

载 Nisin 壳聚糖淀粉涂布纸的制备与性能分析

Preparation and analysis of nisin-loaded chitosan-starch coated paper

刘丹青¹ 卢立新^{1,2} 方家畅¹

LIU Dan-qing¹ LU Li-xin^{1,2} FANG Jia-chang¹

(1. 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省食品先进制造装备技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Advanced Food Manufacturing Equipment and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:制备一种以天然生物材料为防油抗菌涂层的新型防油抗菌纸,并测试其防油抗菌性能。将防油抗菌剂涂布于纸张表面制备防油抗菌纸,用表面排斥法测试其防油等级,用菌落法计算纸张对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抑制率。结果表明:1 g/100 mL 壳聚糖溶液与 10 g/100 mL 淀粉溶液体积比为 1:2 时,涂布纸张的防油等级达到 8,防油部分成本约为 0.3 元/m²;Nisin 的添加量达到 1 g/100 mL 时,涂布纸张对大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 70.3%, 72.8%。载 Nisin 壳聚糖淀粉涂布纸在保证防油性的同时,较壳聚糖涂布纸有效降低了成本,控制了黏度,且具有比淀粉涂布纸张更好的韧性与平整度,能有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

关键词:壳聚糖;淀粉;乳酸链球菌素;防油抗菌;涂布纸

Abstract: Objective To prepare a new kind of grease resistant -antibacterial paper using natural biological material as grease resistant and antibacterial agents, and to test its grease resistance and antibacterial properties. Methods Grease resistant-antibacterial paper was prepared by coating grease resistant antibacterial agent on paper. The grease resistance grade was tested by surface repellency test. The inhibition rate of coated paper on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was calculated by colony method. Results When the ratio of 1 g/100 mL chitosan to 10 g/100 mL starch was 1:2, the grease resistance grade of coated paper reached 8, the cost was about 0.3 RMB/m²; when the addition amount of Nisin reached 1 g/100 mL, the inhibitory rates of coated paper on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 70.3% and 72.8%, respectively. Conclusion Nisin-loaded chitosan -starch coated paper, while ensuring grease resistance of paper, cost less than chitosan coated paper and has more suitable viscosity than chitosan and starch. It also

has better toughness and flatness than starch coated paper, and can inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* effectively.

Keywords: chitosan; starch; nisin; grease resistance; antibacterial; coated paper

纸质材料作为食品常用包装材料已得到广泛应用。近年来随着即食、快消等食品消费增加,对纸质包装材料的性能要求愈来愈高。脂类食品的油脂浸染纸张后,不仅影响包装的美观性、整洁性、机械性能^[1],而且为细菌提供滋生条件,影响食品包装质量甚至安全。为此,研究、开发具有防油抗菌性能的包装纸成为一种必然趋势。

近年来,天然可再生材料在可食用生物降解薄膜以及食品包装中的应用受到越来越多的关注。基于多糖、蛋白质、脂质的生物聚合物包装材料,比石油基聚合物更加符合环境友好的要求,因此作为抗菌剂、抗氧化剂、着色剂等被广泛用于食品行业^[2],其中壳聚糖与 Nisin 是典型的代表。壳聚糖是一种多糖,从甲壳动物的外壳与真菌细胞壁中提取而来,具有良好的生物相容性、生物降解性与成膜性^[3],并且对细菌有抑制作用,因此得到广泛的研究,但因高成本、高黏度与低阻湿性在一定程度上限制了其在造纸工业中的应用^[4]。Nisin 是由乳酸链球菌合成的一种细菌素,对人体无毒副作用^[5],在酸性条件下活性较高,在中性或碱性条件下失活^[6],在 121 °C 高温条件下也能保持活性,因此适应食品与包装的高温加工过程^[7]。作为抗菌剂使用至今并没有出现大范围的抗性突变^[8],是唯一被许可应用于食品的细菌素。

目前,防油包装纸的制作方法主要分为两类^[9]:①使纸张浸渍涂布防油剂,或是在表面复合塑料薄膜,使其具有防油性。其中浸渍涂布类的主要防油剂为含氟防油剂。传统的含氟防油剂生物积累性较强,对人体有毒性,因此近年来的研究主要集中在通过增加其他物质减少含氟物质使用、降低氟碳链长度、用杂原子修饰氟碳链等方式制造生物毒性低的含氟防油剂,以及开发蛋白质、多糖类天然生物防油剂方面^[10];复合聚合物薄膜类防油纸常用的复合材料有 PE、

基金项目:国家重点研发计划课题(编号:2016YFD0400701)

作者简介:刘丹青,女,江南大学在读本科生。

通信作者:卢立新(1966—),男,江南大学教授,博士生导师,博士。

E-mail: lulx21@126.com

收稿日期:2017-06-05

PVA 等,这类纸塑复合材料废弃后难以分离,回收困难,且塑料层不易降解,会使纸材料失去其环境友好优势。② 通过提高纸浆的打浆度使纸张具有防油性能。该方法下纸张防油性随打浆度增高而有所提升,但由于纤维长度变短,结合紧密程度下降,纸张的撕裂强度与耐破度都会降低。因此该方法在实际生产中的应用具有较大局限性。抗菌纸包装可以通过抑制食品表面细菌生长延长其货架期,同时也可以减少食品防腐剂的使用,更符合食品安全要求。目前通过浆内添加、表面施胶、喷淋、浸渍以及涂布等方式将抗菌成分添加到纸基材料中,使其具有抗菌性能^[11]。抗菌剂主要分为无机抗菌剂、有机抗菌剂与天然生物抗菌剂。其中,无机抗菌剂热稳定性好,具有广谱抑菌性,生物毒性低,但工艺复杂,原料昂贵;有机抗菌剂杀菌效果好、作用产生迅速且成本低,但热稳定性较差,有一定生物毒性^[12],且长时间使用细菌易产生耐药性;天然生物抗菌剂一般具有广谱抑菌性,生物相容性好,但由于其热稳定性差,抑菌效果有限且作用时间短,尚未得到普遍应用。国内对于抗菌纸的研究基本处于实验室研究阶段,离工业化与商业化还有一定距离^[13]。

在此基础上,本试验研制一种以可生物降解的天然高分子材料壳聚糖、淀粉为防油剂,以 Nisin 作为抗菌剂的新型防油抗菌纸,并对其性能进行了测定分析,旨在为含油脂食品提供更加安全、环保的防油抗菌包装材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

- 牛皮纸:120 g/m²,上海凯宁纸业有限公司;
- 壳聚糖(CS):生物试剂,脱乙酰度>95%,阿拉丁生化科技股份有限公司;
- 乳酸链球菌素(Nisin):食品添加剂,南京益生源生物科技有限公司;
- 大肠杆菌 CMCC(B)44102、金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003:上海鲁微科技有限公司;
- 可溶性淀粉、蓖麻油、乙酸、甲苯、正庚烷、NaCl、甘油、戊二醛:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
- 牛肉浸出膏、胰蛋白胨、酵母浸出粉、平板计数琼脂:生物试剂,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

- 涂布辊:60 μm,天津科信精机有限公司;
- 旋转黏度计:NDJ-1 型,上海精密仪器有限公司;
- 扫描电镜:Su1510 型,日本日立公司;
- 垂直层流洁净工作台:HCB-1300V 型,海尔生物医疗有限公司;
- 立式压力蒸汽灭菌锅:LDZM-100G 型,上海申安医疗器械厂;
- 生化培养箱:SPX-150B-Z 型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 防油剂、抗菌剂制备

(1) 可溶性淀粉防油剂制备:向 100 mL 去离子水中加入一定量的可溶性淀粉,在 90 ℃ 水浴中搅拌 30 min,使淀粉

糊化,制成 2,4,6,8,10 g/100 mL 的淀粉溶液,备用。

(2) 壳聚糖防油剂制备:向 100 mL 乙酸与水的混合溶液中(乙酸与水的体积比为 1:20)加入一定量的壳聚糖,用磁力搅拌器在 50 ℃ 条件下搅拌 30 min,使其充分溶解,制成 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 g/100 mL 的壳聚糖溶液,备用。

(3) 复合防油剂制备:将 1 g/100 mL 的壳聚糖溶液与 10 g/100 mL 糊化后的淀粉溶液分别按照 3:1,2:1,1:1,1:2,1:3 的体积比融合,得到壳聚糖与淀粉溶液的不同比例混合溶液。向混合溶液中添加一定量的甘油与戊二醛,在 50 ℃ 水浴中交联 30 min,备用。

(4) 抗菌剂 Nisin 添加:以交联后的混合防油剂(壳聚糖溶液与淀粉溶液体积比为 1:2)为基材,分别向其中加入一定量的 Nisin,并调节 pH 至 4,制成含 0.0,0.1,0.5,1.0,1.5 g/100 mL Nisin 的防油抗菌剂。

1.3.2 纸张涂布 为了保证达到设定的涂布量以及均匀涂布的效果,涂布分 2 次进行。每次取 5 mL 配置好的防油剂,用涂布线棒均匀涂在 20 cm×30 cm 的牛皮纸的毛面,60 ℃ 下烘干 1 min,取出晾干进行第 2 次涂布,之后再次在 60 ℃ 烘干 1 min。在 23 ℃,50%相对湿度条件下处理 24 h,准备进行防油等级测试。

1.3.3 扫描电镜分析 使用电镜对比未涂布牛皮纸,壳聚糖、淀粉以及复合防油剂涂布纸的表面特征。

1.3.4 防油等级测试 采用 GB/T 22805.2—2008 中表面排斥法检测纸张的防油性能。每张样品随机选取 5 点测试,若纸张未产生明显浸润黑斑,则证明达到该防油等级。由于食用油的张力在 0.027~0.033 N/m^[14],因此食品防油纸的防油等级一般要求在 5~8 级。

1.3.5 防油抗菌纸抑菌率测试 将含不同浓度 Nisin 的防油抗菌剂的纸张裁成 3 cm×3 cm 的样品置于试管中,每个试管加入 0.5 mL 菌液与 10 mL 营养肉汤(空白对照中不放置纸张,加入 0.5 mL 无菌水和 10 mL 营养肉汤),39 ℃ 恒温培养 24 h。将加入抗菌纸培养 24 h 的菌液稀释 10⁴,10⁶,10⁸ 倍,各取 0.1 mL 于平板培养基上,用涂布棒涂抹均匀,37 ℃ 恒温培养 24 h,取菌落数量在 30~300 CFU 的培养基进行计数,并用式(1)计算抑菌率。

$$k = \frac{n_2 - n_1}{n_2} \times 100\%, \tag{1}$$

式中:

k ——抑菌率,%;

n_1 ——试验组菌落数,CFU;

n_2 ——对照组菌落数,CFU。

2 结果与讨论

2.1 防油剂浓度对纸张防油等级及溶液黏度的影响

用旋转黏度计测量防油剂黏度,制备的涂布纸张经恒温恒湿处理 24 h 后进行抗油脂性能检测,结果见表 1。

由于食品包装的防油等级要求最低为 5 级,表 1 对防油等级低于 5 级的防油剂类型不予讨论。结果表明,当壳聚糖浓度为 3 g/100 mL 时涂布纸防油等级为 7 级,达到防油要求,此时溶液黏度较高(550 mPa·s)。当淀粉浓度为 6 g/100 mL

表 1 不同防油剂对纸张防油等级及溶液黏度的影响

Table 1 Effect of different grease resistance agents on grease resistance level of coated paper and solution viscosity

防油剂种类	防油等级	溶液黏度/(mPa·s)	壳聚糖涂布量/(g·m ⁻²)	淀粉涂布量/(g·m ⁻²)
3.0 g/100 mL 壳聚糖溶液	7	550	5.00	—
3.5 g/100 mL 壳聚糖溶液	8	850	5.83	—
6.0 g/100 mL 淀粉溶液	6	17	—	10.00
8.0 g/100 mL 淀粉溶液	8	29	—	13.33
10.0 g/100 mL 淀粉溶液	10	39	—	16.67
壳聚糖溶液与淀粉溶液体积比 1:2	8	69	0.56	11.11
壳聚糖溶液与淀粉溶液体积比 1:3	9	67	0.42	12.50

时,涂布纸张的防油等级可以达到 6 级。但由于淀粉中含有不易结晶的支链淀粉,亲水性强^[15],因此成膜性差、易脆裂且几乎没有阻水性^[16],涂布于纸张后则表现为纸张平整性差、发硬发脆、弯折时表面涂层极易开裂。因此淀粉涂布纸不适于加工成纸盒、纸袋等包装。当壳聚糖溶液与淀粉溶液体积比为 1:2 时,涂布纸张的防油等级达到 8 级。此时溶液黏度适中(69 mPa·s),同时涂布纸张的平整度与韧性较好,弥补了淀粉涂布纸皱缩、发硬的缺陷。

壳聚糖、淀粉的市场价分别约为 180,18 元/kg,由此可以估算出 3 g/100 mL 壳聚糖涂布纸、6 g/100 mL 淀粉涂布纸与复合防油剂涂布纸(壳聚糖溶液与淀粉溶液体积比为 1:2)的成本分别约为 0.9,0.18,0.3 元/m²。即复合防油剂在保证涂布纸张防油等级与平整度等性能的前提下,成本较壳聚糖防油剂有了大幅度降低,更适于工业化生产。

2.2 不同防油剂涂布纸张扫描电子显微镜(SEM)分析

SEM 可用来观察和分析纸张和涂层的微观结构,是分析纸张及涂层表面结构的一种简便直观的方式。

由图 1 可知,未涂布纸张表面纤维交错,但布满孔隙,因此油脂极易渗透。涂布 3 g/100 mL 壳聚糖溶液的纸张虽然大部分纤维间隙已被填充,但仍存在较多孔隙,因此在防油测试中常出现点状渗透。而 10 g/100 mL 淀粉溶液涂布纸

在纸张表面形成致密的薄膜,纸张表面已经完全观察不到孔隙且几乎观察不到纤维,因此防油等级高。但由于淀粉膜易脆裂,纸张表面存在许多裂纹,这些缺陷在纸张加工过程中很容易进一步扩大,影响纸张外观、机械性能和防油性能。复合防油剂纸张表面既无孔隙,又无裂纹,整体较为均匀平整,证明了复合防油剂较壳聚糖、淀粉防油剂具有更好的综合性能,更适于涂布加工纸张。

2.3 防油抗菌纸对常见细菌的抑制效果

通过菌落试验发现稀释 10⁸ 倍时培养皿上的菌落个数基本处于 30~300 CFU,适于计数,因此选取稀释 10⁸ 倍的试验组进行菌落计数与抑菌率计算,结果见图 2。

由图 2 可知,防油抗菌纸对金黄色葡萄球菌的抑制率总体高于对大肠杆菌的,但二者差别不大。可能是 Nisin 需要穿透细胞壁到达细胞膜发挥作用。革兰氏阳性菌细胞壁的肽聚糖含量高,阴性菌则相对较少,结构紧密,分子量>

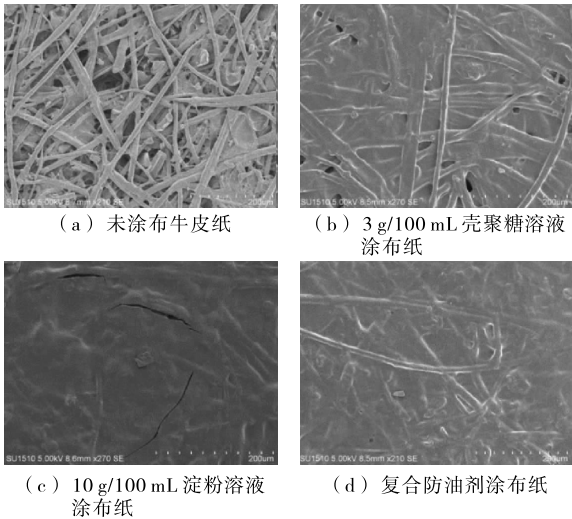


图 1 不同防油剂涂布纸扫描电镜图

Figure 1 SEM picture of grease resistant paper coated by different grease resistant agent

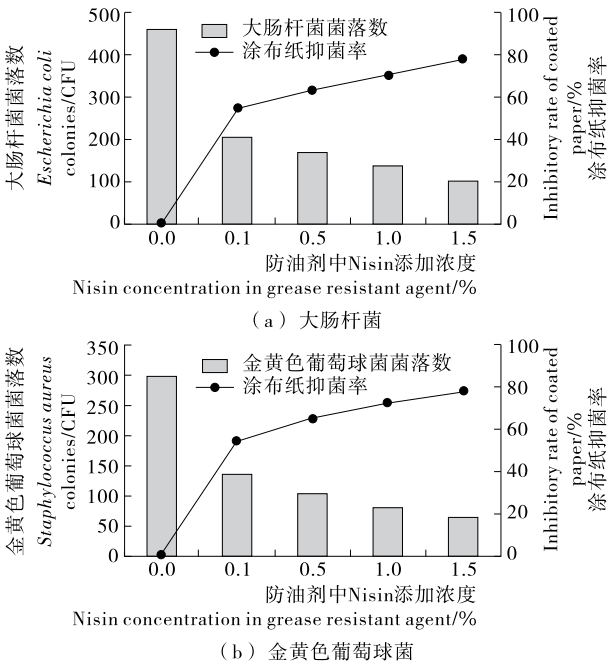


图 2 大肠杆菌与金黄色葡萄球菌菌落计数结果及防油抗菌纸抑菌率

Figure 2 The number of colonies of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the antibacterial rate of coated paper

600 Da 的分子不易通过。Nisin 的分子量约为 3 400 Da,因此更易通过革兰氏阳性菌的细胞壁作用于其细胞膜,从而对革兰氏阳性菌表现出更强烈的抑制作用^[17]。也可能是壳聚糖本身具有广谱抑菌性^[4],因此复合防油抗菌剂涂布纸对典型的革兰氏阴性菌大肠杆菌、革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌均表现出一定的抑制作用。

防油抗菌剂中 Nisin 的添加量达到 1 g/100 mL 时,涂布纸张对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 70.3%,72.8%,均超过 70%,可认为防油抗菌纸能有效抑制大肠杆菌与金黄色葡萄球菌生长^[18]。为了在达到抗菌效果的同时控制成本,防油抗菌剂选择 1 g/100 mL 的 Nisin 添加量。菌落试验中,空白对照组与添加 1 g/100 mL Nisin 的防油抗菌剂涂布纸组菌落数量对比见图 3。

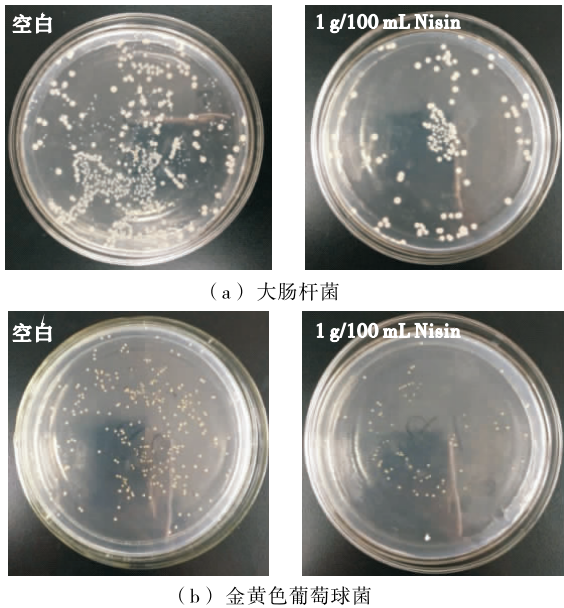


图 3 菌落试验中空白对照组与添加 1 g/100 mL Nisin 的防油抗菌剂涂布纸组菌落数量对比

Figure 3 Comparison of the number of colony in the blank control group and the 1 g/100 mL Nisin coated paper group

2.4 防油抗菌纸的机械性能分析

对未涂布牛皮纸、壳聚糖涂布纸、淀粉涂布纸以及复合防油剂涂布纸的抗张强度、断裂伸长率、撕裂强度、耐破度等机械性能进行了测定分析,结果发现涂布纸的各类机械强度较未涂布纸均有所增强,其中壳聚糖涂布纸增量最大,复合防油剂涂布纸次之,淀粉涂布纸增量最小。综上,复合防油剂涂布可以使纸张各方面机械性能较未涂布纸有一定程度的提升。

3 结论

采用壳聚糖与淀粉复配作为防油剂,当 1 g/100 mL 壳聚糖溶液与 10 g/100 mL 淀粉溶液体积比为 1:2 时,防油剂黏度适中,涂布纸张防油等级较高,防油部分成本较单纯的壳聚糖涂布纸有了很大下降,且克服了淀粉涂布纸无皱缩、发硬的缺陷。在电镜下观察发现,复合防油剂纸张表面

既无孔隙,又无裂纹,整体较为均匀平整,较之于壳聚糖、淀粉防油剂具有更好的综合性能,更适于涂布加工纸张。同时,防油抗菌纸对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌均有一定抑制作用,涂布含 1 g/100 mL Nisin 的防油抗菌剂的纸张对大肠杆菌以及金黄色葡萄球菌的抑制率分别为 70.3%,72.8%。

参考文献

[1] 简超,戴君,卢立新,等. 油脂沾染对瓦楞纸板力学性能的影响[J]. 包装工程,2015(17): 49-51.

[2] KHWALDIA K, ARAB-TEHRANY E, DESOBRY S. Biopolymer coatings on paper packaging materials[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2010, 9(1): 82-91.

[3] 王耀松,赵黎明,吴艳清. 壳聚糖/乳清蛋白复合可食性膜的物理性能研究[J]. 食品与机械,2015, 31(6): 7-10.

[4] JAIN A, DUVVURI L S, FARAH S, et al. Antimicrobial polymers[J]. Advanced Healthcare Materials, 2014, 3(12): 1 969.

[5] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71(1): 1-20.

[6] 郭清泉,张兰威,冯镇,等. Nisin 在酸奶制品中的应用[J]. 食品与机械,2001(4): 30-31.

[7] KIM Y M, AN D S, PARKH J, et al. Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials[J]. Packaging Technology & Science, 2002, 15(5): 247-254.

[8] 王莉嫦. 乳酸链球菌素在鸡汁鲍鱼罐头中的应用[J]. 食品与机械,2013, 29(4): 174-175.

[9] 王士葆. 防油纸的制造技术[J]. 天津造纸,1998(2): 2-10.

[10] 简超. 生物聚合物涂布型防油纸基包装材料的制备及其性能评价[D]. 无锡: 江南大学,2015: 4-7.

[11] 袁麟,钱学仁. 国内外抗菌纸的研发现状与发展趋势[J]. 中国造纸,2013, 32(2): 56-60.

[12] 李婷,钟泽辉,邵杰,等. 食品抗菌包装材料的研究进展[J]. 包装学报,2011, 3(2): 34-36.

[13] 束浩瀚,潘磊庆,屠康,等. 抗菌材料在食品包装中的研究进展[J]. 食品科学,2015, 36(5): 260-265.

[14] 李德军,刘军钦. 氟类抗油抗脂剂的作用机理及其应用[J]. 国际造纸,2003, 22(5): 51-53.

[15] SÁNCHEZ-ORTEGA I, RELAGADO C. Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52(52): 906-913.

[16] GHANBARZADEH B, ALMASI H, ENTEZAMI A A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films; Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose[J]. Industrial Crops & Products, 2011, 33(1): 229-235.

[17] 吕淑霞,白泽朴,代义,等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造,2008, 27(9): 87-91.

[18] 中国纺织工业协会. GB/T20944.3—2008 纺织品抗菌性能评价第 3 部分: 振荡法[S]. 北京: 中国标准出版社,2008: 6.