

低温碱性脂肪酶型时间-温度指示剂的研究

任兴晨,茅林春*,苑佳佳,卢文静

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院,浙江杭州 310058)

摘要:利用碱性脂肪酶催化三乙酸甘油酯分解导致 pH 降低,以酸碱指示剂显示颜色变化,研究并确定低温环境的 TTI(时间温度指示剂)的反应体系及基本特性。该时间温度指示剂(25 mL)的反应体系为:5 mL 三乙酸甘油酯:20 g/L 聚乙烯醇乳液($v:v=1:19$,均质 10000 r/min,每次 3 min,间隔 5 min,共两次)、19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液、0.05 mL 1 g/L 碱性脂肪酶液、0.25 mL 0.10 mol/L CaCl_2 溶液、0.20 mL 百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂。通过测定反应体系在不同温度下的 pH 下降速率,最终确定该反应体系的 E_a 为 60.14 kJ/mol。该反应体系可应用于监测低温环境下食品中酶反应或脂肪分解的程度,间接判断对应食品的品质状况。

关键词:时间温度指示剂,碱性脂肪酶,反应体系,活化能

Research on low-temperature TTI based on lipase

REN Xing-chen, MAO Lin-chun*, YUAN Jia-jia, LU Wen-jing

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The reaction system and basic characteristic of low-temperature TTI (time-temperature indicator) was determined. The TTI was based on the color change of pH indicator resulted from the hydrolysis of triacetin by alkaline lipase. Finally, parameters of 25 mL reaction system was determined: 5 mL triacetin: 20 g/L polyvinyl alcohol emulsion ($v:v=1:19$, 10000 r/min, every time 3 min, 5 min intervals, a total of 2 times), 19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH buffer, 0.05 mL 1 g/L alkaline lipase, 0.25 mL 0.10 mol/L CaCl_2 solution, 0.20 mL Thymol blue-phenolphthalein-thymolphthalein mixture indicator. The activation energy of TTI was determined to be 60.14 kJ/mol by measuring pH descending rate at different temperature. The TTI can be applied to monitor enzyme reaction or steatolysis of low-temperature food, and further to indicate the quality of corresponding food.

Key words: time-temperature indicator; alkaline lipase; reaction system; activation energy

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)10-0251-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.10.042

食品质量的变化程度在很大程度上取决于食品贮运时间的长短和所处环境温度的高低^[1]。时间温度指示剂(time-temperature indicator,简称 TTI)贴附在食品包装上,和食品经历了相同的温度历史效应,通过产生简单的机械形变或颜色变化来指示食品在流通过程中经历的时间和实际温度的双重效应,从而监测食品质量变化和剩余货架期^[2-3]。它可以应用于易变质食品的物流中,监测食品从生产到销售全部或部分温度历史,以确保食品品质安全。

国际上已开展 TTI 的研制,并在牛奶^[4]、冷冻鱼^[5]、冷冻肉^[6]、冷冻汉堡^[7]、冷藏水果及蔬菜^[8]上进行了应用性研究。根据 TTI 的工作原理可以分为:酶型、微生物型、聚合物型、电子型、扩散型等^[9]。其中酶型 TTI 原理简单,易于控制^[3]。脂肪酶为甘油三酯水解酶,能够逐步将甘油三酯水解成甘油二酯、甘油单酯、甘油和脂肪酸^[10],使反应体系 pH 降低,其来源

广泛,价格低廉。

现有报道的脂肪酶型 TTI 反应体系是在 20 ℃ 条件下研究确定的^[11],其反应体系在冷藏温度下的适用性还无法确定。为了确保 TTI 在食品冷藏温度下的适用性,本实验研究了 4 ℃ 条件下的碱性脂肪酶 TTI 反应体系,基本确定了底物种类、乳化处理、金属离子、底物浓度、pH 指示剂等关键组分。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

LVK-F100 型碱性脂肪酶(20000 U/g) 深圳市绿微康生物工程有限公司;三乙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、三油酸甘油酯、聚乙烯醇 124、氯化钠、氯化钙、氯化钾、氯化镁、酚酞、百里酚酞、酚红、百里香酚蓝、氢氧化钠、甘氨酸 国药集团化学试剂有限公司。

FSH-2A FS-2 型可调分散器 金坛市科析仪器有限公司;MIR-254 型培养箱 日本 SANYO 公司;CR

收稿日期:2015-09-29

作者简介:任兴晨(1991-),女,硕士研究生,主要从事水产品保鲜方面的研究,E-mail:xingchen5624@163.com。

*通讯作者:茅林春(1962-),男,博士,教授,主要从事果蔬及水产品保鲜方面的研究,E-mail:linchun@zju.edu.cn。

基金项目:国家科技支撑计划课题(2015BAD17B03)。

-200 型色差计 日本 KONICA MINOLTA 公司; FE20 型实验室 pH 计 瑞士 METTLER TOLEDO 公司。

1.2 反应体系的确定

1.2.1 试剂配制 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液: 250 mL 0.20 mol/L 甘氨酸溶液与 227.50 mL 0.20 mol/L 氢氧化钠溶液混合, 加水定容至 1000 mL, 调节 pH 至 10.60。

1 g/L 碱性脂肪酶液: 称取 0.10 g 碱性脂肪酶, 用 Gly-NaOH 缓冲液定容至 100 mL, 静置 1 h, 过滤取滤液, 4 °C 下保存。

酚红-酚酞-百里酚酞混合指示剂: 称取 0.10 g 酚红, 0.50 g 酚酞, 0.20 g 百里酚酞, 溶于 100 mL 60% 乙醇中, 静置 12 h 后抽滤。

百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂: 称取 0.10 g 百里香酚蓝, 0.30 g 酚酞, 0.10 g 百里酚酞, 溶于 100 mL 50% 乙醇中, 静置 12 h 后抽滤。

1.2.2 反应底物的确定 分别取 0.25 mL 三乙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、三油酸甘油酯, 与 4.75 mL 20 g/L 聚乙烯醇 (PVA) 混合, 用可调分散器乳化两次, 转速 10000 r/min, 每次 3 min, 间隔 5 min^[12]。分别在三种乳化液中加入 19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液, 在 4 °C 下预冷 10 min, 加入 0.05 mL 1 g/L 碱性脂肪酶液, 放置在 4 °C 恒温箱, 每隔 4 h 用 pH 计测 pH。

1.2.3 乳化处理参数的确定 底物和乳化剂分 3 组处理: 第 1 组 0.25 mL 三乙酸甘油酯加入 4.75 mL 20 g/L PVA 混合, 10000 r/min 均质, 每次 3 min, 间隔 5 min, 共两次; 第 2 组 0.25 mL 三乙酸甘油酯加入 4.75 mL 20 g/L PVA, 不均质; 第 3 组 0.25 mL 三乙酸甘油酯加入 4.75 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液^[11]。反应体系同 1.2.2, 放置在 4 °C 恒温箱中, 每隔 4 h 测 pH。

1.2.4 金属离子对 TTI 反应体系的影响 三乙酸甘油酯与 PVA 按 1:19 (v:v) 混合后均质 (10000 r/min, 每次 3 min, 间隔 5 min, 共两次), 取 5 mL 乳化液分别加入到五组 19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液中, 对照组中加入 0.25 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液, 4 个实验组中分别加入 0.25 mL 0.10 mol/L CaCl₂、NaCl、KCl、MgCl₂ 溶液, 其余反应条件同 1.2.2, 每隔 4 h 测 pH。

1.2.5 底物浓度的选择 底物含量配比见表 1, 反应条件同 1.2.2, 每隔 4 h 测 pH。

表 1 底物含量配比

Table 1 The content of substrate concentration

组别	三乙酸甘油酯 (mL)	20 g/L 聚乙烯醇 (mL)	缓冲液 (mL)	酶液 (mL)	0.10 mol/L CaCl ₂ 溶液 (mL)
a	0.15	2.85	21.50	0.05	0.25
b	0.20	3.80	20.50	0.05	0.25
c	0.25	4.75	19.50	0.05	0.25
d	0.30	5.70	18.50	0.05	0.25
e	0.35	6.65	17.50	0.05	0.25

1.2.6 pH 指示剂的确定 0.25 mL 三乙酸甘油酯与 4.75 mL PVA 混合均质 (10000 r/min, 每次 3 min, 间隔 5 min, 共两次), 再加入 19.50 mL 缓冲液, 0.05 mL 酶液, 0.25 mL 0.10 mol/L CaCl₂ 溶液, 分别加入 0.20 mL 酚红-酚酞-百里酚酞混合指示剂、百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂。4 °C 下每隔 4 h 测 pH, 并用色差计测定反应液色泽。

1.3 TTI 反应体系动力学参数的测定

目前对时间温度指示剂的动力学参数 Ea 研究报道的只有 Arrhenius 模型, 即 $\ln K = \ln K_A - E_a / (R \times T)^{[13-14]}$ 。本实验通过在不同温度下测量体系的 pH, 得到 pH 下降速率 K 进而求得 Ea 值。25 mL 反应体系: 0.25 mL 三乙酸甘油酯与 4.75 mL 20 g/L PVA 混合均质 (10000 r/min, 每次 3 min, 间隔 5 min, 共两次)、19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH 缓冲液、0.05 mL 1 g/L 碱性脂肪酶液、0.25 mL 0.10 mol/L CaCl₂ 溶液、0.20 mL 百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂。将反应体系分别置于 4、10、15、20、25 °C 下, 每隔 4 h 测 pH。

1.4 数据处理

全部实验数据用 Origin 8.1 进行统计处理, 计算标准偏差; 并使用 SPSS 19.0 进行差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 TTI 反应体系的确定

2.1.1 底物的选择 脂肪酶为甘油三酯酶^[10], 因此本实验底物从三种常见的甘油三酯中选择。三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯乳化后溶液呈白色, 上层漂浮微小油滴。与三乙酸甘油酯组 pH 变化 (100%) 相比, 三丁酸甘油酯和三油酸甘油酯 pH 相对变化幅度分别为 29.30%、16.28%, 这两种反应体系 pH 下降幅度小、速度慢; 三乙酸甘油酯乳化后为透明均一液体, pH 从 10.46 下降到 8.31, pH 跨度广 (图 1)。三乙酸甘油酯反应体系 pH 呈现出指数变化规律, 将曲线用指数函数拟合, 拟合系数为 0.9635, pH 呈现出良好的时间相关性。因此, 选择三乙酸甘油酯作为 TTI 反应体系的底物。

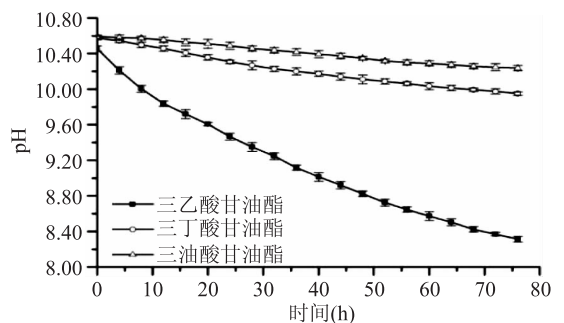


图 1 三乙酸甘油酯反应体系 pH-时间关系图

Fig.1 pH-time relationship of triacetin reaction system

2.1.2 乳化处理的效果 各反应体系 pH 均呈现指数变化的规律, 将各曲线用指数函数拟合, 不加乳化剂不均质组、加乳化剂不均质组、加乳化剂并均质组的拟合系数分别为: 0.9449、0.9410、0.9624, 不加乳化

剂不均质组与加乳化剂不均质组的拟合系数无显著差异 ($p = 0.066$), 加乳化剂并均质组与其他两组的拟合系数具有显著差异 ($p < 0.01$), 加乳化剂并均质组的拟合程度显著高于其他组, pH 与时间相关性好。因此, 本实验选择加乳化剂并均质处理, 处理参数为 10000 r/min, 每次 3 min, 间隔 5 min, 共两次。

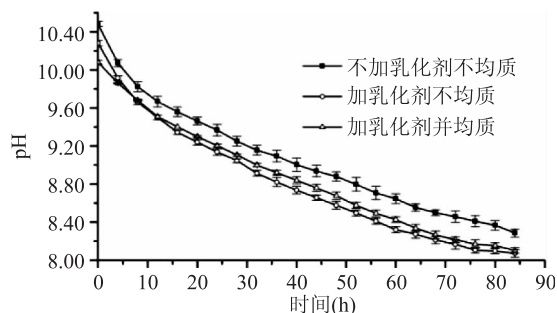


图2 乳化处理对反应体系 pH 的影响
Fig.2 Effect of emulsification on pH value of reaction system

2.1.3 金属离子的选择 有文献报道^[15], Na^+ 能降低反应体系界面电荷效应的抑制作用, 提高酶活力。1 mmol/L K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 可以增强脂肪酶活力^[16]。实验结果显示, 各实验组 pH 差别较小, 根据图像无法判断金属离子对反应体系的影响 (图 3)。

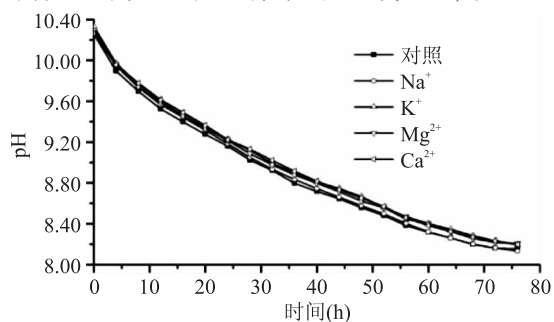


图3 金属离子对反应体系 pH 的影响
Fig.3 Effect of metal ions on pH value of reaction system

反应 60 h 内, pH 随时间的变化呈现出指数变化的规律, 将各曲线用指数函数进行拟合^[17]。对照、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 反应体系拟合系数分别为 0.9683、0.9669、0.9679、0.9673、0.9838。对照组、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 实验组的拟合系数两两之间无显著差异, Ca^{2+} 实验组与其他各组均有显著差异 ($p < 0.01$), Ca^{2+} 实验组的拟合程度显著高于其余实验组, 所以金属离子选择 Ca^{2+} 。

2.1.4 底物浓度的确定 如图 4 所示, 五组不同底物浓度的反应体系中 e 组 pH 变化最大。与 e 组 (100%) 比较, a、b、c、d 组的相对变化幅度分别为 59.38%、75.45%、90.63%、95.98% (图 4)。a 组和 b 组 pH 相对变化幅度较小, 加入 pH 指示剂后指示剂的颜色变化不明显。c、d、e 组 pH 相对变化幅度大, 但 d、e 反应速率太快, 导致时间温度指示剂的指示时间较短, 适合在 4 °C 下储存时间特别短的食品。从水产品实际保存时间来考虑, c 组的底物含量最优。c 组反应曲线的指数函数的拟合系数为 0.9834,

pH 与时间的相关性好, 因此底物浓度选择 c 组。

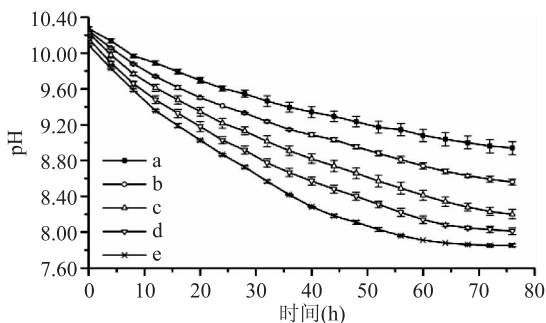


图4 底物浓度对反应体系 pH 的影响
Fig.4 Effect of substrate concentration on pH value of reaction system

2.1.5 pH 指示剂的确定 酚红-酚酞-百里酚酞混合指示剂体系 L^* 随时间先升高后趋于平缓, a^* 先升高后下降, b^* 基本呈上升趋势 (图 5)。与酚红-酚酞-百里酚酞混合指示剂 (L^* 、 a^* 、 b^* 与时间的线性拟合系数分别为 0.8080、0.3624、0.6219) 相比, 百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂体系的 L^* 、 a^* 、 b^* 有较好的时间相关性 (L^* 、 a^* 、 b^* 与时间的线性拟合系数分别为 0.9943、0.9565、0.9689), 随时间增加, L^* 增大, a^* 由正值趋于 0, b^* 由负值趋于 0 (图 6), 说明反应体系颜色逐渐变浅, 最终呈现无色透明溶液。本实验选择百里香酚蓝-酚酞-百里酚酞混合指示剂, 反应液的颜色变化顺序为蓝色-深紫-浅紫-无色, 无色时即为反应终点, 反应终点辨识度高 (图 7)。

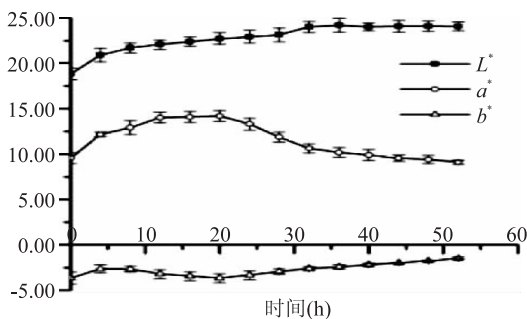


图5 酚红-酚酞-百里酚酞混合指示剂反应体系 L^* 、 a^* 、 b^* 值与时间关系图
Fig.5 Relationship of L^* 、 a^* 、 b^* value and time in Phenol red-phenolphthalein-thymolphthalein indicator reaction system

2.2 TTI 反应体系动力学参数的测定

随着温度的升高, 反应速率加快。在各温度下, 反应的初期 pH 的变化呈现指数变化的趋势 (图 8), 对各反应曲线进行指数函数的拟合, 得到反应速率和决定系数 R^2 (表 2)。

根据 Arrhenius 方程, $\ln K = \ln K_A - Ea / (R \times T)$, 以 $\ln K$ 对 $1/T \times 1000$ 作线性图, 则斜率为 $-Ea / (R \times 1000)$, 得到回归方程 $y = -7.23x + 20.34$, R^2 为 0.9985 (图 9), 因此 $Ea / (R \times 1000) = 7.23$, 求得 Ea 为 60.14 kJ/mol。根据 TTI 应用于食品的匹配原则, 以及引起食品质量下降的主要反应的活化能, 可以判断该 TTI 可以指示因酶反应 (典型活化能值: 41.84 ~

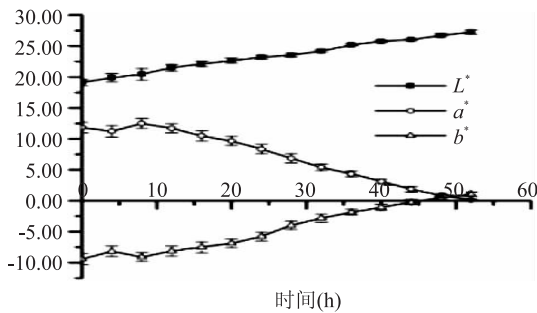


图6 百里香酚蓝-酚酞-百里香酚混合指示剂反应体系 $L^* a^* b^*$ 值与时间关系图

Fig.6 Relationship of $L^* a^* b^*$ value and time in Thymol blue-phenolphthalein-thymolphthalein indicator reaction system

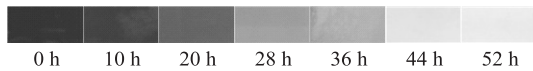


图7 反应体系颜色变化

Fig.7 The color change of reaction system

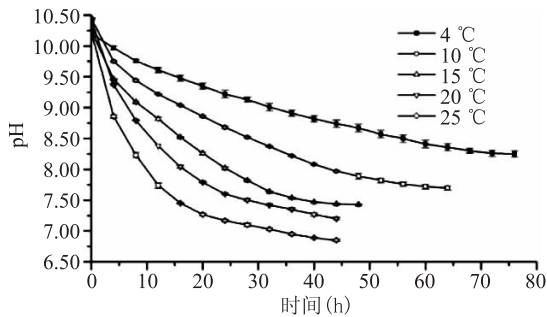


图8 温度对反应体系 pH 的影响

Fig.8 Effect of temperature on pH value of reaction system

表2 不同温度下反应体系的反应速率和拟合曲线决定系数
Table 2 Response rate constants and determination coefficient for reaction system at different temperature

T(°C)	T(K)	K(h ⁻¹)	R ²
4	277	0.0031	0.9813
10	283	0.0055	0.9625
15	288	0.0086	0.9724
20	293	0.0124	0.9423
25	298	0.0201	0.9450

62.76 kJ/mol)或脂肪氧化(典型活化能值:41.84~104.60 kJ/mol)导致品质下降的食品质量变化^[18],应用范围较广。但该TTI具体应用于哪种食品,需要进一步测定特定食品的Ea值和反应终点Ea值才能确定。

3 结论

研究确定了适用于低温(4 °C)环境的碱性脂肪酶型TTI反应体系。反应体系总体积25 mL,包括5 mL三乙酸甘油酯:20 g/L聚乙烯醇乳化液(v:v=1:19,均质10000 r/min,每次3 min,间隔5 min,共两次)、19.50 mL 0.05 mol/L pH10.60 Gly-NaOH缓冲液、0.05 mL 1 g/L碱性脂肪酶液、0.25 mL 0.10 mol/L CaCl₂溶液、0.20 mL百里香酚蓝-酚酞-百里香酚混

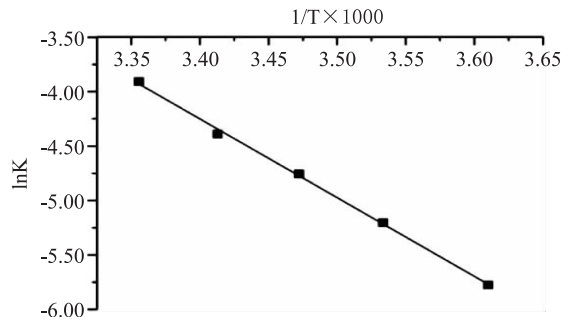


图9 不同温度条件下TTI速率常数与1/T半对数图

Fig.9 Relationship of response rate constant and temperature

合指示剂。反应体系的pH与时间相关性好,颜色变化为蓝色-深紫-浅紫-无色,变化显著,辨识度高,反应体系无色时即为反应终点。通过测定不同温度下的反应速率,确定了反应体系的活化能为60.14 kJ/mol,该时间指示剂可以指示因酶反应或脂肪氧化导致品质下降的食品质量变化。

参考文献

- [1]蔡华伟,任发政,张恒涛,等.淀粉酶型时间-温度指示卡的研制[J].食品科学,2006,27(11):60-62.
- [2]Taoukis P S, Labuza T P. Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products [J]. Food Science, 1989, 54(4):783-788.
- [3]贾增芹,卢立新.商业化时间-温度指示器的研究进展及应用[J].食品与机械,2012,28(1):250-253.
- [4]Wells J H, Singh R P. Application of time-temperature indicators in monitoring changes in quality attributes of perishable and semiperishable foods[J]. Journal of Food Science, 1988(53):148-152.
- [5]Mendoza T F, Weit B A, Otweii S, et al. Kinetic parameter stimulation of time-temperature integrators intended for use with packaged fresh seafood [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(3):90-96.
- [6]Yoon S H, Lee C H, Kim D Y, et al. Time-temperature indicator using phospholipid-phospholipase system and application to storage of frozen pork[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(3):490-493.
- [7]Wells J H, Singh R P, Noble A. A graphical interpretation of time-temperature related quality changes in frozen food [J]. Journal of Food Science, 2006, 52(2):435-439.
- [8]Giannakourou M C, Taoukis P S. Systematic application of time-temperature integrators as tools for control of frozen vegetable quality [J]. Journal of Food Science, 2006, 67(6):2221-2228.
- [9]成欢,朱光明,宋蕊.时间温度指示剂研究进展[J].化工进展,2013,32(4):885-890.
- [10]龚福生,施巧琴,吴松刚.不同微生物碱性脂肪酶对底物水解能力的比较[J].福建轻纺,2000(1):1-4.
- [11]宁鹏,费英,徐幸莲,等.碱性脂肪酶型时间-温度指示卡反应体系的研究[J].南京农业大学学报,2009,32(1):115-120.
- [12]吴丹.碱性脂肪酶货架寿命指示体系的开发[D].杭州:

(下转第267页)

2.1.4 萃取时间对肉豆蔻出油率的影响 如图4所示,随着萃取时间的延长,出油率会随之增加;在达到某一时间后,继续延长萃取时间对出油率无明显变化。萃取过程是肉豆蔻油逐渐溶解于溶剂的过程,时间越长,萃取出的油越多,但当溶剂内溶解的油趋近饱和时,此时出油率也逐渐趋于稳定,继续增加萃取时间不会再提高出油率。

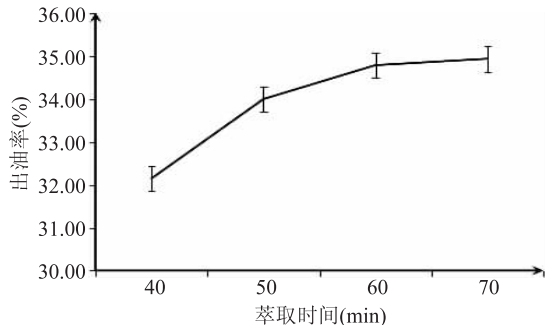


图4 萃取时间对出油率的影响

Fig.4 Effect of time on extraction ratio

2.2 肉豆蔻的亚临界提取正交实验

根据表2极差R直观分析,实验因素的主次排序, A > B > C > D。即原料粉碎度影响最大,萃取温

表2 L₉(3⁴)正交实验结果

Table 2 The L₉(3⁴) orthogonal experiments results

实验号	A	B	C	D	出油率(%)
1	1	1	1	1	26.17
2	1	2	2	2	27.87
3	1	3	3	3	22.17
4	2	1	2	3	36.29
5	2	2	3	1	34.05
6	2	3	1	2	27.19
7	3	1	3	2	35.00
8	3	2	1	3	32.61
9	3	3	2	1	26.92
k ₁	25.403	32.487	28.657	29.047	
k ₂	32.510	31.510	30.360	30.020	
k ₃	31.510	25.427	30.407	30.357	
R	7.107	7.060	1.750	1.310	

(上接第254页)

浙江大学,2005.

[13] Dan Wu, Yajun Wang, Jianchu Chen, et al. Preliminary study on time-temperature indicator(TTI) system based on urease[J]. Food Control, 2013(34):230-234.

[14] Chahattuche Wanihsuksombat, Vipa Hongtrakul, Panuwat Suppakul. Development and characterization of a prototype of a lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality [J]. Journal of Food Engineering, 2010(100): 427-434.

度次之,萃取时间最小。由k值可得最佳萃取工艺为A₂B₁C₃D₃,即原料粉碎度40目,萃取温度50℃,萃取次数5次,萃取时间60min。由方差分析表3可知,原料粒度和萃取温度对肉豆蔻出油率有极显著影响,萃取次数和萃取时间的影响不显著。

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance table

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	88.796	2	1.916	4.460	**
B	87.804	2	1.895	4.460	**
C	5.966	2	0.129	4.460	
D	2.777	2	0.060	4.460	
误差	46.33	2			

注:** (p < 0.01), 为极显著。

2.3 验证实验

按照正交实验分析出的最佳萃取工艺,即原料粉碎度40目,萃取温度50℃,萃取次数5次,萃取时间60min的条件,进行验证实验,得到的肉豆蔻出油率为36.87%,由此可以证明正交实验得出的萃取工艺条件为最佳工艺条件。

3 结论

通过单因素实验和正交实验可知,亚临界萃取肉豆蔻的最佳工艺条件如下:原料粉碎度40目,萃取温度50℃,萃取次数5次,萃取时间60min。在此条件下进行生产肉豆蔻出油率可达36.87%。

参考文献

[1] 朱海涛,董贝森.调味品及其应用[M].济南:山东科学技术出版社,1999:1-110.

[2] 张子英,爱民,李兰城.肉豆蔻的药理研究进展[J].内蒙古医学杂志,2007,39(4):458-459.

[3] 陈杰明,汤卫东,陈吉红,等.CO₂超临界萃取肉豆蔻油树脂的研究[J].江苏调味副食品,2005,22(3):23-26.

[4] 刘辉,李超.超声辅助提取肉豆蔻油的工艺研究[J].中国食品添加剂,2011(3):133-137.

[5] 过利敏,张谦,李兰,等.孜然油的亚临界萃取工艺研究[J].新疆农业科学,2015,52(6):1071-1076.

[6] 刘月荣,陈晔,郑建灿,等.亚临界萃取设备在天然产物有效成分提取中的应用[J].莆田学院学报,2012,19(2):73-75.

[7] 李超,刘辉.超临界萃取肉豆蔻油的工艺研究[J].中国食品添加剂,2011(3):133-137.

[8] 过利敏,张谦,李兰,等.孜然油的亚临界萃取工艺研究[J].新疆农业科学,2015,52(6):1071-1076.

[9] 刘月荣,陈晔,郑建灿,等.亚临界萃取设备在天然产物有效成分提取中的应用[J].莆田学院学报,2012,19(2):73-75.

[10] 李超,刘辉.超临界萃取肉豆蔻油的工艺研究[J].中国食品添加剂,2011(3):133-137.

[11] 过利敏,张谦,李兰,等.孜然油的亚临界萃取工艺研究[J].新疆农业科学,2015,52(6):1071-1076.

[12] 刘月荣,陈晔,郑建灿,等.亚临界萃取设备在天然产物有效成分提取中的应用[J].莆田学院学报,2012,19(2):73-75.

[13] Rathi P, Saxena R K, Gupta R. A novel alkaline lipase from Burkholderia cepacia for detergent formulation [J]. Process Biochemistry, 2001, 37(2): 187-192.

[14] 周晶.一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其酶学性质研究[D].杭州:中国计量学院,2012.

[15] 宁鹏.碱性脂肪酶型时间-温度指示卡的研制[D].南京:南京农业大学,2008.

[16] 郑光,钱静,冯钦.糖化酶型时间-温度指示器反应体系的制备[J].食品科学,2013,34(12):82-85.