负载蓝莓花青素的壳聚糖基智能指示膜监测 花蛤新鲜度的研究

王欣,李停停,冯龙斐,张腾

(上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093)

摘要:目的研发一种可视化的新鲜度指示薄膜,探究其在花蛤新鲜度监测中的可行性。方法 以对 pH 敏感的蓝莓花青素为指示剂,壳聚糖为基质,通过复合明胶、乳酸链球菌素(Nisin)和迷迭香精油制备 5种智能指示膜,研究其 pH 敏感性、颜色响应性、微观结构、阻隔特性、力学性能、含水率、水溶性、 抗氧化、抗菌等特性。结果 蓝莓花青素溶液在 pH 值为 3~12 内颜色响应明显。随着膜组分的增加, 薄膜微观结构的粗糙度增加,而水蒸气阻隔性能逐渐降低。Nisin 和迷迭香精油的添加显著增强了抗氧 化和抗菌能力。壳聚糖/Nisin/迷迭香精油-蓝莓花青素(CSNR-ATH)膜的紫外线阻隔性能较优而水溶 性低。CSNR-ATH 膜在花蛤的冷藏过程中能灵敏反映花蛤新鲜度的变化,复合指示膜由淡绿色变为黄 绿色。结论 负载蓝莓花青素的壳聚糖基智能指示膜为花蛤新鲜度的监测提供了一种新的选择。 关键词:智能指示膜;壳聚糖;蓝莓花青素;花蛤;新鲜度 中图分类号:TS206.4 文献标识码:A 文章编号:1001-3563(2023)11-0010-10 DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2023.11.002

Chitosan-based Smart Indicator Film Loaded with Blueberry Anthocyanins for Monitoring Clam Freshness

WANG Xin, LI Ting-ting, FENG Long-fei, ZHANG Teng

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

ABSTRACT: The work aims to develop a visual freshness indicator film and explore its feasibility in the freshness monitoring of clams. With blueberry anthocyanins sensitive to pH as the indicator and chitosan as the substrate, five smart indicator films were prepared by incorporating gelatin, Nisin, and rosemary essential oil. Then, the film properties such as pH sensitivity, color responsiveness, microstructure, barrier properties, mechanical properties, water content and water solubility and antioxidant and antibacterial properties were investigated. The color of blueberry anthocyanin solution responded significantly to pH in the range of 3-12. The roughness of the microstructure of the film increased with the addition of components, while the water vapor barrier properties gradually decreased. The addition of Nisin and rosemary essential oil significantly increased the antioxidant and antibacterial abilities. The chitosan/Nisin/rosemary essential oil-blueberry anthocyanin (CSNR-ATH) film exhibited better UV barrier properties and lower water solubility. The CSNR-ATH film could reflect the freshness of clams sensitively during the refrigeration process, and the composite indicator film changed from light green to yellow-green. Therefore, the prepared smart indicator film (CSNR-ATH) provides a

收稿日期: 2023-03-27

基金项目:国家重点研发计划(2022YFF110110)

作者简介:王欣(1975—),女,博士,教授,主要研究方向为食品安全与保鲜。

new choice for the freshness monitoring of clams.

KEY WORDS: smart indicator film; chitosan; blueberry anthocyanins; clams; freshness

食品新鲜度指示型包装可以直观反映食品的品质及安全信息,是当前研究热点之一^[1]。食品包装环境的 pH 值与食品新鲜度密切相关^[2]。花青素是一种来源广泛的水溶性可食用天然色素,随 pH 值变化呈现明显的颜色变化,是一种理想的 pH 敏感指示剂^[3]。例如,蓝莓花青素已被用于监测牛肉^[4]、牛奶^[5]的新鲜度。菲律宾蛤仔(*Ruditapes. philippinarum*),俗称花蛤,是世界上主要的经济贝类之一。鲜活菲律宾蛤仔水分含量较高,易受体内微生物生长繁殖的影响而使新鲜度降低,导致样品中蛋白质的分解和挥发性盐基总氮(TVB-N)含量的增加^[6],因此,亟须对其新鲜度进行实时监测。

膜的基材对食品新鲜度指示型包装的构建也很 重要。其中,来源广泛、生物相容性好、成膜能力高 的壳聚糖是理想选择之一^[7]。当然,为了改善单纯壳 聚糖基薄膜力学性能较差的问题,研究者也尝试将壳 聚糖和明胶共混以提高膜的物理性能^[8],或者通过添 加多酚类、精油、多肽等天然生物活性化合物改善薄 膜的物理及功能特性^[9]。

本文以壳聚糖为基质,通过复合明胶、乳酸链球 菌素(Nisin)、迷迭香精油和蓝莓花青素制备了5种 pH 敏感的壳聚糖基复合薄膜。在分析蓝莓花青素及 复合薄膜的 pH 敏感和颜色响应性的基础上,对膜材 的微观结构、物理特性和功能特性等进行研究,并将 较优的指示膜应用于花蛤冷藏过程中新鲜度的监测。

1 实验

1.1 材料与仪器

主要材料:壳聚糖(CS,脱乙酰度≥95%),上 海麦克林股份有限公司;明胶(G),上海维塔有限 公司;乳酸链球菌素(N),浙江新银象生物工程有 限公司;迷迭香油(R),上海鼎芬化学科技有限公司; 甘油,国药集团化学试剂有限公司;吐温-80、蓝莓 花青素(ATH)、甲基红、溴甲酚绿,上海麦克林股 份有限公司;花蛤,上海壹佰米有限公司。

主要仪器: 85-2 型恒温磁力搅拌器,金坛市科 析仪器有限公司;恒温恒湿培养箱,上海跃进医疗器 械有限公司;C-400 型色差仪,日本 Chroma Meter 公司;UV-9100 D 紫外-可见分光光度计,北京莱伯 泰科仪器股份有限公司;Synergy H4 多功能酶标仪, 美国 BioTek Instruments Inc.;TA.XT.Plus 型质构仪, 英国 Stable Micro System 公司;GeminiSEM 300 扫描 电子显微镜,德国 Carl Zeiss 公司;自动凯氏定氮仪, 上海勇规分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 pH 敏感薄膜的制备

将一定质量的壳聚糖溶解在体积分数为 1%的乙 酸溶液中,得到质量分数为 2%的 CS 溶液。将一定 质量的明胶在去离子水中浸泡 10 min, 然后 50 ℃水 浴搅拌 30 min,得到质量分数为 2%的明胶溶液(G)。 将 CS 溶液与 G 溶液以 2:1 的体积比混合得壳聚糖-明胶(CSG)溶液。分别在100 mL的CS和CSG溶 液中加入 0.8 g 的 Nisin, 搅拌均匀得到 CSN 和 CSGN 溶液。将迷迭香精油与吐温-80 以 1:5 的质量比进 行混合得乳化的精油,在100 mL的CSN和CSGN 溶液中分别加入 0.5 g 乳化的迷迭香精油,得到 CSNR 和CSGNR溶液,每种溶液中都含有一定量的甘油(体 积分数为 5%)。最后向 CS、CSN、CSNR、CSGN 和 CSGNR 溶液(100 mL)中加入 0.06 g 的蓝莓花青素, 搅拌均匀后于室温下静置脱气。取 10 g 成膜溶液倒 入直径为9 cm 的培养皿中,在温度为40 ℃、相对 湿度为 30%的条件下干燥 24 h, 薄膜分别命名为 CS-ATH、CSN-ATH、CSNR-ATH、CSGN-ATH 和 CSGNR-ATH。取样分析前,所有薄膜在温度为25℃、 相对湿度为 50%下平衡 48 h。

1.2.2 蓝莓花青素溶液的紫外光谱扫描

在 Liu 等^[10]的方法基础上作适量修改。取 50 μL 蓝莓花青素溶液(1 g/L)至5 mL 的 pH 缓冲液中, 混匀后使用紫外分光光度计扫描获得蓝莓花青素在 不同 pH 值(3~12)的缓冲溶液下的吸收光谱(波 长范围为 300~800 nm)。其中,缓冲液由 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄、0.2 mol/L 的柠檬酸和 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液混合制备而成。

1.2.3 智能指示膜在不同 pH 值缓冲溶液中的颜色 响应

将 5 种薄膜剪切成方形(2 cm×2 cm),在 pH 值 为 3~12 的缓冲溶液中浸泡 10 min 后取出,去除薄 膜表面多余的缓冲溶液,在固定光源下拍照记录薄膜 的颜色变化。

1.2.4 膜的表征

1.2.4.1 厚度

使用数显千分尺测定样品的厚度,在薄膜上随机 取 10 个点进行测量,最后计算平均值。

1.2.4.2 透过率和不透明度

将薄膜裁剪成1 cm×4 cm的长方形,在300~800 nm 扫描范围内测量薄膜(20 mm×40 mm)的透过率(*T*)。 薄膜的不透明度(*O*)根据式(1)进行计算。

$$O = \frac{A_{600}}{d} \tag{1}$$

式中: A₆₀₀ 为薄膜在 600 nm 处的吸光度; *d* 为薄 膜厚度, mm。

1.2.4.3 水分含量和水溶性

薄膜的水分含量根据 Shen 等^[11]的方法修改后测 定。薄膜(20 mm×20 mm)于室温下称量后,在 105 ℃ 下干燥 24 h 后再次称量。根据式(2)计算样品薄膜 的水分含量(M)。

$$M = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$$
 (2)

将上述干燥脱水后的样品浸泡于蒸馏水(25 mL) 中,在 25 ℃下振摇 24 h 后再次在 105 ℃下干燥 24 h 后称量。根据式(3)计算薄膜的水溶率(S)。

$$S = \frac{m_2 - m_3}{m_2} \times 100\%$$
(3)

式中: m_1 为干燥前的质量; m_2 为干燥后的质量; m_3 为浸泡后的质量。

1.2.4.4 力学性能

应用质构仪测定薄膜的拉伸强度(TS)和断裂伸 长率(EB)。用千分尺测量薄膜厚度后,将长方形薄 膜(33 mm×22 mm)用夹具固定;输入样品的长度、 宽度和厚度后,以 3.33 mm/s 的拉伸速度进行测试, 每组样品重复6次。

1.2.4.5 扫描电子显微镜观察

应用扫描电子显微镜(GeminiSEM 300)分析薄膜的表面和横截面形貌。将薄膜样品在液氮中冷冻破碎后喷金镀膜,然后置于样品台,并在 10.0 kV 的加速电压下观察薄膜的表面和横截面形貌。

1.2.4.6 抗氧化特性

DPPH 自由基的清除能力的测量方法是在 Chen 等^[12]的方法基础上稍作修改。以壳聚糖添加量为基础,将样品稀释至0~5 mg/mL。取2.0 mL样品和2 mL DPPH 无水乙醇溶液(0.4 mmol/L)混合,摇匀后于 25 °C避光孵育 30 min,在 517 nm 处测量吸光度,根据式(4)计算 DPPH 自由基清除率(R_{DPPH})。

$$R_{\rm DPPH} = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$
 (4)

式中: A_0 为2 mL DPPH 自由基(乙醇)溶液与 2 mL 无水乙醇反应后的吸光度; A_1 为2 mL DPPH 自 由基(乙醇)溶液与2 mL 样品反应后的吸光度; A_2 为2 mL 样品与2 mL 无水乙醇反应后的吸光度。

ABTS 自由基的清除能力的测量方法在 Wu 等^[13]的方法基础上稍作修改。将 7.0 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液混合得到 7 mmol/L 的 ABTS 储备液,使用前在室温下避光反应 12~16 h。 ABTS 储备液用甲醇稀释,使其在 734 nm 处的吸光 度为(0.700±0.020)。测定时将 1 mL 样品和 4 mL 的 ABTS 储备液充分混合,振荡 30 s 后避光孵育 6 min, 于 734 nm 处测定吸光度,以上实验均以抗坏血酸 (VC)为阳性对照。根据式(5)计算 ABTS 自由基 清除活性 (*R*_{ABTS})。

$$R_{\rm ABTS} = \frac{1 - (A_4 - A_5)}{A_3} \times 100\%$$
 (5)

式中: A_3 为4mLABTS自由基溶液与1mL去离 子水反应后的吸光度; A_4 为4mLABTS自由基溶液 与1mL样品反应后的吸光度; A_5 为4mL样品与1mL 去离子水反应后的吸光度。

1.2.4.7 抗菌特性

以纸片扩散法分析薄膜溶液的抗菌性能^[14]。6 mm 定性滤纸片于 5 mL 棕色玻璃瓶中灭菌干燥后,在无 菌条件下分别将 5 种薄膜溶液注入棕色瓶中。以无菌 水为阴性对照,浸泡 1 h (按每个纸片饱和吸水量为 500 µL 计)。分别取 300 µL 菌液浓度为 10⁸ CFU/mL 的溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、副溶血性弧菌 (*V. alginolyticus*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)和大 肠杆菌 (*E. coli*)等菌液进行平板涂布,静置 3~5 min 后,用无菌镊子将制备好的纸片紧贴于琼脂平板表 面。在 37 ℃下倒置培养 12 h,以直尺十字交叉法测 量抑菌圈直径,读取整毫米数,无明显抑菌作用的记 作滤纸片大小 (6 mm)。抑菌作用判定标准:抑菌圈 直径≥20 mm,高度敏感;抑菌圈直径为[12,20)mm, 中度敏感;抑菌圈直径为[7,12)mm,弱敏感;抑菌圈

1.2.4.8 鲜活花蛤的新鲜度监测

选择性能较佳的薄膜应用于鲜活花蛤新鲜度的 监测。挑选可对外界刺激作出迅速响应的鲜活花蛤 (60±0.2)g,置于 PE 盒中,将指示膜(2 cm×2 cm) 贴于 PE 盒盖的内壁,然后用聚丙烯薄膜密封。在4 ℃ 下保藏 5 d,每天测定样品的 TVB-N 含量和 pH 值。 其中,TVB-N 含量测定参照 GB 5009.228—2016 中 的自动凯氏定氮仪法,pH 值参照 GB 5009.237—2016 中的方法进行测定^[15]。

1.2.5 统计分析

利用 SPSS 21.0 对数据进行 ANOVA 方差分析。 采用 Duncan 多重极差检验评价差异的显著性 (*P*<0.05 为显著性差异)。采用 Origin 8.0 软件进行 数据分析、图表及图谱分析处理。

2 结果与分析

2.1 蓝莓花青素溶液的紫外光谱扫描

蓝莓花青素在不同 pH 值缓冲溶液下的颜色变 化和紫外-可见光谱如图 1 所示。随 pH 值由 3 增加 至 6,红色溶液逐渐变浅;pH 值为 7~10 时,溶液 颜色变为紫红色,随 pH 值的增大逐渐加深;在 pH 值为 10~11 时,溶液颜色变浅;而在 pH 值为 12 时 溶液变为深黄绿色。当 pH 值 < 5 时,溶液在 510 nm 处存在特征吸收峰,随着酸度的增加,吸光度逐渐 降低。pH 值为 7 时,特征吸收峰右移至 550 nm 处。 pH 值为 7~10 时,特征吸收峰出现在 580 nm 处,且 吸光度增加。当 pH 值为 11~12 时,580 nm 处的吸 光度逐渐降低。这种颜色变化、吸收峰及吸光度的变 化与花青素在不同的 pH 条件下的结构转变有关。 Alizadeh-Sani等^[16]发现,花青素在强酸性条件下主要 以呈红色的黄翁阳离子存在,在 510 nm (pH 值为 3) 附近产生特征吸收峰,随着酸性减弱,花青素失去氢 质子,主要以无色的甲醇假碱形式存在,吸光度降低, 吸收峰红移。pH 值为 6~10 时,阴离子醌碱开始产 生,吸收峰进一步红移,吸光度增加。最后,在强碱 溶液中 (pH 值为 11~12)花青素被降解,吸光度降 低且峰值消失^[17]。





2.2 复合薄膜对 pH 的颜色响应

图 2 为 5 种薄膜在不同 pH 缓冲溶液中的颜色变 化。从整体来看,薄膜在 pH 值为 3~5 时整体偏红 色,随酸性的降低红色逐渐变浅;当 pH 值为 6~7 时 薄膜颜色逐渐变为蓝色/绿色;当 pH 值为 7~10 时,随 pH 增大蓝绿色薄膜颜色逐渐加深;当 pH 值为 11~12 时颜色向黄绿色转变。GSNR-ATH 膜的颜色变化更 为明显,而 CS-ATH 膜的颜色整体偏暗。当 pH 值小 于 7 时,CSGN-ATH 和 CSGNR-ATH 膜的颜色为浅 粉色,区分度较小。

2.3 厚度

厚度与膜的物理性能(如力学性能、水蒸气渗透性和透光率等)密切相关。图 3 为 5 种薄膜厚度的变化。

由图 3 可知, CS-ATH 薄膜的厚度为 0.064 mm, 而 CSN-ATH、CSNR-ATH、CSGN-ATH、CSGNR-ATH 膜的厚度显著增大(*P*<0.05)。这是由于膜的厚度一 般与成膜制剂中的固体浓度成正比。CSNR-ATH 膜 厚度最大,为 0.103 mm; CSN-ATH 与 CSGN-ATH 膜的厚度相似,分别为 0.092 mm 和 0.096 mm; CSGNR-ATH 膜厚度较小,为 0.083 mm。

2.4 透光率和不透明度

紫外--可见光阻隔性能是评价食品包装阻碍紫外--可见光能力的重要指标。如图 4 所示,5 组薄膜均表 现出较强的紫外光阻隔性能,薄膜在 600 nm 处的透 光率从大到小依次为 CSNR-ATH、CSN-ATH、 CS-ATH、CSGN-ATH、CSGNR-ATH。花色苷独特的 官能团使其具有强烈吸收紫外线的能力^[18]。壳聚糖--明胶薄膜阻光性较高,可能是由于明胶能够均匀分散 在壳聚糖基质中形成网络结构,透射光在壳聚糖--明 胶聚合物界面处会发生光的散射或反射^[19]。



图 2 不同薄膜在 pH 值为 3~12 的缓冲溶液中的颜色变化 Fig.2 Color change of different films in buffer solutions of pH 3-12





由图 5 可知,与透光率结果一致,CSNR-ATH 的不透明度(1.45 mm⁻¹)显著低于其他 4 组薄膜的, 而 CSGN-ATH 不透明度最高(2.47 mm⁻¹)。薄膜中 添加的天然颗粒改变了聚合物之间的相容性,从而表 现出不同的不透明度^[20]。有研究表明,花青素的添加 会对壳聚糖复合物复杂的空间结构产生破坏作用,导 致光散射和反射,增加了不透明度^[18]。总体而言,5 种薄膜均具有一定抵御紫外线的潜力。

2.5 水分含量和水溶性

由图 6 可知, CS-ATH 膜水分含量最高,为 69.02%;其次为 CSGN-ATH 和 CSGNR-ATH 膜,水 分含量分别为 66.60%和 67.22%; CSN-ATH 膜的水 分含量降低至 63.76%; CSNR-ATH 膜的水分含量最 低,为 61.27%。平衡水分含量高不仅与制备工艺有 关,还与壳聚糖、明胶和甘油的亲水性有关^[10]。





CSN-ATH 膜水分含量较低可能是由于壳聚糖的氨基 与乳酸链球菌素中的羧基结合生成酰胺键,释放出 水分子,形成氢键^[21],从而减少了壳聚糖基质无定 形区域中水和聚合物之间的氢键^[22]。此外,精油也 可通过氢键作用限制多糖与水之间的相互作用,降 低水分含量。

水溶性是反映薄膜耐水性和稳定性的重要参数。 图 6 表明,5 组薄膜的水溶性范围为 70.98%~82.88%。 与单纯壳聚糖薄膜的水溶性(20.00%±0.30%)相比^[23], CS-ATH 膜的水溶性高达 74.78%,这可能是由于壳 聚糖和花青素之间相互作用导致吸水的亲水位点数 量增加^[24]。CSN-ATH(82.88%)与 CSGN-ATH (80.83%)的水溶性都相对较高,而 CSNR-ATH 膜 的水溶性最低,说明迷迭香油的添加显著改变了薄膜 的水溶性^[25]。

2.6 质构特性

拉伸强度(TS)和断裂伸长率(EB)可以反映 食品包装的机械阻力和柔韧性。由图 7 可知, 薄膜成 分显著影响膜的力学性能 (P<0.05)。CS-ATH 膜的 拉伸强度为 2.70 MPa, 断裂伸长率为 76.02%, 添加 Nisin 后, CSN-ATH 膜的拉伸强度和断裂伸长率显著 增大(P<0.05)。这可能是由于乳链球菌肽通过氢键 与壳聚糖连接增加了分子间交联的数量,使薄膜结构 更加稳定^[26]。含有明胶的 CSGN-ATH 薄膜的拉伸强 度和断裂伸长率则低于 CSN-ATH 薄膜的。这可能是 因为 CS 与明胶溶液混合后得到的 CSG 溶液的 pH 值 相对增大, 使 Nisin 在 CSG 溶液中的溶解度降低, 且 Nisin 的添加阻碍了壳聚糖和明胶之间的相互作用, 使得 CSGN-ATH 薄膜力学性能降低^[27]。加入迷迭香 精油后, CSNR-ATH 和 CSGNR-ATH 薄膜的拉伸强 度和断裂伸长率也低于 CSN-ATH 和 CSGN-ATH 薄 膜。这是因为疏水性精油的存在导致生物聚合物在重 排时形成了不均匀的膜网络和不连续的微观结构,使 得机械阻力下降^[28]。CSGN-ATH 组的断裂伸长率高 于 CSNR-ATH 膜的,表明与迷迭香精油相比,明胶 的添加可以增加薄膜的断裂伸长率。这是因为明胶的 羟基能够插入壳聚糖链之间,从而降低分子内和分子 间的结合,有助于增加壳聚糖链之间的距离,提高薄 膜的延伸性[29]。

2.7 SEM

由图 8 可知, 薄膜形态受添加成分的影响且粗糙 度不同。CS-ATH 膜具有连续、均匀和相对光滑的表 面(图 8a)以及致密的内部结构(图 8f)。而 CSN-ATH 膜表面(图 8b)的粗糙度略有增加,但横截面(图 8g)微观结构仍光滑且规则。CSGN-ATH 膜表面(图 8d)具有一些光滑区域和一些粗糙区域,可观察到裂 纹和褶皱,这可能与膜基质内花青素与壳聚糖和明胶成分之间的相互作用有关。从 CSNR-ATH(图 8c)和 CSGNR-ATH 膜(图 8e)的表面图像可观察到明显的粗糙及褶皱断裂。同时,CSNR-ATH(图 8h)和 CSGNR-ATH 膜(图 8j)的横截面图像有空腔存在,这可能是迷迭香精油的疏水性造成的^[30]。



2.8 薄膜的抗氧化特性

图 9 为薄膜对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除活性 的测定结果。图 9 表明,在CS的质量浓度为 0~5 mg/mL 时,5 种薄膜溶液对 ABTS 自由基的清除率高于对 DPPH 自由基的清除率。这可能是由于 DPPH 溶解在 乙醇溶液中,而有机溶剂不容易与亲水性聚合物相互 作用,从而抑制活性成分的释放。Ezati 等^[31]用甲醇



图 8 不同薄膜样品的扫描电子显微镜图像 Fig.8 Scanning electron microscope images of different film samples



图 9 薄膜溶液的抗氧化特性 Fig.9 Antioxidant properties of film solution

DPPH 溶液也得到了类似的结果。5 种薄膜溶液的抗氧化能力随样品溶液浓度的增加而增强,如图 9a 所示。在质量浓度为 5 mg/mL 时,VC、CS、CSN、CSNR、CSGN 和 CSGNR 薄膜溶液对 DPPH 自由基溶液的清除率分别为 50.41%、14.15%、10.65%、15.54%、61.33%和 69.66%。含有精油的 CSNR 和 CSGNR 薄膜溶液对 DPPH 自由基的抗氧化活性显著提高,这是由于迷迭香精油中含有大量具有抗氧化作用的酚酸和萜类化合物^[32]。Gómez-Estaca 等^[33]研究表明,明胶中的肽对自由基有一定的清除能力。图 9b 中,当 CS 的质量浓度为 5 mg/mL 时,VC、CS、CSN、CSNR、CSGN 和 CSGNR 薄膜溶液对 ABTS 自由基的清除率分别为 99.00%、45.72%、90.95%、81.93%、78.00%和 79.00%。表明添加 Nisin、明胶和迷迭香精油后显著提高了复合薄膜对 ABTS 自由基的清除能力。

2.9 薄膜溶液的抗菌特性

5 种薄膜溶液对 V. alginolyticus、V. Parahaemolyticus、S. aureus 和 E. coli 的抗菌活性如图 10 所示。 5 种薄膜溶液对 V. alginolyticus 的抑菌效果均不显著 (抑菌圈小于 7 mm),但 CS 薄膜溶液对 V. Parahaemolyticus 的抑菌圈直径为(8.61±0.96) mm,显著 大于其他 4 种薄膜溶液(P<0.05)对 V. Parahaemolyticus 的抑菌圈直径。带正电荷的壳聚糖可以作为阳 离子的螯合剂,破坏细菌细胞壁的完整性^[34],或通过 静电相互作用与细胞膜上脂多糖的阴离子部分结合, 从而导致细胞死亡^[35]。CSN、CSNR、CSGN、CSGNR 等 4 种复合薄膜溶液对金黄色葡萄球菌均有显著的 抑菌效果,而 CSGN 和 CSGNR 溶液的抑菌效果低于 CSN 和 CSNR 溶液的,说明明胶的加入削弱了薄膜 溶液的抑菌效果。这是因为带负电荷的明胶中和了壳 聚糖的正电,从而导致溶液的抗菌活性减弱^[8]。

2.10 花蛤的新鲜度监测

选择颜色变化明显和物理性能优异的 CSNR-ATH 膜进行鲜活花蛤的新鲜度监测,结果如图 11 所示。



图 11a 中, 在微生物和酶的作用下, 冷藏过程中鲜活 花蛤的新鲜度不断降低,蛋白质和氨基酸被分解为氨 和胺类等挥发性碱性含氮物质,包装环境中的挥发性 含氮物质及 pH 值不断增加^[36]。花蛤初始的 pH 值为 6.96, 冷藏 3 d 后, pH 值增大至 7.31, 在第 5 天时增 大至 7.34。TVB-N 变化更为显著,花蛤初始的 TVB-N 含量为 4.76 mg/100 g, 此时图 11b 中的膜为浅绿色。 冷藏 3 d 后, TVB-N 值显著增加至 16.83 mg/100 g, 此时膜的颜色转变为深绿色。根据 GB 2733—2015 《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》,贝类 TVB-N的新鲜临界值为15 mg/100 g,花蛤冷藏3 d 时已超过不可食用的限值。第4天时, TVB-N 值增 加到 23.53 mg/100 g, 包装盒内产生明显腐败性气味, 膜的颜色向黄绿色转变。第 5 天时 TVB-N 值达到 25.92 mg/100 g, 薄膜达到最终的黄绿色。结果表明, CSNR-ATH 膜可以有效反映鲜活花蛤在冷藏期间新 鲜度的变化。



b CSNR-ATH膜的颜色变化

图 11 花蛤冷藏过程中理化指标及 CSNR-ATH 膜颜色的变化 Fig.11 Changes in physicochemical indicators and CSNR-ATH film color during refrigeration of clams

3 结语

以壳聚糖为基质, 蓝莓花青素为 pH 指示剂, 通 过复合明胶、Nisin 和迷迭香精油制备了 5 种智能指 示膜。经过对 pH 敏感性、颜色响应性、微观结构、 阻隔特性、力学性能、含水率、水溶性、抗氧化、抗 菌等特性的比较,发现蓝莓花青素在不同 pH 缓冲溶 液中的颜色变化显著;CSNR-ATH 膜具有较好的紫 外线阻隔能力、最低的水分含量和水溶性,且有较强 的抗氧化能力和抗菌效果。以CSNR-AT 膜监测鲜活 花蛤冷藏期间的新鲜度,发现随花蛤新鲜度的下降, 该膜颜色变化明显且能反映 TVB-N 含量的变化,表 明 CSNR-ATH 膜可以作为鲜活花蛤新鲜度的智能指 示剂。

参考文献:

 HASHIM S B H, TAHIR H E, LUI L, et al. Smart Films of Carbohydrate-Based/Sunflower Wax/Purple Chinese Cabbage Anthocyanins: A Biomarker of Chicken Freshness[J]. Food Chemistry, 2023, 399: 133824.

- [2] SHAO P, LIU L, YU J, et al. An Overview of Intelligent Freshness Indicator Packaging for Food Quality and Safety Monitoring[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021(Pt.A): 118.
- [3] ZANG Zhi-huan, CHOU Shu-rui, TIAN Jin-long, et al. Effect of Whey Protein Isolate on the Stability and Antioxidant Capacity of Blueberry Anthocyanins: A Mechanistic and in Vitro Simulation Study[J]. Food Chemistry, 2021, 336: 127700.
- [4] 封晴霞,王利强. 蓝莓花青素智能指示膜的制备及应用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 281-290.
 FENG Qing-xia, WANG Li-qiang. Preparation and Application of Blueberry Anthocyanin Intelligent Indicator Films[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(2): 281-290.
- [5] MA Yan-lan, LI Si-ying, JI Teng-teng, et al. Development and Optimization of Dynamic Gelatin/Chitosan Nanoparticles Incorporated with Blueberry Anthocyanins for Milk Freshness Monitoring[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 247: 116738.
- [6] 申淑琦,万玉美,王小瑞,等.海湾扇贝低温无水保 活过程中营养成分和生化特性的变化[J].大连海洋大 学学报,2014,29(6):633-637.

SHEN Shu-qi, WAN Yu-mei, WANG Xiao-rui, et al. Changes in Nutrient Compositions and Biochemical Characteristics of Bay Scallop Argopecten Irradians during Keep-Alive under Free Water at Low Temperature[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2014, 29(6): 633-637.

- [7] WANG Hong-xia, QIAN Jun, DING Fu-yuan. Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(2): 395-413.
- [8] PEREDA M, PONCE A G, MARCOVICH N E, et al. Chitosan-Gelatin Composites and Bi-Layer Films with Potential Antimicrobial Activity[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1372-1381.
- [9] AZMAN N H, KHAIRUL W M, SARBON N M. A Comprehensive Review on Biocompatible Film Sensor Containing Natural Extract: Active/Intelligent Food Packaging[J]. Food Control, 2022, 141: 109189.
- [10] LIU Yun-peng, ZHANG Xue-mei, LI Chen-chen, et al. Comparison of the Structural, Physical and Functional Properties of K-Carrageenan Films Incorporated with Pomegranate Flesh and Peel Extracts[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 1076-1088.
- [11] SHEN Yi, NI Zhi-jing, THAKUR K, et al. Preparation

and Characterization of Clove Essential Oil Loaded Nanoemulsion and Pickering Emulsion Activated Pullulan-Gelatin Based Edible Film[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181(4): 528-539.

- [12] CHEN Yan, LI Xue-hui, ZHOU Li-yuan, et al. Structural Elucidation of Three Antioxidative Polysaccharides from Tricholoma Lobayense[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 484-492.
- [13] WU H, LI M, YANG X, et al. Extraction Optimization, Physicochemical Properties and Antioxidant and Hypoglycemic Activities of Polysaccharides from Roxburgh Rose (Rosa Roxburghii Tratt.) Leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 517-529.
- [14] SOURI D, SALIMI N, GHABOOLI M. Hydrothermal Fabrication of Pure Znse Nanocrystals at Different Microwave Irradiation Times and Their Disc-Diffusion Antibacterial Potential against Gram Negative Bacteria: Bio-Optical Advantages[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2021, 123: 108345.
- [15] LIU J L, HUANG J Y, YING Y B, et al. Ph-Sensitive and Antibacterial Films Developed by Incorporating Anthocyanins Extracted from Purple Potato or Roselle into Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Nano-Zno Matrix: Comparative Study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 178: 104-112.
- [16] ALIZADEH-SANI M, MOHAMMADIAN E, RHIM J-W, et al. Ph-Sensitive (Halochromic) Smart Packaging Films Based on Natural Food Colorants for the Monitoring of Food Quality and Safety[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 93-144.
- [17] ALIZADEH-SANI M, TAVASSOLI M, MCCLEMENTS D, et al. Multifunctional Halochromic Packaging Materials: Saffron Petal Anthocyanin Loaded-Chitosan Nanofiber/Methyl Cellulose Matrices[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 111(17): 106237.
- [18] WU Chun-hua, SUN Ji-shuai, ZHENG Ping-yun, et al. Preparation of an Intelligent Film Based on Chitosan/Oxidized Chitin Nanocrystals Incorporating Black Rice Bran Anthocyanins for Seafood Spoilage Monitoring[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 222: 115006.
- [19] WANG Hong-xia, DING Fu-yuan, MA Liang, et al. Edible Films from Chitosan-Gelatin: Physical Properties and Food Packaging Application[J]. Food Bioscience, 2021, 40(6): 100871.
- [20] SHEN Yi, NI Zhi-jing, THAKUR K, et al. Preparation and Characterization of Clove Essential Oil Loaded Nanoemulsion and Pickering Emulsion Activated Pul-

lulan-Gelatin Based Edible Film[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 181(4): 528-539.

- [21] WU Tian-tian, WU Chun-hua, FANG Zhong-xiang, et al. Effect of Chitosan Microcapsules Loaded with Nisin on the Preservation of Small Yellow Croaker[J]. Food Control, 2017, 79: 317-324.
- [22] MEIRA S M M, ZEHETMEYER G, WERNER J O, et al. A Novel Active Packaging Material Based on Starch-Halloysite Nanocomposites Incorporating Antimicrobial Peptides[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 561-570.
- [23] YONG Hui-min, WANG Xing-chi, BAI Ru-yu, et al. Development of Antioxidant and Intelligent PH-Sensing Packaging Films by Incorporating Purple-Fleshed Sweet Potato Extract into Chitosan Matrix[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 90: 216-224.
- [24] PRIETTO L, MIRAPALHETE T, ZANELLA PINTO V, et al. PH-Sensitive Films Containing Anthocyanins Extracted from Black Bean Seed Coat and Red Cabbage[J]. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie, 2017, 80(2): 492-500.
- [25] OJAGH S M, REZAEI M, RAZAVI S H, et al. Development and Evaluation of a Novel Biodegradable Film Made from Chitosan and Cinnamon Essential Oil with Low Affinity toward Water[J]. FOOD CHEMISTRY, 2010, 122(1): 161-166.
- [26] MEI Jun, YUAN Yi-lin, GUO Qi-zhen, et al. Characterization and Antimicrobial Properties of Water Chestnut Starch-Chitosan Edible Films[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61: 169-174.
- [27] KANG L, LIANG Q, CHEN H, et al. Insights into Ultrasonic Treatment on the Properties of Pullulan/Oat Protein/Nisin Composite Film:Mechanical, Structural and Physicochemical Properties[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134237.
- [28] HAGHIGHI H, BIARD S, BIGI F, et al. Comprehensive Characterization of Active Chitosan-Gelatin Blend Films Enriched with Different Essential Oils[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 33-42.
- [29] PRATEEPCHANACHAI S, THAKHIEW W, DEVAHASTIN S, et al. Improvement of Mechanical and Heat-Sealing Properties of Edible Chitosan Films via Addition of Gelatin and CO₂ Treatment of Film-Forming Solutions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 589-600.
- [30] SANUJA S, AGALYA A, UMAPATHY M J. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide-Neem Oil-Chitosan

Bionanocomposite for Food Packaging Application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 76-84.

- [31] EZATI P, PRIYADARSHI R, BANG Y J, et al. CMC and CNF-Based Intelligent PH-Responsive Color Indicator Films Integrated with Shikonin to Monitor Fish Freshness[J]. Food Control, 2021, 126(2): 108046.
- [32] AMRANI S E, EL A, LALAMI O, et al. ScienceDirect Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Effects of Cinnamon and Clove Essential Oils from Madagascar[J]. Materials Today: Proceedings, 2019, 13: 762-770.
- [33] GóMEZ-ESTACA J, GIMéNEZ B, MONTERO P, et al. Incorporation of Antioxidant Borage Extract into Edible Films Based on Sole Skin Gelatin or a Commercial Fish Gelatin[J]. Journal of Food Engineering, 2009,

92(1): 78-85.

- [34] KUMAR S, MUKHERJEE A, DUTTA J. Chitosan Based Nanocomposite Films and Coatings: Emerging Antimicrobial Food Packaging Alternatives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97: 196-209.
- [35] SINGH N, SHEIKH J. Novel Chitosan-Gelatin Microcapsules Containing Rosemary Essential Oil for the Preparation of Bioactive and Protective Linen[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 178: 114549.
- [36] 张观科,刘红英,齐凤生. 生物保鲜对牡蛎冷藏保鲜效果的研究[J]. 水产科学, 2012, 31(10): 611-615.
 ZHANG Guan-ke, LIU Hong-ying, QI Feng-sheng.
 Fresh-Keeping Effect of Biological Preservatives and Coating on Oyster Cryopreservation[J]. Fisheries Science, 2012, 31(10): 611-615.

责任编辑:曾钰婵