

生物酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料*

王艺峰** 郭雪成 王燕梅 韩 梅 耿增华 郭萌萌 王 霞

(武汉理工大学材料科学与工程学院高分子材料与工程系 武汉 430070)

摘 要 采用微生物转谷氨酰胺酶(mTG)进行修饰,制备了一种生物酶修饰的明胶与纳米银复合生物材料.原子力显微镜测试结果表明纳米银在复合材料中分散比较均匀,没有出现明显的团聚现象.凝胶形成实验和流变性能测试结果表明,mTG 酶能够催化明胶/纳米银复合体系进行反应并形成凝胶.与纯明胶材料相比,mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料的拉伸强度以及在水体系中的稳定性提高;并且该材料显示出了更好的细菌抑制作用,其对金黄色葡萄球菌的抑制率提高了 60.15%.因此,该材料在作为降低细菌感染和炎症反应的皮肤敷料和人工皮肤等生物医用材料领域将具有潜在的应用价值.

关键词 明胶, 纳米银, 微生物转谷氨酰胺酶, 生物材料

明胶是一种具有水溶性的胶原蛋白衍生物,它来源丰富广泛存在于自然界中,是皮肤、骨和结缔组织细胞外基质的重要组成部分^[1,2].明胶具有良好的生物降解性和生物相容性,在人造皮肤、伤口敷料以及愈合剂等方面具有十分广泛的应用价值^[2-4].然而,明胶本身属于蛋白质类物质,能够为细菌生长提供所需的营养物质,因此它容易滋生细菌^[5];此外,明胶材料的力学性能较差、质脆、耐水性差^[6],这些都极大地限制了明胶材料在生物材料和医疗领域的应用.

近年来,纳米银作为抗菌材料在生物医用材料领域中已得到应用^[7].由于具有纳米尺度,纳米银具有一些特殊的物理、化学和生物性能^[8].纳米银能够有效地杀灭细菌^[8,9],因此将纳米银引入到生物大分子材料来提高材料的抗菌性能已经受到广泛关注^[10-12].此外,纳米银的引入也能增强生物大分子材料的力学性能,例如 Rhim 等研究发现纳米银的引入能够改善壳聚糖材料的拉伸强度等力学性能^[13].

目前,采用生物酶修饰高分子材料的工作受到越来越多的研究者的关注^[14-16].然而,目前能够应用于高分子材料构建修饰(例如形成大分子之间的共价连接)的生物酶的种类很少^[17],因此关于此方面的研究工作也比较薄弱.值得关注的

是,微生物转谷氨酰胺酶(mTG)能够催化明胶分子中的谷氨酰胺上的 γ -羟酰胺基和赖氨酸上的 ϵ -氨基之间发生反应形成分子内或分子间的共价连接^[17,18],也有文献报道利用 mTG 酶对生物大分子明胶材料进行交联修饰^[19,21].Broderick 等用 mTG 酶作为修饰剂构建明胶蛋白质支架,经过 mTG 酶修饰的材料的力学性能和热稳定性显著增加^[22].

综上所述,采用纳米银与明胶进行复合,以及采用微生物转谷氨酰胺酶对明胶材料进行修饰,有利于提高材料的抗菌性能、稳定性和力学性能,然而这种采用 mTG 酶修饰的生物大分子明胶/纳米银复合材料我们鲜见文献报道.本工作制备了一种采用 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合材料,并对该材料的抗菌性能、力学性能等进行了分析.这些研究将为采用生物酶作为修饰剂,进行生物大分子与纳米粒子复合材料的制备及修饰研究提供新思路,这种具有更好抗菌性能、稳定性和力学性能的复合材料也将人造皮肤和伤口敷料等生物材料领域具有潜在的应用价值.

1 实验部分

1.1 实验试剂

明胶(来源于动物皮,国药集团化学试剂有

* 2014-03-18 收稿,2014-04-15 修稿;中央高校基本科研业务费专项资金(项目号 WUT: 2012-IV-001)、武汉理工大学自主创新研究基金(基金号 2013-ZY-009)和国家自然科学基金(基金号 50703030)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:yifengwang@whut.edu.cn

doi:10.11777/j.issn1000-3304.2014.14073

限公司);mTG 酶(Microbial transglutaminase, 130 U/g, 武汉远城科技发展有限公司);硝酸银、硼氢化钠、柠檬酸钠购于国药集团化学试剂有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, S. aureus)由中国典型培养物保藏中心提供;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料的制备

1.2.1 纳米银的制备

将 0.136 g 硝酸银加入到 200 mL 去离子水中,超声分散,再取 0.20 g 柠檬酸钠加入硝酸银溶液,搅拌均匀。将 0.191 g 硼氢化钠溶解在 15 mL 去离子水,在搅拌状态下,将硼氢化钠溶液以 20 滴/min 的速度滴加到上述溶液,搅拌 8 h,再将溶液进行离心(10000 r/min),沉淀物用无水乙醇洗涤多次,在 40 °C 真空干燥得到纳米银粒子。

1.2.2 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料的制备

称取 0.92 g mTG 酶加入到 40 mL 去离子水中过滤得到 mTG 酶溶液(3 U/mL)。取明胶加入到去离子水中,在 50 °C 下搅拌溶解得到质量体积浓度为 6% 的明胶溶液。将上述纳米银粉末加入去离子水中,超声分散,制备质量体积浓度为 0.25% 的纳米银分散液。向 50 mL 明胶溶液中加入 4 mL 纳米银分散液,搅拌均匀,再向溶液中加入 mTG 酶溶液(20 U/g-明胶),45 °C 下搅拌 30 min,采用流延法成膜,45 °C 下干燥得到 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合膜(m-G/nAg)。按照上述方法分别制备未加入 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合膜(G/nAg),mTG 酶修饰的明胶膜(m-G)以及纯明胶膜材料(G)作为对照样品。

1.3 紫外光谱测试和粒径分析

采用紫外可见分光光度计(UV-2550)对纳米银分散液的紫外吸收进行表征。采用动态光散射粒度分析仪(Zetasizer Nano S900)对纳米银粒子的粒径及其粒径分布进行测试。采用透射电子显微镜(Tecnai G220 S-TWIN, FEI)对纳米银粒子进行观察。

1.4 原子力显微镜测试

采用扫描探针显微镜(DI Nanoscope IV)在轻敲模式下对 mTG 酶修饰的明胶/纳米银膜的表面形貌进行观察。

1.5 凝胶形成实验和流变性能测试

采用试管倒置实验观察 mTG 酶催化明胶/纳

米银体系反应形成凝胶,将 6% 明胶溶液和 0.25% 纳米银分散液混合搅拌均匀,加入 mTG 酶(20 U/g-明胶)溶液到试剂瓶中搅拌均匀,然后在 45 °C 下静置反应,对反应瓶中的溶液流动情况和凝胶形成过程进行观察。

采用高级流变仪(AR2000, TA, USA)对体系的流变性能进一步分析。配制浓度为 6% 的明胶溶液和浓度为 0.25% 的纳米银分散液,将 2 种溶液混合搅拌均匀,再向混合溶液中加入 mTG 酶(20 U/g-明胶),搅拌均匀,45 °C 恒温 30 min,然后测试体系的弹性模量(G')和黏性模量(G'')随时间 t 的变化,测试时的应变设定为 $(5 \pm 1)\%$,扫描频率为 0.1 Hz,测试温度为 45 °C。

1.6 拉伸测试

材料的拉伸性能测试在万能试验机(CMT-650 型,深圳新三思材料检测有限公司)上进行,原始标距为 30 mm,拉伸速率为 40 mm/min。测试前选取无缺陷的 m-G/nAg 膜材料、G/nAg 膜材料以及 G 膜材料,将其裁成 70 mm × 10 mm 的横条。每个试样在标距内测量 5 个点,取其平均值,作为膜的厚度。每个试样重复测试 5 次取其平均值。

1.7 抗菌测试

材料的金黄色葡萄球菌的抗菌测试过程参考中华人民共和国轻工行业标准,《抗菌塑料-抗菌性能测试方法和抗菌效果》进行。测试时将连续转接 2 次的新鲜金黄色葡萄球菌培养物(12 h 转接的)加入培养液中,依次做 10 倍递增稀释,选择菌液浓度为 $5.0 \times 10^5 \sim 10.0 \times 10^5$ CFU/mL 的稀释液作为试验用菌液。参考 GB 4789.2《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》的方法操作。在每个培养管中加入 2 mL 菌液,然后分别加入 1 片测试样品膜片(10 mm × 10 mm),而不加入膜片的培养管作为空白对照组(control),37 °C 恒温振荡培养 12 h 后,用平板计数法计算出菌落数目。每组数据做两次平行试验,每个样品做 3 个平行抗菌测试。

2 结果与讨论

2.1 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料的制备

对所制备的纳米银分散液进行了紫外光谱分析,结果如图 1(a)所示,从图中可发现在 400 nm 左右出现了明显的吸收峰,说明得到了纳米银^[23];图 1(a)中内嵌图为 0.25% 纳米银分散液的照片,

可以发现分散液颜色为黑色,分散良好.该纳米银分散液的动态光散射粒度分析结果见图 1(b),测试表明纳米银的平均粒径为 4.3 nm,所制备的纳米银粒子尺寸较小,在水中分散良好;图 1(b)中内嵌图为纳米银粒子的透射电镜(TEM)照片,可以观察到纳米银粒子分散均匀,粒径大约在 4 nm 左右.

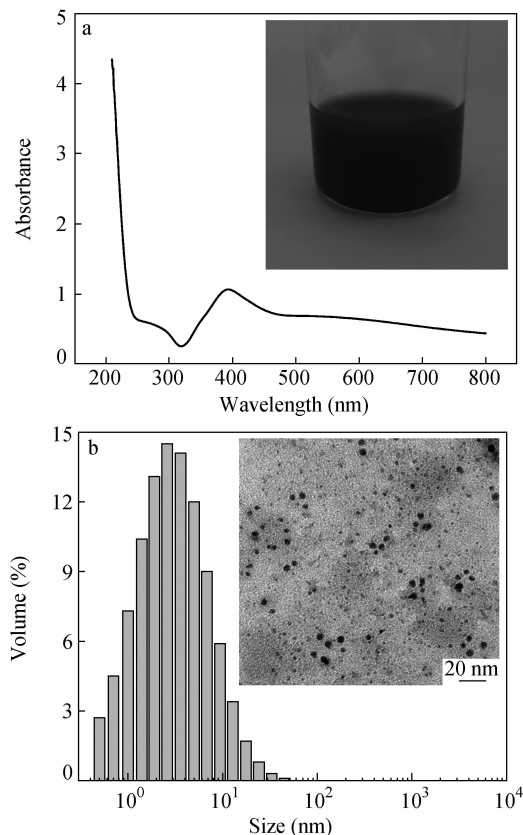


Fig. 1 UV-Visible spectrum of silver nanoparticles (a), and size distribution of silver nanoparticles (b)

mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合材料的制备过程示意图如图 2 所示.先将明胶加入到去离子水中在 50 ℃ 下搅拌溶解,然后取纳米银超声分散在去离子水中得到纳米银分散液,将其加入到明胶溶液中搅拌混合均匀,再将 mTG 酶溶液加入到上述溶液中混合均匀进行反应,将混合溶液倒入培养皿中,45 ℃ 下继续反应,最后干燥得到 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合膜(m-G/nAg).图 2 最右图所示为 m-G/nAg 膜的照片,该膜片表面无缺陷,十分光滑平整,并可根据尺寸需要任意进行裁剪.此外,相比于纯明胶膜,我们所制备的 m-G/nAg 复合膜由于引入了纳米银,膜片的颜色明显变深.

采用动态光散射粒度分析仪对明胶/纳米银复合溶液中的纳米银进行了测试,结果如图 3(a)所示,纳米银的平均粒径为 14.0 nm,纳米银粒子在复合溶液中分散较好.图 3(b)为 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合膜的 AFM 相位图,图中颜色较亮的颗粒状粒子为纳米银,粒径大约 20 nm 左右,它们在复合材料表面分布比较均匀,没有出现明显团聚现象.

2.2 体系的流变性能

试管倒置实验是一种简单方便的判断凝胶形成的方法^[24],采用试管倒置实验对 mTG 酶催化明胶/纳米银体系形成凝胶进行观察的结果如图 4 所示.未加入 mTG 酶的明胶/纳米银复合溶液始终具有流动性(如图 4(a));而加入 mTG 酶以后,随着酶催化反应的进行,溶液的黏度逐渐变大,流动性逐渐变差,最后失去流动性形成凝胶,

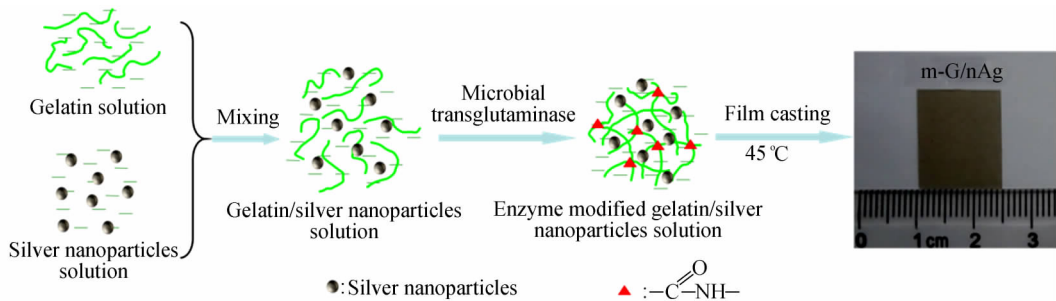


Fig. 2 Schematic diagram of preparation of microbial transglutaminase modified gelatin/silver nanoparticles composite material

此时即使倒置试剂瓶体系也不流动(如图 4(b)),该实验表明 mTG 酶可以催化明胶/纳米银复合体系反应形成凝胶.

采用流变仪进一步分析了 mTG 酶催化明胶/纳米银体系的流变性能,结果如图 5 所示.从图 5

(a)可以发现,在明胶与纳米银复合溶液中加入 mTG 酶后,虽然在测试过程中 G'' 和 G' 都变大,但是 G' 增加的速度比 G'' 快,经过 12 min 后, G' 超过 G'' ,而通常将开始出现 G' 大于 G'' 的点作为凝胶点的判断依据^[25],该测试结果也表明 mTG 酶能够

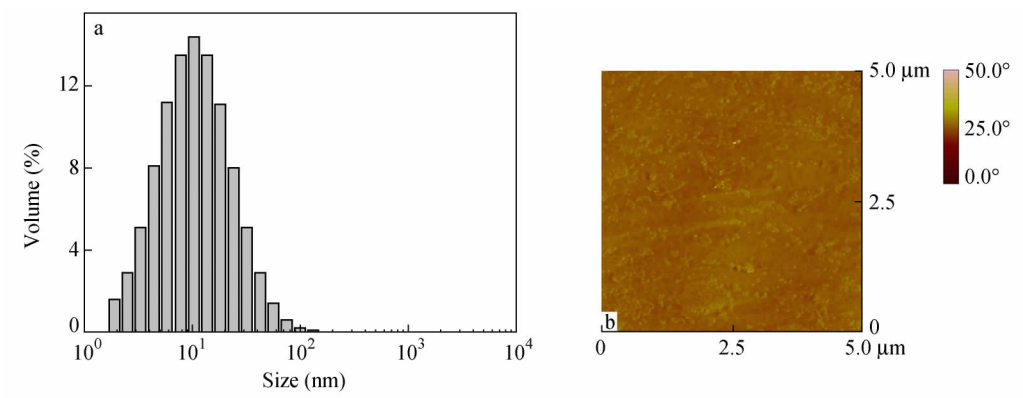


Fig. 3 Size distribution of silver nanoparticles in composite solution (a) , and AFM tapping mode image of m-G/nAg composite film (b)

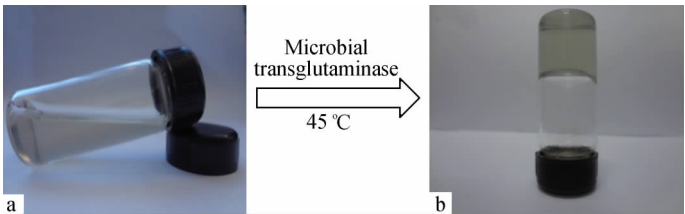


Fig. 4 Visual evidence of microbial transglutaminase catalyzed gel formation from vial inversion tests : (a) control sample without microbial transglutaminase and (b) Microbial transglutaminase catalyzed sample

催化明胶/纳米银体系反应形成凝胶. 图 5 (b) 可以发现,随着时间的变化,未加入 mTG 酶的明胶/纳米银复合溶液的 G'' 几乎没有变化(由于 G' 数值太小难以测定,所以未示出),表明该体系一直处于溶液状态,也说明未加入 mTG 酶的复合体系不能形成凝胶. 研究表明, mTG 酶能够催化明胶分子中的谷氨酰胺上的 γ -羟酰胺基和赖氨酸上的 ϵ -氨基之间发生反应形成分子内或分子间的共价连接^[17,18],并能够形成交联结构^[19-21]. 对上述体系流变性能的研究也表明 mTG 酶能够催化明胶/纳米银复合体系反应并形成凝胶.

2.3 材料在水体系中的稳定性和拉伸强度

生物材料在水体系中的稳定性直接关系到其在生物体体液环境下的使用,由于明胶材料在较高的温度下会在水体系中发生溶解,这极大地限制了它们在生物材料和医疗领域的应用. 本工作测试了材料在水体系中的稳定性,选取 G、G/nAg 以及 m-G/nAg 膜片材料,将它们分别裁成 10 mm × 10 mm 大小的膜片后置于表面皿中(如图 6(a)所示),然后在表面皿中加入 37 °C 的去离子水浸泡,观察膜片溶解情况和稳定性. 如图 6(b)所示,没有经过 mTG 酶修饰的 G 膜和 G/nAg 膜在 37 °C 的去离子水中浸泡 1 h 之后完全溶解;而 m-G/nAg 膜片在同样的条件下浸泡之后未发生溶

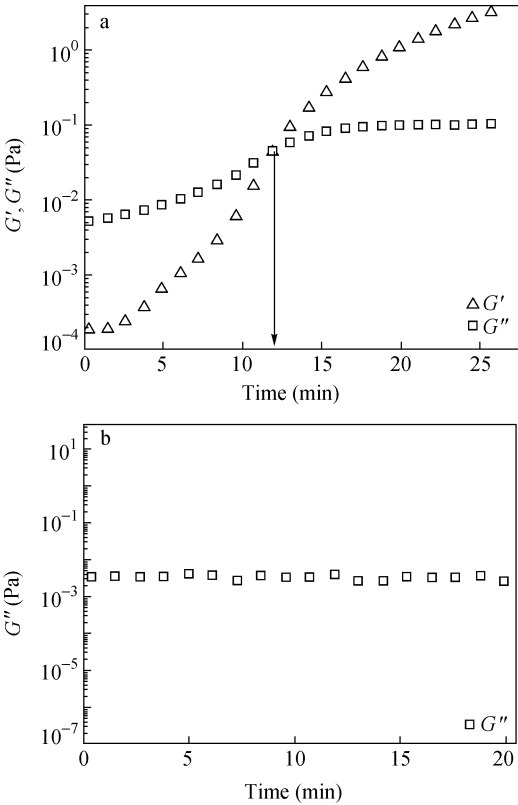


Fig. 5 Rheological detection of microbial transglutaminase catalyzed conversion of gelatin/silver nanoparticles solution to gel at 45 °C : (a) microbial transglutaminase catalyzed sample and (b) control sample without microbial transglutaminase

解,只产生溶胀;继续将 m-G/nAg 膜片浸泡 12 h 以上,也未发生溶解.该结果说明,采用 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合材料能够在明胶分子内或

分子间形成共价连接,从而在材料中形成交联结构,因此在 37 ℃ 的去离子水中不发生溶解,有效改善了材料在水体系中的稳定性.

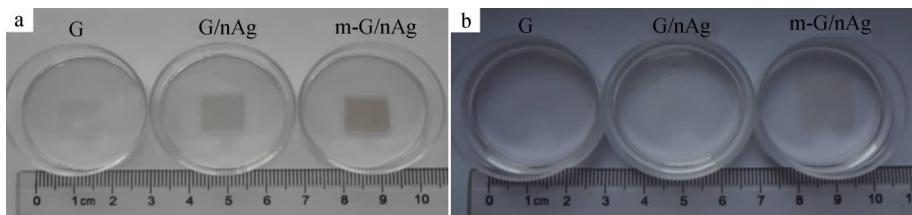


Fig. 6 Photographs of G film, G/nAg film and m-G/nAg film before immersing in aqueous medium (a), and after immersing in aqueous medium (b) at 37 ℃

图 7 示出了 G 膜、G/nAg 膜以及 m-G/nAg 膜的拉伸强度.从图 7 中可以看出,G 膜的拉伸强度为 45.60 MPa,而 G/nAg 复合膜的拉伸强度为 50.94 MPa,这说明纳米银的引入使明胶膜的拉伸强度略有提高,而相关文献也报道了纳米银的引入能够改善生物大分子材料壳聚糖的力学性能^[12].采用 mTG 酶修饰的 m-G/nAg 复合膜的拉伸强度为 60.48 MPa,相比于 G 膜和 G/nAg 膜进一步提高,这表明采用 mTG 酶修饰的明胶/纳米银复合材料能够形成共价连接和交联结构,从而有利于进一步提高材料的拉伸强度和力学性能.

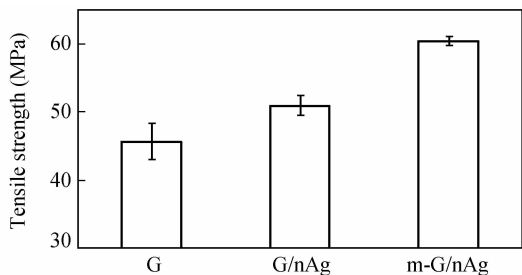


Fig. 7 Tensile strength of G film, G/nAg film and m-G/nAg film

2.4 抗菌性能

用于人造皮肤和伤口敷料等方面的生物材料往往需要满足一定的抗菌要求,因为在临床应用中伤口的细菌感染会很大程度的影响伤口的愈合^[26].图 8 示出了不同材料对金黄色葡萄球菌的抑制作用.从图中可以看出,经过 12 h 培养后,未加入纳米银的 m-G 材料的金黄色葡萄球菌浓度为 1.04×10^8 CFU/mL,相对于 Control(金黄色葡萄球菌浓度为 0.80×10^8 CFU/mL)具有更高的金黄色葡萄球菌浓度,这说明 mTG 酶修饰的明胶材料不具有对金黄色葡萄球菌的抑制作用,相反它

能够作为蛋白质类营养物质促进金黄色葡萄球菌的生长.而 m-G/nAg 复合材料的金黄色葡萄球菌浓度为 0.415×10^8 CFU/mL,与明胶材料相比下降了 60.15%,这说明我们制备的生物酶修饰的明胶/纳米银复合生物材料对金黄色葡萄球菌的抑制作用显著增加.明胶材料由于具有良好的生物相容性、生物降解性和无细胞毒性等优点,被应用于人造皮肤等生物医用材料领域,但是它不具有抗菌活性,这极大地限制了其在生物医用材料领域的应用.Ahmad 等研究表明纳米银能够有效抑制革兰氏阳性细菌大肠杆菌、铜绿假单胞菌和革兰氏阴性细菌金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌的增殖^[10],我们的研究也表明纳米银的加入也能提高材料的抑菌性能.

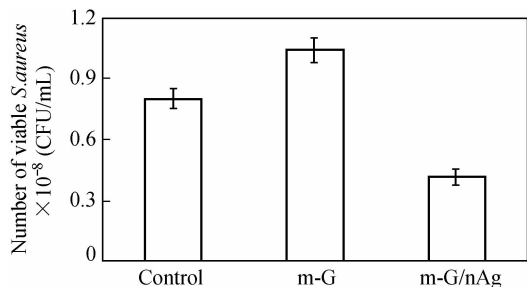


Fig. 8 Number of viable *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in the medium after incubating with Control, m-G film, and m-G/nAg film for 12 h

3 结论

本工作首先制备了在水中分散良好的纳米银粒子,再采用生物酶作为修饰剂制备得到 mTG 酶修饰的明胶与纳米银粒子复合生物材料.测试结果表明,纳米银粒子在复合材料中分散比较均匀,未出现明显团聚现象;mTG 酶能够催化明胶/纳

米银复合体系反应并形成凝胶;与明胶材料相比, 该材料在人造皮肤、伤口敷料等生物材料领域将
该材料在水体系中的稳定性、拉伸强度、以及对金 具有潜在的应用价值.
黄色葡萄球菌的抗菌性能均有明显的提高,因此

REFERENCES

1 Cao Moyuan(曹墨源),Chen Zhengjian(陈正坚),Tu Kehua(涂克华),Wang Liquan(王利群),Jiang Hongliang(蒋宏亮). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(11):1157~1161

2 Mao J S,Zhao L G,Yao K D,Shang Q X,Yang G H,Cao Y L. J Biomde Mater Res A,2003,64(2):301~308

3 Balakrishnan B,Mohanty M,Uماشankar P R,Jayakrishnan A. Biomaterials,2005,26(32):6335~6342

4 Sung H W,Huang D M,Chang W H,Huang L H,Tsai C C,Liang I. J Biomater Sci,Polym Ed,1999,10(7):751~771

5 Koser S A,Chinn B D,Saunders F. J Bacteriol,1938,36:57~65

6 Pei Ying(裴莹),Zhang Lina(张俐娜),Wang Huiyuan(王慧媛),Zhang Xianzheng(张先正),Xu Min(徐敏). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2011,(9):1098~1104

7 Chaloupka K,Malam Y,Seifalian A M. Trends Biotechnol,2010,28(11):580~588

8 Chen X,Schluesener H J. Toxicol Lett,2008,176(1):1~12

9 Kim J S,Kuk E,Yu K N,Kim J H,Park S J,Lee H J,Kim S H,Park Y K,Park Y H,Hwang C Y,Kim Y K,Lee Y S,Jeong D H,Cho M H. Nanomed- Nanotechnol,2007,3(1):95~101

10 Ahmad M B,Lim J J,Shameli K,Ibrahim N A,Tay M Y,Chieng B W. Chem Cent J,2012,6(1):1~9

11 Kim S C,Kim J W,Yoon G J,Nam S W,Lee S Y. Curr Appl Phys,2013,13:48~53

12 Reiad N A,Abdel Salam O E,Abadir E F,Harraz F A. Chinese J Polym Sci,2013,31(7):984~993

13 Rhim J W,Hong S I,Park H M,Perry K W. J Agric Food Chem,2006,54(16):5814~5822

14 Feng Jun(冯俊),Wang Huafen(王华芬),Li Shuangfeng(李双凤),Zhuo Renxi(卓仁禧). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2008,(7):686~690

15 Zeng Qinghui(曾庆慧),Tian Ye(田冶),Zhou Changren(周长忍),Luo Binghong(罗丙红). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2012,(6):593~598

16 Hou Jingwen(侯静文),Guo Shengrong(郭圣荣). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2009,(8):796~802

17 Wu L Q,Bentley W E,Panye G F. INT. J Artif Organs,2011,34(2):215~224

18 Liu Y,Terrell J L,Tsao C Y,Wu H C,Javvaji V,Kim E,Chen Y,Wang Y,Ulijn R V,Raghavan S R,Rubloff G W,Bentley W E,Payne G F. Adv Funct Mater,2012,22(14):3004~3012

19 Chang S T,Chen L C,Lin S B,Chen H H. Food Hydrocolloids,2012,27(1):137~144

20 Jongjareonrak A,Benjakul S,Visessanguan W,Tanaka M. Food Hydrocolloids,2006,20(8):1216~1222

21 Fuchs S,Kutscher M,Hertel T,Winter G,Pietzsch M,Coester C. J Microencapsul,2010,27(8):747~754

22 Broderick E P,O'Halloran D M,Rochev Y A,Griffin M,Collighan R J,Pandit A S. J Biomed Mater Res B,2005,72(1):37~42

23 Suber L,Sondi I,Matičević E,Goia D V. J Colloid Interf Sci,2005,288(2):489~495

24 Liu Y,Javvaji V,Raghavan S R,Bentley W E,Payne G F. J Agric Food Chem,2012,60(36):8963~8967

25 Chen T H,Embree H D,Brown E M,Taylor M M,Payne G F. Biomaterials,2003,24(17):2831~2841

26 Xiao B,Wan Y,Zhao M,Liu Y,Zhang S. Carbohydr Polym,2011,83(1):144~150

Enzyme-modified Gelatin/Silver Nanoparticle Composite Biomaterial

Yi-feng Wang^{*}, Xue-cheng Guo, Yan-mei Wang, Mei Han, Zeng-hua Geng, Meng-meng Guo, Xia Wang

(Department of Polymer Materials and Engineering, School of Materials Science and Engineering,

Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

Abstract An enzyme-modified gelatin/silver nanoparticle composite biomaterial was prepared in this work. The silver nanoparticles were prepared in aqueous solution at first. Then, the blend of gelatin and silver nanoparticles was used as the composite matrix, and microbial transglutaminase (mTG) was employed as the biological modifier. Atomic force microscopy tests show that silver nanoparticles are distributed uniformly on the surface of the composite material, and no obvious aggregation of silver nanoparticles was observed. Vial inversion tests and rheological measurements both confirm that the gel formation and the covalent junctions of the composite can be triggered by microbial transglutaminase. Microbial transglutaminase can crosslink gelatin molecules by catalyzing the transamidation of glutamine and lysine residues to form covalent junctions. The mTG-modified gelatin/silver nanoparticle composite material has better stability in aqueous medium at a moderately high temperature due to the formation of covalent junctions and crosslinks. The results of tensile tests show that the tensile strength of mTG-modified gelatin/silver nanoparticle composite films increases after enzymatic modification. In addition, compared with the mTG-modified gelatin material lacking silver nanoparticles, the mTG-modified gelatin/silver nanoparticle composite material shows better *in vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The viable cell number of *Staphylococcus aureus* of mTG-modified gelatin/silver nanoparticle composite material decreases by 60.15%. With its improved antibacterial activity, stability in aqueous medium, and mechanical strength, this mTG-modified gelatin/silver nanoparticle composite material could be a promising candidate in future applications of skin biomaterial.

Keywords Gelatin, Silver nanoparticles, Microbial transglutaminase, Biomaterial

* Corresponding author: Yi-feng Wang, E-mail: yifengwang@whut.edu.cn