

## 潜在的细菌纤维素/明胶支架材料的制备

杨 茂<sup>1</sup>,甄文娟<sup>2</sup>,陈 慧<sup>1</sup>,单志华<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学 皮革化学与工程教育部重点实验室,四川 成都 610065;2. 成都体育大学 运动医学系,四川 成都 610064)

**摘 要:**实验在 pH 1.0, 温度 40 °C, 避光条件下,通过高碘酸钠对细菌纤维素(BC)进行氧化,制得双醛细菌纤维素(DHBC)。然后在温度 50 °C, pH 6.0, DHBC 与不同用量的明胶溶液进行作用制得双醛细菌纤维素/明胶(DB-G) 3 种复合材料(DB-G5, DB-G10, DB-G15)。通过 FTIR 谱图分析, DB-G 中的 C=O 的伸缩振动吸收峰(1 740 cm<sup>-1</sup>) 消失了,相应地在 1 600 ~ 1 680 cm<sup>-1</sup> 和 1 500 ~ 1 550 cm<sup>-1</sup> 出现了典型的酰胺 I 的  $\nu(\text{C}=\text{O})$  和酰胺 II  $\nu(\text{N}-\text{H})$  的红外吸收峰,随着明胶比例增加,吸收峰变宽并发生部分紫移。根据模拟体液(SBF)降解测试结果, DHBC 及 DB-G 表现出了良好的可降解性,降解周期为 60 ~ 90 d。利用比表面积与孔径分布及 SEM 的测试分析, DB-G5、DB-G10、DB-G15 的孔径变化呈现出了不断减小的趋势。通过 TG/DTG 的热解温度测试结果,与 BC 相比, DHBC 热解温度迅速降低,最大失重温度( $T_{\max}$ )下降 80.1 °C。然而与明胶发生交联后,热分解稳定性得到明显提高, DB-G 的  $T_{\max}$  均大于 340 °C,但 DB-G10 和 DB-G15 的  $T_{\max}$  却不足 2 °C。抗张强度测试表现出类似的情形,与 DB-G10 相比, DB-G15 没有随着明胶用量的进一步提高。综合分析认为,  $m(\text{DHBC}):m(\text{明胶})$  以 1:10 最为合适,即 DB-G10 可作为一种潜在的组织工程支架材料。

**关键词:**细菌纤维素;明胶;支架材料

中图分类号:Q81

文献标志码:A

文章编号:2096-3246(2017)01-0138-06

## Preparation and Properties of the Dialdehyde Bacterial Cellulose-Gelatin Composite Material

YANG Mao<sup>1</sup>, ZHEN Wenjuan<sup>3</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, SHAN Zhihua<sup>1\*</sup>

(1. Key Lab. of Leather Chemistry and Eng. of Ministry of Education, Sichuan Univ., Chengdu 610065, China;

2. Chengdu Sport Univ., Dept. of Sports Medicine, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The dialdehyde cellulose (DHBC) was obtained by oxidation of bacterial cellulose (BC) using sodium periodate at 40 °C and pH 1.0 in the dark. And then three kinds of dialdehyde bacterial cellulose-gelatin composites (DB-G) (DB-G5, DB-G10, DB-G15, respectively) were prepared by reaction of DHBC and gelatin solution at 50 °C and pH 6.0 ± 0.1. By FTIR spectra analysis, the absorption peak of C=O (1 740 cm<sup>-1</sup>) of DB-G disappeared, on the contrary, and the typical bands for amide I  $\nu(\text{C}=\text{O})$  appeared at 1 600 ~ 1 680 cm<sup>-1</sup> and for amide II  $\nu(\text{N}-\text{H})$  at 1 500 ~ 1 550 cm<sup>-1</sup>, in which the absorption peaks become hypsochromic shift and widening with the increase of bonding gelatin. According to the degradation test results in the simulated body fluid (SBF), DHBC and DB-G showed good biodegradable and the cycle of degradation are basically 60 ~ 90 d. The pore diameter of DB-G5, DB-G10 and DB-G15 gradually decrease based on the analysis and test of DB-G by specific surface area, pore diameter distribution and SEM. From the test results of pyrolytic temperature (TG/DTG), compared with the BC, the pyrolysis temperature of DHBC fall rapidly, and the maximum weight loss temperature ( $T_{\max}$ ) drop 80.1 °C. The thermal stability of DB-G was improved considerably after crosslinking with gelatin, in which  $T_{\max}$  were greater than 340 °C, but  $T_{\max}$  of DB-G10 and DB-G15 were less than 2 °C. Similarly, from tensile strength test, DB-G15 is not further improved than DB-G10 with the increase of gelatin. Comprehensive analysis, the appropriate mass ratio of DHBC and gelatin is 1:10 that DB-G10 can be as a kind of potential biomass-based tissue engineering scaffold material.

**Key words:** bacterial cellulose; gelatin; scaffold material

收稿日期:2016-07-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51243006)

作者简介:杨 茂(1986—),男,博士.研究方向:生物质材料. E-mail:ym8669@163.com

\* 通信联系人 E-mail:zhihuashan@sohu.com

近年来,越来越多的证据表明拥有 3D 多孔结构的组织工程材料与生物体细胞外基质更加接近,这不仅可以为细胞的粘附和生长提供一定的力学支撑,而且可以有效地调节细胞的生理活动<sup>[1-3]</sup>。拥有 3D 纳米网状结构的葡萄糖线性超分子聚合物,细菌纤维素(BC)以其优越的力学性能,生物相容性及适应性而成为组织工程学近年来研究的热点<sup>[4-6]</sup>。由于 BC 拥有与其他纤维素相似的化学结构,在人体内环境中无法发生降解,很大程度上限制了 BC 在组织工程材料中的应用。Li 等<sup>[7]</sup>通过利用高碘酸对 BC 进行氧化,制得的双醛细菌纤维素具有很好的可生物降解性能,为制备具有优良力学性能,生物相容和生物可降解性的 BC 基组织工程材料提供了良好的途径。

明胶作为胶原蛋白部分变性产物,具有低抗原性和可生物降解性,含有着大量的重复氨基酸序列单元 RGD (Arg-Gly-Asp),有利于细胞外基质蛋白及整合素的吸附,起到很好调节细胞的粘附,增殖及生理代谢作用<sup>[8-10]</sup>。同时,明胶分子中大量的活性基团为制备明胶复合材料提供了更多的化学位点。考虑到这些因素,实验利用高碘酸对 BC 氧化制得双醛细菌纤维素,然后与明胶溶剂进行交联,旨在制备具有优良性能的 3D 生物质组织工程材料。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料与仪器

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%, AR), 乙二醇 (99.5%, AR), 盐酸羟胺 (98.5%, AR), 明胶 (BR), 成都科龙化工试剂厂; 高碘酸钠 (99.5%, AR), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99.5%, AR), 天津科密欧化学试剂厂; 细菌纤维 BC (BR), 海南亿德食品有限公司。

FTIR 型红外光谱仪 (美国); Tristar 3000 型比表面与孔隙度分析仪 (英国); JSM-7500F 型扫描电镜 (日本); TG209F1 型热重分析仪 (德国); AI-7000SN 型万能材料测试仪 (台湾)。

### 1.2 双醛细菌纤维素的制备

称取一定质量的 BC 膜置入锥形瓶,在摇床上浸入 100 倍 (按 BC 质量计) 蒸馏水中,用 NaOH 调节至中性,并用 100 倍去离子水水洗 2 次,各 5 min。在锥形瓶中加入 100 倍去离子水,1.0 mol/L 硫酸调节 pH 1.0,加入 1.3 倍高碘酸钠,遮光条件下,40 ℃ 恒温振荡反应 4 h。反应结束后,用 100 倍乙二醇洗涤除去未反应的高碘酸盐,并用 100 倍去离子水水洗 3~5 次,各 5 min。冷冻干燥获得双醛细菌纤维

素(DHBC)。定量称取 DHBC,根据席夫碱反应原理,利用盐酸羟胺法测定醛基质量分数<sup>[11]</sup>。

### 1.3 DB-GEL 复合材料的制备

称取相同质量 3 份 DHBC,分别加入明胶溶液中使  $m(\text{DHBC}):m(\text{明胶})$  分别为 1:5,1:10 和 1:15。用 1.0 mol/L 硫酸调节 pH6.0,控温 50 ℃,恒温振荡反应 4 h。反应结束后,用 100 倍 30 ℃ 去离子水水洗 2 次,各 5 min,除去表面粘附的明胶,冷冻干燥,获得复合产物分别标记为 DB-G5、DB-G10、DB-G15。反应过程见图 1。

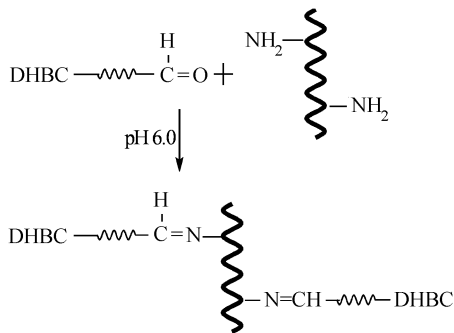


图1 DHBC与明胶缩合反应路线图

Fig.1 Condensation reaction route of DHBC and gelatin

### 1.4 降解性能测试

BC、DHBC 和 DB-G 膜 (15 mm × 15 mm) 各取 7 组,精确称重,记为  $M_{01} \sim M_{07}$ ,浸没于模拟体液<sup>[12]</sup> (SBF) 中,恒温培养箱调温至 37 ℃,分别放置 1、7、14、21、30、60 和 90 d。结束后用去离子水洗涤,冷冻干燥,称重,记为  $M_{d1} \sim M_{d7}$ 。分别计算失重率  $M_L$  为:

$$M_L = \frac{M_0 - M_d}{M_0} \times 100\%。$$

### 1.5 结构与性能的表征

通过红外光谱仪 (FTIR) 分析对比材料结构的变化情况,扫描波长范围 4 000 ~ 500 cm<sup>-1</sup>,分辨率 8 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 32。利用比表面与孔隙度分析仪测定材料的比表面积与孔隙度的变化情况,吸附气为氮气。通过扫描电镜 (SEM) 观察材料的 3D 结构形貌的变化情况,扫描电压 5 kV。并经过热重分析仪测定不同阶段材料热稳定性的变化情况,扫描温度范围 40 ~ 600 ℃,升温速率 10 ℃ /min。通过万能材料测试仪对材料的抗张强度进行测试,测试样品含湿 65%,拉伸速度 50 mm/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解性能分析

可降解型组织工程支架材料要求有适当的降解周

期,一方面,确保在组织尚未形成或尚不足以承担力学负荷时起到主要的支撑作用,有利于细胞的扩增,组织的形成;另一方面,在组织形成后,支架材料的完全降解以实现最终的修复与替代<sup>[13-14]</sup>。BC、DHBC 及 DB-G 样品在 SBF 中的降解性能测试结果如图 2 所示。如预期 BC 表现出来了在 SBF 环境下几乎不降解的特性。而通过 HIO<sub>4</sub> 对 BC 的氧化, DHBC 以及 DB-G 支架材料都表现出了良好的可降解性。在 60~90 d 后,基本实现了材料的完全降解。90 d 后 DHBC 的失重率达到了(86.6 ± 2.5)%, DB-G5、DB-G10、DB-G15 的失重率分别为(90.1 ± 2.1)%、(92.8 ± 1.9)%、(95.1 ± 2.0)%,满足一般组织工程支架材料的降解周期要求。经实践证明,在组织修复过程中,70~105 d 内,组织支架材料将会退化,新的组织将会形成,修复得以完成<sup>[15]</sup>。因此,DB-G 是一种由生物物质构成潜在的可降解组织工程支架材料。

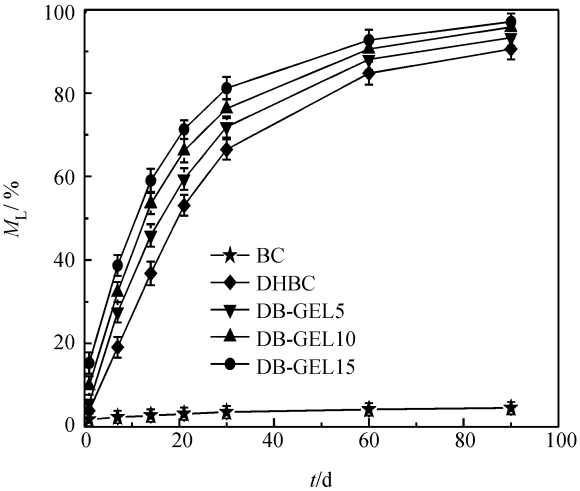


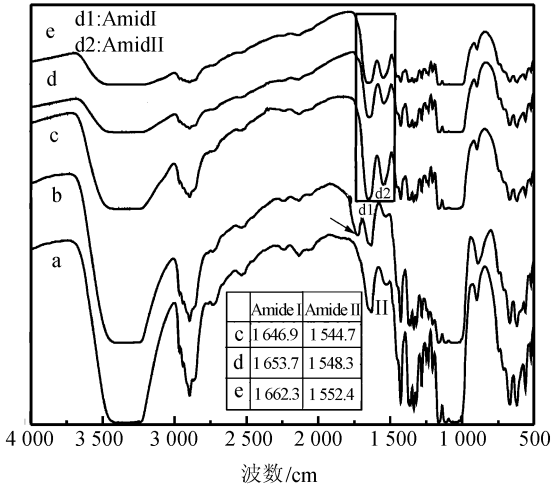
图 2 不同降解阶段  $M_L$  变化情况

Fig. 2 Changes of  $M_L$  of samples in different degradation time

2.2 FT-IR 谱图分析

图 3 为 BC、DHBC、DB-G5、DB-G10、DB-G15 红外谱图对比结果。通过羟胺法测得 DHBC 中羰基质量分数为(42.6 ± 0.5)%。与 BC(曲线 a)相比, DHBC 的红外谱图中在 1 740 cm<sup>-1</sup> (见箭头标注)处出现了明显的  $\nu$ (C=O) 特征峰。3 200~3 500 cm<sup>-1</sup> 处宽的缔合吸收峰为分子结构中  $\nu$ (—OH) 特征吸收峰,1 000~1 150 cm<sup>-1</sup> 处为  $\nu$ (C—O) 吸收峰<sup>[16-17]</sup>。与 DHBC 相比, DB-G 的红外谱图中  $\nu$ (C=O) 吸收峰消失了,但出现了一组新的特征峰(见方框标注),可以观察到典型的酰胺 I  $\nu$ (C=O) 在 1 600~1 680 cm<sup>-1</sup> 的特征吸收峰( $\nu$ (C=N) 也在这个波数区域),以及酰胺 II  $\nu$ (N—H) 在 1 500~

1 550 cm<sup>-1</sup> 的特征吸收峰<sup>[17-18]</sup>,这说明 DHBC 中的活性基团—CHO 与明胶中的—NH<sub>2</sub> 出现交联键合(反应式见图 1)。另外,可以同时观察到随着交联明胶量的增多,DB-G 中酰胺 I 及酰胺 II 特征吸收峰强度变弱,峰变宽,并且吸收峰向高波数发生部分偏移(见图 3 中对比数据),这可能是由于随着交联结合明胶量的增加,分子内与分子间氢键缔合作用的影响不断增大<sup>[17]</sup>。



a. BC; b. DHBC; c. DB-G5; d. DB-G10; e. DB-G15

图 3 不同材料的红外光谱图

Fig. 3 FT-IR spectra of different materials

2.3 样品的比表面与孔径分布

组织工程支架材料要求具有 3 维多孔结构,高的孔隙率和比表面积以满足代谢产物和气体的交换通道、细胞再生的空间<sup>[19-21]</sup>。实验样品的比表面积变化情况如图 4 所示。

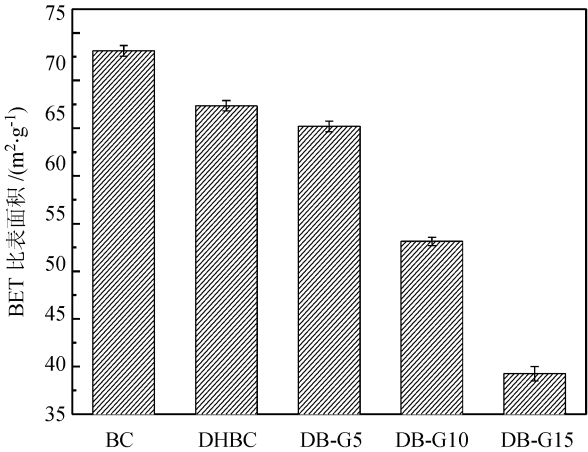


图 4 不同材料的 BET 比表面积变化情况

Fig. 4 Changes of BET surface area of different materials  
DB-G5、DB-G10、DB-G15 的比表面积(65.20 ± 0.56)、(53.13 ± 0.43)、(39.24 ± 0.76) m<sup>2</sup>/g 呈下降趋势,这就说明随着交联明胶量的增多,材料内部

的孔径相对减小或孔隙率降低(从 SEM 图中可以得到进一步证实)。同时,致密性过高对细胞前期在支架材料上的黏附、迁移是不利的。从材料的孔径变化可以观察到,相对 BC、DHBC 由于氧化剂对分子链的侵蚀破坏,使得 DHBC 孔径变大明显。DB-G5、DB-G10、DB-G15 的孔径变化呈现出了不断减

小的趋势,这与比表面积的测定结果相对应(见图 5)。这是由于随着交联明胶量的增加,在 DHBC 分子链被大量的明胶分子结合包裹着或其孔隙被填充,使得材料的孔径不断减小,如图 6 所示。尤其 DB-G15 比表面积及孔径迅速减小甚至被封闭,这将不利于组织细胞的黏附和迁移。

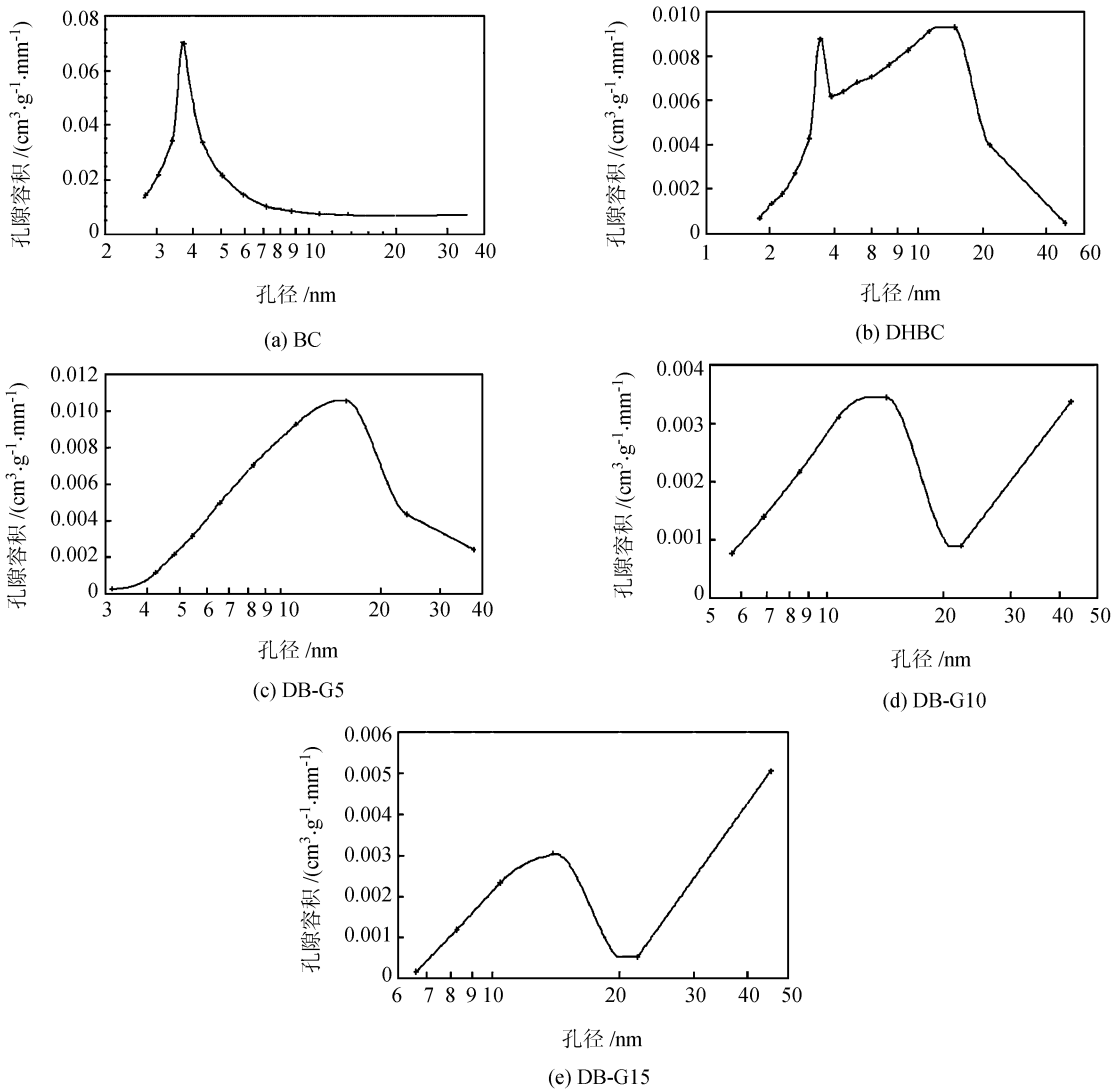


图5 不同材料的孔径分布

Fig.5 Porosity distribution of different materials

2.4 SEM 测试结果分析

综合比表面积与孔径分布特征及 SEM 测试结果分析,样品 DB-G10 既保证了明胶用量比例,同时保留了必要的多孔结构。

2.5 TG/DTG 结果分析

材料的热分解稳定性能测试见图 7。

从初始失重温度 ( $T_i$ ) 数据可知,与 BC 相比, DHBC 由于氧化剂的氧化侵蚀,分子间与分子内结构遭到破坏,稳定性下降。BC 的初始失重温度  $T_{(BC)}$  由 252.5 °C 降低到了  $T$ (DHBC) 的 187.3 °C。

而 DB-G5、DB-G10、DB-G15 则由于 DHBC 与明胶的键合交联,使材料的热分解稳定性显著提高,  $T$ (DB-G)(324.3、326.7、328.4 °C) 高于  $T$ (明胶)(293.6 °C) 与  $T$ (DHBC)。根据不同材料 DTG 曲线的峰值,可以看到 DHBC 的最大失重温度  $T_{max}$ (DHBC) 为 231.9 °C,与  $T_{max}$ (BC)(312.0 °C) 相比下降了 80.1 °C。而一旦与明胶发生交联,热分解稳定性得到明显提高,DB-G5、DB-G10、DB-G15 的  $T_{max}$ (DB-G) 分别为 348.1、365.3、367.1 °C,表明 DHBC 与明胶的交联提高了热分解稳定性。同时,可以观察到 DB-

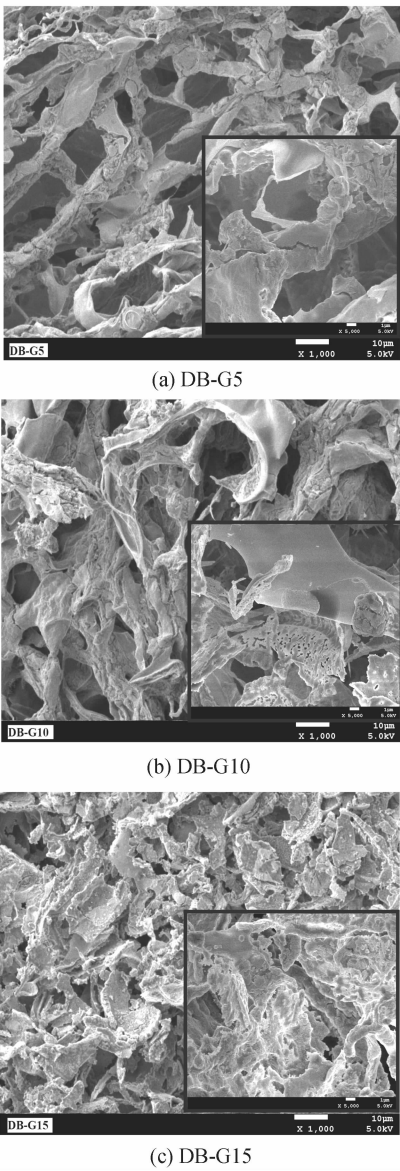


图 6 不同复合材料的 SEM 图像

Fig. 6 SEM images of different materials

G10 和 DB-G15 的最大失重温度不足 2 °C。假设热分解温度与交联相关,这就说明  $m(\text{DHBC}):m(\text{明胶})=10$  时接近了理想的交联,继续增加明胶比例对热分解稳定性影响较小,而对比表面积与孔隙度产生不利影响。

2.6 抗张强度结果分析

根据图 8 中测试结果,可以看到由于  $\text{HIO}_4$  的氧化处理,使得细菌纤维素分子结构的破坏,DHBC 的抗张强度出现明显的下降,但是,随着与明胶比例增加,复合物样品的抗张强度得到提高,其中,DB-G5 和 DB-G10 抗张强度分别达到 0.31、0.35 MPa,作为潜在的支架材料,提供了良好的力学承载力及结构稳定性。但与 DB-G10 相比,DB-G15(0.35 MPa)并没有随着明胶用量的进一步提高,这也与 TG/DTG

的分析结果巧合,DB-G15 并没有明显提高热解稳定性。

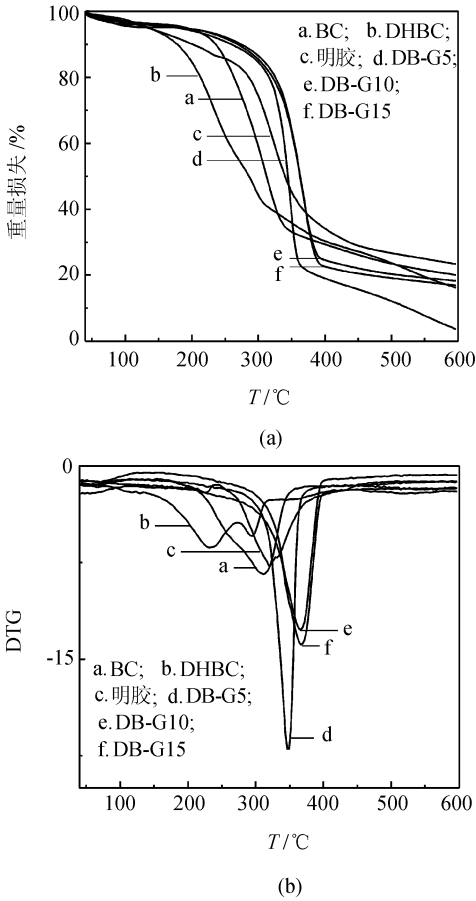


图 7 不同材料的 TG 和 DTG 测试结果

Fig. 7 TG and DTG test results of materials

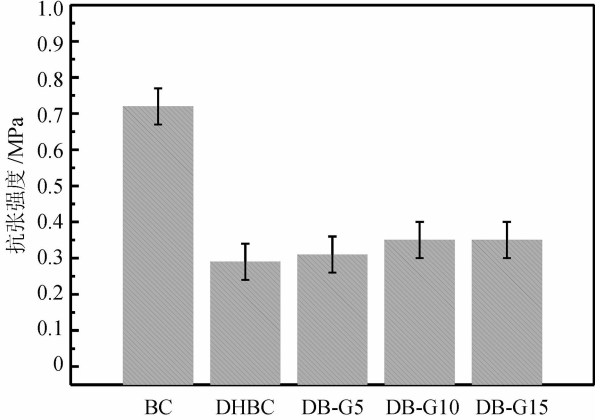


图 8 不同材料的抗张强度测试结果

Fig. 8 Tensile strength test results of different materials

3 结 论

降解性能的测试结果表明,DB-G 有着较好的可生物降解的性能,SBF 中 90 d 失重率均在 90% 以上,可以满足组织工程材料要求的降解周期。根据比表面积与 SEM 的测试结果证明,DB-G10 维持了

适当的比表面积和孔径,保证了细胞的黏附、扩散、增殖以及代谢产物的必要特征。DB-G 的初始失重温度都高于 320 ℃,表现出良好的热解稳定性,表达了样品结构稳定性。同时,良好的力学性能也将确保在新组织形成之前,提供良好的力学承载力及结构稳定性。综合分析表明, $m(\text{DHBC}):m(\text{明胶})$  为 1:10 时,即可达到理想的要求。DB-GEL10 可作为一种潜在的生物质组织工程材料。

## 参考文献:

- [1] Lynch I. Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface[J]. *Physica A*, 2007, 373: 511 – 520.
- [2] Stevens M M, George J H. Exploring and engineering the cell surface interface[J]. *Science*, 2005, 310: 1135 – 1138.
- [3] Srouji S, Kizhner T, Suss-Tobi E, et al. 3-D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold [J]. *Journal of Materials Science( Materials in Medicine )*, 2008, 19(3): 1249 – 1255.
- [4] Hu W L, Chen S Y, Yang J X, et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101: 1043 – 1060.
- [5] Barud H S, Regiani T, Marques R F C, et al. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles compositemembranes [J]. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 11: 1 – 8.
- [6] Fu L N, Zhang J, Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92: 1432 – 1442.
- [7] Li J, Wan Y Z, Li L F, et al. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2009, 29: 1635 – 1642.
- [8] CopieÁ V, Tomita Y, Akiyama S K, et al. Solution structure and dynamics of linked cell attachment modules of mouse fibronectin containing the RGD and synergy regions: Comparison with the human fibronectin crystal structure [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 277: 663 – 682.
- [9] García A J, Reyes C D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Journal of Dental Research*, 2005, 84(5): 407 – 413.
- [10] Elzoghby A O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems; Reviewing three decades of research [J]. *Journal of Controlled Release*, 2013, 172: 1075 – 1091.
- [11] Luo H L, et al. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications [J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2013, 143(1): 373 – 379.
- [12] Oyane A, Kim H M, Furuya T, et al. Preparation and assessment of revised simulated body fluids [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 65(2): 188 – 195.
- [13] Müller F A, Müller L, Hofmann I, et al. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 3955 – 3963.
- [14] Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 2529 – 2543.
- [15] Li X M, Feng Q L, Jiao Y F, et al. Collagen-based scaffolds reinforced by chitosan fibres for bone tissue engineering [J]. *Polymer International*, 2005, 54(7): 1034 – 1040.
- [16] Fan Q G, Lewis D M, Tapley K N. Characterization of cellulose aldehyde using Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 82(5): 1195 – 1202.
- [17] Chang M C, Ko C C, Douglas W H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 2853 – 2862.
- [18] Payne K J, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions; Deconvolution of the amide band for conformational studies [J]. *Biopolymers*, 1988, 27: 1749 – 1760.
- [19] Wu L B, Ding J D. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D, L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 5821 – 5830.
- [20] Cai Z J, Hou C W, Guang Y. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold; Preparation, characterization and biocompatibility evaluation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87: 1073 – 1080.
- [21] Nam Y S, Yoon J J, Park T G. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive [J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 53: 1 – 7.

(编辑 黄小川)

引用格式: Yang Mao, Zhen Wenjuan, Cheng Hui, et al. Preparation and properties of the dialdehyde bacterial cellulose-gelatin composite material [J]. *Advanced Engineering Sciences*, 2017, 49(1): 138 – 143. [杨茂, 甄文娟, 陈慧, 等. 潜在的细菌纤维素/明胶支架材料的制备 [J]. *工程科学与技术*, 2017, 49(1): 138 – 143.]