

董琛, 李丹丹, 张志勇, 等. 食品外包装材料的真菌抑制剂筛选及复配研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 83-90. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120067

DONG Chen, LI Dandan, ZHANG Zhiyong, et al. Selection and Compounding Preparation of Fungus Inhibitor for Food Outer Packaging Materials[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 83-90. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120067

· 生物工程 ·

食品外包装材料的真菌抑制剂 筛选及复配研究

董琛¹, 李丹丹¹, 张志勇¹, 马玉华¹, LI Lei^{2*}

(1. 山东体育学院体育社会科学学院, 运动营养与智慧配餐实验室, 山东济南 250102;

2. 荷兰格罗宁根大学, 生物医学工程研究中心, 荷兰格罗宁根 9713)

摘要:目的: 筛选和优化食品包装材料真菌抑制剂的配方及浓度, 为食品包装材料领域真菌污染控制提供参考。方法: 针对食品外包装和环境常见的芽枝状枝孢霉、黑曲霉、金灰青霉和多主枝孢霉, 分析了有机硅季铵盐(OQAS)、脱氢乙酸钠盐(SD)和聚六亚甲基双胍盐酸盐(PHMB)共3种适用于食品包装材料的抑菌剂单独对4种真菌的菌丝生长抑制效果, 在探明3种抑菌剂的有效使用浓度范围之后, 将3种抑菌剂进行三元复配优化。结果: 完全抑菌时(抑菌率100%)的复合配方为, 有机硅季铵盐浓度为0.38 mg/mL, 脱氢乙酸钠盐浓度为0.69 mg/mL, 聚六亚甲基双胍盐酸盐浓度为0.49 mg/mL, 复合抑菌剂总浓度为1.56 mg/mL。结论: 有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐通过复配可以明显减少单一抑菌剂的用量, 从而使抑菌剂变得更为安全高效。

关键词: 食品包装, 抑菌剂, 筛选, 复配

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)16-0083-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120067

Selection and Compounding Preparation of Fungus Inhibitor for Food Outer Packaging Materials

DONG Chen¹, LI Dandan¹, ZHANG Zhiyong¹, MA Yuhua¹, LI Lei^{2*}

(1. Sport Nutrition and Intelligent Cooking Laboratory, School of Sport Social Science,

Shandong Sport University, Jinan 250102, China;

2. Department of BioMedical Engineering, University of Groningen, Groningen 9713, Netherlands)

Abstract: Objective: The formulation and concentration of fungal inhibitors in food packaging materials were screened and optimized to provide reference for the control of fungal contamination in food packaging materials. Methods: Three bacteriostatic agents, which were suitable for food packaging materials, including organosilicon quaternary ammonium salt (OQAS), sodium dehydroacetate (SD) and polyhexamethylene biguanidine hydrochloride (PHMB) were selected as the target disinfectants and tested on four kinds of fungi including *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium aurantiogriseum* and *Cladosporium herbarum*. The mycelial growth inhibition effects of these three disinfectants on the four fungi were tested separately. Results: The effective concentration range(100%) of the three disinfectants were determined. Then these three disinfectants were combined to get a new compound bactericides, consisting of OQAS (0.38 mg/mL), SD (0.69 mg/mL) and PHMB (0.49 mg/mL), in which the total concentrations of bactericides were 1.56 mg/mL. Conclusion: The dosage of OQAS, SD and PHMB could be significantly reduced by the combination, which would make the antimicrobial agent more safe and efficient.

收稿日期: 2020-12-09

基金项目: 山东省高等学校“青创人才”引育计划基金(编号:72);国家哲学社会科学基金重点项目(18ATY002)。

作者简介: 董琛(1986-),男,博士,讲师,研究方向:食品微生物学,E-mail: dongchen@sdpei.edu.cn。

* 通信作者: LI Lei(1988-),男,博士,副教授,研究方向:食品工业技术,E-mail: l.li@umcg.nl。

Key words: food packaging; bacteriostatic agent; screening; compound preparation

2020年以来,随着新冠肺炎病毒在全球的肆虐,越来越多的食品外包装样本检出新冠病毒核酸阳性,真菌、细菌、病毒互作互生复杂,食品包装材料微生物污染问题引起了各国的广泛关注和重视^[1-2]。目前,食品外包装抑菌剂多种多样,主要有效成分为双季铵盐抑菌剂或过氧化氢及其他混合物等^[3-4]。然而,由于长期使用单一抑菌剂使得微生物产生耐药性的可能性大大提高。研究表明,交替使用不同的抑菌剂或复合抑菌剂在一定程度上可以减缓微生物对于抑菌剂的耐药性^[5]。为了能够减轻微生物的耐药性,开发新型的抑菌剂(包括成分新配方)就成为了食品包装材料领域微生物污染控制的重要一环^[6-7]。

结合食品外包装特点、微生物种类及人员安全因素,适用于食品包装材料的抑菌剂应主要具备高效、低毒、广谱、无味、稳定性好等特点,且对人的皮肤及眼睛无刺激性,对食品包装材料及设备表面不产生腐蚀^[8-9]。有机硅季铵盐是一种理想的抑菌剂,具有良好的综合性能,对人体皮肤无刺激性、无致癌作用^[10]。季铵盐化合物能吸附各种带有负电荷的微生物,抑菌效果优良,并且抑菌谱广,能有效抑制诸多不同类型的微生物,在世界各国应用十分广泛^[11-12]。脱氢乙酸钠盐是一种安全的食品型抑菌剂,可按照国家标准剂量添加在食物中避免霉变引起的产品变质和经济损失^[13-14]。食品级抑菌剂脱氢乙酸钠盐应用于食品包装材料表面抑菌,可保证在发挥其高效广谱的抑菌能力的同时,又不会对人员的健康带来任何威胁。聚六亚甲基双胍盐酸盐等含有胍基官能团的聚合物是一种具有抑制微生物生长活性的有机化合物^[15],在医疗卫生、农业生产、服装等领域使用非常普遍^[16],广泛被用于衣物和纺织品的抑菌除臭,也是食品中综合抑菌性能优良的防腐剂之一^[17]。本试验选用的有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐均是安全性高的生物抑菌剂,将三者单独用于抑菌保鲜研究已见报道,且取得了较好效果,但将上述三种抑菌剂复配用于食品外包装材料的应用尚未见报道。

本研究选择日常食品外包装和环境样本中大量存在的芽枝状枝孢霉、黑曲霉、金灰青霉和多主枝孢霉这四种代表性真菌作为试验测试菌株^[18-21],通过有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐三种抑菌剂的施用筛选及复配,为食品包装领域微生物控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

有机硅季铵盐 AEM-5700(CAS: 27668-52-6,以异丙醇为溶剂,活性物含量 60%)、聚六亚甲基双胍盐酸盐(CAS: 32289-58-0(USA)/27083-27-8(Europe)/133029-32-0(INCI),活性物含量 98%) 长沙研邦

化工科技有限公司;脱氢乙酸钠盐(CAS: 64039-28-7,活性物含量 98%) 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;黑曲霉菌种(*Aspergillus niger* 3.3928) 中国普通微生物菌种保藏管理中心;芽枝状枝孢菌种(*Cladosporium cladosporioides* CICC 2477)、多主枝孢霉菌种(*Cladosporium herbarum* CICC 2443)和金灰青霉菌种(*Penicillium aurantiogriseum* CICC 40651) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

CX33 生物显微镜 奥林巴斯(中国)有限公司(苏州);HCB-900V 超净台 青岛海尔生物医疗股份有限公司;YXQ-LS-50A 灭菌锅 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;101-2AB 微生物培养箱 天津泰斯特仪器有限公司;FJY1002-UVF-P 超纯水制作设备 青岛富勒姆科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验菌种处理 购自菌种保藏中心的菌种为安瓿管封装的冻干菌种,用移液枪在安瓿管中加入 3~5 mL 合适的液体培养基,缓慢振荡摇匀使冻干菌粉溶解呈悬浮状态。用移液枪吸取菌液,将其接入到两支斜面培养基试管中,置于 28~31 °C 环境下培养 2 d,对冻干菌种进行恢复培养。培养 2 d 后,取出复壮后的第二代真菌斜面培养基。再将二代菌种转入平板培养基,在 28~31 °C 恒温培养 3 d,得到第三代工作菌作为本研究用菌种。

1.2.2 抑菌试验方法 将抑菌剂加水溶解,之后添加到灭菌后的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)培养基中,通常按 1:9 比例配制抑菌剂琼脂平板,根据需要来选择抑菌剂浓度范围。在抑菌剂和 PDA 培养基充分混合至均匀之后,将混合物倾倒至灭菌平皿(直径 9 cm),每个无菌培养平板中需倒入 20~25 mm 的培养基。对照组为不含抑菌剂的 PDA 培养基。将直径约为 5 mm 的第三代工作菌种接种到 PDA 培养基中心。将培养皿用封口膜封存并在 28 °C 下培养 5 d,分别测量对照组和试验组的平均菌丝直径,以此计算得出抑菌剂对于菌种的菌丝生长抑制率。本研究所有的抑菌相关试验均做了三组重复,并且所呈现的结果是三组平行试验结果的均值,实验浓度如表 1 所示。

试验组相对于对照组的相对菌丝生长抑制用百分比表示,通过以下公式进行计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

式中:dc 和 dt 分别表示对照组和试验组三组重复的平均菌丝半径,mm。

1.2.3 三种抑菌剂的复配研究方法 通过对单一抑菌剂的抑菌试验,确定了三种抑菌剂的有效浓度范围。根据响应曲面法设计原理,采用 Design-Expert.8.05

表 1 有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐抑菌实验设计

Table 1 Experiment design of OQAS, SD and PHMB

| 杀菌剂及浓度 | 芽枝状枝孢霉 | 黑曲霉 | 金灰青霉 | 多主枝孢霉 |
|--|--------|------|------|-------|
| | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 有机硅季铵盐浓度 (mg·mL ⁻¹) | 3.7 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | 9.3 | 3.7 | 0.9 | 0.9 |
| | 18.5 | 18.5 | 3.7 | 3.7 |
| | 37 | 37 | 13.9 | 13.9 |
| 脱氢乙酸钠盐浓度 (mg·mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0.5 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| | 1 | 0.1 | 0.05 | 0.05 |
| | 1.5 | 0.2 | 0.1 | 0.1 |
| | 2 | 1.5 | 0.2 | 0.2 |
| 聚六亚甲基双胍盐酸盐浓度 (mg·mL ⁻¹) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 0.5 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| | 1 | 0.1 | 0.05 | 0.05 |
| | 1.5 | 0.2 | 0.1 | 0.1 |
| | 2 | 0.3 | 0.2 | 0.2 |

软件中 Box-Behnken 设计三因素三水平实验。制备三元复合抑菌剂。主要影响因素(自变量)为有机硅季铵盐(X₁)、脱氢乙酸钠(X₂)和聚六亚甲基二胍盐酸盐(X₃)的用量,并以+1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低三因素水平,三个自变量根据以下方程进行编码。

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \times 100$$

式中: x_i 是本研究中自变量的编码结果; X_i 是本研究中自变量的实际选取浓度结果, X₀ 是本研究中自变量在位于中心点处的实际浓度水平值, ΔX 是本研究中自变量的波动区间。

根据单一抑菌剂抑菌试验结果,确定复合抑菌剂对芽枝状枝孢霉的试验各因素编码的水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计因素编码及水平
Table 2 Box-Behnken test design factor coding and level

| 因素 | 编码 | 水平 | | |
|-------------------|----------------|------|------|------|
| | X ₁ | -1 | 0 | +1 |
| 有机硅季铵盐(mg/mL) | X ₁ | 0.18 | 0.37 | 0.56 |
| 脱氢乙酸钠盐(mg/mL) | X ₂ | 0.5 | 0.6 | 0.7 |
| 聚六亚甲基双胍盐酸盐(mg/mL) | X ₃ | 0.3 | 0.4 | 0.5 |

1.3 数据处理

每组实验都重复了 3 次,并进行了 2 次平行测量。6 次测量的平均值±标准差作为最终的结果,运用 SPSS 18.0 软件 ANOVA 分析,并应用 Origin 8.5 进行作图。

2 结果与分析

2.1 单一抑菌剂抑菌试验结果

2.1.1 四种真菌自然生长状况 如图 1 所示,为四种真菌在不添加任何抑菌剂的平板上,在 28 °C 下培养 5 d 的生长状况。可以看出,芽枝状枝孢霉和多主

枝孢霉长满了整个平板,其次黑曲霉的生长能力也比较旺盛,而金灰青霉在同样条件下的生长能力最弱,在图 1c 中可以看到大部分培养基都没有利用。

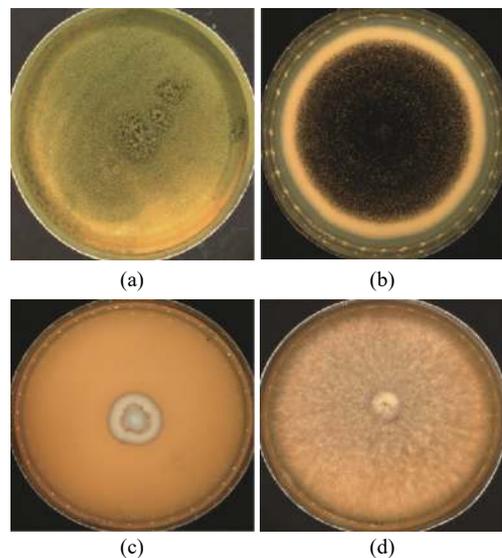


图 1 培养 5 d 后空白对照组芽枝状枝孢霉(a)、黑曲霉(b)、金灰青霉(c)和多主枝孢霉(d)的菌丝生长情况
Fig.1 After 5 days, mycelium growth states of *Cladosporium cladosporioides* (a), *Aspergillus niger* (b), *Penicillium aurantiogriseum* (c) and *Cladosporium herbarum* (d) in the control group

2.1.2 有机硅季铵盐对四种真菌的抑制效果 如图 2 所示,有机硅季铵盐对四种真菌菌丝生长的抑制率随着用量的增加而增加,有机硅季铵盐对四种真菌的实际作用效果有所差异,对多主枝孢霉抑制率最高。经培养 5 d 后实验分析验证,当达到菌丝生长完全抑制时,芽枝状枝孢霉所需有机硅季铵盐的最少用量为 48.1 mg/mL,黑曲霉所需有机硅季铵盐最少用量为 46.3 mg/mL,金灰青霉所需有机硅季铵盐的最少用量为 44.4 mg/mL,多主枝孢霉所需有机硅季铵盐的最少用量为 16.7 mg/mL。

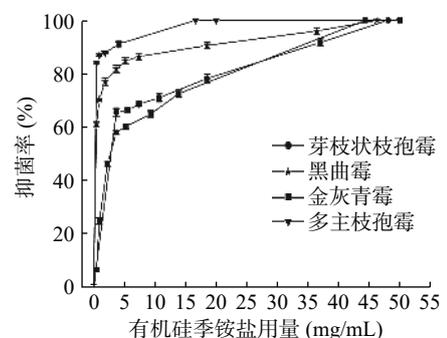


图 2 培养 5 d 后不同浓度的有机硅季铵盐对四种真菌菌丝生长的抑制率

Fig.2 Inhibition rate of different concentrations of OQAS on mycelial growth of fungi after 5 days incubation

如图 3 所示,四种真菌对有机硅季铵盐的反应有明显不同。尽管当达到菌丝生长完全抑制时,芽枝

状枝孢霉、黑曲霉和金灰青霉所需的有机硅季铵盐用量上差异不是十分明显,但在实际抑菌作用效果变化上有明显不同,以有机硅季铵盐用量为 3.7 mg/mL 时为例,可以看出芽枝状枝孢霉的菌丝半径要明显大于其他三种真菌。同时,多主枝孢霉菌丝半径随着有机硅季铵盐用量的增多迅速减小,并且使用较小剂量的有机硅季铵盐就可以达到很好的抑制效果。在对纺织品、医用伤口敷料的研究中,有机硅季铵盐在 1~50 mg/mL 都表现出了良好的抑菌效果,不仅对真菌具有很强的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌及绿脓杆菌的抑制率也均超过 97%^[22-23]。有机硅季铵盐具有良好的综合性能,对人体皮肤无刺激性,能吸附各种带有负电荷的微生物,抑菌效果优良,并且抑菌谱广^[3]。

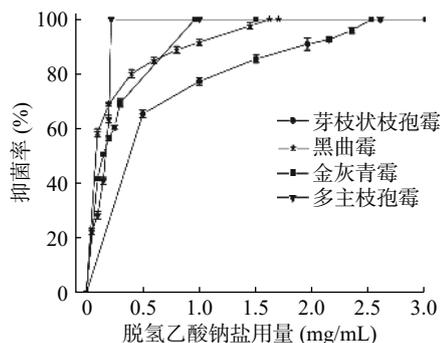


图 4 培养 5 d 后不同浓度的脱氢乙酸钠盐对四种真菌菌丝生长的抑制率

Fig.4 Inhibition rate of different concentrations of SD on mycelial growth of fungi after 5 days incubation

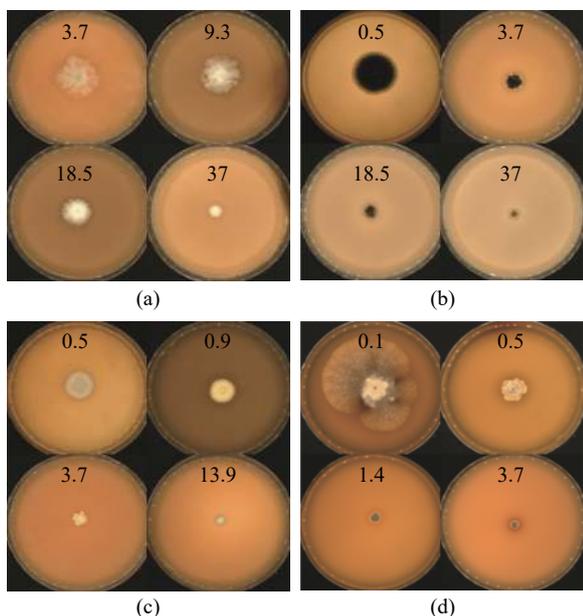


图 3 培养 5 d 后不同浓度的有机硅季铵盐对菌丝生长抑制作用效果

Fig.3 Antifungal activity of different concentrations of OQAS on mycelial growth after 5 days incubation

注:芽枝状枝孢霉(a)、黑曲霉(b)、金灰青霉(c)和多主枝孢霉(d);数字表示抑菌剂浓度,单位为 mg/mL;图 5、图 7 同。

2.1.3 脱氢乙酸钠盐对四种真菌的抑制效果 如图 4 所示,脱氢乙酸钠盐对四种真菌菌丝生长的抑制率随着用量的增加而增加,脱氢乙酸钠盐对四种真菌的实际作用效果有所差异。经实验分析验证,当达到菌丝生长完全抑制时,芽枝状枝孢霉所需脱氢乙酸钠盐的最少用量为 2.52 mg/mL,黑曲霉所需脱氢乙酸钠盐最少用量为 1.62 mg/mL,金灰青霉所需脱氢乙酸钠盐的最少用量为 0.96 mg/mL,多主枝孢霉所需脱氢乙酸钠盐的最少用量为 0.22 mg/mL。

图 5 展示了培养 5 d 后不同浓度的脱氢乙酸钠盐对四种真菌菌丝生长的抑制作用效果图,可以看出 4 种真菌对有机硅季铵盐的反应有明显不同,多主枝孢霉对脱氢乙酸钠盐非常敏感,随着抑菌剂用量的增加,多主枝孢霉菌丝半径迅速减小,而芽枝状枝

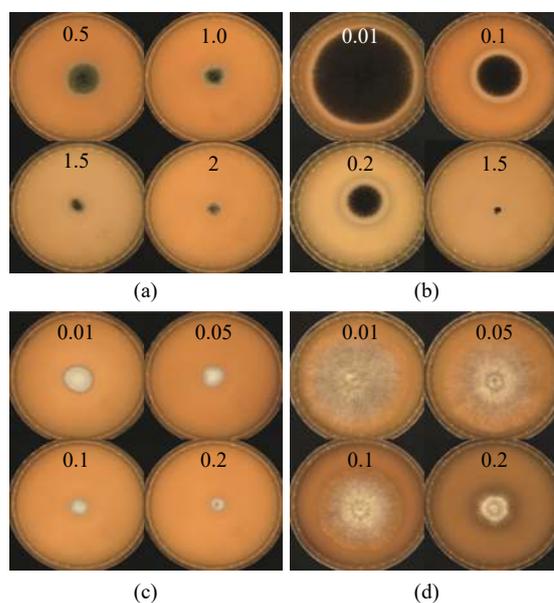


图 5 培养 5 d 后不同浓度的脱氢乙酸钠盐对菌丝生长抑制作用效果

Fig.5 Antifungal activity of different concentrations of SD on mycelial growth after 5 days incubation

孢霉只有在抑菌剂浓度较大时才表现出明显的抑制效果,这也和图 4 折线图相吻合。有研究表明,0.4 mg/mL 脱氢乙酸钠盐对柑橘指状青霉抑菌率达到 99%^[24]。此外,脱氢乙酸钠盐不仅有抗菌效果,还具有防腐效能,添加质量分数为 2% 脱氢乙酸钠的改性 PVA 薄膜对蛋糕的保鲜效果较好,应用于食品材料及设备表面抑菌,可保证在发挥其高效广谱的抑菌能力的同时,又不会对人员的健康带来任何威胁^[13-14]。

2.1.4 聚六亚甲基双胍盐酸盐对四种真菌的抑制效果 如图 6 所示,聚六亚甲基双胍盐酸盐对四种真菌菌丝生长的抑制率均随着用量的增加而增加,聚六亚甲基双胍盐酸盐对四种真菌的实际作用效果有所差异。经实验与分析验证,当达到菌丝生长完全抑制时,芽枝状枝孢霉所需聚六亚甲基双胍盐酸盐的最少用量为 2.9 mg/mL,黑曲霉所需聚六亚甲基双胍盐酸盐最少用量为 0.4 mg/mL,金灰青霉所需聚六亚甲基

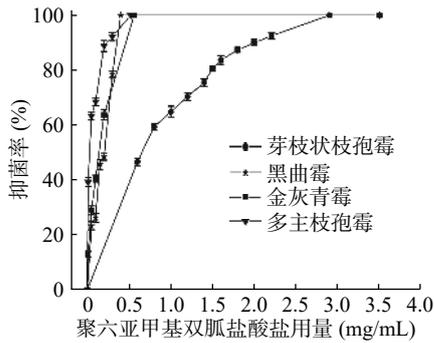


图 6 培养 5 d 后不同浓度的聚六亚甲基双胍盐酸盐对四种真菌菌丝生长的抑制率

Fig.6 Inhibition rate of different concentrations of PHMB on mycelial growth of fungi after 5 days incubation

双胍盐酸盐的最少用量为 0.56 mg/mL, 多主枝孢霉所需聚六亚甲基双胍盐酸盐最少用量为 0.52 mg/mL。

如图 7 所示,可以看出四种真菌对聚六亚甲基双胍盐酸盐的反应有明显不同,随着抑菌剂用量的增加,黑曲霉、金灰青霉和多主枝孢霉对聚六亚甲基双胍盐酸盐反应敏感,菌丝半径迅速减小,而芽枝状枝孢霉只有在抑菌剂浓度较大时才表现出明显的抑制效果,这也和图 6 折线图相吻合。相似的,2 mg/mL 聚六亚甲基双胍盐酸盐在纺织物上的抑菌效果可达 95% 以上^[25],此外,在食品包装薄膜上应用聚六亚甲基双胍盐酸盐母粒 4% 时,抗菌薄膜对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和杂菌样品的抗菌率分别为 99.1%、99.2% 和 83.4%,且存放 6 个月后抗菌薄膜仍保持较强的抗菌作用^[15]。含有胍基官能团的聚合物是一种具有特殊生物活性的有机化合物,在医疗卫生、农业生产、服装等领域使用非常普遍,并对食品的抑菌、除臭具有一定的效果^[16]。

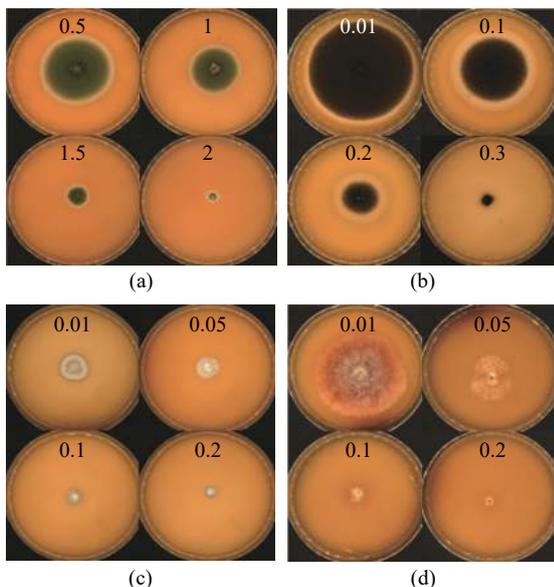


图 7 培养 5 d 后不同浓度的聚六亚甲基双胍盐酸盐对菌丝生长抑制作用效果

Fig.7 Antifungal activity of different concentrations of PHMB on mycelial growth after 5 days incubation

单一抑菌剂抑菌实验结果的图 2、图 4 和图 6 表明,抑菌率随着抑菌剂用量的增加而增加,但是四种真菌对三种抑菌剂的反应明显不同。参照三种抑菌剂对四种真菌的抑制作用效果图(图 3、图 5、图 7)及空白对照组(图 1),可以看出在相同的培养条件下,芽枝状枝孢霉生长繁殖能力强,对抑菌剂敏感度低,需要最多剂量的抑菌剂来完全抑制菌丝生长;而多主枝孢霉虽然生长繁殖能力强,但对抑菌剂敏感度略高,用较小剂量的抑菌剂就可以完全抑制菌丝生长。这从一定角度也揭示了芽枝状枝孢霉、黑曲霉的生长繁殖能力强。此外,已有大量研究表明,不同的微生物对抑菌剂的反应会有明显的差异^[26]。这也很好的解释了在本研究中芽枝状枝孢霉和黑曲霉需要较高剂量的抑菌剂来完全抑制菌丝生长的原因。

本研究通过单一抑菌剂对 4 种测试菌株的抑菌试验,确定了单一抑菌剂的有效浓度使用范围。试验结果表明,对于有机硅季铵盐,其需要使用更大的剂量来实现对四种测试菌株的完全抑制。对于抑菌剂的使用,应尽可能减少抑菌剂的使用剂量,从而保证减少对人体及环境的危害。复合抑菌剂通过将不同抑菌机理的抑菌剂复合,可以使复合抑菌剂的抑菌机理更为复杂,从而使其更为高效,且减缓微生物对抑菌剂的耐药性。

2.2 三元复合抑菌剂研究结果

从单一抑菌剂抑菌试验结果中可以得出,芽枝状枝孢霉达到菌丝完全抑制时所需的三种抑菌剂的浓度显著高于其他三种真菌,说明芽枝状枝孢霉是这四种真菌中存活能力最强的。本着研制高效安全复合的原则,本研究在进行三元复合抑菌剂的复配时,期望通过增加脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐的相对比例,来降低有机硅季铵盐在复合抑菌剂的相对用量,从而降低复合抑菌剂的使用剂量。同时,根据大量同类研究表明,在复合抑菌剂中单一组分的含量一般要低于其单独使用的用量^[27]。所以,本研究在响应面法水平选取中,不单要结合单一抑菌剂抑菌试验结果,还要从复合抑菌剂的角度加以综合考虑。因此在复合抑菌剂研究中,先以复合抑菌剂对芽枝状枝孢霉的抑菌率进行考量,得出最佳复配比例后,再对其他三种真菌进行验证。

2.2.1 复合抑菌剂响应面实验结果 采用 Design-Expert.8.05 软件设计并进行 Box-Benhnken 试验,结果如表 3 所示。

复合抑菌剂抑菌率方差分析表明(表 4),对复合抑菌剂抑菌率所建立的回归模型极显著($P < 0.01$),有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐的用量对芽枝状枝孢霉抑菌率均有极显著影响($P < 0.0001$),以复合抑菌剂抑菌率为响应指标,利用 Design-Expert.8.05 软件对表 3 的试验结果进行二次

表3 Box-Behnken 试验结果
Table 3 Test results of Box-Behnken

| 实验号 | 编码 | | | 抑菌率Y(%) |
|-----|----------------|----------------|----------------|---------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | |
| 1 | -1 | 1 | 0 | 93.15 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 90.56 |
| 3 | 1 | 0 | -1 | 88.52 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 88.98 |
| 5 | -1 | -1 | 0 | 87.22 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 90.28 |
| 7 | 0 | 1 | -1 | 91.11 |
| 8 | 1 | 1 | 0 | 100 |
| 9 | -1 | 0 | 1 | 92.59 |
| 10 | 1 | -1 | 0 | 87.59 |
| 11 | 0 | -1 | -1 | 85.93 |
| 12 | 1 | 0 | 1 | 100 |
| 13 | -1 | 0 | -1 | 88.33 |
| 14 | 0 | -1 | 1 | 89.81 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 90.47 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 90.82 |
| 17 | 0 | 1 | 1 | 100 |

表4 回归方程方差分析
Table 4 Regression equation analysis of variance

| 方差来源 | 自由度 | 均方差 | F | P |
|-------------------------------|-----|--------|--------|---------|
| 模型 | 9 | 34.53 | 92.31 | <0.0001 |
| X ₁ | 1 | 27.45 | 73.39 | <0.0001 |
| X ₂ | 1 | 142.05 | 379.72 | <0.0001 |
| X ₃ | 1 | 101.60 | 271.61 | <0.0001 |
| X ₁ X ₂ | 1 | 10.50 | 28.06 | <0.0001 |
| X ₁ X ₃ | 1 | 13.03 | 34.84 | <0.0001 |
| X ₂ X ₃ | 1 | 6.28 | 16.77 | 0.0003 |
| X ₁ ² | 1 | 5.17 | 13.81 | 0.0005 |
| X ₂ ² | 1 | 0.89 | 2.38 | 0.0218 |
| X ₃ ² | 1 | 2.90 | 7.76 | 0.0020 |
| 失拟项 | 1 | 0.018 | 0.1818 | 0.6918 |
| 纯误差 | 4 | 0.099 | | |
| 总和 | 16 | | | |
| 决定系数R ² | | | | 0.9916 |
| CV(%) | | | | 0.67 |

注: P<0.05表示有显著差异; P<0.01表示差异极显著。

多元回归拟合分析,得到复合抑菌剂抑菌率对编码自变量 X₁(有机硅季铵盐使用浓度)、X₂(脱氢乙酸钠盐的使用浓度)、X₃(聚六亚甲基双胍盐酸盐的使用浓度)的二次多项回归方程:

$$Y=144.38-102.12X_1-94.74X_2-141.08X_3+85.26X_1X_2+95X_1X_3+125.25X_2X_3+30.69X_1^2+46.03X_2^2+83.03X_3^2$$

回归分析表明,该回归模型 P<0.0001, F 为 92.31, 决定系数(R²)=0.9916, 说明该方程的拟合程度和可靠性很高,可用于预测复合抑菌剂的抑菌率。CV, 即 Y 的变异系数,代表实验的准确度, CV 值越高,说明实验的可靠性越差。在本研究中, CV 值为 0.67%, 这表明本研究所采用的研究方法及试验流程是可靠的。此外,在回归方程交互项和二次项 X₁²、X₃² 的

P 值小于 0.001, 具有极其显著的统计学差异。而 X₂² 的 P 值小于 0.05, 有统计学差异。因此,本研究得到的二次多项回归方程可以很好地解释三种单一抑菌剂浓度的变化对复合抑菌剂的抑菌率产生的影响。

为了更直观地解释各种因素及其相互作用对复合抑菌剂抑菌率的影响,并表征其响应函数特征,借助于 Design-Expert.8.05 软件在固定其他因素不变的情况下,得到任意两个因素及其相互作用对复合抑菌剂抑菌率的响应面图,结果如图 8 所示。在响应面分析中,如果响应面的斜率相对平坦,则表明在一定范围内,该抑菌剂使用浓度对复合抑菌剂的抑菌率影响不大;相反,假如一个响应面斜率非常大,则说明复合抑菌剂抑菌率对于该组分的浓度变化十分敏感^[28]。有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐的用量三因素彼此之间存在比较显著的交互作用,对复合抑菌剂抑菌率的影响显著性依次是:脱氢乙酸钠盐用量>聚六亚甲基双胍盐酸盐用量>有机硅季铵盐用量。这可能与三种抑菌剂的抑菌机理相关,有机硅季铵盐以有机硅作为媒介,将具有抑菌功能的铵阳离子基团强有力地吸附于微生物

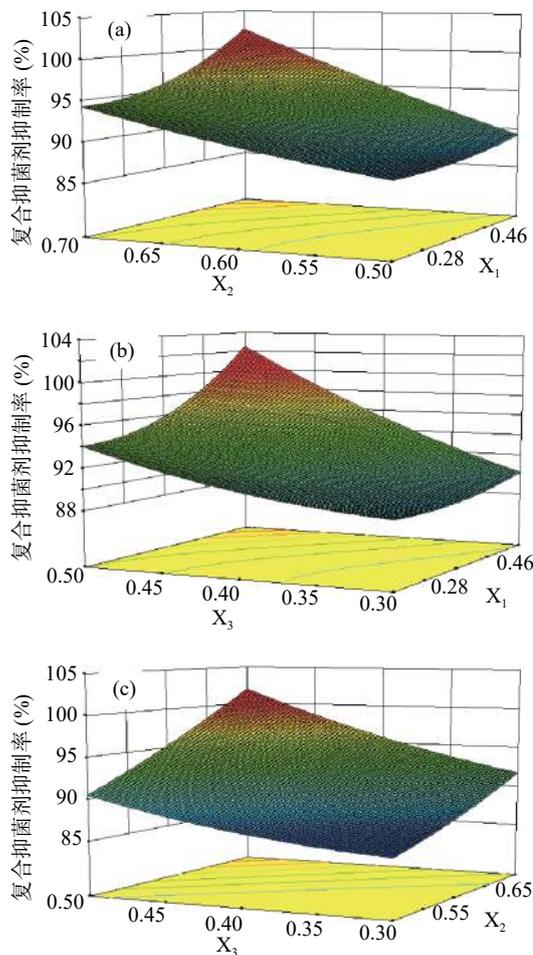


图8 各因素交互影响抑菌率的响应面图

Fig.8 Response surface curves of the interactions between any two factors on the inhibition rate

细胞壁的表面,通过改变微生物细胞壁的通透性,使微生物呼吸作用所需的物质溢出,这使得微生物停止呼吸作用而导致死亡^[29];脱氢乙酸钠盐通过改变膜的通透性来影响微生物的能量代谢,来达到抑制微生物生长的目的^[30];聚六亚甲基双胍盐酸盐的阳离子官能团能够裂解微生物细胞壁,并使细胞膜破裂^[31]。

2.2.2 复合抑菌剂配方 本研究基于以上获得的响应面回归方程作为目标函数,采用二次规划法(Quadratic Programming),对各个因素的水平进行优化,由于只有 3 个因素,因此这里采用的是它的中型优化算法,通过类似求解线性规划问题来获得初始可行解,再通过投影法确定最终的优化结果。二次规划法的数学模型为:

$$\min \frac{1}{2}x^T Hx + f^T x \text{ (目标函数: 响应面方程)}$$

目标函数满足以下约束:

$$A \cdot x \leq b \text{ (不等式约束)}$$

$$A_{eq} \cdot x = b_{eq} \text{ (等式约束)}$$

$$lb \leq x \leq ub \text{ (变量的取值范围)}$$

在 Matlab/Optimization Toolbox 中对以上模型进行求解,得到 3 种抑菌剂用量的最优配比方案(表 5),抑菌率的理论优化值为 99.75%。通过该配方得到复合抑菌剂中有机硅季铵盐的用量为 0.38 mg/mL,脱氢乙酸钠盐的用量为 0.69 mg/mL,聚六亚甲基双胍盐酸盐的用量为 0.49 mg/mL,三种抑菌剂的总用量为 1.56 mg/mL,达到的实际抑菌率为 100%。

表 5 复合抑菌剂配方优化方案

Table 5 Formulation optimization of compound bacteriostatic agent

| 序号 | X ₁ | X ₂ | X ₃ | 总量 | 抑菌率Y(%) |
|----|----------------|----------------|----------------|------|---------|
| 1 | 0.38 | 0.69 | 0.49 | 1.56 | 100 |

将基于芽枝状枝孢霉分析得到的抑菌剂优化配方对其它三种真菌进行验证。将优选得到的抑菌剂配方添加到 PDA 培养基中,并将试样在温度为 28 °C 的条件下培养 5 d。从图 9 可以看出,优化得到的抑

菌剂配方可以完全抑制黑曲霉、金灰青霉和多主枝孢霉的生长。

本研究经优化得到的复配抑菌剂,对四种真菌均呈现出良好的抑制效果(图 9)。在优化配方中,抑菌剂的总用量为 1.56 mg/mL(在安全使用浓度范围之内),并且值得注意的是,其中有机硅季铵盐的用量为 0.38 mg/mL,相对于其单独使用时的用量有了显著的降低。同时,就四种真菌中生长繁殖能力最强的芽枝状枝孢霉而言,优化配方中抑菌剂总用量,要明显低于三种抑菌剂单独作用时的用量(表 6)。可以说,本研究通过复配得到一种高效的复合抑菌剂。此前有研究表明,通过将几种不同的抑菌剂复配使用,可以减少抑菌剂的用量,并且可以达到协同或互补作用,从而使抑菌剂更为高效^[32-33],同时可以减缓耐药性的产生。

表 6 完全抑菌时三种抑菌剂单独作用时的用量

Table 6 The dosage of three kinds of bacteriostatic agents acting alone in complete bacteriostasis

| 抑菌剂浓度(mg/mL) | 芽枝状枝孢霉 | 黑曲霉 | 金灰青霉 | 多主枝孢霉 |
|--------------|--------|------|------|-------|
| 有机硅季铵盐 | 48.1 | 46.3 | 44.4 | 16.7 |
| 脱氢乙酸钠盐 | 2.52 | 1.62 | 0.96 | 0.22 |
| 聚六亚甲基双胍盐酸盐 | 2.9 | 0.4 | 0.56 | 0.52 |

3 结论

抑菌率随抑菌剂量的增加而升高,但四种真菌对三种抑菌剂的反应明显不同。本研究经优化得到的复配抑菌剂,对四种真菌均呈现出良好的抑制效果。完全抑菌时(抑菌率 100%),复合抑菌剂中有机硅季铵盐的用量为 0.38 mg/mL,脱氢乙酸钠盐的用量为 0.69 mg/mL,聚六亚甲基双胍盐酸盐的用量为 0.49 mg/mL,三种抑菌剂的总用量为 1.56 mg/mL。通过复配可以明显减少单一抑菌剂的用量,从而使抑菌剂变得更为安全高效。有机硅季铵盐、脱氢乙酸钠盐和聚六亚甲基双胍盐酸盐的用量三因素彼此之间存在比较显著的交互作用,对复合抑菌剂抑菌率的影响显著性依次是:脱氢乙酸钠盐用量>聚六亚甲基双胍盐酸盐用量>有机硅季铵盐用量。

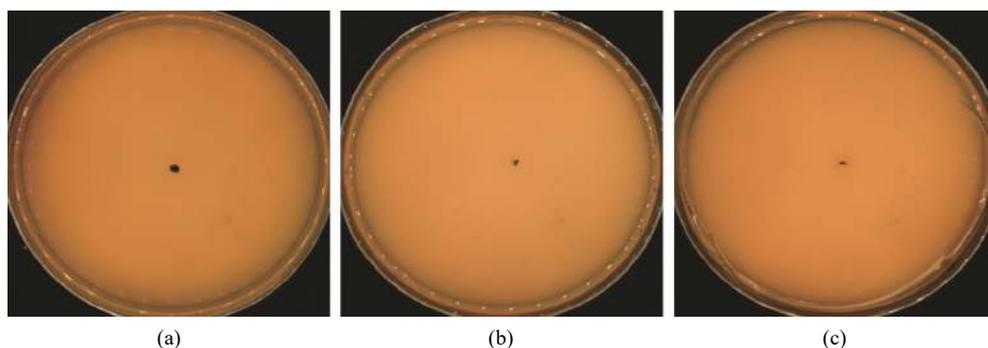


图 9 在 28 °C 培养 5 d 后优化配方对黑曲霉(a)、金灰青霉(b)和多主枝孢霉(c)的菌丝生长抑制效果图

Fig.9 Effect of the optimized formula on mycelial growth inhibition of *Aspergillus niger* (a), *Penicillium aurantiogriseum* (b) and *Cladosporium herbarum* (c) cultured after 28 °C for 5 d

参考文献

- [1] 白露, 李志明, 周成琳. 抗菌剂在食品包装领域的研究进展[J]. 农产品加工, 2020, 4(10): 77-82.
- [2] Kumar S, Mukherjee A, Dutta J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives[J]. Trends in Food Ence & Technology, 2020, 9(7): 196-209.
- [3] 杨万丽, 王丽艳, 王清文. 杂多酸季铵盐双活性中心抗菌剂的合成及抑菌性能研究[J]. 无机化学学报, 2013, 2(2): 295-302.
- [4] Kao C Y, Huang Y C, Chiu S Y, et al. Bacteriostatic effect of a calcined waste clamshell-activated plastic film for food packaging[J]. Materials, 2018, 11(8): 137-150.
- [5] Liu X, Xia W, Jiang Q, et al. Binding of a novel bacteriostatic agent-chitosan oligosaccharides-kojic acid graft copolymer to bovine serum albumin: Spectroscopic and conformation investigations[J]. European Food Research & Technology, 2015, 240(1): 109-118.
- [6] 扈莹莹, 李其轩, 刘昊天. 纳米二氧化钛光催化技术抑菌机制及其在食品包装中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2020, 3(3): 232-238.
- [7] 田芳, 李凯龙, 李勇. 一种含肉桂醛包装纸对面包腐败发霉的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 238-241.
- [8] Nasser T, Ahmed N, Rashad A, et al. Antimicrobial food packaging based on sustainable Bio-based materials for reducing foodborne pathogens: A review[J]. Food Chemistry, 2020, 310(25): 15915-15921.
- [9] Seyed A, Ahmad H, Mat W, et al. Materials for food packaging applications based on bio-based polymer nanocomposites[J]. Journal of Thermoplastic Composite Materials, 2017, 30(2): 143-173.
- [10] 李利娜, 王国锋, 李菲. 季铵盐类医用抗菌 TPU 的制备及性能研究[J]. 化学推进剂与高分子材料, 2020, 3(4): 56-59.
- [11] 苏振, 亢诗雨, 钱晨玮. 新型食品包装材料研究进展[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(4): 126-131.
- [12] Li Z, Liu H, Xu X, et al. Surface modification of silicone elastomer with rosin acid-based quaternary ammonium salt for antimicrobial and biocompatible properties[J]. Materials & design, 2020, 189(4): 184-193.
- [13] 杨福馨, 邱艳娜. 不同含量脱氢乙酸钠改性 PVA 薄膜延长蛋糕保质期的研究[J]. 包装学报, 2016, 8(3): 49-54.
- [14] 叶银枝. 脱氢醋酸钠在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2002, 3(3): 64-66.
- [15] 汪敏, 赵永富, 谢洪德. 胍盐聚合物添加量对抗菌食品包装膜抗菌性及物理性能的影响[J]. 农业工程学报, 2019, 35(7): 303-310.
- [16] Johnson W, Boyer I, Zhu J, et al. Safety assessment of polyaminopropyl biguanide (polyhexamethylene biguanide hydrochloride) as used in cosmetics[J]. International Journal of Toxicology, 2020, 39(3): 65-73.
- [17] Dinning, Alldham, Eastwood, et al. Pyrithione biocides as inhibitors of bacterial ATP synthesis[J]. Japplmicrobiol, 2010, 85(1): 141-146.
- [18] Suhem K, Matan N, Matan N. Effect of high temperature with *Litsea cubeba* Pers. to control mold growth on bamboo food packaging and its possible modes of action[J]. Bioresources, 2019, 14(1): 1289-1302.
- [19] Ma M, Silva D D D, Taylor P W J. Black mould of post-harvest tomato (*Solanum lycopersicum*) caused by *Cladosporium cladosporioides* in Australia[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2020, 15(1): 15-25.
- [20] Bruna J M, Fernandez M, Hierro E M. Combined use of pronase E and a fungal extract (*Penicillium aurantiogriseum*) to potentiate the sensory characteristics of dry fermented sausages[J]. Meat Science, 2000, 54(2): 135-145.
- [21] Jarmila elakovská, Buka J, Radka Vaňková, et al. Sensitisation to molecular allergens of *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* in atopic dermatitis patients[J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 1097-1111.
- [22] 刘蓉, 陈珍, 罗永启. HM98-35 有机硅季铵盐抗菌剂对羊绒织物的抗菌整理[J]. 上海纺织科技, 2017, 45(1): 44-46.
- [23] 石锐, 耿欢, 张静爽. 一种非溶出广谱抑菌型聚己内酯/明胶-有机硅季铵盐纳米纤维膜用于伤口敷料[J]. 生物医学工程学杂志, 2018, 35(3): 396-402.
- [24] 段小芳. 肉桂醛和脱氢乙酸钠对柑橘采后酸腐病和绿霉病的防治[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2016.
- [25] 刘静, 朱华君, 王强. 聚六亚甲基双胍盐酸盐在棉织物上的静电自组装及其抗菌性能[J]. 纺织学报, 2012, 33(4): 86-90.
- [26] N Tao, L Jia, H Zhou. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*[J]. Food Chemistry, 2014, 153(15): 265-271.
- [27] 陈建文, 蔡晨波. 灭菌, 消毒与抗菌技术: 基础·生产·应用[M]. 北京: 工业装备与信息工程出版中心, 2004.
- [28] Choi S, Kim H, Kim Y, et al. Fate of *Bacillus cereus* and naturally occurring microbiota on milled rice as affected by temperature and relative humidity[J]. Food Microbiology, 2014, 38(8): 122-127.
- [29] Ibrahim S S, El Kammar A M, Guda A M, et al. Characterization and separation of pyrite from Abu Tartur black shale[J]. International Journal of Mining Science and Technology, 2015, 4(4): 565-571.
- [30] Yu. Recent development of polysilicone quaternary ammonium salt as antimicrobial agent[J]. China Adhesives, 2008, 4(3): 157-162.
- [31] Place L W, Gulcius-Lagoy S M, Lum J S. Preparation and characterization of PHMB-based multifunctional microcapsules[J]. Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 530(1): 76-84.
- [32] Rojo-Bezares, Sáenz, Zarazaga, et al. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 32-36.
- [33] Smilanick J L, Mansour M F, Gabler F M, et al. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides[J]. Postharvest Biology & Technology, 2008, 47(2): 226-238.