

葡萄糖糖基化米糠蛋白-壳聚糖复合膜的制备及表征

孟才云¹, 孙妍¹, 肖志刚², 李铁晶¹, 赵凤芹³, 王娜^{1,*}

(1. 辽宁大学轻型产业学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳师范大学粮食学院, 辽宁 沈阳 110034;

3. 营口理工学院, 辽宁 营口 115014)

摘要: 为改善米糠蛋白 (rice bran protein, RBP) 膜机械性能、耐水性和阻隔性较差等问题, 将RBP经葡萄糖 (G) 糖基化改性处理后制备葡萄糖糖基化米糠蛋白 (glucose-glycosylated rice bran protein, RBP-G) 膜和RBP-G-壳聚糖复合 (RBP-G-chitosan composite, RBP-G-CS) 膜。以机械性能为指标分别考察G与RBP质量比、RBP-G与CS质量比对薄膜的影响, 对比分析优化条件下RBP膜、RBP-G膜和RBP-G-CS膜的色泽、透明度、耐水性、水蒸气透过率及热特性, 并通过扫描电子显微镜和傅里叶变换红外光谱对薄膜结构进行表征。结果表明, 当G与RBP质量比为1:1时RBP-G膜的机械性能有明显改善, 其抗拉强度较RBP膜提高28.00%, 断裂伸长率提高33.13%; 当RBP-G与CS质量比为1:1时RBP-G-CS膜的机械性能较好, 其抗拉强度和断裂伸长率较RBP膜分别提高了197.33%、84.42%。对比其他性能发现, RBP-G-CS膜的透明度、耐水性、阻水性及热特性均得到显著改善 ($P < 0.05$), 且结构表征显示RBP-G-CS膜内部结构均匀致密, 具有较强的氢键作用力。研究结果证实糖基化改性处理可以提高RBP膜的性能, 且改性后蛋白与CS的良好结合能够大幅度改善薄膜机械性能和耐水性。

关键词: 米糠蛋白; 壳聚糖; 葡萄糖; 糖基化; 复合膜

Preparation and Characterization of Glycosylated Rice Bran Protein-Chitosan Composite Film

MENG Caiyun¹, SUN Yan¹, XIAO Zhigang², LI Tiejing¹, ZHAO Fengqin³, WANG Na^{1,*}

(1. College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; 3. Yingkou Institute of Technology, Yingkou 115014, China)

Abstract: In order to improve the mechanical properties, water resistance and barrier properties of rice bran protein (RBP) film, glycosylated RBP (RBP-G) film and RBP-G-chitosan composite (RBP-G-CS) film were prepared. The effects of the mass ratio of glucose to RBP and the mass ratio of RBP-G to chitosan on the mechanical properties of the films were investigated. The color, transparency, water resistance, water vapor permeability and thermal characteristics of RBP, RBP-G and RBP-G-CS films prepared under the optimal conditions were compared and analyzed. The structure of the films was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The results showed that the mechanical properties of RBP-G film with a glucose to RBP ratio of 1:1 were obviously improved, and the tensile strength increased by 28.00% and the elongation at break by 33.13% compared with RBP film. RBP-G-CS film with a RBP-G to chitosan ratio of 1:1 had better mechanical properties, and its tensile strength and elongation at break increased by 197.33% and 84.42% compared with RBP film, respectively. The transparency, water resistance, barrier properties and thermal properties of RBP-G-CS film were significantly improved ($P < 0.05$). The structure of RBP-G-CS film was uniform and compact, owing to the strong hydrogen bonding forces. These results show that glycosylation modification can improve the performance of RBP film, and a good combination of modified RBP and chitosan can greatly improve the mechanical properties and water resistance of the film.

Keywords: rice bran protein; chitosan; glucose; glycosylation; composite film

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220613-120

中图分类号: TS206.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 16-0135-08

收稿日期: 2022-06-13

基金项目: 辽宁省区域创新联合基金项目 (2020-YKLH-35); 辽宁大学中青年教师专项 (辽大校发 (2020) 59号)

第一作者简介: 孟才云 (1996—) (ORCID: 0000-0002-6984-5488), 女, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。

E-mail: duolaacai123@163.com

*通信作者简介: 王娜 (1990—) (ORCID: 0000-0002-9993-9178), 女, 讲师, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。

E-mail: wangna@lnu.edu.cn

引文格式:

孟才云, 孙妍, 肖志刚, 等. 葡萄糖糖基化米糠蛋白-壳聚糖复合膜的制备及表征[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 135-142.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220613-120. <http://www.spkx.net.cn>

MENG Caiyun, SUN Yan, XIAO Zhigang, et al. Preparation and characterization of glycosylated rice bran protein-chitosan composite film[J]. Food Science, 2023, 44(16): 135-142. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220613-120. <http://www.spkx.net.cn>

据调查, 目前市场上广泛使用的食品包装材料大多为石油基制成的塑料包装, 这主要是因为塑料材料价格比较低廉, 具有机械性能强、阻隔性和热密封能力较好等优势, 然而, 因其不可降解、较低的回收利用率等原因, 对生态环境造成了严重负担^[1-2]。与之相比, 生物质薄膜因具有来源广泛、营养安全、制备简单, 安全环保等优点受到广泛关注^[3-4]。目前, 蛋白质、脂质、多糖及其衍生物或其复合材料是生物质可食性膜的主要原料。生物质薄膜作为一种新型、安全环保的材料, 可将应用于果蔬、肉制品、速食食品调料包、油炸及烘焙食品等方面^[5-6]。

蛋白质内部具有较强的氢键、二硫键、疏水相互作用等作用力, 因此具有较好的成膜特性, 且膜结构比较稳定^[7]。近年来, 米糠蛋白 (rice bran protein, RBP) 因其良好的抗癌、抗氧化等功能性质和营养价值被广泛的应用于成膜材料中。Adebiyi等^[8-9]研究了RBP的成膜特性, 发现RBP可用于可降解蛋白基薄膜的制备且具有一定的功能特性。但RBP的低溶解性导致其功能性质较差, 限制了其应用, 且单一RBP薄膜机械性能和阻隔性能等较差。因此, 用适当的改性方法对蛋白质进行处理^[10], 可以得到具有良好机械性能和阻隔性能的蛋白膜^[11-12]。众多研究表明糖基化改性可以有效改善蛋白质的功能性质^[13-14], 从而提升蛋白膜的性能^[15-16]。蒋丽梅^[15]的研究结果显示木糖糖基化改性花生蛋白膜的抗拉强度和断裂伸长率分别提高了45.75%、42.70%。郭浩等^[16]的研究证明糖基化改性可以使得玉米醇溶蛋白膜具备更强的抗拉强度和热稳定性。陈又铭等^[17]发现经菊粉糖基化改性后的玉米醇溶蛋白膜的透光率和阻隔性得到显著提升。

将蛋白质与多糖两种基材共混制膜可进一步提高薄膜的致密度, 其阻隔性能和渗透率均优于单一蛋白膜, 对食品品质具有更好的保护效果^[18]。此外, 多糖的添加也可以加强溶液体系的黏稠度和凝胶特性, 从而使成膜溶液更加稳定^[19]。壳聚糖 (chitosan, CS) 作为自然界中来源广泛的天然碱性氨基多糖, 其抗菌性、阳离子性和成膜性使其成为医疗、食品等行业的热门材料, 同时因其具有抗氧化和抑菌等功能特性, 以其成膜后用于食品包装可起到防腐保鲜的效果。Hosseini等^[20]发现将CS纳米粒子与鱼皮明胶作用制成的复合膜弹性模量、抗拉强度和阻水性明显增强。Samsalee等^[21]发现CS可以显著改善

猪血浆蛋白膜的透明度、溶解性、机械性能和热性能。Wang Lingling等^[22]利用超声技术制备的大米蛋白水解物-CS可食性复合膜的断裂伸长率提高了125%。

本研究首先利用小分子葡萄糖 (G) 对RBP进行糖基化改性后制备糖基化RBP膜, 利用糖基化反应促进蛋白分子的交联从而改善RBP膜性能; 继而将糖基化RBP与CS复配, 制备葡萄糖糖基化RBP-CS复合 (glucose-glycosylated rice bran protein-chitosan composite, RBP-G-CS) 膜, 以进一步克服单一基材薄膜在物理性能方面的缺点。考察G与RBP质量比、糖基化RBP与CS质量比对薄膜机械性能的影响, 对比分析上述薄膜材料的耐水性、阻隔性、热特性等物理性能, 并利用扫描电子显微镜和傅里叶变换红外光谱仪对薄膜进行结构表征, 以期拓宽RBP的应用范围, 为开发新型食品包装膜提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

脱脂米糠 沈阳奥达油脂有限公司; G、氢氧化钠、盐酸 (均为分析纯) 天津化学试剂一厂; CS (脱乙酰度80.0%~95.0%, 分子质量100 kDa) 上海源叶生物科技有限公司; 丙三醇、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、无水氯化钙、邻苯二甲醛 (1,2-phthalic dicarboxaldehyde, OPA)、硼砂、甲醇、十二烷基硫酸钠 (均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; β -蔗糖基乙醇 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

JD2000-2L电子分析天平 沈阳龙腾电子有限公司; RT10恒温磁力搅拌器 德国IKA公司; HH-S4电热恒温水浴锅 北京市科伟永型仪器有限公司; UV-9000紫外-可见分光光度计 上海市元析仪器有限公司; Dhg-9240A烘箱 上海精宏实验仪器有限公司; BK-302电子数显卡尺 上海鼎冷实业发展有限公司; NS-800色差仪 深圳市三恩时科技有限公司; CT3 4500质构仪 美国博勒飞公司; Q200差示扫描量热仪 美国TA公司; S4800扫描电镜 日本日立公司; FENSOR II傅里叶变换红外光谱仪 德国布鲁克有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RBP的提取

采用碱溶酸沉法^[23]于脱脂米糠中提取RBP。以料液

比1:9 (g/mL)的比例将脱脂米糠与蒸馏水混合,使用1 mol/L NaOH或HCl溶液将混合物pH值调至9.5,50 ℃搅拌2 h后,过滤除去米糠渣后滤液经6 000 r/min离心15 min,将离心后上清液调pH 4.5,再次6 000 r/min离心30 min,收集沉淀稀释并调pH 7.0,冷冻干燥即得RBP(蛋白质质量分数87.13%、溶解度17.59%)。

1.3.2 RBP-G的制备

参考Zhu Dan等^[24]的方法并加以改进,按质量分数3%称取RBP溶于pH 9、50 mmol/L磷酸盐缓冲溶液中,再分别按G和RBP不同质量比(1:3、1:2、1:1、2:1、3:1)称取G溶于溶液中,充分搅拌,在pH 9、90 ℃水浴搅拌60 min后,取出立即冰浴,于4 ℃透析24 h,冻干成粉末,备用。

1.3.3 薄膜样品的制备

采用浇铸成膜的方式制备薄膜。称取一定量RBP-G溶于蒸馏水配制成6 g/100 mL的蛋白溶液,1 mol/L的NaOH溶液调节pH 11,添加甘油至1.25 g/100 mL,室温下磁力搅拌30 min,量取15 mL成膜溶液浇铸到内径为9 cm的无菌塑料培养皿上,50 ℃干燥6~10 h后取出,并将膜放入25 ℃、相对湿度58%的干燥器中保存48 h后得到RBP-G膜,用于后续各项性能的测定。以未经处理的RBP在相同条件下,80 ℃磁力搅拌后制备对照膜(RBP膜)。

分别配制4 g/100 mL的RBP-G溶液(G:RBP=1:1)和2 g/100 mL的CS冰乙酸溶液,将RBP-G置于磁力搅拌器上,边搅拌边缓慢滴加CS,得到不同固形物质量比(RBP-G与CS质量比6:1、4:1、2:1、1:1、2:3)的RBP-G-CS混合溶液,使用1 mol/L NaOH或HCl溶液将混合液调pH 4.0,室温下搅拌4 h,滴加甘油至1.25 g/100 mL后继续搅拌30 min,量取15 mL成膜溶液浇铸到内径为9 cm的无菌塑料培养皿上。将盛有膜液的培养皿水平放入50 ℃的烘箱中,干燥6~10 h后取出,并回软48 h后得到RBP-G-CS膜,用于后续各项性能的测定。

1.3.4 接枝度的测定

采用OPA法^[25]测定样品接枝度,称取40 mg的OPA溶于1 mL甲醇中,分别加入2.5 mL 20 g/100 mL的SDS溶液,25 mL 0.1 mol/L硼砂溶液,100 μL β-巯基乙醇,定容至50 mL混匀,得到OPA试剂。于试管中加入4 mL OPA试剂,再加入200 μL 5 mg/mL样品液,混合均匀后于35 ℃水浴2 min,在340 nm波长处测定溶液吸光度,接枝度按下式计算:

$$\text{接枝度}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为原蛋白质自由氨基总量; A_1 为糖基化蛋白质自由氨基的含量。

1.3.5 机械性能的测定

参照Liu Jun等^[26]的测试方法并适当修改,采用质构仪测定薄膜的抗拉强度和断裂伸长率。将回软48 h的薄膜样品裁剪成长条状(70 mm×15 mm),固定于TA-DGA探头进行拉伸测试,设定目标值为50 mm,触发点负载为0.1 N,测试速率为0.5 mm/s,每个样品重复5次。抗拉强度和断裂伸长率按下式计算:

$$\text{抗拉强度}/\text{MPa} = \frac{F}{W \times d} \quad (2)$$

$$\text{断裂伸长率}/\% = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: F 为峰值负载/N; W 为薄膜样品宽度/mm; d 为薄膜样品厚度/mm; ΔL 为峰值负载变形量; L_0 为样品初始长度。

1.3.6 颜色的测定

采用色差仪对薄膜的色泽进行测定。在薄膜样品上随机选取5处测定并记录样品的 L^* 、 a^* 、 b^* 及 ΔE 值,取其平均值。

1.3.7 不透明度的测定

参考Noshirvani等^[27]的方法使用紫外分光光度计测定薄膜的不透明度。将薄膜样品裁剪成矩形(1 cm×4 cm),将其贴于比色皿内表面,以空白比色皿为空白对照,分别测定样品在600 nm波长处的吸光度,每个膜样品重复测定3次,取平均值。按式(4)计算膜的不透明度:

$$\text{不透明度} = \frac{A_{600 \text{ nm}}}{x} \quad (4)$$

式中: $A_{600 \text{ nm}}$ 为薄膜在600 nm波长处的吸光度; x 为薄膜厚度/mm。

1.3.8 膨胀率的测定

将每组薄膜样品裁剪出3块2 cm×2 cm的正方形,分别将其在105 ℃烘箱中干燥至质量恒定(M_1)后,放于50 mL、20 ℃的蒸馏水中浸泡5 min,取出后用滤纸吸干薄膜表面水分,准确称量记为 M_2 ,薄膜膨胀率按式(5)计算:

$$\text{膨胀率}/\% = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100 \quad (5)$$

1.3.9 水溶性的测定

将每组薄膜样品裁剪出3块2 cm×2 cm的正方形,分别将其在105 ℃烘箱中干燥至质量恒定(W_1)后,放于50 mL、20 ℃的蒸馏水中持续搅拌24 h,将不溶物取出后再次放于105 ℃烘箱中干燥至质量恒定(W_2),薄膜水溶性按式(6)计算:

$$\text{水溶性}/\% = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (6)$$

1.3.10 水蒸气透过率的测定

参照GB 1037—70《塑料透湿性试验方法》和Liu Jun等^[28]的方法,本实验采用“拟杯子法”进行。将薄膜样品密封(确保水分仅通过薄膜迁移)在装满无水氯化钙的25 mL烧杯口,称量后放于盛有蒸馏水的干燥器中,相对湿度为100%,温度为20℃。每隔12 h称量杯子的质量,持续7 d,每组样品测量3个平行。薄膜水蒸气透过率按式(7)计算:

$$\text{水蒸气透过率}/(\text{g}/(\text{m}\cdot\text{s}\cdot\text{kPa}))=\frac{m\times d}{t\times A\times\Delta P}\quad(7)$$

式中: m 为烧杯质量增量/g; d 为薄膜厚度/m; t 为称量时间间隔/s; A 为水分有效迁移面积($12.56\times 10^{-4}\text{m}^2$); ΔP 为测试温度下薄膜两侧蒸汽压差(20℃,2.339 kPa)。

1.3.11 热特性分析

利用差示扫描量热仪对薄膜进行热特性分析,准确称取5 mg蛋白膜样品于坩埚中压片,以空坩埚为对照,放置在差示扫描量热仪中样品台上,采用氮气(N_2)保护,以10℃/min的升温速率在25~250℃范围内扫描,通过TA Universal Analysis软件分析得出样品的玻璃化转变温度(T_g)、变性温度(T_m)和热焓值(ΔH)。

1.3.12 微观结构测定

采用扫描电子显微镜对薄膜样品的表面及横截面结构进行观察。将薄膜样品于50℃条件下放置12 h烘干,再采用液氮冷冻将薄膜破碎,取适当大小的样品固定于样品台上并喷金镀膜,在1.0 kV电压下观察薄膜结构。

1.3.13 傅里叶红外光谱分析

采用红外光谱衰减全反射法对薄膜样品进行傅里叶变换红外光谱。测试范围为4 000~400 cm^{-1} ,以同条件下空气作为扫描背景。

1.4 数据处理

所有样品均重复平行测定,所得结果表示为 $\bar{x}\pm s$,使用Office 2007、SPSS 25、Origin 2018、PeakFit v4.12软件进行数据处理和图表绘制。

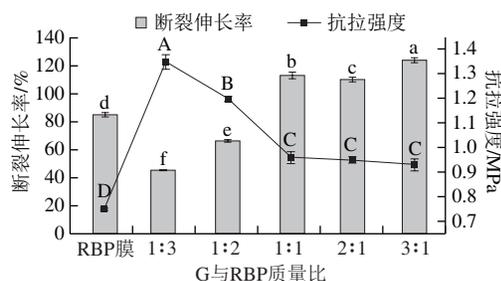
2 结果与分析

2.1 薄膜机械性能分析

2.1.1 糖基化改性条件对RBP-G膜机械性能的影响

将RBP糖基化改性后制备薄膜,以期达到提高RBP膜性能的目的。而机械性能体现了膜材料在食品包装、运输及贮藏过程中的应力承载能力和耐用性,是评价生物物质包装材料最重要的一项指标,其可用抗拉强度和断裂伸长率衡量。前期实验发现,糖基化改性条件中G与RBP质量比对薄膜的成膜性影响最大,改变反应时间薄膜的抗拉强度仅提升22.97%~77.00%,改变反应pH值抗

拉强度仅升高1.16%~55.81%。故本实验仅对G与RBP质量比进行探讨,G与RBP质量比对RBP-G膜机械性能影响如图1所示。同时,测定不同质量比得到的糖基化改性RBP的接枝度,结果如图2所示。



不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

图1 G与RBP质量比对RBP-G膜机械性能的影响

Fig. 1 Effect of mass ratio of glucose to RBP on mechanical properties of RBP-G films

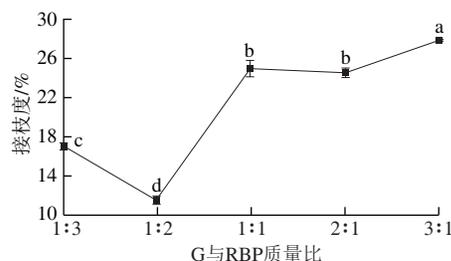


图2 G与RBP质量对接枝度的影响

Fig. 2 Effect of mass ratio of glucose to RBP on grafting degree

由图2可知,当G与RBP质量比低于1:2时,接枝度较低,这主要是因为蛋白浓度较大导致体系黏度较大,从而使得糖基化反应程度较小^[29]。随着糖浓度的增大,糖分子的羰基与蛋白的氨基碰撞机会加大,糖基化程度显著增加,在G与RBP质量比为1:1~3:1范围内,接枝度提升至24.54%~27.87%,说明此时G对RBP有较好的修饰效果。同时,由图1可以看出,随改性过程中G使用量增大,RBP-G膜的断裂伸长率不断增大,抗拉强度逐渐降低,且抗拉强度在G与RBP质量比高于1:1后变化不显著($P>0.05$)。与RBP膜相比,RBP-G膜的抗拉强度提升了24.00%~80.00%,而断裂伸长率在G与RBP质量比达到1:1后显著增强,较RBP膜提升了29.45%~45.93%,结合图2可知此范围内糖基化改性蛋白的接枝度较高。由此推断,美拉德反应过程中蛋白质氨基和G羰基结合能够使薄膜内部形成更加稳定的网络结构,薄膜更加坚固柔韧、机械性能提高。基于以上结果,综合考虑得出G与RBP质量比为1:1时的RBP-G膜具有较好的机械性能(抗拉强度和断裂伸长率为0.96 MPa、113.05%,较RBP膜抗拉强度提高28.00%,断裂伸长率提高33.13%),故选择对其进行后续其他物理性能的对比分析和结构表征。

2.1.2 RBP-G与CS质量比对RBP-G-CS膜机械性能的影响
如图3所示,RBP-G-CS膜的抗拉强度随着CS使用

量的增加呈先升高后降低的趋势,在RBP-G与CS质量比为6:1时仅为0.92 MPa,而两者比例为1:1时达到最大值(2.23 MPa),此时较RBP-G膜(G:RBP=1:1)提高了1.32倍。分析原因,可能是CS的加入引入了大量羟基,羟基可与蛋白分子中的氨基和羧基结合,从而形成稳定作用力,使薄膜的力学强度增强,抗拉强度变大^[30-31],而当CS比例继续加大,膜液流动性变差,削弱了多糖与蛋白之间的作用力^[32]。而RBP-G-CS膜的断裂伸长率随CS占比的增加从76.68%升高至185.38%,当RBP-G与CS质量比为1:1时薄膜的抗拉强度和断裂伸长率较RBP膜分别提高了197.33%、84.42%,其断裂伸长率是RBP-G膜(G:RBP=1:1)的1.39倍。这可能是由于RBP-G膜中分子排列较紧密,CS的加入使得分子排列较之前松散,从而使得复合膜在拉伸过程中可产生较大形变,杨艳妍^[33]和沈凯青^[34]研究也表明CS的加入在一定范围内可以显著改善生物质薄膜的机械性能。基于以上对薄膜机械性能的分析,RBP-G与CS质量比为1:1时,RBP-G-CS膜表现出较好的机械性能,选定其进行后续其他物理性能的对比如分析和结构表征。

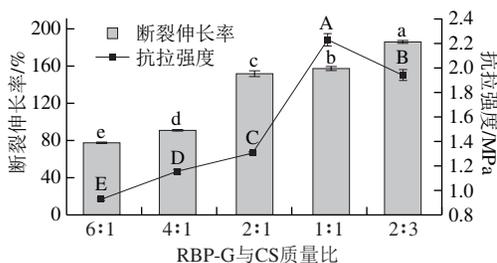


图3 RBP-G与CS质量比对RBP-G-CS薄膜机械性能的影响

Fig. 3 Effect of RBP-G to CS ratio on the mechanical properties of RBP-G-CS films

2.2 薄膜表观分析

对优化后的RBP膜、RBP-G膜、RBP-G-CS膜的色泽及不透明度进行测定,结果如表1所示,样品外观如图4所示。色泽是薄膜重要的感官性质之一,会对其应用产生直接影响。与RBP膜相比,RBP-G膜亮度(L^*)虽有所提升,但红度(a^*)、黄度(b^*)及色差值(ΔE)也有所增加,这表明经糖基化改性后蛋白膜的色泽更深,更偏向于红黄色,这与美拉德反应产生的类黑素类物质有关^[35],此结果显示与Cho^[36]和Rocha^[37]等的研究一致。相较于对照组RBP膜(图4A),RBP-G膜(图4B)的背景字体清晰度有所提升,且其不透明度较RBP膜降低3.94%。

添加CS后的RBP-G-CS膜的色泽较RBP膜和RBP-G膜有很大改善, L^* 值由61.53提升至78.02, a^* 、 b^* 和 ΔE^* 值均显著降低($P < 0.05$),这与CS膜本身较好的色泽有关,且Lee等^[38]也发现CS的加入可以显著改善啤酒糟蛋白膜的表现色泽。RBP-G-CS膜的不透明度与RBP膜相比降低了16.80%,结合图4可以看出,RBP-G-CS膜(图4C)的背景字体清晰度显著优于RBP膜和RBP-G

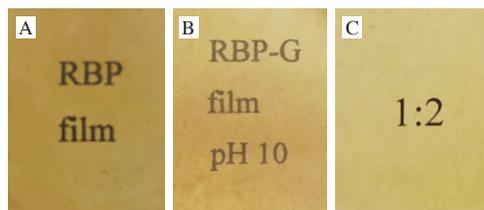
膜,即薄膜的透明度得到显著改善,RBP与CS具备较好的相容性,同时,CS的加入使得复合膜表面更加均匀,RBP-G-CS膜具备更加优质的外观。

表1 不同薄膜样品的色泽和不透明度

Table 1 Color and opacity of different film samples

样品	L^*	a^*	b^*	ΔE	不透明度
RBP膜	61.53±0.67 ^c	5.34±0.18 ^b	31.63±0.46 ^b	41.41±0.81 ^b	3.81±0.15 ^a
RBP-G膜	62.62±0.73 ^b	5.74±0.31 ^a	32.72±0.23 ^a	43.47±0.39 ^a	3.66±0.08 ^b
RBP-G-CS膜	78.02±0.99 ^a	0.23±0.01 ^f	20.94±0.22 ^c	21.94±0.19 ^c	3.17±0.06 ^c

注: 同行中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。



A. RBP膜; B. RBP-G膜; C. RBP-G-CS膜。图5、7同。

图4 不同薄膜样品图片

Fig. 4 Pictures of different film samples

2.3 薄膜物性分析

膨胀率和溶解度可反映出薄膜的耐水性能,所有薄膜样品在蒸馏水中浸泡过后可完整取出。RBP-G膜的膨胀率和水溶性较RBP膜仅分别降低了3.77%、5.19%,而RBP-G-CS膜与RBP-G膜相比,膨胀率和水溶性分别降低了76.30%、51.52%,一方面是CS本身在中性水中溶解度极低,所以复合膜的膨胀率和溶解度因CS的加入而降低;另一方面是RBP-G与CS发生交联,亲水作用位点减少,从而导致复合膜的耐水性优于单一基质薄膜。

水蒸气透过率代表薄膜的阻水性,对食品品质有直接的影响,水蒸气透过率越低则阻水性越好。RBP经糖基化改性后,结构发生变化,暴露出更多疏水基团,同时,蛋白分子在成膜过程中可以交联成致密结构,从而使RBP-G膜的水蒸气透过率较RBP膜降低了16.09%,即RBP经糖基化改性后制得的薄膜阻水性明显提高。而CS的加入可以与糖基化RBP位点结合形成氢键^[34,39],使水蒸气分子运动受阻,从而进一步提高薄膜的阻水性,RBP-G-CS膜的阻水性较RBP-G膜、RBP膜分别提高了15.62%、29.20%。

表2 不同薄膜样品的物理性能

Table 2 Physical properties of different film samples

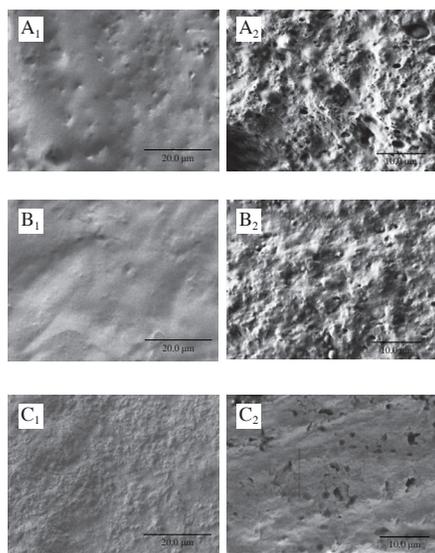
样品	膨胀率/%	溶解度/%	水蒸气透过率/ ($10^{-1} \text{g}/(\text{m} \cdot \text{s} \cdot \text{kPa})$)	$T_g/^\circ\text{C}$	$T_m/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
RBP膜	141.48±1.67 ^a	25.63±0.65 ^a	4.35±0.03 ^a	77.85±1.01 ^c	105.72±1.63 ^c	7.38±0.39 ^a
RBP-G膜	136.15±1.22 ^b	24.30±0.89 ^b	3.65±0.01 ^b	79.02±0.94 ^b	107.54±2.01 ^b	12.47±0.48 ^b
RBP-G-CS膜	32.27±0.54 ^c	11.78±0.13 ^c	3.08±0.01 ^c	85.15±1.85 ^a	110.49±1.27 ^a	17.33±0.65 ^c

本研究通过测定薄膜的 T_g 、 T_m 和 ΔH 比较不同薄膜样品的热稳定性。由表2可以看出,RBP-G膜的 T_g 、 T_m 和 ΔH

较RBP膜分别提高了1.17 °C、1.28 °C、5.09 J/g, 说明糖基化改性后RBP膜的热稳定性有所提高, 这与郭浩等^[16]的研究结果一致。这是因为糖基化改性后, RBP与G结合成了糖蛋白的形式, 其空间结构的变化导致了热稳定性的变化^[40], 美拉德反应提高了蛋白成膜后的热稳定性。当加入CS后, 复合膜的热稳定性表现最佳, T_g 较RBP膜提高了7.30 °C, T_m 较RBP膜提高了4.77 °C, 而 ΔH 是RBP膜的2.35倍、较RBP-G膜亦提高了38.97%。复合膜热稳定性的提高可能是因为CS的加入引入了极性基团, 从而加强了蛋白分子间的交联, 增强了RBP-G和CS分子间的相互作用力^[21]。此外, 在本研究的前期实验测得单一CS膜的 T_g 为94.77 °C、 T_m 为119.37 °C、 ΔH 为50.59 J/g, 故复合膜热稳定的增加一定程度上也可能与CS成膜后较好的热特性有关。

2.4 薄膜微观结构分析

如图5所示, RBP膜表面有较多细小孔洞和凸起颗粒状形态, 内部有较多大小不一的深邃孔洞存在。RBP-G膜表面孔洞较RBP膜明显减少, 仅有些许凸起, 膜表面变的更加平整光滑, 同时如图5B₂所示内部深邃的孔洞数量明显减少, 内部结构更加紧致, 但有较强的颗粒感, 质地不均匀。而RBP-G-CS膜的表面未见明显的孔洞, 仅呈现出较不均匀的状态, 横截面电镜图显示其内部虽有些许孔洞, 但其质地是连续的且较RBP膜和RBP-G膜更加细腻, 并未出现明显的相分离或断层现象, 复合膜内部结构更加均匀致密, 故而其表现出最佳的耐水性、水蒸气透过率和机械强度。薄膜上述性能的提高也表明了糖基化RBP与CS相对兼容, 其截面的某些孔洞说明两者混合只是出现了微小的微相分离。



下标1、2分别为膜表面、膜横截面。

图5 不同薄膜样品扫描电镜图

Fig. 5 SEM images of different film samples

2.5 薄膜分子间相互作用分析

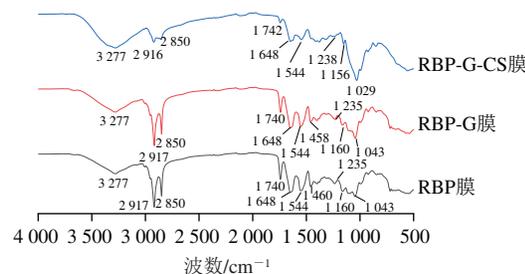


图6 不同薄膜样品傅里叶变换红外光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of different film samples

如图6所示, 与RBP膜相比, RBP-G膜在3 600~3 100 cm^{-1} 范围的一OH吸收峰和1 100~1 040 cm^{-1} 范围的C—O吸收峰明显增强, 酰胺I带(1 700~1 600 cm^{-1})、酰胺II带(1 600~1 500 cm^{-1})和酰胺III带(1 400~1 200 cm^{-1})的蛋白特征峰均有所减弱, 表明共价结合后接枝产物中的羟基增加^[16], 且G中的羰基和RBP中的氨基发生了羧氨缩合反应而被消耗, 从而证实糖和蛋白之间发生了美拉德反应^[40]。当RBP-G与CS两种大分子物质作用形成RBP-G-CS膜时, 其图谱相对于RBP膜产生了较大差异。将CS添加到RBP-G中成膜后, RBP-G-CS膜酰胺I带和酰胺II带的峰强减弱, 峰位置出现微小变化, 最明显的变化是复合膜在3 500~3 100 cm^{-1} 范围内的一OH和一NH₂伸缩振动峰宽度增加, 面积增大, 在2 917~2 850 cm^{-1} 附近—CH₃的吸收峰减弱, 在1 156 cm^{-1} 处(C₃上的一OH)的吸收峰减弱, 这些变化说明RBP-G和CS形成了稳定的分子间和分子内的氢键^[39,41]。

2.6 薄膜二级结构含量分析

对3种薄膜样品的红外光谱图(图6)中的1 700~1 600 cm^{-1} 进行拟合分峰, 利用Peakfit和面积法得出各薄膜样品中二级结构的占比, 拟合曲线如图7所示, 相对含量如表3所示。与RBP膜相比, RBP-G膜中的 α -螺旋和 β -转角相对含量增加, 这是因为糖基化改性使得RBP结构舒展, 内部氨基酸残基暴露, 在后续成膜过程中又重新排列结合^[40], 作用力有所改变, 从而形成如图5所示紧密的内部结构。与RBP膜和RBP-G膜相比, 添加CS后的RBP-G-CS膜中的 β -折叠和 β -转角相对含量分别增加了5.88%~5.99%、8.74%~8.84%, 而无规卷曲和 α -螺旋相对含量显著降低。有研究者表明无规卷曲会破坏薄膜内部结构, 而 β -折叠和 β -转角相对含量的升高会改善薄膜的机械性能, 提升薄膜的耐水性^[42-43], 而本研究所制备的薄膜物理性能变化(2.1节和2.3节)也与此观点相印证。

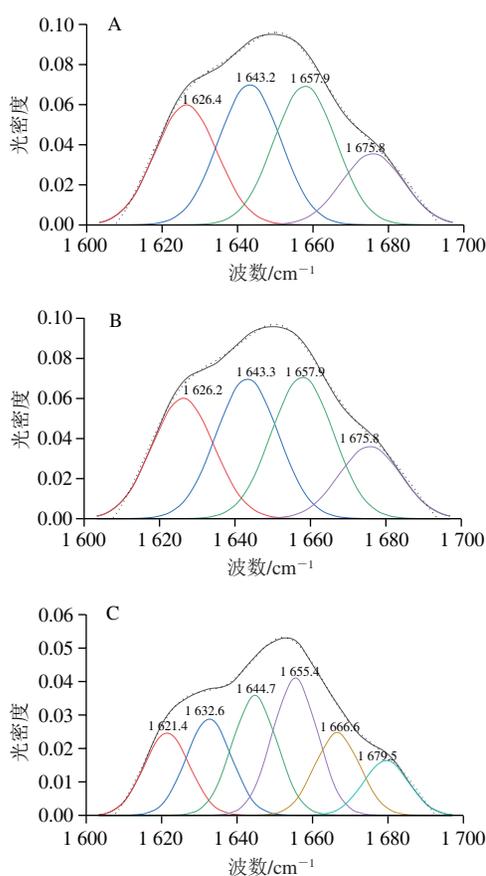


图7 不同薄膜样品傅里叶变换红外光谱二级结构拟合图
Fig. 7 Fitting curves of FTIR spectra for secondary structure analysis of different film samples

表3 不同薄膜样品二级结构相对含量
Table 3 Secondary structure contents of different film samples %

样品	β -折叠	无规卷曲	α -螺旋	β -转角
RBP膜	25.51	29.82	29.52	15.14
RBP-G膜	25.40	29.49	29.87	15.24
RBP-G-CS膜	31.39	20.80	23.83	23.98

3 结论

首先以机械性能为指标,分析糖基化过程中原料配比和复合膜原料对比对薄膜的影响,结果显示当G与RBP质量比为1:1、RBP-G与CS质量比为1:1时,得到的RBP-G膜和RBP-G-CS膜具有较好的抗拉强度和断裂伸长率。其次,对比分析RBP-G-CS膜、RBP-G膜与RBP膜的其他性能发现,糖基化改性可以显著提高RBP膜的耐水性、阻水性和耐热性,CS的加入对薄膜外观色泽及各项性能有更显著的改善效果,其膨胀率较RBP膜和RBP-G膜分别降低77.19%、76.30%,水溶性分别降低54.04%、51.52%,水蒸气透过率分别降低29.20%、15.62%,热焓值分别升高134.82%、38.97%。RBP-G膜的扫描电子显微

镜和红外光谱结果证实了糖基化改性后美拉德反应对薄膜性能和微观结构的改善作用,RBP-G-CS膜的扫描电子显微镜和红外光谱结果则显示了RBP-G与CS存在较可观的相容性和较强的氢键作用,分子间相互作用及二级结构改变有效改善了薄膜的物理性能。因此,利用糖基化对蛋白进行改性处理并与CS复配制备复合膜能够有效改善蛋白膜的各项性能,本研究可为RBP的应用及新型食品包装材料的开发提供一定理论基础。

参考文献:

- [1] ROMANI V P, OLSEN B, COLLARES M P, et al. Cold plasma and carnauba wax as strategies to produce improved bi-layer films for sustainable food packaging[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106087. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106087.
- [2] MOGHADAM M, SALAMI M, MOHAMMADIAN M, et al. Development of antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with pomegranate peel[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105735. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105735.
- [3] BRABER N, GIORGIO L D, AMINAHUEL C A, et al. Antifungal whey protein films activated with low quantities of water soluble chitosan[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 110: 106156. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106156.
- [4] FERNANDES L M, GUIMARÃES J T, SILVA R, et al. Whey protein films added with galactooligosaccharide and xylooligosaccharide[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 104: 105755. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105755.
- [5] 汪洲,徐淑艳,孙巧歌,等.大豆分离蛋白膜制备及改性研究的现状和应用[J].包装工程,2020,41(11):119-126. DOI:CNKI:SUN:BZGC.0.2020-11-019.
- [6] 李鑫,李军,张露,等.鱼明胶基可食用膜改性方法及应用研究进展[J].中国食品学报,2021,21(12):369-378. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.12.039.
- [7] MAURI A N, AÑÓN M. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 86(7): 1064-1072. DOI:10.1002/jsfa.2457.
- [8] ADEBIYI A P, ADEBIYI A O, HASEGAWA Y, et al. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(3): 391-401. DOI:10.1007/s00217-008-0945-4.
- [9] ADEBIYI A P, ADEBIYI A O, JIN D H, et al. Rice bran protein-based edible films[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 43(3): 476-483. DOI:10.1111/j.1365-2621.2006.01475.x.
- [10] WANG Y, XIONG Y L. Physicochemical and microstructural characterization of whey protein films formed with oxidized ferulic/tannic acids[J]. Foods, 2021, 10(7): 1599. DOI:10.3390/foods10071599.
- [11] MONEDERO F M, HAMBLETON A, TALENS P, et al. Study of the retention and release of *n*-hexanal incorporated into soy protein isolate-lipid composite films[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 100(1): 133-138. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2010.03.037.
- [12] 赵扬,甄超英,王静.微波改性对大豆分离蛋白膜特性的影响研究[J].河北工业科技,2016,33(2):139-145. DOI:10.7535/hbgykj.2016yx02008.
- [13] MU L X, ZHAO H F, ZHAO M M, et al. Physicochemical properties of soy protein isolates-acacia gum conjugates[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2011, 29(2): 129-136. DOI:10.1007/978-1-4419-7475-4_28.

- [14] JIA C S, CAO D D, JI S P, et al. Whey protein isolate conjugated with xylo-oligosaccharides via Maillard reaction: characterization, antioxidant capacity, and application for lycopene microencapsulation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 118: 108837. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108837.
- [15] 蒋丽梅. 木糖和谷氨酰胺转氨酶复合改性对花生蛋白膜性能影响的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 17-22.
- [16] 郭浩, 张慧君, 陈又铭, 等. 葡萄糖糖基化改性玉米醇溶蛋白膜的物化性质及在胶囊壳中的应用[J]. 中国油脂, 2019, 44(12): 76-80; 91. DOI:CNKI:SUN:ZYZZ.0.2019-12-015.
- [17] 陈又铭, 张慧君, 郭浩, 等. 玉米醇溶蛋白菊粉糖基化改性成膜工艺及其性能研究[J]. 食品与机械, 2019(7): 134-138. DOI:CNKI:SUN:SPJX.0.2019-07-027.
- [18] CARDOSO G P, DUTRA M P, FONTES P R, et al. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display[J]. Meat Science, 2016, 114: 85-94. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.12.012.
- [19] JIA D Y, FANG Y, YAO K. Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films[J]. Food & Bioproducts Processing, 2009, 87(1): 7-10. DOI:10.1016/j.fbp.2008.06.002.
- [20] HOSSEINI S F, REZAEI M, ZANDI M, et al. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 172-182. DOI:10.1016/j.foodhyd.2014.09.004.
- [21] SAMSALEE N, SOTHORNVIT R. Development and characterization of porcine plasma protein-chitosan blended films[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2019, 22: 100406. DOI:10.1016/j.fpsl.2019.100406.
- [22] WANG L L, DING J, FANG Y, et al. Effect of ultrasonic power on properties of edible composite films based on rice protein hydrolysates and chitosan[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 65: 105049. DOI:10.1016/j.ultsonch.2020.105049.
- [23] SINGH T P, SIDDIQI R A, SOGI D S. Enzymatic modification of rice bran protein: Impact on structural, antioxidant and functional properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 138: 110648. DOI:10.1016/j.lwt.2020.110648.
- [24] ZHU D, DAMODARAN S, LUCEY J A. Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(5): 2988-2994. DOI:10.1021/jf903643p.
- [25] DING R, VALICKA E, AKHTAR M, et al. Insignificant impact of the presence of lactose impurity on formation and colloid stabilising properties of whey protein-maltodextrin conjugates prepared via Maillard reactions[J]. Food Structure, 2017, 12: 43-53. DOI:10.1016/j.foostr.2017.02.004.
- [26] LIU J, LIU S, CHEN Y, et al. Physical, mechanical and antioxidant properties of chitosan films grafted with different hydroxybenzoic acids[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 71: 176-186. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.05.019.
- [27] NOSHIRVANI N, GHANBARZADEH B, GARDRAT C, et al. Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 36-45. DOI:10.1016/j.foodhyd.2017.03.015.
- [28] LIU J, MENG C G, LIU S, et al. Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 457-466. DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.09.035.
- [29] JIMÉNEZ-CASTAÑO L, VILLAMIEL M, LÓPEZ-FANDIÑO R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(3): 433-443. DOI:10.1016/j.foodhyd.2006.05.006.
- [30] JRIDI M, HAJJI S, AYED H B, et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67(3): 373-379. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.054.
- [31] BOURTOOM T, CHINNAN M S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(9): 1633-1641. DOI:10.1016/j.lwt.2007.10.014.
- [32] WANG Y, XIONG Y L, RENTFROW G K, et al. Oxidation promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 115(1): 11-19. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2012.09.013.
- [33] 杨艳妍. 大米蛋白生物可降解材料的制备与性能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010: 49-54.
- [34] 沈凯青. 米渣蛋白膜的制备及其性能表征[D]. 福州: 福建农林大学, 2019: 33-34.
- [35] MAKISHI G L A, LACERDA R S, BITTANTE A M Q B, et al. Films based on castor bean (*Ricinus communis* L.) proteins crosslinked with glutaraldehyde and glyoxal[J]. Industrial Crops & Products, 2013, 50: 375-382. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.07.025.
- [36] CHO S Y, PARK J W, BATT H P, et al. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(3): 418-423. DOI:10.1016/j.lwt.2006.02.003.
- [37] ROCHA M D, LOIKO M R, GAUTERIO G V, et al. Influence of heating, protein and glycerol concentrations of film-forming solution on the film properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein isolate[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 116(3): 666-673. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.004.
- [38] LEE J H, HYUN J, YANG H J, et al. Preparation and characterization of brewer's spent grain protein-chitosan composite films[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 11: 7549-7555. DOI:10.1007/s13197-015-1941-x.
- [39] 刘幸幸. 壳聚糖/植物蛋白复合包装膜的制备与性能研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2012: 22-43.
- [40] 林伟静. 糖基化改性对花生蛋白膜性能的影响及其作用机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015: 35-36.
- [41] VANDEN BRABER N L, DI GIORGIO L, AMINAHUEL C A, et al. Antifungal whey protein films activated with low quantities of water soluble chitosan[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 110: 106156. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.106156.
- [42] LEFÈVRE T, SUBIRADE M, PÉZOLET M. Molecular description of the formation and structure of plasticized globular protein films[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(6): 3209-3219. DOI:10.1021/bm050540u.
- [43] LAL S S, TANNA P, KALE S, et al. Kafirin polymer film for enteric coating on HPMC and gelatin capsules[J]. Journal of Materials Science, 2016, 52(7): 3806-3820. DOI:10.1007/s10853-016-0637-6.