

响应面优化汽化过氧化氢杀灭 PET 瓶内 表面枯草芽孢杆菌工艺

楚莉沙¹, 黄莉莉¹, 汪良峰¹, 崔政伟^{*1}, 刘波², 杨亚军²

(1. 江南大学 江苏省食品先进制造装备技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏新美星包装机械有限公司, 江苏 张家港 215618)

摘要: 研究汽化过氧化氢对聚对苯二甲酸乙二醇酯(Polyethylene Terephthalate, PET)瓶坯内表面上枯草芽孢杆菌的杀菌效果。采用单因素试验结合 Box-Behnken 中心试验设计原理,对过氧化氢溶液流量、灭菌时间和灭菌温度 3 种灭菌工艺条件进行了响应面优化分析。汽化过氧化氢杀灭 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌的最佳工艺条件为:过氧化氢溶液流量 14 mL/min,灭菌时间 9 s,灭菌温度 120℃,在此条件下汽化过氧化氢对枯草芽孢杆菌的杀菌对数值可达 5.40 log。为汽化过氧化氢灭菌的工业化应用提供理论依据。

关键词: 汽化过氧化氢;枯草芽孢杆菌;聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)瓶坯;响应面

中图分类号:R 187.2 文章编号:1673-1689(2019)02-0008-07 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.002

Optimization of Hydrogen Peroxide Vapour Inactivating *Bacillus subtilis* in PET Bottles by Response Surface Methodology

CHU Lisha¹, HUANG Lili¹, WANG Liangfeng¹, CUI Zhengwei^{*1}, LIU Bo², YANG Yajun²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Advanced Food Manufacturing Equipment and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Newamstar Packaging Machinery Co., Ltd., Zhangjiagang 215618, China)

Abstract: This study aims to inactivate *Bacillus subtilis* in Polyethylene Terephthalate (PET) preforms by hydrogen peroxide vapour. Based on single factor experiment combined with Box-Behnken central combination design, sterilization processes, such as H₂O₂ flowrate, treatment and temperature, are optimized by response surface methodology. The optimum process parameters are: H₂O₂ flowrate= 14 mL/min, treatment time= 9 s, and temperature= 120 °C. Under the optimized conditions, the reduction of *Bacillus subtilis* could be up to 5.40 log. It provides theoretical basis for the industrial application of hydrogen peroxide vapour sterilization.

Keywords: hydrogen peroxide vapour, *Bacillus subtilis*, Polyethylene terephthalate (PET) bottle, response surface methodology

收稿日期: 2016-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21606109)。

* 通信作者: 崔政伟(1963—),男,教授,博士,硕士研究生导师,主要从事食品加工技术与装备研究。E-mail: cuizhengwei@jiangnan.edu.cn

引用本文: 楚莉沙, 黄莉莉, 汪良峰, 等. 响应面优化汽化过氧化氢杀灭 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌工艺 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 08-14.

聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)是目前食品包装领域最常用的一种材料,特别是在饮料灌装方面,大多数的饮料瓶是 PET 材质。在无菌灌装系统中,食品与包装材料通常是分开进行灭菌^[1]。现阶段用于 PET 饮料瓶的灭菌方法主要有:物理法、化学法及两者结合 3 种^[2-6]。但是这些方法并不都能高效地杀灭 PET 瓶表面的微生物。因此,找到一种快速、无残留的灭菌方式对 PET 瓶进行灭菌是保证产品质量和提高生产效率所必需的。

过氧化氢具有强氧化性,可形成具有强氧化能力的自由羟基以及活性衍生物,自由羟基和活性衍生物通过破坏微生物的外层保护结构以及内部 DNA 而起到杀菌的作用^[7]。作为一种绿色环保杀菌剂,过氧化氢也越来越多地受到人们的重视。近年来,随着汽化过氧化氢技术的不断发展,汽化过氧化氢灭菌法也成了国外各国药典及灭菌技术规范所推崇的方法,并被广泛用于医疗卫生、生物制药和实验室研究等多种领域^[7-9]。同时,就使用过氧化氢灭菌而言,人们也在寻找一种高效、洁净、成本低廉的灭菌工艺,特别是在环境保护和食品领域。

现阶段,国外对于低浓度汽化过氧化氢杀灭枯草芽孢杆菌的研究^[2,10]比较多,汽化过氧化氢用于食品包装方面也有比较成熟的技术^[11-12],但国内的相关报道较少^[13-14]。为此,本实验以 PET 瓶坯为模型,在单因素试验的基础上,观察汽化过氧化氢对 PET 瓶坯内表面上枯草芽孢杆菌的杀菌效果,并利用响应面分析法对制备汽化过氧化氢的操作工况(H_2O_2 溶液流量、灭菌时间和灭菌温度)进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌(CMCC(B)63501),江南大学食品学院实验室保存;氯化钠、无水乙醇、30%过氧化氢,均为分析纯(国药集团);营养肉汤(国药集团)、平板计数琼脂培养基(国药集团),均购于学校设备管理处。

1.2 仪器与设备

汽化过氧化氢发生器,江苏新美星包装机械股份有限公司;XFS-280M 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;SJ-CJ-2FD 型双人单面洁净工作台,苏州苏洁净化设备有限公司;SPX-200 生化培养箱,上海跃进医疗器械有限公

司;Lab dance S25 小舞灵旋涡混匀器,上海微川精密仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌的培养^[15-16]

1)活化:将保存的枯草芽孢杆菌菌种在平板计数琼脂培养基上进行划线,于 36 ℃ 的培养箱中培养 24 h。

2)培养:将活化后的枯草芽孢杆菌挑取两环接种到装有 100 mL 营养肉汤(经灭菌)的 250 mL 锥形瓶中于 36 ℃ 的培养箱中培养 24 h。

3)确定菌液浓度:先取初始菌液 10 mL 于 90 mL 无菌蒸馏水中,然后采用梯度稀释的方法对培养好的种子液进行稀释,取稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 种菌悬液 1 mL 滴入已标记好的培养皿中,倒入冷却至 45~47 ℃ 的平板计数琼脂培养基,轻轻摇匀,室温放置 15 min 左右,待培养基充分凝固后,将接种好的平板倒置,即皿盖朝下放置,放于 36 ℃ 的培养箱中恒温培养 24 h。

将培养好的 9 只平板计数琼脂培养基从培养箱中取出, 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个浓度之间的倍数大概呈 10 倍,分别计数每个浓度梯度平板上的菌落数,取 3 个平板的平均值为该浓度下 1 mL 菌悬液的菌落数。根据公式

$$\text{菌液浓度} = \lg(\text{有效菌落数} \times 10 \times \text{稀释倍数}) \quad (1)$$

1.3.2 染菌瓶坯制备 试验用瓶坯为 PET 材质,内径约为 15 mm,深 88 mm,外形尺寸如图 1 所示。



图 1 试验用 PET 瓶尺寸

Fig. 1 Size of PET bottle for testing

将培养好的枯草芽孢杆菌菌液 0.2 mL 滴加到无菌瓶坯中,用旋涡混匀器混匀使得瓶坯内表面均匀的沾有细菌悬液。

1.3.3 汽化过氧化氢制备流程 图 2 为制备汽化

过氧化氢的流程图。30%过氧化氢溶液和压缩空气(约 0.5 MP)同时单独的输送到加热器中,两者在加热器中混合并加热生成汽化过氧化氢。过氧化氢溶液流量和压缩空气流量分别通过液体流量计与控

制器和气体流量计与控制器进行控制,加热器加热温度通过 PLC 控制器进行控制,汽化过氧化氢温度通过电阻式温度传感器测量。

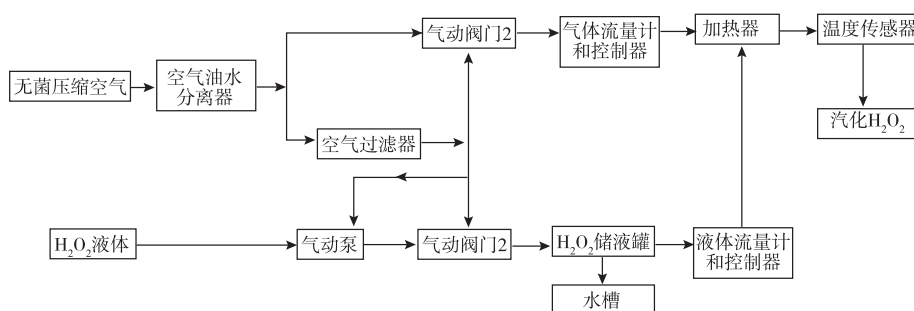


图 2 汽化过氧化氢制备流程

Fig. 2 Process flow diagram for preparation of hydrogen peroxide vapour

试验用过氧化氢溶液和压缩空气混合加热器图如图 3 所示。



图 3 过氧化氢溶液和压缩空气混合加热器

Fig. 3 Mixer and heater for hydrogen peroxide and compressed air

1.3.4 杀菌效果测定 试验在无菌通风橱中进行。试验前将染菌瓶坯预热到 50 ℃。实验时,固定压缩空气流量为 150 L/min(5 bar),过氧化氢溶液流量、灭菌温度和灭菌时间均可调。将生成的汽化过氧化氢直接通入到染菌瓶坯瓶口,灭菌一定时间(2、4、7、10 s)后,用 50 ℃热风将残留在瓶坯内壁的过氧化氢吹干,加入 1.8 mL 无菌蒸馏水到瓶坯中,不断用混匀器混匀,充分洗脱后,以倾注法对残留菌进行回收计数。同时设置阴阳性对照。试验重复 3 次,计算平均灭活细菌的对数值。

1.3.5 汽化过氧化氢杀灭 PET 瓶坯内表面枯草芽孢杆菌的单因素试验

1) H_2O_2 溶液流量的确定。汽化过氧化氢的流量对杀菌起着至关重要的作用^[17-18]。试验固定灭菌时间为 7 s,灭菌温度分别为 120、140、160 ℃的情况下,设置汽化过氧化氢发生器的过氧化氢溶液流量分别为 8、10、13、16 mL/min。测定不同过氧化氢溶液流量对 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌的杀菌效果。

表 1 30% H_2O_2 流量单位换算

Table 1 Unit conversion of 30% hydrogen peroxide flowrate

流量/(mL/min)	质量浓度/(mg/L)
8	11.9
10	14.7
13	18.8
16	22.8

2) 灭菌温度的确定。灭菌温度的选定对杀菌效果有一定的影响^[12]。温度过低会导致过氧化氢汽化不完全,导致原料的浪费以及对后处理带来困难,温度过高则会导致过氧化氢分解,达不到杀菌效果。试验前对设备进行预处理发现,当灭菌温度设为 100 ℃时,过氧化氢溶液会出现汽化不完全的情况,瓶坯内壁生成的凝结雾滴比较大,杀菌效果比较差,可能是因为羟基具有亲水性,生成的雾滴将羟基分子包裹在中心,大大降低了与细菌的接触,使得杀菌效果变弱。因此,根据预处理结果以及国内外的研究^[19-21],考虑到过氧化氢溶液的沸点和设备的温度设定情况,选择灭菌温度为 120、140 ℃和

160 ℃进行试验。

固定灭菌时间为 7 s, H_2O_2 溶液流量分别为 8、10、13、16 mL/min 的情况下, 设置汽化过氧化氢发生器的灭菌温度分别为 120、140、160 ℃, 测定不同灭菌温度对 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌的杀菌效果。

3) 灭菌时间的确定。灭菌时间是影响杀菌效率的重要因素, 并且会影响生产效率。试验固定灭菌温度为 140 ℃, H_2O_2 溶液流量分别为 10、13、16 mL/min 的情况下, 考虑到工业生产中对灭菌效率的要求, 设定灭菌时间分别为 2、4、7、10 s。测定不同灭菌时间对 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌的杀菌效果。

1.3.6 响应面分析法优化灭菌工艺 根据 Box-Behnken 试验设计原理^[22], 在单因素的基础上, 以杀菌对数值为响应值, 选取 H_2O_2 溶液流量、灭菌温度和灭菌时间 3 个因素, 设计三因素三水平试验, 试验因素及设计如表 2 所示。

表 2 汽化过氧化氢杀菌响应面因素水平

Table 2 Response surface level of hydrogen peroxide vapour sterilization

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 过氧化氢流量/(mL/min)	10	13	16
X_2 灭菌时间/s	4	7	10
X_3 灭菌温度/℃	120	140	160

试验以 3 次所得灭菌对数值的平均值为响应值, 共设有 17 个试验点, 其中 12 个为析因实验, 5 个为中心实验, 用以估计误差。

1.3.7 数据统计与分析 运用 OriginPro 9 软件对单因素试验数据进行统计分析, 采用 Design Expert 8.0 软件设计 Box-Behnken 中心组合试验, 建立回归模型并对其进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 H_2O_2 溶液流量对灭菌效果的影响 由图 4 可知, 在灭菌温度不变的情况下, 随过氧化氢溶液流量的增加, 生成的汽化过氧化氢对枯草芽孢杆菌的效果逐渐增强。考虑到 PET 瓶对杀菌效果的要求, 选择过氧化氢溶液流量在 13 mL/min 左右比较适宜。

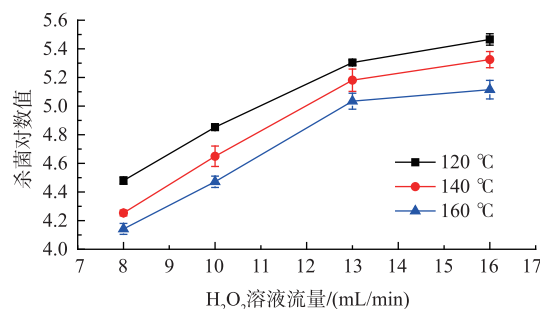


图 4 过氧化氢溶液流量对杀菌效果的影响

Fig. 4 Effect of hydrogen peroxide flow rate on sterilization

2.1.2 灭菌温度对灭菌效果的影响 由图 5 可知, 在 H_2O_2 溶液流量不变的情况下, 随灭菌温度的升高, 灭菌效果逐渐减弱, 这可能是因为随温度的升高, 加热过程中过氧化氢分解逐渐加剧, 导致生成的羟基分子变少, 因而对灭菌效果产生了一定的影响。

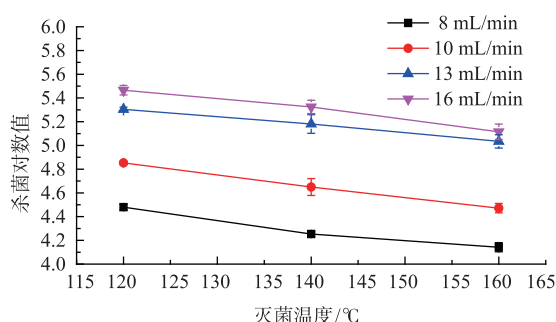


图 5 灭菌温度对杀菌效果的影响

Fig. 5 Effect of temperature on sterilization

2.1.3 灭菌时间对灭菌效果的影响 由图 6 可知, 在 H_2O_2 溶液流量不变的情况下, 随灭菌时间的延长, 杀菌效果逐渐增强。综合考虑 PET 瓶对杀菌效果以及工业生产对灭菌效率的要求, 选择灭菌时间为 7 s 左右比较适宜。

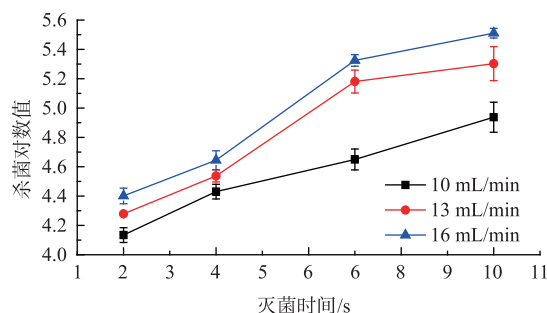


图 6 灭菌时间对杀菌效果的影响

Fig. 6 Effect of treatment time on sterilization

2.2 响应面分析法优化杀菌工艺

2.2.1 响应面实验设计与分析结果 采用 Design Expert8.0 软件对表 3 中的试验结果进行多元回归拟合,得到回归方程为

$$Y = 5.13 + 0.26X_1 + 0.33X_2 - 0.13X_3 + 0.090X_1X_2 + 7.725 \times 10^{-3}X_1X_3 + 0.028X_2X_3 - 0.087X_1^2 - 0.16X_1^2 - 0.069X_3^2 \quad (2)$$

表 3 响应面试验设计及杀菌结果

Table 3 Experimental design and sterilization results for RAS

试验号	H ₂ O ₂ 溶液流量 X ₁	灭菌时间 X ₂	灭菌温度 X ₃	杀菌对数值	
				实测值	理论值
1	0	0	0	5.18	5.13
2	1	0	1	5.11	5.11
3	0	0	0	5.18	5.13
4	-1	0	-1	4.85	4.86
5	0	-1	1	4.48	4.41
6	0	1	1	5.16	5.12
7	-1	-1	0	4.43	4.39
8	-1	0	1	4.47	4.58
9	0	0	0	5.08	5.13
10	1	0	-1	5.47	5.36
11	0	1	-1	5.27	5.33
12	0	0	0	5.17	5.13
13	1	1	0	5.51	5.55
14	0	0	0	5.06	5.13
15	0	-1	-1	4.70	4.73
16	-1	1	0	4.94	4.86
17	1	-1	0	4.64	4.72

2.2.2 回归模型显著性及响应面分析 由表 4 可得,经方差分析^[23]后,该回归方程的 *P* 值 <0.05,表明模型比较显著,失拟项的 *P* 值为 0.079 4 >0.05 (不显著),说明模型拟合得很好。相关系数 $R^2=1.74/1.80=0.966 7$,说明回归方程与实际数据点拟合良好,能很好地反映出 H₂O₂ 溶液流量、灭菌温度和灭菌时间对灭菌效果(杀菌对数值)的影响。同时可得,H₂O₂ 溶液流量和灭菌时间一次项对杀菌对数值的影响非常显著,灭菌温度的一次项比较显著,灭菌时间的二次项对杀菌对数值的影响比较显著,而 H₂O₂ 溶液流量和灭菌温度的二次项均不显著,交互项对杀菌对数值的影响均不显著。所以,试验各因素对响应值的影响并不是简单的线性关系。各因素对灭菌效果的影响大小顺序为:灭菌时间>H₂O₂ 溶液流量 >灭菌温度。

对回归模型进行分析得出,汽化过氧化氢杀灭枯草芽孢杆菌的最佳工艺条件为:过氧化氢(液态)流量 14.13 mL/min,灭菌时间 9.33 s,灭菌温度 120 ℃,此条件下杀菌对数值预测为 5.464 07 log。考虑到试验操作时的方便,将最优工艺条件修正为过氧化氢溶液流量 14 mL/min,灭菌时间 9 s,灭菌温度 120 ℃,在此条件下重复 3 次试验,测得的杀菌对数值的平均值是 5.40 log,与理论预测值接近,说明此回归模型预测可靠,能够很好地反映出试验各因素对灭菌效果(杀菌对数值)的影响。

运用 OriginPro 软件作出各试验因素对响应值交互影响的等高线与响应面图(图 7)。从图 7 可以

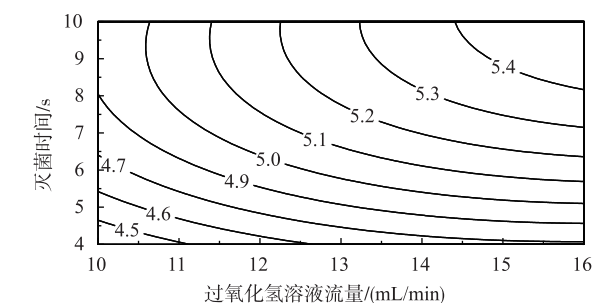
表 4 回归分析试验结果

Table 4 Results of extraction regression analysis

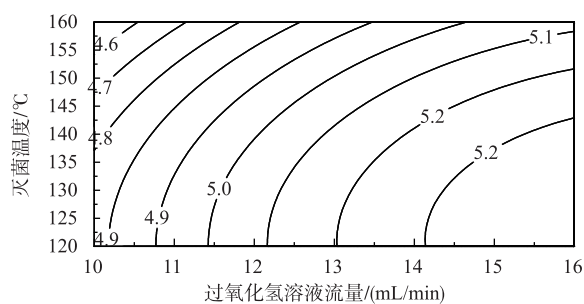
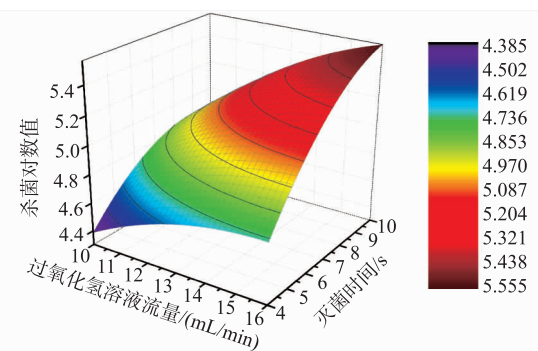
方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
总模型	1.74	9	0.19	21.35	0.000 3	显著
X ₁ -H ₂ O ₂ 溶液流量	0.52	1	0.52	57.62	0.000 1	—
X ₂ -灭菌时间	0.86	1	0.86	95.01	< 0.000 1	—
X ₃ -灭菌温度	0.14	1	0.14	15.59	0.005 5	—
X ₁ X ₂	0.032	1	0.032	3.55	0.101 4	—
X ₁ X ₃	2.387×10 ⁻⁴	1	2.387×10 ⁻⁴	0.026	0.875 6	—
X ₂ X ₃	3.069×10 ⁻³	1	3.069×10 ⁻³	0.34	0.578 7	—
X ₁ ²	0.032	1	0.032	3.48	0.104 2	—
X ₂ ²	0.11	1	0.11	12.60	0.009 4	—
X ₃ ²	0.020	1	0.020	2.22	0.179 5	—
残差	0.063	7	9.054×10 ⁻³	—	—	—
失拟项	0.050	3	0.017	4.77	0.082 7	不显著
纯误差	0.014	4	3.462×10 ⁻³	—	—	—
总误差	1.80	16	—	—	—	—

清楚地看出,过氧化氢溶液流量、灭菌时间和灭菌温度两两之间交互作用的响应曲面图均比较平缓,

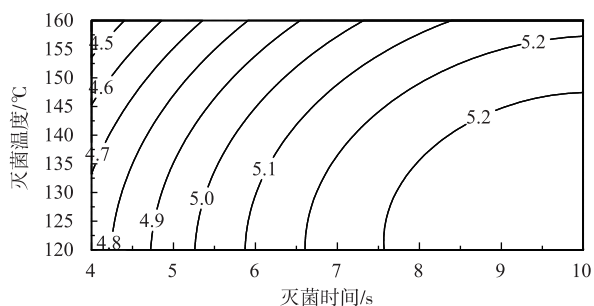
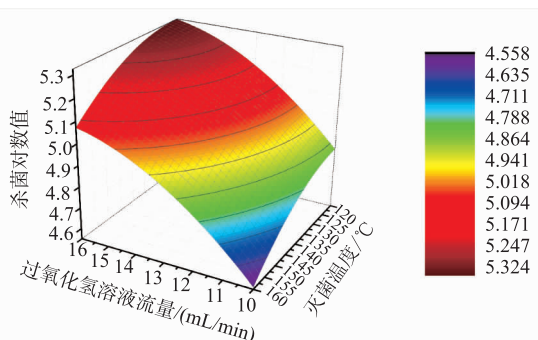
说明各交互作用对杀菌效果的影响并不显著。



(a)过氧化氢溶液流量和灭菌时间对杀菌效果的交互影响



(b)过氧化氢溶液流量和灭菌温度对杀菌效果的交互影响



(c)灭菌时间和灭菌温度对杀菌效果的交互影响

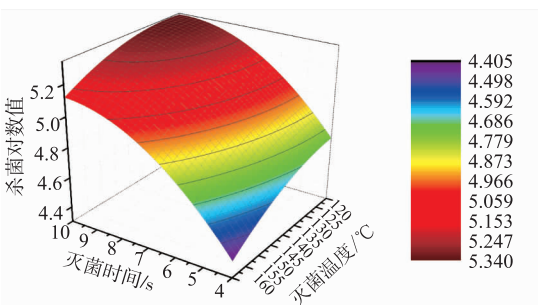


图7 试验各因素对杀菌效果的交互影响响应面图

Fig. 7 Interaction effect of H_2O_2 flow, sterilizing time and sterilizing temperature on sterilization

3 结语

在单因素实验的基础上,本实验利用响应曲面法对汽化过氧化氢杀灭枯草芽孢杆菌的工艺参数进行优化分析。利用 Design Expert 软件建立了三元二次回归模型,方差分析得到,各因素对灭菌效果的影响大小顺序为:灭菌时间 $> H_2O_2$ 溶液流量 $>$ 灭菌温度。 H_2O_2 流量和灭菌时间一次项 X_1 和 X_2 对杀菌对数值(灭菌效果)的影响非常显著,灭菌温度一次项 X_3 比较显著,灭菌时间二次项 X_2^2 对杀菌对数

值(灭菌效果)的影响比较显著,而 H_2O_2 流量和灭菌温度二次项 X_1^2 和 X_3^2 均不显著,交互项对杀菌效果的影响均不显著。对回归模型进行分析,得到汽化过氧化氢杀灭 PET 瓶内表面枯草芽孢杆菌的最佳工艺条件为:过氧化氢溶液流量 14 mL/min,灭菌时间 9 s,灭菌温度 120 °C,在此条件下试验得出,汽化过氧化氢对枯草芽孢杆菌的杀菌对数值可达 5.40 log,说明建立的回归模型可靠,能很好地预测出 H_2O_2 流量、灭菌时间和灭菌温度与灭菌效果(杀菌对数值)之间的关系。

参考文献:

- [1] MANFREDI M, VIGNALI G. Comparative life cycle assessment of hot filling and aseptic packaging systems used for beverages [J]. **Journal of Food Engineering**, 2015, 147: 39-48.
- [2] CARDOSO C, FARIA F, MIRANDA W, et al. Modeling of sporicidal effect of hydrogen peroxide in the sterilization of low density polyethylene film inoculated with *Bacillus subtilis* spores[J]. **Food Control**, 2011, 22(10): 1559-1564.
- [3] MENG J, GONG Y, QIAN P, et al. Combined effects of ultra-high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of *Bacillus subtilis*[J]. **Lwt-Food Science and Technology**, 2016, 68: 59-66.
- [4] SIEMER C, TOEPFL S, HEINZ V. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy - I. Influence of process- and product parameters[J]. **Food Control**, 2014, 39: 163-171.
- [5] ZHANG M, OH J, HUANG S, et al. Priming with nano-aerosolized water and sequential dip-washing with hydrogen peroxide: An efficient sanitization method to inactivate *Salmonella typhimurium* LT2 on spinach[J]. **Journal of Food Engineering**, 2015, 161: 8-15.
- [6] SOMAVAT R, MOHAMED H, SASTRY S. Inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores under ohmic and conventional heating[J]. **Lwt-Food Science and Technology**, 2013, 54(1): 194-198.
- [7] ZHANG Pingjun. Disinfection characteristic of the food grade hydrogen peroxide and its application in the food industry [J]. **Dairy Industry China**, 2005, 33(7): 47-50. (in Chinese)
- [8] BLUESKI Yu. Vaporized hydrogen peroxide sterilization and applications in animal facilities [J]. **Pharmaceutical & Engineering Design**, 2012, 33(2): 49-53. (in Chinese)
- [9] YU Xiaofeng. Advance in sterilization mechanism of hydrogen peroxide [J]. **Chinese Journal of Disinfection**, 1988, 5(3): 149-152. (in Chinese)
- [10] MALIK D, SHAW C, RIELLY C, et al. The inactivation of *Bacillus subtilis* spores at low concentrations of hydrogen peroxide vapour[J]. **Journal of Food Engineering**, 2013, 114(3): 391-396.
- [11] KIRCHNER P, LI B, SPELTHAHN H, et al. Thin-film calorimetric H₂O₂ gas sensor for the validation of germicidal effectivity in aseptic filling processes[J]. **Sensors and Actuators B-Chemical**, 2011, 154(2): 257-263.
- [12] PRUSS K, STIRTZEL S, KUŁOZIK U. Influence of the surface temperature of packaging specimens on the inactivation of *Bacillus spores* by means of gaseous H₂O₂[J]. **J Appl Microbiol**, 2012, 112(3): 493-501.
- [13] SHI Yun. Discussion of application of VHP room temperature sterilization system [J]. **Pharmaceutical & Engineering Design**, 2011, 32(3): 12-14. (in Chinese)
- [14] DING Xiaoyue, LIANG Yi. The observation and exploration of the latest foreign low-temperature vaporized hydrogen peroxide (VHP) sterilization system[J]. **Mechanical and Electrical Information**, 2010, 26: 45-47. (in Chinese)
- [15] 唐丽杰. 微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2005: 57-71.
- [16] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 99-102.
- [17] UNGER-BIMCZOK B, KOTTKE V, HERTEL C, et al. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor [J]. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, 2008, 3(2): 123.
- [18] WATLING D, PARKS M. The relationship between saturated hydrogen peroxide, water vapour and temperature [J]. **Pharmaceutical Technology Europe**, 2004, 16(3): 50.
- [19] ZHANG Xiayun, ZHU Wenqing. Observation on germicidal efficacy of vapor phase hydrogen peroxide the purification space[J]. **Chinese Journal of Disinfection**, 2011, 28(3): 260-262. (in Chinese)
- [20] 克罗内斯股份公司. 用于包装容器杀菌的方法和装置. 中国, CN008029555[P]. 2002-02-20.
- [21] BJERBORN T. Method of sterilizing a package material. US 6682696[P]. 2004-01-27.
- [22] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002, 115-154.
- [23] LU Chen, ZOU Yuhong, ZHANG Shikang, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of protein from tea residue by response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(3): 319-325. (in Chinese)