

微生物型鲜牛奶时间温度指示器

邱灵敏¹, 张嘉帅¹, 钱静¹, 殷献华², 苗冬冬³

(1.江南大学, 江苏 无锡 214000; 2.江南大学产业技术研究院, 江苏 宿迁 223800;

3.蒙牛乳业宿迁有限公司, 江苏 宿迁 223800)

摘要: **目的** 为了准确表征鲜牛奶的新鲜度, 制备一种微生物型时间-温度指示器。**方法** 选择瑞士乳杆菌菌种作为微生物基础, 采用 SPG 膜乳化技术制备微生物微胶囊, 按照微生物胶囊与固体基质的不同比例制作 3 种固体微生物时间-温度指示器, 以色差值为变化参数研究其动力学特性, 并与应用的鲜牛奶在恒温及变温条件下进行匹配试验。**结果** 3 种不同比例时间-温度指示器的活化能与鲜牛奶的活化能差值在 25 kJ/mol 之内, 其中当微胶囊质量与固体基质体积之比 (g/mL) 为 1:2 时, 在变温条件下两者的等效温度差值为 2.1 °C, TTI 预测食品货架期终点的误差为 3%。**结论** 在恒温和变温等 2 种条件下时, 制备的微生物型 TTI 可以精准实现鲜牛奶货架期的可视化。

关键词: 时间温度指示器 (TTI); 鲜牛奶; 动力学参数; 微生物; 微胶囊

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2020)09-0067-07

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.09.010

Microbial Time-temperature Indicator Applied in Fresh Milk

QIU Ling-min¹, ZHANG Jia-shuai¹, QIAN Jing¹, YIN Xian-hua², MIAO Dong-dong³

(1.Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 2.Research Institute of Industrial Technology of Jiangnan University, Suqian 223800, China; 3.Mengniu Dairy Co., Ltd. in Suqian, Suqian 223800, China)

ABSTRACT: The work aims to prepare a microbial time-temperature indicator, in order to characterize the freshness of fresh milk accurately. Microbial microcapsules were prepared by SPG membrane emulsification technology on the basis of *Lactobacillus helveticus* strains. Three kinds of solid microbial time-temperature indicators were made according to different proportions of microbial capsules and solid substrates. Their dynamic characteristics were studied by their color difference values. The test matching the applied fresh milk was carried out under the conditions of constant and variable temperatures. The difference of activation energy between three TTIs at different proportions and fresh milk was within 25 kJ/mol. When the ratio (g/mL) of microcapsule in mass to volume of solid matrix was 1:2, the difference of equivalent temperature between the two indicators was 2.1 °C under variable temperature, and the error of TTI in predicting the end point of food shelf life was 3%. The microbial TTI prepared can accurately visualize the shelf life of fresh milk under constant and variable temperatures.

KEY WORDS: time-temperature indicator; fresh milk; kinetic parameters; microorganism; microcapsules

收稿日期: 2019-07-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1603300); 江苏省苏北专项 (SZ-SQ2017049)

作者简介: 邱灵敏 (1996—), 女, 江南大学硕士生, 主攻食品包装技术与安全。

通信作者: 钱静 (1968—), 女, 江南大学教授、博导, 主要研究方向为运输包装与设计、智能包装。

随着生活品质的提高和经济文化的发展,人们对食品质量的要求越来越高。近年来,我国乳品行业食品安全形势严峻^[1]。鲜牛奶中丰富的营养物质以及适宜的温度会促进残留在鲜牛奶中菌种的生长繁殖,鲜牛奶的变酸结块通常是由乳酸菌造成的,因此,开发了时间-温度指示器(Time-Temperature Indicator, TTI)解决单个食品质量检测的问题。TTI是附于包装或产品上的一种简单装置或标签,能够记录此产品的时间温度历程。

总体来说,根据不同的反应机理,TTI主要可以分为3类,分别为化学型TTI、物理型TTI与生物型TTI^[2]。生物型中的微生物型TTI工作机理是微生物的生长代谢对TTI中的培养基进行酸化,随后培养基的pH值降低,导致酸碱指示剂颜色发生变化^[3]。目前用于制备微生物型TTI的微生物种类大多为乳酸菌^[4-6]。

微生物TTI由微生物菌种和指示器基质混合溶液构成,相关研究表明^[7],大部分微生物菌种在低温下无法生存,因此需要对微生物菌种进行固定来保证其低温下的活性。有研究表明,使用微胶囊技术对微生物菌种进行固定是保护微生物菌种活性最有效果的方式^[8-9]。此实验中将微生物微胶囊化,其壁材可以阻隔微生物与外界不良环境接触^[10]。乳酸菌的微胶囊化可以使乳酸菌在高氧环境、冷冻环境、酸性环境下存活,且微胶囊可以解决微生物型TTI调整反应时间长的问题^[11-12]。

在众多的微胶囊技术中,SPG(Shirasu Porous Glass Membrane)膜乳化法因可用于制备粒径均一的乳液^[13],受到学者的广泛关注。SPG膜乳化法是对分散相液体进行加压,使其透过具有相同细孔径的SPG膜,进而形成微细液滴并分散到分散介质(连续相)中,最终调制成功乳化的方法^[14]。

文中旨在开发一种全新的微生物型时间-温度指示器。由于瑞士乳杆菌是牛乳制品中所有乳酸菌分离菌株的优势菌群^[15],因此在制备微生物型TTI时,选择瑞士乳杆菌菌种作为微生物基础。该指示器利用微生物的产酸原理,即随时间、温度的变化,体系自身会产生颜色变化,以此来指示产品。这种时间-温度指示器的颜色变化可以通过肉眼辨别,因此可用于指示鲜牛奶的新鲜度和货架寿命,为制造商、流通商以及零售商提供有效的销售指导,同时指导消费者购买鲜牛奶。

1 微生物 TTI 的制备

1.1 原料与设备

主要原料:海藻酸钠、液体石蜡、Span 80、氯化钙、氢氧化钠、溴甲酚紫(质量分数为0.04%,溶

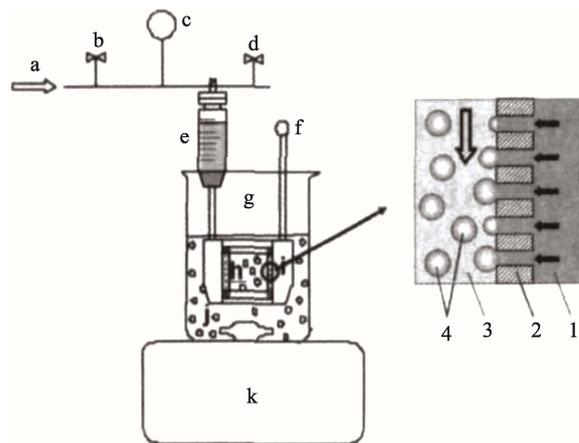
于体积分数为95%的乙醇)、溴甲酚绿(质量分数为0.05%),溶于体积分数为95%的乙醇)、甲基橙(质量分数为0.1%),溶于体积分数为95%的乙醇)、氢氧化钠标准溶液,国药集团化学试剂有限公司;MRS(MRS Broth Sharpe)琼脂培养基、MRS(MRS Broth Rogosa)肉汤,青岛海博生物;瑞士乳杆菌冻干粉,北纳生物菌种保藏中心。

主要试剂:质量分数为1.5%的海藻酸钠溶液(分散相),称取1.5g海藻酸钠,溶解于100mL的蒸馏水中,并将烧杯放入45℃恒温水浴锅中,用电动搅拌器搅拌,保证海藻酸钠完全溶解,使用前均需要进行高温高压杀菌;液体石蜡(连续相),称取2g表面活性剂Span 80,加入至98mL的液体石蜡中,搅拌均匀,使用前均需要进行高温高压杀菌;pH混合指示剂,将溴甲酚紫、溴甲酚绿溶液、甲基橙溶液等体积混合,制得混合指示剂。

主要设备:立式压力蒸汽灭菌锅,LDZM-100G型,上海申安医疗器械厂;垂直层流洁净工作台,HCB-1300V型,海尔生物医疗有限公司;调速多用振荡器,HY-4型,金坛市荣华仪器制造有限公司;生物显微镜,BM-103型,上海比目仪器有限公司;SPG设备,IMK-40型,日本SPG Technology公司;测色仪,Xrite 530型,美国爱色利有限公司。

1.2 微生物微胶囊的制备

SPG膜乳化装置及原理见图1^[16]。



1.分散相 2.SP G膜 3.连续相 4.乳滴
a.氮气进口 b.氮气进口阀门 c.压力表 d.氮气出口阀门
e.内装分散相的注射管 f.膜组件的通孔管道 g.烧杯
h.被固定在膜组件内部的SPG膜 i.膜组件 j.连续相 k.磁力搅拌

图1 SPG膜乳化装置原理

Fig.1 Principle of SPG membrane emulsifier

微胶囊制备及固定步骤如下所述,所有操作均要求在无菌条件下进行。

1) 将SPG膜放入连续相溶液中充分润湿后,将5mL瑞士乳杆菌细胞悬液倒入100mL的海藻酸钠溶

液中，充分震荡混合均匀后，倒入分散相罐中。

2) 将膜安装在 SPG 设备的立柱中，并将液体石蜡与活性剂的混合溶液倒入连续相罐，调节搅拌速率为 300 r/min、供给压强为 15 kPa。

3) 乳化结束后继续搅拌 0.5 h，将生成的乳液直接倾倒入 400 mL 的氯化钙溶液中，并迅速将混合物倒入分液漏斗中。

4) 将密封后的分液漏斗取出，用震荡机充分震荡混合溶液后静置 10 min。

5) 取最下层的微胶囊，并使用灭菌蒸馏水清洗 3~4 次，收集微胶囊，保存于 4 °C 冰箱中。

根据上述方法制备的微生物胶囊粒径均一，且分布均匀，最终制得的微生物微胶囊的显微镜照片见图 2。

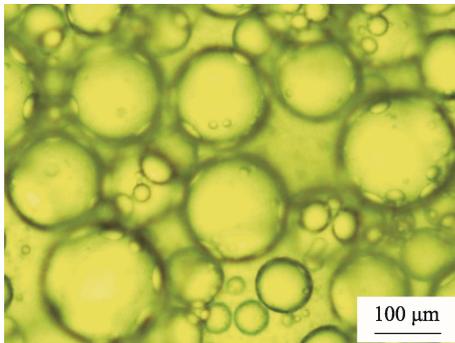


图 2 微胶囊显微镜照片
Fig.2 Microcapsule microphotograph

1.3 微生物固体 TTI 的制备

固体 TTI 制备步骤如下，所有操作均要求在无菌条件下进行。

1) 量取 pH 混合指示剂 1 mL，移入装有 9 mL MRS 肉汤的烧杯中，混合均匀后制得固体基质，并按此制备 3 个混合溶液，调节基质的 pH 值至 7。

2) 称取微胶囊 10, 5, 3.3 g，分别加入装有固体基质的烧杯中，并混合均匀，得到微胶囊的质量与固体基质的体积之比 (g/mL) 分别为 1:1, 1:2, 1:3，编号分别为 1[#]TTI, 2[#]TTI, 3[#]TTI，将混合物密封后放置在 45 °C 的恒温水浴锅中，防止凝固。

3) 将未凝固的混合物移入细胞培养板中，每孔为 200 μL，固体微生物型 TTI 制备完成。

固体 TTI 在移入细胞培养板后，降低温度，便可凝固，因此微胶囊可以在固体基质中均匀分布，不会出现分层现象，便于后续使用色差计对微生物 TTI 颜色进行测量。

2 微生物 TTI 的动力学特性

微生物型 TTI 通常使用颜色响应来反应食品质量的变化，使用 Xrite 530 测色仪对微生物 TTI 的颜

色进行测定，测色孔需紧贴 TTI，分别记录 L^* , a^* , b^* 的数值，每次测量重复 3 次，取平均值作为最终值。最后根据式 (1) 计算 ΔE 的值。文中微生物 TTI 的动力学参数特性研究选择 ΔE 作为体系的颜色参数。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

式中： L^* 为明度； a^* 为红/绿度； b^* 为黄蓝度； ΔE 为色差值。

在常温下，通过 TTI 响应与时间的线性关系方程，可以得到颜色变化速率常数。构建一个响应函数 $F(X)$ ，微生物 TTI 的颜色响应方程见式 (2)。

$$F(X) = kt + F(X_0) \quad (2)$$

式中： $F(X)$ 为 TTI 颜色响应值； k 为反应速率常数 (h^{-1})； t 为时间 (h)； $F(X_0)$ 为初始值。

反应速率 k 的温度依赖性使用 Arrhenius 方程进行计算，见式 (3)。

$$k = A \exp(-E_a/RT) \quad (3)$$

式中： A 为指前因子 (h^{-1})； E_a 为反应的活化能 (kJ/mol)； T 为热力学温度 (K)； R 为气体常数。

对方程两边取对数可得式 (4)。

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \quad (4)$$

将由式 (2) 得出在不同温度下的速率常数 k 代入式 (4)，作 $\ln k - 1/T$ 图，线性拟合便可求得 TTI 的活化能 E_a ，即温度依赖性。

对微生物型 TTI 进行动力学研究，依照式 (2)，将 ΔE 值作为 TTI 的颜色响应函数 $F(X)$ 值，以时间 t 为横轴，分别在 4, 20, 37 °C 下绘制响应变化的曲线并进行线性拟合，见图 3。

根据图 3 中的拟合曲线，得到 3 种 TTI 的相关参数，见表 1。

观察表 1 中数据可知，当温度不同时，TTI 的反应速率不同，色差值变化的速率与时间具有显著的相关性。由表 1 可知不同温度下的速率常数，为了求得反应速率 k 的温度依赖性，根据式 (4) 以及表 1，进行线性回归分析，见图 4。

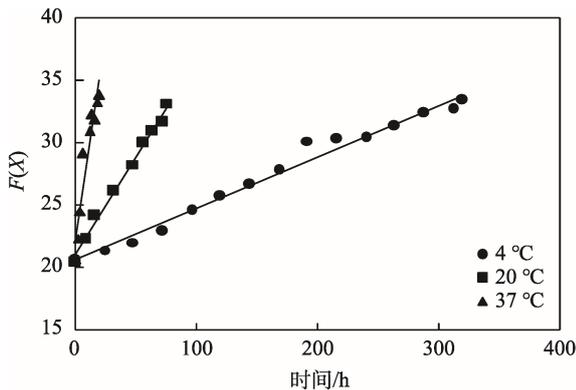
根据式 (4) 线性拟合得到的 TTI 动力学参数见表 2，该回归直线的相关系数分别为 0.9987, 0.9997 和 0.9949，均在 0.99 以上，说明线性关系很好，回归直线达到显著水平。

在 37 °C 下，对 2[#]TTI 随时间的颜色变化进行测定。TTI 的颜色响应值在 22 h 时到达 33.17，之后颜色响应值不再随时间延长而发生变化，该微生物型 TTI 的反应终点即为颜色响应值为 33 时，TTI 在整个反应过程中的颜色变化见图 5。

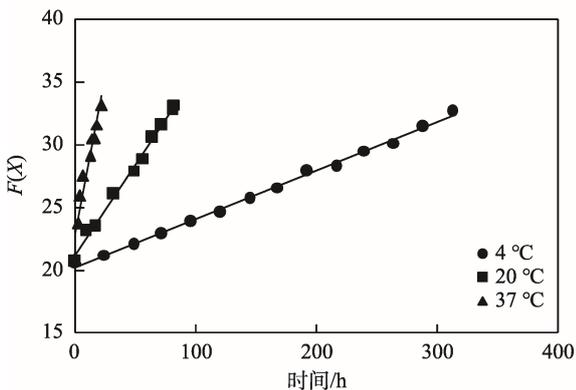
3 TTI 与鲜牛奶的匹配

3.1 匹配要求

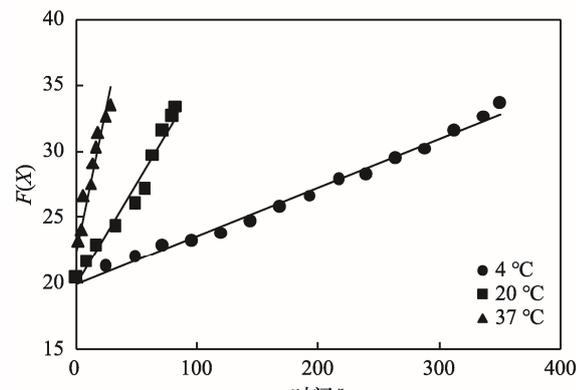
按照 TTI 与食品的匹配原则，TTI 达到反应终点



a 1#TTI



b 2#TTI



c 3#TTI

图3 在不同温度下,3个TTI颜色响应函数随时间的变化
Fig.3 Change in color response function of three TTIs at different temperatures over time

表1 3个TTI在不同温度下的反应速率以及拟合相关参数
Tab.1 Reaction rate and fitting related parameters of three TTIs at different temperatures

TTI 编号	T/K	k/h ⁻¹	R ²	T ⁻¹ /K ⁻¹	ln k/h ⁻¹
1#	277 (4 °C)	0.0419	0.9797	0.0036	-3.1725
	293 (20 °C)	0.1563	0.991	0.0034	-1.856
	310 (37 °C)	0.6444	0.9119	0.0032	-0.4394
2#	277 (4 °C)	0.0387	0.9977	0.0036	-3.2519
	293 (20 °C)	0.1437	0.9931	0.0034	-1.94
	310 (37 °C)	0.4946	0.9327	0.0032	-0.704
3#	277 (4 °C)	0.0365	0.9892	0.0036	-3.3104
	293 (20 °C)	0.1531	0.9696	0.0034	-1.8767
	310 (37 °C)	0.4411	0.9413	0.0032	-0.8185

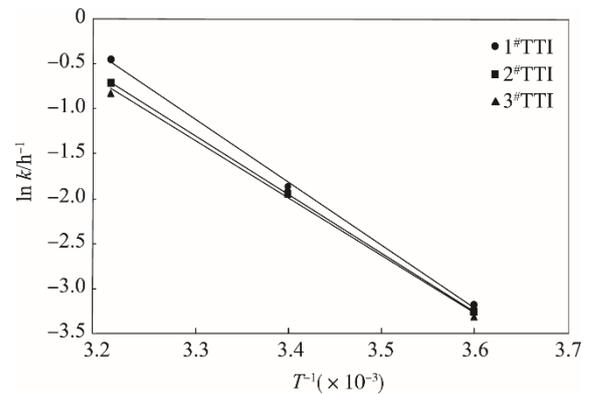


图4 ln k 与 1/T 的线性回归
Fig.4 Linear regression between ln k and 1/T

表2 TTI的动力学参数
Tab.2 Kinetic parameters of TTIs

TTI 编号	拟合方程	活化能/ (kJ·mol ⁻¹)	指前因子 (×10 ⁸)
1#	$\ln k = 22.46 - 7108 \frac{1}{T}$	59.1	56.8
2#	$\ln k = 20.685 - 6630.2 \frac{1}{T}$	55.12	9.62
3#	$\ln k = 20.174 - 6491.2 \frac{1}{T}$	53.97	5.77

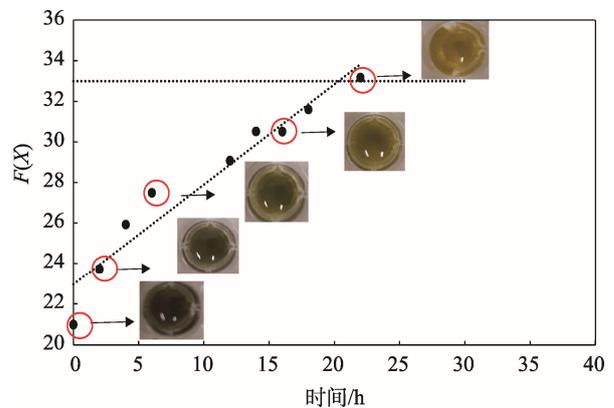


图5 微生物型 TTI 反应终点的确定及其颜色变化历程
Fig.5 Determination of end point of microbial TTI reaction and its color change history

的时间同食品的货架寿命终点相一致,预估误差要低于 15%^[17],且两者的活化能差值应在 25 kJ/mol 以内^[18]。在满足上述 2 个条件的同时,使用此微生物型 TTI 对产品的货架期进行监测才是可靠的。

3.2 恒温实验

事先以鲜牛奶的酸度为响应参数,测量并拟合得出以下 TTI 匹配的一款鲜牛奶活化能 E_a 鲜牛奶=55.5 kJ/mol,指前因子 A 鲜牛奶= 3.24×10^7 h⁻¹。当鲜牛奶的酸度超过 18 °T 视为鲜牛奶变质^[19]。由已得到的微生物型 TTI 自身活化能,并根据上述的匹配要求得出其可指示的活化能范围,见表 3;将微生物型 TTI 反应时间与鲜牛奶变质时间进行比较,见表 4。

表 3 3 种 TTI 可指示活化能范围
Tab.3 Indicating activation energy range for three TTIs

TTI	自身活化能/ (kJ·mol ⁻¹)	可指示的产品活化能范围/ (kJ·mol ⁻¹)
1#TTI	59.1	34.1~84.1
2#TTI	55.12	30.12~80.12
3#TTI	53.97	28.97~78.97

表 4 3 种微生物型 TTI 的指示时间与鲜牛奶的变质时间
Tab.4 Indicated time of three microbial TTIs and deterioration time of fresh milk

温度/ °C	货架期/h		反应时间/h		
	鲜牛奶	1#TTI	2#TTI	3#TTI	
4	336	320	336	350	
20	80	76	82	82	
37	24	20	22	28	

从表 4 可以看出，在 4 °C 下，2#TTI 的货架寿命预测误差值为 0，1#TTI 和 3#TTI 预测的误差分别为 4.7% 和 4.2%；在 20 °C 和 37 °C 下，2#TTI 可指示的时间与鲜牛奶的货架期接近，1#TTI 的反应时间比鲜牛奶的货架期短，这是因为 1#TTI 中的微生物较多，导致在反应过程中，乳酸菌的产酸较快，因此整个体系的反应时间变短；在相同温度条件下 3#TTI 指示的时间比鲜牛奶的货架期长，这是因为 3#TTI 中的乳酸菌较少，产酸较慢，导致整个体系的反应时间变长。综上所述，温度恒定时，2#TTI 达到反应终点需要的时间同鲜牛奶的货架期终点是一致的。

3.3 变温实验

食品在实际生产、运输、储存和销售过程中，其经历的温度不会保持不变。在相同变温条件下，对 2#TTI 同鲜牛奶进行反应终点的匹配试验。

在实际情况下，温度不是恒定值，具有一定的波动性。当温度连续变化时，食品质量函数方程见式 (5)。

$$Q(A)_t = \int_t^0 k dt = A_{食品} \int_t^0 \exp(-E_{a食品}/RT_t) dt \quad (5)$$

将 TTI 应用于监测食品的质量变化的必备条件是 TTI 的动力学方程与食品货架期的动力学方程相同，在温度变化的条件下，TTI 的动力学方程可表示为式 (6)。

$$F(X)_t = \int_t^0 k dt = A_{TTI} \int_t^0 \exp(-E_{aTTI}/RT_{(t)}) dt \quad (6)$$

定义一个等效温度 T_{eff} ，在相同时间内，变温所引起的质量变化与等效温度 T_{eff} 引起的质量变化相同。得到式 (7—8) 食品和 TTI 的等效温度 T_{eff} 可由其计算出。

$$Q(A) = A_{食品} \exp(-E_{A食品}/RT_{eff})t \quad (7)$$

$$F(X) = A_{TTI} \exp(-E_{aTTI}/RT_{eff})t \quad (8)$$

3.3.1 方法

根据前面的方法制备微胶囊质量与固体基质体积之比为 1 : 2 的微生物型 TTI，同时准备包装完整的鲜牛奶，将两者同时置于生化培养箱中，进行变温实验。不同温度条件下放置的时间见图 6，每隔一段时间，将两者取出，分别测定微生物型 TTI 的色差值、鲜牛奶的酸度。

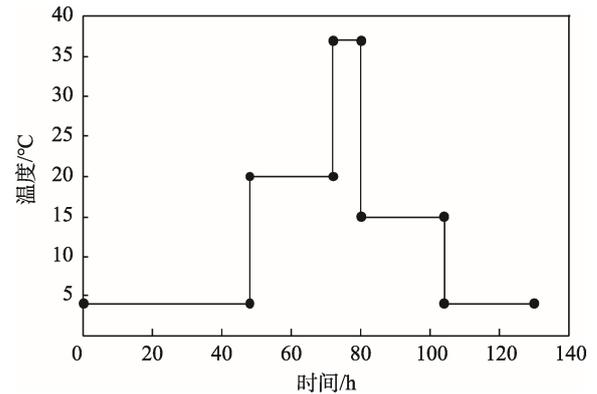


图 6 变温实验历程

Fig.6 History of variable temperature experiment

3.3.2 结果分析

鲜牛奶酸度的变化历程见图 7，可知，在变温试验的历程中，鲜牛奶的酸度不断增大，温度越高，酸度的变化速率越快。当鲜牛奶在 4 °C 下时，其酸度值增长缓慢；在 37 °C 储存时，酸度值增长迅速。在变温试验中，鲜牛奶的酸度由初始值 12.7 °T 增加到 18 °T 的时间为 130 h 左右。

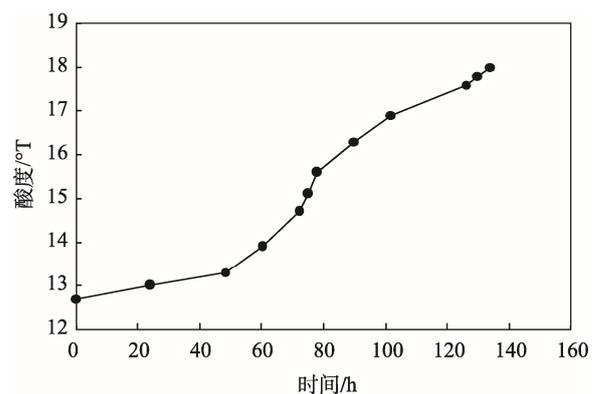


图 7 变温实验中鲜牛奶酸度的变化历程

Fig.7 Change history of fresh milk acidity in variable temperature experiment

微生物型 TTI 的 ΔE 变化历程见图 8，可知，微生物型 TTI 的色差值变化在 134 h 左右达到 33，已经基本接近于完全变色，此时反应结束。体系的反应在不同温度下有不同的速率。温度升高，反应速率增长，在 4 °C 时， ΔE 值增长缓慢；在 37 °C 时， ΔE 值增长迅速，这与鲜牛奶的变质情况与温度的变化关系是相同的。

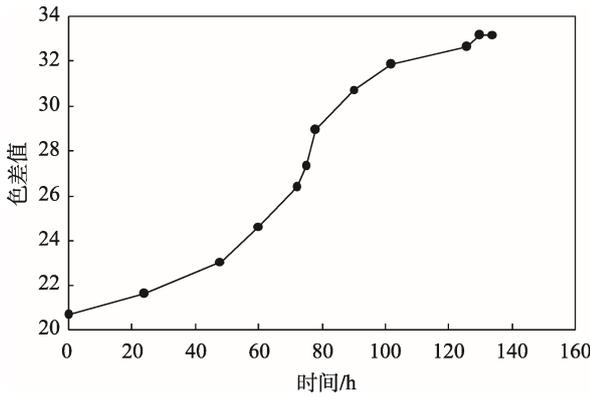


图8 变温实验中微生物型 TTI 的色差值变化历程
Fig.8 Change history of microbial TTI ΔE in variable temperature experiment

根据式 (3) 计算得出鲜牛奶和 TTI 在不同温度下的反应速率常数, 见表 5。

表 5 各温度下鲜牛奶和 TTI 的反应速率
Tab.5 Reaction rate of fresh milk and TTI at different temperatures

温度/°C	$k_{\text{鲜牛奶}}/\text{h}^{-1}$	$k_{\text{TTI}}/\text{h}^{-1}$
4	0.0011	0.0388
15	0.0028	0.0968
20	0.0041	0.1433
37	0.0144	0.4957

由表 5 数据与式 (5) 可得 $Q(A)=0.3312$, 再根据式 (7), 得到该变温过程中鲜牛奶的等效温度 $T_{\text{eff}}=285$ K。由表 5 数据与式 (6) 可得 $F(A)=11.686$, 再根据式 (8), 得到该变温过程中 2#TTI 的等效温度 $T_{\text{eff}}=287.1$ K。

变温条件下 TTI 监测鲜牛奶质量的反馈情况见表 6, 可以得出, 微生物 TTI 监控鲜牛奶的质量时, 等效温度差值为 2.1 °C, 预测误差为 3%, 满足误差范围, 因此, 使用微生物 TTI 可以实现鲜牛奶货架期寿命的可视化。

表 6 变温条件下 TTI 监测鲜牛奶质量的反馈
Tab.6 Feedback of fresh milk quality monitored by TTI under variable temperature conditions

鲜牛奶实际 T_{eff}/K	鲜牛奶货架寿命/h	TTI 的 T_{eff}/K	TTI 货架寿命/h	误差 /%
285	134	287.1	130	3

4 结语

文中基于对鲜牛奶质量参数的研究, 结合 SPG 膜技术制备了固定化微胶囊, 研制出了固体微生物型时间-温度指示器, 并对其动力学特性进行了研究。

反应体系由微生物微胶囊、基质和混合指示剂构成, 颜色由最初的深绿色变为最终的黄色, 可直接通过肉眼观察颜色变化。对 TTI 的活化能和反应时长与鲜牛奶的活化能和货架寿命进行了比较, 在恒温和变温情况下, 对鲜牛奶和微生物型 TTI 进行实验, 探究了两者的匹配度, 结果显示微生物型 TTI 可以精准实现鲜牛奶货架期寿命的可视化。

参考文献:

- [1] 王建刚, 王庆忠. 潍坊市面鲜奶吧巴氏鲜奶质量跟踪检测与评价[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(22): 98—101.
WANG Jian-gang, WANG Qing-zhong. Follow-up Detection and Evaluation of Pasteurized Fresh Milk Quality in Weifang Fresh Milk Bar[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2018, 24(22): 98—101.
- [2] KANG Y J, KANG J W, CHOI J H, et al. A Feasibility Study of Application of Laccase-based Time-temperature Indicator to Kimchi Quality Control on Fermentation Process[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2014, 57(6): 819—825.
- [3] 谢勇, 张诗浩, 曾慧, 等. 时间温度指示器的研究与应用[J]. 包装学报, 2018, 10(6): 28—37.
XIE Yong, ZHANG Shi-hao, ZENG Hui, et al. Research and Application of Time and Temperature Indicators[J]. Journal of Packaging, 2018, 10(6): 28—37.
- [4] 孟晶晶. 微生物型时间温度指示器在酸奶质量管理中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 3—5.
MENG Jing-jing. Application of Microbial Time and Temperature Indicator in Yoghurt Quality Management[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018: 3—5.
- [5] JUNG S W, MIJANUR R A T M, LEE S J. Identification and Evaluation of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria from Imitation Crab Sticks to Develop a Microbial Time Temperature Integrator[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(1): 141—153.
- [6] 张小栓, 孙格格, 肖新清, 等. 一种用于鲜食葡萄品质感知的微生物型时间温度指示器: 中国, 201510243990.6[P]. 2015-05-14.
ZHANG Xiao-shuan, SUN Ge-ge, XIAO Xin-qing, et al. A Microbial Time-temperature Indicator for Quality Perception of Fresh Grapes: China, 201510243990.6[P]. 2015-05-14.
- [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: 303—312.
- [8] WANG Y, DING W, KOU L. A Non-destructive Method to Assess Freshness of Raw Bovine Milk Using FT-NIR Spectroscopy[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(8): 5305—5310.
- [9] FEUCHT A, KWAK H S. Microencapsulation of Lactic

- Acid Bacteria (LAB)[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2013, 33(2): 229—238.
- [10] JAFARI S M, HE Y, BHANARI B. Effectiveness of Encapsulating Biopolymers to Produce Sub-micron Emulsions by High Energy Emulsification Techniques[J]. *Food Research International*, 2007, 40(7): 862—873.
- [11] ROKKA S, RANTAMAKI P. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications[J]. *European Food Research & Technology*, 2010, 231(1): 1—12.
- [12] CHOI D Y, JUNG S W, KIM T J, et al. A Prototype of Time Temperature Integrator (TTI) with Microbeads-entrapped Microorganisms Maintained at a Constant Concentration[J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 120(1): 118—123.
- [13] 于洪丹, 吴新霞, 王俊伟, 等. SPG 膜乳化法制备粒径均匀的布比卡因 P(L)GA 微球[J]. *中国药剂学杂志(网络版)*, 2017(3): 14—22.
YU Hong-dan, WU Xin-xia, WANG Jun-wei, et al. Bupivacaine P(L)GA Microspheres with Uniform Particle Size Were Prepared by SPG Membrane Emulsification[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutics (Online Edition)*, 2017(3): 14—22.
- [14] 洪波, 王保国. SPG 膜乳化法制备单分散微细乳液的研究[C]// 全国膜与膜过程学术报告会, 2005: 57.
HONG Bo, WANG Bao-guo. Preparation of Monodisperse Microemulsion by SPG Membrane Emulsification[C]// National Symposium on Membrane and Membrane Process, 2005: 57.
- [15] 王一迪. 新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌的分离鉴定与系统发育研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2017: 39.
WANG Yi-di. Isolation, Identification and Phylogenetic Study of Lactic Acid Bacteria from Raw Milk in Yili Region, Xinjiang[D]. Shihezi: Shihezi University, 2017: 39.
- [16] 任平伟, 褚良银. 膜乳化和微流控法制备单分散 W/O 乳液的研究[J]. *广州化工*, 2009(2): 63—65.
REN Ping-wei, CHU Liang-yin. Preparation of Monodisperse W/O Emulsion by Membrane Emulsification and Microfluidics[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2009(2): 63—65.
- [17] TAOUKIS P S, LABUZA T P. Applicability of Time-temperature Indicators as Shelf Life Monitors of Food Products[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(4): 783—788.
- [18] 钱静, 郑光临, 冯钦. 基于冷鲜肉脂肪氧化的糖化酶型时间-温度指示器的研究[J]. *食品科学*, 2013(18): 352—357.
QIAN Jing, ZHENG Guang-lin, FENG Qin. Glucoamylase Time-temperature Indicators Based on Fat Oxidation of Chilled Pork[J]. *Food Science*, 2013(18): 352—357.
- [19] GORAN T, VLADISAVLJEVIĆ S H. Influence of Process Parameters on Droplet Size Distribution in SPG Membrane Emulsification and Stability of Prepared Emulsion Droplets[J]. *Journal of Membrane Science*, 2003, 225(1): 15—23.