

## 固态酶型时间温度指示器性能研究

唐园园, 钱静

(江南大学, 无锡 214122)

**摘要:** **目的** 以糖化酶、淀粉为主要原料, 研制一种激活方便的固态酶型时间-温度指示器。**方法** 对糖化酶进行微胶囊化处理, 以糖化酶反应体系为基础, 研究不同因素对指示器色差值的影响, 确定在 4 ℃ 条件下, 时间在 5~6 d 的指示器配比。**结果** 确定了固态酶型 TTI 的反应配方, 通过测定其在不同温度下的反应速率, 得到了 7 组 TTI 体系的活化能, 其活化能值分别为 106.68, 98.47, 87.66, 89.73, 106.74, 97.51 和 87.99 kJ/mol。**结论** 得到可用于 4 ℃ 条件下的时间温度指示器的 7 组配方, 根据其活化能的不同, 可用于指示不同产品的货架期。

**关键词:** 时间-温度指示器; 淀粉; 糖化酶微胶囊; 色差值; 琼脂

**中图分类号:** TB484.9; TS205.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2017)01-0097-06

## Characteristics of Time-temperature Indicator with Solid-state Enzyme

TANG Yuan-yuan, QIAN Jing  
(Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT:** The work aims to develop a conveniently-activated time-temperature indicator with solid-state enzyme with glucoamylase and starch as the main raw materials. Glucoamylase microcapsules were prepared and the effects of different factors on the color difference of the indicator were studied based on the reaction system of glucoamylase. The formula of the indicator at 4 ℃ and within 5-6 days was determined. The formula of TTI with solid-state enzyme was determined, and 7 groups of TTI system activation energies were obtained through measuring the reaction rate at different temperatures. The activation energy values were respectively 106.68, 98.47, 87.66, 89.73, 106.74, 97.51 and 87.99 kJ/mol. 7 groups of TTI formulas are obtained at 4 ℃. According to the different activation energies, they can be used to indicate the shelf life of different products.

**KEY WORDS:** time-temperature indicator; starch; glucoamylase microcapsules; color difference; agar

近年来,随着经济的不断发展以及人们生活水平的提高,消费者对于食品质量问题越来越关注。很多易腐败的产品从开始的生产、运输、储运以及售卖过程中,受温度的影响非常重要。对于需要低温运输和储存的食品,低温环境温度的变化,是造成食品质量安全的重要原因,同时还会带来经济方面的损失<sup>[1]</sup>。时间-温度指示器(TTI)的出现可以很好的监测食品的保质期。时间-温度指示剂/器作为包装的一部分,在低温运输中随着时间和温度的变化发生明显的颜色变化,并且这种变化是不可逆的。TTI作为一种监测食品质量随时间和温度变化的指示方法,可以用于提

示消费者产品的剩余货架期<sup>[2-4]</sup>。

TTI可以基于机械、电化学、化学、酶学等原理得以实现。国外对于温度-时间指示器的开发远早于我国,有很多的指示器已经实现了商业化。国外研究的 TTI 种类繁多,在酶型 TTI 方面, Keehyuk Kim 和 Hye Ri Park<sup>[5-6]</sup>研究了漆酶型 TTI 及其动力学特征。Dong Yeol Choi, Hye Ri Park 和 Eunice Kim<sup>[7-9]</sup>等利用丝网印刷技术制备了微生物型 TTI 对于猪肉和鸡肉的货架期监测。Silvia Zabala González 等<sup>[10]</sup>利用旋转印刷技术制作了时间温度智能标签并研究了动力学特点。目前国内在酶学方面的研究较多,酶型

收稿日期: 2016-08-03

作者简介: 唐园园(1989—),女,江南大学硕士生,主攻运输包装。

通讯作者: 钱静(1968—),女,博士,江南大学副教授,主要研究方向为运输包装,机械设计,相变材料等。

指示器主要通过酶与底物的反应,随着时间的延长和温度积累产生明显的可视颜色变化<sup>[11]</sup>。吴秋明等采用脲酶开发货架寿命体系<sup>[12]</sup>;田秋实等研究了一种基于蛋白酶反应为基础的酶变型TTI<sup>[13]</sup>;卢立新、宁鹏等研究了碱性脂肪酶型TTI,通过反应体系的pH变化原理制成时间-温度指示器<sup>[14-16]</sup>;葛蕾等对于以酪氨酸酶为基础的时间-温度指示系统进行了初步研究<sup>[17]</sup>;蔡华伟等进行了对淀粉酶型TTI的研制<sup>[18]</sup>。同时,钱静、郑光临、冯钦等开发了糖化酶型TTI对于冷鲜肉的监控以及固定酶型TTI对于酸奶的监测<sup>[19-20]</sup>。

文献检索和研究证实,TTI的激活和未启用前的保存成为TTI商业应用的障碍。可印刷性的TTI将是未来时间-温度指示剂应用的方向。该研究在前期研究的基础上,将固定化和可印刷性作为研究的重点,利用微胶囊酶固定技术将淀粉酶有效固定,与选定淀粉及碘按配比均匀涂覆于纸张表面。TTI的启用激活采用一定厚度的琼脂覆盖在涂覆后的纸张表面,观察其色彩变化用以指示时间-温度历程。底物与酶的充分混合简化了TTI的激活过程,利于印刷TTI标签的工业化应用。

大量的生鲜、果蔬类食品的适宜保存温度为4℃左右,保存时间5~6d。为此,文中讨论的时间-温度指示器将应用于在4℃条件下贮藏时间在6d左右的此类产品。其主要原理是利用糖化酶与淀粉的水解反应,以碘为指示剂,利用颜色的变化来指示产品的新鲜度。

## 1 实验

### 1.1 材料

材料有糖化酶(100 000 U/g),江苏锐阳生物科技有限公司;壳聚糖、海藻酸钠、无水氯化钙、冰乙酸、可溶性淀粉、碘、碘化钾,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

主要仪器与设备有紫外可见分光光度计UV1800;xrite530测色仪、SZQ四面涂布器、RJ-TDL-50A离心机、SHB-III循环水式多用真空泵、JB200-SH型数显恒速强力电动搅拌器、DHG型恒温干燥箱、HW.SY1-P3S恒温水浴锅。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 糖化酶微胶囊的制备

称取壳聚糖0.75g,用乙酸溶解(0.5%),配制成质量分数为0.75%的壳聚糖乙酸溶液备用。配制质量分数为3%的海藻酸钠溶液100mL,加入0.1g糖

化酶,搅拌均匀后用10mL的注射器以0.5mL/s的速度滴入0.4mol/L的氯化钙溶液中,得到胶珠后用pH值4.6的缓冲液冲洗3次后加入到壳聚糖乙酸溶液中搅拌完成成膜反应,离心分离,抽滤,然后在37℃下干燥。得到的微胶囊酶颗粒经过粉碎后过200目筛后放入4℃的冰箱内保存。

#### 1.3.2 TTI体系的单因素试验

经过前期的试验探究,确定TTI系统所用乳化剂为海藻酸钠,这里添加的海藻酸钠一方面可以使体系的粘度增大,方便涂布,另一方面也可以保持涂布后的TTI结构的稳定性。TTI系统每20g组分中的海藻酸钠量(以下出现的百分比含量均表示质量分数)为3%,加入2.5mL的碘液以及淀粉混合均匀后涂布于纸上,待干燥后用3%琼脂盖板(加水量的改变可以通过改变3%琼脂凝胶的厚度来实现)进行激活使用。试验中,选择淀粉量、碘浓度、微胶囊酶量以及琼脂凝胶的厚度作为单因素变量,研究不同因素对于TTI系统色差值 $\Delta E$ 的影响,并确定后期正交试验各因素的水平选择范围。

#### 1.3.3 TTI体系的正交试验

通过上述单因素试验,确定了淀粉量、碘浓度、加入的微胶囊酶量以及琼脂盖板厚度的最佳水平值,并以此为基础,采用L9(3<sup>4</sup>)正交法在4℃条件下进行试验,每隔24h测量TTI体系的色差值 $\Delta E$ 。当体系的颜色由深蓝色变为无色时,则为TTI体系的反应终点,这时可以根据色差值的变化来确定TTI的反应配方。具体TTI体系的颜色随色差值变化而变化见图1。

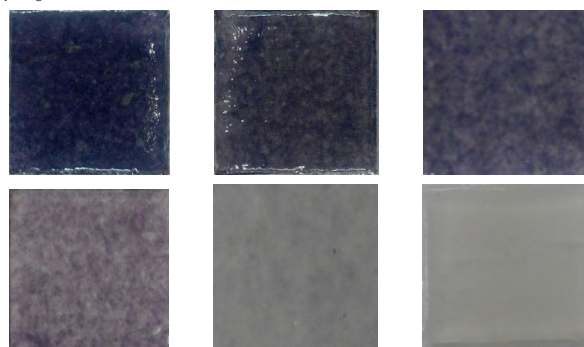


图1 TTI体系的颜色变化  
Fig.1 The color changes of TTI system

#### 1.3.4 TTI体系的动力学参数确定

由Taoukis等<sup>[21]</sup>对于动力学的描述可知,酶催化反应中温度对反应速率的影响遵循Arrhenius公式,TTI体系的色差值变化函数与色差值变化速度的关系函数见式(1)。

$$F(t)=kt \quad (1)$$

式中: $F(t)$ 为TTI的响应函数; $t$ 为时间(h); $k$

为表观反应速率常数 ( $h^{-1}$ )。

对 TTI 体系中色差值随时间的变化曲线图进行相关软件的拟合, 就可以获得不同温度下色差值的变化速度, 即 TTI 反应的速率。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 TTI 体系的单因素试验

单因素试验中, TTI 体系组分以淀粉量 25%, 2.5 mL 浓度为 0.1 mol/L 的碘液(碘液的浓度不同意味着加入体系的碘液质量不同), 微胶囊酶量 0.25%, 琼脂盖板厚度 2 mm 作为 TTI 系统的基本量, 以淀粉量、碘浓度、微胶囊酶量以及琼脂凝胶厚度作为单因素变量, 讨论 4 °C 条件下各因素对 TTI 系统色差值  $\Delta E$  的影响。

由图 2 可观察出不同因素对于 TTI 色差值的影响。淀粉量对于 TTI 体系的影响见图 2a。图 2a 中 4 条曲线变化较为一致, 随着淀粉量的不断增加, 起始色差值也逐渐增大, 使得反应的时间也随之延长。可以看出当淀粉量为 30% 时, 体系的反应时间达到 6 d, 但当淀粉量达到 30% 时, 整个涂布体系的粘稠度变大, 混合时很难均匀, 很容易造成涂布不均的现象, 使 TTI 体系在后期反应中存在误差。碘浓度对于 TTI 体系的影响见图 2b。随着碘浓度的增加, 起始色差值明显增加。从图 2b 中可以观察出所用的碘浓度越大, 反应时间越长, 当碘浓度达到 0.125 mol/L 时, 时间已达到所需的 6 d。所加微胶囊酶量对于体系色差值的影响见图 2c。由于糖化酶经过微胶囊法处理, 在反应的过程中具有缓释作用, 所以图 2c 中的曲线总体较为平缓。随着微胶囊酶量的增加, 反应时间也随之缩短, 当微胶囊酶量为 0.05% 和 0.1% 时, 反应时间为 132 h, 可以满足所需的时间要求。同时发现微胶囊酶量对初始色差值基本无影响。含水量即琼脂凝胶的厚度对于 TTI 色差值的影响见图 2d。盖板的厚度越大即含水量越大, 系统的反应时间就越快, 反之则时间越长, 当盖板厚度为 1 mm 时, 反应时间为 144 h, 可以满足要求。盖板厚度会对颜色的观察有影响, 使反应完成后的残余色差值增加, 所以盖板厚度不能过大, 由此在后续的正交试验中选择 3 mm 作为最大厚度。

在单因素实验中, 符合反应时间为 5 ~ 6 d 的 TTI 体系有 4 个, 具体配方见表 3 中的 1#—4#TTI。

### 2.2 TTI 体系的正交试验

单因素试验探究了单个因素对于 TTI 体系色差值  $\Delta E$  变化的影响, 确定了各因素的水平选择范围, 而正交试验则是在不同因素水平条件下探究 TTI 的  $\Delta E$  影响, 用以找寻更多合适的 TTI 配方。对上述 4

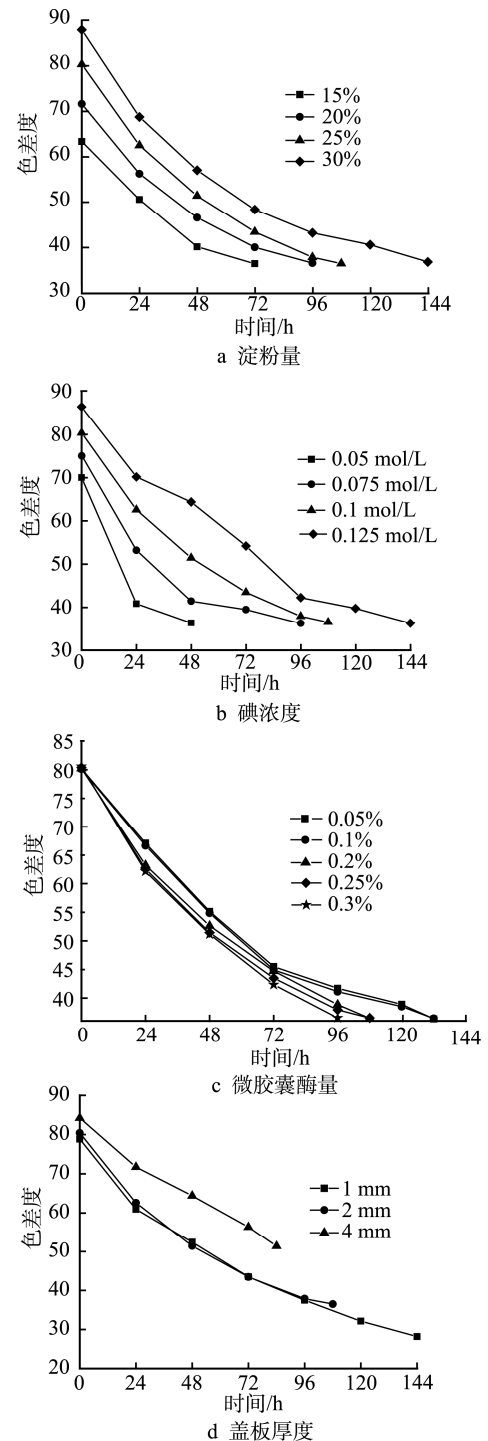


图 2 不同因素对于 TTI 系统色差值的影响  
Fig.2 Effect of different factors to  $\Delta E$  of system reaction

个因素采用 L9 ( $3^4$ ) 正交法进行正交试验, 来得到更多组可以满足时间要求的 TTI 配方。考虑到指示器的颜色变化, 实际操作等因素, 确定微胶囊酶量为 0.05%, 0.15% 和 0.25%。淀粉量在 15% ~ 25% 之间, 具体因素水平见表 1。

正交试验中各组随时间变化的色差值见表 2。从表 2 中可以看出, 满足在 4 °C 条件下, 时间在 120 ~ 144 h 的要求, 符合的试验号为 3, 5, 9。

表1 因素水平  
Tab.1 Factors and levels of orthogonal test

因素	微胶囊酶量A/%	淀粉质量分数B/%	碘浓度C/(mol·L <sup>-1</sup> )	盖板厚度D/mm
水平1	0.05	15	0.05	1
水平2	0.15	20	0.075	2
水平3	0.25	25	0.1	3

正交试验中各组随时间变化的色差值见表2。从表2中可以看出,满足在4℃条件下,时间在120~144h的要求,符合的试验号为3,5,9。

将上述单因素和正交试验中符合时间要求的7组TTI进行编号,具体配方见表3。

表2 正交试验结果  
Tab.2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	色差值						
					0	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1	1	1	1	1	44.73	26.48					
2	1	2	2	2	62.85	40.26	37.45	36.17			
3	1	3	3	3	81.58	68.45	59.87	51.23	45.89	43.38	
4	2	1	2	3	65.85	50.08	43.79				
5	2	2	3	1	70.59	59.4	46.79	40.89	36.22	31.67	28.11
6	2	3	1	2	70.01	46.41	38.23	35.99			
7	3	1	3	2	63.41	50.66	40.18	36.48			
8	3	2	1	3	64.27	44.11					
9	3	3	2	1	73.3	53.52	41.71	36.69	32.04	28.98	

表3 7种TTI所对应的配方  
Tab.3 Seven type of TTI formula

编号	微胶囊酶量/%	淀粉量/%	碘浓度/(mol·L <sup>-1</sup> )	盖板厚度/mm	反应终点时间/h
1 <sup>#</sup> TTI	0.25	25	0.125	2	144
2 <sup>#</sup> TTI	0.05	25	0.1	2	132
3 <sup>#</sup> TTI	0.1	25	0.1	2	132
4 <sup>#</sup> TTI	0.25	25	0.1	1	144
5 <sup>#</sup> TTI	0.05	25	0.1	3	120
6 <sup>#</sup> TTI	0.15	20	0.1	1	144
7 <sup>#</sup> TTI	0.25	25	0.075	1	126

为例,其他6组TTI拟合方式相同,变化相似。由上述的拟合图,可以得到7组TTI在不同温度下的各反应速率以及拟合相关参数,具体数据见表4。

表4 各TTI在不同温度下的各反应速率以及拟合相关参数

Tab.4 The reaction rate and fitting parameters of TTIs in different temperature

	T/K	k/h <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	1/T	lnk
1 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0089	0.9793	0.00361	-4.7217
	288 (15℃)	0.0479	0.9998	0.00347	-3.0393
	298 (25℃)	0.2222	0.9982	0.00336	-1.5043
2 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0142	0.9939	0.00361	-4.2545
	288 (15℃)	0.0558	0.9830	0.00347	-2.8865
	298 (25℃)	0.2810	0.9951	0.00336	-1.2694
3 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0141	0.9936	0.00361	-4.2595
	288 (15℃)	0.0714	0.9884	0.00347	-2.6389
	298 (25℃)	0.1948	0.9986	0.00336	-1.6356
4 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0122	0.9952	0.00361	-4.4047
	288 (15℃)	0.0415	0.9928	0.00347	-3.1830
	298 (25℃)	0.1859	0.9808	0.00336	-1.6824
5 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0126	0.9963	0.00361	-4.3709
	288 (15℃)	0.0542	0.9999	0.00347	-2.9147
	298 (25℃)	0.3222	0.9926	0.00336	-1.1327
6 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0120	0.9948	0.00361	-4.4204
	288 (15℃)	0.0650	0.9994	0.00347	-2.7328
	298 (25℃)	0.2249	0.9995	0.00336	-1.4922
7 <sup>#</sup> TTI	277 (4℃)	0.0228	0.9983	0.00361	-3.7801
	288 (15℃)	0.0563	0.9973	0.00347	-2.8778
	298 (25℃)	0.3375	0.9931	0.00336	-1.0861

### 2.3 TTI体系的动力学参数确定

为测定TTI体系的活化能,需要测定不同温度条件下体系的反应速度。以1<sup>#</sup>TTI为例,不同温度条件下1<sup>#</sup>TTI色差值的变化值及拟合曲线见图3。

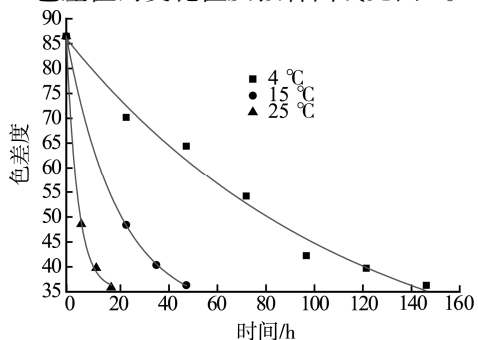


图3 1<sup>#</sup>TTI拟合线  
Fig.3 The fitting line of 1<sup>#</sup>TT

从图3中可以看出,TTI体系在不同温度下反应速度不同,温度越高,反应速度越快。此处仅以1<sup>#</sup>TTI

表 4 中的数据显 示，不同温度下的拟合曲线方程相关系数  $R^2$  均在 0.97 以上，这说明 7 组 TTI 颜色的色差值与时间线性相关性非常显著。表 4 中可以看出反应速率的大小跟温度有很大关系，温度越高，反应速率就越快。根据下面的方程以及表 4 中的数据可以发现固态酶型 TTI 体系颜色的色差值

随时间变化的规律遵循 Arrhenius 方程<sup>[22]</sup>，对 2 边取对数可得：

$$\ln k = \ln k_A - \frac{E_A}{RT} \quad (2)$$

式中： $k$  为反应的速率常数 ( $\text{h}^{-1}$ )； $k_A$  为指前因子 ( $\text{h}^{-1}$ )； $R$  为摩尔气体常数 (这里是  $8.314 \text{ J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$ )； $T$  为热力学温度 ( $\text{K}$ )； $E_A$  为活化能 ( $\text{kJ}/\text{mol}$ )。

以  $\ln k$  对  $1/T$  作图，若两者之间存在很好的线性关系，则表示不同温度下的速率常数遵循 Arrhenius 方程，可求得活化能  $E_A$  值。

由图 4 的拟合曲线可以得到 7 组 TTI 的活化能值，见表 5。参考相应的国内外文献，当一种 TTI 需要指示某种产品时，它与这种产品的活化能差别应该保持在正负  $25 \text{ kJ}/\text{mol}$  以内。如果超过这个范围，那么此 TTI 将不能较为准确的指示该产品，因此，得到的 7 种 TTI 分别可指示的产品活化能范围见表 5。

通过参考文献了解到不同原因引起品质下降的食品活化能是不同的，由扩散控制引起的活化能

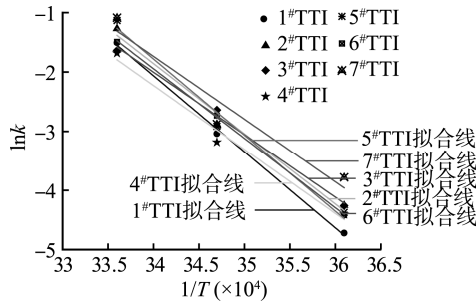


图 4  $\ln k$  对  $1/T$  的线性表示

Fig.4 The linear representation of  $\ln k$  to  $1/T$

表 5 各 TTI 体系可指示的产品活化能范围

Tab.5 The indicate activation energy range of TTIs

TTI	自身活化能 ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	可指示的产品活化能范围 ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
1	106.68	81.68 ~ 131.68
2	98.47	73.47 ~ 123.47
3	87.66	62.66 ~ 112.66
4	89.73	64.73 ~ 114.73
5	106.74	81.74 ~ 131.74
6	97.51	72.51 ~ 122.51
7	87.99	62.99 ~ 112.99

范围为  $0 \sim 62.78 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；酶反应引起的活化能范围是  $41.86 \sim 62.78 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；脂肪氧化引起的活化能范

围为  $41.86 \sim 104.65 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；营养损失引起的活化能范围为  $83.72 \sim 125.58 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；非酶褐变引起的活化能范围为  $104.65 \sim 209.29 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；微生物生长引起的活化能范围为  $41.86 \sim 251.15 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；芽孢致死引起的活化能范围为  $251.15 \sim 334.87 \text{ kJ}/\text{mol}$ ；植物细胞破坏引起的活化能范围是  $209.29 \sim 627.88 \text{ kJ}/\text{mol}$ 。由表 5 中的 7 组 TTI 的活化能范围对照以上数据，不难发现，7 组 TTI 可指示的反应类型较为广泛，除了芽孢致死和植物细胞破坏，其余的反应类型都处于 7 组指示器可以指示的范围内。根据时间温度指示器与产品的匹配原则，除了活化能相匹配外，还应该考虑变温条件下两者反应终点的误差范围。

### 3 结语

通过单因素及正交试验的探索，得到 7 组可以用于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下，反应时间在  $5 \sim 6 \text{ d}$  的固态酶型时间-温度指示器，随着时间与温度的累积，此 TTI 体系的反应呈现出规律性的颜色变化，并且这种颜色变化过程可以很方便的通过肉眼进行观察，这使此种 TTI 在以后的使用中更加简单方便。通过对固态型 TTI 进行动力学研究，确定了 7 组 TTI 的活化能，而对于是否可以用于上述产品的指示，在后期可进行反应终点匹配的实验研究。

国外对时间温度指示剂有了较为深入的研究及一定的应用，国内的研究仍处于科研起步阶段，尚未投入实际应用中，文中所述的固态酶型时间-温度指示器反应结果较液态型稳定，可应用性良好，初步具备了可印刷的特性，投入实际应用时需进一步深入探讨工业化生产的可操作性。

### 参考文献：

[1] 乔磊, 卢立新, 唐亚丽, 等. 酶型时间温度指示器监测冷鲜肉猪肉贮藏货架期[J]. 农业工程学报, 2013, 29(13): 263—269.  
QIAO Lei, LU Li-xin, TANG Ya-li, et al. Monitoring Storage Shelf Life for Chilled Fresh Pork Using Enzymatic Time-temperature Indicator[J]. Agricultural Engineering, 2013, 29(13): 263—269.

[2] WANIHSUKSOMBATA C, HONGTRAKULB V, SUPPAKULA P. 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(3): 427—434.

[3] SHIMONI E, ANDERSON E M, LABUZA T P. Reliability of Time Temperature Indicators under Temperature Abuse[J]. Food Engineering and Physical Properties, 2001, 66(9): 1337—1340.

[4] 田秋实, 谢晶. 时间温度指示剂的发展现状[J]. 渔业现代化, 2009, 36(6): 50—52.

- TIAN Shi-qiu, XIE Jing. Time Temperature Indicator(TTI) Development Status[J]. Fishery Modernization, 2009, 30(6): 50—53.
- [5] KIM K, KIM E, LEE S J. New Enzymatic Time-temperature Integrator(TTI) that Uses Laccase[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 113(1): 118—123.
- [6] PARK H R, KIM K, LEE S J. Adjustment of Arrhenius activation Energy of Laccase-based Time-temperature integrator(TTI) Using Sodium Azide[J]. Food Control, 2013, 32(2): 615—620.
- [7] CHOI D Y, JUNG S W, LEE D S, et al. Fabrication and Characteristics of Microbial Time Temperature Indicators from Bio-Paste Using Screen Printing Method[J]. Packaging Technology and Science, 2014, 27(4): 303—312.
- [8] PARK H R, KIM Y A, JUNG S W, et al. Response of Microbial Time Temperature Indicator to Quality Indices of Chicken Breast Meat during Storage[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 22(4): 1145—1152.
- [9] KIM E, CHOI D Y, KIM H C, et al. Calibrations between the Variables of Microbial TTI Response and Ground Pork Qualities[J]. Meat Science, 2013, 95(2): 362—367.
- [10] ZABALA S, CASTAN J, MARTÍNEZ C. Development of a Time Temperature Indicator (TTI) Label By Rotary Printing Technologies[J]. Food Control, 2015(50): 57—64.
- [11] CORPORATION C. Enzyme-based Time Temperature Indicator: US, 7736866B2[P]. 2010-07-15.
- [12] 吴秋明. 应用脲酶开发货架寿命指示体系的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.  
WU Qiu-ming. Development of a Time-Temperature Indicator Reaction System Based on Urease[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [13] 田秋实. 淡水鱼糜制品酶变型货架寿命指示器的开发[D]. 上海: 上海海洋大学, 2009.  
TIAN Qiu-shi. Study on the Application of Variant Enzyme Indicates the Shelf Life of Freshwater Fish[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2009.
- [14] 吴丹. 碱性脂肪酶货架寿命指示体系的开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.  
WU Dan. Development of Time-temperature Indicating Chemical Reaction System Based on Alkaline Lipase[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [15] 宁鹏, 徐幸莲, 费英, 等. 碱性脂肪酶型时间-温度指示卡指示剂的研究[J]. 江西农业学报, 2008, 20(8): 85—87.  
NING Peng, XU Xing-lian, FEI Ying, et al. Study on Time-temperature Integrated Indicator Based on Alkaline Lipase[J]. Acta Agricultural Jiangxi, 2008, 20(8): 85—87.
- [16] 卢立新, 蔡莹, 郑伟洲. 基于脂肪酶反应扩散的时间温度指示器的制备方法和应用: 中国, 201110023063.5[P]. 2011-09-07.  
LU Li-xin, CAI Ying, ZHENG Wei-zhou. Preparation and Application on Time-temperature Indicator based on Reaction Diffusion of Lipase: China, 201110023063.5 [P]. 2011-09-07.
- [17] 葛蕾, 朱诗怡, 李振兴, 等. 酪氨酸酶为基础的时间温度指示系统的初步研究[J]. 食品工业科技, 2014(17): 180—184.  
GE Lei, ZHU Shi-yi, LI Zhen-xing, et al. Preliminary Study on Time-temperature Indicator System Based on Tyrosinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014(17): 180—184.
- [18] SUN Yan, CAI Hua-wei, ZHENG Li-min, et al. Development and Characterization of a New Amylase Type Time-temperature Indicator[J]. Food Control, 2008, 19(3): 315—319.
- [19] QIAN Jing, ZHENG Guang-lin, FENG Qin. Preparation of Amylase-Based Time Temperature Integrator[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012(200): 433—436.
- [20] 冯钦, 钱静, 刘婧. 固定化淀粉酶时间-温度指示剂性能的研究[J]. 包装工程, 2014, 35(7): 60—65.
- [21] FENG Qin, QIAN Jing, LIU Jing. Performance of Time-temperature Indicator with Immobilized Amylase[J]. Packaging Engineerin, 2014, 35(7): 60—65.
- [22] LABUZA T P, KAMMAN J. Reaction Kinetics and Accelerated Tests Simulation as a Function of Temperature[J]. Applications of Computers in Food Research, 1983.
- [23] TAOUKIS P S, LABUZA T P. Reliability of Time-temperature Indicators as Food Quality Monitors under Non-isothermal Conditions[J]. Food Science, 1989, 54(4): 789—793.