

固定化淀粉酶时间-温度指示剂性能的研究

冯钦, 钱静, 刘婧

(江南大学, 无锡 214122)

摘要: **目的** 研究淀粉酶型时间-温度指示剂(TTI)及酶经固定化后体系稳定性。**方法** 以淀粉酶反应体系为基础,确定在时间为4~5 d内,温度为4℃的条件下指示剂最佳配比,再应用固定化酶技术,观察固定化酶的凝固性,测定其酶活性能以及应用于TTI中的吸光值随时间变化曲线。**结果** 确定了淀粉酶型TTI体系配方,酶经固定后酶活有所下降,但吸光值变化更平稳。**结论** 得到了应用于4℃时的时间-温度指示剂最佳酶固定化条件,以糊精(质量浓度为40 g/L)和碘(质量分数为0.1%)为底物,琼脂固定化酶液(质量分数为3%)为反应物,该条件下得到最适pH值为6.0,最适温度为55℃,此时指示剂稳定性最佳,体系颜色变化与时间最理想。

关键词: 时间-温度指示剂(TTI); 淀粉酶; 固定化酶; 吸光值; 酶活; 琼脂

中图分类号: TS205.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-3563(2014)07-0060-06

Performance of Time-temperature Indicator with Immobilized Amylase

FENG Qin, QIAN Jing, LIU Jing

(Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore amylase time-temperature indicator(TTI) and its stability properties with the immobilized enzyme. **Methods** Based on the reaction of amylase, the optimal formula of the indicator at 4℃ and within 4~5 d was determined. After the employment of enzyme immobilization technology, the coagulation was observed, the enzyme activity and the absorbance value change with time curve when it was applied in TTI were analyzed. **Results** TTI formula was determined, and the activity decreased after the amylase was immobilized, but the absorbance value changed more smoothly. **Conclusion** The best formula applied to TTI at 4℃ was using 40 g/L malt batter and 0.1% Iodine as the substrates, 3% agar immobilization enzyme solution as reactant, with the optimal pH value and temperature of 6.0 and 55℃, respectively. In this case, the highest stability and the optimal time and color changes were achieved.

KEY WORDS: time-temperature indicator(TTI); amylase; immobilized enzymes; absorbance; enzyme activity; agar

近年来,食品安全已成为一项重要的社会问题,关注度日益增加,尤其是易腐食品对所处环境(如温度)的要求相当苛刻。食品冷藏链作为比较理想的贮存手段,通过冷链储运延长食品保质期以保证食品品质^[1],但在整个储运过程中温度具有不可预测性,由此公开货架寿命不能真实反映食品的货架期^[2]。时间-温度指示剂(TTI)作为包装的一部分,可以对食

品整个货架期中的时间、温度参数进行监控和记录,通过对时间温度积累效应指示食品的温度变化历程和剩余货架信息^[3]。

酶型时间-温度指示剂是由酶催化底物反应且以时间和温度为参数产生反应产物,其中反应产物可以通过监控底物和产物与其浓度相关的物理特性进行检测^[4],用肉眼观察其颜色变化过程即可判别。例如

收稿日期: 2013-10-07

基金项目: 留学回国人员科研启动基金项目

作者简介: 冯钦(1989—),女,浙江宁波人,江南大学硕士生,主攻运输包装。

VITSAB 温度指示器,通过脂肪酶和甘油反应,以 pH 指示剂的颜色变化判断其反应变化过程^[5]。2005 年,吴秋明开发了一种脲酶 TTI 体系,并确定了该体系的反应函数和动力学参数^[6]。2007 年,蔡华伟等人将淀粉酶压制成片,利用其水解反应,以碘为指示剂的颜色变化过程研制了一种基于淀粉酶的时间-温度指示剂^[7]。2009 年 7 月,吕志业、卢立新等人对碱性脂肪酶时间温度器变色效应进行了研究^[8]。

固定化酶技术是指在一定空间内呈闭锁状态存在的酶,能连续地进行反应^[9]。固定化酶的优点在于其利用酶的能力比能被利用的可溶酶强许多,既保证了酶活更高效持久稳定又可回收循环使用。糖化酶大多数是液态的,存在酶活力较低、易失活、糖化时间长等缺点。由此,近几十年来,许多学者对糖化酶固定做了大量研究。一般将酶的固定化技术分为四大类,即吸附法、共价法、交联法和包埋法^[10]。吸附法操作简单,但是酶与载体的结合较差;共价法结合非常牢固,却容易破坏酶的活性中心;包埋法使酶的稳定性良好,但酶活容易损失;交联法是采用双功能试剂进行酶蛋白之间的交联,一般与上述方法结合使用^[11]。2005 年,毕金峰等人对利用活性炭固定 α -转移葡萄糖苷酶进行研究,并探讨了固定化 α -转移葡萄糖苷酶的酶学性质^[12]。同年,吴定、邹耀洪等人利用壳聚糖固定化酶技术对生产低聚异麦芽糖工艺进行研究^[13]。2006 年,魏甲乾、周剑平等人对无载体固定化酶进行研究,对其应用前景做了展望^[14]。

早在 1993 年, Susanna F. De Cordt 等人将 α 淀粉酶用戊二醛交联固定于玻璃珠上,并应用到 TTI 中,该指示剂可以在 96 ~ 108 °C 高温下仍然进行工作^[15]。此外,通过多位学者对固定化酶应用到 TTI 中的性能进行研究^[16-17],也验证了固定化酶对 TTI 性能的改善和提高。

综上所述,酶型时间-温度指示剂已经被广泛研究,同时酶固定化技术也渐渐成熟,而将两者进行结合应用虽对于整个体系的稳定性等方面有着显著提高,但目前仍处于科研起步阶段。由此,文中将酶固定化技术应用于淀粉酶型时间-温度指示剂中,该指示剂主要针对低温冷藏食品进行品质监控,使原体系在稳定性及准确性等方面有所提高。该研究针对上述条件,通过单一变量法及正交实验,确定液态酶体系最佳配比,再采用琼脂包埋法固定化酶和海藻酸钠包埋法固定化酶,通过酶活测定实验对其酶活分析评

价,并应用于低温冷藏(4 °C)条件下 TTI 中检测其吸光值变化曲线,拟得到该温度下对 TTI 吸光值变化趋势的稳定性有所提高的糖化酶固定条件。

1 实验

1.1 材料

实验材料:糖化酶(酶活力 10 万 U/mL),无锡赛德生物公司;可溶性淀粉、琼脂粉、海藻酸钠、明胶、氯化钙、戊二醛、冰醋酸、乙酸钠,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

实验仪器:2802UV/VIS 型紫外可见光分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;HH 数显恒温油浴槽,江苏亚基仪器有限公司;MS300 油浴锅,上海般特仪器制造有限公司。

1.3 方法

糖化酶可以水解淀粉,随着淀粉聚合度降低,包合物的颜色呈现出由深到浅直至无色的转变。麦芽糊精作为淀粉的降解产物,遇碘呈蓝紫色。

包埋法是指采用半透性材料(凝胶高聚物或者高分子半透膜),将酶包埋于其中,从而达到酶固定化^[18]。

由于存在各因素的未知性,以确定的糊精浓度、碘液浓度和加酶量的最佳添加范围为根据,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表在 4 °C 下进行实验,确定最佳的 TTI 配比方案。

1.3.1 单因素变量法

缓冲液配制:取 2.2 g $12H_2O \cdot Na_2HPO_4$ 晶体和 6.84 g $2H_2O \cdot NaH_2PO_4$ 晶体,而后混合,并向混合物中加入 1000 mL 蒸馏水搅拌混合均匀,置于阴暗处,作为淀粉酶与底物反应的缓冲液。

确定所添加糊精量为 10 mL,加碘量为 3 mL,通过对糊精浓度、碘浓度和加酶量进行多组单因素实验,从而确定后续正交试验各因素的水平选取范围。

1.3.2 正交试验

对糊精类型及浓度范围、碘液的浓度范围和加酶量进行单因素实验,然后以确定的糊精浓度、碘液浓度和加酶量的最佳添加范围为根据,采用 $L_{16}(4^5)$ 正

交表在 4 ℃ 下进行实验,并每隔 24 h 分别测量一次体系吸光值,当吸光值变为 0 时,则为体系反应终点,即根据吸光值的变化确定最佳的 TTI 配比方案。

1.3.3 糖化酶固定方案

琼脂包埋法实验方案:配置质量分数为 1%,2%,3%,4%,5% 的琼脂溶液,置于 100 ℃ 油浴溶解,待温度冷却至室温,分别取溶解好的各种浓度的琼脂溶液 1 mL,向其中加入 2 mL 酶活力为 125 U/mL 的酶,适当摇匀使酶液与琼脂液充分接触,在室温下静置,待温度稳定后置于 4 ℃ 的冰箱中^[19]。

海藻酸钠包埋法实验方案:该实验以质量分数为 3% 的海藻酸钠溶液为载体,取 10 mL 加入 2 mL 酶活力为 125 U/mL 的酶液,混合搅拌,然后加入质量分数为 3% 的明胶溶液 10 mL,混合乳化约 10 min,慢速搅拌并降温至 5 ~ 10 ℃,通过注射器针头将上述冷却液以 5 cm 的高度注进质量分数为 1% 的氯化钙溶液中,立刻形成光滑微球,然后保持温度为 4 ℃,球在氯化钙溶液中被硬化 30 min 后,将球取出置入温度为 30 ℃,质量分数为 5% 的戊二醛溶液中进一步硬化 1 h,用生理盐水洗涤后,固定化酶被贮存在 4 ℃ 的冰箱内待用^[20]。

1.3.4 酶活检测实验

根据 GB 8276—2006^[21] 对固定后的糖化酶进行酶活检测。以 A,B 试管作为对照组,乙酸-乙酸钠作为缓冲溶液,加入可溶性淀粉溶液作为反应底物,在 40 ℃ 恒温水浴中预热 10 min 后,B 试管加入待测酶液,继续在此温度下反应 30 min 后,向 A,B 试管中同时加入质量浓度为 200 g/L 氢氧化钠溶液使反应终止,而后将两试管取出,A 试管中补加入等量酶液。向 A,B 试管吸取适量反应液,置于碘量瓶中,加入摩尔浓度为 0.1 mol/L 碘标准液和摩尔浓度为 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,置于暗处 15 min 后加入摩尔浓度为 2 mol/L 硫酸溶液;最后用硫代硫酸钠标准液滴定蓝紫色溶液,直至刚好无色,分别记录所消耗滴定溶液的体积 V_A, V_B 。

代入公式:

$$X=(V_A-V_B)\times c\times 90.05\times 32.2/5\times 1/2\times n\times 2\quad (1)$$

式中: X 为所测样品酶活力; V_A 为滴定空白时消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积; V_B 为滴定样品时消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积; c 为硫代硫酸钠标准滴定溶液的准确浓度; n 为稀释倍数。经公式(1)计算得到酶活力数据。

1.3.5 固定化酶应用实验

根据基于淀粉酶的时间-温度指示剂^[22] 中所得游离酶反应体系作为前期研究成果,将此体系配方应用到本 TTI 实验制备中,并对两者反应吸光值变化趋势进行对比分析。

分别制作 1 mL,200 μL,50 μL 3 种酶量的固定化酶。配置质量浓度为 40 g/L 的麦芽糊精溶液,分别取 10 mL 加入试管中,再加入质量分数为 0.1% 的碘液 3 mL,摇匀后加入糖化酶,并置于温度为 4 ℃ 的环境下,每隔一段时间进行吸光值测量,通过所得数据绘制吸光值曲线图。

2 结果

2.1 TTI 最佳配方

通过多组单因素实验分析得到,作为指示器底物,溶液必须在低温条件下长期保持澄清、均一、稳定,且在整个体系颜色变化过程中,阶段性变化明显,确定糊精质量浓度为 10 ~ 50 g/L 之间。由于 TTI 的反应终点为无色,因此选定碘质量分数范围为 0.1% ~ 0.5% 之间。为满足本配方所需时间,选定加酶量分别为 30,50,75 和 100 μL,见表 1。

表 1 正交试验

Tab.1 The orthogonal experiment

因素	糊精质量浓度 A	加酶量 B	碘液质量分数 C
	/(g · L ⁻¹)	/μL	/%
水平 1	20	30	0.1
水平 2	30	50	0.2
水平 3	40	75	0.3
水平 4	50	100	0.4

正交试验中各组随时间变化而得到的吸光值见表 2。对表 2 进行分析得到,为满足冷藏条件下 96 ~ 120 h 的反应时间,即当吸光值为 0、溶液颜色为无色时即反应终止,同时从经济角度出发,当碘质量分数仅为 0.1% 时,已达到此条件,由此该配方最佳碘溶液的质量分数为 0.1%。

其次,对试验号 1,8,11,14 进行分析,从操作及市场可行性(经济方便)角度出发,采用质量浓度为 40 g/L 的糊精溶液。在此基础上,为确定加酶量,以缓冲液配置质量浓度为 40 g/L 的糊精溶液 10 mL 和质量分数为 0.1% 的碘溶液 3 mL 作为底物溶液,添加不同加酶量,数据见表 3。

表 2 试验设计

Tab.2 The Experimental design table

试验号	A	B	C	吸光值/h					
	1	2	3	0	24	48	72	96	120
1	1	1	1	0.914	0.416	0.269	0.124	0.034	0.000
2	1	2	2	1.387	0.719	0.474	0.333	0.263	0.115
3	1	3	3	1.816	0.890	0.580	0.429	0.301	0.196
4	1	4	4	2.001	0.963	0.631	0.472	0.405	0.223
5	2	1	2	1.771	1.103	0.810	0.597	0.483	0.351
6	2	2	1	2.495	1.684	1.227	0.935	0.776	0.588
7	2	3	4	2.650	1.786	1.258	0.967	0.830	0.732
8	2	4	3	1.160	0.463	0.271	0.093	0.000	
9	3	1	3	2.876	2.332	1.859	1.501	1.292	1.148
10	3	2	4	2.950	2.554	2.090	1.713	1.499	1.344
11	3	3	1	1.230	0.619	0.367	0.157	0.062	0.000
12	3	4	2	1.950	1.413	1.037	0.791	0.640	0.502
13	4	1	4	3.005	2.809	2.478	2.155	1.969	1.801
14	4	2	3	1.389	0.720	0.418	0.211	0.070	0.009
15	4	3	2	2.453	1.708	1.283	0.969	0.800	0.630
16	4	4	1	2.943	2.516	2.045	1.693	1.445	1.269

表 3 不同加酶量吸光值数据

Tab.3 Absorbance data at different amount of enzyme

加酶量	/h						
	0	24	48	72	96	120	144
10	1.285	1.008	0.553	0.288	0.138	0.053	0.022
20	1.285	0.936	0.478	0.239	0.096	0.036	0.018
30	1.285	0.917	0.394	0.186	0.063	0.02	0
40	1.285	0.862	0.429	0.134	0.028	0.01	0
50	1.285	0.787	0.342	0.126	0.017	0	
75	1.285	0.71	0.376	0.138	0.063	0	

从表 3 可知,短期内颜色从有到无,即吸光值最终值为 0 时,2 组加酶量分别为 50 μL 和 75 μL,从可行性及经济性角度出发,确定加酶量为 50 μL。

综上所述,TTI 配方为磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液配置 10 mL 质量浓度为 40 g/L 的麦芽糊精溶液,3 mL 质量分数为 0.1% 的碘溶液,混合均匀,最后添加 50 μL 的糖化酶,制得 TTI。

2.2 酶固定方案

琼脂固定化酶,当琼脂含量较低时,固定化后凝胶非常稀,使酶处于半固定半流动状态,不利于酶固定;当琼脂含量较高时,温度一旦降低便迅速成为凝胶,且凝胶较硬,以致网孔太小,也不利于酶固定。通

过肉眼观察,质量分数为 1% 的琼脂固定化酶固定化效果不佳,即低含量琼脂固定,使酶始终处于半流动状态,其他含量琼脂固定化酶固定化效果均可。

海藻酸钠固定化酶,利用 6 号针头注射最终形成数量较多形状均匀的淡黄色微球体,有一定的弹性和强度,固定化效果良好。

2.3 酶活测定

通过实验确定不同固定载体对淀粉酶进行固定后所得到的酶活见表 4。分析表 4 中数据可知,酶经固定后,酶活均有所下降。质量分数为 1% 的琼脂固定化酶的酶活与游离酶的酶活一致,当琼脂含量过低时,不能形成凝胶,游离酶无法得到很好的固定,所测

表 4 V_A 与 V_B 的数值及最终得到的酶活

Tab.4 The values of V_A and V_B and the resulting enzyme activity				
固定载体	V_A	V_B	$(V_A - V_B)$	X
	/mL	/mL	/mL	/(U · mL ⁻¹)
无	9	5	4	92 787
海藻酸钠	9	7.5	1.5	34 794
1%	8.5	4.5	4	92 787
琼脂	9	7.5	1.5	34 794
2%	9	7.6	1.4	32 476
质量分数	3%	9	8	23 196
4%	9			

得的酶活基本为游离酶酶活,不具备作为酶固定载体的能力。质量分数为2%、3%、4%的琼脂固定化酶的酶活逐个降低,且前两者的酶活较接近。由于琼脂浓度越高,所形成的凝胶就越硬,以致网孔太小,不利于酶与底物充分接触发生反应,固定化后酶活相应减小。海藻酸钠固定化酶酶活同质量分数为2%的琼脂固定化酶一致,但分析其表面形态,固定化酶形态为微球,体积小,数量多,与底物接触面积相对更大,理论上酶反应效果更好。

2.4 TTI 中固定化酶应用数据及分析

根据 TTI 反应体系颜色从有到无的渐变过程,吸

光值初始值即为反应起始所测得的最大值,均为同一值;当反应终止,即体系颜色为无色时,吸光值达到最小值0,该过程所需总时间为横坐标最大值,期间每隔一定时间测量体系吸光值,分别得到加酶量为1 mL、200 μ L 和 50 μ L 的不同含量琼脂固定化酶 TTI 体系吸光值变化曲线,见图1,其中图1c所示游离酶代表的吸光值变化曲线为上述前期研究成果。

与琼脂固定化酶体系比较,相同加酶量,海藻酸钠固定化酶体系颜色变化时间非常短,因此将其单独作图说明,200 μ L 和 50 μ L 海藻酸钠固定化酶 TTI 体系的吸光值变化趋势见图2。

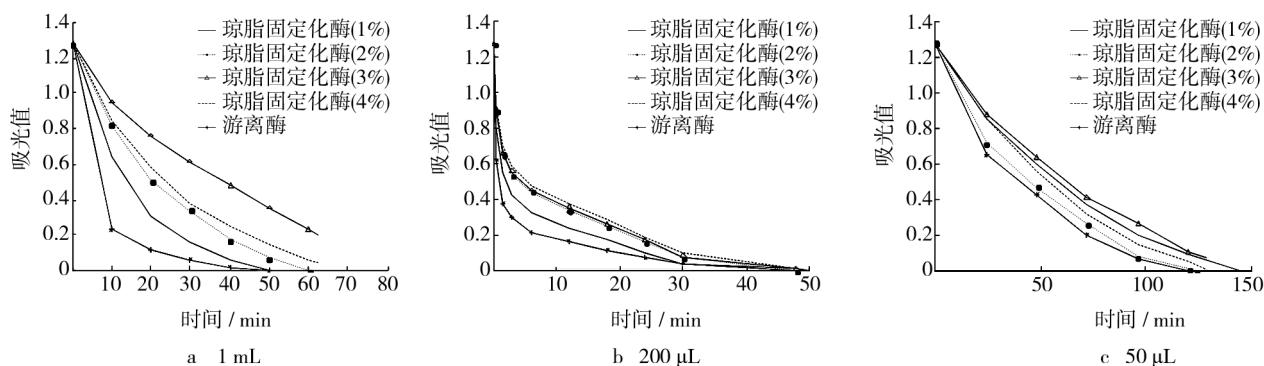


图1 琼脂固定化酶及游离酶制得 TTI 的吸光值变化

Fig. 1 Comparison of absorbance changes of TTI prepared with enzyme immobilized in different contents of agar and free enzyme

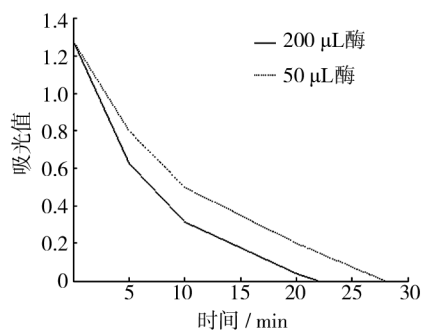


图2 200 μ L 和 50 μ L 海藻酸钠固定化酶及游离酶制得 TTI 的吸光值变化

Fig. 2 Comparison of absorbance changes of TTI prepared with enzyme immobilized in 200 μ L and 50 μ L sodium alginate, and free enzyme

图1的总体变化趋势反映出不同 TTI 体系中,琼脂固定化酶型 TTI 吸光值变化趋势相对于游离酶要平稳许多,但由于酶经固定后酶活力远小于游离酶,

以致反应时间稍长。其中,质量分数为3%的琼脂固定化酶 TTI 体系吸光值曲线变化趋势平稳性最好。由于其酶活较小,因此反应时间较游离酶稍长,这说明质量分数为3%的琼脂固定化酶 TTI 体系反应最稳定,反映到视觉上,即该体系的颜色阶段性变化更容易识别。

由于1 mL 海藻酸钠固定化酶的颜色变化在1 min 左右,因此无法作出曲线图。从图2可以看出,经海藻酸钠固定后的糖化酶 TTI 体系吸光值变化曲线趋近于直线,总反应时间仅为几十分钟。与图1b,c 进行比较得到,相同的固定化酶加入量,海藻酸钠固定化酶体系所需反应时间仅为琼脂固定化酶体系以及游离酶反应体系的几十分之一甚至几百分之一。原因是由于海藻酸钠固定化酶本身为光滑的微球体,数量较多,大大增加了酶与底物溶液间的接触面积,以致在短时间内即可将糊精完全水解,使体系变为无色。

3 结语

该研究在了解国内外温度指示剂工作原理的基础上,探索得到了4℃下淀粉酶型时间-温度指示剂反应体系,以 $12\text{H}_2\text{O} \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 混和溶液作为缓冲液,10 mL质量浓度为40 g/L糊精和3 mL质量分数为0.1%碘为底物,质量分数为3%的酶液为反应物,通过视觉上明显的颜色变化即可判断运输途中环境温度的变化情况。

在此基础上,结合酶固定,琼脂固定化效果良好,并且成功地应用到TTI中,以质量分数为3%的琼脂固定化酶TTI体系反应最稳定,与游离酶体系时间接近。综上所述,糖化酶经固定后不仅提高了酶活的稳定性,同时,包埋法固定化酶从结构形态发生了变化,从普遍液液结合转变为固液结合,这对TTI外部结构设计可以作出一些调整。将固定化酶应用于TTI中,大大改善了反应的稳定性以及结果分析的准确性。

参考文献:

- [1] 谷雪莲,肖洪海,苏树强,等. 食品冷藏链中时间-温度指示器的意义与现状[J]. 食品科学,2002(12):43—45.
GU Xue-lian, XIAO Hong-hai, SU Shu-qiang, et al. The Significance and the Current Situation of Time-temperature Indicators of Cold Food Chain[J]. Food Science, 2002(12):43—45.
- [2] 郑伟洲,卢立新. 时间温度指示器在低温流通食品包装上的研究现状及其应用[J]. 包装工程, 2010,31(23):105—108.
ZHENG Wei-zhou, LU Li-xin. Research Status and Application of Time Temperature Indicator in Low Temperature Distribution on Food Packaging[J]. Packaging Engineering, 2010,31(23):105—108.
- [3] 田秋实,谢晶. 时间-温度指示器(TTI)的发展现状[J]. 渔业现代化,2009,30(6):50—53.
TIAN Qiu-shi, XIE Jing. Time Temperature Indicator (TTI) Development Status[J]. Fishery Modernization, 2009,30(6):50—53.
- [4] Ciba Corporation. Enzyme-based Time Temperature Indicator;US,7736866B2[P]. 2010-07-15.
- [5] 谷雪莲,肖洪海. 时间-温度指示器在食品冷藏链中的应用[J]. 制冷学报,2002(S1):128—131.
GU Xue-lian, XIAO Hong-ha. Time Temperature Indicator in the Application in the Chain of Frozen Food[J]. Journal of Refrigeration, 2002(S1):128—131.
- [6] 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. Study on the Application of Urease Development System Indicates the Shelf Life[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [7] 张恒涛. 一种酶型时间-温度指示卡的制作方法:中国,101055255A[P]. 2007-10-17.
ZHANG Heng-tao. Method for Making the Card of Enzyme Time Temperature Indicator;China, 101055255A[P]. 2007-10-17.
- [8] 吕志业,卢立新. 碱性脂肪酶时间温度指示器变色效应的研究[J]. 包装工程,2009,30(7):8—9.
LYU Zhi-ye, LU Li-xin. Study on Alkaline Lipase Time Temperature Indicator Discoloration Effect[J]. Packaging Engineering, 2009,30(7):8—9.
- [9] 朱慧莉,黎锡流. 糖化酶的固定化研究进展[J]. 食品与发酵工业,2000,27(6):75—78.
ZHU Hui-li, LI Xi-liu. Studies on Immobilization of Glucoamylase[J]. Food and Fermentation Industry, 2000, 27(6):75—78.
- [10] 王富科. α 淀粉酶固定化的研究[J]. 安徽农业科学, 2008,36(21):8872—8873.
WANG Fu-ke. Study on α -amylase Immobilized[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008,36(21):8872—8873.
- [11] 鱼园. 载体吸附交联及无载体交联固定化磷脂酶D方法的研究[D]. 西安:西北大学,2010.
YU Yuan. Study on the Method of Adsorption of Crosslinking Carrier and and Crosslinked Carrier Free Immobilization of Phospholipase D[D]. Xian: Xibei University, 2010.
- [12] 毕金峰. 活性炭固定化 α -转移葡萄糖苷酶的研究[J]. 河南工业大学学报,2005,26(5):11—14.
BI Jin-feng. Study on Immobilization of α -transglucosidase Activated Carbon[J]. Journal of Henan University of Technology, 2005,26(5):11—14.
- [13] 吴定,邹耀洪,王云,等. 固定化酶生产低聚异麦芽糖酶工艺研究[J]. 食品科学,2005,26(3):125—127.
WU Ding, ZOU Yao-hong, WANG Yun, et al. Research of Immobilized Enzyme Producing Isomal Tooligosaccharide Enzyme Technology[J]. Food Science, 2005,26(3):125—127.
- [14] 魏甲乾,周剑平,张文齐. 无载体固定化酶的研究进展[J]. 甘肃科学学报,2006,18(1):66—70.
WEI Jia-qian, ZHOU Jian-ping, ZHANG Wen-qi. Research Progress of Free Carriers for Enzyme Immobilization[J]. Journal of Gansu Sciences, 2006,18(1):66—70.

- ZHANG Ying. The Application of Computer Image Processing Technology Research[J]. Computer CD Software and Applications, 2011(20):161.
- [7] HOLLY M. MATLAB for Engineers (Third Edition) [M]. Newjersey: Prentice Hall, 2011.
- [8] 马晓路. MATLAB 图像处理从入门到精通[M]. 北京: 中国铁道出版社, 2013.
- MA Xiao-lu. MATLAB Image Processing from Entry to the Master[M]. Beijing: China Railway Press, 2013.
- [9] RAFAEL C G, RICHARD E. Digital Image Processing (Third Edition) [M]. Newjersey: Prentice Hall, 2007.
- [10] 孙玉秋. 卷筒纸印刷机张力控制研究[J]. 包装工程, 2008, 29(3): 90—92.
- SUN Yu-qiu. Research of Web Press Tension Control[J]. Packaging Engineering, 2008, 29(3): 90—92.
- [11] LEE Jang-won, LEE Chang-won, SHIN Kee-hyun. Tension Estimation by Using Register Error in Roll to Roll e-Printing System[J]. 17th IFAC World Congress, 2008: 11889—11894.
- [12] PATROVA A. Investigation of Stress-strain Behaviour of Wet Paper Sheets[D]. Sweden: Lulea University of Technology, 2010.
- [13] 黎妹红, 杜晔, 刘吉强. 一种用于卷筒纸印刷的智能套准系统[J]. 计算机工程, 2011, 37(22): 287—289.
- LI Mei-hong, DU Ye, LIU Ji-qiang. Intelligent Register System for Web-press[J]. Computer Engineering, 2011, 37(22): 287—289.
- [14] 赵晨飞. 包装印刷用纸的吸墨性对印品质量的影响[J]. 包装工程, 2008, 29(9): 47—49.
- ZHAO Chen-fei. Analysis of the Effect of Papers Ink Receptivity on the Quality of Printed Product[J]. Packaging Engineering, 2008, 29(9): 47—49.
- [15] 王尚义. 最新印刷纸实用知识手册[M]. 北京: 印刷工业出版社, 1997.
- WANG Shang-yi. Practical Knowledge of the Latest Printing Paper Manual[M]. Beijing: Graphic Communications Press, 1997.
- [16] 杨婷婷. 纤维特征对纸张结构和性能的影响[J]. 广西轻工, 2007(10): 15—18.
- YANG Ting-ting. The Effect of Fiber Characteristics on the Structure and Properties of the Paper[J]. Guangxi Journal of Light Industry, 2007(10): 15—18.
- [17] TURRADO S J, et al. Fiber Properties and Their Influence on Paper Structure[J]. SPIE, 1999, 1(3227): 45—55.
- ~~~~~
- (上接第 65 页)
- [15] SUSANNA F D. Convenience of Immobilized Bacillus Licheniformis α -amylase as TTI[J]. Chem Tech Biotechnol, 1994, 59: 193—199.
- [16] THOMAS H M. A Renewed Interest in Immobilized Enzymes[J]. Science, 1984, 4635(223): 474—476.
- [17] SUSANNA F D. Immobilized α -amylase from Bacillus Licheniformis: A Potential Enzymatic Time-temperature Integrator for Thermal Processing[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1992, 6(27): 661—673.
- [18] 韩志萍, 叶剑芝, 罗荣琼. 固定化酶的方法及其在食品中的应用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(5): 48—53.
- HAN Zhi-ping, YE Jian-zhi, LUO Rong-qiong. Research Progress of Immobilized Enzyme and Its Application in Food[J]. Preservation and Processing, 2012, 12(5): 48—53.
- [19] 黄玲. 琼脂包埋法固定化 α 淀粉酶特性的研究[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(8): 56—58.
- HUANG Lin. Study on the Characteristics of Agar Immobilization of Amylase[J]. Chemical and Biological Engineering, 2007, 24(8): 56—58.
- [20] 陈雄. 固定化糖化酶的研究[J]. 中国酿造, 2001(2): 19—20.
- CHEN Xiong. Studies on the Immobilization of Glucoamylase[J]. China Brewing, 2001(2): 19—20.
- [21] GB 8276—2006, 食品添加剂糖化酶制剂[S].
- GB 8276—2006, Food Additives Glucoamylase Preparation[S].
- [22] 郑光临. 基于淀粉酶的时间-温度指示器的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- ZHENG Guang-lin. Study on Time Temperature Indicator Based on Amylase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.