

明胶-溶菌酶/ZnO 纳米复合抗菌膜材料构建与性能

胡二坤¹, 石伟健², 尹寿伟²

(1. 河南职业技术学院烹饪食品系, 河南郑州 450046)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院食物蛋白工程研究中心, 广东广州 510640)

摘要: 本研究以温敏性的明胶为基材同时包埋有机/无机抗菌剂, 企图实现抗菌剂的协同增效, 扩大材料的抗菌谱, 并系统研究抗菌材料表面结构、机械与阻隔性能随抗菌剂种类及计量的演变规律。溶菌酶/纳米氧化锌-明胶膜材料具有选择吸光性, 在紫外区域有明显吸收峰, 而在可见光区域透光率超过 90%。溶菌酶/纳米氧化锌具有协同增效, 扩大膜材料的抗菌谱, 相对荷载溶菌酶或纳米氧化锌的膜材料, 复合抗菌剂膜对大肠杆菌与枯草芽孢杆菌具有更强的抗菌效果。荷载溶菌酶或纳米氧化锌不改变明胶膜材料的表面微结构, 两者在成膜及膜基质中的相互作用形成异质的膜表面, 并影响蛋白网络结构, 弱化膜材料的水汽及氧气阻隔性能。本研究为新型有机/无机复合抗菌膜材料开发提供理论依据。

关键词: 抗菌膜; 明胶; 溶菌酶; 纳米氧化锌; 协调抗菌

文章编号: 1673-9078(2017)9-159-165

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.023

Fabrication and Characterization of Gelatin-Lysozyme/ Nano-Zno Nanocomposite Films

HU Er-kun¹, SHI Wei-jian², YIN Shou-wei²

(1. College of Cooking and Food, Henan Polytechnic, Zhengzhou 450046, China) (2. Research and Development Center of Food Proteins, School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This work attempted to achieve effective antibacterial gelatin films by incorporating organic / inorganic antibacterials leading to synergistic antibacterial effect and wide antibacterial spectrum. Surface morphology, mechanical and barrier properties as well as antimicrobial activity of the films were evaluated. Gelatin-lysozyme/ nano-ZnO nanocomposite films had selective light absorbance. Obvious absorption peak occurred in the ultraviolet (UV) region, while the transmittance was over 90% in the visible region. The simultaneous incorporation of lysozyme / nano-ZnO resulted in synergistic antibacterial activity against test organism, i.e., *Escherichia coli* (G⁻) and *Bacillus subtilis* (G⁺). The loading of lysozyme or nano ZnO within the gelatin matrix did not affect the surface morphology of the films, while the simultaneous loading of lysozyme and nano-ZnO resulted in heterogeneous surface morphology, probably due to the formation of the agglomerates via the interaction between lysozyme and nano-ZnO in the film-forming solution or the casting process. As a result, gelatin network structure as well as the performance of water vapor and oxygen barrier was varied, in an antimicrobial type-and dose- dependent manner. This study provides a theoretical basis for the development of novel organic/ inorganic composite films.

Key words: antimicrobial films; gelatin; lysozyme; nano-ZnO particles; Synergistic antibacterial effects

食品在加工、运输和储藏过程中易受病菌污染从而引起食源性疾病。致病菌污染造成的食源性疾病的

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 国家自然科学基金: 基于 zein 自组装的纳米粒子控释抗菌膜材料构建及构效关系研究 (31471628); 华南理工大学中央高校基本科研业务费重点项目 (2017ZD080); 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室 (201536)

作者简介: 胡二坤 (1989-) 女, 讲师, 研究方向: 食品营养及食品安全

通讯作者: 尹寿伟 (1980-) 男, 博士, 主要从事新型活性食品包装材料研究

来越受到重视, 美国疾病控制预防中心在 2010 年全民健康计划 (Healthy People 2010 Objectives) 中提出要降低致病菌引起的食源性疾病的发病率, 美国农业部食品安全与检测服务局 (USDA's FSIS) 和美国食品药品监督管理局 (US. FDA) 明确规定在食品中致病菌 (如假单孢李斯特菌) 不得检出。我国疾病控制中心的监控数据也显示致病菌污染已成为我国食源性疾病爆发的主要原因。构建合适的抗菌剂缓释输送载体 (食品包装材料) 是避免食品货架期内有害微生物污染 (或滋生) 的一个重要途径。

蛋白膜材料就是一类食品级(GRAS)抗菌剂输送载体,其作用机制是使抗菌剂包埋在蛋白三维网络基质中,从而起到一定缓释效果^[1]。明胶是一类温敏性蛋白,具有三螺旋结构,温度改变会驱动明胶快速凝胶化,进而均匀包埋活性物质。本研究利用明胶基质同时包埋有机/无机抗菌剂,企图实现抗菌剂的协同增效,扩大其抗菌谱。溶菌酶是常用的 GRAS 级的天然抗菌剂,分解细菌细胞壁的肽聚糖从而使细胞死亡,抑制革兰氏阳性菌^[2,3]。氧化锌是无毒的,也是重要的 Zn 来源,纳米氧化锌具有广谱的抗菌性^[4,5]。天然有机/无机抗菌剂协同使用的鲜有报道。本文题选用温敏性、生物兼容的明胶为基材,将有溶菌酶和纳米氧化锌包埋在明胶基质,研究抗菌剂之间的协调抗菌作用,并系统研究抗菌材料表面结构、机械性能与阻隔性能随抗菌剂种类及计量的演变规律,为抗菌材料构建提供一种新思路。

1 材料与方

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

明胶和氧化锌纳米颗粒(货号,721077):美国 sigma-aldrich 公司;甘油:国药集团试剂有限公司;

溶菌酶:美国 Genview 公司;枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 和大肠杆菌 ATCC 25922:广东省微生物菌种保藏中心;营养肉汤培养基:广东环凯生物科技有限公司;琼脂粉:北京奥博星生物技术有限公司,其它化学试剂是分析纯。

1.1.2 设备与仪器

1530vp 扫描电子显微镜,EO 公司;Nanoscope 3A 原子力显微,美国 Veeco 公司;L&W 250 厚度仪,瑞士 Lorentzen & Wwtre 公司;INSTRON 5565 机械性能测试仪,美国 INSTRON 公司。SW-1-6F 洁净工作台上,海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 方法

1.2.1 明胶基抗菌膜的制备

称取一定量的明胶溶于去离子水中,在 50 °C 水浴水化 2 h,加入一定量的纳米氧化锌,50 °C 水浴水化 2 h;加入溶菌酶,搅拌 30 min(50 °C);最后加入一定量甘油,继续 50 °C 水浴水化 30 min。将成膜液倒入 18×21 cm 有机玻璃盒中,在恒温恒湿箱中干燥 48 h 成膜(25 °C, 40% RH 下干燥)。将膜材料在干燥器平衡两天以上备用(硝酸镁饱和溶液,58% RH)。各种膜材料的成分如下表 1。

表 1 明胶基抗菌膜成分表

Table 1 Composition of gelatin films

膜材料	明胶/(%, m/m 明胶)	溶菌酶/(%, m/m 明胶)	纳米氧化锌/(%, m/m 明胶)	甘油/(%, m/m 明胶)
A	1	-	-	30
B	1	1	-	30
C	1	-	0.5	30
D	1	-	1.0	30
E	1	1	0.5	30
F	1	1	1.0	30

1.2.2 膜制厚度的测定

采用 L&W 250 厚度仪(精确度为 0.1 μm)测定膜材料厚度,随机获取同一张膜上的 13 个点的厚度值,去掉最大值和最小值,计算得到膜材料的平均厚度和标准偏差。

1.2.3 紫外-可见光谱分析

将明胶膜片(1×4 cm)紧贴于石英比色皿的内壁,以 100 nm/min 速度进行全波长扫描。

1.2.4 扫描电子显微镜(SEM)

将膜通过双面胶固定在特制不锈钢样品台表面,用喷金仪在样品表面喷上厚度小于 20 nm 的涂层,镀膜时间为 150 s。将样品取出,通过 LEO 1530 VP 场发射扫描电镜观察膜表面形貌,在 15 kV 加速电压下

进行观察拍照。

1.2.5 原子力电子显微镜(AFM)

采用原子力显微镜观测膜材料表面的微观微结构(形貌)。将膜材料剪切成边长 5 mm 的正方形,用双面胶固定于载物台上,安置在探测针下方,选用轻敲模式(Tapping Mode)成像。图像的扫描范围为 10×10 μm,使用 Digital Nanoscope 软件分析 AFM 图片。选取代表性的表面形态及 3D 图像,计算得出膜样品的粗糙度(RMS)。

1.2.6 机械性能的测定

采用 ASTM 方法测定膜材料机械性能。取膜样品均匀、无气泡破损部分切割成 2.5 cm×8 cm 的长方形条状。在 50%相对湿度下平衡 48 h 后,采用 INSTRON

5565 万能材料试验机测定膜材料的力学性能。拉伸速率：50 mm/min，初始探头间隔距离：50 mm。记录断裂拉伸力及拉伸长度，取至少 8 次测试值计算平均值与标准偏差。根据 ASTM-882 方法计算力学（拉伸）性能参数^[6]。

1.2.7 水汽透过系数 (WVP)

采用 TSY-TIH 透湿性测试仪测定膜材料的水汽透过率^[7]。测试条件：测试温度 37 °C；预热时间：2 h；测试时间：3 h。WVP 值可用下列公式计算得到。

$$WVP = \frac{\Delta m \times d}{A \times \Delta t \times \Delta p}$$

式中：Δm，实验前后质量差 (kg)；d，膜材料厚度 (m)；A，膜材料面积 (m²)；Δt，实验测试时间 (s)；Δp，膜材料上、下表面间气压差 (Pa)。

1.2.8 氧气透过系数 (OP)

采用的是压差法，压差法的测试原理是用待测薄膜将测试腔隔成两个独立的空间，向其中一侧（高压室）充入测试气体，在试样两侧形成一定的压差，高压室的气体透过薄膜渗透到低压室，通过测量低压室的压力或体积变化就可以得出气体的透气量与渗透系数。本实验的具体操作方法步骤如下：用特定的裁纸刀裁取直径为 95 mm 的圆形薄膜，在一起放置样品处边缘涂上一层真空脂，将裁好的样品膜置于仪器中，拧好密封盖，调整好系统参数后开始抽真空（8 h）后开始测量。

1.2.9 抗菌性能的测定

1.2.9.1 菌种活化和细胞悬液的制备方法

利用营养肉汤培养基培养大肠杆菌 (*E.coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*)。取一定量的培养基加入蒸馏水搅拌均匀，充分溶解，调节 pH 至 7.4，利用高压灭菌锅灭菌。取 -40 °C 冷冻保藏的菌种活化两次，然后选取单菌落菌种放置营养肉汤液体培养基，在 37 °C 左右培养 8 h，平板计数后放于 4 °C 冰箱备用。使用前利用计数用无菌去离子水稀释至浓度为 10⁶ CPF/mL。以上操作均在超净工作台下进行。

1.2.9.2 抑菌活性的检测

利用抑菌圈-纸片法的方法进行抑菌活性的检测^[2]。将配置好的营养肉汤液体培养基（15 mL）倒入平板，冷却凝固。分别从浓度为 10⁶ CPF/mL 的 *B.subtilis* 和 *E.coli* 的菌悬液中取出 100 μL 均匀快速涂抹在培养基表面。将利用打孔机制得的直径为 15 mm 的圆形薄膜对角贴于培养基上，在 37 °C 下培养 24 h。然后测量抑菌圈的大小，每个样品至少测定三次平行。

1.2.10 统计性分析

实验数据用“平均值±标准偏差”表示，不同数据间

的差异显著性选取 $p < 0.05$ ，利用 SPSS (版本号 19.0.0) 进行数据差异显著分析。

2 结果与讨论

2.1 膜材料外观及紫外可见光谱分析

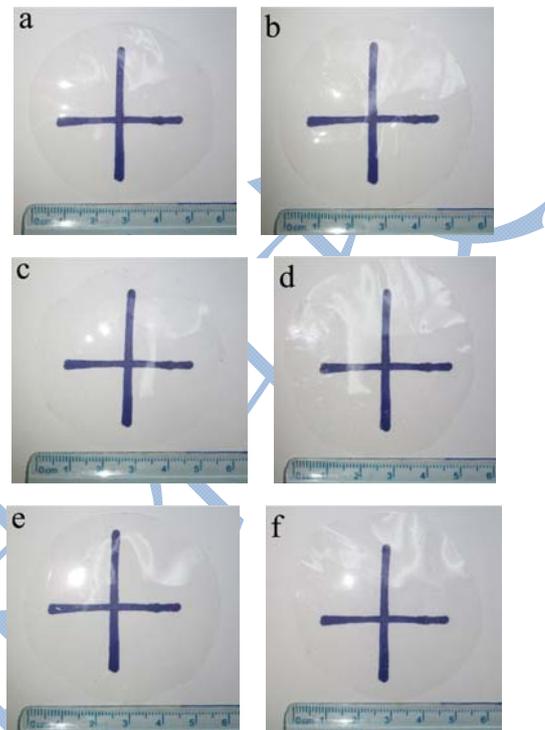


图 1 荷载有机/无机抗菌剂明胶膜材料外观图

Fig.1 Visual appearance gelatin film formulated with antimicrobials

注：a~f，膜材料 A~F。膜材料 A~F 具体成分见于表 1。

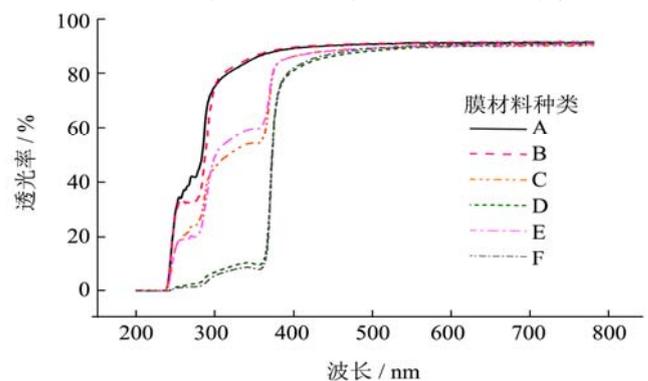


图 2 荷载有机/无机抗菌剂明胶膜材料的紫外-可见光光谱

Fig.2 UV-vis spectra of gelatin films formulated with antimicrobials

注：膜材料 A~F 具体成分见于表 1。

膜材料的透明度直接影响被包装食品的外观。图 1 表明，荷载溶菌酶、荷载纳米氧化锌及同时荷载两种抗菌剂的膜材料与对照明胶膜具有相似的透明外观，表明添加溶菌酶和氧化纳米锌不影响明胶膜材料

的外观。另外，计算膜材料的不透明度值（在 600 nm）显示抗菌材料的不透明值之间差异不显著。膜材料的紫外吸收能力对光敏感食品的保护至关重要。植物蛋白（如豆类蛋白）富含芳香族氨基酸，在紫外光区域有强吸收^[9]。然而，由于明胶分子中这类氨基酸含量较低，明胶膜材料紫外吸收较弱^[10]。值得注意的是，而负载纳米氧化锌的膜材料在 350 nm 以内的紫外区域具有明显的吸收，透光率急剧下降，且具有计量效应（图 2）。荷载溶菌酶膜材料在紫外吸收略有增加。可见光区域的透光率不依赖于抗菌剂种类及添加量，样品之间是相似的，均超过 90%，与膜材料均具有透明外观的实验结果是一致的（图 1）。

2.2 膜材料表面微结构分析

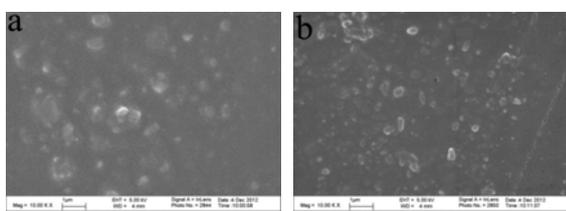


图 3 荷载有机/无机抗菌剂明胶膜材料的 SEM 图

Fig.3 Surface morphology for different gelatin films obtained by SEM

注：a，膜材料 E；b，膜材料 F。膜材料 E、F 具体成分见于表 1。

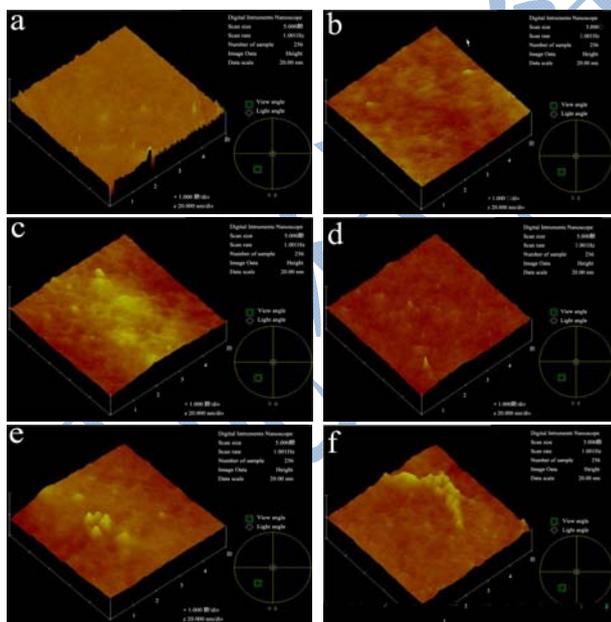


图 4 荷载有机/无机抗菌剂明胶膜材料的 AFM 图

Fig.4 AFM images of different gelatin film

注：a~f，膜材料 A~F。膜材料 A~F 具体成分见于表 1。

膜材料的微观结构决定其宏观物理性质。实验所采用的氧化锌颗粒粒径小于 100 nm，平均粒径小于 40nm (sigma)。扫描电镜图表明，氧化锌纳米颗粒镶

嵌在明胶基质中，存在一定程度的聚集现象。在较低浓度情况下（图 3a），膜基质中出现 500 纳米左右的团聚体；在高浓度情况下，纳米颗粒出现结晶析出现象（图 3b）。

图 4 是抗菌膜材料表面 3D 原子力显微镜图，计算得到根号平均粗糙度 (Rms) 和平均粗糙度 (Ra) (表 2)。Ra，测量范围内波峰与波谷的平均值，反映了材料表面的粗糙程度，其值约小，（膜表面越平整）。对照及添加溶菌酶的膜材料表面均匀，没有明显的突起，粗糙度参数值较低；添加纳米氧化锌膜材料出现凹凸不平，粗糙度参数 (Rms, Ra) 均有增加（表 2）。因此，少量纳米氧化锌的晶体分布在蛋白膜表面。

表 2 荷载有机/无机抗菌剂明胶膜材料的表面粗糙度
Table 2 Surface roughness parameters obtained from AFM analysis of gelatin films

膜材料	Img.Rms/nm	Img.Ra/nm
A	1.891 ± 0.152 ^d	1.203 ± 0.092 ^d
B	1.494 ± 0.081 ^e	1.021 ± 0.100 ^d
C	2.792 ± 0.112 ^c	2.462 ± 0.274 ^{bc}
D	2.501 ± 0.313 ^c	2.112 ± 0.341 ^c
E	3.789 ± 0.273 ^b	2.881 ± 0.229 ^b
F	4.213 ± 0.314 ^a	3.223 ± 0.241 ^a

注：上表 a~e 代表相同列之间有显著差异 (p<0.05)。

同时荷载溶菌酶和纳米氧化锌改变膜材料的表面微结构，呈现出更为异质结构，表面变得粗糙。如在相同浓度的 C 与 E 样品(0.5%纳米氧化锌)和 D 与 F 样品(1%纳米氧化锌)相比，伴随溶菌酶添加，其 Rms 值分别从 2.794、2.501 增加到 3.789、4.213。这个结果可能是由于纳米氧化锌晶与溶菌酶蛋白分子在成膜过程中的相互作用，在膜材料基质中形成团聚体，进而会影响膜材料物理性能，如阻隔性能。

2.3 机械性能

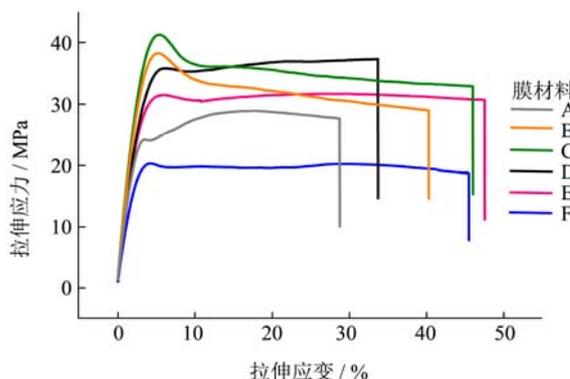


图 5 含不同抗菌剂明胶的的应力应变曲线

Fig. 5 Representative stress-strain curves of different gelatin film

表3 膜的机械性能

Table 3 Tensile properties of different gelatin film

膜材料	EM/Mpa	TS/Mpa	EAB/%
A	1143.43 ± 61.72	30.29 ± 1.17	27.50 ± 4.76
B	1217.26 ± 95.79	35.23 ± 3.79	38.75 ± 10.73
C	1251.28 ± 91.64	36.98 ± 3.08	49.20 ± 5.62
D	1193.62 ± 174.19	33.25 ± 5.90	36.01 ± 6.97
E	1101.87 ± 193.88	34.03 ± 2.43	41.03 ± 14.07
F	1134.32 ± 103.54	29.89 ± 4.19	43.51 ± 10.11

注: EM, 弹性模量 (%); TS, 抗拉强度 (MPa); EAB, 断裂伸长率 (%).

从表3中, 可以看到添加溶菌酶和纳米氧化锌均提升明胶蛋白膜的机械性能。TS值从30.29 MPa分别提升到35.23 MPa和36.98 MPa; EAB值呈现相同的趋势, 从27.50%分别增加至38.75%和49.20%。拉伸实验的结构表明这两种水溶性的抗菌剂并没有破坏明胶膜的网络结构, 反而强化了明胶膜材料的结构。但是, 荷载1%纳米氧化锌膜材料的TS值较0.5%纳米氧化锌略有下降, 这可能与氧化锌纳米颗粒团聚及结晶析出有关, 致使蛋白网络结构松散。Zhou等指出, 当在乳清分离蛋白膜中添加不同比例TiO₂时发现膜材料机械性有不同的响应, 当TiO₂小于1% (wt%), 其蛋白膜TS值域EAB值都有所上升, 而超过1%时机械性能下降^[11]。Shi等研究ZnO-WPI膜材料时, 报道类似的结论^[12]。荷载复合抗菌剂膜与单一抗菌膜的机械性能相比, 抗拉强度有所降低, 这可能因为随着溶菌酶的加入, 纳米氧化晶体性粘附在其分子, 团聚在一起, 从而使膜材料的网络结构变的松弛, 使到机

械性能下降。扫描电镜图显示添加1%纳米氧化锌时, 膜材料表明出现纳米颗粒出现结晶析出现象; 原子力(AFM)图显示在膜材料表明出现明显的突起。因此添加高计量纳米氧化锌可能破坏膜材料的结构完整性, 弱化其抗拉强度(表3)。

2.4 阻隔性能

阻隔性能是包装膜材料的重要性能之一; 环境当中的气体, 如水汽、氧气、二氧化碳将直接影响包装食品的保质时间, 水汽会增加食品内部的水分活度, 对于一些需要控制水分活度如淀粉类的食品, 就会有助于微生物的生长。氧气会使食品的成分发生氧化、分解, 从而失去了原有的风味与口感。本文选择测试的是水汽和氧气的透过性能, 分别用水汽透过系数(WVP)与氧气透过系数(OP)进行表征, 其值越低表示阻隔性能越好。

表4是本实验的WVP值与OP值的统计。明胶膜的水汽透过系数是2.01, 添加1%溶菌酶使蛋白膜的WVP上升至2.31, 而0.5%和1%纳米氧化锌则分别将蛋白膜降至1.92和1.72, 降幅达15%。组成膜材料的生物大分子的亲水/疏水性决定材料的水汽阻隔性能。水分在透过亲水明胶蛋白膜基质时极易破坏网络结构中的氢键, 快速通过。溶菌酶是一类亲水蛋白, 荷载溶菌酶后膜材料的阻水性略有下降(表4)。纳米氧化锌以金属晶体镶嵌在膜基质, 起到阻隔水分子通过的屏障作用, 即水分子不能够透过纳米金属氧化锌, 产生一定的迂回效应, 增大了水分子扩散透过膜材料的途径, 进而水汽阻隔能力得到提升。但是同时添加

表4 抗菌膜的水汽透过率(WVP)及氧气透过率(OP)

Table 4 Water vapor permeability (WVP) and oxygen permeability (OP) of different gelatin films formulated with antimicrobials

样品	Thickness/ μm	WVP/ $(\times 10^{10} \text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1})$	OP/ $(\text{cm}^3 \cdot \text{cm}/\text{cm}^3 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$
A	76.89 ± 1.90	2.01 ± 0.08 ^b	1.11 ± 0.10 × 10 ^{-15ab}
B	75.35 ± 3.21	2.31 ± 0.04 ^a	0.90 ± 0.18 × 10 ^{-15b}
C	76.83 ± 2.78	1.92 ± 0.12 ^b	1.30 ± 0.17 × 10 ^{-15a}
D	70.88 ± 3.43	1.72 ± 0.07 ^c	0.95 ± 0.15 × 10 ^{-15b}
E	75.11 ± 4.32	2.39 ± 0.04 ^a	1.28 ± 0.25 × 10 ^{-15a}
F	77.37 ± 2.19	2.12 ± 0.07 ^b	1.33 ± 0.19 × 10 ^{-15a}

注: 上表a-e代表相同列之间有显著差异($p < 0.05$)。

溶菌酶-纳米氧化锌时, 复合膜材料的WVP较单一添加氧化纳米锌和蛋白膜有所上升(表4)。从AFM和SEM实验结果可以推断同时荷载溶菌酶和纳米氧化锌时, 两者间会发生相互作用形成团聚体而改变膜材料的表面微结构以及膜材料内部的三维网络结构, 从而膜材料结构完整性。扫描电镜图显示添加1%纳米氧化锌时, 膜材料表明出现纳米颗粒出现结晶析出现

象也反映纳米氧化锌与明胶基质是不完全兼容的。

在氧气阻隔方面, 其规律跟水汽阻隔恰恰相反, 可以看到溶菌酶的添加使到蛋白膜的OP有所下降, 而添加0.5%纳米氧化锌与1%纳米氧化锌对阻氧气的影响则不相同, 前者使蛋白膜的阻氧气性能下降, 后者则上升; 当两种抗菌剂复合添加时, 则OP值下降。影响氧气与水汽通过率并不相同, 大量氢键的是阻碍

氧气的通过的,而且因为氧气分子比水汽分子小得多,因此膜的网络结构的轻微改变,都对氧气阻隔性能有影响。溶菌酶和氧化锌晶体的存在,使蛋白膜的网络结构发生不同程度的改变。

2.5 材料抗菌性能

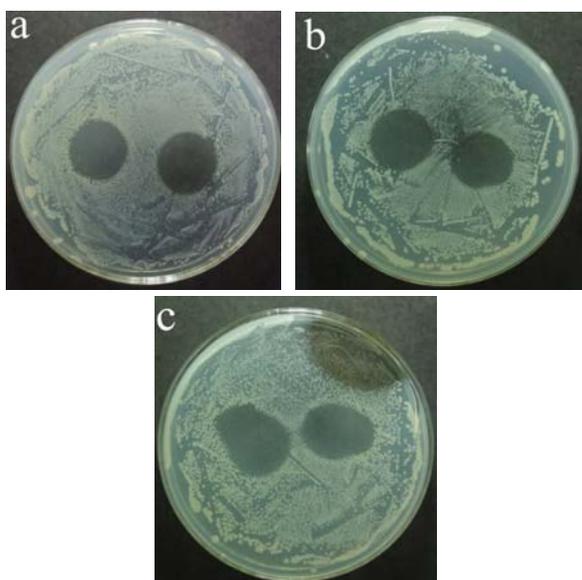


图6 大肠杆菌抑菌圈大小图

Fig. 6 Inhibition zone test results of the films against *E. coli*

注: a, 膜材料 C; b, 膜材料 E; c, 膜材料 F。膜材料 C、

E、F 具体成分见于表 1。

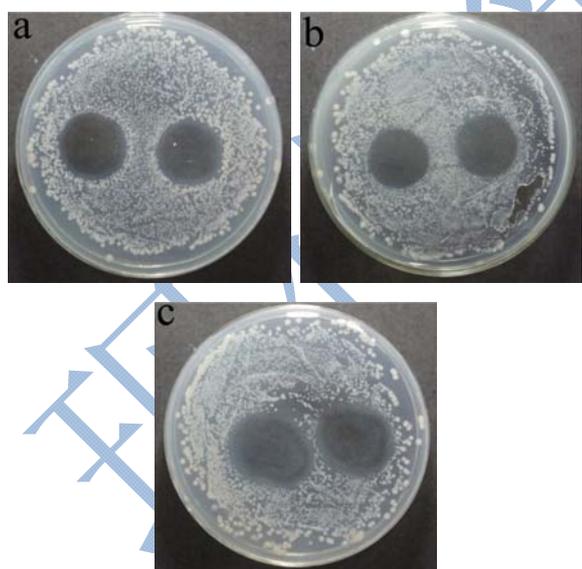


图7 枯草芽孢杆菌抑菌圈图

Fig.7 Inhibition zone test results of the films against *B. subtilis*

注: a, 膜材料 B; b, 膜材料 C; c, 膜材料 F。膜材料 B、

C、F 具体成分见于表 1。

采用膜片法测试材料的抗菌性能,抑菌圈直径大小用十字测量法得到。图 6 和图 7 分别是大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌实验结果,抑菌圈直径大小统计

可见在表 5。大肠杆菌作为革兰氏阴菌,其细胞壁只含有少量的肽聚糖,因此溶菌酶对大肠杆菌并没起到抗菌作用。氧化锌可以产生活性氧化物 ROS,另外作为金属离子,使蛋白质改性,使细胞膜通透性改变,具有良好的广谱性。因此添加 0.5%和 1%的纳米氧化锌都具有一定对大肠杆菌有一定的抗菌效果,值得注意的是当溶菌酶与纳米氧化锌复合添加较单一添加纳米氧化锌,抑菌圈从 1.72 cm 和 2.00 cm 分别增加到 1.91 cm 和 2.23 cm。随着 1%溶菌酶的添加,抑菌圈直径增幅超 10%。这种协同抗菌作用得益于两种抗菌剂的不同抗菌机理,并且有部分氧化锌晶体粘附在溶菌酶上,使到溶菌酶即使不能破坏整个大肠杆菌细胞,也能让氧化锌快速地到达细胞膜上,达到出更好的抑菌效果。

表 5 膜材料抑菌圈直径

Table 5 Inhibition zone test results of the films

样品	抑菌圈直径/cm	
	大肠杆菌(<i>E.coli</i>)	枯草杆菌 (<i>B.subtilis</i>)
A	-	-
B	-	2.24 ± 0.10 ^e
C	1.72 ± 0.09 ^c	2.07 ± 0.13 ^d
D	2.00 ± 0.08 ^b	2.19 ± 0.15 ^c
E	1.91 ± 0.11 ^b	2.39 ± 0.17 ^b
F	2.23 ± 0.12 ^a	2.54 ± 0.09 ^a

注: 上表 a~e 代表相同列之间有显著差异 ($p < 0.05$)。

在对枯草芽孢杆菌的抑菌实验中也呈现出与大肠杆菌相同的规律,由于枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,细胞壁主要是肽聚糖。溶菌酶对其起到明显的抑菌作用。因此相同抗菌成分的蛋白膜,都表现出比大肠杆菌都好的抗菌效果,复合抗菌剂膜较单一抗菌剂膜对枯草芽孢杆菌的抗菌效果都有显著的提升。Emamifar^[13]等,利用 Ag 和 ZnO 复合抗菌研究中,发现对果汁起到较单一抗菌剂起到更好地抗菌作用; Rohani^[14]等研究乳酸链球菌素(nisin)与大蒜精油对单增李斯特菌有很好协调抗菌作用。还有很多研究表明有机抗菌剂与有机抗菌剂、无机抗菌剂与无机抗菌剂复合使用,有显著增强抗菌效果的作用,但是极少有报道是天然抗菌剂与无机金属纳米颗粒抗菌剂的复合使用的。

3 结论

本研究利用明胶基质同时包埋有机/无机抗菌剂,企图实现抗菌剂的协同增效,扩大其抗菌谱,并系统研究抗菌材料表面结构、机械性能与阻隔性能随抗菌剂种类及计量的演变规律,得到以下结论:

3.1 溶菌酶/纳米氧化锌-明胶膜材料具有选择吸光性, 在紫外区域有明显吸收峰, 而在可见光区域具有超过 90%的透光率; 负载溶菌酶/纳米氧化锌改善了明胶膜材料的力学性能。

3.2 溶菌酶/纳米氧化锌具有协同增效, 扩大膜材料的抗菌谱, 相对负载溶菌酶或纳米氧化锌的膜材料, 复合抗菌剂膜对大肠杆菌与枯草芽孢杆菌具有更强的抗菌效果。

3.3 负载溶菌酶或纳米氧化锌不改变明胶膜材料的表面微结构, 蛋白两者在成膜及膜基质中的相互作用形成异质的膜表面, 并影响蛋白网络结构, 弱化膜材料的水汽及氧气阻隔性能。

参考文献

- [1] Ma W, Tang C H, Yin S W, et al. Genipin-crosslinked gelatin films as controlled releasing carriers of lysozym [J]. Food Research International, 2013, 51(1): 321-324
- [2] Conte A, Buonocore G G, Sinigaglia M, et al. Antimicrobial activity of immobilized lysozyme on plasma-treated polyethylene films [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71: 119-125
- [3] Buonocore GG, Del Nobile MA, Panizza A, et al. Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications [J]. Journal of Food Science, 2003, 68: 1365-1370
- [4] Jones N, Ray B, Ranjit K T, et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 279(1): 71-76
- [5] Tankhiwale R, Bajpai S K. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 90: 16-20
- [6] ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting [S] Standard designation: D882. In Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials
- [7] ASTM. (1995). Standard test methods for water vapor transmission of material [S] Standard designation E 96-95. In Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials
- [8] ASTM. (2009). Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Standard designation D1434[S] In Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials
- [9] Ma W, Tang CH, Yang XQ et al. Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate/chitosan composite films at acidic pH [J]. Food Hydrocolloids, 2013: 31237-31247
- [10] Ma W, Tang CH, Yin SW, et al. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 572-579
- [11] Zhou J J, Wang S Y, Gunasekaran S. Preparation and characterization of whey protein film incorporated with TiO₂ nanoparticles [J]. Journal of Food Science, 2009, 74 (7): 50-56
- [12] Shi L, Zhou J, Gunasekaran S. Low temperature fabrication of ZnO-whey protein isolate nanocomposite [J]. Materials Letters, 2008, 62(28): 4383-4385
- [13] Emamifar A, Kadivar M, Shahedi M. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange juice [J]. Food Control, 2011, 22: 408-413
- [14] Rohani SMR, Moradi M, Mehdizadeh T. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44: 2260-2265