

壳聚糖双胍盐酸盐涂膜保鲜砂糖橘及其抑菌作用的研究

傅夏兵¹, 陈佳阳¹, 罗永祥¹, 乐学义^{1,2}

(华南农业大学理学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学生物材料研究所, 广东 广州 510642)

摘要:研究了壳聚糖双胍盐酸盐(CGH)对柑橘绿霉菌和柑橘青霉菌的抑菌能力,并通过涂膜的方法处理砂糖橘,测定了贮藏过程中果实失重率、可溶性固形物含量(TSS)、维生素C(Vc)含量及总酸含量(TA)的变化。结果表明,与壳聚糖(CTS)比较,CGH对柑橘绿霉菌和柑橘青霉菌具有较强的抑菌能力,当CGH浓度为0.4 mg/mL和5.0 mg/mL时,可分别完全抑制柑橘青霉菌和柑橘绿霉菌的生长;质量浓度为2%的CGH涂膜处理的砂糖橘在28(±2)℃下存放27 d后,失重率仅为2.25%,TSS为13.7%,Vc含量为每100 g砂糖橘鲜重含有15.01 mg、可滴定酸含量为0.85%。与对照相比,CGH涂膜较好地保持了果实的品质。

关键词:壳聚糖双胍盐酸盐;砂糖橘;保鲜;抑菌作用

中图分类号:S609.3;S667.2

文献标识码:A

文章编号:1004-874(2013)23-0099-04

Effects of chitosan biguanidine hydrochloride coating on storage quality of *Citrus reticulata* and its antimicrobial activities

FU Xia-bing¹, CHEN Jia-yang¹, LUO Yong-xiang¹, LE Xue-yi^{1,2}

(1. College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute for Biomaterial Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The antimicrobial activities of chitosan biguanidine hydrochloride (CGH) were investigated against *Citrus green mold* and *Citrus Penicillium*, respectively. Relation between variation and storage time of *Citrus reticulata* mass-loss ratio, total soluble solid, Vc content and soluble acid content was examined attentively after fresh-keeping process with CGH as coating film. CGH could completely inhibit the growth of *Citrus Penicillium* and *Citrus green mold* at 0.4 mg/mL and 5.0 mg/mL, respectively. CGH with concentration of 2% coating on *Citrus reticulata* showed a better preservation effect after 27 d storage under 28 ± 2°C. The mass-loss, total soluble solid, Vc content and soluble acid content of *Citrus Reticulata* were 2.25%, 13.7%, 15.01 mg/100g, and 0.85%, respectively.

Key words: chitosan biguanidine hydrochloride; *Citrus reticulata*; fresh-keeping; antibacterial activity

砂糖橘(*Citrus reticulata*)是原产于广东四会市的特优柑橘品种,其果实味甜如砂糖,因此被称为砂糖橘,是一种深受消费者欢迎且经济价值较高的水果。砂糖橘果皮薄而脆嫩,含水量高,易受机械损伤和微生物侵染,给广大果农和果商造成了严重的经济损失。如何防止贮藏期间砂糖橘的各种病害,延长贮藏时间成为了一个重要课题^[1]。目前,化学防腐剂在柑桔贮藏生产上普遍使用,但其多有毒害残留,对人体健康也有一定

的不利影响^[2-3]。

壳聚糖(CTS)属于天然高分子化合物,无毒、可生物降解,理化性能相对稳定,具有成膜性和抗菌性,已被广泛应用于水果保鲜中^[4-5]。但是在对壳聚糖涂膜的研究和应用中发现,因在整个大分子链上有较高密度的分子内和分子间氢键,壳聚糖不溶于水也不易溶于碱溶液,只溶于小部分有机酸溶液,而且壳聚糖膜湿态机械强度较差,膜的强度、韧性不够,透水率高等,导致它在应用上受到极大限制^[6]。然而,当将具有抑菌作用的小分子基团接枝到壳聚糖分子骨架上时,既能改善壳聚糖的水溶性又能增强其抗菌性,并能防止小分子抑菌剂对人体产生毒害作用^[7]。本文采用具有广谱抗菌作用的双胍基^[8]接枝到壳聚糖结构单元上所制得的高分子化合物壳聚糖双胍盐酸盐(CGH)作为试验材料,研究其对柑橘绿霉菌和柑橘青霉菌的抑菌能力,以

收稿日期:2013-07-23

基金项目:广东省科技计划项目(2011B020310005);华南农业大学211工程基金(2009B010100001)

作者简介:傅夏兵(1987-),男,在读硕士生,E-mail:xbf200805@163.com

通讯作者:乐学义(1961-),男,博士,教授,E-mail:lexy@scau.edu.cn

及对砂糖橘的涂膜保鲜作用,为开发新型砂糖橘涂膜保鲜材料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

砂糖橘购自广州市果树科学研究所砂糖橘果场;壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 85\%$),山东奥康生物科技有限公司;壳聚糖双胍盐酸盐为自制,经元素分析测定其接枝率为 50.5% ;柑橘绿霉菌(*Citrus green mold*)和柑橘青霉菌(*Citrus Penicillium*)由华南农业大学资源环境学院提供;2,6-二氯酚靛酚钠盐为生物纯,草酸为优级纯,无水乙醇、氢氧化钠、冰乙酸、抗坏血酸均为分析纯。

DDS-12A型电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;PR- α 型数显折光仪,日本 ATAGO 公司;SW-CI-IF型洁净工作台,上海博迅实业有限公司;LRH-250-S()型微电脑控制恒温恒湿培养箱,广东省医疗器械厂。

1.2 试验方法

1.2.1 CGH的体外抗菌试验 将CTS和CGH分别配制成不同浓度的溶液,用 1 mol/L NaOH溶液调节pH至 $5\sim 6$ 。对于柑橘青霉菌,配制含药品浓度分别为 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 mg/mL 的PDA培养基;对于柑橘青霉菌,配制含药品浓度分别为 1 、 2 、 3 、 4 、 5 mg/mL 的PDA培养基。在已经培养成熟的菌落(真菌PDA培养基)边缘打取直径 5 mm 供试菌饼移入到含药培养基中心, 28°C 恒温培养,待对照组(0 mg/mL)菌落长满平板时,用十字交叉法测量菌落直径,计算抑菌率^[9]。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{D_{\text{空白}} - D_{\text{药品}}}{D_{\text{空白}}} \times 100$$

式中, $D_{\text{空白}}$ 为对照菌落直径, $D_{\text{药品}}$ 为处理菌落直径。

1.2.2 砂糖桔的涂膜处理 制取 0.5% (V/V)壳聚糖乙酸溶液,并用 1 mol/L NaOH溶液调节pH至 $5\sim 6$;用去离子水溶解不同质量的CGH制成质量分数分别为 1.0% 、 2.0% 、 3.0% 的膜溶液^[10],同时调节pH至 $5\sim 6$ 。挑选大小、颜色和成熟度一致的新鲜砂糖橘为样品,随机分成5组,将其中1组作为对照。将上述5组分别浸入制好的壳聚糖乙酸溶液中,静置 3 min ,沥干,分别放入大小相同的篮中,室温($28\pm 2^\circ\text{C}$)下存放。

1.2.3 测试指标 砂糖橘于购买当日分别进行重量、可滴定酸(TA)含量、可溶性固形物(TSS)含量、Vc含量指标的测定,贮藏期间每 3 d 测定1次,每次每组随机抽取果实5个,重复3次。

(1)失重率测定:采用称重法,分别测定待贮存砂糖橘的质量(m_0)与贮存一定时间后的质量(m_t)。

$$\text{失重率}(\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100$$

(2)可滴定酸含量的测定:可滴定酸含量参考文献

[10]方法进行测定。取 10 g 果肉,用研钵磨碎,加已煮沸、冷却、去除 CO_2 的蒸馏水 25 mL ,在沸水浴中提取 30 min ,冷却,过滤,移入 50 mL 容量瓶中,定容至 50 mL ,每次取 10 mL ,加酚酞指示剂2滴,用 0.1 mol/L NaOH标准溶液滴定至微红色在 1 min 内不褪色为终点。

$$\text{酸度}(\%) = \frac{V \times N \times K \times 5}{W} \times 100$$

式中, N 为NaOH标液的摩尔浓度, mol/L ; V 为消耗NaOH标液的体积, mL ; W 为样品用量; K 为换算为适当酸的系数(以苹果酸为标准; $K=0.067$)。

(3)可溶性固形物含量测定:使用PR-32 α 数显折光仪测定可溶性固形物含量。

(4)Vc含量测定:Vc含量采用2,6-二氯酚靛酚法^[11]进行测定。准确称取 10 g 左右砂糖橘,加入 30 mL 2% 草酸,打成浆状,离心,准确吸取上清液 5 mL ,用标定好的2,6-二氯酚靛酚钠盐进行滴定。另取 5 mL 2% 草酸作空白对照滴定。

$$w = \frac{100(V_A - V_B)V_{TA}}{V_S W}$$

式中, w 为 100 g 样品含的Vc毫克数; V_A 为滴定样品所耗用的染料平均体积, mL ; V_B 为滴定空白对照所耗用的染料的平均体积, mL ; V_T 为样品提取液的总体积, mL ; V_S 为滴定时所取样品提取液体积, mL ; A 为 1 mL 染料氧化抗坏血酸量, mg/mL ; W 为待测样品的质量, g 。

1.3 统计方法

每处理3个重复,数据用SPSS软件进行统计,用最低显著性差异法(LSD)进行显著性差异检验($P=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 体外抑菌试验结果分析

柑橘绿霉菌(*Citrus green mold*)和柑橘青霉菌(*Citrus Penicillium*)是水果腐烂致病较为常见的真菌菌种^[12],特别是柑橘类水果,其致腐烂率占柑橘果实总腐烂的 $70\%\sim 80\%$ 。CTS和CGH对柑橘青霉菌及柑橘绿霉菌抑制作用如图1所示。从图1可以看出,CTS和CGH对柑橘青霉菌和柑橘绿霉菌均有抑制作用,相对于CTS,CGH的抑菌活性有所提高。相比之下,CTS和CGH对青霉菌的抑制作用远大于绿霉菌,如当CGH浓度为 0.4 mg/mL 时,就能够 100% 地抑制青霉菌菌丝的生长,而对于绿霉菌,CGH浓度需要 5 mg/mL 。

2.2 涂膜处理对砂糖橘贮藏期间失重率的影响

不同涂膜处理的砂糖橘在贮藏过程中失重率的变化情况如图2所示。从图2可以看出,在所有存放过程中砂糖橘的失重率都呈上升趋势。存放 3 d 内,各组失重率基本相同;第 5 d 开始,空白对照和其他3组涂膜处理的果实失重率开始出现较大的差距。3组的失重率

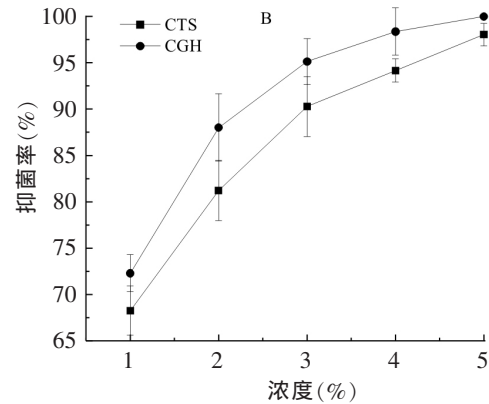
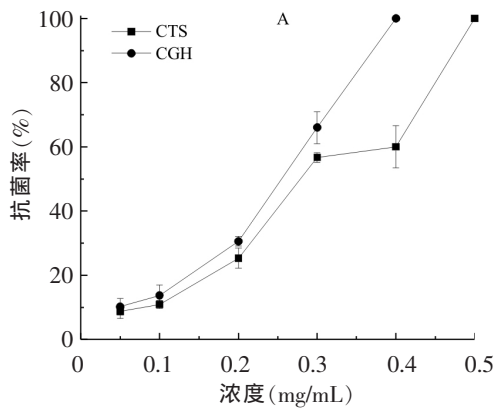


图1 CTS及CGH对柑橘青霉菌(A)和柑橘绿霉菌(B)的抗菌率

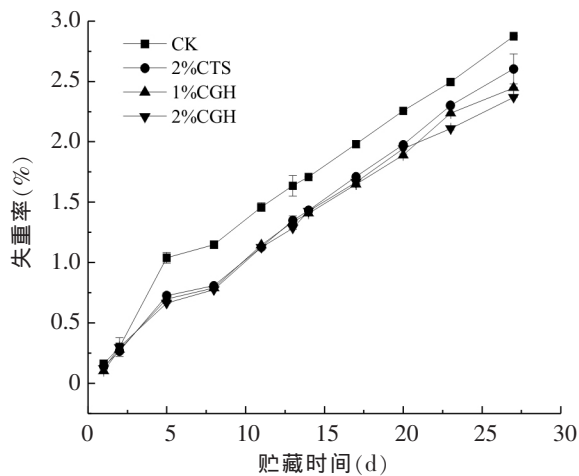


图2 砂糖橘贮藏过程中失重率的变化

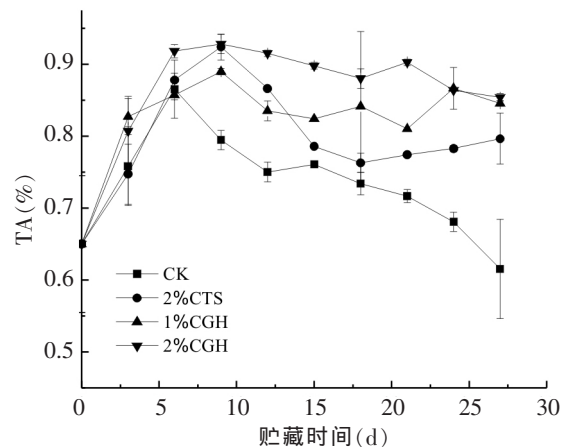


图3 砂糖橘贮藏过程中TA含量的变化

之间在存放的前 21 d 无显著差异, 在后期才出现差别。2% CGH 涂膜的失重率最小, 其 27 d 时的失重率仅为 2.25%, 表明 2% CGH 涂膜能更有效地保鲜砂糖橘。

2.3 涂膜处理对砂糖橘贮藏期间 TA 含量的影响

不同涂膜处理的砂糖橘在贮藏过程中 TA 含量的变化情况如图 3 所示。从图 3 可以看出, 试验中各组砂糖橘 TA 含量总体呈先增加后减少的变化趋势。这可能是由于贮藏前期中, 砂糖橘处理未完全成熟, 部分糖类物质进行有氧分解使有机酸积累; 而贮藏后期果实成熟, 糖含量减少, 并且果实内部含氧量降低, 糖类进行糖酵解, 所以果实内有机酸进一步降解和转化, 导致此时醇、酮和醛类物质增多, 这也是果实贮藏后期风味变淡, 甚至产生异味的原因之一^[13]。试验发现, 空白组果实的 TA 含量变化起伏大, 由刚开始贮藏时的 0.66% 上升到贮藏第 6 d 时的 0.86%, 到第 27 d 降为 0.62%; 2% CGH 涂膜处理的砂糖橘 TA 变化平缓, TA 含量为 0.85%, 表明 2% CGH 涂膜保持 TA 含量的效果最好, 这可能是因为 CGH 涂膜在砂糖橘上, 减缓了果实的新陈代谢过程而有利于果实中营养成分的积累。

2.4 涂膜处理对砂糖橘贮藏期间 TSS 含量变化的影响

TSS 含量变化主要反映了从初期果实成熟过程中糖分积累, 到后期糖分以降解代谢为主的生理过程, 不同涂膜处理的砂糖橘在贮藏过程中 TSS 含量的变化情况如图 4 所示。从图 4 可以看出, 空白对照和 CTS 涂膜砂糖橘的 TSS 含量均呈先上升后下降的趋势, 2 组 CGH 涂膜的样品则呈缓慢上升趋势; 空白对照的砂糖橘中 TSS 先上升到 14.5%, 再下降到 13%, 波动相对比较剧烈; 1% CGH 和 2% CGH 涂膜的橘子 TSS 含量变化较缓, 最终含量保持在 13.8% 和 13.7%。由此可见, CGH 涂膜减缓了果实成熟和新陈代谢的过程。

2.5 涂膜处理对砂糖橘贮藏期间 Vc 含量的影响

不同涂膜处理的砂糖橘在贮藏过程中 Vc 含量的变化情况如图 5 所示。从图 5 可以看出, 各处理的砂糖橘 Vc 含量均随着时间延长而下降。其中, 空白对照的砂糖橘 Vc 含量从第 1 d 的每 100 g 鲜重 23.56 mg 下降到 27 d 时的每 100 g 鲜重 4.64 mg。涂膜保鲜的砂糖橘 Vc 含量下降相对缓慢, 特别是 2% CGH 涂膜处理的砂糖橘在第 27 d 时, 测得 Vc 含量仍高达每 100 g 鲜重 15.01 mg, 这说明 CGH 涂膜有助于砂糖橘贮藏保鲜。

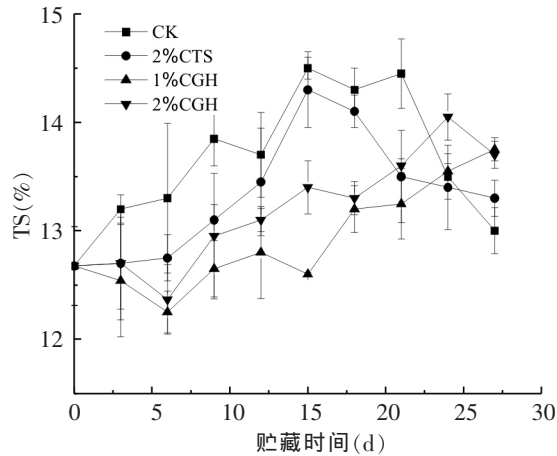


图4 砂糖橘贮藏过程中 TSS 含量的变化

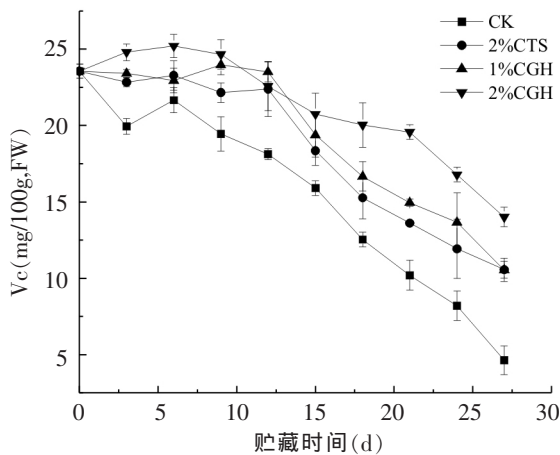


图5 砂糖橘贮藏过程中 Vc 含量的变化

3 结论

砂糖橘汁多味甜、风味极佳,是一类深受消费者欢迎且经济价值较高的水果。然而,砂糖橘也因皮薄而脆嫩,汁多、糖度高,易受机械损伤和微生物侵染,贮藏期相对其他橘类果实较短等特点,易给广大果农和果商带来经济损失。因此砂糖橘的采后保鲜已成为重要研究课题。壳聚糖是一种由甲壳素(Chitin)经过脱乙酰化得到的天然高分子化合物,自然界储量极为丰富,广泛存在于虾、蟹、昆虫的外壳以及真菌和一些藻类的细胞壁中。壳聚糖具有无毒、抑菌、成膜性和生物降解性等优点,尤其是当将具有抑菌作用的小分子基团接枝到壳聚糖分子骨架上时,不仅能改善壳聚糖的物理性能而且能进一步提高其生物活性,在水果保鲜方面显示出良好的应用前景。

本研究测定了具有广谱抗菌作用的双胍基接枝到壳聚糖结构单元上所制得的高分子化合物壳聚糖双胍盐酸盐(CGH)对柑橘绿霉菌和柑橘青霉菌的抑制作用。结果表明,CGH的抑菌活性较CTS强,且随着浓度

增大而加强,对这2种真菌抑制能力大小为柑橘青霉菌>柑橘绿霉菌,在较低浓度下(0.4 mg/mL)即可对柑橘青霉菌的生长达到100%的抑制。另外,通过测定贮藏过程中果实失重率、TSS、Vc含量及TA的变化,发现CGH涂膜对砂糖橘具有显著的保鲜作用,其中以2%CGH涂膜保鲜效果最明显。这种作用主要源于CGH在果实表面形成薄膜,减少了果实中水分的蒸发,较好地调节了果实呼吸气体的转换,有效抑制了外部微生物的入侵,进而减缓果实衰老而达到保鲜效果。

参考文献:

- [1] 江敏,叶夏兰,丘秋洪.壳聚糖-纳米氧化锌复合涂膜保鲜砂糖橘的研究[J].食品工业科技,2012,33(1):348-351.
- [2] Droby S, Chalutz E, Wilson C L. Antagonisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables[J]. Postharvest News and Information, 1991 (2): 169-173.
- [3] Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, et al. Fucoxanthin from edible seaweed *Undaria pinnatifida* shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005,332:392-397.
- [4] 辛颖,陈复生,杨宏顺.壳聚糖涂膜对果蔬质地影响的研究进展[J].食品科技,2009(12):283-286.
- [5] 韦明肖,赖洁玲,钟武,等.壳聚糖和二氧化氯对樱桃番茄联合保鲜效果研究[J].广东农业科学,2012(5):80-84.
- [6] Sajjomsang W. Synthetic methods and applications of chitosan containing pyridylmethyl moiety and its quaternized derivatives: A review[J]. Carbohydr Polym, 2010, 80(3): 631-647.
- [7] 曾涵,赵淑娴,徐江玲,等.壳聚糖-g-N-羧甲基-2-硫代-4,5-2H咪唑啉酮的制备及其抑菌性能[J].应用化学,2009,26(11): 1287-1291.
- [8] Chien P, Sheu F, Yang F. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit[J]. J Food Eng, 2007,78(1):225-229.
- [9] 冯小强,李小芳,杨声,等.壳聚糖金属配合物对黑曲霉的抑制活性研究[J].食品科学,2011,32(3):152-155.
- [10] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997:190-192.
- [11] 江苏省农业科学院.GB/T6195-86 水果、蔬菜维生素C含量测定法(2,6-二氯酚酚滴定法)[S].北京:中国标准出版社,1986.
- [12] Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan[J]. Crop Protection, 2003, 22(2):285-290.
- [13] 于辉,陈海光,梁艳婷.涂膜保鲜对砂糖橘贮藏品质的影响[J].安徽农业科学,2010,38(22):12002-12004.

(责任编辑 刘 翀)