

壳聚糖基纳米氧化锌—丁香精油抗菌复合膜对鲜肉保鲜效果

Study on preservation for raw meat from antibacterial composite membrane with by chitosan-based nano-zinc oxide-clove oil

方丹丹¹

王利强^{1,2}

FANG Dan-dan¹ WANG Li-qiang^{1,2}

(1. 江南大学机械工程学院, 江苏 无锡 214122;

2. 江苏省食品先进制造装备技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. Department of Packaging Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Advanced Food Manufacturing Equipment and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:将抗菌效果良好且不会产生耐药性的无机抗菌剂纳米氧化锌和具有广谱抗菌性、无毒健康的天然抗菌剂丁香精油加入壳聚糖—魔芋葡甘聚糖复合膜中,研究复合膜对鲜肉的保鲜效果。结果发现:添加质量分数 6% 纳米氧化锌和体积分数 0.6% 丁香精油的复合膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率分别为 99.78%, 99.06%, 具有强抗菌效果;红外光谱分析结果表明壳聚糖官能团和丁香精油中存在的酚反应基团之间有效地发生了键合,且扫描电镜结果表明丁香精油在一定程度上可改善纳米氧化锌的分散效果;添加纳米氧化锌和丁香精油的复合膜对鲜肉的保质期可提高 6~8 d。

关键词:壳聚糖;魔芋葡甘聚糖;纳米氧化锌;丁香精油;抗菌

Abstract: Nano-zinc oxide is a kind of inorganic antibacterial agent, which had good antibacterial effect and didn't produce drug resistance. Clove oil is a kind of natural antibacterial agent with spectral antibacterial properties and non-toxic health. In this paper, chitosan and konjac glucomannan were used as the film-forming substrates, two kinds of antibacterial agent were added to the biomass composite membrane. The antibacterial rate of the composite membrane against *Escherichia coli* and *Staphylococcus*

aureus was 99.78% and 99.06%, respectively. The film had a strong antibacterial effect. The results of infrared spectroscopy indicated that the chitosan functional group and the phenol group in the clove oil were effectively bonded, and the results of scanning electron microscopy showed that the clove oil improved the dispersion of nano zinc oxide. The composite membrane was used for the preservation experiment of fresh meat. The preservation effect of the composite membrane was evaluated in a 14-day cycle. It was found that the composite membrane with nano zinc oxide and clove oil increased the shelf life of fresh meat by 6~8 days.

Keywords: chitosan; konjac glucomannan; nano zinc oxide; clove essential oil; antibacterial

抗菌食品包装是一种基于在食品包装材料中加入抗菌物质以控制食物质量的不良变化的新型活性包装形式。随着人们安全意识和环保意识的增强,制备出可降解、绿色环保以及具备对细菌高度敏感的生物基材料已成为食品及包装行业的研究热点。

壳聚糖(chitosan)为甲壳素 N-脱乙酰化产物,是一种具有生物相容性、生物降解性和抗菌性的良好材料,对很多细菌具有抑制作用^[1]。由于其机械和阻隔性能,限制了其在食品包装中的应用,而与其他高分子材料复合是改善其性能的方法之一^[2]。魔芋葡甘聚糖是由 D-葡萄糖和 D-甘露糖两种多糖连接起来的大分子杂多糖,可直接溶解成为无色透明的溶液或是凝胶,用其制备的薄膜具有工艺简单、价格低廉、可热封的优点,具有很好的生物相容性及可降解性,可广泛应用于食品保鲜^[3]。壳聚

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金项目(编号:JUSRP211115);江苏省食品先进制造装备技术重点实验室自主资助基金资助项目(编号:FMZ201902)

作者简介:方丹丹,女,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:王利强(1977—),男,江南大学教授,硕士生导师,博士。E-mail:wlq@163.com

收稿日期:2019-03-31

糖和魔芋葡甘聚糖是两种带有相反电荷的聚电解质,可形成聚电解质复合物,利用两种材料的互补性制备的复合材料具有更好的力学性能和阻隔性能^[4]。

纳米氧化锌(1~100 nm)具有粒子尺寸小,比表面积大等特点。通过超声分散作用,纳米氧化锌在基材中具有很强的纳米分散能力,且与基材界面的相互作用很强^[5]。根据美国食品和药物管理局的协议(21CFR182.8991),氧化锌是公认的安全(GRAS)材料^[6]。纳米氧化锌作为抗菌剂使用,对微生物具有很强的抑制作用,并与人体细胞保持良好的生物相容性^[7]。这种无机抗菌剂能有效弥补壳聚糖膜性能的缺陷^[2],能强化其抗菌作用、机械性能。为了使复合膜的抑菌程度达到高度敏感或是极度敏感的程度,引入新的抗菌剂丁香精油。丁香精油为天然植物抗菌剂,在体外对不同的食源性病原体如大肠杆菌、空肠弯曲杆菌、肠炎沙门氏菌和单核细胞增生李斯特菌等显示出优异的抗微生物活性^[8]。

试验拟以壳聚糖和魔芋葡甘聚糖为成膜基质,甘油为增塑剂,纳米氧化锌和丁香精油为抗菌剂,通过流延成膜法制备抗菌复合膜,并将复合膜用于鲜肉的保鲜试验,以鲜肉色差、pH、菌落总数、挥发性盐基氮为指标来评估复合膜的保鲜效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜猪肉:市售;

壳聚糖:脱乙酰度 80%~95%,国药集团化学药剂有限公司;

魔芋葡甘聚糖:分析纯,合肥博美生物科技有限公司;

甘油、丁香精油:分析纯,国药集团化学药剂有限公司;

纳米氧化锌:粒度 50 nm,分析纯,阿拉丁试剂;

大肠杆菌菌种:CMCC(B)44102,上海鲁微科技有限公司;

金黄色葡萄球菌菌种:CMCC(B)26003,上海鲁微科技有限公司。

1.2 仪器与设备

数字显示转速电动搅拌机:JB200-S 型,上海标本模型厂;

立式压力蒸气灭菌器:LDZM 型,上海申安医疗器械厂;

垂直层流洁净工作台:HCB-1300V 型,青岛海尔特种电器有限公司;

色彩色差计:CR-400/410 型,柯尼卡美能达。

1.3 试验方法

1.3.1 抗菌复合膜的制备

(1) 壳聚糖膜液的制备:称取一定量的壳聚糖粉末倒入体积分数 1%乙酸溶液中,配制成质量分数 1%壳聚糖溶液,60℃搅拌 1 h 充分溶解。

(2) 魔芋葡甘聚糖膜液的制备:称取质量分数 0.5%魔芋葡甘聚糖倒入 60℃水中,搅拌 5 min,60℃水浴 2 h。

(3) 抗菌复合膜的制备:将魔芋葡甘聚糖膜液 60℃水浴使其从凝胶状变为溶液状态,与壳聚糖膜液进行共混,加入质量分数 25%甘油,制备成混合膜液。称取 6%(相对于壳聚糖和魔芋葡甘聚糖干重的质量分数)纳米氧化锌溶于去离子水中,使用超声细胞分散机将其分散在水溶液中,再添加到混合膜液中。加入质量分数 0.2%吐温 80 搅拌 1 h,再分别加入体积分数 0.0%,0.2%,0.4%,0.6%,0.8%,1.0%丁香精油,定容至 300 mL,再次搅拌 1 h,10 000 r/min 均质 5 min,将配置好的溶液倒在干净的有机玻璃板上,烘干。冷却揭膜,保存备用。

1.3.2 抗菌性能的测定 根据 GB/T 31402—2015 对复合膜的抑菌性能进行表征。其中,覆盖膜采用 PE 膜,空白膜为未加抗菌剂的薄膜,抗菌膜为添加质量分数 6%纳米氧化锌和不同浓度丁香精油的复合抗菌膜。将覆盖膜和试样样品放入无菌自封袋中,加入 20 mL 洗脱液,用手充分揉搓袋中试验样品和覆盖薄膜,将细菌洗下,充分摇匀后,吸取 1 mL 菌液,稀释成 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-5} , 分别取 0.1 mL 接种于平板计数琼脂培养基中, $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 24~48 h,按 GB/T 4789.2—2016 的方法测定菌落数,每个样品平行 3 次。按式(1)计算抑菌率。

$$R = \frac{B - C}{B} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——抑菌率,%;

B——PE 膜每平皿平均回收菌落数,CFU;

C——抗菌膜每平皿平均回收菌落数,CFU。

1.3.3 红外光谱分析 使用傅立叶变换红外光谱仪对复合薄膜进行红外光谱表征,扫描范围 $4\,000 \sim 500\text{ cm}^{-1}$ 。

1.3.4 微观结构分析 采用扫描电镜在不同放大倍数下观察膜微观结构,直至出现清晰图片为止,抓取图片并进行分析。

1.3.5 鲜肉保鲜试验

(1) 肉样处理:将抗菌膜、PE 膜、案板和刀具使用 95%酒精擦拭后,于超净台进行紫外灭菌(30 min)。将新鲜肉样切割成 10 g 长方形,分别用 PE 膜(对照)空白膜、抗菌复合膜将其裹包,将 3 个肉样放入同一托盘中,用保鲜膜封好。其中,空白膜(CL-0)为不添加抗菌剂薄膜,抗菌复合膜为添加质量分数 6%纳米氧化锌和体积分数

0.6% 丁香精油的复合膜(CL-6)。将包装好的肉样置于 4 ℃ 冰箱中,分别在第 0,2,4,6,8,10,12,14 天测定样品色差、pH、菌落总数、挥发性盐基氮等指标。

(2) 色差测定:使用色差仪对肉样 L^* 值、 a^* 值和 b^* 值进行测定,每组样品测试 5 次。

(3) pH 测定:按照 GB 9695.5—2008 进行测定。

(4) 菌落总数测定:按照 GB 4789.2—2010 进行测定。

(5) 挥发性盐基氮(TVB-N)测定:按照 GB 5009.228—2016,采用微量扩散法进行测定。

1.4 数据处理

采用 Origin 8 对试验数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 复合膜的抑菌试验

当抑菌率 > 90% 时,复合膜具有抑菌作用;当抑菌率 > 99% 时,复合膜具有强抑菌效果。由表 1 可知,添加纳米氧化锌和丁香精油后菌落数明显减少,两者结合后的抗菌效果更佳。菌落数随丁香精油添加量的增加而减少,抗菌效果越明显,对两种细菌均具备较好的效果。空白膜为壳聚糖—魔芋葡甘聚糖复合膜,该复合膜对目标菌种抑菌率分别为 82.68%,82.18%,抗菌作用力较弱。添加质量分数 6% 纳米氧化锌和体积分数 0.2% 丁香精油的复合膜,对目标菌种抑菌率为 90.24%,91.23%;当丁香精油添加量为 0.6% 时,该复合膜对目标菌种抑菌率分别为 99.78%,99.06%,具有强抗菌作用。这是因为丁香精油中含有丁香酚,其中酚反应性基团和壳聚糖的官能团以及纳米氧化锌与细菌细胞膜有相互作用,在抑制微生物的生长中起着至关重要的作用^[9],且纳米氧化锌和丁香精油在抗菌方面会产生协同作用。故丁香精油体积分数为 0.6%~0.8% 较为合适。

表 1 复合包装膜对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率

Table 1 Antibacterial rate of composite packaging film of different content of clove oil to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* %

样品	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
PE 膜	0.00	0.00
空白膜	82.18	82.68
0.2% 丁香精油	91.23	90.24
0.4% 丁香精油	97.58	96.11
0.6% 丁香精油	99.06	99.78
0.8% 丁香精油	99.73	99.82
1.0% 丁香精油	99.99	99.98

2.2 红外光谱分析

由图 1 可知,3 387 cm^{-1} 处为壳聚糖与魔芋葡甘聚糖分子之间的氢键作用以及壳聚糖的氨基伸缩振动吸收重叠形成的峰;2 897,1 555 cm^{-1} 处分别对应于 CH_2 振动和 H_2O 弯曲模式,1 404,1 021 cm^{-1} 处代表 CH_2 弯曲振动;681 cm^{-1} 处为氧化锌拉伸模式形成的峰。当在基质中分别掺入体积分数 0.2%,0.4%,0.6%,0.8%,1.0% 丁香精油时,其中与 O—H 振动键合的 N—H 键向较低频率移动,分别从 3 387 cm^{-1} 到 3 360,3 323,3 342,3 336,3 307 cm^{-1} ,一方面是由于壳聚糖中的氨基与氧化锌之间发生反应,另一方面是壳聚糖官能团与丁香精油中存在的酚反应性基团发生了键合^[9]。

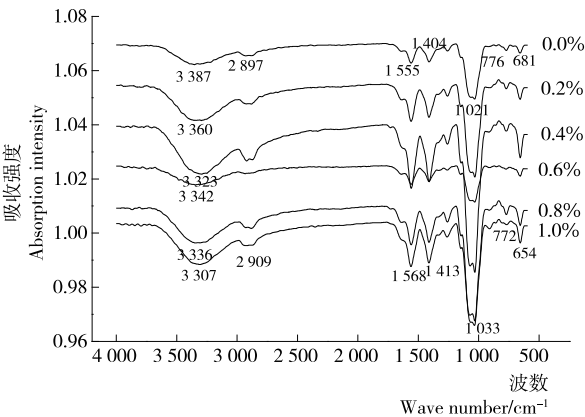
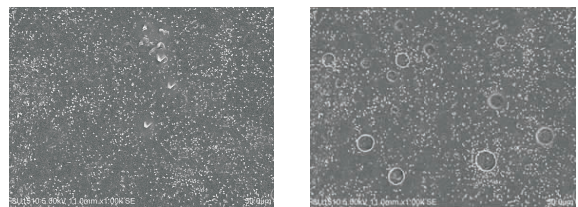


图 1 复合膜红外光谱图

Figure 1 Infrared spectrum of different content of clove oil composite film

2.3 微观结构分析

由图 2 可知,掺入丁香精油和氧化锌的薄膜中,表面结构粗糙度比空白膜的明显。粗糙度的增加可能是由于氧化锌以及整个膜基质中的丁香精油液滴的分布,与体积分数 0.6% 丁香精油结合的壳聚糖—魔芋葡甘聚糖薄膜显示出油相和基材相之间的相分离。丁香精油在基材表面观察到其形状像空心腔,是由于纳米复合膜中存在的丁香精油的疏水性导致的,高含量低密度的丁香精油可定位在薄膜的上表面,从而形成微囊结构。具有疏水



(a) 空白膜 (b) 0.6% 丁香精油

图 2 6% 纳米氧化锌复合膜的微观结构

Figure 2 Microstructure of 6% nano zinc oxide composite film

性质的丁香精油保留并定位在基质内,能阻碍水分子通过薄膜转移,表明丁香精油可防止水分吸附,有助于降低薄膜的水蒸气透过率^[10]。在与精油结合的壳聚糖—魔芋葡甘聚糖薄膜中观察到纳米氧化锌的分散性增强的现象,其在机制中均匀分布,未出现团聚现象,有利于维持复合膜结构,可能是由于纳米粒子可以有效地吸附在油与水之间的界面上。

2.4 鲜肉保鲜试验

2.4.1 色差 由表 2 可知,对照组在贮藏期间的 L^* 值、 a^* 值均低于 CL-0、CL-6 组的, b^* 值均显著高于 CL-0、

CL-6 组的。对照组 L^* 值随贮藏时间的增加而降低,甚至更加明显,由于光的扩散减少,使肉表面过量的水蒸发导致颜色变暗。对照组 a^* 值的显著变化可能是由于脂质氧化和微生物腐败作用。贮藏过程中乳酸菌产生的过氧化氢积累,导致肉制品颜色变化^[11]。CL-6 组样品显示出较低的颜色值变化,是因为添加纳米氧化锌和丁香精油的复合膜具有强的抗氧化和抗微生物性质。结果表明,将纳米氧化锌和植物精油掺入壳聚糖—魔芋葡甘聚糖膜中可以增强膜的抗氧化和抗菌性能,从而保持鲜肉样品的质量。

表 2 鲜肉色差随贮藏时间的变化

Table 2 Variation of color difference of fresh meat with time

贮藏时间/d	L^*			a^*			b^*		
	对照组	CL-0	CL-6	对照组	CL-0	CL-6	对照组	CL-0	CL-6
0	52.93	52.93	52.93	5.19	5.19	5.19	3.19	3.19	3.19
2	50.26	50.83	51.22	4.43	4.72	4.65	5.26	4.30	3.77
4	49.40	48.67	50.28	4.20	4.35	4.43	4.85	4.44	4.47
6	47.16	49.49	50.34	3.66	4.06	4.26	4.84	4.22	4.67
8	48.79	48.71	50.44	2.39	3.62	3.52	5.22	4.14	4.15
10	46.84	48.10	51.36	2.63	3.74	3.85	6.06	5.34	5.02
12	45.43	49.36	50.17	3.02	3.84	4.03	6.59	6.03	5.81
14	44.52	46.55	49.29	3.20	3.75	4.22	6.92	5.73	5.50

2.4.2 pH 由图 3 可知,鲜肉初始 pH 为 5.81,主要是由糖原基被分解为乳酸造成的,与 Hu 等^[12]报道的 5.97 相当接近;贮藏至第 8 天时,对照组 pH 逐渐增加至 7,可能是由于需氧细菌的增殖所致;将 CL-0、CL-6 抗菌膜应用于猪肉表面时,可显著降低 pH 的增加速度,尤其是 CL-6 膜对 pH 值的增加速度影响更为显著。对照组第 4 天 pH 达 6.56,为次鲜肉,CL-0 组第 8 天 pH 为 6.32,为次鲜肉;经 CL-6 复合膜处理过的样品的 pH 在 0~8 d 略微增加,第 12 天 pH 为 6.27(变为次鲜肉),pH 增加幅度变大。基于纳米氧化锌和丁香精油的膜的抗微生物效力可解释包

裹样品的较低 pH。

2.4.3 菌落总数 由图 4 可知,鲜肉初始菌落总数为 3.7 lg CFU/g,表明肉中存在微生物,可能是在切片制备或是包装等过程中被污染。贮藏 0~4 d,对照组(PE 膜包装)菌落总数急剧增加,且第 4 天时超过 6 lg CFU/g(鲜肉的可接受上限),已开始腐败变质;CL-0 组菌落总数略低于对照组,对细菌生长有一定抑制作用,贮藏至第 4 天时细菌总数为 4.27 lg CFU/g,为次鲜肉;CL-6 组贮藏至第 6 天时仍处于新鲜肉范围内,第 8~14 天为次鲜

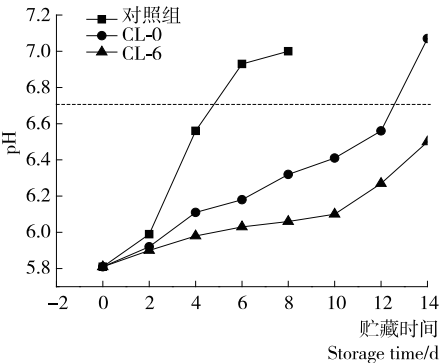


图 3 鲜肉 pH 值随贮藏时间的变化
Figure 3 pH value of the meat sample

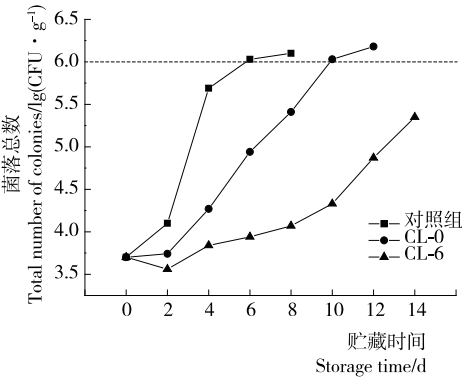


图 4 鲜肉菌落总数随贮藏时间的变化
Figure 4 The logarithm of the total number of colonies of the meat sample varies with storage time

肉(第 14 天时细菌总数为 $5.35 \lg \text{CFU/g}$),较空白组延长保鲜 6~8 d。因此,纳米氧化锌和丁香精油可显著抑制食物腐败微生物的生长,保持肉质质量。

2.4.4 挥发性盐基氮(TVB-N) 由图 5 可知,CL-6 组 TVB-N 值在贮藏期间含量较低。贮藏过程中,所有样品 TVB-N 值持续增加,但添加纳米氧化锌和丁香精油的复合膜的增长速率最小,归因于细菌群体数量的快速减少或细菌对非蛋白质氮化合物的氧化脱氧能力的降低或两者的氧化脱氮能力的降低^[13]。空白组贮藏至第 2 天时 TVB-N 值为 $18.2 \text{ mg}/100 \text{ g}$,为次鲜肉,第 4 天为 $22.4 \text{ mg}/100 \text{ g}$,已腐败变质。CL-0 组贮藏至第 4 天时 TVB-N 值为 $16.6 \text{ mg}/100 \text{ g}$,第 8 天为 $20.1 \text{ mg}/100 \text{ g}$,已腐败变质。CL-6 组贮藏至第 14 天时 TVB-N 值为 $23.5 \text{ mg}/100 \text{ g}$,较对照组和空白组,可延长保鲜 6~8 d,表明 CL-6 膜中组分具有减少蛋白质分解及含氮物质释放的作用。故添加纳米氧化锌和丁香精油的抗菌薄膜具有优异的耐腐性,可延长鲜肉保质期。

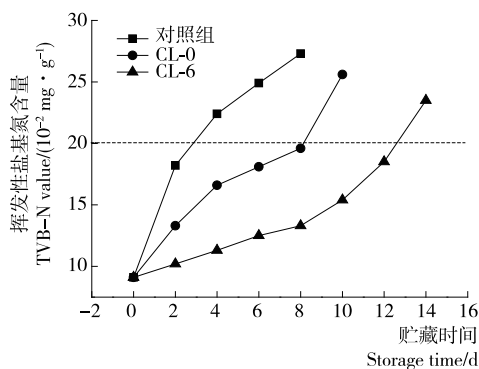


图 5 肉样的挥发性盐基氮含量随贮藏时间的变化

Figure 5 Total number of TVB-N value of meat samples

3 结论

将纳米氧化锌和丁香精油作为抗菌剂,添加至壳聚糖—魔芋葡甘聚糖基膜中,通过流延法制备抗菌复合膜。当丁香精油浓度达 0.6%(体积分数)时,制备的复合膜对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌具有很强的抗菌作用,表明丁香精油和纳米氧化锌在抗菌方面具有很好的协同作用。在鲜肉保鲜试验中,综合各指标发现,PE 膜对鲜肉的保质期为 4 d 左右,无抗菌剂的空白复合膜保质期为 6~8 d,添加质量分数 6% 纳米氧化锌和体积分数 0.6% 丁香精油的复合膜的鲜肉保质期超过 14 d,该抗菌膜可提高鲜肉保质期 6~8 d,可有效用于鲜肉保鲜。试验以丁香精油为抗菌剂添加到复合膜中,达到了很好的抗菌效果,但丁香精油本身具有挥发性,需进行模拟试验以确定其释放规律。

参考文献

- [1] COMA V, DESCHAMPS A, MARTIAL-GROS A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer: Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(9): 2 788-2 792.
- [2] SANUJA S, AGALYA A, UMAPATHY M J. Synthesis and characterization of zinc oxide-neem oil-chitosan bionanocomposite for food packaging application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74(3): 76-84.
- [3] 吴佳. 普鲁兰壳聚糖复合可食用膜的性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 1-6.
- [4] 唐汝培, 杜予民, 郑化, 等. 壳聚糖/羧甲基魔芋葡甘聚糖共混膜[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2001, 47(6): 721-724.
- [5] 高婧婷. 壳聚糖—氧化锌复合抗菌敷料的制备及其生物活性[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2015: 1-16.
- [6] ESPITIA P J P, SOARES, NILDA DE FÁTIMA FERREIRA, et al. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(5): 1 447-1 464.
- [7] PADMAVATHY N, VIJAYARAGHAVAN R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles: An antimicrobial study[J]. Sci Technol Adv Mater, 2008, 9(3): 1 891-1 901.
- [8] LOPEZ P, SANCHEZ C, BATLLE R, et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(17): 6 939-6 946.
- [9] SANUJA S, AGALYA A, UMAPATHY M J. Studies on magnesium oxide reinforced chitosan bionanocomposite incorporated with clove oil for active food packaging application[J]. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2014, 63(14): 733-740.
- [10] ZHANG Le, LIU An-jun, WANG Wen-hang, et al. Characterisation of microemulsion nanofilms based on tilapia fish skin gelatine and ZnO nanoparticles incorporated with ginger essential oil: Meat packaging application[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(7): 1 670-1 679.
- [11] JABERG T B, HAUGUM M, MURMI M. Studies on discoloration of Norwegian salami[J]. Food Science and Technology, 1970, 2(3): 871-877.
- [12] HU Jing, WANG Xu-ge, XIAO Zuo-bing. Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 519-526.
- [13] WEN Jiao-fan, YUAN Long-chi, SHUO Zhang. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice[J]. Food Chem, 2008, 108(1): 148-153.