

苯乳酸纳米粒保鲜膜对冷藏鲟鱼保鲜效果研究

于晓倩, 张成林, 李晴, 刘尊英

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: **目的** 将苯乳酸纳米粒作为抑菌剂, 制备苯乳酸纳米粒抗菌复合保鲜膜, 为苯乳酸生物防腐剂的应用和新型活性包装材料的研究提供理论依据。**方法** 通过离子凝胶法制备苯乳酸纳米粒(PLANanoPs), 将其添加至壳聚糖-明胶基质中, 制成壳聚糖-明胶-苯乳酸纳米粒(G-C-NanoPLA)抗菌复合保鲜膜, 用于冷藏鲟鱼的保鲜; 随后测定鲟鱼贮藏过程中的菌落总数、挥发性盐基氮(TVB-N)值、pH值、硫代巴比妥酸值(TBA)以及感官评分的变化。**结果** 添加苯乳酸纳米粒(质量浓度为0.1 mg/mL)的复合膜显著抑制了鲟鱼感官评分的降低和鲟鱼细菌总数、TVB-N、TBA及pH值的上升($P<0.05$), 并将鲟鱼货架期延长了4 d。**结论** 苯乳酸纳米粒复合保鲜膜可以有效提高鲟鱼的储存品质, 延长鲟鱼保质期, 是非常有前景的水产品活性包装材料。

关键词: 苯乳酸; 复合膜; 鲟鱼; 生物保鲜

中图分类号: S983 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2020)09-0017-06

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2020.09.003

Effect of G-C-NanoPLA Films on the Preservation of Froze Sturgeon

YU Xiao-qian, ZHANG Cheng-lin, LI Qing, LIU Zun-ying

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: The work aims to prepare the chitosan-gelatin-phenyllactic acid (G-C-NanoPLA) antibacterial composite film with phenyllactic acid nanoparticles (PLANanoPs) as bacteriostatic agents, so as to provide a theoretical basis for the application of phenyllactic acid biopreservatives and the research on new active packaging materials. The PLANanoPs were prepared by ion gel method and added to the chitosan-gelatin matrix to prepare G-C-NanoPLA antibacterial composite films for the preservation of sturgeon fillet. The changes in the total number of colonies, total volatile base nitrogen (TVB-N), pH value, thiobarbituric acid (TBA) value and sensory score of sturgeon during its storage were subsequently determined. The G-C-NanoPLA composite films with mass concentration of 0.1 mg/mL PLANanoPs significantly inhibited the decrease of sensory score and the increase of the total number of colonies, TVB-N, TBA and pH value ($P<0.05$), and extended the shelf life of sturgeon for 4 days. In conclusion, the G-C-NanoPLA composite film can improve the storage quality and extend the shelf life of sturgeon, which is a very promising active packaging material for seafood.

KEY WORDS: 3-phenyllactic acid; composite film; sturgeon; bio-preservation

苯乳酸(3-phenyllactic Acid, PLA)主要由乳酸菌产生, 已被证实具有广谱抑菌活性, 是一种安全、

高效、广谱的新型天然抗菌物质, 也是一种天然生物保鲜剂^[1-2]。目前限制苯乳酸发展的重要因素是效

收稿日期: 2019-09-30

基金项目: 山东省重点研发项目(2019GNC106064)

作者简介: 于晓倩(1995—), 女, 中国海洋大学硕士生, 主攻水产品高值化利用。

通信作者: 刘尊英(1974—), 女, 博士, 中国海洋大学教授, 主要研究方向为水产品保鲜与加工。

率较低^[3]。目前,包埋技术常被用于天然抗菌剂的前处理,以提高其在食品加工环境下的长效抗菌性能。纳米级的粒径具有小尺寸效应和表面效应,除了能很好地实现对内容物的保护外,纳米粒还表现出更高的稳定性和更好的控释、靶向性功能^[4]。可食性膜是由生物大分子为原料,通过膜基质分子间产生相互作用形成的膜包装材料,是控制食品品质下降的有效措施^[5-6]。明胶是一种无毒的亲水性大分子胶体,是一种常见的成膜材料,虽具有易获得、成本低等优势,但阻水性和力学性能较差。壳聚糖是甲壳素脱 N-乙酰基的产物,无毒,可降解,与明胶具有良好的生物相容性。壳聚糖通过质子化氨基与明胶中带负电荷的侧链基团间静电的相互作用,可以极大改善单一膜材料的理化性能^[7]。

中国是鲟鱼养殖第一大国,鲟鱼肉厚骨软、营养丰富、味道鲜美,具有极高的营养价值和经济价值,素有水中“活化石”之称。鲟鱼由于组织结构疏松、不饱和脂肪酸和蛋白质含量高,因此容易腐败被氧化,失去营养价值和商品价值,进而造成巨大的资源浪费和经济损失^[8]。文中拟将苯乳酸纳米粒与明胶-壳聚糖复合膜结合制备明胶-壳聚糖-苯乳酸纳米粒复合保鲜膜,并将其用于冷藏鲟鱼的保鲜,希望可以为苯乳酸生物防腐剂的应用和新型活性包装材料的研究提供理论依据。

1 实验

1.1 材料

主要材料:鲟鱼,购自当地水产市场;苯乳酸,购于上海叶源生物有限公司;壳聚糖,购于济南海得贝海洋工程有限公司;明胶,购自青岛东易科技发展有限公司;鲑鱼精 DNA (Salmon Sperm DNA),购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

主要设备:Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪,马尔文仪器有限公司;Microfuge 20R 离心机,贝克曼库尔特有限公司;申鹿 SRH 高压均质机,上海均鹿均质机有限公司;pH 计,上海仪电科学仪器有限公司;BBS-H1500 超净工作台,博科技术有限公司;MSH-20 标准加热型磁力搅拌器,KWEWAB 仪器公司。

1.3 苯乳酸纳米粒的制备与表征

称取一定量的壳聚糖粉末溶于质量浓度为 0.1 mg/mL 的醋酸溶液中,配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的壳聚糖溶液。称取一定量的鲑鱼精 DNA 和苯乳酸,分别配置成质量浓度为 2 mg/mL 的 DNA 溶液和

16 mg/mL 的苯乳酸溶液。在磁力搅拌条件下,将上述苯乳酸溶液缓慢加入壳聚糖溶液中(苯乳酸溶液与壳聚糖溶液的体积比为 1:5),搅拌 15 min 后,缓慢加入与壳聚糖相同体积的 DNA 溶液中,继续搅拌 30 min,得到苯乳酸纳米粒(PLA NanoPs)悬液。将悬浊液过 0.45 μm 滤膜,以 10 000 r/min 的速度离心 30 min,收集纳米颗粒,并冷冻干燥。

用纳米粒度分析仪测定苯乳酸纳米粒粒径、zeta 电位、PDI 和计数率(Count Rate)。测试温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,测试角度为 90 $^{\circ}$ 。

1.4 明胶-壳聚糖-苯乳酸纳米粒复合膜成膜液的制备

称取一定量的壳聚糖粉末溶于质量浓度为 0.1 mg/mL 的醋酸溶液中,配制成质量浓度为 2 mg/mL 的壳聚糖溶液,向上述壳聚糖溶液中加入等体积的、质量浓度为 0.08 mg/mL 的明胶溶液,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下磁力搅拌 30 min,得到明胶-壳聚糖成膜液,然后分别将苯乳酸(PLA)和苯乳酸纳米颗粒缓慢加入明胶-壳聚糖成膜液中,使苯乳酸和苯乳酸纳米粒的最终质量浓度为 0.1 mg/mL,制备 G-C-PLA 成膜液和 G-C-NanoPLA 成膜液,超声 20 min,备用。

1.5 样品处理

实验所用鲟鱼(3.0 $\pm$ 0.5) kg 购于当地水产市场,保活运回实验室,除去鲟鱼头、皮和内脏,并切成 5 cm $\times$ 3 cm $\times$ 0.5 cm 左右的鲟鱼片,洗净。将所有鱼片平均分为 5 组,每组(18.0 $\pm$ 0.5) kg,分别在 G-C 成膜液、G-C-PLA 成膜液(质量浓度为 0.1 mg/mL)、G-C-NanoPLA(质量浓度为 0.1 mg/mL)成膜液和蒸馏水(空白对照)中浸泡 20 min,浸泡后的鱼片在超净工作台晾干水分后置于托盘中,用保鲜膜封口,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏。重复处理 3 次,隔天取样测定相关指标。

1.6 保鲜效果测定方法

1.6.1 菌落总数的测定

参照 GB 4789.2—2016《食品微生物学检验菌落总数测定》中的方法测定菌落总数^[9]。

1.6.2 挥发性盐基氮(TVB-N)的测定

参照 GB 5009.228—2016 中的微量扩散法测定挥发性盐基氮含量^[10]。

1.6.3 pH 的测定

称取 4 g 样品置于锥形瓶中,随后加入 40 mL 蒸馏水,绞碎均质,过滤后用 pH 计测定 pH 值^[11]。

1.6.4 硫代巴比妥酸(TBA)的测定

参照 GB 5009.181—2016 中的分光光度法测定硫

代巴比妥酸含量^[12]。

1.6.5 感官评分的测定

评分标准见表 1,根据鲟鱼的色泽及纹理、气味、弹性和粘液量等 4 个方面进行感官评分。

1.7 数据分析

采用 SPSS 18.0 软件进行方差分析,结果用平均值±标准偏差表示, $P<0.05$ 为差异显著。采用 Origin 2017 作图。

2 结果与分析

2.1 苯乳酸纳米粒的表征

苯乳酸纳米粒的平均粒径、电位、多分散指数和计数率见表 2,可知制备的苯乳酸纳米粒胶体平均粒径为(143.8±0.9)nm ,多分散指数(PDI)为 0.13±0.02 ,

表明胶体中纳米颗粒粒径比较均一 ,无凝聚产生的团聚颗粒。苯乳酸纳米粒在壳聚糖胶体中电位为 31.6±2.4 ,带正电荷,由于静电排斥,苯乳酸纳米粒在胶体中可以维持稳定的分散体系。

2.2 膜的扫描电镜结果

扫描电子显微镜可以直观分析复合膜的微观形貌结构,见图 1。由图 1a 可知,壳聚糖-明胶膜显示出均匀致密的微观结构,截面平整无孔隙。当加入质量浓度为 0.1 mg/mL 的苯乳酸时,薄膜截面变得粗糙,且出现一些大小不均的团状颗粒(见图 1b),这可能是在膜干燥过程中苯乳酸出现聚集,导致共聚物体系中出现相分离所致。由图 1c 可知,加入苯乳酸纳米粒后,膜截面上的团聚颗粒消失,出现许多均匀分布的球状颗粒,表明苯乳酸纳米化有利于保持苯乳酸在多相体系中的稳定性,且表现出更好的分散性,可以均匀分散在膜基质中。

表 1 鲟鱼的感官评分
Tab.1 Sensory scoring criteria of sturgeon fillet

分值	色泽及纹理	气味	质地	粘液
5	颜色呈均匀浅白色,色泽明亮,纹理清晰	鲟鱼肉的清香味	紧实有弹性,指压无形变	表面无粘液
4	出现部分淡黄色,光泽较好但纹理不清晰	产生轻微鱼腥味,鲟鱼清香味减弱	弹性较弱,指压后有轻微形变但可恢复	粘液较少且无粘性
3	呈淡黄色,纹理较模糊	鱼腥味明显	弹性很弱,指压后形变仅能部分恢复	粘液较明显,有轻微粘性
2	表面呈黄褐色,暗淡无光泽,纹理模糊	鱼腥味或其他异味严重	无弹性且质软,指压后不能恢复	粘液明显且浑浊,粘性较强
1	表面呈浑浊的褐绿色,无光泽,无纹理	腐臭味严重	组织松散,指压后软烂	粘液较多且浑浊,粘性很大

表 2 苯乳酸纳米粒的平均粒径、电位、多分散指数和计数率
Tab.2 Mean size, zeta potential, PDI and count rate of PLANanoPs

粒径/nm	Zeta 电位/mV	多分散指数	计数率
143.8±0.9	31.6±2.4	0.13±0.02	356.6±1.2

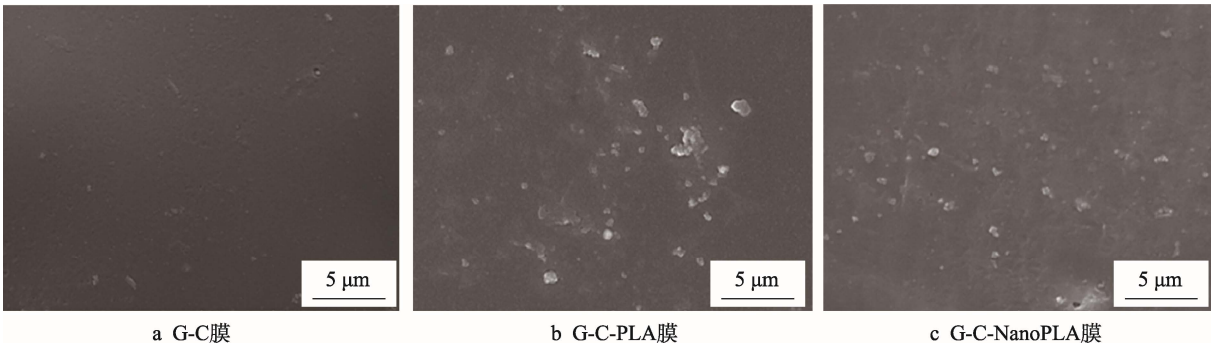


图 1 苯乳酸纳米粒复合保鲜膜截面扫描电镜结果

Fig.1 SEM images of cross-section of G-C, G-C-PLA and G-C-NanoPLA films

2.3 鲟鱼片菌落总数变化

菌落总数是衡量产品腐败程度的关键指标之一。复合膜处理对冷藏鲟鱼菌落总数的影响见图2,可知鲟鱼菌落总数随贮藏时间的延长呈上升趋势,在贮藏第6天,对照组(8.70 lg CFU/g)和G-C组(7.75 lg CFU/g)的细菌总数均高于水产品鲜度限量标准(7 lg CFU/g),而此时G-C-PLA组(5.97 lg CFU/g)和G-C-NanoPLA组(5.16 lg CFU/g)的菌落总数显著低于其余2组($P<0.05$)。在贮藏第8天时,G-C-PLA组菌落总数达到7.19 lg CFU/g,超出了限量标准。在第10 d时,G-C-NanoPLA组的样品刚到腐败期,菌落总数达到7.61 lg CFU/g。实验结果表明,苯乳酸经纳米化后,抑菌活性得到提高,G-C-NanoPLA复合保鲜膜处理可以将鲟鱼的货架期从6 d延长至10 d。Masschalck的研究也表明添加了溶菌酶的鱼皮明胶膜能够显著抑制枯草芽孢杆菌等革兰氏阴性菌的生长^[13],这是因为膜可以增强抑菌物质的粘附性,进而增强作用效果,并延长了作用时间。

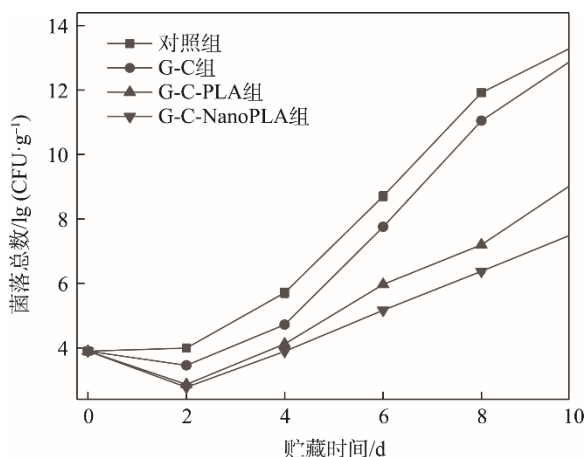


图2 复合膜处理对冷藏鲟鱼菌落总数的影响

Fig.2 Effect of composite film on the total number of colonies of sturgeon fillet

2.4 pH 值变化

复合膜处理对冷藏鲟鱼 pH 的影响见图3。水产品宰后初期,在肌糖原进行无氧酵解形成的乳酸、其他生化途径产生的酸类物质,以及 ATP 在酶的作用下分解产生 H^+ 的共同作用下,鱼片的 pH 值呈下降趋势^[14]。随着贮藏时间的延长,蛋白质的分解产物导致微生物快速繁殖,微生物代谢导致氨类物质增多,进而使 pH 值上升。对照组的 pH 值在第4天达到最低点,而其他处理组的 pH 值在第6 d才达到最低点,这表明不同复合膜处理都能缓解鱼体内 ATP 的下降,延长鱼体死后僵直的时间。在贮藏第6天后,G-C组、G-C-PLA组和G-C-NanoPLA组的 pH 值上升速度均显著低于对照组($P<0.05$),这表明复合膜包裹和添

加苯乳酸均能够有效抑制微生物分解蛋白质和 ATP 的降解过程,进而延长鲟鱼的货架期,且苯乳酸纳米化后,这种抑制作用更为显著。

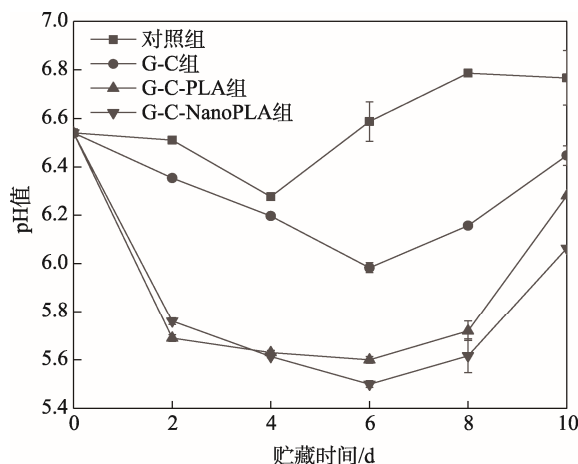


图3 复合膜处理对冷藏鲟鱼 pH 的影响

Fig.3 Effect of composite film on pH of sturgeon fillet

2.5 TVB-N 含量变化

挥发性盐基氮(TVB-N)是衡量水产品腐败变质的重要指标之一,反映了水产品在内源性酶和微生物作用下,分解蛋白质和非蛋白质物质积累的具有挥发性的氨、二甲胺和三甲胺等低级胺类的情况^[15]。GB 10136—2015《动物性水产品卫生标准》规定,TVB-N含量(mg/kg) ≤ 300.0 mg/kg时为合格品。复合膜处理对冷藏鲟鱼挥发性盐基氮的影响见图4,可知在贮藏第6天时,对照组 TVB-N 含量达到了277.6 mg/kg, G-C组和G-C-PLA组分别达到了240.3,177.3 mg/kg, G-C-NanoPLA组 TVB-N 含量仅有144.7 mg/kg,分别比对照组和G-C-PLA组低47.87%和18.39%,差异达显著水平($P<0.05$),且这种趋势一直延续至贮藏第10天。这表明壳聚糖-明胶-苯乳酸复合膜可以抑制微生物活动,减少挥发性盐基氮的积累,且在苯乳酸

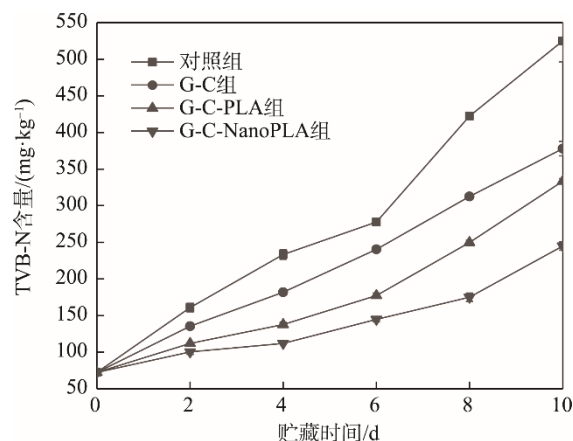


图4 复合膜处理对冷藏鲟鱼挥发性盐基氮的影响

Fig.4 Effect of composite film on TVB-N of sturgeon fillet

纳米化后,抑制作用得到显著提升,这与菌落总数变化的结果一致。

2.6 TBA 含量变化

脂肪氧化是导致水产品腐败的重要因素之一,不饱和脂肪酸的氧化降解产物丙二醛(MAD)可以与硫代巴比妥酸(TBA)试剂反应,生成稳定的红色化合物^[16],因此TBA值可以反映肉类的氧化酸败程度。贮藏期间鲟鱼TBA值的变化情况见图5,可

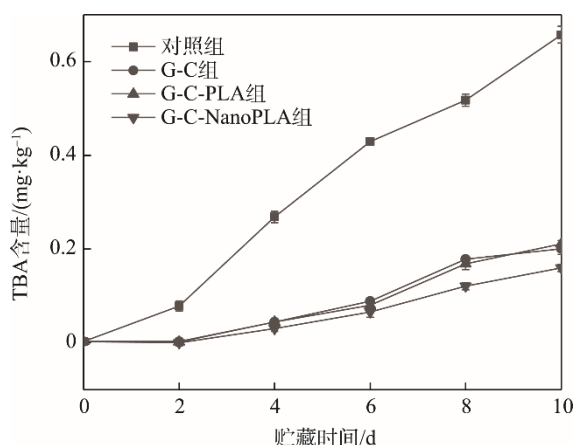


图5 复合膜处理对冷藏鲟鱼丙二醛含量的影响
Fig.5 Effect of composite film on MDA of sturgeon fillet

知对照组的TBA初始值为0.0026 mg/kg,贮藏第6天时为0.429 mg/kg。此时G-C组、G-C-PLA组和G-C-NanoPLA组的TBA值分别为0.089, 0.080, 0.065 mg/kg,其中G-C-PLA组和G-C-NanoPLA组分别比对照组低81.35%和84.85% ($P < 0.05$),且这种现象一直延续至贮藏第8天。表明,壳聚糖-明胶膜能有效抑制脂肪的氧化酸败,这是因为明胶壳聚糖膜具有阻隔氧气和水蒸气透过的能力^[17]。加入苯乳酸纳米粒后,抑制作用得到进一步加强,苯乳酸抑制了微生物引起的脂肪氧化,因此壳聚糖-明胶-苯乳酸纳米粒保鲜膜是一种良好的抗氧化保鲜材料。

2.7 感官评价变化

感官评分是评价鲟鱼品质最直接的指标,其从色泽、气味、质地和粘液等方面反应鲟鱼的新鲜程度,具体的感官评分见图6。由图6可知,随着贮藏期间脂肪的酸败和蛋白质的分解,所有处理组的感官评分都呈下降趋势。从第4天开始,G-C-NanoPLA组的评分>G-C-PLA组的评分>G-C组的评分>对照组的评分,这表明涂膜处理能有效延缓鲟鱼品质的劣化,且这一作用在颜色和气味方面尤为明显。

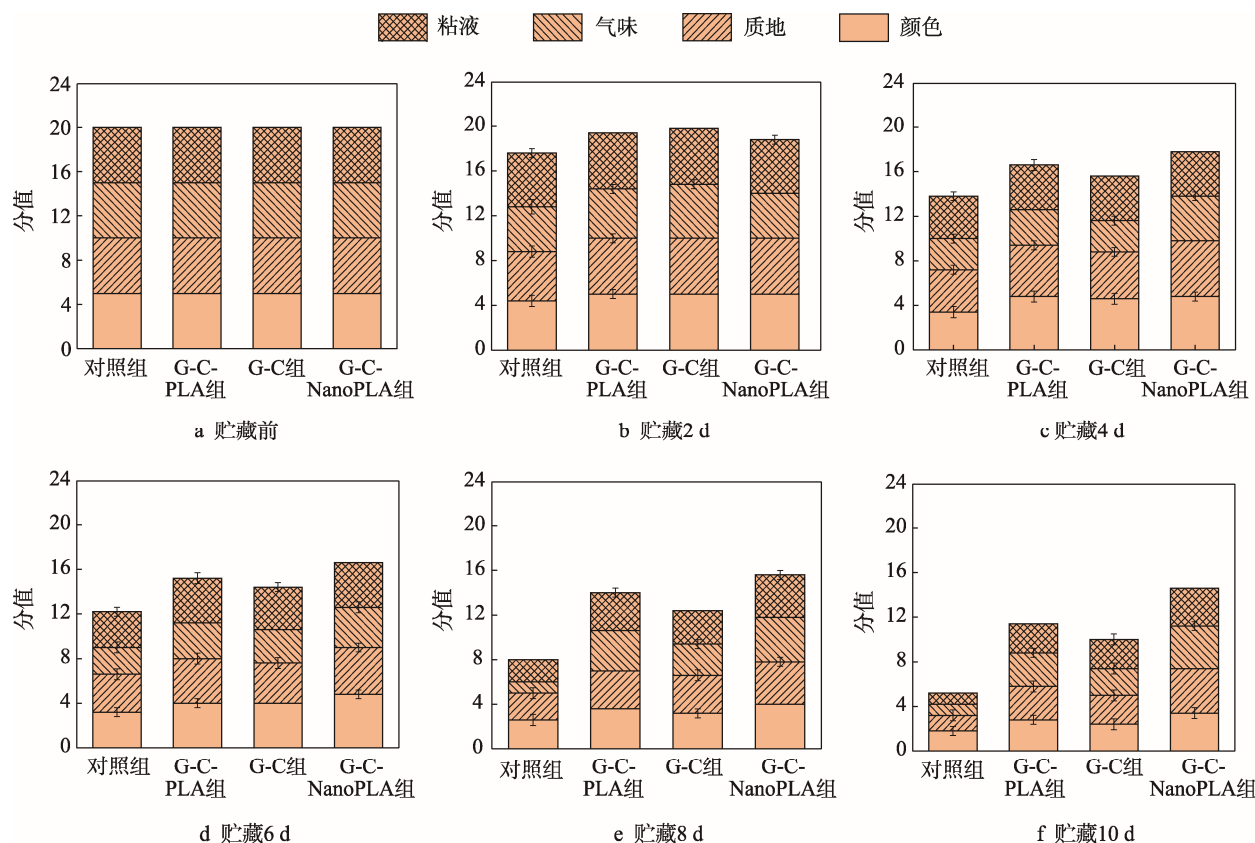


图6 复合膜处理对鲟鱼感官评分的影响
Fig.6 Effects of composite film on sensory scores of sturgeon

3 结语

通过鲟鱼菌落总数、pH值、TBA值、TVB-N值和感官评价等指标比较了游离苯乳酸、壳聚糖-明胶膜和壳聚糖-明胶-苯乳酸纳米粒膜对冷藏鲟鱼的保鲜效果。结果表明,对照组的货架期为5 d; G-C-PLA组虽然可以抑制菌落总数的生长,但无法显著延长鲟鱼的保鲜时间; G-C组虽在阻止脂肪氧化方面显示出较好的效果,但对菌落总数的降低效果不显著,无法有效延长保鲜期;在4℃下, G-C-NanoPLA组对鲟鱼的保鲜期为10 d,且各指标都优于其他处理组,这表明 G-C-NanoPLA复合保鲜膜在抑制水产品脂肪氧化和微生物生长方面有着广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] KUS P M, JERKOVIC C I G, TUBEROSO C, et al. Cornflower (*Centaurea Cyanus* L) Honey Quality Parameters: Chromatographic Fingerprints, Chemical Biomarkers, Antioxidant Capacity and Others[J]. Food Chemistry, 2014, 142: 12—18.
- [2] LI X, NING Y, LIU D, et al. Metabolic Mechanism of Phenyllactic Acid Naturally Occurring in Chinese Pickles[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 265—270.
- [3] NING Y, YAN A, YANG K, et al. Antibacterial Activity of Phenyllactic Acid Against *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* by Dual Mechanisms[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 533—540.
- [4] AGUIAR J, ESTEVINHO B N, SANTOS L. Microencapsulation of Natural Antioxidants for Food Application—the Specific Case of Coffee Antioxidants—a Review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 58: 21—39.
- [5] DEHGHANI S, HOSSEINI S V, REGENSTEIN J M. Edible Films and Coatings in Seafood Preservation: a Review[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 505—513.
- [6] 张乐, 黄艳玲, 陈珊, 等. 二氧化钛对鱼皮明胶纳米可食性膜理化及保鲜性能的影响[J]. 保鲜与加工, 2018, 18(5): 52—56.
ZHANG Le, HUANG Yan-ling, CHEN Shan, et al. Effect of Titanium Dioxide on Physico-chemical and Preservation Properties of Fish Skin Gelatin Nano-edible Films[J]. Storage and Process, 2018, 18(5): 52—56.
- [7] LIU J, LIU S, CHEN Y, et al. Physical, Mechanical and Antioxidant Properties of Chitosan Films Grafted with Different Hydroxybenzoic Acids[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 71: 176—186.
- [8] 梁焕秋, 赵冰, 龚炳德, 等. 淡水鱼防腐保鲜栅栏因子的研究进展[J]. 肉类研究, 2014(5): 50—53.
- LIANG Huan-qiu, ZHAO Bing, GONG Bing-de, et al. Recent Progress in the Research of Hurdle Factors for Freshwater Fish Preservation[J]. Meat Research, 2014, 5: 50—53.
- [9] GB 4789.2—2016, 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2—2016, Microbiological Examination-determination of Colony-forming Units[S].
- [10] GB 5009.228—2016, 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定[S].
GB 5009.228—2016, National Food Safety Standards-determination of TVB-N in Foods[S].
- [11] 王娟, 张万刚, 刘念, 等. 梅山猪与三元杂交猪肉宰后成熟过程品质变化比较[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 254—259.
WANG Juan, ZHANG Wan-gang, LIU Nian, et al. Comparison of Meat Quality between Meishan and Three-crossbred Pigs during Postmortem Aging[J]. Food Science, 2015, 36(8): 254—259.
- [12] GB 5009.181—2016, 食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定[S].
GB 5009.181—2016, National Standard for Food Safety-determination of Malonaldehyde in Food[S].
- [13] MASSCHALK B, MICHIELS C W. Antimicrobial Properties of Lysozyme in Relation to Foodborne Vegetative Bacteria[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2003, 29(3): 191—21.
- [14] 于林, 陈舜胜, 王娟娟, 等. 茶多酚改性胶原蛋白-壳聚糖复合膜对冷藏斜带石斑鱼的保鲜效果[J]. 食品科学, 2017(3): 238—244.
YU Lin, CHEN Shun-sheng, WANG Juan-juan et al. Preservation Effect of Collagen-Chitosan Blend Film Modified by Tea Polyphenols on Grouper (*Epinephelus Coioides*) Fillets Stored at 4℃[J]. Food Science, 2017(3): 238—244.
- [15] 张涵, 徐高原, 冯爱国, 等. 聚赖氨酸复合涂膜协同气调包装对金鲳鱼保鲜作用研究[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 171—176.
ZHANG Han, XU Gao-yuan, FENG Ai-guo, et al. Combined Preservation Effects of Polylysine Composite Coating with Modified Atmospheric Packaging on *Trachinotus Ovatus*[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 171—176.
- [16] HERNANDEZ M D, LOPEZ M B, LÓPEZ, A Á, et al. Sensory, Physical, Chemical and Microbiological Changes in Aquacultured Meagre (*Argyrosomus Regius*) Fillets during Ice Storage[J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 237—245.
- [17] PHAKAWAT T, SOOTTAWAT B, THUMMANOON P. Properties and Antioxidant Activity of Fish Skin Gelatin Film Incorporated with Citrus Essential Oils[J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1571—1579.