

文章编号: 0253-9721(2013)08-0006-06

# 聚乳酸/茶多酚复合纳米纤维膜的抗菌机制及性能

费燕娜<sup>1</sup>, 高卫东<sup>1</sup>, 王鸿博<sup>1</sup>, 王银利<sup>2</sup>

(1. 生态纺织教育部重点实验室(江南大学), 江苏 无锡 214122;

2. 浙江朝晖过滤技术股份有限公司, 浙江 桐乡 314500)

**摘要** 将茶多酚(TP)添加到聚乳酸(PLA)纺丝溶液中,以静电纺丝法制备PLA/TP复合纳米纤维膜。通过红外光谱(FT-IR)测试、抑菌圈法、振荡烧瓶法及透射电镜(TEM)对复合纳米纤维膜的成分、抗菌性能及抗菌机理进行研究。FT-IR测试结果验证了PLA/TP复合纳米纤维膜中通过价键的结合使二者复合在一起。抗菌测试结果显示:随着TP含量增加,复合纳米膜抗菌性能提高。对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈宽度分别从3.67和3.71 cm增加到5.17和5.67 cm,抑菌率从20.6%和21.3%提高到96.9%和97.6%。TEM观察结果表明,PLA/TP复合纳米纤维膜能够破坏菌体细胞膜的完整性,最终导致菌体细胞的死亡。

**关键词** 茶多酚;聚乳酸;纳米纤维膜;抗菌机制

中图分类号: TS 131.9 文献标志码: A

## Antibacterial mechanism and performance of PLA/TP composed nanofiber membrane

FEI Yanna<sup>1</sup>, GAO Weidong<sup>1</sup>, WANG Hongbo<sup>1</sup>, WANG Yinli<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Eco-Textiles (Jiangnan University), Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

2. Zhaohui Filter Technology Co., Ltd., Tongxiang, Zhejiang 314500, China)

**Abstract** Poly(lactic acid) (PLA) solution mixed with tea polyphenol (TP) was electrospun into PLA/TP composed nanofiber membrane whose composition, antibacterial performance and mechanism were investigated using infrared spectroscopy (FT-IR), inhibition zone method, oscillation flask method and transmission electron microscope (TEM). FT-IR test showed that the TP and PLA combined well by valence bonds on PLA/TP nanofiber membrane. Antibacterial experiment indicated that the antibacterial performance of the membrane increased as TP content increased. The widths of inhibition zone against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* increased from 3.67 and 3.71 cm to 5.17 and 5.67 cm respectively. The inhibitory rate increased from 20.6% and 21.3% to 96.9% and 97.6% respectively. TEM examination indicated that PLA/TP composed nanofiber membrane can destroy the integrity of cell membrane of bacteria and finally lead to the death of bacteria.

**Key words** tea polyphenol; polylactic acid; nanofiber membrane; antibacterial mechanism

纳米抗菌材料是在纳米技术出现后,将抗菌剂通过一定的方法和技术制成纳米级抗菌剂,再与抗菌载体通过一定的方法和技术制备而成的具有抗菌功能的材料。目前纳米材料中,抗菌产品<sup>[1-3]</sup>及概念已成为其中最引人注目的应用领域之一<sup>[4-6]</sup>。纳

米抗菌纤维作为纳米材料中一个重要的方面,也受到越来越多研究人员的关注。目前制备纳米级抗菌纤维最常见的方法是将诸如银、氧化锌、甲壳素、二氧化钛等无机天然光催化型抗菌剂与高聚物共混,通过静电纺丝法制备出具有抗菌功能的纳米纤维,

收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2013-01-11

基金项目: 江苏省高等学校优秀科技创新团队资助课题(苏教科2009-10)

作者简介: 费燕娜(1984—),女,博士生。主要研究方向为功能纺织材料。王鸿博,通信作者,E-mail: wxwanghb@163.com。

并对其抗菌性能以及抗菌机制进行研究和探讨<sup>[7-8]</sup>。王曦等<sup>[9]</sup>制备了含银 PA6 纳米纤维,分析了银含量对抗菌效果的影响。XU 等<sup>[10]</sup>制备了壳聚糖/聚乳酸复合纳米纤维,研究了壳聚糖含量与抗菌效果之间的关系。茶多酚(TP)作为一种安全无毒副作用的绿色化合物,近年来已受到研究人员越来越多的关注<sup>[11-13]</sup>。本文将 TP 作为抗菌剂,聚乳酸(PLA)作为载体,采用静电纺丝法,制备 PLA/TP 复合纳米纤维薄膜,分别采用抑菌圈法和振荡烧瓶法对其进行定性和定量的抗菌性能检测,并对其抗菌机理进行初步探讨。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 材料及试剂

茶多酚(TP),纯度 98%,黄褐色粉末(江南大学食品学院);二氯甲烷(DCM)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF),分析纯(国药集团化学试剂有限公司);聚乳酸(PLA)切片,片材级,相对分子质量为 10 万(深圳光华实业伟业有限公司)。

抗菌主要化学试剂:牛肉浸膏、生化试剂 BR、氯化钠、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(中国医药集团上海化学试剂公司);蛋白胨、琼脂粉(国药集团化学试剂有限公司)。

#### 1.1.2 静电纺丝设备

WZ-50 C6 型微量注射泵(浙江史密斯医学仪器有限公司),DW-P303-1ACD8 型高压直流电源(天津东文高压电源厂),平板接收装置(实验室自制)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 纺丝液的制备

用电子天平称取适量 PLA 和 TP,溶于 DCM、DMF 的混合纺丝溶剂中。确定溶液中 DCM 和 DMF 的体积比为 7:3。本文实验设定 PLA 与 TP 的质量比分别为:100/0、90/10、80/20、70/30、60/40、50/50(W/W)。在室温下磁力搅拌 12 h 静置备用。

#### 1.2.2 静电纺丝

将上述纺丝液倒入 20 mL 注射器中,采用内径 0.7 mm 削平的注射针头作为毛细管,调整注射器高度,使针头高度与铝箔接收板的中心位置在同一水平线上,二者之间的接收距离(C-SD)按需调节。注射泵连接高压直流电源的正极,铝箔接收板连接负极,溶液挤出量(纺丝速度)由注射泵控制可调,打开电源,按需要设定纺丝电压。本文实验中,纺丝工

艺参数设定为:纺丝电压 18kV、纺丝速度 0.6 mL/h、接收距离 17 cm。

#### 1.2.3 抗菌试样制备

把待测试样剪成直径为 25 mm 的圆试样(用于抑菌圈测试)及 5 mm × 5 mm 小碎片(用于振荡烧瓶法测试)若干,分别装于三角锥形瓶内封口,由于被测试样不适宜高温灭菌,因此本实验采用紫外灯光照 30 min 灭菌备用。

### 1.3 红外光谱(FT-IR)观察

用衰减全反射(ATR-Ge)制样法,将聚乳酸纳米纤维膜和不同质量混比的聚乳酸/茶多酚复合纳米纤维膜分别制样后进行红外光谱扫描,进行比较分析。

#### 1.4 抗菌性能测试

关于静电纺纳米薄膜的抗菌性能检测,目前国内尚无统一的评价标准。由于聚乳酸/茶多酚复合纳米纤维膜为一次性纺织纤维用品,因此本文实验参照纺织品抗菌性能的评价方法,分别采用抑菌圈法和改良的振荡烧瓶法对 PLA/TP 复合纳米纤维膜的抗菌性能进行定性及定量的检测。参照标准为 GB/T 20944.1—2007《琼脂平皿扩散法》、GB/T 20944.3—2008《振荡法》以及 GB 15979—2002《一次性使用卫生用品卫生标准》。实验中所使用的 2 种菌种分别为:大肠杆菌(格兰氏阴性菌代表,ATCC25922, *E. coli*);金黄色葡萄球菌(格兰氏阳性菌代表,ATCC6538, *S. aureus*)。

##### 1.4.1 抑菌圈法

在无菌培养皿中分别加入 *E. coli* 和 *S. aureus* 菌悬液,然后倒入冷却至 46 °C 的营养琼脂培养基,立即旋转使其充分均匀分散,放置 5 min 待培养基凝结后,将直径 25 mm 的试样均匀的按压在培养基中央,确保试样和培养基充分接触,放入 37 °C 恒温培养箱中培养 18~24 h,观察试样周围的细菌生长情况,测量抑菌圈尺寸。

抑菌圈评价:根据抑菌圈宽度以及试样下方细菌的繁殖情况来判定抑菌效果的好坏。每个试样至少测量 3 处,取平均值。抑菌圈大小可按式(1)计算:

$$H = \frac{D - d}{2} \quad (1)$$

式中:  $H$  为抑菌圈宽度,  $D$  为抑菌圈外径的平均值,  $d$  为试样直径,单位均为 cm。

##### 1.4.2 振荡烧瓶法

将试样放入加有菌液的磷酸盐缓冲液(PBS)中,进行“0”接触时刻取样,按 10 倍稀释法制作平

皿待琼脂冷却后放入 37 °C 培养箱中,然后将装有试样和菌液的烧瓶放入摇瓶柜中,温度设定为 37 °C,转速为 120 r/min,到规定时间后,取出烧瓶,按“0”接触时刻平皿的制作方法制作平皿,冷却后放入相同培养箱培养 24 h。

抗菌效果评价:样品的抗菌性能通过抑菌率进行判定,可按式(2)计算:

$$X_s = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $X_s$  为抑菌率;  $A$  为“0”接触时刻平均菌落数;  $B$  为样品振荡后平均菌落数。

### 1.5 抗菌机理

为探讨 TP 的抗菌机制,采用 H-7000 型透射电镜(日本 HITACHI 公司)分析经过 PLA/TP 复合纳米纤维膜处理后的菌体,观察 TP 加入对细胞超微结构的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 FT-IR 分析

图 1 示出不同混比条件下 PLA/TP 复合纳米纤维膜的红外光谱图。

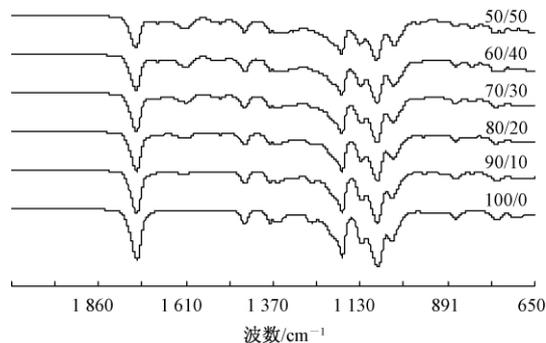


图 1 PLA/TP 复合纳米纤维膜 FT-IR 图

Fig. 1 IR spectra of PLA/TP composed nanofiber membranes

通过分析图 1 可得出以下 2 点结论: 1) 当 PLA 与 TP 混比为 100/0 时,红外谱图中在 1 381  $\text{cm}^{-1}$  处出现甲基的变形振动吸收峰,但随着 TP 含量的增加,当混比为 80/20 时,这个吸收峰已右移至 1 359  $\text{cm}^{-1}$  处,当 TP 含量继续增加至二者比例为 50/50 时,已右移至 1 339  $\text{cm}^{-1}$  处,这是由于 PLA 中的甲基结合 TP 中的苯环形成  $\pi-\pi$  共轭体系,由于共轭效应,使其电子云密度平均化,因此使吸收峰向低波数方向移动,同时由于受到氢键的影响,峰形有变宽的趋势; 2) 随着 PLA/TP 中 TP 含量的增加,PLA 中出现苯环取代现象,当二者混比达到 70/30

时,从红外谱图可以很明显地看出在 1 613  $\text{cm}^{-1}$  处出现苯环吸收峰,当 TP 含量继续增加,吸收峰也随之增强,可以看到在 60/40、50/50 的红外谱图中分别在 1 611  $\text{cm}^{-1}$  和 1 558  $\text{cm}^{-1}$  处出现苯环吸收峰,同时在 821  $\text{cm}^{-1}$  处出现了取代苯的特征吸收峰。综上所述可知:以 PLA 为载体,TP 为抗菌剂共混纺制的 PLA/TP 复合纳米纤维薄膜中二者通过价键的结合很好地复合在一起。

### 2.2 复合膜的抑菌性

图 2 (a)、(b)、(c) 分别示出不同质量比条件下 PLA/TP 复合纳米纤维膜对 *E. coli* 的抑菌效果。图 2 (d)、(e)、(f) 分别示出各试样对 *S. aureus* 的抑菌效果图。从图 2 (a)、(d) 中可以明显看到没有添加 TP 的纯 PLA 纳米纤维膜没有抑菌圈,且试样下方细菌的繁殖情况仅是轻微减少,因此可以判定纯 PLA 纳米纤维膜对 *E. coli* 和 *S. aureus* 没有抗菌效果。当二者质量比为 90/10 时(见图 2 (b)、(e)),可以看出试样周围仍然没有抑菌圈,但试样下方细菌繁殖情况明显被抑制,仅有少量菌落,因此可以认为该试样对 2 种菌的抗菌效果较好。当二者质量比为 80/20 时,从图 2 (c)、(f) 中可以看出试样周围开始出现抑菌圈,且试样下方没有细菌繁殖,对 2 种菌的抗菌效果好。继续增加 TP 含量,发现除抑菌圈宽度稍有增加外,其余效果与图 2 (c)、(f) 相似。

表 1 示出不同质量比 PLA/TP 复合纳米纤维膜抑菌宽度,从表可以看出,随着复合薄膜中 TP 含量的增加,抑菌圈宽度也逐渐增加,抗菌效果增强。当 PLA 与 TP 的质量比为 50/50 时,对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌圈宽度分别达到 5.17 cm 和 5.67 cm。并且对 *S. aureus* 的抑菌圈宽度要稍大于大肠杆菌的抑菌圈宽度,说明复合薄膜对 *S. aureus* 的抗菌效果强于 *E. coli*。

表 1 不同质量比 PLA/TP 复合纳米纤维膜抑菌宽度

Tab. 1 Widths of inhibition zones of PLA/TP composed membranes with different mass ratios cm

PLA/TP	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
90/10	0	0
80/20	3.67	3.71
70/30	4.34	4.67
60/40	4.67	5.34
50/50	5.17	5.67

### 2.3 振荡烧瓶法分析

表 2 示出不同质量 HPLA/TP 复合纳米纤维膜抑菌率。从表可看出,随着 PLA 与 TP 质量比从

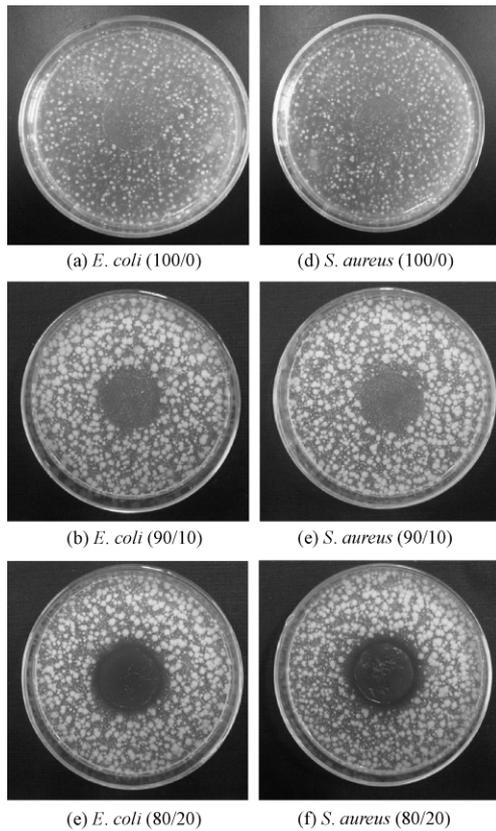


图 2 不同质量比 PLA/TP 复合纳米纤维膜抑菌圈实验效果

Fig. 2 Results of inhibition zone tests of PLA/TP composed membranes with different mass ratios

100/0 减小到 90/10 时, 抑菌率明显提高。对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别从 20.6% 和 21.3% 迅速上升到 92.9% 和 85.7%, 当 PLA 与 TP 质量比继续减小到 50/50 时, 复合纳米纤维膜的抑菌率上升趋势逐渐平缓, 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别达到 96.9% 和 97.6%。说明不加 TP 的 PLA 纳米纤维膜的抗菌效果不明显。当 PLA 与 TP 质量比为 90/10 时, 复合纳米纤维膜的抗菌性能已得到显著提高, 若再增加 TP 含量, 对抗菌性能的改善已不太明显。各试样对 *S. aureus* 的抑菌率要稍大于 *E. coli* 的抑菌率, 与抑菌圈实验结果一致。

图 3 示出不同质量 HPLA/TP 复合纳米纤维抗菌效果。从图可看出, 加了 PLA/TP 复合纳米纤维膜后, 平皿中的菌落数较之不加试样的有明显减少, 随着 TP 含量的增加, 菌落数迅速减少, 当 PLA 与 TP 质量比从 70/30 减小到 50/50 时, 从拍摄的图片中凭肉眼均已很难观察到菌落。

## 2.4 复合膜的形貌分析

为了进一步探讨 PLA/TP 复合纳米纤维膜的抑

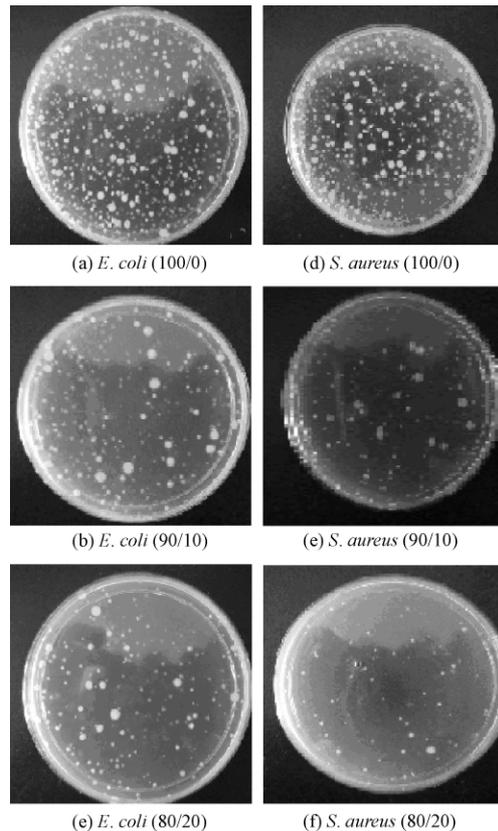


图 3 不同质量比 PLA/TP 复合纳米纤维膜抗菌效果

Fig. 3 Antibacterial results of PLA/TP composed membranes with different mass ratios

表 2 不同质量比 PLA/TP 复合纳米纤维膜抑菌率  
Tab. 2 Antibacterial rate of PLA/TP composed films with different mass ratios

PLA/TP	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	%
100/0	20.6	21.2	
90/10	85.7	92.9	
80/20	93.4	94.7	
70/30	94.5	95.2	
60/40	96.2	97	
50/50	96.9	97.6	

菌机理, 采用透射电镜分析处理前后 *S. aureus* 和 *E. coli* 超微结构的变化。图 4 示出不同薄膜处理前后菌体的 TEM 照片。从图中可以看出未经纤维膜处理的 *S. aureus* 和 *E. coli* 呈清晰的球状结构和杆状结构, 菌体细胞壁和细胞膜连续完整, 表面平滑, 细胞结构完整, 没有损伤(图 4(a)、(d))。2 种菌经 PLA 纳米纤维膜处理后, 虽然细胞结构开始模糊, 但细胞壁、膜没有损伤(图 4(b)、(e))。明显观察到经 PLA/TP (50/50) 复合纳米纤维膜处理后, 细胞质膜开始破裂(图 4(c)、(f)), 并且发现经处理过后的 *S. aureus* 细胞膜破裂程度严重, 导致细胞内容物

外泄,见图 4(c)。由此可以推断 PLA/TP 复合纳米纤维膜破坏了 2 种菌体细胞膜结构的完整性,内容物呈絮状流出,细胞质成碎渣样或呈弥散状,最终导致细胞死亡。同时可以看出添加 TP 的复合纳米薄膜对 *S. aureus* 细胞膜的破坏作用要强于 *E. coli*,作

用相同时间后,TEM 照片显示 *E. coli* 的细胞膜开始出现大量裂痕,而 *S. aureus* 的细胞膜已基本完全破裂,内容物流出。因此在相同作用时间内,PLA/TP 复合纳米纤维薄膜对 *S. aureus* 的抗菌效果要优于 *E. coli*。

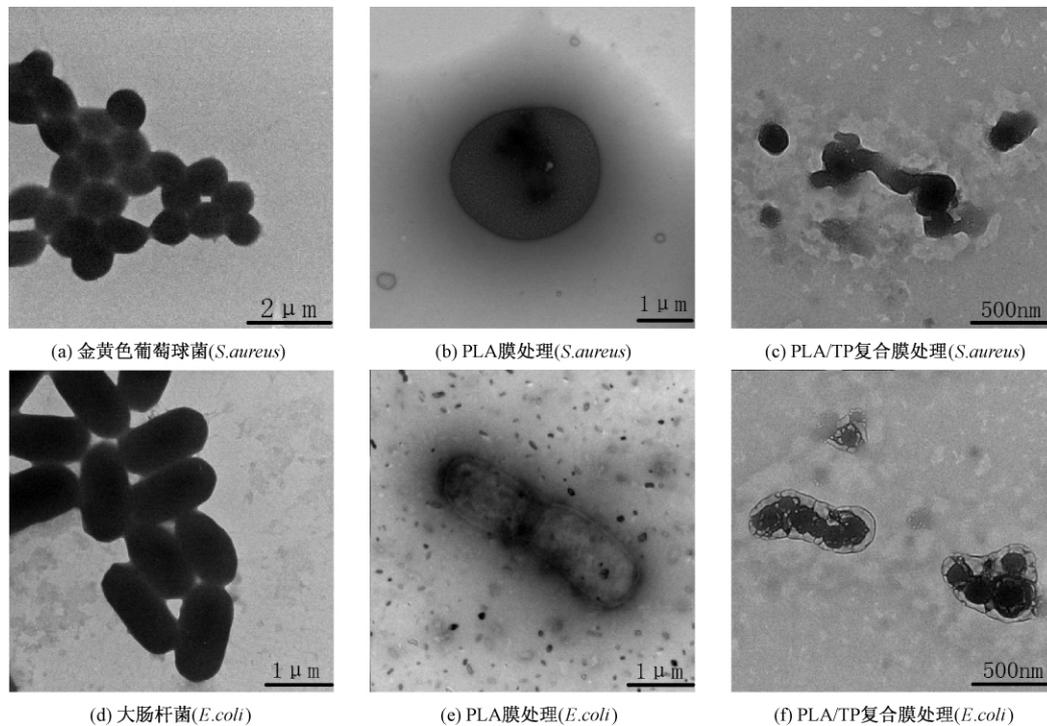


图 4 不同薄膜处理前后菌体的 TEM 照片

Fig. 4 TEM images of bacterial before and after treated by different membranes. (a) (b) (c): *S. aureus* before and after treated by PLA membrane and PLA/TP composed membranes; (d) (e) (f): *E. coli* before and after treated by PLA membrane and PLA/TP composed membrane

### 3 结 论

1) FT-IR 分析确定聚乳酸/茶多酚复合纳米纤维膜中有茶多酚的存在。二者通过价键的结合很好地复合在一起。

2) PLA/TP 复合纳米纤维膜抗菌测试结果均表明:未添加 TP 的 PLA 纳米纤维膜基本没有抗菌效果,但随着 TP 含量的增加,抗菌性能提高。并且复合纳米纤维膜对金黄色葡萄球菌的抗菌效果要优于大肠杆菌。抑菌圈实验结果表明:随着复合薄膜中 TP 含量的增加,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌宽度分别从 3.67 和 3.71 cm 增加到 5.17 和 5.67 cm。振荡烧瓶实验结果表明:少量 TP 的加入,可使得 PLA/TP 复合纳米纤维膜的抗菌性能得到显著提高,若持续增加 TP 含量,对抗菌性能的改善不太明显。

3) TEM 照片从微观上揭示了 PLA/TP 复合纳米纤维膜对 2 种菌种细胞膜结构的破坏作用。同时也揭示了该复合纳米纤维薄膜对金黄色葡萄球菌膜结构完整性的破坏作用要强于大肠杆菌。 **FZXB**

#### 参考文献:

[1] 程永清,李丽玲,尹晓敏,等. 溶胶-凝胶法制备的掺银 TiO<sub>2</sub> 的相变和抗菌性能研究[J]. 贵金属, 2007, 28 (1): 37-42.  
CHEN Yongqing, LI Lilin, YIN Xiaomin, et al. Study on phase transformation and bactericidal activity of sol-gel Ag doped titania powders [J]. Precious Metals, 2007, 28 (1): 37-42.

[2] TIAN F, LI B, JI B P. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: the polarity affects the bioactivities [J]. Food Chem, 2009 (113): 173-179.

[3] MATASYOH J C, MAIYO Z C, NUGRE R M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the

- essential oil of *Coriandrum sativum* [J]. *Food Chem*, 2009 ( 113 ): 526 – 529.
- [ 4 ] KOVALASKAYA N , HAMMONDA R W. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-I and defensin recombinant proteins , protein expression and purification [J]. *Protein Expression and Purification* , 2009 ( 63 ): 12 – 17.
- [ 5 ] 江海风 , 杨建忠. 含纳米  $\text{TiO}_2$  毛织物的抗菌性能研究 [J]. *毛纺科技* 2008 ( 1 ): 4 – 7.  
JIANG Haifeng , YANG Jianzhong. Antibacterial property of the wool fabric with nanometer  $\text{TiO}_2$  [J]. *Wool Textile Journal* , 2008 ( 1 ): 4 – 7.
- [ 6 ] DENG H B , WANG X Y , LIU P , et al. Enhanced bacterial inhibition activity of layer-by-layer structured polysaccharide film-coated cellulose nanofibrous mats via addition of layered silicate [J]. *Carbohydrate Polymers* , 2011 ( 83 ): 239 – 245.
- [ 7 ] 孙娟 , 姚琛 , 季新松. 抗菌聚合物纳米纤维的研究进展 [J]. *高分子通报* 2010 ( 8 ): 27 – 33.  
SUN Juan , YAO Chen , LI Xinsong. Progress in the antibacterial polymer nanofibers [J]. *Polymer Bulletin* , 2010 ( 8 ): 27 – 33.
- [ 8 ] 孙唯唯 , 张华 , 周永凯. 抗菌型多功能聚酰胺纤维的结构与性能 [J]. *纺织学报* 2012 , 33 ( 4 ): 6 – 11.  
SUN Weiwei , ZHANG Hua , ZHOU Yongkai. Structure and properties of antibacterial multifunctional polyamide fibers [J]. *Journal of Textile Research* , 2012 , 33 ( 4 ): 6 – 11.
- [ 9 ] 王曦 , 王鸿博 , 高卫东 , 等. 含银 PA6 纳米纤维制备及抗菌性能的研究 [J]. *合成纤维工业* , 2008 , 31 ( 1 ): 12 – 14.  
WANG Xi , WANG Hongbo , GAO Weidong , et al. Study on preparation and antibacterial property of silver-containing PA6 nanofiber [J]. *China Synthetic Fiber Industry* , 2008 , 31 ( 1 ): 12 – 14.
- [ 10 ] XU J , ZHANG J H , GAO W Q , et al. Preparation of chitosan/PLA blend micro/nanofibers by electro-spinning [J]. *Mater Lett* , 2009 ( 63 ): 658 – 660.
- [ 11 ] CHRISTIANE J D , EDWARD R F. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea [J]. *J Nutr Biochem* , 2001 ( 12 ): 404 – 421.
- [ 12 ] AN B J , KWAK J H , SUN J H , et al. Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols [J]. *Food Chem* , 2004 ( 88 ): 549 – 555.
- [ 13 ] 李慧玲 , 吴明华 , 林鹤鸣. 茶多酚-铜络合物的合成及抗菌、消臭性能研究 [J]. *浙江理工大学学报* , 2008 , 25 ( 3 ): 266 – 270.  
LI Huiling , WU Minghua , LIN Heming. Research on the synthesis of tea polyphenols/Cu complex and its bacteriostasis and deodorization property [J]. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University* , 2008 , 25 ( 3 ): 266 – 270.