

纳米贝壳粉的制备及抑菌活性研究

崔艳俊,盛宏朝,王祥莹,刘璞洁,田丽,孙锬昌,孙利芹

(烟台大学 生命科学学院,山东 烟台 264005)

摘要:我国贝类资源极其丰富,其加工副产物贝壳不仅具有独特的微观结构,还含有多种活性成分,具有很大的开发利用价值。本研究以纳米牡蛎壳粉制备为目的,通过球磨工艺条件优化,确定了纳米级贝壳粉制备的最佳工艺参数,即以纯净水作为球磨助剂,研磨转速 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,总研磨时间为 5.5 h(初磨 2.5 h,复磨 3 h),可以获得平均粒径 91 nm 的贝壳粉。煅烧预处理实验结果显示,煅烧温度为 $900 \text{ }^\circ\text{C}$ 、煅烧时间为 2 h 时,最有利于球磨;贝壳粉的性质表征结果显示,当煅烧温度超过 $900 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,贝壳粉的主要成分以 CaO 为主,且晶体结构有大量孔隙,比表面积增大;抑菌实验结果显示,牡蛎贝壳粉对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有较好的抑菌效果,且 $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ 煅烧处理后的材料具有更好的抑菌效果,添加浓度超过 2% 后,抑菌效果趋于稳定。

关键词:牡蛎壳;纳米材料;球磨工艺;煅烧工艺;抑菌活性

中图分类号:Q819 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2023)04-0328-07

我国贝类产量极大,位列全球首位,贝壳作为贝类加工的主要副产物,资源极其丰富,据初步统计,每年产生的贝壳废弃物约有 900 万 t^[1-2]。贝壳因含有多糖、蛋白质及碳酸钙等活性成分,具有很好的利用价值。已有研究表明,贝壳粉具有很好的抑菌及吸附活性^[3-5],中国古代的药典中也有记载:牡蛎壳具有软坚散结、重镇安神、平肝潜阳、收敛固摄、和胃止痛的功效。但目前绝大多数贝壳作为废弃物被直接扔掉,少数贝壳经简单的粉碎用作粗饲料添加剂,在造成资源浪费的同时也带来了严重的环境污染问题。有文献^[6-7]报道,贝壳粉经过煅烧及化学改性等工艺,可以制备成纳米材料,用作抑菌或者重金属吸附材料等。研究显示,纳米级贝壳粉的制备方法主要有水解法、气相法、球磨法和水热法等^[8-10],其中利用球磨法加工粉末不仅功能强大且经济高效^[11],是一种加工制备纳米材料简单便捷的方式。

本研究以牡蛎加工过程中的副产物贝壳为原材料,以贝壳资源的高值化利用为目的,通过对球磨工艺的参数优化以及煅烧前处理工艺对贝壳粉

结构性质的影响等实验研究,探讨纳米级贝壳粉制备的工艺条件,并考察不同煅烧处理的纳米级贝壳粉的抗菌活性,以期对贝壳粉高值化产品的开发与应用奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用材料为牡蛎壳、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。牡蛎壳采集自烟台市当地海鲜市场;大肠杆菌、金黄色葡萄球菌由烟台大学微生物菌种保藏实验中心提供。

1.2 仪器设备

本研究所用仪器设备如下:高温窑炉(BTH-GDY-S03J),购于景德镇百陶会陶艺装备有限公司;行星式球磨机(Pulverisette6),购于德国飞驰仪器公司;扫描电子显微镜(SEM),JSM-7610F,购于日本电子株式会社;电位仪(ZeTa,ZS90),购

收稿日期:2023-06-30;修回日期:2023-05-30

基金项目:山东省现代农业产业技术体系建设专项资金(SDAIT-26);烟台市校地融合项目(2020);烟台大学大学生创新创业训练计划(YD2021085)

通信作者简介:孙利芹(1973—),女,教授,硕士研究生导师,博士,研究方向为海洋生物资源的高值化利用。E-mail:sliqin2005@163.com

于英国马尔文仪器有限公司;能谱仪(EDS, NS7),购于赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米级贝壳粉制备方法与方案设计

1) 牡蛎壳的前处理

牡蛎壳去肉清洗,用1%的稀盐酸浸泡0.5 h,纯净水冲洗后阴干12 h,80 ℃烘干6 h至干燥,用橡皮锤敲成小块,再用多功能粉碎机粉碎5 min后过150目筛,得到未煅烧的150目牡蛎壳粉。

2) 球磨工艺参数的优化实验

将经过前处理的牡蛎壳粉,在行星式球磨机中进行分级球磨。具体方法为:在 ZrO_2 球磨罐中按照物料比1:5加入球磨助剂,研磨介质为 ZrO_2 球磨珠(初磨3 mm,复磨0.2 mm)。在其它工艺条件固定的条件下,采用单因素实验设计,分别考察球磨助剂(不使用球磨助剂、纯净水和无水乙醇)、球磨转速(400、450、500、550、600 $r \cdot \min^{-1}$)以及球磨时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)对贝壳粉平均粒径的影响,优化球磨工艺参数。

3) 煅烧工艺实验

将前处理的牡蛎壳粉置于高温窑炉中,分别设置煅烧温度和时间,煅烧完成后自然冷却至室温,采用最佳球磨工艺球磨,进行粒径比较。在给定条件下,采用单因素实验设计,以贝壳粉平均粒径为考察指标,分别考察煅烧温度(分别为600、900、1100 ℃)和煅烧时间(分别为1、2、3、4 h)对贝壳粉球磨难易程度的影响。

4) 纳米贝壳粉性质的表征

贝壳粉微观形态表征,采用扫描电镜(SEM)分析,将贝壳粉均匀分散在铜台上,并喷金,扫描电压为10.0 kV。贝壳粉平均粒径测定,采用电位仪(Zeta)对贝壳粉平均粒径进行测量,测试三次,取平均粒度。贝壳粉元素分析,采用能谱仪(EDS)分析,实验时设置加速电压10.0 kV。

1.3.2 抑菌实验方案设计

采用管碟法(牛津杯法)的双层平板法进行单因素抑菌试验^[12],通过交叉法测定抑菌圈的直径大小,判定抑菌效果的强弱。在给定条件下,采用单因素实验设计,以抑菌圈直径为考察指标,分别考察煅烧温度(600、900、1100 ℃)、平均粒径(200、500、1000 nm左右)和贝壳粉添加质量分数(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0%)对贝壳粉抑菌效果的影响。

牛津杯法双层平板实验步骤如下:受试菌在37 ℃下活化20 h,控制菌悬液浓度为 1×10^7 CFU \cdot mL⁻¹,下层平板为15 mL LB培养基,上层平板为5 mL混有受试菌的LB培养基,将牛津杯轻轻放置在上层培养基上,在牛津杯中分别加入贝壳粉悬液200 μ L,置于37 ℃培养箱中培养24 h,设3个生物学重复,使用游标卡尺测量透明抑菌圈直径。

1.4 数据处理

使用SPSS 20.0分析实验数据,结果以平均值 \pm 标准差表示,并作单因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,使用Origin 2022作图。

2 结果分析与讨论

2.1 球磨工艺参数的优化

2.1.1 球磨助剂的选择

本研究分别比较了干磨和湿磨两种球磨方式对贝壳粉平均粒径的影响(图1),结果显示,湿磨的方式更容易获得平均粒径在100 nm级的牡蛎壳粉,且重复性较好;高喆等^[13]曾报道在高能球磨制备 ZrO_2 复合材料时采用无水乙醇作球磨分散剂,对比纯净水和乙醇两种研磨助剂,发现其对贝壳粉平均粒径没有明显的影响,考虑到无水乙醇作为助磨剂会增加 ZrO_2 球磨珠的损耗,因此在后续实验中采取以水为助磨剂的湿磨法进行球磨。

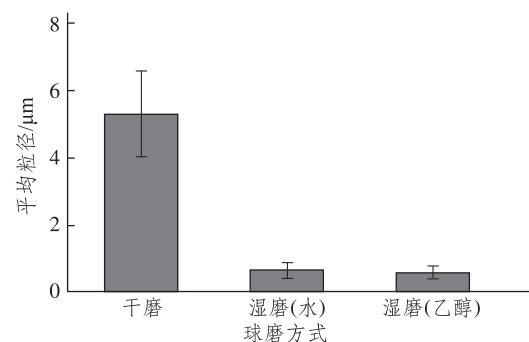


图1 球磨方式对贝壳粉平均粒径的影响

Fig.1 The influence of ball milling method on the average particle size of shell powder

2.1.2 球磨转速的确定

球磨转速是影响材料粒径的重要因素之一。

图 2 展示了球磨转速对牡蛎贝壳粉平均粒径的影响,结果显示,随着球磨转速的增加,颗粒平均粒径逐渐减少,当转速达到 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 后,粒径变化趋于平稳,在转速达到 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,贝壳粉平均粒径最小,达到 516 nm ,故后期选择 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的球磨转速。

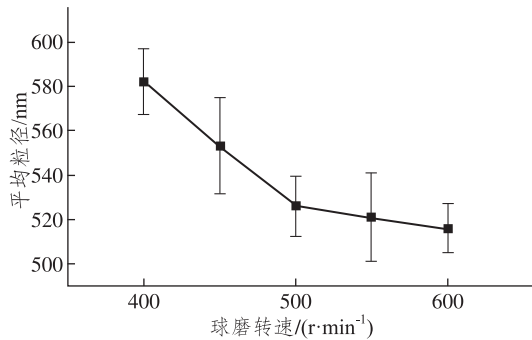


图 2 球磨转速对牡蛎贝壳粉平均粒径的影响

Fig.2 The effect of ball grinding speed on the average particle size of shell powder

2.1.3 球磨时间的确定

初磨和复磨工艺下贝壳粉平均粒径随时间的变化见图 3。由图 3 可知,随着球磨时间的延长,贝壳粉的平均粒径下降,当初磨时间大于 2.5 h 后,球磨时间对粒径影响曲线趋于平稳,此时贝壳粉的平均粒径达到 510 nm (图 3(a));复磨时间与平均粒径的关系曲线显示(图 3(b)),研磨时间为 3 h 时,贝壳粉的平均粒径已经降到 100 nm 以下(实际为 91 nm)。

2.1.4 最佳球磨工艺条件

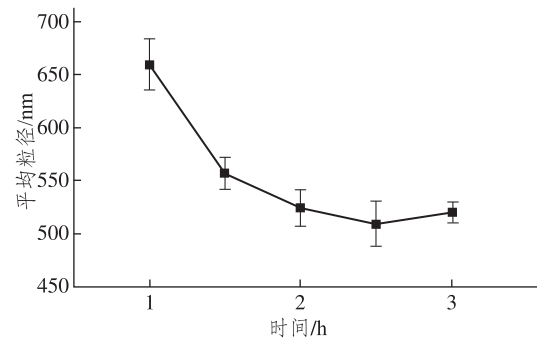
综合上述球磨工艺参数对贝壳粉平均粒径的影响,确定最佳的球磨工艺条件为:以纯净水为球磨助剂,研磨转速为 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,初磨时间为 2.5 h ,复磨时间为 3 h ,此工艺条件下可以获得平均粒径 100 nm 以下的纳米级贝壳粉材料。与王亚会等^[14]报道的结果($450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 25 h 达到 $19.88 \mu\text{m}$ 粒径)相比,本研究确定的工艺条件既减少了时间又节约了能耗。

2.2 煅烧工艺对贝壳粉平均粒径的影响

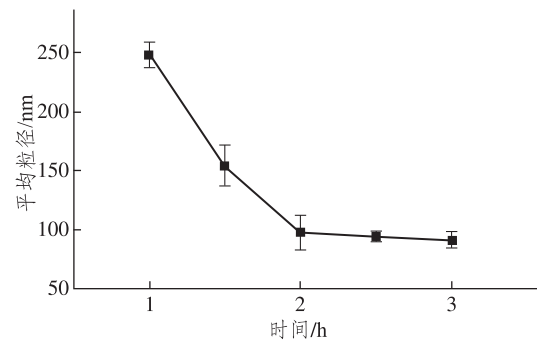
2.2.1 煅烧温度对贝壳粉平均粒径的影响

煅烧温度的不同会导致贝壳粉材料的化学性质发生改变,从而影响贝壳粉的粒径。图 4 为不同煅烧温度对贝壳粉平均粒径的影响,在相同的球磨工艺条件下,低温煅烧($600 \text{ }^\circ\text{C}$)和过高的煅烧温

度($1100 \text{ }^\circ\text{C}$)都不利于纳米级贝壳粉的制备, $900 \text{ }^\circ\text{C}$ 煅烧处理组,可以获得平均粒径为 137.1 nm 的贝壳粉材料。分析原因,低温煅烧处理其组成成分含有少量糖、蛋白质、甲壳素等有机物质,不利于球磨,而过高的煅烧温度,材料化学成分发生变化,材质变硬,影响球磨的效果,具体的变化需要进一步借助扫描电镜等对贝壳粉形态进行观察分析。



(a) 初磨时间的影响



(b) 复磨时间的影响

图 3 球磨时间对牡蛎贝壳粉平均粒径的影响

Fig.3 The effect of ball grinding time on the average particle size of shell powder

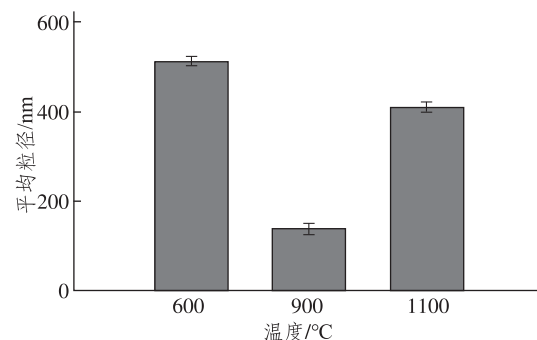


图 4 不同煅烧温度对贝壳粉平均粒径的影响

Fig.4 The influence of different calcination temperatures on the average particle size

2.2.2 煅烧时间对贝壳粉平均粒径的影响

图 5 为不同煅烧时间对贝壳粉平均粒径的影

响,当煅烧时间为 2 h 时,牡蛎壳粉平均粒径达到 137.1 nm,球磨难度最小。同时结合文献[15]分析,当煅烧时间达到 2 h 之后,贝壳粉活化性能变化不大,此时煅烧已完全。

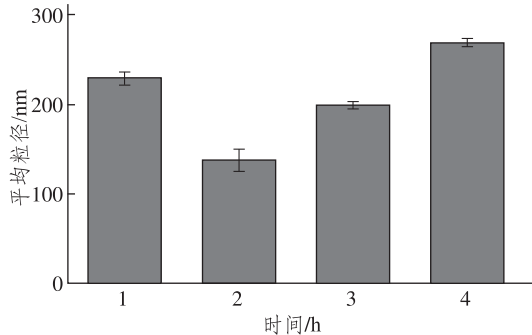


图 5 不同煅烧时间对贝壳粉平均粒径的影响

Fig.5 The influence of different calcination time on the average particle size

2.2.3 最佳煅烧工艺的确定

综合上述两个煅烧工艺参数对贝壳粉平均粒径的影响,确定最佳的煅烧工艺条件为:煅烧温度

900 °C,煅烧时间 2 h,此工艺条件可以在节约能耗的同时获得平均粒径 100~150 nm 的纳米级贝壳粉材料。

2.3 不同煅烧温度处理的贝壳粉结构性质表征

2.3.1 形态结构表征

将不同煅烧温度下的球磨样品采用扫描电镜(SEM)进行形态结构观察,如图 6 (a)~(c)所示。由图 6 可见,低的煅烧温度(600 °C 以下),电镜下贝壳粉的结构近似于球形,排列规则;煅烧温度为 900 °C 和 1100 °C 时,贝壳粉结构不规则,含有颗粒较大的立方晶体与颗粒较小的针状晶体,这与图 4 粒径的测定结果相吻合。结合文献[16—17]分析,高温煅烧后 CaCO_3 转变为 CaO ,且有机物质高温炭化后生成 CO_2 逸出,贝壳粉微观结构发生坍塌缩聚,纳米颗粒的团聚状态加重,硬度随之增加,这个分析结果与本文 2.2.1 节的结果相一致。因此,这种情况下如果想要获得更小粒径的纳米级贝壳粉材料,需要在研磨工艺上进一步改进。

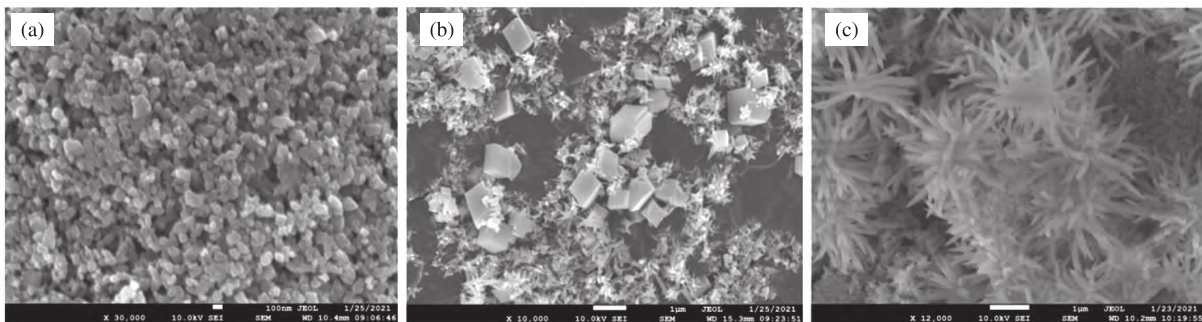


图 6 600 °C (a)、900 °C (b)、1100 °C (c) 煅烧下的贝壳 SEM 图像

Fig.6 SEM image of shells calcined of 600 °C (a), 900 °C (b), 1100 °C (c)

2.3.2 不同煅烧温度处理贝壳粉的元素分析

将不同煅烧温度下的球磨样品利用能谱仪进行元素组成分析,检测其元素组成(图 7)。结合文献以及图 7 (a)~(c)所示,随着煅烧温度的不断上升, CaCO_3 逐渐转化为 CaO ,且 CaO 接触空气中的 H_2O 之后生成 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [17]。此外,在四种煅烧温度下的煅烧样品中均出现了锆元素,推测锆元素可能由于球磨过程中研磨球的表面损耗(本实验研磨球采用 ZrO_2 珠)导致部分锆元素进入样品,故应排除此元素。

2.4 纳米贝壳粉抑菌活性研究

2.4.1 不同煅烧温度处理的贝壳粉抑菌效果

不同煅烧温度对贝壳粉抑菌效果的影响见图 8。如图 8 所示,低温(600 °C)煅烧获得的贝壳粉不具有抑菌活性,随着煅烧温度的提高,牡蛎贝壳粉对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果明显增强,煅烧温度超过 900 °C 以后,抑菌效果明显增强,在同一粒径下(平均粒度为 212.4 nm),煅烧温度 1100 °C 处理的贝壳粉对大肠杆菌的抑菌效果比 600 °C 处理组高出 200%。Aertsen 等[18]和 Torres 等[19]曾报道,高温煅烧使贝壳粉的微观结

构发生变化,贝壳粉的性质也随之发生改变,具有更好的稳定性和抑菌活性。本实验结果与他们的研究结论相似。另外,结合前面的元素分析可知,当煅烧温度达到 900 °C 及以上时,贝壳粉成分中的生物碳酸钙转化为 CaO,细菌生长的环境 pH

值由 7 升高到 9~10,阻碍了细菌的正常生长,并且贝壳粉的 CaO 晶型发生变化,形成大量孔隙通道,比表面积大^[20],有助于抑菌活性的展现,所以表现出较好的抑菌效果。

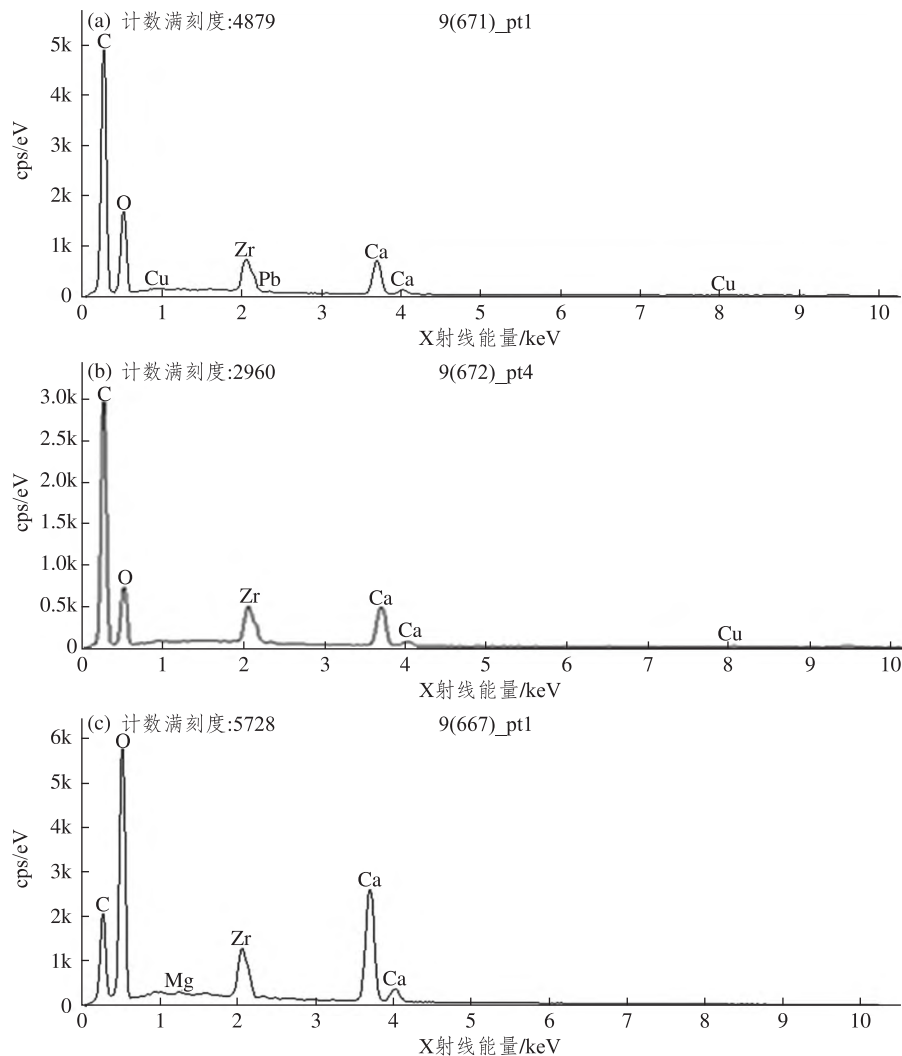


图 7 600 °C (a)、900 °C (b)、1100 °C (c)煅烧下的贝壳 EDS 分析

Fig.7 EDS analysis of shells calcined of 600 °C (a), 900 °C (b), 1100 °C (c)

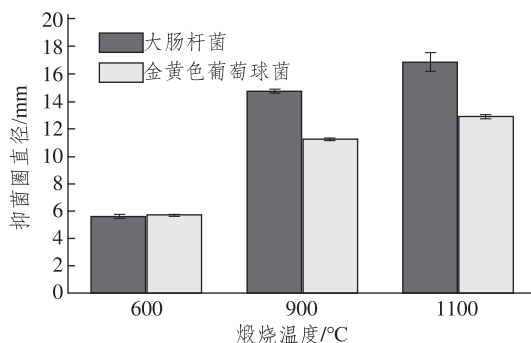


图 8 不同煅烧温度对贝壳粉抑菌效果的影响

Fig.8 Effect of different calcination temperatures on the bacteriostatic effect of shell powder

2.4.2 贝壳粉平均粒径对抑菌效果的影响

选取抑菌效果最好的 1100 °C 煅烧处理组的牡蛎壳为实验材料,进一步考察平均粒径对抑菌效果的影响(图 9)。如图 9 所示,三种粒径的贝壳粉表现的抑菌效果差异不显著($P>0.05$)。又结合 2.1 和 2.2 节的结果可知,在最佳的球磨工艺条件下,1100 °C 煅烧样品虽然没有达到 100 nm,但对抑菌效果没有显著影响。因此综合分析,选用 1100 °C 煅烧处理的样品进一步考查添加浓度对抑菌活性的影响。

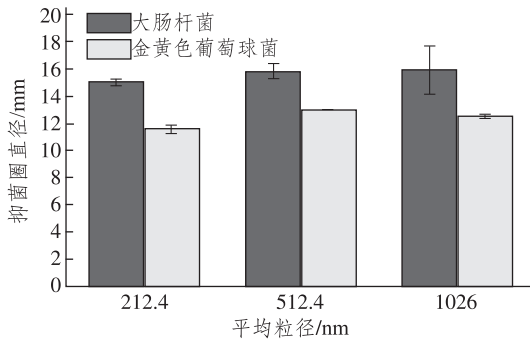


图9 不同平均粒径对贝壳粉抑菌效果的影响

Fig.9 Effect of different average diameter on the bacteriostatic effect of shell powder

2.4.3 贝壳粉添加质量分数对抑菌效果的影响

选取经 1100 °C 煅烧处理的牡蛎壳粉为实验材料,进一步考察贝壳粉添加的质量分数对抑菌效果的影响,结果如图 10 所示。贝壳粉添加对两种常见致病菌都表现出较好的抑菌效果,且低质量分数时抑菌效果与添加的质量分数呈正相关关系,随着贝壳粉质量分数的增大,抑菌活性增大,质量分数为 2% 时,抑菌圈达到最大值,抑菌效果最佳。

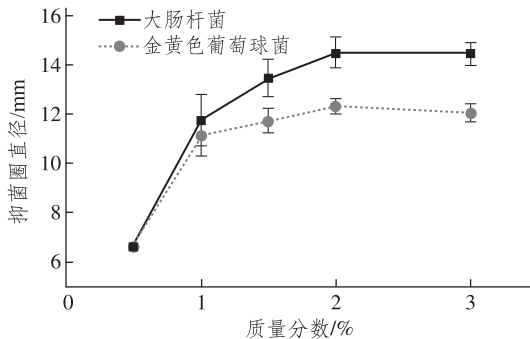


图10 不同贝壳粉添加的质量分数对抑菌效果的影响

Fig.10 Effect of different shell powder addition concentrations on bacteriostatic effect

3 结论

本研究以纳米级牡蛎贝壳粉的制备为目的,获得了最佳的球磨工艺条件:采用纯净水为球磨助剂,研磨转速 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,球磨时间 5.5 h,可以获得平均粒径 91 nm 左右的贝壳粉;在煅烧温度 900 °C,煅烧时间 2 h 的预处理条件下,最有利于球磨,此条件下生产成本低、能耗少。贝壳粉性

质表征和抑菌实验结果表明,不同的煅烧温度处理主要会引起贝壳粉化学成分的变化,从而影响到其抑菌效果;1100 °C 煅烧处理组的纳米贝壳粉材料由于成分以 CaO 为主,并且贝壳粉的 CaO 晶型发生变化形成大量孔隙通道,更有助于其抑菌活性的展现;平均粒径在纳米级以下的贝壳粉,粒径大小对抑菌效果没有显著的影响,贝壳粉添加质量分数对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌效果皆在添加量为 2% 时抑菌效果达到最佳,生产抑菌类产品时应将最佳球磨工艺条件中的煅烧温度定为 1100 °C。本研究结果将为实现贝壳粉资源的高值化开发利用提供一条有效的途径。

参考文献:

- [1] 于秀娟,徐乐俊,吴反修.中国渔业年鉴[M].北京:中国农业出版社,2020:203.
- [2] 陈文韬.牡蛎壳组成特性及其综合利用研究[D].福州:福建农林大学,2013.
- [3] 胡兴娟,沈飏,余辉,等.不同贝壳煅烧粉的杀菌及抑菌效果[J].食品工业科技,2018,39(24):76-79.
- [4] 王珏.改性贝壳粉/La-TiO₂的制备及光催化降解有机磷农药废水的研究[D].沈阳:沈阳建筑大学,2019.
- [5] 盖广清,祁庶瑒.高温煅烧贝壳粉的抗菌性能研究[J].吉林建筑大学学报,2022,39(1):38-42.
- [6] 冯春晖,黄贺杰,徐兵,等.贝壳粉煅烧工艺初探[J].山东化工,2019,48(19):22-23.
- [7] 柳滢春,黄勇,张娜,等.纳米孔活化贝壳粉的制备工艺优化研究[J].化学工程师,2020,34(7):10-12.
- [8] POPOK V N, KYLIÁN O. Formation of advanced nanomaterials by gas-phase aggregation[J]. Applied Nano, 2021, 2(1): 82-84.
- [9] 金志行,李响,李忠星,等.g-C₃N₄负载 SnO₂ 纳米材料制备及光催化性能研究[J].四川化工,2021,24(6):13-16.
- [10] 王小玉.四氧化三钴纳米材料制备路线的研究进展[J].材料导报,2021,35(S2):64-67.
- [11] 刘利萍,刘勇兵,姬连峰,等.球磨工艺对原位合成纳米级 TiB 的影响[J].稀有金属材料与工程,2016,45(5):1157-1161.
- [12] 钱存柔.微生物学实验教程[M].2版.北京:北京大学出版社,2013:12-14.
- [13] 高喆,艾德生,赵昆,等.高能球磨法制备氧化锆-硬脂酸系相变储能材料[J].武汉理工大学学报,2007(10):83-88.
- [14] 王亚会,高文元,唐玲,等.高能球磨时间对牡蛎贝

- 壳粉体性能与结构的影响[J].大连工业大学学报, 2017, 36(4): 295-299.
- [15] 王亚会. 贝壳粉的改性及应用研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2016.
- [16] 薛瑶佳, 黄文豪, 白书立, 等. 染料废水的贝壳粉负载铁-钴双金属催化降解[J]. 印染, 2021, 47(7): 63-66.
- [17] 马国俊, 丁雨田, 金培鹏. 球磨工艺对 $Mg_2B_2O_5$ /6061Al基复合材料微观组织演变及力学性能的影响[J]. 稀有金属材料与工程, 2016, 45(6): 1430-1436.
- [18] AERTSEN A, HOUDT R V, VANOIRBEEK K, et al. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(18): 6133-6141.
- [19] TORRES J, VELAZQUEZ G. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods [J]. *Journal of Food Engineering*, 2004, 67(1): 95-112.
- [20] 谢新媛. 煤燃烧过程固硫剂的研究进展[J]. 化工进展, 2004, 23(10): 1062-1066.

Preparation of Nanoshell Powder and Its Bacteriostatic Activity

CUI Yanjun, SHENG Hongzhao, WANG Xiangying, LIU Pujie, TIAN Li, SUN Kunchang, SUN Liqin

(School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The shellfish resources in China are extremely rich. The by-products of shellfish processing have unique microstructure, and contain a variety of active components, which are of great value for development and utilization. The optimal technological parameters for preparation of nano-oyster shell powder were determined by optimizing the ball milling process conditions, namely, the calcination temperature was 900 °C, the calcination time was 2 h, the purified water was used as the ball milling assistant, the grinding speed was 600 r · min⁻¹, and the total grinding time was 5.5 h (Initial grinding time 2.5 h and regrinding time 3 h). Shell powder with an average diameter of 91 nm can be obtained. The experimental results of calcination pretreatment showed that the optimal calcination temperature and time were 900 °C and 2 h, respectively, which were conducive to ball milling. Then the properties of the prepared nano-shell powder were characterized, and it was found that the main composition of shell powder was CaO when the calcination temperature was over 900 °C. And the crystal structure has a large number of pores, and the specific surface area is increased. The results of bacteriostatic experiment showed that the oyster shell powder had better antibacterial effect on gram negative bacteria and gram positive bacteria. In addition, the material calcined at 1100 °C had a better antibacterial effect. And when the concentration of oyster shell powder was added at 2%, the antibacterial effect became stable.

Keywords: oyster shell powder; nano-materials; ball milling process; calcination process; bacteriostatic activity

(责任编辑 李维卫)