

抗菌肽 Piscidin 1 PG/聚乳酸电纺纳米纤维膜的制备及其对海鲈鱼的保鲜作用

徐宇辰¹, 励建荣¹, 李婷婷², 谢晶³, 劳敏军⁴, 王轰⁵, 郭晓华⁶

(1.渤海大学食品科学与工程学院, 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁锦州 121013) (2.大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600) (3.上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(4.浙江兴业集团有限公司, 浙江舟山 316120) (5.蓬莱京鲁渔业有限公司, 山东烟台 265600)

(6.山东美佳集团有限公司, 山东日照 276800)

摘要: 本研究使用静电纺丝法制备了 Piscidin 1 PG/聚乳酸 (Pis-1 PG/PLA) 纳米纤维膜, 并对纤维膜形态、拉伸强度、结构、热性能、力学性能以及对腐败希瓦氏菌生长的影响进行了研究。最后用 Pis-1 PG/PLA 纤维膜包裹海鲈鱼鱼肉, 通过测定 4 °C 冷藏 15 d 内菌落总数、pH、挥发性盐基氮 (TVB-N) 等指标研究膜的保鲜效果。结果表明: Pis-1 PG/PLA 纳米纤维呈线状, 结构光滑有序; Pis-1 PG 的加入使得 Pis-1 PG/PLA 纤维膜纤维平均直径下降至 225 nm, 纤维膜拉伸强度提升至 2.70 MPa, 结晶度降低; 红外光谱显示 Pis-1 PG 的加入对 PLA 的结构没有影响; 体外抑菌实验显示 Pis-1 PG/PLA 纤维膜在 6 h 内会抑制腐败希瓦氏菌的生长并有持续抑菌的效果, 抑菌效果显著 ($p < 0.05$); 在 4 °C 贮藏 6 d 后, Pis-1 PG/PLA 纤维膜处理鱼肉的菌落总数低于空白组 2.02~3.23 lg(cfu/mL), 进而有效抑制鱼体 pH 值和 TVB-N 含量的升高, 能延长海鲈鱼鱼肉冷藏期 3 d 以上。综上所述 Pis-1 PG 成功负载到了 PLA 纤维膜中; Pis-1 PG/PLA 纤维膜对海鲈鱼鱼肉有保鲜效果, 在水产品保鲜和食品包装等方面具有应用潜力。

关键词: 抗菌肽 Piscidin 1 PG; 聚乳酸; 静电纺丝; 保鲜; 海鲈鱼;

文章编号: 1673-9078(2021)04-102-109

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0662

Preparation of Antimicrobial Peptide Piscidin 1 PG/ Polylactic Acid

Electrospun Nanofiber Membrane and Its Preservation Effect on Sea Bass

XU Yu-chen¹, LI Jian-rong¹, LI Ting-ting², XIE Jing³, LAO Min-jun⁴, WANG Hong⁵, GUO Xiao-hua⁶

(1.College of Food Science and Engineering, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China)

(2.College of Life Sciences, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China) (3.College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China) (4.Zhejiang Xingye Industrial Group Co. Ltd., Zhoushan 316120, China)

(5.Penglai Jinglu Fishery Co. Ltd., Yantai 265600, China) (6.Shandong Meijia Group Co. Ltd., Rizhao 276800, China)

Abstract: In this study, Piscidin 1 PG/polylactic acid (Pis-1 PG/PLA) nanofiber membrane was prepared by an electrospinning method. The morphology, tensile strength, structure, thermal properties and mechanical properties of the nanofiber membrane as well as the growth of *Shewanella putrefaciens* were investigated. Finally, the sea bass meat was wrapped with Pis-1 PG/PLA fiber membrane, and the preservation effect was investigated. The results showed that the Pis-1 PG/PLA nanofiber membrane had a linear structure and smooth surface. The addition of Pis-1 PG made the average diameter of the Pis-1 PG/PLA fiber membrane fibers decrease to 225 nm, the tensile strength of the fiber membrane increased to 2.70 MPa, and the crystallinity decreased. The infrared spectrum showed that the addition of Pis-1 PG had no effect on the structure of PLA. The in vitro antibacterial experiment showed that the Pis-1 PG/PLA fiber membrane could inhibit the growth of *Shewanella putrefaciens* within 6 h and had a continuous antibacterial effect. The antibacterial effect was significant ($p < 0.05$). After 6 d of storage at 4 °C, the bacterial load of sea bass meat wrapped with Pis-1 PG/PLA fiber membrane was lower than that of the blank group (2.02~3.23 lg(cfu/mL)), which effectively inhibited the increase of pH value and TVB-N content of sea bass meat, and could extend the refrigeration period of sea bass meat for more than 3 d. In conclusion, Pis-1 PG was successfully loaded onto the PLA fiber membrane; Pis-1 PG/PLA fiber membrane has a preservation effect on sea bass meat, and has application potential in aquatic product preservation and food packaging.

引文格式:

徐宇辰, 励建荣, 李婷婷, 等. 抗菌肽 Piscidin 1 PG/聚乳酸电纺纳米纤维膜的制备及其对海鲈鱼的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4):102-109

XU Yu-chen, LI Jian-rong, LI Ting-ting, et al. Preparation of antimicrobial peptide piscidin 1 PG/ polylactic acid electrospun nanofiber membrane and its preservation effect on sea bass [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 102-109

收稿日期: 2020-07-15

基金项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新重点专项 (2018YFD0400601; 2019YFD0901702); 国家自然科学基金项目 (3130572)

作者简介: 徐宇辰 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全控制

通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全控制; 共同通讯作者: 李婷婷 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产品贮藏加工及质量安全控制

effect of the membrane was studied through measuring the total number of colonies, pH and total volatile basic nitrogen (TVB-N) during 15 days of cold storage at 4 °C. The results showed that Pis-1 PG/PLA nanofibers were linear with a smooth and disordered structure; the addition of Pis-1 PG decreased the average diameter of Pis-1 PG/PLA fiber membrane to 225 nm, increased the tensile strength of the fiber membrane to 2.70 MPa, and decreased the crystallinity. IR spectra showed that the addition of Pis-1 PG had no effect on the structure of PLA. *In vitro* antibacterial experiments revealed that Pis-1 PG/PLA fiber membrane could inhibit the growth of *Shewanella putrefaciens* within 6 hours, and exhibited a sustained antibacterial effect, with the antibacterial effect being significant ($p < 0.05$). After 6 days of storage at 4 °C, the total bacterial count of the fish treated with Pis-1 PG/PLA fiber membrane was lower (2.02~3.23 lg(cfu/mL)) than that of the blank group. As a result, Pis-1 PG/PLA fiber membrane inhibited effectively the increases of pH value and TVB-N content, and prolonged the cold storage period of sea bass by more than 3 days. In summary, Pis-1 PG was successfully loaded into PLA fiber membrane; Pis-1 PG/PLA fiber film exerted a preservation effect on sea bass thereby having the application potential in seafood preservation and food packaging.

Key words: antimicrobial peptide Piscidin 1 PG; polylactic acid; electrospinning; preservation; sea bass

海鲈鱼学名鲈鱼,在我国黄海、渤海中广泛分布,富含蛋白质,不饱和脂肪酸,矿物元素等营养物质^[1]。但海鲈鱼在冷藏运输过程中,由于鱼肉内蛋白含量高,使其在自身的酶解反应和微生物作用下极易产生胺类、硫化氢等有害物质,进而引起鱼肉的腐败变质,影响产品销售造成经济损失^[2]。

抗菌肽是一种在宿主先天免疫系统中起着重要作用的小分子多肽。迄今,已有多种抗菌肽从动物、植物或细菌中分离出来^[3,4]。抗菌肽 Piscidin 1 (Pis-1) 是从杂交斑纹鲈鱼 (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) 的肥大细胞中分离得到的^[5,6]。Pis-1 抗菌活性强,对细菌、真菌具有广谱抗菌性。它主要通过直接破坏细胞膜来发挥抑菌作用。但是, Pis-1 会引起溶血并有细胞毒性,这极大地限制了它在食品保鲜中的使用^[7,8]。研究发现将 Pis-1 第 8 个氨基酸处用脯氨酸 (Pro) 替换甘氨酸 (Gly) 后的 Pis-1 PG 在保留原有抗菌活性的同时具有了低细胞毒性和溶血活性,使其有望运用在食品保鲜中^[9]。

聚乳酸 (PLA) 也称为聚丙交酯是由葡萄糖发酵得到的乳酸开环聚合而成,成本低且易生产,是目前最常用的生物可降解聚合物^[4,10]。PLA 已经被用来加工成食品的包装、容器、杯子和餐具等产品^[10]。PLA 由于物理性能、相容性、力学性能、热稳定性良好,使其常应用于静电纺丝技术中^[11-13]。

腐败希瓦氏菌是一种产三甲胺 (TMA)、氨 (NH₃) 和二甲胺 (DMA) 等具有异味的胺类物质的特殊腐败菌^[14]。腐败希瓦氏菌可在低温下生长,广泛分布于冷藏鱼产品中,已被证实是海鲈鱼在冷藏和冷冻过程中的优势腐败菌^[15]。验证纺丝膜对腐败希瓦氏菌生长的影响对研究纤维膜包裹海鲈鱼鱼肉实验有很强的参考作用。

为了达到提高水产品安全性及延长保质期的目的,利用静电纺丝技术使聚合物与抗氧化剂、抑菌剂

相结合来开发生物活性食品包装,有利于抑制鱼肉腐败和氧化^[16-18]。本文选择抗菌肽 Pis-1 PG 作为抑菌剂,通过静电纺丝技术制备 Pis-1 PG/PLA 复合纳米纤维膜。研究了抗菌肽 Pis-1 PG 的加入对 PLA 电纺纤维形态、分子结构、晶体结构、力学性能和对腐败希瓦氏菌生长的影响。最后,用 Pis-1 PG/PLA 纤维膜包裹海鲈鱼鱼肉,研究冷藏中 Pis-1 PG/PLA 纤维膜对鱼肉的菌落总数、pH、挥发性盐基氮总数 (TVB-N) 含量等保鲜指标来研究其保鲜效果。期望开发一种能有效延长海鲈鱼鱼肉冷藏期的包装方法,推广静电纺丝纤维膜的应用,为其他鱼类的保鲜提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

聚乳酸,分子量=100000,东莞市华创塑化有限公司;新鲜海鲈鱼,市售;N,N-二甲基甲酰胺 (DMF),二氯甲烷 (分析纯),北京索莱宝科技有限公司;LB 营养肉汤、LB 营养琼脂,青岛海博生物技术有限公司;Piscidin 1 PG (FFHHIFRPIVHVKGKTIHRLVTG,纯度≥95%),生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 仪器与设备

THZ-D 台式恒温振荡器,太仓市实验室设备厂;SW-CJ-2FD 超净工作台,苏景集团苏州安泰技术有限公司;SC-303 型电子管电热恒温培养箱,浙江省嘉兴县新腾电器厂;85-2 恒温磁力搅拌器,北京世纪科信科学仪器有限公司;PE Victor X3 多功能酶标仪,美国铂金埃尔默仪器;ET-2535H 型静电纺丝设备,北京永康乐业科技发展有限公司;S-4800 型冷场发射扫描电子显微镜,日本日立公司;质构仪 (XT plus),英国 Stable Micro Systems 公司;傅立叶变换红外光谱仪 (Alpha-Centauri 560),美国 Nicolet 公司;Rigaku

Ultima IV 型 X 射线粉末衍射仪, 日本理学 Rigaku 公司; FOSS 全自动凯氏定氮仪 (KJELTEC 8400), 上海瑞粉国际贸易有限公司。

1.3 静电纺丝纤维膜的制备

(1) 制备 PLA 溶液。称取 1.00 g 的 PLA 溶于 10 mL 的二氯甲烷: N,N-二甲基甲酰胺=7:3 溶液中, 在恒温磁力搅拌器上搅拌 3~4 h, 直至 PLA 完全溶解, 溶液呈现为具有一定黏度的透明液体。

(2) 制备 Pis-1 PG/PLA 混合溶液。量取 4.00 mg 的 Pis-1 PG 加入到 4 mL 的 PLA 溶液中, 溶液中 Pis-1 PG 的含量为 1 mg/mL。在恒温磁力搅拌器上搅拌 1~2 h, 直至 Pis-1 PG 完全溶解, 溶液最终为澄清透明的液体。

(3) 静电纺丝。分别取 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 混合溶液 4 mL 转移到 5 mL 注射器中, 并放置到注射泵上。将铝箔纸裹在接收筒上, 接收筒与针口间距 15 cm, 注射器推进速率为 0.75 mL/h, PLA 溶液施加电压 10 kV, Pis-1 PG/PLA 混合溶液施加电压 16 kV, 进行静电纺丝。将所得纤维膜从铝箔纸上剥离后在真空干燥箱中 25 °C 干燥过夜去除残留溶剂。

1.4 静电纺丝纤维的特性

1.4.1 形貌表征

将得到纤维膜切成 5 mm×5 mm 的薄片, 经镀金处理后用扫描电镜观察其形貌特征, 并使用 Image J 软件测量电镜照片中的静电纺丝纤维直径, 每个样品选择 50 根静电纺丝纤维来进行分析得到纤维直径平均值和标准偏差。

1.4.2 力学性能测试

将纤维膜切割成 70 mm×25 mm 的样品。使用质构仪上的拉伸探针测量静电纺丝纤维的拉伸强度。试验参数如下: 试验长度为 40 mm; 拉伸速率为 5 mm/min; 拉伸距离 70 mm; 试验温度为室温。根据这些试验, 分别用公式 1 和 2^[19]计算了静电纺丝的拉伸强度 (σ) 和断裂伸长率 (ϵt) 值。实验重复 3 次以获得平均值。

$$\sigma = p/(b \times d) \quad (1)$$

其中, σ 是拉伸强度 (MPa), p 是断裂时的拉伸力 (N), b 是样品宽度 (mm), d 是样品厚度 (mm)。

$$\epsilon t = (L - L_0)/L_0 \times 100\% \quad (2)$$

其中, ϵt 是断裂伸长率 (%), L_0 是样品的原始长度 (mm), L 是断裂处的长度 (mm)。

1.4.3 化学结构分析

分别将纤维膜和 Pis-1 PG 粉末在白炽灯下干燥后切成碎片与溴化钾混合压入压片机成片, 使用傅立叶变换红外光谱仪在波数范围 400~4000 cm^{-1} 对样品片进行了分析。

1.4.4 X 射线衍射 (XRD) 分析

取适量纤维膜和 Pis-1 PG 粉末用 XRD 在工作电压和电流为 40 kV 和 40 mA 时, 使用 Cu K α 辐射, 扫描速度设定为 16 °/min, 并在 2θ 范围为 5~90 °内测量测定电纺纤维的结晶性能。

1.5 Pis-1 PG/PLA 纤维体外抗菌活性评价

以腐败希瓦氏菌为实验菌株, 对所合成的 Pis-1 PG/PLA 进行抗菌活性测定。将腐败希瓦氏菌培养稀释至 10^6 cfu/mL 进行分析。使用前, 将纤维的两侧暴露在紫外线下 15 min, 以消除表面细菌。然后, 分别将 1.00 mg 的 PLA 纤维膜和 Pis-1 PG/PLA 的纤维膜加入 2 mL 接种细菌的培养基中, 在 28 °C 下的恒温振荡器中进行培养。样品每隔 2 h 吸取 200 μL 培养液添加到无菌 96 孔板中在 595 nm 处测量 OD 值并加入 200 μL 无菌培养液以保持总体积恒定, 以无纤维浸泡的细菌培养为对照组进行实验。每个样品进行 3 次平行实验并取平均值。

1.6 海鲈鱼的处理与分组

取新鲜海鲈鱼腹部鱼肉去皮, 用无菌去离子水冲洗海鲈鱼鱼体表面, 洗去黏液和部分微生物, 在超净工作台将鱼肉切割分成三组。第一组鲈鱼片用紫外线消毒 (15 min) 的 Pis-1 PG/PLA 电纺纳米纤维膜包裹。第二组鲈鱼片用紫外线消毒 (15 min) 的 PLA 电纺纳米纤维膜包裹。第三组无纺丝膜鲈鱼片 (空白组)。将三组鱼片按每块样品 60.00 g 放入无菌蒸煮袋中, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.7 菌落总数的测定

参照 GB 4789.2-2016 《食品微生物学检验菌落总数测定》^[20], 对实验方法略有修改。将鱼肉置于超净工作台上, 取 5.00 g 鱼肉样品置于已灭菌的蒸煮袋中, 加入 45 mL 浓度为 0.85% 的无菌生理盐水, 拍打均质 120 s。将均质液进行 10 倍系列稀释。适当选择 2~3 个稀释倍数的稀释液, 分别吸取 1 mL 加入至已灭菌培养皿中, 再加入约 20 mL 已灭菌的平板计数琼脂培养基, 摇匀, 每个稀释度做 3 个平行。带琼脂凝固后, 将平板翻转。置于 28 °C 培养箱中培养 48 h, 最后进行菌落计数。

1.8 pH 的测定

pH 参照 GB 5009.237-2016《食品 pH 值的测定》^[21]的方法,称取 5.00 g 鱼肉样品,绞碎混匀置于锥形瓶中,无菌去离子水定容到 45 mL 均质静置半小时用 PH 计测定溶液 PH,每组样品平行实验 3 次并取平均值。

1.9 TVB-N 含量的测定

参照国标 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定》^[22]自动凯氏定氮仪法,将 5.00 g 搅碎的鱼肉样品于整流管中,依次加入 25 mL 去离子水和 0.50 g 氧化镁粉末,采用全自动凯氏定氮仪测定鱼肉样品的 TVB-N 含量,每组样品平行实验 3 次并取平均值。

1.10 数据处理

每个样品设置 3 个平行,采用 Origin 8.5 软件处理分析数据,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, $p < 0.05$ 为差异性显著, $p > 0.05$ 为差异性不显著。

2 结果与讨论

2.1 静电纺丝纤维特性

2.1.1 纤维形态分析

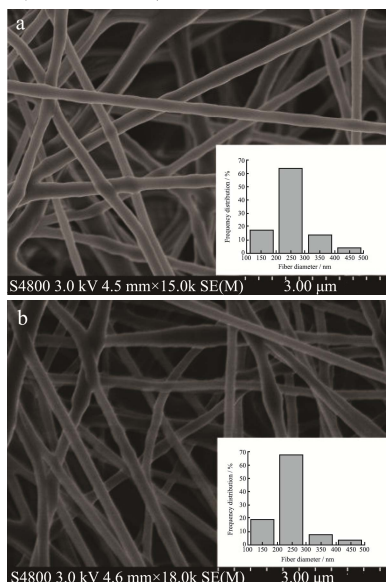


图 1 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 的纳米纤维 SEM 图像和直径分布直方图

Fig.1 SEM image and diameter distribution histogram of PLA and PLA/Pis-1 PG nanofibers

注: a: PLA 纳米纤维及纤维直径分布图; b: Pis-1 PG/PLA 纳米纤维和纤维直径分布图。

PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纳米纤维膜表面光滑均匀,

纤维膜容易与铝箔纸分离。图 1 显示了 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纳米纤维 SEM 图像。采用静电纺丝技术制备出的纤维的方向随机,形成网络结构,光滑无珠。PLA 纤维直径为 170~430 nm,平均直径 255 nm。Pis-1 PG/PLA 纤维的直径略有减小为 160~400 nm,平均直径 225 nm。这种现象可能是由于加入 Pis-1 PG 后,PLA 溶液的导电性增加,导致纤维直径减小^[23,24]。

2.1.2 力学性能

对 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纤维膜进行力学性能测试,如表 1 计算了纤维的拉伸强度(σ)和断裂伸长率(ϵ)。实验中静电纺丝纤维随着拉伸力的增大而伸长变形,拉伸力增大到一定程度后纤维断裂。实验数据表明 PLA 纤维膜具有良好的拉伸强度和断裂伸长率,这一结论和 Ding Ting 等^[19]制得的聚乳酸静电纺丝纤维膜所测出的力学性能结果类似。Pis-1 PG/PLA 纤维膜的拉伸强度显著高于 PLA 纤维膜($p < 0.05$),断裂伸长率差异不显著($p > 0.05$)。这说明 Pis-1 PG/PLA 纤维膜拉伸强度高,不容易断裂,适合用做食品保鲜膜。

表 1 纤维膜力学性能

Table 1 Mechanical Properties of fiber membrane

| 纤维膜 | 拉伸强度/MPa | 断裂伸长率/% |
|--------------|-----------|------------|
| PLA | 1.16±0.21 | 66.32±4.38 |
| Pis-1 PG/PLA | 2.70±0.49 | 67.51±6.05 |

2.1.3 纤维结构分析

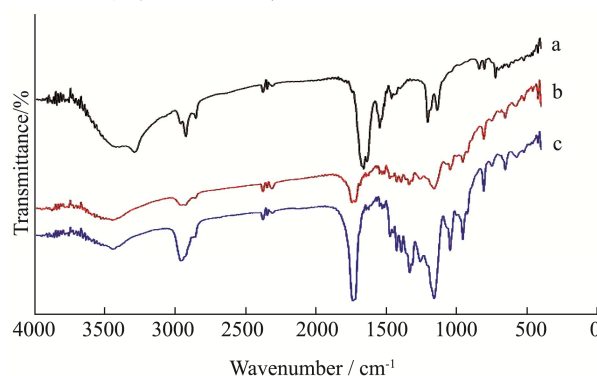


图 2 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纤维膜的 FTIR 光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of PLA and PLA/Pis-1 PG fiber membranes

注: a: Pis-1 PG; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

图 2 为 PLA 纤维膜、Pis-1 PG/PLA 纤维膜和 Pis-1 PG 粉末的 FT-IR 光谱图。在 PLA 纤维的红外光谱中 PLA 的特征吸收峰为 1760.4 cm^{-1} (-C=O 伸缩振动), 1184.1 cm^{-1} (-C-O-伸缩振动), 1092.0 cm^{-1} (-C-O-伸缩振动)。上述峰在 Pis-1 PG/PLA 纤维中未消失且无较大的偏移。Pis-1 PG 的特征峰为 1136 cm^{-1} (-C-O-

伸缩振动), 1546 和 1658 cm^{-1} (-C=O 伸缩振动), 2852 cm^{-1} (-C-H 伸缩振动), 3284 cm^{-1} (N-H, O-H 伸缩振动)。由于 Pis-1 PG 部分官能团与 PLA 相同, 谱峰相近, 在纤维膜的红外谱图中两种分子的谱峰出现叠加。在 Pis-1 PG/PLA 膜的中, Pis-1 PG 含量低肽的强度明显减弱。实验表明 Pis-1 PG 的加入对 PLA 的结构无影响, 肽与 PLA 主要为物理结合。这与杜智等^[11], 将杆菌肽加入到聚乳酸静电纺丝纤维中的 FT-IR 光谱结果相同, 肽的加入对 PLA 纤维膜的 FT-IR 光谱没有明显变化。

2.1.4 XRD 分析

图 3 显示了 Pis-1 PG/PLA 纤维膜, PLA 纤维膜和 Pis-1 PG 粉末的 X 射线衍射图。PLA 纤维膜的主要衍射峰出现在 $2\theta=20$ 和 22.9° 这是 PLA 晶体特有的衍射峰。Pis-1 PG 粉末的宽衍射峰出现在 $2\theta=21^\circ$, 这表明 Pis-1 PG 是微晶体结构。Pis-1 PG/PLA 纤维膜的衍射峰出现在 $2\theta=19.4$ 和 22.3° 和 PLA 纤维膜的衍射峰相比峰的锐度有所下降且峰宽度变大。Pis-1 PG/PLA 纤维膜的衍射峰发生了小幅移动, 这可能是由于静电纺过程中施加的电压更高电场发生变化引起的。PLA 纤维膜负载 Pis-1 PG 后衍射峰位置没有发生大的变化, 表明添加 Pis-1 PG 不会改变 PLA 的结晶性质。然而衍射峰的锐度降低宽度变大, 可能是由于 Pis-1 PG 是微晶体结构导致负载 Pis-1 PG 后 PLA 纤维膜结晶度降低。

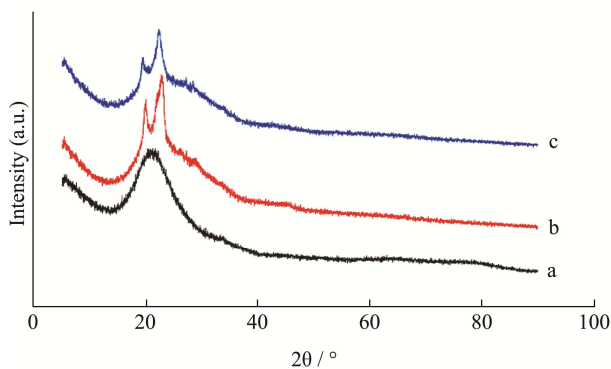


图 3 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纤维膜的 X 射线衍射图

Fig.3 X-ray diffraction patterns of PLA and PLA / pis-1 PG fiber membranes

注: a: Pis-1 PG; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

2.2 体外抗菌活性

细菌悬浮液的浓度与吸光度值成正比, 因此细菌生长可以通过细菌悬浮液吸光度曲线的趋势来判断^[25]。图 4 显示了腐败希瓦氏菌菌悬浮液吸光度曲线, Pis-1 PG 纤维膜组吸光度曲线显著低于对照组

($p<0.05$)。Pis-1 PG/PLA 纤维膜浸泡在腐败希瓦氏菌培养液中细菌在 0~6 h 的生长速度被迅速抑制; 在 6~12 h 细菌悬浮液的吸光度不断降低, 细菌整体数量不断减少。Pis-1 PG 纤维膜对腐败希瓦氏菌有持续抑菌的效果。PLA 纤维膜组会使细菌悬浮液吸光度降低是由于 PLA 有一定抑菌作用^[26,27]但对细菌生长没有明显影响, 和对照组差异不显著 ($p>0.05$)。实验表明 Pis-1 PG 纤维膜可以抑制海鲈鱼内优势腐败菌 (腐败希瓦氏菌)^[15]的生长, 为 Pis-1 PG/PLA 纤维膜包裹海鲈鱼肉实验提供依据。

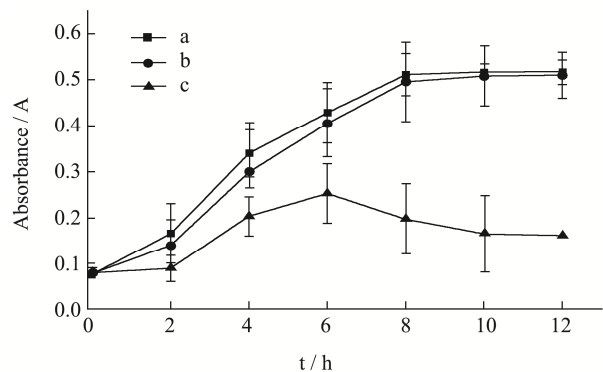


图 4 PLA 和 Pis-1 PG/PLA 纤维膜对腐败希瓦氏菌生长的影响

Fig.4 Effect of PLA and PLA / pis-1 PG fiber membranes on the growth of *Shewanella putrefaciens*

注: a: 对照组; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

2.3 海鲈鱼冷藏期间菌落总数的变化

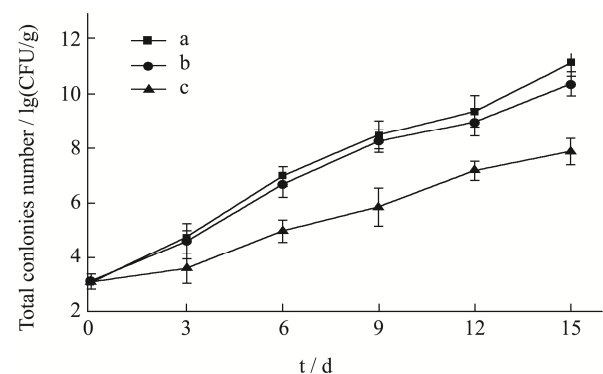


图 5 海鲈鱼冷藏期间菌落总数的变化

Fig.5 Changes of total colonies number of Sea bass during cold storage

注: a: 空白; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

菌落总数变化能直接反映鱼肉因微生物的作用而发生腐败的程度^[28]。由图 5 可知, 随着时间的延长各组海鲈鱼肉细菌总数均呈上升趋势, 空白组的菌落总数上升最快在 3 d 达到了 4.74 $\text{lg}(\text{cfu}/\text{mL})$, 超过一级鲜度 4 $\text{lg}(\text{cfu}/\text{mL})$; 在 6 d 为 6.98 $\text{lg}(\text{cfu}/\text{mL})$, 超过二级鲜度 6 $\text{lg}(\text{cfu}/\text{mL})$, 显著高于 Pis-1 PG/PLA 纤维膜

组 ($p < 0.05$)。PLA 有一定抑菌作用^[26,27]。PLA 纤维膜组菌落总数低于空白组, 但无显著性差异 ($p > 0.05$)。PLA 纤维膜组在 3 d 和 6 d 的菌落总数分别为 4.60 lg(cfu/mL) 和 6.67 lg(cfu/mL), 并没有延缓鱼肉的腐败。整个冷藏期间 Pis-1 PG/PLA 纤维膜组菌落总数增长速度最缓慢。冷藏时间为 6 d 的 Pis-1 PG/PLA 纤维膜组菌落总数为 4.96 lg(cfu/mL), 超过一级鲜度; 在 9 d 菌落总数为 5.84 lg(cfu/mL) 接近二级鲜度, 12 d 时为 7.27 lg(cfu/mL), 超过二级鲜度。整个冷藏期间 Pis-1 PG/PLA 纤维膜组对鱼肉内微生物有持续的抑制作用, 可能是由于 PLA 纤维膜有缓释作用^[29], Pis-1 PG 可以从 PLA 纤维膜内持续释放出来, 能长时间抑制鱼肉内微生物生长。实验表明 Pis-1 PG/PLA 纤维膜能阻止微生物细菌的生长对鱼肉中微生物的繁殖具有抑制效果, 可以延缓鱼肉腐败 3 d 以上。

2.4 海鲈鱼冷藏期间 pH 的变化

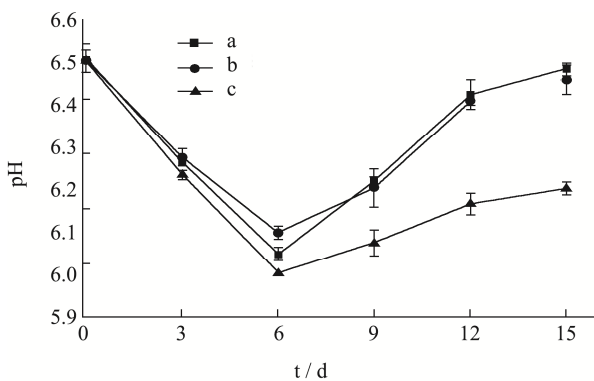


图6 海鲈鱼冷藏期间 pH 的变化

Fig.6 pH change of Sea bass during cold storage

注: a: 空白; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

由图 6 可知, 海鲈鱼冷藏期间 pH 值都先下降后升高, 与相关鱼肉冷藏期间 pH 变化趋势一致^[30]。冷藏初期由于鱼肉内部体内糖原在无氧条件和酶的作用下分解形成乳酸及其他酸类物质, 微生物无氧呼吸生成 CO₂ 产生酸类物质, 从而导致 pH 值下降。冷藏时间 6 d 后由于细菌的繁殖及鱼肉蛋白质分解生成挥发性盐基氮等碱性物质导致 pH 值升高, 对照组 pH 值为显著高于 Pis-1 PG/PLA 纤维膜组 ($p < 0.05$)。冷藏时间为 9 d 时空白组 pH 值为 6.22 和 PLA 纤维膜组 pH 值为 6.20, pH 上升趋势明显, Pis-1 PG/PLA 纤维膜组 pH 上升最为缓慢并在后期趋于稳定, 15 d 时 pH 值为 6.20 显著低于前两组 ($p < 0.05$)。这与张海燕等^[31]研究结果类似, 在 4 °C 的海鲈鱼片在 6 d 后 pH 值开始增加, 且随着时间延长处理组 pH 值上升速度低于对照组。由此说明, Pis-1 PG/PLA 纤维膜能够有效抑制鱼肉内微生物的生长, 减缓碱性物质的产生和积累, 从而控

制 pH 值上升, 起到保鲜效果。

2.5 海鲈鱼冷藏期间 TVB-N 值变化

TVB-N 是判断鱼肉腐败程度的重要指标, 反映了鱼肉蛋白质被内源酶和微生物的作用分解产生具有挥发性胺类物质的情况^[32]。由图 7 可知, 随着冷藏时间增加各组鱼肉内 TVB-N 含量逐渐增大。冷藏前期, 鱼肉内的蛋白酶分解蛋白质产生胺类物质, 各组样品 TVB-N 值增长缓慢。冷藏 6 d 后, 鱼肉内腐败希瓦氏菌等优势腐败菌大量繁殖, 产生大量氨、二甲胺和三甲胺等胺类物质, 使菌落总数和 pH 值在此时快速上升, 导致 TVB-N 值快速上升。空白组 TVB-N 值上升最快, 冷藏 6 d 时显著高于 Pis-1 PG/PLA 纤维膜组 ($p < 0.05$), 在冷藏期间为 9 d 时超过一级新鲜度 (15 mg/100 g), 12 d 时超过二级新鲜度 (20 mg/100 g)。PLA 纤维膜组冷藏期间为 12 d 时 TVB-N 值为 19.41 mg/100 g 超过一级新鲜度接近二级新鲜度。Pis-1 PG/PLA 纤维膜组 TVB-N 值上升趋势最慢冷藏期间 12 d 时为 15.25 mg/100 g 超过一级新鲜度, 15 d 时为 21.85 mg/100 g 超过二级新鲜度。由此说明, Pis-1 PG/PLA 纤维膜抑制腐败希瓦氏菌等产胺类的腐败菌生长, 延缓胺类物质的积累, 从而减缓 TVB-N 值增长。

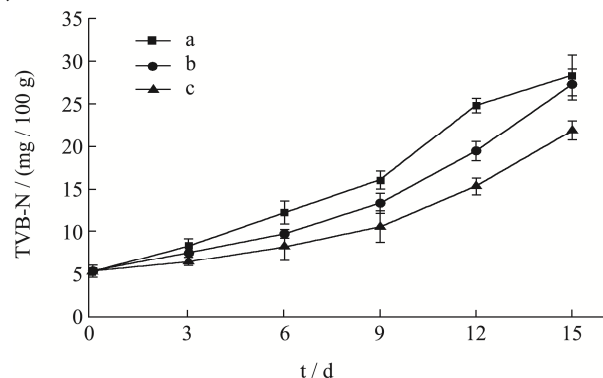


图7 海鲈鱼冷藏期间 TVB-N 值变化

Fig.7 Changes of TVB-N in Sea bass during cold storage

注: a: 空白; b: PLA 纤维膜; c: Pis-1 PG/PLA 纤维膜。

3 结论

本研究通过静电纺丝技术成功地制备了 Pis-1 PG/PLA 纳米纤维膜。SEM 结果表明纳米纤维呈线状, 结构光滑无序; Pis-1 PG 加入后, 纤维膜平均纤维直径下降至 225 nm。Pis-1 PG 的加入使得 Pis-1 PG/PLA 纤维膜拉伸强度提升至 2.70 MPa, 结晶度降低, PLA 的结构没有发生变化。Pis-1 PG/PLA 纤维膜在 6 h 内会抑制腐败希瓦氏菌的生长并有持续抑菌的效果, Pis-1 PG/PLA 纤维膜对腐败希瓦氏菌有明显的抗菌活

性。用 Pis-1 PG/PLA 纤维膜包裹处理海鲈鱼鱼肉后,纤维膜会抑制鱼肉中微生物的生长。在 4 °C 贮藏 6 d 后, Pis-1 PG/PLA 纤维膜处理鱼肉的菌落总数低于空白组 2.02~3.23 lg(cfu/mL), 进而有效抑制鱼体 pH 值和 TVB-N 含量的升高, 能够延长海鲈鱼鱼肉冷藏期 3 d 以上, 对海鲈鱼有保鲜效果。综上所述, Pis-1 PG/PLA 纤维膜可应用于鱼肉保鲜中, 在食品包装方面具有应用潜力。

参考文献

- [1] 吴燕燕,李冰,朱小静,等.养殖海水和淡水鲈鱼的营养组成比较分析[J].食品工业科技,2016,37(20):348-352,359
WU Yan-yan, LI Bing, ZHU Xiao-jing, et al. Comparison of nutrient composition of cultured sea bass and cultured fresh-water bass, *Lateolabrax japonicas* and *Micropterus salmoides* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(20): 348-352, 359
- [2] S Cakli, B Kilinc, A Cadun, et al. Effects of gutting and uncutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(7): 519-527
- [3] Ganz, Tomas. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity [J]. Nature Reviews Immunology, 2003, 3(9): 710-720
- [4] 苗建银,柯畅,郭浩贤,等.抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J].现代食品科技,2014,30(1):233-240
MIAO Jian-yin, KE Chang, GUO Hao-xian, et al. Extraction, isolation and antibacterial mechanism of antibacterial peptides [J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(1): 233-240
- [5] Umaporn Silphaduang, Edward J Noga. Peptide antibiotics in mast cells of fish [J]. Nature: International Weekly Journal of Science, 2001, 414(6861): 268-269
- [6] Noga E J, Silphaduang U. Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish [J]. Drug News & Perspectives, 2003, 16(2): 87-92
- [7] Mehrnejad F, Zarei M. Molecular dynamics simulation study of the interaction of Piscidin 1 with DPPC bilayers: structure-activity relationship [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2010, 27(4): 551-559
- [8] Tianhu Yuan, Xin Zhang, Zehan Hu, et al. Molecular dynamics studies of the antimicrobial peptides Piscidin 1 and its mutants with a DOPC lipid bilayer [J]. Biopolymers, 2012, 97(12): 998-1009
- [9] Lee S A, Kim Y K, Lim S S, et al. Solution structure and cell selectivity of Piscidin 1 and its analogues [J]. Biochemistry, 2007, 46(12): 3653-3663
- [10] Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials [J]. Macromolecular Bioscience, 2004, 4(9): 835-864
- [11] 杜智,姚军燕,李玉洁,等.聚乳酸/杆菌肽静电纺丝纤维的体外释药研究[J].材料科学与工艺,2015,5:52-58
DU Zhi, YAO Jun-yan, LI Yu-jie, et al. Drug controlling release behavior of electrospun poly (lactic acid)/bacitracin drug delivery system [J]. Materials Science and Technology, 2015, 5: 52-58
- [12] M P Arrieta, J López, D López, et al. Effect of chitosan and catechin addition on the structural, thermal, mechanical and disintegration properties of plasticized electrospun PLA-PHB biocomposites [J]. Polymer Degradation and Stability, 2016, 132: 145-156
- [13] Alharbi H F, Luqman M, Fouad H, et al. Viscoelastic behavior of core-shell structured nanofibers of PLA and PVA produced by coaxial electrospinning [J]. Polymer Testing, 2018, 67: 136-159
- [14] Mu He, Quan-you Guo, Wei Song, et al. Inhibitory effects of chitosan combined with nisin on *Shewanella* spp. isolated from *Pseudosciaena crocea* [J]. Food Control, 2017, 79: 349-355
- [15] Dimitra Taliadourou, Vassilios Papadopoulos, Eleni Domvridou, et al. Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(13): 1373-1379
- [16] Aytac Zeynep, Ipek Semran, Durgun Engin, et al. Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging [J]. Food Chemistry, 2017, 233(Oct.15): 117-124
- [17] 陈榕钦,吕茹倩,梁鹏,等.静电纺丝技术在食品科学领域中应用的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(3):351-356
CHEN Rong-qin, LYU Ru-qian, LIANG Peng, et al. Research progress of electrospinning technique in the field of food science and technology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(3): 351-356
- [18] Wen Peng, Zhu Ding-He, Wu Hong, et al. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging [J]. Food Control, 2016, 59: 366-376
- [19] Ting Ding, Tingting Li, Jianrong Li. Preparation of coaxial polylactic acid-propyl gallate electrospun fibers and the effect

- of their coating on salmon slices during chilled storage [J]. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2019, 11(6): 6463-6474
- [20] GB 5009.237-2016 食品 pH 值的测定[S]
GB 5009.237-2016 Determination of pH of Food [S]
- [21] GB 5009.228-2016 食品中挥发性盐基氮的测定[S]
GB 5009.228-2016 Determination of Volatile Base Nitrogen in Food [S]
- [22] GB 4789.2-2016 食品微生物学检验菌落总数测定[S]
GB 4789.2-2016 Food Microbiology Inspection Total Number of Colonies [S]
- [23] Wang X, Yue T, Lee T C. Development of pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application [J]. Food Control, 2015, 54: 150-157
- [24] 高宁萧,吴晶,刘勇.静电纺丝法制备溶解型胶原蛋白肽/丝素蛋白复合纤维面膜[J].北京化工大学学报(自然科学版),2018,45(6):21-28
GAO Ning-xiao, WU Jing, LIU Yong, Preparation of a dissolved collagen peptide-silk fibroin composite fiber mask by electrospinning [J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2018, 45(6): 21-28
- [25] 张军宁.凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)复合保鲜剂的研制及其抑菌机理初步研究[D].青岛:中国海洋大学, 2012
ZHANG Jun-ning, Research on preparation and preliminary antibacterial mechanisms of compound preservative of *Litopenaeus vannamei* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012
- [26] Shukla, Mukul, Swaroop, Chetan. Nano-magnesium oxide reinforced polylactic acid biofilms for food packaging applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2018, 113: 729-736
- [27] 曾丽萍,孟金明,徐世娟,等.聚乳酸纳米抗菌复合膜对冷却猪肉保鲜效果的研究[J].包装工程,2018,39(21):105-110
ZENG Li-ping, MENG Jin-ming, XU Shi-juan, et al. Comparative effects of polylactic acid antibacterial nanocomposite film packaging on chilled pork during storage [J]. Packaging Engineering, 2018, 39(21): 105-110
- [28] 张成云,王璇,关文强,等.冰温冷藏鲜肉的菌落总数动态变化预测模型拟合验证[J].肉类研究,2019,33(1):31-36
ZHANG Cheng-yun, WANG Xuan, GUAN Wen-qiang, et al. Fitting verification of prediction models for dynamic change of total number of bacterial colonies in fresh meat during cold storage [J]. Meat Research, 2019, 33(1): 31-36
- [29] Hadis Rostamabadi, Elham Assadpour, Hoda Shahiri, et al. Electrospinning approach for nanoencapsulation of bioactive compounds; recent advances and innovations [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 100: 190-209
- [30] 蓝蔚青,陈梦玲,孙晓红,等.超高压结合竹醋液处理对冷藏鲈鱼片品质和蛋白特性的影响[J].高压物理学报,2019, 33(1):166-174
LAN Wei-qing, CHEN Meng-ling, SUN Xiao-hong, et al. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) with bamboo vinegar on the quality and protein characteristics of perch (*Lateolabrax japonicus*) fillets during refrigerated storage [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2019, 33(1): 166-174
- [31] 张海燕,吴燕燕,杨少玲,等.聚赖氨酸与魔芋葡甘聚糖复配对海鲈鱼片的保鲜效果[J].食品与发酵工业,2019, 45(24): 202-208
ZHANG Hai-yan, WU Yan-yan, YANG Shao-ling, et al. Combined preservation effects of ϵ -polylysine and konjac glucomannan on *Lateolabrax japonicus* fillets [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(24): 202-208
- [32] 唐森,韦浪生,覃逸明,等.壳聚糖-咖啡酸衍生物涂膜对鲈鱼的保鲜效果研究[J].安徽农业科学,2019,47(23):207-209, 224
TANG Sen, WEI Lang-sheng, TAN Yi-ming, et al. Preservation effects of coating film with chitosan-caffeic acid derivative on sea perch during storage [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(23): 207-209, 224