

# 可食性抗菌肽-明胶复合膜的制备及性能表征

段星星, 段杉, 罗慧芬, 林叶萍, 曹庸, 苗建银

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 为了研究新型的可食性抗菌包装材料, 以明胶、甘油、不同浓度的抗菌肽为抗菌剂制备了抗菌肽-明胶复合膜。以光学性能等指标以及傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)、扫描电子显微镜 (SEM) 和差示扫描量热仪 (DSC) 对复合膜的性能进行表征。结果表明: 添加了抗菌肽的明胶复合膜在 250~300 nm 波长范围内吸收显著提高, 抗菌肽的添加使膜的颜色偏黄, 机械性能得到一定的改善, 如 50 mg/mL 的抗菌肽添加量使水蒸气透过率具有一定程度降低 (与纯明胶相比降低了 17.30%), 膜的抗拉强度 (TS) 和断裂伸长率 (EAB) 与纯明胶膜相比, 分别增加了 11.40% 和 42.90%。当抗菌肽的添加量为 50 mg/mL 时, 薄膜抗菌能力最为显著 (对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 14.60 mm 和 12.30 mm)。FT-IR 和 SEM 显示复合膜有良好的相容性。DSC 数据显示抗菌肽对复合膜的热稳定性有一定程度的降低作用。

**关键词:** 明胶; 抗菌肽; 复合膜; 性能表征

文章编号: 1673-9078(2019)04-140-147

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.020

## Preparation and Characterization of Edible Antibacterial Peptide-gelatin Composite Films

DUAN Xing-xing, DUAN Shan, LUO Hui-fen, LIN Ye-ping, CAO Yong, MIAO Jian-yin

(College of Food Science South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In order to study novel edible antibacterial packaging materials, antibacterial peptide-gelatin composite films were prepared using gelatin, glycerol, and different concentrations of antibacterial peptides as antibacterial agents. The properties of the composite films were characterized based on optical properties and by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscopy (SEM), and differential scanning calorimeter (DSC). The results showed that the addition of the antibacterial peptide to the gelatin-based composite films increased the absorption in the wavelength range of 250~300 nm, made the film color slightly turn yellow, and improved film's mechanical properties. Adding 50 mg/mL of antibacterial peptide reduced the water vapor permeability to a certain extent (17.30% reduction compared to the film made with gelatin alone), increased film tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) by 11.40% and 42.90%, respectively (compared to the film made with gelatin alone), and enabled the highest film antibacterial activity (the diameters of the inhibition zones against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 14.60 mm and 12.30 mm, respectively). The FT-IR and SEM examinations revealed the good compatibility of the composite films. DSC results showed that antimicrobial peptides might reduce the thermal stability of the composite films to some extent.

**Key words:** gelatin; antibacterial peptide; composite film; characterization

生物高分子材料由于其在食品工业领域的优势及

收稿日期: 2018-11-10

基金项目: 广州市科技计划项目 (201707010415); 中国航天员科研训练中心  
航天营养与食品工程重点实验室开放基金项目 (201707130245-001-001);  
广东省自然科学基金项目 (2016A030310442); 国家自然科学基金青年基金  
项目 (31601474); 广东省高等教育教学改革项目 (粤教高函[2016]166 号);  
华南农业大学教育教学改革与研究项目 (JG16012)

作者简介: 段星星 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与贮藏  
原理

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与功  
能食品

潜在应用而受到关注<sup>[1]</sup>。生物高分子材料形成的膜是一类很好的载体, 能够添加增塑剂、交联剂等改善膜的机械性能; 也能够结合功能性成分如抗氧化剂、抗菌剂、着色剂等各种添加剂, 进而达到延长或者改善食品的风味及保鲜期的作用<sup>[2,3]</sup>。应用最多的生物高分子材料通常是来自于天然的蛋白类、多糖类、脂类物质以及它们的复合物。

明胶是胶原的部分水解产物, 一般是由动物的皮和骨制备, 它具有良好的生物相容性和可降解性<sup>[4,5]</sup>。由于来源丰富, 具有优越的成膜性能和良好的营养价值, 在体内能被完全吸收, 其大量的功能基团能被

化学交联,且理化性质易于调节,因此明胶膜在可食性膜领域备受关注<sup>[6,7]</sup>。但是由于明胶膜具有较差的机械性能,因此一般添加增塑剂提高膜的机械性能,例如甘油、聚乙二醇等。单一的明胶膜没有抑菌性能,在明胶成膜液中添加植物抗菌成分来提高膜的抑菌效果已有部分研究。然而目前只见以明胶为成膜基材添加尼生素的部分研究<sup>[8]</sup>。

抗菌肽,又名宿主防御肽,是机体抵抗外来致病菌侵袭的重要屏障。天然抗菌肽一般包含 12~100 个氨基酸残基,由于其带正电荷、呈两亲性的分子结构,使得其便于与带负电荷的微生物膜或其他细胞靶点相互作用。抗菌肽按照来源不同主要分为植物源、动物源和微生物源。主要在抗细菌、真菌、抗肿瘤等方面有一定的作用<sup>[9]</sup>。本研究团队前期从副干酪乳杆菌的牛乳发酵物中提取到高效广谱的抗菌肽成分,在酸性、中性和弱碱性均显示良好抗菌活性,同时对蛋白酶具有一定程度耐受性,尤其其最强活性单体 F1 是一种新发现抗菌肽,氨基酸序列为首次报道,具有深入研究的价值<sup>[10,11]</sup>,若能将其用于复合膜的制备,将大提升该天然抗菌肽在食品防腐保鲜领域的应用。

本文将研究团队前期研究发现的抗菌肽发酵粗提物加入到明胶中制备可食性明胶复合膜,考察膜的厚度、颜色、光学性能、力学性能、水蒸气透过透光率和抑菌效果,同时利用膜的红外光谱图和扫描电镜观察二者相容性及示扫描量热法分析膜的热稳定性。以期获得一种性能良好的复合食品包装膜,为抗菌肽/明胶抗菌复合膜在食品贮藏与保鲜领域的应用提供理论依据和技术参数,具有良好应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

MRS 肉汤、葡萄糖、酵母粉:广州环凯生物试剂有限公司;明胶:广州翔博生物有限公司;牛奶购于正丰超市;供试菌株:金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,来自于华南农业大学食品学院微生物实验室;从西藏奶开菲尔中分离出的副干酪乳杆菌 FX-6 保存于华南农业大学食品学院。

### 1.2 仪器与设备

螺旋测微器:东莞市景有模具五金有限公司;质构仪 TA.XT Plus:英国 SMS 公司;傅里叶红外扫描仪(Vertex 70):德国布鲁克公司;Merlin 高分辨场发射扫描电子显微镜:德国 Zeiss 公司;差式扫描量热仪(DSC8000):美国 PE 公司;UV-750 紫外可见分

光光度计:日本岛津公司;SW-CJ-1FDA 型超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 抗菌肽发酵粗提物的制备

菌株 FX-6 经 MRS 肉汤 37 °C 过夜活化 18 h,用无菌 MRS 肉汤培养基调节菌液浓度在 OD<sub>600</sub> 在 0.2 左右备用。发酵体系为:纯牛奶、葡萄糖添加量为 3.40% (W/V)、酵母粉 2% (W/V)、菌液 9% (V/V),发酵温度 32 °C,时间 72 h。发酵结束后 4000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,上清液过 6000 u 超滤管超滤。超滤液冻干即得抗菌肽发酵粗提物<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.2 明胶复合膜的制备

首先配置 6%(W/V)的明胶溶液,40 °C 水浴 30 min 使其完全溶解。添加 25%甘油(以明胶质量为基准)作为增塑剂,不同质量的抗菌肽粉末添加到明胶成膜液,配置不同质量分数(1%、2%、3%、4%、5%)的明胶复合膜成膜液。磁力搅拌 30 min,超声脱气 20 min。取 20 mL 成膜液倒入塑料培养皿室温下(30 °C 左右)干燥揭膜。将膜在放置在恒温恒湿(25±0.5 °C, 50±5%RH)条件下平衡 48 h 备用。

#### 1.3.3 明胶复合膜厚度的测定<sup>[3]</sup>

膜的厚度用螺旋测微器测量,每个样品选取四个顶点和中心点共 5 个点测量,取平均值。

#### 1.3.4 明胶复合膜光学性能的测定

将膜裁成 70 mm×10 mm,贴于比色皿表面,用 UV-750 型紫外分光光度计在 200 nm~800 nm 测定复合膜的吸光度,同时以空比色皿校准基线<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.5 明胶复合膜颜色的测定

用色度计测定膜的 L\*(亮度)、a\*(红-绿)、b\*(黄-蓝),每个样品选取 5 个不同的点取平均值。膜在标准白板上(L\*=95.21、a\*=-1.24、b\*=-0.36)测定<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.6 明胶复合膜的水蒸气透过率的测定

参照 Ahmad<sup>[15]</sup>的方法并略做修改,水蒸气透过率采用拟杯子法测定。室温下,将干燥至恒重的无水 CaCl<sub>2</sub> 加入到恒重的坩埚,将测量好膜厚度的膜密封在坩埚口,迅速称重。将称重的坩埚放在底部为饱和氯化钠的干燥器内。即 25 °C 下,75%的相对湿度条件下保证膜内外两侧的水蒸气不变。隔一定时间取出坩埚称重。每组 3 个平行。计算公式如下:

$$WVP = \frac{Wl}{At\Delta P}$$

式中:WVP:水蒸气透过率[g/(m·s·Pa)];W:坩埚增加的质量(g);l:复合膜的厚度(mm);A:复合膜的面积(m<sup>2</sup>);t:坩埚增加的质量所用的时间(s);ΔP:复合膜两侧的压差(Pa),

实验是在 25 ℃, 相对湿度保持在 75%, 故  $\Delta P$  取为 2376.75 Pa。

### 1.3.7 明胶复合膜的机械性能的测定

膜的机械性能的测定参照 Sahraee<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改, 将膜裁成 4 cm×1.5 cm 的试样, 用质构仪测定抗拉强度(TS)和断裂伸长率(EAB), 探头为 AT/G, 测试部件间距为 3 cm, 以 0.5 mm/s 速度拉伸。

$$TS = \frac{F}{S}$$

式中 TS 为抗拉强度 (MPa); F 为膜断裂时收到的最大拉力 (N); S 为膜的横截面积 (m<sup>2</sup>)。

$$EAB = \frac{L_0 - L}{L} \times 100\%$$

式中  $L_0$  是膜断裂时长度 (cm); L 为膜的测试部件的初始间距 (cm), 为 3 cm。

### 1.3.8 明胶复合膜的抑菌实验

以抑菌直径作为直径去评价明胶复合膜的抑菌性能。按 Arfat<sup>[17]</sup>的方法, 实验菌株是用革兰氏阴性菌大肠杆菌和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌加在 LB 肉汤中, 在培养箱种 37 ℃培养 24 h。无菌水稀释 10 倍, 作为初始菌液。

取 0.1 mL 菌液在 PCA 琼脂固体培养基, 进行平板涂布。明胶复合膜裁成直径 1 cm 的圆形, 贴在琼脂板上。在 37 ℃下培养 24 h, 观察测量透明圈大小。

### 1.3.9 明胶复合膜的红外光谱

测定前将复合膜放在含有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的干燥器中一周以尽可能多的去除水分。然后将 2×0.5 cm 的膜片放入样品室, 分辨率设置为 4 cm<sup>-1</sup>, 扫描次数 32 次, 环境温度 25 ℃。用傅立叶红外光谱分析仪(500~4000 cm<sup>-1</sup>)扫描后分析复合膜的红外光谱图<sup>[18]</sup>。

### 1.3.10 明胶复合膜的扫描电镜形态

测定前将复合膜放在含有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的干燥器中一周以尽可能多的去除水分。取适当面积的待测膜, 并裁剪成规格为 5 mm×2 mm 的长条, 通过液氮处理截取横断面, 分别将膜的横断面和水平表面固定到样品台上, 喷铂金约 20 min。将处理好的待测膜样品置于扫

描电子显微镜中, 设定电子束的加速电压为 10 kV, 调整放大倍数, 分别截取膜表面和断面的扫描电镜图。

### 1.3.11 明胶复合膜的热稳定性

测定前将复合膜放在含有 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的干燥器中一周以尽可能多的去除水分。以空铝坩埚作为参比, 称取约 5 mg 样品于铝坩埚中, 放入差示扫描量热仪中进行膜的热稳定性扫描, 检测其热稳定性。试验温度设置为以 10 ℃/min 的速率从 -20 ℃加热至 150 ℃。根据所得曲线, 确定膜的玻璃态转化温度( $T_g$ )与吸热熔转变温度( $T_{max}$ ), 分析抗菌肽对膜热稳定性的影响<sup>[19]</sup>。

### 1.3.12 数据分析

试验重复三次, 取测定结果的平均值。采用 SPSS 21 软件 (IBM, MS, USA) 进行 Duncan 单因素方差分析, 采用 Origin 9.1 (Origin Lab, MA, USA) 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 明胶复合膜的厚度及颜色分析结果

膜的厚度与成膜液的体积及成膜模具面积有直接关系<sup>[20]</sup>, 在本研究中将 20 mL 成膜液倒入直径 15 cm 的塑料培养皿中摇匀成膜。明胶复合膜的厚度与颜色测定结果见表 1。

由表 1 可知, 复合膜的厚度随着抗菌肽比例的增加而增加, 从 75.00±4.08 μm 到 117.00±2.21 μm。主要是因为抗菌肽比例的增加导致了成膜液中固形物的增加, 体现在膜的厚度上有逐渐增加的现象。

由表 1 可知, 与纯明胶膜相比较, 抗菌肽的添加有使膜的 L\*值降低的趋势, 但是并没有出现显著性差异, 说明膜的透明度都较高。但是随着抗菌肽比例的增加, b\*值逐渐升高, 说明复合膜的颜色随着抗菌肽比例的增加而偏黄, 当添加比例达到 30 mg/mL 时且开始具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。造成这种结果是由于抗菌肽粉末偏黄, 但并不影响复合膜的应用性能。类似的现象在吕妍霄<sup>[21]</sup>的研究中也存在, 由于姜黄素的本身是黄色的, 导致最后的明胶膜的颜色也是黄色。

表 1 不同浓度明胶复合膜厚度与颜色测定结果

Table 1 The thickness and color of composite films with various concentrations of antimicrobial peptides

| 抗菌肽浓度/(mg/mL) | 膜厚度/(μm)                 | L* (亮度)                 | a* (红-绿)                 | b* (蓝-黄)                |
|---------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 0             | 75.00±4.08 <sup>a</sup>  | 37.62±0.33 <sup>a</sup> | -0.37±0.01 <sup>ab</sup> | -0.51±0.01 <sup>a</sup> |
| 10            | 84.00±3.77 <sup>b</sup>  | 37.53±0.31 <sup>a</sup> | -0.35±0.01 <sup>a</sup>  | -0.48±0.02 <sup>a</sup> |
| 20            | 92.00±2.36 <sup>c</sup>  | 36.10±0.68 <sup>a</sup> | -0.39±0.01 <sup>b</sup>  | -0.44±0.04 <sup>a</sup> |
| 30            | 102.00±2.38 <sup>d</sup> | 36.54±0.23 <sup>a</sup> | -0.26±0.00 <sup>c</sup>  | 0.26±0.04 <sup>b</sup>  |
| 40            | 107.00±2.16 <sup>d</sup> | 36.45±0.73 <sup>a</sup> | -0.23±0.02 <sup>c</sup>  | 0.47±0.01 <sup>c</sup>  |
| 50            | 117.00±2.21 <sup>e</sup> | 36.96±0.70 <sup>a</sup> | -0.18±0.00 <sup>d</sup>  | 0.90±0.01 <sup>d</sup>  |

注: 表中数据为平均值±标准偏差; 含有不同字母的具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。下表同。

表 2 不同浓度抗菌肽明胶复合膜的水蒸气透过率测定结果

Table 2 water vapor permeability of composite films with various concentrations of antimicrobial peptides

| 抗菌肽浓度/(mg/mL)                                       | 0                            | 10                           | 20                           | 30                           | 40                            | 50                            |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| WVP/[ $\times 10^{-11}$ g/(m $\cdot$ s $\cdot$ Pa)] | 2.48 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 2.00 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> | 1.97 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup> | 2.01 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup> | 2.02 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup> | 2.05 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup> |

## 2.2 明胶复合膜光学性能分析结果

由图 1 可知, 纯明胶膜的 200~250 nm 处有很强的紫外吸收, 这与其他研究学者的结果相一致<sup>[22,23]</sup>。主要原因就是明胶中大量的芳香族氨基酸可吸收紫外光。添加了抗菌肽的膜在 250~300 nm 处也有较强的紫外吸收, 且随着添加量的增加而增强。在 300~400 nm 时, 随着波长的增加, 吸光度急剧下降, 说明透光率急剧上升; 可见光区 400~800 nm, 随着波长的增加, 所有的膜的吸光度都基本上趋于稳定。由图 1 说明透光率高, 膜的结构紧密, 表面光滑无裂痕存在。

在胡二坤<sup>[24]</sup>等人的研究中发现, 在明胶膜中加入溶菌酶/ZnO, 使抗菌膜在 250 nm~350 nm 波长范围内有显著吸收, 在 400~800 nm 范围内有很高的透光率, 且不受抗菌剂种类和数量的影响, 与本研究结论相符合。在 Kanmani<sup>[13]</sup>的研究中, 纳米银离子使抗菌膜在 450 nm 左右处有很强的吸收峰, 但是在可见光区域并没有太大的影响, 主要由于强表面等离子体共振过渡带的形成。说明对抗菌膜的透光性能的影响主要取决于抗菌剂的官能团以及抗菌剂的添加量。

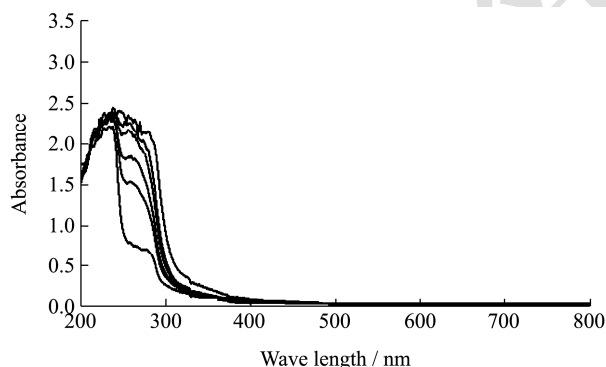


图 1 不同浓度抗菌肽明胶复合膜的紫外-可见吸收光谱

Fig.1 UV-vis absorption spectra of composite films with various concentrations of antimicrobial peptides

注: 从下往上依次为抗菌肽添加量为 0、10、20、30、40、50 mg/mL 的明胶膜。

## 2.3 明胶复合膜水蒸气透过率分析结果

膜的水蒸气透过率是对薄膜水分的阻隔效果的反映<sup>[25]</sup>。膜液中不同添加量的抗菌肽对明胶膜的水蒸气透过率的影响见表 2。

食品包装材料的主要功能之一是减少食品的水分流失, 所以膜的水蒸气透过率应尽可能低。水蒸气阻

隔能力差通常被认为是生物高分子材料作为包装材料的主要限制<sup>[26]</sup>。膜的水蒸气透过率受明胶氨基酸与抗菌肽氨基酸残基分子间的氢键以及水分在膜中扩散行为影响<sup>[27]</sup>。

从表 2 中可以看出, 添加抗菌肽以后膜的水蒸气透过率有下降的趋势。低浓度的抗菌肽与纯明胶膜有显著性差异, 但是随着抗菌肽浓度的增大, 不同浓度抗菌肽之间的差异不显著 ( $p>0.05$ ), 当抗菌肽浓度达到 50 mg/mL 时与纯明胶膜的水蒸气透过率之间也没有显著性差异。原因是抗菌肽的加入, 使得膜的结构更加紧密且存在有序分散分子, 改变了分子的结晶结构, 水蒸气透过膜孔隙需要更长的路径<sup>[28]</sup>, 但是由于抗菌肽含有多种亲水性氨基酸, 高比例的抗菌肽可以从环境中吸收更多的水分, 导致水蒸气透过率不能有显著下降。同样的现象在王坤等<sup>[29]</sup>人的研究中也出现, 随着单宁浓度的增加, 水蒸气透率先减低后上升, 主要有单宁中含有大量的酚羟基导致从环境中吸收及较多的水分。

## 2.4 明胶复合膜机械性能分析结果

不同添加量的抗菌肽对复合明胶膜的抗拉强度和断裂伸长率的测试结果如图 2, 抗菌肽添加量为 0 mg/mL 的纯明胶膜的抗拉强度 (图 2a) 和断裂伸长率 (图 2b) 分别为 (3.41 $\pm$ 0.24) MPa 和 (60.72 $\pm$ 1.20)%; 抗菌肽浓度较低时, 随着抗菌肽的增加, 明胶复合膜的抗拉强度 (图 2a) 逐渐增大, 但到抗菌肽浓度增大到 30 mg/mL 时, 该指标有略微下降的趋势, 但并无显著性差异, 其原因可能是由于低浓度时明胶大分子中的氨基酸残基与抗菌肽中的氨基酸残基相互作用, 使膜内结构更加紧密, 随着抗菌肽浓度增大, 膜成分中引入更多亲水性氨基酸残基, 使膜的保水性和从环境中吸收水特性增强; 明胶复合膜的断裂伸长率随着抗菌肽添加量的增大逐渐增大 (图 2b)。

在吴菲菲等<sup>[30]</sup>人的研究中, 2% (W/V) 的鱼鳞明胶与 0.30 g/g 甘油形成的膜测定的 TS 为 27.55 $\pm$ 1.67 MPa, EAB 为 57.82% $\pm$ 4.6%。本研究结果当中抗拉强度相对较低, 可能与制膜的厚度及明胶种类相关。在王坤等<sup>[29]</sup>人的研究中, 添加了单宁的明胶膜抗拉强度得到提升, 特别是当单宁浓度达到 30 mg/g 的时候, 抗拉强度显著提升; 但是随着单宁浓度的增加, 膜断裂伸长率有所下降, 其原因是单宁中的酚羟基与明胶



发生交联作用使复合膜的结构更为紧密。

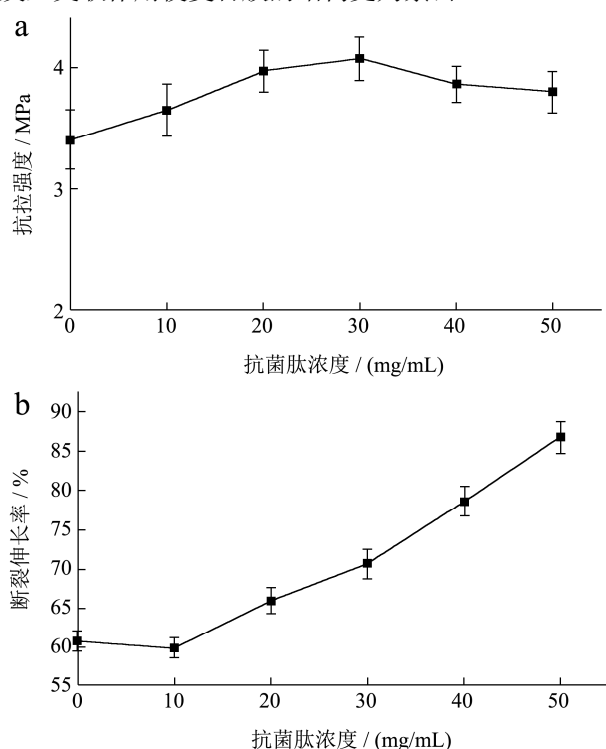


图2 不同浓度明胶复合膜的抗拉强度(a)和断裂伸长率(b)测定结果

Fig.2 TS and EAB of composite films with various concentrations of antimicrobial peptides

## 2.5 明胶复合膜抑菌实验分析结果

本研究中的抗菌肽是一种可以替代化学合成抗菌剂在食品中的应用。由图3可以看出添加了抗菌肽的明胶膜抗菌性能有了很大的提高。在前期研究中Miao<sup>[31]</sup>发现其对金黄色葡萄球菌的抗菌机理是抗菌肽通过破坏细菌细胞膜和通过破坏细菌细胞膜, 然后与细胞质中的基因组DNA结合发挥其杀菌作用, 导致细胞快速死亡。复合膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果见图3, 可以看出, 随着抗菌肽浓度增加, 复合膜的抑菌效果不断增强, 50 mg/mL时效果最佳 ( $p < 0.05$ ), 考虑到预试验中继续不断增大抗菌肽浓度会导致复合膜吸水性增强而影响拉伸强度, 在预实验中我们将抗菌肽添加浓度最高定为50 mg/mL。同时, 发现复合膜中抗菌肽浓度为10 mg/mL时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果不明显, 浓度大于30 mg/mL后, 复合膜对大肠杆菌抑制作用明显强于金黄色葡萄球菌。当抗菌肽浓度为50 mg/mL时, 大肠杆菌的抑菌圈为14.60 mm, 金黄色葡萄球菌只增加到12.03 mm, 抗菌效果差异显著 ( $p < 0.05$ )。

在Kanmani<sup>[13]</sup>的研究中, 在明胶膜中添加纳米银离子制备抗菌膜。当低浓度的添加量时没有抑菌效果,

当添加量为40 mg/mL时形成的明胶复合膜, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到11.00 mm, 对大肠杆菌抑菌直径达到9.50 mm。本研究与之相比, 抑菌圈直径有较大的提升, 说明抗菌肽的抗菌效果比纳米银离子较好。Rawdkuen<sup>[8]</sup>研究发现儿茶素溶菌酶与明胶复合形成的抗菌膜对金黄色葡萄球菌的抑制效果也大于大肠杆菌, 其抗菌性能与细菌细胞壁中肽聚糖层的水解以及膜扰动有关, 溶菌酶通过分裂细菌细胞壁中肽聚糖的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺之间的键而表现出抗微生物活性。

在其他学者的研究中<sup>[16]</sup>, 发现壳聚糖具有很好的成膜性, 同时也具有广谱抗菌作用, 但是其必须用乙酸作为溶剂才能溶解, 在后期成膜的过程中很难除去, 进而影响其感官性能, 而本研究中的抗菌肽作为天然来源的抗菌剂, 无毒副作用, 添加在保鲜膜中有很大的应用前景。

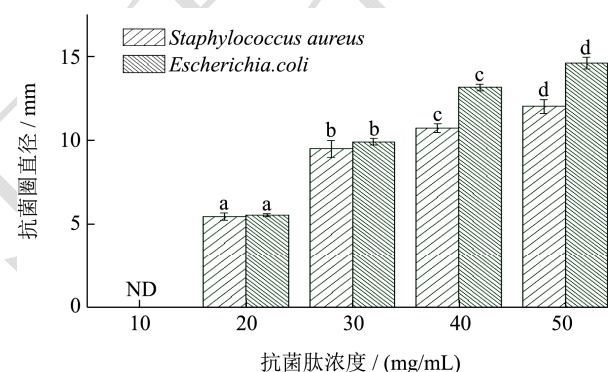


图3 不同浓度明胶复合膜的抑菌活性

Fig.3 Antimicrobial activity of gelatin film with various concentrations of antimicrobial peptides

注: 含有不同字母的具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ); ND 代表透明圈不明显。

## 2.6 明胶复合膜红外光谱分析结果

基于抗拉强度和抑菌实验等结果, 选取50 mg/mL抗菌肽添加量制备抗菌复合膜, 纯明胶膜和添加50 mg/mL抗菌肽的明胶膜的红外光谱分析结果如图4所示。由图4可知, 红外分析光谱显示了蛋白质的主要特征峰, 但在纯明胶膜和添加了50 mg/mL的明胶膜中峰的幅度及位置发生了变化。两种膜在1700~1000  $\text{cm}^{-1}$  范围内有相似的光谱, 包括酰胺I, II和III带。纯明胶膜中1632.53  $\text{cm}^{-1}$  为酰胺I带 (表示C=O拉伸/氢键与C-N拉伸, C-CN变形相结合), 1542.98  $\text{cm}^{-1}$  和1235.69  $\text{cm}^{-1}$  为酰胺II带 (由N-H基团的弯曲振动和C-N基团的拉伸振动引起) 和酰胺III带 (表示结合酰胺的C-N和N-H基团的平面振动或甘氨酸的-CH<sub>2</sub>基团的振动)<sup>[22,32]</sup>。在添加50 mg/mL抗菌肽的

明胶膜中, 酰胺-I, II 和 III 带有类似的波数。与纯明胶膜相比, 添加抗菌肽的明胶膜在  $1031.46\text{ cm}^{-1}$  出振幅有明显的增加, 这可能与 O-H 有关<sup>[15]</sup>。这也证明抗菌肽提供了大量的 O-H。

酰胺-A 带 (-NH 拉伸与氢键结合) 通常在  $3300\text{ cm}^{-1}$  处有强吸收峰<sup>[33]</sup>, 纯明胶膜与明胶复合膜分别在波数  $3297.26\text{ cm}^{-1}$  和  $3284.93\text{ cm}^{-1}$  处观察到, 由于在复合膜中明胶 N-H 与抗菌肽中的 O-H 集团形成氢键导致其波数向较低的方向移动<sup>[34]</sup>。另外在复合膜中酰胺-A 带比纯明胶膜中的峰宽有明显的增加, 再次说明抗菌肽提供了大量的酰胺-A 带。酰胺-B 带 (=CH 的对称拉伸振动以及-NH 伸缩振动), 纯明胶膜与明胶复合膜分别在波数  $3078.36\text{ cm}^{-1}$  和  $3074.93\text{ cm}^{-1}$  处观察到, 由于肽链之间的-NH<sub>3</sub> 基团的相互作用, 明胶复合膜具有比纯明胶膜更低的波数。 $2851\sim 2852\text{ cm}^{-1}$  和  $2919\sim 2922\text{ cm}^{-1}$  的波数通常分别指定为脂肪族 CH<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub> 基团中 C-H 的不对称和对称伸展振动。因此, 添加了抗菌肽的明胶膜可改变或影响纯明胶薄膜的分子结构。

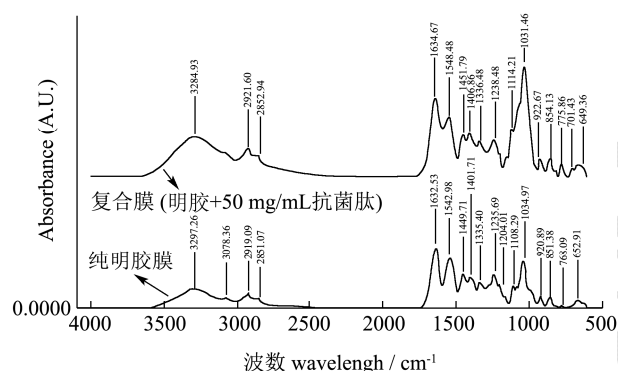


图4 纯明胶膜与 50 mg/mL 抗菌肽 (0.83 g 抗菌肽/g 明胶) 的明胶复合膜的红外光谱测定结果

Fig.4 FT-IR spectra of gelatin film and composite film with 50mg/mL antimicrobial peptide (0.83 g antimicrobial peptide/g gelatin)

## 2.7 明胶复合膜扫描电镜分析结果

纯明胶膜和添加 50 mg/mL 抗菌肽的明胶膜的扫描电镜图如图 5 所示。从图 5 可以看出, 纯明胶膜和加了抗菌肽的膜表面均匀没有任何颗粒状多孔结构, 说明膜的结构均匀。另一方面, 纯明胶膜的显微照片显示出光滑的表面和连续致密的横断面, 这与 Nilsuwan 之前的研究明胶膜的表面和断面均匀光滑相一致<sup>[22]</sup>。在加入抗菌肽的情况下, 从图中可以看出没有出现明显的相分离。表明两种物质具有很好的相容性。这归因于两种物质有大量的羟基官能团, 形成了新的氢键<sup>[35]</sup>, 分子间作用力较强, 形成了较为致密的

网络结构, 从而使明胶复合膜在扫描电镜下呈现规整、致密的形态, 表现出良好的形貌。

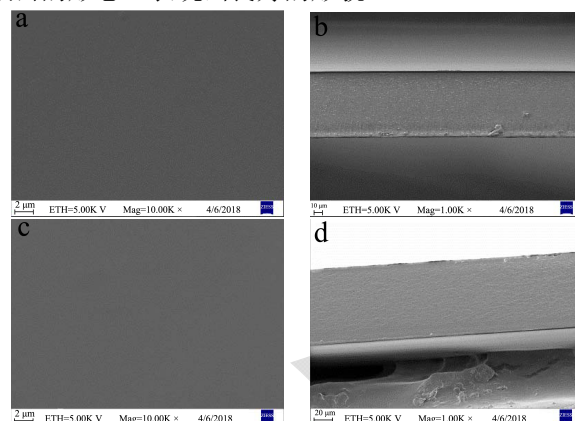


图5 纯明胶膜与 50 mg/mL 抗菌肽的明胶复合膜 (0.83 g 抗菌肽/g 明胶) 的扫描电镜图

Fig.5 SEM images of gelatin film and composite film with 50 mg/mL antimicrobial peptide (0.83 g antimicrobial peptide/g gelatin)

注: a、b 分别为纯明胶膜的表面和断面 SEM 图; c、d 分别为 50 mg/mL 抗菌肽添加量的明胶膜的 SEM 图。

## 2.8 明胶复合膜热稳定性分析结果

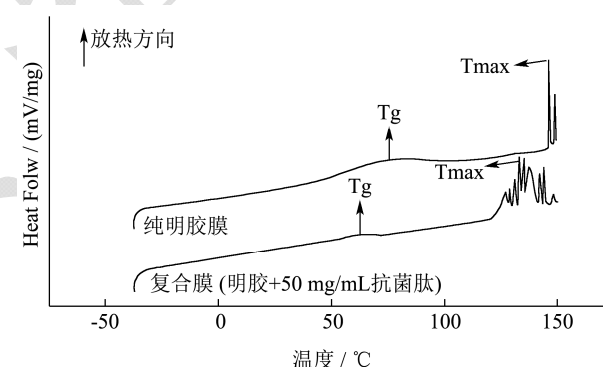


图6 纯明胶膜与 50 mg/mL 抗菌肽 (0.83 g 抗菌肽/g 明胶) 的明胶复合膜的 DSC 热分析图

Fig.6 DSC thermogram of gelatin film and composite film with 50 mg/mL antimicrobial peptide (0.83 g antimicrobial peptide/g gelatin)

图 6 分别为纯明胶膜和添加 50 mg/mL 抗菌肽的明胶膜的热分析图。从图中可以得到膜的玻璃态转化温度 ( $T_g$ ) 和熔融温度 ( $T_{max}$ )。玻璃态转化温度 ( $T_g$ ), 玻璃态转化与无序 (非晶相) 结构的分子节段运动有关, 其从脆性玻璃状固态变为橡胶状态, 特别是无定形材料或无定型区域<sup>[36]</sup>; 纯明胶膜与添加了 50 mg/mL 抗菌肽的膜的  $T_g$  分别为  $73.23\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $63.18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。纯明胶膜与添加了 50 mg/mL 抗菌肽的膜的  $T_{max}$  分别为  $148.94\text{ }^{\circ}\text{C}$  降到  $135.10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在玻璃化转变后获得的这种吸热转变可能与明胶的螺旋-线圈转变有关<sup>[37]</sup>和膜的

有序聚集结构的破坏<sup>[33]</sup>。添加了抗菌肽导致膜的热稳定性有一定的降低,但是并不影响在实际应用中的作用。

### 3 结论

采用溶液共混法制备了不同抗菌肽浓度的明胶抗菌复合膜并比较其特性。结果表明添加了抗菌肽对明胶膜的光学性能、水蒸气阻隔性能、抗拉强度及断裂伸长率有一定的提高;对于复合膜的功能特性,添加了抗菌肽对明胶膜的抑菌性能有显著性提高,当抗菌肽的浓度达到 50 mg/mL 时,复合膜对金黄色葡萄球菌的抑菌圈为 12.03 mm,大肠杆菌的抑菌圈达到 14.60 mm。复合膜结构上,FT-IR 和 SEM 显示抗菌肽与明胶有很好的互溶性,两者没有发生明显的相分离,形成的膜表面都没有孔洞和间隙。DSC 数据表明抗菌肽的添加对复合膜的热稳定性有一定程度的降低作用。本研究结果为天然抗菌膜基材的制备提供了新的思路和原材料,也有利于拓展抗菌肽在食品保鲜领域的应用。

### 参考文献

- [1] Kanmani P, Rhim J. Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 644-652
- [2] Rhim J W, Ng P K. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007, 47(4): 411-433
- [3] 吕飞,丁祎程,叶兴乾.肉桂油/海藻酸钠薄膜物理特性和抗菌性能分析[J].农业工程学报,2012,28(2):268-272  
LYU Fei, DING Yi-cheng, YE Xing-qian. Physical and antimicrobial properties of cinnamon oil/alginate film [J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(2): 268-272
- [4] Pulieri E, Chiono V, Ciardelli G, et al. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010, 86A(2): 311-322
- [5] Ma W, Tang C, Yin S, et al. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 572-579
- [6] 陈丽清,张宇昊,周梦柔,等.猪皮明胶提取过程中的超高压预处理工艺优化[J].农业工程学报,2012,28(19):262-269  
CHEN Li-qing, ZHANG Yu-hao, ZHOU Meng-rou, et al. Optimization of pretreatment by ultra-high pressure during production of gelatin from pig-skin [J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(19): 262-269
- [7] 郑雅爻,马月,罗永康,等.鲢鱼皮明胶提取方法和谷氨酰胺转氨酶改性对明胶结构和膜性能的影响[J].食品科学,2017, 38(19):92-99  
ZHENG Ya-yao, MA Yue, LUO Yong-kang, et al. Effect of extraction methods and transglutaminase modification on film properties and structure of gelatin [J]. Food Science, 2017, 38(19): 92-99
- [8] Rawdkuen S, Suthiluk P, Kamhangwong D, et al. Mechanical, physico-chemical, and antimicrobial properties of gelatin-based film incorporated with catechin-lysozyme [J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 131
- [9] 韩文瑜,孙长江.抗菌肽的研究现状与展望[J].中国兽药杂志,2009,43(10):11-19  
HAN Wen-yu, SUN Chang-jiang. Research progress on antibacterial peptides and its development prospect [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 43(10): 11-19
- [10] Jianyin Miao, Guo Liu, Yong Cao, et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli* [J]. Food Control, 2016, 65: 63-72
- [11] Miao J, Guo H, Ou Y, et al. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China [J]. Food Control, 2014, 42: 48-53
- [12] Miao J, Peng W, Liu G, et al. Biopreservative effect of the natural antimicrobial substance from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 on fresh pork during chilled storage [J]. Food Control, 2015, 56: 53-56
- [13] Kanmani P, Rhim J. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films [J]. Food Chemistry, 2014, 148: 162-169
- [14] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T, et al. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 48: 248-259
- [15] Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 189-199
- [16] Sahraee S, Milani J M, Ghanbarzadeh B, et al. Physicochemical and antifungal properties of bio-nanocomposite film based on gelatin-chitin nanoparticles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 97: 373-381
- [17] Arfat YA, Benjakul S, Prodpran T, et al. Properties and

- antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41: 265-273
- [18] Hosseini S F, Rezaei M, Zandi M, et al. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films [J]. Food Chemistry, 2013, 136(3-4): 1490-1495
- [19] Li Y, Jia H, Cheng Q, et al. Sodium alginate-gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity [J]. Journal of Membrane Science, 2011, 375(1-2): 304-312
- [20] 郭开红,张蕾蕾,吴晓翠,等.鲢鱼皮明胶-海藻酸钠复合膜的制备与性能[J].食品科学,2018,39(7):243-248
- GUO Kai-hong, ZHANG Lei-lei, WU Xiao-cui, et al. Preparation and properties of silver carp skin gelatin-sodium alginate composite films [J]. Food Science, 2018, 39(7): 243-248
- [21] 吕妍霄,薛伟.姜黄素对鸡皮明胶膜的性能及结构的影响[J].现代食品科技,2018,34(1):83-90
- LYU Yan-xiao, XUE Wei. Effects of curcumin on properties and structure of chicken skin gelatin film [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(1): 83-90
- [22] Nilsuwan K, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidative activity of fish gelatin-based film incorporated with epigallocatechin gallate [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80: 212-221
- [23] Wang W, Xiao J, Chen X, et al. Fabrication and characterization of multilayered kafirin / gelatin film with one-way water barrier property [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81: 159-168
- [24] 胡二坤,石伟健,尹寿伟.明胶-溶菌酶/ZnO 纳米复合抗菌膜材料构建与性能[J].现代食品科技,2017,33(9):159-165
- HU Er-kun, SHI Wei-jian, YIN Shou-wei. Fabrication and characterization of gelatin-lysozyme / Nano-ZnO Nanocomposite films [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(9): 159-165
- [25] 汤秋治,潘道东,孙杨赢,等. $\epsilon$ -聚赖氨酸/海藻酸钠抗菌复合膜的制备及性能研究[J].中国食品学报,2016,16(12):101-107
- TANG Qiu-ye, PAN Dao-dong, SUN Yang-ying, et al. Preparation and performance of antimicrobial films based on sodium alginate and  $\epsilon$ -poly-L-lysine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(12): 101-107
- [26] Galus S, Mathieu H, Lenart A, et al. Effect of modified starch or maltodextrin incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity and appearance of soy protein isolate-based edible films [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 16(10): 148-154
- [27] 邹小波,王圣,石吉勇,等.天然花青素提取物与壳聚糖明胶复合膜的制备和表征[J].农业工程学报,2016,32(17):294-300
- ZOU Xiao-bo, WANG Sheng, SHI Ji-yong, et al. Preparation and characterization of chitosan / gelatin composite films incorporated with four natural pigments [J]. Transactions of the CSAE, 2016, 32(17): 294-300
- [28] Vázquez M B, Flores S K, Campos C A, et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings [J]. Food Research International, 2009, 42(7): 762-769
- [29] 王坤,王稳航,张义,等.添加单宁对明胶可食膜性质的影响[J].现代食品科技,2017,33(3):251-256
- WANG Kun, WANG Wen-hang, ZHANG Yi, et al. Impact of tannin on the properties of gelatin edible film [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(3): 251-256
- [30] 吴菲菲,翁武银,苏文金,等.罗非鱼鱼鳞明胶蛋白膜的制备及特性[J].食品工业科技,2013,34(11):277-282
- WU Fei-fei, WENG Wu-yin, SU Wen-jin, et al. Preparation and characterization of edible gelatin films from tilapia (*Tilapia Zillii*) scales [J]. Food Industry Technology, 2013, 34(11): 277-282
- [31] Miao J, Zhou J, Liu G, et al. Membrane disruption and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cell induced by a novel antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 [J]. Food Control, 2016, 59(1): 609-613
- [32] Wu J, Chen S, Ge S, et al. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 42-51
- [33] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T, et al. Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 56(5): 93-107
- [34] Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332

(下转第 272 页)