

抗菌黏附型酪蛋白基纳米复合水凝胶的制备

徐群娜^{1,2,3}, 杨羽西^{1,2}, 闫文飞⁴, 马建中^{1,2,3}, 徐小雨^{1,2}

[1. 陕西科技大学 轻工科学与工程学院, 陕西 西安 710021; 2. 轻化工程国家级实验教学示范中心, 陕西 西安 710021; 3. 西安市绿色化学品与功能材料重点实验室, 陕西 西安 710021; 4. 中国皮革和制鞋工业研究院(晋江)有限公司, 福建 晋江 362200]

摘要: 以酪蛋白为基体, 引入纳米氧化锌(ZnO NPs), 通过“半溶解溶胶-凝胶酸化法”制备了抗菌黏附型酪蛋白基纳米复合水凝胶。通过 FTIR、SEM、EDS 对水凝胶结构进行了表征, 对其抗菌性能、黏附性能、溶胀性能、力学性能及生物相容性进行了测定。结果表明, 所制备的纳米复合水凝胶具有立体的三维网络结构, 孔径分布均一; 当引入 ZnO NPs 添加量为酪蛋白质量的 3% 时, 其溶胀率可达 79.19%; 抗张强度和断裂伸长率分别可达 1.95 MPa 和 137.4%; 该水凝胶能够通过氢键作用、疏水相互作用与皮肤、玻璃、塑料、金属等产生良好黏附性, 且对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌均具有良好的抗菌性能。

关键词: 酪蛋白; 水凝胶; 纳米氧化锌; 抗菌性能; 黏附; 功能材料

中图分类号: TQ314.1; TQ427.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2022)03-0496-09

Preparation of casein-based nanocomposite hydrogel with antibacterial and adhesion properties

XU Qunna^{1,2,3}, YANG Yuxi^{1,2}, YAN Wenfei⁴, MA Jianzhong^{1,2,3}, XU Xiaoyu^{1,2}

[1. College of Bioresources Chemical & Materials Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, Shaanxi, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Light Chemistry Engineering Education, Xi'an 710021, Shaanxi, China; 3. Xi'an Green Chemicals and Functional Materials Key Laboratory, Xi'an 710021, Shaanxi, China; 4. China Leather and Footwear Industry Research Institute (Jinjiang) Co. Ltd., Jinjiang 362200, Fujian, China]

Abstract: Antibacterial and adhesive casein-based nanocomposite hydrogel was prepared by “semi-soluble sol-gel acidification” from casein and nanoparticles ZnO (ZnO NPs). The structure of hydrogel was characterized by FTIR, SEM and EDS, and the antibacterial property, adhesion property, swelling property, mechanical property and biocompatibility were measured. The results showed that the as-prepared nanocomposite hydrogel had three-dimensional network with uniform pore distribution. The nanocomposite hydrogel with ZnO NPs addition (based on the mass of casein) of 3% had a swelling rate of 79.19%, with tensile strength and elongation at break of 1.95 MPa and 137.4%, respectively. This nanocomposite hydrogel exhibited excellent adhesion to many materials, such as human skin, glass, plastic, metal through hydrogen bonding and hydrophobic interaction, and had good antibacterial performance against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: casein; hydrogel; ZnO NPs; antibacterial property; adhesion; functional materials

水凝胶是一类以水为分散介质并具有三维网状交联结构的高分子体系^[1]。按其来源可分为天然水凝胶和合成水凝胶两类^[2]。近年来, 天然水凝胶由于其优越的生物相容性、可降解性以及来源丰富等

特点在生物敷料、注射凝胶^[3]、智能皮肤^[4]、海水淡化等领域被广泛应用。用于制备水凝胶的天然高分子材料主要包括蛋白质、海藻酸盐、壳聚糖、纤维素等^[5-8]。蛋白质水凝胶作为一类天然水凝胶, 通常

收稿日期: 2021-07-28; 定用日期: 2021-11-24; DOI: 10.13550/j.jxhg.20210765

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(22078185); 陕西省创新人才推进计划青年科技新星项目(2019KJXX-011); 国家自然科学基金青年项目(21908171); 陕西省自然科学基金(2020JQ-825)

作者简介: 徐群娜(1987—), 女, 副教授, 博士生导师, E-mail: xxqnn870304@163.com。

具有多种功能,如导电性、黏附性等,尤其受到生物医药领域的关注。例如:胶原蛋白基水凝胶由于能够诱导细胞增殖和组织重建,被作为一种应用于组织工程的支架而广泛研究^[9]。

作为一种来源于牛乳的天然蛋白质,酪蛋白的结构开放疏松,具有良好的吸水溶胀性、高分散性、黏附性和耐水性^[10-11],因此在水凝胶领域展现出优异的应用前景。然而,纯酪蛋白易受细菌侵蚀,且机械性能较差,这限制了其作为水凝胶的进一步应用。围绕提升水凝胶机械性能的目标,研究者大多采用引入其他聚合物〔如聚丙烯酰胺(PAAm)〕作为支撑为酪蛋白提供刚性网络。XU等^[12]制备的酪蛋白-PAAm水凝胶可以通过物理相互作用反复黏附在各种固体材料和生物组织的表面,在铝表面的最大剥离力为378 N/m;断裂应力可达到1.8 MPa。GUAN等^[13]将酪蛋白和LiCl引入到聚丙烯酰胺水凝胶中,制备出韧性强、黏附性好的PAAm/酪蛋白水凝胶。然而,目前针对以酪蛋白为基体的水凝胶研究较少,且功能性不足,尤其是满足生物敷料应用的兼具黏附性、抗菌性及机械性能的酪蛋白基水凝胶还鲜见报道。

近年来,纳米复合水凝胶被认为是一种潜在的高分子纳米复合材料,无机纳米材料的加入可以赋予水凝胶其他功能,如抗菌性、吸附性和力学性能等^[14-15]。将聚合物自身独特的结构所带来的特殊功能与无机纳米材料相结合,可重新赋予材料新的功能。纳米氧化锌(ZnO NPs)作为一种有效抗菌的金属纳米粒子已被多方面报道。ZHANG等^[16]通过自发席夫碱反应在醛基海藻酸钠(SA)、壳寡糖(COS)体系中引入ZnO NPs制备了一种纳米复合水凝胶,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等均具有显著的抗菌活性。鉴于此,作者设想在酪蛋白基水凝胶中引入金属纳米粒子ZnO NPs制备酪蛋白基纳米复合水凝胶。ZnO NPs不仅能够起到有效的抗菌作用,还可以为体系提供更多交联点,赋予水凝胶较优的强度和韧性,以及耐水性及抗菌性能。

作者前期围绕酪蛋白的改性与功能化进行了大量的研究^[17-18]。结果发现,将不同无机纳米粒子引入到酪蛋白基体中,通过调控复合材料的结构可以赋予其特殊性能,最终得到具有系列功能如高机械强度、抗菌性或自清洁性的酪蛋白基纳米复合材料^[19-21]。此外,相比于传统酪蛋白基纳米复合材料,具有三维网络结构的酪蛋白基纳米水凝胶具有高含水量以及黏附性,可以有效黏附人体组织并维持湿润,加之有效的抗菌性使其在生物基水凝胶敷料领域具有一定的应用潜力。

基于以上背景,本研究采用“半溶解溶胶-凝胶酸化法”^[22]制备酪蛋白基水凝胶,并将ZnO NPs同时作为抗菌剂与交联剂引入酪蛋白水凝胶体系中,制备得到具有三维网络结构的抗菌黏附型酪蛋白基纳米复合水凝胶。酪蛋白基体在酸性条件下发生溶胶-凝胶化转变,通过对ZnO NPs添加量的调控,探究水凝胶抗菌机理与黏附机理,得到最佳制备工艺。并测定所制备水凝胶的抑菌能力、黏附能力和力学性能等,以期得到一种能用于生物医用敷料的生物基水凝胶。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

酪蛋白,上海川和食品有限公司;纳米ZnO(质量分数 $\geq 95\%$,粒径 < 200 nm),秦皇岛太极环纳米制品有限公司;三乙醇胺(TEA)、无水乙醇(C_2H_5OH),天津市天力化学试剂有限公司;盐酸(HCl),西安三浦精细化工厂;蛋白胨、琼脂粉、牛肉膏、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾,北京奥博星生物技术有限公司;小牛血清(MP20005),上海源叶生物科技有限公司;胰酶(143188),兰杰柯科技有限公司;谷氨酰胺(GNM21051)、丙酮酸钠(GNM11444)、非必须氨基酸(GNM71450),吉诺生物科技有限公司;CCK8(IV08-100),Invigentech(美国)公司;小鼠胚胎细胞(NIH-3T3),上海赛百慷生物技术有限公司;DMEM高糖培养基(10-013-CVRC),Corning(美国)公司;聚丁二酸丁二醇酯(简称PBS,WH0112201 911XP),武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司。以上试剂除酪蛋白为优级纯外,其余均为分析纯。

PHBJ-260F pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;SYQDSX280B手提不锈钢压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;LHS-150HC-11恒温恒湿箱,上海一恒科学仪器有限公司;QHX-250BS-II人工气候培养箱,上海新苗医疗器械有限公司;Vega 3 SBH扫描电子显微镜(SEM)+能谱仪,捷克TESCAN有限公司;VECTOR-22傅里叶变换红外光谱仪,德国Bruker公司;TA-XT plus物性分析仪,英国SMS公司;DHR-1流变仪,美国TA仪器公司;TUM-P3z纸张纸板测厚仪,上海双旭电子有限公司;TH-8203SD型拉力试验机,苏州量子仪器有限公司。

1.2 酪蛋白/ZnO纳米复合水凝胶的制备

称取2.00 g酪蛋白加入10 mL pH=9~10的三乙醇胺溶液中,于50 °C磁力搅拌0.5 h得到酪蛋白溶解液;将不同添加量(以酪蛋白质量计,分别取值为0、1%、2%、3%、4%、5%,下同)的ZnO NPs超

声(常温下超声分散 15 min, 超声功率 100 W)分散在 1 mL 无水乙醇中得到均匀分散液。在 65 °C 下通过磁力搅拌 0.5 h 使其与酪蛋白水溶液混合均匀, 得到酪蛋白/ZnO NPs 分散液; 采用“半溶解溶胶-凝

胶酸化法”, 将酪蛋白/ZnO NPs 分散液转移至模具中, 待其恢复至室温后置于酸性环境中反应 10 h, 再将其置于 4 °C 冷藏保存后脱模取出, 得到酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶, 其制备路线示意图见图 1。

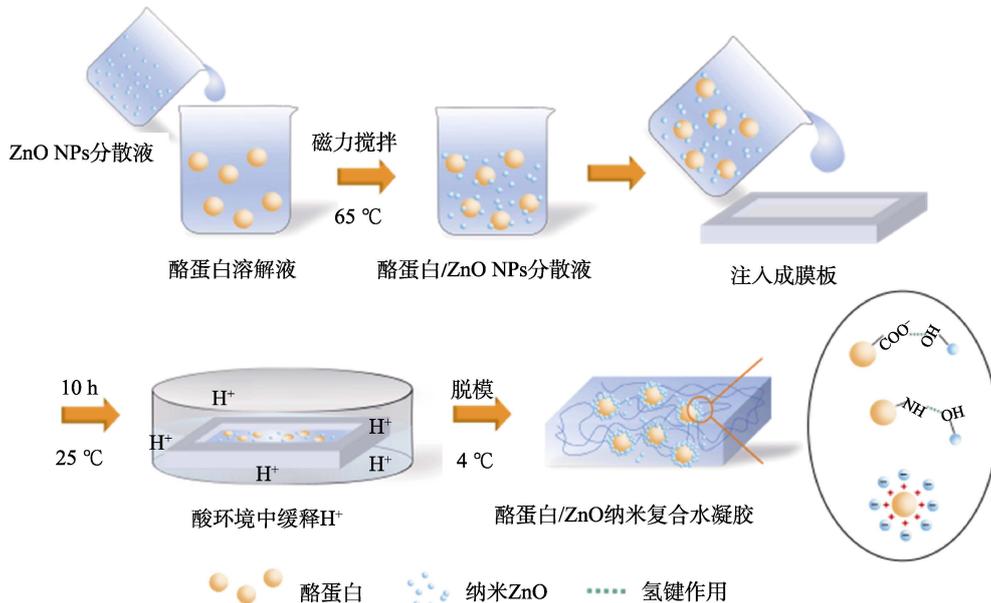


图 1 “半溶解溶胶-凝胶酸化法”制备酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶示意图

Fig. 1 Schematic diagram of casein/ZnO nanocomposite hydrogel by “semi-dissolution acidification sol-gel transition method”

1.3 结构表征与性能测试

制备不同组成的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶, 考察 ZnO NPs 添加量对纳米复合水凝胶的微观结构、力学性能、溶胀性能以及抗菌性能的影响。

1.3.1 结构表征

FTIR 采用红外光谱仪进行测定, 将水凝胶置于真空干燥机中完全干燥, 研磨后加入少量溴化钾粉末, 再放在压片机上压成薄片, 扫描范围 4000~500 cm^{-1} 。

SEM+EDS 测试: 通过 SEM+能谱仪观察样品内部微观结构, 通过 EDS 观察样品微区成分元素种类与含量。将水凝胶样品置于液氮中冷冻淬断后, 对干燥后水凝胶喷金处理, 加速电压为 1.0 kV, 对其断面进行观察。

1.3.2 抗菌性能

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌液接种于 PBS 溶液 (pH=7.0~7.4) 中, 分别置于 (36.8±0.2) °C 的水浴振荡器中培养 18 h, 用 PBS 溶液将细菌悬液稀释 1000 倍, 得到 1×10^6 CFU/mL 的菌液。称取 2 g 牛肉膏, 2.5 g 蛋白胨, 7.5 g 琼脂粉, 加入 500 mL 水加热完全溶解后, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH=7.2~7.4, 获得琼脂培养基。将滤纸裁剪为直径为 2 cm 的圆片, 备用。在 103 kPa、121 °C 条件下对实验器材及培养基灭菌 15 min。在无菌环境下,

将灭菌后的琼脂培养基倒入培养皿中, 自然冷却至凝固。用注射器量取 0.1 mL 稀释后的菌液于凝固的琼脂培养基上, 用涂布器涂覆均匀。将滤纸片在所制备的水凝胶溶胶中浸泡 20 min 后, 用镊子夹取并滤去多余溶胶, 并将滤纸片紧贴于培养基上。然后将培养皿倒置放入温度为 (37±1) °C, 相对湿度为 80%±2% 的恒温恒湿培养箱中培养 24~48 h。最后用游标卡尺准确测量纸片直径及抑菌圈外沿距离, 若抑菌圈不规则, 则测量 3 点记录均值。抑菌宽度 (W_{inh}) 根据公式 (1) 进行计算:

$$W_{\text{inh}} = (d_1 - d_2) / 2 \quad (1)$$

式中: W_{inh} 为抑菌宽度, mm; d_1 为抑菌圈外沿距离, mm; d_2 为滤纸片直径, mm。

1.3.3 黏附性能

通过 TA-XT plus 物性分析仪测定水凝胶的黏附性能。4 °C 下, 将制备好的水凝胶体切成长、宽、高均为 2 cm 的小块, 置于物性分析仪的测试平台上测定其黏附性。测定条件: 探头 P 0.5, 测前速度 1.0 mm/s, 测定速度 1.1 mm/s, 测后速度 10 mm/s, 测定高度 15 mm, 触发力 5.0 g。每个样品重复 3 次实验。

1.3.4 溶胀性能

25 °C 下, 称取一定质量 (W_1) 干燥的水凝胶浸渍到蒸馏水以及不同 pH 条件下的 PBS 缓冲溶液

中, 在一定的时间间隔取出, 用滤纸去除表面残留的水分称重 (W_2), 直至保持恒重。其溶胀率按公式 (2) 计算:

$$SR/\% = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: SR 为水凝胶的溶胀率, %; W_1 为水凝胶干燥时的质量, g; W_2 为水凝胶溶胀平衡时的质量, g。

1.3.5 力学性能

1.3.5.1 动态流变性能

利用流变仪来测定样品的动态黏弹性。将水凝胶样品置于流变仪的测定平台, 静置 2 min 释放残余的应力, 调节好间距后, 涂抹一层硅油防止水分挥发。25 °C 下, 测定不同的样品储能模量 (G') 以及损耗模量 (G'') 与频率的相关性, 频率变化范围为 0.1~100 Hz。

1.3.5.2 单轴拉伸性能

根据测试项目利用模具对水凝胶样品进行裁剪, 试样规格为哑铃形, 全长 35 mm, 其中有效长为 15 mm, 中间宽度为 2 mm。为保证样品的湿度均衡, 采用恒温恒湿箱内放置 12 h。然后采用测厚仪对其有效部位进行厚度测量, 分别测试 3 个不同部位。采用拉力试验机进行力学性能测试, 记录其抗张强度和断裂伸长率。

1.3.6 生物相容性

采用 CCK-8 法对其生物相容性进行检测。首先配制细胞培养基, 按照 V (DMEM 高糖培养基) : V (小牛血清) : V (丙酮酸钠) : V (谷氨酰胺) : V (非必须氨基酸) 为 87 : 10 : 1 : 1 : 1 的比例进行配制。取对数生长期的 NIH-3T3, 进行细胞计数, 调整细胞浓度, 按照 4×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 体积分数 5% CO_2 , 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。称取样品 0.2 g, 正反面各 30 min 紫外线照射灭菌后, 加入 2 mL 细胞培养基, 37 °C 浸提 24 h 后, 凝胶样品形成分散液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。将 NIH-3T3 细胞和水凝胶浸提液加入细胞培养基中, 分组培养 1、3、5 d。其中, 对照组加入 100 μL /孔的细胞培养基; 实验组加入 100 μL /孔的样品浸提液, 每个处理组均做 3 个复孔。移除培养基, 用 PBS 溶液清洗各孔 3 次, 按照 100 μL /孔加入含体积分数 10% CCK-8 的培养基, 在体积分数 5% CO_2 , 37 °C 恒温培养箱中培养 2 h。用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值 (OD)。其细胞相对活性按公式 (3) 计算:

$$\text{细胞相对活性}/\% = \frac{OD_1 - OD_0}{OD_c - OD_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: OD_1 为实验组吸光度值; OD_0 为背景吸光度值; OD_c 为对照组吸光度值。

所有的实验步骤遵循实验动物护理和使用指南: 第 8 版, ISBN-10: 0-309-15396-4, 由西安交通大学动物伦理委员会批准。

2 结果与讨论

2.1 酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的结构表征

采用“半溶解溶胶-凝胶酸化法”制备得到 ZnO NPs 添加量为 3% 的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的红外光谱如图 2 所示。

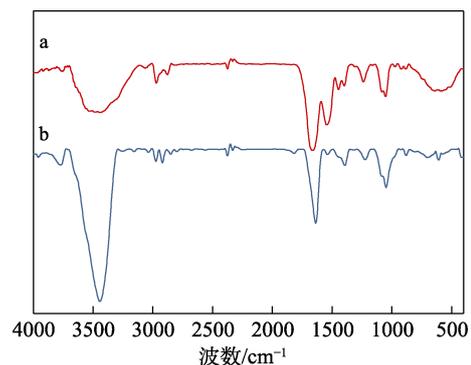


图 2 酪蛋白 (a) 和纳米复合水凝胶 (b) 的 FTIR 谱图
Fig. 2 FTIR spectra of CA and nanocomposite hydrogel

由图 2 可见, 两条曲线均出现了酪蛋白的特征吸收峰。酪蛋白在 3440、1658、1063 cm^{-1} 处有明显吸收峰, 分别对应 N—H 键、C=O 键和 C—N 键(酪蛋白分子骨架中—CONH—键的特征峰)的伸缩振动^[23]。加入 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶也出现了相似的特征吸收峰, 分别是 3485、1652、1051 cm^{-1} , 对应吸收峰均发生位移说明酪蛋白与 ZnO NPs 之间产生了氢键作用, 但本身的结构并未改变。除此之外, 加入 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶, 在 610 cm^{-1} 出现了新的特征峰, 即 ZnO 的特征性吸收峰, 说明纳米复合水凝胶内部有 ZnO NPs 的存在^[24], 这与目标产物一致。

ZnO NPs 用量的改变使得纳米复合水凝胶的外观和手感也随之变化。不同 ZnO NPs 添加量下纳米复合水凝胶外观照片见图 3。其外观和手感的评价结果列于表 1。

如图 3 所示, 酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶为透明柔软的块状, 且具有一定弹性和黏性。随着 ZnO NPs 用量的增加, 纳米复合水凝胶的颜色由淡黄色逐渐变为乳白色, 且遮盖性逐渐增强。此外, 加入 ZnO NPs 后, 纳米复合水凝胶的黏性逐渐降低, 质地由柔软逐渐变硬 (表 1), 呈现出一定的弹性, 这可能是由于无机粒子的刚性性质与酪蛋白基材的柔性性质结合所致^[25]。

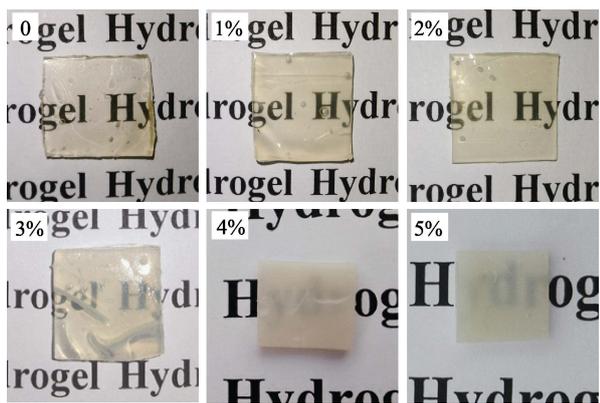


图 3 不同 ZnO NPs 添加量下纳米复合水凝胶外观图
Fig. 3 Appearance of nanocomposite hydrogels with different ZnO NPs additions

表 1 ZnO NPs 添加量对纳米复合水凝胶性能的影响
Table 1 Effect of ZnO NPs addition on properties of nanocomposite hydrogels

ZnO NPs 添加量/%	外观	手感
0	淡黄色, 透明	柔软, 有一定黏性(++++)
1	淡黄色, 透明	柔软, 有一定黏性(+++)
2	淡黄色, 透明	柔软, 有一定黏性(++)
3	淡黄色, 有一定遮盖性(+)	较硬, 有一定黏性(+)
4	乳白色, 有一定遮盖性(++)	较硬, 黏性较差
5	乳白色, 有一定遮盖性(+++)	较硬, 基本无黏性

注：“+”代表程度，数量越多，表示该项指标效果越强。

水凝胶是一种可吸收和储存大量水分的亲水性三维网络聚合物，其内部的网络及其孔道结构对其力学与溶胀等性能至关重要。为探究 ZnO NPs 添加量对水凝胶微观结构的影响规律，分别对不同 ZnO NPs 添加量的纳米复合水凝胶的断面进行 SEM 图像采集，结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出，水凝胶均呈现出均匀且致密的三维网络结构，孔径分布在 10~50 μm，且表面呈现出粗糙的孔道结构。与未加入 ZnO NPs 的水凝胶对比发现：酪蛋白纳米复合水凝胶内部结构发生变化，ZnO NPs 的加入使得水凝胶内部形成了较为均匀分散且相互贯穿的孔道；且随着 ZnO NPs 添加量从 0 增加至 5%，孔壁变薄，孔道更加均匀完整，呈现出更加致密的三维网络结构；平均孔径分别为 (18.3±4.0)、(20.8±4.4)、(20.9±4.8)、(21.2±4.5)、(22.4±5.9)、(20.8±5.0) μm。造成以上现象可能是由于 ZnO NPs 在水凝胶内起到了交联点的作用，其表面的一OH 会与酪蛋白表面的一COOH 和—NH₂ 发生缔合，而部分表面带负电的 ZnO 与酪蛋白表面的正电荷（酸性条件）相互吸引，发生静电作用。因此，ZnO NPs 的引入增加了水凝胶内部的交联密度，且对网络结构起到了一定的支撑作用，使

原本不均匀的网络结构更加规整^[26]。

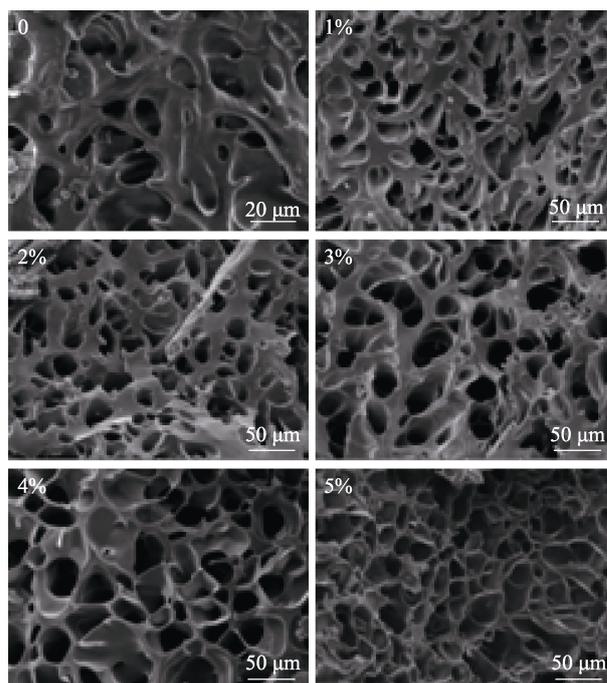
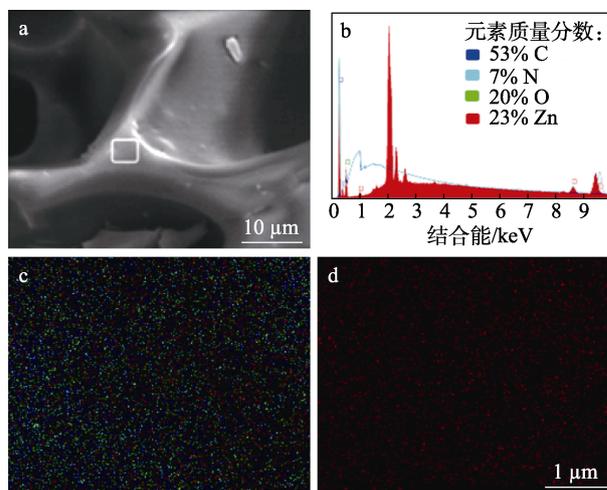


图 4 不同 ZnO NPs 添加量下纳米复合水凝胶的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of nanocomposite hydrogels with different ZnO NPs additions

ZnO NPs 添加量为 5% 的纳米复合水凝胶的 EDS 图见图 5。



a—纳米复合水凝胶原始 SEM 图；b—样品中 C、N、O、Zn 元素质量分数；c—C、N、O、Zn 元素分布；d—Zn 元素分布
注：深蓝色为 C，浅蓝色为 N，绿色为 O，红色为 Zn

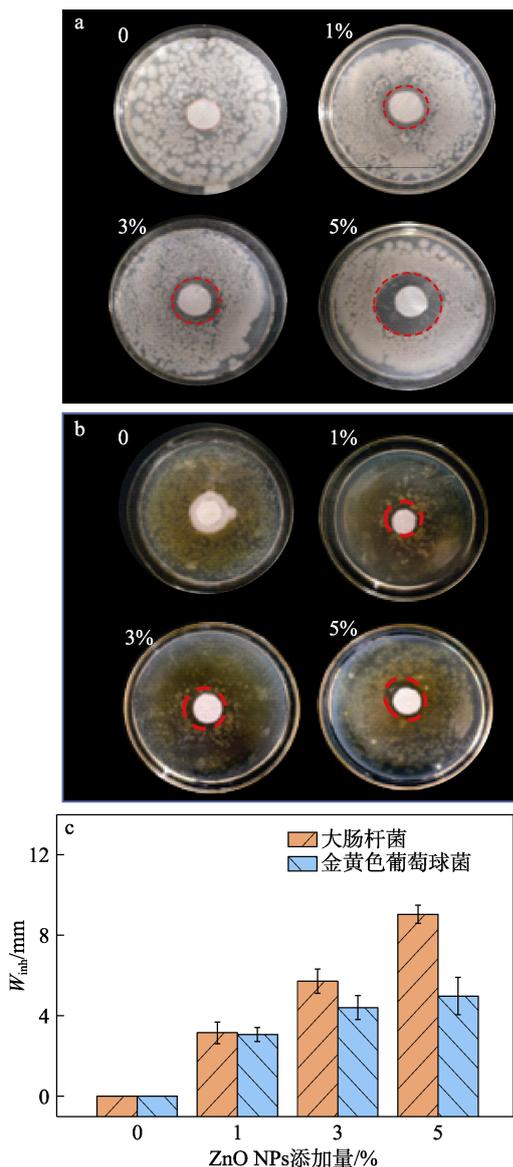
图 5 纳米复合水凝胶的 EDS 图
Fig. 5 EDS images of nanocomposite hydrogels

结合 EDS 结果（图 5）可知，在 ZnO NPs 添加量为 5% 的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶中，Zn 元素均匀地分布于水凝胶网络中，且显示其占比为 23%（在水凝胶该区域的元素分析中，Zn 元素占 C、N、O、Zn 多种元素总质量的 23%），这与 ZnO NPs 的

添加量相符, 说明 ZnO NPs 在复合水凝胶中起到了良好的交联点作用, 有利于形成纳米复合水凝胶致密均匀的孔道结构, 不仅可以赋予材料良好的吸水溶胀性能, 也为其弹性和拉伸性能提供了可延伸的空间^[27]。

2.2 抗菌性能

采用抑菌圈法评估了水凝胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌性能, 结果见图 6。



a—大肠杆菌; b—金黄色葡萄球菌; c—抑菌圈大小统计

图 6 不同添加量 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶的抗菌性能
Fig. 6 Antibacterial properties of nanocomposite hydrogels with different additions

由图 6 可见, 在培养 48 h 后, 未加入 ZnO NPs 的培养基中均无抑菌区域出现。而加入 ZnO NPs 的培养基, 出现了明显的抑菌圈, 其中, 对大肠杆菌的抑菌宽度最高达到 9.04 mm, 对金黄色葡萄球菌的抑菌宽度最高达 4.98 mm, 说明水凝胶对金黄色

葡萄球菌与大肠杆菌均产生了抑制作用。此外, 随着 ZnO NPs 添加量的增多, 抑菌圈逐渐扩大, 纳米复合水凝胶的抑菌作用也不断增强。

在采用“半溶解溶胶-凝胶酸化法”制备该体系的过程中(图 1), ZnO NPs 分散液与酪蛋白溶解液均匀混合, 酸溶液在温度作用下缓慢释放 H⁺, 使得酪蛋白溶解液发生变性, 逐步转变为凝胶, 而 ZnO NPs 则通过静电作用与缔合作用固定在水凝胶中。ZnO NPs 的抗菌作用主要来自于两方面: 一是 ZnO NPs 缓慢释放 Zn²⁺, 与细菌膜蛋白结合后破坏细菌结构; 同时进入细胞内部作用于酶蛋白并使其失活, 进而破坏细菌的生理代谢活动和分裂增殖能力, 从而达到杀菌效果。二是在阳光尤其是紫外光的照射下, ZnO NPs 能自行释出 e⁻, 所产生的活性氧 (ROS) 可与多种微生物发生氧化反应, 最终达到杀菌效果^[28]。

此外, 所制备的纳米复合水凝胶对大肠杆菌的抗菌效果要优于对金黄色葡萄球菌的抗菌效果。这主要是因为金黄色葡萄球菌较大肠杆菌具有更丰厚的细胞壁结构, 对 ZnO NPs 或 Zn²⁺ 进入到细胞质中造成了阻碍^[29], 导致纳米复合水凝胶对金黄色葡萄球菌较大肠杆菌的抗菌效果更弱。

2.3 黏附性能

传统水凝胶通常黏附强度较弱, 这是由于大量的水在其表面与基底之间形成一层屏障, 使二者无法直接接触, 导致其表面能降低, 黏附力减弱。此外, 水分子通过氢键与水凝胶中的黏附基团相互作用, 显著降低了水凝胶与固体材料的界面反应^[30-31], 尤其对于高强度水凝胶, 其刚性网络更不利于表面黏附^[4,32]。因此, 水凝胶在不同基底上的黏附性研究仍是当前水凝胶领域的一大挑战。将 ZnO NPs 添加量为 3% 的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶涂覆在人体皮肤、玻璃、陶瓷、橡胶、塑料、金属 (铝、钢、铁) 材料表面观察其黏附效果, 并测试不同添加量 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶的黏附性能, 结果见图 7。

由图 7 可以看出, 纳米复合水凝胶可以较好地贴合在材料表面, 具有天然的黏附性。作为一种有机-无机相复合水凝胶, 其中的酪蛋白作为有机相为水凝胶提供柔性网络和黏性位点, 酪蛋白表面含有大量的—COOH、—OH、—NH₂ 基团和疏水链段, —COOH 基团会与金属离子形成金属络合, —OH、—NH₂ 基团与金属铝表面的 O 原子, 玻璃、橡胶上的 O、N 原子形成氢键, 与玻璃表面的疏水基团形成疏水相互作用^[12,33-34]; 而 ZnO NPs 作为无机相则可以吸附聚合物链, 带正电的 Zn²⁺ 通过静电引力吸附在酪蛋白胶束表面上^[35]。因此, 酪蛋白基纳米复合水凝胶能够与多种材料发生黏附。同时发现, 随着 ZnO NPs 添加量的增加, 水凝胶的黏附性呈现先

增强后减弱的趋势。当 ZnO NPs 添加量为 3% 时黏附性最高, 达到 10.88 g·s; 当 ZnO NPs 添加量继续增大时, ZnO NPs 发生团聚而在体系中出现内摩擦, 从而降低水凝胶与基底的黏附性。ZnO NPs 虽然可以赋予纳米复合水凝胶优异的抗菌性能, 但过量反而降低水凝胶的黏附性。此外, 通过调节 ZnO NPs 添加量还可以对纳米复合水凝胶上的黏附性进行调节, 实现可调。



图 7 纳米复合水凝胶对不同基材的黏附 (a) 及不同添加量 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶的黏附性能 (b)
Fig. 7 Adhesion of nanocomposite hydrogel to different substrates (a) and adhesion property of nanocomposite hydrogels with different ZnO NPs additions (b)

2.4 溶胀性能

溶胀率是衡量水凝胶吸水性能的重要依据。图 8 为 ZnO NPs 添加量对纳米复合水凝胶溶胀性能的影响。

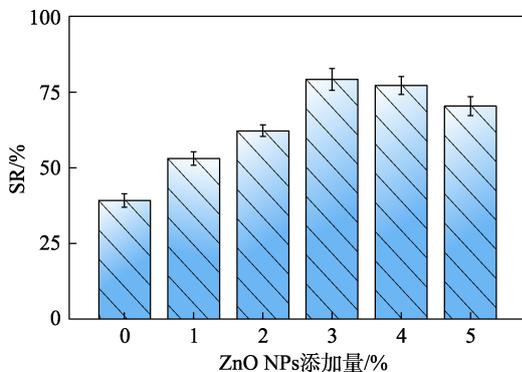


图 8 不同添加量 ZnO NPs 的纳米复合水凝胶的溶胀性能
Fig. 8 Swelling properties of nanocomposite hydrogels with different ZnO NPs additions

由图 8 可以看出, 随着 ZnO NPs 添加量的增加,

其溶胀率呈现先增大后缓慢减小的趋势; 当 ZnO NPs 添加量为 3% 时呈现出最高的溶胀率, 可达到 79.19%, 较未加入 ZnO NPs 时提高了近 1 倍; 继续添加 ZnO NPs, 溶胀率缓慢下降, 这可能是由于过量的 ZnO NPs 未与酪蛋白结合, 堆积在水凝胶孔壁表面, 降低了其亲水表面占比。ZnO NPs 的加入使水凝胶的吸水能力显著改善, 这主要是因为纳米粒子提高了水凝胶内部的交联程度, 增加了孔状结构, 使三维的网络结构可以为溶液的吸收和容纳提供更充足的空间^[26,36]; 此外, ZnO NPs 的加入还会导致水凝胶内部的网络结构渗透压发生改变, 对水分子进入水凝胶内部提供促进作用^[37-38], 进而提高水凝胶的溶胀率。

2.5 力学性能

2.5.1 动态流变性能

水凝胶的动态流变性能是表征水凝胶内部结构的一种重要方法。图 9 是 ZnO NPs 添加量为 3% 的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的动态流变性能曲线。

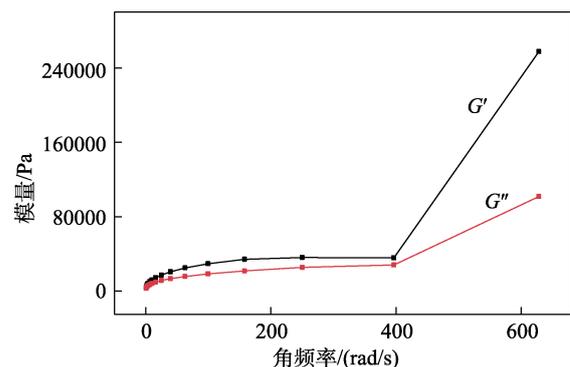


图 9 酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的动态流变性
Fig. 9 Dynamic rheological property of CA/ZnO nanocomposite hydrogel

由图 9 可以看出, 在整个角频率范围内, 水凝胶的 G' 始终大于 G'' , 并且 G' 不依赖于角频率变化, 这表示水凝胶的弹性响应强于其黏性响应^[39], 水凝胶显示出弹性体行为, 属于黏弹性固体, 具有较完整稳定的网络结构和机械稳定性^[40]。

2.5.2 单轴拉伸性能

无机纳米粒子可以改善基材的力学性能。图 10 为 ZnO NPs 添加量为 3% 的酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的拉伸性能。

由图 10 可知, 对纳米复合水凝胶施加一定力进行拉伸, 可以使其延长至原长的 2 倍。结合文献^[41]可知, ZnO NPs 具有相对较高的模量, 常被作为一种机械增强剂引入聚合物基体中, 因此在体系中引入 ZnO NPs 后, 纳米复合水凝胶的抗张强度显著增强, 从未加入 ZnO NPs 的 614.93 kPa 升高到

1.95 MPa, 提升了 217.1%, 这说明 ZnO NPs 的引入对复合水凝胶起到了增强作用。然而, 酪蛋白/ZnO 纳米复合水凝胶的断裂伸长率为 137.4%, 略有降低, 这可能是因为纳米粒子的加入增强了水凝胶内部的交联程度, 使网络结构更加致密, 使得水凝胶可以均匀分散外力, 并发生能量耗散, 但其薄弱的孔壁难以在拉伸方向上提供更多的延伸^[41], 这与 SEM 图所呈现的结果一致。

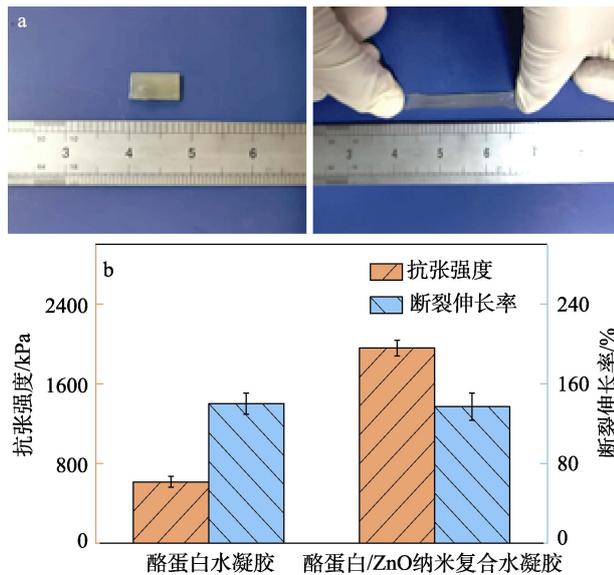


图 10 纳米复合水凝胶的拉伸性能

Fig. 10 Tensile property of nanocomposite hydrogel

2.5.3 生物相容性

为了进一步研究纳米复合水凝胶作为生物医学材料的应用潜力, 采用 CCK-8 法通过将 NIH-3T3 细胞培养于纳米复合水凝胶的浸提液中, 并对其 1、3、5 d 的生物相容性进行评估, 结果见图 11。

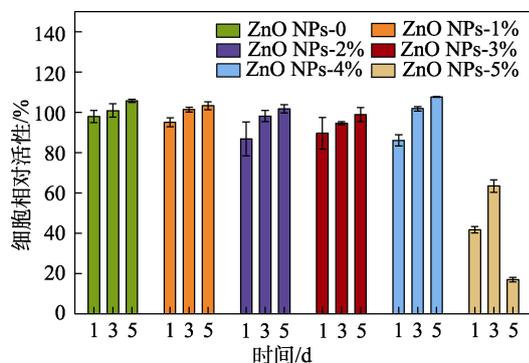


图 11 不同 ZnO NPs 添加量的纳米复合水凝胶的细胞相对活性

Fig. 11 Relative cell viability of nanocomposite hydrogels with different ZnO NPs additions

如图 11 所示, 当 ZnO NPs 的添加量 < 5% 时, 与空白对照组相比, 其细胞相对活性均 > 80%, 且在培

养 3 d 后随培养时间的延长而增加, 细胞活性良好, 在 5 d 时仍呈现增加趋势, 细胞相对活性最高可达 108%。表明纳米复合水凝胶显著促进细胞增殖, 少量的 ZnO NPs 不影响细胞生长, 纳米复合水凝胶对 NIH-3T3 细胞无毒且具有生物相容性^[42]。但 ZnO NPs 添加量增到 5% 时, 细胞相对活性呈现降低的趋势, 可能是由于较高浓度的 ZnO NPs 会阻碍细胞的增殖^[43]。ZnO NPs 浓度的增加对细胞生长的影响较大, 因此, 选择 ZnO NPs 添加量在 1%~4% 范围更利于酪蛋白基纳米复合水凝胶作为伤口敷料的应用。

3 结论

通过“半溶解溶胶-凝胶酸化法”成功制备了具有结构及性能稳定的酪蛋白基纳米复合水凝胶。该水凝胶具有立体的三维网络结构, 孔径分布均一; 对溶液具有一定的吸收、容纳并储存的能力; 当 ZnO NPs 添加量为 3% 时, 复合水凝胶的溶胀率可达 79.19%; 该水凝胶具有较好的力学性能, 抗张强度和断裂伸长率分别可达 1.95 MPa 和 137.4%; 对于人体皮肤、玻璃、陶瓷、橡胶、塑料、金属 (铝、钢、铁) 材料均具有较好的黏附性, 可达到 10.88 g·s; 该水凝胶具有良好的生物相容性, 在培养 5 d 后细胞相对活性可达 108%; 且对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的生长繁殖均表现出良好的抑制性能, 说明其具有良好的抗菌性能。作为一种绿色功能性水凝胶材料, 该研究所制备的酪蛋白基纳米复合水凝胶在生物敷料领域具有一定的应用潜力。

参考文献:

- [1] RUI L R, NEVES N M, MANO J F, *et al.* Natural-based polymers for biomedical applications[M]. Cambridge: CRC Press, 2008.
- [2] LEE K Y, MOONEY D J. Hydrogels for tissue engineering[J]. Chemical Reviews, 2001, 101(7): 1869-1879.
- [3] LI H B, CHENG F, WEI X J, *et al.* Injectable, self-healing, antibacterial, and hemostatic *N,O*-carboxymethyl chitosan/oxidized chondroitin sulfate composite hydrogel for wound dressing[J]. Materials Science and Engineering: C, 2021, 118: 111324.
- [4] LEI X J, YE D D, CHEN J, *et al.* Customizable multi-dimensional self-wrinkling structure constructed via modulus gradient in chitosan hydrogels[J]. Chemistry of Materials, 2019, 31(24): 10032-10039.
- [5] GUAN Q F, YANG H B, HAN Z M, *et al.* Sustainable cellulose-nanofiber-based hydrogels[J]. ACS Nano, 2021, 15(5): 7889-7898.
- [6] HOFFMAN A. Hydrogels for biomedical applications[J]. Annals of the New York Academy of Ences, 2012, 54(1): 18-23.
- [7] PEPPAS N A, HILT J Z, KHADEMOSSEINI A, *et al.* Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology[J]. Advanced Materials, 2006, 18(11): 1345-1360.
- [8] JEONG B, KIM S W, BAE Y H, *et al.* Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64(1): 154-162.
- [9] BAI X P, ZHENG H X, FANG R, *et al.* Fabrication of engineered heart tissue grafts from alginate/collagen barium composite microbeads[J].

- Biomedical Materials, 2011, 6(4): 045002.
- [10] LIU M S (刘梅森), HE W P (何唯平), CHEN S L (陈胜利). Effect of stabilizer on the quality of soft ice flooding[J]. Food Science (食品科学), 2006, 5(11): 124-128.
- [11] DUAN S H (段善海), CHEN L Y (陈凌远), YE D H (叶瞰昊), *et al.* Study on compound emulsifying stabilizer of low calorie ice cream[J]. Food Industry Technology (食品工业科技), 2007, 28(3): 187-190.
- [12] XU J Y, FAN Z W, DUAN L J, *et al.* A tough, stretchable, and extensively sticky hydrogel driven by milk protein[J]. Polymer Chemistry, 2018, 9(19): 2617-2624.
- [13] GUAN L, YAN S, LIU X, *et al.* Wearable strain sensors based on casein-driven tough, adhesive and anti-freezing hydrogels for monitoring human-motion[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(34): 5230-5236.
- [14] CARLOS J, MELENDEZ H, IVAN H, *et al.* Composite based on poly(acrylic acid-co-itaconic acid) hydrogel with antibacterial performance[J]. Polymer Composites, 2018, 39: 171-180.
- [15] CHEN S, TANG F, TANG L Z, *et al.* Synthesis of Cu-nanoparticle hydrogel with self-healing and photothermal properties[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(24): 20895-20903.
- [16] ZHANG M, GAO J, FAN Y J, *et al.* Comparisons of nitrite accumulation, microbial behavior and nitrification kinetic in continuous stirred tank (ST) and plug flow (PF) moving bed biofilm reactors[J]. Chemosphere, 2021, 278(5/6): 130410.
- [17] XU Q N, MA J Z, ZHOU J H, *et al.* Bio-based core-shell casein-based silica nano-composite latex by double *in situ* polymerization: Synthesis, characterization and mechanism[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 228(28): 281-289.
- [18] ZHANG F, MA J Z, XU Q N, *et al.* Hollow casein-based polymeric nanospheres for opaque coatings[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(18): 11739-11748.
- [19] XU Q N, FAN Q Q, MA J Z, *et al.* Facile synthesis of casein-based TiO₂ nanocomposite for self-cleaning and high covering coatings: Insights from TiO₂ dosage[J]. Progress in Organic Coatings, 2016, 99: 223-229.
- [20] WANG Y N, MA J Z, XU Q N, *et al.* Fabrication of antibacterial casein-based ZnO nanocomposite for flexible coatings[J]. Materials & Design, 2017, 113(5): 240-245.
- [21] MA J Z, AN W, XU Q N, *et al.* Antibacterial casein-based ZnO nanocomposite coatings with improved water resistance crafted *via* double *in situ* route[J]. Progress in Organic Coatings, 2019, 134: 40-47.
- [22] TANG S, YANG J, LIN L, *et al.* Construction of physically crosslinked chitosan/sodium alginate/calcium ion double-Network hydrogel and its application to heavy metal ions removal[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 393: 124728.
- [23] SELVAM S, SUNDRARAJAN M. Functionalization of cotton fabric with PVP/ZnO nanoparticles for improved reactive dyeability and antibacterial activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1419-1424.
- [24] MOHAMED A L, EL-SHEIKH M A, WALY A I. Enhancement of flame retardancy and water repellency properties of cotton fabrics using silanol based nano composites[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(1): 727-737.
- [25] WANG Y N (王雅楠). Synthesis and properties of antibacterial casein-based nano-ZnO composite leather finishing materials[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology (陕西科技大学), 2017.
- [26] CHI H J (迟宏进). Preparation and properties of nano-ZnO composite hydrogels[D]. Qinhuangdao: Yanshan University (燕山大学), 2019.
- [27] DENG W (邓伍). Preparation and study of UV resistant nano-ZnO epoxy resin composites[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China (电子科技大学), 2013.
- [28] FU F Y, LI L Y, LIU L J, *et al.* Construction of cellulose based ZnO nanocomposite films with antibacterial properties through one-step coagulation[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(4): 2597-2606.
- [29] YANG J W, BAI R B, CHEN B H, *et al.* Hydrogel adhesion: A supramolecular synergy of chemistry, topology, and mechanics[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 30(2): 1901693.
- [30] ZHANG W, WANG R X, SUN Z M, *et al.* Catechol-functionalized hydrogels: Biomimetic design, adhesion mechanism, and biomedical applications[J]. Chemical Society Reviews, 2020, 49(2): 433-464.
- [31] CUI C Y, WU T L, GAO F, *et al.* An autolytic high strength instant adhesive hydrogel for emergency self-rescue[J]. Advanced Functional Materials, 2018, 28(42): 1804925.
- [32] SEDO J, SAIZ-POSEU J, BUSQUE F, *et al.* Catechol-based biomimetic functional materials[J]. Advanced Materials, 2013, 25(5): 653-701.
- [33] LIU X, ZHANG Q, GAO Z, *et al.* Bioinspired adhesive hydrogel driven by adenine and thymine[J]. ACS Applied Materials & Interface, 2017, 9(20): 17645-17652.
- [34] LU Q Y, DANNER E, WAITE J H, *et al.* Adhesion of mussel foot proteins to different substrate surfaces[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2013, 10(79): 20120759.
- [35] XIONG X P, DUAN J J, WANG Y, *et al.* Novel hierarchical microparticles super-assembled from nanoparticles with the induction of casein micelles[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2013, 15(8): 1-11.
- [36] CHI H J, QIAO Y, WANG B, *et al.* Swelling, thermal stability, antibacterial properties enhancement on composite hydrogel synthesized by chitosan-acrylic acid and ZnO nanowires[J]. Polymer-Plastics Technology and Materials, 2019, 15(58): 1649-1661.
- [37] HUANG Y W, ZENG M, REN J, *et al.* Preparation and swelling properties of graphene oxide/poly(acrylic acid-co-acrylamide) super absorbent hydrogel nanocomposites[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2012, 401: 97-106.
- [38] THAKUR S, GOVENDER P, MAMO M, *et al.* Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond[J]. Vacuum, 2017, 146(5): 396-408.
- [39] ZHENG X J (郑学晶), LIU F B (刘芳蓓), PEI Y (裴莹), *et al.* Review on rheology of hydrogels[J]. Polymer Bulletin (高分子通报), 2017, (5): 1-10.
- [40] ZHANG Y X (张亿鑫). Synthesis and properties of CaCO₃/DNA-calcium alginate composite hydrogel[D]. Qingdao: Qingdao University (青岛大学), 2020.
- [41] GAO H X (高海霞). Preparation and photocatalytic properties of nano-ZnO/polymer composites[D]. Shanghai: East China Normal University (华东师范大学), 2007.
- [42] WANG L N, ZHANG H J, LIU X Q, *et al.* A physically cross-linked sodium alginate-gelatin hydrogel with high mechanical strength[J]. ACS Applied Polymer Materials, 2021, 3(6): 3197-3205.
- [43] ZHANG M, CHEN S, ZHONG L, *et al.* Zn²⁺-loaded TOBC nanofiber-reinforced biomimetic calcium alginate hydrogel for antibacterial wound dressing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 143: 235-242.