

微胶囊化脂肪酶型 TTI 的制备及其性能研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2022.03.009

崔子杰 刘丹飞

陈思源 蒲玉梅

钟云飞

湖南工业大学

包装与材料工程学院

湖南 株洲 412007

摘要: 针对脂肪酶在时间-温度指示剂的应用中存在热稳定性能差, 温度、pH 值对其活性影响较大等问题, 采用离子凝胶技术制备脂肪酶微胶囊。应用单因素试验和正交试验相结合的方法, 以海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙浓度为变量, 优化脂肪酶微胶囊的制备工艺, 对原脂肪酶与脂肪酶微胶囊的热稳定性能、最适温度与 pH 值进行研究, 采用红外光谱 (FTIR)、扫描电镜 (SEM) 对脂肪酶微胶囊结构及形貌进行分析, 并对脂肪酶微胶囊在时间-温度指示剂中的应用做出初步研究。得到了脂肪酶微胶囊最佳制备工艺条件为: 海藻酸钠质量浓度 30 g/L, 壳聚糖质量浓度 6 g/L, 氯化钙浓度 0.3 mol/L。脂肪酶微胶囊的热稳定性比原脂肪酶有明显提高。脂肪酶微胶囊制备工艺稳定、可靠, 具有应用于时间-温度指示剂中的实用价值。

关键词: 脂肪酶; 微胶囊; 时间-温度指示剂

中图分类号: TS206.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2022)03-0060-09

引文格式: 崔子杰, 刘丹飞, 陈思源, 等. 微胶囊化脂肪酶型 TTI 的制备及其性能研究 [J]. 包装学报, 2022, 14(3): 60-68.

1 研究背景

近年来, 食品安全问题受到广泛关注。食品安全与食品质量密切相关, 而食品的质量则与食品特性、贮藏温度、贮藏时间有显著的关系。相比于检测最终产品质量, 人们更应该关注食品在整个生命周期中的实时监测关键参数^[1-3]。时间-温度指示剂 (time-temperature indicator, TTI) 作为一种新兴的智能可识别技术, 是一种成本低、变化不可逆的食品质量记录工具, 通常附着在食品或食品包装上。

在食品生产—储存—运输过程中, TTI 可对整个过程的温度积累效应进行监测和记录, 并以自身颜

色变化与被包装食品的货架期相对应, 从而显示食品品质的变化和剩余货架寿命信息^[4-6]。根据 TTI 中颜色变化工作原理的不同, TTI 可分为物理型、化学型、微生物型及酶型四大类^[7]。物理型 TTI 主要通过反应物的物理变化使指示剂产生色彩变化, 典型的如 Monitor Mark 型 TTI, 此 TTI 根据酯质扩散速度随温度升高而加快的原理设置, 通过酯质扩散长度或范围判断被指示食品的新鲜程度^[8]。化学型 TTI 主要通过反应物的聚合反应使指示剂产生色彩变化, 如张嘉帅^[9]根据 2, 4-己二炔-1, 6-二烷基脲在温度、辐射等外界条件的刺激下会发生不可逆的固相化学聚合反应从而产生颜色变化的原理, 制成化学型 TTI

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ30218); 湖南省高等学校产学研示范基地项目 (2014-117)

作者简介: 崔子杰 (1998-), 女, 湖南张家界人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为智能指示剂及相关材料,

E-mail: 1085016574@qq.com

通信作者: 钟云飞 (1975-), 男 (白族), 湖南慈利人, 湖南工业大学教授, 主要从事信息技术在包装印刷上的应用、图形图像处理研究, E-mail: maczone@163.com

并应用于疫苗冷链的实时监控。微生物型 TTI 主要通过微生物的生长代谢使反应体系的 pH 值^[10]或底物成分^[11]发生变化, 结合 pH 指示剂达到指示效果。酶型 TTI^[12]则根据酶与底物反应生成可变色物质, 配合显色指示剂达到颜色变化的效果。相较于其他型 TTI, 酶型 TTI 具有性能稳定、生产成本低、可控性好的特点, 被广泛应用于牛乳、酸奶、冷鲜肉、鱼类等冷链产品的货架期指示, 但目前酶型 TTI 多制备成液态形式, 在实际应用中易发生泄漏, 污染产品^[2]。

固态 TTI 因具有易于储存与应用、稳定性强等特点, 逐渐成为研究热点。目前的固态 TTI 主要是使用聚乙烯醇或琼脂制作缓释薄膜^[13-14], 或利用静电纺丝技术^[15-17]、微胶囊技术^[18]达到固定化的效果。微胶囊技术作为一种将微量物质包裹在聚合物薄膜中的微型包装技术, 可以有效减少活性物质对外界环境因素(如光、氧、水)的反应, 有效控制芯材的释放, 从而达到提高反应体系稳定性的效果^[19-20]。酶对温度、pH 值的变化较为敏锐, 将微胶囊技术应用在酶的固定化上, 会使酶型 TTI 具有更好的储存稳定性^[21-23]。

脂肪酶型 TTI 在酶型指示剂中占有重要地位, 但目前对于固态脂肪酶 TTI 的研究相对较少。本研究采用离子凝胶技术制备脂肪酶微胶囊, 通过单因素试验考察海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度对脂肪酶微胶囊活性的影响, 并通过正交工艺法优化实验方案, 得到最佳制备工艺条件; 进一步通过控制外界环境变量, 得到脂肪酶微胶囊反应的最适温度及 pH 值, 并初步应用于 TTI。

2 实验

2.1 材料与试剂

1) 原料: 脂肪酶, 酶活力为 20 000 U/g, 上海源叶生物有限公司。

2) 试剂: 壳聚糖, 生物试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 海藻酸钠, 生物试剂, 阿拉丁化学试剂有限公司; 冰乙酸, 分析纯, 阿拉丁化学试剂有限公司; 无水氯化钙, 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司; 酚酞, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 聚乙烯醇 1799 型, 分析纯, 阿拉丁化学试剂有限公司; 三乙酸甘油酯, 分析纯, 上海源叶生物有限公司; 氢氧化钠, 分析纯, 阿拉丁化学试剂有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 湖南汇虹试剂有限公司; 磷酸二氢钾,

分析纯, 阿拉丁化学试剂有限公司; 十二水磷酸氢二钠, 分析纯, 阿拉丁化学试剂有限公司; 蒸馏水, 购于屈臣氏。

2.2 仪器与设备

集热式恒温加热磁力搅拌器, DF-101S 型, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; 分析电子天平, FA2004 型, 上海良平仪器仪表有限公司; 冷冻干燥机, SCIENTZ-12N 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 扫描电子显微镜, PHenom ProX 型, 中国赛默飞世尔科技有限公司; 离子溅射仪, SBC-12 型, 北京中科科仪股份有限公司; 可调高速匀浆机, FSH-2A 型, 常州亿能实验仪器; 傅里叶红外光谱测试仪, TENSOR II 型, 德国布鲁克光谱仪器公司; pH 计, pH-100 型, 上海力辰邦西仪器科技有限公司。

2.3 脂肪酶微胶囊的制备及工艺优化

2.3.1 脂肪酶微胶囊的制备

称取 1 g 脂肪酶, 用 10 mL 水溶解, 静置分层, 过滤取滤液; 称取一定量的海藻酸钠, 加入脂肪酶溶液中, 磁力搅拌 15 min, 得到海藻酸钠脂肪酶溶液; 称取一定量的壳聚糖, 用 100 mL 乙酸溶液溶解, 磁力搅拌 15 min, 得到壳聚糖溶液; 称取一定量的氯化钙, 加入壳聚糖溶液中, 磁力搅拌 5 min, 得到壳聚糖氯化钙混合溶液; 使用 10 mL 注射器将海藻酸钠脂肪酶溶液滴入壳聚糖氯化钙混合溶液中, 搅拌直至完成成膜反应, 过滤, 冷冻干燥, 获得脂肪酶微胶囊^[21-22]。

2.3.2 脂肪酶的活性测定

脂肪酶微胶囊的水解活力采用 GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》中的通用测定方法进行测定, 并得到脂肪酶微胶囊的酶活回收率, 选取脂肪酶微胶囊的最佳制备方案。

脂肪酶活力的计算公式为:

$$X_1 = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 50 \times n_1}{15 \times 0.05}$$

式中: X_1 为样品的酶活力, U/g; V_1 为滴定空白时消耗氢氧化钠标准溶液的体积, mL; V_2 为滴定样品时消耗氢氧化钠标准溶液的体积, mL; c 为氢氧化钠标准溶液浓度, mol/L; n_1 为样品的稀释倍数。

酶活回收率的计算公式为:

$$R = \frac{X_1}{X_0} \times 100\%$$

式中: X_1 为脂肪酶微胶囊的酶活力, U/g; X_0 为原脂

肪酶的酶活力, U/g。

2.3.3 脂肪酶微胶囊制备的单因素试验

在预实验中,发现海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度等3个因素对脂肪酶微胶囊活性可能存在影响,故以海藻酸钠质量浓度(20, 30, 40 g/L)、壳聚糖质量浓度(3, 6, 9 g/L)、氯化钙浓度(0.1, 0.2, 0.3 mol/L)进行单因素试验,并测定脂肪酶微胶囊的水解活性。上一单因素试验结束后,选取其中最佳的因素水平作为条件进行下一单因素试验,每个试验平行3次,探究各因素对脂肪酶微胶囊活性的影响^[18, 24]。

2.3.4 脂肪酶微胶囊制备的正交法工艺优化试验

根据单因素试验考察海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度3个因素对脂肪酶微胶囊活性的影响,采用L9(3⁴)正交表设计正交法工艺优化试验,并测定脂肪酶微胶囊的水解活性。每个试验平行3次,通过极差分析确定各因素对脂肪酶微胶囊活性的影响,得到最优制备工艺。

2.4 外界环境对脂肪酶微胶囊性能的影响

根据上述试验得到脂肪酶微胶囊的最优制备工艺,制备脂肪酶微胶囊。比较所得脂肪酶微胶囊与原脂肪酶的热稳定性能、最适温度及pH值,探究微胶囊化处理对脂肪酶的影响。

2.4.1 脂肪酶的热稳定性

其他条件不变的情况下,将原脂肪酶与脂肪酶微胶囊在60℃下水浴中分别加热0, 30, 60, 90, 120 min,再采用GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》中通用测定方法测定脂肪酶的活性,得到其热稳定性能变化情况。

2.4.2 反应温度对脂肪酶活力的影响

其他条件不变的情况下,分别在反应温度为20, 30, 40, 50, 60℃的环境中,采用GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》中通用测定方法对原脂肪酶与脂肪酶微胶囊的活性进行测定,得到脂肪酶活力随反应温度的变化情况。

2.4.3 反应溶液pH值对脂肪酶活力的影响

其他条件不变的情况下,分别在缓冲溶液pH值为6, 7, 8, 9, 10的环境中,采用GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》中通用测定方法对原脂肪酶与脂肪酶微胶囊的活性进行测定,得到脂肪酶活力随pH值的变化情况。

2.5 脂肪酶微胶囊理化性质分析

2.5.1 红外光谱分析

分别称取海藻酸钠、壳聚糖、原脂肪酶、脂肪酶

微胶囊各2 mg,各加入100 mg溴化钾进行研磨压片,105℃烘干处理,然后采用TENSOR II傅里叶红外光谱仪进行扫描分析,扫描范围为400~4000 cm⁻¹。

2.5.2 粒径分布分析

使用Nano Measurer粒径分布计算软件统计微胶囊在未干燥形态和干燥形态下的粒径分布情况,并计算其平均粒径。

2.5.3 形貌及结构分析

准备完整的微胶囊颗粒及粉碎后的微胶囊颗粒,分别对微胶囊的外部形貌与内部结构进行观察分析。具体操作方法为:在样品架上贴一层导电胶带,然后将微胶囊均匀平铺在导电胶带上,使用SBC-12离子溅射仪喷洒一层薄金后,用PHenom ProX扫描电子显微镜对待测样品的形貌/结构进行观察。

2.6 脂肪酶微胶囊在TTI上的初步应用

1) 原理。根据脂肪酶水解脂肪产生脂肪酸使反应体系pH值产生变化的原理,选取适当的pH指示剂与反应物作为变色底物,再加入脂肪酶微胶囊,使得反应过程中体系内pH值变化引起颜色变化,从而达到指示效果。

2) 具体方法。选取脂肪酶微胶囊的最优制备工艺得到的微胶囊酶颗粒,粉碎后过200目筛;在pH=10.6的甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液中加入琼脂加热溶解,冷却后加入三乙酸甘油酯作为底物,酚酞-百里酚酞-百里香酚蓝混合指示剂作为变色指示剂,得到变色底物。取1 mL变色底物置入一次性培养皿中,冷却凝固;另取冷却后的琼脂溶液加入微胶囊0.05 g,取0.5 mL置于一次性培养皿中,冷却凝固;将底物琼脂片与脂肪酶微胶囊琼脂片接触以激活脂肪酶TTI体系,用聚乙烯膜将指示剂体系密封置于4℃环境下保存,在同一光源下观察其颜色变化。

3 结果与分析

3.1 脂肪酶微胶囊的制备工艺优化

在单因素试验中,分别以海藻酸钠质量浓度(A)、壳聚糖质量浓度(B)、氯化钙浓度(C)为变量进行试验,并对得到的脂肪酶微胶囊的水解活性进行测定,试验设计及结果如表1所示。

由表1可以看出,这3种变量对微胶囊的活性均有影响。随着海藻酸钠和壳聚糖浓度的增大,脂肪酶微胶囊的活性均呈现先上升后下降的趋势,这说明所选取的因素水平范围合适,可用作正交试验中的水平

范围;随着氯化钙浓度的增大,脂肪酶微胶囊的活性也随之上升,但氯化钙浓度达到 0.2 mol/L 后,再增大氯化钙浓度对酶活性的影响则相对较小。

表 1 单因素试验及酶的活性测定

Table 1 Single factor test and enzyme activity determination

试验号	A/(g·L ⁻¹)	B/(g·L ⁻¹)	C/(mol·L ⁻¹)	酶活力/(U·mL ⁻¹)
A ₁	20	6	0.2	2333.33
A ₂	30	6	0.2	2983.33
A ₃	40	6	0.2	2500.00
B ₁	30	3	0.2	2516.67
B ₂	30	6	0.2	3016.67
B ₃	30	9	0.2	2333.33
C ₁	30	6	0.1	2560.00
C ₂	30	6	0.2	3020.01
C ₃	30	6	0.3	3140.01

壳聚糖作为微胶囊壁材,能与海藻酸钠溶胶发生络合反应,形成壳聚糖-海藻酸钠聚电解质复合膜。适当的浓度能够使微胶囊的外部壁材形态更加稳固,从而对内部的脂肪酶起到更好的固定作用,但浓度过高会导致微胶囊壁过厚,内部的脂肪酶很难通过壁材,从而降低了其活性。海藻酸钠浓度和氯化钙浓度对微胶囊酶的活性影响可能是因为海藻酸钠作为微胶囊芯材,与氯化钙发生络合反应,海藻酸钠中的钠离子与氯化钙中的钙离子发生置换,形成海藻酸钙网状水凝胶结构,对脂肪酶起载体作用,适当的浓度能够使脂肪酶更加均匀的分散在芯材中,但海藻酸钠浓度过大会导致溶液流动性变差,无法通过注射器挤出均匀的球状溶液,从而使包裹微胶囊壁材过程变得十分困难。

为了获得脂肪酶微胶囊的最佳制备工艺,对单因素试验后进一步采用正交试验法优化工艺。采用 L9 (3⁴) 正交法,以海藻酸钠质量浓度(A)、壳聚糖质量浓度(B)、氯化钙浓度(C)为变量,并设置空白变量组,对得到的脂肪酶微胶囊的水解活性进行测定,并对测定结果进行极差分析,试验设计及结果如表 2 所示。

由表 2 可看出, $k_{2A} > k_{3A} > k_{1A}$, $k_{2B} > k_{1B} > k_{3B}$, $k_{3C} > k_{2C} > k_{1C}$, 因此 A₂、B₂、C₃ 分别是 A、B、C 三因素的最优水平; $R_B > R_C > R_A$ 表明壳聚糖浓度对脂肪酶微胶囊的活性影响最大,其次是氯化钙浓度,海藻酸钠浓度影响最小。因此,通过正交试验获得的脂肪酶微胶囊制备最优工艺组合为 A₂B₂C₃, 即海藻酸钠质量浓度为 30 g/L, 壳聚糖质量浓度为 6 g/L, 氯化钙

浓度为 0.3 mol/L。

表 2 正交试验结果及极差分析

Table 2 Orthogonal experiment results and range analysis

编号	因素				酶活力 / (U·mL ⁻¹)
	A/(g·L ⁻¹)	B/(g·L ⁻¹)	C/(mol·L ⁻¹)	空白	
1	20	3	0.1	1	1700.00
2	30	3	0.2	3	2516.67
3	40	3	0.3	2	2500.00
4	20	6	0.2	2	2983.33
5	30	6	0.3	1	3333.33
6	40	6	0.1	3	2833.33
7	20	9	0.3	3	2616.67
8	30	9	0.1	2	2083.33
9	40	9	0.2	1	1833.33
k_{1j}	2366.67	2238.89	2205.56		最佳制备工艺: A ₂ B ₂ C ₃
k_{2j}	2644.44	3050.00	2461.11		
k_{3j}	2405.56	2127.78	2750.00		
R	277.77	922.30	544.44		

3.2 生物催化性能分析

3.2.1 脂肪酶微胶囊的热稳定性

酶作为一种对温度十分敏感的生物试剂,高温存储会使其活性明显降低,而酶的固定化可以有效解决酶的热变性问题。本研究分别将原脂肪酶与脂肪酶微胶囊在 60 ℃下水浴中加热一段时间,并研究两种酶的活性随时间的变化情况,结果如图 1 所示。

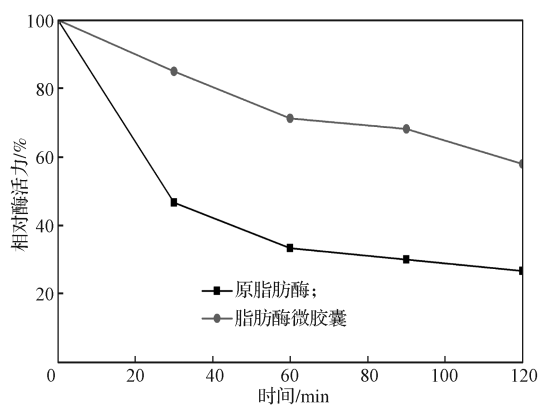


图 1 脂肪酶在 60 ℃环境下的热稳定性

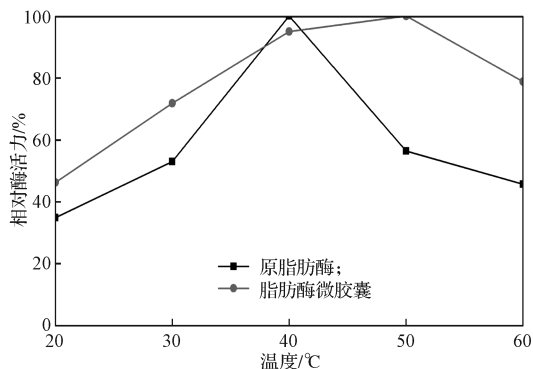
Fig. 1 Thermal stability of lipase at 60 °C

由图 1 可知,在 60 ℃储存条件下,原脂肪酶的水解活性迅速降低,2 h 后的活性仅为初始活性的 26.67%;而脂肪酶微胶囊的水解活性降低速率明显下降,在 2 h 后仍有初始活性的 57.96%。这可能是因为微胶囊壁材对芯材有一定的保护作用,且固定化载体的存在阻止了部分脂肪酶分子的伸展变形以及分子变性。对脂肪酶进行微胶囊化处理,有效提高了

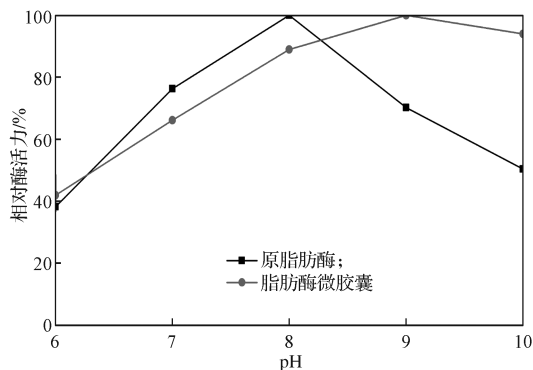
原脂肪酶的热稳定性。

3.2.2 外界环境对脂肪酶微胶囊活性的影响

脂肪酶作为一种酶制剂，对外界的环境十分敏感，因此外界环境如反应溶液 pH 值、反应温度等对脂肪酶的活性都会产生影响。本研究通过控制反应溶液的 pH 值、反应温度，得到原脂肪酶与脂肪酶微胶囊活性随溶液 pH 值及反应温度的变化，结果如图 2 所示。



a) 反应温度



b) 反应溶液 pH 值

图 2 外界环境对脂肪酶活力的影响

Fig. 2 Effect of external environment on lipase activity

由图 2a 可知，原脂肪酶的最适反应温度为 40 °C 左右，脂肪酶微胶囊的最适温度则在 50 °C 左右，这也进一步证明了脂肪酶微胶囊热稳定性的提高。由图 2b 可知，原脂肪酶在 pH=8 左右的水解活性最强，而脂肪酶微胶囊的水解活性在 pH=9~10 左右时最强，这说明微胶囊化后的脂肪酶耐碱性更好，更适合在碱性条件下反应。由此说明，微胶囊化处理使脂肪酶的耐碱性及耐高温性能都有一定的提升。

3.3 物理和形态特征分析

3.3.1 红外光谱分析

脂肪酶微胶囊、原脂肪酶、海藻酸钠、壳聚糖的

红外光谱图如图 3 所示，其中：A 为脂肪酶微胶囊；B 为原脂肪酶；C 为壳聚糖；D 为海藻酸钠。

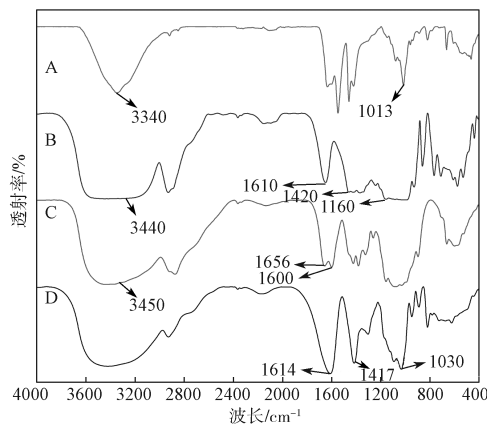


图 3 脂肪酶微胶囊红外光谱图

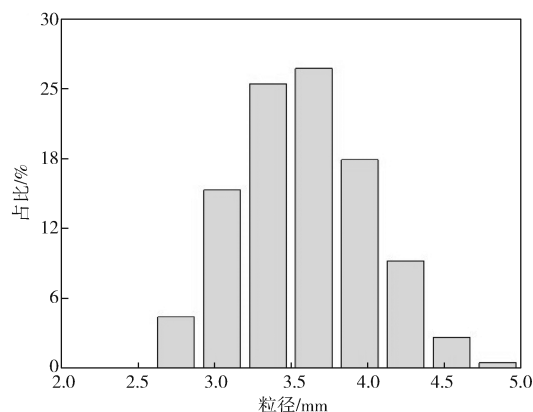
Fig. 3 Infrared spectrum of lipase microcapsules

由海藻酸钠红外光谱图（图 3D）可知，由于 C=O 键的不对称伸缩振动引起 1614 cm⁻¹ 处的宽峰，C=O 键的对称伸缩振动引起 1417 cm⁻¹ 处的窄峰；1030 cm⁻¹ 处的宽峰则是由于 C—O 键伸缩振动引起的。壳聚糖红外光谱（图 3C）中 3450 cm⁻¹ 左右的峰，是形成氢键缔合的—OH 伸缩振动吸收峰与—NH 的伸缩振动吸收峰重叠而增宽的多重吸收峰；在 1600 cm⁻¹ 及 1656 cm⁻¹ 处，由于 N—H 弯曲振动和 C=O 伸缩振动形成酰胺吸收峰。原脂肪酶（图 3B）在 3440 cm⁻¹ 处的吸收峰，与—OH 键轴向变形有关；1610 cm⁻¹ 处的峰与 N—H 键的弯曲振动有关；1420 cm⁻¹ 处的峰与 C—N 键轴向变形有关；1160 cm⁻¹ 处的峰与 C—O 键轴向变形有关。对于脂肪酶微胶囊（图 3A），可以观察到微胶囊—OH 键和—NH 键的伸缩振动吸收峰强度降低，且移动至 3340 cm⁻¹ 处，C—O 键轴向变形相关的峰（1013 cm⁻¹ 处）吸收强度也有所减弱，可能是壳聚糖中的氨基和海藻酸钠中羧基的离子间及静电相互作用导致 N—H 键减少。有研究发现，如果形成包埋物，芯、壁材分子间的非共价键作用会减弱分子间的键能，体现在红外光谱中相应基团的吸收强度会相应减弱，以此来表征壁材分子是否对芯材产生了包埋作用^[24-25]。比较谱图 4A~B 可以看出，脂肪酶微胶囊的吸收峰强度有所减弱，这表明脂肪酶进入了微胶囊内腔，实现了微胶囊对脂肪酶的包埋作用。

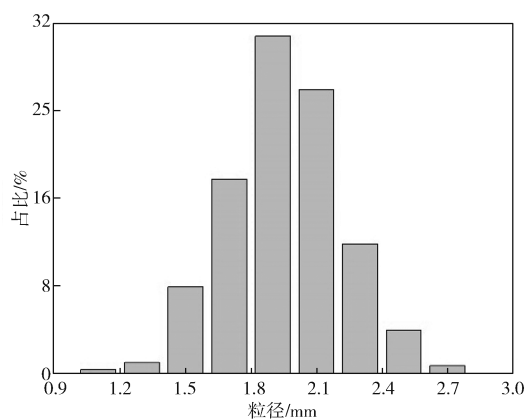
3.3.2 粒径分布分析

利用 Nano Measurer 粒径分布计算软件统计脂肪

酶微胶囊在未干燥形态和干燥形态下的粒径分布情况, 并计算其平均粒径, 结果如图 4 所示。由图 4a 可知, 未干燥的微胶囊粒径主要分布在 3.0~4.0 mm 左右, 平均粒径约为 3.58 mm; 由图 4b 可知, 干燥后的微胶囊粒径主要分布在 1.6~2.4 mm 左右, 平均粒径约为 1.95 mm。



a) 未干燥状态下



b) 干燥状态下

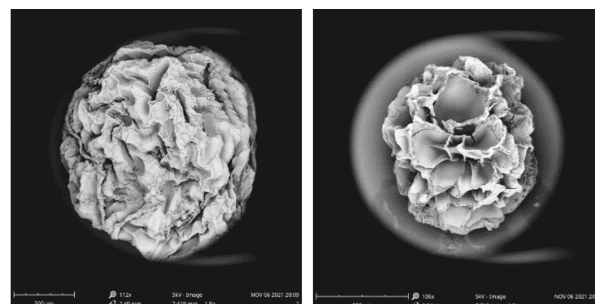
图 4 脂肪酶微胶囊粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of lipase microcapsules

3.3.3 形貌及结构分析

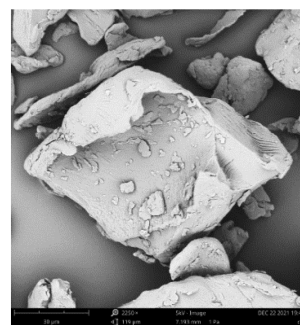
利用扫描电子显微镜观察脂肪酶微胶囊的外部形貌、内部结构及粉碎后的微观结构, 结果如图 5 所示。由图 5a 可以观察到, 微胶囊颗粒为表面坍塌不均匀的球体。这是由于在水凝胶基微胶囊的形成过程中, 水分子通过分子排列及二次力存在于微胶囊中, 使微胶囊呈现出均匀的球形; 但在冷冻干燥过程中, 由于水分子的消失与基体结构的减弱, 这种稳定的三维结构会发生改变, 因此干燥后微胶囊不再是一个均匀的球体, 表面会出现坍塌与褶皱, 内部则形成大量的孔洞^[20-22]。由图 5b 可以观察到微胶囊颗粒内部呈网状结构, 这是由于海藻酸钠中的钠离子与氯化钙中

的钙离子会发生置换反应, 形成海藻酸钙网状水凝胶结构。图 5c 微胶囊粉碎后的内部结构中, 可以看到脂肪酶附着在微胶囊内壁上。



a) 外部形貌

b) 内部整体结构



c) 微观结构

图 5 脂肪酶微胶囊扫描电子显微镜图

Fig. 5 Scanning electron microscopy of lipase microcapsules

3.4 脂肪酶微胶囊在 TTI 上的初步应用分析

通过正交试验得到脂肪酶微胶囊的最优制备工艺, 即在海藻酸钠质量浓度 30 g/L、壳聚糖质量浓度 6 g/L、氯化钙浓度 0.3 mol/L 的条件下制备脂肪酶微胶囊, 并进一步制备 TTI, 用聚乙烯膜将指示剂体系密封, 置于 4 ℃ 环境下保存, 在同一光源下每隔 8 h 观察其颜色变化, 结果如图 6 所示。

由图 6 可以看出, 随着时间的推移, 此 TTI 的颜色发生紫色 - 淡紫色 - 黄色的变化过程, 24 h 后再无颜色变化, 反应终止。在本 TTI 体系中, 使用甘氨酸 - 氢氧化钠溶液作为缓冲溶液, 初始 pH 值在 10.6 左右。当 TTI 激活后, 脂肪酶微胶囊水解变色底物中的三乙酸甘油酯, 产生脂肪酸, 使得 TTI 体系中的 pH 值缓慢下降。酚酞 - 百里酚酞 - 百里香酚蓝混合指示剂作为 TTI 体系中的 pH 指示剂, 可在 pH=10.6~8.0 的范围内对体系 pH 值的变化做出颜色响应, 得到一个可视化的变色效果, 当 TTI 体系的 pH 值下降到 8.0 后, 颜色不再发生变化, 此 TTI 体系达到指示终点。

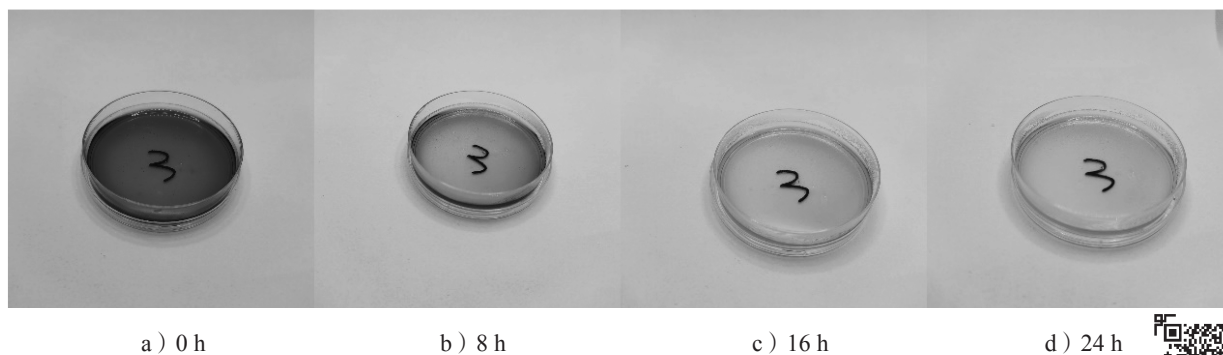


图6 脂肪酶微胶囊 TTI 的颜色变化过程

Fig. 6 Color change process of lipase microcapsule TTI

彩图

本研究中制备的酶型 TTI 体系, 将变色底物与脂肪酶微胶囊分别固定化, 并采取接触激活的方式, 有利于 TTI 反应体系初始反应时间的控制, 不存在必须现做现用的问题; 且在固定化过程中, 本研究先对脂肪酶进行了微胶囊化处理, 使得脂肪酶在储存和反应过程中的稳定性更好, 再对整个 TTI 反应体系进行固定化, 使 TTI 更易存储及应用。从该应用实验可以看出, 本实验制备的脂肪酶微胶囊可以应用于 TTI 的研究中, 对于固态 TTI 的研究有一定的帮助。在后续实验中, 可以通过改变 TTI 体系内各组分的含量, 达到缩短或增长反应时长的目的, 从而应用于指示不同食品的品质变化及货架期。

4 结语

本研究采用单因素试验与正交试验相结合优化脂肪酶微胶囊的制备工艺, 得出理论最佳工艺为海藻酸钠质量浓度 30 g/L、壳聚糖质量浓度 6 g/L、氯化钙浓度 0.3 mol/L, 在此条件下, 制备的脂肪酶微胶囊水解活性最高。相比于原脂肪酶, 本研究制备的脂肪酶微胶囊的热稳定性有所提高, 最适温度和 pH 值也有所改变, 使得脂肪酶耐碱性更好, 更适合在碱性条件下反应。

通过红外光谱分析和扫描电子显微镜观察可知, 脂肪酶的特征吸收峰强度有所减弱, 表明脂肪酶进入了微胶囊内腔, 包埋成功; 微胶囊的外部形貌为不均匀球体, 呈现出塌陷和不均匀的表面, 内部则是网状结构, 可以使脂肪酶更加均匀地附着在微胶囊内壁, 且不阻碍脂肪酶与外界反应。

本研究对制备的脂肪酶微胶囊在时间-温度指示剂中进行了初步应用, 制备的 TTI 随时间呈现明显的颜色变化, 为脂肪酶微胶囊在 TTI 方面的应用

提供了依据。在后期的研究中, 将进一步完善该微胶囊在固态 TTI 体系中的应用与分析。

参考文献:

- [1] GAO T T, TIAN Y, ZHU Z W, et al. Modelling, Responses and Applications of Time-Temperature Indicators (TTIs) in Monitoring Fresh Food Quality[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 311-322.
- [2] LIU D F, CUI Z J, SHANG M, et al. A Colorimetric Film Based on Polyvinyl Alcohol/Sodium Carboxymethyl Cellulose Incorporated with Red Cabbage Anthocyanin for Monitoring Pork Freshness[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2021, 28: 100641.
- [3] LIU D F, YANG L, SHANG M, et al. Research Progress of Packaging Indicating Materials for Real-Time Monitoring of Food Quality[J]. Materials Express, 2019, 9(5): 377-396.
- [4] 刘丹飞, 崔子杰, 尚咪, 等. 用于食品质量监测的 pH 智能指示剂的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8351-8358.
LIU Danfei, CUI Zijie, SHANG Mi, et al. Research Progress of pH Intelligent Indicators for Food Quality Monitoring[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(22): 8351-8358.
- [5] 周云令, 魏娜, 郝晓秀, 等. 智能包装技术在食品供应链中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 336-344.
ZHOU Yunling, WEI Na, HAO Xiaoxiu, et al. Progress in Application of Intelligent Packaging Technologies in Food Supply Chain[J]. Food Science, 2021, 42(7): 336-344.
- [6] PANDIAN A T, CHATURVEDI S, CHAKRABORTY S. Applications of Enzymatic Time-Temperature Indicator

- (TTI) Devices in Quality Monitoring and Shelf-Life Estimation of Food Products During Storage[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 15(2): 1523–1540.
- [7] 王琳, 孟晶晶, 李园锦, 等. 固定化糖化酶型时间-温度指示器在酸奶质量检测上的应用[J]. *包装学报*, 2018, 10(1): 46–53.
- WANG Lin, MENG Jingjing, LI Yuanjin, et al. Application of Immobilized Glucoamylase Time-Temperature Indicators on Yogurt Quality Monitoring[J]. *Packaging Journal*, 2018, 10(1): 46–53.
- [8] 刘冬青, 陈朴, 臧鹏, 等. 时间-温度指示器在食品保质期预测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(22): 1–10.
- LIU Dongqing, CHEN Pu, ZANG Peng, et al. Application of Time-Temperature Indicator in Food Shelf Life Prediction[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(22): 1–10.
- [9] 张嘉帅. 基于疫苗的化学型时间温度指示剂的制备及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- ZHANG Jiashuai. Preparation and Application of Chemical Time-Temperature Integrator Based on Vaccine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [10] 邱灵敏, 张嘉帅, 钱静, 等. 微生物型鲜牛奶时间温度指示器[J]. *包装工程*, 2020, 41(9): 67–73.
- QIU Lingmin, ZHANG Jiashuai, QIAN Jing, et al. Microbial Time-Temperature Indicator Applied in Fresh Milk[J]. *Packaging Engineering*, 2020, 41(9): 67–73.
- [11] ESFAHANI S S, EMTIAZI G, RABBANI M. Preparation of a Microbial Time-Temperature Indicator by Using the Vegetative Form of *Bacillus Amyloliquefaciens* for Monitoring the Quality of Chilled Food Products[J]. *Applied Food Biotechnology*, 2017, 4(2): 79–84.
- [12] JAISWAL R K, MENDIRATTA S K, TALUKDER S, et al. Application of Lipase Based Enzymatic Time Temperature Indicator (TTI) as Quality Marker for Frozen Chicken Meat[J]. *Food Science and Technology Research*, 2020, 26(1): 9–16.
- [13] 任兴晨, 茅林春, 苑佳佳, 等. 低温碱性脂肪酶型时间-温度指示剂的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 251–254, 267.
- REN Xingchen, MAO Linchun, YUAN Jiajia, et al. Research on Low-Temperature TTI Based on Lipase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 251–254, 267.
- [14] 徐凤娟, 葛蕾, 李振兴, 等. 固态酶型时间温度指示器的研发[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3507–3512.
- XU Fengjuan, GE Lei, LI Zhenxing, et al. Development of a Novel Time-Temperature Indicator Based on Tyrosinase[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(9): 3507–3512.
- [15] JHUANG J R, LOU S N, LIN S B, et al. Immobilizing Laccase on Electrospun Chitosan Fiber to Prepare Time-Temperature Indicator for Food Quality Monitoring[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2020, 63: 102370.
- [16] JHUANG J R, LIN S B, CHEN L C, et al. Development of Immobilized Laccase-Based Time Temperature Indicator by Electrospinning Zein Fiber[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020, 23: 100436.
- [17] TSAI T Y, CHEN S H, CHEN L C, et al. Enzymatic Time-Temperature Indicator Prototype Developed by Immobilizing Laccase on Electrospun Fibers to Predict Lactic Acid Bacterial Growth in Milk During Storage[J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(5): 1160.
- [18] 唐园园. 固态酶型时间温度指示器的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- TANG Yuanyuan. Research on the Solid-Type Time-Temperature Indicators[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [19] 项郑昊, 周化岚, 张建国. 海藻酸钠微胶囊制备及其在微生物包埋中的应用[J]. *工业微生物*, 2021, 51(1): 43–49.
- XIANG Zhenghao, ZHOU Hualan, ZHANG Jianguo. Preparation of Alginate Microcapsules and Its Application in Industrial Microbiology[J]. *Industrial Microbiology*, 2021, 51(1): 43–49.
- [20] YOUSEFI M, KHANNIRI E, SHADNOUSH M, et al. Development, Characterization and in Vitro Antioxidant Activity of Chitosan-Coated Alginate Microcapsules Entrapping *Viola Odorata* Linn. Extract[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163: 44–54.
- [21] DA S PEREIRA A, DINIZ M M, DE JONG G, et al. Chitosan-Alginate Beads as Encapsulating Agents for *Yarrowia Lipolytica* Lipase: Morphological, Physico-Chemical and Kinetic Characteristics[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 621–630.
- [22] DA S PEREIRA A, FRAGA J L, DINIZ M M, et al. High Catalytic Activity of Lipase from *Yarrowia Lipolytica* Immobilized by Microencapsulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3393.
- [23] SU F, LI G, FAN Y, et al. Enhanced Performance

- of Lipase via Microcapsulation and Its Application in Biodiesel Preparation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29670.
- [24] 王记莲. 响应面法优化红菊苣花青素的提取工艺及其微胶囊的制备 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(22): 8870–8877.
- WANG Jilian. Optimization of Extraction Technology of Anthocyanins from *Cichorium Intybus* by Response Surface Methodology and Preparation of Microcapsules[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(22): 8870–8877.
- [25] 陈明真. 酶制剂微胶囊的制备、改性及释放研究 [D]. 上海: 东华大学, 2021.
- CHEN Mingzhen. Preparation, Modification and Release of Enzyme Microcapsule[D]. Shanghai: Donghua University, 2021.

(责任编辑: 李玉华)

Preparation and Properties of Microencapsulated Lipase TTIs

CUI Zijie, LIU Danfei, CHEN Siyuan, PU Yumei, ZHONG Yunfei

(College of Packaging and Materials Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: Lipase microcapsules were prepared by adopting ion gel technology in order to solve the problems of poor thermal stability performance and great influence of temperature and pH value on lipase activity in the application of time-temperature indicator. The preparation process of lipase microcapsules was optimized by single factor test and orthogonal test with the concentration of sodium alginate, chitosan and calcium chloride as variables with the thermal stability, optimum temperature and pH value of lipase and lipase microcapsules were studied. The structure and morphology of lipase microcapsules was analyzed by infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM), and then the application of lipase microcapsule in time-temperature indicator was preliminarily studied. The optimal preparation conditions of lipase microcapsules were as follows: sodium alginate mass concentration was 30 g/L, chitosan mass concentration was 6 g/L, calcium chloride concentration was 0.3 mol/L, and the thermal stability of lipase microcapsules was significantly improved compared with the original lipase. The preparation technology of lipase microcapsule is stable and reliable, which has practical value in time-temperature indicator.

Keywords: lipase; microcapsule; time-temperature indicator