

低温等离子体制备天然功能性多糖

韦宗伟^{1,2} 王洁卿² 户帅锋² 高明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 生物医用材料与界面研究中心 深圳 518055)

摘 要 天然多糖由于具有天然可再生、价格低廉、生物相容好等优点,受到广泛关注。该文选择具有代表性的羧甲基纤维素钠和海藻酸钠作为研究对象,探讨了低温等离子体技术应用于多糖改性的可行性。通过系统地研究等离子体处理对这两种多糖溶液黏度、pH 值、菌落总数及 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼清除率等性能的影响,并在此基础上,分析等离子体处理对两种多糖结构和性质的影响差异及相关机制。实验结果表明,处理后的多糖具备了一定的抗菌及抗氧化性能。主要机制为:等离子体处理过程中产生的能量,使多糖内部的分子键断裂;这个过程中,也引入了含氧、含氮等活性官能团,与断键之后的多糖稳定结合,从而赋予其相应的功能。相较于传统的酸、碱和酶提取法制备功能性多糖,低温等离子体更为稳定、高效且没有任何化学试剂污染。因此,低温等离子体处理为功能性多糖的制备提供了新的方法。

关键词 低温等离子体;多糖;抗菌性;抗氧化性

中图分类号 TB 34 O 636.9 文献标志码 A

The Effect of Cold Plasma Treatment on the Properties of Polysaccharides

WEI Zongwei^{1,2} WANG Jieqing² HU Shuaifeng² GAO Ming²

WANG Huaiyu^{1,2} WANG Zhe²

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

²(Center for Biomedical Materials and Interfaces, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Polysaccharides have attracted wide attention due to their renewable, biocompatibility and low cost. The objective of this research was to study the effect of cold plasma treatment on the properties of sodium carboxymethyl cellulose and sodium alginate. The viscosity, pH, total viable colonies and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl values were determined. Besides, the structures and mechanisms of sodium carboxymethyl cellulose and sodium alginate were also discussed. Results indicate that sodium carboxymethyl cellulose and sodium alginate modified with cold plasma treatment obtained antimicrobial and antioxidant ability.

收稿日期: 2018-04-09 修回日期: 2018-05-14

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: 韦宗伟, 学士, 研究方向为多糖抗菌; 王洁卿, 学士, 研究方向为可食膜制备; 户帅锋, 硕士, 研究助理, 研究方向为高分子薄膜; 高明, 硕士, 工程师, 研究方向为等离子体技术; 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.

This is mainly attributes to the energy produced during plasma treatment breaks the molecular bonds within polysaccharides, meanwhile some active groups containing oxygen and nitrogen are introduced. Then the active groups could combine with the broken molecular band, lead to some functional properties. Compared with some traditional methods such as acid and alkali exaction, cold plasma treatment possesses stability and high efficiency, without any chemical pollution. Thus, cold plasma treatment provides a new method for the preparation of functional polysaccharides.

Keywords cold plasma treatment; polysaccharides; antibacterial; antioxidation

1 引 言

羧甲基纤维素钠(Sodium Carboxymethyl Cellulose, CMC)是一种由纤维素经醚化后得到水溶性阴离子的直链高分子。由于其具有水溶性佳、易生物降解和生物相容性好等优点,被广泛用于医药、食品等领域。CMC可作为功能表面材料,与甲壳素、聚丙烯腈等物质复合制成可净化水质的薄膜,在解决工业污水排放、净化家庭饮用水等方面具有较大的应用前景^[1]。在医用材料上,经过处理的CMC不仅可作为稳定的乳化剂应用在针剂上,CMC还可以作为在片剂上的成膜剂和粘结剂,具有减轻患者手术后的疼痛,防止患者皮肤黏膜相互粘连等作用^[2,3]。海藻酸钠(Sodium Alginate, SA)是由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸按(1 \rightarrow 4)键连接而成的一种天然多糖。SA含有游离的羧基,这使其性质活泼,具有很高的离子交换功能。SA在速释药物中可以作为药物的崩解剂,加速药物的释放,提高药物的药效。SA由于其低毒性、可降解和良好的生物相容性,在食品、化妆品等医用材料领域应用广泛,而对其进行改性使其具有生物功能性,也具有较大的应用前景^[4,5]。

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。利用低温等离子体技术对高分子材料表面进行改性研究,其改性优点具体体现在:

(1)赋予改性的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^[6,7]。

传统的多糖降解方法主要是化学法、氧化法、酶解法和物理降解法。其中,化学法降解工艺条件较难掌握,生产成本低,污染严重,且降解产物复杂,所以现有研究较少。董诗竹^[8]利用过氧化氢(H₂O₂)制备低分子量盐藻聚糖硫酸酯,结果表明H₂O₂浓度越高,降解后的产物分子量和硫酸根含量越低,而硫酸根与褐藻糖胶的生物活性密切相关,所以采用氧化法降解多糖需要控制好参数,以减少对多糖活性的影响。李文惠等^[9]利用壳聚糖酶降解壳聚糖,得到抗氧化的降解产物试剂1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除能力达92.60%。酶解法虽然工艺温和,但成本高昂。基于等离子体改性多糖的研究,方法简单、绿色环保无污染,且大都集中在壳聚糖的改性研究。Chokradjaroen等^[10]利用氧化剂(如过氧化氢、过硫酸钾、亚硝酸钠等)与等离子体技术结合处理壳聚糖,改变其分子链结构。这种方法中,化学试剂用量少且能实现壳聚糖快速地降解,制备的低分子壳聚糖和壳寡糖收率高。Ekezie等^[11]采用液相等离子体技术处理 β -壳聚糖溶液后对其性能进行测试发现,处理后的 β -壳聚糖溶液黏度

下降, 结晶度被破坏。马凤鸣^[12]通过脉冲等离子体对壳聚糖进行降解, 同时赋予壳聚糖新的功能性。翟佳慧等^[13]对壳聚糖与甲基聚乙二醇单醚进行官能团偶联, 制备出具有水溶性且有抑菌作用的壳聚糖。由等离子体处理技术可知, 等离子体携带的高能粒子进入空气, 使得空气中的氧气、氮气分子等离子化, 这些离子化的分子进入水中可以形成氨基、羟基等活性自由基, 自由基的氧化特性及高能粒子的冲击使多糖分子键断裂, 产生自由基, 从而改变多糖结构的同时也使多糖产生新的生物活性, 如抗氧化、抗菌等特性^[14]。对于等离子体技术处理多糖的研究, 大多数是在改性壳聚糖上, 如降低壳聚糖的分子量, 使其更容易水解。国内对其他多糖的研究则较少, 且处理的多糖均未表现出明显的抗菌和抗氧化特性。本文采用低温等离子体技术对羧甲基纤维素钠

(CMC)和海藻酸钠(SA)进行处理, 制备出具有生物功能的羧甲基纤维素钠和海藻酸钠, 旨在引进一种新的制备具有生物功能多糖的手段。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

本文中所涉及的试验仪器及材料如表 1 和 2 所示。

2.2 试验方法

2.2.1 多糖溶液的制备

取 0.5 g 多糖(如 CMC 和 SA)置于 250 mL 烧杯中, 准确加入 99.5 mL 蒸馏水, 磁力搅拌 2 h, 静置消泡, 制得 0.5% 多糖溶液, 备用。

2.2.2 低温等离子体处理多糖溶液

采用低温等离子体射频放电的方式对多糖溶

表 1 主要实验仪器名称及厂家

Table 1 The main experimental equipment name and manufacturer

仪器名称	型号	厂家
电子天平	YP601N	北京润泽康生物科技有限公司
恒温磁力搅拌器	78HW-1	北京沫之东生物技术有限公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9070A	上海一恒科技有限公司
涡旋振荡器	XW-80A	海门市其林倍儿仪器制造有限公司
红外光谱仪	Frontier	美国 PerkinElmer 公司
紫外分光光度计	UV-2450	日本岛津
pH 计	Sartorius PB-10	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
旋转流变仪	Haake MARS III	德国-赛默飞世尔科技

表 2 试剂名称及厂家

Table 2 Reagent name and manufacturer

试剂名称	类型	厂家
海藻酸钠(SA)	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
羧甲基纤维素钠(CMC)	化学纯	国药集团化学试剂有限公司
平板计数琼脂	分析纯	北京陆桥技术股份有限公司
胰蛋白胨大豆肉汤	分析纯	广东环凯微生物科技有限公司
氯化钠(NaCl)	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司

液进行处理。其中,处理装置主要由一个喷嘴的金属管与等离子体电源的正电极连接,距离喷嘴下端 2~3 mm 处放置一个玻璃器皿。实验首先取 20 mL 多糖溶液(CMC 和 SA 等)加入到玻璃凹槽中,然后放置于低温等离子体喷头下端,多糖溶液液面与喷头距离约为 2~3 mm,放电电压为 2 kV,处理 30 min。

2.2.3 改性多糖性能的测试

(1) 多糖溶液处理前、后的 pH 值测试

分别取经过低温等离子体处理的多糖溶液(CMC、SA)和未经处理的多糖溶液(作为空白对照) 10 mL 置于 50 mL 的离心管中,将已校正好的 pH 计电极插入溶液中,连续搅拌直到 pH 计的数值稳定后,记录下处理后在 0 h 时的 pH 值,每个样品重复测 3 次,取平均值。最后,依次在 24、48、72 和 96 h 测试多糖溶液 pH 值的变化情况。

(2) 多糖溶液处理前、后的黏度测试

首先,分别在经过低温等离子体处理的多糖溶液(CMC、SA)和未经处理的多糖溶液(作为空白对照)中,取 7 mL 溶液于旋转流变仪的装料槽中。然后,调整电脑参数,测试多糖溶液的黏度。最后,通过 Original 8.0 软件画出多糖溶液处理前、后的黏度变化。

2.2.4 改性多糖功能的测试

(1) 多糖溶液处理前、后抗菌性的测试

首先,将浓度为 10^7 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌液,通过梯度稀释至菌液浓度为 10^2 CFU/mL。其中,CFU 为菌落形成单位(Colony-Forming Units)。其次,取 0.5 mL 浓度为 0.5% 的改性多糖溶液(未改性的多糖溶液作为空白对照)并加入 4.5 mL 10^2 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌液,涡旋振荡后置于 37℃ 恒温摇床培养 30 min 后,取 1 mL 混合液加入到平板上,倒入平板计数琼脂、摇匀、凝固后放入恒温培养箱中过夜培养。最后,通过自动菌落计数仪对菌落数进行测定,

并使用 IBM SPSS Statistics 软件对比多糖溶液处理前、后抗菌能力的差异。

(2) 多糖溶液处理前、后抗氧化性的测试

首先,精确称取 3.5 mg DPPH 试剂,加入无水乙醇溶解并用无水乙醇定容到 10 mL 容量瓶,摇匀。其次,吸取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入无水乙醇定容,得到浓度为 0.035 mg/mL 的 DPPH 液,放于冰箱备用。最后,将 4 mL 0.5% 多糖溶液与 4 mL DPPH 溶液混合、黑暗保存 30 min 后测得吸光度值 A_1 ; 4 mL 浓度为 0.5% 多糖溶液与 4 mL 无水乙醇的混合液置于黑暗保存 30 min 后测定吸光度 A_2 ; 4 mL 无水乙醇与 4 mL DPPH 溶液的混合液置于黑暗保存 30 min 后测定吸光度 A_3 。最终通过公式(1)计算 DPPH 的自由基清除率 K 。

$$K = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \right] \times 100\% \quad (1)$$

3 结果与讨论

3.1 低温等离子体处理对多糖溶液 pH 值的影响

由图 1 可知,经过低温等离子体处理的水、羧甲基纤维素钠(CMC)和海藻酸钠(SA)的溶液 pH 值均呈下降趋势。其中,经过低温等离子体处理的水溶液 pH 值下降最明显,大致在 3 左右。这可能是因为,等离子体在空气中活化的氮气分子,进入水溶液产生氨基自由基,随后被羟基自由基氧化,产生游离的硝酸根离子,导致 pH 降低。而 CMC 和 SA 对应的 pH 值为 5.5~5.7。相比于水溶液,经过处理的 CMC 和 SA 溶液并未呈现明显的 pH 值下降现象,这主要是游离的硝酸根离子与 CMC 和 SA 降解后产生的自由基结合。另外,随着时间的变化,各组溶液对应的 pH 值均无明显变化。因此,该结果表明,低温等离子体处理后的多糖溶液体系稳定。

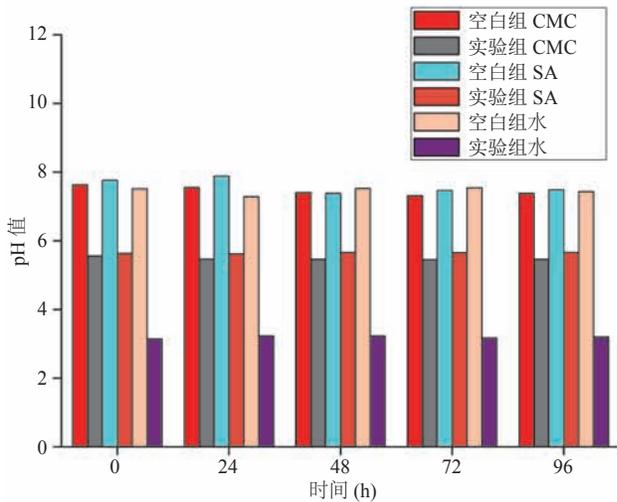
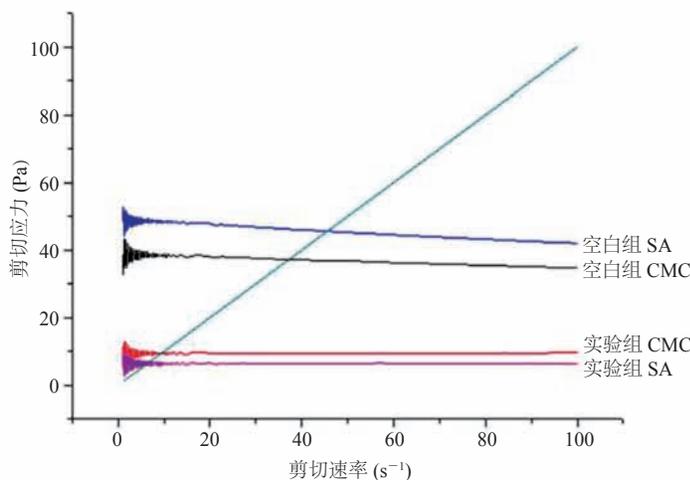


图 1 多糖溶液处理前、后 pH 值的变化

Fig. 1 Changes in pH before and after Polysaccharide solution treatment

3.2 低温等离子体处理对多糖溶液黏度的影响

由图 2(a)可知,与空白组的羧甲基纤维素钠、海藻酸钠相比,处理组溶液黏度均出现下降。这主要是因为:在等离子体处理过程中,产生的高能粒子及氧化物将多糖分子链打断或氧化断裂,从而使多糖降解,分子量下降,对应的溶液黏度也会下降。因此,该结果表明,低温等离子体处理可有效降解多糖。



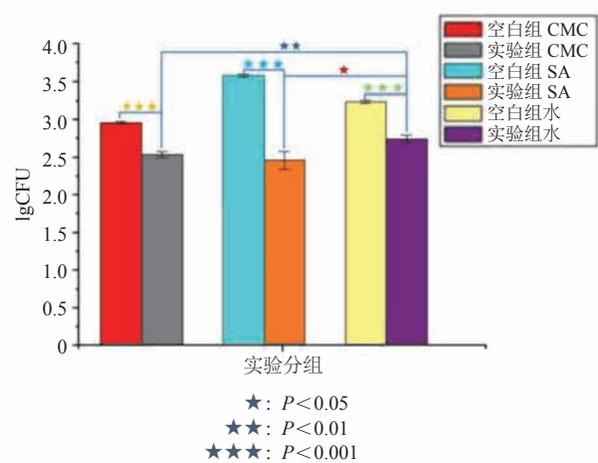
(a) 多糖溶液黏度变化

3.3 低温等离子体处理对多糖溶液抗菌性能的影响

由图 2(b)可知,CMC、SA 和水溶液的抗菌性均具有显著性差别($P < 0.001$),即经过处理的多糖溶液抗菌性,明显强于水溶液的。后者具备抗菌性主要是溶液中游离的高反应活性基团。由 pH 与黏度的结果可知,经处理后的 CMC 和 SA 溶液中游离的高反应活性基团明显少于水溶液,说明起抗菌作用的更多是由于降解之后多糖产生的活性官能团。因此,可以推断:低温等离子体可赋予多糖一定的抗菌性能。

3.4 低温等离子体处理对多糖溶液抗氧化性能的影响

DPPH 的自由基清除率 K 越高,表明被测试物质的抗氧化活性越强。由图 3 可知,羧甲基纤维素钠在波长为 517 nm 时,空白组的吸光度 $A_1 = 0.403$, $A_2 = 0.009$, $A_3 = 0.341$, $K = -15.54\%$;实验组的吸光度 $A_1 = 0.169$, $A_2 = 0.003$, $A_3 = 0.341$, $K = 51.32\%$,表明空白组的羧甲基纤维素钠不具备抗氧化性,而经过低温等离子体处理的羧甲基纤维素钠具有抗氧化性。海藻酸钠在波长为 517 nm 时,空白组的吸光度 $A_1 = 0.400$, $A_2 = 0.049$, $A_3 = 0.301$, $K = -16.61\%$;实验组的吸



(b) 多糖溶液抗菌效果

图 2 多糖溶液的黏度变化及抗菌效果的显著性分析

Fig. 2 Analysis of viscosity changes and antibacterial effects of polysaccharide solution

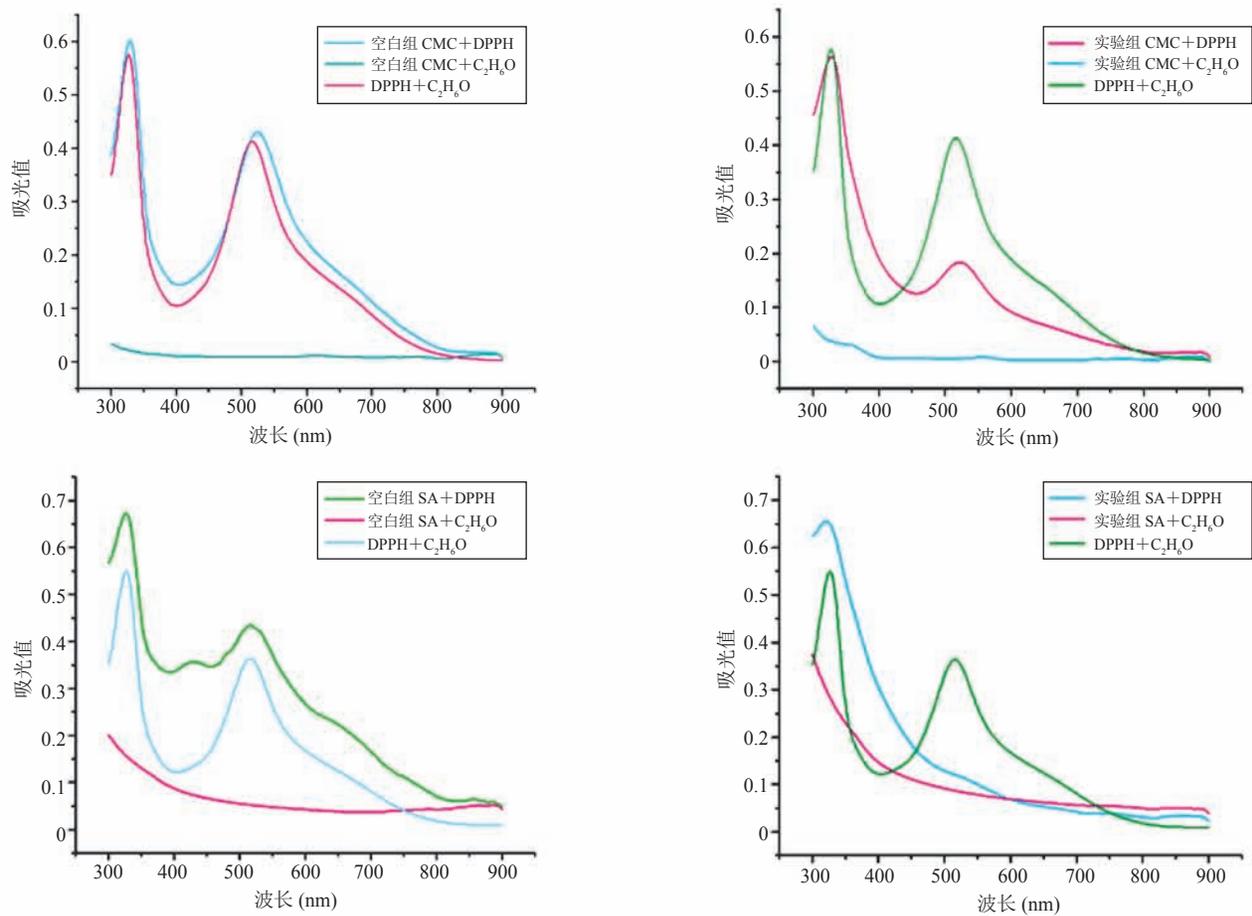


图3 羧甲基纤维素钠与海藻酸钠溶液处理前、后的吸光度

Fig. 3 Absorbance before and after treatment of sodium carboxymethyl cellulose and sodium alginate solutions

光度 $A_1=0.107$, $A_2=0.081$, $A_3=0.301$, $K=91.36\%$, 表明空白组的海藻酸钠不具备抗氧化性, 而经过低温等离子体处理的海藻酸钠具有抗氧化性。因此, 可以推断: 低温等离子体处理可赋予多糖一定的抗氧化性。DPPH 自由基的清除能力与提供氢或电子的数量直接相关。当低温等离子体降解多糖后, 多糖分子链变短, 羟基活性增强, 提供氢或电子的数量增加, 与 DPPH 自由基反应而形成稳定的分子, 从而达到清除的目的^[12]。

4 与国内外相似研究的对比分析

虽然已有较多低温等离子体对多糖降解的研

究, 但均侧重于对降解效率的研究, 而对降解产物的功能性研究仍较少。马凤鸣等^[14]运用脉冲等离子体技术提取黑木耳多糖发现, 脉冲等离子体技术对细胞破壁效果优于超声波法, 且对热敏活性成分的降解更为有效。Cheng 等^[15]利用等离子体技术降解水中的酚类化合物发现, 随着处理时间延长至 60 min, 其降解率可达 100%。马凤鸣^[12]通过等离子体对壳聚糖进行降解, 产生具有抗氧化活性的降解产物并且其抗菌性能也得到增强。本文通过对降解产物的抗菌效果及抗氧化特性进行研究, 初步证明运用等离子体技术对 CMC 和 SA 的降解, 可使降解产物具备一定的抗菌和抗氧化活性。这可为今后研究等离子体技术改性多糖提供新的探索。

5 结 论

采用低温等离子体射频放电的方式分别对羧甲基纤维素钠(CMC)和海藻酸钠(SA)溶液进行等离子体处理。通过利用等离子体的高能和活性对多糖进行降解, 获得的多糖溶液的性质发生变化:

(1) 经过低温等离子体处理的多糖溶液, pH值都会有一定程度的下降, 且都呈弱酸性;

(2) 经过低温等离子体处理的多糖溶液, 由于多糖分子结构发生改变, 分子量减少, 溶液黏度均明显下降, 流动性增加;

(3) 经过低温等离子体处理的多糖溶液, 在分子链被打断的同时有一些活性基团接枝在分子结构上, 使得溶液具有抗菌和抗氧化等生物活性功能。

参 考 文 献

- [1] 刘章, 姬胜利, 王凤山. 低分子肝素的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 药物生物技术, 2014, 21(06): 573-578.
- [2] 孙业全, 王秀春, 陈常胜, 等. 羧甲基纤维素钠在卵巢癌介入治疗中的应用 [J]. 山东医药, 2006, 46(23): 21-22.
- [3] 李飞飞, 万丹丹, 严孝强. 二甲双胍-羧甲基纤维素钠聚电解质聚集体作为药物缓释载体的研究 [J]. 北方药学, 2015, 12(1): 108-109.
- [4] 盘茂东, 李嘉诚, 林强, 等. 海藻酸钠在药物控释中的应用 [J]. 中国药业, 2008, 17(19): 3-5.
- [5] 张莉华, 李科, 卜方方. 海藻酸钠在药物制剂中的应用进展 [J]. 中南药学, 2016, 14(1): 52-56.
- [6] 熊青. 大气压低温等离子体射流的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [7] 姚骏, 张弘, 郭森, 等. 海带的生物活性及系列产品开发研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 198-202.
- [8] 董诗竹. 海带低分子量岩藻聚糖硫酸酯的制备及其抗血栓活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [9] 李文惠, 李亚鹤, 徐年军, 等. 壳聚糖酶法降解工艺优化及其产物的抗氧化活性 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(11): 121-130.
- [10] Chokradjaroen C, Rujiravanit R, Watthanaphanit A, et al. Enhanced degradation of chitosan by applying plasma treatment in combination with oxidizing agents for potential use as an anticancer agent [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 167: 1-11.
- [11] 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 & Technology, 2017, 69: 46-58.
- [12] 马凤鸣. 壳聚糖的等离子体降解动力学模型及结构表征与生物活性 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [13] 翟佳慧, 孙庆申, 刘春光, 等. 改性壳聚糖的制备及抑菌效果评价 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2010, 27(6): 778-782.
- [14] 马凤鸣, 王振宇, 赵海田, 等. 脉冲放电等离子体技术提取黑木耳多糖 [J]. 农业工程学报, 2010 (S1): 363-368.
- [15] Cheng HH, Chen SS, Yoshizuka K, et al. Degradation of phenolic compounds in water by non-thermal plasma treatment [J]. Journal of Water Chemistry and Technology, 2012, 34(4): 179-189.