

壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的制备及其对猪肉的保鲜作用

何守魁¹, 刘欣悦², 李慧珍², 王一非^{2*}

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海应用技术大学香料香精化妆品学部, 上海 201418)

摘要: 目的 探究壳聚糖-丁香精油(clove essential oil, CEO)微乳液复合膜对猪肉的保鲜效果。**方法** 首先将丁香精油运载到微乳液中, 然后制备壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜, 并探索复合膜的理化特征及其对猪肉的保鲜作用。**结果** 丁香精油微乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)均为 62.5 $\mu\text{L/L}$, 而纯丁香精油对这两种菌的 MICs 分别为 500 和 125 $\mu\text{L/L}$, 说明微乳液技术提高了丁香精油的抑菌效果。随着添加到壳聚糖薄膜中的微乳液浓度增加(0、0.5%、1.0%、3.0%), 复合膜的厚度、不透明度和色差均不断增加, 而水分活度却逐渐降低。其中, 复合膜的水分活度(0.486~0.536)低于允许微生物生长的最低水分活度(0.610), 说明其适合作为抑菌包装材料。此外, 猪肉保鲜试验结果显示, 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜可以有效抑制猪肉冷藏期间总菌数的增长, 同时较好地延缓猪肉的脂质氧化。**结论** 本研究制备的复合膜理化特征较好, 可用于猪肉的防腐保鲜, 为丁香精油在肉制品保鲜领域的应用奠定了基础。

关键词: 丁香精油; 微乳液; 壳聚糖薄膜; 理化特征; 猪肉保鲜

Preparation and pork preservation application of chitosan films incorporated with clove essential oil microemulsions

HE Shou-Kui¹, LIU Xin-Yue², LI Hui-Zhen², WANG Yi-Fei^{2*}

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2. School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of chitosan films incorporated with clove essential oil (CEO) microemulsions on pork preservation. **Methods** CEO was loaded in a microemulsion system, and this microemulsion was then incorporated into chitosan films. The resulting films were subjected to physiochemical property analysis and pork packaging application. **Results** CEO microemulsions exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 62.5 $\mu\text{L/L}$ against both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. However, the MICs of pure CEO against these 2 bacteria were 500 and 125 $\mu\text{L/L}$, respectively, indicating that the antibacterial activity of CEO could be enhanced by microemulsion technology. When different concentrations of CEO microemulsions (0, 0.5%, 1.0%, 3.0%) were added into chitosan films, film thickness, opacity, and total color difference were enhanced, while film water activity was reduced. Interestingly, water activity of all composite films (0.486-0.536) was lower than the minimum limit (0.610)

基金项目: 上海市自然科学基金项目(22ZR1429900)、上海交通大学新进青年教师启动计划(22X010500276)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation Project of Shanghai (22ZR1429900), and the Startup Fund for Young Faculty at Shanghai Jiao Tong University (22X010500276)

***通信作者:** 王一非, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品贮藏与保鲜。E-mail: yifei wang_521@163.com

***Corresponding author:** WANG Yi-Fei, Ph.D, Associate Professor, School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China. E-mail: yifei wang_521@163.com

required for microbial growth, which provided evidences for the suitability of chitosan-CEO microemulsion films for food packaging. In the pork preservation assay, chitosan-CEO microemulsion films were able to retard total viable count growth as well as lipid oxidation. **Conclusion** Composite films generated in this work have good physiochemical properties with the potential to extend the shelf life of pork, which offers a possible solution for the practical application of CEO in meat preservation.

KEY WORDS: clove essential oil; microemulsion; chitosan film; physiochemical property; pork preservation

0 引 言

猪肉是一种主要的优质动物蛋白质来源, 约占我国每年肉类总消费量的 60%。与其他富含蛋白质的食品一样, 猪肉易滋生微生物, 易发生脂质氧化, 从而发生腐败变质, 进而威胁食品安全, 可能造成巨大的经济损失^[1]。目前, 国内外的肉制品保鲜技术主要包括使用化学添加剂、紫外辐射、超高压处理等^[2]。然而, 化学保鲜剂的使用存在安全问题, 辐射技术的大众认知度较低, 超高压处理会影响猪肉的色泽^[3]。因此, 新型肉制品保鲜技术和产品(例如天然保鲜剂)的开发是学术界目前关注的热点问题。

植物精油是一般公认安全(generally recognized as safe, GRAS)的物质, 因为抑菌活性强、抗氧化作用好等优点而广受关注^[4]。本课题组前期通过大规模的筛选, 发现丁香精油和肉桂精油具有较好的抑菌活性^[5]。然而, 精油具有芳香气味, 而且不溶于水、容易挥发, 这极大地限制了这一天然抑菌物质在食品保鲜领域的应用^[4]。因此, 学者们提出了通过微乳液、可食性薄膜等技术来攻克精油在食品保鲜应用中的瓶颈问题^[4-5]。其中, 微乳液技术是疏水性物质的优良载体, 可有效提升精油的水溶性, 而可食性薄膜技术则可缓解精油对食品风味带来的影响^[1]。这两种技术的联合使用可能会产生叠加效应, 为应对精油在食品领域的应用瓶颈提供有效方法。

壳聚糖是一种常用的多糖类成膜基质, 具有较强的阻气性及优良的抑菌和抗氧化活性^[6]。前人已经将肉桂、姜、香茅、紫苏、柠檬等多种精油添加到壳聚糖薄膜中^[7-9], 制备了性能较佳的活性包装材料, 并尝试用于草莓、鸡肉、鱼等食品的保鲜中^[10-12]。然而, 目前鲜有研究将微乳液技术用于制备以精油为活性组分的可食性薄膜, 来实现精油的增溶增效和高效运载。此外, 这类复合包装材料对猪肉等食品的保鲜效果也尚未可知。因此, 本研究拟开发壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜, 并探索其对猪肉的保鲜效果, 以期对植物精油在食品保鲜领域的应用提供可行的新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肉(上海奉贤乐购生活购物有限公司)。

丁香精油(上海云峰香精有限公司); 壳聚糖、甘油、无水乙醇、吐温-80、LB 培养基(上海国药集团药业股份有限公司); 平板计数琼脂(上海中科昆虫生物技术开发有限公司); 大肠杆菌 CICC20729、金黄色葡萄球菌 CICC23478(中国工业微生物菌种保藏管理中心)。

1.2 仪器与设备

WSC-S 型色差计(上海精密科学仪器有限公司); Aw-1A 型智能水分活度仪(无锡市碧波电子设备厂); 数显卡尺[0~150 mm, 密测多友量仪(苏州)有限公司]; FA25 型均质机(FLUKO 公司); WFZ UV-2100 型紫外可见分光光度计(上海龙尼柯仪器有限公司); MP200B 型电子天平(感量 0.01 g, 上海精科实业有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 丁香精油微乳液的体外抑菌活性测定

(1) 菌悬液的制备

用 LB 培养基将受试菌株在 37℃ 连续活化 2 次, 然后转接到 50 mL LB 培养基中, 在 37℃ 温度、200 r/min 转速下过夜培养, 待用。

(2) 丁香精油微乳液的制备

根据课题组前期采用的滴水法制备丁香精油微乳液^[5], 制备的微

加入甘油作为塑化剂,并加入吐温-80 促进精油的溶解。混匀后,加入丁香精油微乳液,使得混合溶液中微乳液的终浓度分别为 0、0.5%、1.0%、3.0% (V:V)。在 10000 r/min 均质 4 min 后,将成膜溶液倒入玻璃板中(20 cm×20 cm),凝固后放到 40℃烘箱中干燥 24 h。冷却到室温后,小心撕下薄膜,在 25℃条件下贮藏在干燥器中备用。

1.3.3 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的理化特性分析

(1)复合膜厚度的测定

通过数显游标卡尺测量壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜厚度(mm)。在复合膜的每个边和中央位置至少各测量 3 次,将复合膜厚度平均值用于不透明度的计算。

(2)复合膜不透明度的测定

参照 TUNÇ 等^[14]的测定方法,将复合膜剪成 1.0 cm×4.0 cm 的矩形长条,放置在紫外可见分光光度计中,在 600 nm 波长下测定吸光度(A_{600}),不透明度的计算见式(1)。

$$\text{不透明度} = A_{600} / \text{复合膜厚度} \quad (1)$$

(3)复合膜水分活度的测定

通过智能水分活度仪测定壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的水分活度。先用饱和硝酸镁溶液对仪器进行校准,然后将复合膜放在专用的测量皿中,读取水分活度值。

(4)复合膜颜色的测定

通过 WSC-S 型色差计测定壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的颜色^[15],其中白板的参数为 $L_{\text{standard}}=91.00$ 、 $a_{\text{standard}}=-0.99$ 、 $b_{\text{standard}}=4.44$ 。将复合膜放在标准白板上,读取相应的色差值,并分别记录为 L_{film} 、 a_{film} 、 b_{film} 。总色差 ΔE 的计算见式(2)。

$$\Delta E = \sqrt{(L_{\text{film}} - L_{\text{standard}})^2 + (a_{\text{film}} - a_{\text{standard}})^2 + (b_{\text{film}} - b_{\text{standard}})^2} \quad (2)$$

1.3.4 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜在猪肉保鲜中的应用

(1)复合膜对猪肉的包装

参照课题组前期采用的方法^[1]将复合膜放在托盘上,在复合膜中央放上猪肉(5.0 g 左右),然后在猪肉上层覆盖一层复合膜,使得上下两层复合膜紧密粘贴在一起。未用复合膜包装的猪肉作为对照。将托盘放在聚乙烯袋中密封以隔绝外界环境,并放到 4℃冰箱中冷藏 8 d。

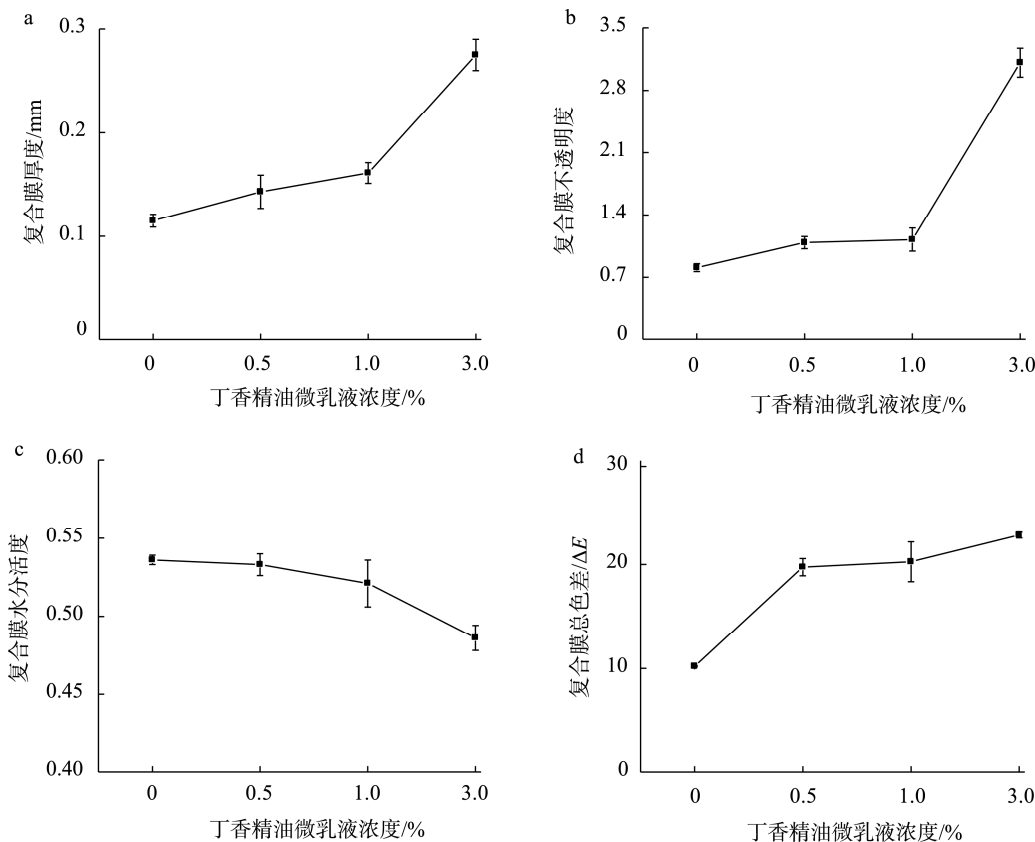
(2)猪肉总菌数的测定

采用平板计数琼脂测定猪肉在冷藏期间的总菌数(total viable count, TVC)变化^[1]。在猪肉冷藏的第 0、8 d 取样,挑取 2~3 份复合膜包装的猪肉,从中称取 10 g 在无菌条件下剪碎后放入均质袋中,加入 90 mL 无菌生理盐水,振荡混匀。用无菌生理盐水将均质液 10 倍梯度稀释,然后吸取 100 μL 适宜梯度的稀释液涂布到平板计数琼脂上。将培养皿倒置放在 28℃培养箱中培养 2 d 后,记录平板上的菌落数。

(3)猪肉硫代巴比妥酸值的测定

采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法^[16]测定猪肉在冷藏期间的脂质氧化情况。在猪肉冷藏的第 0、8 d

取样,将 0.1 g 猪肉放入 1 mL 去离子水中,然后分别加入 1.5 mL 醋酸(20%, V:V)和 1.5 mL TBA 溶液(0.8%, m:m)。样品振荡混匀后,放入 100℃水浴锅中加热 60 min。样品冷却后,再加入 5 mL 正丁醇,混匀后离心。取上层液体,在 532 nm 波长处测定吸光度值(A_{53



注: a~d 分别为丁香精油微乳液浓度对复合膜厚度、不透明度、水分活度和总色差的影响。

图 1 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的理化特征

Fig.1 Physicochemical properties of chitosan films incorporated with clove essential oil microemulsions

乳液均可提高壳聚糖薄膜的 ΔE 值。LIU 等^[22]也发现丁香、肉桂、百里香等多种精油的添加显著提高了壳聚糖薄膜的 ΔE 值。壳聚糖复合膜 ΔE 值的变化与植物精油携带的颜色相关, 其中薄膜中丁香精油自身的淡黄色有助于阻止由可见光和紫外光导致的食品降解、变色、变味^[22]。

2.3 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜对猪肉的保鲜效果

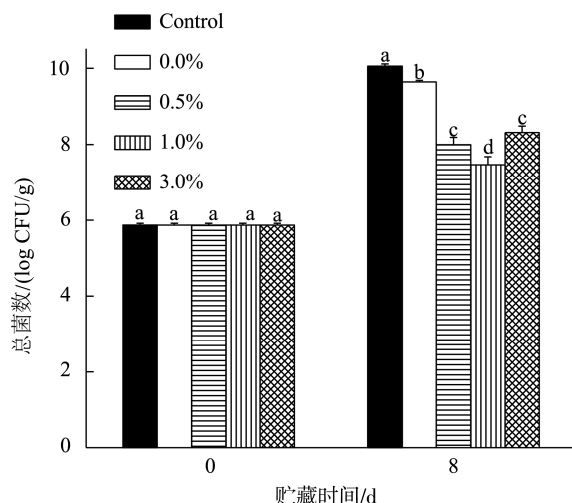
2.3.1 复合膜对猪肉总菌数的影响

微生物滋生是导致猪肉腐败的一个重要原因。因此, 本研究测试了壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜对猪肉总菌数的影响。如图 2 所示, 所有复合膜均可显著降低猪肉在 4℃ 冷藏期间的总菌数。此外, 添加了丁香精油微乳液的薄膜抑菌效果显著高于纯壳聚糖薄膜。由此可知, 丁香精油微乳液可有效提升壳聚糖对猪肉中总菌数的抑制效果。壳聚糖通过其阳离子与细胞膜互作来破坏微生物的完整性^[23], 丁香精油也可直接破坏微生物细胞膜导致细胞内容物泄漏^[24]。因此, 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜的良好抑菌效果可能是壳聚糖和丁香精油两种物质对细胞膜叠加作用的结果。值得注意的是, 随着丁香精油微乳液添加量的增加, 复合膜包装的猪

肉总菌数呈现先下降后上升的趋势。当丁香精油微乳液添加量为 3.0% 时, 猪肉中的总菌数高于其他两个添加量(0.5%, 1.0%), 这可能与复合膜的水溶性和机械强度等有关。在猪肉冷藏期间, 本研究发现丁香精油微乳液浓度为 3.0% 的复合膜最容易破裂, 这可能会导致复合膜阻气性能变差, 因而其对猪肉总菌数的抑制作用也弱于其他浓度丁香精油微乳液制备的复合膜。综上可知, 壳聚糖和 1.0% 丁香精油微乳液制备的复合膜对猪肉总菌数的抑制效果最佳。

2.3.2 复合膜对猪肉 TBA 值的影响

脂质氧化是导致猪肉变质的另一个重要原因^[25]。因此, 本研究测定了猪肉冷藏期间的 TBA 值, TBA 值越低, 表明薄膜的抗氧化能力越强^[26]。由图 3 可知, 添加或未添加丁香精油微乳液的壳聚糖薄膜均可显著降低猪肉的 TBA 值, 但这些薄膜对 TBA 的抑制效果无显著差异, 这可能是薄膜成分、制备工艺和食品类型综合作用的结果。因此, 复合膜具有一定的抗氧化作用, 可显著降低猪肉中脂质的氧化程度。与此类似, 壳聚糖-肉桂精油-姜精油复合薄膜在猪肉中也表现出抗氧化作用, 事实上, 植物精油一般通过提供氢原子来破坏自由基链, 从而实现抗氧化效应^[1]。



注: Control, 未用复合膜包装的猪肉; 不同小写字母表示组间差异显著, $P < 0.05$, 下同。

图2 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜对猪肉冷藏期间总菌数的影响

Fig.2 Effects of chitosan films incorporated with clove essential oil microemulsions on the TVC values of pork meat during refrigerated storage

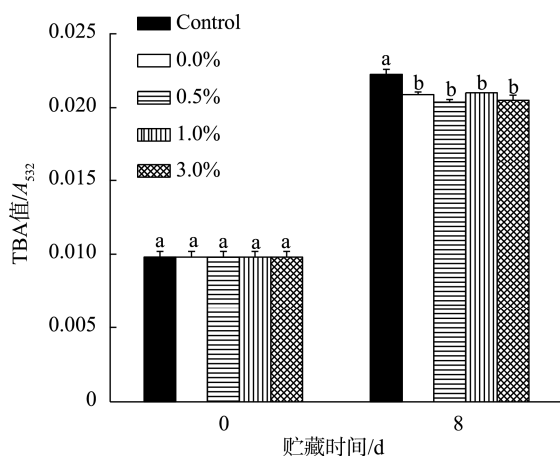


图3 壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜对猪肉冷藏期间TBA值的影响

Fig.3 Effects of chitosan films incorporated with clove essential oil microemulsions on the TBA values of pork meat during refrigerated storage

3 结论

本研究发现微乳液可显著提升丁香精油的抑菌效果, 而且适合运载到壳聚糖薄膜中。壳聚糖-丁香精油微乳液复合膜比单一的壳聚糖薄膜厚度大、水分活度低、色差大, 适合用于食品的包装。当复合膜用于冷藏猪肉保鲜时, 可有效抑制猪肉总菌数的增加和脂质的氧化, 表明该材料在肉制品的保鲜方面具有较好的应用潜力。

目前, 尚未见以精油微乳液为活性物质的壳聚糖薄膜在食品保鲜中的应用研究, 因此本研究为精油在食品领域的应用提供了新思路。

抗菌活性和抗氧化性能对于植物精油在肉制品保鲜领域的应用至关重要^[27-28]。本研究中丁香精油微乳液在一定程度上提高了壳聚糖薄膜的抑菌性能, 但是却未改变复合膜的抗氧化特性。因此, 后续研究可以通过优化丁香精油微乳液配方和复合膜制备工艺, 挖掘在猪肉中抑菌和抗氧化效果更佳的复合膜。此外, 虽然可食性薄膜可以缓和精油给食品感官品质带来的影响^[29-30], 但是壳聚糖-丁香精油微乳液对猪肉感官性质的影响仍有待探索。通过上述方面的进一步研究, 可望推进精油在食品领域的商业化应用进程。

参考文献

- [1] WANG Y, XIA Y, ZHANG P, *et al.</*

- [11] PERDONES A, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L, CHIRALT A, *et al.* Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2012, 70: 32–41.
- [12] YAGHOUBI M, AYASEH A, ALIREZALU K, *et al.* Effect of chitosan coating incorporated with *Artemisia fragrans* essential oil on fresh chicken meat during refrigerated storage [J]. *Polymers*, 2021, 13(5): 716.
- [13] SONG X, SUN Y, ZHANG Q, *et al.* Failure of *Staphylococcus aureus* to acquire direct and cross tolerance after habituation to cinnamon essential oil [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(1): 18.
- [14] TUNÇ S, DUMAN O. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2011, 44 (2): 465–472.
- [15] RAMOS ÓL, SILVA SI, SOARES JC, *et al.* Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds [J]. *Food Res Int*, 2012, 45 (1): 351–361.
- [16] FASSEAS MK, MOUNTZOURIS KC, TARANTILIS PA, *et al.* Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils [J]. *Food Chem*, 2008, 106 (3): 1188–1194.
- [17] 石俊杰, 鲁晓翔. 植物精油微乳技术及在食品保鲜中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(6): 267–273.
- SHI JJ, LU XX. Microemulsion technology of plant essential oil and its application in food preservation [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(6): 267–273.
- [18] OJAGH SM, REZAEI M, RAZAVI SH, *et al.* Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water [J]. *Food Chem*, 2010, 122 (1): 161–166.
- [19] PIRES C, RAMOS C, TEIXEIRA G, *et al.* Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil [J]. *J Food Eng*, 2011, 105(3): 422–428.
- [20] HOSSEINI MH, RAZAVI SH, MOUSAVI MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils [J]. *J Food Process Pres*, 2009, 33(6): 727–743.
- [21] ESPÍNDOLA SA, LUCHESE CL, FACCIN DJL, *et al.* Influence of replacing oregano essential oil by ground oregano leaves on chitosan/alginate-based dressings properties [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 181: 51–59.
- [22] LIU T, LIU L, GONG X, *et al.* Fabrication and comparison of active films from chitosan incorporating different spice extracts for shelf life extension of refrigerated pork [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 135(2): 110181.
- [23] CHANDRASEKARAN M, KIM KD, CHUN SC. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review [J]. *Processes*, 2020, 8(9): 1173.
- [24] CUI H, ZHANG C, LI C, *et al.* Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. *Food Control*, 2018, 94: 140–146.
- [25] MENG DM, SUN SN, SHI LY, *et al.* Application of antimicrobial peptide mytichitin-CB in pork preservation during cold storage [J]. *Food Control*, 2021, 125: 108041.
- [26] XIONG Y, CHEN M, WARNER RD, *et al.* Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatin edible coating and its effect on cold storage of fresh pork [J]. *Food Control*, 2020, 110: 107018.
- [27] PATEIRO M, MUNEKATA PE, SANT'ANA AS, *et al.* Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 337: 108966.
- [28] ZHANG H, LIANG Y, LI X, *et al.* Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices [J]. *Meat Sci*, 2020, 166: 108137.
- [29] HE S, YANG Q, REN X, *et al.* Antimicrobial efficiency of chitosan solutions and coatings incorporated with clove oil and/or ethylenediaminetetraacetate [J]. *J Food Saf*, 2014, 34: 345–352.
- [30] YUAN G, CHEN X, LI D. Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems [J]. *Food Res Int*, 2016, 89: 117–128.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介

