

# 一种生物外科补片的制备方法及基于该方法制备的生物外科补片及其应用

## 交叉引用

本申请要求2019年7月1日提交的专利名称为“一种生物外科补片的制  
5 备方法及基于该方法制备的生物外科补片”的第201910584735.6号中国专  
利申请的优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

## 技术领域

本发明涉及生物材料技术领域，具体涉及一种生物外科补片的制备方  
法及基于该方法制备的生物外科补片及其应用。

## 10 背景技术

生物外科补片的现有制备方法为直接发酵，且为发酵过程中不添加其  
他成分的静态发酵方法，根据发酵时间的长短控制所得的细菌纤维素膜的  
厚度，从而间接调节膜材料的机械性能，固发酵时间长、膜材料的机械性  
能提升不明显，孔径密集，不利于细胞、组织的增殖，难以满足临床的需  
15 求。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种生物外科补片的制备方法及基于该方法  
制备的生物外科补片及其应用。本发明所述制备方法得到的生物外科补片  
具有良好的生物相容性、力学性能、缝合性能及临床使用便利性，可以满  
20 足作为外科补片材料的基本要求。

本发明提供了一种生物外科补片的制备方法，包括以下步骤：

- 1) 将菌种进行发酵培养，得到细菌纤维素膜；所述发酵培养过程中  
添加生物高分子材料；所述生物高分子材料包括聚乳酸、聚酰胺、聚酯、  
甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯中的一种或多种；
- 25 2) 将步骤1)得到的细菌纤维素膜依次在无机碱液和酸溶液中浸泡，  
得到纯化后的细菌纤维素膜；

3) 将步骤 2) 得到的纯化后的细菌纤维素膜浸入氧化剂溶液中进行氧化, 得到氧化后的细菌纤维素膜;

4) 将步骤 3) 得到的氧化后的细菌纤维素膜进行冻融, 得到冻融后的细菌纤维素膜;

5) 将步骤 4) 得到的冻融后的细菌纤维素膜置于甘油水溶液中搅拌, 干燥, 得到复合处理后的细菌纤维素膜;

6) 将步骤 5) 得到的复合处理后的细菌纤维素膜进行静电纺丝, 得到生物外科补片中间品; 所述静电纺丝液包括聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液; 所述溶液的溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、乙醚、正己烷、石油醚中的一种或多种;

7) 将步骤 6) 得到的生物外科补片中间品进行冷冻干燥、压膜得到生物外科补片。

优选的是, 步骤 1) 所述发酵培养用培养基每 1000mL 中包括: 甘露醇 20~25g, 聚乙二醇 10~15g, 蔗糖 25~30g, 葡萄糖 15~20g, 烟酸 0.5~0.8mg, 酵母粉 5~6g, 玉米浆干粉 10~15g, 牛肉膏 5~10g, 蛋白胨 5~10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5~2.5g,  $\text{MgSO}_4$  2.0~2.5g, 无水乙醇 8~10g, 硫酸铵 0.5~0.8g, 柠檬酸 0.5~0.6g, 羧甲基纤维素钠 0.5~0.6g 和葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的混合物 40~50g; 所述葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的质量比为 1: (1~5)。

优选的是, 步骤 1) 所述菌种包括醋酸菌属、根瘤菌属、葡糖酸杆菌属、木醋杆菌属、八叠球菌属、假单胞菌属、无色杆菌属、产碱菌属、气杆菌属、固氮菌属和土壤杆菌属中的一种或多种。

优选的是, 步骤 1) 所述发酵培养的条件为在 20~40°C、通氧量为 0.01~10L/min、pH 值为 3~9 的条件下发酵培养 6~14d。

优选的是, 当步骤 1) 中所述生物高分子材料包括两种及以上时, 按照聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯的顺序逐一添加。

优选的是，步骤3)所述氧化剂为包括过氧化氢、次氯酸钠、过氧化钠、过氧化钾、过氧乙酸、过碳酸钠、过硼酸钠和过硼酸钾中的一种或几种的水溶液。

5 优选的是，所述过氧化氢、次氯酸钠、过氧化钠、过氧化钾、过氧乙酸、过碳酸钠、过硼酸钠和过硼酸钾在水中的质量分数分别为1~50%。

优选的是，步骤4)所述冻融为：置于-45~-1℃下冷冻0.2~10h，取出置于5~35℃环境下融冰0.2~10h，将融化后的水分倒掉；重复上述冷冻、融冰操作2~9次。

10 优选的是，步骤6)所述静电纺丝液中聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈或聚碳酸酯的质量浓度分别为0.01~5g/mL。

优选的是，步骤6)中复合处理后的细菌纤维素膜与聚乳酸、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚偏氟乙烯、壳聚糖或聚己内酯的质量比分别为(0.1~3):10。

15 本发明还提供了基于上述技术方案所述制备方法制备得到的生物外科补片。

本发明所述生物外科补片由细菌纤维素构成，并具有纳米网络结构。

优选地，所述细菌纤维素干态及湿态强度高，其微纤维的杨氏模量可以为10-1000GPa(优选为50-200GPa)，拉伸强度可以为0.1-100GPa(优选为1-20GPa，更优选为2-10GPa)。

20 其中，所述细菌纤维素的单元是原微纤维，其直径为0.1-50nm(优选为1.0-10nm)，由若干个 $\beta$ -1,4-葡聚糖结合而成，并具有三重螺旋结构。这些原微纤维聚集形成微纤维，微纤维进一步聚集成带状结构的束状组装纤维，由此形成本发明所述的纳米网络结构。

25 在本发明的一个实施方案中，所述微纤维的直径为0.1-20nm。在本发明的另一个实施方案中，所述纳米网络结构中的纤维(即所述束状组装纤维)的直径为10-200nm。该束状组装纤维与胶原纤维束尺寸相当。

其中，纤维素链(即上述束状组装纤维)的装配过程是一个显著的动力

学过程，所得到的纳米网络结构的孔隙率和孔径等能在一定范围内调控。在本发明的一个实施方案中，所述纳米网络结构的孔隙率为 60%-99%；孔径为 10-500nm。

5 本发明所述生物外科补片为利用现代生物发酵技术制备而成，具有优异的力学性能和生物学性能。并且，本发明所述生物外科补片的生物相容性好，为纯纤维素材料，为非动物源性，无免疫原性风险，无有机溶剂残留风险，生物相容性优异，能够满足不同临床需求。

在本发明的另一个方面，还提供了本发明所述生物外科补片在制备医药用途的修复材料中的应用。本发明所述医药用途包括但不限于：用于神经外科（硬脑脊膜）、普外科（腹壁疝、腹壁缺损、腹股沟疝、乳房补片、盆底补片等）、心血管科（房、室间隔）。具体地，本发明所述生物外科补片可用作硬脑脊膜、乳房补片、盆底补片、房、室间隔等，或可用作治疗腹壁疝、腹壁缺损、腹股沟疝的修复材料。

15 本发明提供了一种生物外科补片的制备方法。本发明所述制备方法的制备基材为经生物发酵制得的细菌纤维素膜；将生物发酵制得的细菌纤维素膜经纯化处理、氧化处理、冻融处理、复合工艺处理，静电纺丝处理、冷冻干燥处理和压膜处理制备得到生物外科补片。本发明采用微生物经静态/动态法发酵制得的细菌纤维素膜，通过在发酵过程中添加适量生物高分子材料，其拉伸强度、缝合强度等性能可以满足临床上对生物外科补片的要求；且所述细菌纤维素膜通过化学方法提高了材料的孔径，能够促进细胞组织的增殖；所述细菌纤维素膜经静电纺丝工艺在其表面覆盖一层具有抑菌和可降解功能的生物高分子涂层后，得到的生物外科补片能起到抑菌防感染，预防组织粘连的作用，对患者术后的快速恢复具有重大意义。本发明所述生物外科补片采用细菌纤维素膜为基材，相比其它动物源性基  
20 材，具有来源广泛、成本低廉且在临床上的应用更加安全的优点。本发明通过发酵条件的改进使所得细菌纤维素膜厚度和力学性能更好的满足临床使用需求，化学处理和冻溶干燥方法得到更适于人体组织细胞生长的支

架材料，静电纺丝使生物补片获得抑菌、防黏连的功效，所以产生了缝合强度、生物相容性大大提高的效果。本发明所述制备方法得到的生物外科补片具有良好的生物相容性、力学性能、缝合性能及临床使用便利性，可以满足作为外科补片材料的基本要求。

## 5 附图说明

图 1 为本发明提供的生物外科补片实物图（经裁剪后）；

图 2 为本发明提供的生物外科补片 SEM 图（放大 5000 倍）。

## 具体实施方式

本发明提供了一种生物外科补片的制备方法，制备基材为经生物发酵制得的细菌纤维素膜；将经生物发酵制得的细菌纤维素膜经纯化处理、氧化处理、冻融处理、复合工艺处理，静电纺丝处理、冷冻干燥处理和压膜处理，得到生物外科补片；

所述生物外科补片的制备方法包括以下步骤：

1) 将菌种进行发酵培养，得到细菌纤维素膜；所述发酵培养过程中添加生物高分子材料；所述生物高分子材料包括聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯中的一种或多种；

2) 将步骤 1) 得到的细菌纤维素膜依次在无机碱液和酸溶液中浸泡，得到纯化后的细菌纤维素膜；

3) 将步骤 2) 得到的纯化后的细菌纤维素膜浸入氧化剂溶液中进行氧化，得到氧化后的细菌纤维素膜；

4) 将步骤 3) 得到的氧化后的细菌纤维素膜进行冻融，得到冻融后的细菌纤维素膜；

5) 将步骤 4) 得到的冻融后的细菌纤维素膜置于甘油水溶液中搅拌，干燥，得到复合处理后的细菌纤维素膜；

6) 将步骤 5) 得到的复合处理后的细菌纤维素膜进行静电纺丝，得到生物外科补片中间品；所述静电纺丝液包括聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液；所述溶液的溶剂为二氯甲烷、

三氯甲烷、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、乙醚、正己烷、石油醚中的一种或多种；

7) 将步骤 6) 得到的生物外科补片中间品进行冷冻干燥、压膜得到生物外科补片。

- 5 本发明将菌种进行发酵培养，得到细菌纤维素膜；所述发酵培养过程中添加生物高分子材料；所述生物高分子材料包括聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯中的一种或多种。本发明优选先将菌种进行活化、扩大培养，得到种子液，将种子液接种至发酵培养基中进行发酵培养，得到细菌纤维素膜；所述菌种优选包括醋酸菌属、根瘤菌
- 10 属、葡萄糖杆菌属、木醋杆菌属、八叠球菌属、假单胞菌属、无色杆菌属、产碱菌属、气杆菌属、固氮菌属和土壤杆菌属中的一种或多种；所述发酵培养优选为在 20~40°C、通氧量为 0.01~10L/min、pH 值为 3~9 的条件下发酵培养 6~14d，在发酵的第一天和第三天优选分别加入发酵液体积 1~5%的甘露醇和 1~10%的聚乙二醇；本发明所述发酵培养过程中添加生
- 15 物高分子材料；所述生物高分子材料包括聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯中的一种或多种。在本发明中，当所述生物高分子材料包括多种时，优选按照聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯的顺序逐一添加，如当所述生物高分子材料包括聚酯和聚氯乙烯时，先添加聚酯，再添加聚氯乙烯；
- 20 当所述生物高分子材料包括甘油、聚己内酯和聚乙烯时，本发明先添加甘油，然后是聚己内酯，最后是聚乙烯。在本发明中，所述生物高分子材料的添加能够加速细菌纤维素膜的发酵，同时增强细菌纤维素膜的力学性能和微孔结构，使得细菌纤维素膜满足不同临床需求。在本发明中，所述发酵培养基每 1000mL 中包括：甘露醇 20~25g，聚乙二醇 10~15g，蔗糖
- 25 25~30g，葡萄糖 15~20g，烟酸 0.5~0.8mg，酵母粉 5~6g，玉米浆干粉 10~15g，牛肉膏 5~10g，蛋白胨 5~10g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5~2.5g，MgSO<sub>4</sub> 2.0~2.5g，无水乙醇 8~10g，硫酸铵 0.5~0.8g，柠檬酸 0.5~0.6g，羧甲基纤维素钠 0.5~0.6g

和葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的混合物 40~50g; 所述葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的质量比为 1: (1~5), 更优选为 1: 3.5。在本发明中, 所述发酵培养的条件优选为在 30°C、通氧量为 1.0 L/min、pH 值为 6.0 的条件下发酵培养 8d。在本发明中, 所述细菌纤维素膜的厚度为 0.05~2.0cm, 更优选为 0.5cm。

5 得到细菌纤维素膜后, 本发明将细菌纤维素膜依次在无机碱液和酸溶液中浸泡, 得到纯化后的细菌纤维素膜。本发明优选先将细菌纤维素膜进行第一清洗, 将第一清洗后的细菌纤维素膜在无机碱液中浸泡 0.5~5h, 加热煮沸 1~5h, 进行第二清洗, 在酸溶液中浸泡 0.5~5h, 进行第三清洗, 得到纯化后的细菌纤维素膜; 所述第一清洗、第二清洗和第三清洗独立的  
10 为在注射用水中浸泡搅拌 3~60min, 倒掉注射用水。在本发明中, 所述第一清洗、所述第二清洗和所述第三清洗的次数优选为 5 次。在本发明中, 所述第一清洗优选为将细菌纤维素膜的 pH 洗至 4.0~8.0, 更优选为 6.0。在本发明中, 所述无机碱液包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钡、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌、碳酸钠、碳酸氢钠溶液  
15 中的一种或多种; 所述无机碱液的质量浓度为 0.1~5.0mol/L, 温度为 60~100°C。在本发明中, 所述酸溶液包括醋酸、柠檬酸、乳酸、草酸、甲酸、棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸等有机酸中的一种或多种。

得到纯化后的细菌纤维素膜后, 本发明将纯化后的细菌纤维素膜浸入氧化剂溶液中进行氧化, 得到氧化后的细菌纤维素膜。本发明优选将纯化  
20 后的细菌纤维素膜浸入氧化剂溶液中, 搅拌 5~60min, 真空抽滤, 淋洗后, 得到氧化后的细菌纤维素膜。在本发明中, 所述氧化剂为质量分数分别为 1~50% 的过氧化氢、次氯酸钠、过氧化钠、过氧化钾、过氧乙酸、过碳酸钠、过硼酸钠和过硼酸钾水溶液中的一种或几种。在本发明中, 所述氧化能够使所述细菌纤维素膜的孔径满足组织细胞生长繁殖要求, 促进组织生  
25 长。在本发明中, 所述真空抽滤优选为将细菌纤维素膜装在玻璃柱中, 启动真空泵进行抽滤, 抽滤后优选使用注射用水对细菌纤维素膜进行淋洗。在本发明中, 所述淋洗至淋洗液中细菌内毒素的含量小于等于 0.03EU/ml

时停止。在本发明中,所述淋洗优选为将细菌纤维素膜的 pH 洗至 4.0~8.0,更优选为 6.0。

得到氧化后的细菌纤维素膜后,本发明将氧化后的细菌纤维素膜进行冻融,得到冻融后的细菌纤维素膜。本发明优选将氧化后的细菌纤维素膜置于-45~-1°C下冷冻 0.2~10h,取出置于 5~35°C环境下融冰 0.2~10h,将融化后的水分倒掉;重复上述冷冻、融冰操作 2~9 次,取最后一次融冰的细菌纤维素膜,将融化后的水分倒掉,得到冻融后的细菌纤维素膜。

得到冻融后的细菌纤维素膜后,本发明将冻融后的细菌纤维素膜置于甘油水溶液中搅拌,干燥,得到复合处理后的细菌纤维素膜。优选的,本发明将冻融后的细菌纤维素膜置于质量分数为 0.5~3%的甘油水溶液中,20rpm~1000rpm 下搅拌 0.5~4h,本发明优选平铺于不锈钢网上进行干燥,干燥得到复合处理后的细菌纤维素膜。在本发明中,所述干燥的条件为:10~99°C干燥 0.5~24h,更优选为 65°C。在本发明中,所述甘油水溶液中甘油的质量分数优选为 3.85%。在本发明中,所述搅拌的条件优选为 20~1000rpm 搅拌 0.5~4h,最优选为 500rpm 搅拌 4h。在本发明中,所述不锈钢网的面积优选为 20~100cm\*20~100cm,目数优选为 100~50 目,本发明所述平铺时优选要保证复合膜材料平整、和不锈钢网之间无气泡产生。本发明对所述干燥的方式没有特殊限定,优选在鼓风干燥箱中进行干燥。本发明复合处理后的细菌纤维素膜为生物外科补片基材,本发明所述生物补片基材的纤维直径优选为 0.05~0.5 $\mu$ m;厚度优选为 2~2000 $\mu$ m,尺寸为 a cm\*b cm ( $2\leq a\leq 10$ ,  $2\leq b\leq 10$ ),形状优选为矩形、圆形、椭圆形或不规则形状。

得到复合处理后的细菌纤维素膜后,本发明将复合处理后的细菌纤维素膜进行静电纺丝,得到生物外科补片中间品;所述静电纺丝液包括聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液;所述溶液的溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、乙醚、正己烷、石油醚中的一种或多

种。本发明优选将复合处理后的细菌纤维素膜固定于静电纺丝设备接收装置上，将静电纺丝液装入注射器中，进行静电纺丝，得到生物外科补片中间品；所述静电纺丝液包括含质量浓度为 0.01~5g/mL 聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液；所述溶液的溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、乙醚、正己烷、石油醚中的一种或多种；所述冻融干燥后的细菌纤维素膜与聚乳酸、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚偏氟乙烯、壳聚糖或聚己内酯的质量比分别为 (0.1~3):10；所述静电纺丝的条件为：正极电压 10~30KV，负极电压-0.1~-10KV，接受距离 5~30cm。在本发明中，所述静电纺丝液优选包括含质量浓度为 0.2~5g/mL 聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液。当所述静电纺丝液为聚乳酸-二氯甲烷溶液和聚己内酯-二氯甲烷溶液时，本发明优选将聚乳酸-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝，得到生物外科补片中间品 A1，再将聚己内酯-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A2；本发明对不同静电纺丝液的使用顺序没有限定，比如聚乳酸-二氯甲烷溶液和聚己内酯-二氯甲烷溶液的静电纺丝顺序可以调换。在本发明中，所述冻融干燥后的细菌纤维素膜与聚乳酸、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚偏氟乙烯、壳聚糖或聚己内酯的质量比分别优选为 1:10、1:8、1:8、1:10、1:5、1:8。在本发明中，所述静电纺丝的条件优选为：正极电压 20KV，负极电压 2KV，接受距离 15cm。本发明所述细菌纤维素膜经静电纺丝工艺在其表面覆盖一层具有抑菌和可降解功能的生物高分子涂层后，得到的生物外科补片能起到抑菌防感染，预防组织粘连的作用。

得到生物外科补片中间品后，本发明将生物外科补片中间品进行冷冻干燥、压膜得到生物外科补片。本发明优选将生物外科补片中间品浸泡于体积浓度为 50~99%的乙醇水溶液中 10~60min，取出后浸入注射用水中浸泡 10~60min，冷冻干燥得到冷冻干燥的生物外科补片中间品。得到冷冻干燥的生物外科补片中间品后，本发明将冷冻干燥后的生物外科补片中间

品进行压膜，得到生物外科补片。在本发明中，所述压膜的厚度为0.01mm~10mm。在本发明中，所述生物外科补片优选裁剪成5~100mm\*5~100mm规格，经内包、外包、灭菌、包装后，得到生物外科补片产品。在本发明中，所述灭菌优选包括微波、紫外线、X射线、 $\gamma$ 射线、电子束和Co60灭菌方式中的一种或多种，当所述灭菌方式为Co60时，剂量优选为5~50KGy，更优选为25KGy。

本发明还提供了基于上述技术方案所述制备方法制备得到的生物外科补片。本发明所述生物外科补片实物图如图1所示，SEM图如图2所示。本发明采用微生物经静态/动态法发酵制得的细菌纤维素膜，通过在发酵过程中添加适量生物高分子材料，其拉伸强度、缝合强度等性能可以满足临床上对生物外科补片的要求；且所述细菌纤维素膜通过化学方法提高了材料的孔径，能够促进细胞组织的增殖；所述细菌纤维素膜经静电纺丝工艺在其表面覆盖一层具有抑菌和可降解功能的生物高分子涂层后，得到的生物外科补片能起到抑菌防感染，预防组织粘连的作用，对患者术后的快速恢复具有重大意义。本发明所述生物外科补片采用细菌纤维素膜为基材，相比其它动物源性基材，具有来源广泛、成本低廉且在临床上的应用更加安全的优点。

下面结合具体实施例对本发明所述的一种生物外科补片的制备方法以及基于该方法制备的生物外科补片做进一步详细的介绍，本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

### 实施例1

步骤1) 培养基的配制：称取甘露醇20g，聚乙二醇15g，蔗糖25g，葡萄糖20g，烟酸0.5mg，酵母粉5g，玉米浆干粉10g，牛肉膏5g，蛋白胨10g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g， $\text{MgSO}_4$  2g，无水乙醇8g，硫酸铵0.5g，柠檬酸0.5g，羧甲基纤维素钠0.5g，葡萄糖酸10g，葡萄糖酸钠40g，加入1000mL纯化水中。

步骤2) 发酵：取产纤维素膜的微生物菌种活化，得活化菌种，将活

化菌种转移至不锈钢托盘扩大培养，得到种子液，放于 37℃恒温培养箱中培养 10 天，在发酵的第一天和第三天分别加入 2%的甘露醇和 5%的聚乙二醇，且整个发酵过程维持体系 pH 为 6.8，通氧量 0.4L/min，发酵完成后，在发酵液上层得到一层细菌纤维素膜，将细菌纤维素膜取出备用；

- 5 步骤 3)清洗及前处理: 使用注射用水清洗发酵所得的细菌纤维素膜，直至所述细菌纤维素膜的 pH 为 6，然后将其放入灭菌注射用水配制的 1L 的 0.5mol/L 的氢氧化钠溶液中，浸泡 5h，再加热煮沸 2h，取出，用灭菌注射用水浸泡并搅拌 50min，直至拧出液 pH 为 6.0，再转移至灭菌注射用水配制的 1L 的 1mol/L 的醋酸、柠檬酸混合溶液中，其中醋酸、柠檬酸的物质的量之比为 4:1，浸泡 5h 后取出，再用注射用水浸泡并用玻璃棒进行搅拌 3min，倒掉洗涤后的注射用水。

- 步骤 4)氧化及纯化处理: 将步骤 3)中所得的细菌纤维素膜转移至 15%的过氧化氢溶液中，浸泡及搅拌 30min，取出装于玻璃柱中，启动真空泵进行抽滤，以注射用水作为淋洗液对细菌纤维素膜进行持续淋洗，并对淋洗液进行检测，所得细菌内毒素的含量小于等于 0.03EU/ml，即得到纯化的细菌纤维素膜；

步骤 5)冻融干燥处理: 置于-45℃环境下冷冻 0.2h，取出置于 5℃环境下融冰 10h，将融化后的水分倒掉；重复以上操作 2 次。取最后一次融冰的细菌纤维素膜，将融化后的水分倒掉，留存备用；

- 20 步骤 6) 复合过程: 将细菌纤维素膜放于 0.5%的甘油溶液中进行搅拌，转速为 1000rpm，时间为 0.5h，完成后平铺于不锈钢网上，转移至鼓风干燥箱中进行干燥，此时温度为 10℃，时间为 24h，干燥完成后即得生物外科补片基材，留存备用；

- 步骤 7)静电纺丝液的配制: 配制聚乳酸-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 1.5g/mL；配制聚己内酯-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 1.5g/mL，备用；

步骤 8)静电纺丝: 将步骤 5)所得的生物外科补片基材固定于静电

纺丝设备接收装置上，先将步骤 6) 中的聚乳酸-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A1，其中静电纺丝参数为电压 20KV，接收距离为 20cm；再将聚己内酯-二氯甲烷溶液转移到注射器中，对 A1 进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A2，其中静电纺丝参数为电压 20KV，接收距离为 20cm，且细菌纤维素膜与聚乳酸或聚己内酯质量比为 1.0:10；

步骤 9) 对中间品进行纯化处理：将步骤 7) 得到的生物外科补片中间品浸泡于浓度为 85% 的乙醇溶液中 20min，取出再转移至注射用水中浸泡 20min，然后利用冷冻干燥制备成型；

10 步骤 10) 包装：利用压膜机将干燥成型样品制备成厚度为 0.025mm、裁剪成大小为 5mm\*5mm 规格，经过内包、外包、产品灭菌（剂量为 35K Gy）、包装后，即得最终成品。

## 实施例 2

步骤 1) 培养基的配制：称取甘露醇 25g，聚乙二醇 10g，蔗糖 30g，葡萄糖 15 g，烟酸 0.8mg，酵母粉 6g，玉米浆干粉 15g，牛肉膏 10g，蛋白胨 5g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g，MgSO<sub>4</sub> 2.5g，无水乙醇 10g，硫酸铵 0.8g，柠檬酸 0.6g，羧甲基纤维素钠 0.6g，葡萄糖酸 10g，葡萄糖酸钠 50g，加入 1000mL 纯化水中。

20 步骤 2) 发酵：取产纤维素膜的微生物菌种活化，得活化菌种，将活化菌种转移至不锈钢托盘扩大培养，得到种子液，放于 40℃ 恒温培养箱中培养 6 天，在发酵的第一天和第三天分别加入 2% 的甘露醇和 5% 的聚乙二醇，且整个发酵过程维持体系 pH 为 3.8，通氧量 3.5L/min，发酵完成后，在发酵液上层得到一层细菌纤维素膜，将细菌纤维素膜取出备用；

25 步骤 3) 清洗及前处理：使用注射用水清洗发酵所得的细菌纤维素膜，直至所述细菌纤维素膜的 pH 为 6，然后将其放入灭菌注射用水配制的 1L 的 0.75mol/L 的氢氧化钠溶液中，浸泡 5h，再加热煮沸 2h，取出，用灭菌注射用水浸泡并搅拌 60min，直至拧出液 pH 为 6.0，再转移至灭菌注

射用水配制的 1L 的 1mol/L 的醋酸、柠檬酸混合溶液中，其中醋酸、柠檬酸的物质的量之比为 4:1，浸泡 5h 后取出，再用注射用水浸泡并用玻璃棒进行搅拌 60min，倒掉洗涤后的注射用水。

步骤 4) 氧化及纯化处理：将步骤 3) 中所得的细菌纤维素膜转移至 5 30% 的过氧化氢溶液中，浸泡及搅拌 30min，取出装于玻璃柱中，启动真空泵进行抽滤，以注射用水作为淋洗液对细菌纤维素膜进行持续淋洗，并对淋洗液进行检测，所得细菌内毒素的含量小于等于 0.03EU/ml，即得到纯化的细菌纤维素膜；

步骤 5) 冻融干燥处理：置于 -1°C 环境下冷冻 10h，取出置于 35°C 环 10 境下融冰 0.2h，将融化后的水分倒掉；重复以上操作 9 次。取最后一次融冰的细菌纤维素膜，将融化后的水分倒掉，留存备用；

步骤 6) 复合过程：将细菌纤维素膜放于 3% 的甘油溶液中进行搅拌，转速为 20rpm，时间为 2h，完成后平铺于不锈钢网上，转移至鼓风干燥箱中进行干燥，此时温度为 50°C，时间为 12h，干燥完成后即得生物外 15 科补片基材，留存备用；

步骤 7) 静电纺丝液的配制：配制聚乳酸-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 4.5%；配制聚己内酯-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 4.5%，备用；

步骤 8) 静电纺丝：将步骤 5) 所得的生物外科补片基材固定于静电 20 纺丝设备接收装置上，先将步骤 6) 中的聚乳酸-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A1，其中静电纺丝参数为电压 10KV，接收距离为 5cm；再将聚己内酯-二氯甲烷溶液转移到注射器中，对 A1 进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A2，其中静电纺丝参数为电压 30KV，接收距离为 30cm，且细菌纤维素膜与聚乳酸或聚己内酯质量比为 0.1:10；

25 步骤 9) 对中间品进行纯化处理：将步骤 7) 得到的生物外科补片中间品浸泡于浓度为 50% 的乙醇溶液中 60min，取出再转移至注射用水中浸泡 10min，然后利用冷冻干燥制备成型；

步骤 10) 包装: 利用压膜机将干燥成型样品制备成厚度为 0.025mm、裁剪成大小为 50mm\*50mm 规格, 经过内包、外包、产品灭菌 (剂量为 25KGy)、包装后, 即得最终成品。

### 实施例 3

5 步骤 1) 培养基的配制: 称取甘露醇 22g, 聚乙二醇 13g, 蔗糖 28g, 葡萄糖 18g, 烟酸 0.65mg, 酵母粉 6g, 玉米浆干粉 12g, 牛肉膏 8g, 蛋白胨 8g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g,  $\text{MgSO}_4$  2.2g, 无水乙醇 9g, 硫酸铵 0.7g, 柠檬酸 0.6g, 羧甲基纤维素钠 0.6g, 葡萄糖酸 15g, 葡萄糖酸钠 30g, 加入 1000mL 纯化水中。

10 步骤 2) 发酵: 取产纤维素膜的微生物菌种活化, 得活化菌种, 将活化菌种转移至不锈钢托盘扩大培养, 得到种子液, 放于 25°C 恒温培养箱中培养 11 天, 在发酵的第一天和第三天分别加入 1% 的甘露醇和 3% 的聚乙二醇, 且整个发酵过程维持体系 pH 为 7, 通氧量 8L/min, 发酵完成后, 在发酵液上层得到一层细菌纤维素膜, 将细菌纤维素膜取出备用;

15 步骤 3) 清洗及前处理: 使用注射用水清洗发酵所得的细菌纤维素膜, 直至所述细菌纤维素膜的 pH 为 6, 然后将其放入灭菌注射用水配制的 1L 的 1.0mol/L 的氢氧化钠溶液中, 浸泡 5h, 再加热煮沸 2h, 取出, 用灭菌注射用水浸泡并搅拌 60min, 直至拧出液 pH 为 6.0, 再转移至灭菌注射用水配制的 1L 的 1mol/L 的醋酸、柠檬酸混合溶液中, 其中醋酸、柠檬酸的物质的量之比为 4:1, 浸泡 5h 后取出, 再用注射用水浸泡并用玻璃棒进行搅拌 60min, 倒掉洗涤后的注射用水。

20 步骤 4) 氧化及纯化处理: 将步骤 3) 中所得的细菌纤维素膜转移至 30% 的过氧化氢溶液中, 浸泡及搅拌 30min, 取出装于玻璃柱中, 启动真空泵进行抽滤, 以注射用水作为淋洗液对细菌纤维素膜进行持续淋洗, 并对淋洗液进行检测, 所得细菌内毒素的含量小于等于 0.03EU/ml, 即得到纯化的细菌纤维素膜;

步骤 5) 冻融干燥处理: 置于 -1°C 环境下冷冻 10h, 取出置于 5°C 环

境下融冰 10h，将融化后的水分倒掉；重复以上操作 2 次。取最后一次融冰的细菌纤维素膜，将融化后的水分倒掉，留存备用；

步骤 6) 复合过程：将细菌纤维素膜放于 1.5%的甘油溶液中进行搅拌，转速为 500rpm，时间为 1h，完成后平铺于不锈钢网上，转移至鼓风干燥箱中进行干燥，此时温度为 99℃，时间为 2h，干燥完成后即得生物外科补片基材，留存备用；

步骤 7) 静电纺丝液的配制：配制聚乳酸-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 5%；配制聚己内酯-二氯甲烷溶液 10mL，其浓度为 5%，备用；

步骤 8) 静电纺丝：将步骤 5) 所得的生物外科补片基材固定于静电纺丝设备接收装置上，先将步骤 6) 中的聚乳酸-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A1，其中静电纺丝参数为电压 30KV，接收距离为 30cm；再将聚己内酯-二氯甲烷溶液转移到注射器中，对 A1 进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A2，其中静电纺丝参数为电压 10KV，接收距离为 5cm，且细菌纤维素膜与聚乳酸或聚己内酯质量比为 3.0:10；

步骤 9) 对中间品进行纯化处理：将步骤 7) 得到的生物外科补片中间品浸泡于浓度为 99%的乙醇溶液中 10min，取出再转移至注射用水中浸泡 60min，然后利用冷冻干燥制备成型；

步骤 10) 包装：利用压膜机将干燥成型样品制备成厚度为 0.010mm、裁剪成大小为 5mm\*50mm 规格，经过内包、外包、产品灭菌（剂量为 5K Gy）、包装后，即得最终成品。

#### 实施例 4

步骤 1) 培养基的配制：称取甘露醇 25g，聚乙二醇 10g，蔗糖 30g，葡萄糖 19g，烟酸 0.8mg，酵母粉 6g，玉米浆干粉 13g，牛肉膏 10g，蛋白胨 5g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5g，MgSO<sub>4</sub> 2.0g，无水乙醇 8g，硫酸铵 0.5g，柠檬酸 0.6g，羧甲基纤维素钠 0.6g，葡萄糖酸 10g，葡萄糖酸钠 35g，加入 1000mL 纯化水中。

步骤2) 发酵: 取产纤维素膜的微生物菌种活化, 得活化菌种, 将活化菌种转移至不锈钢托盘扩大培养, 得到种子液, 放于 32°C 恒温培养箱中培养 10 天, 在发酵的第一天和第三天分别加入 1.5% 的甘露醇和 5% 的聚乙二醇, 且整个发酵过程维持体系 pH 为 5.2, 通氧量 0.3L/min, 发酵完成后, 在发酵液上层得到一层细菌纤维素膜, 将细菌纤维素膜取出备用;

步骤3) 清洗及前处理: 使用注射用水清洗发酵所得的细菌纤维素膜, 直至所述细菌纤维素膜的 pH 为 6, 然后将其放入灭菌注射用水配制的 1L 的 1.0mol/L 的氢氧化钠溶液中, 浸泡 3h, 再加热煮沸 2h, 取出, 用灭菌注射用水浸泡并搅拌 60min, 直至拧出液 pH 为 6.0, 再转移至灭菌注射用水配制的 1L 的 1mol/L 的醋酸、柠檬酸混合溶液中, 其中醋酸、柠檬酸的物质的量之比为 4:1, 浸泡 5h 后取出, 再用注射用水浸泡并用玻璃棒进行搅拌 30min, 倒掉洗涤后的注射用水。

步骤4) 氧化及纯化处理: 将步骤3) 中所得的细菌纤维素膜转移至 50% 的过氧化氢溶液中, 浸泡及搅拌 30min, 取出装于玻璃柱中, 启动真空泵进行抽滤, 以注射用水作为淋洗液对细菌纤维素膜进行持续淋洗, 并对淋洗液进行检测, 所得细菌内毒素的含量小于等于 0.03EU/ml, 即得到纯化的细菌纤维素膜;

步骤5) 冻融干燥处理: 置于 -25°C 环境下冷冻 6h, 取出置于 15°C 环境下融冰 5h, 将融化后的水分倒掉; 重复以上操作 2 次。取最后一次融冰的细菌纤维素膜, 将融化后的水分倒掉, 留存备用;

步骤6) 复合过程: 将细菌纤维素膜放于 2.5% 的甘油溶液中进行搅拌, 转速为 800rpm, 时间为 0.75h, 完成后平铺于不锈钢网上, 转移至鼓风干燥箱中进行干燥, 此时温度为 65°C, 时间为 5h, 干燥完成后即得生物外科补片基材, 留存备用;

步骤7) 静电纺丝液的配制: 配制聚乳酸-二氯甲烷溶液 10mL, 其浓度为 0.5%; 配制聚己内酯-二氯甲烷溶液 10mL, 其浓度为 0.5%, 备用;

步骤8) 静电纺丝: 将步骤5) 所得的生物外科补片基材固定于静电

5 纺丝设备接收装置上，先将步骤 6) 中的聚乳酸-二氯甲烷溶液转移到注射器中，进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A1，其中静电纺丝参数为电压 20KV，接收距离为 20cm；再将聚己内酯-二氯甲烷溶液转移到注射器中，对 A1 进行静电纺丝得到生物外科补片中间品 A2，其中静电纺丝参数为电压 15KV，接收距离为 15cm，且细菌纤维素膜与聚乳酸或聚己内酯质量比为 1.0:10；

步骤 9) 对中间品进行纯化处理：将步骤 7) 得到的生物外科补片中间品浸泡于浓度为 75% 的乙醇溶液中 40min，取出再转移至注射用水中浸泡 40min，然后利用冷冻干燥制备成型；

10 步骤 10) 包装：利用压膜机将干燥成型样品制备成厚度为 0.04mm、裁剪成大小为 50mm\*100mm 规格，经过内包、外包、产品灭菌（剂量为 50K Gy）、包装后，即得最终成品。

有益效果如表 1 所示。

表 1 生物外科补片各项参数

| 编号 | 制备参数   | 干膜厚度<br>(mm) | 拉伸强度<br>(MPa) | 断裂伸长率<br>(%) | 孔隙率<br>(%) | 顶破强度<br>(KPa) | 缝合强度<br>(N) |
|----|--------|--------------|---------------|--------------|------------|---------------|-------------|
| 01 | 见实施例 1 | 0.025        | 72.173        | 20.1         | 92.4       | 60.4          | 18.6        |
| 02 | 见实施例 2 | 0.025        | 68.315        | 19.8         | 93.6       | 61.2          | 18.3        |
| 03 | 见实施例 3 | 0.010        | 60.062        | 20.5         | 90.8       | 56.8          | 15.5        |
| 04 | 见实施例 4 | 0.040        | 89.389        | 18.0         | 90.7       | 92.6          | 26.0        |

15 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

### 工业实用性

20 本发明提供一种生物外科补片的制备方法及其基于该方法制备的生物外科补片及其应用。本发明所述制备方法的制备基材为经生物发酵制得的细菌纤维素膜；将经生物发酵制得的细菌纤维素膜经纯化处理、氧化处理、冻融处理、复合工艺处理、静电纺丝处理、冷冻干燥处理和压膜处理，得

到生物外科补片。本发明所述制备方法得到的生物外科补片具有良好的生物相容性、力学性能、缝合性能及临床使用便利性，可以满足作为外科补片材料的基本要求，具有较好的经济价值和应用前景。

## 权 利 要 求 书

1. 一种生物外科补片的制备方法，其包括以下步骤：

- 1) 将菌种进行发酵培养，得到细菌纤维素膜；所述发酵培养过程中添加生物高分子材料；所述生物高分子材料包括聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯中的一种或多种；
- 2) 将步骤 1) 得到的细菌纤维素膜依次在无机碱液和酸溶液中浸泡，得到纯化后的细菌纤维素膜；
- 3) 将步骤 2) 得到的纯化后的细菌纤维素膜浸入氧化剂溶液中进行氧化，得到氧化后的细菌纤维素膜；
- 4) 将步骤 3) 得到的氧化后的细菌纤维素膜进行冻融，得到冻融后的细菌纤维素膜；
- 5) 将步骤 4) 得到的冻融后的细菌纤维素膜置于甘油水溶液中搅拌，干燥，得到复合处理后的细菌纤维素膜；
- 6) 将步骤 5) 得到的复合处理后的细菌纤维素膜进行静电纺丝，得到生物外科补片中间品；所述静电纺丝液包括聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈、聚碳酸酯中的一种或多种的溶液；所述溶液的溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、四氢呋喃、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、乙醚、正己烷、石油醚中的一种或多种；
- 7) 将步骤 6) 得到的生物外科补片中间品进行冷冻干燥、压膜得到生物外科补片。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 1) 所述发酵培养用培养基每 1000mL 中包括：甘露醇 20~25g，聚乙二醇 10~15g，蔗糖 25~30g，葡萄糖 15~20g，烟酸 0.5~0.8mg，酵母粉 5~6g，玉米浆干粉 10~15g，牛肉膏 5~10g，蛋白胨 5~10g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5~2.5g， $\text{MgSO}_4$  2.0~2.5g，无水乙醇 8~10g，硫酸铵 0.5~0.8g，柠檬酸 0.5~0.6g，羧甲基纤维素钠 0.5~0.6g 和葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的混合物 40~50g；所述葡萄糖酸与葡萄糖酸钠的质量比为 1: (1~5)。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述菌种包括醋酸菌属、根瘤菌属、葡萄糖杆菌属、木醋杆菌属、八叠球菌属、假单胞菌属、无色杆菌属、产碱菌属、气杆菌属、固氮菌属和土壤杆菌属中的一种或多种。

5        4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述发酵培养的条件为在20~40℃、通氧量为0.01~10L/min、pH值为3~9的条件下发酵培养6~14d。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,当步骤1)中所述生物高分子材料包括多种时,按照聚乳酸、聚酰胺、聚酯、甘油、聚丙交酯、聚己内酯、聚氯乙烯、聚乙烯的顺序逐一添加。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3)所述氧化剂为包括过氧化氢、次氯酸钠、过氧化钠、过氧化钾、过氧乙酸、过碳酸钠、过硼酸钠和过硼酸钾中的一种或几种的水溶液。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述过氧化氢、次氯酸钠、过氧化钠、过氧化钾、过氧乙酸、过碳酸钠、过硼酸钠和过硼酸钾在水中的质量分数分别为1~50%。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤4)所述冻融为:置于-45~-1℃下冷冻0.2~10h,取出置于5~35℃环境下融冰0.2~10h,将融化后的水分倒掉;重复上述冷冻、融冰操作2~9次。

20        9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤6)所述静电纺丝液中聚乳酸、聚己内酯、壳聚糖、聚丙烯腈或聚碳酸酯的质量浓度分别为0.01~5g/mL。

10. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤6)中复合处理后的细菌纤维素膜与聚乳酸、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚偏氟乙烯、壳聚糖或聚己内酯的质量比分别为(0.1~3):10。

11. 根据权利要求1~10任一项所述制备方法制备得到的生物外科补片。

12、根据权利要求 11 所述的生物外科补片，其特征在于，所述生物外科补片由细菌纤维素构成，并具有纳米网络结构；

优选地，所述细菌纤维素的杨氏模量为 10-1000GPa，拉伸强度为 0.1-100GPa；

5 优选地，所述纳米网络结构中的纤维的直径为 10-200 nm；

优选地，所述纳米网络结构的孔隙率为 60%-99%；孔径为 10-500nm。

13、权利要求 11 或 12 所述的生物外科补片在制备医药用途的修复材料中的应用。