

ϵ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理

Synergistic effect and mechanism of ϵ -polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus*

史文艳 孙震

SHI Wen-yan SUN Zhen

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:以碱性磷酸酶、紫外吸收物、丙酮酸含量以及 SDS-PAGE 凝胶电泳结果等为指标,通过单独及联合使用 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐、乳酸链球菌素(Nisin),综合评价了 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐、Nisin 对蜡状芽孢杆菌的抑菌作用。结果表明: ϵ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌具有协同抑制作用,Nisin 主要是通过破坏细胞壁膜结构以增加细胞壁膜的通透性,而 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐主要是通过影响 ATP 酶活性、蛋白质合成与表达及能量代谢过程来影响菌体的生长代谢活动。二者联合使用,可在较低浓度下达到更好抑菌效果。

关键词: ϵ -聚赖氨酸盐酸盐;乳酸链球菌素;蜡状芽孢杆菌;膜渗透性;蛋白表达;能量代谢

Abstract: The bacteriostatic action and mechanism of both against *Bacillus cereus* were studied by using ϵ -polylysine hydrochloride and nisin alone and in combination. The alkaline phosphatase content, UV absorbing content, pyruvic acid content and SDS-PAGE gel electrophoresis were used as indicators to comprehensively evaluate the antibacterial activity of ϵ -polylysine hydrochloride and Nisin against *Bacillus cereus*. The results showed that ϵ -polylysine hydrochloride and Nisin had a synergistic inhibitory effect on *Bacillus cereus*. Nisin mainly destroyed cell wall membrane structure and increased the permeability of cell wall membrane, while ϵ -polylysine hydrochloride mainly affected the growth and metabolism of bacteria by affecting ATPase activity, protein synthesis and expression, and energy metabolism. The combination use of the ϵ -polylysine hydrochloride and nisin can a-

chieve better bacteriostatic effect at lower concentrations.

Keywords: ϵ -polylysine hydrochloride; Nisin; *Bacillus cereus*; membrane permeability; protein expression; energy metabolism

亚硝酸盐可促进肉制品发色、形成特有风味、延长肉制品货架期、抑制肉毒梭状杆菌生长及毒素产生等优势^[1-5],只要符合 GB 2760 的规定限量,在肉制品加工中添加亚硝酸盐是允许的。但亚硝酸盐不仅对其他致病菌如蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜杆菌的抑制作用微弱^[6],且存在潜在致癌风险^[7-8],因此,研究开发出比亚硝酸盐更安全的可用于肉制品的抑菌剂具有重要意义。

ϵ -聚赖氨酸盐酸盐(ϵ -PLH)具有广谱抑菌性,不仅可抑制革兰氏阳性菌(G^+)及真菌,而且对部分革兰氏阴性菌(G^-)也有强烈抑制作用。乳酸链球菌素(Nisin)对 G^+ 菌具有较强抑制作用,特别是对可生成芽孢的细菌,但对 G^- 基本无抑制作用。现有研究还未发现某种食品抑菌剂单独使用就能有效抑制或杀死食品中所有微生物,抑菌剂复配使用不仅可降低单一抑菌剂使用量,而且还能增强抑制效果。本试验旨在研究 ϵ -PLH 与 Nisin 的联合抑菌作用及其机制,为 ϵ -PLH 和 Nisin 在低温肉制品中的复合应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

1.1.2 材料与试剂

蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*):江南大学食品学院实验室保存;

营养肉汤培养基、平板计数培养基:国药集团化学试剂有限公司;

基金项目:史文艳,女,江南大学在读硕士研究生。

作者简介:孙震(1966—),女,江南大学副教授,博士。

E-mail: zhsun@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2019-01-03

ϵ -PLH:92.87%,江苏一鸣生物股份有限公司;

乳酸链球菌素(Nisin): 10^6 IU/g,江苏一鸣生物股份有限公司;

碘化丙啶 PI 染色液:50 μ g/mL,含 RNase,上海源叶生物科技有限公司;

碱性磷酸酶试剂盒、AKP 试剂盒、ATP 酶试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒:南京建成生物工程研究所;

盐酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

2,4-二硝基苯肼:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

DNP 试剂:精确称取 594 mg 2,4-二硝基苯肼,溶于 1 000 mL 2 mol/L HCl 溶液中,摇匀完全溶解后,置于棕色瓶中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.3 仪器与设备

电子天平:FA2204B 型,上海精科天美科学仪器有限公司;

手提式不锈钢压力蒸汽灭菌锅:SYQ-DSX-280B 型,上海申安医疗器械厂;

新世纪紫外可见光光度计:T6 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

隔水式恒温培养箱:GNP-9270 型,上海精宏实验设备有限公司;

超净工作台:ZHJH-C1209C 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

高速冷冻离心机:CR21G III 型,日本日立公司;

流式细胞仪:FACSCalibur 型,美国 BD 公司;

电泳仪:1645050 型,美国伯乐公司;

化学发光凝胶成像系统:Chemidoc XRS+ 型,美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备 蜡状芽孢杆菌用牛肉膏蛋白胨培养基进行增殖培养,临用时用无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释至所需菌浓度。

1.2.2 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌最小抑菌浓度(MIC)的测定 以蜡状芽孢杆菌为研究对象,采用试管二倍稀释法。以最后 1 根澄清试管内防腐剂的浓度计为能抑制蜡状芽孢杆菌生长的最低浓度。同时测定 600 nm 处菌悬液的吸光值,得到关于 ϵ -PLH 和 Nisin 剂量和抑菌率的关系。按式(1)计算抑菌率。

$$I = \frac{A_1 - (A - A_0)}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

I ——抑菌率,%;

A_1 ——阳性对照组的吸光值;

A_0 ——阴性对照组的吸光值;

A ——试验组的吸光值。

1.2.3 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌联合作用效果的测定 采用棋盘法,用试管代替 96 孔板。37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后肉眼观察结果,分光光度计测定 600 nm 处的吸光值,按式(2)计算分级抑菌浓度指数 $FICI$,并判断相互作用类型。

$$FICI = MIC(A \text{ 联合}) / MIC(A \text{ 单独使用}) + MIC(B \text{ 联合}) / MIC(B \text{ 单独使用}), \quad (2)$$

式中:

$FICI$ ——分级抑菌浓度指数;

$MIC(A \text{ 联合})$ 、 $MIC(B \text{ 联合})$ ——分别表示联合使用时 Nisin 和 ϵ -PLH 的最小抑菌浓度,mg/L;

$MIC(A \text{ 单独使用})$ 、 $MIC(B \text{ 单独使用})$ ——分别表示 Nisin 和 ϵ -PLH 单独使用时的最小抑菌浓度,mg/L。

$FICI < 0.5$,协同作用; $0.5 < FICI < 1$,相加作用; $1 < FICI < 2$,无关; $FICI > 2$,拮抗作用。

1.2.4 样品的处理 蜡状芽孢杆菌的菌悬液稀释至 10^6 CFU/mL,加入 ϵ -PLH 与 Nisin 溶液,使菌悬液中抑菌剂的终浓度分别为 $1/4 MIC_{\epsilon\text{-PLH}}$ 、 $1/4 MIC_{\text{Nisin}}$ 、 $1/8 MIC_{\epsilon\text{-PLH}} + 1/8 MIC_{\text{Nisin}}$,以等量无菌 PBS 替代防腐剂作为空白对照。

1.2.5 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌蜡状芽孢杆菌体活力的影响 根据文献[9]修改如下:样品经 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后取出,加入 PI 染色液,避光作用 15 min,流式细胞仪分析。

1.2.6 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌细胞壁完整性的影响 根据文献[10]修改如下:样品经 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h 后取 1 mL 菌液,4 $^{\circ}$ C 下 3 500 r/min 离心 10 min。取 100 μ L 上清,依次测定样品的 AKP 的活性。

1.2.7 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌 ATPase 活力的影响 根据文献[11]修改如下:样品于 5 000 r/min 下离心 5 min 后弃去上清液,无菌生理盐水洗涤菌体并重悬;经超声波破碎后,12 000 r/min 冷冻离心 20 min,所得上清液备用。用 ATP 酶试剂盒进行测定。

1.2.8 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌代谢过程中丙酮酸含量的影响 根据文献[12],采用 DNP 法对蜡状芽孢杆菌代谢过程中丙酮酸含量进行测定。所得丙酮酸含量的标准曲线方程为: $y = 0.040 1x + 0.005 7$, $R^2 = 0.999 6$ 。

1.2.9 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌紫外吸收物的影响 根据文献[13]的试验方法,修改如下:菌悬液 3 500 r/min 离心 5 min,无菌 PBS 洗涤 2 次。37 $^{\circ}$ C 培养,于 0.1,3,5,7,9,12 h 取样,经 0.22 μ m 滤膜过滤,测定 260 nm 处的吸光值。

1.2.10 ϵ -PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌菌体蛋白的影响 根据文献[14]的试验方法,修改如下:37 $^{\circ}$ C 培养 3,

6 h 后取样。3 500 r/min 离心 10 min, 取菌体沉淀, 经 PBS 洗涤 2 次后用定量无菌水溶解, 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 加入 25 μL 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 上样操作, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3 数据处理

Origin 9.0 进行数据处理和分析, SPSS 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌 MIC 的影响

通过肉眼观察, 得到 ε-PLH、Nisin 作用于蜡状芽孢

杆菌的 MIC 分别为 12.5、6.25 mg/L。结合 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌作用的抑菌率(见表 1)可看出, 随着 ε-PLH、Nisin 浓度的升高, 抑菌率也逐渐增大, 当 ε-PLH、Nisin 分别为 12.5、100 mg/L 时, 可完全抑制蜡状芽孢杆菌的生长。由此说明, 通过仅肉眼观察会造成很大的误差, 影响结果的准确性。

2.2 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌联合作用效果

ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌联合作用效果见表 2。

由表 2 可计算出, $FICI=0.25$, $FICI<0.5$, 故 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌具有协同抑制作用。

表 1 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌作用的抑菌率

Table 1 Inhibition rate of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on Bacillus cereus %

抑菌物质	浓度/(mg · L ⁻¹)					
	200	100	50	25	12.5	6.25
ε-PLH	100.39±0.27	100.31±0.32	100.21±0.32	100.34±0.29	100.16±0.30	32.08±0.42
Nisin	99.90±0.17	99.42±0.22	84.70±0.17	68.11±0.32	66.23±0.28	63.49±0.30

表 2 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌联合作用效果

Table 2 Effect of the inhibition of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on Bacillus cereus

ε-PLH	Nisin					
	2 MIC	MIC	1/2 MIC	1/4 MIC	1/8 MIC	1/16 MIC
2 MIC	—	—	—	—	—	—
MIC	—	—	—	—	—	—
1/2 MIC	—	—	—	—	—	—
1/4 MIC	—	—	—	—	—	+
1/8 MIC	—	—	—	—	—	+
1/16 MIC	—	—	—	+	+	+

† “—”表示无菌落生长; “+”表示有菌落生长。

2.3 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌细胞壁完整性的影响

细胞壁具有保护细胞抵抗外界不利因素、固定细胞外形、保证细胞完整性等功能。碱性磷酸酶通常位于细菌细胞壁与细胞膜之间, 只有在细胞壁出现破损时, AKP 才会从壁膜之间泄露出去。通过测定碱性磷酸酶的活性强弱, 可判断出菌体细胞壁被破坏的程度。

由表 3 可知, 与对照组相比, 经 ε-PLH、Nisin 处理过的蜡状芽孢杆菌菌悬液中 AKP 含量均有所升高, 尤其是 ε-PLH、Nisin 联合作用时 AKP 活力最高, 说明细胞壁结构被破坏程度大, 细胞壁通透性增加, 推测可能会影响蜡状芽孢杆菌的生长和代谢活动。

ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌细胞膜的破坏作用与 Chen 等^[15]所研究的大分子聚合抑菌剂对 G⁺ 和 G⁻ 细菌

表 3 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌的 AKP 含量的影响[†]

Table 3 Effect of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on AKP content of Bacillus cereus (n=3)

组别	AKP 活力/ (King Unit · g ⁻¹ · Prot)
空白对照	0.78±0.02 ^a
1/4 MIC ε-PLH	0.93±0.03 ^c
1/4 MIC Nisin	1.09±0.03 ^b
1/8 MIC ε-PLH+1/8 MIC Nisin	1.45±0.04 ^d

† 不同字母表示差异显著(P<0.05)。

膜结构的破坏作用机制类似。其研究表明, 由于细菌带负电, 抑菌剂具有高的正电荷密度, 静电相互作用很快使它们彼此接触。当亚硝酸盐细菌处于悬浮液中时, 抑菌剂从细菌中置换表面二价离子如钙和镁, 并与带负电荷

的磷脂膜结合,迅速中和甚至逆转细菌的表面电荷,从而引起膜渗透性的轻微变化。该阶段,抑菌剂与细菌的相互作用是可逆的,当抑菌剂浓度更高时,相对高的浓度可使膜蛋白变性并开始渗透磷脂双层,膜渗透性的增加导致钾离子泄漏,使膜结构进一步不稳定。最终,高浓度的杀菌剂导致细菌膜完全崩解,起到杀菌作用。

2.4 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌菌体活力的影响

碘化丙啶(PI)能够透过死亡细胞或破损的细胞膜而对 DNA 进行染色,不能透过活细胞膜,故常用于鉴定死细胞。通过流式细胞仪检测细胞数量和荧光强度的变化,可直观得出菌体的存活率和损伤情况^[16-17]。

由图 1 可看出,与空白对照相比,经 ε-PLH、Nisin 作用后的蜡状芽孢杆菌的荧光强度明显增大,表明细胞壁膜结构均遭到破坏,细胞膜通透性增大。ε-PLH、Nisin 联合作用时荧光强度最大,菌体被破坏的程度最大,菌体活力最低,表明 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌具有协同抑制作用。

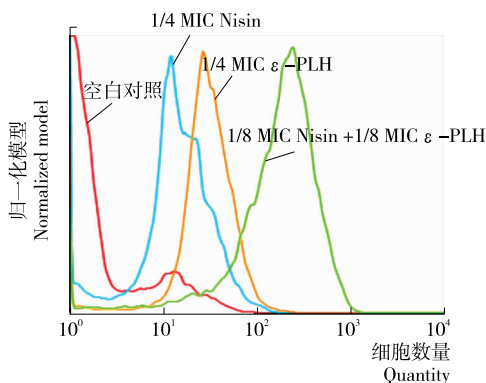


图 1 ε-PLH、Nisin 作用蜡状芽孢杆菌经 PI 染色后的流式细胞仪分析结果

Figure 1 Flow cytometry analysis of ε-polylysine hydrochloride and Nisin acting on *Bacillus cereus* by PI staining

2.5 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌 ATPase 活力的影响

ATPase 存在于组织细胞及细胞器的膜上,在物质运送、能量转换以及信息传递方面具有重要作用。通过检测 ATPase 的含量,可以间接地反映出 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌能量代谢过程的影响。

由表 4 可看出,经过 ε-PLH、Nisin 处理过的蜡状芽孢杆菌 Na⁺K⁺-ATPase 活力显著下降,说明能量代谢过程受阻,经 ε-PLH、Nisin 联合处理的蜡状芽孢杆菌 ATPase 活力最低,结合对细胞壁的完整性的影响,推测可能是 Nisin 主要作用于破坏细胞膜结构而增加细胞壁膜的通透性,使 ε-PLH 更容易作用于蜡状芽孢杆菌的内

表 4 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌 Na⁺K⁺-ATPase 活力的影响[†]

Table 4 Effect of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on the activity of *Bacillus cereus* Na⁺K⁺-ATPase (n=3)

组别	Na ⁺ K ⁺ -ATPase 活力/ (U · mg ⁻¹ · Prot)
空白对照	24.62 ± 0.25 ^a
1/4 MIC ε-PLH	11.82 ± 0.30 ^c
1/4 MIC Nisin	15.32 ± 0.38 ^b
1/8 MIC ε-PLH+1/8 MIC Nisin	10.28 ± 0.19 ^d

[†] 不同字母表示差异显著(P<0.05)。

部结构,导致菌体代谢活动受阻,影响蜡状芽孢杆菌的生长和代谢活动。

2.6 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌代谢过程中丙酮酸含量的影响

丙酮酸是机体代谢的中间产物,处于糖酵解途径的末端,同时它又连接着 EMP 途径和 TCA 循环。作为能量代谢的中间产物,丙酮酸含量的多少可间接反映代谢活动的进程。

由图 2 可看出,蜡状芽孢杆菌代谢过程中丙酮酸含量经历了升高、下降再升高的过程。与对照组相比,经过 1/4 MIC ε-PLH、1/4 MIC Nisin 单独处理过的蜡状芽孢杆菌菌悬液中,丙酮酸含量变化不大;但经过 1/8 MIC ε-PLH 与 1/8 MIC Nisin 联合处理过的蜡状芽孢杆菌菌悬液中,丙酮酸含量显著下降,说明二者联合作用影响甚至阻碍了蜡状芽孢杆菌的能量代谢过程。

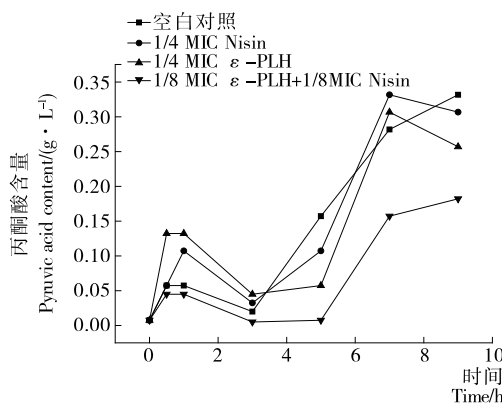


图 2 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌代谢过程中丙酮酸含量的影响

Figure 2 Effect of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on pyruvate content in the metabolism of *Bacillus cereus*

2.7 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌紫外吸收物的影响

核苷酸类物质在 260 nm 处有强吸收,如果细菌膜受损,可通过检测 260 nm 处的吸光度而估计出从细胞质释放的 DNA 和 RNA 的量,从而评定细胞膜的完整性。

由图 3 可看出,对照组基本无紫外吸收,而经ε-PLH、Nisin 处理后的蜡状芽孢杆菌菌悬液的紫外吸收均有所增加,说明蜡状芽孢杆菌的细胞膜结构受到了不同程度的破坏,导致细胞内容物的渗漏,从而进一步影响菌体代谢和生长。经ε-PLH、Nisin 联合处理后,菌悬液紫外吸收值最大,说明联合使用后菌体细胞膜破损程度最高,与 AKP 结果相对应。从而进一步证明了ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌具有协同抑制作用,其中 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的细胞膜结构的破坏程度要强于ε-PLH,说明二者联合使用时 Nisin 主要作用是破坏膜结构,而ε-PLH 则是影响代谢活动。

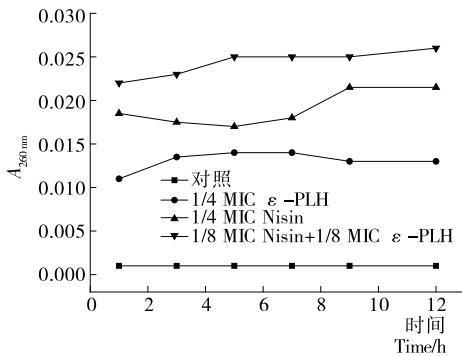


图 3 ε-PLH、Nisin 对蜡状芽孢杆菌紫外吸收物含量的影响

Figure 3 Effect of ε-polylysine hydrochloride and Nisin on the content of UV absorption of *Bacillus cereus*

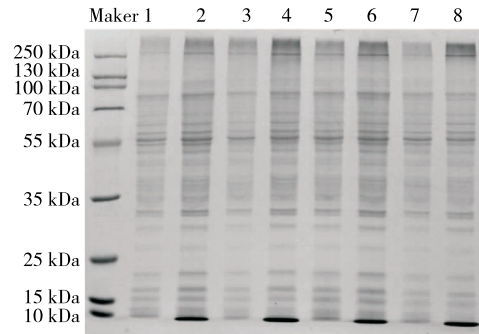
2.8 ε-PLH 与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌菌体蛋白的影响

对菌体总蛋白的 SDS-PAGE 分析可证明抑菌剂能否影响和阻碍细胞内蛋白质的表达。

与对照组相比,经ε-PLH 处理过的蜡状芽孢杆菌菌体蛋白质(2,4,6,8 泳道)中,小分子蛋白质尤其是<10 kDa 分子量的蛋白质明显增多,说明ε-PLH 可能影响了蛋白质的合成和分解过程,可将大分子蛋白质分解成小分子蛋白质。经 1/4 MIC Nisin 处理后,电泳条带无明显变化;经 1/8 MIC ε-PLH+1/8 MIC Nisin 处理后,大分子量蛋白质条带颜色变浅,小分子蛋白质增多且颜色加深,说明二者联合作用对菌体的蛋白质表达和正常代谢有一定抑制作用,且这种作用随着培养时间的延长而增强。

3 结论

ε-PLH、Nisin 抑制蜡状芽孢杆菌的最小抑菌浓度分



1~4 分别为对照组,经过 1/4 MIC ε-PLH,1/4 MIC Nisin 以及 1/8 MIC ε-PLH+1/8 MIC Nisin 处理 3 h 后的电泳条带;5~8 分别为对照组,经过 1/4 MIC ε-PLH,1/4 MIC Nisin 以及 1/8 MIC ε-PLH+1/8 MIC Nisin 处理 6 h 后的电泳条带。

图 4 ε-PLH、Nisin 作用下蜡状芽孢杆菌菌体蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Figure 4 SDS-PAGE electrophoresis of *Bacillus cereus* bacterial protein under the action of ε-polylysine hydrochloride and Nisin

别为 12.5,6.25 mg/L,并且二者具有协同抑制作用。协同抑菌机理为:Nisin 首先破坏细胞壁胞膜,当菌体的细胞膜受损后,半透性丧失、流动性减弱、细胞的内容物外泄。随后ε-PLH 进入细胞胞内,抑制了细胞膜上的 ATP 酶活力、影响蛋白的合成和表达、导致细胞内多种代谢途径受阻,同时影响细胞膜的稳定性和多种酶的反应活性,达到协同抑菌的效果。后续研究可考虑在 DNA 分子水平或结合蛋白组学进一步探究ε-PLH、Nisin 的协同抑菌机制。

参考文献

- [1] DUNCAN C L, FOSTER E M. Effect of sodium nitrite sodium chloride, and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(2): 406-411.
- [2] DUNCAN C L, FOSTER E M. Role of curing agents in the preservation of shelf-stable canned meat product[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(2): 401-405.
- [3] JR J B F. Chemistry of Meat Pigments[J]. Agricultural and Food Chem, 1966, 14(3): 207-210.
- [4] FREYBLER L A, GRAY J I, ASGHAR A, et al. Nitrite stabilization of lipids in cured pork[J]. Meat Science, 1993, 33(1): 85-96.
- [5] RICHARDS M P. Redox Reactions of Myoglobin[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, 18(17): 2342-2351.
- [6] BRUING-FANN C S, KANEENE J B. The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review[J]. Veterinary & Human Toxicology, 1993, 35(6): 521, 38.

(下转第 103 页)

卸过程中,弓形架会受到反复的交变应力作用。在循环载荷影响下,弓形架结构将形成损伤累积。由线性疲劳损伤理论可知,在变幅载荷作用下,由 n 个循环造成的结构损伤可通过 Miner 理论来表述,如式(7)所示,

$$D = \sum_{i=1}^n \frac{1}{N_i}, \quad (7)$$

式中:

D ——损伤变量;

N ——当前载荷水平所对应的疲劳寿命^[11-12],次。

设该模具夹紧机构的使用寿命为 2 年,与之对应的使用循环次数为 72 000 次。运行损伤分析计算过程,在达到 72 000 次使用循环次数后,弓形架最大损伤位置主要分布于 U 形表面内侧,如图 8 所示,该区域损伤因子为 0.785 03。根据线性疲劳损伤理论,当临界损伤变量 $D_{CR}=1$ (该变量为损伤变量的临界值)时试验样件将被破坏^[11]。由分析结果可知,弓形架损伤因子 $D < 1$,因此损伤程度符合使用寿命设计要求。

5 结论

通过弓形架力学计算、结构建模、拓扑优化及疲劳寿命分析,确定了一种更为合理的制造约束方案(即对称和拔模约束),实现了弓形架的轻量化设计和结构改进,验证了变密度法在弓形架结构拓扑优化设计中的可行性和有效性;同时结合相关设计准则,评估了弓形架的疲劳寿命及损伤程度,从理论层面为模具夹紧机构的设计和使用提供了重要参考。本文主要针对弓形架结构进行相关仿真分析,在后续研究工作中,可考虑以螺杆和固定座为仿真对象,通过研究其力学性能和疲劳特性等,以期为模

具夹紧机构的改进提供更为全面的理论支撑和技术借鉴。

参考文献

- [1] 邓奕,丁科,付宏,等. 基于 VERICUT 的模具数控加工仿真及加工路线优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 85-89.
- [2] 潘志达. 模块化设计和预制装配式技术的应用研究[J]. 建筑技术开发, 2017, 44(20): 19-20.
- [3] 赵灵. 食品罐内盖注塑模具设计[J]. 制造技术与机床, 2016(1): 138-140.
- [4] 王平,张国玉,刘家燕,等. 机载光电平台内框架拓扑优化设计[J]. 机械工程学报, 2014, 50(13): 135-141.
- [5] 寇鑫,葛文杰. 基于多点驱动式柔性机构的变形翼后缘拓扑优化[J]. 机械强度, 2018, 40(4): 983-986.
- [6] 林瑞,匡兵,周峰,等. 基于变密度法的发动机支架性能优化[J]. 组合机床与自动化加工技术, 2018(11): 123-126.
- [7] 张宪民,胡凯,王念峰,等. 基于并行策略的多材料柔顺机构多目标拓扑优化[J]. 机械工程学报, 2016, 52(19): 1-8.
- [8] 赵海鸣,蒋彬彬,李密. 基于拓扑优化与多目标优化的机床底座结构设计[J]. 机械设计与研究, 2018, 34(4): 100-105.
- [9] 杨福芹,蒋典兵. 三叉杆滑块式万向联轴器的疲劳寿命分析[J]. 机械强度, 2018, 40(6): 1 501-1 505.
- [10] 聂文武,肖雨,毛洪海,等. 某重型商用车传动轴强度与疲劳寿命分析[J]. 机械设计, 2018, 35(1): 166-168.
- [11] 李静,张显余,张乐迪. 基于 ANSYS Workbench 某型起落架疲劳寿命分析[J]. 兵器装备工程学报, 2017, 38(10): 171-174, 180.
- [12] 郑战光,蔡敢为,李兆军,等. 基于损伤力学阐释 Manson-Coffin 低周疲劳模型[J]. 中国机械工程, 2011, 22(7): 812-814.
- [7] CHENNI F Z, TACHÉ, NAUD N, et al. Heme-induced Biomarkers associated with red meat promotion of colon Cancer Are Not Modulated by the intake of nitrite[J]. Nutrition and Cancer, 2013, 65(2): 227-233.
- [8] BOUVARD V, LOOMIS D, GUYTON K Z, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat[J]. The Lancet Oncology, 2015, 16(16): 1 599-1 600.
- [9] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The Anti-microbial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7 758-7 770.
- [10] 刘韵昕. 苯乳酸的抑菌活性及抑菌机理研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2017: 21.
- [11] LIN lin, GU Yu-lei, LI Chang-zhu, et al. Antibacterial mechanism of ε-Poly-lysine against Listeria monocytogenes and its application oncheese[J]. Food Control, 2018, 91(9): 76-84.
- [12] 王佶. 大肠杆菌积累丙酮酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008: 23-25.
- [13] 翟培,韩晋辉,侯丽霞. 家蝇抗菌肽的抑菌动力学研究及其机理初探[J]. 中国生物工程, 2006, 26(11): 33-39.
- [14] 刘蔚,周涛. ε-聚赖氨酸抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 15-20.
- [15] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3 359-3 368.
- [16] PAPARELLA A, TACCOGNA L, AGUZZI I, et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against Listeria monocytogenes[J]. Food Control, 2008, 19(12): 1 174-1 182.
- [17] WICZLING P, KRZYZANSKI W. Flow cytometric assessment of homeostatic aging of reticulocytes in rats[J]. Experimental Hematology, 2008, 36(2): 119-127.

(上接第 19 页)