

响应面法优化超声波辅助提取罗望子壳中总黄酮的工艺研究

文攀,陈继姝*,裴志胜,金雅婷
(琼州学院,海南三亚 572022)

摘要:以罗望子壳为材料,用乙醇作为提取剂,利用超声波辅助提取罗望子壳中的总黄酮。以总黄酮的提取率为指标,进行料液比、乙醇浓度、超声波时间和超声波功率的单因素实验,并在此基础上,选取料液比、乙醇浓度、超声波时间和超声波功率进行响应面优化实验。结果表明,罗望子壳中总黄酮的最佳提取工艺参数为:料液比1:47(g/mL)、乙醇浓度60%、超声波时间26 min、超声波功率1080 W,在此工艺条件下,罗望子壳中总黄酮的提取率为81.59%。

关键词:罗望子壳,总黄酮,超声波,响应面

Optimization of ultrasonic assisted extraction conditions of flavonoids from *Tamarindus indica* shell by response surface method

WEN Pan, CHEN Ji-shu*, PEI Zhi-sheng, JIN Ya-ting

(Qiongzhou University, Sanya 572022, China)

Abstract: The shell of *Tamarindus indica* as material, ethanol as extracting agent, the flavonoids in *Tamarindus indicis* was extracted by ultrasonic assisted extraction. The extraction ratio of total flavonoids as index, material liquid ratio, ethanol concentration, ultrasonic time and ultrasonic power as factors, single factor test and response surface optimization test were taken. The results showed that the optimum extraction conditions of flavonoids from *Tamarindus indica* shell were concentration of ethanol 60%, liquid-solid ration of 1:47 (g/mL), ultrasonic time 26 min, and ultrasonic power 1080 W. Under the above optimized conditions, the yield of flavonoids from *Tamarindus indica* shell was 81.59%.

Key words: *Tamarindus indica* shell; flavonoids; ultrasonic; response surface methodology

中图分类号: TS209

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)20-0248-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.044

罗望子(*Tamarindus indica* L.),是一种生长于热带及亚热带的高大常绿乔木,在我国海南、广西、台湾有较多的栽培,其果肉含有丰富的有机酸、糖类、维生素、蛋白质、游离氨基酸等多种营养成分^[1]。罗望子壳是罗望子粉生产过程中的一种副产物,约占种子的28.6%,壳中纤维占21.6%,灰分占7.4%,单宁物质占20%~24%^[2]。据相关研究表明^[2-3],罗望子壳与果实一样含有较高的黄酮类化合物,具有较强的抗氧化性和一定的降血糖活性。同时,王阿丽等^[4]用高效液相色谱测定罗望子果实不同部位木犀草素的含量,发现罗望子壳中含有一定量的木犀草素,而木犀草素是主要黄酮类物质之一。可见,罗望子壳非常值得开发研究。

然而近年来,国内外对罗望子的研究主要集中在叶片、种仁和果实,以多糖、果胶、总黄酮的提取及

提取物的抗氧化、降血糖等方面的研究为主^[5-7],鲜见罗望子壳总黄酮提取的相关报道。罗望子壳在鲜食和加工过程中因不可食用而被遗弃,既污染环境,也是一种资源浪费,如何综合利用罗望子壳,提高产品附加值,保护环境,越来越受到人们的重视。因此本文采用超声波辅助法对罗望子壳中的总黄酮提取工艺进行研究,以期使罗望子壳黄酮能够成为一种新的天然食品添加剂资源,用于食品、药品或作为具有某些生物活性的新资源,在产生经济效益的同时减少环境污染,提高产品的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

罗望子 市购;芦丁标准品PCS0724 中国药品生物制品检定所;无水乙醇、硝酸铝、氢氧化钠、亚硝酸钠 均为分析纯,广州化学试剂厂。

收稿日期:2015-01-16

作者简介:文攀(1983-),女,硕士研究生,实验师,研究方向:植物活性成分开发与利用,E-mail:408597297@qq.com。

*通讯作者:陈继姝(1993-),女,本科,研究方向:植物活性成分开发与利用,E-mail:53663540@qq.com。

基金项目:2013年国家大学生创新创业训练计划项目(201311100068);三亚市院地科技合作项目(2013YD34)。

UV-2550紫外可见分光光度计 日本岛津; FA2204B分析天平 苏州江东精密仪器有限公司; JU-6224调节超声发生器 上海杰恩超声设备有限公司; DZF-OB真空干燥箱 上海凯朗仪器设备厂; DHG-9245A电热恒温鼓风干燥箱 金坛盛蓝仪器制造有限公司; DPX-9082B-1恒温水浴箱 金坛盛蓝仪器制造有限公司; YF2-2粉碎机 瑞安市永历制药机械有限公司; SHZ-D(III)循环水多用真空泵 上海凌科实业发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 罗望子壳总黄酮的提取工艺流程 罗望子壳→烘干(60℃鼓风干燥)→粉碎→过筛(60目)→称重→液料混匀→超声波处理→抽滤→取上清液测含量。

1.2.2 罗望子壳总黄酮最大吸收峰的测定 取罗望子壳粉1.0003 g放入50 mL的烧杯中,加入一定量60%乙醇溶液,充分混合均匀,在45℃恒温水浴箱中浸提60 min,过滤,冷却,加入5%亚硝酸钠溶液1.5 mL,摇匀,放置6 min后加入10%的硝酸铝溶液,摇匀,放置6 min,加入4%氢氧化钠溶液20 mL,摇匀,放置10 min,用分光光度计以0.2 nm为精度进行高速扫描,测定总黄酮的吸收光谱。同样的方法处理芦丁对照品,比对两个样品的吸收光谱,确定最大吸收峰。

1.2.3 标准曲线的制备 精确称取0.0646 g芦丁标准品,用50 mL 60%的乙醇溶液溶解,充分混合摇匀,在45℃恒温水浴箱中加热60 min,冷却过滤,再用60%乙醇溶液定容至250 mL,准确吸取芦丁标准液0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 mL于50 mL容量瓶中,依次加入5%亚硝酸钠溶液1.5 mL,摇匀,静置6 min后加入10%的硝酸铝溶液,摇匀,静置6 min,加入4%的氢氧化钠溶液20 mL,摇匀,静置10 min,于334 nm处测定其吸光度。

1.2.4 罗望子壳总黄酮的提取及测定 准确称取1.0028、1.0030、1.0032 g罗望子壳粉,分别放入50 mL 60%的乙醇溶液,置于超声波发生器中,设定超声波功率为1080 W,提取时间为25 min,按以上操作反复提取,直到提取液为无色,分别将每次的提取液合并,于334 nm处采用硝酸铝显色法^[9]测定吸光值,计算罗望子壳总黄酮含量。罗望子壳中总黄酮提取率公式如下:

$$\text{罗望子壳总黄酮提取率}(\%) = C \times V_1 \times D / M \times 100^{[9]}$$

式中:C为根据芦丁标准曲线计算罗望子壳总黄酮的质量浓度,mg/mL;V₁为原提取液总体积,mL;D为提取液稀释的倍数;M为称取罗望子壳总黄酮含量:50.21 mg。

1.2.5 单因素实验 通过单因素实验确定不同因素的实验水平。分别考察料液比、乙醇浓度、超声波时间、超声波功率四个因素对超声波辅助提取效果的影响,以罗望子壳总黄酮提取率作为考察指标。

1.2.5.1 料液比的筛选 分别准确称取1.0 g罗望子壳粉7份,料液比(g/mL)分别设定为1:20、1:30、1:40、1:45、1:50、1:60、1:70,乙醇浓度为60%,设定超声波时间20 min,超声波功率1080 W,考察不同料液比对罗望子壳总黄酮提取效果的影响。

1.2.5.2 乙醇浓度的筛选 分别准确称取1.0 g罗望子壳粉4份,乙醇浓度分别设定为40%、60%、80%、100%,料液比(g/mL)为1:50,设定超声波功率1080 W,超声波时间20 min,考察不同乙醇浓度对罗望子壳总黄酮提取效果的影响。

1.2.5.3 超声波时间的筛选 分别准确称取1.0 g罗望子壳粉6份,料液比(g/mL)为1:50,乙醇浓度为60%,设定超声波功率为1080 W,超声波时间分别为5、10、15、20、25、30 min,考察不同超声波时间对罗望子壳总黄酮提取效果的影响。

1.2.5.4 超声波功率的筛选 分别准确称取1.0 g罗望子壳粉6份,料液比(g/mL)为1:50,乙醇浓度为60%,设定超声波时间20 min,超声波功率分别设定为600、720、840、960、1080、1200 W,考察不同超声波功率对罗望子壳总黄酮提取效果的影响。

1.2.6 响应面优化实验 在上述单因素实验的基础上,根据Box-Behnken中心组合设计原理,以总黄酮提取率为指标,选取料液比、超声波时间、超声波功率、乙醇浓度四个因素进行响应面实验设计(见表1),得出相关实验数据,通过Design-Expert软件对实验数据进行回归分析,得出优化罗望子壳总黄酮提取工艺参数,并开展验证性实验。

表1 响应面分析因子与水平表

Table 1 Factor levels of response surface analysis

因素	水平		
	1	0	-1
X ₁ 料液比(g/mL)	1:50	1:45	1:40
X ₂ 乙醇浓度(%)	70	60	50
X ₃ 超声波时间(min)	30	25	20
X ₄ 超声波功率(W)	1200	1080	960

1.2.7 数据处理 每次实验设3个平行样,取平均值,数据采用Design Expert 7.0软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 罗望子壳总黄酮最大吸收峰的确定

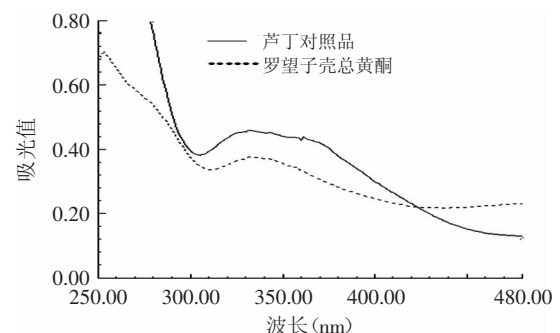


图1 芦丁和罗望子壳总黄酮的紫外吸收光谱

Fig.1 The UV absorption spectrum of the rutin and total flavonoids in *Tamarindus indica* shell

从芦丁和罗望子壳总黄酮的光谱扫描(图1)可以看出,二者均在334 nm附近有强吸收,故本实验选择在波长为334 nm处测定罗望子壳中总黄酮提取液

的吸光度。

2.2 芦丁对照品标准曲线的绘制

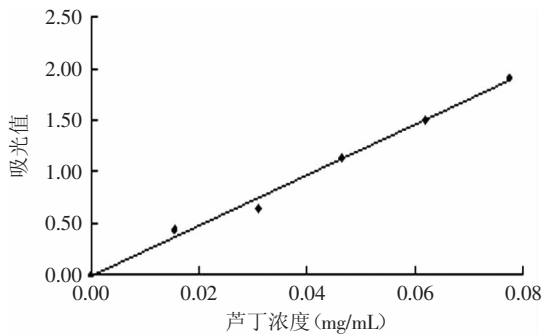


图2 芦丁标准曲线

Fig.2 Standard curve of rutin

以芦丁浓度为横坐标X,吸光值为纵坐标Y,绘制标准曲线如图2所示,线性回归方程为: $Y=24.370X-0.0066$ ($R^2=0.9928$)。

2.3 单因素实验

2.3.1 料液比对罗望子壳中总黄酮提取效果的影响

由图3可知,随着液料比的增加,提取液中总黄酮的提取率增加,这可能是因为液料比增大时,黄酮与溶液在单位时间内存在较大的质量浓度梯度,扩散系数大,有利于黄酮的溶出^[9]。但当液料比达到1:45 g/mL时,总黄酮提取率的增加趋于缓慢,总黄酮的提取率基本达到最大值;当液料比达到1:50 g/mL时,继续增加溶剂的用量,总黄酮的提取率下降。可见,在一定范围内,溶剂用量的增加有利于黄酮类化合物的浸出,当达到固液接触饱和后,再增加提取剂的量,反而促进杂质的溶出,不利于有效成分的提取。同时,过多的溶剂造成溶剂和能源的浪费^[11]。故选择料液比1:40、1:45、1:50 g/mL进行响应面实验。

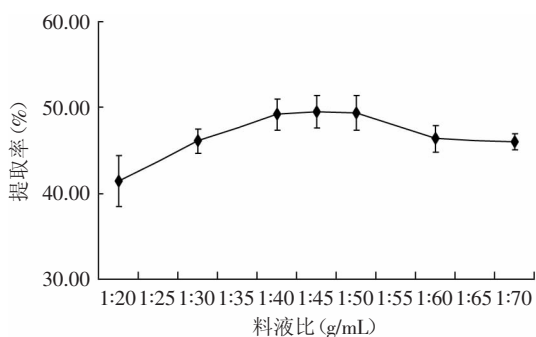


图3 料液比对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate of total flavonoids in *Tamarindus indica* shell

2.3.2 乙醇浓度对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

图4表明,在乙醇浓度为40%~60%的范围时,随着乙醇浓度的增加,总黄酮提取率也相应提高。当乙醇浓度超过60%后,总黄酮提取率随之下降。出现这一结果可能是因为黄酮是一类极性范围很广的化合物,其极性随乙醇浓度的变化而变化,60%乙醇的极性与罗望子壳中黄酮类化合物的极性相似,所以提

取率最高;但过高的乙醇浓度,会导致糖类、脂溶性物质等物质大量溶出,影响总黄酮的提取^[12]。因此,选择乙醇浓度50%、60%、70%进行响应面实验。

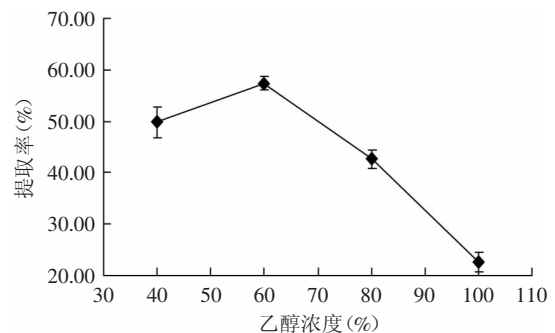


图4 乙醇浓度对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of alcohol concentrations on extraction rate of total flavonoids in *Tamarindus indica* shell

2.3.3 超声波时间对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

如图5所示,初始时黄酮的提取率随着提取时间的延长而增加,提取时间达到25 min时提取量最大,原因可能是初始时随着提取时间的延长,黄酮较容易在超声的空化作用、机械作用和热效应下被溶剂快速地溶出,到达25 min时大部分黄酮已经溶出^[10]。但当提取时间超过25 min后,随着超声波时间的增加其提取率下降,可能是长时间的超声波振幅破坏黄酮类化合物的结构,导致黄酮溶出量减少^[13]。因此选择超声波时间20、25、30 min进行响应面优化实验。

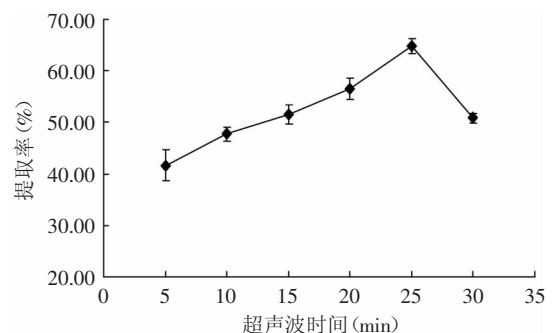


图5 超声波时间对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic time on extraction result of total flavonoids from *Tamarindus indica* shell

2.3.4 超声波功率对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

由图6可以看出,随着超声波功率的增加,总黄酮提取率增加。当超声波功率为1080 W时,提取率达到最大值,之后,随着超声波功率的增大提取率下降。这可能是因为过高的功率产生的瞬间高温使活性成分受到破坏,溶出较多杂质从而影响了提取效果^[14]。因此,选择超声波功率960、1080、1200 W进行响应面优化实验。

2.4 响应面法优化实验

根据Box-Behnken型的中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,选取料液比、超声波时间、超声波功率、乙醇浓度4个因素,采用四因素三水平的

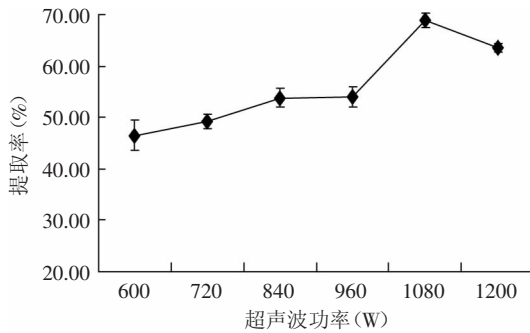


图6 超声波功率对罗望子壳中总黄酮提取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic power on extraction result of total flavonoids from *Tamarindus indica* shell

表2 Box-Behnken响应面实验设计及结果

Table 2 The Box-Behnken experimental response surface design and result

序号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	提取率 (%)
1	-1	-1	0	0	52.96
2	-1	1	0	0	57.28
3	1	-1	0	0	56.98
4	1	1	0	0	55.81
5	0	0	-1	-1	59.81
6	0	0	-1	1	68.75
7	0	0	1	-1	61.92
8	0	0	1	1	68.35
9	-1	0	0	-1	65.25
10	-1	0	0	1	71.06
11	1	0	0	-1	66.92
12	1	0	0	1	80.34
13	0	-1	-1	0	55.03
14	0	-1	1	0	62.76
15	0	1	-1	0	47.62
16	0	1	1	0	60.39
17	-1	0	-1	0	67.87
18	-1	0	1	0	68.93
19	1	0	-1	0	70.62
20	1	0	1	0	74.35
21	0	-1	0	-1	54.05
22	0	-1	0	1	61.96
23	0	1	0	-1	50.29
24	0	1	0	1	53.34
25	0	0	0	0	82.25
26	0	0	0	0	79.90
27	0	0	0	0	82.61

响应面分析方法, 响应面分析方案及实验结果如表2所示。采用Design-Expert软件对所得数据进行分析。

2.5 回归模型的检验

以料液比X₁、乙醇浓度X₂、超声波时间X₃、超声波功率X₄实验因素, 总黄酮提取率Y为考察指标的回归模型为:

$$Y=40.96667+0.906667X_1-0.795833X_2+1.129167X_3+$$

$$1.906667X_4 - 2.230417X_1^2 - 0.69X_1X_2 + 0.335X_1X_3 + 0.995X_1X_4 - 9.756667X_2^2 + 0.6325X_2X_3 - 0.61X_2X_4 - 3.609167X_3^2 - 0.315X_3X_4 - 3.882917X_4^2.$$

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性, 由F检验来判定, 概率p的值越小, 则相应变量的显著程度越高^[15]。

模型的方差分析表3表明, 此模型的复相关系数R²为0.9385, 离均差为0.8668。响应面回归模型达到极显著水平(p=0.0001<0.01); 失拟度F值为7.077289, p=0.130066>0.05, 说明该二次模型能够拟合真实的实验结果, 实验误差小^[16]。

表3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis results of regression model

来源	自由度	平方和	均方	F值	Pr>F
模型	14	606.1226	43.29447	13.08168	0.0001**
线性	4	76.38948	19.09737	5.770384	0.007925
平方	4	520.2462	130.0615	39.29887	0.0001
交互	6	9.486925	1.581154	0.477755	0.812514
残差	12	39.71459	3.309549		
失拟误差	10	38.62312	3.862312	7.077289	0.130066
纯误差	2	1.091467	0.545733		
总和	26	645.8372			

$$R^2=0.93851, R^2_{Adj}=0.8668$$

注:*表示在5%的水平内显著;**表示在1%的水平内极显著;表4同。

表4的结果表明, 在所选择的因素水平范围内, 对结果影响的主次顺序为: X₄>X₃>X₁>X₂, 即超声波功率>超声时间>料液比>乙醇浓度。其中, 一次项中, 超声波功率对响应面值影响极显著(p<0.01), 料液比、乙醇浓度、超声波时间对响应面值影响不显著; 二次项中, 乙醇浓度、超声波时间、超声波功率对响应面值影响极显著(p<0.01), 料液比对响应面值影

表4 回归方程系数及其显著性检验

Table 4 The coefficients of regression equation and the test of significance

来源	估计值	标准误差	T值	Pr> t
X ₁	0.906667	0.525163	1.726449	0.109895
X ₂	-0.79583	0.525163	-1.5154	0.15556
X ₃	1.129167	0.525163	2.150128	0.052631
X ₄	1.906667	0.525163	3.630621	0.003447**
X ₁ ²	-2.23042	0.787744	-2.8314	0.015136*
X ₁ X ₂	-0.69	0.909608	-0.75857	0.46275
X ₁ X ₃	0.335	0.909608	0.36829	0.719072
X ₁ X ₄	0.955	0.909608	1.049902	0.314448
X ₂ ²	-9.75667	0.787744	-12.3856	0.0001**
X ₂ X ₃	0.6325	0.909608	0.695354	0.500078
X ₂ X ₄	-0.61	0.909608	-0.67062	0.515164
X ₃ ²	-3.60917	0.787744	-4.58165	0.000631**
X ₃ X ₄	-0.315	0.909608	-0.3463	0.735111
X ₄ ²	-3.88292	0.787744	-4.92916	0.000348**

响显著 ($p < 0.05$); 各交互项的影响均不显著。

2.6 最佳条件优化

将回归方程用LINGO语言进行分析, 得到最佳方案为: 料液比为1:46.41373 g/mL、超声波时间为25.76313 min、超声波功率为1113.406 W、乙醇浓度59.4546%, 罗望子壳中总黄酮提取率的理论值为81.70%。

验证响应面法的可行性, 因仪器设备的条件及便于方便操作, 将以上条件参数做微小的修正: 料液比为1:47 g/mL、超声波时间为26 min、超声波功率为1080 W、乙醇浓度为60%。在此条件下, 重复实验3次, 得到实际平均提取率为81.59%, 与理论值相比, 其相对误差约为0.13%, 可见该模型较好的预测了实验结果。

李会瑞等^[7]结合正交实验采用乙醇浸泡工艺提取罗望子壳总黄酮的最佳工艺条件为: 料液比1:40 g/mL, 乙醇浓度75%, 温度80 °C, 时间2.0 h, 总黄酮得率为2.7%。按照李会瑞的计算方法, 本研究的总黄酮得率为4.097%。可能是由于超声波对细胞的空化作用, 促使细胞内物质溶出, 提高了得率, 也说明了通过响应面优化得出的提取条件能显著提高罗望子壳中总黄酮的得率。

3 结论

本研究选取料液比、乙醇浓度、超声波时间、超声波功率四个因素进行单因素实验, 采用Box-Behnken响应面设计进行优化, 建立响应面与各因素之间的数学模型, 根据此二次回归模型, 确定罗望子壳总黄酮的最佳提取工艺参数为: 料液比为1:47 g/mL、乙醇浓度为60%、超声波时间为26 min、超声波功率为1080 W, 在此条件下罗望子壳中总黄酮提取率达81.59%。本实验中建立的数学模型能很好地预测各因素与提取率之间的关系。

参考文献

[1] 李晔, 杜阳吉. 罗望子果实黄酮类物质的提取纯化工艺[J]. 现代食品科技, 2011, 27(7): 724-725.
[2] 吉宏武, 丁霄霖. 罗望子研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2000, 6(19): 10-14.

[3] 庄俊钰. 罗望子壳醇提物的生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011: 1.

[4] 王阿丽, 胥秀英, 郑一敏, 等. 高效液相色谱法测定酸角果实不同部位木犀草素的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 4(17): 551-552.

[5] Urszula Tril, Juana Fernández-López, José Ángel Pérez Álvarez, et al. Chemical physicochemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of rich-fibre powder extract obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.) [J]. Industrial Crops & Products, 2014, 55: 155-162.

[6] Rodríguez-Amado, Jesús, Pérez Rosés, et al. Standardization of the quality control parameters of the *Tamarindus indica* L. soft extract [J]. Rev Cubana Plant Med, 2012, 17(1): 108-114.

[7] Martinello, Soares, Franco, et al. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(6): 810-818.

[8] 孙兰萍, 马龙, 张斌, 等. 花生壳中黄酮物质提取工艺优化研究[J]. 食品科学, 2009, 30(6): 97-101.

[9] 刘琦. 金花葵花总黄酮提取、纯化、分离制备及抗氧化性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012: 23-26.

[10] 郭占京, 刘雄民, 黄宏妙, 等. 响应面法优化超声辅助提取罗芙木中育亨宾工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 1-14.

[11] 王影, 陈晓平. 绿豆芽总黄酮的提取工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(5): 45-48.

[12] 乔孟, 屈晓清, 丁之恩. 响应面法优化超声辅助提取湖北海棠叶中总黄酮工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 143-147.

[13] 王汉卿, 王文革, 闫津金, 等. 超声提取枸杞叶中总黄酮提取工艺及其不同采收期含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 44-47.

[14] 陈健, 孙爱东, 高雪娟, 等. 响应面分析法优化超声波提取槟榔原花青素工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 82-86.

[15] 孙哲浩, 李宝珍, 赵谋明, 等. 响应面分析法优化荔枝核总黄酮提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 30-32.

[16] 施伟梅, 陈建福, 王妙飞, 等. 响应面法优化熟地黄总黄酮的纤维素酶法提取工艺[J]. 食品科技, 2015, 40(1): 240-245.

[17] 李会瑞, 崔旭. 罗望子壳总黄酮提取及其清除羟基自由基活性研究[J]. 南方农业学报, 2014, 45(5): 844-849.

(上接第237页)

[7] GB/T5009.33-2010, 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S].
[8] Wang X H, Ren H Y, Wang W, et al. Effects of inoculation of commercial starter cultures on the quality and histamine accumulation in fermented sausages [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(2): 377-384.
[9] 孙群. 肉制品脂类氧化: 硫代巴比妥酸实验测定醛类物质 [J]. 食品科学, 2002, 23(8): 331-334.
[10] 蒋立凤, 叶扣贵. 猪肉在冻藏中挥发性盐基氮含量的变化 [J]. 肉类工业, 2001(12): 17-18.
[11] GB 2726-2005, 熟肉制品卫生标准[S].
[12] Gardini F, Martuscelli M, Crudele M A, et al. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content [J]. Meat Science, 2002, 61: 275-283.

[13] Honikel K O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products [J]. Meat Science, 2008, 78(2): 68-76.
[14] Martuscelli M, Grudele M, Gardini F, et al. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages [J]. Letter Applied Microbiology, 2000, 31: 228-232.
[15] Bover-Cid S, Hugas M, Izquierdo-Pulido M, et al. Amino acid decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(3): 185-189.
[16] 谢主兰, 陈龙, 雷晓凌, 等. 采用挥发性盐基氮动力学模型预测低盐虾酱的货架寿命 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 29-33.