

高压CO₂对枯草芽孢杆菌 杀菌模型及其优化

高媛¹, 周先汉², 曾庆梅³, 吴克平², 邹旭鹏²

(1. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021;

2. 合肥工业大学分析测试中心, 安徽合肥 230009;

3. 合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽合肥 230009)

摘要:以枯草芽孢杆菌为主要研究对象, 杀灭对数值为衡量高压CO₂杀菌效果的指标。在单因素实验基础上, 选取压力、温度和保压时间为自变量, 杀灭对数值为响应值。通过响应面方法中的Box-Behnken模式, 研究各自变量及其交互作用对杀灭对数值的影响, 模拟得到二次多项式回归方程的预测模型。确定最佳条件为压力30MPa, 温度48℃, 时间90min, 实际测得的枯草芽孢杆菌杀灭对数值为5.22, 与模型预测值5.44相比, 实验平均相对误差为2.32%; 采用响应曲面优化法建立的回归模型准确可行, 优化得到的工艺参数可以应用。

关键词:枯草芽孢杆菌, 高压CO₂, 响应曲面法

Optimum process of *Bacillus subtilis* of high pressure inactivation in food by response surface methodology

GAO Yuan¹, ZHOU Xian-han², ZENG Qing-mei³, WU Ke-ping², ZOU Xu-peng²

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

2. Center for Analysis and Measurement, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

3. Engineering Research Center of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* was as the research object, with the killing log value as a measure indicator. Three inactivation parameters including pressure, temperature and pressure holding time were optimized using response surface methodology (RSM). Box-Behnken design was applied to evaluate the effects of three independent variables on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores. The simulated quadratic polynomial regression equation of prediction model was set up. The optimum process parameters for inactivation of *Bacillus subtilis* were obtained as follows: pressure 30Mpa, temperature 48℃, pressure holding time 90min. Under the condition of killing log value was 5.22, compared to the theoretical value, the relative error of 2.32%. The adequacy of the model equation for predicting the optimum response values was verified effectively by the validation data.

Key words: *Bacillus subtilis* spores; high pressure CO₂; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)14-0077-05

高压CO₂杀菌技术(High Pressure Carbon Dioxide, 简称HPCD)作为一种新兴的“冷杀菌”(又称非热杀菌)技术受到广泛关注^[1]。高压CO₂杀菌技术在有效的杀灭微生物保证食品贮藏安全的同时, 又能满足广大消费者对于食品新鲜、健康、安全的要求。和具有“冷杀菌”美誉的超高压灭菌(400~1000MPa)技术相比, 高压CO₂杀菌技术操作压力相对较低, 一般只需3~70MPa, 同时随着高压CO₂的设备改进、成本降低及杀菌机理的明确, 其在食品加工领域的发展前景更

加广阔^[2-5]。高压CO₂杀菌技术已经在液体食品中取得了良好的杀灭微生物的作用。在压力低于50MPa, 温度5~60℃之间进行的高压CO₂处理可以实现对微生物2~12个对数级的杀灭效果^[6], 至少有12种革兰氏阳性菌, 10种革兰氏阴性菌, 8种细菌芽孢以及8种真菌菌丝体或孢子被用来进行高压CO₂处理杀菌的实验研究^[7-9], 在适当的温度和压力下, 单纯高压CO₂处理能够显著地杀灭细菌的营养体。然而在室温下, 高压CO₂处理对于细菌芽孢的杀灭效果不够理想^[10-13]。由于芽孢的高耐热性和其他抗性, 因此, 是否能够杀灭一些代表菌的芽孢就成了衡量各种消毒手段的最重要的指标。芽孢杀灭的指示菌——枯草芽孢杆菌具有芽孢结构, 孢子较为耐热耐压, 用高压CO₂对其孢子较为难杀灭。当芽孢一旦萌发生长为营养体后, 则其抗热抗压能力下降, 与非芽孢菌的菌体类似, 较易

收稿日期: 2013-01-15

作者简介: 高媛(1986-), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 食品现代加工理论、方法及工程化技术。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871739, 30571304); 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2007A099)。

杀灭^[14-15]。本文以枯草芽孢杆菌为研究对象,通过高压CO₂处理实验,考察其不同压力和温度组合条件下的致死作用,结合响应曲面法的Box-Behnken模式,建立枯草芽孢杆菌高压CO₂杀菌模型,优化杀菌工艺参数,为高效杀灭芽孢菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 编号:20622,购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC);高压气体 实验选用高压CO₂气体作为实验选用的杀菌介质,气体纯度为99%,CO₂气瓶压力为5~6MPa,由合肥恒隆电气技术有限公司提供;固体培养基 普通营养琼脂(蛋白胨10g,牛肉膏3g,氯化钠5g,琼脂15g,蒸馏水1000mL),调pH7.0~7.2,121℃高压灭菌15min;促芽孢生长培养基^[16] 在上述固体培养基中加入MnCl₂(培养基中Mn²⁺的浓度为50mg/L),调pH后混匀,灭菌备用;液体培养基 营养肉汤(蛋白胨10g,牛肉膏3g,氯化钠5g,蒸馏水1000mL),加入3%硫酸锰溶液,混匀,121℃高压灭菌15min。

HA121-50-01-C高压CO₂杀菌装置 如图1所示,最高压力50MPa,单缸容积1L,江苏南通华安超临界萃取有限公司生产;TDL-50B台式离心机 上海安亭科学仪器厂;PHS-25B型数字酸度计 上海大普仪器有限公司;721分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;净化工作台 苏州净化设备有限公司;生化培养箱 上海跃进医疗器械厂;微生物实验常规仪器。

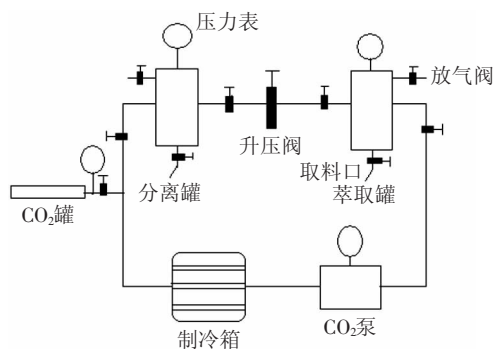


图1 高压CO₂杀菌设备工艺流程图

Fig.1 Schematic diagram of high pressure CO₂ sterilization

1.2 实验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌萌发处理 为保证枯草芽孢杆菌芽孢一定的形成率,在100mL液体培养基中接入枯草芽孢杆菌,(30±1)℃、150r/min培养18h,用接种环挑取第1代的菌悬液,30℃下于固体培养基平板上划线培养18h,染色后显微镜检(芽孢专用染色法),要求芽孢形成率在90%~95%以上。4000r/min离心30min,弃上清液,加无菌蒸馏水冲洗离心,重复2~3次;将洗净的芽孢悬浮于灭过菌的磷酸钾缓冲液(PBS,0.2mol/L,pH7.2)中,调细胞浓度为10⁸~10⁹CFU/mL^[17]。热力和压力协同能够有效地促进芽孢的萌发,结合实验结果并考虑到具体的应用,选择协同温度60℃,压力10MPa,对芽孢悬液进行40min的高

压CO₂处理,促使芽孢萌发,随后验证高压CO₂改变杀菌参数时的杀菌效果。

1.2.2 样品的高压CO₂处理 实验前,于无菌操作台上,将制好的枯草芽孢杆菌孢子悬液接种于pH为7.2的磷酸盐缓冲液中,并调整含菌量为10⁷CFU/mL。将菌悬液加入釜内,通入CO₂先赶走釜内残存的空气,然后向高压釜内通入CO₂至所需压力(升压时间控制在30s左右),按照实验要求保压一定时间后,从放料口出料。

1.2.3 微生物数量的测定 采用平板计数法(GB 4789-2003)进行菌落计数,以无菌生理盐水适当稀释处理后和未处理(对照组)的芽孢菌悬液,于营养琼脂平板上37℃培养48h后,计菌落数。重复3次,计平均数。

$$\text{致死率(杀灭对数值)} = -\log N/N_0$$

式中: N —经过高压CO₂处理后,芽孢在普通营养琼脂培养基上培养可见的菌落总数,CFU/mL; N_0 —未经过高压CO₂处理前的菌落总数,CFU/mL。

1.2.4 高压CO₂致死枯草芽孢杆菌的响应曲面法分析 采用Box-Behnken模式,以萌发后的枯草芽孢杆菌为实验对象,以压力、温度和保压时间为自变量(independent variable),实验优化,建立高压CO₂杀灭枯草芽孢杆菌杀菌效果模型。

结合现有实验条件及相关研究报道^[17],确定压力、温度和保压时间三个因子的取值范围分别为10~30(步长10)MPa、10~50(步长20)℃和30~90(步长30)min。根据 $x_i(X_i-X_{i0})/\Delta X_i$ 对自变量进行编码(x_i 为自变量的编码值; X_i 为自变量的真实值,其中 $i=1,2,3$; X_{i0} 为实验中心点处自变量的真实值; ΔX_i 为自变量变化步长)。实验自变量因素编码及水平见表1。高压CO₂对枯草芽孢杆菌的杀灭对数值 Y (致死率)为响应值($Y=-\lg N/N_0$,其中 N 为高压CO₂处理后1mL菌液中活菌数, N_0 为未处理的对照组1mL菌液中的活菌数)。采用Design Expert 7.1.0软件进行实验设计和数据分析。

表1 实验自变量因素编码及水平

Table 1 Codes and levels of factors chosen for the trials

自变量因素	代码		水平		
	编码值	真实值	-1	0	1
压力(MPa)	x_1	X_1	10	20	30
温度(℃)	x_2	X_2	10	30	50
时间(min)	x_3	X_3	30	60	90

2 结果与讨论

2.1 高压CO₂致死枯草芽孢杆菌回归模型的建立

采用统计软件Design-Expert 7.0进行实验设计,并优化出17组实验,实验结果见表2。为了确保实验结果的科学性,随机挑选表2中的组别进行实验,不刻意按照其实验号顺序进行实验。通过回归分析得到多元二次回归模型:

$$Y = 3.49 + 0.88x_1 + 1.44x_2 + 0.27x_3 + 0.22x_1x_2 - 0.14x_1x_3 + 0.043x_2x_3 - 0.16x_1^2 - 0.96x_2^2 + 0.19x_3^2 \quad \text{式(1)}$$

对模型进行方差分析,结果见表3。由表中可以看出:模型 $F_{\text{模型}} = 127.87 > F_{0.01}(9, 4) = 14.66$,模型 $p < 0.0001$,

表2 实验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design arrangement and responses

实验号	X_1	X_2	X_3	Y 响应值	
				实验值	预测值
1	+1	-1	0	1.58	1.60
2	0	0	0	3.42	3.49
3	-1	-1	0	0.39	0.28
4	0	-1	-1	0.98	0.93
5	0	0	0	3.56	3.49
6	0	0	0	3.67	3.49
7	+1	0	-1	4.12	4.15
8	+1	0	+1	4.84	4.68
9	0	-1	+1	1.52	1.65
10	-1	0	-1	1.95	2.11
11	0	+1	+1	4.57	4.62
12	-1	0	+1	3.22	3.19
13	0	0	0	3.38	3.49
14	0	+1	-1	3.86	3.72
15	+1	+1	0	4.82	4.93
16	0	0	0	3.44	3.49
17	-1	+1	0	2.74	2.71

表3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
模型	28.51	9	3.170	127.87	<0.0001
失拟项	0.12	3	0.039	2.74	0.1772
误差	0.057	4	0.014		
和	28.69	16			

$$R^2=0.9940 \quad R^2_{Adj}=0.9862$$

表明模型极显著, $F_{失拟}=2.74 < F_{0.05}(9, 3)=8.81$, 失拟项 $p=0.1772 > 0.05$, 模型失拟度不显著。模型的调整确定系数 $R^2_{Adj}=0.9862$, 说明该模型能够解释98.62%响应值的变化, 因而模型拟合程度良好, 实验误差小, 可以用此模型对高压CO₂杀灭枯草芽孢杆菌进行分析和预测。

回归方程系数显著性检验结果见表4。由表4可知, 模型中检验项p值小于0.0500, 则该项显著, 否则该项不显著。模型中一次项压力 X_1 、温度 X_2 、时间 X_3 、二次项 X_2^2 达到极显著水平 ($p < 0.0001$), X_3^2 、 X_1X_2 达到显著水平 ($p < 0.05$); X_1^2 ($p=0.0819$)、交互项 X_1X_3 ($p=0.1241$)、 X_2X_3 ($p=0.6059$) 不显著。

其中自变量 X_2X_3 影响不显著 ($p > 0.25$), 进行回归方程的优化, 剔除不显著的影响因素 X_2X_3 , 重新进行回归分析, 剔除后的方差分析见表5。

方差分析表明, 各因素对致死率的影响大小顺序为: $X_2 > X_1 > X_3$; 剔除不显著系数后, 除交互项 X_1X_2 ($p=0.1241$) 以及二次项 X_2^2 ($p=0.1772$) 不显著, 各因素回归系数达到显著水平, 新的回归方程为:

$$Y=3.15+0.82X_1+2.13X_2+0.55X_3+0.19X_1X_2-0.34X_1X_3-0.38X_1^2-0.86X_2^2+0.22X_3^2 \quad \text{式(2)}$$

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Test of significance for regression coefficients

模型参数	估计值	自由度	标准误差	95%置信区间		p值
				低端值	高端值	
截距	3.49	1	0.070	3.33	3.66	
X_1	0.88	1	0.056	0.75	1.01	<0.0001
X_2	1.44	1	0.056	1.31	1.57	<0.0001
X_3	0.27	1	0.056	0.27	0.54	<0.0001
X_1^2	-0.16	1	0.077	-0.34	0.026	0.0819
X_2^2	-0.96	1	0.077	-1.14	-0.77	<0.0001
X_3^2	0.19	1	0.077	0.013	0.38	0.0319
X_1X_2	0.22	1	0.079	0.036	0.41	0.0255
X_1X_3	-0.14	1	0.079	-0.32	0.049	0.1241
X_2X_3	0.043	1	0.079	-0.14	0.23	0.6059

表5 偏回归系数检验方差分析表

Table 5 Test of significance for regression coefficients

差异源	SS	自由度	MS	F	p值
回归	28.510	8	3.170	127.8700	<0.0001
X_1	6.230	1	6.230	251.4900	<0.0001
X_2	16.590	1	16.590	669.6000	0.0002
X_3	1.310	1	1.310	52.9700	0.0202
X_1X_2	0.200	1	0.200	0.0255	0.1241
X_1X_3	0.076	1	0.076	0.1241	0.0119
X_1^2	0.100	1	0.100	0.0891	0.0391
X_2^2	3.850	1	3.850	4.1200	0.1772
X_3^2	0.160	1	0.160	155.2500	0.0255
离回归	0.057	4	0.079	6.4100	0.0241
总差异	28.690	15			

2.2 压力与温度因素对枯草芽孢杆菌致死率的响应曲面

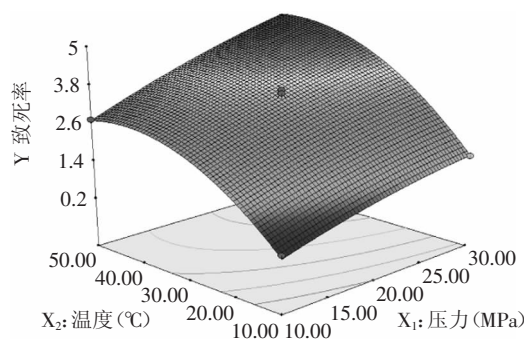
图2 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面Fig.2 Response surface of $Y=f(X_1, X_2)$

图2为 $X_3=0$ 水平(保压时间60min)时, 压力与温度两因素的响应曲面。在压力(X_1)为10~30MPa, 温度(X_2)10~50℃的响应曲面中可以看到: 在压力固定不变的情况下, 随着温度的增加, 枯草芽孢杆菌致死率有显著的提高。在温度固定不变的情况下, 随着压力的增加, 致死率有所增加, 但增加的幅度较小。

2.3 压力与时间因素对枯草芽孢杆菌致死率的响应曲面

图3为固定温度 $X_2=30^\circ\text{C}$ 条件下在不同压力和时间处理下枯草芽孢杆菌致死率变化情况。由回归方程系数显著性检验可知,压力($p<0.001$)和时间($p<0.001$)都是枯草芽孢杆菌致死的显著影响因素,两者交互作用不显著。从压力和时间因素的响应曲面图中可以看出,在时间固定不变的情况下,随着压力的增加,致死率增加;在压力固定不变时,延长保压时间可以缓慢增加枯草芽孢杆菌的致死率。

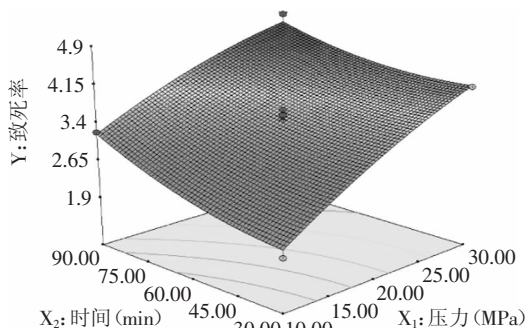


图3 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应曲面
Fig.3 Response surface of $Y=f(X_1, X_3)$

2.4 温度与时间因素对枯草芽孢杆菌致死率的响应曲面

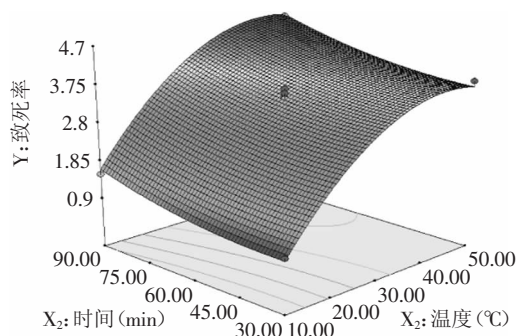


图4 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应曲面
Fig.4 Response surface of $Y=f(X_2, X_3)$

图4为 $X_1=0$ 水平时,即固定压力为20MPa的条件下,温度与时间对枯草芽孢杆菌致死率的影响。在温度(X_2)为10~50(步长为10) $^\circ\text{C}$,保压时间(X_3)为30~90(步长为15)min变化的响应曲面图中可以看到:在压力处于20MPa水平下,时间固定不变的情况下,随着温度的增加,致死率不断提高;而当温度固定不变时,随着温度的增加致死率提高的很缓慢。温度与时间因素处于最高水平时能够达到4.7个对数值的杀菌率。要想提高杀灭效果,必须提高温度。

2.5 高压 CO_2 杀菌最佳条件的优化

考虑到高压 CO_2 在食品工业中的实际应用,由式(2)回归方程预测杀灭枯草芽孢杆菌的最佳条件。采用统计软件Design Expert软件模拟寻优预测出10组杀菌效果好的工艺参数进行验证,表中所列各参数值为控制目标值,波动范围分别为压力 $\pm 2\text{MPa}$,温度 $\pm 1^\circ\text{C}$,时间 $\pm 1\text{min}$ 。结果见表6。

由表6可以看出,回归模型预测优化出的10组杀

表6 回归模型优化的10组杀菌工艺参数及结果验证
Table 6 Verified results of sterilized process parameters of optimum ten groups from regression equation

实验号	X_1	X_2	X_3	Y 响应值		相对误差 (%)
				预测值	实验值	
1	30	48	90	5.44	5.22	4.04
2	30	37	90	5.17	5.06	2.13
3	30	47	36	4.82	4.60	4.56
4	30	38	90	5.24	5.34	1.91
5	22	46	89	4.89	4.66	4.70
6	29	47	90	5.41	5.21	3.70
7	30	47	75	5.15	5.24	1.75
8	28	50	90	5.35	5.38	0.56
9	30	50	69	5.04	5.17	2.58
10	30	50	89	5.42	5.38	0.74

灭效果较好的工艺参数其杀灭效果预测值最高能够达到5.44个数量级,最低4.82个数量级。工艺参数的取值范围是:压力 X_1 为22.55~30.00MPa,温度 X_2 为37.17~50 $^\circ\text{C}$,时间 X_3 为36.42~90min。考虑到最大限度的保留食品的营养和风味,节约能源,将高压 CO_2 杀灭枯草芽孢杆菌的杀菌优化工艺参数确定为:压力30MPa,温度48 $^\circ\text{C}$,时间90min。验证实验测得的枯草芽孢杆菌杀灭对数值为5.22,与模型预测值相差4.04%。实验平均相对误差为2.32%;因此,采用响应曲面优化法建立的回归模型准确可行,优化得到的工艺参数可以应用。

3 结论

以枯草芽孢杆菌为主要研究对象,采用响应曲面法中的Box-Behnken设计,进行了对已部分萌发枯草芽孢杆菌的高压 CO_2 杀灭效果优化实验,结果表明,各因素对杀灭效果的影响大小顺序为温度(X_2)>压力(X_1)>时间(X_3)。对杀菌对数值的响应变化进行建模分析,建立了杀菌效果模型,在实验条件范围内建立的回归模型准确有效,可以用于预测实验条件范围内的杀灭对数值,可为杀菌工艺参数的选择提供参考。通过对所建立的回归模型优化得出的10组实验条件进行验证,在压力30MPa,温度48 $^\circ\text{C}$,时间90min的条件下进行高压 CO_2 处理,达到5.22个杀灭对数值的效果,与模型预测值相差4.04%。

参考文献

- [1] 曾庆梅,周先汉,杨毅,等. 高密度 CO_2 杀菌机制与协同措施研究现状[J]. 食品科学,2010,31(1):251-257.
- [2] D Fraser. Bursting bacteria by release of gas pressure[J]. Nature, 1951, 167: 33-40.
- [3] Angela D, Fariba D, Jeffrey H *et al.* Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10344-10348.
- [4] Debs Louka E, Louka Q, Abraham G, Chabot V, *et al.* Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell[J]. Environ Microbial, 1999, 65(2): 626-631.

(下转第90页)

- 5009.5-2010. 蛋白质含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.37-2003. 动植物油脂酸价、过氧化值含量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.3-2010. 测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 食品中水分的测定[S]. 2010.
- [10] Barat J M, Gallart-Jornrt L, Andres A, *et al.* Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 73(1): 9-19.
- [11] Debevere J, Boskou G. Effect of modified atmosphere packaging on the TVB-N/TMA-producing micro-flora of cod fillets[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 31(3): 221-229.
- [12] Ruiz-Capillas C, Moral A. Sensory and biochemical aspects of quality of whole big eye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres[J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 347-354.
- [13] 王永丽. 风干高温成熟对风鸭蛋白质、脂肪分解氧化及风味的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.

(上接第80页)

- [5] Erkmen O. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide[J]. Food Microbiology, 2000(17): 225-232.
- [6] Damar S, Balaban M O. Review of Dense Phase CO₂ Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality[J]. Food Science, 2006(71): 1-11.
- [7] Zhang J, Davis T A, Matthews M A, *et al.* Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2006(38): 354-372.
- [8] Karaman H, Erkmen O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* broth[J]. Food Microbiology, 2001(18): 11-16.
- [9] Myers R H. Response surface methodology[M]. Ann Arbor: Edwards Brothers, 1976.
- [10] Montgomery D C. Design and analysis of experiments 2nd ed [M]. New York: John Wiley, 1991(5): 119-121.
- [11] Guangfen Mu, Feng Luan, Huitao Liu, *et al.* Use of Experimental Design and Artificial Neural Network in Optimization of Capillary Electrophoresis for the Determination

(上接第84页)

- [19] Marcazzan M, Vianello F, Scarpa M, *et al.* An ESR assay for α -amylase activity toward succinylated starch, amylose and amylopectin[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 1999, 38: 191-202.
- [20] Zhang Y, Jin Rg, Liu M H. Growth of CaCO₃ in the templated Langmuir-Blodgett film of a bolaamphiphilic diacid[J]. New Journal of Chemistry, 2004, 28: 614-617.
- [21] Nagaoka S, Tobata H, Satoh T. Characterization of cellulose microbeads prepared by a viscose phase-separation method and their chemical modification with acid anhydride[J]. Journal of

- [14] Fidel Toldrà. Proteolysis and lipolysis in flavor development of dry-cured meat products[J]. Meat Science, 1998, 49: 101-110.
- [15] Elías Rico F T J F. Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin B, H and L activity[J]. European Food Research And Technology, 1991, 193(6): 541-544.
- [16] 郝淑贤, 李来好, 杨贤庆, 等. 五种罗非鱼营养成分分析及评价[J]. 营养学报, 2007, 29(6): 612-618.
- [17] Motilva M J, F Toldrà J. Assay of lipase and esterase activities in fresh pork meat and dry-cured ham[J]. Lebensmittel Untersuchung und-Forschung, 1992, 195: 446-450.
- [18] Salih A M, Smith D M, Price J F, *et al.* Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry[J]. Poultry Science, 1987, 66: 1483-1488.
- [19] C Coutron-Gambotti, G Gandemer. Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing [J]. Food Chemistry, 1999, 64: 95-101.
- [20] TURHAN S, USTUN S N, ALTUNKAYNAK T B. Effect of cooking methods on total and heme iron contents of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88(2): 169-172.

- of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Food Compared with High-Performance Liquid Chromatography[J]. Food Analytical Methods, 2012(5): 111-121.
- [12] Annadurai G, Sheeja R Y. Use of Box-Behnken design of experiments for the adoption of verofix-red using Biopolymer [J]. Bioprocess Eng, 1998(18): 463-466.
- [13] Giovanni M. Response surface methodology and product optimization[J]. Food Technology, 1983, 37(11): 41-45.
- [14] Began G, Manohar B, Sankar KU, *et al.* Responsesurfaces for solubility of crude soylecithin lipid in supercritical carbon dioxide[J]. European Food Research and Technology, 2000, 210(3): 209-212.
- [15] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压灭活枯草芽孢杆菌 (AS1.140) 的参数优化[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 158-159.
- [16] 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孢的作用[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 90-95.
- [17] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[M]. 第3版. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1999, 10.

- Applied Polymer Science, 2005, 97: 149-157.
- [22] Bao J, Xing J, Phillips D L, *et al.* Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 2283-2287.
- [23] Zhu F, Cai Y Z, Sun M, *et al.* Effect of phytochemical extracts on the pasting, thermal, and gelling properties of wheat starch[J]. Food Chemistry, 2009, 112: 919-923.
- [24] Trubiano P C. Modified starches: Properties and uses [M]. Boca Raton: CRC Press, 1986.