

基于 Nisin 对琼脂/卡拉胶基复合膜的改性及应用评价

宋雪健^{1,2}, 王欣卉¹, 王春圻¹, 李志江^{1,2,3}, 李娟¹, 王洪江¹, 孟令伟¹, 张东杰^{1,2,3*}, 张爱武¹, 魏甜甜¹, 于金池¹
(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319) (2. 黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319) (3. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为了防止微生物对蓝莓的侵害, 改善传统石油基包装材料对环境造成的污染。研究采用琼脂、卡拉胶作为成膜基材, 甘油作为增塑剂, 以不同浓度的乳酸链球菌素(Nisin)作为抗菌剂来制备复合抗菌膜, 对其理化指标及对蓝莓的保鲜效果进行综合评价。通过对抗菌膜的抑菌性、水溶性、光学性能、阻隔性能及机械性能进行全面分析得出以下结论, 当复合抗菌膜中 Nisin 的质量分数为 0.28% 时, 复合抗菌膜对金黄色葡萄球菌和李斯特菌的抑菌宽度为 3.326 mm、1.812 mm, 水溶性为 45.01%, 透光率为 79.78%, 抗拉强度为 16.09 MPa, 具有较好的应用特性。将含有 0.28% Nisin 的复合抗菌膜应用于蓝莓的保鲜研究中发现, 在 4 °C 和 20 °C 的条件下, 储藏期满时复合膜组的菌落数为 4.20 lg cfu/g 和 2.46 lg cfu/g 明显低于其他对照组, 并且对减缓营养成分的流失有一定的作用。因此, 试验制备的复合膜能有利于延长蓝莓的货架期。

关键词: 琼脂; Nisin; 蓝莓保鲜; 抗菌性

文章编号: 1673-9078(2022)11-200-209

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0107

Modification and Application of Agar/Carrageenan Composite Film Based on Nisin

SONG Xuejian^{1,2}, WANG Xinhui¹, WANG Chunqi¹, LI Zhijiang^{1,2,3}, LI Juan¹, WANG Hongjiang¹, MENG Lingwei¹, ZHANG Dongjie^{1,2,3*}, ZHANG Aiwu¹, WEI Tiantian¹, YU Jinchi¹

(1.College of Food, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

(2.Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China)

(3.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

Abstract: A composite antibacterial film was prepared using agar and carrageenan as film-forming substrates, glycerol as the plasticizer, and different concentrations of the antibacterial agent nisin, and its physical and chemical indexes were comprehensively evaluated. This study was aimed at preventing microbial growth on blueberries and ameliorating the environmental pollution caused by traditional petroleum-based packaging materials. When the concentration of nisin in the compound antibacterial film was 0.28%, the antibacterial widths of *Staphylococcus aureus* and *Listeria* sp. were 3.326 and 1.812 mm, respectively; the water solubility, light transmittance, and tensile strength of the film were 45.01%, 79.78%, and 16.09 MPa, respectively. Therefore, the antibacterial film exhibited good water solubility and antibacterial, optical, barrier, and mechanical properties. Blueberries packaged with this antibacterial film at 4 and 20 °C had 4.20 and 2.46 lg cfu/g, respectively, of

引文格式:

宋雪健,王欣卉,王春圻,等.基于 Nisin 对琼脂/卡拉胶基复合膜的改性及应用评价[J].现代食品科技,2022,38(11):200-209

SONG Xuejian, WANG Xinhui, WANG Chunqi, et al. Modification and application of agar/carrageenan composite film based on Nisin [J].

Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 200-209

收稿日期: 2022-01-29

基金项目: 黑龙江八一农垦大学自然科学人才培养计划(ZRCPY202108); 大庆市指导性科技计划项目(zd-2021-77); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(202110223051); 国家科技部支撑计划项目(2015BAD16B05)

作者简介: 宋雪健(1991-), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: byndxsj@126.com; 共同第一作者: 王欣卉(1992-), 女, 在读博士, 研究方向: 食品科学, E-mail: w604466213@163.com

通讯作者: 张东杰(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: byndzj@126.com

microbial content at the end of storage, and exhibited lower nutrient loss. Therefore, the composite film prepared for this test can help prolong the shelf life of blueberries.

Key words: agar; Nisin; blueberries maintaining freshness; antibacterial characteristic

多糖 (Polysaccharide) 是由十个以上的单糖通过糖苷键结合的高分子碳水化合物, 包括淀粉 (Amylum)、纤维素 (Cellulose)、阿拉伯胶 (Gum Arabic)、琼脂 (Agar) 等。多糖分子可以通过氢键相互作用, 形成一个连续复杂的网络结构^[1,2], 具有一定的成膜性, 是传统石油基包装材料的可替代品。琼脂是由琼脂糖 (Agarose) 和琼脂胶 (Agaropectin) 构成的多聚半乳糖, 琼脂糖是由 1→3-β-D-半乳糖和 1→4-3,6 内醚-α-L-半乳糖结合成的链状结构^[3]; 琼脂胶与琼脂糖的分子结构较为相似, 但由于甲氧基 (CH₃O-)、硫酸基等基团的存在导致琼脂胶没有凝胶功能, 但会在琼脂的制作过程中随着工艺流程渐渐被除去^[4,5]。琼脂的稳定性强, 无毒无害, 美国食品和药物管理局 (FDA) 自 1972 年就开始认定琼脂胶为安全的 (GRAS) 成分。我国也出台了相应的国家标准《食品安全国家标准 食品添加剂琼脂》(GB/T 1886.239-2016)^[6]。琼脂具有较强的凝胶特性, 即使浓度低至 0.004% 仍然能形成凝胶, 但离子、pH 值等因素会影响凝胶强度。琼脂单独成份制备的膜性能指标较差, 组织粗糙、易脆及较硬。但上述缺点可通过与其他材料复合进行改进。琼脂与其他材料一起制备膜的研究也已有报道, 如 Sousa 等^[7]在 95 °C 的条件下, 将 1% (m/m) 的琼脂和干基重的 15% 甘油, 共混 10 min, 制备的琼脂膜其厚度为 (7±1) μm。Jang 等^[8]研究发现琼脂和质量分数为 1.5 wt% (基于琼脂重) 的甘油制备的薄膜其断裂伸长率为 47.17%, 明显高于琼脂与山梨醇、果糖等增塑剂制备的薄膜。上述研究结果表明, 甘油是提高琼脂膜弹性的最有效的增塑剂。将琼脂与其他生物聚合物共混, 可以有效地改变其单独成膜的功能特性。此外, Mahuwala 等^[9]利用质量比为 2:2 的琼脂/木薯淀粉共混, 1.2 g 甘油作为增塑剂制备的复合膜理化性能较好, 其水蒸气透过率为 $2.02 \times 10^{-1} \pm 0.22 \times 10^{-1} \text{ g}(\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ 。Rhim 等^[10]研究发现卡拉胶和琼脂进行复配, 可以提升琼脂膜的抗拉强度和透明度。

Nisin 是一种天然生物抗菌剂, 是由乳酸链球菌通过菌株的代谢过程得到的由 34 个氨基酸组成的多肽化合物, 化学式为 C₁₄₃H₂₃₀N₄₂O₃₇S₇^[11,12]。Nisin 对大多数革兰氏阳性菌表达出较强的抑制作用, 可以通过阻碍细胞膜上的磷脂化合物的合成, 影响巯基团的活性进而使造成细胞膜受损, 导致具体失活^[13]。Nisin 于 1988 年被 FDA 列入一般公认安全名单^[14], 1990 年,

我国国标中正式批准 Nisin 可适用于作为食品防腐剂^[15]。

果蔬的腐败变质首先是受到细菌的侵害后, 才进一步感染真菌、霉菌, 在果蔬保鲜中对细菌的控制极为重要。近些年来, Nisin 作为细菌抗菌剂也被应用于包装领域。如 Lopes 等^[16]研究发现, 在壳聚糖/果胶复合凝聚物中加入 Nisin, 可以赋予其抑菌功能, 并且可以延缓 Nisin 的释放, 提高其在食品保鲜中的稳定性。Sivarrooban 等^[17]在大豆分离蛋白膜中加入 10 000 IU/g 的 Nisin、1wt% 的葡萄籽提取物及 0.16wt% 的 EDTA 制备的薄膜具有较好的理化性能, 能抑制李斯特菌、大肠杆菌及沙门氏菌的滋生。Wang 等^[18]制备的含有 Nisin 的 N-琥珀酰壳聚糖抗菌膜能够起到延长草莓货架期的效果。综上所述, Nisin 在作为抗菌剂被应用于抗菌保鲜材料的研究具有一定的可行性, 并且将 Nisin 与琼脂进行复合的研究较为少见, 因此, 本研究采用琼脂作为成膜基材, Nisin 作为抗菌剂, 卡拉胶作为增强剂来制备复合抗菌膜, 并将其应用于果蔬的保鲜研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

琼脂, 北京索莱宝科技有限公司; Nisin (效价 ≥1 000 000 IU/g), 南京森贝伽生物科技有限公司; 卡拉胶, 滕州市香凝生物工程有限责任公司; 丙三醇, 辽宁泉瑞试剂有限公司; 脑心浸液琼脂 (BHI), 青岛高科园海博生物技术有限公司; 2,6-二氯靛酚, 上海研生实业有限公司; 抗坏血酸, 天津富宇化工厂; 氢氧化钠, 天津市大茂化学试剂厂; 邻苯二甲酸氢钾, 穗冠化工; 蓝莓, 购置于北京华联超市; 妙洁密实袋 (PE), 烟台白马包装有限公司。

1.2 试验设备

XLW 型智能电子拉力试验机, 济南兰光机电技术有限公司; DGG-9140B 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海森信实验仪器厂; BYT-B1 型透气性测试仪, 济南兰光机电技术有限公司; TSY-T1H 透湿性测试仪, 济南兰光机电技术有限公司; FMJ-450 双面加热塑料封口机, 济南兰光机电技术有限公司; DMN 型光泽度仪, 天津市其立科技有限公司; WGT-S 透光率/雾度测定仪, 上海仪电物理光学仪器有限公司; JSM-6390LV 扫描电子

显微镜, 日本 JEOL 公司; Nicolet iS5 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Dynamica Velocity 公司; HGA-02 顶空气体分析仪, 济南兰光机电技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 复合抗菌膜的制备

试验参照 Wang 等^[19]的研究方法, 确定了琼脂的质量分数为 1.6% (m/V , 占水比, 下同), 0.2% (m/V) 的卡拉胶, 0.6% (m/V) 的甘油于 220 mL 的蒸馏水中, 用保鲜膜覆盖烧杯口, 防止液体蒸发, 在 100 °C 的水浴条件下, 中速共混, 待其充分溶解后, 分别将质量分数为 0.00%、0.20%、0.24%、0.28%、0.32%、0.36% 的 Nisin 分散于 30 mL 的蒸馏水中, 并加入成膜液中, 混匀, 将 250 mL 成膜液流延于 20×29 cm 的玻璃板上, 待其凝固成型, 在 35 °C 的条件下干燥 8 h, 即可得到复合膜, 并将其置于温度为 25 °C、相对湿度为 50% 的条件下保存 24 h 后对其性能指标进行分析。

1.3.2 复合抗菌膜的性能表征

1.3.2.1 厚度的测定

试验参考 Oscar 等^[20]的研究方法但有所修改, 在复合膜的上中下位置处各去 3 个点利用电子数显微螺旋测微器进行测量, 并取平均值, 即为复合膜的厚度。

1.3.2.2 抑菌性能

试验选取金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 和单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 作为目标菌, 将菌种在 (37±1) °C 的条件下进行活化 3 代, 采用 0.9% 的生理盐水进行梯度稀释, 使其浓度达到 10⁸ CFU/mL。吸取 100 μL 菌液于 BHI 培养基中涂布均匀待用。将含有不同浓度 Nisin 的抗菌膜裁剪成直径为 6 mm 的小圆圈, 至于上述培养皿中央, 于 (37±1) °C 条件下培养 48 h, 用游标卡尺对抑菌圈宽度进行测量。用公式 1 对抑菌圈宽度进行计算^[21]。

$$D = \frac{D_1 - D_2}{2} \quad (1)$$

式中:

D ——抑菌圈宽度, mm;

D_1 ——抑菌圈外径, mm;

D_2 ——抗菌膜直径, 单位为 mm。

1.3.2.3 水溶性 (Water-solubility, WS) 及溶胀度 (Swelling Degree, SD) 的测定

参照 Ghanbarzadeh 等^[22]的方法经改进后进行水溶性测量。将膜裁剪成 20×20 mm 的正方形样品, 置于培养皿中于 80 °C 下恒温干燥至恒重。将膜称重后放入盛有 20 mL 蒸馏水的培养皿中。室温下溶胀 1 h 后将膜取出, 再次干燥至恒重, 然后称重。计算膜的水溶性。

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

式中:

m_1 ——第一次称重的质量, g;

m_2 ——第二次称重的质量, g。

将膜裁剪成 20×20 mm 的正方形样品, 于 65 °C 条件下恒温干燥至恒重, 称重后放入蒸馏水中, 室温下浸泡 2 h, 将膜取出后放于滤纸上, 用滤纸将膜表面的水吸干后称重。计算膜的溶胀度。

$$SD = \frac{m_4 - m_3}{m_3} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

m_3 ——第一次称重的质量, g;

m_4 ——第二次称重的质量, g。

1.3.2.4 光学性能的测定

将复合膜裁剪成 5×5 cm 的正方形, 参考 GB/T 2410-80-2008 及美国材料试验协会标准 ASTM D1 003-61-2007, 对复合膜的透光率 (Transmittance, T) 及雾度 (Haze, H) 进行测定^[23]。

选取入射角度为 75° 的光泽度测试仪, 根据 GB/T 8941-2007 进行光泽度 (Glossiness, G) 的测试, 其中标准板进行标定处理差值在 1.2 Gs 之内即可^[24]。

1.3.2.5 阻隔性能的测定

参照国标 GB/T 12704-1997 的标准方法, 对复合膜的透氧系数 (Oxygen Permeability, OP) 进行测试, 高纯氧气浓度为 99.99%。参考 Zhang 等^[25]研究方法对包装膜的透湿量 (Water Vapor Permeability, WVP) 进行测试。测试的环境温度为 25 °C、相对湿度为 50%。

1.3.2.6 机械性能的测定

将抗菌膜裁剪成 2×15 cm 的尺寸, 设置仪器上移速度为 25 mm/min, 初始夹距为 50 mm, 对抗菌膜的抗拉强度 (Tensile strength, TS) 及断裂伸长率 (Elongation at Break, EB) 进行测试。

将膜裁剪成宽为 15 mm, 长为 150 mm 的长条, 将其中的一端用封口机封合。设置拉力试验机的初始夹距为 50 mm, 拉引速率为 50 mm/min。以热封部位为中心, 将抗菌膜打开呈 180°, 对热封强度 (Heat Sealing Strength, HS) 进行测试。试验结果单位以 N/15 mm 表示。

1.3.2.7 微观结构的测定

(1) 扫描电镜测定 (SEM)

将抗菌膜剪裁成样条, 平铺于粘有导电胶的载体上进行表面喷金处理, 采用合适的放大倍数观察膜的表面结构^[26]。

(2) 红外光谱测定 (FT-IR)

采用 FT-IR 结合溴化钾压片前处理, 对复合膜的内

部结构及其官能团信息,在波数为 400~4 000 cm⁻¹ 范围内进行信息采集分析^[27]。

1.3.3 复合抗菌膜的保鲜研究

1.3.3.1 蓝莓的包装设计理论基础

采用抗菌膜对蓝莓进行最优的包装方式进行保鲜研究。蓝莓的最优 O₂ 体积分数为 5%, CO₂ 体积分数为 20%^[28]。在 4 °C 的条件下 O₂ 的扩散系数为 0.063 m²·h⁻¹, 在 20 °C 的条件下 O₂ 的扩散系数为 0.069 m²·h⁻¹。

采用顶空气体分析仪在相对湿度为 90%, 温度分别为 4、20 °C 的条件下用取样针刺透硅胶密封垫测定果蔬的消耗氧速率, 设置采样时间间隔为 5 s, 分析时间为 15 s, 多次测量取平均值。试验根据气调包装气体传质模型公式 4 对抗菌膜的气调包装方式进行设计。

$$\frac{dno_2}{dt} = \frac{ND_{O_2}A_p(0.21P_a - P_{O_2})}{L_d} \left(\frac{1}{RT} \right) + \frac{\bar{P}_{O_2}S(0.21P_a - P_{O_2})}{L} - WR_{O_2} \quad (4)$$

式中:

N——抗菌膜的打孔数量;

D——气体的扩散系数, m²/h;

A_p——所打孔的孔面积, m²;

P——分压, atm;

P_a——大气压, atm;

L——抗菌膜的厚度, μm;

L_d——在穿孔深度为穿孔直径的 1.1 倍时气体扩散阻力的校正穿孔长度, m;

R——气体常数, m³·atm·k⁻¹·mol⁻¹;

\bar{P} ——抗菌膜的透气性, mol·μm·m⁻²·h⁻¹·atm⁻¹;

S——抗菌膜的表面积, m²;

W——被包装物的质量, kg;

R_{O₂}——O₂ 的消耗速率, mol·kg⁻¹·h⁻¹。

1.3.3.2 果蔬的处理方法

试验选取 200 g 蓝莓作为研究对象, 分别用抗菌膜 (含有 Nisin 的复合膜)、琼脂膜 (不含有 Nisin 的复合膜)、PE 膜进行包装处理, 其中 PE 膜作为对照组, 分别在温度为 4 °C、20 °C, 相对湿度为 90% 条件下进行储藏, 研究随着储藏时间的延长抗菌膜对果蔬的保鲜效果。蓝莓在 4 °C 的条件下取样时间间隔为 6 d; 在 20 °C 条件下取样时间间隔为 1 d。

1.3.3.3 失水率的测定

将蓝莓从包装袋中取出, 根据公式 5 对果蔬的失水率进行测定^[29]。

$$A = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

A——失水率, %;

m₀——贮前质量, g;

m_t——贮间测定质量, g。

1.3.3.4 菌落总数

根据 GB/T 4789.2-2016 (食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定) 标准对菌落总数进行测定。

1.3.3.5 可溶性固形物含量的测定 (SSC)

试验选取果实中部的果肉, 吸取汁液均匀涂在阿贝折射仪上进行测定^[30]。

1.3.3.6 硬度的测定

用 GY-4 型水果硬度计进行硬度值测试。

1.3.3.7 Vc 含量的测定

采用 2,6-二氯酚法进行测定。

1.4 数据处理

利用 SPSS 20.0 软件结合 Duncan 计算方法进行数据分析, *p* < 0.05 表示差异显著。所有指标均测量 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 复合抗菌膜的性能表征

2.1.1 Nisin 质量分数对复合膜厚度的影响

研究发现随着 Nisin 的质量分数增加抗菌膜的厚度也随之变大, 从 0.065 mm 增加到 0.103 mm, 并且添加 Nisin 的抗菌膜与未添加的相比较具有显著性的差异 (*p* < 0.05), 可能是 Nisin 分子会与琼脂分子形成交联反应, 提升成膜基材凝胶化, 导致膜厚度增加。试验制备的琼脂膜抗菌膜与 Wang 等^[19]制备的琼脂膜抗菌膜 (厚度为 0.201 mm) 相比较具有厚度薄, 节省材料的优点, 导致这一结果的原因, 可能是成膜组分的相容性较好。

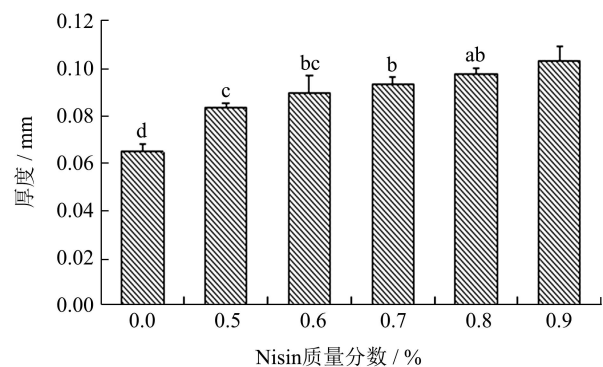


图 1 Nisin 浓度对复合膜厚度的影响

Fig.1 Effect of Nisin concentration on the thickness of film

注: “a-d”代表指标差异显著性, 字母不同表示差异显著 (*p* < 0.05); 字母相同表示差异不显著 (*p* > 0.05), 下同。

2.1.2 Nisin 浓度对复合膜抗菌效果的影响

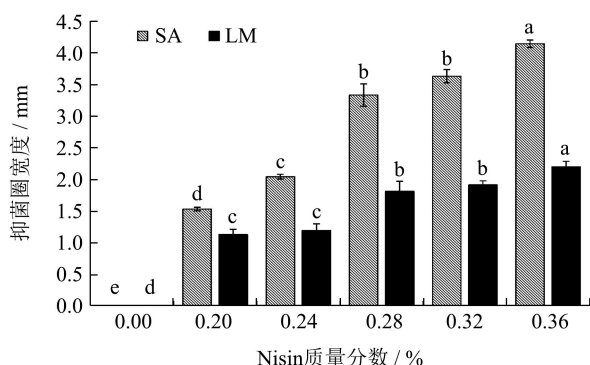


图2 Nisin 浓度对复合膜的抑菌圈宽度影响

Fig.2 Effect of Nisin concentration on the bacteriosphere width of the composite film

金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌是导致果蔬变质的微生物之一，因此对其进行抑制是延长果蔬货架期的重要保障。由图2可知，对于金黄色葡萄球菌来说，随着Nisin浓度的增加，复合膜的抑菌圈宽度由1.533 mm增加到4.133 mm，并呈现出显著的差异性 ($p < 0.05$)，证明Nisin与其他组分进行了较好的融合，且保持了良好的抑菌活性。本文的研究与Lan等^[31]得到的研究结果相一致，并且于张乐等^[32]研究的乳链菌肽对明胶-酪蛋白钙复合抗菌膜相比较，本试验制备的复合抗菌膜中Nisin浓度较低，但对于金黄色葡萄球菌有着相似的抑菌圈宽度，证明了本试验中抗菌膜有较好的抑菌效果。试验结果表明复合抗菌膜对于李斯特菌也有一定的抑菌效果。整体抑菌圈宽度呈上升趋势，由1.131 mm增加到2.197 mm，但差异不够明显，特别是相邻两浓度梯度之间差异不显著。该结果与Abdollahzadeh等^[33]将乳酸链球菌素(100 AU)、肉桂精油(0.6wt%)和氧化锌纳米颗粒(10 mg/15 mL)加入到琼脂基膜中，制

备的共混膜具有显著抑制单核增生李斯特菌生长的作用，并对食品品质无影响，取得的研究结果相一致，说明不同的成膜材料可能不影响Nisin的抑菌效果。在Nisin质量分数为0.28%时，相比较0.24%以下，试验制备的复合抗菌膜对两种细菌有较强的抑制效果。因此，试验制备的复合抗菌膜表现出较强的抑菌效果，复合试验预期，可以进行下一步试验。

2.1.3 复合膜的综合性能指标评价

由表1可知，复合膜的水溶性和溶胀度均随着Nisin质量分数的增加而增大 ($p < 0.05$)，在质量分数为0.28%时，水溶性为45.01%，溶胀度为197.01%，说明试验制备的复合膜具有可降解特性、复合环保基材材料研究目的。试验制备的复合膜水溶性与Bi等^[34]等采用壳聚糖/花青素/甘油制备的复合膜(水溶性为16.97%~19.30%)相比较，具有较大的水溶效果。

透光率是指光线透过抗菌膜的光通量和射到抗菌膜上的光通量的比值。雾度是指光线透过薄膜而偏离入射光线方向的散射光通量与透射光通量的比值。透光率和雾度是食品包装材料中的关键参数，直接影响消费者对产品的接受程度。对于复合膜而言，透光率和雾度成反比。Nisin的颜色为淡黄色，复合膜的透光率随着Nisin质量分数的增加而降低 ($p < 0.05$)，但当Nisin的质量分数为0.28%时，透光率为79.78%，雾度为70.01%。较低的透光率和较高雾度可以更好的减少光照对被包装物的影响，与普通包装材料相比试验制备的复合膜一定程度上对果蔬能予以较好的保护作用^[35]。

光泽度与复合膜表面的粗糙程度有直接关系。虽然Nisin镶嵌于琼脂/卡拉胶膜表面或贯穿其分子层时，会造成表面光滑度降低，因Nisin的浓度较低，所以对于复合膜的光泽度无显著差异 ($p > 0.05$)。

表1 Nisin 浓度对复合膜的综合性能指标影响

Table 1 Effect of Nisin concentration on the comprehensive performance index of the composite film

Nisin 浓度/%	WS/%	SD/%	T/%	H/%	G/Gs	WVP/ g·m ⁻² ·d ⁻¹	OP/xc ⁻¹⁴ cm ³ ·cm/cm ² ·s·Pa	HS/ N·15 ⁻¹ mm
0.00	24.16±0.46 ^e	155.40±1.86 ^f	86.25±0.58 ^a	35.74±0.31 ^f	51.81±1.58 ^a	298.40±11.25 ^f	2.463±0.321 ^f	5.53±0.31 ^a
0.20	34.82±0.68 ^d	177.36±5.86 ^e	83.51±0.16 ^b	57.34±0.42 ^c	44.67±2.68 ^b	325.34±10.11 ^e	3.752±0.255 ^e	3.97±0.05 ^b
0.24	42.52±1.26 ^c	185.28±5.59 ^d	81.20±0.12 ^c	63.83±0.55 ^d	42.71±2.11 ^{bc}	378.88±9.42 ^d	8.563±0.161 ^d	3.54±0.12 ^c
0.28	45.01±1.18 ^c	197.01±1.74 ^c	79.78±0.23 ^d	70.01±0.68 ^c	38.26±3.15 ^{cd}	390.18±4.68 ^c	13.121±0.127 ^c	3.21±0.08 ^d
0.32	54.32±0.98 ^b	215.63±1.34 ^b	78.89±0.44 ^e	73.73±0.68 ^b	36.59±2.07 ^{de}	424.78±6.16 ^b	18.042±0.355 ^b	2.75±0.09 ^e
0.36	66.13±2.86 ^a	285.67±9.62 ^a	76.93±0.62 ^f	78.18±0.51 ^a	33.06±1.58 ^e	440.91±5.24 ^a	19.815±0.092 ^a	2.46±0.07 ^f

透氧系数是衡量抗菌膜透气性能的参数之一，数值越大，表明透气性越高。研究发现Nisin的浓度与复合膜的透氧系数存在正相关。Nisin的浓度与复合膜的透湿量成正比，随着浓度的增加，透湿量由298.40 g·m⁻²·d⁻¹增加到440.91 g·m⁻²·d⁻¹，由此验证了水

溶性增大的原因，并推断Nisin的浓度可能会影响到复合膜的机械性能。

机械性能是评价包装材料应用能力的体现。如图3可知，Nisin的质量分数与复合膜的抗拉强度成反比，当Nisin质量分数从0.00%增加到0.36%时，复合

膜的抗拉强度从 24.23 MPa 下降到 12.88 MPa。说明 Nisin 分子的存在确实降低了成膜基材分子间的相互作用力。当 Nisin 质量分数为 0.28% 时, 复合膜的热封强度为 3.21 N/15 mm, 抗拉强度为 16.09 MPa, 与张金丽等^[36]利用 12 g/L 的琼脂和 40 g/L 的明胶 (1:1)、0.4 g 甘油及不同体积的银纳米颗粒制备的复合膜 (抗拉强度为 13.92~14.89 MPa) 相比较具有较强的机械性能。

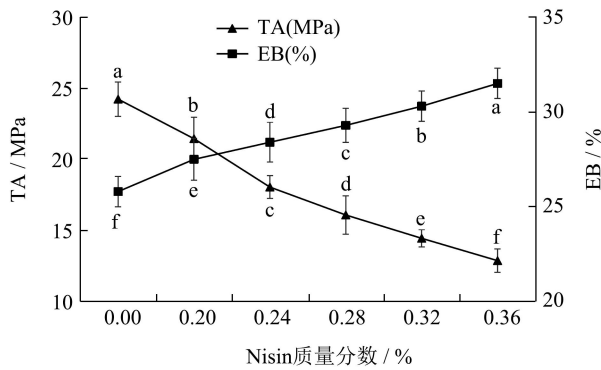


图3 Nisin 浓度对复合膜的机械性能影响

Fig.3 Effect of the Nisin concentration on the mechanical properties of the composite films

2.1.4 复合膜微观结构分析

2.1.4.1 扫描电镜结果与分析

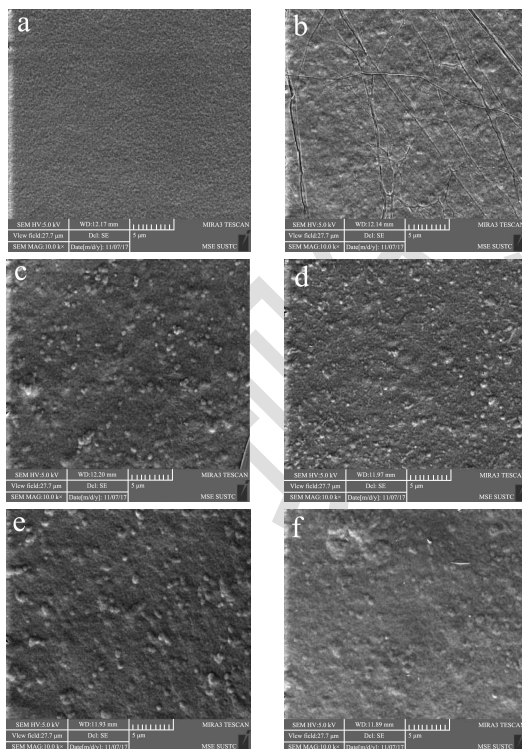


图4 不同 Nisin 含量复合膜的扫描电镜图

Fig.4 SEM micrograph of composite films with different Nisin concentration

注: a~f 的 Nisin 质量分数分别为 0.00%、0.20%、0.24%、0.28%、0.32%、0.36%。

由图 4 可知当复合膜中不添加 Nisin 时, 复合膜的

相容性较好, 表面均匀、平整, 但随着 Nisin 质量分数的增加, 复合膜开始出现了明显的团聚现象, 并且浓度越大, 复合膜的团聚现象越多越大, 进而验证了复合膜的各项性能指标测试结果。试验与李迪等^[37]研究结果相吻合。通过综合对复合膜的抑菌性、机械性能等指标的综合评价, 以及考虑实际应用中成本的问题, 故试验选取 Nisin 质量分数为 0.28% 的复合膜进行进一步研究及保鲜效果评价。

2.1.4.2 红外光谱分析

由图 5 可知, A、B 两条图谱大体呈相似趋势, 琼脂在 3 400 cm^{-1} 处有一个宽峰, 属于羟基 O-H 和 N-H 的伸缩振动峰的叠加; 2 923 cm^{-1} 和 2 927 cm^{-1} 为残糖基上的甲基或次甲基的 C-H 的伸缩振动吸收峰; 1 151 cm^{-1} 处出现了 C-O-C 振动吸收峰, 1 091 cm^{-1} 处出现了 C-O 振动吸收峰。Nisin-琼脂基抗菌膜与琼脂膜进行对比, 二者最大不同在于 1 652 cm^{-1} 有明显的 C=O 伸缩振动吸收峰, 1 598 cm^{-1} 处出现的伯胺基的 N-H 弯曲振动峰^[38], 说明 Nisin 中酰胺基成功与琼脂中氨基进行键合, 形成了 Nisin-琼脂的共聚物。

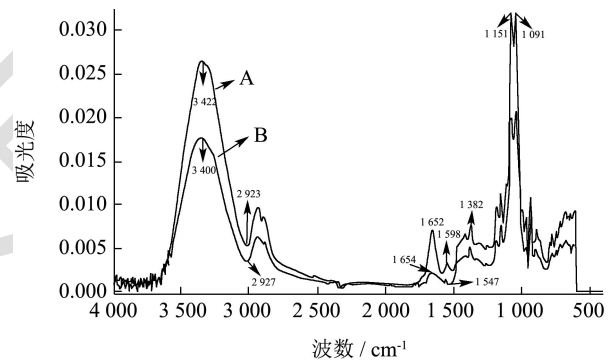


图5 复合膜的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrogram of the composite film

注: A 为添加 Nisin 的复合膜, B 为无 Nisin 添加复合膜。

2.2 复合膜的保鲜效果研究

2.2.1 果蔬的包装设计分析

综合上述的研究成果, 从抑菌能力、性能指标、成本分析及应用价值角度出发, 研究采用 Nisin 质量分数为 0.28% 的抗菌膜对果蔬进行保鲜研究。因果蔬中水分的含量较大, 且储藏环境较为湿润, 故选取高湿条件下进行包装设计。包装设计的依据源自果蔬的呼吸强度与抗菌膜的透气能力处于相平衡的状态, 避免造成无氧损伤或者氧气浓度过高对果蔬造成的伤害, 从而达到延长货架期的目的。由于包装材料的透气系数较低, 无法满足水果的适宜储藏条件, 因此需要进行打孔处理, 孔径为 0.302 mm, 且各组的打孔位置相一致, 其他处理组也需要做相应的操作。

表2 蓝莓的包装方式

Table 2 Packaging method of blueberry

质量/g	贮藏温度/°C	包装膜面积/m ²	呼吸速率/(mol·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)	打孔数量/个
200	4	0.018	0.000 45	2
	20		0.002 27	15

2.2.2 蓝莓的保鲜效果

2.2.2.1 蓝莓的失水率

水果在储藏期内其呼吸作用会造成水分流失。由图6可知,蓝莓的失水率随贮藏时间的延长而逐渐增大,在4℃条件下贮藏15d,PE保鲜袋组的最大失水率为0.98%,抗菌膜组1.88%,琼脂膜组2.03%。在20℃条件下储藏5d,PE组最大失水率为1.98%,抗菌膜组5.76%,琼脂膜组5.25%。试验与Chiabrando等^[39]利用壳聚糖对蓝莓进行涂膜保鲜减缓蓝莓水分的流失的作用相一致。蓝莓在20℃条件下的失水率远高于4℃,主要由于温度越高蓝莓果实的呼吸作用越强。PE保鲜袋组要优于其他处理组,虽然PE膜也打孔了,但由于空隙较小,且PE膜的透水性较差,故水蒸气难以散发,一定程度上增大了保鲜膜内部空气环境湿度,减少了水分的蒸发,更加有利于微生物的滋生。抗菌膜透水性优于琼脂膜,但随着抗菌剂的释放迁移与溶解,使得抗菌膜和琼脂膜对于保水性的差异逐渐减小($p>0.05$)。

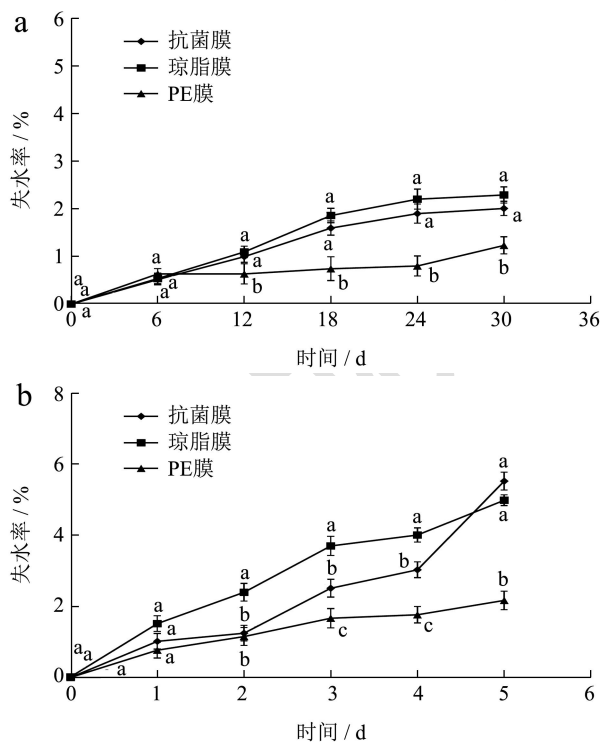


图6 不同温度条件对蓝莓失水率的影响

Fig.6 Effect of temperature on the rate of water loss blueberries

注:图a:4℃条件下,图b:20℃条件下。折线上字母a-c代表同一时间不同处理组的指标差异显著性,字母不同表示差异显著($p < 0.05$),下图同。

2.2.2.2 蓝莓的菌落总数

由图7所示,在不同条件下蓝莓中菌落总数呈“J”型增长趋势,在低温条件下菌落增长速率较为缓慢。抗菌膜组菌落数明显少于其他对照组,证明随着时间的延长,抗菌膜中抗菌剂的释放与迁移,抑制了蓝莓表面细菌的滋生及外部环境细菌的侵害,延缓了蓝莓的腐烂变质。在储藏期满时,在4℃和20℃的条件下,抗菌膜组的菌落总数为4.20 lg cfu/g、6.37 lg cfu/g明显低于其他处理组($p < 0.05$)。试验取得的结果与许琳琳^[40]利用枯草芽孢杆菌环脂肽/海藻酸钠复合膜对蓝莓进行保鲜研究得到的结果相似。PE组内的蓝莓因呼吸作用释放的水蒸气,无法全部排出保鲜袋外,造成了内部空气湿度环境过大,水分的回流加速了蓝莓的腐败与溃烂,验证了失水率分析中给出的猜想。

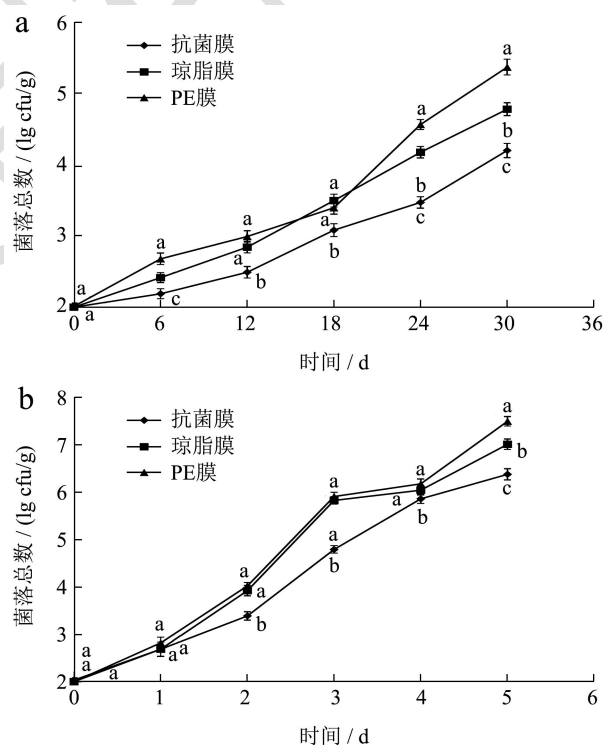


图7 不同贮藏温度对菌落总数的影响

Fig.7 Effects of different storage temperature on the total number of colonies

2.2.2.3 蓝莓的可溶性固形物

SSC是衡量水果的成熟度、果品品质的重要参考指标之一。图8表示蓝莓中SSC的随贮藏时间的变化过程,开始阶段由于蓝莓的水分流失及成熟度进一步提高,使SSC小幅度上升,后因微生物的影响及呼吸

作用使蓝莓中营养物质开始流失, 导致其开始下降。在 4 °C 和 20 °C 条件下, 储藏期满时, 对照组蓝莓的 SSC 降低到 10.08% 和 10.37%, 明显低于抗菌膜组且具有显著性差异 ($p < 0.05$), 因此, 抗菌膜组能有效地减缓 SSC 的流失。杨清菁等^[41]在 4 °C 和 20 °C 的储藏条件下, 采用 0.5wt% 壳聚糖对蓝莓果实进行涂膜处理, 结果表明该方法对 SSC 含量影响较小, 试验与其得到的结果相似。

2.2.2.4 蓝莓的硬度

硬度是反应果蔬成熟度、耐贮存性、果品品质的

重要指标之一, 通过硬度的检测对下一步的运输和贮藏提供依据。由图 9 可知, 蓝莓的硬度随着储藏时间的延长而逐渐降低。在不同温度条件下抗菌膜组蓝莓硬度的分别从 5.89×10^5 Pa 降低到 4.58×10^5 Pa, 5.87×10^5 Pa 降低到 4.69×10^5 Pa, 与其他处理组相比较具有显著性差异 ($p < 0.05$)。主要是因为抗菌膜可以有效的抑制蓝莓中微生物的增长与繁殖, 减缓蓝莓营养成分的损失, 故硬度下降趋势较为缓慢。抗菌剂 Nisin 对细菌的抑制能有效地减缓蓝莓果肉中胶层和纤维素等物质的分解, 抑制了蓝莓硬度的降低^[42]。

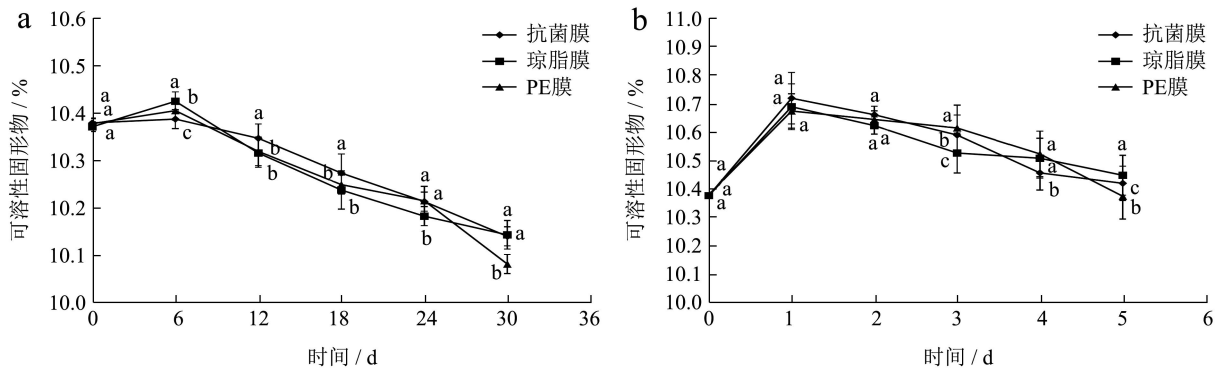


图 8 不同贮藏温度对可溶性固形物的影响

Fig.8 Effects of different storage temperatures of soluble solids

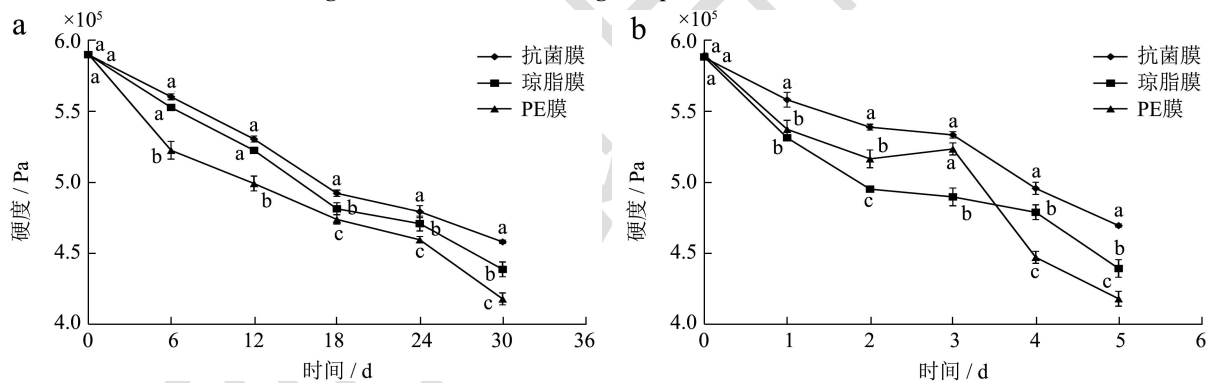


图 9 不同贮藏温度对蓝莓硬度的影响

Fig.9 Effects of different storage temperature on the hardness of blueberries

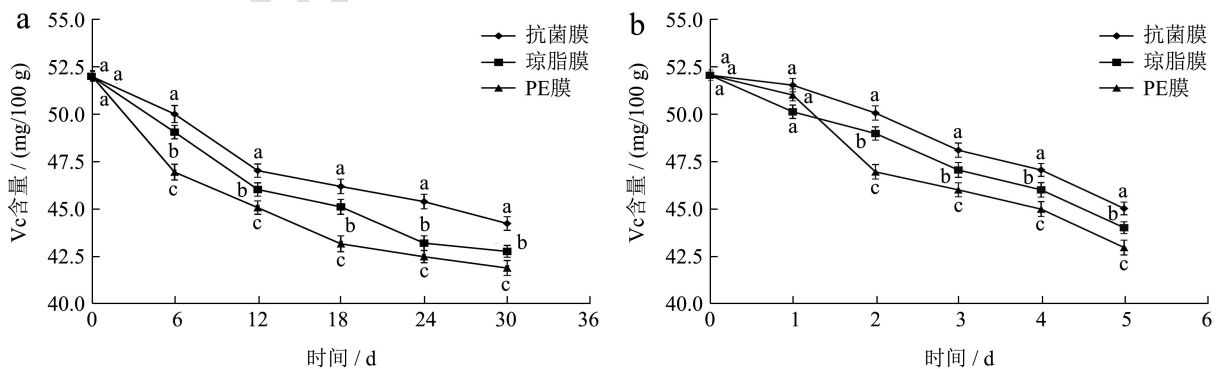


图 10 不同贮藏温度对 Vc 含量的影响

Fig.10 Effects of different storage temperature conditions on the content of Vc

2.2.2.5 蓝莓的 Vc 含量

新鲜的蓝莓中含有大量的 Vc, 采后随着储藏时间的延长 Vc 极易被氧化而造成流失。蓝莓的 Vc 含量的变化如图 10 所示。蓝莓中的 Vc 含量随着贮藏时间延长而逐渐降低, 但降低程度存在差异。在 4 °C 条件下抗菌膜组与其他处理组相比较具有显著性差异 ($p < 0.05$)。Vc 含量从 51.99 mg/100 g 下降到 44.25 mg/100 g, 琼脂膜组从 51.99 mg/100 g 下降到 42.78 mg/100 g, PE 组从 52.03 mg/100 g 下降到 41.91 mg/100 g, 在高温条件下, 也是抗菌膜组优于其他处理组 ($p < 0.05$)。这是因为抗菌膜组能有效地抑制微生物的滋生, 降低蓝莓的腐烂速率, 并且抗菌膜阻隔性好, 将蓝莓与外界隔绝, 降低了 Vc 的氧化作用, 达到了延长货架期的目的。汪东风等^[43]研究发现与对照组相比较, 壳聚糖膜对蓝莓保鲜时能有效地减低 Vc 的流失, 试验与其得到结果相类似。

3 结论

研究采用 1.6wt% 的琼脂、0.2wt% 的卡拉胶作为主要的成膜基材, 体积分数 0.6% 的甘油作为增塑剂、不同质量分数的 Nisin 作为抗菌剂制备环保抗菌膜, 并对其性能指标及对蓝莓的保鲜效果进行研究, 结果表明, 随着 Nisin 质量分数 (0.00%、0.20%、0.24%、0.28%、0.32%、0.36%) 增加, 复合抗菌膜的水溶性、雾度、透光率、透氧系数、热风强度及抗拉强度存在显著性差异。

复合抗菌膜能有效地抑制导致蓝莓腐败变质特征菌, 金黄色葡萄球菌和李斯特菌的滋生, 并且当 Nisin 浓度为 0.28% 时对两者的抑菌圈宽度分别为 3.326 mm 和 1.812 mm, 说明了该抗菌膜可以应用于蓝莓的保鲜研究。

采用 Nisin 浓度为 0.28% 的抗菌膜对蓝莓进行合理的包装设计, 研究其保鲜效果, 结果表明, 抗菌膜与对照组相比较能有效地抑制蓝莓中菌落数的增加, 减缓可溶性固形物、硬度、Vc 的流失, 可以起到延长其货架期的目的。

参考文献

- [1] KurT A, Kahyaoglu T. Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan [J]. Carbohydr Polym, 2014, 104: 50-58
- [2] Mostafavi F S. The surface characteristics of biopolymer-coated tomato and cucumber epicarps: effect of guar, Persian and tragacanth gums [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(1): 840-847
- [3] Lahaye M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry [J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(2): 173-184
- [4] Naretto A, Fanuel M, Ropartz D, et al. The agar-specific hydrolase Zg AgaC from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* defines a new GH16 protein subfamily [J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 249(17): 6923-6939
- [5] Si H P, Lee C R, Hong S K. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(11): 2815-2832
- [6] GB/T 1886.239-2016, 食品安全国家标准 食品添加剂 琼脂[S]
- [7] Sousa A M M, Sereno A M, Hilliou L, et al. Biodegradable agar extracted from *Gracilaria vermiculophylla*: films properties and application to edible coating [C]// Materials Science Forum. Trans Tech Publications, 2010
- [8] Jang S A, Shin Y J, Seo Y B, et al. Effects of various plasticizers and nanoclays on the mechanical properties of red algae film [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(3): N30-N34
- [9] Mahuwala A A, Hemant V, Meharwade S D, et al. Synthesis and characterisation of starch/agar nanocomposite films for food packaging application [J]. IET Nanobiotechnology, 2020, 14(9): 809-814
- [10] Rhim J W, Wang L F. Mechanical and water barrier properties of agar/k-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(1): 71-81
- [11] Arauz L J D, Jozala A F, Mazzola P G, et al. Nisin biotechnological production and application: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(3-4): 146-154
- [12] Gross E, Morell J L. The structure of nisin [J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(18): 4634-4635
- [13] 朱燕莉,王正莉,王卫,等.天然食品防腐剂的抑菌机理研究进展[J].中国调味品,2021,46(9):176-180
- [14] Ali A H, Hale T W, Fa K W, et al. NISIN and *Clostridium difficile*: a potentially effective treatment for an increasingly problematic disease [J]. American Journal of Gastroenterology, 2013, 108(4): 625-625
- [15] GB 2760-1996, 食品添加剂使用卫生标准[S]
- [16] Lopes N A, Barreto Pinilla C M, Brandelli A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70(SEP.): 1-7
- [17] Sivarooban T, Hettlarachchy N S, Johnson M G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and

- EDTA incorporated soy protein edible films [J]. Food Research International, 2008, 41(8): 781-785
- [18] Wang H, Guo L, Liu L, et al. Composite chitosan films prepared using nisin and *Perilla frutescense* essential oil and their use to extend strawberry shelf life [J]. Food Bioscience, 2021, 41(2): 101-115
- [19] Wang H J, Soon AN D, Lee D S. Development of multifunctional active film and its application in modified atmosphere packaging of shiitake mushrooms [J]. J Food Prot, 2016, 79(9): 1599-1608
- [20] Óscar L R, Isabel R, Sara I S, et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(1): 110-122
- [21] 贾琳,王西贤,陶文娟,等.聚丙烯腈抗菌复合纳米纤维膜的制备及其抗菌性能[J].纺织学报,2020,41(6):14-20
- [22] Ghanbzadeh B, Almasi H, Entezami A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: effect of citric acid and carboxymethyl cellulose [J]. Industrial Crops and Products, 2011, 33(1): 229-235
- [23] GB/T 2410-80-2008,透明塑料透光率和雾度的测定[S]
- [24] GB/T8941-2007,纸和纸板镜面光泽度的测定[S]
- [25] Zhang X, Liu Y, Yong H, et al. Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO₂ nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94(SEP.): 80-92
- [26] Liu C, Jiang S, Zhang S, et al. Characterization of edible corn starch nanocomposite films: The effect of self-assembled starch nanoparticles [J]. Starch - Stärke, 2016, 68(3-4): 239-248
- [27] Wu S, Wang W, Yan K, et al. Electrochemical writing on edible polysaccharide films for intelligent food packaging [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 186(15): 236-242
- [28] 张莉会,李志航,廖李,等.不同保鲜剂对蓝莓保鲜效果的比较[J].现代食品科技,2020,36(11):121-129
- [29] Shiri M A, Ghasemnezhad M, Bakhshi D, et al. Effect of postharvest putrescine application and chitosan coating on maintaining quality of table grape cv. "Shahroudi" during long-term storage [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2013, 37(5): 999-1007
- [30] Wu W L, Zhao H F, Fang L, et al. Nutritional components in the fruit of different blueberry cultivars in Nanjing [J]. Applied Mechanics & Materials, 2012, 140: 374-378
- [31] Lan W T, Zhang R, Ji T T, et al. Improving nisin production by encapsulated *Lactococcus lactis* with starch/carboxymethyl cellulose edible films [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 251(1): 117-126
- [32] 张乐,刘安军,韩悦,等.乳链菌肽对明胶-酪蛋白钙复合膜理化及抑菌特性的影响研究[J].现代食品科技,2016,4:52-58
- [33] Abdollahzadeh E, Hosseini H M, Fooladi A I. Antibacterial activity of agar-based films containing nisin, cinnamon EO, and ZnO nanoparticles [J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(3): e12440
- [34] Bi F Y, Zhang X, Bai R Y, et al. Preparation and characterization of antioxidant and antimicrobial packaging films based on chitosan and proanthocyanidins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 11-19
- [35] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Structural, morphological and thermal behavior characterizations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41(1): 33-43
- [36] 张金丽,陈子和,陈燕婷,等.Ag NPs 改性鱼鳞明胶-琼脂复合膜的制备及性能[J].精细化工,2020,37(12):2496-2503,2509
- [37] 李迪,孙庆申,于艳梅,等.载 Nisin 壳聚糖淀粉复合膜的研制及抑菌效果评价[J].黑龙江大学自然科学学报,2012,29(6): 811-816
- [38] Chang R, Lu H, Li M, et al. Preparation of extra-small nisin nanoparticles for enhanced antibacterial activity after autoclave treatment [J]. Food Chemistry, 2018, 245(apr. 15): 756-760
- [39] Chiabrando V, Giacalone G. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity after fresh storage of blueberry treated with edible coatings [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2015, 66(3): 248-253
- [40] 许琳琳. 枯草芽孢杆菌环脂肽对海藻酸钠成膜性能以及蓝莓保鲜效果影响研究[D].北京:北京林业大学,2020
- [41] 杨清菁,李锐琦,张春龙,等.壳聚糖涂膜结合冷藏对不同品种蓝莓品质的影响[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2021, 44(5):448-453
- [42] 王磊明,李洋,张茜,等.壳聚糖-肉桂精油复合膜对蓝莓保鲜效果的影响[J].食品科技,2017,42(9):14-21
- [43] 汪东风,张一妹,徐莹,等.壳聚糖复合膜处理对蓝莓保鲜效果的影响[J].现代食品科技,2014,30(2):62-65,41