

## 柠檬酸和温度联合处理对海水鱼中副溶血性弧菌的杀灭作用

丁珊珊<sup>1</sup>, 杨振泉<sup>2</sup>, 李宝利<sup>1</sup>, 潘志明<sup>1</sup>, 焦新安<sup>1</sup>

**摘要:**采用响应曲面分析法对副溶血性弧菌的抑制条件进行优化。对副溶血性弧菌死亡率影响因素进行单因素分析后,以Box-Behnken设计(BBD)评价温度、时间、pH3个因素显著性和交互作用,得出副溶血性弧菌最佳净化条件为:温度55.5℃、时间25 s、pH4.96。在该条件下,副溶血性弧菌死亡率的预测值为97.36%,在三文鱼上验证该值达97.07%,并且该条件处理前后鱼肌原纤维蛋白的Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性没有显著差异。

**关键词:**副溶血性弧菌;柠檬酸;温度;减菌;响应面分析法

中图分类号:R378.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)02-0205-05

## Killing effects on combined treatment of citric acid and temperature for *Vibrio parahaemolyticus* on marine fish

DING Shan-shan<sup>1</sup>, YANG Zhen-quan<sup>2</sup>, LI Bao-li<sup>1</sup>, PAN Zhi-ming<sup>1</sup>, JIAO Xin-an<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou 225009, China;

2. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**ABSTRACT:** The decontamination method of *Vibrio parahaemolyticus* was studied using response surface method (RSM). The temperature, time and pH value were selected as the single factor in the experiment. Based on the analysis of significance and interaction among different factors, the optimal condition of decontamination method was obtained as follows: temperature was 55.5℃, time was 25s, and pH=4.96. The predicted value and measured value of death rate of *Vibrio parahaemolyticus* in salmon was 97.36% and 97.07%, respectively. However, there was no difference in the activity of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in fish protein before and after treatment.

**KEY WORDS:** *Vibrio parahaemolyticus*; citric acid; temperature; decontamination; response surface method

Corresponding author: Jiao Xin-an, Email: jiao@yzu.edu.cn

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*,以下简称*Vp*)属于弧菌科弧菌属,是一种革兰氏阴性嗜盐细菌,主要分布在近海岸的海水、海河交界处和鱼类、虾类、贝类等海产品中。江苏地区2008年和2009年食源性致病菌监测研究数据显示*Vp*检出率分别为15.9%和7.8%,居于首位,生食水产品导致食源性疾病的风险较高<sup>[1]</sup>。因此,控制在海产品中*Vp*的带菌量,建立科学的减菌和杀菌方法至关重要。

目前对于*Vp*的控制手段主要有流水净化、温度处理、高压处理、辐射等,但是这些方法都不能经济安全有效地抑制水产品中*Vp*<sup>[2]</sup>。有研究发现有

机酸食品添加剂能有效抑制*Vp*,但是在抑制过程中食品的风味发生了改变<sup>[3]</sup>。2000年,Andrews等人提出低温巴氏杀菌(48℃~50℃,5 min)可使贝类中*Vp*(1.2×10<sup>5</sup> MPN/g)降低到不能检测水平(<3MPN/g),但是这种处理可能会导致贝内容物发生变化<sup>[4]</sup>。很少有研究报道有机酸和温度联合处理对于*Vp*的作用,为此,我们建立一种既能降低*Vp*带菌量,又能最大限度地保证海产品鲜度的新型控制手段。

### 1 材料与方法

1.1 菌株与试剂 *Vp*大流行株 RIMD2210663由军事医学科学院馈赠;*Vp*标准菌株 ATCC33847 和 ATCC17802由上海疾病预防与控制中心馈赠;环境分离株 Vp098、Vp343 和 Vp012由扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室分离鉴定并保存。

通讯作者:焦新安,Email: jiao@yzu.edu.cn

作者单位:1. 扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室,扬州 225009;

2. 扬州大学食品科学与工程学院,扬州 225009

琼脂培养基 TCBS 购自杭州微生物试剂有限公司。LBS 液体培养基、高离子强度盐溶液 (0.1 mol/L KCl + 0.01 mol/L NaCO<sub>3</sub> + 0.04 mol/L NaHCO<sub>3</sub>)、50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、4 M KCl 均由本实验室自制,其它试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌悬液制备** 挑取 RIMD2210663、ATCC33847、ATCC17802、Vp098、Vp343、Vp012 的 TCBS 典型单菌落至 LBS 培养液,37 °C, 180 r/min, 过夜振荡培养。分别吸取 10 μL 过夜培养物至新鲜 LBS 培养液,37 °C, 180 r/min, 振荡培养 4~5 h, 测六种菌株的 OD<sub>600</sub> 值, 并调 OD<sub>600</sub> 至 0.8 左右。均匀混合 RIMD2210663、ATCC33847、ATCC17802、Vp098、Vp343、Vp012 这 6 种菌株, 制成混合菌悬液备用。

**1.2.2 Vp 死亡率测定** 用无菌微量移液器分别吸取处理前后菌液 100 μL, 沿管壁缓缓注入含有 900 μL PBS 的无菌 1.5 mL 离心管中(注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 振摇使其混合均匀, 制成 1:100 的样品匀液。根据对样品污染状况的估计, 按上述操作, 依次制成十倍递增系列稀释样品匀液。选取 2~3 个适宜的连续稀释度, 每个稀释度接种 3 个无菌 TCBS 平皿, 每皿 100 μL。选取菌落数在 20 CFU~300 CFU 之间的平板, 分别计数平板上出现的典型和可疑 Vp 菌落, 典型菌落为墨绿色。

计算公式:

$$\text{death\%} = \frac{\text{处理前菌落数} - \text{处理后菌落数}}{\text{处理前菌落数}} \times 100\%$$

**1.2.3 单因素试验** 以死亡率为指标, 分别对 pH、温度、时间作单因素试验。吸取 100 μL 混合菌液于 1.5 mL 中, 12 000 r/min 离心 8 min, 重悬, 在 45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 水浴中处理, 分别于 5 s、25 s、45 s、65 s、85 s 取样分析细菌的死亡率。同样分别吸取 100 μL 混合菌液, 离心沉淀, 用 PBS 重悬, 稀释, 涂板, 37 °C, 培养 24 h, 计数得到处理前菌落数, 其余分别用 pH2.5、pH3.5、pH4、pH4.5、pH5 的柠檬酸溶液重悬, 在 55 °C 水浴中处理 15 s, 稀释, 涂布, 37 °C, 培养 24 h, 计数, 计算死亡率。

**1.2.4 响应面法优化温度、pH 和时间** 在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计, 以温度、pH、时间 3 个因素为自变量, 菌株死亡率为响应值, 采用响应面分析法在三因素三水平上对处理条件进行优化, 以获得最大死亡率。试验因素与水平设计如表 1 所示。根据表 1, Box-Behnken 软件自动生成 17 种组合条件, 如表 2 所示。例如第一种组合是吸取两组混合菌悬液各 100 μL, 一组直接离心、PBS 重悬、稀释涂板, 37 °C 培养 24 h, 计数, 获得处理前菌落数, 另一组混合于 1 mL pH5.5 柠檬酸溶液中, 60 °C 水浴处理 15 s, 然后离心、PBS 重悬, 稀释涂布, 37 °C 培养 24 h, 计数, 获得处理后菌落数, 以计算死亡率。其它 16 种组合根据具体条件做法同上。

**1.2.5 最优条件的验证** 根据 17 种组合的试验数据, 软件自动分析得出最佳组合条件, 对该条件进行验证并考查该条件对鱼蛋白活性的影响。

**1.2.5.1 样品处理** 将市售新鲜三文鱼肉冷冻状态下切割成大小均一的块状, 用灭菌生理盐水浸泡洗涤 9~10 次, 并

表 1 响应面分析因素与水平

Tab. 1 Factors and their coding levels in response surface analysis

Factor	Coding	Level		
		-1	0	1
Temperature/°C	A	50	55	60
Time/s	B	5	15	25
pH	C	4.5	5	5.5

检测 Vp 的携带情况。

**1.2.5.2 人工污染** 取 6 块鱼肉样品解冻后置于混合菌液中浸泡 10~15 min, 用镊子取出分装至玻璃瓶中(每瓶 1 片), 其中 3 瓶做对照组, 加 PBS, 搅匀, 稀释涂布于 TCBS 平板, 37 °C 培养 24 h 后计数。其余 3 瓶做处理组, 加 pH4.96 柠檬酸溶液, 在 55.5 °C 条件下处理 25 s 后, 搅匀, 稀释涂布于 TCBS 平板, 37 °C 培养 24 h 后计数。

## 1.2.6 鱼蛋白活性的测定

**1.2.6.1 肌原纤维蛋白的制备** 为了进一步观察处理条件对鱼蛋白活性的影响, 参考李来好等<sup>[5]</sup> 的报道取三文鱼肉 2 g 各两份, 一份做对照组, 一份用 pH4.96, 55.5 °C, 25 s 处理, 两组分别放在研钵中并置于冰箱急冻室冷冻 5~10 min, 取出研碎, 在冰水浴中边研磨边加入 20 mL 预冷的高离子强度盐溶液, 研磨 15 min。然后加 10 倍冰水稀释, 搅匀放在 4 000 r/min 的离心机中离心 10 min, 弃去上清液, 取出沉淀物。再同法洗涤离心 3 次, 最后得到的肌原纤维沉淀物加 Tris-HCl 缓冲液(pH7.0) 匀浆搅匀, 然后定容至 100 mL, 所得的肌原纤维悬浊液供 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性测定。

**1.2.6.2 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的测定** 在试管中加入 20 mmol/L Tris-HCl 2.5 mL、50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 1.0 mL、4 M KCl 1.0 mL、6.67 mmol/L dATP 1.5 mL 和 4.0 mL 肌原纤维蛋白酶液, 最后加入 1.0 mL 15% 的三氯醋酸终止反应。用钼酸铵法在 314 nm 波长测定磷含量。

## 2 结 果

**2.1 单因素试验结果** 在 45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 温度条件下分析了温度对 Vp 死亡率的影响(图 1a), 死亡率随温度的升高而增大, 45 °C 至 50 °C 死亡率上升最迅速, 上升了近 13%, 55 °C 至 60 °C 上升较迅速, 上升了近 5%, 当温度大于 60 °C 时, 死亡率已接近 100%, 变化不显著。结合实际生产应用情况, 适宜的温度范围确定为 50 °C~60 °C。

在 pH2.5、pH3.5、pH4、pH4.5、pH5.5 条件下分析了 pH 对 Vp 死亡率的影响(图 1b), Vp 死亡率随 pH 的增大而降低。Vp 在 pH2.5 的柠檬酸溶液中死亡率近 100%, 当 pH 至 5.5 时死亡率降低了近 5%, 这说明 Vp 有一定的耐酸能力。考虑到食品风味的需求, 适宜的 pH 范围确定为 4.5~5.5。

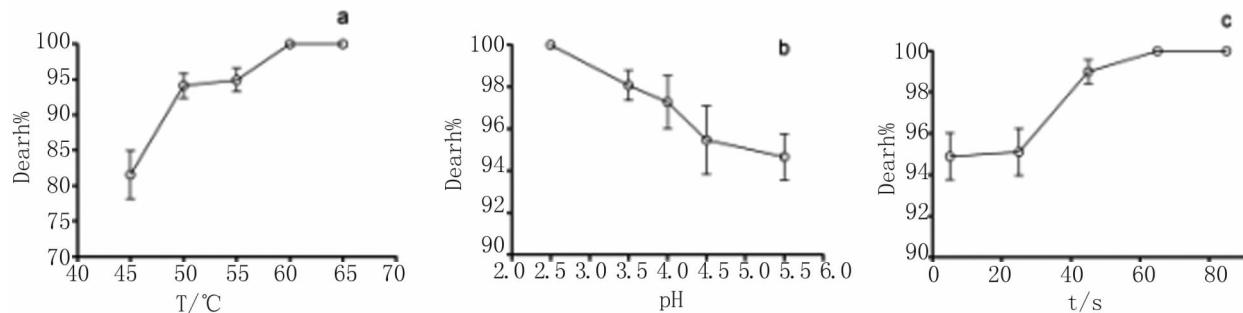


图 1 单因素试验

注:图 1(a)、图 1(b)、图 1(c)分别为温度、pH、时间作为单因素对 *Vp* 死亡率的影响。

Fig. 1 Single factor experiment

Note: (a), (b), and (c) show the effects of single factor temperature, pH and time, respectively, on the death of *Vp*.

在不同作用时间分析了时间对 *Vp* 死亡率的影响对 *Vp* 死亡率的影响(图 1c),曲线呈 S 型,在起始 25 s 内,死亡率仅增加了 1%,在 25 s 至 45 s,死亡率增加了近 4%,65 s 后死亡率接近 100%。为了保证食品鲜度,尽可能选择较短作用时间,故选择 5 s —25 s。

## 2.2 响应面分析法对控制条件的优化

### 2.2.1 模型建立及显著性检验

根据单因素试验结果,以温度(A)、时间(B)、pH(C)为自变量,以死亡率(y)为响应值,分析方案及实验结果见表 2。

二次多项回归模型方程为:

$$\begin{aligned} y = & 97.23 + 0.21A + 0.14B - 0.30C - 0.088AB \\ & + 0.040AC - 0.020AC - 0.020BC - 0.56A^2 - \\ & 0.028B^2 - 1.89C^2 \end{aligned}$$

对该模型进行方差分析,结果见表 3,模型系数显著性检验见表 4。由表 3 可以看出  $P < 0.0001$ ,说明模型方程不同处理间的差异显著;失拟项  $P = 0.1262 > 0.05$ ,不显著;模型的校正决定系数  $R^{2\text{Adj}} = 96.73\%$ ,说明该模型能解释约 96.73% 响应值的

表 2 响应面分析方案及实验结果

Tab. 2 Experimental design and results for response surface analysis

No.	A	B	C	y (%)
1	1	0	1	94.67
2	0	0	0	96.99
3	0	1	-1	95.79
4	1	-1	0	96.89
5	1	0	-1	95.06
6	0	0	0	97.3
7	0	-1	1	94.88
8	0	-1	-1	95.56
9	0	1	1	95.03
10	0	0	0	97.26
11	0	0	0	97.29
12	-1	-1	0	96.02
13	-1	0	-1	94.98
14	-1	0	1	94.43
15	1	1	0	97.09
16	0	0	0	97.3
17	-1	1	0	96.57

表 3 回归模型方差分析

Tab. 3 Variance analysis of regression equation

Variance sources	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F Value	P Value
Model	18.17	9	2.02	53.67	<0.0001
Lack of fit	0.19	3	0.064	3.55	0.1262
Error	0.072	4	0.018		
Total	18.44	16			

$$R = 99.28\%; R^2 = 98.57\%; R^{2\text{Adj}} = 96.73\%$$

变化,仅有总变异 3.27% 不能用此模型解释,相关系数  $R = 99.28\%$ ,说明该模型拟合程度良好。表 4 回归方程系数显著性检验可知:模型一次项 A( $P <$

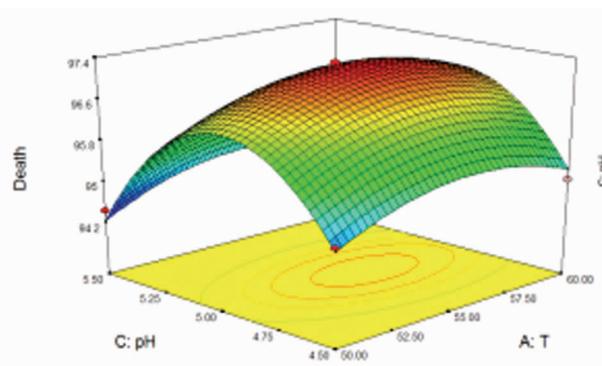
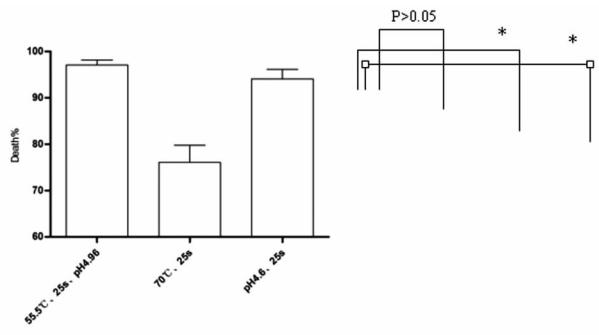
0.05)、C( $P < 0.05$ )显著;二次项  $A^2$ 、 $C^2$  显著;交互项不显著。

2.2.2 响应曲面分析及优化 由上述结果得出, T

表 4 回归方程系数显著性检验表

Tab. 4 Significance test for regression coefficients

Model	Coefficient estimates	Standard deviation	F value	P value
A	0.21	0.069	9.72	0.016 9
B	0.14	0.069	4.24	0.078 4
C	-0.30	0.069	18.82	0.003 4
AB	-0.088	0.097	0.81	0.396 9
AC	0.040	0.097	0.17	0.692 4
BC	-0.020	0.097	0.043	0.842 5
A2	-0.56	0.095	34.82	0.000 6
B2	-0.028	0.095	0.086	0.777 6
C2	-1.89	0.095	397.77	<0.000 1

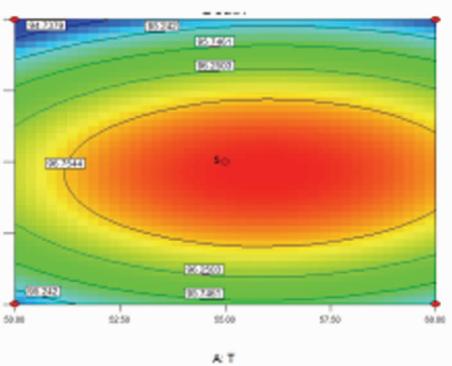
图 2 *Vp* 的死亡率与两个因素的函数关系图和等高线图Fig. 2 Response surface and contour plots for the effect of cross-interaction among two factors on death rate of *Vibrio parahaemolyticus*图 3 在三文鱼上验证 *Vp* 死亡率  
Fig. 3 Death rate of *Vp* on salmon

2.3.2 鱼蛋白活性  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力单位, 是在一定的条件下, 以每分钟每毫克肌原纤维蛋白酶分解 ATP 所释放的磷酸根中磷微克分子量来计算 ( $\mu\text{mol Pi}/\text{min. mg pro.}$ )。图 4 显示, 与对照组相比, 55.5 °C、pH4.96、25 s 处理后  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力差异不显著, 而 pH2.25 s 和 80 °C、25 s 处理后,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活力显著降低。这说明 55.5 °C、pH4.96、25 s 的处理条件从某种程度上可以保证鱼

和 pH 是对 *Vp* 死亡率影响最大的因素, 其中以 pH 尤为重要。可以看出, 随着温度的升高和 pH 的降低, 死亡率也逐渐升高。当温度和 pH 分别在 53.5 °C ~ 60 °C 和 4.75 ~ 5.25 的范围内时, 死亡率最大。响应面软件给出的最优组合是: 55.5 °C、25 s、pH4.96, 模型预测死亡率为 97.36%。

### 2.3 最优条件的验证

2.3.1 *Vp* 死亡率 人工污染三文鱼, 根据下面三组条件处理, 比较死亡率。从上图 3 可以看出, 70 °C、25 s 处理后死亡率达到 76.09%, pH4.6, 5 s 处理后死亡率达到 94.1%, 而 55.5 °C、25 s 与 pH4.96 联合处理后死亡率达到 97.07%, 这说明 pH 和温度的联合作用优于它们单独处理效果。



蛋白的活力。

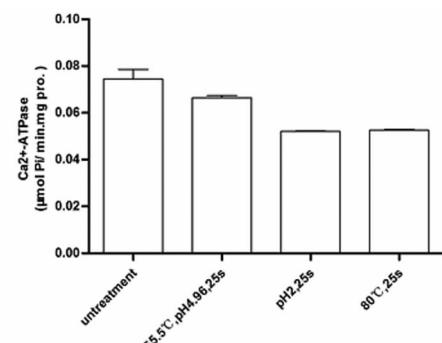


图 4 鱼蛋白活力的测定结果

Fig. 4  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of salmon

### 3 讨论

作为某些天然成分的有机酸对人类无害, 被列为食品添加剂。因为有机酸的抗菌效应, 它还被应用于控制饲料原料和饲料保存中细菌的生长<sup>[6]</sup>。有机酸通过两种途径作用于微生物, 一是 pH 的影响, 二是其阴离子还具有独特的杀菌功能<sup>[7]</sup>。对于引起

胃肠疾病的病原菌, Russell 等人认为, 有机酸的杀菌作用主要是由其阴离子引起的。无机酸作用不佳, 可能在于不具有有机酸阴离子的类似作用<sup>[8]</sup>。有机酸的抗菌效果随着有机酸碳链的增长和不饱和度的增加而增强<sup>[9]</sup>。有人研究报道柠檬酸饮料对弧菌有强烈的抑制作用<sup>[10]</sup>。

目前, 水产品鲜度的评价方法主要包括感官评价、微生物检验、化学检验、物理指标评价和鲜度指示蛋白评价等<sup>[11]</sup>。基于本研究的目的是要考察温度和酸性环境对鱼鲜度的影响, 我们借鉴李来好<sup>[5]</sup>等人的关于鲻鱼蛋白质变性研究, 选择鱼蛋白Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性作为指标。鱼的肌动蛋白和肌动球蛋白切断 ATP 末端的磷酸基团产生 ADP 和 Pi。通过比色测定, 测定无机磷含量, 可以表明 ATPase 活性。无机磷含量的测定采用钒钼酸铵法。

我们研究发现, 70 °C 处理 25 s 时, Vp 死亡率达到 76.09% (降低了 0.59—0.67 个数量级), 而 55.5 °C、pH 4.96 处理 25 s, Vp 死亡率达到 97.73% (降低了 1.34—1.92 个数量级)。Castillo 等人报道使用单独蒸汽灭菌效果明显不及乳酸和温度联合的蒸汽灭菌效果<sup>[12]</sup>。又有人研究也发现单独用 pH 2.40 乳酸处理 15 s 后肠炎沙门菌降低了 0.70 个数量级, 但是当用 pH 2.40 乳酸、82 °C、15 s 处理后, 降低了 0.86~1.19 个数量级<sup>[13]</sup>。Ikeda 等人研究报道被单核细胞增生性李斯特菌人工污染的牛肉经过 75 °C, 30 s 处理和 pH 2.40、55 °C, 30 s 处理后, 菌落数分别降低了 1.4~2 和 1.8~2.6 个数量级<sup>[14]</sup>。尽管这些研究条件有差异, 但是它们和本研究一起证实了有机酸处理使较低温杀菌成为可能。而且本研究还进一步验证了建立的条件对鱼蛋白活性影响不显著。但是在实际应用中, 鱼肉的大小和厚度会不会影响灭菌效果, 而且 Pohlman 等人指出当使用多种抑菌处理手段时, 处理的顺序是很重要的<sup>[15]</sup>。这需要后续试验完善。目前有研究报道 3% NaCl 相比于 2% 和 1% NaCl 使 Vp O3:K6 对 pH 和温度环境的压力有很好的耐受力<sup>[16]</sup>, 说明盐度与 Vp 的耐酸机制有关。那么本研究中那些经过处理后近 3% 存活的 Vp, 是否也有什么保护机制存在, 还不清楚, 有待进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] Yuan BJ, Dai Y, Fu XM, et al. Surveillance on food-borne pathogens in Jiangsu province during 2008-2009 [J]. Jiangsu J Prev Med, 2010, 21(4): 1-3. (in Chinese)  
袁宝君, 戴月, 符晓梅等. 江苏地区 2008 年—2009 年食源性致病菌监测研究[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(4): 1-3.
- [2] Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety [J]. Food Microbiol, 2007, 24(6): 549-558. DOI: 10.1016/j.fm.2007.01.005
- [3] Sun Y, Oliver JD. Antimicrobial action of some GRAS compounds against *Vibrio vulnificus* [J]. Food Addit Contam, 1994, 11(5): 549-558.
- [4] Andrews LS, Park DL, Chen YP. Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters [J]. Food Addit Contam, 2000, 17(9): 787-791.
- [5] Li LH, Chen PJ, Li LD, et al. Protein denaturation of *Mugil cephalus* in refrigeration [J]. J Fisheries China, 2001, 25(4): 363-366. (in Chinese)  
李来好, 陈培基, 李刘冬等. 鳜在冷冻过程中蛋白质的变性[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 363-366.
- [6] Li CL, Zhou AG, Wang ZS. Developments in anti-bacteria effects and its mechanism research [J]. Feed Industry, 2006, 27(11): 35-41. (in Chinese)  
李成良, 周安国, 王之盛. 有机酸的抗菌效应及其机制的研究进展[J]. 饲料工业, 2006, 27(11): 35-41.
- [7] Foster JW. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(2): 170-174. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80030-7
- [8] Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling [J]. J Appl Microbiol, 1992, 73(5): 363-370. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x
- [9] Foegeding PM, Busta FF. Chemical food preservatives [M]. In: Disinfection, sterilization and preservation, Philadelphia: Lea & Febiger, 1991: 802-832.
- [10] Tomotake H, Koga T, Yamato M, et al. Antibacterial activity of citrus fruit juices against *Vibrio* species [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2006, 52(2): 157-160. DOI: 10.3177/jnsv.52.157
- [11] Li JR, Li TT, Li XP. Advances in methods for evaluating freshness of aquatic products [J]. J Beijing Technol Business Univ (Nat Sci Ed), 2010, 28(6): 1-8. (in Chinese)  
励建荣, 李婷婷, 李学鹏. 水产品鲜度品质评价方法研究进展 [J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2010, 28(6): 1-8.
- [12] Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, et al. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays [J]. J Food Prot, 1999, 62(2): 146-151.
- [13] Ozdemir H, Yildirim Y, Kuplulu O, et al. Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on beef [J]. Food Contr, 2006, 17: 299-303. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.11.003
- [14] Ikeda JS, Samelis J, Kendall PA, et al. Acid adaptation does not promote survival or growth of *Listeria monocytogenes* on fresh beef following acid and nonacid decontamination treatments [J]. J Food Prot, 2003, 66(6): 985-992.
- [15] Pohlman FW, Stivarius MR, McElvea KS, et al. The effects of ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef [J]. Meat Sci, 2002, 61(3): 307-313. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00198-X
- [16] Whitaker WB, Parent MA, Naughton LM, et al. Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(14): 4720-4729. DOI: 10.1128/AEM.00474-10