

分类号：Q81
密 级：公开

单位代码：10363
学号：2220520104

细菌纤维素膜原位制备、改性及应用研究

Research on in-situ preparation and modification of bacterial cellulose pellicles, and its application

论 文 作 者 :	童杰
校 内 导 师 :	聂光军 教授
校 外 导 师 :	王立言 博士
专业学位类别:	生物与医药
研究方向(领域):	生物技术与工程

论文答辩日期：2025/05/15

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期： 2025 年 5 月 16 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于 保密 □，在 _____ 年解密后适用本版权书。
不保密 ☒。

学位论文作名: 音杰 指导教师签名: 夏志军

日期：2025 年 5 月 16 日

日期：2025 年 5 月 16 日

细菌纤维素膜原位制备、改性及应用研究

摘 要

细菌纤维素 (Bacterial cellulose, BC) 是一种由微生物合成的高纯度纳米纤维材料, 因其优异的机械性能、生物相容性以及高保水性等特点, 在生物医药、组织工程 and 环境保护等领域具有广泛应用前景。细菌纤维素膜 (Bacterial cellulose pellicles, BCP) 是 BC 原纤维自交联后形成的膜状物。然而, BCP 产量低、生产成本低且应用功能性不足等问题严重限制了其大规模产业化和应用。为此, 本文系统地开展了 BCP 原位制备和改性技术的研究, 并探索了其在功能性敷料领域的应用。

为提高 BCP 产量, 本研究通过优化发酵底物类型及浓度, 引入大分子作为 BC 原纤维交联点, 乙醇作为菌体生长的反馈抑制剂, 全面优化培养基。结果表明培养基关键培养物类型及浓度对 BCP 产量影响明显。其中, 壳寡糖 (Chitosan oligosaccharide, COS) 作为大分子添加物且添加浓度为 2% 以及添加 10% (W/V) 的乙醇对 BCP 的合成具有最大促进作用。最终, BC 的产量较最初的氮源优化提高了 6 倍。

为进一步提升 BCP 产量及性能, 在上述研究基础上, 采用原位网络添加策略改性 BCP。以木醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*, *G. xylinus*) 发酵进程为添加时间节点导向, 系统研究了最优添加时间点下的 COS 与透明质酸 (Hyaluronic acid, HA) 网络骨架诱导 BCP 自

组装,进而改善 BCP 产量、性能以及结构。结果表明, COS/HA 网络原位添加显著提升了 BCP 产量,尤其是在发酵 24 h 后添加大分子时, BC 产量提升了 72.7%, 韧性和溶胀性能也进一步提高。结构分析证实, 大分子材料与 BC 之间形成了强氢键交互作用, 增强了双网络 BCP 材料机械性能。

针对糖尿病慢性伤口难以愈合的广泛需求,在原位改性的基础上进一步开发了一种功能性 BC 敷料。通过 HA 原位引入羧基基团,并与多巴胺(Dopamine, DA)共价交联,以铜离子(Cu^{2+})为络合桥梁,通过去铁胺(Deferoxamine, DFO)的负载,赋予材料光热响应能力,抗氧化、生物安全性以及促进血管新生等功能。这种功能化后的复合敷料展现出了良好的抗菌性,抗菌率达到了 98%。此外,该功能化材料在促进创伤愈合和血管生成方面同样展现出显著效果,复合敷料在糖尿病小鼠模型中应用后,15 天伤口愈合率达 90%,血管生成率达 33.6%,显著优于对照组。

本研究成果一定程度实现了 BC 的高效生产与性能优化,推动了 BC 功能材料在生物医学领域的应用拓展,为 BC 的研究奠定理论基础,也为其进一步开发应用提供了可供借鉴的策略。

关键词: 细菌纤维素, 原位改性, 共价交联, 光热效应, 糖尿病伤口敷料

RESEARCH ON IN-SITU PREPARATION AND MODIFICATION OF BACTERIAL CELLULOSE PELLICLES, AND ITS APPLICATION

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC), a high-purity nanofibrillar material synthesized by microorganisms, exhibits exceptional mechanical properties, biocompatibility, and high water retention, rendering it promising for applications in biomedicine, tissue engineering, and environmental protection. Bacterial cellulose pellicles (BCP) are membranes formed by self-crosslinking of BC fibrils. However, many problems such as low yield, high production cost, and insufficient functional versatility of BCP have seriously restricted its large-scale industrialization and application. To address these challenges, this study systematically investigated in situ preparation and modification strategies for BCP, with a focus on its application in functional wound dressings.

To increase BCP yield, fermentation substrates were optimized by adjusting nutrient types and concentrations, incorporating macromolecules as fibril crosslinking agents, and introducing ethanol as a feedback inhibitor for bacterial growth. The results demonstrated that substrate composition critically influenced BCP synthesis. Specifically,

supplementation with 2% (w/v) chitosan oligosaccharide (COS) and 10% (w/v) ethanol synergistically maximized BC production, achieving a six-fold increase compared to initial nitrogen source optimization.

Building on this, an in-situ network reinforcement strategy was implemented to further improve BCP yield and performance. Guided by the fermentation timeline of *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*), COS and hyaluronic acid (HA) were introduced at optimal intervals to induce self-assembly of BC fibrils into a dual-network structure.

The results showed that macromolecular addition at 24 h post-incubation made BC yield increased by 72.7%, while simultaneously enhancing mechanical toughness and swelling capacity. Structural analyses confirmed robust hydrogen bonding between BC and the COS/HA network, underpinning the improved mechanical properties of BCP.

To address the challenge of chronic diabetic wound healing, a multifunctional BC-based dressing was developed through in situ modification. Carboxyl groups were introduced via HA, followed by covalent crosslinking with dopamine (DA) using Cu^{2+} as a coordination bridge. Subsequent loading of deferoxamine (DFO) endowed the composite with photothermal responsiveness, antioxidant activity, biosafety, and pro-angiogenic capabilities. The functionalized dressing demonstrated 98% antibacterial efficacy. In diabetic mouse models, wounds treated with the dressing achieved 90% closure within 15 days,

accompanied by a 33.6% angiogenesis rate, significantly better than the control group.

This study advances BC production efficiency and performance optimization, providing theoretical foundations and practical strategies for expanding BC-based functional materials in biomedical applications. The findings underscore the potential of tailored BC composites to address critical clinical needs while offering scalable production methodologies.

KEY WORDS: Bacterial cellulose, In-situ modification, Covalent cross-linking, Diabetic wound dressing

目录

摘 要	I
ABSTRACT.....	III
目录	i
第 1 章 绪论	1
1.1 细菌纤维素简介.....	1
1.1.1 结构特性.....	1
1.1.2 理化特性.....	2
1.2 细菌纤维素改性.....	2
1.2.1 原位改性.....	2
1.2.2 非原位改性.....	3
1.3 糖尿病慢性伤口.....	4
1.3.1 糖尿病伤口简介.....	4
1.3.2 糖尿病伤口愈合过程.....	5
1.4 糖尿病慢性伤口的治疗.....	6
1.4.1 功能性伤口敷料治疗.....	6
1.4.2 光热疗法协同干预治疗.....	7
1.5 研究意义与内容.....	7
1.5.1 研究意义.....	7
1.5.2 研究内容.....	8
第 2 章 细菌纤维素发酵条件优化及网络原位诱导改性.....	10
2.1 前言.....	10
2.2 实验材料与仪器.....	10
2.2.1 菌种.....	10
2.2.2 培养条件.....	11
2.2.3 实验试剂与实验仪器.....	11

2.3 实验方法.....	12
2.3.1 发酵条件的优化.....	12
2.3.2 大分子双网络添加.....	13
2.3.3 发酵进程测定.....	13
2.3.4 材料表征.....	14
2.3.5 统计分析.....	15
2.4 结果与分析.....	15
2.4.1 培养基优化研究.....	15
2.4.2 原位添加大分子与醇类影响.....	16
2.4.3 网络原位诱导研究.....	18
2.4.4 发酵进程.....	19
2.4.5 大分子网络最优添加时间优化.....	20
2.4.6 BCP 的演变过程.....	23
2.5 本章小结.....	25
第 3 章 基于 BCP 的糖尿病伤口敷料构建及其效果研究.....	27
3.1 前言.....	27
3.2 实验仪器与实验材料.....	27
3.2.1 培养条件.....	27
3.2.2 试剂与仪器.....	28
3.3 实验方法.....	29
3.3.1 木醋杆菌种子液的制备.....	29
3.3.2 原材料制备.....	29
3.3.3 性能表征.....	30
3.3.4 结构表征.....	31
3.3.5 光热性能.....	31
3.3.6 DFO 和 Cu^{2+} 的释放行为.....	31
3.3.7 生物相容性和抗菌性能.....	32
3.3.8 体内伤口愈合.....	33
3.3.9 组织学分析.....	34

3.3.10 酶联免疫吸附实验.....	34
3.3.11 统计分析.....	34
3.4 结果与分析.....	35
3.4.1 复合材料的成分优化.....	35
3.4.2 结构表征.....	37
3.4.3 性能表征.....	43
3.4.4 光热响应.....	45
3.4.5 药物释放模型.....	46
3.4.6 抗氧化性能.....	47
3.4.7 抑菌性能.....	48
3.4.8 细胞毒理及细胞迁移.....	49
3.4.9 小鼠实验.....	51
3.4.10 组织分析.....	53
3.5 本章小结.....	56
第 4 章 总结与展望.....	58
4.1 总结.....	58
4.2 展望.....	59
参考文献.....	60
在校期间发表论文、专利情况	71
论文.....	71
专利.....	71
致谢	72

第 1 章 绪论

细菌纤维素（Bacterial Cellulose, BC）作为一种由微生物合成的天然纳米纤维素^[1]，因其独特的物理化学特性，在生物医学、材料科学、食品工业及环境工程等领域展现出广阔的应用前景^[2-5]。相较于传统植物纤维素，细菌纤维素具有高纯度、高结晶度、优异的机械强度、大孔径纤维网络结构以及可调控的生物功能性等优点，被认为是新一代功能材料的理想候选者^[6]。然而，BC 是微生物利用葡萄糖底物合成得到，其产量较低，生产成本较高，这在一定程度上限制了其大规模应用^[7]。此外，BC 的功能性相对单一，附加值较低，这也是限制其发展的主要因素^[8]。因此，如何通过优化发酵条件以提高细菌纤维素的产量，并通过技术改性提升其附加值，已成为当前研究的热点。

1.1 细菌纤维素简介

1.1.1 结构特性

BC 是由木醋杆菌合成的纳米级纤维素，其基本化学结构与植物纤维素相同，均为葡萄糖分子经 β -1,4 糖苷键相连形成的线性高分子结构。与植物纤维素相比，BC 的聚合度较低且纤维直径更为细小，相当于植物纤维素微纤丝直径的 1/100^[9]。如图 1-1 b, c 所示，BCP 由菌体在合成过程中自组装产生纳米级纤维，这些纤维进一步缠结形成三维网状结构的纤维素网络，宏观上展现出透明的胶状物。又因 BC 无需经过木质化过程，因此其产物中不含半纤维素、木质素、果胶等杂质组分，纤维纯度较高^[10]，晶形为纤维素的 I 型晶型^[11]，结晶度可达 84%–89%，具有较高的孔径率和高度有序的晶区结构，为功能性改造提供良好条件^[12]。

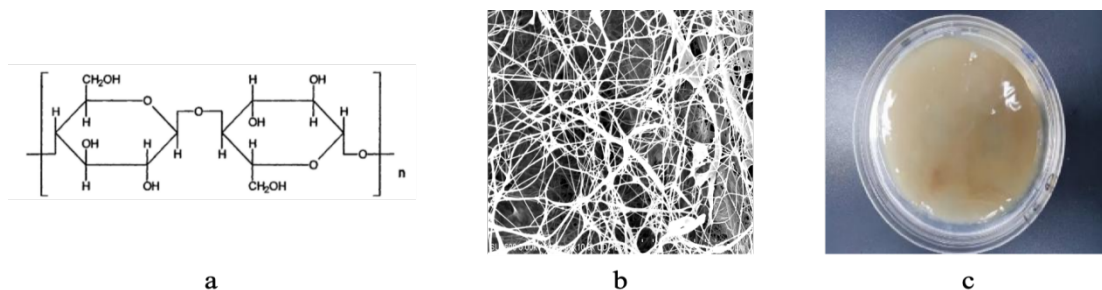


图 1-1 BC 结构式 (a)，BC 电镜图 (b)，发酵后得到的 BCP (c)

Fig. 1-1 BC structural formula (a), BC electron microscope (b), BCP obtained after fermentation (c)

1.1.2 理化特性

得益于高结晶度和致密结构, BC 表现出卓越的力学性能, 具有很高的拉伸强度和杨氏模量, 在溶胀状态下也具有良好的强度和韧性^[13]; BC 具有巨大的比表面积和丰富的亲水基团, 能够吸附大量水分, 具有优秀的亲水性^[14]; 原生的 BC 膜中水含量可高达 98%, 这种高持水能力使 BC 膜能够保持湿润的环境并兼备优异的保水性^[15]; BC 内部的网络孔隙结构为其提供了良好的透气性; 又因为 BC 不含木质素等杂质成分, 使其具有了优秀的生物相容性和生物可降解性; Jeirani Khamene 等人研究发现, BC 材料不会明显引发显著的炎症反应, 具有良好的细胞相容性^[16]。细菌纤维素作为一种纯度较高的纳米纤维素材料, 集合了高机械性能、高保水性和良好生物相容性等优点, 在食品、医药、组织工程等领域受到广泛关注^[17-19]。

1.2 细菌纤维素改性

尽管 BC 具有诸多优点, 但仍存在一定的不足。例如, BC 缺乏特定的功能基团, 对细胞黏附和组织再生的促进作用有限, 且天然 BC 由于其纤维素结构难以被生物自身降解, 在体内长期存在可能影响组织的正常重建^[20]。此外, BC 材料本身几乎不具备抗菌、抗氧化等性能, 限制了其在医疗方面的应用^[21]。为改善 BC 性能、赋予其新的功能, 发展出了多种改性手段, 主要分为原位改性和非原位改性两大类。如图 1-2 所示, 原位改性是在 BC 发酵合成的过程中直接添加改性物质, 以获得改性的细菌纤维素产物; 非原位改性则是在获得 BC 膜后, 通过物理或化学方法对其进行加工处理, 从而改变其结构或赋予新功能^[22]。

1.2.1 原位改性

原位改性是指在细菌发酵合成 BC 的过程中, 通过改变培养基成分、碳源种类或添加外源物质, 使细菌在合成纤维素的同时将改性物质引入纤维素网络中。这种方法利用细菌合成纤维素的“从底到上”组装过程, 将目标改性物质嵌入正在形成的细菌纤维素原纤维中, 从而进一步获得功能化的 BC 膜^[23]。原位改性的一个显著优点是改性组分可以直接成为纤维网络的一部分, 实现与纤维素的紧密结合^[24]。许多研究将其视为赋予 BC 特定功能的简便途径, Gao 等人通过在培养基中加入高分子或纳米材料, 制备出增强力学性能且具有非天然特征荧光的功能性的 BC 复合膜^[25]。Li 等人通过添加淀粉等大分子则可调控 BC 膜的孔隙率, 从

而制备出多孔结构的 BC 用于细胞支架^[26]。已有报道的原位添加改性物质包括：天然高分子、明胶、生物可降解聚酯、粘土、二氧化硅、磁性纳米粒子等^[27-31]。这些外源物质在原位条件下会嵌入 BC 的纳米纤维网络中,形成均匀的复合结构,从而在不同程度上改善 BC 的物理力学性能或溶胀性能,并赋予其抗菌、导电、磁响应等新功能。

然而,原位改性也存在一些局限性。首先,所添加的改性物质必须不能对发酵菌株存在抑制作用,如果改性物质对菌有抑制或毒害作用,会导致发酵受阻,BC 产量下降。其次,添加物需要在培养基中均匀分散且保持一定活性,不溶性或疏水性的材料往往在水培环境中难以均匀分布,会因其表面张力作用聚集沉淀,导致改性效果不佳^[32]。并且大量外源物的引入可能干扰纤维素正常的结晶组装,造成纤维网络结构的变化。

1.2.2 非原位改性

非原位改性是指对已经合成获得的 BC 进行后处理的改性方法。与原位改性侧重于发酵过程中的调控不同,非原位改性利用 BC 膜丰富的表面羟基和多孔结构,通过化学反应或物理手段在纤维素产物上引入新的功能基团或复合其他材料^[33]。常见的非原位改性策略包括:

(1) 化学改性:利用 BC 纤维素分子上的羟基进行化学反应,如周期性氧化、接枝聚合、交联反应等^[34-36]。这些化学手段可以在分子水平上改变 BC 的化学组成或表面性质,例如引入带电基团以增强细胞黏附,接枝疏水链段以改善材料的疏水性,通过交联提高 BC 水凝胶的力学强度和稳定性^[37]。在生物医用领域, Bodin 等人为了改善 BC 作为组织工程支架的细胞亲和力,在其细菌纤维素表面接枝细胞识别信号分子,促进了细胞黏附和增殖^[38]

(2) 物理改性:利用 BC 的多孔网络作为支架,将其他活性功能物质填充其网络孔径中。一种方式是溶胀-吸附法,即将干燥或从未干燥的 BC 膜浸泡在某种功能溶液或纳米粒子分散液中,使功能物质渗入并负载于 BC 网络中^[39]。Lin 等人将 BC 水凝胶膜浸渍于壳聚糖溶液,制得 BC/壳聚糖复合膜,从而显著提高其保湿性和抑菌性能^[40];另一种方式是将 BC 解离成纳米纤维悬浮液,与其他高分子混合,然后再形成复合膜或凝胶^[41]。物理复合的方法可以方便地引入各种生物活性分子、药物控制释放组分或纳米填料,从而赋予 BC 复合材料多样化的功

能。Andrade 等人为了应用于血管移植，在 BC 表面共价固定抗凝血功能基团并构建多层复合以提高其力学性能和血液相容性^[42]。

总之，非原位改性为 BC 的功能拓展提供了灵活多样的手段，根据目标应用需求选取合适的改性方法来获得性能优化的 BC 基材料，非原位改性已经成为目前对 BC 进行改造最直接、简单的方法。

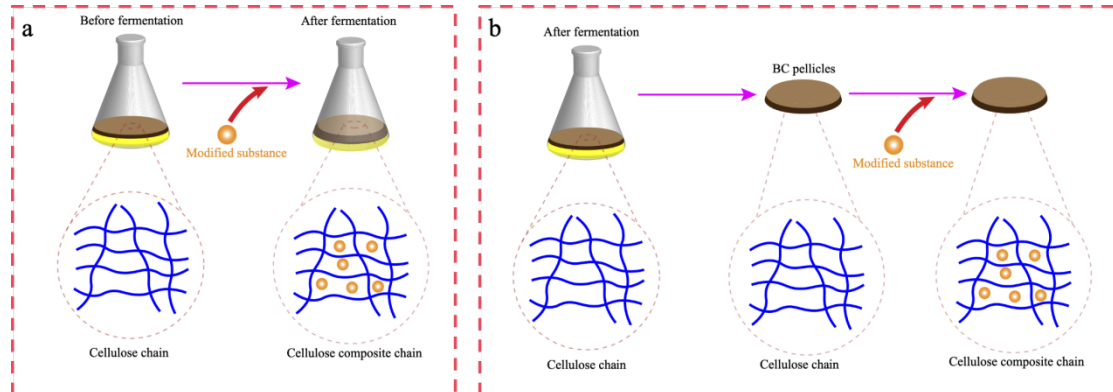


图 1-2 原位添加示意图 (a)，非原位添加示意图 (b)

Fig. 1-2 Schematic diagram of in-situ addition (a), schematic diagram of non in-situ addition (b)

1.3 糖尿病慢性伤口

1.3.1 糖尿病伤口简介

糖尿病患者常发生的慢性难愈伤口是糖尿病最严重的并发症之一^[43]。糖尿病慢性伤口通常发生在下肢足部，其形成是多因素共同作用的结果，包括长期高血糖导致的周围神经病变、外周动脉疾病和免疫功能受损等^[44-46]。糖尿病患者脚部周围感觉神经病变使患者对足部疼痛和损伤不敏感，日常行走时反复无意识损伤足部皮肤，导致溃疡形成^[47]。同时，运动神经和自主神经受损引起足部肌肉萎缩变形、皮肤干燥开裂，这些改变进一步增加了溃疡发生的风险。腿部周围发生的外周动脉粥样硬化则导致下肢供血不足和组织缺氧，组织抵抗损伤和感染的能力下降。这些因素使糖尿病伤口长期处于慢性炎症且无法愈合的状态，如图 1-3 所示，糖尿病伤口发生的主要风险因素^[48]。

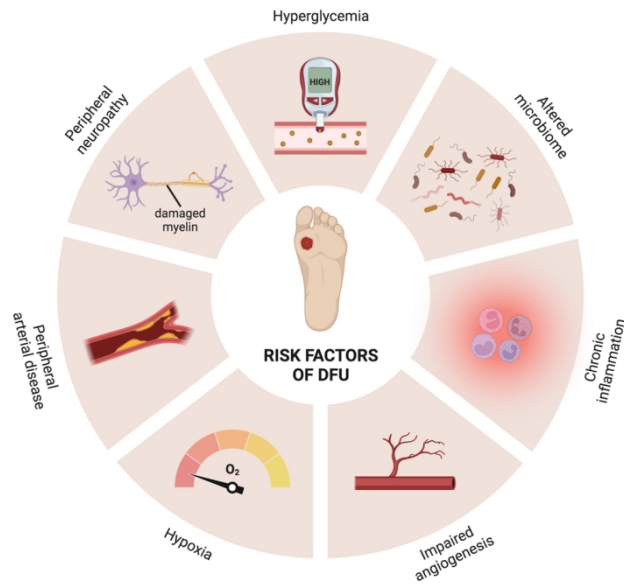


图 1-3 糖尿病伤口发生的主要风险因素

Fig. 1-3 Main risk factors of diabetic wound

1.3.2 糖尿病伤口愈合过程

糖尿病慢性高血糖状态对伤口愈合的各个阶段均有不利影响，与普通伤口不同，普通伤口愈合阶段如图 1-4 所示。糖尿病伤口在止血阶段，早期凝血因子过度激活而纤维蛋白溶解不足，导致凝血块难以清除^[49]。

在炎症阶段，高血糖环境促使大量中性粒细胞和单核-巨噬细胞持续聚集于伤口^[50]，糖尿病患者中性粒细胞释放的细胞因子失衡，削弱了对病原的清除效率；巨噬细胞长期停留在促炎的 M_1 表型而向抗炎 M_2 表型转换不足，导致伤口内促炎细胞因子和活性氧水平长期升高^[51]，最后导致伤口始终处于低度炎症的状态，难以进入下一阶段。此外，在糖尿病伤口中还存在基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinase, MMP）异常升高和生长因子显著减少的现象，这种异常现象往往会阻碍愈合信号传递^[52]，特别是影响转化生长因子 $\beta 1$ （Transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$ ）的表达水平，影响伤口的愈合速率^[53]。

在增生阶段，高糖及炎症环境对组织再生细胞功能造成抑制，导致伤口中的成纤维细胞和角质形成细胞增殖和迁移能力显著降低。高血糖诱导的晚期糖基化终产物（Advanced Glycosylation End-products, AGEs）可直接损伤成纤维细胞，使其对生长因子信号反应迟钝，胶原合成和重新排序的能力异常^[54]。研究表明糖尿病患者伤口内血管内皮细胞增殖和迁移能力下降，血管新生减少，伤床供血不足，进一步限制了肉芽组织的生长和伤口修复。并且伤口长期缺乏充足的新生微血管，细胞得不到足够氧气和营养供应，组织缺氧又会加剧炎症和细胞功能障碍，

引起恶性循环。

在重塑阶段，糖尿病患者成纤维细胞合成功能和胶原重排能力异常，即使勉强闭合的伤口，其瘢痕组织质量也较差、强度偏低，容易反复破溃。

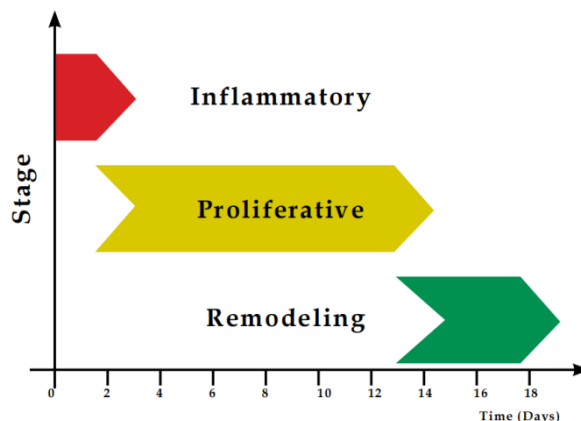


图 1-4 普通伤口恢复阶段^[55]

Fig. 1-4 General wound recovery stage

1.4 糖尿病慢性伤口的治疗

1.4.1 功能性伤口敷料治疗

功能性伤口敷料通常由天然或合成的高分子材料制备，常见的天然生物材料包括藻酸盐、纤维素、壳聚糖、胶原、明胶、HA 等多糖聚合物。这些天然材料生物相容性好、良好的生物降解性，与机体组织相容性强，如 Lou 等人发现藻酸盐敷料源自海藻提取物，具有良好的吸液和成凝胶特性，可保持伤口湿润并促进凝血^[56]；Agnes 等人发现壳聚糖具有广谱抗菌和生物黏附性能，有利于阻止感染并作为细胞生长支架^[57]；Lu 等人认为 HA 作为体内基质成分，可保持伤口湿润并促进细胞迁移^[58]。然而天然材料也存在机械强度差、降解过快等缺点，往往需要与合成高分子共价交联或共混改性以提高整体性能，共价合成材料包括聚乙烯醇（Polyvinyl alcohol, PVA）、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（Polylactic acid-hydroxyacetic acid copolymer, PLGA）、聚-己内酯（Poly-Caprolactone, PCL）等^[59-61]，这些材料可提供稳定的物理性能和稳定性，可重复性高。通过将天然与合成材料结合，可制备具有良好生物活性又具备足够强度和稳定性的复合敷料，近年来，纳米纤维膜、水凝胶、泡沫、凝胶纤维等多种形式的功能性敷料相继出现，为适应不同伤口类型提供了选择^[62-64]。

1.4.2 光热疗法协同干预治疗

光热疗法 (Photothermal therapy, PTT) 是近年来在难愈合伤口处理领域受到关注的一种物理疗法, 它利用光能转化为热能的原理对伤口进行杀菌和机体调节^[65]。光热疗法借助光热转换材料, 将通常为近红外光 (Near-infrared, NIR) 的光源照射组织, 引起局部热效应, 消灭伤口周围的病原微生物并促进组织修复^[66]。由于近红外光能穿透皮肤一定深度, 光热疗法可实现对深部难以清除的组织区域进行非侵入性的局部高温消毒, 被视为一种无需抗生素的理想抗菌策略, 对于耐药菌感染的伤口尤为有用^[67]。研究显示, 将组织周围温度迅速加热至 50°C 左右的高温短时间, 即可导致细菌蛋白变性、细胞膜通透性破坏, 从而杀死大多数致病菌^[68]。

1.5 研究意义与内容

1.5.1 研究意义

尽管细菌纤维素在材料和生物医药等领域展现出了广泛的开发和应用前景, 但目前 BC 的低产率、低附加值一直是限制其进一步发展的重要原因。

BC 的产率通常与培养基成分与发酵条件相关。常规的培养基组分无法满足菌体生长所需营养, 通过检测菌体发酵时状态改善培养基成分是增加 BC 产量的有效方法。此外, 天然 BC 膜由于其结构单一, 导致其力学性能和保水性能不强, 通过原位改性提升 BC 性能具有极大潜力。

BC 由于其结构单一导致其功能性不足, 附加值低。在慢性难愈合伤口处理中, 理想的伤口敷料不仅需要提供湿润的愈合环境, 还应具备抗菌、防氧化及促进组织再生等多重功效。但 BC 天然不具备抗菌活性, 也缺乏促进细胞增殖和血管生成的生物活性分子, 这使其在应对糖尿病伤口等复杂环境时显得功能不足。因此, 对 BC 进行改性以赋予其新的功能, 从而满足特定应用的需求。

基于上述背景, 本研究针对 BC 的低产量、性能不足以及功能局限等问题开展创新性的改性与应用研究。通过发酵工艺优化和改性策略的结合, 提高 BC 的合成效率和材料性能, 为 BC 的大规模生产和应用提供技术支撑; 同时, 引入改性手段赋予 BC 在生物医用领域的新功能, 拓展 BC 作为功能性生物材料的应用潜能。通过本研究的实施, 将加深对细菌纤维素发酵合成规律和改性机制的理解, 丰富纤维素基生物材料的设计策略, 推动 BC 在高性能生物材料领域的进一步发

展。

1.5.2 研究内容

为解决上述问题。设计了以下具体步骤流程图，如图 1-5，1-6 所示，具体内容和方法如下

(1) 细菌纤维素发酵条件优化：针对 BC 产量低、性能有待提高的问题，开展培养基组分优化和原位改性研究。通过优化碳源、氮源等成分浓度，原位添加大分子物质，诱导 BC 的自组装，显著提高其静态发酵条件下 BC 的产量及性能。

(2) 基于发酵进程的原位网络诱导改性策略：以发酵进程为导向，在发酵过程中添加 COS 和 HA 钠两种高分子物质。通过考察不同添加浓度和时间对 BC 产量、力学强度和溶胀性能的影响，确定最优的添加方案。并通过表征改性后 BC 复合膜的结构与性能，进一步揭示 COS/HA 网络诱导 BCP 自组装的机制。

(3) 基于 BCP 构建糖尿病伤口敷料：原位添加 HA 的细菌纤维素经 DA、 Cu^{2+} 、DFO 改性用于糖尿病伤口愈合，面向功能性糖尿病慢性伤口敷料的应用，设计并制备了一种多功能改性 BC 膜用于促进糖尿病伤口愈合。首先在 BC 发酵体系中原位加入 HA，使所得 BC 膜引入大量羧基基团，为后续表面改性提供反应位点。然后将 BC 膜置于 DA 溶液中并加入羧基活化剂进行活化交联，并形成 PDA 涂层。引入 Cu^{2+} 络合，赋予材料对近红外光的光热响应能力和一定的抗菌活性。随后将 DFO 负载到改性的 BC 膜上，通过 Cu^{2+} 络合作用实现 DFO 与 BC 复合交联，得到功能化的 BC 敷料。通过表征该敷料的光热转换性能、抗菌性能、促进血管生成和加速伤口愈合的能力，评估其对小鼠创伤模型的治疗效果。

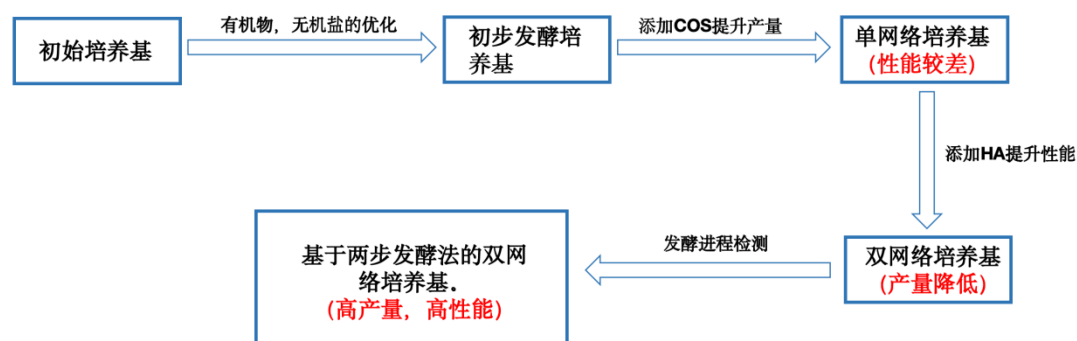


图 1-5 细菌纤维素发酵条件优化及双网络改性示意图

Fig. 1-5 Schematic diagram of BC fermentation conditions optimization and dual network modification

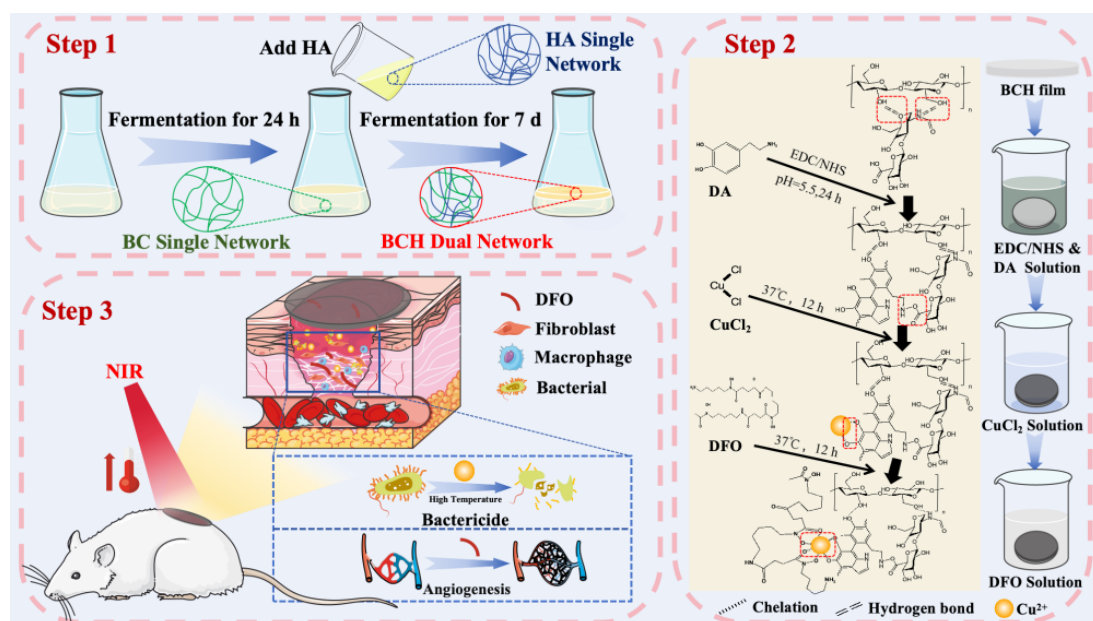


图 1-6 原位添加 HA 的细菌纤维素与 DA、Cu²⁺和 DFO 交联治疗糖尿病伤口示意图
Fig. 1-6 Schematic diagram of hyaluronic acid In-situ added BC crosslinked with dopamine, copper ion and deferoxamine in the treatment of diabetic wounds

第2章 细菌纤维素发酵条件优化及网络原位诱导改性

2.1 前言

BC 是木醋杆菌在有氧条件下产生的代谢产物，其结构由葡萄糖分子通过 β -1,4 糖苷键连接形成的大分子物质。与植物纤维素相比，BC 具有更小的纤维直径和更高的纯度。由于这种结构差异，BC 展现出更高的水合性、优良的力学性能、卓越的生物相容性以及快速可降解性等独特优点。因此，BC 作为一种高分子聚合物材料，在生物医药、食品、环境保护、医美、电子信息等多个领域具有广泛的应用前景^[69-73]。然而，目前 BC 的低产量和整体性能不足仍然是制约其进一步发展的主要障碍之一。

木醋杆菌的发酵通常在液体培养基中完成，培养基的组分及含量对 BC 的产出至关重要，合适的培养基能使 BC 的产率得到大幅提高^[74]。BC 在形成过程中，由于木醋杆菌在液体体系中发酵生长，BC 纤维产生后在液体中无序移动，以静电吸引的方式自主缠绕，从而导致细菌纤维素膜 (Bacterial cellulose pellicles, BCP) 产量低，形成周期长，细菌纤维素结构不够致密，机械性能和溶胀性能不够强^[75]。非原位改性是在纤维素形成后进行的物理吸附或化学修饰，存在功能分子分布不均匀、结合不牢固、易脱落等问题，难以确保改性材料长期稳定发挥。而网络原位诱导改性通过在合成纤维素的同时引入材料或其他功能性物质，通过诱导原纤维交联，使其均匀分布纤维网络中，获得更稳定、更加均匀的复合材料。

为了解决上述问题，提升 BC 的产量及性能，本章通过优化培养基组分的基础上增加 BC 的产量，并通过对发酵进程检测确定发酵过程中原位添加大分子材料最佳添加时间点，通过添加高分子材料来增加细菌纤维素产量的同时增强其机械、溶胀性能。本章通过对培养基成分及含量的系统性研究，揭示了大分子的添加与 BC 形成之间的动态关联，实现 BC 的高效生产及性能提升，为 BC 深入研究与实际应用提供帮助。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 菌种

木醋杆菌 (*Gluconacetobacter xylinus*, *G. xylinus*) 为实验室筛选的高产菌株。

2.2.2 培养条件

使用接种环将琼脂斜面培养基上的木醋杆菌接种到含有 50 g/L 葡萄糖和 5 g/L 酵母粉的 50 mL 培养基中，并在 30℃和 120 rpm 下孵育 24 h。将发酵后的培养基视为种子液，在 4℃下储存备用。

初始发酵培养基：葡萄糖 50 g/L，酵母粉 5 g/L，pH 6.8。

2.2.3 实验试剂与实验仪器

本章实验所使用的试剂及仪器见表 2-1，2-2。

表 2-1 主要试剂
Table 2-1 Main reagents

药品名称	药品类型	生产厂地
葡萄糖	BR	国药化学试剂有限公司
酵母膏	BR	国药化学试剂有限公司
酵母粉	BR	国药化学试剂有限公司
胰蛋白胨	BR	国药化学试剂有限公司
十二水合磷酸氢二钠	AR	国药化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	国药化学试剂有限公司
壳聚糖	AR	国药化学试剂有限公司
COS	AR	中科荣信生物科技有限公司
盐酸	AR	国药化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	国药化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药化学试剂有限公司
甲醇	AR	国药化学试剂有限公司
异丙醇	AR	国药化学试剂有限公司
HA	BR	常州洋森生物科技有限公司
海藻酸钠	AR	国药化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	国药化学试剂有限公司
琼脂	AR	国药化学试剂有限公司
碳酸钙	AR	国药化学试剂有限公司

表 2-2 主要仪器
Table 2-2 Main instruments

仪器名称	仪器型号	生产厂地
超纯水机	LD-DI-15V	上海硕鼎水处理设备公司
电子天平	TA-214	上海海康电子仪器厂
pH 计	PHS-25	上海仪电科学仪器公司
恒温加热磁力搅拌器	DF-101SZ	巩义予华仪器有限责任公司
震荡培养箱	BS-1E	金坛杰瑞尔电器有限公司
恒温培养箱	GHP-9080	上海以恒科学仪器有限公司
质构仪	TexturePro CT	美国布鲁克公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
电热恒温鼓风干燥箱	GZX-GF101-I-BS-II	上海贺德实验设备公司

2.3 实验方法

2.3.1 发酵条件的优化

基础条件：葡萄糖 50 g/L，酵母膏 5 g/L，30℃，pH 6.8 条件下发酵 10 d。

2.3.1.1 氮源种类的选择

选择以硫酸铵、胰蛋白胨、酵母粉、酵母膏为发酵培养基氮源，pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，探究不同氮源种类与 BC 产量之间的关系，确定最佳氮源。

2.3.1.2 氮源浓度的选择

基于 2.3.1.1 的实验结果，分别选取酵母粉浓度为 8、11、14、17、20 和 23 g/L，在 pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，探究不同酵母膏浓度与 BC 产量之间的关系，确定最佳酵母膏浓度。

2.3.1.3 碳源浓度的选择

在 2.3.1.2 条件上，选择葡萄糖作为基础碳源，分别添加葡萄糖浓度为 50、60、70、80、90、100、110、130、160 g/L，在温度为 30℃，pH 6.8 条件下发酵 10 d，确定葡萄糖浓度与 BC 产量之间的关系。

2.3.1.4 无机盐浓度的选择

基于 2.3.1.3 实验结果，选择磷酸氢二钠、柠檬酸和硫酸镁作为无机盐添加物。其中，选择磷酸氢二钠的浓度为 0、4、5、6、7 g/L；选择柠檬酸的浓度为

0、0.5、1、1.5、2 g/L；选择硫酸镁的浓度为 0、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L。在 pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，探究不同无机盐浓度与 BC 产量之间的关系，确定最佳无机盐添加浓度。

2.3.1.5 大分子及其浓度的选择

基于 2.3.1.4 实验结果，分别选取壳聚糖、COS、HA 和海藻酸钠为大分子添加物，根据 BC 产量确定最优大分子添加物后，选择其质量浓度为 0.45、0.6、1.2、2、3 %。在 pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，探究大分子与 BC 产量之间的联系。

2.3.1.6 醇类物质及其浓度的选择

基于 2.3.1.5 实验结果，分别选取乙醇、甘油、甲醇、异丙醇和丙二醇为醇类添加，根据 BC 产量确定最优醇类添加物后，选择其浓度为 4、6、10、15、22、30、40 mL/L。在 pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，探究醇类与 BC 产量之间的联系。

2.3.2 大分子双网络添加

选取 HA 钠的添加浓度为 0.2、0.5、1、2、3 g/L，HA 加热溶解后与 COS 溶液混合原位添加至发酵培养基中，在 pH 6.8，培养温度 30℃条件下培养 10 d，以 BC 产量、机械性能、溶胀性能为指标探究大分子双网络对 BC 形成的影响。

2.3.3 发酵进程测定

对木醋杆菌发酵 BCP 进程进行 10 d 的动态测定，分别检测了 BC 产量，总蛋白，葡萄糖浓度，pH，菌浓度 5 项指标。

2.3.3.1 BC 产量测定

从培养基中取出 BCP，浸泡于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中，80℃水浴加热 30 min，使附着在 BCP 上的菌体裂解以及去除残留培养基，取出 BC 后使用去离子水冲洗直至使膜呈乳白色半透明状。置于 45℃烘箱中烘干至恒重。

2.3.3.2 总蛋白测定

将发酵液稀释一定倍数，使用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒（C503041，生工生物工程股份有限公司，中国）测定发酵液总蛋白浓度，将反应后溶液使用全自动酶标仪于 OD₅₉₅ 测定数值。代入 BSA 标准蛋白制作的标准

曲线得到蛋白含量。

2.3.3.3 糖含量测定

使用 DNS 法测定还原糖浓度，原理如下：在碱性反应体系中，还原糖与 3,5-二硝基水杨酸发生显色反应，经高温显色后生成具有特征吸收的棕红色物质（3-氨基-5-硝基水杨酸）。该显色复合物在特定浓度区间内的吸光度值与还原糖浓度呈正相关，通过公式（2-1），测定培养基的还原糖含量

$$\text{还原糖浓度 (mg/mL)} = \frac{OD-b}{a} \quad (2-1)$$

式中：a：线性函数斜率；b：截距

2.3.3.4 pH 测定

取出 1 mL 发酵培养基，使用 pH 仪器直接测定。

2.3.3.5 生物量测定

制备 100 mL，0.1 mol/L 的醋酸钾醋酸缓冲液，pH 4.6-4.8，在缓冲液中加入 2 g 纤维素酶，置于冰箱中待用。测定时，取 2 mL 活化的纤维素酶溶液和 5 mL 的样品溶液在 50℃，pH 5.0 条件下充分水解 2 h 后稀释两倍，于 OD₆₁₀ 测定数值。

2.3.4 材料表征

2.3.4.1 机械性能

将干燥的薄膜剪成 1 cm 宽、5 cm 长的条状标本。采用质构仪测定样本的最大拉伸强度和断裂应变。测量范围为 5000 cN，预紧力为 10 cN，夹紧距离为 26 mm，拉伸速率为 100 mm/min。韧性是使用 Origin 2021 软件对曲线进行积分。

2.3.4.2 溶胀性能

样品薄膜完全干燥至恒重，将干燥后的 BCP 样品称重（W_d）后浸泡在蒸馏水中，等待样品完全溶胀至吸水到达恒重记为（W_w）。薄膜的溶胀率（Swelling ratio, SR）按公式（2-2）计算：

$$SR(\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100\% \quad (2-2)$$

2.3.4.3 傅里叶红外光谱（FTIR）

所有样品经 80℃干燥 24 小时后，与预干燥的溴化钾粉末研磨均匀后压片，采用傅里叶变换红外光谱仪进行测定。扫描参数设定为：检测范围在 400-4000 cm⁻¹ 红外区间，分辨率为 4 cm⁻¹，累计扫描 32 次提高信噪比。原始数据导入 Origin

2021 进行二阶导数转化,消除基线漂移干扰后,通过 Gaussian-Lorentzian 混合函数对特征峰进行非线性最小二乘法拟合。

2.3.5 统计分析

使用 Excel 365、Origin 2021、image J 进行了统计分析。所有实验均重复进行了三次。

2.4 结果与分析

2.4.1 培养基优化研究

2.4.1.1 氮源及其浓度影响

氮源是木醋杆菌蛋白质合成,细胞生长的基本组分,充足的氮源能够促进木醋杆菌的快速生长和繁殖^[76]。氮源通过提供氨基酸合成所需的氨基化合物,促进相关酶的合成,从而提高 BC 的合成效率^[77]。

如图 2-1 a 所示,当使用酵母粉作为氮源时,BCP 产量最高,达到了 0.78 g/L。表明酵母粉能够提供丰富的氨基酸、肽类、维生素及其他生长因子,相较于单一氮源如硫酸铵或胰蛋白胨,能够更有效地促进木醋杆菌的生长与代谢,促进纤维素合成相关酶的合成。并且作为粉状物,酵母粉更易溶解于培养基中,这些综合因素共同作用,使酵母粉在发酵培养基中显著提高 BCP 的产量。

然而,过量使用酵母粉会导致代谢负担增加、碳氮比失衡、副产物积累及发酵过程不稳定等问题,因此需要对酵母粉的添加量进行优化^[78]。根据图 2-1 b 所示,当酵母粉浓度为 20 g/L 时,BCP 的产量达到最高,为 1.03 g/L,较未进行浓度优化的 14 g/L 提升了 32%。优化后的 20 g/L 的酵母粉浓度是最佳氮源浓度,对 BC 的合成具有最优促进效果。

2.4.1.2 葡萄糖浓度影响

在 BC 发酵过程中,碳源既是菌体生长的能量来源又是 BC 合成的底物。适量的葡萄糖能够为木醋杆菌提供充足的碳源,促进菌体生长和 BC 合成^[79]。然而,Mizzi 等人研究发现当葡萄糖浓度过高时,会导致代谢抑制和副产物积累,导致其代谢途径发生变化,产生大量酸性副产物葡萄糖酸,改变了培养环境进而抑制 BC 的合成^[80]。

如图 2-1 c 所示,当葡萄糖浓度为 100 g/L 时,BCP 的产量达到最高,达到了 1.98 g/L,较氮源优化提升了 92%。然而,随着葡萄糖浓度的进一步增加,BCP

产量出现下降。因此，选择最佳的葡萄糖添加浓度为 100 g/L。

2.4.1.3 无机盐浓度影响

无机盐在 BC 发酵中至关重要，既是细菌生长所必需的营养成分，也有助于维持细胞的正常代谢、提高酶活性、调节 pH 和优化发酵环境^[81]。磷酸氢二钠为木醋杆菌提供磷源，支持细胞的生长、核酸和 ATP 的合成，同时帮助维持培养基的 pH 稳定^[82]；硫酸镁提供的镁离子是许多酶的辅因子，有助于细菌的能量代谢和细胞生长^[83]；柠檬酸能够调节 pH、提供能量并参与三羧酸循环，对细菌的代谢和生长有积极作用^[84]。

如图 2-1 d-f 所示，单一无机盐的增减对 BCP 产量影响较小，但仍然起到一定正向作用。结果显示在磷酸氢二钠添加浓度为 6 g/L，产量增加 0.21 g/L；柠檬酸添加浓度为 1 g/L，产量增加 0.03 g/L；硫酸镁的添加浓度为 0.5 g/L 时，产量增加 0.13 g/L。总体而言，BCP 产量较未添加无机盐的产量增加了 1.31 g/L，达到多种无机盐的协同作用对 BCP 的产出具有明显的增长作用。

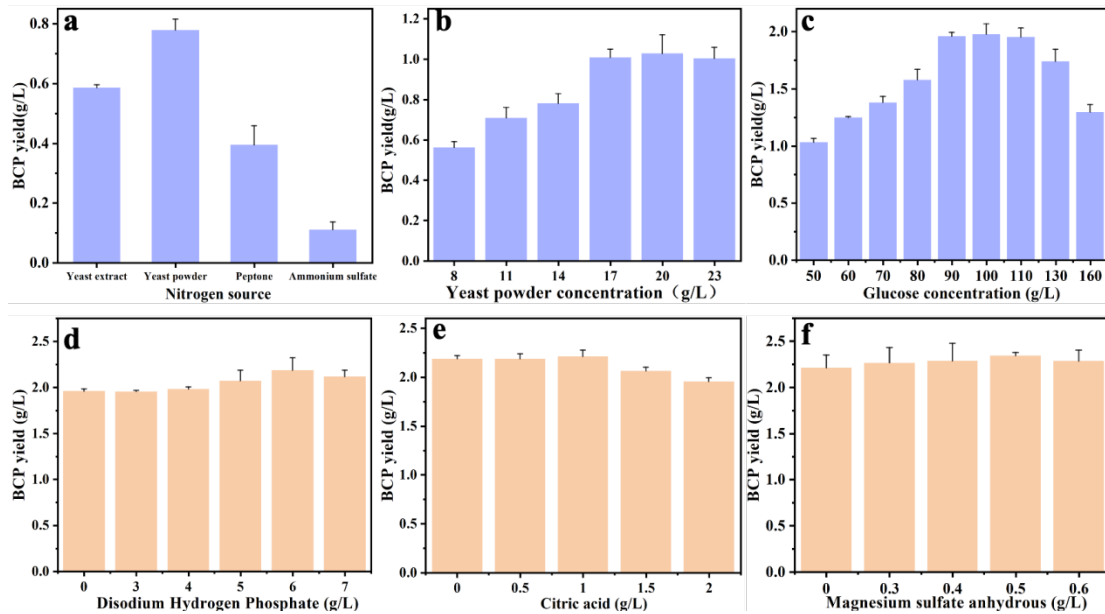


图 2-1 不同优化条件对 BCP 产量的影响，氮源筛选（a），酵母粉浓度筛选（b），葡萄糖浓度筛选（c）， Na_2HPO_4 浓度筛选（d），柠檬酸浓度筛选（e），硫酸镁浓度筛选（f）

Fig. 2-1 The effects of different optimization conditions on BCP yield, nitrogen source screening (a), yeast powder concentration screening (b), glucose concentration screening (c), Na_2HPO_4 concentration screening (d), citric acid concentration screening (e), magnesium sulfate concentration screening (f)

2.4.2 原位添加大分子与醇类影响

BC 的自组装依赖于木醋杆菌合成的葡萄糖单链在培养基中的沉积和聚合，

而大分子物质的加入, 可以作为辅助支架或模板。氨基、羟基或其他功能基团的引入, 能加强与纤维素单链之间的化学相互作用, 诱导纤维素单链自组装, 促进纤维素纤维的定向排列^[8]。

从图 2-2 a 可以看出 COS 的原位添加对 BCP 产量影响最大, 达到了 3.24 g/L, 增加了 0.9 g/L, 而其他有机大分子对木醋杆菌发酵产 BC 无促进作用。添加海藻酸钠与壳聚糖甚至抑制了 BC 的产生, 造成这样的原因是这两类大分子物质具有较高的聚合度, 溶解于培养基后会导致培养基黏度大幅增加, 过高的黏度会限制氧气和营养物质的扩散, 导致木醋杆菌生长受限^[85]。木醋杆菌会因为养分和溶氧的不足而减缓代谢活动, 导致 BC 合成的减少。因此, 选择聚合度较小的 COS 不仅不会影响培养基的黏度, 并且可以通过自身静电作用提供骨架给纤维素单链自组装, 促进 BCP 合成^[86]。且 COS 的添加会使得一部分 COS 被分解为底物, 作为营养物质被木醋杆菌利用, 进一步增强了 BCP 的合成。

但是过高的添加量仍会降低 BCP 的合成, 图 2-2 b 所示, 在 COS 的添加质量浓度增加到 3% 时, BCP 合成会出现下降的现象, 这是因为浓度过高 COS 会同 CS、SA 相似增加培养基的黏度, 导致培养基的溶氧量降低, 木醋杆菌为好氧微生物, 氧浓度的降低会导致代谢活动速度的下降, 所以会导致 BCP 的合成速度下降。因此, 选择 COS 添加质量浓度为 2% 为最优添加浓度, 这个条件下 BCP 的产量最高, 达到 3.96 g/L。

在对培养基的优化过程中, 醇类的添加对 BCP 产量的影响最为明显。Yunoki 等人通过碳标记研究发现乙醇未被用作 BC 生产的碳源, 而是被氧化为乙酸, 乙醇补充抑制了葡萄糖的消耗率和葡萄糖向葡萄糖酸的细胞外转化, 导致葡萄糖直接聚合成 BC 的速度加快^[87]。但是并不是所有的醇类都能促进 BCP 的产量, 图 2-2 c 所示, 只有乙醇与甘油能够对 BCP 产生具有明显的促进作用, 其中乙醇的加入使得产量提升到 5.73 g/L。相反地, 其他醇类会抑制 BCP 的合成甚至导致木醋杆菌的死亡。乙醇虽然不能被木醋杆菌直接利用, 但它可以利用乙醇转化为乙酸的间接途径, 生产的乙酸对其代谢途径具有反馈抑制, 增强了葡萄糖生成 BC 的途径表达, 可以很好地解释在少量乙醇存在的条件下, 木醋杆菌的生长并不显著受抑制, 反而提高 BC 的合成速率。图 2-2 d 所示, 在乙醇浓度 22 mL/L 时, BCP 的产量达到最高为 6.25 g/L。但乙醇作为常用的消毒剂, 其高浓度状态下能

够抑制细菌细胞壁的合成，同样对木醋杆菌适用。所以当乙醇浓度继续增加时，BCP 的产量开始出现下降。选择 22 mL/L 的乙醇作为醇类添加剂，BCP 的产量达到最高，达到了 6.25 g/L，乙醇的添加较未添加提升了 57.9%。

如图 2-2 e 所示，从最初的氮源优化到最后的乙醇优化，BCP 的产量从氮源优化的 1.03 g/L 提升到最终的 6.25 g/L，增加了 607%。在发酵过程中，通过一系列优化策略显著提高了 BC 的合成，通过逐步优化不同培养条件和添加剂来提升细菌的代谢活性、纤维素合成能力以及发酵环境的适应性。

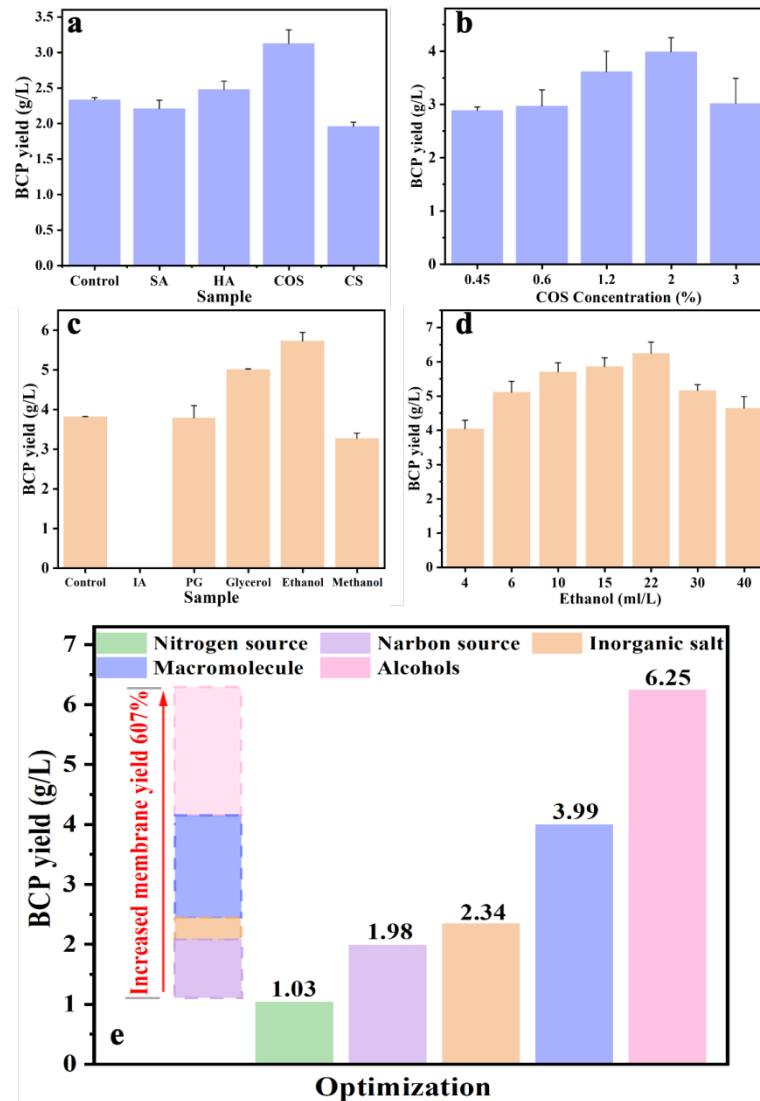


图 2-2 大分子与醇类对 BCP 产量的影响，大分子对产量的影响（a），COS 浓度对产量的影响（b），醇类对产量的影响（c），乙醇浓度对产量的影响（d），优化条件对产量的影响对比图（e）

Fig. 2-2 The impact of macromolecules and alcohols on BCP yield, the impact of macromolecules on yield (a), the impact of COS concentration on yield (b), the impact of alcohols on yield (c), the impact of ethanol concentration on yield (d), and the comparison chart of the impact of optimized conditions on yield (e)

2.4.3 网络原位诱导研究

COS 是一种天然的多糖类物质，可通过诱导原纤维自组装、作为底物等进而增强 BC 的合成，之前的实验已经证明其具有促进 BCP 合成的作用。通过引入 COS 的培养基发酵生成的 BCP 复合膜（BCC）内是纤维素原纤维与 COS 单链交织形成；通过引入 HA 的培养基发酵生成的 BCP 复合膜（BCH）内是纤维素原纤维与 HA 单链交织形成；COS 能与 HA 在溶解的状态下混合，形成混合溶液，通过引入 COS,HA 的混合溶液的培养基发酵生成的 BCP 复合膜（BCCH）是纤维素原纤维与 COS/HA 网络链交织形成。

图 2-3 a 所示，大分子溶液的原位添加对 BC 产量的增加明显，BCH 的产量增加到了 6.01 g/L；BCC 的产量增加到了 6.24 g/L；BCCH 的产量增加到了 5.92 g/L。COS 对 BCP 产量的影响前面已经论述，BCH、BCCH 对 BC 产量的增加原因类似，都是通过可以通过自身静电作用提供骨架给纤维素单链自组装，促进 BCP 的合成。但是由于自身黏度差异，对培养基溶氧量影响也不相同，会导致 BC 的产量会有差异。但是整体变化符合规律，添加的大分子溶液黏度为 $COS/HA > HA > COS$ ，这与产量成反比。

图 2-3 b 显示出大分子溶液的原位添加都会导致机械性能出现一定的下降，导致这样的原因是大分子与纤维素链之间的相互作用，干扰了纤维素纤维的正常自组装和交联过程，影响了膜的结构均匀性、致密性和结晶度。但是大分子的加入，引入的大量的亲水基团，并且大分子的引入会导致膜的孔隙增加导致整体结构的松散，孔隙的增加会导致机械性能的下降，但会使膜的溶胀性得到了一定的提升，尤其是 BCCH，双网络的引入对自由水的亲和力增加，溶胀性能随之增加。

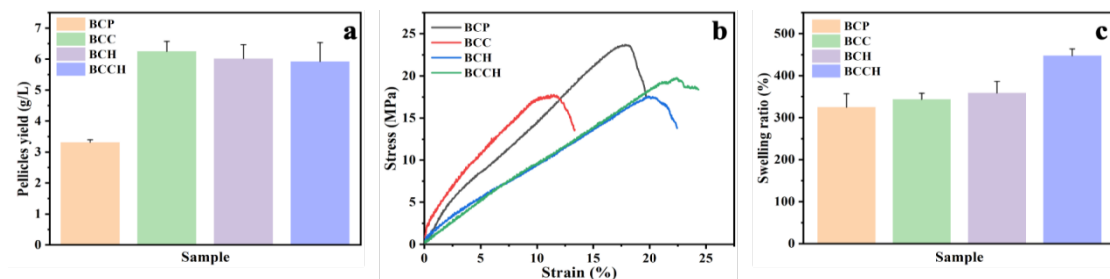


图 2-3 原位添加大分子对 BCP 产量 (a)，机械性能 (b)，溶胀性能 (c) 的影响
Fig. 2-3 Effect of In-situ addition of macromolecules on BCP yield (a), mechanical properties (b), swelling properties (c)

2.4.4 发酵进程

发酵过程的监测通过对 pH、BCP 产量、总糖含量、生物量和总蛋白各项指

标,了解发酵过程的动态变化。通过检测发酵过程寻找最优网络诱导添加时间点,增加 BC 产量及膜性能。

如图 2-4 c、d 所示,在发酵的前 24 h 内,培养基中的菌体处于生长期,木醋杆菌主要利用培养基中的营养进行菌体生长,此时代谢活动较为缓慢,因此 pH、BC 产量、葡萄糖含量、生物量和总蛋白含量变化不明显。24 至 96 h 内,木醋杆菌进入对数生长期,快速增殖,生物量迅速增加。在此过程中,木醋杆菌的代谢产生醋酸,导致 pH 值下降。葡萄糖浓度快速降低用于细胞代谢,总蛋白含量也迅速增加,表明菌体的代谢活动变得更加活跃。同时,培养基中开始出现少量细菌纤维素丝状物。发酵时间在 72 至 168 h 之间,菌体开始富集代谢产物,细菌纤维素形成饼状薄膜。168 h 后菌体代谢缓慢,各项指标变化不明显。

得出结论:木醋杆菌发酵 72 h 前是 BC 生成的关键时期,在 72 h 前加入大分子网络有利于促进链缠结,更有机会诱导 BC 的自组装,增加 BCP 产量及性能。

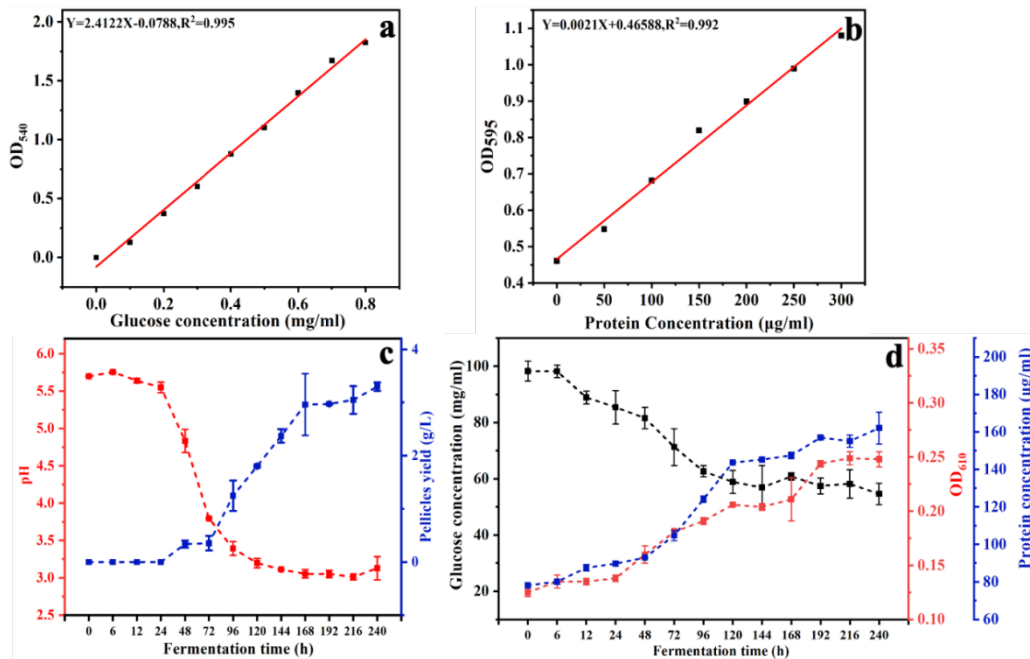


图 2-4 葡萄糖标准曲线 (a), 蛋白质标准曲线 (b), 发酵过程中 pH, 膜产量的变化 (c), 葡萄糖含量, 生物量, 蛋白质变化 (d)

Fig. 2-4 Glucose standard curve (a), protein standard curve (b), changes in pH, pellicles yield during fermentation (c), glucose content, biomass, protein changes (d)

2.4.5 大分子网络最优添加时间优化

为探究大分子网络最优添加时间,分别选择添加时间点为 24、48、72 h 得到的复合膜命名为 BCCH24、BCCH48、BCCH72。

在发酵 24 h 后添加 COS/HA 混合溶液，BCP 的产量和机械性能均优于其他两组。Zhong 等人发现 COS 作为一种水溶性膳食纤维，会被杆菌吸收利用^[88]。因此 COS 可能被木醋杆菌直接代谢或部分分解为葡萄糖和短链低聚糖，为菌体提供高效碳源，从而促进细胞生长并提高 BCP 合成。COS/HA 大分子具有更为紧密的网络结构，为纤维素原纤维自组装提供了更多的交联点。在发酵初期，木醋杆菌的代谢活动不活跃，添加大分子物质为原纤维的自组装和交联提供更多机会，从而使 BC 膜更加致密、结构更均匀，进而提高机械性能。

结果显示在发酵 24 h 后添加 COS/HA 大分子的 BCP 产量较初始添加增加了 4.30 g/L，增长了 72.7%，相对于 48 h、72 h 添加增加了 3.24 g/L、4.24 g/L，增长了 31.7%、60.7%。BCCH24 较 BCCH 应力未发生增加，但是应变增加了 19.6%，应变的下降表明 BC 膜的柔韧性减弱。这是由于在发酵过程中，BC 膜的结构变得更加致密，纤维素分子之间的交联增加，导致其伸展性下降。BCCH48，BCCH72 相对于 BCCH24 都出现了应力应变的下降。通常机械性能的增加会导致溶胀性能的减弱，但 BCCH24 相对于 BCCH 的溶胀性能下降并不明显，仍在可接受范围之内。实验结果可以得出在发酵 24 h 添加 COS/HA 网络大分子可以促进 BCP 的产量及增加复合膜性能的同时溶胀性能不会出现大幅下降。

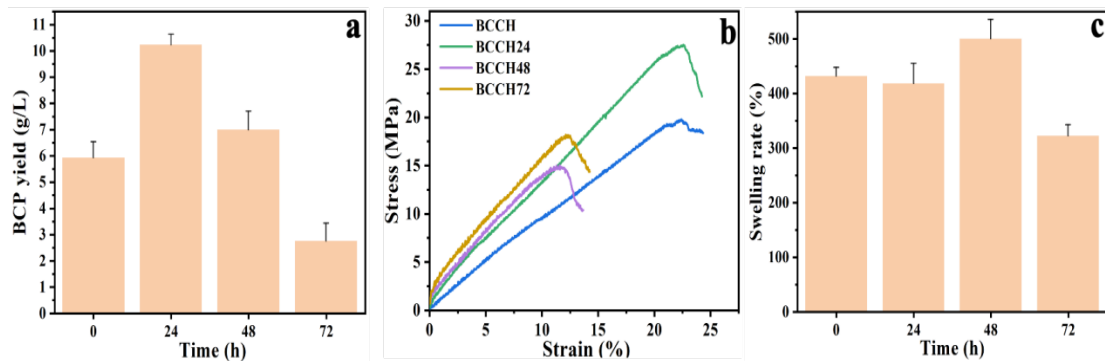


图 2-5 不同添加时间的 BCP 产量 (a)，机械性能 (b)，溶胀行为 (c)

Fig. 2-5 Different addition times of BCP yield (a), mechanical properties (b), swelling behavior (c)

发酵过程中各参数的变化能够反映出菌的生长情况，对 BCP 与 BCCH24 两种发酵方式进行比较，更加能够说明发酵 24 h 后添加 COS/HA 网络大分子对发酵环境的影响。

图 2-6 a 所示，两组的 pH 值均呈下降趋势，表明随着发酵过程的进行，木醋杆菌的代谢活动逐渐增强，产生的醋酸导致培养基 pH 值下降。在 0 至 24 h 内，

BCP 和 BCCH24 的 pH 值变化较小, 维持在 5.5。48 h 后, pH 值开始显著下降, 且 BCCH24 的 pH 降幅较大, 从 5.5 降至 2.9, 而 BCP 的 pH 降幅较小, 逐渐下降至 3.3。图 2-6 b 显示, 在发酵的前 24 h 内, 木醋杆菌在此阶段尚未合成 BC, 但随着发酵时间的延长, BC 产量逐渐增加。48 h 后, BC 产量开始快速上升, 并在随后的时间保持增加, 最终达到 3.3 g/L。BCCH24 前 24 h 同样未产生 BCP, 但随着发酵的进行, BCCH24 组的产量开始高于 BCP 组。到 48 h, BCCH24 的 BC 产量为 1.441 g/L, 在 240 h 达到 10.234 g/L。最终, BCCH24 的产量是 BCP 的 310%, 产量的大幅增加表明 COS/HA 网络大分子的引入显著促进了 BC 的产生。如图 2-6 c, d, e 所示, 木醋杆菌的生物量与蛋白质含量呈正相关, 而与葡萄糖消耗量呈负相关。木醋杆菌在生长过程中, 利用葡萄糖作为碳源, 并通过代谢合成蛋白质。引入 COS/HA 网络大分子后, 木醋杆菌的生物量在 48 h 后显著增加, 较 BCP 组高出 125%。生物量的变化还会导致葡萄糖和蛋白质含量发生变化, 但这一过程具有一定的滞后性。

网络原位诱导对 BCP 产量、机械性能、溶胀行为的影响已经在 2.4.3 分析, 这里仅对韧性详细分析。如图 2-6 h 所示, 在发酵 24 h 后引入 COS/HA 网络大分子后, 韧性增强了 37.9%, 达到了 3.78 MJ/m³。培养基内部网络结构的加入能够诱导 BC 单链围绕网络组装, 从而形成以大分子网络为骨架 BC 附着的复合膜结构, 从而表现出韧性增强。

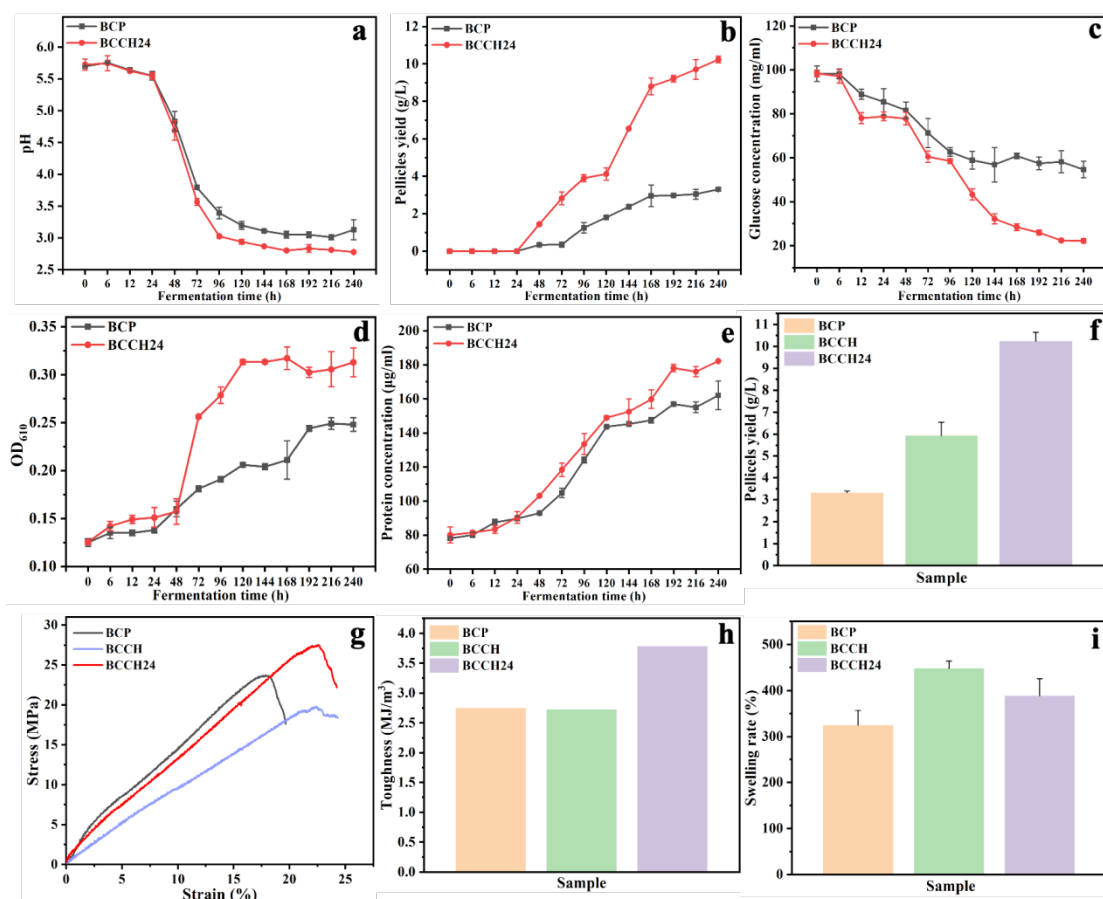


图 2-6 BCP 与 BCCH24 发酵过程中 pH 值变化 (a), 膜产量变化 (b), 葡萄糖含量 (c), 生物量 (d), 蛋白质变化 (e)。不同发酵方法的产量, 机械性能, 韧性, 溶胀性能对比 (f-i)。

Fig. 2-6 Changes in pH (a), yield (b), glucose content (c), biomass (d), and protein (e) during the fermentation of BCP and bcch24. Comparison of yield, mechanical properties, toughness and swelling properties of different fermentation methods (f-i).

2.4.6 BCP 的演变过程

将 BCP、BCC、BCH、BCCH、BCHH24 获得的膜处理后使用厚度测量仪对膜厚度进行测定并取平均值。图 2-7 所示, BCCH24 由于大分子网络的引入使膜产量出现明显的增加, 从膜的厚度可以直观体现。由于培养瓶面积一定, 因此产量与厚度成正比, BCCH24 较 BCP 的厚度提升了 90%, 达到了 5.1 mm。

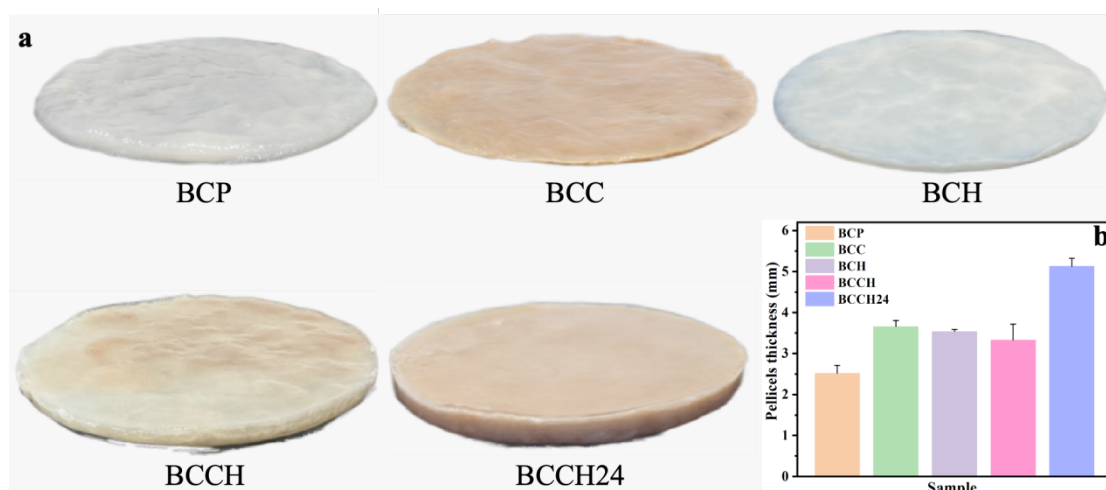


图 2-7 优化处理后膜实物 (a) 及厚度变化 (b)

Fig. 2-7 Physical picture of pellicles after optimization treatment (a), thickness comparison of different materials (b)

为了研究高分子材料的加入对膜整体结构的影响，对 BCP、BCC、BCH、BCCH 和 BCCH24 五种材料进行了红外检测，并对 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} 的波段进行了分峰处理，以探究大分子的引入对氢键的影响。

从图 2-7 a 可以看出，在 3400 cm^{-1} 处出现一个宽峰，这与细菌纤维素的优势官能团 O-H 基团的伸缩振动有关^[89]， $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ 的宽峰对应于 O-H 与 N-H 弯曲振动的重叠，重叠导致在 3260 cm^{-1} 处出现侧峰^[90]。所有样品的 FTIR 光谱相似，表明在所有条件下获得的纤维素具有相同的化学成分。但是 COS 或 HA 的加入使得 BCC、BCH、BCCH 和 BCCH24 在 1545 cm^{-1} 和 1120 cm^{-1} 处出现新的峰，其分别对应酰胺键与 C-O-C 键的振动^[91]。 1020 cm^{-1} 对应着糖环中 C=O 的拉伸振动^[92]。

从分峰图可以看出，在 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} 区域，主要是 O-H 伸缩振动的吸收峰。BCC、BCH、BCCH 和 BCCH24 在低波束出现新的吸收峰或者向低波束偏移。当峰向低波数位移时，表示分子间氢键作用增强，因为氢键的形成或增强通常会导致 O-H 伸缩振动的频率降低^[93]。当 HA、COS 加入培养基中时，通过氢键或静电作用与 BC 纤维发生交联，交联会导致纤维素分子结构的变化，形成分子之间的强氢键，使 O-H 的伸缩振动向低波束偏移，能够解释为什么大分子的加入会引起 BCP 产量的增加以及机械性能的增强。

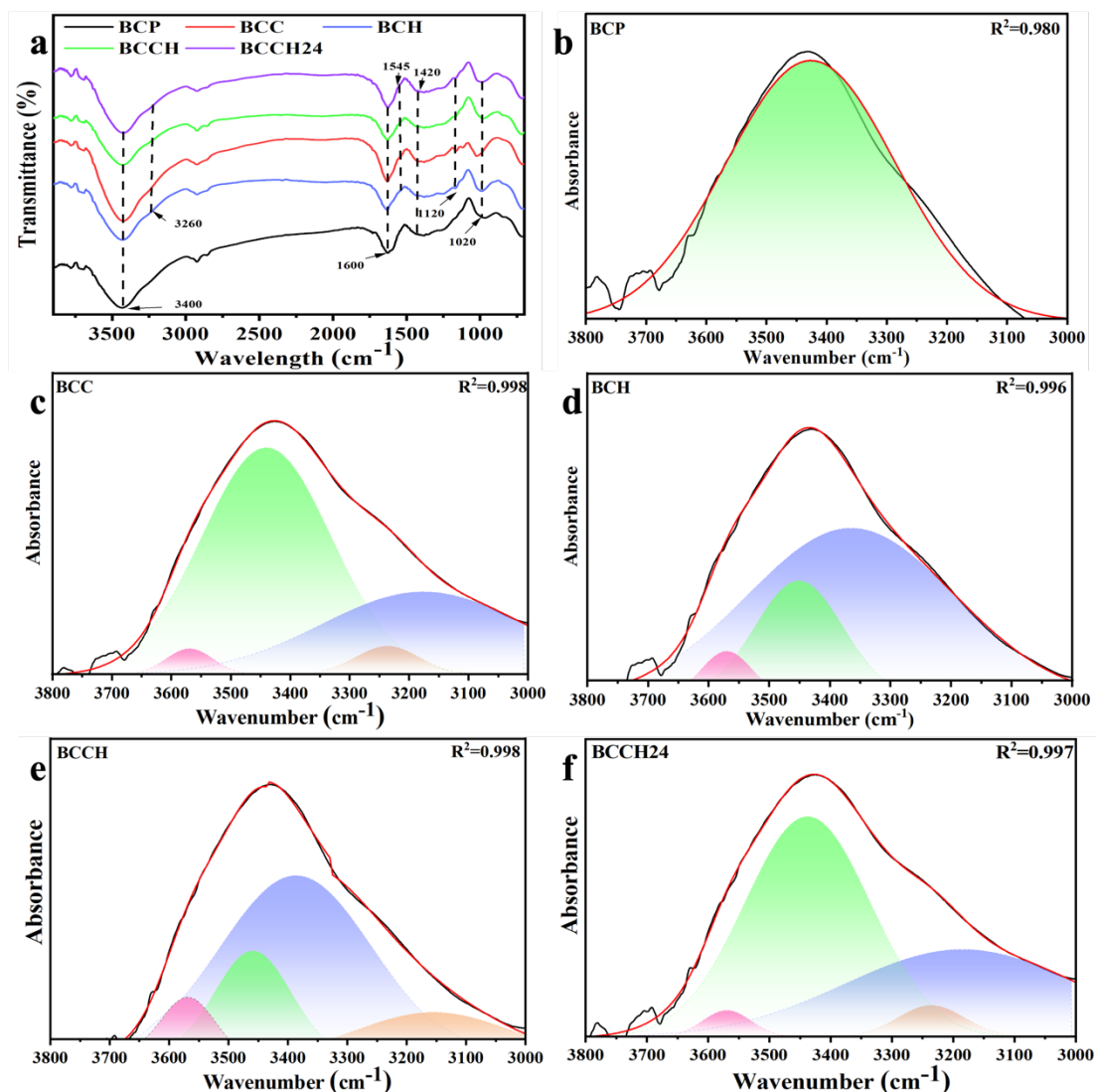


图 2-8 FTIR (a) , 不同材料在 3000 cm^{-1} -3800 cm^{-1} 波段的分峰处理 (b-f)

Fig. 2-8 FTIR(a), Peak splitting processing of different materials in the range of 3000 cm^{-1} -3800 cm^{-1} (b-f)

2.5 本章小结

本章优化了 BC 发酵培养基的组成, 并探讨了 CS、SA、HA 和 COS 对 BC 产量及膜性能的影响。通过优化发酵条件、氮源、碳源、无机盐浓度、醇类以及大分子的添加, 显著提高了 BC 的产量和膜性能。通过双网络大分子的引入, 为原纤维提供交联点增加了复合膜的性能, 并从氢键的角度分析了具体原因。具体内容如下:

(1) 培养基优化: 通过对氮源、葡萄糖浓度、无机盐浓度的系统优化, 确定酵母粉浓度为 20 g/L, 葡萄糖浓度为 100 g/L, 磷酸氢二钠、柠檬酸、硫酸镁的最佳添加浓度分别为 6 g/L、1 g/L 和 0.5 g/L。醇类的加入对 BC 产量的影响最明

显。优化后的 BCP 产量较未优化提升 607%。

(2) 原位添加大分子材料的影响: COS 和 HA 的原位添加可以显著提升 BC 的产量。尤其是在发酵 24 h 后添加双网络大分子时, BC 产量提升了 72.7%。此外, 机械性能和溶胀性能也有所改善。

(3) 网络大分子对 BC 结构的影响: FTIR 分析发现, 大分子材料的引入改变了 BC 膜的氢键结构, 导致 O-H 伸缩振动峰向低波数位移, 表明分子间氢键作用增强, 解释了大分子对 BC 膜产量和机械性能的促进作用。

通过优化发酵条件和大分子材料的原位添加, 本章实现了 BC 的高效生产及性能提升, 为 BC 的实际应用提供了理论和实验依据。

第3章 基于BCP的糖尿病伤口敷料构建及其效果研究

3.1 前言

糖尿病患者由于长期高血糖，易出现多种并发症，其中糖尿病伤口尤其常见且严重，糖尿病引起的免疫功能低下、血糖波动等因素，导致患者伤口往往难以愈合^[94]。因此，寻找有效的伤口愈合材料已成为当下研究的一个重要方向，BC因其独特的物理和生物学特性，被广泛应用于伤口敷料材料的研究^[95-98]。尽管BC在伤口愈合方面展现出巨大潜力，其功能性仍然存在局限，尤其是在糖尿病伤口愈合中的应用。如何增强其抗菌性、促进伤口愈合速度及提升抗氧化能力，是当前面临的主要挑战。

PTT是一种基于光热效应的治疗方法，其原理是将光能转化为热能，通过热能作用于指定区域进行治疗。该疗法具有非侵入性和较强的指向性，已广泛应用于癌症治疗、伤口愈合、抗菌等领域^[99-101]。

DFO作为一种铁螯合剂，能够与铁离子形成稳定的复合物，从而有效地去除体内过量的铁。在糖尿病伤口愈合中的作用主要体现在减少氧化应激、调节铁代谢、改善细胞功能、促进血管生成、抗菌和改善伤口微环境等方面^[102,103]。通过去除过量铁离子，DFO有助于恢复正常的细胞功能、减少损伤、加速伤口愈合^[104,105]。

国内大部分临床使用的糖尿病伤口敷料仍为传统的纱布或简单水凝胶类敷料，这些敷料虽然能够提供基础的保护，但在抗菌、促进细胞增殖和组织再生等方面的效果较为有限^[106,107]。随着对糖尿病伤口愈合要求的提升，市场和研究也急需新型、功能化的伤口敷料。因此本章提出了一种新型的BC改性策略，通过原位引入HA提供羧基，为接枝DA提供官能团，引入 Cu^{2+} 为近红外光照射提供局部升温效应及“桥梁”作用。随后，通过释放引入的DFO，从而达到加速糖尿病伤口的愈合的效果。

3.2 实验仪器与实验材料

3.2.1 培养条件

发酵培养基：葡萄糖 100 g/L，酵母膏 20 g/L，磷酸氢二钠 6 g/L，柠檬酸 1 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，乙醇 10 mL/L，pH 6.8。

3.2.2 试剂与仪器

本实验所使用的试剂及仪器见表 3-1，3-2。

表 3-1 主要试剂
Table 3-1 Main reagents

药品名称	药品类型	生产厂地
葡萄糖	BR	国药化学试剂有限公司
酵母粉	BR	国药化学试剂有限公司
十二水合磷酸氢二钠	AR	国药化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	国药化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	国药化学试剂有限公司
盐酸	AR	国药化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	国药化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药化学试剂有限公司
DFO	AR	麦克林生化科技有限公司
盐酸多巴胺	AR	麦克林生化科技有限公司
EDC	AR	国药化学试剂有限公司
NHS	AR	国药化学试剂有限公司
HA	BR	常州洋森生物科技有限公司
溴化钾	AR	国药化学试剂有限公司
三水合氯化铁	AR	国药化学试剂有限公司
氯化铜	AR	国药化学试剂有限公司

表 3-2 主要仪器
Table 3-2 Main instruments

仪器名称	仪器型号	生产厂地
超纯水机	LD-DI-15V	上海硕鼎水处理设备公司
电子天平	TA-214	上海海康电子仪器厂
pH 计	PHS-25	上海仪电科学仪器公司
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101SZ	巩义予华仪器有限责任公司
红外热成像仪	HM-TPE09Pro	海视康威有限公司
红外发射仪	FU808AD1000F34	深圳富喆富镭科技有限公司
差示扫描量热仪	DSC25	美国 TA 仪器沃特斯公司
酶标仪	Multiskan FC	北京普析通用仪器公司
质构仪	TexturePro CT	美国布鲁克公司
真空冷冻干燥机	SJIA-10N	宁波市双嘉仪器有限公司
扫描电子显微镜	S-8600	日本日立公司
傅里叶变换红外光谱仪	IRPrestige-21	日本岛津公司
X-射线衍射仪	D8Advance	德国布鲁克公司
荧光倒置显微镜	Olympus IX73	日本奥林巴斯公司
光学接触角仪器	SL250	美国科诺有限公司

3.3 实验方法

3.3.1 木醋杆菌种子液的制备

木醋杆菌由实验室筛选得到的高产菌株。使用接种环将琼脂斜面培养基上的木醋杆菌接种到 50 mL 50 g/L 葡萄糖和 5 g/L 酵母粉的培养基中，并在 30°C 和 120 rpm 下孵育 24 h。将发酵后的培养基视为种子液，在 4°C 下储存备用。

3.3.2 原材料制备

3.3.2.1 原位添加 HA 及 BCH 的纯化

对已有的方法进行改进^[8]，具体地，将 3 mL 种子液接种于 40 mL 的发酵培养基（pH 6.8）中，30°C 120 rpm 动态发酵 3 h 后转变为静态发酵，24 h 后将 10 mL 含有 0.1 g HA 的发酵培养液加入发酵体系中，继续静态发酵 7 天。发酵结束后，每个新得到的复合纤维素膜浸泡在 0.1 mol/L 氢氧化钠中在 75°C 40 min 去除杂质，直到乳白色和半透明，然后使用蒸馏水清洗，直至 pH 7.0。最后将薄膜

于 45°C 烘干，得到的产物为原位添加 HA 的复合纤维素膜，标记为 BCH。

3.3.2.2 近红外响应型的复合 BCP 制备

将 4.05 mg EDC，3 mg NHS，100 mg DA 加入 5 mL 的 MES 缓冲液中，充分混匀。将 BCH 浸泡到上述缓冲液中，37°C 120 rpm 反应 16 h，反应结束后取出复合膜，使用去离子水冲洗复合膜去除未反应成分，得到的中间产物记为 BD；接下来将 BD 浸泡于 5 mL 15 mmol/L 的 CuCl₂ 溶液，37°C 100 rpm 反应 12 h，得到的中间产物记为 BD@Cu；之后将 BD@Cu 加入 5 mL 12.5 µg/mL 的 DFO 溶液中，于 37°C 100 rpm 反应 12 h，最后得到的复合膜记为 BD@Cu-D。反应的每一步结束后都使用去离子水充分冲洗去除未结合的试剂，并在烘干后进行下一步。

3.3.3 性能表征

3.3.3.1 机械性能

参考 2.3.4.1

3.3.3.2 溶胀性能

参考 2.3.4.2

3.3.3.3 持水率

所有样品完全溶胀后去除表面水称重记为 W_w，将其置于 37°C 烘箱中干燥，在固定时间内取出测量其重量（W_t），直至膜完全干燥（W_d）。持水力（Water retaining ratio, WRR）根据公式（3-1）计算：

$$WRR (\%) = \frac{W_t - W_d}{W_w - W_d} \times 100\% \quad (3-1)$$

3.3.3.4 水蒸气透过率

根据已报道的方法测定水蒸气透过率（Water vapor permeability, WVP）^[108]。将样品裁剪成 4.0 cm×4.0 cm 的大小，紧紧贴在装有 3 g 无水 CaCl₂ 称量瓶的瓶口上方，样品和称量瓶口之间密封。将测试瓶置于恒温恒湿箱中，在温度 25°C，湿度为 75% 的恒定条件下放置 24 h。其中 Δm (kg) 是测试前后瓶子重量的变化，d (m) 是薄膜的厚度，A (m²) 是暴露的薄膜表面的面积，t (s) 是测试的时间，P (Pa) 是薄膜两侧之间的水蒸气压差（温度为 25°C 湿度为 75% 时为 0.02308 atm）。WVP 由式（3-2）计算得出：

$$WVP (kg \times m^{-1} \times s^{-1} \times Pa^{-1}) = \frac{\Delta m \times d}{A \times t \times P} \quad (3-2)$$

3.3.4 结构表征

3.3.4.1 傅里叶红外光谱 (FTIR)

参考 2.3.4.3

3.3.4.2 扫描电子显微镜 (SEM)

样品置于冷冻干燥机中冷冻干燥 24 h 后喷金 5 min, 采用扫描电镜在 5 kV 加速电压下检测表面形貌。

3.3.4.3 X-射线衍射 (XRD)

使用 XRD 仪分析样品的晶体性质。在 40 kV 和 40 mA 条件下, X 射线衍射图用镍过滤, 测定步长为 5°/min, 扫描范围为 10-50°。BC 的结晶度指数 (CrI) 值为非晶区和结晶区强度的比值。干燥复合膜的 CrI 由公式 (3-3) 确定。

$$\text{CRI (\%)} = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100\% \quad (3-3)$$

I_{002} 和 I_{am} 分别为在 22.7°和 18°衍射强度的最大值 (在 Origin 2021 中使用二阶导数方法对 XRD 图谱进行基线校正。在校正后的光谱中定位峰的高度和最大半峰宽 (Full width half maximum, FWHM), 高度与 FWHM 的比值定义为峰值锐度。

3.3.4.4 热重 (TGA)

采用岛津 DTG-60H 微型差示热平衡仪对样品进行热重分析。8-10 mg 样品在 20 mL/min N_2 中, 以 10 °C/min 温度从 30°C加热至 700°C。

3.3.4.5 接触角 (CA)

使用美国科洛光学接触角仪 SL250 对材料进行接触角测定, 所使用的接触液体为去离子水, 图像采集频率为 20 帧/秒, 仅保留完全接触材料的第一张照片。

3.3.5 光热性能

为测定材料的光热性能, 采用波长为 808 nm、功率密度为 1 W/cm² 的 NIR 激光在室温条件下照射样品, 并使用红外热成像仪实时监测样品的温度变化并拍照。进行红外照射后的材料记为 BD@Cu-D(N)。

3.3.6 DFO 和 Cu²⁺的释放行为

通过体外实验评价了材料及其在 NIR 照射下 DFO 和 Cu²⁺的释放行为^[109]。将材料分别置于 pH 值为 5.5 和 7.4 的 3 mL PBS 缓冲液中。其中 pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液中加入 12 mg 葡萄糖以模拟糖尿病慢性伤口的生理状态。同时, 一部

分样品在近红外照射下进行释放实验。所有样品均置于 37°C、100 rpm 的恒温振荡条件下进行释放行为测试。取样时，每次取出 500 μ L 的缓冲液，并立即用 500 μ L 的新鲜缓冲液补充。向取出后的缓冲液中加入一定体积的 3 mmol/L 氯化铁溶液，随后使用酶标仪在 485 nm 波长处测量吸光度。根据标准曲线，计算出 DFO 的浓度，并根据公式（3-4）计算出累积释放量（Cumulative Release, CR）。

Cu^{2+} 的检测按照 GB/T 36084-2018 的指南进行，简单地说，在酸性条件下， Cu^{2+} 与纳米银颗粒的表面的 Ag 原子发生氧化还原反应，生成一价铜离子（ Cu^+ ）和银离子（ Ag^+ ）；同时， Cu^+ 被溶液中的溶解氧氧化为 Cu^{2+} ，从而实现对纳米银颗粒的循环刻蚀，导致纳米银颗粒的尺寸减小，纳米银颗粒溶液的颜色由亮黄色逐渐变为无色^[110]。最后通过分光光度法代入标准曲线计算出 Cu^{2+} 的浓度，并根据公式（3-4）计算出累积释放量

$$\text{CR} = V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n \quad (3-4)$$

式中， V_e 和 V_0 分别为 500 μ L 和 3 mL。 C_n 为 n 次采样后溶液中药物模型的浓度。

3.3.7 生物相容性和抗菌性能

3.3.7.1 细胞培养

L929 细胞购自海星生物科技有限公司，并在补充有 10% (v/v) 胎牛血清（天杭生物，中国）和 1% (v/v) 青霉素-链霉素（赛维尔生物，中国）的 1640 培养基（赛维尔生物，中国）中培养。HUVECs 细胞由复旦大学上海医学院提供，并在补充有 12% (v/v) 胎牛血清和 1% (v/v) 青霉素-链霉素的高葡萄糖培养基（赛维尔生物，中国）中培养。在实验中，细胞系的传代数在 2 到 6 之间。两种细胞系均在 37°C 和 5% CO_2 的恒温恒湿培养箱中培养。

3.3.7.2 生物相容性评估

通过 CCK-8 试剂盒（上海白鲨生物科技有限公司）和 Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒（碧云天生物科技有限公司）实验评估材料对 L929 细胞与 HUVECs 细胞的细胞毒性。对于 CCK-8 测定，将 L929 和 HUVECs 细胞接种在 96 孔板中 (1×10^4 cells/well)，使用对照、BC、BCH、BD、BD@Cu、BD@Cu-D 和 BD@Cu-D(N) 材料的浸出液培养基处理 1、3、5 天。加入 CCK-8 试剂后，在 37°C 下孵育 1 h 后，于 450nm 处测定孔板的吸光度。细胞活力（Cell viability）通过

公式 (3-5) 计算。

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{control}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (3-5)$$

对于细胞活死测定, 将 L929 和 HUVECs 细胞接种在 12 孔板中(1×10^6 cells/well)培养 12 h 后, 使用材料浸出液培养基替换原培养基, 孵育 24 h 后吸出培养基, 按照试剂盒说明书处理细胞 30 min, 在荧光倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

3.3.7.3 细胞迁移率实验

使用体外伤口愈合迁移确定材料对 HUVECs 细胞迁移的趋化作用^[111]。将 HUVECs 细胞接种在 6 孔培养板中(1×10^5 cells/well)。当细胞均匀铺满整个培养基时, 使用含材料浸出液的低血清培养基替代原始培养基。每孔使用 10 μ L 移液器尖端制作平行伤口, 分别在 24, 48 h, 使用明场显微镜观察伤口, 通过观察伤口面积的变化来量化伤口愈合率。

3.3.7.4 抑菌实验

通过集落形成实验评估各材料的抗菌活性, 所有实验均在无菌环境下进行^[112]。将金黄色葡萄球菌(*S aureus*, ATCC 6538)和大肠杆菌(*E coli*, ATCC 25922)接种于 LB 液体培养基中, 并培养至对数生长期(1×10^6 CFU/mL)。随后, 将菌液与材料样品置于试管中, 在 37°C 孵育 12 h。孵育后, 将每孔溶液用 PBS 稀释 1×10^3 倍, 并接种至 LB 琼脂平板上, 在 37°C 下继续培养 24 h。最终, 通过拍照记录平板上的菌落生长情况, 并计数细菌菌落数以评估材料的抗菌性能。

3.3.8 体内伤口愈合

通过小鼠全层伤口模型评估了材料对伤口愈合的影响。所有实验方案均已获得动物护理委员会的批准。实验中使用 20 只 7~8 周龄的雄性 ICR 小鼠进行糖尿病模型的建立。通过腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素 (*Streptozotocin*, STZ) 诱导糖尿病模型, 并在 3 天后测量血糖水平。选择血糖水平高于 300 mg/dL 的 12 只小鼠参与后续实验^[113]。将这 12 只小鼠随机分为 4 组: 空白组、BD 组、BD@Cu-D 组和 BD@Cu-D(N)组。在每只小鼠背部制作直径 8 mm 的皮肤伤口模型, 并通过金黄色葡萄球菌感染伤口部位以模拟感染环境。所有实验使用的复合材料均在无菌条件下制备, 并分别将 BD、BD@Cu-D 和 BD@Cu-D(N)敷料应用于伤口, 使用 TM 胶布固定材料。在实验的第 0、5、9 和 14 天, 观察记录伤口愈合情况,

并更换新的敷料。伤口面积变化使用 Image J 软件进行测量和计算，以评估敷料对伤口愈合的效果。

3.3.9 组织学分析

为了更好地评估敷料对伤口愈合的影响，通过苏木精-伊红（H&E）染色和 Masson 三色染色进行组织学分析。具体而言，在实验第 14 天处死小鼠，采集伤口组织样本，并用 4% 多聚甲醛固定。样本经梯度乙醇脱水后，进行石蜡包埋，并切割成厚度为 5 μm 的切片。切片经过脱蜡和复水处理后，分别使用 H&E 染色试剂盒（塞维尔，中国）和 Masson 三色染色试剂盒（塞维尔，中国）进行染色。随后，使用倒置荧光显微镜观察切片并拍摄图像。为进一步评估成熟血管系统的形成，对切片进行了 α -SAM（塞维尔，中国，1:100）和 CD31（塞维尔，中国，1:100）染色，具体实验步骤参考文献并根据实验需求对实验设计和分析方法进行了适当调整^[114]。

3.3.10 酶联免疫吸附实验

应用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测不同材料对 HUVECs 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的影响^[115]。具体而言，将 HUVECs 细胞接种于 6 孔培养板中培养（ 4×10^5 cells/well），待细胞贴壁稳定后，分别加入含不同材料的培养基，培养 3 天，并于培养期间进行一次换液。实验结束后，弃去培养基，用预冷的含蛋白酶抑制剂的 PBS 漂洗细胞两次。然后，加入适量 RIPA 裂解液，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 持续裂解 30 min，再以 16000 rpm 条件下离心 20 min，取其上清液备用。最后使用 HIF-1 α 和 VEGF 的 ELISA 试剂盒，按照说明书方法对裂解液上清液中的 HIF-1 α 、VEGF 及 SDF-1 蛋白表达进行测定。实验所得结果分别以 ng/mL 和 pg/mL 表示。

3.3.11 统计分析

使用 Excel 365、Origin 2021、image J 进行了统计分析。使用 SPSS 26.0 进行了方差分析，并使用 Duncan 多重范围检验在 $p < 0.05$ 为差异显著。所有实验均重复进行了三次。

3.4 结果与分析

3.4.1 复合材料的成分优化

3.4.1.1 DA 浓度的优化

DA 在碱性或者有氧环境会氧化为聚多巴胺 (Dopamine, PDA)，自聚合形成的 PDA 涂层，能够进一步增强材料的强度和韧性^[116]。但过高浓度的 DA 会导致材料的刚性增加、脆性上升，延展性，透气性降低等，不利于膜作为敷料的整体应用^[117,118]。通过浓度优化，找到机械性能和溶胀率的最佳平衡点，确保材料既能吸收足够水分，又不会因过度膨胀而失去强度。

分别在 BCH 的基础上添加了 5、10、20、40、60 mg/mL 的 DA，结果如图 3-1 所示，DA 对膜整体机械性能提升明显，尤其是应力的提升超过 200%。但当 DA 浓度超过 10 mg/mL 后，应力上升速度减慢，这是由于 DA 氧化自聚合形成的 PDA 材料在网络中起到增强作用，DA 浓度较低时，PDA 逐渐填充材料的孔隙，提高了膜的交联度和致密性，增强了材料的力学性能。但当 DA 浓度超过 10 mg/mL 后，PDA 的生成量达到一定饱和度，继续增加 DA 仅能提供有限的附加增强，导致应力增长趋于缓慢。随着 DA 浓度不断增加，复合膜的溶胀性也不断增加，但整体增长幅度不明显，在 DA 的添加量为 60 mg/mL 时，溶胀达到了 554%。在 10 mg/mL 浓度下的溶胀率为 443%，这个浓度的 DA 既能提升材料的吸水能力，促进伤口湿润环境的维持，又不因过高的吸水能力导致伤口的高湿度从而引起感染，且机械性能也得到明显的提升，应力达到了 38.2 MPa，断裂伸长率为 16.3%。最终选择 DA 的添加量为 10 mg/mL。

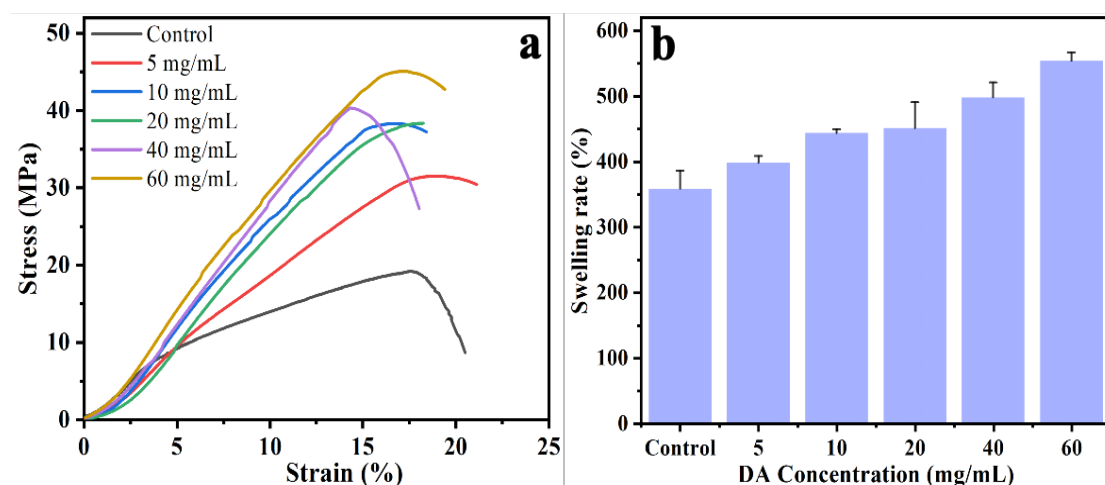


图 3-1 不同浓度 DA 对材料机械性能 (a)，溶胀性能 (b) 的影响

Fig. 3-1 Effects of different concentrations of dopamine on mechanical properties (a) and

3.4.1.2 Cu^{2+} , DFO 浓度优化

在 BD 中引入 Cu^{2+} 和 DFO 主要是为了赋予材料抗菌、抗氧化、光热响应性、促进糖尿病伤口愈合等功能^[119,120]。若 Cu^{2+} 浓度过低, 材料的抗菌性能不足, 无法有效抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等病原菌的生长; 过量的 Cu^{2+} 会导致细胞毒性, 影响成纤维细胞等正常组织细胞的增殖^[121]。DFO 是一种强效的铁螯合剂, 低浓度可能不足以有效降低过量的 Fe^{2+} , 难以促进慢性伤口恢复; 过量 DFO 可能导致铁离子过度螯合, 影响正常细胞的生长和代谢, 抑制愈合过程。

采用细胞毒理实验对 Cu^{2+} 以及 DFO 浓度进行筛选, 通过测量细胞存活率, 判断不同浓度的添加是否具有细胞毒性, 从而选择适宜的浓度范围。采用稀释平板计数法, 通过拍照记录平板上的菌落生长情况, 并计数细菌菌落数以保证毒理性安全的情况下评估添加浓度有效性。由图 3-2 a, b 所示, 通过对 HUVECs, L929 两种细胞进行毒理性测试, Cu^{2+} 在 10 mmol/L 的浓度内能保持在 80% 以上的人源细胞存活率, 在 15 mmol/L 内的浓度内能保持在 80% 以上的鼠源细胞存活率, 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 细胞存活率逐步降低, 说明过量的 Cu^{2+} 会导致一定的细胞毒性。通过 DFO 的毒理性实验发现, 低浓度的 DFO 对细胞并未具有伤害作用, 反而能够促进细胞生长, 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度内, 鼠源细胞存活率仍然能够超过 100%, 随着浓度的增加, 细胞存活率则会下降, 低浓度的 DFO 能够降低自由基的数量, 从而促进细胞增殖, 高浓度的则会具有一定的毒性。最终通过毒理性实验确定了 Cu^{2+} 在 15 mmol/L 的添加浓度内, DFO 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度内能够保证材料整体的生物安全性。

在生物安全范围内对 Cu^{2+} 浓度以及 DFO 浓度进行筛选, 通过图 3-2 c 可以得到, 随着 Cu^{2+} 的浓度不断增加, 抑菌效果逐渐明显, 但是随着 DFO 浓度的增加, 相同浓度下的 Cu^{2+} 抑菌效果更差, 这是因为, 低浓度 DFO 会刺激细菌分泌更多铁载体, 增强铁摄取能力, 并会避免细菌 DNA 负载过载, 从而使细菌增殖加快^[122]。细菌能分泌一种微小的铁载体, 与 DFO 竞争结合环境中的铁^[123]。若 DFO 浓度不足或细菌的铁载体效率更高, DFO-Fe 复合物可能会被细菌的转运系统识别并“劫持”, 反而成为细菌的铁源。最终选择 Cu^{2+} 浓度为 15 mmol/L, DFO 浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 能够在保证生物安全性的情况下, 保证最有效抑菌性能, 使得复合材料具有生物安全性和抑菌性能。

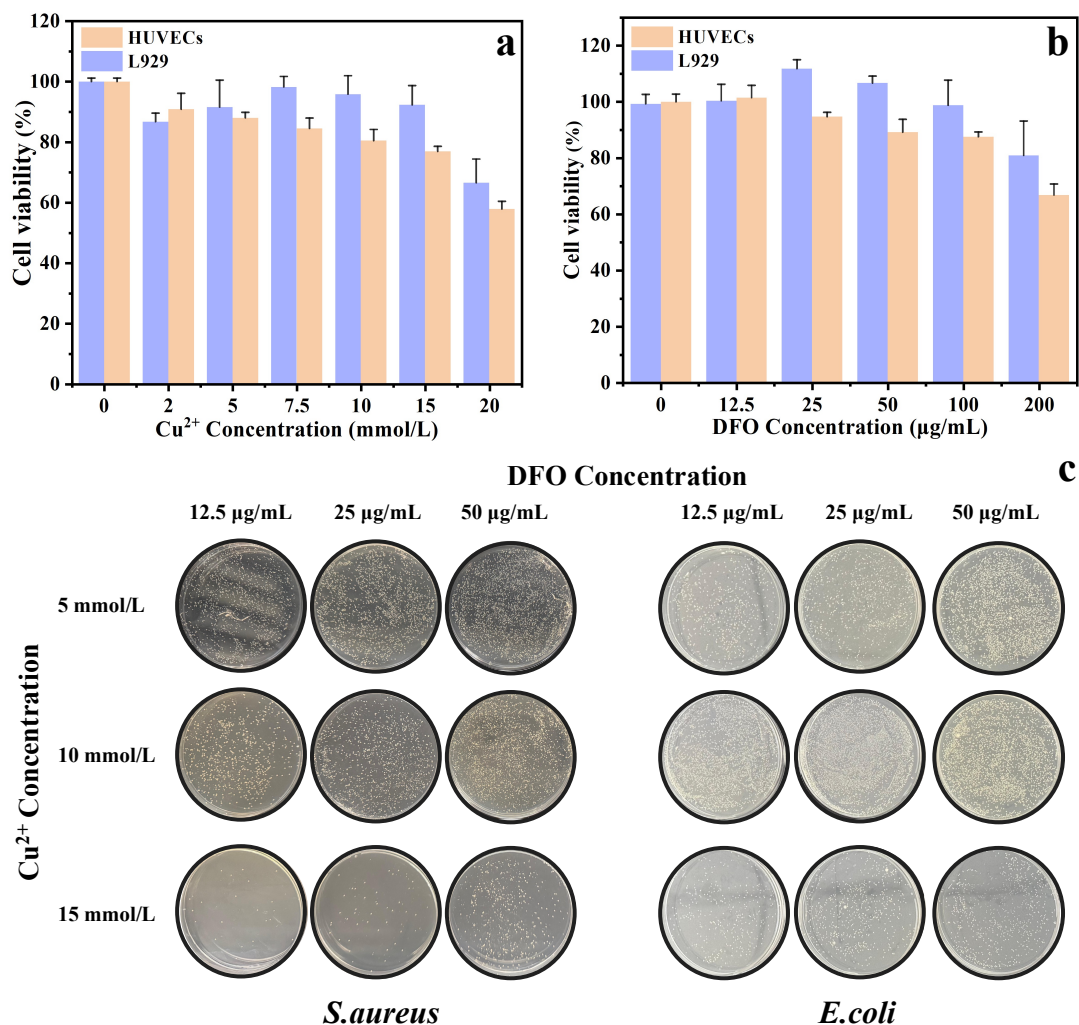


图 3-2 材料中 Cu^{2+} 和 DFO 对 HUVECs, L929 细胞活性影响 (a, b), 材料中 Cu^{2+} 和 DFO 的抑菌性能 (c)

Fig.3-2 Effects of Cu^{2+} and DFO in the material on the activity of HUVECs and L929 cells (a, b), and the antibacterial properties of Cu^{2+} and DFO in the material (c)

3.4.2 结构表征

3.4.2.1 SEM

BC 膜的主要特征是其由纳米级纤维组成的结构, 这些纤维呈现出交织的状态, 形成了一个高度网状结构。如图 3-3 所示, 通过 SEM 观察, BC 纤维的直径在几十至几百纳米之间, 显示出 BC 膜的高比表面积和结晶性, 但其纤维的排列依然呈现出一定的松散结构以及具有较大的孔隙。BCH 复合膜中, HA 的原位添加改变了纤维的排列方式, 与原始 BC 膜相比, 复合膜的纤维呈现出更均匀排列, HA 引入使得分子间作用力增强, 促使复合膜的纤维间隙更为紧密均匀, 孔隙较小。而 BD 的纤维表面分布着较为明显的团块或颗粒, 颗粒的形态不规则, 但分

布相对均匀。这些团块是由 DA 与羧基活化后的 BCH 进行化学交联形成的，DA 交联后形成交联点，诱导更多 DA 吸附在交联点上，在有氧条件下形成 PDA^[124]，SEM 上显示的团块或颗粒为 DA 聚集形成的 PDA 或多巴胺醌。BD@Cu 膜表面同样分布着很多颗粒，颗粒形态和分布比之前的 BD 膜更加显著且均匀，颗粒大小与 BD 不同，BD 表面呈现片状分布，BD@Cu 表面则呈现明显的颗粒状，导致这样的原因是 Cu^{2+} 能够促进 DA 聚合为 PDA，并具有一定吸附作用^[125]， Cu^{2+} 会与 DA 产生螯合作用，使得 DA 分子从片状聚合为大颗粒状。BD@Cu-D 膜表面形态体现出更高的粗糙度和致密的纤维网络。SEM 图像显示，经过 DFO 和铜处理后，纤维表面形成了一层均匀纳米颗粒涂层，使每根纤维表面从原先平滑变为粗糙，这种均一表面粗糙化意味纤维间接触面积增大，相邻纤维通过表面沉积层发生了轻微粘连或交联，说明 DFO 引入增加了大量氢键作用力与静电作用，BD@Cu-D 膜的纤维网络仍然清晰可见，但纤维交叉点处被一同覆盖的 Cu-DFO 络合物连接，呈现出略微更致密的网络结构。

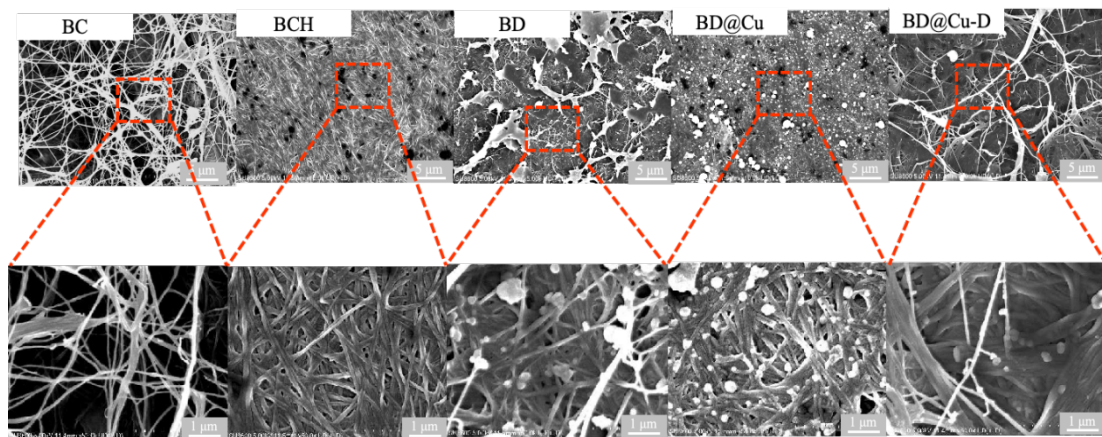


图 3-3 不同复合材料 SEM 图

Fig. 3-3 SEM images of different composites

3.4.2.2 FTIR

为研究分子基团之间的相互影响，对五种复合材料进行红外检测，并对 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} 和 1500 cm^{-1} - 1800 cm^{-1} 进行分峰处理，进一步显示出材料内部的基团变化以及峰偏移和强度变化。表 3-3 列出了原始 BC 的 FTIR 光谱的波段分配。

如图 3-4 所示，在 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} 区域，主要是 O-H 伸缩振动吸收峰。BCH、BD、BD@Cu 和 BD@Cu-D 在低波束出现新的吸收峰或者向低波数偏移，当峰向低波数位移时，表示分子间氢键作用增强，因为氢键形成或增强通常会导

致 O-H 伸缩振动频率降低。在 1550 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} 处为酰胺 II 带吸收峰，从分峰图可见 BC 在这一范围内没有明显吸收峰，在 1540 cm^{-1} 处出现的吸收峰为含氮培养基残留的峰。BCH 在 1550 cm^{-1} 处开始出现弱峰，是来源于 HA 结构中的酰胺 II^[131]。BD 在这个范围处峰值增强，是因为 EDC/NHS 促进了 HA 羧基与 DA 胺基之间的反应，生成了 -CONH- 结构^[132]，此区域的增强表明酰胺化程度增加。BD@Cu、BD@Cu-D 仍在 1550 - 1600 cm^{-1} 处有吸收峰，说明酰胺结构在铜修饰及 DFO 络合后仍然存在，并发生一定的低峰位移。五个样品都在 1720 cm^{-1} 出现了 C=O-CH 弱峰，但 BC 的吸收峰几乎消失，说明 BC 结构中未含有大量游离羰基。BCH 在 1720 cm^{-1} 处吸收峰增强，来源于 HA 中 COOH 结构，其区域内的 BD@Cu 吸收信号减弱，因为 Cu^{2+} 络合导致游离的 -COO- 结构减少，以及部分铜配位降低了 C=O 键的对称性，导致吸收强度变化。BD@Cu-D 在 1720 cm^{-1} 处吸收又有所增强，因为 DFO 分子中含有 C=O 结构，或者 DFO 络合后导致未配位羧基数量增加，从而使该峰增强。

Table 3-1 BC 的 FTIR 光谱的波段分配
Table 3-1 Band distribution of FTIR spectra of natural BC

峰位/ cm^{-1}	归属	参考文献
3353	O-H 伸缩振动	[89]
2921	C-H 的拉伸振动，证实了纤维素的无定形	[126]
1424	纤维素的特征能带 CH_2 的弯曲振动	[127]
1159	C-O-C 键的伸缩振动 (β -1,4-糖苷键)	[91]
1106	C-OH 伸缩振动 (多糖结构)	[128]
1054	C-O 伸缩振动 (糖环骨架)	[91,129,130]

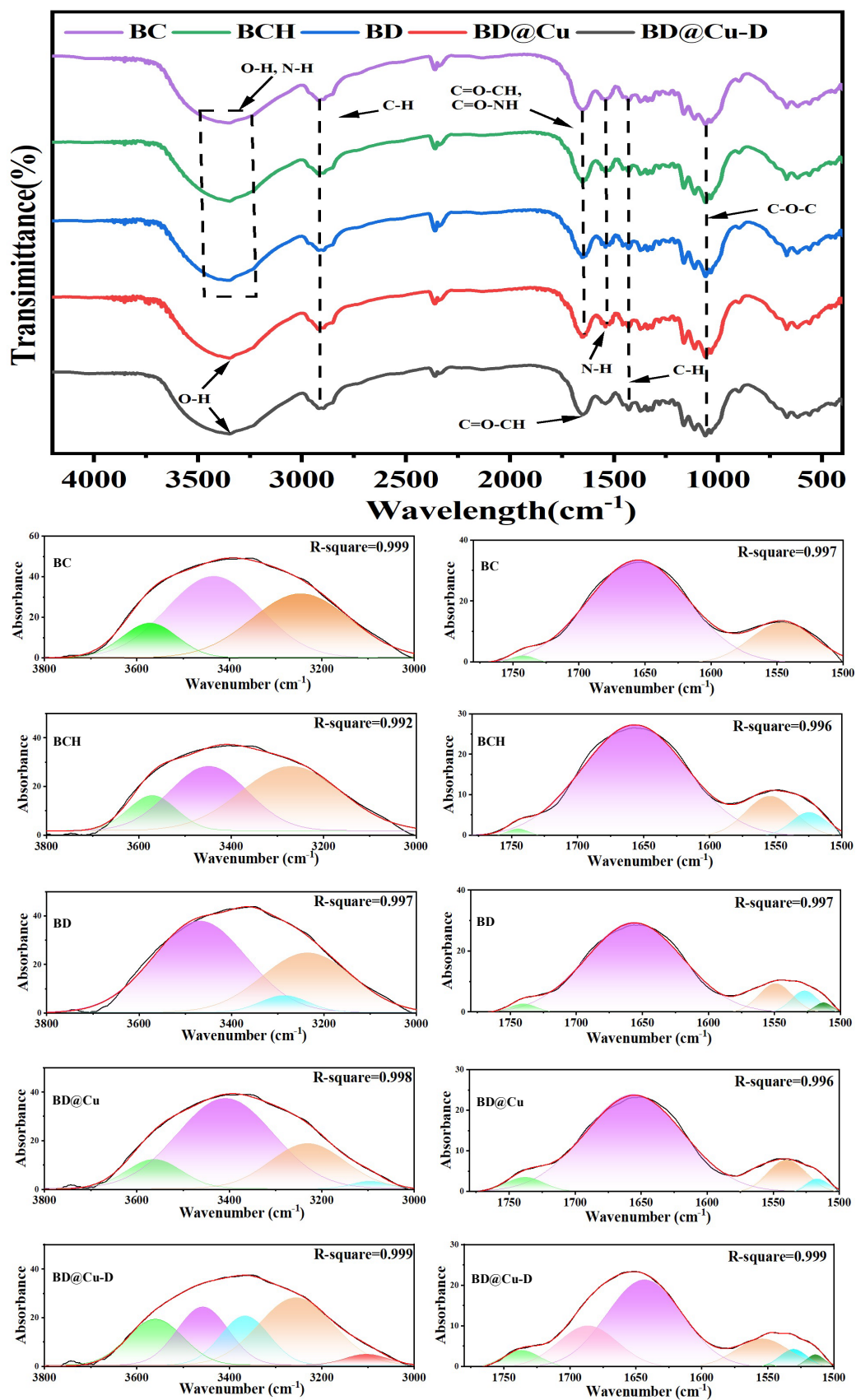


图 3-4 不同材料 FTIR 分析及分峰图

Fig. 3-4 FTIR analysis and peak splitting diagram of different materials

3.4.2.2 XRD

XRD 常用于研究材料的晶体结构和结晶度，晶体的几何形状和对称性是导致结构稳定的重要因素，直观影响 BCP 的机械强度。如图 3-5 所示，所有样品均在 14.7° 、 16.8° 和 22.7° 处观察到 3 个明显的特征衍射峰，分别对应于 (101)， $(10\bar{1})$ ，和 (002) 结晶平面，是典型的纤维素 I 型晶型，是在原始 BC 中常见的单细胞晶体结构^[133]。该类型纤维素处于亚稳定状态，可转化为 I β 型纤维素多态性。此外，根据 Segal 的公式计算了复合膜样品的结晶度指数 (Crystallinity index, CrI)^[134]，CrI 是衡量材料中结晶区与无定形区比例的重要参数。

表 3-2 不同复合膜的 XRD 图谱 CrI 分析
Table 3-2 Analysis of CrI of different composite films by XRD patterns

Sample	CrI (%)
BC	76.15
BCH	72.38
BD	80.90
BD@Cu	81.54
BD@Cu-D	83.65

引入的 HA 对细菌纤维素的结构产生了扰动，增加了无定形区，导致 BC，BCH 的结晶度降低^[135]。在 BCH 基础上引入 DA 后，结晶度有所提高，表明 DA 促进了纤维素分子链的规整排列，增强了材料的结晶特性，提高了材料的机械强度。根据图 3-1 也可以发现 BD@Cu 的分布更加均匀， Cu^{2+} 的引入进一步提高了结晶度。 Cu^{2+} 的引入络合了 DA，使得材料整体排布更加紧密。DFO 的加入，材料的结晶度增加， Cu^{2+} 对 DFO 的络合作用增加，分子链结构进一步趋于有序。

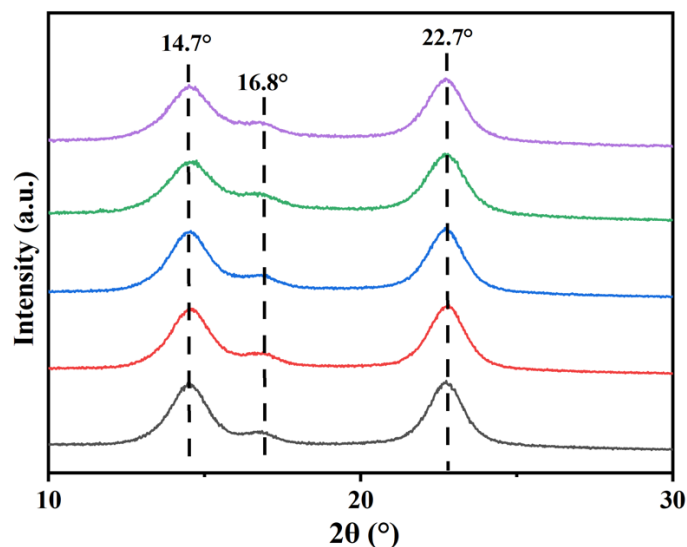


图 3-5 不同材料的 XRD 分析
Fig. 3-5 XRD analysis of different materials

3.4.2.3 热重分析

热重用于研究材料的热稳定性、降解行为和成分分析^[136]。根据图 3-6，五种材料在 100~270°C 之间重量缓慢降低，这一阶段的质量损失与样品中的自由水和挥发性小分子物质的蒸发有关^[137]。所有材料在此阶段的质量损失相对较小，表明它们的水分含量较低。

随着温度升高，在 270°C 后，材料出现剧烈的降解，根据 DTG，BC、BCH 在 350°C 左右达到最大降解速率，表明它们主要由纤维素主链降解导致质量迅速下降。而在主要的热分解阶段，BC、BCH、BD 以及 BD@Cu、BD@Cu-D 都在此温度范围内出现明显的质量损失，说明它们的主要成分仍然是纤维素。BCH 的热分解提前，是因为 HA 的引入降低了材料的稳定性，HA 是一种亲水性聚阴离子多糖，其分解温度低于细菌纤维素，当 HA 掺入 BC 体系后，整个材料的降解行为受到 HA 的影响，使得主要分解温度向低温方向移动，并且根据先前的 XRD 分析，HA 的引入降低了材料整体的结晶度，减少热稳定的结晶区，导致热分解提前。在 BD@Cu 和 BD@Cu-D 中，低温阶段（200~400°C）的热分解速率加快，铜离子的加入催化自由基反应，加快有机结构的降解。在大于 500°C 的高温阶段，它促进了碳化作用，使材料在高温下形成更多的残炭，并且 Cu^{2+} 与 DA 中的酚羟基或胺基形成稳定络合物，提高材料整体的结晶度，所以增强了一定的热稳定性。

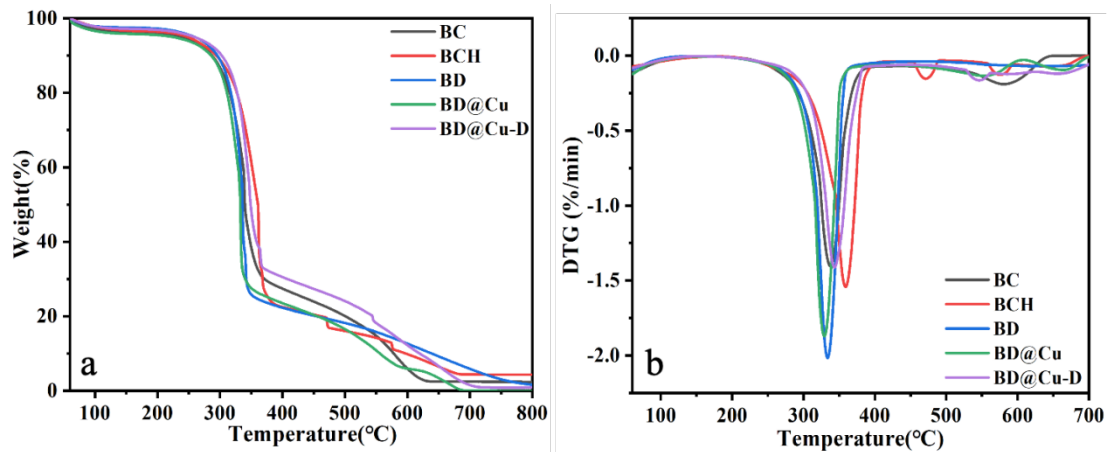


图 3-6 不同材料的 TGA (a) , DTG (b)

Fig. 3-6 Thermogravimetric analysis of TGA (a), DTG (b)

3.4.3 性能表征

3.4.3.1 机械性能及溶胀亲水性能

机械性能反映材料整体的强度，是材料结构改变的直观表现。根据图 3-7 a 所示，HA 的引入并不能增强膜的整体性能，根据 XRD 分析，HA 引入会导致膜整体结晶度的下降，使结构变得更加无序，且 HA 具有很强的亲水性，容易吸附自由水并在材料内部形成水合层，水合效应会削弱纤维素链间的氢键作用^[138]，导致材料结构变得松散，引起应变的降低。DA 通过化学改性交联至材料中，显著增强分子间的相互作用，从而使材料的结构更紧密，DA 的引入明显增强了膜的整体性能，应力从 BC 的 23.4 MPa 增加到 32.7 MPa，增加了 39.74%。在有氧条件下，DA 可以发生自聚反应形成 PDA，增加整体交联度，并且结晶度的增加也是机械强度上升的另一个原因。Cu²⁺的引入进一步络合 DA，使得整体更为均匀紧密，Cu²⁺的引入使得应力提升 13.7%，断裂伸长率几乎不变。DFO 的加入也是类似的作用，Cu²⁺作为 DA 与 DFO 中络合的“桥梁”，拉紧分子之间的距离，促使膜整体结构紧密，DFO 的加入使得应力增加到 46.5MPa，提升了 9%。

杨氏模量的增加往往会导致溶胀性能的降低，杨氏模量的增加代表材料的刚性增强，分子链排列更加紧密，交联程度更高，材料内部的孔隙和自由空间变小，水分子更难渗透和扩散，高刚性的材料不易形成较大的水合层，因此整体的溶胀性能下降^[139]。在 BC 复合膜中，杨氏模量增强的 BD、BD@Cu 和 BD@Cu-D 都出现了溶胀性能的大幅度降低，DA 的化学交联使得膜整体交联更加紧密，分子链刚性增强，水分子难以渗透至内部。

根据图 3-7 b 的接触角可以看出，BC 接触角为 76°，表现出亲水性。这与 BC

本身的亲水特征一致, 由于其具有丰富的羟基, 能够与水分子形成氢键, 因此具有一定的亲水性。HA 的引入使接触角度数增加, 为 84.6° , 相比纯 BC 有所增加, 表明材料的亲水性降低。HA 虽然本身具有亲水性的羟基和羧基, 但当其与 BC 结合时, 会在材料表面形成一定的屏蔽层, 掩盖了 BC 原本暴露在表面的亲水性官能团。这会减少水分子与材料表面直接相互作用的机会, 从而导致接触角增加, 表现出相对疏水的特性。BD 接触角为 71.9° , 比 BC 低 3.1° , 因为 DA 含有大量的酚羟基和胺基, 可以促进与水分子的相互作用, 提高材料表面的亲水性^[140]。而 BD@Cu 的亲水性下降是因为 Cu 与 PDA 发生配位作用, 导致 PDA 与自由水的结合作用下降, 使得材料整体趋向疏水性。DFO 的引入, 亲水性大幅增加, DFO 内部羟基与 Cu^{2+} 进行配位后, 外部亲水基团暴露在表面使得亲水性增加。从电镜图也可以看到, BD@Cu-D 纤维交叉点处被一同覆盖的 Cu-DFO 络合物连接, 呈现出更致密的网络结构, 引起纤维的聚集牵引, 使得内部孔径增大, 溶胀也出现了一定的增加。

3.4.3.2 持水性及水蒸气透过率

持水率反映了材料吸水后保持水分的能力, 由材料的亲水性和孔隙结构决定^[141]。持水率相对较高的材料可以在较长时间内维持湿润, 有助于伤口愈合, 但过高持水率会导致细菌滋生或渗液堆积^[142]。由图 3-7 c 所示, BC 具有三维纳米纤维网络结构, 富含孔隙, 可以溶胀大量水分, 因此具有较高的持水率。原位添加 HA 使得膜内部网络更为致密均匀, 因此 BCH 的溶胀性最高, 对水分的保持能力最强, 在 240 min 水分才完全消失。BD 中的 PDA 会在纤维表面沉积, 部分填充孔隙, 使整体孔隙率降低, 减少了水分储存能力, 导致持水率下降, BD 在 180 min 时水分已经完全消失, 重量不再变化。BD@Cu 与 BD@Cu-D 的持水性相似, 都优于 BD, 说明 Cu^{2+} 的络合作用使得纤维更为致密, 增强了一定的持水性, 在 220 min 时水分才消失。

水蒸气透过率反映了材料允许水蒸气通过的能力, 主要受孔隙率、分子间相互作用和表面自由能的影响^[143]。从图 3-7 d 可以看出, BD@Cu 的 WVP 最高, 达到了 $3.25 \times 10^{-8} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ 。铜的加入导致纤维表面的不均匀分布, 使材料孔隙结构开放性增加, 水蒸气更易穿透。DFO 的引入会增强分子间氢键作用, 导致材料在微观上更致密, 从而降低 WVP, 较 BD@Cu 降低了 17.5%。溶胀行为较

高, 反而导致 WVP 的降低, 虽然 BC 的孔隙较大, 具有较高的亲水性, 能吸附大量的水分, 但吸附的水分子会在纤维网络中形成氢键, 阻碍外部水分子扩散至瓶内。WVP 的结果跟溶胀性能成反比, 能够很好说明这个问题。

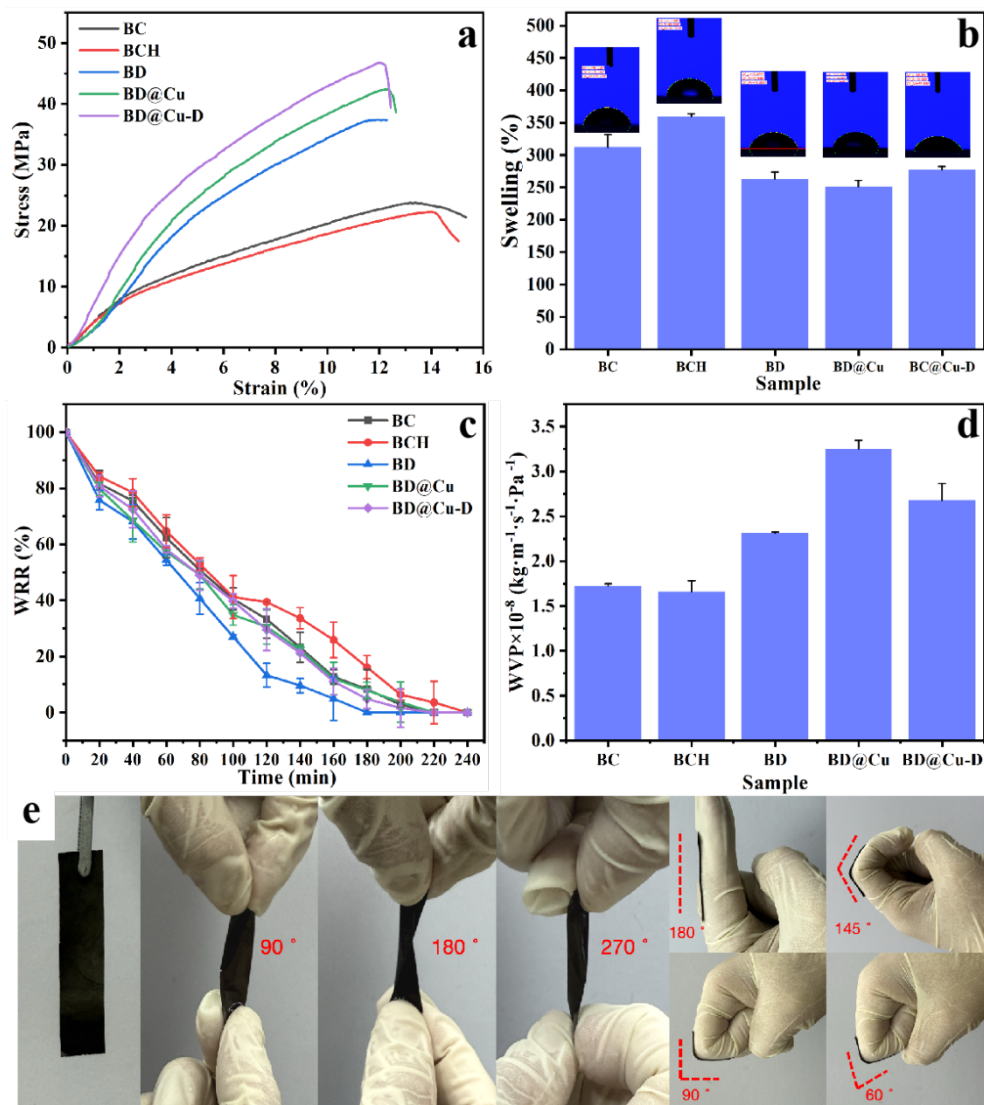


图 3-7 不同材料的机械性能(a), 溶胀性能与接触角(b), 持水性(c), 水蒸气透过率(d), 实拍图(e)

Fig. 3-7 Mechanical properties (a), swelling properties and contact angle (b), water holding capacity (c), water vapor transmission rate (d), actual picture (E) of different materials

3.4.4 光热响应

光热治疗是一种基于光热转换效应的非侵入式治疗方法, 通过特定波长的近红外光激发光敏材料, 使其吸收光能并转换为热能, 从而杀灭病原体、肿瘤细胞或促进组织修复^[144]。

如图 3-8 a 所示, 因为细菌纤维素本身无显著的 NIR 吸收能力, 且材料整体热导率较低, 所以 BC 在经过 NIR 照射过后, 温度升高缓慢, 最终稳定在 28°C。

PDA 具有类似黑色素的共轭 π 电子结构, 可以强烈吸收近红外光, 尤其在 700-900 nm 近红外区域吸收较强, 是一种具有优异光热转换能力的仿生材料, 能够有效吸收光能并转化为热能^[145,146], BD@Cu-D 在经过近红外照射后温度迅速上升, 在 2 min 内迅速达到 48.4°C, 并趋于稳定。另一方面铜具有局域表面等离子体共振效应, 同样能够在 NIR 照射下能够吸收光能并转化为热能^[147]。

在对 BD@Cu-D 进行循环四次的 10 min 照射实验, 以验证其光热稳定性和循环可逆性。如图 3-8 b 所示, BD@Cu-D 在每次 NIR 照射后, 材料的温度迅速升高, 最终趋于 48°C, 表明该材料具有优异的光热转换能力。在光源关闭后, 温度迅速下降, 恢复至室温, 材料能够快速释放热量, 具有良好的热传导性和可逆性。材料经历四个光照—冷却循环, 且每个循环的温度变化趋势基本一致, 没有明显的升温衰减, 表明 BD@Cu-D 在多次循环后仍能保持稳定的光热转换性能, 不会因材料降解或结构变化而导致效能下降。

在对小鼠伤口处敷上 BC 及 BD@Cu-D 两种材料并对其伤口进行 NIR 照射以模拟伤口治疗环境, 并对材料进行体外红外光照热成像观察。如图 3-8 c 所示, BC 在经过 8 min 照射后, 整体温度有所上升, 但升温幅度较小; BD@Cu-D 在 NIR 照射过程中, 材料温度迅速升高, 中心区域形成明显的高温热点。且材料在小鼠伤口处红外表现与体外照射表现类似, 说明材料在伤口处仍具有一定的光热效力。

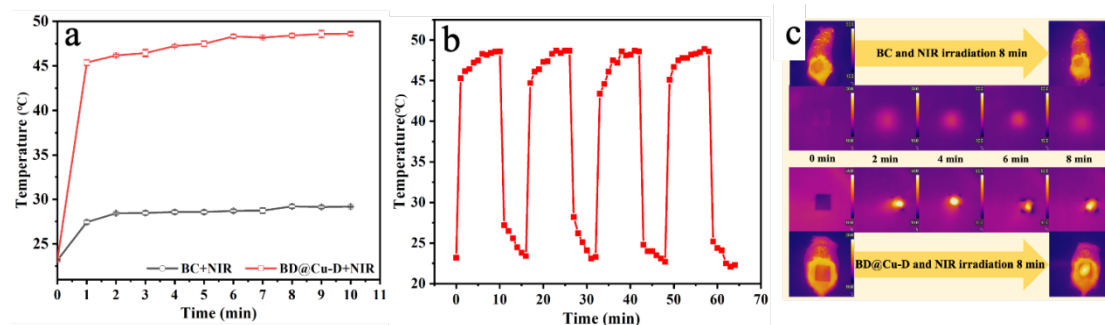


图 3-8 BC 及 BD@Cu-D 的光热性能 (a), BD@Cu-D 的光热稳定性 (b), BC 及 BD@Cu-D 的热成像 (c)

Fig. 3-8 BC and BD@Cu-D Photothermal performance (a), BD@Cu-D Photothermal stability (b), BC and BD@Cu-D Thermal imaging of (c)

3.4.5 药物释放模型

药物释放模型实验是评价药物控释体系的重要手段, 用于评估材料在体外模拟糖尿病伤口处的药物释放, 以评价材料的生物功能和治疗效果^[148]。

如图 3-9 a 所示, 在 pH 7.4 环境下, Cu^{2+} 释放量明显高于 pH 5.5 下的释放量, 从 17.7% 增加到 27.1%, 增加了 53.1%, 在较高 pH 下, 铜配位键的稳定性降低, 导致更多 Cu^{2+} 被释放。在 NIR 的照射作用下, 铜的局域表面等离子体共振效应使得产生的高能电子可以转移到 Cu^{2+} 配位键的反键轨道, 促进 Cu^{2+} 与配位基团之间的电子转移从而削弱配位作用, 使得 Cu^{2+} 与其配体的键强降低, 促进释放^[147], 因此近红外照射显著促进了 Cu^{2+} 的释放, 尤其在 pH 7.4 条件下, NIR 照射后, Cu^{2+} 释放量达到了 33.6%, NIR 的引入使得 Cu^{2+} 的释放增加了 23.9%。

如图 3-9 b 所示, 在 pH 7.4 条件下, DFO 的释放量高于 pH 5.5 的释放量, 从 54.6% 增加到 66%, 增加了 20.8%。这是因为 Cu^{2+} 在较高 pH 下的铜配位键的稳定性降低, 对 DFO 的络合作用降低, 使 DFO 更容易从材料中扩散出来。在 NIR 照射下, 照射加速了 DFO 的释放, 最终 DFO 的释放量达到了 75.1%, 装载的 3/4 被释放, 具有较高的释放效率。DFO 的高释放率是多种效应协同的结果, 首先 Cu^{2+} 局域表面等离子体共振效应以及 PDA 可以强烈吸收近红外光, 使得材料局部温度升高, 温度升高导致材料自由体积增加, 从而使 DFO 更容易从材料内部扩散到外部溶液中, 符合 Fick 扩散定律, 即扩散速率与温度呈正相关^[149], 加快了 DFO 的释放。其次, DFO 是水溶性分子, 温度升高会增加溶解度, 加速其从材料中溶解并扩散至外部溶液。且 Cu^{2+} 在 NIR 照射下的铜与 DFO 的配位键的稳定性降低, 导致 DFO 更多的释放。

3.4.6 抗氧化性能

在糖尿病伤口愈合过程中, 氧化应激过量累积所引起的生物损伤过程尤为明显, 糖尿病患者的高血糖环境会导致自由基大量生成, 加剧伤口部位的细胞损伤, 抑制血管生成和细胞增殖。DA 在自聚合后形成 PDA, 具有优异的抗氧化性, 可清除自由基并改善材料的生物活性。DFO 通过螯合自由铁离子, 减少 Fenton 反应产生的羟基自由基, 从而降低氧化应激水平^[150]。

进行 5 种材料及 BD@Cu-D 在 NIR 照射下对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力, 分别用于评估材料的抗氧化性能。如图 3-9 c 所示, BC 和 BCH 对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除率最低, DPPH 分别为 27.1% 和 23.7%, ABTS 分别为 16% 和 20.2%, 较低的清除率说明它们本身不具备较强的抗氧化能力, BC 和 BCH 为基础的纤维结构, 并未具有抗氧化成分。PDA 的酚羟基能够提供氢原子, 与自由

基反应，从而终止自由基链反应，降低氧化应激水平，且 PDA 具有高度共轭的 π 电子体系，可以稳定自由基，起到抗氧化的作用^[151]，导致 BD 的抗氧化能力显著增强，DPPH 和 ABTS 清除率均大幅提升，其中 DPPH 达到了 48.4%，ABTS 达到了 37.5%，分别提升了 104%和 85.7%。BD@Cu 的抗氧化能力相较于 BD 有所下降， Cu^{2+} 是一种过渡金属离子，能够通过类 Fenton 反应催化自由基的产生，增加氧化应激水平，但是仍具有一定的抗氧化性能，DPPH 和 ABTS 自由基的清除率分别为 28.3%与 26.8%。BD@Cu-D 及其在近红外照射后抗氧化能力增强，具有 41%的 DPPH 清除能力和 42.5%的 ABTS 清除能力，因为 DFO 与 Cu^{2+} 形成稳定的配合物，减少自由 Cu^{2+} 的浓度，降低 Cu^{2+} 催化的类似 Fenton 反应的效果，从而抑制自由基的生成，提高材料的抗氧化性能。在 NIR 照射下，温度升高， Cu^{2+} 产生局域表面等离子体共振，使得其价态趋于稳定，从而减少了自由基的生成。

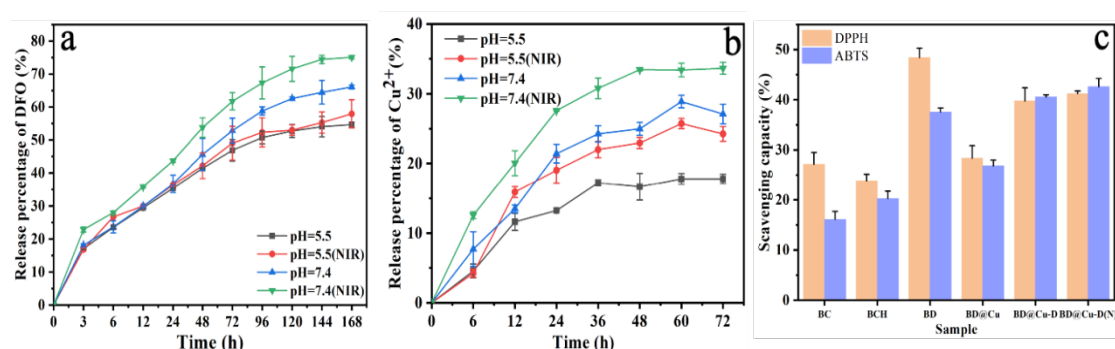


图 3-9 BC 及 BD@Cu-D 的 Cu^{2+} 释放 (a)，DFO 释放 (b)，DPPH, ABTS 自由基清除率 (c)

Fig. 3-9 BC and BD@Cu-D Of copper ion release (a), DFO release (b), DPPH, ABTS radical scavenging(c)

3.4.7 抑菌性能

在糖尿病伤口愈合过程中，糖尿病患者的中性粒细胞趋化性、吞噬能力和杀菌能力下降，机体对病原菌的清除能力减弱^[152]。如图 3-10 所示，BD 由于 PDA 本身具有抗氧化和一定的抗菌能力，能够与细菌细胞壁相互作用，破坏其结构，但作用较弱。因此，BD 组的抑菌效果有限，但是相对于 Control 能达到 60%的抑菌效率；BD@Cu-D 的抑菌率显著提高，在进行 DFO 浓度筛选时经过实验已经发现低浓度 DFO 并不具有抑菌效果，说明 Cu^{2+} 在抗菌过程中起到了重要作用， Cu^{2+} 作为一种广谱抗菌剂，可以与细菌细胞壁中的磷脂和蛋白质结合，导致细菌膜通透性增加，细胞内容物泄漏，最终死亡^[153]， Cu^{2+} 的引入使得材料的抑菌效率

达到 85%，较未添加增加了 42.7%；BD@Cu-D(N)的抑菌能力最高，达到了 98%，说明近红外光照射显著增强了材料的抗菌作用。PDA 具有光热转换能力，在 NIR 照射下温度升高，局部高温可以直接破坏细菌膜结构，使其失活。并且先前已经解释，NIR 照射后 Cu^{2+} 的释放会增多，导致整体抑菌性能进一步加强。革兰氏阳性菌细胞壁主要由厚厚的肽聚糖层组成， Cu^{2+} 更容易穿透并破坏其结构，因此抗菌效果较革兰氏阴性菌更明显，达到 96%。

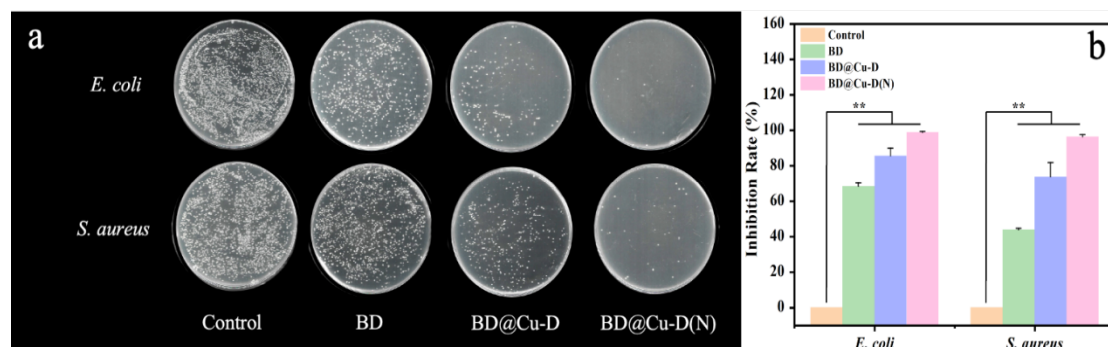


图 3-10 各材料同大肠杆菌、金黄色葡萄球菌共孵后生长情况 (a)，量化指标 (b)

Fig. 3-10 The growth of each material after co-incubation with *E. coli* and *S. aureus* (a), quantitative index (b)

3.4.8 细胞毒理及细胞迁移

BC 通常被认为是一种无毒的细胞材料，通过对 BD、BD@Cu-D、BD@Cu-D(N)进行 HUVECs 细胞实验，以评估细胞增殖情况。从图 3-11 a 可以看出，材料并未对细胞具有明显毒性，Control 出现的红色死亡细胞属于细胞正常凋亡。DA 和 DFO 的引入后，细胞仍然保持较高的存活率，说明在一定浓度下 DA、DFO 并不具有生物毒性。红外照射后，细胞凋亡出现增加，是因为红外照射后，材料中的 Cu^{2+} 较多的析出，由于 Cu^{2+} 就有一定的细胞毒性，导致细胞出现死亡^[154]，但整体仍在可接受范围之内。

利用材料浸出液对 HUVECs 细胞进行 5 天的培养，以评估材料对细胞增殖的影响。第 1 天细胞处于贴壁状态，增殖较为缓慢，所有组别的细胞增殖水平相近，各组材料的初始细胞相容性较好，没有出现明显的细胞毒性。第 3 天所有组别的细胞增殖均显著增加，细胞开始贴壁生长，并开始大量增殖：Control 的吸光度最高，表明传统培养条件对初期细胞增长具有优势；BD 的细胞增殖稍有延迟，但仍在持续增加，说明 DA 修饰不会抑制细胞的增殖；BD@Cu-D 的细胞增殖略低于 Control 组，可能与 Cu^{2+} 释放影响细胞行为有关，但整体趋势仍然呈上

升状态, 未出现显著抑制作用; BD@Cu-D(N)的增殖水平与 BD@Cu-D 组相似, 表明 NIR 照射并未对细胞生长产生负面影响。第 5 天细胞增殖进入稳定期, 吸光度基本达到最高值。各材料对细胞的增殖没有抑制作用, 表明各材料的生物安全性较高。

体外迁移实验可用于评估材料对细胞迁移的促进作用, 反映其在伤口愈合中的潜力。利用材料浸出液对 HUVECs 细胞进行 48 h 的培养观察, 由于已经改用低血清培养基, 细胞迁移效果多为材料影响。从图 3-11 c, d 可以看出, 在 24 h 时, 对照组迁移率达到约 32.6%, 略高于 BD 的 20.8%、BD@Cu-D 的 23.8%和 BD@Cu-D(N)的 22.5%, 可能是因为在初期细胞贴壁时, 由于 BD、BD@Cu-D 和 BD@Cu-D(N)组的材料浸出液加入培养基, 改变了培养基的黏度, 影响了细胞的铺展与贴壁速度, 导致迁移率略低于对照组。尽管在 24 h 时对照组的迁移率较高, 但随着时间推移, 材料调控作用开始显现; DA 能够在材料表面形成 PDA 涂层, 提高材料的亲水性, 促进细胞在材料表面的贴附, 使细胞更容易迁移。并且 PDA 具有类似细胞外基质的功能, 可促进整合素受体的结合, 提高细胞的铺展性和运动能力, DA 的引入使得细胞迁移率明显上升, 在 48 h 后从 43.7%增加到 72.7%, 增加了 66.4%; BD@Cu-D 中 DFO 通过调节铁离子水平, 通过抑制 HIF-1 α 降解, 使其在低氧环境中持续表达, 从而刺激 VEGF 和 MMPs 促进细胞迁移^[155], 但由于 Cu²⁺的毒理作用, 导致 BD@Cu-D 略低于 BD, 分别为 67.8%和 68.3%; BD@Cu-D(N)在 48 h 时达到最佳迁移效果, 迁移率达到 83.7%, 近红外照射进一步促进 DFO 释放, 导致迁移率增加。

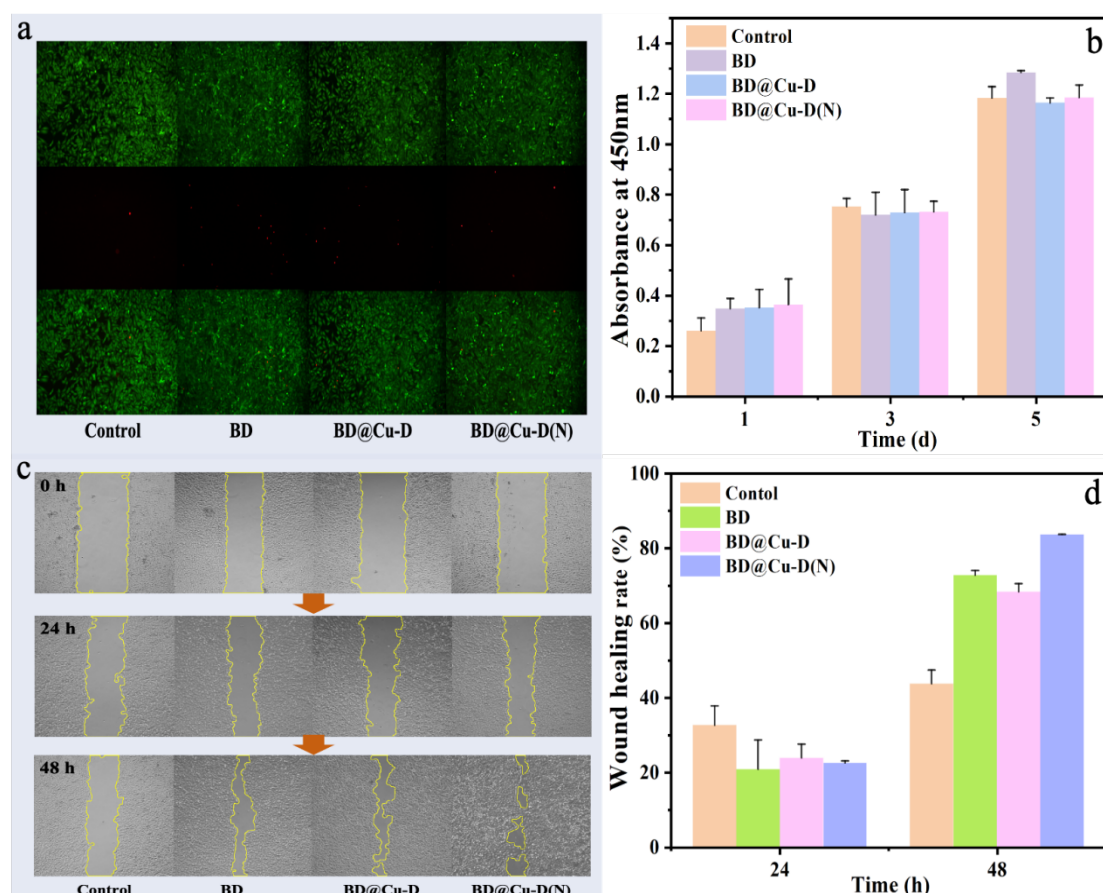


图 3-11 材料处理后 HUVECs 细胞活死染色图 (a)，细胞增殖 (b)，细胞迁移 (c)，细胞迁移量化 (d)

Fig. 3-11 Cell death staining diagram (a), cell proliferation (b), cell migration (c), and cell migration quantification (d) of HUVECs after material treatment

3.4.9 小鼠实验

小鼠实验是材料体内研究的重要环节，通过小鼠伤口愈合模型，验证 BD、BD@Cu-D 及其 NIR 照射下处理对伤口修复、抗菌、促血管生成方面的作用。

对正常小鼠进行糖尿病造模如图 3-12 a 所示。Cu²⁺可增加 HIF-1 α 活性，上调 VEGF，进而增加新生毛细血管形成，为伤口修复提供氧气和营养^[156]。并且 Cu²⁺具有广谱抑菌性，能够抑制伤口感染处的有害微生物生长。DFO 通过螯合 Fe²⁺，减少 Fenton 反应产生的羟自由基，降低氧化损伤，保护细胞^[157]。同时 DFO 通过螯合 Fe²⁺，抑制脯氨酰羟化酶 (PHD) 活性，使 HIF-1 α 稳定表达。在常氧条件下，HIF-1 α 会被 PHD 降解。而 PHD 又依赖于 Fe²⁺作为辅因子，所以通过减少 Fe²⁺从而抑制 PHD 活性，最终稳定 HIF-1 α 表达，上调 VEGF，SDF-1 的表达^[158]。VEGF 通过 PI3K/Akt 信号通路促进抗凋亡蛋白表达，抑制内皮细胞凋亡可促进微血管形成，提高氧气和营养供应，加速伤口修复^[159]。

对小鼠背部伤口创伤后使用金黄色葡萄球菌感染模拟糖尿病患者感染情况。结果如图 3-12 b,c 所示,在恢复至第五天时, Cu^{2+} 的引入能够显著加快伤口的愈合能力,愈合率达到了 22.8%,但 DA 的抑菌效果不明显,仅为 3.9%。 Cu^{2+} 的加入,抑制了伤口附近的金黄色葡萄球菌生长,从而明显促进伤口愈合。红外照射后,小鼠背部局部升温,对细菌具有消灭作用,所以 BD@Cu-D(N)该组的伤口愈合率进一步提高,达到了 24.6%,表明 NIR 不仅促进了 Cu^{2+} 和 DFO 的释放,同时增强了光热效应,提高了组织修复效率。第 14 天时, BD@Cu-D、BD@Cu-D(N)两种材料的伤口愈合率接近 90%, DFO 的引入和红外的照射能够明显促进伤口的恢复。Control 与 BD 的愈合率最低,仅为 59.9%和 63.9%,说明单靠机体的自我修复能力,愈合效果较差, BD 材料能够促进愈合,但效果有限,表明单纯 DA 改性不能提高修复伤口能力。

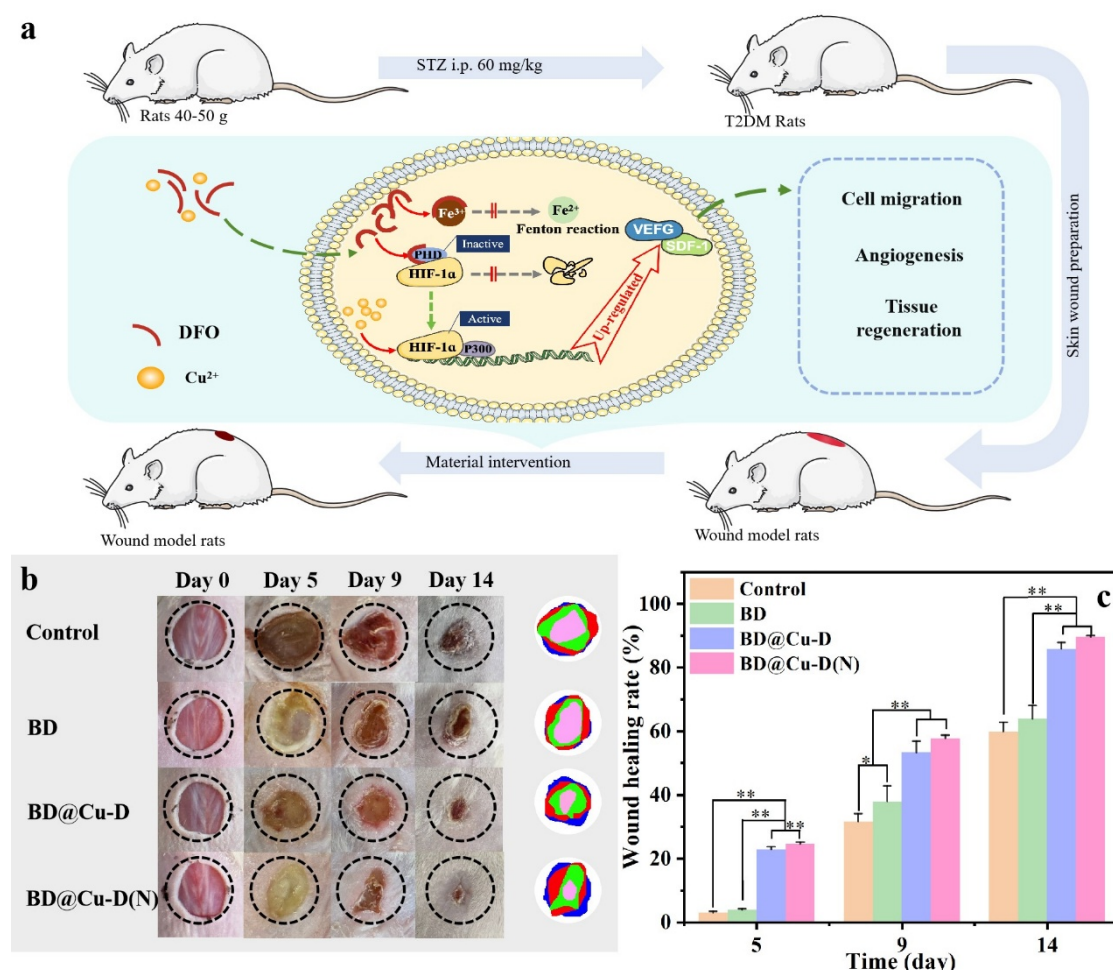


图 3-12 糖尿病小鼠造模过程及材料作用机理 (a), 小鼠伤口恢复 (b), 小鼠伤口恢复量化统计图 (c)

Fig. 3-12 Modeling process of diabetic mice and mechanism of materials (a), wound recovery of mice (b), quantification of wound recovery of mice (c)

3.4.10 组织分析

3.4.10.1 H&E 及 Masson 染色分析

Masson 染色时, 胶原纤维染为蓝色: 皮肤组织愈合过程中, 胶原纤维沉积在创面组织, 有利于创面的闭合, 胶原纤维的排列由不规则逐渐变成规则, 根据创面组织中胶原纤维沉积的多少和规则程度^[160], 能够反映伤口愈合程度。而 H & E 染色是一种组织学染色方法, 用于观察组织的基本结构和细胞形态: 苏木精呈碱性, 与细胞核内的 DNA、RNA 结合, 使细胞核呈蓝紫色。伊红, 呈酸性, 与细胞质、胞外基质蛋白结合, 使其呈粉红色。炎症细胞如中性粒细胞、巨噬细胞等染色颜色较深, 与正常细胞有一定差别。

如图 3-13 a, c, d 所示, 对照组中胶原沉积量最低, 且胶原纤维排列紊乱, 伤口愈合质量差。BD 中胶原沉积量相对较高, 但组织结构的纤维排列有序性仍有限。BD@Cu-D 胶原纤维的密度显著增加, 排列趋于规则。BD@Cu-D(N)在近红外光照射下胶原纤维的生成更为密集且排列更为整齐, 组织结构恢复最佳, 这说明该材料显著促进伤口愈合和组织再生。且 BD@Cu-D、BD@Cu-D(N)材料处理后的伤口直径显著小于对照及 BD 组, 仅为 3.17 mm 和 3.36 mm, 较 BD 的 4.84 mm 减少了近 35%, 说明 DFO 的引入能够促进伤口愈合, 通过红外照射后效果更加显著。

图 3-13 b, e 所示, 对照组的小鼠伤口部位存在明显的炎症细胞浸润, 真皮结构疏松, 组织排列紊乱。BD 组中炎症细胞浸润虽略有减少, 但整体炎症水平仍较高, 其炎症比例达到 10.6%, 仅比对照组少 0.6%。BD@Cu-D 组中炎症细胞的比例明显降低, 比例降低至 8.7%, 皮肤组织修复明显改善, 结构较为清晰、完整。BD@Cu-D(N) 的炎症细胞浸润进一步显著减少, 为 8.1%, 真皮组织结构清晰, 组织再生情况最优, 体现了明显的抗炎和促愈合效果。从 H&E 染色以及 Masson 三色染色中可以看出, BD@Cu-D 复合材料表现出较好的抗炎、促进胶原沉积及组织再生的能力, 而在近红外照射的协同作用下, 其组织修复能力和抗炎性能更加突出, 展现出在糖尿病慢性伤口治疗中的明显优势和应用潜力。

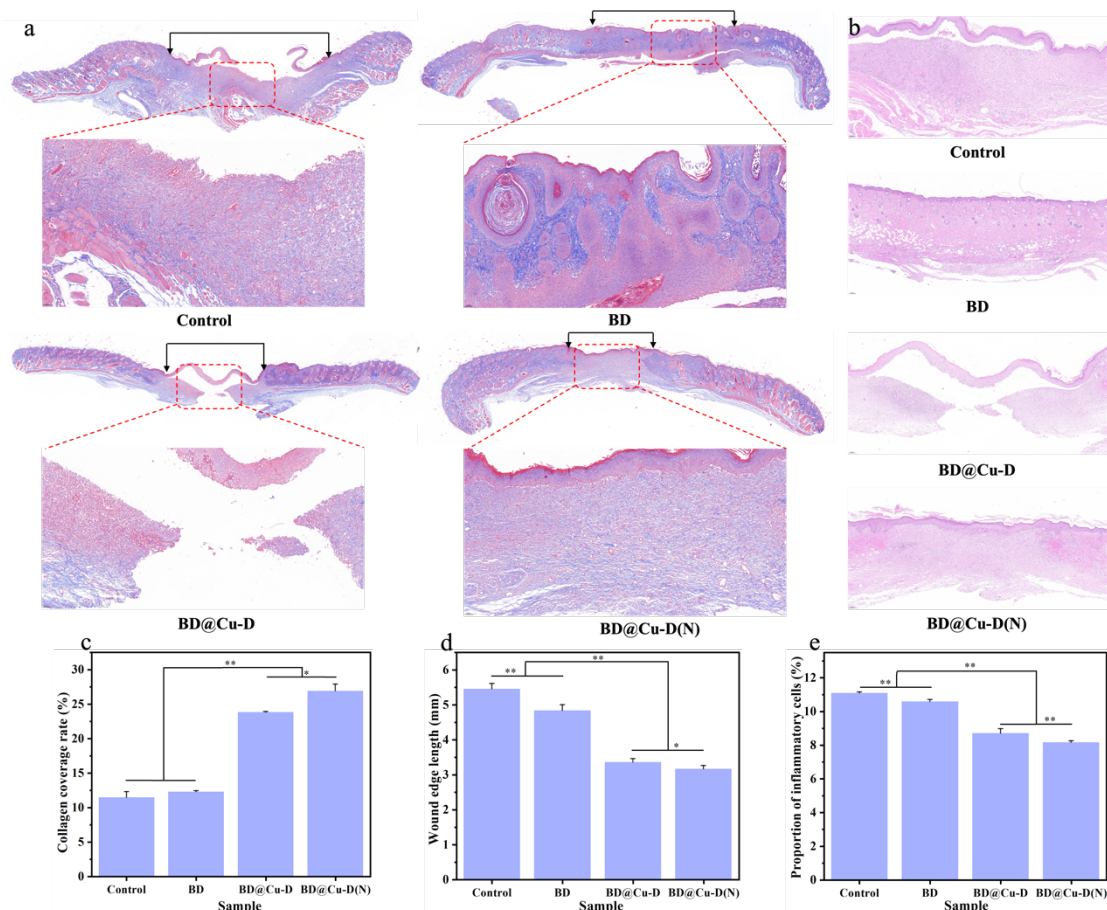


图 3-13 小鼠组织 Masson 染色，比例尺=500µm，局部放大图比例尺=50 µm (a)，小鼠组织 HE 染色，比例尺=100µm (b)，材料处理后伤口胶原覆盖统计 (c)，材料处理后伤口长度统计 (d)，材料处理后伤口炎症比例统计 (e)

Fig. 3-13 Mouse tissue Masson staining, scale = 500µm, local zoom scale = 50µm (a), mouse tissue HE staining, scale = 100µm (b), statistical analysis of wound collagen coverage after material treatment (c), statistical analysis of wound length after material treatment (d), statistical analysis of wound inflammation ratio after material treatment (e)

3.4.10.2 CD31 及 α -SMA 染色分析

对内皮细胞标志物 CD31、 α -SMA 进行了检测，以评估材料对伤口床上血管形成总数的影响。CD31 主要表达在血管内皮细胞表面，用作标记新生血管的指标^[161]，反映组织中血管生成情况阳性染色位于血管内皮细胞胞膜和胞质，呈现棕黄色阳性表达。如图 3-14 a 所示，对照组的棕色阳性区域最少，微血管密度最低，说明新生血管形成能力较弱。BD 略有提高，阳性区域稍增多，表明引入 DA 对新生血管的形成有一定促进作用，但不显著，较对照的 8.2%增加至 9.5%。BD@Cu-D 和 BD@Cu-D(N)棕色阳性区域最多且密集，尤其是在 NIR 光照射后，新生微血管密度显著增加，达到了 33.6%，说明 DFO 的使用以及近红外照射后均能明显促进新生血管的生成。

α -SMA 通常用来评价成熟血管和肌成纤维细胞的活化程度^[162]，染色阳性区域越明显，表示血管成熟度越高，创面组织修复状态越佳。对照组成熟血管数量少，染色微弱，说明其组织修复与血管成熟度较低。BD 阳性区域有所增加，说明 DA 的加入在一定程度上提高了血管的成熟度，达到了 14.8% 的占比。BD@Cu-D 与 BD@Cu-D(N) 表现出明显较高的 α -SMA 表达，分别为 30.3% 和 32.3%，特别是 BD@Cu-D(N) 的染色深度与阳性密度最高，成熟血管形成程度最好。

两种染色结果表明：DA 的引入能够在材料中聚合成 PDA，具有较好的光热转化能力，在 NIR 光照射下迅速将光能转化为热能，提高材料的局部温度。DFO 作为一种铁螯合剂，能有效稳定缺氧诱导因子，促进创面组织内 VEGF、SDF-1 等关键因子的表达，从而诱导新生血管形成，加速组织的血管化和愈合过程。在 NIR 光照射条件下，由于材料温度升高，配体与 Cu^{2+} 之间的键合更容易断裂，促进了 DFO 的释放，更有效地发挥其生物活性，加速伤口愈合过程。

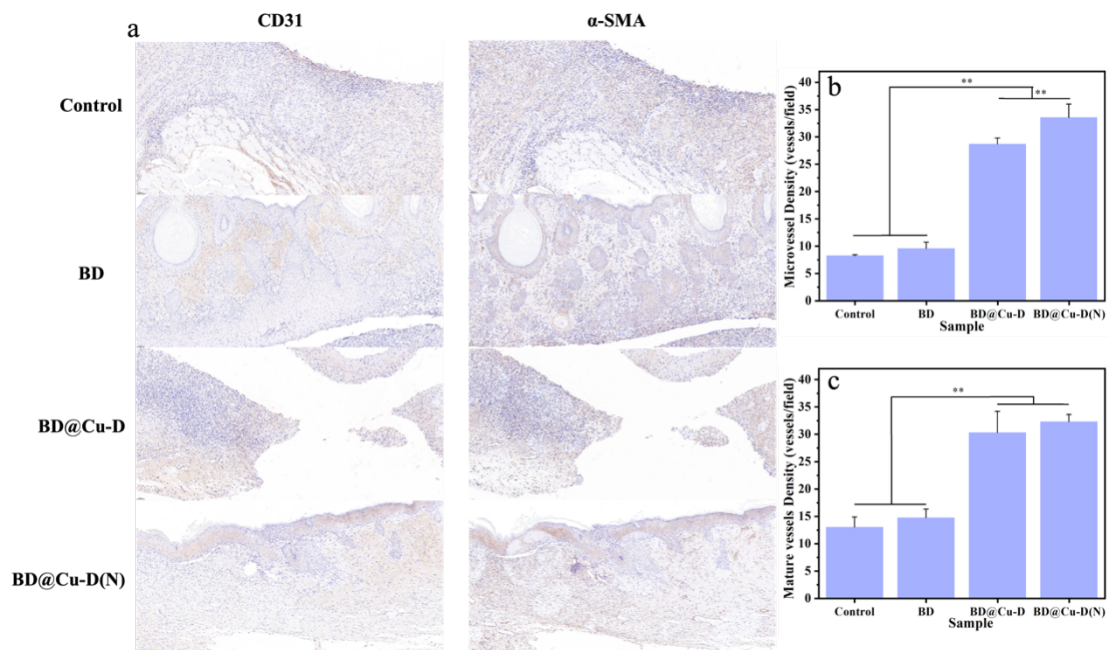


图 3-14 小鼠组织 CD31 和 α -SMA 染色，比例尺=50 μm (a)，微血管视野占比统计 (b)，成熟血管视野占比统计 (c)

Fig. 3-14 Immunofluorescence staining of CD31 and α -SMA in mouse tissue, scale = 50 μm (a), statistical analysis of new blood vessel area ratio (b), statistical analysis of mature blood vessel area ratio (c)

3.4.10.3 酶联免疫吸附实验

利用酶联免疫吸附试验测定细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平，反映材料对伤口愈合的促进作用。

如图 1-15 所示，与对照组相比，BD 的 HIF-1 α 表达升高，从 3.7 ng/mL 增加

到 4 ng/mL，说明 DA 修饰本身能提高细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达。加入 Cu²⁺与 DFO 的 BD@Cu-D 表达进一步提高，表达量达到了 5.8 ng/mL，由于 Cu²⁺能通过模拟缺氧效应，进一步增强 HIF-1 α 蛋白稳定性，而 DFO 通过螯合铁离子，抑制 HIF-1 α 降解，从而协同提升了 HIF-1 α 表达。NIR 照射后的 BD@Cu-D(N)则表现出最高 HIF-1 α 表达，为 6.3 ng/mL，说明光热作用能够增强材料内部 Cu²⁺与 DFO 的释放效率，进一步增强了细胞内 HIF-1 α 的稳定性与表达。

VEGF 表达趋势与 HIF-1 α 类似，BD 相比对照组未显著提高 VEGF 表达水平，仅为 110.2 pg/mL。而 BD@Cu-D 显著提高了 VEGF 的表达，达到 253.4 pg/mL，因为 HIF-1 α 水平的升高，而 HIF-1 α 是 VEGF 表达的重要调控因子。NIR 照射进一步增加了 VEGF 的表达量，使得 VEGF 表达量达到 272.7 pg/mL，说明材料的局部升温加强了促药物释放的能力，进一步增强了细胞的血管生成因子分泌能力。

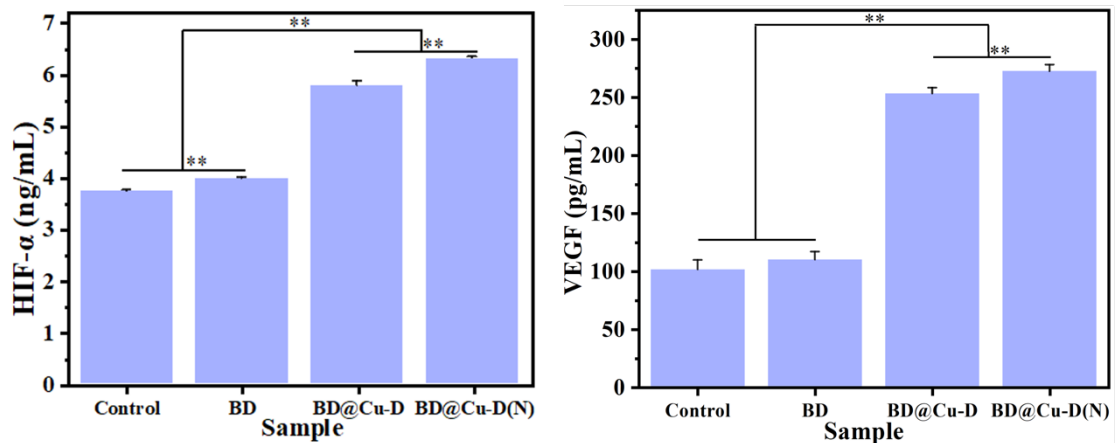


图 3-15 ELISA 检测 HIF-1 α 的蛋白表达 (a)，ELISA 检测 VEGF 的蛋白表达 (b)
Fig. 3-15 ELISA detection of HIF-1 α protein expression (a), ELISA detection of VEGF protein expression (b)

3.5 本章小结

本章制备了一种新型多功能 BC 复合膜，通过原位引入 HA，再羧基活化后接枝 DA，以 Cu²⁺为桥梁络合 DFO，制备具有抗菌、抗氧化及光热治疗作用的复合材料，用于糖尿病慢性伤口的治疗。具体如下：

(1) DA、Cu²⁺及 DFO 浓度优化：以机械性能、溶胀率和细胞毒性为依据，确定最佳 DA 浓度为 10 mg/mL；采用 CCK-8 法确定了 Cu²⁺和 DFO 的安全使用浓度，分别为 15 mmol/L 和 12.5 μ g/mL，既维持了材料的抗菌性能，又确保其良好的细胞相容性。

(2) 材料结构与性能分析：SEM 观察表明，原位引入 HA 使 BC 膜纤维分

布更加均匀, DA 接枝后进一步增强了纤维之间的交联作用, Cu^{2+} 及 DFO 引入则形成更加致密且均匀的结构。FTIR 分析证实, DA 与 BC 膜通过酰胺键成功连接, Cu^{2+} 、DFO 与材料形成明显的络合物, 增强了材料的结构稳定性。XRD 分析发现, 引入 DA、 Cu^{2+} 及 DFO 后, 材料的结晶度明显提高。

(3) 光热性能及药物释放行为研究: 材料在 808 nm NIR 照射下能够迅速升温至 48°C 左右, 并且具备优异的光热稳定性和重复性; 在模拟糖尿病伤口环境下, NIR 照射促进了 Cu^{2+} 和 DFO 的释放, 表明复合材料具备良好的控释及光热响应能力。

(4) 生物相容性与抗菌性能评价: 复合材料对 HUVECs 及 L929 细胞具有良好的生物相容性, 无明显毒性; 材料在 NIR 照射下表现出更高的抑菌率, 尤其对金黄色葡萄球菌表现出 98% 以上的抑制效果, 体现出优异的抗菌活性。

(5) 体内伤口愈合效果评估: 利用糖尿病小鼠伤口模型, 发现复合材料能够显著加速伤口愈合过程, BD@Cu-D(N) 在 14 天内伤口愈合率接近 100%。通过 HE 染色、Masson 染色及 CD31、 α -SMA 免疫染色和 ELISA 进一步证实了复合材料可促进胶原纤维生成、新生血管形成, 并有效降低炎症反应。

综上, 本章开发的原位改性多功能 BC 复合膜, 通过优化改性剂浓度、提升结构性能及光热效应, 实现了对糖尿病慢性伤口的有效治疗, 为进一步的临床应用提供了重要的实验基础和理论支持。

第4章 总结与展望

4.1 总结

本文以解决 BC 低产量、性能差以及功能性单一等问题为目标导向，主要开展了以下三个方面的研究：（1）基于组分优化的 BC 发酵提升 BCP 产量；（2）大分子网络原位改性制备 BC/COS/HA 复合膜，在优化发酵基础之上探究双网络大分子对 BCP 产量、结构和性能的影响；（3）基于 HA 互穿共价交联的 BC/HA 功能性复合膜的构建，通过接支光热响应性材料赋予 BC 新功能，用于糖尿病伤口治疗。总结如下：

（1）系统优化发酵条件，提高了 BCP 的产量和基础性能。通过考察不同氮源、碳源及无机盐的影响，确定了最佳的培养基配方。其中，酵母粉以 20 g/L 浓度作为氮源表现最佳，葡萄糖浓度优化为 100 g/L，磷酸氢二钠 6 g/L、柠檬酸 1 g/L 和硫酸镁 0.5 g/L 的协同加入对 BCP 产量也有明显的提升。此外，发现醇类添加物尤其是乙醇的适量添加显著促进了 BCP 的产量，使 BC 产量达到 6.25 g/L，相比初始状态提高了 607%。这一系列优化措施成功提升了 BC 生产效率，有效解决了现有细菌纤维素生产中成本高和产量低的瓶颈问题。

（2）原位添加双网络大分子对 BC 性能的影响，COS 和 HA 原位添加能够有效提高 BC 的产量和溶胀性能。实验确定了最佳添加时间为发酵 24 h 后，此时细菌进入对数生长期初期，大分子添加对菌体生长和纤维素合成的促进作用最明显。双网络原位添加后，BC 的产量相比未改性提高了 72.7%。同时，尽管机械性能略有降低，但在一定程度上增强了膜的韧性和溶胀性能。这种原位改性策略，确保了功能组分与 BC 纤维网络之间的紧密结合，表现出良好的生物医用材料特性。

（3）在功能性改性方面，本研究创新性地提出了一种适用于糖尿病慢性伤口治疗的功能性敷料的设计，通过原位添加 HA，再共价交联改性 DA，通过负载 Cu^{2+} 和 DFO，制备出一种具备光热响应、抗菌及促愈合功能的 BC 敷料。HA 的引入提供了大量羧基反应位点，使后续 DA 成功接枝； Cu^{2+} 与 DA 络合，赋予材料优异的近红外光热效应，有效灭活病原菌；同时 DFO 负载提供抗氧化及促进血管生成的活性，使敷料在糖尿病伤口治疗中表现出了明显的优势。这种多功能复合敷料在抗菌、血管新生和伤口愈合方面表现突出，有望为糖尿病慢性伤口

的治疗提供新的解决方案。

4.2 展望

本文以解决 BC 低产量、性能差以及功能性单一等问题为目标，尽管本研究取得了积极成果，但是由于时间等因素的限制，论文还有以下局限性和不足，为此，未来将从以下几个方面进一步开展工作

（1）优化产业化规模生产工艺。尽管本研究提高了 BC 的产量，但实验室条件与工业规模发酵工艺存在较大差距。后续研究需关注发酵罐体积放大时的菌种适应性、氧气传输和发酵稳定性问题。同时，进一步降低培养基成本、简化工艺流程。

（2）多学科交叉研究的强化。应更加注重与医学、材料科学、生物技术等交叉学科的紧密合作，如 BC 与其他体系大分子材料有效结合达到新的效果。并且基于实际问题与需求导向，开发更为多样化和适用性更强的 BC 复合材料，实现 BC 材料从基础研究到产业转化的跨越。

（3）功能性改性材料性能与生物安全性的深入评价。虽然本研究已初步证明了复合材料的抗菌性和促愈合性能，但在实际医疗应用中，更全面的生物安全性评估和动物实验仍不可或缺。此外，针对糖尿病伤口敷料，还需进一步优化敷料对伤口愈合微环境的适应性，如精准控制药物释放、强化抗氧化和免疫调节功能。

（4）功能化复合敷料的精准性能调控。本研究通过多功能化策略，制备出具有抗菌、抗氧化、促进血管新生和光热效应的复合敷料。然而，实际应用场景中，患者伤口的个体差异较大，对敷料性能的需求各异。后续研究可进一步探索多功能组分之间的协同效应，利用智能响应材料设计个性化的“可定制”敷料，提升 BC 附加值。

参考文献

- [1] Deng L, Li F, Han Z, etc. Bacterial cellulose-based hydrogel with regulated rehydration and enhanced antibacterial activity for wound healing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267: 131291.
- [2] Bao X, Wu L, Yu Y, etc. A photothermal cellulose-based material for rapid anti-bacteria and HCHO removal via sequential formation of MnO₂ coatings and amine-quinone networks[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 468: 143584.
- [3] Lima N F, Maciel G M, Lima N P, etc. Bacterial cellulose in cosmetic innovation: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 275: 133396.
- [4] Padhan K, Patra R K, Sethi D, etc. Exploitation of cellulose degrading bacteria in bioconversion of agro-wastes[J]. Chemosphere, 2024, 347: 140654.
- [5] Luz E P C G, da Silva T F, Marques L S M, etc. Bacteria-Derived Cellulose Membranes Modified with Graphene Oxide-Silver Nanoparticles for Accelerating Wound Healing[J]. ACS applied bio materials, 2024, 7(8): 5530-5540.
- [6] Meng S, Wu H, Xiao D, etc. Recent advances in bacterial cellulose-based antibacterial composites for infected wound therapy[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 316: 121082.
- [7] Bulkina A, Prilepskii A. Bacterial cellulose: is it really a promising biomedical material[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 357: 123427.
- [8] Tong J, Yu C, Wang Y, etc. Simultaneous use of two-step fermentation and in-situ addition of chitosan oligosaccharide improving bacterial cellulose pellicle in the synthesis and various behaviors[J]. Cellulose, 2024, 31(8): 4967-4987.
- [9] Choi S M, Shin E J. The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications[J]. Nanomaterials, 2020, 10(3): 406.
- [10] Sani A, Dahman Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2010, 85(2): 151-164.
- [11] Li J, Chen G, Zhang R, etc. Production of high crystallinity type-I cellulose from komagataeibacter hansenii JR-02 isolated from kombucha tea[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(1): 108-118.
- [12] Gorgieva S, Trček J. Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications[J]. Nanomaterials, 2019, 9(10): 1352.
- [13] Jozala A F, de Lencastre-Novaes L C, Lopes A M, etc. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100: 2063-2072.
- [14] Amorim J D, Costa A F, Galdino Jr C J, etc. Bacterial cellulose production using fruit residues as substrate to industrial application[J]. Cet Journal-chemical Engineering Transactions, 2019, 74: 1165-1170.
- [15] Pogorelova N, Rogachev E, Digel I, etc. Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties[J]. Materials, 2020, 13(12): 2849.

- [16] Jeirani Khamene A, Yazdian F, Pourmadadi M, etc. Fabrication and characterization of an innovative g-C₃N₄/calcium/aloe vera enriched PVA-bacterial cellulose wound dressing: a novel approach to diabetic wound management[J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2024, 168: 112879.
- [17] Wu Y, Jia D, Lu K, etc. Bacterial cellulose-based dressings with photothermal bactericidal activity and pro-angiogenic ability for infected wound healing[J]. *Journal of Materials Science and Technology*, 2023, 160: 76-85.
- [18] Miranda K W E, Frota M M, Mattos A L A, etc. Eco-friendly bionanocomposite based on a ternary blend reinforced with bacterial cellulose for application in packaging materials[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2025, 48: 101442.
- [19] Zhang G, Yu C, Dong Y, etc. Self-expanding cellulose sponge with enhanced hemostatic ability by tannic acid/metal ion composite coating for highly effective hemostasis of difficult-to-control bleeding wounds[J]. *Biomaterials Advances*, 2025, 166: 214025.
- [20] Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, etc. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 2141-2149.
- [21] 王静, 李彩云, 万怡灶. 电化学储能及传感用细菌纤维素及其复合材料的研究进展[Z]. *复合材料学报*: 2024,41(6): 2745-2760.
- [22] Reiniati I, Hrymak A N, Margaritis A. Kinetics of cell growth and crystalline nanocellulose production by *komagataeibacter xylinus*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 127: 21-31.
- [23] Cheng Z, Yang R, Liu X, etc. Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 234: 8-14.
- [24] Wang J, Tavakoli J, Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—a review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 219: 63-76.
- [25] Gao M, Li J, Bao Z, etc. A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 437.
- [26] Lv X, Yang J, Feng C, etc. Bacterial cellulose-based biomimetic nanofibrous scaffold with muscle cells for hollow organ tissue engineering[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(1): 19-29.
- [27] Wu H, Williams G R, Wu J, etc. Regenerated chitin fibers reinforced with bacterial cellulose nanocrystals as suture biomaterials[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 180: 304-313.
- [28] Khalid A, Khan R, Ul-Islam M, etc. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 164: 214-221.
- [29] Fürsatz M, Skog M, Sivilér P, etc. Functionalization of bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L-lysine[J]. *Biomedical Materials*, 2018, 13(2): 25014.
- [30] Seifert M, Hesse S, Kabrelian V, etc. Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the

- culture medium[J]. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2004, 42(3): 463-470.
- [31] Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72(1): 43-51.
- [32] Rühls P A, Storz F, López Gómez Y A, etc. 3D bacterial cellulose biofilms formed by foam templating[J]. *Biofilms and Microbiomes*, 2018, 4(1): 21.
- [33] Cai Z, Kim J. Preparation and characterization of novel bacterial cellulose/gelatin scaffold for tissue regeneration using bacterial cellulose hydrogel[J]. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 2010, 1(2): 21002.
- [34] Bodin A, Ahrenstedt L, Fink H, etc. Modification of nanocellulose with a xyloglucan–RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: implications for tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(12): 3697-3704.
- [35] Véliz D S, Alam C, Toivola D M, etc. On the non-linear attachment characteristics of blood to bacterial cellulose/kaolin biomaterials[J]. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 2014, 116: 176-182.
- [36] Wang J, Zhao L, Zhang A, etc. Novel bacterial cellulose/gelatin hydrogels as 3D scaffolds for tumor cell culture[J]. *Polymers*, 2018, 10(6): 581.
- [37] Keshk S M, Nada A M. Heterogeneous derivatization of bacterial and plant cellulose[J]. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 2016, 1(1): 39-42.
- [38] Bodin A, Ahrenstedt L, Fink H, etc. Modification of nanocellulose with a xyloglucan–RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: implications for tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(12): 3697-3704.
- [39] Khattak S, Qin X T, Huang L H, etc. Preparation and characterization of antibacterial bacterial cellulose/chitosan hydrogels impregnated with silver sulfadiazine[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 189: 483-493.
- [40] Lin W C, Lien C C, Yeh H J, etc. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94(1): 603-611.
- [41] Markstedt K, Mantas A, Tournier I, etc. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications[J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(5): 1489-1496.
- [42] Andrade F K, Silva J P, Carvalho M, etc. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose[J]. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 2011, 98(4): 554-566.
- [43] Akkus G, Sert M. Diabetic foot ulcers: a devastating complication of diabetes mellitus continues non-stop in spite of new medical treatment modalities[J]. *World Journal of Diabetes*, 2022, 13(12): 1106.
- [44] Hurlow J J, Humphreys G J, Bowling F L, etc. Diabetic foot infection: a critical complication[J]. *International Wound Journal*, 2018, 15(5): 814-821.
- [45] Pouget C, Dunyach-Remy C, Pantel A, etc. Biofilms in diabetic foot ulcers:

- p>significance and clinical relevance[J].
- Microorganisms*
- , 2020, 8(10): 1580.
- [46] Edmonds M, Manu C, Vas P. The current burden of diabetic foot disease[J]. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 2021, 17: 88-93.
- [47] Apelqvist J. Diagnostics and treatment of the diabetic foot[J]. *Endocrine*, 2012, 41(3): 384-397.
- [48] Perez-Favila A, Martinez-Fierro M L, Rodriguez-Lazalde J G, etc. Current therapeutic strategies in diabetic foot ulcers[J]. *Medicina*, 2019, 55(11): 714.
- [49] Erem C, Hacıhasanoğlu A, Çelik Ş, etc. Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications[J]. *Medical Principles and Practice*, 2005, 14(1): 22-30.
- [50] Petkovic M, Sørensen A E, Leal E C, etc. Mechanistic actions of microRNAs in diabetic wound healing[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2228.
- [51] Childs D R, Murthy A S. Overview of wound healing and management[J]. *Surgical Clinics*, 2017, 97(1): 189-207.
- [52] Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, etc. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients[J]. *Diabetologia*, 2002, 45: 1011-1016.
- [53] Soo C. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair-a correction[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2000, 106(1): 236.
- [54] Galiano R D, Tepper O M, Pelo C R, etc. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells[J]. *American Journal of Pathology*, 2004, 164(6): 1935-1947.
- [55] Maione A G, Smith A, Kashpur O, etc. Altered ECM deposition by diabetic foot ulcer-derived fibroblasts implicates fibronectin in chronic wound repair[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2016, 24(4): 630-643.
- [56] Lou J, Xiang Z, Zhu X, etc. Enhanced healing of burn wounds by dressings with alginate: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Regenesi Repair Rehabilitation*, 2025, 1(2): 14-37.
- [57] Agnes C J, Li L, Bertrand D, etc. Assessment of bone regeneration potential for a 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) encapsulated chitosan-based scaffold in a mouse critical sized bone defect model[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 304: 140995.
- [58] Lu D, Cai K, Zeng Z, etc. VEGF loading heparinized hyaluronic acid macroporous hydrogels for enhanced 3D endothelial cell migration and vascularization[J]. *Biomaterials Advances*, 2025, 167: 214094.
- [59] Hai J, Zhang X, Lei Y, etc. 3D printed TC4 titanium alloy bone scaffolds with TNTs-VA-PLGA composite coating on the surface: improved infection resistance and biocompatibility[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2024, 102: 106386.
- [60] Shabestari S M, Jafari S H, Benisi S Z, etc. Role of phosphate-modified cellulose into the scaffold based on poly (glycerol azelaic acid)-co-poly(ϵ -caprolactone) for using bone regenerative medicine[J]. *International Journal of Biological*

- Macromolecules, 2025, 304: 140855.
- [61] Li X, Xiao X, Zhang Y, etc. Microneedles based on hyaluronic acid-polyvinyl alcohol with antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant effects promote diabetic wound healing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137185.
 - [62] Ma C, Du L, Guo Y, etc. A review of polysaccharide hydrogels as materials for skin repair and wound dressing: construction, functionalization and challenges[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 135838.
 - [63] Moradifar F, Sepahdoost N, Tavakoli P, etc. Multi-functional dressings for recovery and screenable treatment of wounds: a review[J]. Heliyon, 2025, 11(1): e41465.
 - [64] Liu M, Chen Y, Zhang Y, etc. Breathable functional aerogel dressings facilitate the healing of diabetic wounds[J]. Biomedical Technology, 2025, 9: 100071.
 - [65] Amoozadeh M, Zarepour A, Khosravi A, etc. MXenes in combination therapy: chemo-photothermal, chemodynamic, and photothermal/photodynamic therapies for cancer treatment and antibacterial applications[J]. Flatchem, 2025: 100849.
 - [66] Gao M, Sun S, Lin H, etc. A multifunctional carbon dot-based nanoplatfom for antibacterial therapy: integrating photodynamic, photothermal, and gas treatments[J]. Chinese Chemical Letters, 2025: 111055.
 - [67] Meng W, Zhang L Y, Chen X T, etc. An NIR-II light-responsive nanoplatfom for photothermal and enhanced photodynamic synergistic therapy toward drug-resistant bacterial infection and hypoxia relief in subcutaneous wound healing[J]. Applied Materials Today, 2023, 32: 101839.
 - [68] Zhang X, Tan B, Wu Y, etc. A review on hydrogels with photothermal effect in wound healing and bone tissue engineering[J]. Polymers, 2021, 13(13): 2100.
 - [69] da S. Ferreira G, da Silva D J, Souza A G, etc. Eco-friendly and effective antimicrobial melaleuca alternifolia essential oil pickering emulsions stabilized with cellulose nanofibrils against bacteria and SARS-CoV-2[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 243: 125228.
 - [70] El Houari A, Carpenter M, Chaplin D, etc. Taxonomic description and genome sequence of anaerorudis cellulovorans gen. Nov. sp. nov., a novel cellulose- and xylan-degrading bacterium of the bacteroidota phylum isolated from a lab-scale methanogenic landfill bioreactor digesting municipal solid waste[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2025, 48(2): 126590.
 - [71] Xu J M, Chen Z T, Cheng F, etc. Exploring a cellulose-immobilized bacteria for self-healing concrete via microbe-induced calcium carbonate precipitation[J]. Journal of Building Engineering, 2024, 95: 110248.
 - [72] Yan C, Chen J, Wan X, etc. Smart bacteria cellulose facial mask for sensing and recovering skin pH[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 306: 141286.
 - [73] Yun Y J, Yoon O J, Son D I, etc. Metal/bacteria cellulose nanofiber bilayer membranes for high-performance hydrovoltaic electric power generation[J]. Nano Energy, 2023, 118: 108934.
 - [74] Khiabani A, Sarabi-Jamab M, Shakeri M sadat, etc. Bacterial cellulose

- biosynthesis: optimization strategy using iranian nabat industry waste[J]. Heliyon, 2024, 10(16): e35986.
- [75] Amin Ojagh S M, Vahabzadeh F, Fallah N, etc. Highly functionalized all-cellulose nanocomposites via bacteria-enabled in-situ modifications[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 498: 155409.
- [76] Ho Jin Y, Lee T, Kim J R, etc. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by gluconacetobacter xylinus[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2019, 75: 158-163.
- [77] Liu G, Zou F, He W, etc. The controlled degradation of bacterial cellulose in simulated physiological environment by immobilization and release of cellulase[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 314: 120906.
- [78] Wang M Z, Lai B M, Dandekar A A, etc. Nitrogen source stabilization of quorum sensing in the pseudomonas aeruginosa bioaugmentation strain SD-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(16): e00870-17.
- [79] El-Gendi H, Taha T H, Ray J B, etc. Recent advances in bacterial cellulose: a low-cost effective production media, optimization strategies and applications[J]. Cellulose, 2022, 29(14): 7495-7533.
- [80] Mizzi L, Maniscalco D, Gaspari S, etc. Assessing the individual microbial inhibitory capacity of different sugars against pathogens commonly found in food systems[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 71(3): 251-258.
- [81] Williams D N, Ehrman S H, Pulliam Holoman T R. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2006, 4(1): 3.
- [82] Sallam K I, Samejima K. Effects of trisodium phosphate and sodium chloride dipping on the microbial quality and shelf life of refrigerated tray-packaged chicken breasts[J]. Food Science and Biotechnology, 2004, 13(4): 425-429.
- [83] Nepal S, Kumar P. Growth, cell division, and gene expression of escherichia coli at elevated concentrations of magnesium sulfate: implications for habitability of europa and Mars[J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 637.
- [84] Graham A F, Lund B M. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of clostridium botulinum[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1986, 61(1): 39-49.
- [85] McNeil B, Harvey L M. Viscous fermentation products[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1993, 13(4): 275-304.
- [86] Liu X, Wang Y, Cheng Z, etc. Nano-sized fibrils dispersed from bacterial cellulose grafted with chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 214: 311-316.
- [87] Yunoki S, Osada Y, Kono H, etc. Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using ¹³C-labeled carbon sources[J]. Food Science and Technology Research - Food Sci Technol Res, 2004, 10: 307-313.
- [88] Zhong C, Ukowitz C, Domig K J, etc. Short-chain cello-oligosaccharides: intensification and scale-up of their enzymatic production and selective growth promotion among probiotic bacteria[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(32): 8557-8567.
- [89] Yin N, Du R, Zhao F, etc. Characterization of antibacterial bacterial cellulose

- p composite membranes modified with chitosan or chitooligosaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115520.
- [90] Rescignano N, Fortunati E, Armentano I, etc. Use of alginate, chitosan and cellulose nanocrystals as emulsion stabilizers in the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2015, 445: 31-39.
- [91] Zhang P, Chen L, Zhang Q, etc. Using in situ dynamic cultures to rapidly biofabricate fabric-reinforced composites of chitosan/bacterial nanocellulose for antibacterial wound dressings[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 260.
- [92] Wang X, Xie Y, Ge H, etc. Physical properties and antioxidant capacity of chitosan/epigallocatechin-3-gallate films reinforced with nano-bacterial cellulose[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 179: 207-220.
- [93] Dai F, Zhuang Q, Huang G, etc. Infrared spectrum characteristics and quantification of OH groups in coal[J]. ACS Omega, 2023, 8(19): 17064-17076.
- [94] Spampinato S F, Caruso G I, De Pasquale R, etc. The treatment of impaired wound healing in diabetes: looking among old drugs[J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(4): 60.
- [95] Zhao X, Shi Y, Yang M, etc. Barnacle-inspired and polyphenol-assisted modification of bacterial cellulose-based wound dressings for promoting infectious wound healing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 279: 135291.
- [96] Rong X, Gao G, Lou J, etc. Double-network hydrogel dressing regulated by cationic polymer-grafted bacterial cellulose for promote rapid healing of infected wounds[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 353: 123257.
- [97] 李瑞赞, 马维. 细菌纤维素用作伤口敷料的研究[J]. 辽宁丝绸, 2024(01): 39-40.
- [98] 王心茹, 张杰, 单金玉, 等. 细菌纤维素基抗菌医用敷料的制备及其在伤口愈合领域的应用[J]. 纺织科学研究, 2024(10): 29-37.
- [99] Badir A, Refki S, Sekkat Z. Utilizing gold nanoparticles in plasmonic photothermal therapy for cancer treatment[J]. Heliyon, 2025, 11(4): e42738.
- [100] Wang S, Zhao X, Zhang L, etc. A light-responsive multifunctional composite hydrogel for synergistically photodynamic/photothermal enhanced chemodynamic and electrical stimulation therapy of wound infection[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 504: 158714.
- [101] Chen L, Wu X, Li D, etc. Magnesium alloy implant with photothermal-enhanced ferroptosis towards a multimodal therapy strategy for osteosarcoma[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 509: 161350.
- [102] Hou Z, Nie C, Si Z, etc. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2013, 101(1): 62-71.
- [103] Aneesha V A, Qayoom A, Anagha S, etc. Topical bilirubin-deferoxamine hastens excisional wound healing by modulating inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and collagen deposition in diabetic rats[J]. Journal of Tissue Viability, 2022, 31(3): 474-484.

- [104] Cui J, Shi J, Liu Y, etc. Engineered hydrogel platform for diabetic wound healing[J]. Chemical Engineering Journal, 2025, 507: 160379.
- [105] Yang H, Wang Y, Li R, etc. A 3D-printed grid-like hyaluronic acid based hydrogel loaded with deferoxamine as wound dressing promotes diabetic wound healing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 303: 140598.
- [106] 沈佳斌, 朱怡蓉, 杨金花, 等. 高性能慢性伤口敷料的研究进展[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2025(48): 143-153.
- [107] 伍静, 杨宽, 颜晓燕, 等. 天然多糖基自愈水凝胶在糖尿病伤口治疗中的应用[J]. 高分子通报 2025, 38(3): 1-20.
- [108] Geng C, Jiang Y, Bian H, etc. Selective gas-permeation films with nano MOFs as gas “switches” for mango preservation[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 481: 148757.
- [109] Deng L, Huang Y, Chen S, etc. Bacterial cellulose-based hydrogel with antibacterial activity and vascularization for wound healing[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 308: 120647.
- [110] Miao L J, Xin J W, Shen Z Y, etc. Exploring a new rapid colorimetric detection method of Cu^{2+} with high sensitivity and selectivity[J]. Sensors and Actuators, B: Chemical, 2013, 176: 906-912.
- [111] Kim D, Lee S, Bae Y. Colorectal cancer cells differentially impact migration and microRNA expression in endothelial cells[J]. Oncology Letters, 2019, 18(6): 6361-6370.
- [112] Haase H, Jordan L, Keitel L, etc. Comparison of methods for determining the effectiveness of antibacterial functionalized textiles[J]. PLOS One, 2017, 12(11): 0188304.
- [113] Zhu Y, Zhou W, Xiang J, etc. Deferoxamine-loaded janus electrospun nanofiber dressing with spatially designed structure for diabetic wound healing[J]. Materials & Design, 2023, 233: 112166.
- [114] Ren S, Chen J, Duscher D, etc. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10(1): 47.
- [115] Butler J E. Enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Immunoassay, 2000, 21(2-3): 165-209.
- [116] Liu Y, Su C, Zu Y, etc. Ultrafast deposition of polydopamine for high-performance fiber-reinforced high-temperature ceramic composites[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 20489.
- [117] Wang D, Wang Q, Lin Z, etc. Effect of pH and concentration of dopamine solution on the deposited polydopamine film and the prepared graphene-like material[J]. Crystals, 2023, 13(4): 607.
- [118] Zhong W G, Xin M L, Wang D, etc. Study on in-situ modification of polydopamine on glass fibers and its effect on shrinkage performance of cement materials[J]. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2020, 770(1): 12102.
- [119] Salah I, Parkin I P, Allan E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances[J]. RSC Advances, 2021, 11(30): 18179-18186.

- [120] Apak R, Güçlü K, Özyürek M, etc. Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts[M]. Armstrong D. Advanced Protocols in Oxidative Stress I: Vol. 477. Totowa, NJ: Humana Press, 2008: 163-193.
- [121] Borkow G. Using copper to improve the well-being of the skin[J]. Current Chemical Biology, 2015, 8(2): 89-102.
- [122] Charbon G, Klitgaard R N, Liboriussen C D, etc. Iron chelation increases the tolerance of escherichia coli to hyper-replication stress[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10550.
- [123] Wilson B R, Bogdan A R, Miyazawa M, etc. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential[J]. Trends in Molecular Medicine, 2016, 22(12): 1077-1090.
- [124] Rajamani L, Srinivasan M, Sim C P C. Oxidative polymerization of dopamine: a high-definition multifunctional coatings for electrospun nanofibers-an overview[M]. Chandra Yeniseti S C. Dopamine - Health and Disease. Rijeka: Intech Open, 2018.
- [125] Velez-Pardo C. Manganese and copper promote the binding of dopamine to “serotonin binding proteins” in bovine frontal cortex[J]. Neurochemistry International, 1995, 26(6): 615-622.
- [126] Asemani M, Rabbani A R. Detailed FTIR spectroscopy characterization of crude oil extracted asphaltenes: curve resolve of overlapping bands[J]. Journal of Petroleum Science & Engineering, 2020, 185: 106618.
- [127] Ul-Islam M, Khan T, Park J K. Nanoreinforced bacterial cellulose—montmorillonite composites for biomedical applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(4): 1189-1197.
- [128] Gopu G, Govindan S. Production of bacterial cellulose from komagataeibacter saccharivorans strain BC1 isolated from rotten green grapes[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(9): 842-852.
- [129] Xu S, Xu S, Ge X, etc. Low-cost and highly efficient production of bacterial cellulose from sweet potato residues: optimization, characterization, and application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 196: 172-179.
- [130] Zhang P, Chen L, Zhang Q, etc. Using In situ dynamic cultures to rapidly biofabricate fabric-reinforced composites of chitosan/bacterial nanocellulose for antibacterial wound dressings[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7 (2016): 260.
- [131] Wu Y, Zhao S, Wang J, etc. Methods for determining the structure and physicochemical properties of hyaluronic acid and its derivatives: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137603.
- [132] Petit N, Chang Y yin J, Lobianco F A, etc. Hyaluronic acid as a versatile building block for the development of biofunctional hydrogels: In vitro models and preclinical innovations[J]. Materials Today Bio, 2025, 31: 101596.
- [133] Garvey C J, Parker I H, Simon G P. On the interpretation of X-ray diffraction powder patterns in terms of the nanostructure of cellulose fibers[J]. Macromolecular Chemistry and Physics, 2005, 206(15): 1568-1575.

- [134] Nam S, French A D, Condon B D, etc. Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 135: 1-9.
- [135] Yu C, Han Z, Sun H, etc. Balancing mechanical property and swelling behavior of bacterial cellulose film by in-situ adding chitosan oligosaccharide and covalent crosslinking with γ -PGA[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 267: 131280.
- [136] Ng H M, Saidi N M, Omar F S, etc. Thermogravimetric analysis of polymers[M]. Mark H F. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 3rd ed. Wiley, 2018: 1-29.
- [137] Kumar V, Sharma D K, Sandhu P P, etc. Sustainable process for the production of cellulose by an acetobacter pasteurianus RSV-4 (MTCC 25117) on whey medium[J]. Cellulose, 2021, 28(1): 103-116.
- [138] Nilsson R, Olsson M, Westman G, etc. Screening of hydrogen bonds in modified cellulose acetates with alkyl chain substitutions[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 285: 119188.
- [139] Han Z, Wang M, Hu Z, etc. Tracking the enzyme-response mechanism of tannic acid-embedded chitosan/ γ -polyglutamic acid hydrogel[J]. Communications Materials, 2024, 5(1): 137.
- [140] Wang J, Guo H, Shi X, etc. Fast polydopamine coating on reverse osmosis membrane: process investigation and membrane performance study[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2019, 535: 239-244.
- [141] Fang S, Zhong Y, Wu J, etc. A comparative analysis of the water retention properties of hydrogels prepared from melon and orange peels in soils[J]. Gels, 2024, 11(1): 8.
- [142] Gounden V, Singh M. Hydrogels and wound healing: current and future prospects[J]. Gels, 2024, 10(1): 43.
- [143] Zhang P, Whistler R L. Mechanical properties and water vapor permeability of thin film from corn hull arabinoxylan[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2004, 93(6): 2896-2902.
- [144] Xie M, Gong T, Wang Y, etc. Advancements in photothermal therapy using near-infrared light for bone tumors[J]. International journal of molecular sciences, 2024, 25(8): 4139.
- [145] Tian Y, Younis M R, Tang Y, etc. Dye-loaded mesoporous polydopamine nanoparticles for multimodal tumor theranostics with enhanced immunogenic cell death[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 365.
- [146] Zhang H, Tian S, Li M, etc. Novel donor-acceptor conjugated polymer-based nanomicelles for photothermal therapy in the NIR window[J]. Biomacromolecules, 2022, 23(8): 3243-3256.
- [147] Pan Y, Chu L, Liu J, etc. Precise control of copper-localized surface plasmon resonance in the near infrared region for enhancement of up-conversion luminescence[J]. Metals, 2020, 10(5): 628.
- [148] 施芳婷, 沈佳琪, 仵敏娟. 糖尿病难愈性创面的发病机制研究进展[J]. 生命科学, 2024(36): 509-516.

- [149] Vallero D A. Air pollution calculations: quantifying pollutant formation, transport, transformation, fate and risks[M]. Second edition. Amsterdam Kidlington, Oxford Cambridge, MA: Elsevier, 2024.
- [150] Velasquez J, Wray A A. Deferoxamine[M]. Statpearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.
- [151] Liu H, Qu X, Tan H, etc. Role of polydopamine redox-activity on its pro-oxidant, radical-scavenging, and antimicrobial activities[J]. Acta Biomaterialia, 2019, 88: 181-196.
- [152] Clayton S M, Shafikhani S H, Soulika A M. Macrophage and neutrophil dysfunction in diabetic wounds[J]. Advances in Wound Care, 2024, 13(9): 463-484.
- [153] Ma X, Zhou S, Xu X, etc. Copper-containing nanoparticles: mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review[J]. Frontiers in Surgery, 2022, 9: 905892.
- [154] Chen X, Cai Q, Liang R, etc. Copper homeostasis and copper-induced cell death in the pathogenesis of cardiovascular disease and therapeutic strategies[J]. Cell Death and Disease, 2023, 14(2): 105.
- [155] Shen H, Ma Y, Qiao Y, etc. Application of deferoxamine in tissue regeneration attributed to promoted angiogenesis[J]. Molecules, 2024, 29(9): 2050.
- [156] Yin X, Wei Y, Qin H, etc. Oxygen tension regulating hydrogels for vascularization and osteogenesis via sequential activation of HIF-1 α and ERK1/2 signaling pathways in bone regeneration[J]. Biomaterials Advances, 2024, 161: 213893.
- [157] Cai J, Liu S, Zhong Q, etc. Multifunctional PDA/ZIF8 based hydrogel dressing modulates the microenvironment to accelerate chronic wound healing by ROS scavenging and macrophage polarization[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 487: 150632.
- [158] Singh A, Wilson J W, Schofield C J, etc. Hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an in-vitro ischaemia model[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1597.
- [159] Tsai J L, Lee Y M, Pan C Y, etc. The novel VEGF121-VEGF165 fusion attenuates angiogenesis and drug resistance via targeting VEGFR2-HIF-1 α -VEGF165/lon signaling through PI3K-AKT-mTOR pathway[J]. Current Cancer Drug Targets, 2016, 16: 275-286.
- [160] Gardeazabal L, Izeta A. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing[J]. Experimental Dermatology, 2024, 33(3): 15052.
- [161] Liu L, Shi G P. CD31: beyond a marker for endothelial cells[J]. Cardiovascular Research, 2012, 94(1): 3-5.
- [162] Anggorowati N, Kurniasari C R, Damayanti K, etc. Histochemical and immunohistochemical study of α -SMA, collagen, and PCNA in epithelial ovarian neoplasm[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017, 18(3): 667.

在校期间发表论文、专利情况

论文

- [1] **Tong J**, Yu C, Wang Y, etc. Simultaneous use of two-step fermentation and in-situ addition of chitosan oligosaccharide improving bacterial cellulose pellicle in the synthesis and various behaviors. *Cellulose*, 2024, 31(8).
- [2] Wang Y, **Tong J**, Wang T, etc. Combined use of steam explosion, alkali, and microbial methods improving the yield, structure and properties of soluble dietary fiber from bamboo shoot shells. *Food Chemistry*, 2025, 471.
- [3] Han Z, Wang M, Hu Z, **Tong J**, etc. Tracking the enzyme-response mechanism of tannic acid-embedded chitosan/ γ -polyglutamic acid hydrogel. *Communications Materials*, 2024, 5(1): 137.
- [4] Yu C, Han Z, Sun H, **Tong J**, etc. Balancing mechanical property and swelling behavior of bacterial cellulose film by in-situ adding chitosan oligosaccharide and covalent crosslinking with γ -PGA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 267.
- [5] Liu D, Han Z, Hu Z, **Tong J**, etc. Comparative analysis of the transcriptome of *Bacillus subtilis* natto incubated in different substrates for nattokinase production. *Process biochemistry*, 2023, 129:30-43.

专利

- [1] 聂光军, **童杰**, 陈思雨. 一种壳寡糖/透明质酸 3D 网络改性细菌纤维素膜及其制备方法. (实审中)
- [2] 聂光军, 余晨锐, 岳文瑾, **童杰**, 等. 一种细菌纤维素/壳寡糖/ γ -聚谷氨酸复合膜及其制备方法和应用. (已授权)

致谢

站在学生生涯的尾声，回望过去二十余载的求学之路，心中百感交集。从年少时的懵懂好奇，到如今能够独立思考、开展科研工作，这一路走来，有挑战有困惑，也有成长与收获，既有艰辛跋涉的汗水，也有拨云见日的欣喜。回首这段旅程，心中涌动着太多的感激与感恩，纵然千言万语，不知从何说起。

首先，感谢我的硕士导师——聂光军教授。本论文的研究工作，从课题的选定、实验方案的实施，到论文的撰写与完善，都是在聂老师的悉心指导下完成的。硕士期间，聂老师不仅在学术上倾囊相授，在生活上也给予无微不至的关怀。他的点拨，使我在科研的道路上学会了如何深入思考；他的言传身教，让我深刻体会到学术的严谨与求真的态度，也让我在学问之外，对生活有了更深刻的理解。在此，谨向聂老师表达最深的敬意和最诚挚的感谢。

同时，我要感谢我的父母和亲人。他们给予我无条件地支持，让我在求学的道路上能够坚定前行。求学的岁月，或有迷茫，或有困顿，但因为他们的默默守护，我始终未曾停下脚步。正是这份无私的爱，让我能够心无旁骛地探索知识的边界，勇敢迎接每一次挑战。

此外，我还要感谢求学过程中给予我帮助和指导的每一位老师与同门。感谢薛正莲老师、赵世光老师、钱森和老师、唐红进老师、王洲老师、李闯老师，在论文开题及中期检查阶段给予的宝贵建议，让我的研究更加完善。感谢我的师兄韩振兴、师姐胡紫微、师姐余晨锐，在科研的道路上给予悉心指导与支持。感谢我的同门王雨，三年同窗，携手共进，彼此鼓励。也感谢师妹马若彤、师弟王汀、师妹程思雨，科研上的相互扶持，生活中的点滴关怀，都是这段岁月里温暖的印记。

最后，感谢论文评阅人及答辩委员会的各位专家，感谢你们在百忙之中审阅我的论文，提出宝贵的意见，使我的研究更加完善和深入。