

# 细菌纳米纤维素/壳聚糖微球复合膜的制备及评价

吴雯<sup>1</sup>, 陈琳<sup>1</sup>, 洪枫<sup>1,2\*</sup>

(1. 东华大学 生物与医学工程学院 微生物工程与医学材料研究组, 上海 201620;

2. 国家先进功能纤维创新中心, 江苏 苏州 215000)

**摘要:**以细菌纳米纤维素(BNC)膜为基底,在三聚磷酸钠(TPP)的存在下,通过离子凝胶法让壳聚糖(CS)分子在BNC网络内部形成微球(CSMS),获得BNC/CSMS复合膜,并对材料的理化性能和生物活性进行测试。结果表明:1.0%的TPP与1.0%或者1.5%的CS的浓度组合下,微球形态明显且分布均匀,粒径约40 nm;CS浓度增加提高了复合膜的力学和抗菌性能;0.5%和1.0%的CS制得材料更有助于细胞增殖;材料植入大鼠皮下后,无严重炎症反应,且促进细胞附着和细胞外基质重塑,证明其组织相容性良好,在伤口敷料上有很好的应用前景。

**关键词:**细菌纳米纤维素;壳聚糖微球;离子凝胶法;伤口敷料

中图分类号: R318.08 文献标识码: A 文章编号: 1004-8405(2023)03-0001-06 DOI: 10.16561/j.cnki.xws.2023.03.01

创面修复是医疗领域需要解决的一大问题。因外力导致的皮肤撕裂是造成皮肤创面的主要原因,其愈合是一个漫长而复杂的过程,包括止血、炎症、增殖和重塑四个阶段<sup>[1]</sup>。皮肤创面的裸露可能会造成感染,导致伤口进一步恶化,因此采取适当的干预措施来加速伤口愈合是十分必要的。应用伤口敷料封闭创面,可为伤口提供一个适宜愈合的环境。理想的伤口敷料应具备如下条件:具抗菌活性;能维持湿性环境;更换敷料时避免二次创伤;利于气体交换;可促进自溶清创;能促进肉芽组织的产生和组织愈合过程,以及疤痕形成最小化<sup>[2-3]</sup>。目前市面上已有大量不同类型的伤口敷料,例如纱布、水凝胶敷料和泡沫敷料等。但能够同时满足以上条件的较少,距离理想敷料尚有较大差距<sup>[4]</sup>。

细菌纳米纤维素(Bacterial nanocellulose, BNC)具有良好的生物相容性、力学性能和透汽性,且可以阻隔微生物侵入,被国内外学者公认为是用于治疗皮肤创伤的理想材料<sup>[5]</sup>。但由于其不具有抗氧化性、抗菌性等,限制了进一步的发展<sup>[6]</sup>。壳聚糖(Chitosan, CS)是一种天然碱性多糖,具生物可降解、抑菌、止血、促愈和防止疤痕形成等生理活性<sup>[7-8]</sup>。CS已被广泛用于开发药物递送系统,特别是以壳聚糖微球(Chitosan microspheres, CSMS)的形式用于提高难溶性药物的溶出率和药物的靶向运输<sup>[9]</sup>。制备CSMS的方法有很多,目前常用的主要有乳液交联法、凝聚沉淀法、喷雾干燥法、离子凝胶法等<sup>[7,10-11]</sup>。其中,CS与三聚磷酸钠(Sodium triphosphate, TPP)可通过离子凝胶法制备CSMS,该方法操作简单又避免了有毒交联剂的使用<sup>[12]</sup>。

细菌纳米纤维素/壳聚糖(BNC/CS)复合材料已有许多报道,BNC可作为材料的基底和支撑,而CS赋予了材料多重生物活性,BNC/CS复合材料在多孔支架<sup>[13]</sup>、人工血管<sup>[14]</sup>、抗菌膜<sup>[15]</sup>等领域都有大量研究成果,特别是CS的抗菌和止血及BNC的保湿和细胞支持的特性组合对于伤口敷料的应用具有重要意义。本文借助离子凝胶法,以BNC的纳米纤维网络为分散相,通过将浸渍了CS水溶液的BNC水凝胶膜置于TPP溶液中,制备了BNC/CSMS复合膜;探究了不同CS浓度对于材料的微观形貌、力学性能、抗菌性能的影响,并在此基础上进一步评估了该材料的细胞相容性和组织相容性,为该材料用于伤口敷料和创面药物递送系统提供新思路。

## 1 实验

### 1.1 菌种与化学试剂

木醋杆菌 DHU-ATCC-1, 东华大学微生物工程与医学材料研究组保藏菌; 小鼠皮肤成纤维细胞(L929), 中科院上海细胞库; 葡萄糖、胰蛋白胍、酵母粉、氢氧化钠、无水乙醇、冰醋酸、氯化钠、琼脂粉、叔丁醇, 购自国药集团化学试剂有限公司; 壳聚糖(粘度 50~200 mPa·s, 分子量 50 000, 脱乙酰度 80%~90%), 罗恩试剂; 三聚磷酸钠, 购自生工生物工程股份有限公司; 多聚甲醛, 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胎牛血清、DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶, Adamas life; CCK-8 溶液, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 钙黄绿素, 购自上海翌圣生物科技有限公司。舒泰<sup>®</sup> 50, SD 大鼠(体重 200~250 g), 上海千崖康药生

收稿日期: 2023-05-04

基金项目: 国家先进功能纤维创新中心重点项目(HX105210640); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2021GXJS025)。

作者简介: 吴雯(1997~), 女, 安徽黄山人, 硕士研究生; 研究方向: 止血抗菌医用材料的制备及表征。

\* 通讯作者: 洪枫(1970~), 男, 教授; 研究方向: 细菌纤维素的低成本制备及其高值应用。fhong@dhu.edu.cn

http://xwsk.cbpt.cnki.net/WKC/WebPublication/index.aspx?mid=xwsk

物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养基的准备及溶液的预处理

实验中需用到的培养基按如下配比进行配制:

木醋杆菌培养基: 酵母粉 3 g/L, 胰蛋白胨 5 g/L, 葡萄糖 40 g/L, pH5.0

LB 培养基: 氯化钠 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, pH7.0

琼脂培养基: 氯化钠 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 琼脂粉 28 g/L, pH7.0

细胞完全培养基: 1%青霉素-链霉素溶液, 10%胎牛血清, 89% DMEM 高糖培养基

实验过程中需用到溶液的配制和预处理:

CS 溶液: 称取壳聚糖粉末溶解于 0.1 M 醋酸水溶液中, 并置于高压灭菌锅中 121℃处理 20 min, 高温可打断 CS 的分子长链, 得到低分子量和低粘度的 CS 溶液。

TPP 溶液: 称取三聚磷酸钠颗粒溶解于去离子水中, 可获得 TPP 溶液。

### 1.2.2 BNC 的制备和纯化

采用浅盘静态培养法<sup>[16]</sup>制备 BNC 膜。取 DHU-ATCC-1 菌种, 接种于含 100 mL 木醋杆菌培养基的切口瓶中, 30℃静置培养 3 天。剪下一块菌膜至含 600 mL 培养基的摇瓶中, 30℃、160 r/min 振荡培养 3 h。将规格为 37.5 cm×27 cm×5.6 cm 的浅盘灭菌并烘干, 向其中倒入 600 mL 培养基和 600 mL 菌悬液, 将浅盘置于隔水式恒温培养箱中 30℃静置培养 3 天。培养结束后, 取出 BNC 膜浸入 1%(w/V) NaOH 溶液中煮沸 2 h, 然后换成去离子水煮沸 2 h, 重复循环 3 次即可获得纯 BNC 膜<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 BNC/CSMS 复合膜的制备

将 BNC 膜在 0.1 MPa 真空度下抽滤 5 s 后分别加入 0.5%~2.0%的 CS 溶液抽滤 1 min, 结束后将膜置于 CS 溶液中吸水恢复厚度。取出膜后, 分别放入 0.5%和 1.0%浓度的 TPP 溶液中, 静置 20 min 后取出, 用去离子水反复清洗, 放入 4℃冰箱保存备用。复合膜根据壳聚糖的浓度命名, 分别为 0.5%BNC/CSMS、1.0%BNC/CSMS、1.5%BNC/CSMS、2.0%BNC/CSMS。

### 1.2.4 样品外观及微观结构观察

拍摄 BNC、BNC/CSMS 的外观照片, 比较样品间的宏观形态差异。将 BNC 和 BNC/CSMS 经液氮充分冷冻后放入真空冷冻干燥机 (LYOQUEST-55, Telstar) 中冻干 60 h。用导电胶将冻干样品固定在样品台上, 喷金后使用场发射扫描电镜 (S-4800,

HITACHI) 拍摄内部纤维结构, 随机取 50 根纤维使用 ImageJ 2.0 统计微球直径。

### 1.2.5 红外光谱测定

将 BNC、BNC/CSMS 冻干后, 使用全反射傅里叶红外光谱仪 (Nicolet 6700, Thermo Fisher) 在 400~4000 cm<sup>-1</sup> 的波长范围内扫描, 根据结果分析样品所含的化学官能团情况。

### 1.2.6 复合膜的力学性能测试

将制备的 BNC、BNC/CSMS 用模具裁剪成条状, 使用万能材料测试机 (HY-0580, 上海衡翼精密仪器有限公司) 测试样品的机械性能。在室温条件下, 使用 50 N 的传感器以 10 mm/min 的速度拉伸样品。样品完全断裂后停止拉伸自动返回。测试参数包括应力-应变曲线、杨氏模量、断裂伸长率和拉伸强度。

### 1.2.7 复合膜的抗菌性能测试

参照国家标准《GB/T 20944.2-2007》对材料的抗菌性能进行测试。

试验菌选用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coil*)。样品灭菌后用 0.01 MPBS 清洗, 将菌液滴加在样品表面, 使细菌与样品充分接触, 25℃孵育 18 h 后, 将样品洗脱并稀释涂布在细菌琼脂培养基上, 37℃培养 24 h, 抑菌率通过公式 (1) 计算。

$$R / \% = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

其中,  $R$  代表抑菌率(%),  $C_0$  为对照组菌落数,  $C_1$  为样品组菌落数。

### 1.2.8 复合膜的细胞相容性评估

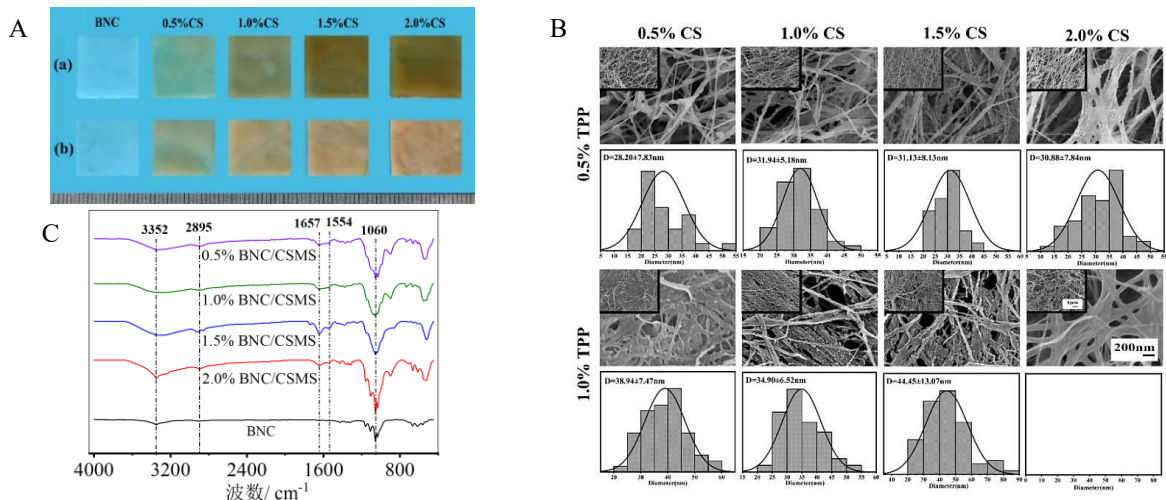
选用小鼠皮肤成纤维细胞 (L929) 用于测试。复合膜样品加入细胞培养基浸提 24 h, 收集浸提液待用。取生长状态良好的细胞, 用胰酶消化后获得细胞悬液, 将细胞稀释至  $2 \times 10^4$  个/mL, 向孔板中每孔加入 0.5 mL 细胞悬液, 置于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的环境中培养 24 h, 将培养基换成各样品浸提液, 隔天更换一次浸提液。CCK-8 实验: 到达培养时间后, 向每孔加入稀释的 CCK-8 溶液, 37℃孵育 1.5 h, 使用酶标仪 (1510, Thermo) 测定 450 nm 处吸光度, 全程避光, 第 2、3 天的操作相同。钙黄绿素染色: 到达培养时间后, 每孔加入 400 μL 稀释的钙黄绿素溶液, 37℃孵育 0.5 h, 充分漂洗后用荧光显微镜 (BX53, Olympus) 拍摄荧光照片。细胞固定: 将细胞直接种在材料表面, 培养 3 天后, 加入多聚甲醛固定 4 h。清洗后用 25%、50%、75%、95%、100% 的乙醇依次脱水, 每次 15 min, 最后用叔丁醇置换 3 次, 每次 15 min。-80℃冷冻过夜, 冷冻干燥后用场发射扫描电镜观察。

### 1.2.9 大鼠皮下包埋

舒泰<sup>®</sup> 50 按 1 mL/kg 体重肌肉注射麻醉大鼠; 背部去皮, 用碘伏消毒; 用手术刀片于背部造成切口, 使用弯剪制包埋袋后, 将灭菌后的试样植入包埋袋中, 利用 3-0 带针缝合线缝合伤口。分别在第 3 天、第 14 天实验终点, 将大鼠处死, 将材料及周围组织取出, 用无菌生理盐水冲洗, 拍照, 固定, 进行 HE 染色和 Masson 染色, 用显微镜观察切片。

### 1.2.10 数据分析

实验数据用 Excel 2019 进行统计和汇总。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行单因素 ANOVA 分析, 用最小显著差异法 (LSD) 进行各组显著性差异的比较,  $\alpha$  值设为 0.05, 即在  $P=0.05$  的水平上进行比较。用 Origin 2018 对数据进行绘图, 显示平均值和标准差, 组间显著性差异采用字母法标记。a、b、c、d、e 等字母表示组平均值的大小从高到底, 当两组间  $P$  值  $<0.05$  时, 表示差异具有统计学意义, 两组的标记不会有字母重叠; 当  $P$  值  $>0.05$  时, 表示差异不具有统计学意义, 两组的标记含相同字母。



A. 样品外观图 (a 为成球前, b 为成球后); B. 样品的微观形貌和粒径分布图; C. 不同样品的红外光谱

图 1 BNC/CSMS 的形貌和化学结构

### 2.2 红外光谱图分析

图 1C 为 BNC 和 BNC/CSMS 的红外光谱图, 其差异反映出不同样品所含官能团的差别。由于所有样品都以 BNC 为基底, 因此都含有  $3352\text{ cm}^{-1}$  处的 O-H 吸收峰,  $2895\text{ cm}^{-1}$  处的  $-\text{CH}_2$  吸收峰和  $1060\text{ cm}^{-1}$  处的 C-O 吸收峰。而 BNC/CSMS 样品中还出现了  $1657\text{ cm}^{-1}$  处的 C=O 吸收峰和  $1554\text{ cm}^{-1}$  处的 N-H 吸收峰, 这两种峰是 CS 的特征峰, 证明 CS 分子成功进入了 BNC 基质中。

### 2.3 力学性能分析

各样品的应力-应变曲线、杨氏模量、抗拉强

## 2 结果及讨论

### 2.1 样品的外观及微观结构

图 1A 展示了 BNC 及四种不同浓度 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%) 的 CS 溶液制备的 BNC/CSMS 的外观形貌图。由图可见, 纯 BNC 光滑透明, 呈乳白色; 通过负压使 CS 进入 BNC 膜后, 膜呈现出 CS 溶液的棕黄色, 且颜色随着 CS 溶液浓度的增加而加深。未放入 TPP 溶液前, 膜呈透明状, 浸入 TPP 溶液后, 膜转变为不透明状, 证明 CS 与 TPP 在 BNC 内部发生了反应。

图 1B 为 BNC/CSMS 的电镜图。由图可知, CS 与 TPP 形成的微球分散在 BNC 纤维上。CS 和 TPP 的浓度都会对微球的形态和大小产生影响。随着 CS 浓度的升高, 微球数量明显增多, 形态逐渐明显, 在粒径上略有增加。随着 TPP 浓度升高, 微球的形状更加清晰, 粒径从  $30\text{ nm}$  左右增加至  $40\text{ nm}$ 。当 CS 和 TPP 都为低浓度时成球较少; 都为 2% 浓度时, 可见纤维直径明显加粗, 但观察不到微球的形态, 因此无法进行微球粒径统计。当 TPP 浓度为 1.0% 且 CS 浓度为 1.0% 和 1.5% 时, 微球呈现出最好的形态, 且分布均匀, 粒径在  $40\text{ nm}$  左右。

度和断裂伸长率如图 2 所示。杨氏模量可衡量物体抵抗形变的能力, CSMS 的引入显著增大了 BNC 的杨氏模量, 且与 CS 浓度正相关; 而在抗拉强度上, 样品间的区别较小, 只有当 CS 的浓度增大至 2% 才与 BNC 产生显著性差异; 从断裂伸长率可以看出, 低浓度 CSMS 的引入增大了 BNC 的弹性, 使其延伸的长度加长, 但随后 CS 浓度与材料的断裂伸长率成负相关, CS 浓度越高, 材料弹性越差。总的来说, BNC/CSMS 比 BNC 具更好的力学性能, 且这种性能随着 CS 浓度的提高而增强。

纯 BNC 是结构疏松的纳米纤维网状结构, 其

杨氏模量、抗拉强度及断裂伸长率都相对较低。BNC 作为材料的主要骨架,与 CS 化学结构相似,都含有大量氢键,两者复合时可通过氢键结合增大界面强度,从而赋予材料韧性,增强力学性能。同时 CS 可填补 BNC 纤维间的空隙,使 BNC 含水率减少,CS 浓度增加可增大粒径,浓度为 2% 时,微球在纤维表面呈膜状,这也是造成机械性能提高的

原因之一。在断裂伸长率上,由于 CS 分子中含有许多六元环,刚性较大,呈现出脆性,断裂的过程中 BNC 卷曲的纤维被拉长直至断裂,当少量的 CS 复合时,使其纤维加粗,不易被拉断,因此延伸长度略有增加,而当 CS 浓度升高后,其刚性更为明显,导致材料的延伸率下降。

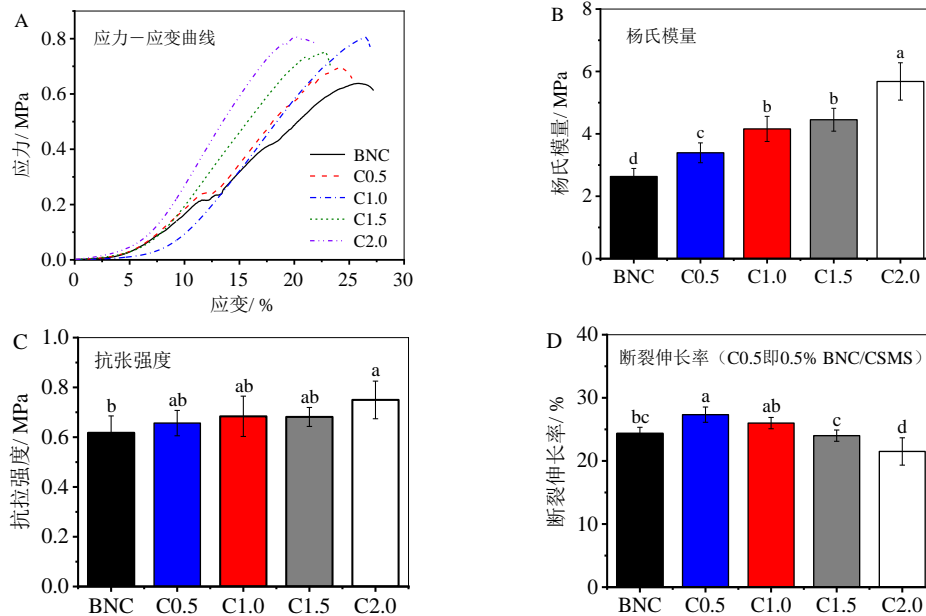


图2 BNC/CSMS 的力学性能

#### 2.4 抗菌性能分析

图 3 显示了样品的抗菌性能。创面敷料需要一定的抗菌性能来保证伤口表面免受感染或使已感染的创面症状减轻。实验结果 (A) 显示,CS 的引入增强了 BNC 的抗菌性能。随着 CS 浓度的增加,样品的抑菌率也在增加,当 CS 浓度为 0.5% 时,样品

对两种菌的抑菌率在 60% 左右,但当 CS 浓度为 2.0% 时,抑菌率均达到了 98% 以上,从样品洗脱稀释后涂布形成的菌落图 (B) 也可以看出,随着 CS 浓度的增加,样品上存活的菌越少。结果表明,该材料的抗菌性能良好,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有一定的抑制作用。

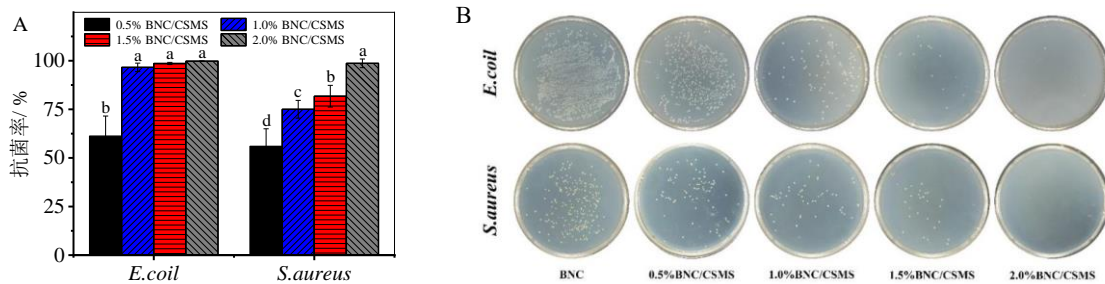


图3 BNC/CSMS 的抗菌性 (A. 抑菌率; B. 样品洗脱稀释后涂布形成的菌落图)

#### 2.5 细胞相容性评估

图 4 显示了样品的细胞相容性。BNC 已经被证明是细胞相容性良好的材料<sup>[8]</sup>,因此以 BNC 为对照进行测试。(A) 图显示所有样品组都呈现出细胞增殖行为,说明都可以支持细胞生长。培养 1 天后,由于细胞数量较少,对环境还处于适应阶段,因此样品间没有较大差异;培养 2 天的情况与第一天类似,但 2% BNC/CSMS 组的细胞活力明显降低;培

养 3 天后细胞增殖速度较快,且在样品间呈现出显著差异,BNC、0.5%BNC/CSMS、1.0%BNC/CSMS 组细胞数量明显高于其他两组。

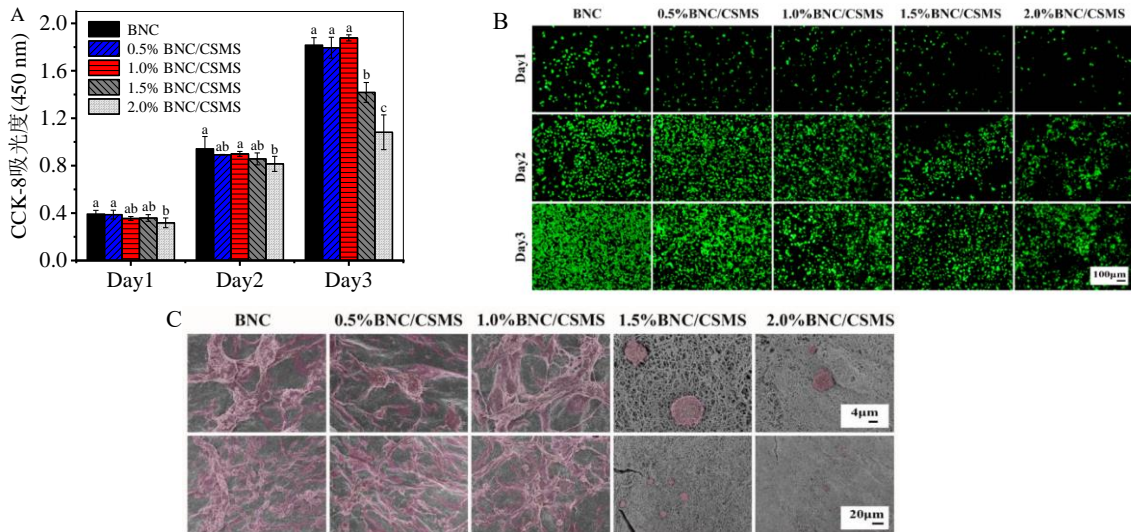
钙黄绿素染色结果如图 (B) 所示,第 1 天所有样品组的活细胞数量较少,且较分散;第 2 天活细胞数量明显增多,BNC、0.5%BNC/CSMS、1.0%BNC/CSMS 组细胞数量高于其他两组;第 3 天活细胞之间空隙小且排列紧密,但 1.5%BNC/CSMS、

2%BNC/CSMS 细胞有成团现象，细胞数量低于前三组，且细胞团之间可见较大间隙。

细胞培养 3 天后，对细胞固定并用扫描电镜观察细胞在膜表面的形态，结果如 (C) 所示。细胞在 BNC、0.5%BNC/CSMS、1.0%BNC/CSMS 上的黏附效果较好，细胞呈饱满的椭圆形或梭形，已在表面铺展开，样品表面被细胞外基质覆盖。而 1.5%BNC/CSMS、2.0%BNC/CSMS 样品组细胞数量

较少，仅可见单个的球状细胞，且复合膜的结构清晰未见细胞外基质的附着。

综上，CS 浓度对细胞的增殖黏附和形态存在较大影响，0.5%和 1.0%的 CS 不影响细胞的生长，细胞在该材料表面的生长情况与 BNC 相似，在 3 天内可观察到细胞的快速增殖，而 1.5%和 2.0%CS 条件下，细胞增长较缓慢，且细胞活力明显下降。



A. CCK-8 实验结果；B. 钙黄绿素染色结果图；C. 3 天时，细胞在材料表面的电镜图

图 4 BNC/CSMS 细胞实验结果

### 2.6 组织相容性评估

为了测试样品在生物体内的组织相容性，进行了大鼠皮下包埋实验。HE 染色结果表明，植入后 3 天，由于生物对外来材料的排异，BNC 和 BNC/CSMS 周围都有少量炎症细胞聚集，但 14 天时炎症情况基本消失，且 BNC 和 BNC/CSMS 的表面都有大量

成纤维细胞。Masson 染色结果表明，植入 3 天材料周围仅有少量的胶原纤维，14 天时可见胶原纤维的大量附着。证明 14 天时材料与大鼠皮肤出现了组织融合，材料的植入不影响成纤维细胞及胶原的生长，BNC 和 BNC/CSMS 都具有良好的组织相容性，也证明其作为伤口敷料的安全性。

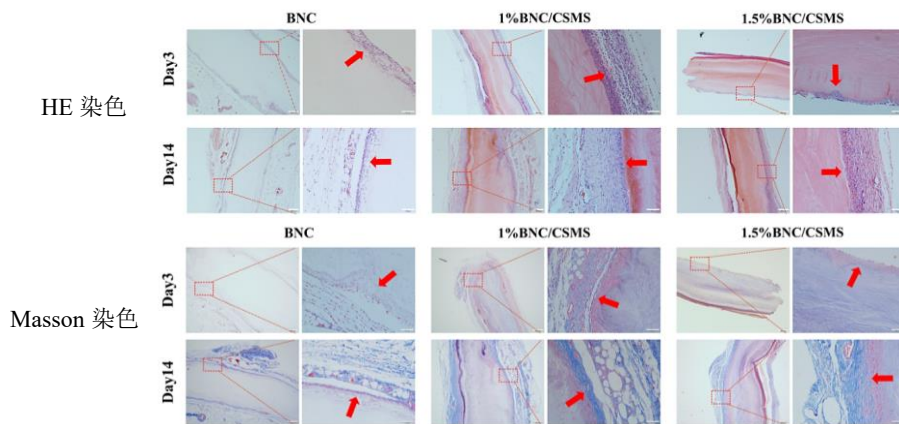


图 5 BNC 和 BNC/CSMS 的组织学染色

### 3 结论

负压浸渍法和离子凝胶法相结合可成功制备 BNC/CSMS 复合材料。对不同浓度 CS 制备的材料进行测试后发现，CSMS 的引入可提高材料的力学

性能和抗菌性；CS 浓度为 0.5%和 1.0%的材料具有高细胞相容性；植入大鼠皮下后，材料表面被成纤维细胞和胶原覆盖，呈现出良好组织相容性。该制备方法具有简单高效和安全的特点，且制备出的

BNC/CSMS 在适宜的 CS 浓度下各种性能良好, 有作为创面敷料的潜力。

### 参考文献:

- [1] GUO S D, DIPIETRO L A. Factors affecting wound healing[J]. *Journal of Dental Research*, 2010, 89(3): 219-229.
- [2] BOATENG J S, MATTHEWS K H, STEVENS H, *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: A review[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(8): 2892-2923.
- [3] NAPA VICHAYANUN S, AMORN SUDTHIWAT P, PIENPINIJTHAM P, *et al.* Interaction and effectiveness of antimicrobials along with healing-promoting agents in a novel biocellulose wound dressing[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2015, 55: 95-104.
- [4] DONG R, GUO B. Smart wound dressings for wound healing[J]. *Nano Today*, 2021, 41: 101290.
- [5] SHAHRIARI-KHALAJI M, LI G, LIU L, *et al.* A poly-L-lysine-bonded TEMPO-oxidized bacterial nanocellulose-based antibacterial dressing for infected wound treatment. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 287: 119266.
- [6] ZHANG P, CHEN L, ZHANG Q S, *et al.* Using in situ dynamic cultures to rapidly biofabricate fabric-reinforced composites of chitosan/bacterial nanocellulose for antibacterial wound dressings[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 260.
- [7] AGNIHOTRI S A, MALLIKARJUNA N N, AMINABHAVI T M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 99(1): 5-28.
- [8] JING A, JI Z, WANG D, *et al.* Preparation and characterization of uniform-sized chitosan/silver microspheres with antibacterial activities[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2014, 36: 33-41.
- [9] FU Y N, LI G, YANG L, *et al.* Adaptive chitosan hollow microspheres as efficient drug carrier [J]. *Journal of Turbulence*, 2017, 18(7): 2195-2204.
- [10] ZHOU H Y, CAO P P, ZHAO J, *et al.* Release behavior and kinetic evaluation of berberine hydrochloride from ethyl cellulose/chitosan microspheres[J]. *Frontiers of Materials Science*, 2014, 8(4): 373-382.
- [11] DESAI K, PARK H J. Preparation and characterization of drug loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying[J]. *Drug Development Research*, 2005, 64(2): 114-128.
- [12] 肖新才, 官亚兰, 王振环, 等. "水包水"法制备壳聚糖-多聚磷酸钠微囊[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2013, 32(1): 42-46.
- [13] 蔡志江, 侯成伟. 细菌纤维素/壳聚糖复合多孔支架材料的制备与表征[J]. *高分子材料科学与工程*, 2012, 28(6): 121-124.
- [14] LI X, TANG J, BAO L, *et al.* Performance improvements of the BNC tubes from unique double-silicone-tube bioreactors by introducing chitosan and heparin for application as small-diameter artificial blood vessels[J]. *Carbohydrate polymers*, 2017, 178: 394-405.
- [15] SHARMA C, BHARDWAJ N K, PATHAK P. Static intermittent fed-batch production of bacterial nanocellulose from black tea and its modification using chitosan to develop antibacterial green packaging material[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 279: 123608.
- [16] YUAN H, CHEN L, HONG F F. Evaluation of wet nanocellulose membranes produced by different bacterial strains for healing full-thickness skin defects[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 285: 119218.
- [17] HONG F, WEI B, CHEN L. Preliminary study on biosynthesis of bacterial nanocellulose tubes in a novel double-silicone-tube bioreactor for potential vascular prosthesis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2014: 560365.
- [18] YUAN H, CHEN L, HONG F F. Homogeneous and efficient production of a bacterial nanocellulose-lactoferrin-collagen composite under an electric field as a matrix to promote wound healing[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9: 930-941.

## Preparation and Evaluation of Composite Membranes of Bacterial Nanocellulose/Chitosan Microspheres

WU Wen<sup>1</sup>, CHEN Lin<sup>1</sup>, HONG Feng<sup>1,2\*</sup>

(Research Group of Microbiological Engineering and Medical Materials, College of Biological Science and Medical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China; 2. National Advanced Functional Fiber Innovation Center, Suzhou 215000, China)

**Abstract:** BNC/CSMS composite membranes were obtained by using the ionic gelation method, where chitosan (CS) and sodium triphosphate (TPP) were used to make CS microspheres (CSMS) inside bacterial nanocellulose (BNC) nanofiber matrix. Physicochemical properties and biological activity of the materials including mechanical properties, antibacterial properties, cytocompatibility, and histocompatibility were performed. The results showed that the concentrations of CS and TPP affected the size and distribution of CSMS, and the combination of 1.0% TPP with 1.0% or 1.5% CS resulted in obvious morphology and uniform distribution of microspheres with a particle size of about 40 nm. All the composite membranes contained characteristic groups of CS. The increase of CS concentration improved the mechanical and antibacterial properties of the materials. The materials produced with 0.5% and 1.0% of CS were more supportive of cell proliferation. After the materials were implanted via subcutaneous embedding experiment in rats, the attachment of fibroblasts and the presence of abundant collagen fibers were seen, and there was a slight inflammation at the beginning, but then it disappeared, proving that the materials have excellent histocompatibility. All data and results indicate that BNC/CSMS has great potential in application as wound dressings.

**Key words:** bacterial nanocellulose; chitosan microsphere; ionic gelation method; wound dressing