [58] REINEKE K, MATHYS A, HEINZ V, et al. Mechanisms of Endospore Inactivation Under High Pressure[J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(6): 296—304.