

蜡样芽孢杆菌在草莓中的生长及预测模型的建立

魏超, 代晓航, 郭灵安, 刘炜

(四川省农业科学院分析测试中心, 四川成都 610066)

摘要: 在对草莓的病源微生物污染调查中发现蜡样芽孢杆菌具有高的检出率。为比较不同温度和不同包装方式的草莓表面蜡样芽孢杆菌数量的变化情况, 测定了 7℃、15℃、25℃、30℃ 的温度条件下, 采用保鲜盒包装和保鲜膜包装方式的草莓表面蜡样芽孢杆菌生长数据; 选用 Baranyi Roberts 模型为初级模型, 拟合不同温度和不同包装方式的草莓中蜡样芽孢杆菌生长曲线, 并对模型进行验证。结果显示, 7℃ 冷藏的蜡样芽孢杆菌均增长缓慢而与包装方式无关; 15℃ 低温贮藏过程中, 膜装与盒装延滞期基本相同, 但膜装比盒装降低了 0.7 lg cfu/g 的生长势, 说明保鲜膜在此温度下有一定的抑菌作用; 在 25℃、30℃ 储藏下两种包装方式的比生长速率和延滞期基本相同, 蜡样芽孢杆菌在 42 h 后分别增长了 2.9 lg cfu/g、3.2 lg cfu/g, 表明贮藏温度是影响蜡样芽孢杆菌的主要因素。因此, 在高温条件下蜡样芽孢杆菌会带来潜在的食用安全风险。本研究结果为微生物定量风险评估提供重要信息。

关键词: 草莓; 蜡样芽孢杆菌; 基质解吸电离飞行时间质谱; 微生物生长预测模型; 模型验证

文章编号: 1673-9078(2019)09-291-296

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.038

Growth and Prediction Model of *Bacillus cereus* in Strawberry

WEI Chao, DAI Xiao-hang, GUO Ling-an, LIU Wei

(Analysis and Testing Center of Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: The investigation of the pathogenic microbial contamination of strawberry revealed that *Bacillus cereus* had a high detection rate. To study the changes in the number of *Bacillus cereus* on the surface of strawberry at different temperatures and packaged using different methods, the growth of *Bacillus cereus* on the surface of the strawberries packaged in a crisper or wrapped with plastic wrap was measured at 7℃, 15℃, 25℃ and 30℃. The Baranyi Roberts model was used as the primary model to fit the growth curve of the *Bacillus cereus* in strawberries at different temperatures and with different packaging methods, followed by model verification. The results showed that the growth of the *Bacillus cereus* refrigerated at 7℃ was slow and independent on the packaging method. During the low temperature storage at 15℃, the lag periods for both packaging methods were essentially the same, but the growth decreased by 0.7 lg cfu/g in the case of membrane package compared with the case of using crispers, suggesting that the plastic wrap might exert a certain degree of antibacterial effect at this temperature. During the storage at 25℃ and 30℃, the specific growth rate and lag period were essentially the same for the two packaging methods, with an increase of 2.9 and 3.2 lg cfu/g, respectively, in the growth of *Bacillus cereus* after 42 h, indicating that storage temperature was the main factor affecting *Bacillus cereus*. Therefore, *Bacillus cereus* will bring potential safety risk of strawberry consumption under high temperature conditions. The results of this study provide important information for quantitative microbial risk assessment.

Key words: strawberry; *Bacillus cereus*; MALDI-TOF-MS; microbial growth prediction model; model verification

草莓因其风味独特、质地柔软受到广大消费者的喜爱, 但其柔软质地和高含糖量也成为微生物繁殖生长的温床^[1,2]。对草莓等即食果蔬安全评价和管控措施多集中在农药残留等方面, 但有研究表明, 草莓表面的微生物也可成为其食用安全的隐患^[3]。蜡状芽孢杆菌是典型的菌体细胞, 分布广, 对热等致死因子有较强的抵抗力^[4], 在农业上部分菌株被作为生态调节剂进行开发和利用^[5]。但某些蜡样芽孢杆菌会产生呕

吐毒素和多种肠毒素而引起食物中毒, 公认食物中毒类型为呕吐型和腹泻型, 典型肠毒素为溶血致死肠毒素 BL(Hbl)、非溶血性肠毒素 (Nhe) 和细胞毒性肠毒素 (CytK) 等^[4,6,7], 由于此菌不分解蛋白质, 因此食品在感官上无明显变化, 易误食发生食物中毒^[8], 我国 1973-2013 年的食物中毒事件中, 由蜡样芽孢杆菌引起的中毒事件占有食物中毒的构成比 12.95% (位居第二)^[4]。蜡样芽孢杆菌在我国的产品标准中少有限量, 但在多数境外标准中有限量要求^[9], 见表 1 所示。

预测微生物学(predictive microbiology)是一门建立在微生物学、数学、统计学基础上的新兴学科, 微

收稿日期: 2019-02-20

基金项目: 农业部农产品质量安全监管项目(风险评估(GJFP2019013))

作者简介: 魏超(1985-), 女, 助理实验员, 研究方向: 农产品及相关领域微生物检测及相关风险评估

生物预测模型的建立为微生物定量风险评估(QMRA)和危害分析关键控制点(HACCP)提供了科学依据,是管理食品安全的重要工具^[10-13]。

表1 国内外即食食品中蜡样芽孢杆菌限量要求

Table 1 Limit requirements for <i>B. cereus</i> in ready-to-eat foods at home and abroad				
国家或地区	蜡样芽孢杆菌数量/(cfu/g)			
	满意	可接受	不满意	有潜在危害
英国	$<10^3$	$10^3 \sim 10^5$	$>10^5$	-
澳大利亚和新西兰	$<10^2$	$10^2 \sim 10^3$	$10^3 \sim 10^4$	$\geq 10^4$
韩国	$\leq 10^3$	-	-	-
中国香港	$<10^3$	$10^3 \sim 10^5$	$>10^5$	-
中国澳门	$<10^3$	$10^3 \sim 10^4$	$10^4 \sim 10^5$	$\geq 10^5$

本研究结合多年草莓中蜡样芽孢杆菌的检出数据及宏基因组方法对草莓表面微生物群落的调查,通过拟合草莓上市时温度和常见不同包装方式下蜡样芽孢杆菌在草莓中的生长情况,建立各温度下细菌预测模型,并进行模型可靠性验证,旨在推荐合理的草莓贮藏方式,为开展定量风险评估和保障草莓质量安全提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

草莓, 120 份样品购于成都大型超市及成都某生产基地, 每年度 40 份样品。蜡样芽孢杆菌(ATCC 11778)。

1.1.2 试剂

甘露醇卵黄多黏菌素琼脂(MYP)、缓冲蛋白胨水(BPW)、营养琼脂, 购于广东环凯生物科技有限公司; 0.75% NaCl, 法国梅里埃公司; 乙腈(色谱纯)、乙醇(色谱), Fisher Scientific公司; 甲酸(色谱纯), TEDIA公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)(suitable for MALDI-TOF-MS), SIGMA公司。实验用水均为 ddH₂O。

1.1.3 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS), 日本岛津公司; GXZ 智能光照培养箱, 宁波江南仪器厂; HF-safe-1200 生物安全柜, 上海立申仪器设备有限公司; YM75Z 高压灭菌锅, 上海三申仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 草莓中蜡样芽孢杆菌的计数

草莓蜡样芽孢杆菌污染调查草莓的计数方法参照 4789.14 食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验法一。确定性验证采用基质辅助解析电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)方法。

质谱前处理: 取菌适量加入 70%乙醇水溶液 0.75 mL, 震荡 30 s, 常温 40 kHz 超声 10 min, 离心 1 min 弃上清, 加入 75%乙酸水溶液 0.75 mL 震荡 20 s, 加入 0.75 mL 乙腈震荡均匀, 常温 40 kHz 超声 10 min, 离心 1 min 取上清 1 μ L 点至靶板, 加入 1 μ L CHCA, 晾干。

质谱条件: 模式 Mode liner SARAMIS, 能量角 75~85, 收集范围 2000~20000 (m/z), 每样品 100 次收集峰叠加, 校准品 ATCC 8739 大肠杆菌。收集质谱图谱导入 SARAMIS 数据库与数据库中与标准菌株的谱图进行多重比较, 获得鉴定相关结果。

1.2.2 生长模型的建立

实验设置在 7 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 条件下设置温度点, 在 0 h、3 h、6 h、9 h、18 h、21 h、23.5 h、26.5 h、29 h、31 h、41 h、45 h、52 h、72 h、75 h 选择温度点进行蜡样芽孢杆菌计数, 将数据导入 ComBase 数据库的在线软件^[14], 选取 Baranyi 模型作为一级模型进行曲线拟合, 方程式:

$$Y(t) = Y_0 + \mu_{\max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{(\exp \mu_{\max} A(t) - 1)}{\exp Y_{\max} Y_0} \right) \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left[\exp(-\mu_{\max} t + \exp(-h_0)) - \exp(-\mu_{\max} t - h_0) \right] \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{\ln(1 + h_0)}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

式中: t 为时间, h ; $Y(t)$ 为 t 时的菌数, cfu/g; Y_0 为初始菌数, cfu/g; $Y_{\max}$ 为最大菌数, cfu/g; $\mu_{\max}$ 为最大比生长速率; λ 表示迟滞时间, h ; h_0 表示初始时细胞的生理状态。

1.2.3 模型的验证

为了评价建立的动力学模型预测值的可靠性, 实验采用准确因子(Accuracy factor, A_f)、偏差因子(Bias factor, B_f)和均方根误差(Root Mean Square Error, RMSE)对预测值和实测值进行分析检验。RMSE、 A_f 和 B_f 表达式见公式(4~6)

$$RSME = \sqrt{\frac{\sum (N_{\text{obs}} - N_{\text{pre}})^2}{n}} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum \lg \left(\frac{N_{\text{pre}}}{N_{\text{obs}}} \right)}{n}} \quad (5)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum \lg\left(\frac{N_{pre}}{N_{obs}}\right)}{n}} \quad (6)$$

式中: N_{obs} 表示实测值, N_{pre} 表示应用模型得到的预测值, n 是观测值个数。

2 结果与讨论

2.1 蜡样芽孢杆菌在草莓中污染调查分析

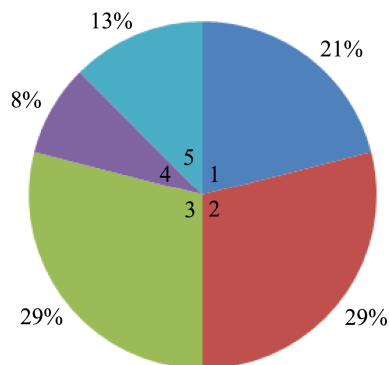


图1 蜡样芽孢杆菌阳性分布情况

Fig.1 Positive distribution of *B. cereus*

注: 1: 检出值 $\lg(\text{cfu/g}) \leq 1 \lg(\text{cfu/g})$; 2: $1 \lg(\text{cfu/g}) < \text{检出值} \lg(\text{cfu/g}) \leq 2 \lg(\text{cfu/g})$; 3: $2 \lg(\text{cfu/g}) < \text{检出值} \lg(\text{cfu/g}) \leq 3 \lg(\text{cfu/g})$; 4: $3 \lg(\text{cfu/g}) < \text{检出值} \lg(\text{cfu/g}) \leq 4 \lg(\text{cfu/g})$; 5: $4 \lg(\text{cfu/g}) < \text{检出值} \lg(\text{cfu/g})$ 。

采用国标方法对成都地区的草莓的蜡样芽孢杆菌的连续三年的污染状况调查结果见表2, 其中阳性检出的定量分析的比率见图1。本实验采用质谱方法进行

表2 草莓中蜡样芽孢杆菌筛查结果

Table 2 The results of *B. cereus* on strawberry

果蔬产品	样品数	阳性样品量和比例	蜡样芽孢杆菌 (定性)	蜡样芽孢杆菌 (定量) $> 10^3$ (cfu/g)
草莓	120	24 (20%)	24 (20%)	5 (4.1%)

2.2 在不同温度及包装条件下草莓中蜡样芽孢杆菌生长模型的建立

在不同温度及包装条件下选取相应的时间点对草莓中蜡样芽孢杆菌进行计数, 采用公式(1~3), 拟合一级生长模型, 在 7°C 下拟合为没有对数生长期的模型 Baranyi and Roberts Model (no lag), 在 30°C 、 25°C 、 15°C 拟合模型为完整的模型 Baranyi and Roberts Model (complete)。模型参数见表3, 拟合线性图见图3。

如表3所示, 建立模型的回归系数 (R^2) 在 $0.972 \sim 0.999$, 标准误差 (SE) 在 $0.05 \sim 0.21$ 间, 说明此模型对实验数据的拟合度较好。膜装草莓的微生物的回归

选择培养基中疑似蜡样芽孢杆菌进行定性的鉴定, 定性鉴定质谱图见图2, 质谱指纹图谱标识峰出峰稳定, 表明鉴定结果稳定可靠。在表1叙述中, 对蜡样芽孢杆菌各国(地区)的限量结果分为满意、可接受、不满意和有潜在危害4种水平, 但综合各国(地区)标准, 蜡样芽孢杆菌在即食食品中限量最安全范围为 $\leq 10^3 \text{ cfu/g}$ 。在本次样品分析中, 蜡样芽孢杆菌检出率为20%, 在可检出样品中 $> 10^3 \text{ cfu/g}$ 的样品占总样品量的4.1%, 在阳性样品中的占比也高达22%。调查结果体现了草莓中蜡样芽孢杆菌高的检出率和高存在量, 究其原因蜡样芽孢杆菌被作为生防菌和生态调节剂在大规模农业生产中进行利用, 农业环境中蜡样芽孢杆菌较易漂移, 草莓生产中果实与土地直接接触, 更易感染蜡样芽孢杆菌, 导致草莓食用过程中蜡样芽孢杆菌会带来潜在的安全风险。

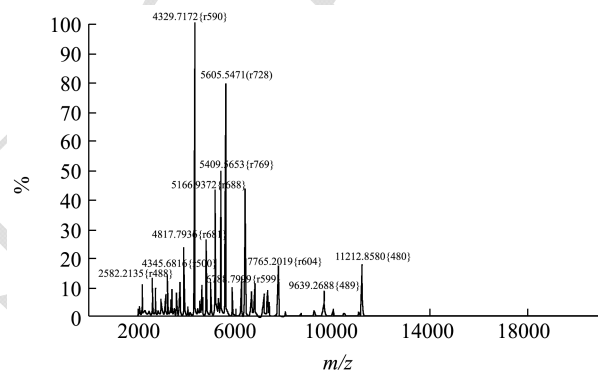
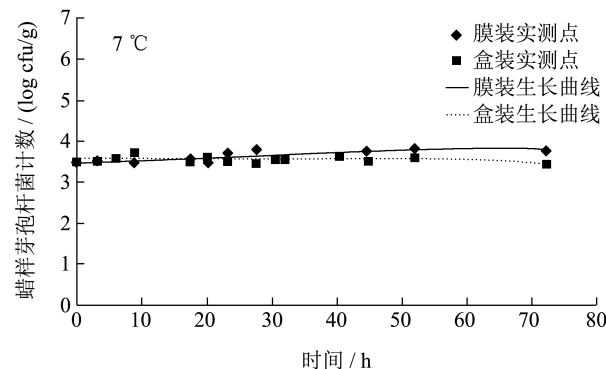


图2 蜡样芽孢杆菌鉴定质谱图

Fig.2 Mass spectrum of *B. cereus*

系数较高, 标准误差也较盒装的低, 可能因为膜装较盒装透气性较差, 草莓呼吸作用产生的水分没有被空气流通带走, 水分活度保持一个很高的水平, 且相对环境较封闭, 其生长曲线拟合后更符合 Baranyi 的数学模型。



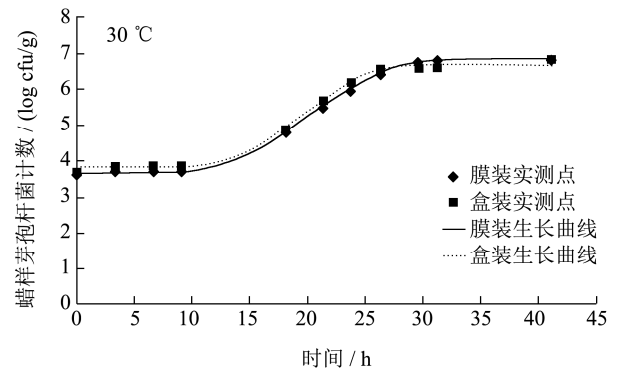
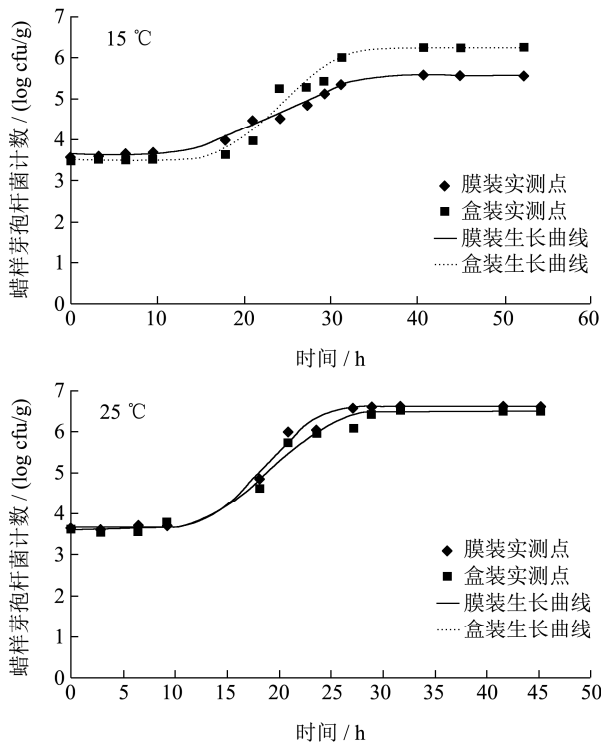


图3 不同温度、包装条件下草莓中蜡样芽孢杆菌的生长曲线
Fig.3 The growth curve *B. cereus* on strawberry under different temperatures and packaged

但实验的比生长速率 ($\mu_{\max}$) 不符合温度二级模型的规律特征, 25 °C 下比生长速率高于 30 °C, 草莓表面微生物群落关系较复杂, 且在微生物培养过程中, 微生物的营养基质仅来源于草莓, 草莓的外表皮是否破裂, 汁液成分是否溢出, 及腐烂程度也在一定程度上影响蜡样芽孢杆菌的额生长水平, 相对原因较复杂。

表3 草莓中蜡样芽孢杆菌 Baranyi 模型拟合参数

Table 3 Parameters of developed Baranyi models of *B. cereus* on strawberry

温度/°C		λ	$\mu_{\max}$	SE	R^2	Y_0	$Y_{\max}$
30	盒装	12.50±1.79	0.20±0.03	0.05	0.999	3.71±0.09	6.70±0.08
	膜装	13.60±0.62	0.25±0.002	0.07	0.997	3.83±0.04	6.59±0.04
25	盒装	12.55±1.92	0.214±0.44	0.19	0.979	3.63±0.10	6.49±0.10
	膜装	13.21±1.23	0.27±0.043	0.14	0.990	3.68±0.07	6.59±0.06
15	盒装	14.02±1.66	0.21±0.036	0.21	0.975	3.82±0.11	6.72±0.11
	膜装	14.28±0.98	0.11±0.01	0.08	0.991	3.65±0.04	6.27±0.04

2.3 在不同温度及包装条件对草莓中蜡样芽孢杆菌生长的影响

如图3所示7 °C贮藏时, 微生物基本没有明显的生长。15 °C贮藏时细菌生长较缓慢, 迟滞期约15~17 h, 随后进入指数生长期。25 °C贮藏时细菌生长迟滞期约13~16 h, 随后进入指数生长期, 25 h后细菌增长量超过6 log(cfu/g), 30 °C贮藏时细菌生长较快, 但在40 h后25 °C和30 °C贮藏温度下蜡样芽孢杆菌的数量级基本相同。根据调研情况, 四川省冬草莓上市的时间环境温度在5~15 °C间, 春草莓上市的温度在15~30 °C之间, 草莓种植户在采后直接销售, 保藏时间不会超过72 h, 在15 °C以上的温度, 蜡样芽孢杆菌生长的延滞期没有超过18 h, 因此, 草莓在非冷藏条件下, 收、贮、运各环节都有可能为病原细菌的增殖提供条件, 从而引发食品安全问题。从本研究结果看, 7 °C以下的冷藏可减少蜡样芽孢杆菌数量, 是最

理想的采后贮藏方式。不同包装的影响中, 在低温条件下(7 °C), 两种包装方式对微生物数量影响不大。在15 °C时两种包装差异显著($p<0.05$), 盒装草莓微生物数量大于保鲜膜装草莓, 保鲜膜起到一定的抑菌效果, 但在25 °C时, 两种包装中微生物的数目体现不出显著性差异($p>0.05$); 30 °C时, 保鲜膜装比盒装微生物增长更为迅速, 主要原因可能为保鲜膜装更容易在高温保藏过程中的呼吸作用后锁住水分, 使草莓表面的水分活度增加, 在相同的温度、营养条件下, 水分活度成为影响微生物差异的主要原因。总结试验结果, 草莓采后冷藏或低温贮藏过程中, 可采取简易包装, 防治细菌交叉污染。市场销售及家庭消费环节, 中温贮藏可以采取保鲜膜包装, 可有效的防止交叉污染和起到一定的抑菌作用, 若草莓暴露在较高温度下, 则建议采取可通风透气的包装, 以防水分活度的升高加快草莓的腐烂。

2.4 模型的验证

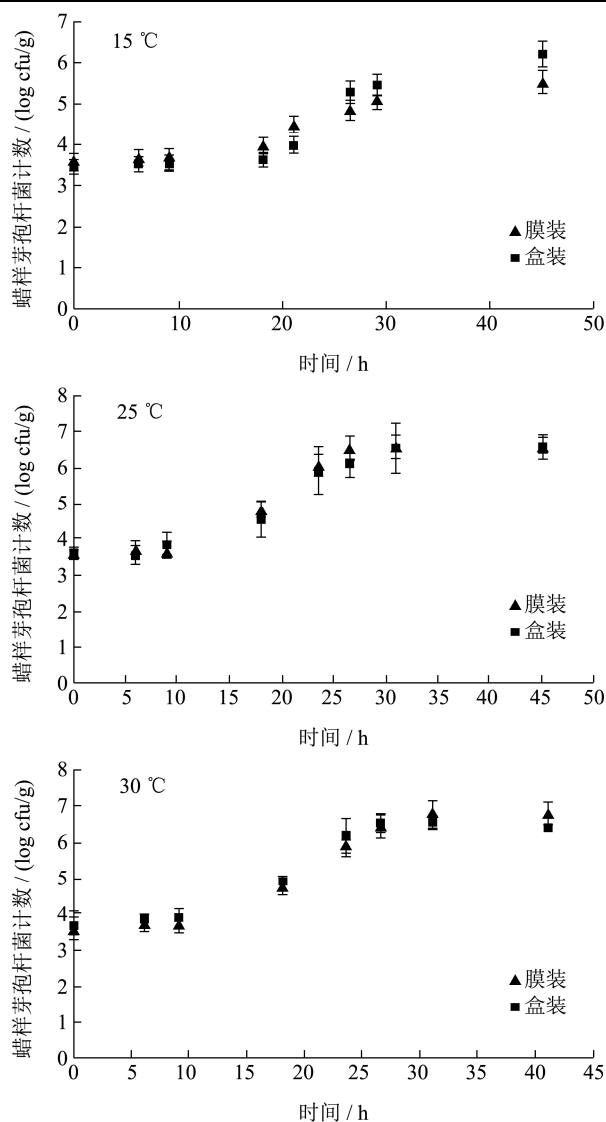


图4 模型验证蜡样芽孢杆菌量观察值与预测值

Fig.4 Model to verify the observed and predicted values of *Bacillus cereus*

分别在 15、25、30 °C 下，在 8 个随机时间点进行模型的验证实验，见图 4，计算其准确因子及偏差因子分析，结果见图 4。

表4 验证结果

Table 4 Validation results				
温度/°C		A_f	B_f	RMSE
30	盒装	1.03	1.02	0.12
	膜装	1.02	1.01	0.01
25	盒装	1.03	0.98	0.20
	膜装	1.05	0.99	0.23
15	盒装	1.03	1.01	0.05
	膜装	1.01	0.99	0.19

A_f 代表了每一个预测值的点与等值线之间的平均距离，可以衡量预测值和观测值之间的接近程度^[15]，本实验中 A_f 分布在 1.01~1.05 之间，表示模型的

稳定性较高， B_f 用来判断预测值在等值线的上方还是下方以及评价预测值偏离等值线的程度^[15]，本实验中 B_f 分布在 0.98~1.02 之间，当 $B_f > 1$ 说明该模型为有效保护模型，在 25 °C，建立模型为保护性模型，30 °C 是预测偏差向下，但总体偏差较小。RMSE 值一般用来验证预测模型的离散程度^[15]，实验中 RMSE 在 0.01~0.23 表明实测数据和预测模型数据离散程度相对较小，整体体现模型可接受。

3 结论

蜡样芽孢杆菌的某些菌虽然作为大田生产的生防菌进行广泛利用，可能是导致草莓蜡样芽孢杆菌的检出率较高的主要原因，由不同培养条件下建立的草莓中蜡样芽孢杆菌的微生物生长是模型可以看出，在一定条件下，蜡样芽孢杆菌会在草莓中大量增殖，具一定危害食用者健康的风险。实验结果表明在相对冷藏贮藏蜡样芽孢杆菌不会短时间增殖，在 15 °C 下保鲜膜对蜡样芽孢杆菌有一定的抑制作用，但在 30 h 后也增长了 2 个对数单位，达到对人体具有危害的范围，在更高的温度下，通风透气避免机械损伤才能更有效的减少微生物的增殖。实验结果总体表明草莓有蜡样芽孢杆菌污染的食用风险，低温储藏和采摘后尽快食用可以规避一定蜡样芽孢杆菌带来的食用风险。建议若加工草莓产品应考虑蜡样芽孢杆菌可能带来的食用安全的危害，并对相关指标进行监测。本结果将为鲜食蔬菜上微生物定量风险评估提供基础数据。

参考文献

- [1] 魏超,代晓航,郭灵安,等.春草莓表面霉菌鉴定及其致病能力研究[J].食品安全质量检测学报,2017(11):247-255
WEI Chao, DAI Xiao-hang, GUO Ling-an, et al. Identification and capability of causing-spoilage of moulds on strawberry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017(11): 247-255
- [2] 魏超,郭灵安,代晓航,等.草莓表面典型微生物鉴定、16S rDNA 同源性分析及附着能力研究(I) [J].西南农业学报, 2017,30(3):2939-2943
WEI Chao, GUO Ling-an, DAI Xiao-hang, et al. Research on identification, 16S rDNA homology and adhesion ability of atrawberry surface (I) [J]. Southwest China Journal of Agricultural Science, 2017, 30(3): 2939-2943
- [3] 魏超,郭灵安,胡莉,等.草莓表面农药残留检测及其对微生物群落影响[J].西南农业学报,2014,27(6):2534-2538
WEI Chao, GUO Ling-an, HU li, et al. Pesticide residues detection of strawberries surface and its effects on microflora,

- [J]. Southwest China Journal of Agricultural science, 2014, 27(6): 2534-2538
- [4] 柳增善,任洪林,孙鸿斌.食品病原微生物学[M].北京:科学出版社,2015
- LIU Zeng-shan, REN Hong-lin, SUN Hong-bin. Food Pathogenic Microbiology [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2015
- [5] 胡永红,陈卫,欧阳平凯.高效有益微生物生态制剂开发与利用-蜡样芽孢杆菌[M].北京:化学工业出版社,2013
- HU Yong-hong, CHEN Wei, OUYANG Ping-kai. Development and Utilization of High-Efficiency Beneficial Microbial Ecological Agents-*Bacillus cereus* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015
- [6] Lindbäck Toril, Fagerlund A Rødland, Marianne Skeie, et al. Characterization of the *Bacillus cereus* the enterotoxin [J]. Microbiology, 2004, 150(12): 3959-3967
- [7] Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, et al. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(3): 352-356
- [8] Gerald M Sapers, James R Gorny, et al. Microbiology of Fruits and Vegetables [M]. CRC: Taylor & Francis, 2011
- [9] 刘芳,兰全学,李碧芳,等.国内外即食食品微生物限量标准解析[J].食品与生物技术学报,2017,36(2):215-223
- LIU Fang, LAN Quan-xue, LI Bi-fang, et al. Comparative analysis on domestic and international microbiological limits for ready-to-eat foods [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(2): 215-223
- [10] 周康,刘春兰,李平兰,等.食品微生物生长预测模型研究新进展[J].微生物学通报,2008,35(4):0589-0594
- ZHOU Kang, LIU Chun-lan, LI Ping-Lan, et al. New advances in predictive food microbial growth model [J]. Microbiology China, 2008, 35(4): 0589-0594
- [11] Stephen J Forsythe. Microbiological Risk Assessment of Food [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2002
- [12] Guillier, Laurent. Predictive microbiology models and operational readiness [J]. Procedia Food Science, 2016, 7: 133-136
- [13] 李柏林,郭剑飞,欧杰.预测微生物学数学建模的方法构建[J].食品科学,2004,25(11):52-57
- LI Bai-lin, GUO Jian-fei, OU Jie. Research approach of microbial modeling on predictive microbiology [J]. Food Science, 2004, 25(11): 52-57
- [14] Combined Database [DB/OL] Home <https://www.combase.cc/index.php/en/>
- [15] 王军,董庆利,丁甜.预测微生物模型的评价方法[J].食品科学,2011,32(21):268-272
- WANG Jun, DONG Qing-li, DING Tian. An overview of evaluation methods for predictive microbial growth models [J]. Food Science, 2011, 32(21): 268-272

(上接第 203 页)

- [15] Al-Amer S, Bekhit E D A, Gooneratne R, et al. Nutritional composition of Mutton bird (*Puffinus griseus*) meat [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2016, 46: 22-28
- [16] Lin C C, Liang J H. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(2): 530-533
- [17] Zielbauer B I, Franz J, Viezens B, et al. Physical aspects of meat cooking: Time dependent thermal protein denaturation and water loss [J]. Food Biophysics, 2016, 11(1): 34-42
- [18] Riyanto J, Sudibya, Cahyadi M, et al. Nutrition content of brisket point end of part simental on gale crossbred meat in boiled various temperature [C]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2018. 102(1): 12011
- [19] 刘登勇,刘欢,张庆永,等.反复卤煮过程中扒鸡卤汤物理及感官特性变化分析[J].食品科学,2017,38(11):116-121
- LIU Deng-yong, LIU Huan, ZHANG Qing-yong, et al. Changes in physical and sensory characteristics of Dezhou braised chicken brine during repeated braising [J]. Food Science, 2017, 38(11): 116-121
- [20] 唐爱明,夏延斌.肉制品中亚硝酸盐降解方法、机理及研究进展[J].食品与机械,2004,2:35-37
- TANG Ai-ming, XIA Yan-bin. Degradation mechanism and research development of nitrite in meat products [J]. Food and Machinery, 2004, 2: 35-37
- [21] Alvarado C, McKee S. Marination to improve functional properties and safety of poultry meat [J]. 2007, 16(1): 113-120