

负载小麦醇溶蛋白纳米银胶体颗粒的 抗菌壳聚糖复合膜构建及表征

鄢俐¹, 古丽容², 赖富饶¹, 尹寿伟^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广东金友米业股份有限公司, 广东韶关 512000)

摘要: 本研究采用浇筑法, 成功构建了 Ag NPs/小麦醇溶蛋白/壳聚糖复合抗菌膜, 实现了 Ag NPs 的稳态化和协同增效。自组装的小麦醇溶蛋白 (gliadin), 同时充当 Ag NPs 的螯合剂和稳定剂, 有效抑制了纳米银颗粒 (Ag NPs) 团聚。与其他复合膜相比, gliadin/AgNPs 复合膜透明度良好。SEM 和 EDS 证实 Ag NPs 均匀分布于复合膜。此外, gliadin/AgNPs 复合颗粒具有优异的缓释特性。人皮肤成纤维细胞评估结果表明复合膜具有更好的生物相容性, 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 显示 gliadin/AgNPs 复合膜对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌具有更强的抗菌效果。这些薄膜在抗菌食品包装材料、伤口敷料以及植入物的开发方面极具应用价值。

关键词: 壳聚糖; 小麦醇溶蛋白/纳米银颗粒; 生物相容性; 抗菌性

文章编号: 1673-9078(2020)01-106-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.015

Development and Characterization of Antibacterial Chitosan Composite Films Incorporated with Gliadin-coated AgNPs

YAN Li¹, GU Li-rong², LAI Fu-rao¹, YIN Shou-wei^{1,2}

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Jinyou Rice Co. Ltd., Shaoguan 512000, China)

Abstract: In this work, the Ag nanoparticles / gliadin / chitosan composite antimicrobial films were successfully constructed using the cast method to achieve the stabilization and synergistic effect of Ag nanoparticles (AgNPs). Self-assembled gliadin colloidal particles acted as both chelator and stabilizer of AgNPs, effectively inhibited the aggregation of AgNPs. As compared with other films, gliadin /AgNPs composite films possessed excellent transparency. SEM and EDS confirmed that AgNPs were evenly distributed on the composite film. Moreover, gliadin /AgNPs composite films had excellent sustained-release properties. Human skin fibroblast evaluation results showed that the composite films have better biocompatibility. More important, confocal laser scanning microscope (CLSM) revealed that the gliadin /AgNPs composite films possessed stronger antibacterial effect on *E. coli* and *S. aureus*. These films are of great value in the development of antibacterial food packaging materials, wound dressings and implants.

Key words: chitosan; gliadin/AgNPs; biocompatibility; antibacterial activity

我国疾病预防控制中心的监控数据表明我国爆发食源性疾病的主因就是致病菌的污染。因此, 人们非常重视食品加工、运输、储藏过程中的致病菌污染和食品安全问题。而在此过程中, 包装材料的抗菌性往往对食品安全有着很大的影响^[1]。目前, 我国的食物包装材料大多为 PE 和 PP 等材料制成, 这些传统的包装材料成本低、轻便、无毒, 但是无法生物降, 造成白色

收稿日期: 2019-9-28

基金项目: 广东省科技创新战略专项 (大专项+“任务清单”管理模式) 项目 (粤财教[2018]157号)

作者简介: 鄢俐 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品包装材料

通讯作者: 尹寿伟 (1980-), 男, 副教授, 研究方向: 食品级 Pickering 乳液

污染。所以, 开发抗菌生物降解的包装材料及拓展其应用已成为食品领域研究和关注的焦点^[2,3]。

壳聚糖是一种可降解、可生物相容的聚合物, 具有优异的成膜性能。与其他聚合物相比, 它具有抗菌活性^[4], 这使得它在包装领域具有广阔的前景^[5]。早前有通过内化抗微生物溶菌酶和百里香酚来开发壳聚糖膜作为抗菌材料的报道^[6,7]。与这些基于生物活性物质的抗菌剂相比, 嵌入纳米银复合颗粒可以提供独特的优点, 例如高效率和低挥发性。本研究利用壳聚糖包埋 gliadin/AgNPs 复合抗菌剂, 企图发挥纳米银抗菌剂的高效稳定性和壳聚糖膜的生物相容效应。纳米银颗粒 (AgNPs) 具有抗菌活性强、广谱性、无耐药性、安全等优点^[8]。因此, 目前关于荷载纳米银的抗菌材

料及抗菌包装的研究很多；但是纳米银颗粒容易聚集氧化，从而降低甚至丧失抗菌性能。而大量研究表明，生物大分子与纳米银结合既能维持传统纳米银颗粒的基本性能，也能避免其缺点，进而增强其稳定性^[9,10]。小麦醇溶蛋白(gliadin)独特的两亲性使其在反溶剂过程中能发生自组装作用，可以更好的稳定和分散纳米银颗粒^[11,12]。此外，小麦醇溶蛋白来源广泛，价格便宜，可再生，具有良好的生物降解性和生物相容性等优点。鼠尾草酸是强抗氧化剂可以绿色还原纳米银颗粒，且能与纳米银颗粒协同抗菌。目前，关于以鼠尾草酸绿色还原纳米银，且以 gliadin/AgNPs 复合颗粒为抗菌剂并用壳聚糖为膜基材的研究尚未见报道。本文题选用可生物相容、可降解的壳聚糖为基材，将 gliadin/AgNPs 复合颗粒包埋在壳聚糖基质中，研究复合膜的细胞相容性和抗菌作用，并系统研究抗菌材料外观形貌、结构性质、银累计释放量，为抗菌包装材料的构建提供一种新思路。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

鼠尾草酸、硝酸银、氢氧化钠、盐酸、冰醋酸和甘油，国药试剂化学有限公司；无水乙醇，南京试剂化学有限公司；大肠杆菌 ATCC 8739 和金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，广东省微生物培养中心；壳聚糖，美国 sigma-aldrich 公司；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

FA1004 分析天平，上海精科仪器有限公司；CR22G 冷冻离心机，日本 HITACHI 公司；RV10 旋转蒸发仪，德国 IKA 公司；RW2 电子搅拌器，德国 IKA 公司；S210 精密 pH 计，梅特勒-托利多仪器有限公司；LEO 1530VP 场发射扫描电子显微镜，德国 ZEISS 公司；UV-C40 紫外分光光度计，德国 IMPLLEN 公司；LHS 精密恒温恒湿箱，上海一恒科技有限公司；TCS-SP5 激光共聚焦显微镜，德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦醇溶蛋白的制备

小麦醇溶蛋白的提取是根据 Duclairoir 等^[13]的方法，稍加改动。以市购谷朊粉为原料，称 100 g 取谷朊粉置于 2000 mL 烧杯中，加入 70% 的乙醇 1000 mL，在室温下搅拌 2 h，8000 r/min 条件下离心 20 min，取

上清液透析 3 d。第一天用蒸馏水透析，第二天用 0.5% 的冰乙酸透析，第三天用蒸馏水透析。透析过程完成后，取清液冷冻干燥。干燥粉末即小麦醇溶蛋白，待用。

1.2.2 小麦醇溶蛋白/纳米银 (gliadin/AgNPs) 复合颗粒的制备

利用液相还原法，制备壳-核结构小麦醇溶蛋白/纳米银复合颗粒 (gliadin/AgNPs)。将小麦醇溶蛋白加入到 70% (W/V) 的乙醇溶液中得到 0.5% (W/V) 的小麦醇溶蛋白醇溶液；将硝酸银溶解在水溶液中得到 0.05 mol/L 的硝酸银溶液；将鼠尾草酸溶解在 95% (W/V) 乙醇水溶液中得到 0.5% 的鼠尾草酸溶液。将一定量的硝酸银溶液加入小麦醇溶蛋白溶液中搅拌 10 min。然后将鼠尾草酸溶液按照一定的比例慢慢的倒入硝酸银-小麦醇溶蛋白溶液中，在倒入过程中用电子搅拌器不停的搅拌直至混合均匀，然后在 37 °C 条件下，水浴搅拌反应一段时间，溶液的颜色由无色变为红棕色，直至溶液颜色无变化，自然冷却至室温，然后对小麦醇溶蛋白/纳米银胶体进行反溶剂、旋蒸等一系列操作，最后装在截留分子量 10 ku 的透析袋中透析 24 h。从而制备出小麦醇溶蛋白/纳米银胶体颗粒。

1.2.3 小麦醇溶蛋白/纳米银 (gliadin/AgNPs) 颗粒的壳聚糖复合膜的制备

采用浇铸技术制备荷载小麦醇溶蛋白/纳米银 (gliadin/AgNPs) 颗粒的壳聚糖复合膜。称取 1 g 壳聚糖溶解在 70 mL 1% (V/V) 冰乙酸水溶液中并在室温下搅拌 12 h，10000 r/min 离心 20 min，去除杂质，取上清液。然后，以 10% (V/V) 的比例将 gliadin/AgNPs 胶体颗粒 (Ag 当量 32 μg/mL) 加入到壳聚糖水溶液中，室温下搅拌 30 min。再加入 20% 的甘油，继续搅拌 30 min。最后，将成膜液置于超声机中超声 30 min 后倒入 18×21 cm 的聚苯乙烯板上浇铸成膜，在 (50 °C, 50% RH 下干燥) 恒温恒湿箱中干燥 48 h 成膜。将膜材料在 (硝酸镁饱和溶液, 58% RH) 干燥器平衡两天以上备用。

1.2.4 复合膜的外观观察

用相机对制备好的复合膜的外观进行拍照观察。

1.2.5 复合膜的紫外-可见光谱分析

将复合膜片材料剪切成 1×4 cm² 的片块，然后紧贴于石英比色皿的内壁，从 200 nm 至 800 nm，以 100 nm/min 速度进行全波长扫描。

1.2.6 复合膜的红外光谱分析

将复合膜片 (1×4 cm²) 放置在玛瑙钵中，加入 KBr 粉末，压成片状，进行波长扫描，扫描频率为 400~4000 cm⁻¹。

1.2.7 复合膜的扫描电子显微镜 (SEM) 和元素分析 (EDS)

将膜用双面胶固定在样品台表面, 然后用喷金仪在样品表面镀金, 镀金时间 150 s。取出样品, 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。

根据扫描电镜 (TE-SEM) 截取一部分膜的图像, 然后根据 EDS 分析膜中银元素的分布。

1.2.8 复合膜中银的累计释放量的测定

复合膜中银的累计释放量是通过 ICP-MS 分析来衡量, 其方法是根据 Tong^[14]等的研究稍作修改。将复合膜裁剪成 $1 \times 1 \text{ cm}^2$, 然后放置在含有 40 mL 的 pH=7 0.01 mol/mL PBS 溶液的烧杯中, 并将烧杯密封好放置在摇床中。在规定的时间内收集 1 mL 溶液。

将采集的溶液先用 5% 的稀硝酸溶液稀释至 5 mL, 然后将稀释后的溶液沸水浴 2 h, 硝化后用 ICP-MS 分析复合膜中的银含量。

1.2.9 复合膜的细胞相容性

用人包皮成纤维细胞来评价复合膜的细胞相容性。将细胞保存在 DulbCo 改性 EAG 培养基培养基 (DMEM, ATCC) 中, 其中含有 4 mL 的 L-谷氨酰胺 (ATCC), 4500 mg/L 葡萄糖, 1500 mg/L 碳酸氢钠, 1 mM 丙酮酸钠, 1 份培养基辅以 10% (V/V) 胎牛血清和 10 g 1 mL 潮霉素 B, 在 37 °C, 5% 加湿的加湿环境中。

在融合前, 细胞用胰蛋白酶 EDTA (ATC30-2101, 0.25% (W/V)) 溶液在 Hank 的 BSS 中培养处理 24 h, 密度约为 5.1×10^4 个细胞/孔。24 h 后, 用无菌 PBS 洗涤细胞两次, 将样品 (复合膜在 PBS 中培养 0、7、15 d 的银累计释放液) 放置在孔中, 加入 1 毫升完全生长培养基 (DMEM), 然后 37 °C 孵育细胞 1 d。结束后, 取出生长培养基并用 PBS 洗涤两次, 在 37 °C 下用 500 μL 10% (V/V) AlamarBlue Cell Viability 试剂在 DMEM 中染色 4 h。之后, 用 600 nm 作为参考波长, 在微板读数器中测量 570 nm 处的吸光度。形成的副产物的数量与数量是成正比的。H₂O₂ (500 μM) 作为细胞死亡的阳性对照。三次平行。

1.2.10 复合膜的抑菌活性测定

荧光强度与细胞内 ROS 生成量成正比, ROS 通过细胞氧化应激反应诱导细胞凋亡甚至死亡。而且细菌细胞死后会有一定程度的聚集。取大肠杆菌 ATCC 8739 和金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的一个菌落分别分散并在营养肉汤中于 37 °C 温育 16 h, 用无菌水稀释至 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL 的细菌密度。用打孔器将复合膜裁剪成直径为 6 mm 的膜片并将其放置在 24 孔板中。

向 24 孔板中加入 1 mL 菌悬液 (OD 600=0.01), 然后用恒温箱在 37 °C 条件下培养细菌 24 h。24 h 后, 取出 24 孔板, 用 1 mL pH=6.5 的 0.9% 氯化钠溶液洗涤复合膜片三次, 再用 10 μM DCFDA (2,7-二氯荧光素) 染色 30 min。将准备好的样品放在激光共聚焦显微镜下观测, 样品的测定在室温下进行, 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 550 nm, 狭缝 4 nm。采用 40 \times 和 10 \times 的目镜, 1024 \times 1024 的分辨率进行图像采集。

1.2.11 数据统计与分析

实验中每个实验所得数据均重复三次, 利用 SPSS 22.0 系统对实验所得数据进行显著性分析, 数值表示采用平均值 \pm 标准偏差方法。

2 结果与讨论

2.1 复合膜的外观及紫外-可见光谱分析

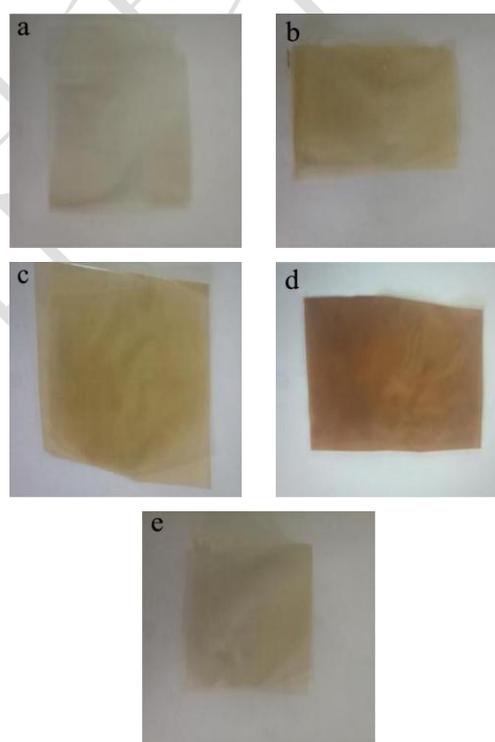


图 1 壳聚糖复合膜的外观图

Fig.1 Visual appearance of the composite chitosan film

注: a、b、c、d、e 分别为壳聚糖膜 (CS)、鼠尾草酸-壳聚糖膜 (CA-CS)、硝酸银-壳聚糖膜 (AgNO₃-CS)、纳米银-壳聚糖膜 (AgNPs-CS)、小麦醇溶蛋白/纳米银-壳聚糖膜 (G/AgNPs-CS)。

食品包装材料的外观取决于膜材料的透明度。图 1 表明, gliadin/AgNPs 复合膜的外观与对照的壳聚糖膜相似, 但是略有微黄色, 表明添加 gliadin/AgNPs 对壳聚糖膜材料的外观影响并不大。由图 2 结果可知壳聚糖膜的紫外吸收值最小, 说明壳聚糖膜的透明度

较好,而 gliadin/AgNPs 复合膜、鼠尾草酸-壳聚糖膜、AgNO₃ 复合膜和 AgNPs 复合膜的不透明度依次增加,颜色为黄色甚至红褐色,此为氧化变色的结果。与 AgNPs 复合膜对比, gliadin/AgNPs 复合膜的透明度好,可能是小麦醇溶蛋白能够稳定纳米银,将其紧紧包裹在壳层内,使其不易氧化变色。值得注意的是, AgNPs 复合膜和 gliadin/AgNPs 复合膜在 420 nm 左右的紫外光谱中的吸收峰较为明显,该吸收峰来自于银原子表面等离子体振动的典型激发。通过紫外-可见光谱由此确定了纳米银颗粒的存在。

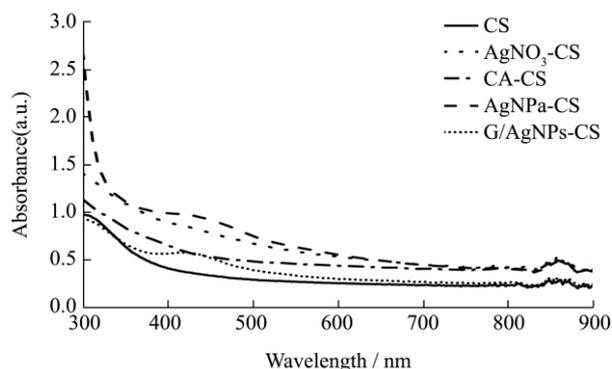


图2 壳聚糖复合膜的紫外光谱图

Fig.2 UV spectrum of the composite chitosan film

2.2 复合膜的红外光谱分析

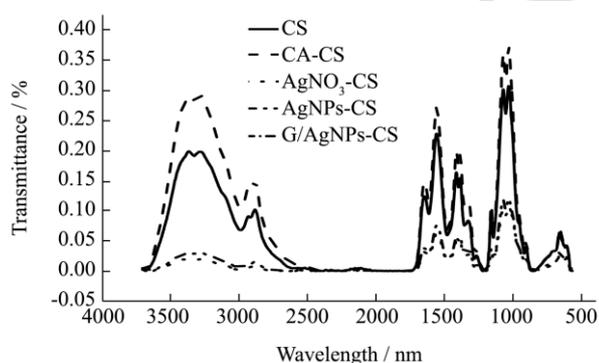


图3 壳聚糖复合膜的红外光谱图

Fig.3 Infrared spectrum of the composite chitosan film

图3是复合膜的红外吸收光谱 (FT-IR)。由图3我们可知,在壳聚糖膜的 FT-IR 曲线中, 897.17 cm⁻¹ 和 1152.77 cm⁻¹ 处的吸收峰是多糖结构的吸收峰, 1091.53 cm⁻¹ 处是 C-C 骨架振动吸收峰, 1653.69 cm⁻¹ 处为 C=O 伸缩振动吸收峰, 除此之外, 2850.33 cm⁻¹ 处出现的较小的尖峰为 -CH₃ 的伸缩振动, 以及 3362.25 cm⁻¹ 处为 O-H 的伸缩振动。而且壳聚糖也具有多糖的 β-构型糖苷键的特征吸收峰, 此吸收峰介于 890~900 cm⁻¹ 之间。从图中可以看出, 样品膜的 FT-IR 曲线与壳聚糖膜振动吸收峰位置基本相同, 这个结果说明这些壳聚糖膜的结晶程度相似。但是含银的样品

膜的峰强变弱,尤其是 gliadin/AgNPs 复合膜在 3362.25 cm⁻¹ O-H 处的伸缩振动峰变得非常平缓。说明可能是壳聚糖和小麦醇溶蛋白产生了作用力,小麦醇溶蛋白中的-OH 与壳聚糖中的 C=O 及 O 之间连接,产生了分子间氢键,从而改变了壳聚糖的基团偶极矩,导致分子的对称性变差,吸收变弱。

2.3 复合膜的电子扫描显微镜 (SEM) 和元素分析 (EDS)

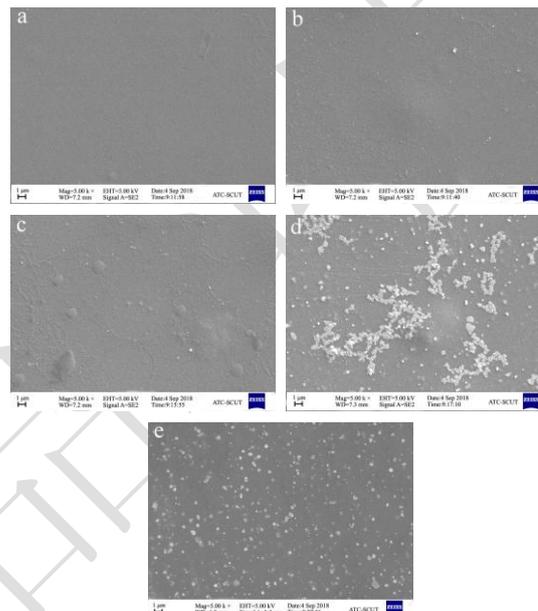


图4 抑菌复合膜的扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron micrograph of the antibacterial composite films

注: a、b、c、d、e 分别为壳聚糖膜 (CS)、鼠尾草酸-壳聚糖膜 (CA-CS)、硝酸银-壳聚糖膜 (AgNO₃-CS)、纳米银-壳聚糖膜 (AgNPs-CS)、小麦醇溶蛋白/纳米银-壳聚糖 (G/AgNPs-CS) 标尺膜 (标尺:1 μm)。

图4显示了代表复合膜表面(近空气侧)的 SEM 形貌特性。图5为分别 AgNPs 复合膜和 gliadin/AgNPs 复合膜的元素分布 (EDS) 图。由图4可知,壳聚糖膜、鼠尾草酸复合膜和 AgNO₃ 复合膜平整光滑。相比之下, AgNPs 复合膜和 gliadin/AgNPs 复合膜由于含有许多纳米银颗粒,平整度降低,且 AgNPs 复合膜里的纳米银颗粒分布不均匀。这可能是因为纳米银颗粒在壳聚糖的成膜过程中,稳定性较低,发生团聚从而形成大颗粒的银团簇。图4e中, gliadin/AgNPs 复合膜在成膜过程中,由于纳米银表面的小麦醇溶蛋白壳层的位阻效应和同种电位排斥效应,纳米银颗粒具有较高的稳定性,不易团聚。FT-IR 结果也表明壳聚糖与小麦醇溶蛋白形成了氢键,能够协同稳定纳米银。纳米银颗粒发挥抗菌作用的关键就是需要避免团聚。

虽然目前的成像过程不允许对膜上的单个纳米银进行认证,但是通过 EDS 分析证明了 gliadin/AgNPs 在膜中能够均匀分布(图 5c、d)。很明显,纳米颗粒可以均匀稳定在壳聚糖复合膜中。而图 5 中 a、b 也证实了 AgNPs 在膜中会发生一定程度的团聚,从而影响复合膜的抑菌效果。

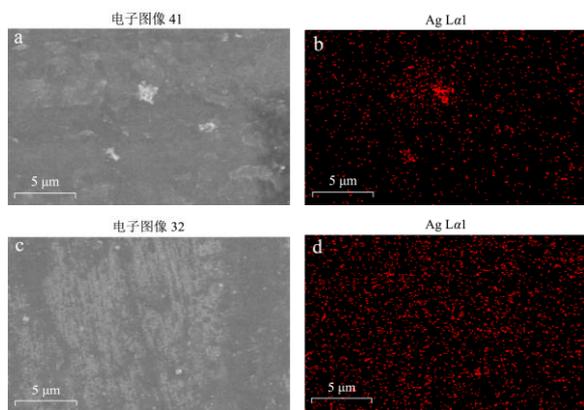


图 5 AgNPs-CS、G/AgNPs-CS 的电子图像和该图像的银元素的分布图

Fig.5 The electronic images and the distribution of the silver elements of AgNPs film and gliadin/AgNPs film

注: a、b 分别为采集的纳米银-壳聚糖膜(AgNPs-CS)的电子图像和该图像的银元素的分布图; c、d 分别为采集的小麦醇溶蛋白/纳米银-壳聚糖膜(G/AgNPs-CS)的电子图像和该图像的银元素的分布图。

2.4 复合膜中银的累计释放量的测定

壳聚糖复合膜的抑菌效果源于其中包埋活性成分的不断释放,本实验用 ICP-MS 测量量化复合膜中银的累计释放量,不同膜的银累积释放量见表 1,银累积释放百分比随时间的变化过程见图 6。结果表明,复合膜的纳米银释放过程明显有快速释放期和缓慢释放期。爆发释放期在 24 h 内,然后持续释放至少一周,最后达到平衡。15 d 后,检测到 AgNPs 复合膜和 gliadin/AgNPs 复合膜的释放量分别为 485×10^{-9} 和 511×10^{-9} 。同时观察到两组膜的释放曲线非常相似,但释放量有明显的差异。早期 AgNPs 复合膜的释放量略高于 gliadin/AgNPs 复合膜,可能是由于小麦醇溶蛋白本身具有稳定纳米银的作用,且壳聚糖与小麦醇溶蛋白之间形成了氢键,能够协同稳定纳米银颗粒,使得复合颗粒中银的溶出需要一定的缓冲,因此壳聚糖和小麦醇溶蛋白可以控制纳米银的释放且小麦醇溶蛋白是控制其释放的主要因素。但是后期 gliadin/AgNPs 膜中银的释放总量略高于纳米银膜。究其原因可能是纳米银不稳定,在膜中团聚形成较大的颗粒,壳聚糖膜中形成的网络结构将其紧紧束缚,从而导致其在长

时间内的溶解出率降低。

表 1 荷载小麦醇溶蛋白/纳米银的壳聚糖膜的银总释放量

Table 1 Total silver release from chitosan membrane loaded with wheat gliadin/nanosilver

天数/d	纳米银/($\times 10^{-9}$)	小麦醇溶蛋白/纳米银膜/($\times 10^{-9}$)
0	4.56 ± 0.59^d	3.18 ± 2.00^e
1	318.74 ± 8.19^a	286.18 ± 6.50^b
3	363.72 ± 7.11^a	356.02 ± 2.46^c
5	419.44 ± 9.02^a	432.85 ± 6.52^b
7	432.01 ± 1.75^c	471.95 ± 4.48^b
9	469.70 ± 0.27^e	496.34 ± 1.80^c
11	476.54 ± 4.09^b	505.63 ± 5.53^b
13	479.66 ± 0.67^d	509.85 ± 2.03^c
15	485.79 ± 1.54^c	511.04 ± 9.21^a

注: a、b、c、d、e 表示不同物质之间的显著性差异 ($p < 0.05$)。

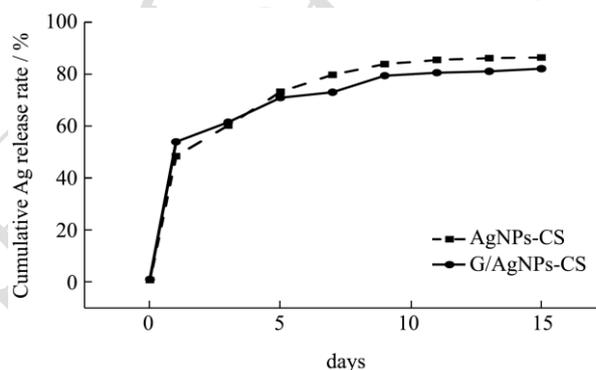


图 6 荷载纳米银和小麦醇溶蛋白/纳米银的壳聚糖膜的银总释放率

Fig.6 Total silver release rate of chitosan membrane loaded with nanosilver and wheat gliadin/nanosilver

2.5 复合膜的生物相容性

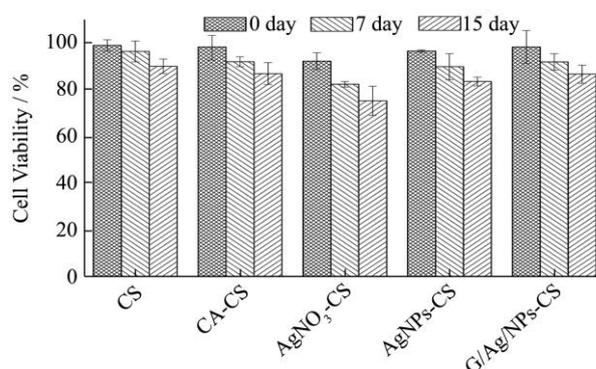


图 7 复合膜的细胞相容性

Fig.7 Viability of cell in the composite films

注: 其中: 壳聚糖膜 (CS); 鼠尾草酸-壳聚糖膜 (CA-CS); 硝酸银-壳聚糖膜 ($\text{AgNO}_3\text{-CS}$); 纳米银-壳聚糖膜 (AgNPs-CS); 小麦醇溶蛋白/纳米银-壳聚糖膜 (G/AgNPs-CS)。

纳米银可用于食品包装及伤口敷料, 是美国食品

和药物管理局批准可用于抗菌的纳米材料之一。然而，随着人类对纳米材料的接触增加及了解愈深，其纳米毒性成为一个越来越令人担忧的问题。纳米银的毒性与其尺寸和形状有关^[15,16]。此外，银离子的生物利用度也是影响纳米银毒素的主要因素^[17,18]。用人皮肤成纤维细胞评估了膜的生物相容性（图7），结果表明细胞的代谢活性随着银含量的增加均有所下降。接触1~2周的样品液后，细胞系仍具有代谢活性，实验组间细胞活力均为80%以上。唯一的例外是AgNO₃复合膜，它也没有引起相当大的细胞毒性，细胞活力下降到应用可接受的水平：7d为80%，15d为75%左右。与AgNPs复合膜相比，gliadin/AgNPs复合膜的细胞毒性明显略低。这可能是小麦醇溶蛋白壳层绿色环保，对细胞具有一定的保护作用，且缓释纳米银颗粒，对其溶出能够起到一定的缓冲作用，从而导致细胞毒性较低。Gliadin/AgNPs复合膜的细胞活力15d后细胞活力85%，而银纳米粒子交联生物共轭的壳聚糖-纤维素复合膜的研究中为80%，gliadin/AgNPs复合膜的细胞毒性明显较小。

2.6 复合膜的抑菌活性测定

抑菌性是决定复合抗菌膜功能的重要指标。本抑菌实验测试的是复合膜的抗菌性能，其抑菌活性通过激光共聚焦显微镜评估。测试菌种选择大肠杆菌与金黄色葡萄球菌。如图8所示，a到e是各样品膜对大肠杆菌的抑菌效果图，f到j是对金黄色葡萄球菌的抑菌效果图。显然，单纯的壳聚糖膜对于这两种细菌均不太敏感，抑菌效果不明显。与其他复合膜相比，图e和j的CLSM图中出现的绿色荧光细菌簇（细菌细胞凋亡后即发生团簇现象）最多且团聚体明显较大，即表明gliadin/AgNPs复合膜的抑菌效果最好。研究

表明：纳米银复合颗粒的比表面积大，与细菌的接触面大^[19]，因此大量的纳米银颗粒吸附在细菌表面，可以使其细胞壁失去通透性，蛋白变质，导致细胞凋亡。另外，由于大肠杆菌作为革兰氏阴性菌，其细胞壁结构分为外内壁层，而金黄色葡萄球菌细胞壁只有一层，纳米银复合颗粒容易穿透金黄色葡萄球菌的细胞壁，导致其死亡。因此，gliadin/AgNPs复合膜对金黄色葡萄球菌的抗菌性较强。

值得注意的是，gliadin/AgNPs复合膜的抑菌效果强于AgNPs复合膜，这是由于纳米银粒子为纳米级，蛋白壳层能够控制纳米银的溶出使其缓释，但对其抑菌性能并无影响。当Ag⁺溶出后，会很容易进入细菌内部并发挥抑菌作用。另外，小麦醇溶蛋白的保护作用，使纳米银粒子保持稳定，不容易团聚氧化。因此，小麦醇溶蛋白在一定程度上能够促进纳米银颗粒抑菌性能的发挥。早期研究表明，壳聚糖和鼠尾草酸都显示出广泛的抗菌活性^[20]。根据图8显示的结果表明由于有部分鼠尾草酸包覆在小麦醇溶蛋白壳层中，鼠尾草酸和AgNPs的抗菌活性可以发挥协同作用，这种协同抗菌得益于两种抗菌材料的不同抗菌机理；并且壳聚糖也能与纳米银复合颗粒协同作用，使到复合颗粒能快速释放到达细胞膜，达到更好的抑菌效果。这与银纳米粒子交联生物共轭的壳聚糖-纤维素复合膜^[21]等研究类似，膜基材与抗菌剂协同作用，提高抑菌效果，但gliadin/AgNPs复合膜的抗菌性和生物相容性更好，应用范围更广。此外，还有很多类似的应用研究，但极少有报道是关于纳米银复合颗粒抗菌膜的应用。本实验利用小麦醇溶蛋白包裹天然抗氧化剂还原得到纳米银并用其制备复合膜材料是一大尝试，能够使其协同抗菌，且达到延长抗菌时间，提高抗菌性能的效果。

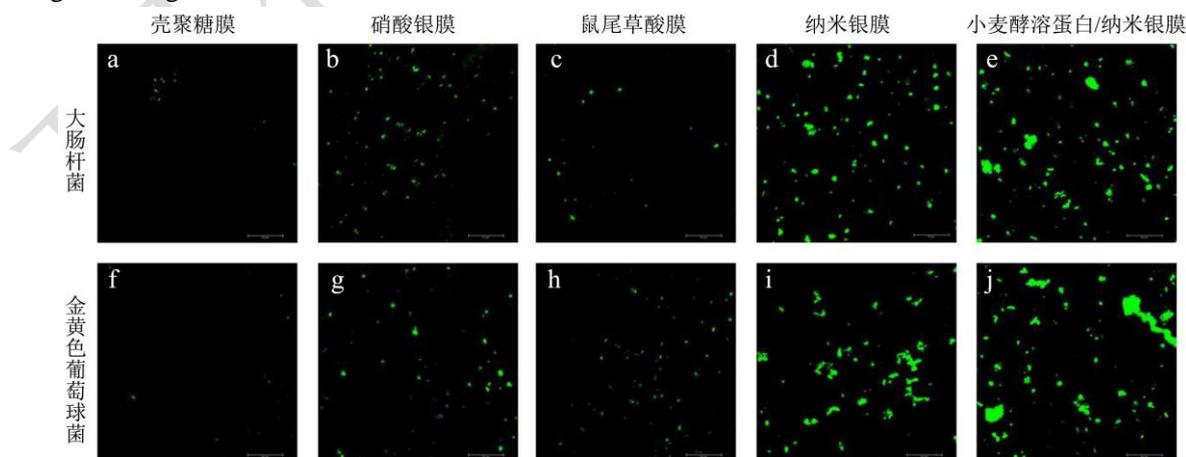


图8 抑菌复合膜的光学显微镜图（标尺：10 μm）

Fig.8 Optical micrograph of the antibacterial composite membrane (scale: 10 μm)

3 结论

本研究采用浇铸法成功构建了 gliadin/AgNPs 复合抗菌膜, 并且系统研究了复合膜的结构特征、外观形貌、银累计释放量、生物相容性及抗菌性。结果表明由于小麦醇溶蛋白与壳聚糖之间产生氢键, 能够协同作用, 因此 gliadin/AgNPs 复合颗粒在膜中呈现均匀分布, 稳定性较强, 且能够在膜中持续缓慢释放, 延长复合膜的抗菌时间。此外, gliadin/AgNPs 复合膜对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌具有更强的抗菌效果, 其细胞相容性也较好。这些特点为进一步应用于食品包装, 抑制有害菌, 降低食品腐败变质发生的风险铺平了道路。

参考文献

- [1] Besten H M W D, Wells-Bennik M H J, Zwietering M H. Natural diversity in heat resistance of bacteria and bacterial spores: impact on food safety and quality [J]. *Review of Food Science and Technology*, 2018, 9(1): 383-410
- [2] Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review [J]. *Dental Materials Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 2015, 31(4): 89-99
- [3] Esmailzadeh H, Khaksar R, Sangpour P, et al. New generation of food packaging based on nanoparticles: A review on mechanism and antimicrobial properties of silver nanoparticles [J]. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 2013, 22(3): 837-844
- [4] Veerasamy R, Xin T Z, Gunasagaran S, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities [J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2011, 15(2): 113-120
- [5] Wu J J, Lee G J, Chen Y S, et al. The synthesis of nano-silver/polypropylene plastics for antibacterial application [J]. *Current Applied Physics*, 2012, 12(9): S89-S95
- [6] Kumar-Krishnan S, Prokhorov E, Hernández-Iturriaga M, et al. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions [J]. *European Polymer Journal*, 2015, 67(1): 242-251
- [7] Murugadoss A, Chattopadhyay A. A 'green' chitosan-silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst [J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(1): 227-229
- [8] Davies R L, Etris S F. The development and functions of silver in water purification and disease control [J]. *Catalysis Today*, 1997, 36(1): 107-114
- [9] Zhang D, Yang H. Synthesis of biomacromolecule-stabilized silver nanoparticles and their surface-enhanced Raman scattering properties [J]. *Applied Physics a Materials Science & Processing*, 2013, 112(3): 739-745
- [10] You C C, Verma A, Rotello V M. Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface [J]. *Soft Matter*, 2006, 2(3): 190-204
- [11] Joye I J, Davidov-Pardo G, Ludescher R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins [J]. *Food Chemistry*, 2015, 185(12): 261-267
- [12] Ezpeleta I, Irache J M, Stainmesse S, et al. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all- trans -retinoic acid [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996, 131(2): 191-200
- [13] Woychik J H, Boundy J A, Dimler R J. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1961, 94(3): 477-482
- [14] Li X, Tu H, Huang M, et al. Incorporation of lysozyme-rectorite composites into chitosan films for antibacterial properties enhancement [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 9(20): 102
- [15] Carlson C, Hussain S M, Schrand A M, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(43): 13608-13619
- [16] El Badawy A M, Silva R G, Morris B, et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(1): 283-287
- [17] Lubick, Naomi. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(23): 8617-8617
- [18] Kim S, Choi J E, Choi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(6): 1080-1084
- [19] Robledo N, Vera P, Lã³pez L, et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes [J]. *Food Chemistry*, 2018, 246(17): 211-219

(下转第 191 页)

现代食品科技