淀粉/羧甲基纤维素/花青素指示膜的制备及在鱼肉鲜度指示中的应用

蒋光阳[1]，侯晓艳[1]，任文[1]，吴贺君[1]，黎杉珊[1]，申光辉[1]，陈安均[1]，王章英[2]，张志清[1*]

（1.四川农业大学食品学院 四川雅安，625014；2.广东省农业科学研究院作物研究所，广东广州，510000）

摘 要：以马铃薯淀粉（S），羧甲基纤维素（CMC）为成膜基材，紫薯花青素（PA）作为指示剂制备指示膜。研究马铃薯淀粉和 CMC 的比例、花青素质量浓度、甘油质量浓度对指示膜性能抗拉伸强度（TS）、断裂伸长率（EAB）、水溶性（WS）、颜色（a 值）的影响，将指示膜的性能综合分作为响应值，采用响应面法优化制备工艺参数，并对最优指示膜进行表征。结果表明当马铃薯淀粉和 CMC 质量比 6:4，花青素质量浓度为 0.5%，甘油质量浓度为 0.6%，可得指示膜的综合得分为 63.8，此时对应的 TS 为 21.48±0.12 MPa，EAB 为 28.88±0.08%，WS 为 19.24±0.21%，a 为 4.95±0.02。通过 FT-IR、XRD 和 SEM 分析各组分之间相容性好，截面平整光滑。将指示膜用于监测草鱼新鲜度，鱼肉的 TVB-N 值，pH 以及菌落总数分别达到 21.55 mg/100g，7.58，7.3 lg CFU/g 时，此时指示膜由红色变为蓝紫色。研究结果可为指示膜用于食品货架期指示应用提供参考。

关键词：指示膜； 马铃薯淀粉；羧甲基纤维素；紫薯花青素； 性能优化； 结构表征

Preparation of indicator films based on carboxymethyl-cellulose /starch and purple sweet potato anthocyanins for monitoring fish freshness

JIANG Guangyang[1], HOU Xiaoyan[1], REN Wen[1], WU Hejun[1], LI Shanshan[1], SHEN Guanghui[1], CHEN Anjun[1], WANG Zhangying[2], ZHANG Zhiqing1,*

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya’an 625014, China;
2. Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510000, China)

Abstract: Indicator films were prepared through using starch (S) and carboxymethyl cellulose (CMC) as film forming material, purple sweet potato anthocyanins (PA) were used as the indicator. The effects of S and CMC ratio, anthocyanin concentration and glycerol concentration on the physical properties such as tensile strength (TS), elongation at break (EAB), water soluble (WS) and color (a) had been investigated. The comprehensive score of indicator film performance is used as the response value, the process parameters were optimized by the response surface method, and the optimal indicator film was characterized. The results demonstrated that the optimum formula of indicator films were starch and CMC ratio of 6:4, anthocyanin concentration of 0.5%, glycerol concentration of 0.6%. The score of indicator films were the best overall as high as 63.8 under these optimal conditions, and the properties of indicator films showed tensile strength of (21.48±0.12) MPa, elongation at break of (28.88±0.08)%, water solublity of (19.24±0.21)%, color of (4.95±0.02). Results of FT-IR, XRD and SEM indicated that the cross section of the SCA film was smooth and good compatibility of the ingredients. Furthermore, the indicator film was used to monitor the freshness of the grass carp. The total volatile basic nitrogen (TVB-N) value, pH and the total

基金项目：广东省应用型科技研发专项（编号：2016B020233003）；广东省应用型科技研发专项（编号：060H0304）

*第一作者：蒋光阳（1993.11-）（ORCID: 0000-0001-6672-136X），男，硕士研究生，专业：粮食，油脂及植物蛋白质工程，E-mail: 1429067976@qq.com

通讯作者：张志清（1976.07-）（ORCID: 0000-0001-5871-6499），男，教授，博士生导师，研究方向：粮食，油脂及植物蛋白质工程，Email:zqzhang721@163.com

viable count reached at 21.55 mg/100g, 7.58，7.3 lg CFU/g, respectively. And simultaneously the indicator film changed from red to blue-violet. The research results can provide reference for the use of indicator films for food shelf life judgment applications.

Key words: indicator film; potato starch; carboxymethyl cellulose; purple sweet potato anthocyanins; properties optimization; structure characterization

中图分类号：TS206.4 文献标志码：A

DOI：10.7506/spkx1002-6630-20190715-202

近年来，食品智能包装由于能追踪实时食品安全而备受关注。智能包装旨在掌握和提供有关包装食品的安全性、对环境条件的响应或决定保质期的信息[1]。花青素是一种安全无毒对人体无危害的水溶性色素， 且对 pH 的变化十分敏感。目前国内外均有将红甘蓝、黑豆、蓝莓和紫薯花青素等作为食品智能包装的天然指示剂的研究报道[2, 3]。 而且鱼肉在贮藏过程中，由于蛋白质的变性以及分解会产生许多挥发性含氮化合物，从而导致鱼肉 pH 值快速升高，从而引起花青素色泽变化，因此常作为花青素指示膜应用的受试材料。Zhai 等将玫瑰茄花青素作为指示剂，淀粉和 PVA 作为成膜基材制备指示膜，并用于实时监测鱼肉的新鲜度，指示膜颜色由红色变为浅蓝色[4]。Huang 等将紫草根提取物作为指示剂，添加到成膜基材琼脂中用于实时检测鱼肉的新鲜度，随着鱼肉贮藏时间的延长，指示膜的颜色由原来的红色变为蓝色，结合 TVB-N 表明此时指示膜为蓝色时鱼肉已经腐败变质[5]。

为了能够很好地固定天然花青素，并考虑到食品的安全性，许多无毒和可生物降解的天然材料被研究，例如淀粉、羧甲基纤维素钠、果胶、琼脂等[6, 7]。其中马铃薯淀粉价格低廉，且优异的成膜性被广泛用于可降解薄膜的制作，但是单一的成膜基材制备出的薄膜性能较差，进而为了改善其机械性能将两种或多种天然聚合物相结合从而改善其性能。根据课题组前期报道，将马铃薯淀粉，羧甲基纤维素钠、魔芋葡甘露聚糖两两混合为成膜基材制备指示膜，研究结果表明三种混合物中马铃薯淀粉和羧甲基纤维素钠混合后相容性好，两种成膜基材混合后能够形成氢键，并有较好的性能[8]。但指示膜的综合性能（力学性能，水溶性，颜色）都未达到最优。

本研究主要以马铃薯淀粉和羧甲基纤维素钠为成膜基材，通过添加紫薯花青素，采用流延方法制备指示膜，利用单因素试验研究成膜材料比例、花青素质量浓度和甘油质量浓度对膜性能的影响，结合响应面分析优化和建立各因素间的数学模型，得到制备指示膜的最佳制备工艺条件，并将制备出最优的指示膜进行表征及用于鱼肉新鲜度检测研究，以期为天然花青素指示膜应用与食品货架期监测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫薯 由广东省农业科学院作物所提供；马铃薯淀粉 宁夏万里淀粉有限公司；活草鱼，购于四川省雅安市农贸市场，每尾约 1 kg；羧甲基纤维素钠（CMC）、甘油、无水乙醇（分析纯）成都科龙化工试剂厂

1.2 仪器与设备

101 型 电热鼓风干燥箱 北京永光明医疗仪器有限公司；RE-200B 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂； Ultra 型扫描电子显微镜 卡尔•蔡司股份公司；TA.XT Plus 质构仪 超技仪器有限公司；is10 型傅立叶变换红外光谱仪 美国 Thermofisher 公司；Q200 DSC 差示扫描量热仪 美国 TA 仪器公司；UV-3100N 紫外-可见分光光度计 上海美普达仪器有限公司；自制有机成膜板；SC-10 便携式色

差仪 苏州欣美和仪器有限公司； D8 XRD 衍射仪 德国 Bruker 公司

1.3 实验方法

1.3.1 紫薯花青素（PA）的提取

将紫薯片烘至恒重，粉碎过筛。将体积分数 40%乙醇作为提取剂，并按照料液比 1:10 g/mL，在 60ºC 水浴搅拌 3 h，滤液在 50ºC 避光旋蒸得到花青素浓缩液，冻干得到紫薯花青素粉（PA）[7]。

1.3.2 淀粉/羧甲基纤维素钠（SC）/花青素指示膜（SCA）的制备

将 6 g 马铃薯淀粉溶于 100 mL 蒸馏水中，95 ºC 搅拌糊化 15 min 后备用；取 1.2 g CMC 溶于 100 mL 蒸馏水中备用；按照适当的比例混合两种溶液，并依次加入适量甘油（w/w），适量紫薯花青素粉（w/w），均质后，将混合液真空-超声除去气泡后，倒入自制有机成膜板中，45ºC 烘箱中烘干成膜。揭膜后置于相对湿度(55±1)%、温度(25±1) ºC 的恒温恒湿箱中平衡 48 h 后测指示膜性能。

1.3.3 SCA 指示膜的制备优化

按 1.3.2 的制备工艺流程，对其中马铃薯淀粉与羧甲基纤维素钠质量比、紫薯花青素质量浓度、甘油质量浓度按表 1 中的设计进行单因素试验，所有试验至少重复 3 次取平均值。

1.3.3.1 单因素试验设计

表 1 单因素试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of single factor experiment

水平	马铃薯淀粉：CMC 质量比	紫薯花青素质量浓度 (%，w/w)	甘油质量浓度（%，w/w）
1	4:6	0.2	0.5
2	5:5	0.3	0.6
3	6:4	0.4	0.7
4	7:3	0.5	0.8
5	8:2	0.6	0.9

1.3.3.2 响应面试验设计

在单因素试验结果的基础上，设计三因素三水平响应面试验，将马铃薯淀粉与羧甲基纤维素钠质量比、紫薯花青素质量浓度、甘油质量浓度作为试验因素，以指示膜抗拉伸强度（TS）、断裂伸长率（EAB）、水溶性（WS）、颜色（a 值）的性能综合评分作为响应值进行试验，因素与水平见表 2。

表 2 响应面分析因素水平表

Table 2 Factors and levels of response surface analysis

水平	因素		
	马铃薯淀粉：CMC 质量比	紫薯花青素质量浓度(%，w/w)	甘油质量浓度（%，w/w）
-1	6:4	0.3	0.5
0	7:3	0.4	0.6
1	8:2	0.5	0.7

1.3.4 SCA 指示膜的性能及结构表征

1.3.4.1 SCA 指示膜的指标测定

（1）力学性能测定

参照 GB/T 1040.3-2006 膜厚度进行测定[9]，并通过质构仪测定 SCA 膜的抗拉强度（tensile strength，TS）和断裂伸长率（elongation at break，EAB），将膜裁剪为 80 mm×15 mm 的薄条，初始距离为 50 mm，速度为 50 mm/min。每组指示膜测试 10 个平行样品，TS、EAB 按照公式分别进行计算：

$$TS(MPa) = \frac{F}{(b \times H)} \quad (1)$$

$$EAB(\%) = \frac{(D - L)}{L} \quad (2)$$

式中 F：膜断裂时张力/N，B：膜宽度/mm，H：膜厚度/mm；D：膜断裂时的长度/mm

（2）水溶性（WS）测定

参照邹小波等的方法[10]，将 SCA 膜放在 105ºC 烘箱中烘至恒重 W_1（g）然后浸泡在 50 mL 蒸馏水中，24 h 后倒出浸泡液，再次放入 105 ℃烘箱中烘至恒重并称取质量为 W_2（g），每组重复测定三次。根据公式（3）计算出水溶性 WS：

$$WS(\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\% \quad (3)$$

（3）颜色测定

利用手持色差仪测定出指示膜的颜色（a 值）。

（4）指示膜物理性能综合指标评定

运用隶属度综合评分法和主成分分析法相结合来确实指示膜性能指标的综合评分。其中，主成分分析主要用于各指标权重的确定。隶属度则根据公式计算所得：

$$P = \frac{A_1 - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \quad (4)$$

$$P = 1 - \frac{A_1 - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \quad (5)$$

式中，P 表示隶属度；A_i 表示对应指标值；A_{max} 表示对应指标最大值；A_{min} 表示对应指标最小值。对于正效应的 TS、EAB、a 值运用公式（4）计算；负效应的 WS 运用公式（5）计算[11]：

指示膜物理性能综合分 S 计算如下：

$$S = a_1P_1 + a_2P_2 + a_3P_3 + a_4P_4 \quad (6)$$

式中，S 为指示膜物理性能综合分，P_1、P_2、P_3、P_4分别代表 TS、EAB、WS 和 A 值的隶属度值；a_1、a_2、a_3和a_4分别代表着四个指标的权重。

1.3.4.2 SCA 指示膜的表征

（1）傅里叶变换红外光谱分析

将样品烘干后，利用 is10　型傅里叶变换红外光谱仪记录样品的红外光谱，扫描范围 650~4000 cm^{-1}。

（2）扫描电镜分析

通过扫描电镜记录 SCA 指示膜的横截面结构并拍照，将 2×2 cm SCA 膜试样，干燥后，利用液氮将 SCA 膜冻裂喷金，加速电压为 7 kV。

（3） X 射线衍射

用 X 射线衍射仪测得 SCA 指示膜 X 射线衍射的图像，扫描速率 6°/min，扫描范围 0°～55°[12]。

1.3.5 SCA 指示膜的应用

将去皮后的鱼肉切成 10 g/块并去刺备用，将 SCA 指示膜裁成大小为 4×4 cm 的小块并覆盖在鱼肉上一起放入培养皿中，用保鲜膜包裹并置于 25ºC 的恒温恒湿条件下，并根据 GB5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》测定鱼肉的挥发性盐基氮（TVB-N）[13]；根据 GB4789.2—

2016《食品微生物学检验　菌落总数的测定》测定鱼肉的菌落总数（TVC）[14]；根据 GB/T9695.5—2008《肉与肉制品 pH 的测定》测定鱼肉的 pH[15]；同时对指示膜的颜色变化进行测定。

1.4 数据统计与分析

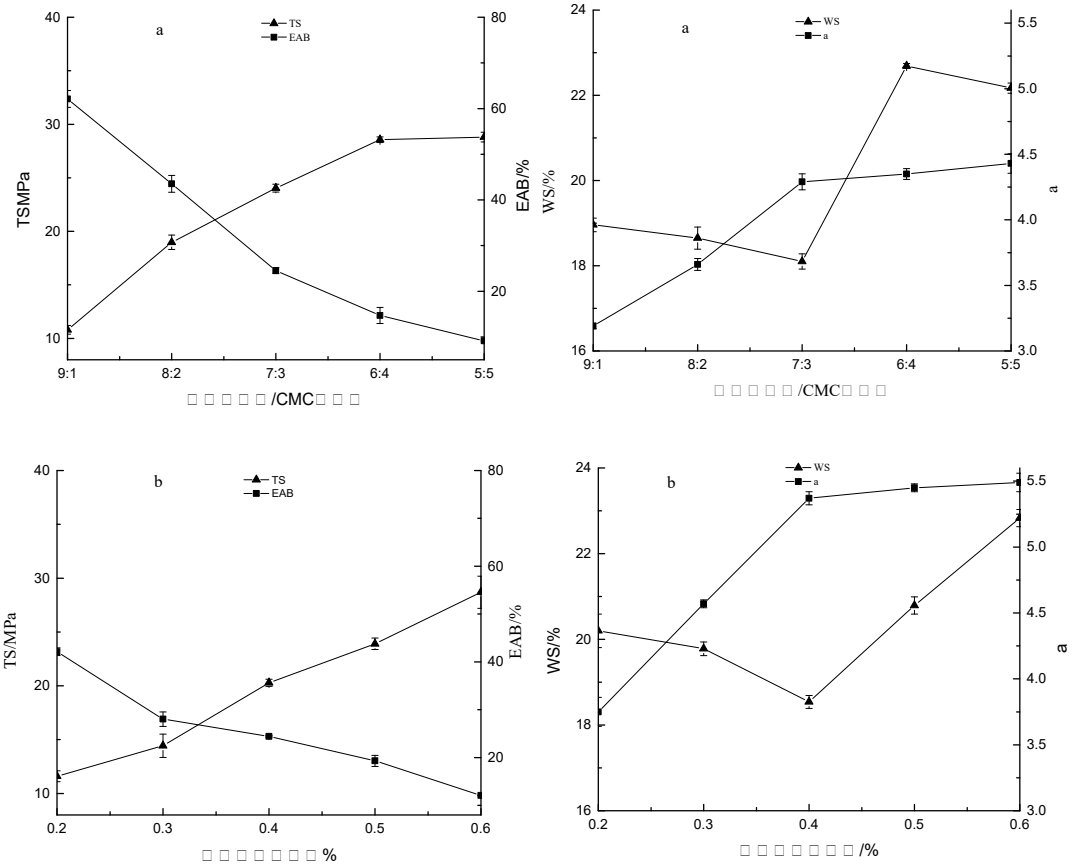
结果以平均值±标准差形式表示，使用 SPSS20、Origin9 进行数据处理，采用方差分析(ANOVA)显著性差异($P<0.05$)，评价不同平均值之间的差异性。

2 结果与分析

2.1 SCA 指示膜制备条件的优化

2.1.1 各成膜组分对指示膜性能的影响

成膜组分中马铃薯淀粉与羧甲基纤维素钠质量比、紫薯花青素质量浓度、甘油质量浓度对指示膜 TS、EAB、WS、a 值的影响见图 1。



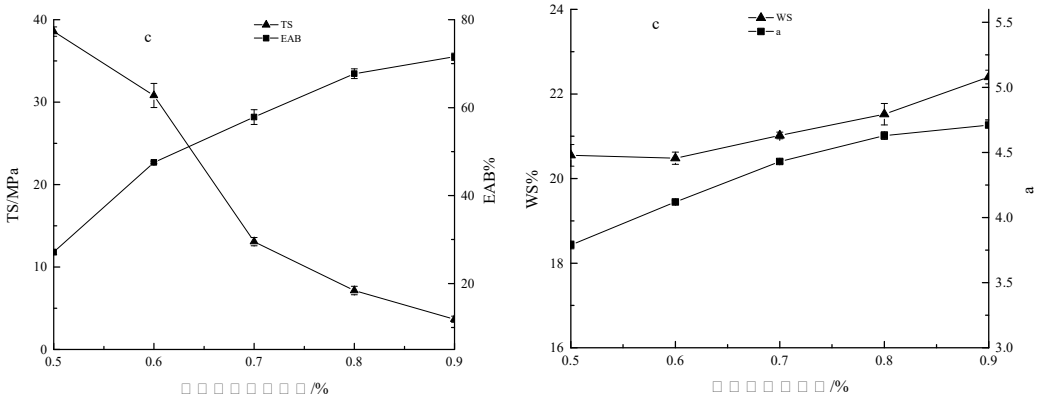


图1 各成膜组分对指示膜性能的影响（a.淀粉与CMC质量比，b.花青素质量浓度，c.甘油质量浓度）
Fig. 1 Effect of film-forming material on properties of indicator films（a. ratio of starch to CMC，b. the addition of anthocyanin ，c. addition of glycerol）

图 1a 为马铃薯淀粉与羧甲基纤维素钠（CMC）质量比对指示膜 TS、EAB、WS、a 值的影响，随着淀粉与 CMC 质量比的减小 TS 呈逐渐上升的趋势，EAB 呈逐渐下降趋势。Ghanbarzadeh 等提高 CMC 质量浓度，降低淀粉浓度，同样发现复合膜的 TS 增加 EAB 降低[16]。这可能是 CMC 与淀粉都具有较好的相容性，共混成膜时，形成了分子间的网状结构，从而导致指示膜的 TS 增高。EAB 的降低是由于淀粉中支链淀粉含量较高，淀粉占比较少，同时减少了分子中的支链结构，糊化后形成结晶容易，因而制备的指示膜柔软度较低，降低了膜的断裂伸长率[17]。随着 CMC 的占比增加，指示膜的水溶性先降低后增加，马铃薯淀粉与 CMC 质量比为 7:3 时，WS 达到最低值 18.1%，水溶性的降低归因于淀粉和 CMC 指示膜分子新的排列，使两者之间形成了很强的氢键作用力，质量比为 6：4 时指示膜的 WS 大幅度增加，由于 CMC 的分子链中含有大量的亲水基团—OH 和—COOH，导致指示膜放入水中易溶解，CMC 的含量不断增加，水溶性也不断上升[18]。指示膜的 a 值随着质量比的上升，a 值不断变大，红色越来越深，淀粉和 CMC 之间分子链的运动影响了淀粉分子的结晶度，结晶度越高，指示膜成膜基材越透明，加入的花青素颜色更容易显现出来[19]。综合上述分析当淀粉与 CMC 质量比为 7:3 时可能最佳。

图 1b 为花青素质量浓度对指示膜 TS，EAB，WS，A 值的影响。TS 和 EAB 随着花青素浓度的升高，分别呈现出逐渐升高和下降的趋势。花青素与聚合物之间通过氢键形成界面相互作用，花青素的量不断上升，相互作用增强，TS 不断升高[20]。但花青素加入后，由于天然植物花青素能抑制聚合物链的运动，同时导致柔软性降低，EAB 随之降低，本结果与 Huang 等人研究结果一致[5]。花青素质量浓度不断的升高，指示膜的 WS 先从 20.2%降低至 18.54%再逐渐升高，WS 的降低可能是由于花青素的加入使得花青素与淀粉和 CMC 分子中的亲水基团相结合，形成了分子之间作用力。当花青素质量浓度为 0.4%时指示膜的 WS 开始升高，由于花青素属于亲水性物质，花青素过量添加导致指示膜吸水能力更强，从而指示膜的水溶性升高[21]。指示膜的颜色随着花青素的质量浓度增加，颜色不断加深，原因与前述结晶度变高，成膜基材透明度变高，加入花青素后颜色变深一致。综合上述分析，选择花青素质量浓度为 0.4%时较合适。

图 1c 为甘油质量浓度对指示膜 TS，EAB，WS，a 值的影响。指示膜的 TS 随着甘油浓度的提高从(38.58±0.56) MPa 下降到（3.67±0.38）MPa，而 EAB 随着甘油浓度的提高从（27.13±0.6）%升高到（71.57±0.81）%。孙海涛等同样发现提高甘油质量浓度，膜的 TS 不断减小，EAB 不断增加[11]。对于指示膜而言，甘油属于小分子，小分子物质很容易进入原料的大分子链间，破坏原有的

分子结构导致分子间作用力不断的减弱，而增强了分子链的流动性，使膜变得更加柔软， 同时可能由于甘油是亲水性物质将水分子保留在指示膜的成膜基质中，水分子不仅与聚合物的羟基直接作用，还存在于聚合物链与甘油分子之间，分子链间间距增大，因此指示膜的 TS 减弱，EAB 增加[22]。膜的 WS 整体呈现出上升的趋势，甘油的亲水性导致聚合物链间的分子间力降低，增加自由体积，遇水后更容易溶解在水中，从而造成指示膜的水溶性增加[23]。高丹丹等也发现随着甘油质量浓度的提高，膜的溶水时间减少，加快了膜的溶解速度[24]。颜色变得更加明显，a 值不断升高，是因为甘油使指示膜刚性结构得到软化，导致指示膜的结构得到有效的松弛和延展，透明度增大，花青素受干扰较少，颜色显示更加明显。综上分析甘油质量百分浓度为 0.6%时为可能的最佳配比浓度。

2.1.2 指示膜性能综合评分分析

为了得到综合性能较优的指示膜，本研究采用主成分分析法与隶属度综合评分法相结合确定指示膜性能的综合评分。首先确定指示膜各性能指标的权重，从单因素试验中随机抽取 9 组数据（表 3）进行主成分分析，将指示膜的 TS、EAB、WS、a 值作为分析对象，相关成分特征值、贡献率及特征向量见表 4 和表 5。分析可知，第一（2.479）和第二（1.131）主成分的特征值均大 1，第一主成分（Z_1）的方差贡献率为 61.98%，第二主成分（Z_2）的方差贡献率为 28.27%，累计方差贡献率为 90.25%，大于 85%，表明前两个主成分能够反映出全部指标的信息[25]。根据表 5 结果可以构建主成分与各指标之间的线性关系式：Z_1=0.934X_1-0.908X_2+0.69X_3+0.552X_4，Z_2=0.209X_1+0.237X_2+0.652X_3-0.778X_4，结合各主成分的特征值、方差贡献率以及特征向量。求得指示膜 4 个指标（TS、EAB、WS、a 值）经归一化后的权重分别为：0.36、0.25、0.38、0.01，结合公式（4）～（6）得到指示膜性能的综合评分：S=0.36P_1+0.25P_2+0.38P_3+0.01P_4。

表 3 主成分分析试验数据

Table 3 Test data of contribution rate by principal component analysis

编号	抗拉强度（TS）	断裂伸长(EAB)	水溶性(WS)	a
1	11.6±0.5	42.12±0.8	20.2±0.39	3.75±0.08
2	20.28±0.34	24.43±0.15	18.54±0.75	5.37±0.17
3	30.81±1.46	47.53±0.29	22.54±0.08	3.81±0.05
4	3.67±0.38	71.57±0.81	19.69±0.14	4.11±0.11
5	10.79±0.41	62.1±1.84	18.96±0.16	3.19±0.2
6	28.8±0.45	9.15±0.07	22.17±0.12	4.43±0.1
7	13.07±0.50	57.85±1.69	21.05±0.32	4.39±0.09
8	23.9±0.53	19.3±1.15	20.79±0.2	5.45±0.03
9	28.56±0.26	14.71±0.17	22.69±0.06	4.35±0.04

表 4 相关成分的特征值及贡献率

Table 4 Eigenvalues and cumulative variance contribution rates of the related components

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
Z_1	2.479	61.980	61.980
Z_2	1.131	28.270	90.250
Z_3	0.264	6.611	96.861
Z_4	0.126	3.139	100.000

注：仅提取特征值>1 的主成分因子。

表 5 前两个主成分的特征向量

Table 5 Eigenvectors of the first two principal components

成分	TS	EAB	WS	a
Z_1	0.934	-0.908	0.69	0.552
Z_2	0.209	0.237	0.652	-0.778

2.1.3 响应面试验优化的回归拟合

在本单因素试验基础上，选择马铃薯淀粉与 CMC 质量比（X_1），花青素质量浓度/%（X_2）和甘油质量浓度（X_3）进行三因素三水平的响应面试验，综合分（S）为响应值。试验结果如表 6 所示，使用 Design-Expert 软件将试验数据进行回归拟合，得到方程如下：$S=61.02+3.85X_1-2.46X_2-2.51X_3+2.44X_1X_2+0.92X_1X_3-6.28X_2X_3+3.61X_1^2-7.35X_2^2-11.6X_3^2$

表 6 响应面试验设计及结果

Table 6 Design and results of response surface experiment

试验号	X_1 马铃薯淀粉与 CMC 质量比	X_2 花青素质量浓度/%	X_3 甘油质量浓度/%	综合分
1	1	0	1	45.87
2	0	-1	1	49.16
3	1	0	-1	53.01
4	-1	1	0	62.09
5	-1	-1	0	60.67
6	1	-1	0	57.35
7	-1	0	-1	58.35
8	0	0	0	61.85
9	0	0	0	60.2
10	0	0	0	60.27
11	0	0	0	61.46
12	-1	0	1	54.89
13	0	0	0	61.32
14	0	1	1	30.21
15	1	1	0	49.01
16	0	-1	-1	41.35
17	0	1	-1	47.53

根据方差结果（表 7）分析可知，回归方程模型的 $P<0.0001$，说明模型差异极显著；失拟项 $P=0.1589>0.05$，表明失拟不显著，本试验模型的决定因素系数 $R^2=0.9944$ 表明模型的预测结果与实际值拟合度高，因此该模型能够很好地对响应值综合分 S 进行分析和预测。回归方程各项显著性表明，本研究一次项 X_1，X_2，X_3 项影响均达到极显著水平（$P<0.01$），同时二次项影响极显著，交互项 X_1 X_2，X_2 X_3 影响达到极显著水平，X_1 X_3 影响不显著，分析可知影响综合评分的主次顺序依次是：$X_1>X_2>X_3$。

表 7 回归模型的方差分析

Table.7 ANOVA of regression model

来源	Df	F 值	p	显著性
模型	9	137.52	<0.0001	**
X_1	1	115.73	<0.0001	**
X_2	1	47.42	0.0002	**
X_3	1	49.46	0.0002	**
X_1X_2	1	23.30	0.0019	**
X_1X_3	1	3.31	0.1116	
X_2X_3	1	154.48	<0.0001	**
X_1^2	1	53.80	0.0002	**
X_2^2	1	222.80	<0.0001	**
X_3^2	1	554.74	<0.0001	**
残差	7	2.99		
失拟项	3		0.1589	

纯误差	4	
总和	16	
	R^2=0.9944	R^2Adj=0.9871

注：**表示 *P*<0.01，相关性极显著；*表示 *P*<0.05 相关性显著

使用 Design-Expert 分析出指示膜的最佳工艺条件为：马铃薯淀粉与 CMC 质量比 60.85:39.15，花青素质量浓度 0.47%，甘油质量浓度 0.59%，预测得到指示膜的综合得分为 64.26。为了检验模型准确性和考虑实际情况，将最优工艺修改为质量比 60:40，花青素质量浓度为 0.5%，甘油质量浓度为 0.6%，在此条件下平行试验三次，得出综合评分为 63.8，此时对应的 TS 为 21.48±0.12 MPa，EAB 为 28.88±0.08%，WS 为 19.24±0.21%，a 为 4.95±0.02。由此可见综合评分的验证试验值与模型预测值比较接近，达到预测值的 99.28%，表明预测结果较优。

2.2 SCA 膜的表征

2.2.1 SCA 膜的傅里叶变换红外光谱分析

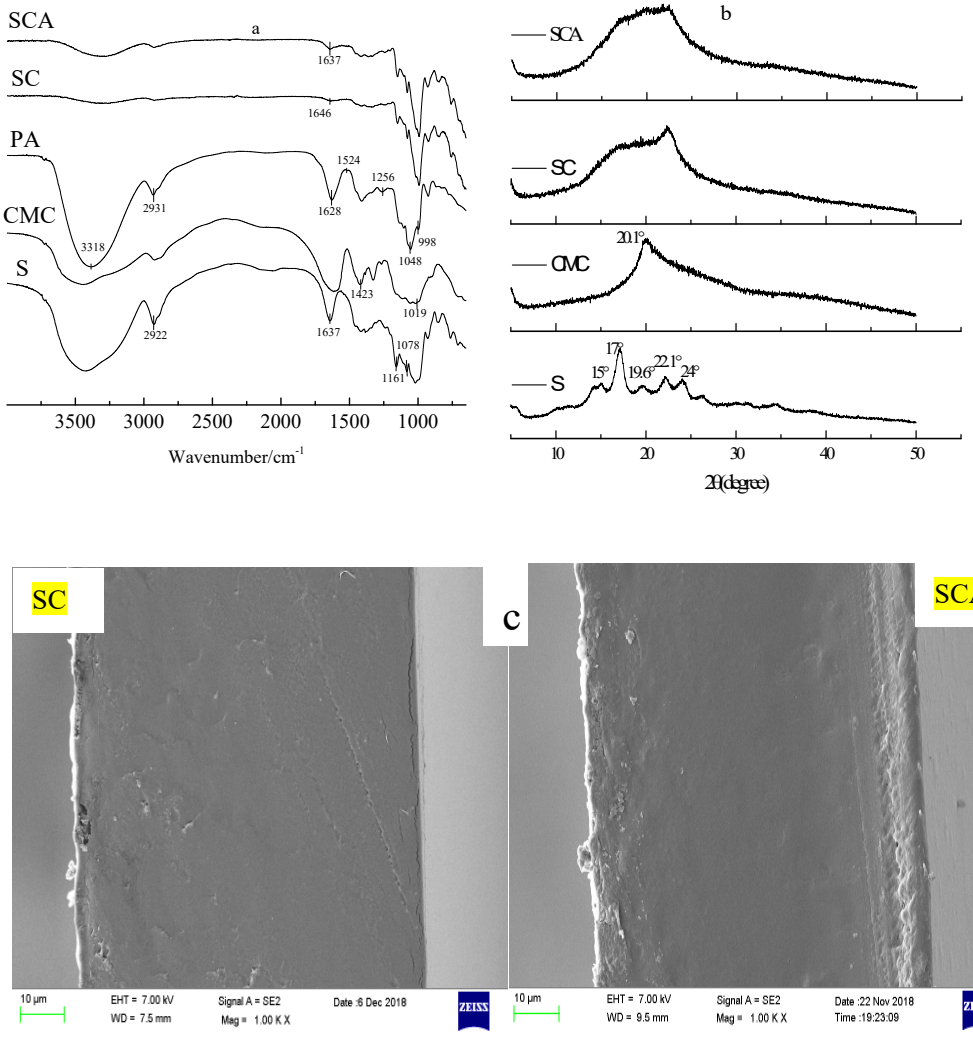


图2 指示膜的表征（a. 基材及膜的FT-IR图谱b. 原料和膜的XRD图c. 膜横截面的扫描电镜图）

Fig.2 Characterization of the indicator film (a. FT-IR spectra of materials and films. b. XRD spectra of materials and films c. Scanning electron micrographs of the cross sections of the films)

图 2a 为成膜原料和指示膜的红外光谱图，其中，3318cm^{-1} 附近为-OH 键的伸缩振动吸收峰，这与成膜原料（CMC，S，PA）中含有丰富的羟基结果一致，同时在 2931 cm^{-1} 和 2922 cm^{-1} 有两个明

显的特征峰为原料中-CH_2和-CH 的伸缩振动而产生[26]。在原料 PA 中 1628 cm^{-1}处的强吸收带和 1524 cm^{-1}处的特征峰归因于 C ＝ C 芳环的弯曲振动而产生，归因于 PA 属于芳香族化合物有关，此外，1256 cm^{-1}指定为类黄酮化合物的吡喃环段，1048cm^{-1}处的吸收带归因于芳环的 C-H 而产生[27]。在淀粉原料的光谱中 1161 cm^{-1}和 1078 cm^{-1}可能是 C-O、C-C、O-H、C-O-C 的共同作用而产生了伸缩振动峰，而这些特征峰在 SC 膜和 SCA 指示膜中均有体现[28]。SC 膜的吸收峰由原来的 1646 cm^{-1}移至 1637 cm^{-1}，这可能是加入花青素后与原料之间产生相互作用，形成了较强的分子之间作用力。根据光谱结果表明，原料的成分未发生改变，同时 PA 很好的嵌入了成膜基材中。

2.2.2 SCA 膜的 X 射线衍射分析

图 2b 可知，淀粉在 17.0°处具有很强的衍射峰，在 15.0°、19.6°、22.1°、24.0°处具有一些弱峰，另外，在 5.5°处观察到最弱的特征峰。对于淀粉而言，通常，由于不同的晶体结构，XRD 光谱图有三种类型。A 型淀粉在 15°和 23°附近有明显的衍射峰，在 17°和 18°处有未分辨的双峰； B 型淀粉在约 17.0°处产生更明显的衍射峰，在约 5.6°处产生特征峰，同时在约 15.0°，20.0°，22.0°和 24°处产生一些小峰；C 型是 A 型和 B 型的混合物[29]。该结果暗示淀粉材料是第二类（B）淀粉。由图可知 CMC 的特征峰而在 20.1°附近的宽峰，归因于其特有的晶体结构。在 SC 膜中未发现淀粉和 CMC 的特征峰，表明淀粉与 CMC 混合效果较好，同时二者的结晶区受加热搅拌的影响。加入花青素后 SCA 指示膜的宽峰强度变大，可能归因于 PA 与淀粉和 CMC 的羟基之间形成的氢键。通过图谱分析表明各成分之间有较强的相互作用，打乱了各自原有的结晶结构，从而提高了指示膜的力学性能。

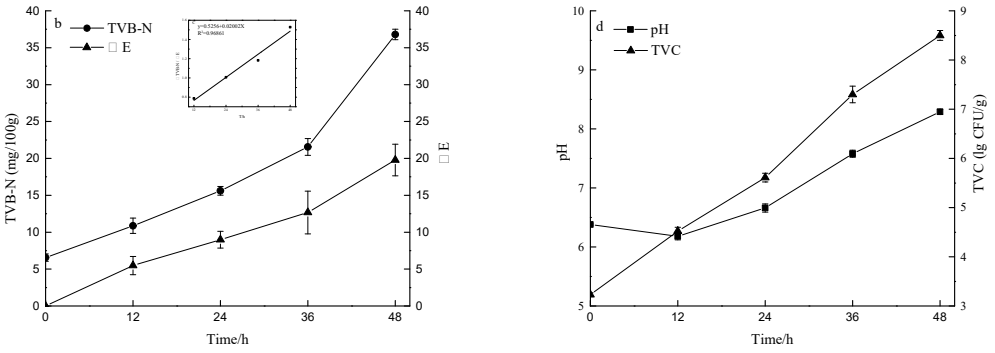
2.2.3 SCA 膜的 SEM 分析

图 2c 通过扫描电镜比较分析 SC 膜和 SCA 指示膜的横截面发现，两种膜的表面大部分区域平整光滑，表明物质之间相容性好，而有轻微的颗粒状物质，可能是因为成膜基材的团聚现象，相对而言，在 SCA 指示膜中横截面表现更加光滑，截面出现没有褶皱和纹路，表明 PA 加入后对淀粉和 CMC 之间的相容性有增强作用[30]。Zhang 等研究发现将玫瑰茄花青素加入两两混合的可降解生物聚合物基材中制备指示膜，玫瑰茄花青素改善了成膜基材的相容性，使得指示膜截面更加光滑[31]。同时 PA 中的酚羟基可以结合成膜基材中的羟基有效地降低了聚合物的链分子，从而提高了指示膜的力学性能，指示膜的截面的均一性使得自由水不易从孔洞进入指示膜内部导致其水溶性降低[32]。

2.3 SCA 膜应用于鱼肉新鲜度监测



a



a：SCA 指示膜 48 h 内的颜色变化情况；b：48 h 内鱼肉 TVB-N 值和△E 的变化；c: TVB-N 值变化值与色差比值（△TVB-N/△E）;d: 48 h 内鱼肉 pH 值和 TVC 的变化

图 3 鱼肉存放期间膜颜色和品质的变化

Fig. 3 Quality and film color changes during storage of fish

选择优化后综合性能较优的 SCA 指示膜用于实时监测鱼肉新鲜度。根据图 3a,b,d 可知，随着储存时间的延长，鱼肉的 TVB-N 值，pH 值以及菌落总数不断上升，SCA 指示膜的颜色也随着不断改变。鱼肉的初始 TVB-N 为 6.56 mg/100 g，根据 GB 2733-2015 规定新鲜鱼肉中 TVB-N 值应该小于 20mg/100g，鱼肉可食用，此时 SCA 指示膜显示出红色。随着时间的延长 TVB-N 不断的增大，当储存时间达到 36 h，鱼肉的 TVB-N 达到 21.55 mg/100g，鱼肉的 pH 为 7.58，菌落总数为 7.3 lg CFU/g，表明鱼肉已经不能食用，同时 SCA 指示膜显示出蓝紫色，△E 值为 16.78，与鱼肉新鲜时指示膜的颜色对比变化较大，肉眼可直接观察 SCA 指示膜颜色的改变。当储存时间达到 48 h 时，TVB-N，pH 以及菌落总数分别为 36.79 mg/100g，8.29，8.52 lg CFU/g，表明鱼肉已经完全腐败变质，此时 SCA 指示膜蓝色加深，△E 值为 24.55，视觉观察更加明显。由图 3c 可知，在鱼肉贮藏期间，TVB-N 值不断增大色差也不断上升，且具有线性关系，Y=0.5256+0.02002X，R^2=0.96861。在储存期间，鱼的新鲜度随着微生物生长和发生的生化反应而降低，碳水化合物，蛋白质和脂肪被分解，产生许多挥发性含氮化合物，这些含氮化合物会改变鱼肉 pH 值，从而导致指示膜颜色的改变[33]。因此 SCA 指示膜能够用于检测鱼肉新鲜度。Huang 等提取紫草根花青素作为指示剂，将琼脂作为成膜基材制备指示膜用于检测鱼肉新鲜度，指示膜颜色由粉红色变成蓝紫色，与本研究结果相似[5]。

3 结论

马铃薯淀粉和 CMC 的比例、花青素浓度、甘油浓度对指示膜 TS，EAB，WS，颜色（a 值）共 4 个指标有不同程度的影响，减少马铃薯淀粉和 CMC 的比例可提高指示膜的 TS 降低指示膜的 EAB，随着花青素的浓度提升指示膜的 a 值不断增大，甘油浓度提高显著提高指示膜的水溶性。采用主成分分析法和隶属度综合评分法相结合确定指示膜的综合评分，主成分分析法确定了前两个主成分的累计方差贡献率达到 90.250%，同时 4 个指标归一化处理后 TS、EAB、WS 和 a 值四个指标对应权重分别为 0.36、0.25、0.38、0.01。通过响应面优化指示膜的最佳工艺参数马铃薯淀粉和 CMC 质量比 60:40，花青素质量浓度为 0.5%，甘油质量浓度为 0.6%，可得指示膜的综合得分为 63.8，此时对应的 TS 为 21.48±0.12 MPa，EAB 为 28.88±0.08%，WS 为 19.24±0.21%，a 为 4.95±0.02。FT-IR 和 XRD 结果分析显示 PA 很好的嵌入了成膜基材中，并使得各成分之间作用力加强，提高了指示膜的力学性能。SEM 结果分析表明指示膜截面平整光滑，各组分之间相容性好。利用最优 SCA 指示膜实时监测鱼肉新鲜度，鱼肉的 TVB-N 从最初的 6.56 mg/100 g 达到 21.55 mg/100g

时，指示膜的颜色由原来的红色变为蓝紫色，并结合 pH 和菌落总数的变化，表示鱼肉不再新鲜，最后指示膜变为蓝色。结果表明 SCA 指示膜综合性能较优，各组分间相容性好，且能实时监测鱼肉新鲜度。

参考文献：

[1] Jr V A P, ARRUDA I N Q D. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43(1): 180-188. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014

[2] LUCHESE C L, SPEROTTO N, SPADA J C, et al. Effect of blueberry agro-industrial waste addition to corn starch-based films for the production of a pH indicator film [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104, 11-18. Doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.149

[3] PRIETTO L, MIRAPALHETE T C, PINTO V Z, et al. pH-sensitive films containing anthocyanins extracted from black bean seed coat and red cabbage [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 80, 492-500. Doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.006

[4] ZHAI X, SHI J, ZOU X, et al. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69, 308-317. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.014

[5] HUANG S, XIONG Y, ZOU Y, et al. A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebia euchroma* root extracts for monitoring fish freshness [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90, 198-205. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.009

[6] ŠEALIJA S, NESIC A, RUZIC J, et al. Edible blend films of pectin and poly(ethylene glycol): Preparation and physico-chemical evaluation [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77, 494-501. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.027

[7] CHOI I, LEE J Y, LACROIX M, et al. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato [J]. Food Chemistry, 2017, 218, 122-128. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.050

[8] 蒋光阳， 肖力源， 王章英等. 不同基材复配紫薯花青素制备智能指示膜及应用研究 [J/OL].食品科学， 2019,1-11. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20181018.1501.016.html.

[9] GB/T 1040.3-2006. 塑料 拉伸性能的测定第3部分:薄膜和薄片的试验条件[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

[10] 邹小波，王圣，石吉勇等. 天然花青素提取物与壳聚糖明胶复合膜的制备和表征 [J]. 农业工程学报, 2016, 32(17): 294-300. Doi：10.11975/j.issn.1002-6819.2016.17.039

[11] 孙海涛 邵信儒，姜瑞平等. 玉米磷酸酯淀粉/秸秆纤维素可食膜的制备及物理性能 [J]. 食品科学，2016，37(24)：21-28. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201624004

[12] GUTIERREZ T J, HEMIOU-JULIEN C, ALVAREZL V A. Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 18, 135-143. Doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.039

[13] GB 5009.228—2016.国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中挥发性盐基氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[14] GB4789.2—2016. 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[15] GB/T9695.5—2008 国家质量监督检验检疫总局.肉与肉制品 pH测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[16] GHANBARZADEH B, ALMASI H, ENTEZAMI A A. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(4): 690-702. Doi.org/10.1016/j.ifset.2010.06.001

[17] 王晓玲，董海洲，刘传富等. 木薯淀粉对改善可食性羧甲基纤维素膜性能的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 2: 63-65.

[18] SANUJA S, AGALA A, UMAPATHY M J. Synthesis and characterization of zinc oxide–neem oil–chitosan bionanocomposite for food packaging application [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74, 76-84. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.036

[19] CHAMBI H, GROSSO C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase [J]. Food Research International, 2006, 39(4): 458-66. doi:10.1016/j.foodres.2005.09.009

[20] PEREDA M, AMIXCA G, RACAZ I, et al. Preparation and characterization of sodium caseinate films reinforced with cellulose derivatives [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 1014-21. doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.063

[21] WANG, X., YONG, H., GAO, L., et al.. Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract [J]. Food Hydrocolloids. 2018 doi:10.1016/j.foodhyd.2018.10.019

[22] ZHANG Y, HAN J H. Plasticization of Pea Starch Films with Monosaccharides and Polyols [J]. Journal of Food Science, 2010, 71(6): 253-261.

[23] TONG Q, QIAN X, LIM L T, et al. Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films [J]. Food Research International, 2008, 41(10): 1007-1014. Doi.org/10.1016/j.foodres.2008.08.005

[24] 高丹丹, 江连洲, 张超等. 响应面法优化普鲁兰多糖-明胶可食性膜制备工艺 [J]. 食品科学, 2012, 33(18): 21-24.

[25] 陈珊珊,陶宏江,王亚静等. 葵花籽壳纳米纤维素/壳聚糖/大豆分离蛋白可食膜制备工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 306-14. DOI. org/10.11975/j.issn.1002-6819.2016.08.043

[26] HONG J, CHEN R, ZENG X A, et al. Effect of pulsed electric fields assisted acetylation on morphological, structural and functional characteristics of potato starch [J]. Food Chemistry, 2016, 192,15-24. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.058

[27] SILVA-PERAIR M C, TEIXEIRA J A, PEREIRA-JUNIOR V A, et al. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 61(1): 258-262. Doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.041

[28] CAPRON I, ROBERT P, COLONNA P, et al. Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(2): 249-59. Doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.015

[29] GUO J, LIU L, LIAN X, et al. The properties of different cultivars of JinHai sweet potato starches in China [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67(6): 1-6. Doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.002

[30] LIU B, XU H , ZHAO H , et al. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications.[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157:842-849. Doi:10.1016/j.carbpol.2016.10.067

[31] ZHANG, J., ZOU, X., ZHAI, X, et al. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness.[J]. Food Chemistry, 2019, 272, 306–312. doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.041

[32] RIVERO S, GARCIA M A, PINOTTI A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 90(4): 531-9. Doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021

[33] HUNG L, ZHAO J, CHEN Q, et al. Nondestructive measurement of total volatile basic nitrogen (TVB-N) in pork meat by integrating near infrared spectroscopy, computer vision and electronic nose techniques [J]. Food Chemistry, 2014, 145(7): 228-36. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.073