

抗菌蛋白膜的包装性能及 抑菌性能的研究

黄志英, 雷 桥*, 包建强, 寻倩男, 张玉亭
(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 以前期均匀实验设计得出的最优配方(5%乳清分离蛋白(WPI)、2%酪蛋白酸钠(NaCas)和50%甘油)为成膜材料,在此基础上,向成膜溶液中添加不同浓度(0、0.025、0.05、0.075、0.1g/200mL)的乳酸链球菌素(Nisin)制备抗菌蛋白膜,研究Nisin对复合蛋白膜的包装性能及抑菌性能的影响。结果表明,Nisin与WPI-NaCas复合膜有较好的相容性,Nisin的添加提高了复合蛋白膜的抗张强度和断裂伸长率,降低了其水蒸气透过系数,但不影响膜的热封温度(145℃)。随着Nisin浓度的提高,膜的耐热性能随之增大。载Nisin的WPI-NaCas复合膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有较强的抑制作用。

关键词: 抗菌蛋白膜, 乳酸链球菌素, 包装性能, 抑菌性能

Study on packaging performance and antimicrobial properties of antibacterial composite protein films

HUANG Zhi-ying, LEI Qiao*, BAO Jian-qiang, XUN Qian-nan, ZHANG Yu-ting

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The composite protein film-forming materials contained 5% whey protein isolate (WPI), 2% sodium caseinate (NaCas) and 50% glycerol, which was the optimal formula obtained by uniform design method of previous work. The packaging performance and antimicrobial properties of WPI-NaCas composite protein films were discussed by addition of Nisin at different concentrations (0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1g/200mL) in film-forming solution. Results showed that Nisin and composite protein films showed good compatibility. Addition of Nisin could improve tensile strength and elongation at break of the composite protein films and decrease WVP values of the films, with no effect on the sealing temperature of antibacterial protein films. The increase of Nisin caused the improvement of heat resistance of the films. And incorporation of Nisin had antimicrobial activity against both *E. coli* and *S. aureus*.

Key words: antibacterial protein films; Nisin; packaging performance; antimicrobial properties

中图分类号: TS206.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)06-0288-04

抗菌蛋白膜是一种新型、可以取代塑料、无污染的、可用于食品的包装材料,它有能力延缓水分、氧气、香味和溶质传递,并且在医药、食品等领域得到广泛开发与利用^[1-4]。乳清分离蛋白因其良好的营养特性及成膜的能力,能形成柔软、有弹性的薄膜,而且对氧气、芳香物质和油脂具有良好的阻隔性^[5]。酪蛋白、酪蛋白酸盐具有其独特的疏水性,采用其作为可食性膜的原料,能降低膜的吸湿能力^[6]。当在成膜溶液中添加食品添加剂(如抗氧化剂、抗菌剂等),能更好地延长食品的保质期^[7]。Nisin是一种安全公认的食品添加剂,因为其能够很好地抑制大部分革兰氏

阳性菌,而且当在特定条件下Nisin也能抑制革兰氏阴性菌,因此已被50多个国家和地区批准使用^[8-11]。Ramos等^[12]以乳清分离蛋白作为基体材料,甘油作为增塑剂,并在成膜溶液中添加壳寡糖、乳酸和苯甲酸钠,结果发现,乳酸和壳寡糖的组合能产生最大的抑菌效应。Sivaroban等^[13]将葡萄籽提取物(1%)、乳酸链球菌素(10,000IU/g)和EDTA(0.16%)添加到大豆分离蛋白的成膜溶液中,结果发现李斯特杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌的生长分别减少了2.9、1.8、0.6lg CFU/mL。

前期均匀实验设计研究得出由5%乳清分离蛋白、2%酪蛋白酸钠和50%甘油复合制备而成的蛋白膜,成膜性好,有良好的机械性能(抗张强度为3.56MPa,伸长率为48.9%)、光学性能(透明度为92.0%,雾度为22.72%)和阻湿性能(水蒸气透过系数为 $2.626 \times 10^{-13} \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$),能够替代部分塑料。本实验在均匀实验设计方法制备乳清分离蛋白-酪蛋

收稿日期:2013-09-13 * 通讯联系人

作者简介:黄志英(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品工程与包装技术。

基金项目:上海高校知识服务平台上海海洋大学水产动物遗传育种中心(ZF1206)。

白酸钠复合膜的基础上,在成膜溶液中添加Nisin研制抗菌蛋白膜,旨在为抗菌蛋白膜的研制及使用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳清分离蛋白 美国Hilmar公司,蛋白>92.0%,脂肪<1.8%,乳糖<1.0%,灰分<3.5%;酪蛋白酸钠 新西兰MG公司,92.9%蛋白;甘油 国药试剂集团,分析纯;Nisin 浙江银象生物工程有限公司,生物效价>1000IU/mg,食品级;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 由农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海)提供。

YP202N型电子天平 上海精密科学仪器有限公司;DF-101S型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-A型循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司;GX-ZGF101型恒温鼓风干燥箱 上海贺德实验设备有限公司;GDS-100L型恒温恒湿箱 索亚特实验设备有限公司;DCP-KZ300型电脑测控抗张实验机 四川成都名驰仪器有限责任公司;PERMATRAN-W1/5水蒸气透过率测试仪 美国膜康有限公司;0~25mm电子数显螺旋测微仪 桂林广陆数字测控有限责任公司;HPX-9052 MBE型数显电热培养箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;热封测试仪 广州标际包装设备有限公司;TG NETZSCH 209 F3型热重分析仪 德国耐驰仪器制造有限公司;S3400N型扫描电镜 Hitachi(日立)公司。

1.2 实验方法

1.2.1 成膜工艺流程 a.将5g乳清分离蛋白加入到100mL去离子水中,在常温下搅拌2h使其充分溶解,再将此溶液置于85℃水浴30min,使蛋白变性,制得乳清分离蛋白溶液,冷却备用。b.将2g酪蛋白酸钠加入到100mL去离子水中,在常温下搅拌2h使其充分溶解,再将此溶液置于85℃水浴30min,使蛋白变性,制得酪蛋白酸钠溶液,冷却备用。c.将乳清分离蛋白溶液与酪蛋白酸钠溶液以1:1的体积比混合,添加50%(占总物质百分比)甘油,再分别加入不同浓度的Nisin(0、0.025、0.05、0.075、0.1g/200mL)^[14],常温下搅拌1h,使其充分混合,制得抗菌蛋白膜溶液。d.用真空泵排气。e.采用流延法成膜,55℃干燥5h后,置于25℃、50% RH的恒温恒湿箱中平衡48h后,再进行性能测试^[15]。

1.2.2 微观结构 采用S3400N扫描电镜观察膜横截面的微观结构,并得到薄膜表面的图形,仪器的加速电压为5.0千伏^[16]。

1.2.3 性能测定方法

1.2.3.1 膜厚度的测定 任选五个点,并用电子数显螺旋测微仪测试,并取其均值。厚度值是用于抗张强度、水蒸气透过率等性能测试的计算。

1.2.3.2 机械性能的测试 根据ASTM-09^[17],将膜裁切成长90.00mm,宽15.00mm的长条,用电脑测控抗张实验机测试抗张强度(TS)和断裂伸长率(E)。设定

夹距50mm,速度500mm/min,抗张强度由 $TS=F/S$ 计算得到,其中TS为抗张强度(MPa),F为膜断裂时承受的最大张力(N),S为膜的横截面积(m²)。每个样品测3次,取其平均值。

1.2.3.3 水蒸气透过率测定 根据ASTM E398^[18],采用PERMATRAN-W1/5透湿仪测试在膜的两侧相对湿度为10%/100%下膜的水蒸气透过率,水蒸气透过系数由 $WVP=WVTR \times n / \Delta p$ 计算得到,其中,WVP为水蒸气透过系数(g·m⁻¹·s⁻¹·Pa⁻¹),WVTR是通过透湿仪测试得到的水蒸气透过量,n为膜的厚度,Δp为气体的输出压力,为0.20MPa。每个样品测3次,取其平均值。

1.2.3.4 热封性能测试 采用热封测试仪测定薄膜的热封温度^[19],将试样置于上下热封头之间,在预先设定的温度、压力、时间下,完成试样的封口,测定其热封温度。

1.2.3.5 热重分析 采用NETZSCH TG209F3热重分析仪测试,将3.0~5.0mg样品置于Al₂O₃坩埚,测量温度范围为35℃到850℃,升温速率为10℃/min,为避免热氧化反应将氮气作为载体^[20]。

1.2.4 膜的抗菌效果的测定 用切刀将膜裁成直径为16.00mm大小的圆片,贴在均匀涂布了两种受试菌种菌悬液的琼脂培养基的表面(该过程在无菌条件下操作),将培养皿倒置培养于37℃恒温培养24h,观察膜表面菌体生长现象^[21],并记录抑菌圈的直径。

2 结果与讨论

2.1 扫描电镜分析结果

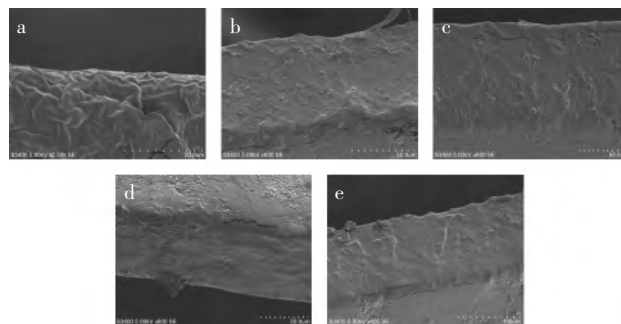


图1 添加Nisin的WPI-NaCas复合膜的微观结构图

Fig.1 Scanning electron microscopy(SEM) of WPI-NaCas films with different Nisin

注 a~e中Nisin的添加量分别为0、0.025、0.05、0.075、0.1g/200mL。

图1是不同浓度Nisin对复合膜的扫描电镜的微观结构图。由图1可知,所有的薄膜表面光滑均匀,无气孔或者裂缝。与未添加Nisin的膜相比,添加Nisin的薄膜表面的结构更紧凑。这可能是因为Nisin与蛋白膜分子内和分子间发生了交联作用,这说明Nisin与WPI-NaCas的相容性较好。

2.2 Nisin对复合蛋白膜机械性能及水蒸气透过率的影响

表1为Nisin对复合蛋白膜机械性能及水蒸气透过率的影响。由表1可知,与对照组相比,Nisin的加入,TS增大,E也增大。成膜溶液中不添加Nisin,膜的

抗张强度为3.56MPa,伸长率为48.9%。当Nisin的添加量为0.05g时,抗菌蛋白膜的抗张强度最大,为4.92MPa,比未添加Nisin的膜的抗张强度增加了38.2%;当Nisin的添加量为0.075g时,抗菌蛋白膜的伸长率最大,为65.7%,比未添加Nisin的膜的伸长率增加了34.3%。

表1 Nisin对复合蛋白膜机械性能及水蒸气透过率的影响

Table 1 Effect of Nisin on the mechanical properties and water vapor permeability of the composite protein films

Nisin的添加量 (g/200mL)	厚度 (mm)	抗张强度 (MPa)	伸长率 (%)	水蒸气透过系数 ($\times 10^{-13} \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)
0.000	0.127	3.56	48.9	2.626
0.025	0.126	3.64	60.1	0.936
0.050	0.119	4.92	49.4	0.887
0.075	0.125	3.72	65.7	0.924
0.100	0.118	3.62	52.6	0.973

由此表明,添加Nisin对复合蛋白膜能起到增强和增韧的作用。这可能是因为Nisin添加适量时,在复合蛋白膜中分散均匀,并与蛋白质的无定形区域肽链侧链产生相互作用。从而增强复合蛋白膜的抗张强度和断裂伸长率。

由表1可知,与对照组相比,Nisin的加入,膜的水蒸气透过系数降低。成膜溶液中不添加Nisin,膜的水蒸气透过系数为 $2.626 \times 10^{-13} \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ 。当Nisin的添加量为0.05g时,抗菌蛋白膜的水蒸气透过系数最低,为 $0.887 \times 10^{-13} \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$,比未添加Nisin的膜的水蒸气透过系数降低了66.2%。但是当继续增加Nisin的添加量至0.075、0.1g时,抗菌蛋白膜的水蒸气透过系数又缓慢回升,分别为 0.924×10^{-13} 、 $0.973 \times 10^{-13} \text{g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ 。

由此表明,添加Nisin能降低复合蛋白膜的水蒸气透过系数。这可能是因为Nisin是疏水性多肽,适当的添加量(0.05g/200mL)有助于扩大分子间的相互作用,使复合蛋白膜致密均匀,能防止水分通过膜,从而降低了薄膜的水蒸气透过系数。但是随着Nisin的添加量的继续增加,复合蛋白膜的结构紧实性可能有所松动,水分通过膜有所增强,使得薄膜的水蒸气透过系数略微回升。

2.3 薄膜热封性能

Nisin的加入不会影响膜的热封温度,为145℃,抗菌蛋白膜的热封温度高于普通PE膜,低于蒸煮袋(PE膜的热封温度为120℃,蒸煮袋的热封温度为150~160℃)。

2.4 热重分析结果

图2是不同浓度Nisin对复合膜的热重分析图,由图2可知,膜的质量损失主要出现在三个阶段。第一阶段的质量损失在35~180℃之间,膜的质量损失了14.03%,可能是因为膜的游离水的损失。第二阶段的质量损失出现在温度约为180~420℃之间,其降解速率最大,膜的质量损失了74.08%,可能是因为甘油化合物(沸点约为289℃)和游离水的损失。第三阶段的

质量损失出现在420~560℃,占膜总量的5.75%。而当温度大于600℃时,膜的热分解更稳定,可能因为加热过程中产生的交联反应。由热重分析图可以看出,抗菌蛋白膜在低于150℃的条件下质量损失较小,比较稳定,适合使用。而且随着Nisin浓度的增加,膜的耐热性能也逐渐增大。

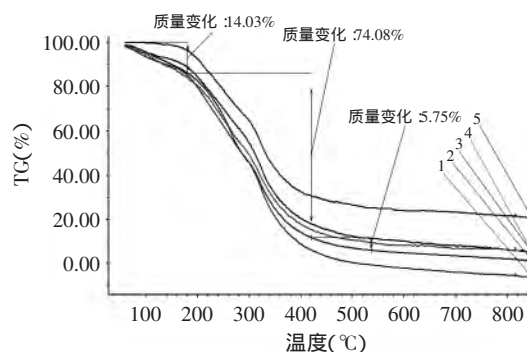


图2 添加Nisin的WPI-NaCas复合膜的热重分析图

Fig.2 TGA curves of WPI-NaCas films with different Nisin
注:1~5中Nisin的添加量分别为0、0.025、0.05、0.075、0.1g/200mL。

2.5 Nisin对受试菌种的抑菌效果

表2 Nisin对受试菌种的抑菌作用

Table 2 Effect of antimicrobial activity of Nisin against bacteria tested

Nisin的添加量 (g/200mL)	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌	
	抑菌圈 直径(mm)	表面生长 状况	抑菌圈 直径(mm)	表面生长 状况
0.000	0	++	0	++
0.025	20.00(0.07)	-	22.20(3.15)	-
0.050	24.40(3.28)	-	28.60(1.57)	-
0.075	28.50(0.75)	-	30.30(0.58)	-
0.100	30.00(1.25)	-	30.20(0.36)	-

注:表中值为三次实验平均值,括号内的值为标准偏差,“-”表示无菌生长,“+”表示菌体生长较弱,“++”表示菌体生长较强。

表2为不同浓度的Nisin对受试菌种的抑菌作用的影响,由表2可知,在成膜溶液中不添加Nisin,膜是没有抑菌作用,载入Nisin的抗菌膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有抑制作用,这与前人的研究结果(Nisin能够很好地抑制大部分革兰氏阳性菌,但是不能抑制革兰氏阴性细菌)^[22]相矛盾,但将Nisin单独加入蛋白膜中是否对大肠杆菌有抑制作用的研究很少,这可能是因为Nisin加入,使蛋白质的空间结构发生变化,从而使大肠杆菌菌体蛋白质减少。随着Nisin浓度的增加,膜对两种菌的抑制作用都增强。当在成膜溶液中添加0.025g Nisin时,膜对大肠杆菌的抑菌圈直径为20.00mm,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为22.20mm;当Nisin的添加量增加到0.1g时,膜对大肠杆菌的抑菌圈直径为30.00mm,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为30.20mm。由表2可知,随着Nisin浓度的增大,抑菌效果也更好。因此通过抑菌实验,可以判定Nisin-复合蛋白膜具有抑

菌作用。

3 结论

Nisin与WPI-NaCas复合蛋白膜相容性较好,与对照组相比,组织更加致密。抗菌蛋白膜的TS增大,E增大,WVP降低。抗菌蛋白膜的热封温度为145℃,适用温度小于150℃。

抗菌蛋白膜对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制作用,并且随Nisin浓度的增加而增强。

参考文献

- [1] Gennadios A, Weller C L. Edible films and coatings from wheat and corn proteins[J]. Food Technology, 1990, 44(10): 63-69.
- [2] 武莹滢. 大豆分离蛋白的碱性蛋白酶酶解条件研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 141-143.
- [3] 李丽杰, 王越男, 李艳辉. 可食性复合膜的制备及其在羊肉保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 317-320.
- [4] 黄志英, 雷桥, 包建强, 等. 蛋白薄膜包装性能的研究进展[J]. 包装工程, 2013, 34(15): 146-151.
- [5] 王芳, 张兰威. 乳清蛋白可食性膜的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2007(3): 109-112.
- [6] 寻倩男, 雷桥, 包建强, 等. 明胶-酪蛋白酸钠可食性膜的包装性能研究[J]. 包装工程, 2013, 34(15): 40-45.
- [7] Rico-Pena DC, Torres JA. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid films: water activity and pH effects[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(2): 497-499.
- [8] 丛建民. Nisin在草莓保鲜中的应用研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 131-133.
- [9] Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(8): 859-865.
- [10] 张国只, 陈林海, 杨天佑, 等. 琼脂扩散法等测定乳链菌肽校价的优化[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 175-178.

[11] 吴琼. 乳酸菌肽测定方法的研究[J]. 食品科学, 1999(6): 56-59.

[12] Ramos, OL, Santos, AC, Leao, MV, et al. Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents[J]. International Dairy Journal, 2012, 25(2): 132-141.

[13] Sivarooan, T, Hettiarachchy, NS, Johnson, MG. 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.

[14] Pranoto, Y, Rakshit, SK, Salokhe, VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(8): 859-865.

[15] 陈桂云, 雷桥. 海藻酸钠对可食性复合膜性能的影响研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 400-403.

[16] Ghasemlou, M, Khodaiyan, F, Oromiehie, A. Physical, mechanical, barrier and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefirin[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 477-483.

[17] ASTM, D882-09. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting[S]. 2009.

[18] ASTM, E398. Standard test method for water vapor transmission rate of sheet materials using dynamic relative humidity measurement[S]. 2003.

[19] Chen, GY, Lei, Q. Research on preparation and properties of edible composite protein films[J]. Applied Mechanics and Manufacturing Technology, 2011, 87: 213-222.

[20] Mu, CD, Guo, LM, Li, XY, et al. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27: 22-29.

[21] 平川, 王昆, 马玲. 乳清蛋白可食用膜抑菌性、溶解性的研究[J]. 肉类工业, 2012(6): 35-37.

[22] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008(9): 87-91.

(上接第287页)

[4] Raphael M J, Downmore M, Rutendo M. An evaluation of utility of *Jatropha curcas* L. as a source of multiple energy carriers[J]. International Journal of Engineering, Science and Technology, 2010, 2(7): 115-122.

[5] 李育川, 郭巧生, 房海灵, 等. 小桐子果壳抑菌活性部位的分离及HPLC-MS分析[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1445-1448.

[6] 李育川, 耿开友, 王海燕, 等. 麻疯树果壳正丁醇相抑菌活性部位的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(3): 275-277.

[7] 王娟, 蒋文举, 李莎璐. 微波活化制备麻疯树果壳活性炭研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(6): 69-71.

[8] H Hidayat, E R P Keijsers. Preparation and properties of binderless boards from *Jatropha curcas* L. seed cake[J]. Industrial crops and products, 2014, 52: 245-254.

[9] Yao L C, Han C R, Chen G Y, et al. A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L.[J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1318-1321.

[10] 张婷婷, 马博, 李荣峰, 等. 桂西野生蕨菜黄酮提取工艺优化研究[J]. 北方园艺, 2013(16): 163-165.

[11] 徐向宏, 何明珠. 实验设计与Design-Expert, SPSS应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 146-157.

[12] Mihaela B, Rodica O, Dana M, et al. Thermal stability of new vanadyl complexes with flavonoid derivatives as potential insulin-mimetic agents [J]. J Therm Anal Calorim, 2010, 99(3): 823-827.

[13] 张玉香, 屈慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 33-37.