

载纳米银丝蛋白/海藻酸钠海绵的制备及表征

陈 雍, 赵 朋, 邓 超, 陈敬华*

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以丝蛋白(SF)和海藻酸钠(SA)为基质构建新型负载纳米银生物敷料。以SF溶液为稳定剂,采用紫外光照射法合成了纳米银,加入SA后,经氯化钙/乙醇/水(摩尔比,1:71:77)处理3 h,将上述材料润洗冻干后得到负载纳米银的SF/SA复合海绵(AgNPs-SF/SA)。透射电子显微镜(TEM)观察显示,合成的纳米银平均粒径为 (5.03 ± 1.42) nm,在丝蛋白溶液中分布均匀。扫描电子显微镜(SEM)图像显示,与纯丝蛋白海绵相比,AgNPs-SF/SA显示连通的多孔结构。SA的加入增强了海绵的吸水性和保水性;在SF和SA的协同作用下,AgNPs-SF/SA的水蒸气透过率有所提高。以K-B扩散法和菌液培养法测定了AgNPs-SF/SA的抗菌性,结果显示,AgNPs-SF/SA对金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌的抗菌性优于阳性对照AQUACEL® Ag;24 h和48 h的菌液培养显示,AgNPs-SF/SA具有更持久的抗菌活性。综上所述,AgNPs-SF/SA的物理性能和抗菌性能优良,有望作为一种新型的抗菌生物敷料用于预防和治疗创面感染。

关键词:生物敷料;抗菌活性;丝蛋白;海藻酸;纳米银

中图分类号:R 318.08 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1689(2017)02-0200-07

Preparation and Characterization of Nano-Silver Loaded Fibroin/Alginate Sponge

CHEN Yong, ZHAO Peng, DENG Chao, CHEN Jinghua*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study aimed to fabricate a novel Ag nano-particles(AgNPs) loaded biologic dressing based on silk fibroin(SF) and sodium alginate(SA). AgNPs were first synthesized in the stabilizer, SF solution, under UV irradiation, and after the addition of SA, were then treated by CaCl_2 /ethanol/water (molar ratio, 1:71:77) for 3 h. After rinsing and freeze-drying, AgNPs loaded SF/SA composite sponge (AgNPs-SF/SA) was obtained. Transmission electron microscopy observation (TEM) showed that AgNPs were evenly distributed in the SF solution with a mean diameter of 5.03 nm. Scanning electron microscopy (SEM) images showed that compared with pure SF sponge, AgNPs-SF/SA had a linked porous structure. Addition of SA improved the water absorption and retention ability of the sponge and the synergistic effect of SF and SA increased the water vapor

收稿日期: 2015-02-08

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目(BY2014023-170)。

* 通信作者: 陈敬华(1971—),男,湖北黄石人,理学博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物大分子和生物功能材料的研究。

E-mail: jhchenwhut@126.com

引用本文: 陈雍,赵朋,邓超,等.载纳米银丝蛋白/海藻酸钠海绵的制备及表征[J].食品与生物技术学报,2017,36(02):200-206.

transmission rate. K-B disk diffusion and bacterial solution culture methods indicated that AgNPs-SF/SA possessed a higher and more continuous anti-bacterial potential than the positive control, AQUACEL® Ag, against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In conclusion, the excellent physical and anti-bacterial properties demonstrated that AgNPs-SF/SA could be a novel anti-bacterial biologic dressing for prevention and treatment of wound infection.

Keywords: biologic dressing, anti-bacteria potential, silk fibroin, alginate, nano-silver

感染是烧创伤护理过程中最为常见的并发症之一, 可以导致微生物入侵, 阻碍表皮组织的再生和修复, 延迟伤口愈合, 促使瘢痕形成, 甚至威胁患者的生命安全^[1-2]。因此, 预防和治疗创面感染始终是伤口修复的重要前提。目前, 通过创面局部应用广谱抗生素来防治感染会产生细菌耐药及可能存在过敏和毒性风险, 且临床上通常将抗菌材料与棉织物复合使用, 生物相容性差, 不利于创面的修复^[3-4]。因此, 制备载有安全、广谱抗菌剂的生物敷料对创面修复具有重要意义。

纳米银作为微生物抗菌剂具有悠久的历史, 因其本身具有持久、高效、广谱的抗菌优点, 在抗生素应用具有局限性的现状下受到广泛关注^[5]。由于具有独特的小尺寸效应和表面效应, 即使在低浓度下纳米银也能轻易进入病原体发挥杀菌作用^[6-8]。因此将纳米银引入以生物大分子材料为基质的生物敷料中能够提高敷料的抗菌性能。

丝蛋白是蚕丝经脱胶得到的一种无生理活性的天然高分子材料, 不仅来源丰富, 价格低廉, 而且具有良好的生物相容性, 生物可降解性, 能促进细胞的吸附及增长, 具有较低的炎症反应, 其在医用生物敷料、药物载体等方面的研究日趋广泛和深入^[9-10]。并且丝蛋白能作为稳定剂, 分散剂及催化剂在光照条件下还原纳米银, 为纳米银的引入提供了简便绿色的方法^[11]。但是一些研究表明用乙醇处理的丝蛋白海绵存在较高疏水性^[12], 冻干的丝蛋白海绵机械性能差^[13-14], 限制了其在医学材料领域的应用发展。海藻酸钠应用于医用敷料具有高吸湿性, 高透氧性及良好的生物降解性及生物相容性, 海藻酸钠的引入能改善复合材料的机械物理性能, 以满足复合材料在医学敷料方面的应用^[15]。

本研究中通过在丝蛋白溶液中合成纳米银和引入海藻酸钠, 制备了具有抗菌性能的纳米银丝蛋白/海藻酸钠复合海绵, 海藻酸钠的引入整体上改善

了复合海绵作为生物敷料的性能, 包括吸水性, 保水性和水蒸气透过率等。与银离子敷料相比, 此复合海绵的抗菌效果能持久。

1 材料与方法

1.1 原料及所用仪器

蚕茧, 购于安徽兄弟药业有限公司; 海藻酸钠 (CP, 相对分子质量 300 000), 国药集团 (上海) 化学试剂有限公司; 水解酪蛋白琼脂培养基 (M·H 琼脂培养基), 上海科玛嘉微生物技术有限公司产品; 水解酪蛋白肉汤培养基 (M·H 肉汤培养基), 广东环凯微生物科技有限公司产品; 金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌, 无锡市第三人民医院检测科提供; 其他试剂均购自国药集团 (上海) 化学试剂有限公司。AQUACEL® Ag 型银离子敷料购自康维德 (中国) 医疗用品有限公司。

UV-1800 型紫外可见分光光度计, 岛津国际贸易 (上海) 有限公司产品; JEM-2100 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司产品; S-4800 型扫描电子显微镜, 日本日立仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 丝蛋白溶液的制备 称取 10 g 剪碎的蚕茧, 置于煮沸的碳酸钠 (0.02 mol/L) 溶液 45 min, 用去离子水洗净, 烘干, 得到干燥脱胶的丝素蛋白。将干燥脱胶的丝素蛋白溶解于氯化钙/乙醇/水 (摩尔比 = 1:2:8) 溶液, 70 °C 水浴加热 1 h, 振荡, 使丝蛋白充分溶解, 待溶液冷却后, 12 000 r/min 离心 20 min, 除去不溶杂质, 透析 3 d, 得到干净脱胶丝蛋白溶液。在此方法下获得的丝蛋白, 其数均分子量为 110 000^[16]。

1.2.2 纳米银的合成 将 0.68 g/dL 硝酸银按体积比 1:4 加入 1.5 g/dL 丝蛋白溶液中, 置于 365 nm 紫外灯下反应 6 h, 即得到含纳米银的丝蛋白溶液。

1.2.3 载纳米银丝蛋白/海藻酸钠复合海绵的制备 3% 海藻酸钠溶液与上述含纳米银丝蛋白溶液按体

积比 1:1 混合,将共混溶液除去气泡注入模具中,置于-20 ℃中预冻 2 h,-80 ℃过夜,冻干。取出冻干样品,用氯化钙/乙醇/水(摩尔比=1:71:77)溶液浸泡处理,缓慢振荡 3 h,用去离子水洗净,冻干,得到含纳米银丝蛋白/海藻酸钠复合海绵。本实验中,0.006 g 海藻酸钠与 9.36×10^{-7} mol Ca^{2+} 发生交联,由此计算得到海藻酸钠羧基与 Ca^{2+} 的交联度近似为 6%。

1.2.4 纳米银及复合海绵的结构表征 取 2 mL 载纳米银丝蛋白溶液置于石英池中,用紫外-可见分光光度计在 200~900 nm 范围内扫描,记录图谱。用 JEM-2100 型透射电子显微镜观察粒子粒径与形态。用 S-4800 型场发射扫描电子显微镜在加速电压 1.0 kV 条件下观察材料形貌和纳米银分布。

1.2.5 复合海绵的吸水性、保水率及水蒸气透过率表征

1)平衡吸水倍率(g/g)^[17]:干燥海绵样品(W_0)在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)浸泡 30 min,待其完全溶胀后,轻轻拭去样品表面液体,称重(W_1)。样品平衡吸水倍率按式(1)计算:

$$\text{平衡吸水倍率(g/g)} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \quad (1)$$

2)保水率^[18]:将完全溶胀于磷酸盐缓冲液(pH=7.4)的样品(W_s)置于有滤网的离心管内,500 r/min 离心 3 min,称重(W)。样品保水率按式(2)计算:

$$\text{WR}(\%) = W \times 100\% / W_s \quad (2)$$

3)水蒸气透过率(WVTR)^[19]:参照美国标准局公布的 ASTM E96—00 方法,将干燥样品覆盖于装有 10 mL 去离子水的烧杯杯口,密封杯口边缘防止水汽损失,称重(W_0)然后置于干燥器中保持温度 37 ℃,相对湿度 79%。以无覆盖物的烧杯为空白对照,24 h 后取出称重(W_1),测烧杯表面积 A 。样品水蒸气透过率按式(3)计算:

$$\text{WVTR(g/(m}^2 \cdot \text{d))} = (W_1 - W_0) / A \quad (3)$$

1.2.6 复合敷料抗菌性能测定

1)抑菌圈法定性分析。取铜绿色假单胞菌和金黄色葡萄球菌于 M·H 肉汤培养基中复苏,在 37 ℃恒温培养箱中缓慢振荡(120 r/min),培养过夜。然后用 M·H 肉汤培养基将细菌悬浮液稀释至 600 nm 处 OD 值为 0.08~0.1。用灭菌后的棉球蘸取菌液,反复均匀的涂布于 M·H 琼脂培养基上,用镊子轻轻将直径 1.0 cm 的海绵样品贴在带菌培养基平板上,37 ℃孵箱中培养 24 h,测定抑菌圈大小。以含银商

品敷料 AQUACEL® Ag 作为阳性对照。用游标卡尺测量抑菌圈宽度,根据国标 GB/T 20944.1—2007 抗菌效果评价^[20]计算

$$H = (D - d) / 2 \quad (4)$$

上式中, H 为抑菌圈宽度; D 为抑菌带外径的平均值(mm); d 为样品直径(mm)。

2)试管法定量分析。取铜绿色假单胞菌和金黄色葡萄球菌于肉汤培养基中复苏,在 37 ℃恒温培养箱中缓慢振荡(120 r/min),培养过夜。然后用 M·H 肉汤培养基将细菌悬浮液稀释至 600 nm 处 OD 值 0.07,将直径为 1.0 cm 的海绵样品浸没在装有 2 mL 细菌悬浮液的灭菌试管中,在 37 ℃孵箱中培养 24 h,测细菌悬浮液 OD 值。以含银商品敷料 AQUACEL® Ag 作为阳性对照。

2 结果与讨论

2.1 纳米银的表征

2.1.1 紫外可见分光光度计(UV-vis)测定 如图 1 所示,在丝蛋白溶液中,纳米银在波长 430~450 nm 产生明显特征吸收峰,并且随着时间延长,纳米银吸收强度增强,表明随着反应时间的延长,越来越多的银被还原成的单质银聚集成纳米银,溶液中的银主要以纳米粒子的形式存在。该结果表明在丝蛋白溶液中利用光化学还原反应成功合成纳米银。Xiang 等^[11]在丝蛋白溶液中合成稳定的纳米银,能在避光或光照下保存 30 d,丝蛋白可以作为纳米银合成的良好稳定剂,分散剂及催化剂。纳米银可在自然光照反应合成,但是自然光照条件不易控制,紫外灯照射条件易控制,反应效率高,能快速合成纳米银^[11,21]。

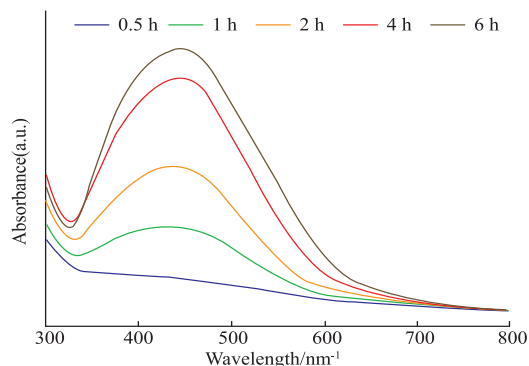


图 1 纳米银的紫外-可见光谱图

Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of nano-silver in the SF solution

2.1.2 透射电子显微镜(TEM)观察 如图 2 所示,所得纳米银近似球形,平均粒径(5.03 ± 1.42) nm,银均匀分散在丝蛋白溶液中,无团聚现象。在反应过程中丝蛋白可以作为纳米银合成的良好稳定剂,分散剂及催化剂,反应过程不需添加其他任何化学物质,减少反应过程中其他物质的形成与干扰。形成的纳米银粒径小,这有利于提高其与细胞的有效接触面积,使其发挥更强的抗菌性能^[7,22]。

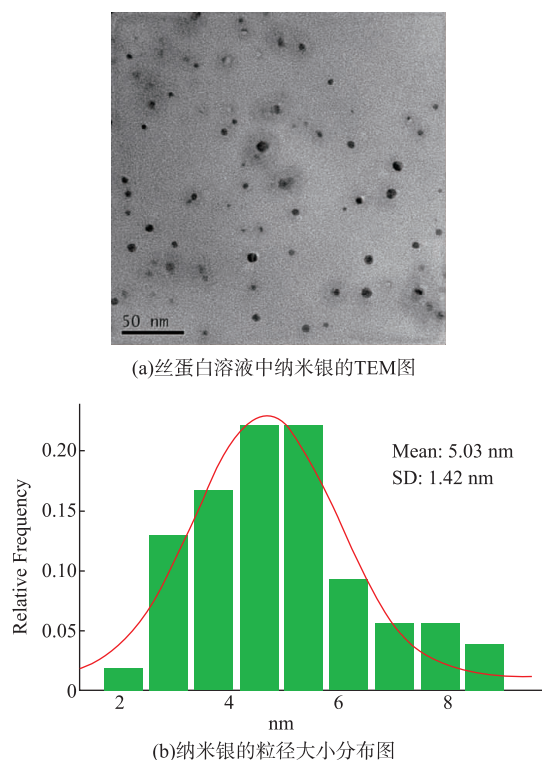


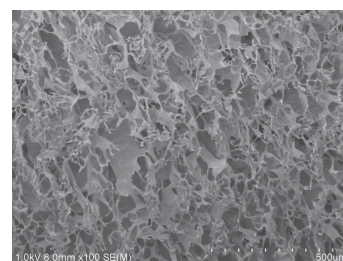
图 2 丝蛋白溶液中纳米银的 TEM 图和粒径大小分布图
Fig. 2 TEM image of the AgNPs in SF solution and distribution of particle size

2.2 复合海绵的形貌观察

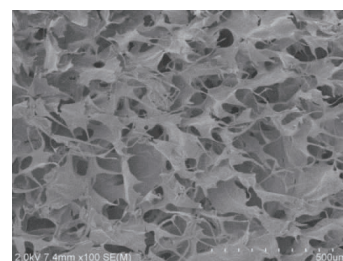
由图 3 可知,交联后的复合海绵样品的微观结构呈规则均一的多孔结构,相较于纯丝蛋白海绵样品,孔径增大且排列更加规则。孔径的增大提高了材料的吸水性和透气性,同时有利于细胞的吸附和纳米银的释放,增加了纳米银同细菌的接触反应起到抗菌效果,这为材料应用于生物敷料提供了有利条件。

2.3 海绵样品的吸水性、保水性及水蒸气透过率性能

由图 4(a)可知各个海绵样品均具有良好的吸水性能,且实验过程复合海绵能在极短时间内达到



(a)纯丝蛋白海绵SEM图

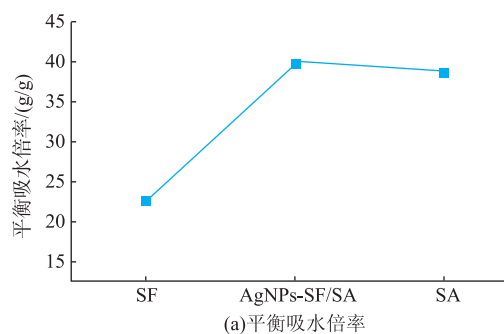


(b)AgNPs-SF/SA复合海绵SEM图

图 3 样品 SEM 图

Fig. 3 SEM images of sponges

溶胀平衡。纯丝蛋白本身具有较高的溶胀性能,溶胀平衡时吸水量是本身材料的 22.7 倍,复合海绵溶胀平衡的吸水量达到材料本身 39.7 倍,材料的吸水性明显得到提高。海藻酸钠的引入增加了材料的亲水基团。其次,材料的孔径也随之增大,使得吸水性增强,能有效吸取伤口渗液,为创面修复维持理想环境,同时减少感染风险。图 4(b)显示复合海绵的保水率较纯丝蛋白保水率有所提高,接近纯海藻酸钠保水率,亲水基团的增加及海藻酸钠的加入使海绵成规则片状网络结构,提高了样品的储水能力。图 4(c)结果表明复合海绵的水蒸气透过率均高于单组份海绵,较空白对照降低 $323.12 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 。避免了水蒸气的过度损失造成伤口过分干燥,同时也避免大量渗液积累延缓伤口愈合,为创面提供了一个相对湿润环境。



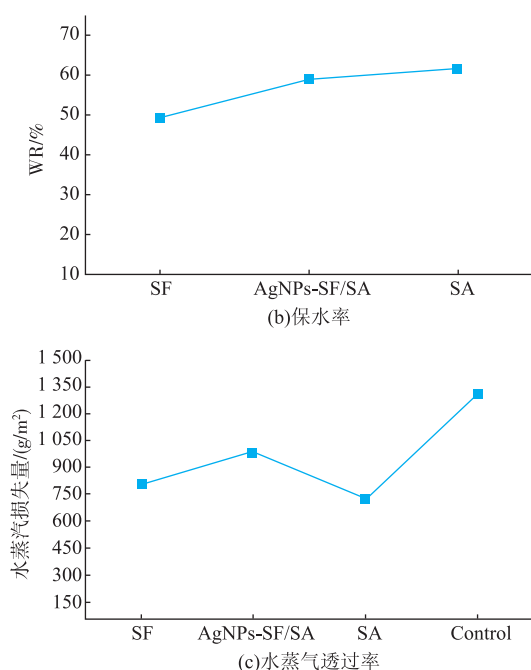


图4 海绵样品的物化性能

Fig. 4 Properties of homogenous SF, AgNPs-SF/SA composite and homogenous SA sponges

2.4 抑菌性能测定

金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌是伤口感染的常见革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌。由图5可见,复合海绵周围形成明显抑菌圈,对金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌的抑菌带宽度分别为 $(2.51 \pm 0.14) \text{ mm}$ 、 $(1.82 \pm 0.15) \text{ mm}$,未添加硝酸银的丝蛋白/海藻酸钠复合海绵周围无明显抑菌圈。根据国标 GB/T 20944.1—2007 抗菌效果评价^[20],结果表明 AgNPs-SF/SA 复合敷料对金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌的抗菌效果好。

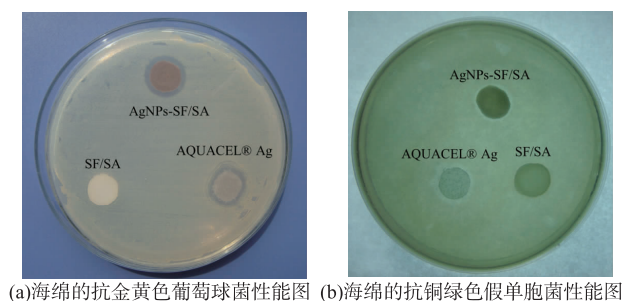
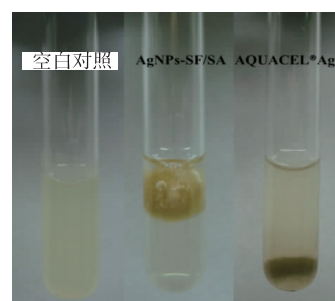


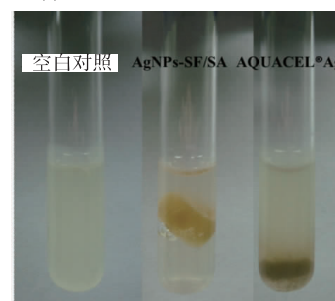
图5 平板法测定海绵的抗菌性能比较图

Fig. 5 Antimicrobial properties against *S. aureus* and *P. aeruginosa* as evaluated by the Kirby-Bauer method

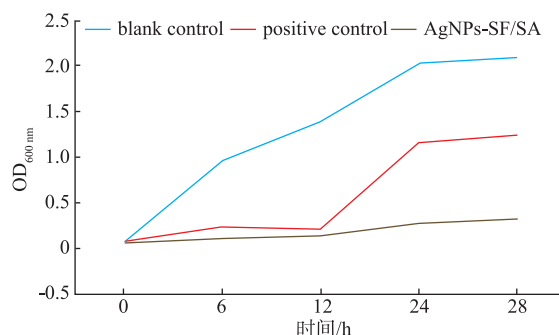
图6(a)与(b)分别为24 h时浸有样品与对照组的细菌生长情况图,图片显示 AgNPs-SF/SA 复合样品浸没的细菌悬浮液颜色清亮,表明很少细菌繁殖,空白对照呈浑浊状态,表明细菌生长良好,与平板法所得结果相应。图6(c)与(d)分别为各时间点所对应的 OD 值,结果显示在 12 h 时样品浸没的金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌细菌悬浮液 OD 值分别为 0.13 和 0.10,均与阳性对照无显著性差异,与阴性对照具有显著性差异。在 12 h 以后阳性对照浸没的金黄色葡萄球菌及铜绿色假单胞菌细菌悬浮液 OD 值均显著上升,在 24 h 时分别达到 1.15 和 1.13,样品浸没的铜绿色假单胞菌悬浮液 OD 值上升至 0.7,由此可知样品对金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌均具有高效、持久的抗菌效果,抗菌效果均优于阳性对照,且对金黄色葡萄球菌的抗菌效果优于铜绿色假单胞菌。



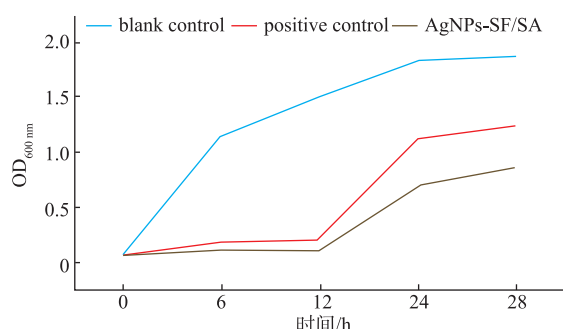
(a) 24 h 金黄色葡萄球菌悬浮液图



(b) 24 h 铜绿色假单胞菌悬浮液图



(c) 不同时间点金黄色葡萄球菌悬浮液 OD 值



(d)不同时间点铜绿色假单胞菌悬浮液OD值

图 6 24 h 金黄色葡萄球菌与铜绿色假单胞菌悬浮液图及不同时间点金黄色葡萄球菌和铜绿色假单胞菌悬浮液 OD 值

Fig. 6 Photos of *S. aureus* and *P. aeruginosa* solutions after the growth for 24 h and the time courses of OD values of *S. aureus* and *P. aeruginosa* solutions

3 结 语

本研究中利用光学还原法在可溶性丝蛋白溶液中合成纳米银,并通过氯化钙/乙醇/水交联得到载纳米银丝蛋白/海藻酸钠复合海绵。纳米银在丝蛋白溶液中分散性好,无团聚现象,平均粒径在 5.03 nm,所得到的该复合材料具有均一的多孔结构,且具有较高的吸水性和保水率,水蒸气透过率良好,对典型的创面感染细菌金黄色葡萄球菌及铜绿色假单胞菌敏感性强,抑菌效果良好,有望成为新型的纳米银抗菌生物敷料。

参考文献:

- [1] SEETHARAMAN S, NATESAN S, STOWERS R S. A PEGylated fibrin-based wound dressing with antimicrobial and angiogenic activity[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(7): 2787-2796.
- [2] BARAJAS N L A, LOPEZ A J, ROQUE I F M. Antibiotic prophylaxis for preventing burn wound infection[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(6): D8738.
- [3] OVINGTON L G. The truth about silver[J]. *Ostomy Wound Manage*, 2004, 50(9A Suppl): 1S-10S.
- [4] ZENG Xiaofeng, WEI Kun, HAN Xue. Preparation and properties of chitosan/polyvinyl alcohol loaded with nano-silver for wound dressing[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(8): 1413-1416. (in Chinese)
- [5] RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(1): 76-83.
- [6] MADHUMATHI K, SUDHEESH K P T, ABHILASH S. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2010, 21(2): 807-813.
- [7] MORONES J R, ELECHIGUERRA J L, CAMACHO A. The bactericidal effect of silver nanoparticles[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(10): 2346-2353.
- [8] SONDI I, SALOPEK S B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria[J]. *Journal of Colloid Interface Science*, 2004, 275(1): 177-182.
- [9] WENK E, MERKLE H P, MEINEL L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 150(2): 128-141.
- [10] REN Y, ZHOU Z, LIU B. Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 44(4): 372-378.
- [11] FEI X, JIA M, DU X. Green synthesis of silk fibroin-silver nanoparticle composites with effective antibacterial and biofilm-disrupting properties[J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(12): 4483-4488.
- [12] WONGPANIT P, RUJIRAVANIT R. Combinatorial effects of charge characteristics and hydrophobicity of silk fibroin on the sorption and release of charged dyes[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2012, ahead-of-print (ahead-of-print): 1-17.
- [13] TIYABOONCHAI W, CHOMCHALAO P, PONGCHAROEN S. Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds[J]. *Fibers and Polymers*, 2011, 12(3): 324-333.

- [14] KIM M K, KWAK H W, KIM H H. Surface modification of silk fibroin nanofibrous mat with dextran for wound dressing[J]. **Fibers and Polymers**, 2014, 15(6): 1137-1145.
- [15] ZHAN Yizhen, ZHU Ping, ZHAO Xue. The preparation and development of alginate fiber in medical dressings[J]. **Technical Textiles**, 2007, 25(8): 39-44. (in Chinese)
- [16] CHO H J, KI C S, OH H, et al. Molecular weight distribution and solution properties of silk fibroins with different dissolution conditions[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012, 51(3): 336-341.
- [17] MAO J S, ZHAO L G, YIN Y J. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds[J]. **Biomaterials**, 2003, 24(6): 1067-1074.
- [18] HE Lanzhen, LIU Yi, YANG Dan. The Preparation and performance of the sponge of chitosan-gelatin [J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2006, 13(1): 45-48. (in Chinese)
- [19] American National Standards Institute. ASTM E96-00. Standard test methods for water vapor transmission of materials [S]. Philadelphia: ASTM, 2000.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20944. 1-2007 纺织品 抗菌性能的评价 第 1 部分: 琼脂扩散法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [21] LU Z, MENG M, JIANG Y. UV-assisted in situ synthesis of silver nanoparticles on silk fibers for antibacterial applications[J]. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2014, 447: 1-7.
- [22] RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. **Biotechnology Advances**, 2009, 27(1): 76-83.

科技信息

欧盟食品安全局重新评估琼脂作为食品添加剂的安全性

据欧盟食品安全局 (EFSA) 消息, 2016 年 12 月 21 日欧盟食品安全局就琼脂作为食品添加剂的安全性再次发布意见。

欧盟专家组对琼脂的安全性进行评估发现, 琼脂的基因毒性不会对人体构成影响, 大鼠、小鼠实验也未发现致癌性, 口服实验也未发现显著的副作用。因此专家组得出结论认为, 没有必要制定琼脂 ADI 值, 琼脂作为食品添加剂无食品安全风险。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟食品安全局重新评估琼脂作为食品添加剂的安全性 [EB/OL]. (2016-12-26). <http://news.foodmate.net/2016/12/409846.html>