

百里香酚-壳聚糖复合膜及其在猪肉保鲜中的应用

The thymol-chitosan composite membrane and its application in pork preservation

王 娣 张仁凤 张 彬 程 柏

WANG Di ZHANG Ren-feng ZHANG Bin CHENG Bai

许 晖 柯春林 任茂生

XU Hui KE Chun-lin REN Mao-sheng

(蚌埠学院生物与食品工程系, 安徽 蚌埠 233030)

(Department of Biology and Food-Engineering, Bengbu College, Bengbu, Anhui 233030, China)

摘要:研究百里香酚对单核增生李斯特氏菌的抑菌活性及抑菌机理,制作百里香酚-壳聚糖复合膜(CH/TO),研究复合膜的性质及其对猪肉的保鲜作用。结果表明,百里香酚对单核增生李斯特氏菌的最小抑菌浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$;百里香酚能造成单核增生李斯特氏菌电导率增加,核酸和蛋白质大量渗出;随着复合膜中百里香酚浓度的不断增加(0.25%, 0.50%, 1.00%),膜的硬度和穿刺强度逐渐降低,百里香酚复合膜(CH/TO)具有一定抗氧化能力,温度和百里香酚浓度会影响复合膜对 DPPH 自由基的清除,25 $^{\circ}\text{C}$ 时 1.00% 百里香酚复合膜的清除率最高;百里香酚-壳聚糖复合膜能抑制猪肉中的微生物生长繁殖,降低菌落总数,延长猪肉的冷藏期。

关键词:百里香酚;抑菌作用;电导率;复合膜;保鲜

Abstract: The bacteriostatic activity and bacteriostatic mechanism of thymol to *Listeria monocytogenes* were studied and the thymol-chitosan composite membrane was prepared to study the properties of the composite membrane and its preservation effect on pork. The results showed that the minimum inhibitory concentration of thymol on *Listeria monocytogenes* was 12.5 $\mu\text{g/mL}$. The experimental study of conductivity, nucleic acid and protein leakage found that thymol caused by mononuclear proliferative *Leptospira* cell membrane damage, so that bacterial cell inclusions caused by bacterial death. With the increase of thymol concentration (0.25%, 0.50%, 1.00%) in the thymol-chitosan composite membrane, the hardness and puncture strength of the membrane gradually decreased. The temperature and thymol concentration affected the removal of DPPH free radicals by composite membranes. At 25 $^{\circ}\text{C}$, the scavenging rate of 1.00% thymol-composite membrane was the highest.

the growth and reproduction of microbes in pork were reduced by the thymol-chitosan composite membrane, the total number of colonies decreased and the chilling period of pork was prolonged.

Keywords: Thymol; Antibacterial effect; conductivity; composite membrane; preservation

百里香酚(Thymol)又称麝香草酚^[1],是百里香属植物中重要成分,主要存在于百里香精油和百里香活性提取物中。国内外研究发现百里香酚对常见食品污染菌如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等均有一定抑制作用^[1-4],对鲜切蔬菜、水果等保鲜也有影响,保鲜效果较好^[5-7],但未发现用于肉类的保鲜中。单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是常见的肉类食品污染菌,致病性很强,可导致人死亡。调查发现中国多个省份都有关于人和动物感染单核增生李斯特氏菌的案例报道^[8],尤其猪肉、牛肉等生鲜食品容易感染李斯特氏菌^[9-11],目前尚未见到有关百里香酚对食品污染菌单核增生李斯特氏菌的研究报道。

本试验采用管碟法研究百里香酚对单核增生李斯特氏菌的最小抑制浓度,并研究不同浓度的百里香酚对单核增生李斯特氏菌生长曲线及细胞渗透性的影响;制作百里香酚-壳聚糖复合膜(CH/TO),并把复合膜应用于猪肉的保鲜中,研究复合膜对猪肉保藏中菌数的影响,为百里香酚作为一种新型肉类保鲜剂的开发与应用提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料、菌种与试剂

猪后腿瘦肉:购自蚌埠家乐福超市;

单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*):CGM-

基金项目:安徽省教育厅重点科研项目(编号:KJ2015A204)

作者简介:王娣(1976—),女,蚌埠学院副教授,硕士。

E-mail:1480439569@qq.com

收稿日期:2017-08-28

CC1.9144,中国科学院微生物研究所;

胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基(TSA-YE);上海博微生物科技有限公司;

胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基(TSB-YE);上海博微生物科技有限公司;

吐温-80、冰醋酸、丙三醇、葡萄糖:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

DPPH:分析纯,东京化成工业株式会社;

百里香酚:AR 级,国药集团化学试剂有限公司;

壳聚糖:脱乙酰度 95%,BR 级,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器

恒温培养箱:PWT-P42B 型,华德利科学器材有限公司;

恒温振荡箱:HZQ-X500 型,上海一恒科学仪器有限公司;

牛津杯:10 mm×7.8 mm×6 mm,中国科欢有限公司;

高速冷冻离心机:KDC-160HR 型,安徽中科中佳科学仪器有限公司;

微生物比浊仪:WBS-100 型,北京先驱威锋技术开发公司;

紫外可见分光光度计:TU-1901 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

电导率仪:DDBJ-350 型,齐威仪器有限公司;

质构仪:TA.XT Plus 型,英国 Stable Micro Systems 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 百里香酚抑菌活性研究

(1) 不同浓度百里香酚溶液的配制:取 1.00 g 百里香酚,加入 0.5%吐温-80,用无菌水溶解,配置成浓度为 1.00 mg/mL 的原液密封冷藏,备用。

(2) 最小抑菌浓度(MIC)的测定:采用管碟法检测百里香酚对单核增生李斯特氏菌的最小抑菌浓度(MIC)^{[12][13]24,53}。制作含单核增生李斯特氏菌的 TSA-YE 平板,将无菌牛津杯置于平皿内,注入不同浓度(100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25 μg/mL)的百里香酚溶液 100 μL,做空白对照。

(3) 百里香酚对单核增生李斯特氏菌生长曲线的影响:研究 1/2 MIC、1 MIC 百里香酚不同浓度对李斯特氏菌生长曲线的影响^[14]。在比色管中加入 TSB-YE 培养基 10 mL,使比色管里的菌体浓度在 1×10⁶ CFU/mL,百里香酚终浓度为 1/2 MIC、1 MIC,做空白对照;生长曲线检测采用微生物比浊仪,每隔 1 h 测吸光度值 A_{600 nm}。

(4) 细胞膜渗透性及细胞中核酸、蛋白质泄露的检测:利用电导率法研究百里香酚对细菌细胞膜的影响^{[13]52}。电导率是衡量溶液离子强度高低的参数,抑菌剂会破坏微生物细胞膜,使细胞渗透性增强,电解质外泄,电导率上升^[14]。在 260,280 nm 处测吸光度值分析细胞中核酸和蛋白质的泄露^[15]。参照并改进 Kong 等^[16]的方法,将单核增生李斯特氏菌悬液用 5%葡萄糖溶液清洗获得等渗细胞;移取 10⁶ CFU/mL 菌悬液至无菌比色管中,加入百里香酚使其终浓度为 0,1,2 MIC,每隔 0.5 h 测 1 次电导率;测细菌核酸

(A₂₆₀)和蛋白质(A₂₈₀)的泄露量。

1.2.2 百里香酚-壳聚糖复合膜(CH/TO)的制作及其性能检测

(1) CH/TO 复合膜的制作:壳聚糖是天然多糖中唯一的阳离子聚合多糖,具有一定抗氧化和抑菌活性^[17-18]。将百里香酚和壳聚糖混合制备复合膜,使其在百里香酚膜中含量为 0.00%,0.25%,0.50%,1.00%。具体方法:取 2.0 g 壳聚糖,加入不同量百里香酚(0.25,0.50,1.00 g),再加入 1.0 mL 冰醋酸、1.0 mL 丙三醇和 200 μL 吐温-80,去离子水定容至 100 mL,搅拌均匀后超声脱气,40 ℃ 烘干成膜,4 ℃ 冷藏,备用。

(2) CH/TO 复合膜的硬度与强度检测:采用质构仪检测百里香酚-壳聚糖复合膜(CH/TO)硬度和穿刺强度。比较不同浓度(0.25%,0.50%,1.00%)百里香酚-壳聚糖复合膜的硬度;选择直径 2 mm 的探针,比较不同浓度百里香酚-壳聚糖复合膜的穿刺力,做空白对照。

(3) CH/TO 复合膜对 DPPH 自由基清除活性:抗氧化试验参考文献[19],比较在 15,25 ℃ 时 CH/TO 的抗氧化能力。将 CH/TO 样品(3 cm×3 cm)置于 50%的乙醇溶液中,每隔 1 h 取 1 mL 与 4 mL DPPH 溶液混匀,避光静止 30 min,于 517 nm 处测吸光度。DPPH 自由基清除能力按式(1)计算:

$$P = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\%,$$
 (1)

式中:

P——DPPH 自由基清除率,%;

A₀——空白的吸光度值;

A_i——样品的吸光度值。

1.2.3 CH/TO 复合膜对猪肉的保鲜作用

(1) 猪肉保藏中菌落总数的测定:将猪后腿瘦肉无菌分割成 5.0 g 肉块,用壳聚糖膜和百里香酚浓度为 1%的 CH/TO 复合膜包裹,4 ℃ 冷藏,每隔 2 d 测定菌落总数^[20]。

(2) 猪肉感官评定:感官评定小组由 6 人组成,每隔 2 d 对猪肉的颜色、气味、百里香味进行综合评定^[21]。按表 1 采用 5 点评分法对猪肉进行评分。

2 结果与分析

2.1 抑菌作用研究

2.1.1 最小抑菌浓度(MIC) 由表 2 和图 1 可知,随着百里香酚浓度的增加,对单核增生李斯特氏菌的抑菌圈直径不

表 1 感官评分表

Table 1 Sensory evaluation

分数	色泽	猪肉气味	百里香味
1	鲜红有光泽	有鲜猪肉特有气味,无异味	没有百里香味
2	较鲜红有光泽	有鲜猪肉正常气味,无异味	有百里香味
3	暗红没有光泽	稍有腐败气味	有少许百里香味
4	灰暗红没有光泽	有腐败气味	有适量百里香味
5	暗褐色没有光泽	强烈的腐败气味,臭味	有强烈百里香味

表 2 百里香酚对单核增生李斯特氏菌抑菌圈大小[†]
Table 2 Inhibitory effect of thymol on the size of inhibitory zone of *Listeria monocytogenes*

百里香酚浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌圈直径平均值/mm
100.00	$11.97 \pm 0.27^{\text{a}}$
50.00	$11.60 \pm 0.66^{\text{a}}$
25.00	$10.80 \pm 0.56^{\text{b}}$
12.50	$9.92 \pm 0.87^{\text{b}}$
6.25	—

[†] “—”表示没有抑菌圈;不同小写字母表示同一列数据之间有显著性差异($P<0.05$)。

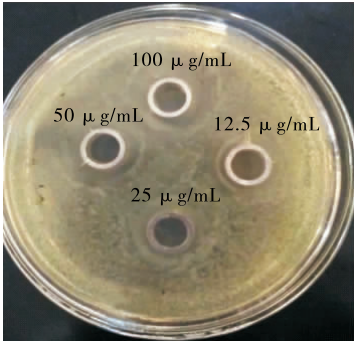


图 1 百里香酚对单核增生李斯特氏菌的抑菌作用

Figure 1 Antimicrobial effect of thymol on *Listeria monocytogenes*

断增加,当百里香酚浓度为 $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,无抑菌圈且牛津杯内有少许菌生长。因此确定最小抑菌浓度(MIC)为 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.2 对单核增生李斯特氏菌生长曲线的抑制作用 由图 2 可知,空白对照组中单核增生李斯特氏菌生长正常;而百里香酚浓度为 1 MIC 时,细菌几乎不生长;在 $1/2$ MIC 浓度下,细菌迟滞期比较长,且菌体生长缓慢,菌数远低于空白对照组。

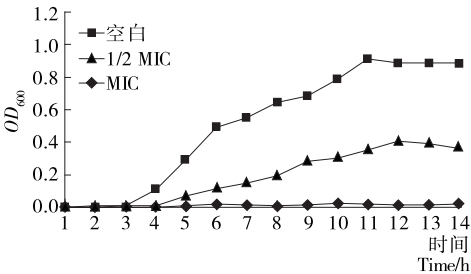


图 2 百里香酚对单核增生李斯特氏菌生长曲线的抑制

Figure 2 Inhibitory effect of thymol on the growth curve of *Listeria monocytogenes*

2.1.3 细胞膜渗透性 电导率的改变直接反映出细胞渗透性的变化。由图 3 可知,空白对照组电导率变化幅度很小。随着百里香酚浓度的增加(1 MIC 和 2 MIC)和时间的延长,电导率值不断增加,表明有离子释放出来,可能是一定浓度的百里香酚破坏了单核增生李斯特氏菌的细胞膜渗透性,随着细胞膜的破坏,细胞内组分泄漏所致。

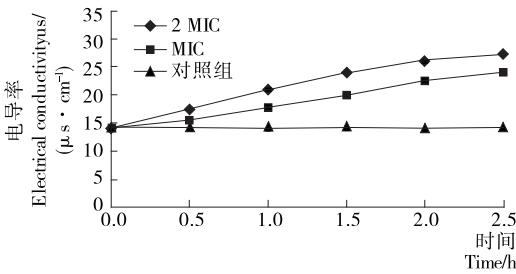


图 3 百里香酚对细胞膜渗透性的影响

Figure 3 Effect of thymol on permeability of cell membrane

2.1.4 细胞中核酸和蛋白质泄露 百里香酚对单核增生李斯特氏菌作用后的菌悬液随时间的变化情况(A_{260} 、 A_{280})见图 4、5。试验结果表明,百里香酚能使单核增生李斯特氏菌细胞渗透性增加,使细胞内大分子物质核酸和蛋白质泄漏出来。由图 4、5 可知,0.0~0.5 h,吸光度值基本无变化,说明百里香酚抑菌需要作用一段时间,随着百里香酚浓度的增加和时间的延长,吸光度值开始逐渐增加,并在 1.5 h 后达到平衡,表明百里香酚破坏了细菌的细胞膜,细胞内的核酸和蛋白质发生泄露所致;空白对照组的吸光度则始终未发生变化,表明细胞中核酸和蛋白质的泄露与百里香酚的作用有关。

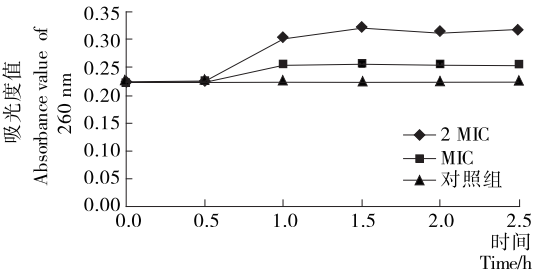


图 4 单核增生李斯特氏菌 260 nm 吸光度变化

Figure 4 Changes in absorbance of 260 nm of *Listeria monocytogenes*

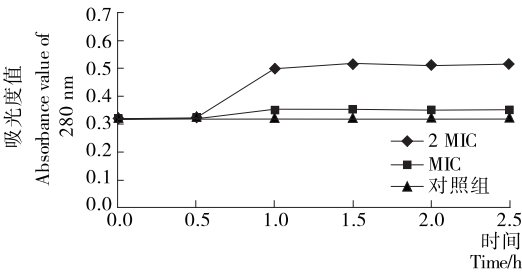


图 5 单核增生李斯特氏菌 280 nm 吸光度变化

Figure 5 Changes in absorbance of 280 nm of *Listeria monocytogenes*

2.2 百里香酚-壳聚糖复合膜(CH/TO)的制作及其性能检测
2.2.1 CH/TO 复合膜的制作 由图 6 可知,空白的壳聚糖膜颜色比较淡,随着百里香酚浓度的增加,混合溶液呈现乳白色,可能是吐温-80 乳化作用所致,成膜后膜颜色随百里香酚浓度的增加而加深,呈淡黄色,同时散发出百里香酚的独特芳香气味。

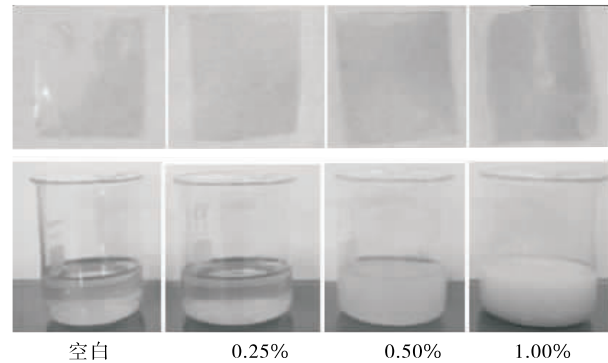


图6 不同浓度百里香酚-壳聚糖复合膜及膜溶液

Figure 6 Different concentrations of thymol-chitosan membrane and its solution

2.2.2 CH/TO 的硬度与穿刺强度 由表 3 可知,随着百里香酚浓度的增加,穿刺强度从 106.35 ± 2.35 逐渐减小至 70.6 ± 2.3 ,硬度从 236.7 ± 11.1 逐渐降至 80.1 ± 7.7 ,降幅明显,可能是百里香酚属疏水性物质,会破坏膜的均一性和连续性,使膜的韧性下降。

表 3 百里香酚-壳聚糖复合膜的物理性质[†]

Table 3 Physical properties of thymol-chitosan membrane

百里香酚/%	硬度	穿刺强度
0.00	236.7 ± 11.1^a	106.35 ± 2.35^a
0.25	148.2 ± 15.8^b	106.20 ± 3.80^a
0.50	81.2 ± 8.3^c	103.23 ± 1.91^a
1.00	80.1 ± 7.7^c	70.60 ± 2.30^b

[†] 不同小写字母表示同一列数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.3 DPPH 法测定百里香酚-壳聚糖复合膜抗氧化作用

由图 7、8 可知,百里香酚能有效清除 DPPH 自由基,清除率随百里香酚浓度的增加不断增大并趋于平衡;温度对 DPPH 自由基清除能力也有一定影响,15℃效果低于 25℃,百里香酚浓度为 1.00% 的 CH/TO, 25℃温度下 4 h 时 DPPH 自由基清除率超过 75%,而 15℃温度下 DPPH 自由基清除率不到 60%。可能高温更有利于 DPPH 自由基的清除。

2.3 百里香酚-壳聚糖复合膜对猪肉的抑菌保鲜作用

2.3.1 菌落总数检测 在 NY 5029—2008 中规定,鲜猪肉

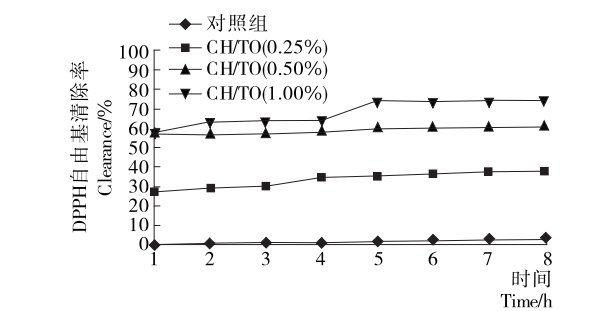


图7 不同浓度百里香酚的复合膜在 25℃的 DPPH 自由基清除率

Figure 7 DPPH removal rate of different concentration thymol of compound membrane at 25℃

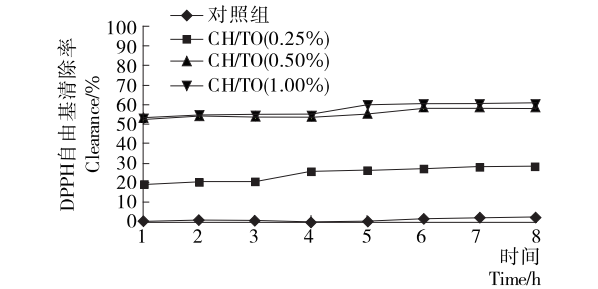


图8 不同浓度百里香酚的复合膜在 15℃的 DPPH 自由基清除率

Figure 8 DPPH removal rate of different concentration thymol of compound membrane at 15℃

的菌落总数标准为 $\leq 1 \times 10^6$ CFU/g。由图 9 可知,在 0~2 d 时,壳聚糖膜和 CH/TO 复合膜包裹的猪肉菌落总数基本相同,壳聚糖膜包装的猪肉在第 8 天超过了 NY 5029—2008 标准限值,菌落总数增加了 60%,而 CH/TO 包装的猪肉,在 12 d 后菌落总数仍低于标准限值,只增长了 19%,表明百里香酚-壳聚糖复合膜可以有效抑制微生物的生长,延长猪肉的贮藏期。

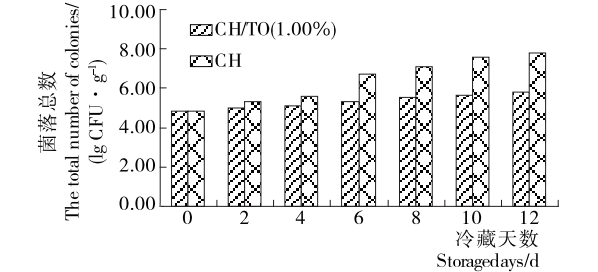


图9 猪肉 4℃冷藏菌落总数变化

Figure 9 Changes of total colonies of chilled pork at 4℃

2.3.2 感官评定 由表 4 和图 10 可知,经过 10 d 的冷藏,使用保鲜膜包裹的猪肉色泽由初始值 1 增加到最大值 5,在第 10 天肉色失去光泽、发绿并伴有腐败臭味。CH/TO 复合膜处理后的猪肉,冷藏到 10 d 色度略增加,没有出现臭味。

3 结论

本试验对百里香酚的抑菌活性进行研究,结果表明其对

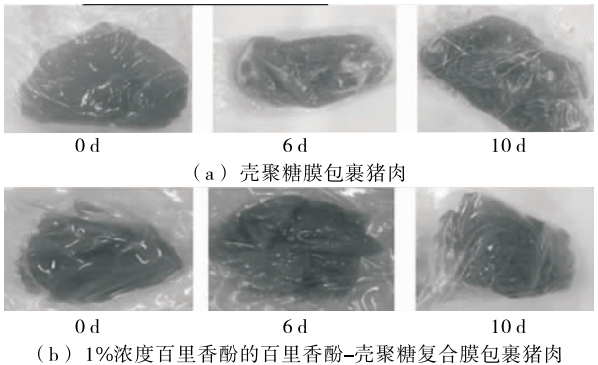


图10 猪肉在不同包装材料中 4℃外观变化

Figure 10 Appearance changes of pork at 4℃ in different packing materials

表 4 4 ℃冷藏过程中不同材料包装猪肉的感官变化[†]

Table 4 Sensory changes of pork at 4 ℃ in different packing materials

贮藏时间/d	色泽		猪肉气味		百里香酚味	
	壳聚糖膜	CH/TO 膜	壳聚糖膜	CH/TO 膜	壳聚糖膜	CH/TO 膜
0	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	1.00±0.00 ^a	3.80±0.20 ^a
2	1.60±0.16 ^b	1.86±0.21 ^b	1.70±0.32 ^b	1.24±0.05 ^b	1.00±0.00 ^a	3.52±0.18 ^a
4	2.12±0.06 ^c	1.98±0.05 ^b	2.15±0.11 ^c	1.81±0.06 ^c	1.00±0.00 ^a	3.46±0.14 ^b
6	3.56±0.56 ^d	2.15±0.14 ^b	3.51±0.25 ^d	2.10±0.07 ^d	1.00±0.00 ^a	2.98±0.17 ^c
8	4.34±0.18 ^c	2.21±0.23 ^c	4.10±0.46 ^e	2.34±0.15 ^e	1.00±0.00 ^a	2.80±0.06 ^c
10	5.00±0.00 ^f	2.58±0.44 ^c	5.00±0.00 ^f	2.54±0.08 ^f	1.00±0.00 ^a	2.43±0.24 ^d

† 不同小写字母表示同一列数据之间有显著性差异(P<0.05)。

食品污染菌单核增生李斯特氏菌具有一定抑菌作用,最小抑菌浓度为 12.5 μg/mL;且百里香酚会破坏单核增生李斯特氏菌细胞膜,细胞内含物渗出引起电导率变化,使核酸和蛋白质发生泄漏;百里香酚-壳聚糖复合膜性质检测试验表明膜的硬度和穿刺强度会随着膜中百里香酚浓度的增加而逐渐降低,且复合膜具有一定抗氧化能力,对 DPPH 自由基清除率为 75%(1.00%百里香酚,25 ℃);为完善复合膜的性能,后续试验将添加不同浓度的乳化剂和塑化剂与百里香酚复合成膜,并用于猪肉油脂的抗氧化研究中;百里香酚-壳聚糖复合膜猪肉保鲜试验结果表明复合膜能有效地抑制猪肉中微生物的生长繁殖,降低菌落总数,延长猪肉的冷藏期,后续试验将深入研究百里香酚对猪肉腐败菌群的抑制作用,进一步提高百里香酚的实际应用价值。

参考文献

[1] 斐海闰, 韩笑, 曹学力. 百里香精油成分分析及其抗氧化和抑菌活性评价[J]. 中国食品学报, 2011, 11(5): 182-187.

[2] 王建清, 刘光发, 金政伟, 等. 百里香精油的抑菌作用及其对鲜切冬瓜的保鲜效果[J]. 包装技术与工程, 2009, 30(10): 1-4.

[3] SCOLLARD J, MCMANAMON O, SCHMALENBERGER A. Inhibition of *Listeria Monocytogenes* growth on freshcut product with thyme essential oil and essential oil compound verbenone[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 120: 61-68.

[4] 樊明涛, 李亚琴. 百里香提取物抑菌作用影响因素的研究[J]. 江苏理工大学学报, 2001, 22(3): 13-16.

[5] 樊明涛, 陈锦屏. 百里香提取物抑菌特性的研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 501-504.

[6] 殷清华, 庄英帜, 严奉祥. 百里香酚的抗肿瘤作用[J]. 现代微生物学进展, 2010, 10(11): 2 073-2 075.

[7] ANIL Kumar Chauhan, SUN Chul Kang. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser.typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model[J]. *Research in Microbiology*, 2014, 165: 559-565.

[8] 连凯, 谈卫君, 赵月. 2002~2012 年人和动物李斯特菌感染报告数据流行病学分析[J]. 中国人兽共患学报, 2014, 30(10): 1 033-1 038.

[9] 孙亚薇, 徐鹏, 平政, 等. 单核细胞增生李斯特菌感染所致炎症反应性疾病的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(6):

884-887.

[10] 周辉, 叶科元, 胡逸敏. 尿肠球菌 HY07 发酵液对冷却猪肉中单增李斯特菌的抑制作用研究[J]. 食品科技, 2015, 40(2): 145-148.

[11] 周伟, 刘国荣, 李平兰, 等. 植物乳杆 L-1 对单核细胞增生李斯特氏菌作用机理的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 260-264.

[12] MOHAMMADREZA Rezaei Golestania, MEHRNAZ Rad, MOHAMMADREZA Bassami, et al. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Life Sciences*, 2015, 135: 22-26.

[13] 刘伟. 姜酚抑菌作用及姜酚-壳聚糖复合膜性质与应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[14] ANJA Klancnik, SASA Piskernik, BARBARA Jersek, et al. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(2): 121-126.

[15] 赵淑艳, 呼世斌, 吴焕利, 等. 山茱萸提取物抑菌活性成分稳定性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 98-101.

[16] KONG Ming, CHEN Xi-guang, LIU Cheng-sheng, et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and surfaces*[J]. *Biointerfaces*, 2008, 65(2): 197-202.

[17] 曾媛媛, 周研, 谢晶, 等. 羧甲基壳聚糖/海藻酸钠共混膜对哈密瓜保鲜效果的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 151-154.

[18] 张思聪, 夏文水, 王斌, 等. 不同分子量壳聚糖对高脂膳食小鼠血糖的调节作用[J]. 食品与机械, 2017, 33(4): 122-126.

[19] PENG Yong, WU Yan. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013 (59): 282-289.

[20] 卫生部编制. GB/T 4789.2—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[21] 张晓鸣. 食品感官评定[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013: 6-8.