

纳米 TiO₂ 对贮藏期南丰蜜桔抑菌性能研究

龙小艺, 刘玉英, 余达欢, 叶丹, 文智总, 吕建峰, 李良翔

(江西农业大学 理学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 以酞酸丁酯为原料, 在无水条件下, 采用溶胶-凝胶法合成纳米二氧化钛粉末, 通过正交实验法确定制备纳米二氧化钛的最佳工艺条件, 并利用 XRD 衍射仪进行结构表征。采用牛津杯法研究纳米二氧化钛悬浮液对寄生于南丰蜜桔常见菌类的活性抑制效果, 并进行实证性保鲜实验, 重点考察纳米二氧化钛对贮藏期南丰蜜桔的抑菌性能。所制备的纳米二氧化钛平均粒径为 14.6 nm, 实际平均产率为 90.83%, RSD 为 0.86%。结论是纳米二氧化钛对贮藏期南丰蜜桔具有一定的抑菌性能。

关键词: 纳米二氧化钛; 南丰蜜桔; 抑菌性能

中图分类号: S436.661.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 01-0061-05

Antibacterial Effects of Nano-scale TiO₂ on Parasitic Bacteria of Nanfeng Citrus in Storage Periods

LONG Xiao-yi, LIU Yu-ying, YU Da-huan, YE Dan,
WEN Zhi-zhong, LU Jian-feng, LI Liang-xiang

(College of Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: Nano-scale Titanium dioxide was prepared by butyl phthalate on anhydrous conditions adopting for sol-gel method, and the orthogonal experiment for preparation using XRD diffraction for structural characterization was optimumly investigated. As Oxford cup method was exploited for inspecting Nano-scale Titanium dioxide suspension's repression effect on fungi survived in Nanfeng citrus skin, the empirical fruit fresh experiment was carried out. Nano-scale Titanium dioxide's antibiotic activity on Nanfeng citrus was emphatically investigated. The average diameter of Nano-scale Titanium dioxide powder attained to 14.6nm, but the actual average yield was 90.83% with RSD (Relative Standard Deviation) of 0.86%. The conclusion was Nano-scale titanium dioxide had good antibacterial property on Nanfeng Citrus in storage periods.

Key words: Nano-scale Titanium dioxide; Nanfeng Citrus; antibacterial property

南丰蜜桔(Nanfeng Citrus)属乳桔类果蔬, 在我国已有 2000 多年栽培历史, 自唐开元年间以来一直被历代皇室列为贡品, 700 多年前被引种到日本等国家。南丰蜜桔果小皮薄, 光泽橙黄, 果形扁圆, 单果重 25~50 g, 单果囊瓣 7~10 片, 近肾形, 囊衣薄, 种子 1~3 粒或者无核。南丰蜜桔具有“皮薄汁多,

酸甜适口, 少核化渣, 清香独特, 营养丰富”的鲜明特征。目前, 我国南丰蜜桔种植面积已达 5.33 万 hm², 年产量达 10 亿 kg。

南丰蜜桔贮藏期间如防腐保鲜措施不当, 果实腐烂率可高达 10%~30%^[1], 会严重影响果品品质与食用安全。本试验选用溶胶-凝胶法, 以钛酸丁酯作

收稿日期: 2011-12-29

作者简介: 龙小艺, 男, 讲师, 硕士, 主要从事纳米材料合成及应用研究, E-mail: long8864@126.com。

为前驱体,低温制备纳米TiO₂^[2],考察其对贮藏期南丰蜜桔寄生菌类的活性抑制性能。

1 材料与仪器

1.1 试剂与菌种

酞酸丁酯(化学纯),95%乙醇(化学纯),冰醋酸(分析纯),氯化钠(分析纯),无水乙醇(分析纯),纯化琼脂粉(生化试剂),青霉菌菌种(*Penicillium* sp),绿霉菌菌种(*Penicillium digitatum*),大肠杆菌菌种(*Escherichia coli*),以上菌种源自江西农业大学理学院及食品学院实验室。

1.2 主要仪器

马弗炉,游标卡尺,恒温培养摇床,SX2-5型箱式电阻炉,JYT-2型药物天平,DF-II型集热式磁力搅拌器,LRH-150-G II型微电脑控制培养箱,DHG-9101-2型电热恒温鼓风干燥箱,YXQ-LS-50SI型立式压力蒸汽灭菌器,德国Bruker-AXS公司D8 FOCUS型X射线粉末衍射仪,单人单面超净工作台。

2 试验方法

2.1 二氧化钛的制备

取17 mL的酞酸丁酯加入到盛有40 mL的无水乙醇的分液漏斗中混匀,得到溶液A;另取10 mL

冰醋酸和42.5 mL的95%乙醇混匀得到溶液B;将A溶液缓慢滴加到B溶液中,均匀搅拌得到透明胶体溶液。

在室温条件下自然风干,控温105℃在烘箱中进行烘干,将所得的干凝胶研磨成粉,置于马弗炉中控温500℃左右进行煅烧4 h,得到纳米TiO₂粉末^[3]。

2.2 PDA培养基的制备

将削皮后的马铃薯100 g切成薄片,加400 mL水煮沸30 min,加入20 g葡萄糖,17 g琼脂,加热溶化并定容至1 000 mL,分别装入4个锥形瓶中,高压湿热灭菌,冷藏备用。

2.3 牛肉膏蛋白胨培养液的配制

准确称取牛肉浸膏3 g,蛋白胨10 g,氯化钠20 g,待用。将牛肉浸膏和蛋白胨混合装入烧杯,加入500 mL蒸馏水进行水浴加热,再加入氯化钠,混匀定容至1000 mL,调节pH值至7.0~7.2,将配制的培养液分装到4个锥形瓶中,冷却后包好,湿热灭菌后备用。

2.4 正交实验因素及水平

纳米TiO₂合成实验主要有钛酸丁酯滴加时间、胶体静置时间、煅烧时间、煅烧温度等四种影响因素,通过正交实验法考察其对纳米TiO₂合成产率的影响,以确定最佳工艺条件。

表1 L₉(3⁴)正交实验的因素水平

| 因素 | 水平1 | 水平2 | 水平3 |
|--------------|-----|-----|-----|
| A: 滴加时间 /min | 30 | 60 | 90 |
| B: 凝胶静置时间 /d | 3 | 6 | 9 |
| C: 煅烧时间 /h | 2 | 4 | 6 |
| D: 煅烧温度 /℃ | 400 | 500 | 600 |

2.5 X射线衍射(XRD)测试方法

本次XRD分析在德国Bruker-AXS公司D8型X射线全自动衍射仪上进行,选用Cu K_α辐射源,管压40 kV,管流40 mA,采用阶梯扫描方式收集衍射峰型,扫描速率6°/min。

2.6 抑制大肠杆菌实验方法

取大肠杆菌斜面管一支,挑取一环菌苔洗至10 mL的无菌水中,并将菌悬液充分震荡混匀,以无菌操作吸取0.1 mL菌液,接种到每一培养皿中,吸取已配置好的TiO₂悬浮液,37℃震荡培养1 d。

2.7 抑制青霉菌及绿霉菌实验方法

用无菌水准确配制TiO₂质量分数分别为0.02%,0.1%,0.5%的TiO₂悬浮液。

牛津杯法测定抑菌效果的试验方法如下^[4]:

(1) 制备待用菌悬液:在菌苔生长旺盛处挑取1~2环活化菌苔,以无菌操作将菌种充分洗入无菌水中,配制成1×10⁵ cfu/mL菌悬液进行抑菌实验,平行测定3次。

(2) 用移液管移取10 mL在50~60℃水浴中受热融化的培养基,加入水平培养皿并轻摇,使其均匀铺在培养皿底面,冷却凝固。以无菌操作加入已配制好的菌悬液0.1 mL,混合均匀后倒入培养皿中刮匀,使其平铺在培养基上。

(3) 每一培养皿按适当的间隔放置3个不锈钢小管(即牛津杯),静置5 min,利用牛津杯自身重量让其沉降,用移液器分别吸取150 μL配置好的

TiO₂悬浮液, 移入牛津杯中, 每一培养皿重复设置3次。另吸取150 μL无菌水作为对照。

(4) 放入培养箱控温26 ℃培养48 h。取出, 利用十字交叉法测量牛津杯周围的抑菌圈直径。

2.8 保鲜实验

筛选36枚大小相近、色泽金黄且软硬适中的新摘南丰蜜桔果实, 均分为12份。将第1、2、3份编为第一组, 在果皮外周分别涂布青霉菌种、绿青霉菌种及大肠杆菌种, 将第4、5、6份编为第二组, 在果皮外周先分别涂布青霉菌种、绿青霉菌种及大肠杆菌种, 再选择0.1%纳米TiO₂悬浮液作为保鲜剂, 喷淋于果实表面进行抑菌保鲜。将第7、8、9份编为第三组, 先在果皮外周选择0.1%纳米TiO₂悬浮液作为保鲜剂, 喷淋于果实表面, 再分别涂布青霉菌种、绿青霉菌种及大肠杆菌种。将第10、11、12份编为第四组, 先在果皮外周选择0.1%纳米TiO₂悬浮液作为保鲜剂, 喷淋于果实表面, 再分别涂布青霉菌种、

绿青霉菌种及大肠杆菌种, 涂布结束后再次喷淋。四组对比实验的常温保鲜时间均设定为360 h。

3 结果与讨论

3.1 正交实验结果分析

由表2和表3正交实验结果且结合实际, 最佳实验工艺条件可设定为 A₁B₁C₂D₂: 即钛酸丁酯均相连续滴加时间控制为30 min, 所生成的胶体放置时间为3 d, 控温500 ℃左右煅烧4 h, 晶粒表面呈白色。在此条件下平行测定5次, 实际平均产率为90.83%, RSD值为0.86%, 表明本方法实验结果的重现性良好。

3.2 XRD 衍射实验结果分析

由图1可知, 在2θ=25.5°、26.00°、38.10°、49.34°等处有明显的衍射峰, 与标准锐钛矿相 TiO₂ 晶体的X射线衍射峰基本一致, 具有典型的锐钛矿相 TiO₂ 晶体结构。

表2 二氧化钛合成的正交实验表

| 序号 | 滴加时间 A | 凝胶放置时间 B | 煅烧时间 C | 煅烧温度 D | 产率/% |
|----|--------|----------|--------|--------|-------|
| 1 | 30 | 3 | 2 | 400 | 87.65 |
| 2 | 30 | 6 | 4 | 500 | 91.06 |
| 3 | 30 | 9 | 6 | 600 | 82.32 |
| 4 | 60 | 3 | 6 | 500 | 78.46 |
| 5 | 60 | 6 | 2 | 600 | 80.37 |
| 6 | 60 | 9 | 4 | 400 | 78.55 |
| 7 | 90 | 3 | 4 | 600 | 88.25 |
| 8 | 90 | 6 | 6 | 400 | 83.11 |
| 9 | 90 | 9 | 2 | 500 | 82.28 |

表3 极差及方差分析

| 因素 | 滴加时间 A | 凝胶放置时间 B | 煅烧时间 C | 煅烧温度 D |
|-------------------|--------|----------|--------|--------|
| K ₁ /3 | 87.01 | 84.79 | 83.53 | 83.10 |
| K ₂ /3 | 79.13 | 84.85 | 85.95 | 84.03 |
| K ₃ /3 | 84.65 | 81.15 | 81.30 | 83.65 |
| 极差 | 7.88 | 3.70 | 4.65 | 0.93 |
| 因素主次 | 主要 | 一般 | 一般 | 次要 |
| 均方 | 75.83 | 40.22 | 40.48 | 24.90 |
| 显著性 | 显著 | 不显著 | | |

根据 Scherrer 公式 $d=K\lambda/B_{1/2}\cos\theta$, 计算 TiO₂ 晶粒平均粒径大小, 其中 K 为 Scherrer 常数, 其值为 0.89; d 为晶粒尺寸, nm; B_{1/2} 为积分半高宽度(以弧度表示); θ 为衍射角, λ 为 X 射线波长(0.154 056 nm)。通过 XRD 图谱得知衍射峰半宽和 θ 值, 通过计算可知颗粒平均粒径为 14.6 nm。

3.3 二氧化钛对寄生菌种的活性抑制

南丰蜜桔贮藏期主要病害有青霉病、绿霉病、蒂腐病、炭疽病、黑腐病和酸腐病, 均可明显增大南丰蜜桔的腐烂率。另外, 在挂果期增施农家肥或采摘期出现自然落果, 可能沾染自制肥料或泥土中的大肠杆菌, 均使南丰蜜桔腐烂率增高或食用安全

风险增大。因此，对于菌种活性抑制效果的考察，重点选择寄生于南丰蜜桔的青霉菌、绿霉菌及大肠杆菌等 3 种菌种。

抑菌圈实验是微生物学常用的基本试验手段

[5]。利用牛津杯法测定抑菌圈直径，并通过空白及不同浓度药物的对照比较实验，可简便准确地检测 TiO₂ 对贮藏期间寄生于南丰蜜桔青霉菌、绿霉菌及大肠杆菌的抑菌效果。

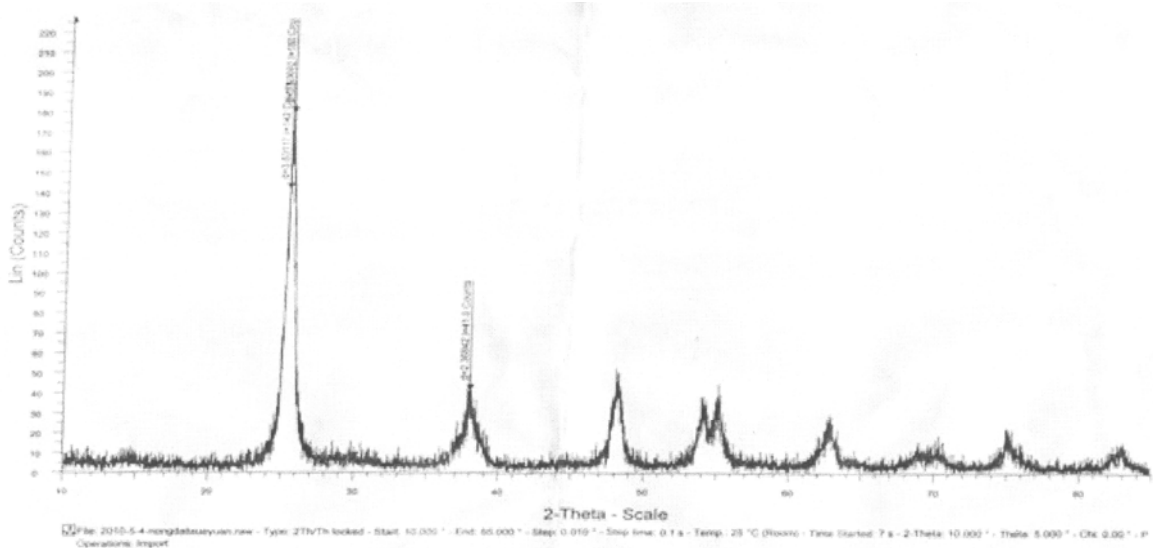


图 1 纳米二氧化钛粉末的 XRD 衍射图谱

表 4 二氧化钛对寄生菌种的活性抑制

| TiO ₂ 质量分数 | 青霉菌抑菌圈直径 | 绿霉菌抑菌圈直径 | 大肠杆菌抑菌圈直径 |
|-----------------------|----------|----------|-----------|
| 0.02 | 12.20 | 11.20 | 10.60 |
| 0.10 | 14.30 | 15.40 | 12.40 |
| 0.50 | 22.10 | 19.50 | 16.30 |
| 0 | 0 | 0 | 0 |

注：表中直径为 3 次平行测定值的平均值。

由表 4 可知，结果表明纳米 TiO₂ 具有一定的抑菌效果。悬浮液中的纳米 TiO₂ 质量分数越高，其抑菌性能越好。当纳米 TiO₂ 质量分数达到 0.10% 时，对寄生于南丰蜜桔的青霉菌、绿霉菌及大肠杆菌种已具有较高的活性抑制能力。

3.4 保鲜实验结果

实验结果显示：第一组的腐烂区域最广，面积最大，约占全组水果总表面积的 78.10%，腐烂程度较高，果实外表色泽均转为暗褐色，果体松软，且稍用力挤压后回弹性差，基本无法复原，且约有 40% 左右果实破损处出现混浊果汁外溢等腐烂现象。第四组保鲜效果最好，腐烂面积最小，约占本组水果总表面积的 4.70%，保鲜蜜桔果实色泽为金黄色，果体饱满，弹性良好，除局部有极少数霉变斑点外，并无其它异况。如将第二组与第三组相比较，腐烂

面积分别约占该组水果总表面积的 36.20% 及 21.50%，第二组保鲜效果相对较差。其原因可能是第三组先在果皮外周选择纳米 TiO₂ 悬浮液喷淋于果实表面，再涂布不同种类的菌种，这样在致病菌种与果皮之间有抑菌物质存在，细菌不易快速繁殖。

而第四组先后两次在果皮外周选择纳米 TiO₂ 悬浮液喷淋于果实表面，对处在两层 TiO₂ 悬浮液保鲜剂中间的菌种而言，繁殖生长空间有所缩小，易被杀灭。实证结果表明第四组保鲜方式应为最佳保鲜方式：在南丰蜜桔保鲜实践过程中，应考虑在第一时间将保鲜剂喷淋于摘后蜜桔表面，之后的贮藏期可择机喷淋。

4 结论

本论文初步研究结果表明纳米 TiO₂ 对南丰蜜

