

聚乙烯醇/单宁共混膜的制备及其抗菌性能*

杨芬玲 姚晋荣** 陈新 邵正中

(聚合物分子工程国家重点实验室 复旦大学高分子科学系 先进材料实验室 上海 200433)

摘要 采用溶液共混浇膜法制备了不同单宁含量的聚乙烯醇/单宁共混膜材料,利用扫描电镜(SEM)、广角X-射线衍射(WAXD)及示差扫描量热分析(DSC)对共混膜的结构进行了表征.结果表明,单宁和聚乙烯醇具有良好的相容性,聚乙烯醇的结晶能力及熔点均随单宁的加入量增大而稍降低.少量戊二醛的轻度交联作用使单宁在共混膜中非常稳定,在水中浸泡24 h后也仅有不到1.8%的单宁(相对膜中单宁总质量)渗出.接触法抗菌试验表明,所制备的共混膜对大肠杆菌(*E. coli*, CMCC 44103)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 6538)和表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*, ATCC 12228)都具有良好的抗菌能力,且随着单宁含量的升高而增强.

关键词 单宁, 聚乙烯醇, 共混膜, 抗菌

单宁(tannin, TN)是一类源于植物体的多酚化合物的通称,广泛存在于植物各部分^[1,2].由于具有多元酚结构,单宁能与蛋白质、生物碱和多糖等生物大分子形成复合物^[1,3,4],并能与多种金属离子形成稳定的络合物^[5,6],具有良好的防紫外、抗氧化和广谱抗菌等性能^[7-14].作为一种来源广泛、价格低廉的天然有机广谱抗菌剂及抗氧化剂,单宁已被成功地应用于食品、水处理和涂料等领域.

聚乙烯醇(PVA)是一种水溶性高分子,具有优异的成膜性能、良好的生物相容性和生物可降解性,广泛地应用于包装、粘接剂及生物医用等领域^[15-18].但聚乙烯醇也存在吸湿性大、耐水性差及长期处于潮湿环境下易于滋生各种细菌等缺点.为提高聚乙烯醇的抗微生物侵蚀能力,本文采用溶液共混浇膜法制备了一种水不溶性PVA和单宁共混膜材料.实验结果表明,单宁的引入赋予了PVA材料良好的抗菌能力,对大肠杆菌(*E. coli*, CMCC 44103)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 6538)和表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*, ATCC 12228)均有一定的杀灭能力.

1 实验部分

1.1 试剂

黑荆树皮单宁(工业级)由福建南靖林化厂提供;聚乙烯醇(分析纯,聚合度为1750)购自上

海前进化学试剂厂;磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH = 7.4)购自Sigma-Aldrich公司;戊二醛(分析纯, 25%)购自国药集团上海化学试剂有限公司;LB肉汤、LB琼脂、SOB琼脂、Tryptone肉汤购自生工生物工程(上海)有限公司;大肠杆菌(*E. coli*, CMCC 44103)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC 6538)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*, ATCC 12228)购自上海天呈生物信息科技有限公司;一次性无菌培养皿和接种环购自上海三踏生物科技有限公司.

1.2 聚乙烯醇/单宁共混膜的制备

称取适量的单宁溶于去离子水中配制成0.5 wt%的单宁水溶液.将适量聚乙烯醇置于去离子水中,在95℃下搅拌12 h使其完全溶解后,配制成6 wt%的聚乙烯醇溶液.在60℃下,将计算量的上述单宁水溶液缓慢滴加入聚乙烯醇溶液中,并继续搅拌2 h以混合均匀;再滴加适量的0.1 wt%的戊二醛水溶液(戊二醛与PVA中羟基含量的摩尔比为0.04%),搅拌均匀后将共混溶液浇铸于由涤纶薄膜制成的盒子中,在室温下干燥成膜.共混膜透明,表面光滑,膜厚约50 μm,储存于干燥器中备用.

1.3 共混膜的表征

广角X-射线衍射(WXRD)采用X'Pert PRO X-射线衍射仪(荷兰PANalytical公司)测定共混膜的X-射线衍射图谱,铜靶($\lambda = 15406 \text{ nm}$),管电

* 2011-04-11 收稿, 2011-06-27 修稿;国家自然科学基金(基金号 21034003)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: yaoyaojr@fudan.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11092

压 40 kV,管电流 40 mA,范围 $5^{\circ} \sim 60^{\circ}$,扫描速度为 $0.05(^{\circ})/\text{min}$.

扫描电镜(SEM)采用 Tescan 5136MM(捷克 TESCAN 公司)扫描电子显微镜,将共混膜在液氮中淬断后喷金,观察样品的断面形貌.测试的电压为 20 kV.

示差扫描量热分析(DSC)采用日本岛津公司 DSC-60 示差扫描量热仪得到共混膜的 DSC 曲线,氮气($30 \text{ mL}/\text{min}$)气氛,从 50°C 以 $10 \text{ K}/\text{min}$ 的速率升温至 300°C .聚乙烯醇膜及共混膜的 DSC 曲线上熔融峰值温度记作为相应样品的熔点(T_m).

1.4 共混膜在水中单宁析出率

采用 UV-3150 型紫外分光光度计(日本岛津公司,1 cm 石英比色皿)测定不同浓度的单宁水溶液在 275 nm 处吸光度值,得到单宁含量标准曲线.室温下将加入相同戊二醛量所制备的 PVA 膜和 PVA/TN 膜(直径为 $85 \sim 90 \text{ mm}$ 的圆形膜)分别浸没于 100 mL 去离子水中一定时间后,采用分光光度法定量测定所析出的单宁浓度(以 PVA 膜浸泡液做参比).共混膜在水中单宁的析出率定义为在指定时间内共混膜在 100 mL 水中所析出单宁质量占共混膜中单宁总质量的百分数.

1.5 抗菌性能测试

为保障实验安全,所有涉菌实验均在生物安全柜(Ⅱ级)内进行,并按文献[19]的指导方法进行.按产品说明用去离子水将培养基干粉配制成相应的无菌琼脂盘和营养液.LB 琼脂和 LB 肉汤用于培养大肠杆菌(*Escherichia coli*,CMCC 44103),SOB 琼脂和 Tryptone 肉汤用于培养金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,ATCC 6538)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*,ATCC 12228).

1.5.1 细菌悬浮液的准备

用一次性无菌接种环取适量的菌种干粉放入相应的培养液(LB 肉汤或 Tryptone 肉汤)中,在涡旋振荡器上混合均匀后放入生物培养箱内(37°C)培养 24 h.再用从中取出 $100 \mu\text{L}$ 细菌溶液加入到 3 mL 相同的培养液中,混合均匀后在 37°C 下培养 24 h.所得细菌溶液用无菌 PBS($\text{pH} = 7.4$)稀释 100 倍后备用,细菌浓度约为 $10^5 \sim 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$.

1.5.2 接触法抗菌的测试

取 $100 \mu\text{L}$ 上述细菌溶液接种到共混膜样品

($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$)上,静置一段时间(如 0.5,1.0,1.5,3.0 h 等)后,将膜小心转移到盛有 10 mL 无菌 PBS($\text{pH} = 7.4$)的 100 mL 广口瓶中,在涡旋混合器上振荡 3 min;然后将所得的细菌液用无菌 PBS($\text{pH} = 7.4$)进行梯度稀释,各取 $100 \mu\text{L}$ 细菌溶液分别滴置在相应的琼脂培养基上,静置几分钟后将其转移到生物培养箱(37°C)内培养 24 h,最后取出进行菌落计数而计算出膜材料上残留的细菌浓度.用细菌对数降低值(bacterial log reduction)来表示膜材料的抗菌性能,它等于放置相同时间的细菌溶液浓度对数值与接触一定时间后 PVA 膜或 PVA/TN 膜上残留细菌浓度对数值之差.实验中同时使用 3 块相同单宁含量的共混膜进行平行试验,并至少重复 1 次.

1.5.3 细菌在膜表面的吸附

将 PVA 及 PVA/TN 膜($0.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$)浸没于 10 mL 细菌溶液(*S. aureus*,ATCC 6538, $10^5 \sim 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$)中,室温下振荡 1 h;取出后用灭菌去离子水小心清洗 1 次,用 25% 戊二醛溶液室温浸泡 0.5 h,再分别用 10 mL 的去离子水及不同浓度乙醇(25%、50%、75% 和无水乙醇)进行清洗和梯度脱水,待乙醇挥发后放入干燥器中过夜.表面喷金后,电镜下观测细菌在膜表面的吸附情况.

2 结果与讨论

2.1 共混膜的结构表征

黑荆树皮单宁是一种天然多酚类的化合物,属缩合类单宁^[1],含有大量的酚羟基和醇羟基,因此单宁和聚乙烯醇能通过羟基产生氢键相互作用而紧密结合在一起.通过简单的溶液共混浇膜方法,PVA 和单宁在少量戊二醛的轻度交联作用下形成了一种均一稳定的水不溶性共混膜.图 1 为聚乙烯醇膜和不同单宁含量的共混膜断面的 SEM 图.与纯聚乙烯醇膜(图 1(a))相比,单宁加入后除随单宁含量的增加到 20% 时(图 1(d))共混膜断面稍显粗糙外,共混膜断面并无明显的宏观相分离,即表明聚乙烯醇和单宁具有良好的相容性.

图 2 为聚乙烯醇和共混膜的 XRD 图.纯聚乙烯醇膜(图 2(a))在 19.9° 处有一较强的结晶衍射峰,而且在 12° 和 40° 附近各有一个不甚明显的宽峰,与文献报道基本一致^[20,21].加入单宁后,位于 19.9° 处的衍射峰仍然很明显,但该衍射峰的半高峰宽随单宁加入量的增加而有所增大(图 2

(b)~(d)). 这表明所添加的单宁对聚乙烯醇的结晶能力有一定的影响,使结晶度略微有所下降. 同时 DSC 分析结果显示,纯聚乙烯醇膜的 T_m 为 231.7°C ,与文献值相近^[21];单宁含量为 5%、10%

和 20% 时,共混膜的 T_m 分别为 229.0°C 、 226.8°C 和 221.3°C ,即随着单宁含量的增加共混膜的 T_m 值逐渐下降.

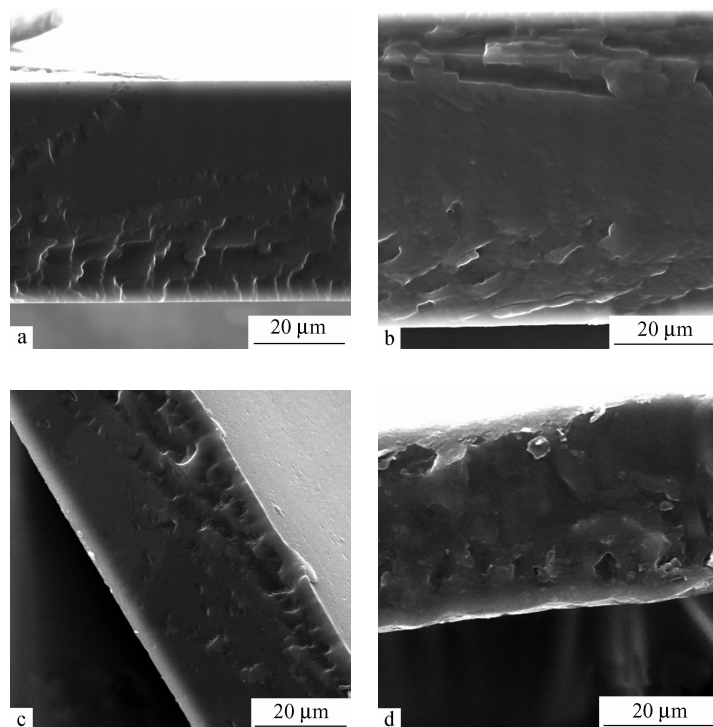


Fig. 1 SEM images of the cross-section of PVA film (a) and PVA/tannin blended films with 5% (b), 10% (c) and 20% (d) of Tannin

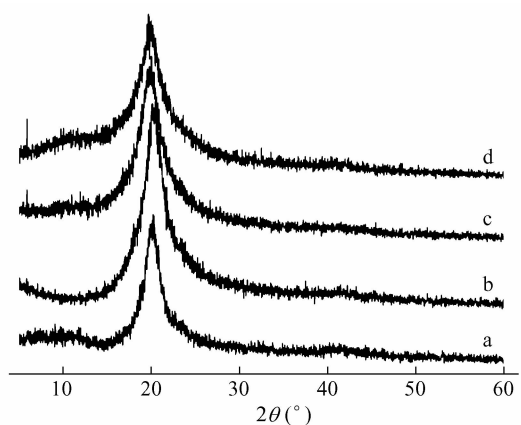


Fig. 2 WAXRD patterns of PVA film (a) and PVA/tannin blended films with 5% (b), 10% (c) and 20% (d) of tannin

综合以上结果我们认为,因单宁和聚乙烯醇都含有大量羟基,单宁能通过与聚乙烯醇分子形成较强的氢键相互作用而插入聚乙烯醇分子链间,从而使聚乙烯醇分子链的结晶能力下降.但所用单宁的分子量并不高(约 3000),少量单宁的加

入并不能完全破坏聚乙烯醇的规整结构,结果导致结晶度和 T_m 值均有所下降,这与添加含多羟基的小分子增塑剂及茶多酚的实验结果类似^[21~25].

2.2 共混膜中单宁的稳定性

单宁是一种天然多酚类化合物,在紫外光区有很强的吸收,因此可以采用分光光度法对 PVA 与单宁共混膜在水中的析出量进行定量测定^[1],从而得出单宁在共混膜中结合状况及稳定性.共混膜在水里浸泡一段时间后单宁析出量的 UV 测定结果列于表 1.从表中可以看出,单宁在水里析出量很小,尽管随浸泡时间的延长单宁的析出量会有所增大,但即使在析出量最大的情况下(含 20% 单宁的共混膜经 24 h 浸泡)也仅占原膜单宁总质量的 1.76%,基本可以忽略不计.这表明单宁在聚乙烯醇/单宁的共混膜中非常稳定,不易渗出.因为戊二醛与 PVA 和单宁的羟基均可发生反应,使单宁固定在这种轻度交联的共混膜中而难以渗出,有利于材料保持其抗菌能力的长效性.

Table 1 Tannin content leaked from PVA/TN blend films after immersed in water for various time

Tannin content in PVA/TN film (%)	Tannin content leaked from the blend films (%)				
	5 min	0.5 h	1 h	9 h	24 h
10	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	—
20	0.26 ± 0.01	0.79 ± 0.03	1.09 ± 0.01	1.69 ± 0.01	1.76 ± 0.03

2.3 共混膜的抗菌性能

采用接触法以大肠杆菌 (*Escherichia coli*, CMCC 44103, 革兰氏阴性菌), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, 革兰氏阳性菌) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228, 革兰氏阳性菌) 为对象进行不同单宁含量的聚乙烯醇/单宁共混膜的抗菌性能测试, 结果列于表 2.

从表 2 可以看出, 经过一段时间接触后, PVA 及 PVA/TN 共混膜上的残留细菌浓度都有一定程度的降低, 且接触时间越长膜上残留细菌越少甚至检测不到. 但这并不意味着纯 PVA 有抗菌性能, 而是膜表面对细菌有一定的吸附作用所导致 (图 3(a)), 这在其他材料 (如棉布和聚氨酯) 的接触法抗菌测试中也同样可以观测到^[26]. 同时从图 3 还可以看出, 单宁含量分别为 10% 和 20% 共混膜表面 (图 3(b) 和 (c)) 所吸附的细菌数量与纯 PVA 膜相比差别并不大. 这说明单宁的加入对膜的细菌吸附性能影响不大, 加之单宁在膜中很稳定而不易析出, 因此共混膜的抗菌功能主要源于固定在膜表面的单宁.

以 PVA 膜作参照, 大肠杆菌在膜材料上接触 1 h 后含 5% 单宁的共混膜上残留细菌浓度相对于纯 PVA 膜下降了 1.6 个数量级 (即减少了 97.5%); 当单宁含量增加到 10% 及 20% 后, 共混

Table 2 Antibacterial activities of PVA/TN blend films against *Escherichia coli* (CMCC 44103), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)^a

Content of tannin (%)	Contact time (h)	Bacterial lg reduction		
		<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
0 (PVA)	0.5	-0.04 ± 0.09	0.14 ± 0.09	0.03 ± 0.01
	1.0	1.25 ± 0.03	1.42 ± 0.03	0.06 ± 0.01
	1.5	1.04 ± 0.09	1.21 ± 0.09	0.73 ± 0.35
	3.0	1.49 ± 0.26	1.66 ± 0.26	1.00 ± 0.33
5	0.5	1.90 ± 0.16	1.60 ± 0.02	0.93 ± 0.42
	1.0	2.85 ± 0.07	2.02 ± 0.07	0.39 ± 0.01
	1.5	3.04 ± 0.04	3.36 ± 0.06	0.81 ± 0.42
	3.0	3.72 ± 0.09	3.93 ± 0.09	1.95 ± 0.15
10	0.5	2.00 ± 0.01	1.73 ± 0.10	0.09 ± 0.05
	1.0	3.46 ± 0.01	1.49 ± 0.07	0.78 ± 0.01
	1.5	4.60 ± 0.14	2.90 ± 0.08	1.40 ± 0.01
	3.0	T ^b	3.35 ± 0.01	1.53 ± 0.35
20	0.5	1.70 ± 0.03	1.88 ± 0.03	1.09 ± 0.01
	1.0	3.56 ± 0.10	2.57 ± 0.10	1.53 ± 0.05
	1.5	5.00 ± 0.09	3.00 ± 0.08	T ^b
	3.0	T ^b	4.48 ± 0.05	T ^b

^a Bacterial concentration: $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL; ^bT: total killed

膜上残留细菌则相应减少了 99.4% 和 99.5%, 即单宁含量的增加共混膜的抗菌能力也随之增强. 不同接触时间和不同菌种的实验结果都可以得出相同的结论. 因此, 单宁的引入大大加强了 PVA 的抗菌性能, 且随单宁的含量升高而增强.

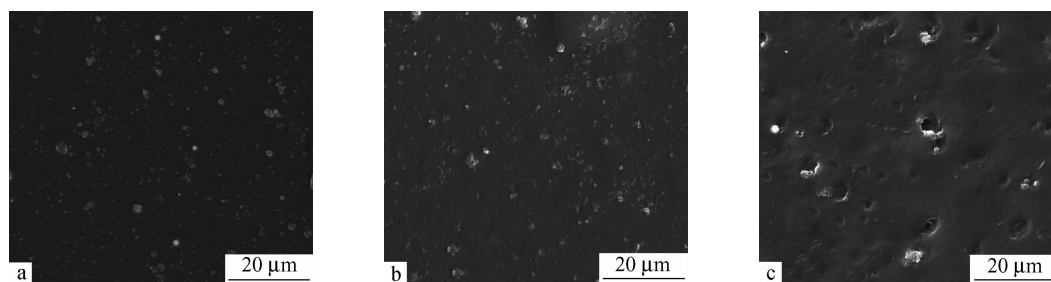


Fig. 3 SEM images of the surface of PVA film (a) and PVA/tannin blended films with 10% (b) and 20% (c) of tannin after immersing in *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL) solution for 1 h

3 结论

通过简单的溶液共混浇膜方法将单宁引入到聚乙烯醇中,得到了一种均一稳定的聚乙烯醇/单宁共混膜材料.单宁和聚乙烯醇都带有大量的羟基,相互间可以形成较强的氢键相互作用紧密结合而使得两者间具有良好的相容性;同时少量戊

二醛的交联作用使单宁固定在共混膜轻度交联的网络中,因此在水中具有良好稳定性.单宁的加入使聚乙烯醇的结晶能力和熔点均有所下降,但能显著地提高聚乙烯醇材料的抗菌性能且随单宁含量的增加而增强.这种具有良好抗菌性的新型聚乙烯醇/单宁复合材料可望在包装材料和涂料等领域得到应用.

REFERENCES

- 1 Shi Bi(石碧),Di Ying(狄莹). Plant Polyphenols(植物多酚). Beijing(北京):Science Press(科学出版社),2000. 5 ~ 45
- 2 Braval L. Nutrition Reviews,1998,56(11):317 ~ 333
- 3 Kroll N G,Rawel H M,Rohn S. Food Sci Thechnol Res,2003,9(3):205 ~ 208
- 4 Sakihama Y,Cohen M F,Grace S C,Yamasaki H. Toxicology,2002,177(1):67 ~ 80
- 5 Ogata T,Nakano Y. Water Research,2005,39(18):4281 ~ 4282
- 6 Liao X P, Ma H W, Wang R, Shi B. J Membrane Sci,2004,243(1-2):235 ~ 241
- 7 Reddy M K,Gupta S K,Jacob M R,Khan S I,Ferreira D. Planta Medica,2007,73(5):461 ~ 467
- 8 Kloucek P,Polesny Z,Svobodova B,Vlkova E,Kokoska L. J Ethnopharmacology,2005,99(2):309 ~ 312
- 9 Ramesh N,Viswanathan M B,Selvi V T,Lakshmanaperumalsamy P. Med Chem Res,2004,13(6-7):348 ~ 360
- 10 Ge J J, Shi X H, Cai M Q, Wu R, Wang M. J Appl Polym Sci,2003,90(10):2756 ~ 2763
- 11 Du WX,Olsen CW,Avena-Bustillos RJ,Friedman M,McHugh T H. J Food Science,2011,76(2):M149 ~ M155
- 12 Ge Jinjie(戈进杰),Wu Rui(吴睿),Shi Xinghai(施兴海),Liu Yingjun(刘颖俊),Wang Min(王珉). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2003,(6):809 ~ 815
- 13 Ge Jinjie(戈进杰),Cai Meiqin(蔡美琴),Shi Xinghai(施兴海),Wu Rui(吴睿),Wang Min(王珉),Gao Min(高岷),Li Wenjun(李文俊). Polymer Materials Science & Engineering(高分子材料科学与工程),2003,19:187 ~ 190
- 14 Zujko M E,Witkowska A M. International Journal of Food Properties,2011,14(2):300 ~ 308
- 15 Yuan Ruixuan(严瑞瑄). Water-Soluble Polymers(水溶性高分子). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社),1998. 42 ~ 81
- 16 Yang S Y,Huang C Y. J Appl Polym Sci,2008,109(4):2452 ~ 2459
- 17 Ai Limei(艾丽梅),Chen Jie(陈捷),Li Yongxian(李永仙),Feng Wei(冯威),Liu Yan(刘延),Xiong Deqi(熊德骐). Acta Chimica Sinica(化学学报),2007,65(17):1841 ~ 1844
- 18 Matsumura S,Tomizawa N,Toki A,Nishikawa K,Toshima K. Macromolecules,1999,32:7753 ~ 7761
- 19 Richmond J Y,McKinney R W. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,4th ed. Washington,DC:U. S. Government Printing Office,1999. 17 ~ 53
- 20 Li B,Xie B J. J Appl Polym Sci,2004,93(6):2775 ~ 2780
- 21 Jiang Xiancai(江献财),Xu Wenping(徐文萍),Tang Yandong(唐宴东),Zhang Xi(张熙),Dai Hua(代华). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2010,(9):1143 ~ 1147
- 22 Maria T M C,de Carvalho R A,Sobral P J A,Habitante A M B Q,Solorza-Feria J. J Food Eng,2008,87(2):191 ~ 199
- 23 Wang Ru(王茹),Wang Qi(王琪),Li Li(李莉),Ao Ningjian(敖宁建),Hua Zhengkun(华正坤). China Plastics Industry(塑料工业),2002,30(1):32 ~ 34
- 24 Zou Shilong(邹石龙),He Jiyu(何吉宇),Yang Rongjie(杨荣杰). Polymer Materials Science And Engineering(高分子材料科学与工程),2008,24(5):84 ~ 87
- 25 Xu X J,Huang S M,Zhang L H. Polym Compos,2009,30:1611 ~ 1617
- 26 Barnes K,Liang J,Worley S D, Lee J,Broughton R M,Huang T S. J Appl Polym Sci,2007,105:2306 ~ 2313

PREPARATION AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF PVA/TANNIN BLEND FILMS

YANG Fenling, YAO Jinrong, CHEN Xin, SHAO Zhengzhong

(State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Department of Macromolecular Science,
Laboratory of Advanced Materials, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Wattle tannin (TN), a kind of polyphenols compound originated from black wattle, was introduced into poly(vinyl alcohol) (PVA) to prepare PVA/TN blend films by solution blending method. Glutaraldehyde was used to slightly crosslink PVA/TN blend films. The PVA/TN blend films were characterized by scanning electron microscopy (SEM), wide-angle X-ray diffraction (WAXD) and differential scanning calorimetry (DSC). The SEM observations revealed that PVA and TN was miscible in the blend films, which may due to the strong intermolecular hydrogen bonding between the hydroxyl groups from PVA and TN. The melting temperature of the blend film decreased from 231.7°C to 221.3°C when the TN content in the blend film increased from 0 to 20%, but the crystallinity of PVA was slightly decreased. It was found that less than 1.8% of the total amount of TN in blend films could be leached out when the blend films were soaked in water even for 24 h. This implies the good stability of PVA/TN blend films in water, which is beneficial to the long duration of antibacterial activity. The antibacterial activities of PVA/TN blend films were challenged by *Escherichia coli* (CMCC 44103), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) with contact mode. The results showed that with the addition of TN, these PVA-based polymer films exhibited strong antibacterial activities against both gram-negative and gram-positive bacteria. For instance, only 0.5% of *E. coli* was survived on the blend film with 20% TN after 1 h contacting. Therefore, the PVA/TN blended films may have great potential in packaging material and coating fields.

Keywords Tannin, PVA, Blend films, Antibacterial activity