

低温等离子体辅助聚乳酸表面接枝乳酸链球菌素 及抗菌性

户帅锋^{1,2} 王洁卿² 李鹏辉^{1,2} 高明² 韦宗伟² 王怀雨^{1,2} 王喆²

¹(深圳市中科摩方科技有限公司 深圳 518114)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 该文主要通过低温等离子体处理聚乳酸薄膜, 并研究了不同处理时间(0、15 s、30 s、45 s 和 60 s)后薄膜的表面形貌及亲水性。在此基础上, 将低温等离子体处理后的聚乳酸薄膜浸泡到乳酸链球菌素溶液中, 对其抗菌性能进行测定。通过调节等离子体处理时间, 可以明显改善聚乳酸薄膜的表面亲水性及粗糙度。结果表明, 随着处理时间的增加, 聚乳酸薄膜表面粗糙度先增加后减小, 接触角先降低后增加。经过 60 s 低温等离子体处理的聚乳酸薄膜, 浸泡乳酸链球菌素溶液进行接枝, 可有效降低单核增生李斯特菌的菌落总数。因此, 低温等离子体处理聚乳酸薄膜, 为其在食品抗菌包装领域提供了一个非常好的思路。

关键词 低温等离子体; 聚乳酸; 乳酸链球菌素

中图分类号 TB 34 O 636.9 **文献标志码** A

Nisin-Coated Polylactic Acid Film Facilitated by Cold Plasma

HU Shuairong^{1,2} WANG Jieqing² LI Penghui^{1,2} GAO Ming² WEI Zongwei²
WANG Huaiyu^{1,2} WANG Zhe²

¹(China Morefound Technology Ltd., Shenzhen 518114, China)

²(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract The research focuses on the effect of cold plasma treatment on polylactic acid film with different time (0, 15 s, 30 s, 45 s and 60 s), to determine the film morphology and hydrophilicity. Based on that, the polylactic acid films treated with cold plasma were immersed in nisin solution, and the antimicrobial activity was evaluated. The results indicate that cold plasma time can significantly change the hydrophilicity and roughness of the film surface. Moreover, it is found that with the cold plasma time increases, the roughness firstly increases and then decreases, whereas, the water angle initially decreases and then increases. Furthermore, the polylactic acid films with 60 s cold plasma treatment present a better antimicrobial

收稿日期: 2018-04-09 修回日期: 2018-05-25

基金项目: 深圳市海外高层次人才孔雀团队项目(KQTD2016030111500545); 深圳市技术攻关项目(SY69512); 深圳市海外高层次人才创新创业专项基金(SY8A202)

作者简介: 户帅锋, 硕士, 研究助理, 研究方向为高分子薄膜; 王洁卿, 学士, 研究方向为可食膜制备; 李鹏辉, 博士, 副研究员, 研究方向为高分子材料; 高明, 硕士, 工程师, 研究方向为等离子体技术; 韦宗伟, 学士, 研究方向为多糖抗菌; 王怀雨, 博士, 研究员, 研究方向为材料表面改性; 王喆(通讯作者), 博士, 高级工程师, 研究方向为食品储藏保鲜, E-mail: zhe.wang@siat.ac.cn.

ability against *Listeria monocytogenes*. Herein, it is concluded that cold plasma treatment can improve the applicability of polylactic acid film in antimicrobial food packaging.

Keywords cold plasma; polylactic acid; nisin

1 引言

抗菌活性包装是目前食品及材料领域研究开发的一个前沿和热点, 是将抗菌剂混入高聚物包装材料中, 使其具有抗菌活性的包装方法。抗菌活性包装可以缓慢地释放出抗菌剂, 在包装内部维持长期稳定的抗菌剂浓度, 达到抗菌防腐的目的, 以逐渐减少或代替向食品中加入的防腐剂^[1]。其替代了传统的向食品中添加抗菌剂的食品保藏方法, 能长时间保持食品的营养和风味, 延长货架期, 提高安全性, 能够有效解决高水分活度食品的抗菌防腐难题。

目前应用的抗菌活性包装分为两类: (1) 将抗菌剂包埋在基材内部或直接涂抹在表面, 通过向食品表面释放抗菌剂实现抗菌活性, 同时又通过控制抗菌剂的迁移溶出速率, 实现持续性抗菌; (2) 将抗菌剂分子与基材通过化学键等方式结合, 固定在基材表面, 使其不溶出, 通过材料与食品的紧密接触来实现抗菌活性, 并阻止环境中微生物对食品的侵蚀, 能够长期保持抗菌活性^[2]。

抗菌包装体系主要包括包装基材、抗菌剂和食品三个部分。食品的货架期除受自身因素影响外, 还取决于包装材料的特性。但现在常用的塑料包装不易降解, 容易造成白色污染, 所以对可降解包装材料的研究, 一直是包装领域的研究热点。聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)是一种原材料来源广泛, 废弃后不会造成污染, 且很有发展前途的高分子材料^[3], 非常适合做食品活性包装基材。但 PLA 也存在一些缺点, 如无抗菌性

等。这些缺点限制了其在活性抗菌食品包装领域的进一步应用。

乳酸链球菌素(Nisin)是一种天然多肽抗菌素类物质, 在食品工业中应用广泛^[4,5]。Nisin 作为一种安全高效新型天然防腐剂, 在国内外均得到认可, 并且已经应用到食品行业的各个领域。将 Nisin、壳聚糖和茶多酚复合配比对新鲜冷却羊肉进行冷却保鲜证明, Nisin 具有很好的抑菌效果, 并发现壳聚糖和 Nisin 之间具有很好的交互反应^[6]。采用不同浓度的葡聚糖和海藻糖对 Nisin 进行热处理后稳定性的影响研究。实验结果表明, 添加葡聚糖和海藻糖均能提高 Nisin 热处理后的效价^[7]。用葡萄提取物、Nisin 和乙二胺四乙酸与大豆分离蛋白复合的可食性薄膜不仅具有较好的物理性质, 而且还有较高的抗菌活性^[8]。

等离子体改性技术能快速、高效地引发常规反应中不能或很难实现的物理或化学变化, 赋予膜材料表面各种优异性能, 而不改变基体材料本身的性质, 是拓展高分子膜材料应用范围的一种重要方法^[9]。将高分子材料进行表面改性, 达到高性能或高功能, 是经济有序地开发新材料的重要功能。近年来, 利用低温等离子体技术对高分子材料表面改性的研究十分活跃, 其改性优点具体体现在^[10]: (1) 赋予改性表面各种优异的性能; (2) 表面改性层, 厚度极薄(从几纳米到几百纳米), 整体性质基本不变; (3) 可以赋予一些材料本身不具有的性能, 如抗菌特性等。

本文将利用低温等离子体技术, 在低真空的条件下对 PLA 膜进行表面改性, 并对其表面性能进行表征。通过用 Nisin 溶液浸泡, 从而使

Nisin 接枝在改性的 PLA 薄膜表面, 赋予 PLA 薄膜抗菌活性, 促进其在食品包装领域的应用。

2 材料与方法

2.1 材料

PLA 薄膜(4032D, 厚度: 40 μm)购自深圳光华伟业有限公司; Nisin(900 UI/mg)购自上海源叶生物科技有限公司; *L. monocytogenes* 菌株(ATCC19115)购自广东微生物菌种保藏中心。

2.2 低温等离子体处理

低温等离子体处理(Cold Plasma Treatment, CPT)采用自制的等离子体设备(400 kHz, 200~500 W)。其中, 等离子体设备的反应室直径为 100 nm, 两个电极板之间的距离为 25 mm。在(20 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 的环境下, PLA 薄膜样品尺寸为 50 mm \times 50 mm。实验中, 首先将反应室抽真空至 100 Pa(无气体通入), 样品在功率为 300 W 的条件下分别处理 0、15 s、30 s、45 s 和 60 s, 并依次命名为 PLA0、PLA15、PLA30、PLA45 和 PLA60; 然后, 将处理后的样品放置于温度为(20 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 50% 的条件下保存待用。

2.3 Nisin 涂膜处理

首先, 将 Nisin 溶于蒸馏水, 在室温下以 100 rpm 的速率搅拌 1 h 后, 获得 10 mg/mL 的 Nisin 溶液。然后, Nisin 溶液经过 5 300 rpm 冷冻离心 20 min, 取上清液置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏待用。最后, 在(20 \pm 5) $^{\circ}\text{C}$ 环境下, 将 PLA0、PLA15、PLA30、PLA45 和 PLA60 分别置于解冻后的 Nisin 溶液中 2 min, 再置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 6 h。将获得的薄膜分别命名为 PN0、PN15、PN30、PN45 和 PN60, 以上 5 组样品合称为 PLA Nisin 薄膜, 即 PN 薄膜。

2.4 薄膜的性能表征

2.4.1 原子力显微镜

将膜样品取一小片后, 置于原子力显微镜

(Bruker MultiMode 8, Bruker, 德国)中, 采用非接触方式工作, 谐振频率约为 267 kHz, 操作在手套箱(氧气含量 $<$ 0.1 ppm, 水蒸气含量 $<$ 0.1 ppm)中完成。利用该手段, 主要对 PLA 薄膜的粗糙度进行表征。

2.4.2 水接触角

选用固体石蜡和玻璃作为基板材料。实验前, 对固体基板表面进行抛光和清洗处理。人工抛光后, 首先分别用清洁剂、自来水、蒸馏水超声清洗 15 min; 然后, 将基板取出在无水酒精中清洗 10 min, 室温下置于滤纸上吹干; 最后, 用微量注射器垂直缓慢地将 5 μL 膜液滴到水平放置的固体基板上, 使用接触角测定仪(OCA20, Dataphysics Co. Ltd., 德国)测定膜液接触角。相同试验重复 3 次, 结果取平均值。

2.4.3 抗菌性能测试

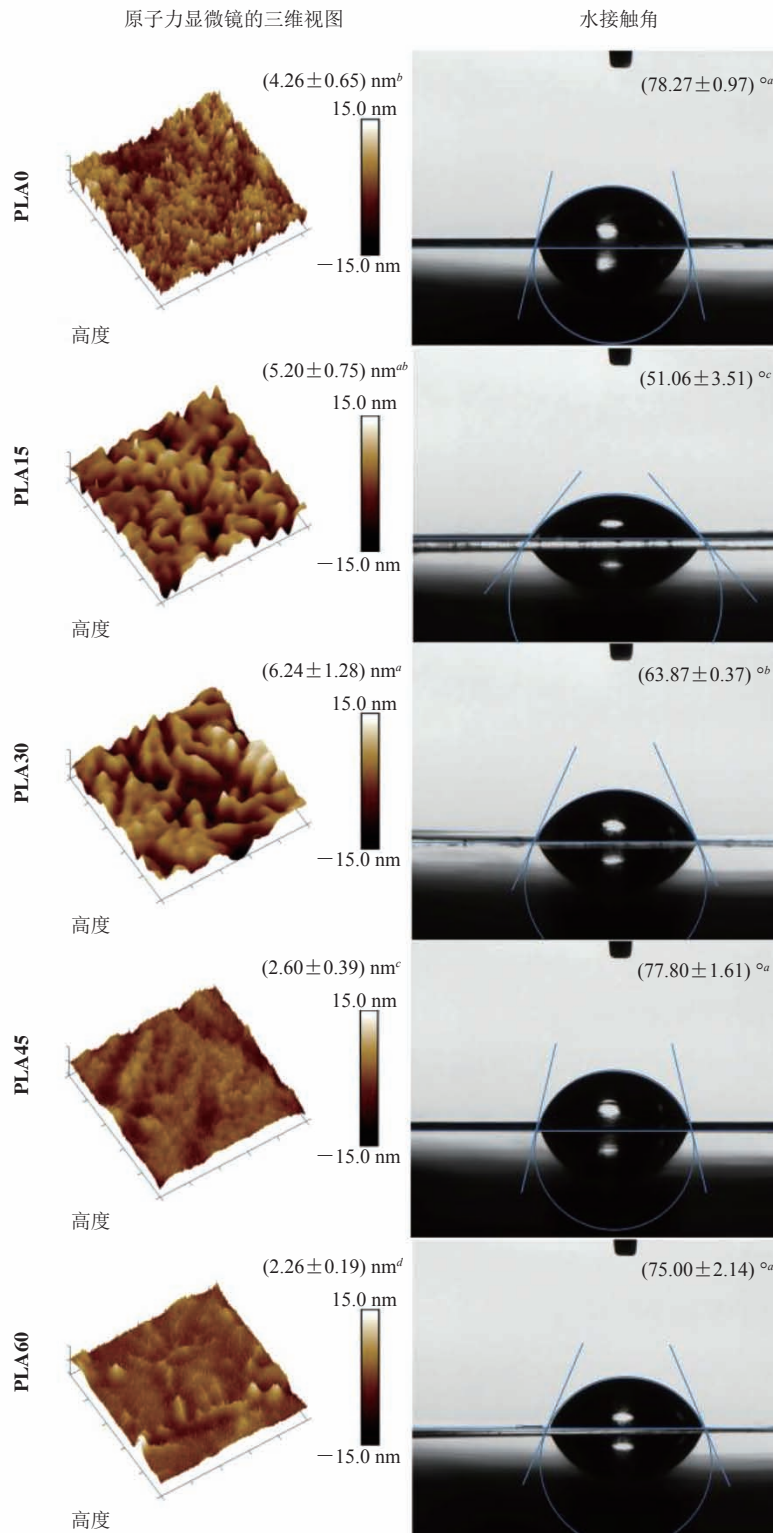
将 *L. monocytogenes* 菌株(ATCC19115)接种于脑心津液琼脂培养基表面, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中活化培养 24 h, 然后在胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤(TSB-YE)中进行两次传代培养恢复菌株活性。用生理盐水进行梯度稀释, 得到 10^5 CFU/mL 的 *L. monocytogenes* 菌液待用。其中, CFU 为菌落形成单位(Colony-Forming Units)。

取 2.5 mL 10^5 CFU/mL 的 *L. monocytogenes* 菌液接种于 22.5 mL TSB-YE 中。将 PLA、PN0、PN15、PN30、PN45 和 PN60 分别加入上述溶液中作为 6 个实验组, 领取一组不加任何薄膜作为空白对照。每组均做 3 个平行, 置于摇床中以 250 rpm 的速率震荡培养 1 h。经过梯度稀释后, 进行平板计数。

3 结果与讨论

3.1 粗糙度

由图 1 可知, 随着处理时间的延长, 薄膜表面平均粗糙度(Ra)先增大后减小。这是由于



注: 图中同列数值后面标注的不同字母 (*a*、*b*、*c*、*d*) 表示显著性差异 ($P < 0.05$)

图 1 低温等离子体处理对 PLA 薄膜表面性能的影响

Fig. 1 The effect of cold plasma treatment on the properties of PLA film surface

低温等离子体放电过程中产生的高能活性粒子、离子、自由基等,在处理中不断轰击 PLA 膜表面,碰撞传导的能量远超过材料表面原子的结合能,引发化学键断裂,产生表面刻蚀现象。但是,我们也可以看到,当处理时间超过 30 s 后,PLA 薄膜的粗糙度呈下降趋势,这与常规看起来并不相符。

研究显示,等离子体能量的增加导致分子单体断裂成更多片段,因此薄膜的粗糙度随着等离子体射频的增加而减小^[11]。另有研究表明,经过氩气和氦气等离子体处理后,薄膜表面的凸起被刻蚀,薄膜粗糙度更加均匀,更加平滑^[12]。而大气等离子体处理的薄膜,由于空气中氧气的刻蚀作用更强,导致薄膜表面粗糙度增大。处理方式是影响薄膜表面粗糙度的一个因素,另一个因素则是薄膜的内在结构^[13]。PLA 在挤出成型过程中,由于退火温度的不同,导致薄膜表层和内部的结晶度、均匀性不同。薄膜表面的分子结构大多都是无定型态,结构更加松散,相对于内层更容易被刻蚀。在 100 Pa、无处理气体的条件下,高能离子和 PLA 易刻蚀的表层导致处理时间超过 30 s 后薄膜逐渐变得光滑。

3.2 接触角

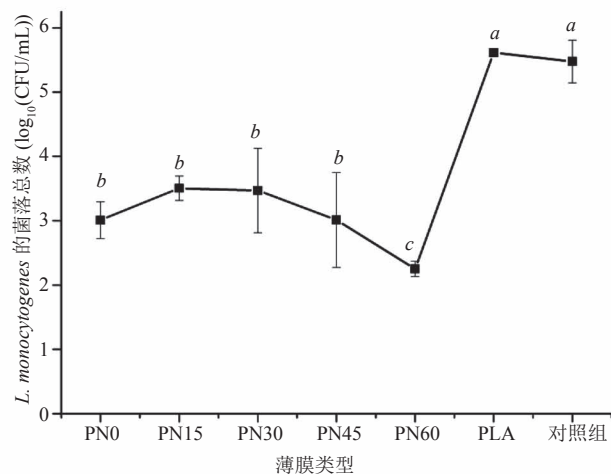
接触角测量是一种快速、简单的研究材料表面性能变化的方法。图 1 为水滴在膜表面 3 s 内接触角的变化趋势。未经等离子体处理改性的 PLA 膜的接触角为 82.5° ,属于疏水性膜。随着等离子体处理时间的增加,PLA 薄膜的接触角先下降后上升,在 15 s 降至最低 51.06° ($P < 0.05$);在 45 s 和 60 s 时分别上升至 77.8° 、 75° ,与未处理薄膜间无显著差异 ($P > 0.05$)。可见,薄膜的接触角变化与粗糙度变化呈负相关。有研究表明,粗糙度和化学性质的变化使材料表面的接触角与杨氏方程产生差异^[14,15]。根据经典的润湿理论^[16],薄膜表面粗糙度的增加可以提高其在大气中的亲水性。上述两种理论证实,等离子体处理

对 PLA 薄膜表面粗糙度的影响导致了其接触角的变化。

3.3 菌落总数分析

抗菌材料的抗菌活性取决于两个方面:一是抗菌剂自身的抗菌活性及经过挤出加工后的抗菌活性,这是材料具有抗菌活性的前提;二是抗菌剂从基材中的迁移溶出速率,这是材料具有抗菌活性的关键。对抗菌材料的制备和研究需要从这两个方面入手。Nisin 是由 34 个氨基酸组成的短肽,氨基酸残基赋予其亲水性和亲脂性。由于 Nisin 使 *L. monocytogenes* 菌体细胞内蛋白质溶出,破坏菌体细胞膜的完整性进而导致菌体裂解死亡^[17,18]。因此,Nisin 对 *L. monocytogenes* 具有良好的抗菌效果。Shiroodi 等^[19]通过共混包埋的方式制备出含 Nisin 的大豆分离蛋白(PPI)、乳清分离蛋白(WPI)和 PLA 薄膜,将上述薄膜置于 *L. monocytogenes* 菌液中经过 48 h 培养后,结果显示含有 Nisin 的 PPI、WPI 和 PLA 薄膜中菌液的浓度分别上升至 $6.0 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 、 $8.47 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 和 $9.0 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 。这表明包埋后的 Nisin 不能充分与菌接触,进而发挥其抑菌作用。本文选用 *L. monocytogenes* 作为抗菌对象,将 Nisin 接枝在 PLA 薄膜表面,考察 PN 膜的抗菌活性。

等离子体处理对 PLA 表面 Nisin 接枝效果的影响如图 2 所示。经过 1 h 震荡培养后,空白对照组和 PLA 组的 *L. monocytogenes* 的菌落总数由初始的 $4.0 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 分别增加至 $5.61 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 、 $5.48 \log_{10}(\text{CFU/mL})$,但两者间无显著差异 ($P > 0.05$)。而 PN0、PN15、PN30、PN45 和 PN60 组的 *L. monocytogenes* 的菌落总数分别下降至 $3.01 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 、 $3.50 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 、 $3.47 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 、 $3.01 \log_{10}(\text{CFU/mL})$ 和 $2.25 \log_{10}(\text{CFU/mL})$,显示 Nisin 接枝后的 PN 薄膜具备不同的抑菌效果,且均好于 PLA 薄膜。抗菌效果不同表明接枝在薄膜表面的 Nisin 含



注: 图中标注的不同字母(a、b、c)表示显著性差异($P < 0.05$)

图2 低温等离子体处理对PN薄膜抗菌性能的影响

Fig. 2 The effect of cold plasma treatment on the antimicrobial properties of PN film surface

量不同。经过等离子体处理的PLA膜表面粗糙度的变化导致接触面积增加,刻蚀作用导致表面自由基增多,可有效与Nisin进行接枝反应,从而具备一定的抗菌性能。在Nisin溶液浸泡后,等离子体处理前45 s和未经等离子体处理的PLA薄膜间的抗菌效果差异不显著($P > 0.05$),说明Nisin的接枝量差异不明显。随着低温等离子体处理时间延长至60 s,PN60的抑菌效果达到最佳。

4 与国内外相似研究的对比分析

Xu等^[20]通过化学偶联的方法将Nisin接枝固定在聚醚酰亚胺薄膜表面,将其置于10 mL 10^5 CFU/mL *S. aureus* 溶液中,经过24 h培养后,95.2%的*S. aureus*被杀死。Aveyard等^[21]通过化学偶联的方法将Nisin接枝固定在经过氦气等离子体处理后的聚苯乙烯薄膜表面,以薄膜对*L. monocytogenes*和*S. aureus*的抑菌效果证明,不同条件下Nisin的接枝效果不同。因此,本文主要是通过PN膜的抑菌性能强弱来判断经

等离子体处理的PLA薄膜与Nisin接枝的程度。其中,PN60组的菌落总数最低($P < 0.05$),证明其具有最优的抑菌效果。

5 结论

低温等离子体处理可明显改善PLA薄膜表面的物理性质。表征结果表明,平均粗糙度随着处理时间的增加先增大后减小,表面亲水性与粗糙度呈正相关。通过对抑菌性能表征发现,PN60具有最好的抑菌效果,这说明低温等离子体处理60 s后的PLA薄膜与Nisin的接枝效果最好。

参考文献

- [1] Biji KB, Ravishankar CN, Mohan CO, et al. Smart packaging systems for food applications: a review [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6125-6135.
- [2] Irkin R, Esmer O. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6095-6111.
- [3] Siracusa V, Rocculi P, Romani S, et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2008, 19(12): 634-643.
- [4] Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, et al. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(8): 1262-1274.
- [5] Gharsallaoui A, Joly C, Oulahal N, et al. Nisin as a food preservative: part 2: antimicrobial polymer materials containing nisin [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(8): 1275-1289.
- [6] He L, Zou L, Yang Q, et al. Antimicrobial activities of nisin, tea polyphenols, and chitosan and their combinations in chilled mutton [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(6): M1466-M1471.

- [7] Wang LF, Rhim JW. Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 80: 460-468.
- [8] Theivendran S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(2): M39-M44.
- [9] Oh YA, Roh SH, Min SC. Cold plasma treatments for improvement of the applicability of defatted soybean meal-based edible film in food packaging [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 58: 150-159.
- [10] Ekezie FGC, Sun DW, Cheng JH. A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: current applications and future trends [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2017, 69: 46-58.
- [11] Assis OBG, Hotchkiss JH. Surface hydrophobic modification of chitosan thin films by hexamethyldisilazane plasma deposition: effects on water vapour, CO₂ and O₂ permeabilities [J]. *Packaging Technology and Science*, 2007, 20(4): 293-297.
- [12] Bhatti M, Veeramachaneni A, Shelef LA. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 97(2): 215-219.
- [13] Ding Z. Immobilization of chitosan onto poly-l-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(6): 1059-1067.
- [14] Wang L, Wei J, Su Z. Fabrication of surfaces with extremely high contact angle hysteresis from polyelectrolyte multilayer [J]. *Langmuir*, 2011, 27(24): 15299-15304.
- [15] Vrsaljko D, Grčić I, Guyon C, et al. Designing hydrophobicity of the PLA polymer blend surfaces by ICP etching [J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2016, 13(9): 869-878.
- [16] Song S, Yang H, Zhou C, et al. Underwater superoleophobic mesh based on BiVO₄ nanoparticles with sunlight-driven self-cleaning property for oil/water separation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 320: 342-351.
- [17] Zhu A. Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive heterobifunctional crosslinking reagent on PLA surface [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(23): 4657-4665.
- [18] Laroussi M, Akan T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: a review [J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2007, 4(9): 777-788.
- [19] Shiroodi SG, Nesaei S, Ovissipour M, et al. Biodegradable polymeric films incorporated with nisin: characterization and efficiency against *Listeria monocytogenes* [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 9(6): 958-969.
- [20] Xu X, Jin T, Zhang B, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antibacterial properties of a nisin-grafted hydrated mucin multilayer film [J]. *Polymer Testing*, 2017, 57: 270-280.
- [21] Aveyard J, Bradley JW, McKay K, et al. Linker-free covalent immobilization of nisin using atmospheric pressure plasma induced grafting [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(13): 2500-2510.