

# 不同碱性条件下乳清分离蛋白-酪蛋白酸钠-普鲁兰多糖薄膜的美拉德改性及其抗氧化作用

张文惠<sup>1</sup>, 雷桥<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)(2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为了增强成膜过程中的美拉德反应, 以提高薄膜的功能特性, 该研究以乳清分离蛋白 (Whey Protein Isolate, WPI)、酪蛋白酸钠 (Sodium Caseinate, NaCas)、普鲁兰多糖 (Pullulan, PUL) 为成膜基材。在 pH 值 7.0~12.0 的碱性条件下, 采用湿法加热 (90 °C) 协同引发美拉德反应, 通过成膜溶液中游离氨基酸、还原糖含量的变化和褐变程度等参数来判断其美拉德反应的程度; 研究了改性薄膜的结构变化、阻隔性、热稳定性和抗氧化活性, 并应用于椰子油的包装贮藏中。实验结果表明, 碱性条件能够显著加速和增强热致成膜溶液的美拉德反应并提高薄膜的功能特性, 且在 pH 值 11.0 条件下表现显著, 薄膜性能也更为优异: 氧气透过率、水蒸气透过率、抗拉强度分别达到 0.045 cm<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>·d)、5.680×10<sup>-12</sup> g·cm/(cm<sup>2</sup>·s·Pa)、3.61 MPa 的高阻隔性和高强度; DPPH 自由基清除能力和还原力分别达到 95.07% 和 1.83, 具备优良的抗氧化活性, 在 50 °C 加速保藏实验中, 20 天后椰子油的酸价和过氧化值分别为 0.27 mg/g、0.12 g/100 g, 显著抑制了椰子油的氧化酸败作用, 延长了椰子油的货架期。研究结果为美拉德反应改性薄膜应用于延长油脂货架期提供新思路。

**关键词:** pH 值; 美拉德改性; 游离氨基酸; 还原糖; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2025)01-229-239

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1369

## Maillard Modification of A Whey Protein Isolate-sodium Caseinate-pullulan Polysaccharide Film and Its Antioxidant Effects under Different Alkaline Conditions

ZHANG Wenhui<sup>1</sup>, LEI Qiao<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocea University, Shanghai 201306, China)

(2.Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** To enhance the Maillard reaction during the film formation process and improve their functional properties, whey protein isolate (WPI), sodium caseinate (NaCas), and pullulan polysaccharide (PUL) were used as film-forming substrates. Under alkaline conditions with a pH value of 7.0~12.0, wet heating (90 °C) was used to synergistically trigger the

引文格式:

张文惠,雷桥.不同碱性条件下乳清分离蛋白-酪蛋白酸钠-普鲁兰多糖薄膜的美拉德改性及其抗氧化作用[J].现代食品科技,2025,41(1):229-239.

ZHANG Wenhui, LEI Qiao. Maillard modification of a whey protein isolate-sodium caseinate-pullulan polysaccharide film and its antioxidant effects under different alkaline conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 229-239.

收稿日期: 2023-11-15

基金项目: 上海市教育委员会产学研项目 (15cyx69)

作者简介: 张文惠 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程与包装技术, E-mail: zhangwenhuihui1101@163.com

通讯作者: 雷桥 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性食品包装, E-mail: qlei@shou.edu.cn

Maillard reaction. The degree of carbonyl-ammonia reaction was determined by parameters such as changes in the content of free amino acids and reducing sugars in the film-forming solution and degree of browning. The structural changes, barrier properties, thermal stability and antioxidant activity of the modified films were investigated. These films were also applied to the packaging and storage of coconut oil. The results show that alkaline conditions significantly accelerate and enhance the Maillard reaction of the thermotropic film-forming solution and improve the functional properties of films. Furthermore, the performance and properties of films significantly improved at pH value 11.0. Oxygen transmittance, water vapor transmittance, and tensile strength reached  $0.045 \text{ cm}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ,  $5.680 \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{cm}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$ , and  $3.61 \text{ MPa}$  high barrier and high strength, respectively; DPPH radical scavenging ability and reducing power reached 95.07% and 1.83, respectively, achieving outstanding antioxidant activities. In the accelerated storage experiment at  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , the acid and peroxide values of coconut oil were  $0.27 \text{ mg/g}$  and  $0.12 \text{ g}/100 \text{ g}$ , respectively, after 20 days. The films significantly inhibited the oxidative rancidity of coconut oil and extended its shelf life. The results provide new applications of Maillard reaction modified films to prolong the shelf life of oils and fats.

**Key words:** pH value; maillard modification; free amino acids; reducing sugar; antioxidant activity

多糖-蛋白质基质薄膜制备过程中的美拉德反应(羰氨反应)及其产物,可实现对薄膜的改性作用:增强薄膜的交联度,提高薄膜的避光性、阻隔性能、机械性能等<sup>[1]</sup>。美拉德反应早期阶段,还原糖与氨基化合物反应得到反应中间体—Amadori重排产物(ARPs);中期阶段为重排产物与Strecker降解;后期阶段通过环化、反醛化、异构化等反应,形成棕色含氮聚合物和共聚合物类黑素<sup>[2]</sup>。美拉德反应受pH值、温度、反应时间、反应底物的浓度和种类、水分活度等因素影响。

Han等<sup>[3]</sup>通过改变普鲁兰多糖和蛋清蛋白的混合比例,研究了美拉德反应对薄膜性能的影响,薄膜的机械性能、热稳定性明显得到提高;Kchaou等<sup>[4]</sup>以鱼明胶和葡萄糖为基材,研究了温度对美拉德反应复合膜性能的影响,薄膜的水溶性降低,抗氧化能力和热稳定性增强。除了温度、浓度等影响因素,pH值的变化也影响薄膜性能,Etxabide等<sup>[5]</sup>研究了在pH值2.0和天然pH值(pH值5.4)下美拉德反应对乳糖-改性明胶复合膜的影响,发现在pH值2.0时的交联度较低,薄膜在水中更易溶解,微观结构不如天然pH值下紧密。pH值对非质子化形式的氨基酸比例有很大影响,较高的pH值会增加美拉德反应的初始缩合步骤,当pH值接近蛋白质的等电点时,变性蛋白会通过疏水作用随机聚集;反之,静电斥力阻碍了随机聚集体的形成,导致线性聚合物的形成<sup>[6]</sup>,削弱了凝胶化作用对氨基和还原糖的阻隔,促进了美拉德反应的发生,从而导致共价交联,形成交联聚合物。

ARPs的氧化裂解是美拉德反应过程中关键的一步,其后续反应取决于pH值,酸性条件下ARPs

主要发生1,2-烯醇化反应,形成糠醛;碱性条件下主要涉及到2,3-烯醇化反应,形成呋喃酮或还原酮,当还原酮的形成高于糠醛时,导致颜色加深<sup>[2]</sup>,从而可改善薄膜的避光性。此外,美拉德反应的褐变程度与抗氧化活性密切相关,随着褐变程度的增大,生成更多的醛、酮等还原性中间产物,抗氧化活性随之而提高。由于类黑素和ARPs具有螯合金属和清除氧自由基的潜力<sup>[7]</sup>,因此,美拉德反应产物可作为天然抗氧化剂,延缓或抑制脂质氧化。

WPI/NaCas蛋白基薄膜可降解,成膜性好,但阻隔能力较差,PUL薄膜具有良好的阻氧性能,可提供羰基与蛋白质中的氨基促成美拉德反应。本课题前期工作探索了美拉德改性的工艺参数,如反应时间、反应温度<sup>[8]</sup>等,发现此类方法耗时耗能( $95 \sim 110 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h),且易使薄膜易碎开裂;酸性条件下制备的薄膜由于蛋白质的聚集或变性呈现不透明的白色。为了改良改性工艺,该研究拟通过碱性条件下调整pH值的方法,以期实现在低温短时( $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , 4 h)条件下,促进美拉德反应,制备出性能优良的功能性薄膜并应用于椰子油的包装,达到环保可生物降解,抗酸败、抗氧化,延长椰子油货架期的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

乳清分离蛋白粉(UPI),美国ISOPURE公司;酪蛋白酸钠(NaCas),上海麦克林生化科技(中国)有限公司;普鲁兰多糖(PUL),萨恩化学技术(上海)有限公司;甘油,上海麦克林生化科技(中国)有限公司;去离子水,实验室自制;冷

榨椰子油，文昌椰海食品有限公司。

## 1.2 仪器设备

DHG-9045A 型恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器，河南省巩义市科瑞仪器有限公司；SHB-III A 型循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；PHS-3E 型 pH 计，上海仪电科学仪器股份有限公司；U-3900 紫外分光光度计，日本日立高新技术科学公司；XLW(EC) 型智能电子拉力试验机，济南蓝光机电技术有限公司；OX-TRAN 2/2H 型氧气透过率测试仪，美国 MOCON 公司；W-D-31D 水蒸气透过率测试仪，广州西唐机电科技有限公司；CR-400 色差仪，日本柯尼卡美能达有限公司；Nicolet iS10 Thermo 傅里叶变换红外光谱仪，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；TA 差式扫描量热仪，美国 TA Instruments；S3400N 型扫描电镜，日本 Hitachi（日立）公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 成膜溶液的制备及pH值改性

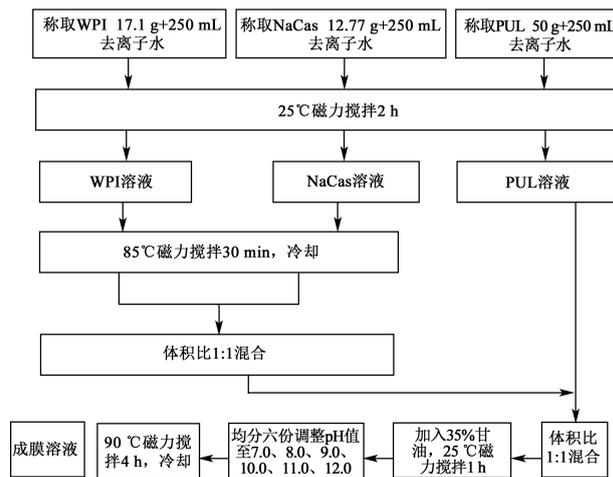


图 1 成膜溶液工艺流程

Fig.1 Film forming solution process flow

本实验在郟梓含等<sup>[9]</sup>方法的基础上进行了调整，分别称取 17.1、12.77、50 g 的 WPI、NaCas 和 PUL，将三种基质分别溶解于 250、250、500 mL 去离子水中，并在室温下使用磁力搅拌器连续搅拌 2 h 使其完全溶解，然后将完全溶解在去离子水中的 WPI 和 NaCas 分别在 85 °C 下搅拌 30 min，再将冷却至室温的 WPI 和 NaCas 以体积比 1:1 混合，然后加入 PUL，混合比例为  $V_{\text{WPI-NaCas}}:V_{\text{PUL}}=1:1$ ，再加入 35% 的甘油，用磁力搅拌器室温下搅拌 1 h。采用 1 mol/L NaOH 溶液调整溶液 pH 值，分别调整至

7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。将调整过 pH 值的溶液封盖置于 90 °C 的磁力搅拌器中搅拌 4 h。冷却后，将样品密封放在 4 °C 下储存待用。

### 1.3.2 薄膜的成型

将上述成膜溶液进行真空脱气，溶液倾注平板，在 65 °C 恒温鼓风干燥箱中烘 6 h，得到薄膜。制备好的薄膜放置在 23 °C、50% RH 的恒温恒湿条件下待测。以未改变 pH 值和温度的薄膜作为对照组。

### 1.3.3 成膜溶液褐变指数测定

根据 Morales 等<sup>[10]</sup>的方法稍作改动。将体积比 2:1 的 24%（质量分数）三氯乙酸和成膜溶液充分反应后在室温下进行离心（7 000 r/min，20 min），取上清液，在 420 nm 和 550 nm 处分别读取吸光度，褐变指数 OD 计算公式为：

$$OD = A_{420 \text{ nm}} - A_{550 \text{ nm}} \quad (1)$$

结果以稀释后样品的 OD/g 表示。

### 1.3.4 成膜溶液中游离氨基酸的测定

根据 Frank 等<sup>[11]</sup>的方法测定，并稍作改动。80 mg 邻苯二甲醛（OPA）溶于 2 mL 甲醇，加 5 mL 20%（质量分数）十二烷基磺酸钠（SDS），50 mL 0.1 mol/L 硼砂和 200  $\mu\text{L}$   $\beta$ - 巯基乙醇，得到 OPA 试剂。成膜溶液稀释 50 倍后取 300  $\mu\text{L}$  与 6 mL OPA 试剂混合均匀，在 35 °C 的水浴锅中放置 2 min，340 nm 下测吸光度，水与 OPA 试剂的混合液作空白。L- 亮氨酸为标准做标准曲线。

### 1.3.5 成膜溶液中还原糖的测定

根据韩美艳<sup>[12]</sup>的方法稍作改动。3.15 g 3,5- 二硝基水杨酸与 131 mL 2 mol/L NaOH 溶液加入 250 mL 含有 92.5 g 酒石酸钾钠的热水溶液中，加 2.5 g 苯酚与 2.5 g 亚硫酸钠，搅拌，冷却至室温，蒸馏水定容至 500 mL，得到 DNS 试剂。取成膜溶液 2 mL 与 1.5 mL DNS 试剂于比色管中混合均匀，沸水浴加热 5 min，取出后立刻放入冷水中冷却至室温，用蒸馏水定容至 25 mL，混匀。水与 DNS 试剂的混合液调 0，540 nm 下测得吸光度。0.1 mg/mL 的葡萄糖为标准做标准曲线。

### 1.3.6 薄膜的色度

利用色差仪对薄膜的色度进行测量。根据 Kchaou 等<sup>[4]</sup>的方法计算，利用下列公式分别计算色差（ $\Delta E$ ）和褐变指数（Browning index, BI）：

$$\Delta E = \sqrt{(L-L')^2 + (a-a')^2 + (b-b')^2} \quad (2)$$

$$z = \frac{a+1.75 \times L}{5.645 \times L + a - 3.012 \times b} \quad (3)$$

$$BI = \frac{100 \times (z - 0.31)}{0.172} \quad (4)$$

式中:

$L$ —薄膜亮度;

$a$ —薄膜红绿值;

$b$ —薄膜黄蓝值;

$L', a', b'$ —标准白板的色度值  $L' = 98.84, a' = 0.43, b' = 4.25$ 。

### 1.3.7 薄膜的光学性能

将薄膜裁剪成  $1 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$  的矩形, 利用紫外分光光度计在波长  $200 \sim 800 \text{ nm}$  范围内测量薄膜的透光率。

### 1.3.8 傅里叶红外光谱分析

使用傅里叶红外光谱仪对薄膜进行扫描, 扫描范围为  $600 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ , 频率为  $4 \text{ cm}^{-1}$ 。

### 1.3.9 薄膜的微观结构

通过扫描电子显微镜对薄膜的横截面进行观察, 在此之前需将薄膜样品浸泡在液氮中进行脆断, 然后将脆断后的样品垂直固定在贴有导电胶的横截面样品盘上, 接着进行喷金处理, 最后在  $5.0 \text{ kV}$  的加速电压下观察薄膜的微观结构。

### 1.3.10 薄膜的抗氧化性能

#### 1.3.10.1 DPPH 自由基清除活性

根据 Hela 等<sup>[13]</sup>的方法进行测定, 并稍作改动。将薄膜样品剪碎 ( $m = 20 \text{ mg}$ ), 浸泡于装有  $1000 \mu\text{L}$  去离子水、 $750 \mu\text{L}$   $99.5\%$  (体积分数) 无水乙醇和  $250 \mu\text{L}$   $0.02 \text{ mmol/L}$  DPPH 的  $99\%$  (体积分数) 乙醇溶液中, 避光  $24 \text{ h}$ 。在  $517 \text{ nm}$  下测量, 计算公式如下:

$$R = \frac{A_c - (A_s - A_b)}{A_c} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$R$ —DPPH 自由基清除率, %;

$A_c$ —DPPH 溶液吸光度;

$A_s$ —处理过的薄膜样品的吸光度;

$A_b$ —不添加 DPPH 溶液的薄膜样品的吸光度。

#### 1.3.10.2 还原能力

根据 Matmaroh 等<sup>[14]</sup>的方法稍作改动。称取  $10 \text{ mg}$  的薄膜样品, 将薄膜样品浸泡在  $0.5 \text{ mL}$  去离子水、 $1.25 \text{ mL}$   $0.2 \text{ mol/L}$  磷酸盐缓冲液和  $1.25 \text{ mL}$

$10 \text{ g}/100 \text{ mL}$  铁氰化钾混合溶液中, 然后在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  下水浴  $3 \text{ h}$ 。吸取  $1 \text{ mL}$  反应溶液与  $500 \mu\text{L}$   $10\%$  (质量分数) 三氯乙酸混合均匀, 然后离心 ( $3000 \text{ r/min}$ ,  $10 \text{ min}$ ),  $1.25 \text{ mL}$  去离子水、 $0.25 \text{ mL}$   $0.1 \text{ g}/100 \text{ mL}$  氯化铁再与  $1.25 \text{ mL}$  上清液混合, 反应  $10 \text{ min}$ ,  $700 \text{ nm}$  处测溶液吸光度。还原能力的大小与吸光度呈正相关。

### 1.3.11 热性能分析

使用差式扫描量热仪分析薄膜的热稳定性。称取薄膜样品约  $7 \text{ mg}$  置于铝坩锅中, 在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  与  $290 \text{ }^\circ\text{C}$  之间以  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度扫描。

### 1.3.12 薄膜的氧气透过率

利用 OX-TRAN 2/2H 型氧气透过率测试仪测定薄膜的氧气透过率, 选取无破损、无气泡的薄膜沿样品切割器进行切割, 测试面积为  $50 \text{ cm}^2$ , 在样品盘边缘均匀涂抹中温真空润滑脂, 保持薄膜四周密封, 盖上样品盘的盖子, 放入测试腔中, 在恒定温度和湿度 ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $65\% \text{ RH}$ ) 下测定薄膜的氧气透过率。

### 1.3.13 薄膜的水蒸气透过率

利用 W-D-31D 水蒸气透过率测试仪测定薄膜的水蒸气透过率, 选取无破损、无气泡的薄膜用样品切割器将薄膜裁剪成  $33 \text{ cm}^2$  大小的圆片, 固定在盛有适量蒸馏水的样品杯中, 然后放置于测试腔内测定薄膜的水蒸气透过率, 温度为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 相对湿度为  $90\% \text{ RH}$ 。

### 1.3.14 薄膜的机械性能

将薄膜样品裁剪为  $15 \text{ mm} \times 70 \text{ mm}$  的矩形, 初始距离为  $50 \text{ mm}$ , 速度为  $50 \text{ mm/min}$ , 使用电子拉力试验机测定薄膜的抗拉强度及断裂伸长率。

### 1.3.15 椰子油的加速包装保藏实验

通过对薄膜的性能的测定, 选取性能较好的 pH 值  $9.0$ 、 $10.0$  和  $11.0$  等三种薄膜用于保藏实验。裁剪尺寸相同的三种薄膜用热封机预制成袋, 每袋封入  $10 \text{ mL}$  椰子油。采用加速实验, 利用高温加速椰子油的氧化过程, 将其置于  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  的恒温培养箱内  $0$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $12$ 、 $16$ 、 $20 \text{ d}$ , 分别测定椰子油的酸价与过氧化值。具体实验方法参照 GB 5009.229-2016《食品安全国家标准 食品中酸价的测定》与 GB 5009.227-2016《食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定》。未被封装的椰子油作空白组。

### 1.3.16 统计分析

采用了 SPSS 22.0 软件进行方差分析 (ANOVA), 分析各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。收集的数据以平均值  $\pm$  标准差 (SD) 表示, 并均使用 Origin 2018 绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同 pH 值对成膜溶液褐变程度的影响

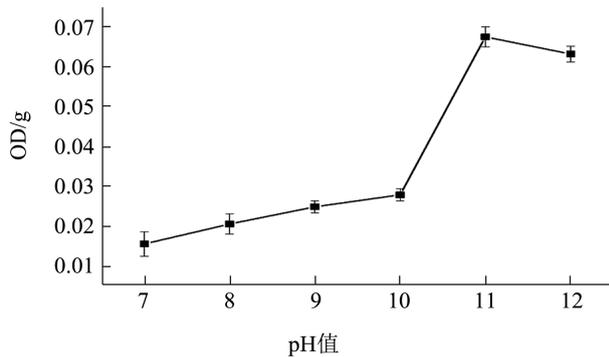


图 2 不同 pH 值下成膜样品溶液的褐变程度

Fig.2 Browning degree of the film-forming sample solution at different pH values

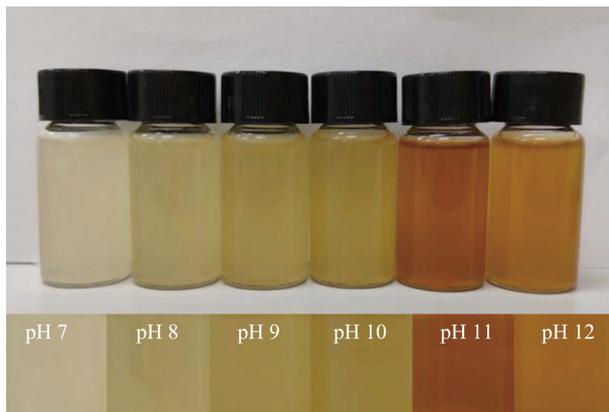


图 3 不同 pH 值下成膜溶液的外观变化

Fig. 3 Appearance changes of film forming solution at different pH values

为了消除样品本身的浊度对褐变指数的影响, 采用利用 420 nm 处的吸光度值减去 550 nm 处的吸光度值得到样品的褐变程度<sup>[10,15]</sup>。从图 2 中可以发现在 pH 值 7.0~11.0 范围内, 样品溶液的褐变程度与 pH 值正相关, 并在 pH 值 11.0 时褐变达到最大, 增幅明显提升, 这是由于 pH 值对  $\alpha$ -氨基酸的完全去质子化具有强烈的影响, 较高的 pH 值增

加了美拉德反应的初始缩合步骤, 加速了糖与氨基酸之间的羰氨反应<sup>[16]</sup>。pH 值 12.0 处褐变程度出现了下降的趋势, 可能是由于缺乏足够的氢离子催化 Amadori 重排<sup>[17]</sup>, 降低了美拉德反应的程度。图 3 可以直观地观察到样品溶液的变化, 并且与图 2 曲线趋势一致。

### 2.2 成膜溶液中游离氨基酸的变化值

为了判别羰氨反应 (美拉德反应) 的程度, 分别研究了 pH 值调整前后、90 °C 加热前后, 成膜溶液中游离氨基酸含量和还原糖含量的变化, 其中, 游离氨基酸来自于成膜溶液中的 WPI-NaCas 组分, 游离还原糖来自于 PUL, 两者变化量 (反应消耗量) 越大, 说明参与美拉德反应的羰基、氨基基团量越多, 反应程度越高。

图 4 结果表明, pH 值处理和热处理均对游离氨基酸的含量变化产生显著影响, 加热前, 随着 pH 值的提高, 游离氨基酸含量逐渐减少, 表明常温下微弱的美拉德反应随着 pH 值的增大而愈发剧烈; 经过 90 °C 的水浴加热后, 溶液中游离氨基酸的含量急剧下降, 表明与单一的热处理相比, pH 值处理与热处理的协同作用促进了蛋白与多糖之间的相互作用, 显著加速了羰氨反应。未加热时, pH 值 7.0~12.0 时游离氨基酸的含量分别比 WPI-NaCas 中游离氨基酸的含量降低了 14.10%、17.96%、17.02%、19.21%、23.27%、29.98%; 经过 90 °C 水浴加热后则分别降低了 33.42%、37.79%、36.23%、40.91%、62.16%、69.81%, 且 pH 值 12.0 时氨基酸的减少量明显比 pH 值 11.0 时放缓, 美拉德反应速度随之趋缓。

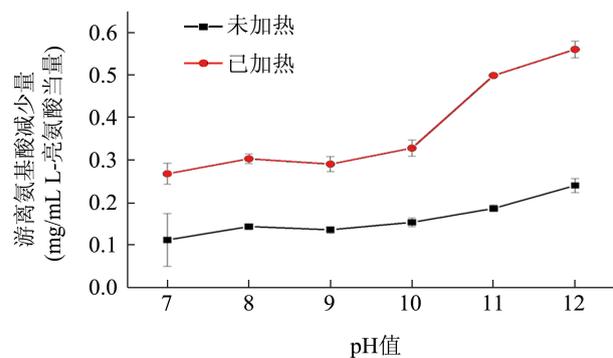


图 4 不同 pH 值下成膜溶液中游离氨基酸的变化量

Fig.4 Changes of free amino acids in film forming solution at different pH values

### 2.3 成膜溶液中还原糖含量的变化值

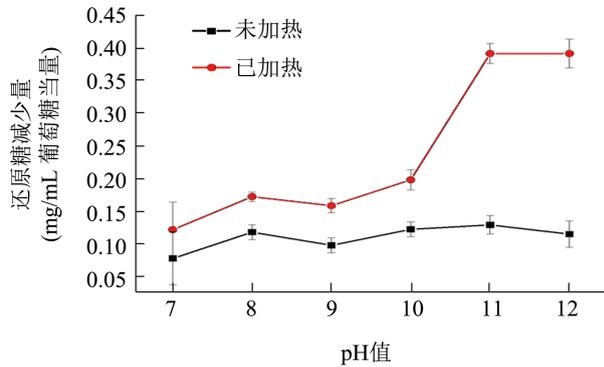


图5 不同pH值下成膜溶液中还原糖的变化量

Fig.5 Changes of reducing sugars in film forming solutions at different pH values

由图5可知,与氨基酸含量变化的结果相似,pH值调整与加热处理,都导致了还原糖的含量降低,说明在25℃与90℃的水浴加热下均发生了不同程度的美拉德反应。pH值7.0~12.0下未加热的成膜溶液,其还原糖的含量分别下降了6.06%、9.15%、7.60%、9.49%、10.02%、8.92%;加热后下降了9.45%、13.33%、12.28%、15.32%、30.20%、30.20%。对于还原糖的消耗,焦糖化反应也是因素之一,当有糖类存在时,160℃以上的高温下会导致焦糖化反应的发生,由于本实验的加热温度远低于160℃,因而忽略焦糖化反应的影响。此外,pH值12.0处还原糖的减少量出现降低趋势,这可能是蛋白质的

变性导致游离氨基酸含量的减少,从而缺乏足够的游离氨基酸与还原糖发生美拉德反应,这一点在傅里叶红外光谱分析中也有所验证。

### 2.4 复合薄膜的色差和褐变指数

由表1可知 $\Delta E$ 和BI均随pH值的增大而提高,并在pH值11.0时达到峰值。和对照组的薄膜相比 $\Delta E$ 和BI分别提升了1.48~7.61倍和0.60~33.89倍。 $\Delta E$ 和BI的变化代表着美拉德反应的程度,这与成膜溶液的褐变程度正相关。随着pH值的增大,BI与OD值都随之增大,并都在pH值11.0时达到最大。当pH值为12.0时,又都呈下降的趋势,分别相较于pH值为11.0时的BI和OD值下降21.25%和7.14%。BI的变化与表1薄膜外观变化一致。此外,尽管薄膜的颜色越来越深,但依然保持透明。

### 2.5 光学性能

随着pH值的上升,薄膜的透光率不断下降,并在pH值11.0时达到最低值(图6),这与 $\Delta E$ 和BI的变化相吻合,随着美拉德反应的加剧,薄膜的颜色随之变深,其避光能力也随之增强。pH值11.0与pH值12.0改性薄膜可以阻挡300nm以下的紫外光,高于其他pH值下的薄膜,主要是由于薄膜褐变程度增强所致。包装材料阻挡紫外线的性能有助于防止脂质氧化,延长食品保质期<sup>[18]</sup>。

表1 不同pH值下WPI-NaCas-PUL薄膜的色差及褐变指数

Table 1 Color difference and browning index of WPI-NaCas-PUL films at different pH values

pH值	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Delta E$	BI	外观图片
对照组	91.62±0.37 <sup>a</sup>	0.36±0.07 <sup>a</sup>	7.85±0.25 <sup>c</sup>	4.25±0.39 <sup>c</sup>	8.94±0.27 <sup>c</sup>	
7	91.51±0.24 <sup>a</sup>	0.64±0.09 <sup>a</sup>	9.04±0.57 <sup>c</sup>	14.31±3.35 <sup>d</sup>	10.54±0.63 <sup>c</sup>	
8	91.06±0.08 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>a</sup>	9.88±0.68 <sup>c</sup>	19.87±3.87 <sup>d</sup>	11.57±0.8 <sup>dc</sup>	
9	90.33±0.24 <sup>b</sup>	0.39±0.09 <sup>a</sup>	11.98±0.67 <sup>d</sup>	36.23±5.96 <sup>d</sup>	14.06±0.79 <sup>d</sup>	
10	89.22±0.29 <sup>c</sup>	-0.24±0.1 <sup>b</sup>	17.73±0.59 <sup>c</sup>	101.9±8.98 <sup>c</sup>	21.19±0.77 <sup>c</sup>	
11	86.98±0.69 <sup>d</sup>	-1.22±0.49 <sup>c</sup>	28.15±1.84 <sup>a</sup>	311.86±48.1 <sup>a</sup>	36.58±3.35 <sup>a</sup>	
12	88.55±0.46 <sup>c</sup>	-0.57±0.11 <sup>b</sup>	23.2±0.21 <sup>b</sup>	194.15±6.24 <sup>b</sup>	28.81±0.57 <sup>b</sup>	

注:同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异( $P < 0.05$ )。

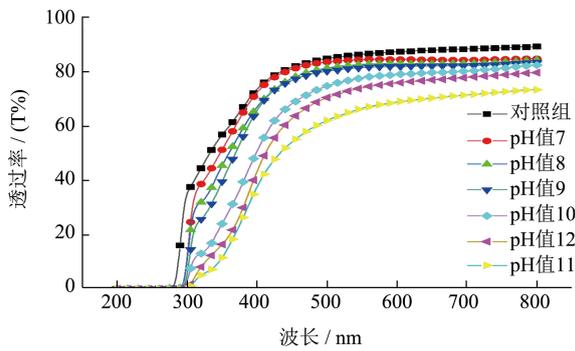


图6 WPI-NaCas-PUL 薄膜在不同 pH 值处理条件下的透光率

Fig.6 Light transmittance of WPI-NaCas-PUL films under different pH value treatment conditions

## 2.6 傅里叶红外光谱分析

如图7所示, 蛋白质的主要光谱特征是酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 带, 分别位于  $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  (C=O 拉伸振动),  $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$  (C-N 拉伸振动和 N-H 弯曲振动) 和  $1330\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  之间<sup>[19]</sup>。从表2中可以看出, 随着 pH 值的增加  $\alpha$ -螺旋结构显著减少, 分别比对照组降低了 38.64%、39.44%、34.41%、44.44%、45.15%、43.61%, 并在 pH 值 11.0 时为最低, pH 值 7.0~9.0 时  $\alpha$ -螺旋结构含量较高, 可能是 pH 值离蛋白质等电点较近, 发生变性较少, 为交联提供的反应位点少<sup>[5]</sup>。而  $\beta$ -折叠结构则呈现上升的趋势, 与对照组相比, 随着 pH 值的提高分别上升了 17.89%、18.06%、17.40%、20.55%、20.75%、15.76 倍。这两处变化表明在美拉德反应作用下, 蛋白质的二级结构发生了变化, 且受 pH 值的影响明显。pH 值 12.0 处  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠结构均出现了与 pH 值 7.0~11.0 处趋势相反的结果,  $\alpha$ -螺旋结构含量的升高, 导致交联位点少, 这可能是导致 pH 值 12.0 处美拉德反应程度降低和还原糖减少量降低的原因之一。

$1180\sim 953\text{ cm}^{-1}$  处出现了一系列的吸收峰, 这些峰的出现与碳水化合物有关, 是由于 C-C 键和 C-O 键的伸缩振动以及 C-H 键的弯曲振动引起的<sup>[20]</sup>。在  $1100\sim 1000\text{ cm}^{-1}$  处可以观察到, 随着 pH 值的增大, 该处峰幅度逐渐变宽, 并且在 pH 值 11.0 处最宽, 这可能与 pH 值对美拉德反应扩展的影响有关<sup>[5]</sup>, pH 值的增大延伸了美拉德反应的范围, 说明 pH 值的提高能加剧美拉德反应的发生。

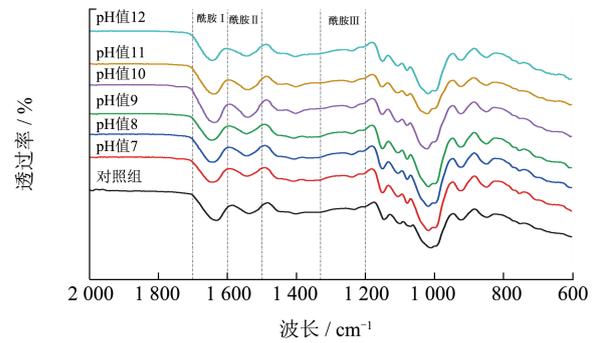


图7 不同 pH 值处理条件下薄膜的 FT-IR 光谱

Fig.7 FT-IR spectra of thin films under different pH value conditions

表2 酰胺 I 带蛋白质二级结构的变化

Table 2 Secondary structure changes of amide I band proteins

pH 值	$\alpha$ -螺旋/%	$\beta$ -折叠/%	$\beta$ -转角/%	无规则卷曲/%
对照组	45.31	1.20	16.36	37.12
7	27.80	22.67	13.01	36.52
8	27.44	22.87	15.55	34.13
9	28.15	22.08	14.25	35.51
10	25.17	25.86	12.79	36.17
11	24.85	26.10	14.54	34.52
12	25.55	20.11	17.48	36.85

## 2.7 微观结构

图8所示, 与对照组相比, 经美拉德反应改性薄膜的结构更加光滑紧密, 这是由于在美拉德反应过程中, 蛋白与糖产生了交联, 交联程度较高的薄膜呈现出更为光滑致密、空隙较少的状态<sup>[21]</sup>。随着 pH 值的增大, 薄膜光滑紧密度提高, 在 pH 值 11.0 时最显著, 即 pH 值 11.0 时薄膜的交联度达到最大。在 pH 值 12.0 时, 薄膜变得粗糙, 可能是蛋白质提供的交联位点变少, 以及缺少足够的氢离子催化 Amadori 重排, 抑制了美拉德反应的进一步发生。

## 2.8 抗氧化能力

### 2.8.1 DPPH 自由基清除能力

由图9可知, 薄膜 DPPH 自由基清除能力在美拉德改性作用下明显增强, 提升了 1.22~2.24 倍, 并且随 pH 值的增大而升高, 表现较好的是 pH 值 11.0 和 pH 值 12.0 处理的薄膜, 分别达到 95.07% 和 87.93%, 比 pH 值 7.0 时分别提升了 46.10% 和 35.19%。这表明美拉德反应产物本身为良好的抗氧

化剂, 并且受 pH 值的影响十分显著。自由基清除能力与 BI 的变化呈正相关, 证明了薄膜的抗氧化活性与成膜溶液和薄膜的褐变程度都密切正相关。Lotfy 等<sup>[22]</sup>也发现抗氧化活性随着颜色强度的增加而提高。

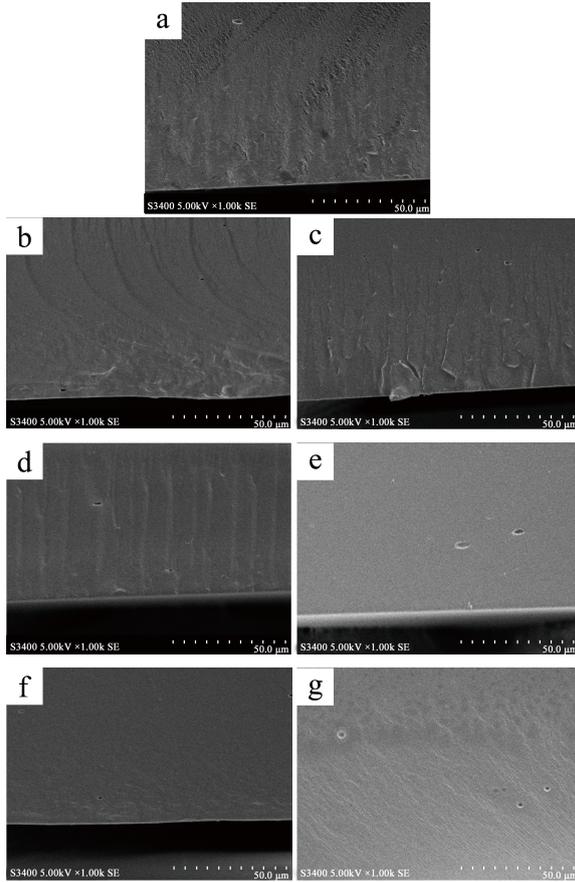


图 8 不同 pH 值处理条件下薄膜的微观结构

Fig.8 Microstructure of thin films under different pH value treatment conditions

注:(a) 对照组;(b)pH 值 7;(c)pH 值 8;(d)pH 值 9;(e) pH 值 10;(f) pH 值 11;(g) pH 值 12。

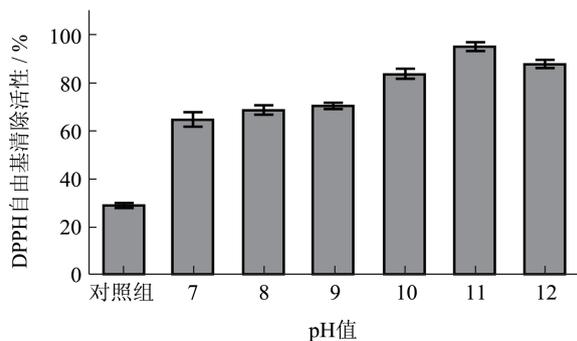


图 9 不同 pH 值处理条件下薄膜的 DPPH 自由基清除能力

Fig.9 DPPH free radical scavenging ability of thin films under different pH value treatment conditions

### 2.8.2 还原力

与薄膜的 DPPH 清除能力相似, 薄膜的还原力受美拉德反应的影响同样十分显著, 与对照组相比提升了 1.60~4.63 倍。并在 pH 值 11.0 和 pH 值 12.0 时表现较好, 分别比 pH 值 7.0 时提高了 116.67% 和 100.48% (图 10)。这说明 WPI-NaCas-PUL 混合物在发生美拉德反应的过程中形成了具有抗氧化活性的还原性化合物。还原力与 DPPH 自由基清除能力都有效地反映了薄膜的抗氧化活性, 并且趋势一致, 都与薄膜的褐变程度正相关。因此, pH 值是决定美拉德反应产物抗氧化活性的重要可控因素, 可以将其应用在基于美拉德反应的蛋白质-多糖成膜体系中, 通过调节 pH 值来提升薄膜的抗氧化活性。

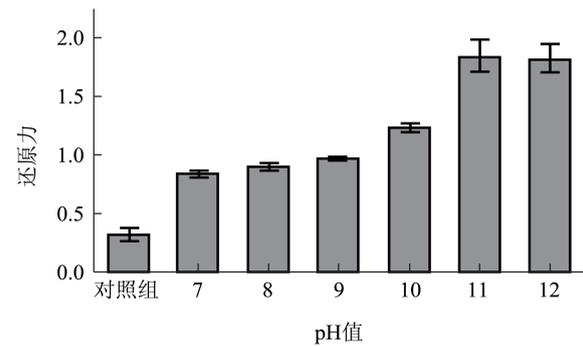


图 10 不同 pH 值处理条件下薄膜的还原力

Fig.10 Reducing power of films under different pH value treatment conditions

### 2.9 热稳定性分析

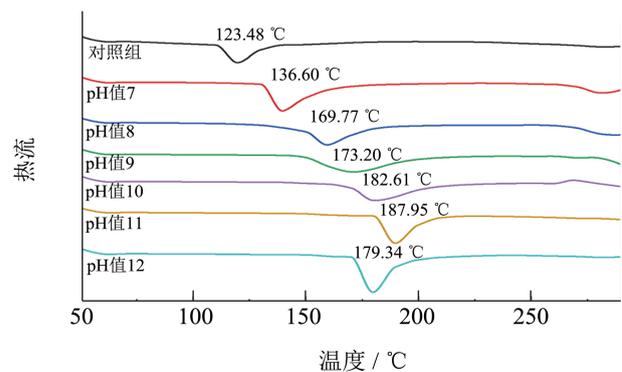


图 11 不同 pH 值处理条件下薄膜 DSC 热分析图

Fig.11 DSC thermal analysis of thin films under different pH value conditions

图 11 可以观察到, 由于美拉德反应的发生, 薄膜的热稳定性显著升高, 并随着 pH 值的增大而增强, 且在 pH 值 11.0 时, 薄膜的粘流温度 ( $T_m$ ) 高

达 187.95 °C，其热稳定性显著提高，这是由于共轭多糖的亲水性和空间相互作用阻止或减缓了非吸附蛋白质的热诱导聚集<sup>[23]</sup>，从而促进了美拉德反应的发生。pH 值 12.0 下的薄膜  $T_m$  出现了下降趋势，这是由于缺乏足够的氢离子催化 Amadori 重排，以及蛋白质上的交联位点较少，降低了美拉德反应程度，多糖与蛋白质分子之间的交联较弱，交联聚合物较少，线性聚合物较多，从而导致  $T_m$  降低。由此说明成膜溶液的碱性化处理，可显著提高薄膜的耐热性和热稳定性，表现为  $T_m$  向更大的值偏移。这是由于 pH 值的升高促进了美拉德反应，增强了分子之间的交联度。交联度的增加有助于  $T_m$  的增高，Sumit 等<sup>[24]</sup>也发现交联度较低、结构较疏松或结晶度较低的复合材料，其  $T_m$  较低。

## 2.10 阻隔性能

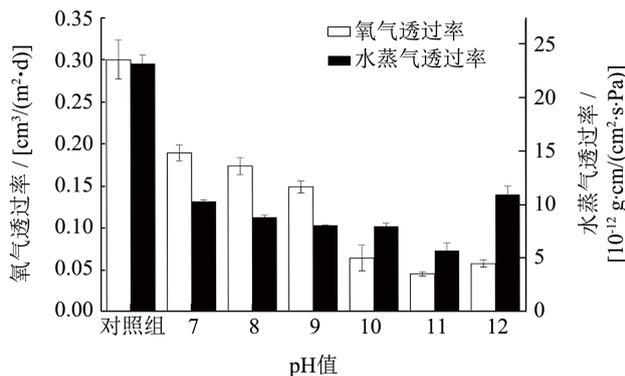


图 12 不同 pH 值处理条件下薄膜的阻隔性能变化

Fig.12 Changes of barrier properties of the films under different pH value treatment conditions

图 12 显示，美拉德 pH 值改性的薄膜氧气透过率、水蒸气透过率相较于对照组，分别降低了 37.01%~85.06%、53.02%~75.50%，显著提高了薄膜的阻隔性能。pH 值 11.0 处理的薄膜，阻氧性能最强，其透氧率较 pH 值 7.0 薄膜降低了 76.29%。产生这一现象的根本原因是 WPI-NaCas-PUL 因 pH 值的增大，削弱了其凝胶化作用对游离氨基酸和还原糖的阻隔作用，促进了美拉德反应的进行，形成了更多的交联聚合物，从而使薄膜的结构更致密（图 8），阻氧性更强。薄膜的水蒸气透过率在 pH 值 7.0~11.0 范围均随着 pH 值的升高而降低。这也进一步证明了随着 pH 值的增大，美拉德反应更加剧烈，WPI-NaCas-PUL 的交联更加紧密，从而提高了阻水性。但在 pH 值 12.0 时薄膜的水蒸气透过率比 pH 值 7.0 下的薄膜增大了 5.82%，可能是 pH 值 12.0 时，未

与蛋白质发生美拉德反应的多余的多糖，其结构中含有大量的亲水性羟基，增强了吸湿性，提高了水蒸气透过率<sup>[25]</sup>。

## 2.11 机械性能

图 13 所示，抗拉强度与断裂伸长率由于美拉德反应的发生而增强，相较于对照组最大分别提高了 2.43 倍和 4.32 倍。薄膜的抗拉强度在 pH 值 11.0 时达到最大，为 3.61 MPa，比 pH 值 7.0 时的薄膜提高了 44.53%，同时断裂伸长率也随着 pH 值的增加而增大，抗拉强度和断裂伸长率的增大归因于 WPI-NaCas-PUL 之间的分子交缠和交联密度，从而形成更紧密的结构，具有更好的抗拉强度和优越的柔韧性<sup>[26-28]</sup>。与 DSC 结果相似，抗拉强度与  $T_m$  均随着 pH 值的增加而增高，并在 pH 值 12.0 时减弱，这也进一步证明了，pH 值的增大会促进美拉德反应的进行使薄膜出现更紧密的结构，与图 8 中微观结构的变化一致。而 pH 值 12.0 下薄膜的抗拉强度突然降低，较 pH 值 11.0 薄膜显著降低了 83.03%，这可能与导致  $T_m$  降低的原因相似，同时在强碱的作用下蛋白质结构得到充分舒展，促进了蛋白质-蛋白质相互作用，部分未与多糖反应的蛋白质聚集，而 PUL 本身不能形成凝胶<sup>[29]</sup>，内部只形成了蛋白质凝胶，从而增强了薄膜的弹性，但凝胶结构较弱降低了硬度。

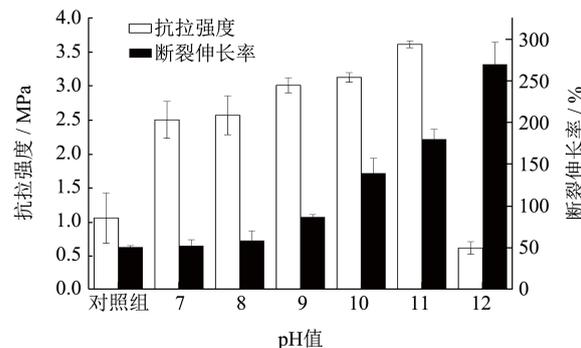


图 13 不同 pH 值处理条件下薄膜的机械性能变化

Fig.13 Changes of mechanical properties of the films under different pH value treatment conditions

## 2.12 椰子油的包装保藏性

### 2.12.1 酸价

酸价通过对油脂脂肪酸中游离羧基团数量的计量标准，来衡量脂肪水解酸败的程度，酸价越低油脂的质量越好<sup>[30]</sup>。从图 14 中可以看出，在 50 °C 的保藏加速实验中，椰子油初始酸价为 0.15 mg/g，

在第 20 天时, 空白组、pH 值 9.0、10.0、11.0 改性复合薄膜包装的椰子油, 酸价分别达到 0.40、0.34、0.32、0.27 mg/g。pH 值 9.0、10.0、11.0 改性复合薄膜包装的椰子油第 20 天的酸价分别较空白组降低了 15.66%、20.34%、32.48%, 这是由于经 pH 值改性的薄膜, 其阻氧性能、阻湿性能和避光性能得以显著提高 (图 12、表 1), 有效地抑制了外界环境中氧气、水蒸气和光对椰子油的氧化酸败作用。并且, 与阻隔性能相对应的是, 采用 pH 值 11.0 改性复合薄膜包装的椰子油, 其酸价的增速显著放缓, 包装贮藏效果更具优势。

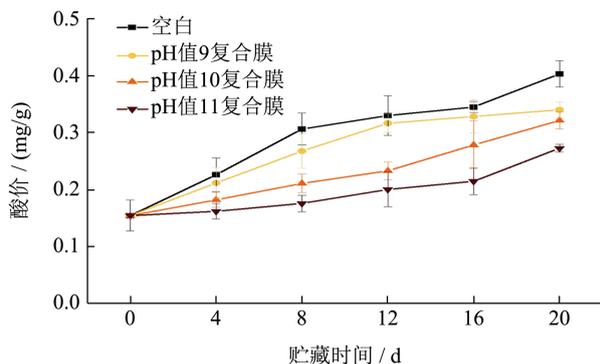


图 14 50 °C 贮藏条件下不同薄膜包装的椰子油的酸价变化

Fig.14 Changes in acid value of coconut oil packaged with different films under 50 °C storage conditions

### 2.12.2 过氧化值

过氧化值表示油脂和脂肪酸等被氧化的程度, 可判断油脂的变质程度, 过氧化值越高油脂越不新鲜, 在 GB 2716-2018 中<sup>[31]</sup>规定食用植物油的过氧化值不能超过 0.25 g/100 g。在加速实验的第 20 天, 空白组样品的过氧化值明显超过了国标的规定范围, 达到了 0.30 g/100 g, 而采用 pH 值 9.0、10.0、11.0 改性复合薄膜包装的椰子油, 第 20 天的过氧化值分别为 0.24、0.19、0.12 g/100 g, 均低于 0.25 g/100 g (图 15)。pH 值 9.0、10.0、11.0 改性复合薄膜包装的椰子油第 20 天的过氧化值分别较空白降低了 19.43%、34.74%、60.19%。pH 值改性复合薄膜对椰子油过氧化值的影响作用明显强于酸价, 这主要得益于薄膜较高的抗氧化活性和还原力 (图 10、图 11)。综上所述, pH 值改性复合薄膜可有效用于椰子油的包装中, 从薄膜的性能方面综合考虑, pH 值 11.0 处理的复合薄膜, 其保藏性更高。

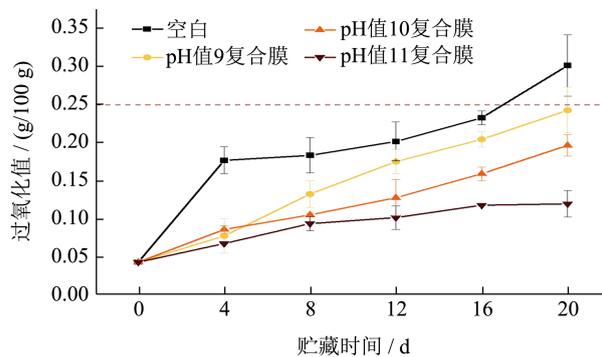


图 15 50 °C 贮藏条件下不同薄膜包装的椰子油的过氧化值变化

Fig.15 Changes of peroxide value of coconut oil packaged with different films under 50 °C storage conditions

## 3 结论

本实验研究了碱性 pH 值处理对 WPI-NaCas-PUL 成膜溶液美拉德反应程度及复合膜性能的影响, 发现提高成膜溶液的 pH 值, 能够削弱基质凝胶化作用对游离氨基和还原糖的阻隔, 增强成膜溶液的羰氨反应程度, 从而提高薄膜的阻隔性、热稳定性和抗氧化等性能。研究还发现 pH 值 11.0 对 WPI-NaCas-PUL 美拉德改性薄膜的交联度提升作用最为显著, 其溶液和薄膜的褐变程度达到峰值, 薄膜的机械性能、阻隔性能和抗氧化活性也都显著优于其他薄膜。

因其较高的阻隔性能和抗氧化活性, 在包装保藏应用中, 能够显著降低椰子油的氧化酸败作用, 有效延长椰子油的货架期。因此, pH 值诱发美拉德改性开发制备的复合薄膜有望用于食用油的内包装, 不仅能够提升油品, 还兼具绿色环保的功能。

## 参考文献

- [1] ZHANG W, AZIZI-LALABADI M, ROY S, et al. Maillard-reaction (glycation) of biopolymeric packaging films; principles, mechanisms, food applications [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 523-538.
- [2] CUI H, YU J, ZHAI Y, et al. Formation and fate of Amadori rearrangement products in Maillard reaction [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 115: 391-408.
- [3] HAN K, LIU Y, LIU Y, et al. Characterization and film-forming mechanism of egg white/pullulan blend film [J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126201.

- [4] KCHAOU H, BENBETTAIEB N, JRIDI M, et al. Influence of Maillard reaction and temperature on functional, structure and bioactive properties of fish gelatin films [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105-196.
- [5] ETXABIDE A, URDANPILLETA M, GÓMEZ-ARRIARAN I, et al. Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2017, 117: 140-146.
- [6] BOYE J I, ALLI I, ISMAIL A A, et al. Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation [J]. *International Dairy Journal*, 1995, 5(4): 337-353.
- [7] NOOSHKAM M, VARIDI M, BASHASH M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems [J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 644-660.
- [8] 吴浩.WPI-NaCas-PUL复合薄膜的美拉德交联改性研究及蛋白-纸基复合材料的开发和应用[D].上海:上海海洋大学,2022.
- [9] 郗梓含,雷桥,高文婧,等.美拉德交联对乳清分离蛋白-酪蛋白酸钠-普鲁兰多糖薄膜阻隔性及抗氧化性的改性研究[J].*食品与发酵工业*,2020,46(14):70-76.
- [10] MORALES F J, BOEKEL M A J S V. A study on advanced maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation [J]. *International Dairy Journal*, 1998, 11: 675-683.
- [11] FRANK C, HAROLD E, DAVID H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins [J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(6): 1219-1227.
- [12] 韩美艳.桔梗多糖的提取、分离纯化和结构研究[D].郑州:郑州大学,2010.
- [13] HELA K, NASREDDINE B, MOURAD J, et al. Enhancement of structural, functional and antioxidant properties of fish gelatin films using Maillard reactions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 326-339.
- [14] MATMAROH K, BENJAKUL S, TANAKA M. Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose-glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase [J]. *Food Chemistry*, 2006, 98(1): 1-8.
- [15] PALOMBO R, GERTLER A, SAGUY I. A simplified method for determination of browning in dairy powders [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 49(6): 1609-1609.
- [16] AJANDOUZ E H, PUIGSERVER A. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1999, 47(5): 1786-1793.
- [17] WANG W Q, SHENG H B, ZHOU J Y, et al. The effect of a variable initial pH on the structure and rheological properties of whey protein and monosaccharide gelation via the Maillard reaction [J]. *International Dairy Journal*, 2021, 113: 104896.
- [18] KANATT S R, RAO M S, CHAWLA S P, et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 29(2): 290-297.
- [19] CHANG M C, TANAKA J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(24): 4811-4818.
- [20] WANG W Q, BAO Y H, CHEN Y. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 355-361.
- [21] ZAREIE Z, YAZDI F T, MORTAZAVI S A J C P. Development and characterization of antioxidant and antimicrobial edible films based on chitosan and gamma-aminobutyric acid-rich fermented soy protein [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 244(4): 116491.
- [22] LOTFY S N, SAAD R, EL-MASSREY K F, et al. Effects of pH on headspace volatiles and properties of Maillard reaction products derived from enzymatically hydrolyzed quinoa protein-xylose model system [J]. *LWT*, 2021, 145: 111328.
- [23] KAN X, CHEN G, ZHOU W, et al. Application of protein-polysaccharide Maillard conjugates as emulsifiers: Source, preparation and functional properties [J]. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 2021, 150: 110740.
- [24] LAL S S, MHASKE S T. TEMPO-oxidized cellulose nanofiber/kafirin protein thin film crosslinked by Maillard reaction [J]. *Cellulose*, 2019, 26: 6099-6118.
- [25] LONG J, ZHANG W, ZHAO M, et al. The reduce of water vapor permeability of polysaccharide-based films in food packaging: A comprehensive review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 321: 121267.
- [26] KCHAOU H, BENBETTAIEB N, JRIDI M, et al. Enhancement of structural, functional and antioxidant properties of fish gelatin films using Maillard reactions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 326-339.
- [27] SAMIRA S, TAN T C, AZHAR M E. Effect of ribose-induced Maillard reaction on physical and mechanical properties of bovine gelatin films prepared by oven drying [J]. *International Food Research Journal*, 2014, 21(1): 269-276.
- [28] AFFES S, NASRI R, LI S, et al. Effect of glucose-induced Maillard reaction on physical, structural and antioxidant properties of chitosan derivatives-based films [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 255: 117341.
- [29] FARRIS S, UNALAN I U, INTROZZI L, et al. Pullulan - based films and coatings for food packaging: present applications, emerging opportunities, and future challenges [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014, 131(13): 40539.
- [30] 易志,吴雪辉,沈冰,等.温度及光照对亚麻籽油贮藏稳定性影响研究[J].*粮食与油脂*,2016,29(6):17-21.
- [31] GB 2716-2018,食品安全国家标准 植物油[S].