

高灵敏度指示膜对鱼肉新鲜度的监测及其机理分析

石彤, 胡慧玲, 熊治渝, 王林, 袁丽, 高瑞昌*
(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 新鲜度指示标签/指示膜的灵敏度已成为智能食品包装的重要研究方向。本研究以蓝莓花青素为指示剂、以玉米醇溶蛋白为基质, 利用静电纺丝技术制备含有明胶和 Fe^{2+} 的高灵敏度指示膜, 以鲢鱼鱼肉新鲜度监测为例验证该指示膜的有效性和灵敏度, 并分析其潜在机理。pH灵敏度、氨灵敏度及花青素释放情况分析结果表明, 添加明胶和 Fe^{2+} 能够提高以蓝莓花青素为指示剂的指示膜对pH值和氨响应的灵敏度, 且能够较好地束缚膜内花青素。利用含有适量明胶和 Fe^{2+} 的指示膜监测鱼肉新鲜度, 颜色响应特性 $P = (L^* + a^* + b^* + R + G + B)/a^*$ 与鱼肉新鲜度指标总挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 含量之间存在较强的相关性 ($R^2 > 0.98$)。以上结果表明本研究所制备的指示膜能有效地监测鱼肉新鲜度, 而花青素、明胶和 Fe^{2+} 之间存在的氢键等相互作用可能会影响指示膜的颜色响应特性和灵敏度。

关键词: 静电纺丝; 明胶; Fe^{2+} ; 蓝莓花青素; 新鲜度

Application and Mechanism of High-Sensitivity Indicator Film for Monitoring Fish Freshness

SHI Tong, HU Huiling, XIONG Zhiyu, WANG Lin, YUAN Li, GAO Ruichang*
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The sensitivity of freshness indicator labels/films has become an important research direction of intelligent food packaging. In this study, a high-sensitivity indicator film containing gelatin and Fe^{2+} was prepared by electrospinning using blueberry anthocyanins as the indicator and zein as the matrix for monitoring fish freshness. The validity and sensitivity of the indicator film for detecting the freshness of silver carp were tested and the potential mechanism was elucidated. The results of pH sensitivity, ammonia sensitivity and anthocyanin release showed that the addition of gelatin and Fe^{2+} improved the sensitivity of the indicator film to pH and ammonia, and contributed to better binding of the anthocyanins in the film. There was a strong correlation between the color response ($P = (L^* + a^* + b^* + R + G + B)/a^*$) of the film and the content of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish meat as a freshness indicator ($R^2 > 0.98$). In conclusion, the prepared indicator film can effectively monitor fish freshness, and the hydrogen bond interactions between anthocyanins and gelatin/ Fe^{2+} may affect the color response characteristics and sensitivity of the indicator film.

Keywords: electrospinning; gelatin; Fe^{2+} ; blueberry anthocyanins; freshness

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220803-033

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 13-0150-09

引文格式:

石彤, 胡慧玲, 熊治渝, 等. 高灵敏度指示膜对鱼肉新鲜度的监测及其机理分析[J]. 食品科学, 2023, 44(13): 150-158.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220803-033. <http://www.spkx.net.cn>

SHI Tong, HU Huiling, XIONG Zhiyu, et al. Application and mechanism of high-sensitivity indicator film for monitoring fish freshness[J]. Food Science, 2023, 44(13): 150-158. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220803-033. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-08-03

基金项目: 国家现代农业产业技术体系岗位科学家专项 (CARS-46)

第一作者简介: 石彤 (1991—) (ORCID: 0000-0001-6603-819X), 女, 实验师, 博士, 研究方向为水产品加工与综合利用。

E-mail: 1000005720@ujs.edu.cn

*通信作者简介: 高瑞昌 (1976—) (ORCID: 0000-0001-5742-5446), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品加工与综合利用。

E-mail: xiyan2008@ujs.edu.cn

鱼肉富含蛋白质, 容易被微生物污染而引发食品安全问题, 为了提高食品安全性并获悉所购买的冷鲜肉(如鱼肉)等新鲜程度, 研究人员开发出多种冷鲜肉新鲜度监测的方法。相对于耗时且操作繁琐的传统检测方法和需要借助专业仪器且数据处理复杂的快速无损检测方法, 比色型pH指示膜(智能包装的一种)无需破坏包装, 只需利用指示剂随食物及其微环境pH值的变化而改变颜色的特点, 就可以让消费者迅速区分新鲜和变质的食物, 对于减少食物浪费具有重要意义。然而, 很多基于天然色素的pH指示膜的灵敏度不高, 并且许多天然指示剂(如蓝莓花青素^[1-2]和紫薯花青素^[3-5])在不同pH值条件下色泽变化不明显, 故限制了这类指示剂及指示膜的应用。Buchweitz等^[6]发现含有铁-花青素螯合物的明胶基凝胶较琼脂和酰胺化果胶基的凝胶表现出更深更明显的蓝色色调。因此, 针对蓝莓花青素在特定pH值条件下变色不明显, 且以其为指示剂制备的指示膜不能较好地监测食品新鲜度等问题, 本研究旨在利用明胶和Fe²⁺这两种物质增强指示膜的显色效果和灵敏度, 从而更好地监测食品新鲜度, 期望通过促进指示膜中的指示剂与鱼肉腐败所产生特征性物质(生物胺)的反应凸显颜色变化, 从而使得消费者能够根据指示膜的颜色判断鱼肉所处的新鲜度等级。同时, 考虑到静电纺丝是一种经济高效、操作简单、条件温和的制备高孔隙率、高比表面积和高活性包埋率的高灵敏度纳米纤维的技术^[7-9], 且玉米醇溶蛋白是一种无毒、可生物降解、具有成膜性且可用于静电纺丝制备纳米纤维和胶囊的疏水性聚合物^[10-13], 因此, 本研究采用静电纺丝技术制备以蓝莓花青素为指示剂, 以玉米醇溶蛋白为基质的含有乌鳢鱼皮明胶/Fe²⁺的高灵敏度纳米纤维指示膜, 并以鲢鱼鱼肉新鲜度监测为例验证该指示膜的有效性和灵敏性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜的花鲢和乌鳢购于镇江市吉麦隆超市。

玉米醇溶蛋白 美国Sigma公司; 蓝莓花青素(纯度5%~25%) 上海麦克林生化科技有限公司; 其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

DP30高压静电纺丝机 天津云帆科技有限公司; HH-S2恒温水浴锅 江苏金怡仪器科技有限公司; 紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; 激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司; CR-400色差仪 日本柯尼卡美能达有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乌鳢鱼皮明胶的提取

将清洗干净的乌鳢鱼皮切成2 cm×2 cm大小正方形小块, 用于提取明胶^[14]。首先, 将准备好的鱼皮

在0.05 mol/L NaOH溶液中以1:5 (m/V) 的料液比浸泡8 h, 然后, 将蒸馏水冲洗至鱼皮pH值为中性(将鱼皮以1:4 (m/V) 的比例置于蒸馏水中, 在55 °C的恒温水浴锅中水浴6 h)。最后, 用纱布和滤纸过滤提取液后得到滤液进行冷冻干燥, 获得明胶粗提物, 并将其保存在-40 °C冰箱中备用。

1.3.2 指示膜的制备

1.3.2.1 静电纺丝液的制备

称取适量的玉米醇溶蛋白和蓝莓花青素溶于体积分数70%的乙酸溶液中, 其中, 玉米醇溶蛋白和花青素的质量浓度基于先前的实验分别取30 g/100 mL和5 g/100 mL^[15]。在避光条件下用磁力搅拌器搅拌使玉米醇溶蛋白和花青素完全溶解得到纺丝液。在此基础上, 添加明胶(1 g/100 mL)和FeSO₄·7H₂O(0、0.01、0.04、0.07 mg/mL)制备含有明胶/Fe²⁺的纺丝液。

1.3.2.2 静电纺丝指示膜的制备

采用高压静电纺丝机将上述纺丝液进行静电纺丝得到纳米纤维指示膜, 静电纺丝参数为: 电压(18.0±1.5) kV、进样速率0.000 1 mm/s、温度(20±5) °C、相对湿度(30±5) %。电纺纳米纤维膜收集在铝箔纸上, 并避光储存。未添加明胶和Fe²⁺的指示膜记为F_{0.0}, 仅添加明胶的指示膜记为F_{1.0}, 仅添加Fe²⁺的指示膜根据Fe²⁺的质量浓度(0.01、0.04、0.07 mg/mL)分别记为F_{0.1}、F_{0.4}、F_{0.7}, 既添加明胶又添加Fe²⁺的指示膜根据Fe²⁺质量浓度(0.01、0.04、0.07 mg/mL)分别记为F_{1.1}、F_{1.4}、F_{1.7}。

1.3.3 指示膜pH敏感性测定

首先配制pH值分别为7、8、9、10、11、12、13的溶液, 然后将制备的指示膜浸泡在10 mL不同pH值的溶液中, 5 min后拍照记录指示膜的颜色, 根据指示膜在不同pH值溶液条件下的颜色变化情况初步判断指示膜的pH(7~13)敏感性。

1.3.4 指示膜对氨气敏感性测定

由于肉类新鲜度智能指示膜主要通过pH指示剂与肉制品腐败时产生的挥发性成分反应的变化信息来判断肉类的新鲜度, 且氨气(NH₃)是肉类变质产生的挥发性碱性气体的代表, 所以本实验以氨气为模型气体判断含有明胶/Fe²⁺的指示膜在监测鱼肉新鲜度时敏感性是否有所提升。具体实验步骤如下: 将F_{0.0}、F_{0.4}、F_{1.0}和F_{1.4} 4种指示膜置于含有100 mL 10 mmol/L氨水的锥形瓶瓶口, 每隔一定时间对指示膜拍照, 记录其颜色变化, 直到指示膜的颜色达到平衡^[15]。之后用Photoshop 2019软件处理所拍得指示膜照片, 并将指示膜的颜色进行数值化分析, 获取颜色参数L*、a*、b*、R、G、B及颜色代码等相关信息。在CIE-L*a*b*颜色标准系统中, L*值表示颜色的明度; a*值表示红绿度, 正值表示偏红, 负值表示偏绿; b*值表示黄蓝度, 正值表示偏黄, 负值表示偏蓝。

RGB色彩模式是工业领域的一种颜色标准, RGB即是代表红、绿、蓝3个通道的颜色。获取颜色参数后按下式计算指示膜的颜色变化值(色差) ΔE 。

$$\Delta E = \sqrt{(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2}$$

式中: L_t^* 、 a_t^* 、 b_t^* 是指示膜暴露于氨气环境后在 t 时刻的颜色值; L_0^* 、 a_0^* 、 b_0^* 是指示膜的初始颜色值。

1.3.5 指示膜中花青素释放情况测定

为了解所制备的指示膜($F_{0.0}$ 、 $F_{0.4}$ 、 $F_{1.0}$ 和 $F_{1.4}$)中蓝莓花青素在高湿度条件下的稳定性, 测定了指示膜浸泡于水中时花青素的释放情况。首先参照刘景荣^[16]的方法绘制蓝莓花青素的标准曲线, 然后称取适量的指示膜, 以膜、水8:5(m/V)的比例将指示膜浸泡一定时间, 每1 h用紫外-可见分光光度计测定上清液在530 nm波长处的吸光度。根据测得的吸光度和蓝莓花青素含量标准曲线计算不同时间点溶液中花青素含量占指示膜中花青素总量的百分比, 即花青素溶出率。

1.3.6 指示膜应用于鱼肉新鲜度监测实验

1.3.6.1 鱼肉腐败过程中总挥发性盐基氮含量和pH值的测定

将处理好的花鲢鱼肉, 分成若干等分, 每份50 g, 装在一次塑料培养皿中, 并将其分别贮藏在4 °C和25 °C环境中, 4 °C贮藏的鱼肉每3 d测1次pH值和总挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)含量, 直至鱼肉完全腐败。25 °C贮藏的鱼肉每12 h测1次pH值和TVB-N含量, 直至鱼肉完全腐败。参考GB 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》测定鱼肉的TVB-N含量。测定pH值时, 5 g鱼肉中加入25 mL去离子水进行均质后静置30 min, 过滤取滤液测定pH值, 重复3次实验。

1.3.6.2 鱼肉新鲜度监测

将处理好的花鲢鱼肉, 分成若干等分, 每份50 g, 装在一次塑料培养皿中, 并将指示膜($F_{0.0}$ 、 $F_{0.1}$ 、 $F_{0.4}$ 、 $F_{0.7}$ 、 $F_{1.0}$ 、 $F_{1.1}$ 、 $F_{1.4}$ 、 $F_{1.7}$)剪成0.5 cm×0.5 cm的正方形贴在培养皿盖上。之后将若干装有鱼肉且粘有指示膜的培养皿分别放入4 °C的冰箱和25 °C的恒温箱中。按照1.3.6.1节所述的时间间隔定期拍照记录指示膜的颜色。按1.3.3节的方式处理所拍照片获取响应的颜色信息, 并按上式计算 ΔE 。其中, L_t^* 、 a_t^* 、 b_t^* 值是指示膜监测鱼肉新鲜度过程中 t 时刻的颜色值, L_0^* 、 a_0^* 、 b_0^* 值是指示膜监测鱼肉新鲜度过程中 t 时刻前一个时间点的颜色值。

1.3.6.3 相关性分析

为了确定所制备的指示膜应用于花鲢新鲜度监测时所呈现的颜色信息与鱼肉新鲜度之间的关系。将上述监测鱼肉新鲜度时指示膜的颜色响应值 P 与鱼肉新鲜度指标TVB-N含量进行线性拟合, 根据线性拟合的决定系数判断二者的相关性。其中 $P = (L^* + a^* + b^* + R + G + B) / a^*$ 。

1.3.7 指示膜作用机制初探

1.3.7.1 Zeta电位测定

配制不同pH值(5、7、9)的醋酸-醋酸钠缓冲液, 将花青素/明胶/ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于缓冲液中, 用激光粒度仪在25 °C测定相应样品的Zeta电位。将样品注入一次性样品池进行测定, 重复3次。仅含有花青素的样品记为A; 仅含有乌鳢鱼皮明胶的样品记为G; 仅含有 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的样品记为F; 含有花青素和明胶的样品记为AG, 含有花青素和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的样品记为AF, 含有明胶和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的样品记为GF, 含有花青素、明胶和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的样品记为AGF。

1.3.7.2 驱动力测定

为了进一步验证明胶、花青素和 Fe^{2+} 之间的相互作用, 在pH值为5、7、9条件下分别配制了2种悬浊液: 含蓝莓花青素和明胶的悬浊液(S11)和含蓝莓花青素、明胶和 Fe^{2+} 的悬浊液(S12), 花青素、明胶和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的最质量终浓度分别为0.5、0.5 mg/mL和0.2 mg/mL。悬浊液的驱动力测定参照Akbari等^[17]的方法并稍做修改。将上述悬浊液分别与相同体积的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、尿素和二硫苏糖醇(*DL*-dithiothreitol, DTT)混合, 其中SDS终质量浓度分别为0、0.25、0.50、0.75、1.00 g/100 mL, 尿素终浓度分别为0、2、4、6、8 mol/L, DTT终浓度分别为0、15、30、45、60 mmol/L。反应6 h后, 用涡流振荡仪将其混合均匀并立即测定其在600 nm波长处的吸光度(以此表征浊度), 测定两种悬浊液在不同SDS、尿素和DTT添加量下的浊度, 并通过计算浊度下降情况分析不同SDS、尿素和DTT添加量对两种悬浊液浊度的影响。混合物浑浊度的降低被认为是反映颗粒分解程度的一个指标。

1.4 数据处理与分析

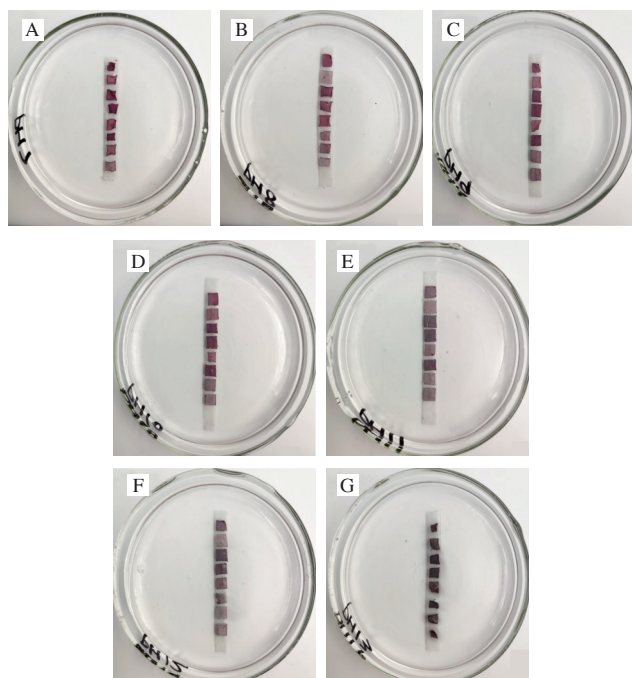
所有实验重复3次, 每次3个平行。结果表示为平均值±标准差。采用SPSS Statistic 22软件进行单因素方差分析及显著性分析($P < 0.05$ 表示差异显著); 采用Excel 2010软件绘制线性相关性图; 采用Origin 2018软件绘制其他实验结果图; 采用Microsoft PowerPoint 2010软件绘制机理图。

2 结果与分析

2.1 指示膜的pH敏感性

8种指示膜浸泡在不同pH值(7~13)溶液中的颜色变化如图1所示。随着pH值的增加, 指示膜先由红色变为紫红色, 然后再变成紫灰色, 最后变成灰黑色。与花青素的结构变化相对应: 甲醇假碱和黄烊盐阳离子逐渐转变成醌式碱和阴离子醌式碱^[18]。此外, pH值从8增加到9时, $F_{1.4}$ 和 $F_{1.7}$ 最先发生了比较明显的颜色变化。而其他大部分指示膜在pH 10时才发生较明显的颜色变化。据报道,

铁(亚铁)离子和花青素可以形成有色螯合物^[6]。当铁(亚铁)离子含量较低时,花青素上的酚羟基取代基与铁(亚铁)离子发生部分配位,导致部分粉色显色反应^[19],而当铁(亚铁)离子的数量增加到一定程度时,铁(亚铁)-花青素螯合物的数量增加,进一步使溶液的颜色变为紫色甚至蓝色^[20]。同时,明胶中含有生色团和助色基团,在一定程度上会影响指示膜的颜色^[15]。此外,pH值增加至12~13时,花青素容易从指示膜中扩散出来,即溶液碱性很强时,容易破坏指示膜的玉米醇溶蛋白基质,使花青素容易扩散至溶液中,与玉米醇溶蛋白易溶于高碱性溶液的结论^[13]是一致的。



A~G.分别为pH 7~13。每个培养皿中从上往下依次为F_{0.0}、F_{0.4}、F_{1.0}、F_{1.4}。

图1 不同指示膜在不同pH值溶液中的颜色

Fig. 1 Color response of different indicator films in solutions with different pH

2.2 指示膜对氨气的敏感性

暴露于10 mmol/L的氨水上方的指示膜F_{0.0}、F_{0.4}、F_{1.0}和F_{1.4}所产生的色差值(ΔE)的变化曲线如图2A所示。随着暴露于氨水上方的时间延长,指示膜 ΔE 趋于稳定,表明随着时间的延长,指示膜的颜色逐渐趋于稳定。暴露时间不超过6 min时,F_{1.0}和F_{1.4}的 ΔE 迅速增加,继续暴露于氨水上方后, ΔE 基本稳定在20左右,表明在6 min时,F_{1.0}和F_{1.4}的颜色变化基本达到极限,颜色不再有明显的变化。而F_{0.0}的 ΔE 则在6 min之后继续增加,需要暴露在氨水上方更长时间才能使得颜色趋于稳定,且 ΔE 趋于稳定所需的时间依次为F_{1.0}/F_{1.4}<F_{0.4}<F_{0.0},即F_{1.0}和F_{1.4}在暴露时间更短、氨气量更少的情况下就能使

颜色变化趋于稳定,说明添加了明胶/Fe²⁺的指示膜F_{1.0}和F_{1.4}对氨气的响应灵敏度更高。Jiang Guangyang等^[5]制备了含紫甘薯花青素的淀粉/羧甲基纤维素基的指示膜用于监测鱼肉新鲜度,指示膜对氨(32 mmol/L)的响应分析结果表明,紫甘薯花青素添加量为0.1 g/100 g时,指示膜的 ΔE 最先趋于稳定,且 ΔE 达到稳定时所需时间为4.52 min,而不添加紫甘薯花青素指示膜达到稳定时所需时间为14 min。进一步说明了本实验所制备的含明胶和Fe²⁺指示膜的氨灵敏度较高。

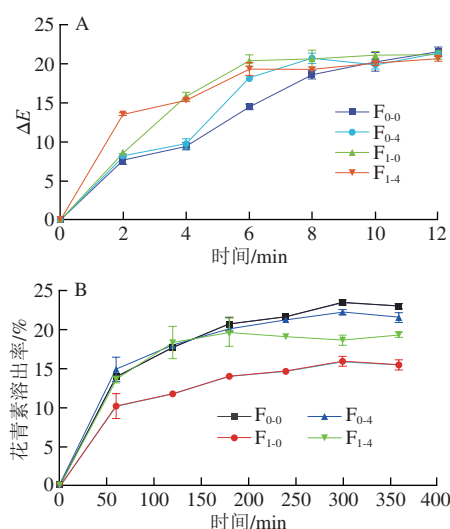


图2 指示膜的 ΔE 随暴露于10 mmol/L氨水上方时间的变化曲线(A)及指示膜中花青素的释放曲线(B)

Fig. 2 Curves of the color difference values (ΔE) of the films as a function of time of exposure to 10 mmol/L ammonia (A) and release curves of anthocyanins from the films (B)

2.3 指示膜中花青素的释放情况

指示膜(F_{0.0}、F_{0.4}、F_{1.0}和F_{1.4})中花青素在水中的释放情况如图2B所示。指示膜浸泡6 h之后花青素的溶出率仍保持在25%以下,说明本研究制备指示膜中的花青素不容易渗透至所监测的食品上,可能是因为指示膜的成膜基质是疏水性的玉米醇溶蛋白。而翟晓东^[21]制备的复合膜中花青素提取物6 h后释放率超过90%,进一步体现出本实验所制备的指示膜对花青素的束缚作用。此外,浸泡1 h时指示膜中花青素表现出突释的现象,可能是由于指示膜表面及靠近表面的花青素更容易从膜中释放出来^[16]。F_{1.0}和F_{1.4}浸泡6 h后花青素溶出量较F_{0.0}和F_{0.4}小,说明大分子明胶对于花青素的溶出具有抑制作用,可能与花青素及铁-花青素螯合物与明胶之间的相互作用有关^[15]。

2.4 鱼肉腐败过程中TVB-N含量和pH值变化

TVB-N是鱼肉、畜肉等动物肌肉贮藏过程中,内源酶和微生物分解蛋白质而产生的^[22],主要包括二甲胺、三甲胺及氨等含氮化合物,其含量是评价水产品新鲜度的

重要指标之一。随着贮藏时间的延长, pH值先由于ATP酶、糖类酵解及乳酸菌等作用产生乳酸而下降, 随后由于蛋白质分解产生碱性胺类物质而上升, 故pH值亦可用于评价鱼肉等肉类的新鲜程度^[23]。由图3可知, 在4℃和25℃贮藏条件下, 鱼肉的pH值均为先下降后上升, 且TVB-N含量在贮藏前阶段缓慢增加, 随后急剧增加。GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》规定, 淡水鱼的TVB-N含量 ≤ 20 mg/100 g时被认为是可接受的。从图3A中可以看出, 贮藏于4℃的鲢鱼鱼肉第9天左右的TVB-N含量稍大于20 mg/100 g, 说明此时鱼肉已经腐败, 不宜食用。随着贮藏时间的继续, TVB-N含量急剧增加, 贮藏12 d后鱼肉完全腐败。25℃下贮藏24 h鲢鱼鱼肉的TVB-N含量接近规定的可接受值, 说明此时鱼肉即将腐败, 贮藏48~60 h之后, 鲢鱼鱼肉完全腐败(图3B)。由于低温不利于微生物的繁殖, 所以贮藏于4℃的鱼肉完全腐败所需的时间较长。

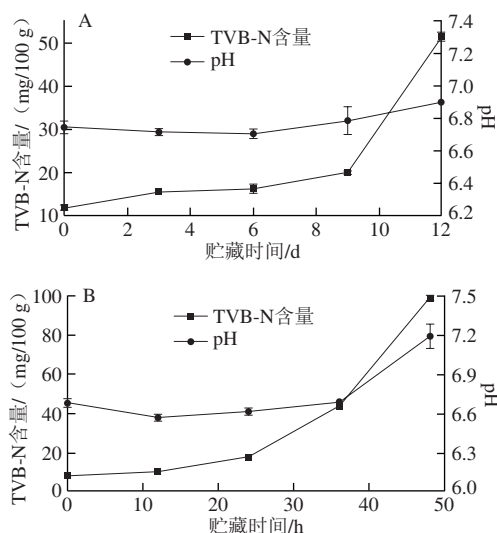


图3 贮藏于4℃(A)和25℃(B)的鱼肉腐败过程中TVB-N含量和pH值的变化曲线

Fig. 3 Curves of TVB-N content and pH of of fish stored at 4 °C (A) and 25 °C (B) during spoilage

2.5 指示膜监测鱼肉新鲜度时颜色响应

由图4可知, 指示膜用于监测贮藏于4℃下的鱼肉新鲜度时, 随着贮藏时间的延长, 指示膜的颜色从紫红色变为灰紫色, 最后变为灰棕色。本实验鲢鱼肉在4℃条件下贮藏9 d之后, TVB-N含量开始超过规定值, 表明鱼肉在贮藏9 d后腐败变质, 此时指示膜(F₀₋₀、F₀₋₁、F₀₋₄和F₀₋₇)由深灰紫色变为浅灰紫色, 而指示膜(F₁₋₀、F₁₋₁、F₁₋₄和F₁₋₇)则由灰紫色变为灰(绿)色。而鲢鱼肉在25℃条件下贮藏约24 h之后, TVB-N含量开始超过限值, 即鱼肉在贮藏24 h后腐败变质, 此时指示膜F₀₋₀、F₀₋₁、F₁₋₀由紫红色变为棕红色, F₀₋₄和F₁₋₁由深紫灰色变为灰棕色, F₀₋₇由深紫灰色变为灰紫色, F₁₋₄和F₁₋₇则由灰棕色变成灰色。且指示膜在监测新鲜鱼肉(0 d/0 h)时的颜色和监测完全腐败鱼肉(12 d(4℃)/48 h(25℃))时的颜色变化最明显。鱼肉贮藏过程中产生的生物胺会使pH值增加, 从而使指示膜的颜色发生上述变化, 说明本研究制备的指示膜可用于鱼肉新鲜度监测, 这与Li Yana等^[18]的研究结果类似。此外, 体系内的TVB-N含量增加使微环境pH值增加的同时, 会导致指示膜红色逐渐褪去, 与图5所示的代表红绿度的颜色参数a*值的减小趋势是一致的, 且a*值越大(指示膜红色越明显)说明鱼肉越新鲜。当指示膜监测贮藏于4℃时的鱼肉新鲜度时, 含明胶/Fe²⁺的指示膜(F₀₋₇、F₁₋₁、F₁₋₄和F₁₋₇)在初始时a*值的减小速度更快, 指示膜红色褪去更快, 说明这些指示膜的氨反应灵敏度较高, 与2.2节的结论是一致的。类似地, Ge Yunjun等^[24]制备的明胶/氧化几丁质纳米晶体纳米复合膜暴露于pH值范围为2~12的缓冲液时, 复合膜的颜色参数a*值随pH值的增加而减小, 说明pH值越大, 红色越不明显, 而绿色则越来越明显。

一般来说, 当颜色差异值 ΔE 大于5时, 肉眼能够观察到两种颜色之间的差异^[25]。鱼肉新鲜度监测过程中, 指示膜在相邻时间点的颜色差异情况如表1所示。由于4℃和25℃贮藏的鱼肉分别在9 d和24 h后TVB-N含量超过

表1 指示膜监测鱼肉过程中相邻两个时间点的 ΔE

Table 1 ΔE of indicator films between two adjacent time points during the monitoring of fish meat

温度/℃	时间	ΔE							
		F ₀₋₀	F ₀₋₁	F ₀₋₄	F ₀₋₇	F ₁₋₀	F ₁₋₁	F ₁₋₄	F ₁₋₇
4	0 d	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}
	3 d	12.79±0.5 ^{Ad}	15.83±0.19 ^{Cd}	13.25±0.11 ^{Ad}	17.27±0.18 ^{Dc}	15.07±0.06 ^{Bd}	15.93±0.53 ^{Cd}	15.07±0.06 ^{Bc}	21.62±0.23 ^{Ec}
	6 d	3.49±1.09 ^{Ab}	5.19±0.17 ^{Bc}	6.95±0.29 ^{CDc}	3.63±0.53 ^{Ab}	6.03±0.66 ^{BCc}	6.17±0.97 ^{BCDc}	6.77±0.53 ^{CDd}	7.30±0.04 ^{Dd}
	9 d	5.94±0.05 ^{BCc}	5.39±0.93 ^{BCc}	5.56±1.03 ^{BCb}	3.06±0.65 ^{Ab}	5.35±0.75 ^{BCc}	6.70±1.60 ^{Cc}	5.64±0.91 ^{BCc}	4.89±0.77 ^{Bc}
	12 d	5.52±0.54 ^{BCc}	4.12±0.77 ^{ABb}	5.76±0.39 ^{Cb}	3.32±0.70 ^{Ab}	3.52±1.40 ^{Ab}	3.95±1.06 ^{Ab}	3.45±0.39 ^{Ab}	3.34±0.90 ^{Ab}
25	0 h	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}	0.00 ^{Aa}
	12 h	9.47±0.62 ^{ABCc}	11.78±0.56 ^{Dd}	10.25±1.02 ^{ABCd}	10.8±0.65 ^{CDd}	9.74±0.81 ^{ABCd}	8.81±0.70 ^{Ac}	9.27±0.28 ^{ABc}	10.74±1.27 ^{BCDc}
	24 h	8.02±2.14 ^{Cc}	6.66±1.38 ^{ABCc}	4.64±1.28 ^{Abc}	5.28±1.08 ^{ABb}	6.41±0.94 ^{ABCc}	5.87±0.89 ^{ABCb}	7.64±1.37 ^{BCc}	7.08±1.14 ^{ABCb}
	36 h	4.76±0.25 ^{BCb}	4.24±0.31 ^{ABb}	2.15±1.02 ^{Aab}	6.79±0.49 ^{BCDc}	5.00±1.21 ^{BCDbc}	6.01±0.92 ^{BCDcb}	7.57±2.94 ^{Dc}	7.22±1.49 ^{CDb}
	48 h	5.85±0.41 ^{CDb}	6.44±0.46 ^{Dc}	6.57±2.38 ^{Dc}	4.28±0.70 ^{CBb}	3.94±0.47 ^{CBb}	4.95±0.86 ^{CDb}	2.79±0.54 ^{ABb}	1.80±1.06 ^{Aa}

注: 同行肩标大写字母不同表示不同指示膜间差异显著 ($P < 0.05$); 同一温度下, 同列肩标小写字母不同表示不同时间相同指示膜间差异显著 ($P < 0.05$)。

限值, 不宜食用, 所以指示膜在9 d和36 h两个时间点的 ΔE 需要足够大, 从而确保可以通过肉眼辨别出颜色的差异情况。从表1可以看出, 添加了明胶和 Fe^{2+} 的指示膜 ΔE 较大, 说明添加了明胶和 Fe^{2+} 之后的指示膜显示出的颜色变化更易于被肉眼观察到, 有利于区分新鲜和腐败的鱼肉。

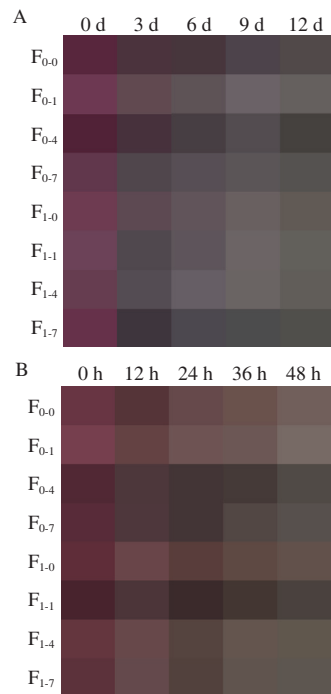


图4 指示膜监测贮藏于4 °C (A) 和25 °C (B) 条件下的鱼肉新鲜度时颜色随时间的变化

Fig. 4 Changes in color response of indicator films to the freshness of fish stored at 4 °C (A) and 25 °C (B)

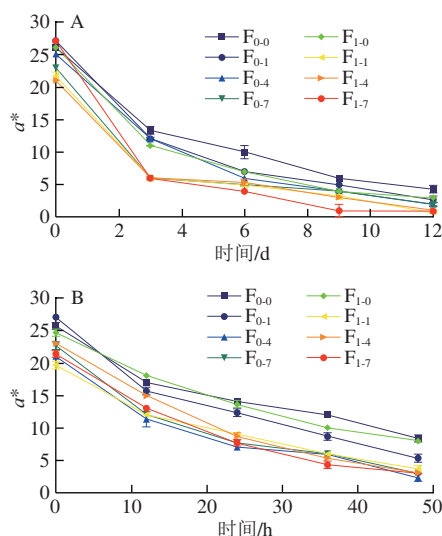


图5 指示膜监测贮藏于4 °C (A) 和25 °C (B) 条件下的鱼肉新鲜度时的颜色参数 a^* 值随时间的变化

Fig. 5 Changes in color parameter a^* of indicator films for monitoring the freshness of fish stored at 4 °C (A) and 25 °C (B)

2.6 颜色响应与TVB-N含量相关性分析

TVB-N含量是鱼肉新鲜度的重要指标之一, 为了使得指示膜不仅能够监测鱼肉新鲜度而且还能科学准确地推算出鱼肉的TVB-N含量, 本研究对指示膜的颜色响应参数和TVB-N含量进行了线性拟合。以鱼肉贮藏过程中TVB-N含量为纵坐标, 以颜色响应情况 $(L^*+a^*+b^*+R+G+B) / a^*$ (记为 P) 为横坐标进行线性拟合。从表2可以看出, 指示膜应用于监测贮藏于4 °C的鱼肉新鲜度时, 除了 $F_{1.0}$ 和 $F_{1.7}$ 之外, 其余指示膜的颜色响应情况 P 和TVB-N含量之间均存在较好的线性关系。其中, $F_{1.1}$ 和 $F_{1.4}$ 颜色响应情况 P 和TVB-N含量之间显示出非常强的线性相关性 (R^2 分别为0.999 1和0.983 3), 但是 $F_{1.7}$ 则显示出相关性较差的线性关系。说明明胶添加量为1 g/100 mL时, 若 Fe^{2+} 添加量为0.01 mg/mL和0.04 mg/mL, 指示膜的颜色响应情况与鱼肉新鲜度指标TVB-N含量之间存在高度一致性, 而继续增加 Fe^{2+} 质量浓度至0.07 mg/mL时, 由于氨反应灵敏度过高使得线性相关性降低。同样, 指示膜应用于监测贮藏于25 °C的鱼肉新鲜度时, 所有指示膜的颜色响应情况 P 和TVB-N含量之间均存在较好的线性关系。其中 $F_{0.7}$ 、 $F_{1.1}$ 和 $F_{1.4}$ 颜色响应情况 P 和TVB-N含量之间显示出非常强的线性相关性 (R^2 分别为0.987 6、0.983 3和0.981 7), 说明仅添加 Fe^{2+} (0.07 mg/mL) 或既添加明胶 (1 g/100 mL) 又添加 Fe^{2+} (0.01、0.04 mg/mL) 时, 指示膜的颜色响应情况与鱼肉新鲜度指标TVB-N含量之间存在高度一致性, 而明胶添加量为1 g/100 mL时, 继续增加 Fe^{2+} 添加量至0.07 mg/mL, 由于氨反应灵敏度过高使得线性相关性降低。线性拟合结果表明, 在监测鱼肉新鲜度的过程中, 可以根据指示膜的颜色响应情况 P 科学地推算出TVB-N含量, 从而判断鱼肉的新鲜程度。同时也可以根据TVB-N含量的限值推算出所对应的颜色响应 P 的限值, 进而根据 P 的限值判断鱼肉新鲜程度。以4 °C下监测鱼肉新鲜度的指示膜 $F_{1.1}$ 为例, 当TVB-N含量为20 mg/100 g时, 根据拟合方程 $y=0.085x+11.406$, 颜色响应 P 所对应的鱼肉可食用限值为101.11。因此, 4 °C条件下, 指示膜的 $(L^*+a^*+b^*+R+G+B) / a^*$ 值超过101.11时, 所监测的淡水鱼已腐败变质, 不能食用。表明指示膜颜色响应参数 P 能够指示鱼肉的新鲜度, 并能对可食用和不宜食用鱼肉进行鉴别。该结论与Luo Qian等^[26]根据水凝胶的 $(R+G+B) / B$ 值判断鱼肉新鲜度的结果相似。

表2 4℃和25℃贮藏条件下的鱼肉新鲜度指标(TVB-N含量)与指示膜颜色参数 $P(L^*+a^*+b^*+R+G+B)/a^*$ 的线性关系

Table 2 Linear correlation of fish freshness index (TVB-N) content and film color parameter $P(L^*+a^*+b^*+R+G+B)/a^*$ at 4℃ and 25℃

贮藏温度/℃	膜名称	拟合方程	决定系数 R^2
4	F ₀₋₀	$y=0.722 8x+1.881 7$	0.823 2
	F ₀₋₁	$y=0.353 5x+4.539 7$	0.892 8
	F ₀₋₄	$y=0.358 9x+5.751 7$	0.856 5
	F ₀₋₇	$y=0.328 3x+2.301 3$	0.904 2
	F ₁₋₀	$y=0.351 5x+4.686 2$	0.677 8
	F ₁₋₁	$y=0.085 x+11.406$	0.999 1
	F ₁₋₄	$y=0.136 2x+8.463 6$	0.983 3
	F ₁₋₇	$y=0.098 2x+10.992$	0.554 6
25	F ₀₋₀	$y=3.194 1x-35.765$	0.945 5
	F ₀₋₁	$y=1.723 2x-19.492$	0.979 3
	F ₀₋₄	$y=0.962 7x-3.625 3$	0.956 4
	F ₀₋₇	$y=1.199 9x-9.689 5$	0.987 6
	F ₁₋₀	$y=3.458 1x-40.606$	0.912 4
	F ₁₋₁	$y=1.809 9x-17.395$	0.983 3
	F ₁₋₄	$y=1.075 5x-10.663$	0.981 7
	F ₁₋₇	$y=1.05x-12.828$	0.934 1

2.7 明胶、Fe²⁺、花青素相互作用分析

2.7.1 Zeta电位分析

Zeta电位的绝对值反映了溶液的稳定性。绝对值越高,粒子之间的相互排斥力越大,它们相互碰撞和聚集的可能性就越小。相反,绝对值越低,粒子就越容易相互吸引并聚集^[27]。由图6可知,不同pH值的蓝莓花青素溶液的带有部分净负电荷,且Zeta电位绝对值小于5,可能是花青素在不同的pH值条件下不稳定所导致。当pH值从3增加至9时,明胶的Zeta电位由正值转为负值,且在pH 5和pH 7之间存在净电荷为零的点,说明本实验所提取的乌鳢鱼皮明胶的等电点在5~7之间^[28]。这与文献[29]报道的碱法提取所获得的B型明胶等电点在pH 5左右相一致。在花青素存在下,明胶的Zeta电位绝对值增加,说明花青素的存在使得明胶溶液的稳定性增加。花青素对蛋白质溶液的表面电荷特性和稳定性有一定的影响,这可能是花青素的添加引起静电屏蔽现象导致的^[30-31]。在Fe²⁺存在条件下,花青素溶液和明胶溶液的Zeta电位变化均不大,可能是Fe²⁺含量较低所致。而花青素、明胶和Fe²⁺共同存在时,与两两复合时相比,Zeta电位绝对值增加,说明三者之间可能存在相互作用且所形成复合物的稳定性增加^[27]。

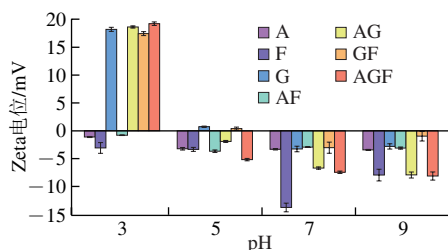
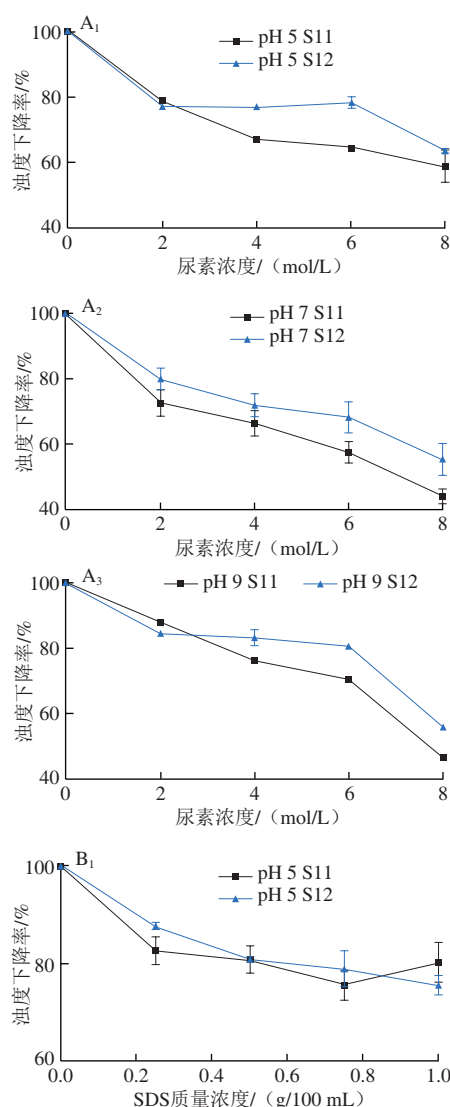


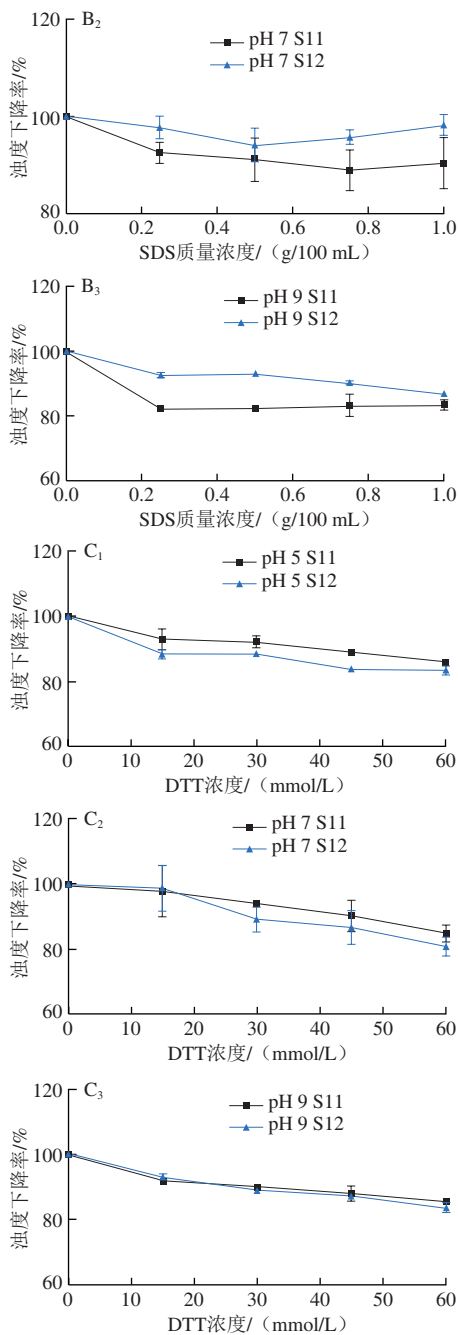
图6 不同pH值条件下不同样品的Zeta电位分布

Fig. 6 Zeta potential distribution of different samples under different pH conditions

2.7.2 驱动力分析

不同的分子间作用力可以被不同的化学试剂破坏^[32]。尿素可以通过与蛋白质氨基酸残基形成新的氢键而破坏分子间和分子内的氢键;SDS通过自身非极性尾巴与蛋白质分子的疏水区域作用,使蛋白质部分展开,从而破坏蛋白质及其聚集体疏水相互作用;而DTT可以破坏二硫键^[32]。为了研究花青素、明胶和Fe²⁺之间的氢键、二硫键和疏水相互作用,采用不同添加量的尿素、DTT和SDS处理S11和S12。从图7中可以看出,加入尿素时,S11和S12的浊度下降得最多,说明花青素、明胶和Fe²⁺之间的主要是氢键相互作用,而疏水相互作用和二硫键则占比少。且不同pH值条件下,添加Fe²⁺之后的混合液(S12)在添加尿素和SDS之后浊度下降率减小。说明添加Fe²⁺之后,混合液中不同物质之间的氢键数量和疏水相互作用减少。猜想可能是Fe²⁺既会和明胶形成基态配合物,又会和花青素形成螯合物,减少了花青素和明胶的结合,从而使二者相互作用所形成的氢键数量减少^[6,19,33]。





下标1. pH 5; 下标2. pH 7; 下标3. pH 9.

图7 尿素 (A)、SDS (B) 和DTT (C) 对不同pH值条件下S11和S12浊度降低的影响

Fig.7 Effect of urea (A), sodium dodecyl sulfate (SDS) (B) and DL-dithiothreitol (DTT) (C) on the decrease in the turbidity of S11 and S12 under different pH conditions

添加明胶和Fe²⁺的指示膜具有良好的氨反应灵敏性、花青素保护特性及颜色响应特性。而根据添加明胶和Fe²⁺之后蓝莓花青素溶液的紫外-可见吸收光谱的吸收峰强度和位置发生变化^[15]及Zeta电位发生变化可知三者存在相互作用,而驱动力分析结果表明三者主要存在氢键相互作用。三者可能的主要相互作用机理如图8所示。

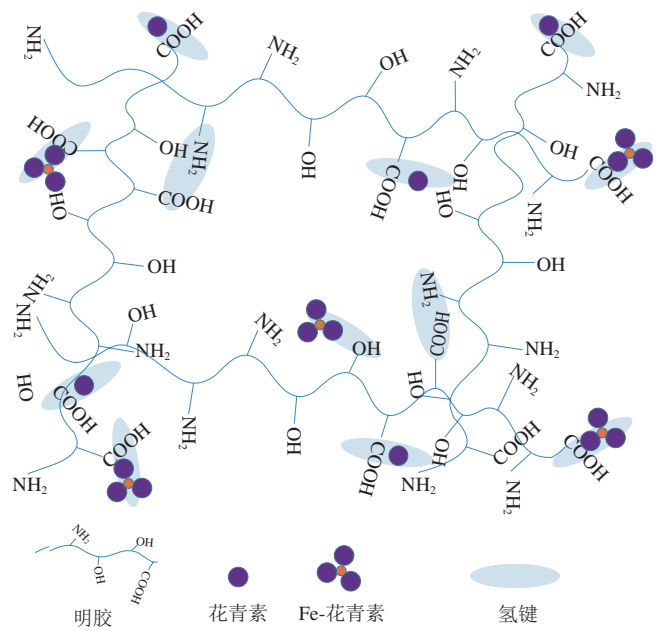


图8 提出的花青素、明胶和Fe²⁺之间的主要相互作用机理
Fig.8 Proposed interaction mechanism among anthocyanins, gelatin and Fe²⁺

3 结论

本研究制备以蓝莓花青素为指示剂、以玉米醇溶蛋白为基质的含明胶和Fe²⁺指示膜具有对pH值和氨的高灵敏性,可应用于鱼肉的新鲜度监测。含有适量明胶和Fe²⁺的指示膜监测鱼肉新鲜度时呈现的颜色响应特性 $P(L^*+a^*+b^*+R+G+B)/a^*$ 与鱼肉新鲜度指标TVB-N含量之间存在较强的相关性($R^2>0.98$)。明胶/Fe²⁺与花青素的相互作用影响了指示膜的颜色,使指示膜在监测腐败鱼肉时表现出与新鲜鱼肉较大的颜色差异(ΔE),因此对腐败鱼肉的监测具有很高的灵敏性。花青素、明胶和Fe²⁺之间主要通过氢键相互作用,创造了独特的微环境,增加了花青素对pH值的灵敏性。本研究通过将一些特殊物质与色素结合,可为开发智能食品包装和各种食品保鲜指标提供新的思路。

参考文献:

[1] MA Yanlan, LI Siying, JI Tengting, et al. Development and optimization of dynamic gelatin/chitosan nanoparticles incorporated with blueberry anthocyanins for milk freshness monitoring[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 247: 116738. DOI:10.1016/j.carbpol.2020.116738.

[2] SHI Ce, ZHANG Jiaran, JIA Zhixin, et al. Intelligent pH indicator films containing anthocyanins extracted from blueberry peel for monitoring tilapia fillet freshness[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 101(5): 1800-1811. DOI:10.1002/jsfa.10794.

[3] CHEN Huizhi, ZHANG Min, BHANDARI B, et al. Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish

- freshness[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105438. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105438.
- [4] ZHANG Kailong, HUANG T S, YAN Hao, et al. Novel pH-sensitive films based on starch/polyvinyl alcohol and food anthocyanins as a visual indicator of shrimp deterioration[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 145: 768-776. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.159.
- [5] JIANG Guangyang, HOU Xiaoyan, ZENG Xuedan, et al. Preparation and characterization of indicator films from carboxymethyl-cellulose/starch and purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam) anthocyanins for monitoring fish freshness[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 359-372. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.024.
- [6] BUCHWEITZ M, BRAUCH J, CARLE R, et al. Application of ferric anthocyanin chelates as natural blue food colorants in polysaccharide and gelatin based gels[J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 274-282. DOI:10.1016/j.foodres.2012.11.030.
- [7] KUMAR T S M, KUMAR K S, RAJINI N, et al. A comprehensive review of electrospun nanofibers: food and packaging perspective[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2019, 175: 107074. DOI:10.1016/j.compositesb.2019.107074.
- [8] ULRICH S, MOURA S O, DIAZ Y, et al. Electrospun colourimetric sensors for detecting volatile amines[J]. *Sensors and Actuators B Chemical*, 2020, 322: 128570. DOI:10.1016/j.snb.2020.128570.
- [9] AGARWAL S, GREINER A, WENDORFF J H. Functional materials by electrospinning of polymers[J]. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38(6): 963-991. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001.
- [10] ALEHOSSEINI A, GÓMEZ-MASCARAQUE L G, GHORANI B, et al. Stabilization of a saffron extract through its encapsulation within electrospun/electrosprayed zein structures[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 113: 108280. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108280.
- [11] AGHAEI Z, GHORANI B, EMADZADEH B, et al. Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness[J]. *Food Control*, 2020, 111: 107065. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.107065.
- [12] SHAIKH S, YAQOUB M, AGGARWAL P. An overview of biodegradable packaging in food industry[J]. *Current Research in Food Science*, 2021, 4(12): 503-520. DOI:10.1016/j.crfs.2021.07.005.
- [13] LAWTON J W. Zein: a history of processing and use[J]. *Cereal Chemistry*, 2002, 79(1): 1-18. DOI:10.1094/CCHEM.2002.79.1.1.
- [14] TAN C C, KARIM A A, UTHUMPORN U, et al. Effect of extraction temperature on the physicochemical properties of gelatine from the skin of black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Journal of Physical Science*, 2019, 30: 1-21. DOI:10.21315/jps2019.30.s1.1.
- [15] GAO Ruichang, HU Huiling, SHI Tong, et al. Incorporation of gelatin and Fe²⁺ increases the pH-sensitivity of zein-anthocyanin complex films used for milk spoilage detection[J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 677-686. DOI:10.1016/j.crfs.2022.03.016.
- [16] 刘景荣. pH颜色响应智能食品包装膜的制备、性能与应用[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019: 28-46.
- [17] AKBARI A, WU J. Cruciferin nanoparticles: preparation, characterization and their potential application in delivery of bioactive compounds[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 107-118. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.09.017.
- [18] LI Yana, WU Kaixuan, WANG Beihai, et al. Colorimetric indicator based on purple tomato anthocyanins and chitosan for application in intelligent packaging[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 174(4): 370-376. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.182.
- [19] EL-NAGGAR M E, EL-NEWEHY M H, ALDALBAHI A, et al. Immobilization of anthocyanin extract from red-cabbage into electrospun polyvinyl alcohol nanofibers for colorimetric selective detection of ferric ions[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(2): 105072. DOI:10.1016/j.jece.2021.105072.
- [20] KHAODEE W, AEUNGMAITREPIROM W, TUNTULANI T. Effectively simultaneous naked-eye detection of Cu (II), Pb (II), Al (III) and Fe (III) using cyanidin extracted from red cabbage as chelating agent[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 126: 98-104. DOI:10.1016/j.saa.2014.01.125.
- [21] 翟晓东. 基于比色型智能指示标签的典型冷鲜肉新鲜度实时监测研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020: 25-35.
- [22] 郑舒文. 基于红肉火龙果色素的鱼鲜度检测智能包装的研究与制作[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019: 9-15.
- [23] 薛瑾. 基于花青素的三文鱼新鲜度指示型包装材料研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019: 11-18.
- [24] GE Yujun, LI Yuan, BAI Yan, et al. Intelligent gelatin/oxidized chitin nanocrystals nanocomposite films containing black rice bran anthocyanins for fish freshness monitorings[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 155: 1296-1306. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.101.
- [25] PRIETTO L, PINTO V Z, HALAL S E, et al. Ultrafine fibers of zein and anthocyanins as natural pH indicator[J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2017, 98(7): 2735-2741. DOI:10.1002/jsfa.8769.
- [26] LUO Qian, ZHANG Yaqin, ZHOU Yan, et al. Portable functional hydrogels based on silver metallization for visual monitoring of fish freshness[J]. *Food Control*, 2020, 123: 107824. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107824.
- [27] MALHOTRA A, COUPLAND J N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18(1): 101-108. DOI:10.1016/S0268-005X(03)00047-X.
- [28] 黄洁. 明胶与鞣酸分子间相互作用及其复合物在丁香油乳液制备中的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017: 14-28.
- [29] SU Kai, WANG Chunming. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(11): 2139-2145. DOI:10.1007/s10529-015-1907-0.
- [30] ZANG Zhihuan, CHOU Shurui, GENG Lijuan, et al. Interactions of blueberry anthocyanins with whey protein isolate and bovine serum protein: color stability, antioxidant activity, *in vitro* simulation, and protein functionality[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 152(3): 112269. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112269.
- [31] ZHOU Rui, DONG Xueyan, SONG Lanlan, et al. Interaction mode and nanoparticle formation of bovine serum albumin and anthocyanin in three buffer solutions[J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 155: 244-250. DOI:10.1016/j.jlumin.2014.06.037.
- [32] 闫荣. 玉米淀粉与蛋白质组合结构及分离机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 41-54.
- [33] 唐世华, 黄建滨. Cu²⁺和Fe³⁺与明胶的相互作用[J]. *物理化学学报*, 2001(10): 873-878. DOI:10.3866/PKU.WHXB20011003.