(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116322363 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202180074346.4
(22)申请日 2021.10.29
(30)优先权数据
63/107,226 2020.10.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2021/051537 2021.10.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/087750 EN 2022.05.05
(71)申请人 紫露草公司
地址 加拿大安大略省渥太华
(72)发明人 R•希基 K•奥雷塞夫斯基 P•C•D•S•F•蒂施勒 A•E•佩林 A•坎托 J•萨拉蒙 M•洛伦索
(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所 11330
专利代理师 李娜
(51)Int.Cl.
A23L 19/00(2006.01)

权利要求书10页 说明书127页 附图137页

(54)发明名称

植物衍生的气凝胶、水凝胶和泡沫及其方法和用途

(57)摘要

本文提供了气凝胶和泡沫，包括：衍生自植物或真菌组织的单结构细胞和/或结构细胞组，该单结构细胞具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞的3D结构；该单结构细胞和/或结构细胞组分布在衍生自脱水、低压冻干或冷冻干燥的水凝胶的载体内。本文还提供了用于制备气凝胶或泡沫的方法，包括以下步骤：提供脱细胞的植物或真菌组织；通过进行浸碱从脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞和/或结构细胞组；将单结构细胞和/或结构细胞组混合或分布在水凝胶中以提供混合物；以及对混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫。还提供了相关的方法和用途。

CN 116322363 A

1.一种气凝胶或泡沫,包括:

衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者,所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞的三维结构;

所述单结构细胞、结构细胞组或两者分布在载体内,所述载体衍生自脱水、低压冻干或冷冻干燥的水凝胶。

2.根据权利要求1所述的气凝胶或泡沫,其已被再水化。

3.根据权利要求1或2所述的气凝胶或泡沫,其中,衍生出所述单结构细胞或结构细胞组的所述植物或真菌组织包括脱细胞的植物或真菌组织。

4.根据权利要求3所述的气凝胶或泡沫,其中,使用SDS和任选的$CaCl_2$脱细胞所述植物或真菌组织。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的气凝胶或泡沫,其中,所述单结构细胞、结构细胞组或两者通过浸碱从所述植物或真菌组织中衍生。

6.根据权利要求5所述的气凝胶或泡沫,其中,所述浸碱包括使用氢氧化钠和过氧化氢加热处理所述植物或真菌组织。

7.根据权利要求5所述的气凝胶或泡沫,其中,所述浸碱包括使用碳酸氢钠和过氧化氢加热处理所述植物或真菌组织。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的气凝胶或泡沫,其具有所述单结构细胞的粒度分布,所述单结构细胞的平均费雷特直径在约1μm至约1000μm,如约100至约500μm,例如约100至约300μm的范围内。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的气凝胶或泡沫,其中,所述水凝胶包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、植物蛋白(例如豌豆蛋白)、食品级着色剂(例如甜菜根)、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素、或其任何组合;其中,所述水凝胶是任选交联的。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的气凝胶或泡沫,包括通过以下产生的模板化或对准的微通道:定向冷冻;非定向冷冻;使用具有微观尺度和/或宏观尺度特征(如通道)的模具成型;在至少一个表面内和/或表面上穿孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征(例如使用针);或其任何组合。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的气凝胶或泡沫,其中,所述植物组织包括苹果组织、梨组织或棕榈心组织。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的气凝胶或泡沫,当所述气凝胶或泡沫处于水合形式时,所述气凝胶或泡沫包括约5%至约95%m/m,如约10-50%m/m(或更多)的单结构细胞、结构细胞组或两者。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的气凝胶或泡沫,其中,所述水凝胶包括海藻酸盐、果胶或两者,并且所述气凝胶或泡沫用$CaCl_2$溶液再水化以提供交联。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的气凝胶或泡沫，其体积模量在约0.1至约500kPa，如约1至约200kPa的范围内。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的气凝胶或泡沫，其被再水化并且进一步包含一个或多个动物细胞。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的气凝胶或泡沫，其中，所述气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物通过物理交联(例如使用甘氨酸)和/或化学交联(例如在热存在下使用柠檬酸)进行交联；其中，所述气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物用接头(例如琥珀酸)官能化，一个或多个官能部分任选地连接到所述接头(例如含胺基团，其中，交联可以进一步任选地用一种或多种蛋白质交联剂如福尔马林、甲醛、戊二醛和/或转谷氨酰胺酶实现)；或其任何组合。

17.通过脱细胞的植物或真菌组织的浸碱而衍生自所述脱细胞的植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸和缺乏所述植物或真菌组织的一种或多种碱溶性木质素组分的脱细胞的三维结构。

18.一种制备气凝胶或泡沫的方法，包括：

提供脱细胞的植物或真菌组织；

通过对所述脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞的三维结构的单结构细胞或结构细胞组，从所述脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两者；

将所述单结构细胞、结构细胞组或两者混合或分布在水凝胶中，以提供混合物；以及

对所述混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供所述气凝胶或泡沫。

19.根据权利要求18所述的方法，其中，所述浸碱包括用碱和过氧化物处理所述脱细胞的植物或真菌组织，优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱，以及过氧化氢作为过氧化物。

20.根据权利要求18或19所述的方法，其中，所述浸碱包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理所述脱细胞的植物或真菌组织。

21.根据权利要求18或19所述的方法，其中，所述浸碱包括在加热的同时用碳酸氢钠水溶液和过氧化氢处理所述脱细胞的植物或真菌组织。

22.根据权利要求20或21所述的方法，其中，在将所述过氧化氢加入反应之前，用所述氢氧化钠水溶液或碳酸氢钠水溶液处理所述脱细胞的植物或真菌组织第一时间段。

23.根据权利要求22所述的方法，其中，所述过氧化氢以30％过氧化氢水溶液的形式加入。

24.根据权利要求22所述的方法，其中，所述过氧化氢以15％过氧化氢水溶液的形式加入。

25.根据权利要求18-24中任一项所述的方法，其中，用于浸碱的所述过氧化氢以以下比例使用：

约20mL至约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；

如：

约20mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

约10mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;或

约5mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液。

26.根据权利要求18-24中任一项所述的方法,其中,用于浸碱的所述过氧化氢以以下比例使用:

约20mL至约5mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的10％w/v碳酸氢钠水溶液;

如:

约20mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的10％w/v碳酸氢钠水溶液;

约10mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的10％w/v碳酸氢钠水溶液;或

约5mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的10％w/v碳酸氢钠水溶液。

27.根据权利要求18-26中任一项所述的方法,进一步包括用一种或多种中和处理来中和pH。

28.根据权利要求27所述的方法,其中,所述中和处理包括用酸溶液,优选HCl水溶液的处理。

29.根据权利要求27所述的方法,其中,所述中和处理包括用CH_3COOH水溶液的处理。

30.根据权利要求18-29中任一项所述的方法,其中,所述浸碱在加热至约80℃的条件下进行。

31.根据权利要求18-30中任一项所述的方法,其中,对于1M氢氧化钠水溶液,使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行所述浸碱,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,使用当量比进行所述浸碱。

32.根据权利要求18-31中任一项所述的方法,其中,所述浸碱进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

33.根据权利要求18-32中任一项所述的方法,其中,通过离心收集所得的具有脱细胞的三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

34.根据权利要求18-33中任一项所述的方法,其中,将所述单结构细胞、结构细胞组或两者混合或分布在水凝胶中,所述水凝胶包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素、或

其任何组合;其中,所述水凝胶是任选交联的。

35.根据权利要求18-34中任一项所述的方法,其进一步包括对所述混合物进行定向或非定向冷冻以在所述混合物的表面上、所述混合物内部或两者上引入模板化或对准的微通道的步骤;使用具有微观尺度特征的模具模制所述混合物以引入模板化或对准的微通道的步骤,所述模具接触所述混合物和/或由所述混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥产生的气凝胶或泡沫的一个或多个表面;在所述混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥之前、期间或之后,在所述混合物和/或所述气凝胶或泡沫的至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征的步骤;或其任何组合。

36.根据权利要求35所述的方法,其中,通过从一个或多个方向在所述混合物上产生热梯度来进行所述定向冷冻,以便从所述热梯度的冷侧开始形成对准的冰晶。

37.根据权利要求36所述的方法,其中,定向冷冻所述混合物至少约30分钟的时间段,优选约2小时的时间段。

38.根据权利要求36或37所述的方法,其中,通过冷却到至少约-15℃,优选约-25℃的温度定向冷冻所述混合物。

39.根据权利要求18-38中任一项所述的方法,其中,对所述混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供所述气凝胶或泡沫的步骤包括冷冻所述混合物,然后低压冻干或冷冻干燥所述混合物。

40.根据权利要求18-39中任一项所述的方法,包括交联所述水凝胶、再水化所述气凝胶或泡沫,或两者的另外的步骤;任选地在存在海藻酸盐或果胶或琼脂水凝胶的情况下使用$CaCl_2$溶液提供交联。

41.根据权利要求40所述的方法,其中,所述交联步骤使用约2%w/v至约20%v/v,优选约10%w/v的柠檬酸溶液进行。

42.根据权利要求40或41所述的方法,其中,所述交联进行约30分钟至约2小时,优选约1.5小时。

43.根据权利要求40-42中任一项所述的方法,其中,所述交联在约80℃至约120℃,优选约110℃的温度下进行。

44.根据权利要求18-43中任一项所述的方法,包括在所述气凝胶或泡沫上或其中培养动物细胞的另外的步骤。

45.一种通过权利要求18-44中任一项所述的方法生产的气凝胶或泡沫。

46.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫用于骨组织工程的用途。

47.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫用于模板化或对准细胞生长的用途。

48.根据权利要求47所述的用途,其中,所述细胞包括肌肉细胞。

49.根据权利要求47所述的用途,其中,所述细胞包括神经细胞。

50.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫在脊髓损伤修复或其他再生医学应用中的用途。

51.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫作为绝缘或包装泡沫的用途。

52.一种用于在有此需要的受试者中进行骨组织工程或修复的方法,包括:

在有此需要的所述受试者的受累部位植入根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫;

使得所述气凝胶或泡沫促进骨组织生成或修复。

53.一种用于模板化或对准细胞生长的方法,包括:

在根据权利要求1-17或45中任一项所定义的气凝胶或泡沫上培养细胞,其中,所述气凝胶或泡沫包括在所述气凝胶或泡沫的至少一个表面上、在所述气凝胶或泡沫内或两者的模板化或对准的微通道,所述模板化或对准的微通道任选地通过以下形成:定向或非定向冷冻;使用具有微观尺度特征的模具成型;在至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征;或其任何组合;

使得所述培养的细胞沿着所述微通道对准。

54.根据权利要求53所述的方法,进一步包括在所述模具中使用针,优选30G(规格)针。

55.根据权利要求53或54所述的方法,其中,所述细胞包括肌肉细胞或神经细胞。

56.一种用于修复有此需要的受试者的脊髓损伤的方法,包括:

在有此需要的所述受试者的受累部位植入根据权利要求1-17或45中任一项所定义的气凝胶或泡沫,其中,所述气凝胶或泡沫包括任选地通过定向或非定向冷冻形成的模板化或对准的微通道;

使得所述气凝胶或泡沫通过神经细胞沿着所述模板化或对准的微通道的对准生长来促进脊髓修复。

57.一种食品,包括根据权利要求1-17或45中任一项所定义的气凝胶或泡沫。

58.根据权利要求57所述的食品,进一步包括染料或着色剂。

59.根据权利要求57或58所述的食品,包括用胶水粘合在一起的两个或多个气凝胶或泡沫亚基。

60.根据权利要求59所述的食品,其中,所述胶水包括琼脂。

61.根据权利要求57-60中任一项所述的食品,其中,所述气凝胶或泡沫包括任选地通过定向或非定向冷冻形成的模板化或对准的微通道,并且其中,所述气凝胶或泡沫包括沿着所述模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞、或内皮细胞,或其任何组合;优选地,其中,所述气凝胶或泡沫包括任选地通过定向或非定向冷冻形成的模板化或对准的微通道,并且其中,所述气凝胶或泡沫包括沿着所述模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、脂肪细胞、结缔组织细胞(例如成纤维细胞)、软骨、骨、上皮或内皮细胞或其任何组合。

62.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫在食品中的用途。

63.一种从脱细胞的植物或真菌组织制备单结构细胞、结构细胞组或两者的方法,包括:

提供脱细胞的植物或真菌组织;

通过对所述脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞的三维结构

的单结构细胞或结构细胞组，从所述脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两者。

64.根据权利要求63所述的方法，其中，所述浸碱包括用碱和过氧化物处理所述脱细胞的植物或真菌组织，优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱，和过氧化氢作为过氧化物。

65.根据权利要求63或64所述的方法，其中，所述浸碱包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理所述脱细胞的植物或真菌组织。

66.根据权利要求65所述的方法，其中，在将所述过氧化氢加入所述反应之前，用所述氢氧化钠水溶液处理所述脱细胞的植物或真菌组织第一时间段。

67.根据权利要求66所述的方法，其中，所述过氧化氢以30％过氧化氢水溶液的形式加入。

68.根据权利要求66所述的方法，其中，所述过氧化氢以15％过氧化氢水溶液的形式加入。

69.根据权利要求63所述的方法，其中，所述浸碱包括用碱和过氧化物处理所述脱细胞的植物或真菌组织，优选碳酸氢钠或另一种碳酸氢盐碱作为碱，和过氧化氢作为过氧化物。

70.根据权利要求64-69中任一项所述的方法，其中，用于浸碱的所述过氧化氢以以下比例使用：

约20mL至约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；

如：

约20mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；

约10mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；或

约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液。

71.根据权利要求64-69中任一项所述的方法，其中，用于浸碱的所述过氧化氢以以下比例使用：

约20mL至约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的10％碳酸氢钠水溶液；

如：

约20mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的10％碳酸氢钠水溶液；

约10mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的10％碳酸氢钠水溶液；或

约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的10％碳酸氢钠水溶液。

72.根据权利要求63-71中任一项所述的方法，进一步包括用一种或多种中和处理来中和pH。

73.根据权利要求72所述的方法，其中，所述中和处理包括用酸溶液，优选HCl水溶液的

处理。

74.根据权利要求73所述的方法,其中,所述酸溶液为CH_3COOH水溶液。

75.根据权利要求63-74中任一项所述的方法,其中,所述浸碱在加热至约80℃的条件下进行。

76.根据权利要求63-75中任一项所述的方法,其中,所述浸碱是(a)对于1M氢氧化钠水溶液,使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行的,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,使用等效比例进行的,或(b)对于10%w/v的碳酸氢钠水溶液,使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行的,或对于另一种碳酸氢钠水溶液浓度,使用等效比例进行的。

77.根据权利要求63-76中任一项所述的方法,其中,所述浸碱进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

78.根据权利要求63-77中任一项所述的方法,其中,通过离心收集所得的具有脱细胞的三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

79.通过权利要求63-78中任一项所述的方法制备的单结构细胞、结构细胞组或两者。

80.一种纤维素基水凝胶,其包括通过用二甲基乙酰胺和氯化锂溶解,然后用乙醇再生而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。

81.一种用于制备纤维素基水凝胶的方法,包括:

提供脱细胞的植物或真菌组织;

通过用二甲基乙酰胺(DMAc)和氯化锂(LiCl)处理来溶解所述脱细胞的植物或真菌组织的纤维素;以及

通过与乙醇的溶剂交换由所述溶解的纤维素再生纤维素基水凝胶,

从而提供所述纤维素基水凝胶。

82.根据权利要求81所述的方法,其中,所述与乙醇的溶剂交换使用透析膜进行,或者通过在所述溶解的纤维素上部添加乙醇来促进溶剂交换。

83.根据权利要求81或82所述的方法,进一步包括用过氧化氢漂白所述纤维素基水凝胶。

84.一种纤维素基水凝胶,其包含通过用以下溶解而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素:二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(如1-丁基氯化吡啶和氯化铝,与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓,优选室温离子液体)、或其任何组合。

85.一种用于制备纤维素基水凝胶的方法,包括:

提供脱细胞的植物或真菌组织;

通过用二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(如1-丁基氯化吡啶和氯化铝,与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓,优选室温离子液体)、或其任何组合的处理而溶解所述脱细胞的植物或真菌组织的纤维素;

获得所述溶解的纤维素,以及使用所述溶解的纤维素制备所述纤维素基水凝胶。

86.一种通过权利要求81-83或72中任一项所述的方法制备的纤维素基水凝胶。

87.根据权利要求1-17或45中任一项所述的气凝胶或泡沫,其中,所述水凝胶包括根据

权利要求80、84或86中定义的纤维素基水凝胶。

88.一种食品，其包含根据权利要求1-17、45、79或87中任一项所述的气凝胶或泡沫或结构细胞，其中，所述食品是肉模拟品并且包含多条线，所述多条线提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼类肉中发现的脂肪白线外观。

89.根据权利要求88所述的食品，其中，所述食品是金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉模拟品。

90.根据权利要求88或89所述的食品，其中，所述食品含有提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉的颜色的一种或多种染料或着色剂。

91.根据权利要求88-90中任一项所述的食品，其中，所述多条线形成在所述气凝胶或泡沫中形成的切口或通道中。

92.根据权利要求88-91中任一项所述的食品，其中，所述多条线包含二氧化钛或甜菜根，任选地与作为结合剂的琼脂或海藻酸钠组合。

93.根据权利要求92所述的食品，其中，将所述二氧化钛，任选地与作为结合剂的琼脂或海藻酸钠组合，施加到所述气凝胶或泡沫中形成的切口或通道中以提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼类肉中发现的脂肪白线外观。

94.一种用于制备食品的方法，所述食品是金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉模拟品，所述方法包括：

提供根据权利要求1-17、45、79或87中任一项所定义的气凝胶；

任选地，将所述气凝胶染色或着色为金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉的颜色；

切割或以其他方式处理所述气凝胶，以便沿着所述气凝胶的表面形成切口或通道；以及

将染料或着色剂施加到所述切口或通道，以提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉特有的脂肪白线外观。

95.根据权利要求94所述的方法，其中，施加到所述切口或通道的所述染料或着色剂包含或甜菜根。

96.根据权利要求94或95所述的方法，其中，施加到所述切口或通道的所述染料或着色剂与结合剂组合。

97.根据权利要求96所述的方法，其中，所述结合剂包括琼脂或海藻酸钠。

98.一种通过权利要求94-97中任一项所述的方法制备的食品。

99.一种不可吸收的真皮填充剂，包括根据权利要求1-17、45、79、80、84、86或87中任一项所定义的气凝胶、泡沫、结构细胞或纤维素基水凝胶；或其任何组合。

100.一种真皮填充剂，包括衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞的三维结构，所述单结构细胞或结构细胞组或两者通过浸碱从所述植物或真菌组织中衍生。

101.根据权利要求99或100所述的真皮填充剂，其中，所述真皮填充剂进一步包括载体流体或凝胶。

102.根据权利要求101所述的真皮填充剂，其中，所述载体流体或凝胶包括水、水溶液或水凝胶。

103.根据权利要求102所述的真皮填充剂，其中，所述载体流体或凝胶包括盐水溶液或胶原、透明质酸、甲基纤维素和/或溶解的植物衍生的脱细胞纤维素基水凝胶。

104.根据权利要求100-103中任一项所述的真皮填充剂,进一步包括麻醉剂。

105.根据权利要求104所述的真皮填充剂,其中,所述麻醉剂包括利多卡因、苯佐卡因、丁卡因、波洛卡因、肾上腺素或其任何组合。

106.根据权利要求99-105中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述真皮填充剂包括PBS(盐水)、透明质酸(交联或非交联)、海藻酸盐、胶原、普朗尼克酸(例如普朗尼克F127)、琼脂、琼脂糖或纤维蛋白、羟基磷灰石钙、聚-L-乳酸、自体脂肪、硅酮、葡聚糖、甲基纤维素或其任何组合。

107.根据权利要求99-106中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述真皮填充剂包括以下至少一种:2%利多卡因凝胶;包括20%苯佐卡因、6%利多卡因和4%丁卡因的三重麻醉凝胶(BLT凝胶);3%波洛卡因;或2%利多卡因与肾上腺素的混合物。

108.根据权利要求99-107中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有至少约20μm的尺寸、直径或最小费雷特直径。

109.根据权利要求99-108中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有小于约1000μm的尺寸、直径或最大费雷特直径。

110.根据权利要求99-109中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有在约20μm至约1000μm的范围内的尺寸、直径或费雷特直径分布。

111.根据权利要求99-110中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有峰值为约200-300μm的粒度、直径或费雷特直径分布。

112.根据权利要求99-111中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有在约200μm至约300μm的范围内的平均粒度、直径或费雷特直径。

113.根据权利要求99-112中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述结构细胞具有在约30,000至约75,000μm^2的范围内的平均投影颗粒面积。

114.根据权利要求99-113中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述真皮填充剂是灭菌的。

115.根据权利要求114所述的真皮填充剂,其中,所述灭菌是通过伽玛灭菌进行的。

116.根据权利要求99-115中任一项所述的真皮填充剂,其中,所述真皮填充剂配制用于真皮下注射、深层真皮注射、皮下注射(例如皮下脂肪注射)或其任何组合。

117.根据权利要求99-116中任一项所述的真皮填充剂,在注射器或注射装置中提供所述真皮填充剂。

118.根据权利要求99-117中任一项所述的真皮填充剂作为软组织填充剂、用于重建手术或两者的用途。

119.根据权利要求99-117中任一项所述的真皮填充剂用于改善有此需要的受试者的美容外观的用途。

120.根据权利要求99-119中任一项所述的真皮填充剂在有此需要的受试者中用于增加组织体积、抚平皱纹或两者的用途。

121.一种用于改善有此需要的受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合的方法,所述方法包括:

向有此需要的区域施用或注射根据权利要求99-117中任一项所定义的真皮填充剂;

从而改善所述受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合。

122.根据权利要求118-120中任一项所述的用途，或根据权利要求121所述的方法，其中，所述受试者的原生细胞渗入所述真皮填充剂。

123.根据权利要求118-120或122中任一项所述的用途，或根据权利要求108或109所述的方法，其中，所述真皮填充剂是不可吸收的，使得所述脱细胞的植物或真菌组织在所述受试者体内保持基本上完整。

124.根据权利要求34或40所述的方法，其中，所述交联是通过将所述水凝胶从模具中挤出到用于连续进料交联的交联剂浴中进行的。

125.根据权利要求124所述的方法，用于获得具有期望形状的水凝胶。

植物衍生的气凝胶、水凝胶和泡沫及其方法和用途

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及气凝胶、水凝胶和泡沫。更具体地，本发明涉及衍生自和/或包含脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞的气凝胶、水凝胶和泡沫。

背景技术

[0002] 支架材料在许多不同的领域受到高度追捧，尤其是那些提供同质和/或可复制的三维结构的支架材料。在药物、医疗设备、治疗和食品领域，生物相容性和/或可食用的支架材料特别受追捧，并且那些能够支持细胞生长的材料是非常需要的。

[0003] 已经开发了各种支架材料，其中许多是基于合成聚合物或其他此类材料。其中一些已知是生物相容性和/或生物惰性的，但额外的支架材料对于各种应用仍然具有重要意义。

[0004] 已经开发了包含脱细胞的植物或真菌组织的支架生物材料，并在标题为“Decellularised Cell Wall Structures From Plants and Fungus and Use Thereof as Scaffold Materials”的PCT专利公开WO2017/136950中进行了描述。描述了显著的生物相容性，以及在各种治疗应用中的用途。这些支架生物材料对于各种不同的应用具有重要意义。

[0005] 然而，额外的支架材料，特别是那些提供气凝胶、水凝胶和/或泡沫的材料在各种领域都是需要的。气凝胶、水凝胶和/或泡沫提供可调或可定制的物理/机械性质和/或微观/宏观架构特别受追捧。

[0006] 需要替代的、额外的和/或改进的气凝胶、水凝胶和/或泡沫，以及其方法和/或用途。

发明内容

[0007] 本文提供了衍生自和/或包含脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞的气凝胶、水凝胶和泡沫。如下文详细描述的，现在已经开发出气凝胶、水凝胶和泡沫，这些可以衍生自和/或可以包括脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞，并且这些可以包括感兴趣的植物或真菌微观结构和/或架构；可以通过易于规模化的生产方法来生产；可以提供广泛的支架微观结构和/或宏观结构和/或生物化学；可提供可调的机械性质；可以提供可调的孔隙率；可以在体外和/或体内具有生物相容性；可以对各种条件稳定(例如在食品的情况下的烹饪条件下)；或其任何组合。通过使用分布在衍生自一种或多种脱水、低压冻干(lyophilized)或冷冻干燥的水凝胶的载体内的衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者(具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组)，现在已经开发并制备了各种具有期望性质的气凝胶、水凝胶和泡沫。在某些实施方案中，使用本文描述的浸碱处理，可以从植物或真菌组织(通常是脱细胞的植物或真菌组织)衍生单结构细胞、结构细胞组或两者，这允许可重复和可规模化生产。本文还详细描述了相关的方法和用途以及生产方法。

[0008] 在一个实施方案中，本文提供了一种气凝胶或泡沫，包括：

[0009] 衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构；

[0010] 所述单结构细胞、结构细胞组或两者分布在载体内，所述载体衍生自脱水、低压冻干或冷冻干燥的水凝胶。

[0011] 在上述气凝胶或泡沫的另一个实施方案中，气凝胶或泡沫已经被再水化。

[0012] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，衍生出单结构细胞或结构细胞组的植物或真菌组织可以包括脱细胞的植物或真菌组织。

[0013] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，可以使用SDS和任选的$CaCl_2$使植物或真菌组织脱细胞。

[0014] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中，单结构细胞、结构细胞组或两者可以通过浸碱从植物或真菌组织衍生。在某些实施方案中，植物或真菌组织可以是脱细胞的植物或真菌组织。

[0015] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，浸碱可以包括使用氢氧化钠和过氧化氢以及加热处理植物或真菌组织。

[0016] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，气凝胶或泡沫可以包括单结构细胞的粒度分布，所述单结构细胞的平均费雷特直径(定方向接线径，feret diameter)在约1μm至约1000μm，例如约100至约500μm，例如约100至约300μm的范围内。

[0017] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中，水凝胶可以包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸(pluronic acid)、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如，胶原、明胶或纤连蛋白，或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素、或其任何组合；其中所述水凝胶是任选交联的。

[0018] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，气凝胶或泡沫可以包括通过以下产生的模板化或对准的微通道：定向冷冻；或者通过使用具有微观尺度特征的模具成型；通过在至少一个表面内和/或表面上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征；或其任何组合。

[0019] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，植物组织可以包括苹果组织或梨组织。

[0020] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中，当气凝胶或泡沫处于水合形式时，气凝胶或泡沫可以包括约5％至约95％m/m的单结构细胞、结构细胞组或两者。

[0021] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，水凝胶可以包括海藻酸盐、果胶或两者，并且气凝胶或泡沫可以用提供交联的$CaCl_2$溶液再水

化。

[0022] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，气凝胶或泡沫可以具有在约0.1至约500kPa的范围内，例如约1至约200kPa的体积模量。

[0023] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中，气凝胶或泡沫可以被再水化，并且可以进一步包括一个或多个动物细胞。

[0024] 在上述一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中，气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)可以通过物理交联(例如使用甘氨酸)和/或化学交联(例如在热存在下使用柠檬酸)进行交联；其中气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)用接头(例如琥珀酸)官能化，一个或多个官能部分任选地连接到所述接头(例如含胺基团，其中交联可以进一步任选地用一种或多种蛋白质交联剂如福尔马林、甲醛、戊二醛和/或转谷氨酰胺酶实现)；或其任何组合。

[0025] 在又一个实施方案中，本文提供了通过脱细胞的植物或真菌组织的浸碱而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸和缺乏植物或真菌组织的一种或多种碱溶性木质素组分的脱细胞三维结构。

[0026] 在又一个实施方案中，本文提供了一种制备气凝胶或泡沫的方法，包括：

[0027] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0028] 通过对脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组，从脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两者；

[0029] 将单结构细胞、结构细胞组或两者混合或分布在水凝胶中，以提供混合物；以及

[0030] 对混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫。

[0031] 在上述方法的又一个实施方案中，浸碱可以包括用碱和过氧化物处理脱细胞的植物或真菌组织，优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱，和过氧化氢作为过氧化物。

[0032] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，浸碱可以包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理脱细胞的植物或真菌组织。

[0033] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织可以在将过氧化氢加入反应之前用氢氧化钠水溶液处理第一时间段。

[0034] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，过氧化氢可以作为30％的过氧化氢水溶液加入。

[0035] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，用于浸碱的过氧化氢可以按以下比例使用：

[0036] 约20mL至约5mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；

[0037] 例如：

[0038] 约20mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；

[0039] 约10mL的30％过氧化氢溶液：约100g的脱细胞的植物或真菌组织：约500mL的1M NaOH溶液；或

[0040] 约5mL的30％过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0041] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,该方法还可以包括用一种或多种中和处理来中和pH的步骤。

[0042] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,中和处理可以包括用酸溶液,优选HCl水溶液进行处理。

[0043] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,浸碱可以在加热至约80℃的情况下进行。

[0044] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,对于1M氢氧化钠水溶液,可以使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行浸碱,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,可以使用当量比进行浸碱。

[0045] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,浸碱可以进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

[0046] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,可以通过离心收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

[0047] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,单结构细胞、结构细胞组或两者可以混合或分布在水凝胶中,所述水凝胶包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素、或其任何组合;其中所述水凝胶是任选交联的。

[0048] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,该方法可以进一步包括对混合物进行定向冷冻的步骤,以在混合物的表面上、混合物内部或两者上引入模板化或对准的微通道;使用具有微观尺度特征的模具模制混合物的步骤,所述模具接触混合物和/或由混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥产生的气凝胶或泡沫的一个或多个表面,以引入模板化或对准的微通道;在混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥之前、期间或之后,在混合物和/或气凝胶或泡沫的至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征的步骤;或其任何组合。

[0049] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,可以通过从一个或多个方向在混合物上产生热梯度来进行定向冷冻,以便从热梯度的冷侧(多个)开始形成对准的冰晶。

[0050] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,通过定向冷冻产生的微通道的微架构可以通过产生混合物来控制,该混合物包括含有不同量的一种或多种其他溶解化合物的溶剂,例如蔗糖、葡萄糖、海藻糖、玉米淀粉、甘油、乙醇、甘露醇、氯化钠、$CaCl_2$、明胶、柠檬酸、PVA、PEG、葡聚糖、NaF、NaBr、NaI、磷酸盐缓冲液或其他此类试剂,这改变从热梯度的冷侧生长的对准的冰晶的结构性质。

[0051] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，可将混合物定向冷冻至少约30分钟的时间段，优选约2小时的时间段。

[0052] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，混合物可以通过冷却至约-190℃至约0℃，例如至少约-15℃，优选约-25℃的温度进行定向冷冻。

[0053] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，对混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫的步骤可以包括冷冻混合物，然后低压冻干或冷冻干燥混合物。

[0054] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，该方法可以包括交联水凝胶的另外步骤(例如，在冷冻/低压冻干之前或之后交联水凝胶)、再水化气凝胶或泡沫，或两者；任选地在存在海藻酸盐或果胶或琼脂水凝胶的情况下使用$CaCl_2$溶液提供交联。

[0055] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，该方法可以包括在气凝胶或泡沫上或其中培养动物细胞的另外步骤。

[0056] 在另一个实施方案中，本文提供了通过本文描述的一种或多种方法中的任一种生产的气凝胶或泡沫。

[0057] 在又一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于骨组织工程的用途。

[0058] 在又一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于细胞的模板化或对准生长的用途。

[0059] 在上述用途的另一个实施方案中，所述细胞可以包括肌肉细胞。

[0060] 在上述用途的另一个实施方案中，所述细胞可以包括神经细胞。

[0061] 在又一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于修复脊髓损伤的用途。

[0062] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种作为绝缘或包装泡沫的用途。

[0063] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于在有此需要的受试者中进行骨组织工程或修复的方法，包括：

[0064] 将本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种植入有此需要的受试者的受累部位；

[0065] 使得气凝胶或泡沫促进骨组织生成或修复。

[0066] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于模板化或对准细胞生长的方法，包括：

[0067] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种上培养细胞，其中所述气凝胶或泡沫包括在气凝胶或泡沫的至少一个表面上、在气凝胶或泡沫内或两者的模板化或对准的微通道，任选地通过定向冷冻形成；通过使用具有微观尺度特征的模具成型；通过在至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征；或其任何组合；

[0068] 使得培养的细胞沿着微通道对准。

[0069] 在上述用途的另一个实施方案中，所述细胞可以包括肌肉细胞或神经细胞。

[0070] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于在有此需要的受试者中修复脊髓损伤的方法，包括：

[0071] 在有此需要的受试者的受累部位植入本文所定义的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种，其中所述气凝胶或泡沫包括任选形成的定向冷冻的模板化或对准的微通道；

[0072] 使得气凝胶或泡沫通过神经细胞沿着模板化或对准的微通道的对准生长来促进脊髓修复。

[0073] 在另一个实施方案中，本文提供了包括本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种的食品。

[0074] 在上述食品的又一个实施方案中，可以产生用于基于细胞或基于植物的肉类工业的食品，并且可以利用细胞农业技术来产生包括或使用如本文描述的气凝胶和/或泡沫的养殖性肉制品或植物性肉制品，例如那些包括衍生自脱细胞的植物或真菌组织的材料的气凝胶和/或泡沫。下文所包括的实施例支持本文描述的气凝胶和/或泡沫可以被烹饪，可以支持哺乳动物细胞生长，可以被着色并形成植物性和/或细胞性肉制品。下文所述的实施例包括以植物为基础的金枪鱼模拟品的详细实施例作为说明性实施例。

[0075] 在上述食品的又一个实施方案中，食品可以包括染料或着色剂。

[0076] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，食品可以包括胶合在一起的两个或多个气凝胶或泡沫亚基。

[0077] 在上述一种或多种食品中任一种的另一个实施方案中，所述胶可以包括琼脂。

[0078] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，气凝胶或泡沫可以包括任选地通过定向冷冻形成的模板化或对准的微通道，并且其中气凝胶或泡沫包括沿着模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞或内皮细胞，或其任何组合；优选地，其中所述气凝胶或泡沫包括任选地通过定向冷冻形成的模板化或对准的微通道，并且其中所述气凝胶或泡沫包含沿着模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、脂肪细胞、结缔组织细胞(例如成纤维细胞)、软骨、骨、上皮或内皮细胞或其任何组合。

[0079] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种在食品中的用途。

[0080] 在又一个实施方案中，本文提供了一种从脱细胞的植物或真菌组织制备单结构细胞、结构细胞组或两者的方法，包括：

[0081] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0082] 通过对脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组，从脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两者。

[0083] 在上述方法的又一个实施方案中，浸碱可以包括用碱和过氧化物处理脱细胞的植物或真菌组织，优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱，和过氧化氢作为过氧化物。

[0084] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，浸碱可以包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理脱细胞的植物或真菌组织。

[0085] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织

可以在将过氧化氢加入反应之前用氢氧化钠水溶液处理第一时间段。

[0086] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,过氧化氢可以作为30%的过氧化氢水溶液加入。

[0087] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,用于浸碱的过氧化氢可以按以下比例使用:

[0088] 约20mL至约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0089] 例如:

[0090] 约20mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0091] 约10mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;或

[0092] 约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液。

[0093] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,该方法还可以包括用一种或多种中和处理来中和pH的步骤。

[0094] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,中和处理可以包括用酸溶液,优选HCl水溶液进行处理。

[0095] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,浸碱可以在加热至约80℃的情况下进行。

[0096] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,对于1M氢氧化钠水溶液,可以使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行浸碱,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,可以使用当量比进行浸碱。

[0097] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,浸碱可以进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

[0098] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,可以通过离心收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

[0099] 在又一个实施方案中,本文提供了通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的单结构细胞、结构细胞组或两者。

[0100] 在另一个实施方案中,本文提供了一种纤维素基水凝胶,其包含通过用二甲基乙酰胺和氯化锂溶解,然后用乙醇再生而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。

[0101] 在又一个实施方案中,本文提供了一种制备纤维素基水凝胶的方法,包括:

[0102] 提供脱细胞的植物或真菌组织;

[0103] 通过用二甲基乙酰胺(DMAc)和氯化锂(LiCl)处理来溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素;以及

[0104] 通过与乙醇的溶剂交换从溶解的纤维素再生纤维素基水凝胶,

[0105] 从而提供纤维素基水凝胶。

[0106] 在上述方法的另一个实施方案中,与乙醇的溶剂交换可以使用透析膜进行,或者通过在溶解的纤维素上部添加乙醇来促进溶剂交换。

[0107] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，该方法可以进一步包括用过氧化氢漂白纤维素基水凝胶。

[0108] 在另一个实施方案中，本文提供了一种纤维素基水凝胶，其包含通过用二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(例如1-丁基氯化吡啶和氯化铝，与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓，优选室温离子液体)、或其任何组合溶解而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。

[0109] 在又一个实施方案中，本文提供了一种制备纤维素基水凝胶的方法，包括：

[0110] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0111] 通过用二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(例如1-丁基氯化吡啶和氯化铝，与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓，优选室温离子液体)、或其任何组合处理而溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素；

[0112] 获得溶解的纤维素，并使用溶解的纤维素制备纤维素基水凝胶。

[0113] 在另一个实施方案中，本文提供了一种通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的纤维素基水凝胶。

[0114] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种的另一个实施方案中，水凝胶可以包括本文描述的一种或多种中的任一种纤维素基水凝胶。

[0115] 在又一个实施方案中，本文提供了一种食品，包括本文描述的一种或多种气凝胶、或一种或多种泡沫或一种或多种结构细胞中的任何一种，其中所述食品是肉模拟品，并且包括多条线，所述多条线提供在金枪鱼、三文鱼或另一鱼类肉中发现的脂肪白线外观。

[0116] 在上述食品的又一个实施方案中，食品可以是金枪鱼、三文鱼或另一种鱼肉的模拟品。

[0117] 在上述一种或多种食品中任一种的另一个实施方案中，食品可以含有一种或多种提供金枪鱼、三文鱼或另一种鱼肉的颜色的染料或着色剂。

[0118] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，多条线可以形成在气凝胶或泡沫中形成的切口或通道中。

[0119] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，多条线可以包括二氧化钛，任选地与琼脂结合剂或另一种这样的结合剂组合。

[0120] 在上述一种或多种食品的另一个实施方案中，任选地与琼脂结合剂组合的二氧化钛可以被施加到形成在气凝胶或泡沫中的切口或通道中以提供金枪鱼、三文鱼或另一种鱼类肉中发现的脂肪白线外观。

[0121] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于制备食品的方法，所述食品是金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉模拟品，所述方法包括：

[0122] 提供本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种；

[0123] 任选地，将气凝胶染色或着色为金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉的颜色；

[0124] 切割或以其他方式处理气凝胶，以便沿着气凝胶的表面形成切口或通道；以及

[0125] 将染料或着色剂施加到切口或通道，以提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉特有的脂肪白线外观。

[0126] 在上述方法的另一个实施方案中，施加到切口或通道的染料或着色剂可以包括二

氧化钛。

[0127] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,施加到切口或通道的染料或着色剂可与结合剂组合。

[0128] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,结合剂可以包括琼脂。

[0129] 在另一个实施方案中,本文提供了一种通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的食品。

[0130] 在另一个实施方案中,本文提供了一种不可吸收的真皮填充剂,所述真皮填充剂包括本文描述的气凝胶、泡沫、结构细胞或纤维素基水凝胶;或其任何组合。

[0131] 在又一个实施方案中,本文提供了一种真皮填充剂,所述真皮填充剂包括衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者,所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构,所述单结构细胞或结构细胞组或两者通过浸碱从植物或真菌组织中衍生。

[0132] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,真皮填充剂可以进一步包括载体流体或凝胶。

[0133] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中,载体流体或凝胶可以包括水、水溶液或水凝胶。

[0134] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中,载体流体或凝胶可以包括盐水溶液,或胶原、透明质酸、甲基纤维素和/或溶解的植物衍生的脱细胞纤维素基水凝胶。

[0135] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,真皮填充剂可以进一步包括麻醉剂。

[0136] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中,麻醉剂可以包括利多卡因、苯佐卡因、丁卡因、波洛卡因(polocaine)、肾上腺素或其任何组合。

[0137] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,真皮填充剂可以包括PBS(盐水)、透明质酸(交联或非交联)、海藻酸盐、胶原、普朗尼克酸(例如普朗尼克F127)、琼脂、琼脂糖或纤维蛋白、羟基磷灰石钙、聚-L-乳酸、自体脂肪、硅酮、葡聚糖、甲基纤维素或其任何组合。

[0138] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,真皮填充剂可以包括以下的至少一种:2%利多卡因凝胶;包括20%苯佐卡因、6%利多卡因和4%丁卡因的三重麻醉凝胶(BLT凝胶);3%波洛卡因;或2%利多卡因与肾上腺素的混合物。

[0139] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,结构细胞可以具有至少约20μm的尺寸、直径或最小费雷特直径。

[0140] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,结构细胞可以具有小于约1000μm的尺寸、直径或最大费雷特直径。

[0141] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中,结构细胞可具有在约20μm至约1000μm的范围内的尺寸、直径或费雷特直径分布。

[0142] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中,结构细胞可以具有峰值在约200-300μm的粒度、直径或费雷特直径分布。

[0143] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中,结构细胞可具有在

约200μm至约300μm的范围内的平均粒度、直径或费雷特直径。

[0144] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，结构细胞可具有在约30,000至约75,000μm^2的范围内的平均投影颗粒面积。

[0145] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，真皮填充剂可以被灭菌。

[0146] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，灭菌可以通过γ灭菌。

[0147] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，真皮填充剂可配制用于真皮下注射、深层真皮注射、皮下注射(例如皮下脂肪注射)或其任何组合。

[0148] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以在注射器或注射装置中提供。

[0149] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种作为软组织填充剂、用于重建手术或两者的用途。

[0150] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种用于改善有此需要的受试者的美容外观的用途。

[0151] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种用于增加有此需要的受试者的组织体积、抚平皱纹、或两者的用途。

[0152] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于改善有此需要的受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合的方法，所述方法包括：

[0153] 向有此需要的区域施用或注射本文描述的一种或多种真皮填充剂中的任一种；

[0154] 从而改善受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合。

[0155] 在上述一种或多种用途或一种或多种方法的另一个实施方案中，受试者的原生细胞可以渗入真皮填充剂。

[0156] 在上述一种或多种用途或一种或多种方法的又一个实施方案中，真皮填充剂可以是不可吸收的，使得脱细胞的植物或真菌组织在受试者体内保持基本上完整。

附图说明

[0157] 这些和其他特征将根据以下描述和附图进一步理解，其中：

[0158] 图1显示了实施例1中描述的较小AA样品(图像中为100g)中AA(苹果)浸碱和变色的结果。将100g的脱细胞AA(苹果)材料在500mL的1M NaOH中于80℃下浸碱1小时。在整个浸碱过程中总共加入75mL的H_2O_2以使样品变色(反应形成Na_2O_2(过氧化钠)，它是一种强氧化剂)。图1(A)显示了在NaOH中的AA样品(T＝0分钟)。图1(B)显示了在刚加入25mL的H_2O_2后，在NaOH中的AA样品。变色过程在添加后立即开始。(T＝2分钟)。在图1(C)中，样品呈黄色(T＝10分钟)。在图1(D)中，AA样品在NaOH和H_2O_2添加中浸碱60分钟后呈灰白色；

[0159] 图2(A)显示了用作浸碱工艺起始材料的脱细胞AA组织，图2(B)显示了实施例1中描述的浸碱后获得的产物。显示了后续中和和离心后的产物。图2(B)所示的获得的产品材料非常粘稠，类似于一种苹果“糊状物”；

[0160] 图3显示了在实施例1中所述的浸碱后获得/分离的苹果衍生的脱细胞单结构细胞(以及包括连接在一起的一小部分单结构细胞的一些结构细胞组)的图像。在图3中，用刚果

红染料稀释和荧光染色结构细胞,发现细胞的微架构是完整的;

[0161] 图4显示了如实施例1中所述的通过添加H_2O_2浸碱(1M NaOH)的脱细胞AA的粒度分布(分析的N=10个图像)。平均尺寸证实了完整的单结构细胞的存在,这些细胞保持了其微架构特征;

[0162] 图5显示了如实施例1所述的在所有三种配比条件(即在100mL的1M NaOH中的20g、50g和100g AA)的整个60分钟浸碱过程中,AA-NaOH溶液的颜色变化;

[0163] 图6显示在各种溶液中浸碱后,对分离的单个AA细胞进行成像,并如实施例1所述那样测量其费雷特直径。结果表明,在各个条件下,分离的浸碱细胞的平均尺寸、数量和分布没有显著差异;

[0164] 图7显示了实施例1中描述的5%海藻酸盐气凝胶。支架的直径为6cm,厚度为0.7cm;

[0165] 图8显示了实施例1中描述的50%海藻酸盐气凝胶的显微镜图像(比例尺=500um);

[0166] 图9显示了交联的50%海藻酸盐气凝胶,其已按照实施例1中所述进行再水化(气凝胶直径约1cm,厚度约4mm);

[0167] 图10显示了如实施例1所述,在烹饪开始时,在煎锅上加入黄油的水化气凝胶(在本实施例中是基于海藻酸盐的)的实例;

[0168] 图11显示了图10中所示的相同气凝胶,但经过几分钟的烹饪后,观察到气凝胶保持其形状和完整性,并形成了硬皮;

[0169] 图12显示了实施例1中描述的"生的"(左)和熟的(右)气凝胶的比较;

[0170] 图13显示了实施例1中使用的定制定向冷冻设备;

[0171] 图14显示了图13所示定向冷冻设备的示意图;

[0172] 图15显示了注射器混合设备,用于将海藻酸盐水凝胶与凝胶混合,该凝胶包含从脱细胞苹果组织的浸碱中获得的结构细胞,如实施例1所述;

[0173] 图16显示了实施例1中描述的仍在猎鹰管中的气凝胶的俯视图,其中可以观察到多孔结构;

[0174] 图17显示了如实施例1所述从猎鹰管中取出后的气凝胶;

[0175] 图18显示了在-20℃的冷冻机中制备的气凝胶泡沫,没有额外的冷冻时间,气凝胶泡沫在低压冻干过程中会塌陷(左);和在低压冻干前在冷冻机(-20℃)中放置过夜的气凝胶泡沫(右);如实施例1中所述。每个支架的高度为约3cm;

[0176] 图19显示了实施例1中描述的整个气凝胶横截面的反射光图像(1倍聚光器,0.75倍放大率);

[0177] 图20显示了实施例1中描述的垂直于气凝胶圆柱体轴线的明视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦);

[0178] 图21显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的明视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦);

[0179] 图22显示了实施例1中描述的垂直于气凝胶圆柱体轴线的暗视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦);

[0180] 图23显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的暗视场横截面(立体显

微镜2倍聚光器,1.25倍变焦);

[0181] 图24显示了实施例1中描述的垂直于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面,露出微通道;

[0182] 图25显示了实施例1中描述的垂直于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面,露出微通道;

[0183] 图26显示了实施例1中描述的垂直于圆柱体轴线的SEM横截面;

[0184] 图27显示了垂直于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面;

[0185] 图28显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面,露出远程对准;

[0186] 图29显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面;

[0187] 图30显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面;

[0188] 图31显示了实施例1中描述的平行于气凝胶圆柱体轴线的SEM横截面;

[0189] 图32显示了实施例1中描述的干燥气凝胶部分(左)和0.1M $CaCl_2$处理的再水化气凝胶部分(右)的图像。图像是在大致相同的高度和放大率下采集的。气凝胶部分保持完整,保持其微观结构,并且可以被拾取和操纵。在这种情况下,$CaCl_2$溶液中的再水化使再水化气凝胶的海藻酸盐交联并稳定(右);

[0190] 图33描述了泡沫聚苯乙烯盒中的冷冻设备,其中在照片拍摄前刚刚加入LN_2,可以看到底部煮沸,如实施例1所述;

[0191] 图34显示了制备的水凝胶混合物的三种制剂,其中溶剂为A)PBS、B)0.9%盐水或C)水,以评估盐是否会在定向冷冻过程中改变冰晶形成和通道对准/架构(比例尺=2mm,适用于所有情况)。在所有情况下,材料冻结得如此之快,没有明显的冰晶形成,以至于没有观察到对准的通道。如实施例1中所述的方法得到非常致密和柔软的泡沫;

[0192] 图35显示了(A)在图33的LN_2系统上定向冷冻的水性海藻酸盐混合物(比例尺=2mm)。支架非常致密和柔软,在肉眼看来是均匀的。这与基于珀尔帖的定向冷冻平台上创建的支架形成了鲜明对比,在该平台上,通道架构肉眼清晰可见。然而,如(B)所示,在高分辨率(比例尺=200um)下,支架的小孔径变得可见,这为细胞侵袭和组织工程和食品科学中的几个潜在的其他应用创造了机会,例如,如实施例1所述;

[0193] 图36显示了实施例2中描述的5%海藻酸盐和果胶储备溶液;

[0194] 图37显示了实施例2中描述的普朗尼克储备溶液的制备;

[0195] 图38显示了实施例2中描述的明胶AA气凝胶的制备;

[0196] 图39显示了用于将水凝胶与实施例2中描述的浸碱结构细胞混合的基于注射器的混合设备;

[0197] 图40描述了在样品冷冻干燥之前和之后,如实施例2中所述制备的不同气凝胶制剂的示意图;

[0198] 图41显示了将GFP 3T3细胞(绿色)接种到实施例2中描述的用刚果红(红色)染色的某些气凝胶(如图所示)上的结果。将琼脂、海藻酸盐、果胶和明胶水凝胶与1.5g的脱细胞浸碱苹果(10%)或7.5g的脱细胞、浸碱苹果(50%)(比例尺=200μm)组合使用。在BX53立式显微镜上以10倍放大率采集图像,其中GFP滤光器用于细胞,TXRED滤光器用于支架;

[0199] 图42显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干琼脂基凝胶的应力-应变曲线;

[0200] 图43显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干琼脂基凝胶的应力-应变曲线；

[0201] 图44显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0202] 图45显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0203] 图46显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0204] 图47显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0205] 图48显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0206] 图49显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0207] 图50显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干甲基纤维素基凝胶的应力-应变曲线；

[0208] 图51显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干甲基纤维素基凝胶的应力-应变曲线；

[0209] 图52显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的干普朗尼克基凝胶的应力-应变曲线；

[0210] 图53显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的干普朗尼克和海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0211] 图54显示了具有水合物对应物的干燥样品的杨氏模量。浸碱AA的体积由1.5和7.5表示；两者均以克为单位，并且分别对应于10％和50％的溶液。使用1％琼脂、海藻酸盐和果胶的基础水凝胶。明胶是5％的最终溶液，如实施例2中所述；

[0212] 图55显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的水化琼脂基凝胶的应力-应变曲线；

[0213] 图56显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的水化琼脂基凝胶的应力-应变曲线；

[0214] 图57显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的水化海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0215] 图58显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的水化海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0216] 图59显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的水化果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0217] 图60显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的水化果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0218] 图61显示了实施例2中描述的含有1.5g浸碱AA的水化明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0219] 图62显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的水化明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0220] 图63显示了实施例2中描述的含有7.5g浸碱AA的水化普朗尼克和海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0221] 图64显示了水化样品的杨氏模量。浸碱AA的体积由1.5和7.5表示；两者均以克为

单位，并且分别对应于10％和50％的溶液。使用1％琼脂、海藻酸盐和果胶的基础水凝胶。明胶是5％的最终溶液，如实施例2中所述；

[0222] 图65显示了实施例2中描述的具有1.5g(10％)和7.5g(50％)脱细胞和浸碱AA的海藻酸盐基气凝胶的SEM；

[0223] 图66显示了实施例2中描述的具有1.5g(10％)和7.5g(50％)脱细胞和浸碱AA的果胶基气凝胶的SEM；

[0224] 图67显示了实施例2中描述的具有7.5g浸碱AA(50％)的海藻酸盐泡沫的共焦图像的最大强度z投影。红色是刚果红染色的支架。绿色为稳定转染的3T3细胞的GFP，蓝色为GFP 3T3细胞的细胞核；

[0225] 图68显示了实施例3中描述的72小时反应后DMAc和LiCl与脱细胞苹果的溶解溶液；

[0226] 图69显示了实施例3中描述的离心去除未溶解的物质后DMAc和LiCl与脱细胞苹果的溶解溶液；

[0227] 图70显示了纤维素膜再生。将溶解的纤维素倒入60mm的皮氏培养皿中以覆盖底部表面。将95％的乙醇倒在溶解溶液的顶部以促进溶液交换并使纤维素再生。如实施例3中描述的，在膜形成时观察到褶皱；

[0228] 图71显示了在加入乙醇的5分钟内，可以用抹刀推动膜并将其捆扎，如实施例3中描述；

[0229] 图72显示了如实施例3中描述的收集的再生纤维素凝胶；

[0230] 图73显示了如实施例3中描述的不受干扰时的再生纤维素膜；

[0231] 图74显示了再生纤维素膜，倾斜以显示皮氏培养皿中的载玻片，如实施例3中描述；

[0232] 图75显示了具有密度梯度的再生纤维素。用透析膜完成溶剂交换。再生发生在50mL猎鹰管中。圆柱形端部与膜接触并且具有最大量的溶液交换。与实施例3中描述的不太坚硬和密度较小的尾部区域相比，它更坚硬并保持其形状；

[0233] 图76显示了再生纤维素膜设置，透析膜由盖子固定，盖子的中心开有一个孔，如实施例3中描述；

[0234] 图77显示了图76中致密区域的低压冻干切片。如实施例3中描述，低压冻干导致支架塌陷；

[0235] 图78显示了用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔。这些材料在处理前是浅棕色的，用过氧化物处理后是透明的。事实上，由于它们的透明度，它们很难被看到，如实例3描述；

[0236] 图79显示了通过暗场成像成像的用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔，如实施例3中描述；

[0237] 图80显示了用刚果红染色以使微观结构可视的用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔；表面非常平坦，有小孔。这是具有TRITC的荧光图像，如实施例3中描述；

[0238] 图81显示了与浸碱AA混合的DMAc LiCl溶解的纤维素(颜色来自DMAc LiCl溶解的纤维素溶液；浸碱材料为白色)，如实施例3中描述；

[0239] 图82显示了溶解的纤维素，其中混合了浸碱AA。通过用一层95％乙醇涂布过夜使

膜再生。如实施例3中描述，获得了一种复合膜；

[0240] 图83显示了其中混合了浸碱材料的再生纤维素的荧光显微镜图像。可以看到来自浸碱材料的苹果结构细胞紧密地堆积在一起。如实施例3中描述的，这种形貌不同于从纯再生纤维素获得的光滑材料；

[0241] 图84显示了实施例3中描述的反应布置。反应在带有磁力搅拌棒的小烧杯中进行。这些烧杯用石蜡膜覆盖，并放入一个较大的烧杯中，烧杯中含有冰浴；

[0242] 图85显示了甲基纤维素和浸碱AA。与甘氨酸(在称重舟皿，上部)和浸碱AA(在皮氏培养皿，下部)混合的甲基纤维素。如实施例3中描述，1g甲基纤维素比0.5g(左两幅图像)更粘稠(右两幅图像)；

[0243] 图86显示了在室温下孵育过夜交联后，具有浸碱AA(苹果)和甘氨酸(添加甘氨酸后引入的AA)的甲基纤维素凝胶。凝胶可以从皮氏培养皿中取出并保持其形状。1g甲基纤维素凝胶更硬，如实施例3中描述；

[0244] 图87显示了甲基纤维素和浸碱AA凝胶。在冰浴中通过磁力搅拌将1g甲基纤维素、1g Aa在10mL的2M NaOH中混合1小时，然后在冰上加入5mL的30％甘氨酸在2M NaOH中的溶液并搅拌另外1小时。在60mm皮氏培养皿中在室温下交联过夜。凝胶可以被处理并保持其形状，如实施例3中描述；

[0245] 图88显示了用手术刀片将图87中的相同凝胶切成两半。一个被保留，另一个被用于测试如实施例3中描述的中和。用5％乙酸中和1小时，然后用10水洗涤。还测试了在这样做之后是否会有NaOH的缓慢释放，这将导致pH增加。这确实发生了。结果，将半气凝胶洗涤70次，并且还用30％乙酸中和；

[0246] 图89显示了图88中过度洗涤的“半气凝胶”在-20℃下冷冻，然后在-46℃和0.050mbar下低压冻干(上图)。干燥的材料看起来很脆弱，但实际上摸起来相当坚硬。还观察到了定向冷冻。然后将切片撕下并浸入dH_2O中(下面图像)。如实施例3中描述，它保持完整并且具有柔软、粘性质地；

[0247] 图90显示了从图88中切割的气凝胶的后半部分被中和。立即用30％的乙酸进行中和。这产生了类似但相反的结果：随着时间的推移，pH会漂移到酸性值，且乙酸的缓慢释放使pH漂移到较低值。这是用1M NaOH缓慢滴定来校正的。然而，这表明5％至30％乙酸之间的最佳中和步骤可能是更快、更有效的方法。如实施例3中描述，将中性样品保留以供将来的染色测试；

[0248] 图91显示了甲基纤维素与用15％乙酸中和的浸碱AA(1:1)半气凝胶。还发现甲基纤维素凝胶(含有和不含有AA)膨胀很大。这也可以在冷冻和冷冻干燥时发生，如实施例3中描述；

[0249] 图92显示了甲基纤维素与用15％乙酸中和的浸碱AA(1:1)半气凝胶。图92所示的气凝胶被中和为半气凝胶(图91)。在冷冻过程中，它们膨胀以填充60mm的皮氏培养皿。一旦冷冻干燥，它们就会产生一种白色泡沫，很容易处理，而且相对较硬。一旦水化，它们就膨胀，如果它们继续膨胀，就会变成具有粘性稠度的松散材料，如实施例3中描述；

[0250] 图93显示了具有浸碱AA(1:1)膨胀的甲基纤维素。将半气凝胶放置在其原始的60mm皮氏培养皿上进行比较，如实施例3中描述；

[0251] 图94显示了甲基纤维素与浸碱AA(1:1)持续膨胀成松散材料，如实施例3中描述；

[0252] 图95显示了甘氨酸在降低的温度(约4℃)下从40％的溶液中结晶,如实施例3中描述;

[0253] 图96显示了羧甲基纤维素凝胶在不存在甘氨酸的情况下产生类似的物理交联材料;

[0254] 图97显示了如实施例4描述的在植入环钻的缺损中之前的海藻酸盐(左)和果胶(右)气凝胶支架;

[0255] 图98显示了如实施例4描述的植入顶骨的环钻缺陷中的海藻酸盐(左)和果胶(右)气凝胶生物材料;

[0256] 图99显示了实施例4中描述的切除前大鼠颅盖中的海藻酸盐气凝胶植入物;

[0257] 图100显示了实施例4中描述的切除大鼠颅盖。

[0258] 图101显示了8周后切除并用计算机断层扫描(CT)扫描的具有环钻缺陷的大鼠颅盖。海藻酸盐生物材料(左)和果胶生物材料(右)。结果表明,气凝胶生物材料支持体内细胞浸润和再生,如实施例4中描述;

[0259] 图102显示了在1小时时间内用20mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白,如实施例5描述的;

[0260] 图103显示了在1小时时间内用10mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白,如实施例5描述的;

[0261] 图104显示了在1小时时间内用5mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白,如实施例5描述的;

[0262] 图105显示了(A)在用不同量的过氧化物进行1小时浸碱后,对于较高的过氧化物浓度,颜色稍微更清晰;(B)中和后,轻微的颜色变化消失,所有三者都有清晰/灰白色;和(C)对于三种过氧化氢比例,最终浓缩产物是可比较的,如实施例5中描述;

[0263] 图106显示了实施例6中描述的三种不同AA:NaOH比例条件(即浸碱条件)的荧光显微镜图像。(A)-1:5、(B)-1:2和(C)-1:1。使用BV滤光器和刚果红染色,用Olympus SZX16显微镜以2.5倍放大率捕获图像;

[0264] 图107显示了实施例6中描述的不同比例的脱细胞AA与1M NaOH的浸碱的粒度分布直方图;

[0265] 图108显示了实施例7描述的冷冻干燥后从60mm皮氏培养皿中切下的海藻酸盐气凝胶生物材料的实例;

[0266] 图109显示了被压缩的干(左)和交联/湿(右)海藻酸盐生物材料的10mm活检打孔凿-轴向测量,如实施例7描述;

[0267] 图110显示了描述的CMC与柠檬酸交联的结果。CMC对照为透明凝胶,而具有浸碱材料(结构细胞)的CMC为半透明白色凝胶,如实施例8中描述;

[0268] 图111显示了用柠檬酸膜交联的CMC的结果。CMC对照(左)是透明膜,而具有浸碱材料(结构细胞)的CMC是半透明的白色膜(其更硬),它具有虾壳质地,如实施例8中描述;

[0269] 图112显示了实施例8中描述的反应完成后的纤维素;

[0270] 图113显示了实施例8中描述的用水强烈洗涤完成后的纤维素;

[0271] 图114显示了FTIR光谱,显示了脱细胞支架(2AP-DECEL)和琥珀酰化植物衍生纤维素的化学结合复合物(5AP-AS)的FTIR光谱,如实施例8中描述;

[0272] 图115显示了用实施例3中描述的制剂生产的低压冻干气凝胶(样品P1、P2、P3、P4、P5、P6),直径约1cm;

[0273] 图116显示了用实施例3中描述的制剂生产的更大规模的低压冻干(直径3cm)气凝胶(P2(左)、P7(中)、P3(右)图像);

[0274] 图117显示了一种"金枪鱼"寿司模拟品(红色),它是通过将气凝胶(交联的50%海藻酸盐)支架片状物分层并用更多的海藻酸盐胶合而成。然后将构建体切成3×2cm的片状物(近似),并用红色食品染料着色,以模拟真正的金枪鱼。如实施例9中描述,沿着其长度切割小的对角切片以模拟肌肉层之间的界面;

[0275] 图118显示了一种"金枪鱼"寿司模拟品(红色),它是通过将之前染色的气凝胶(交联的50%海藻酸盐)片状物分层并用二氧化钛(TiO_2)染色的琼脂"胶水"胶合而成,二氧化钛是一种常见的白色食品着色剂。如实施例9中描述,这种构建体允许更令人信服地模拟真实金枪鱼中存在于不同肌肉组织层之间的筋膜;

[0276] 图119显示了一种"金枪鱼"(红色),它是通过将之前染色的气凝胶(交联的50%海藻酸盐)片状物分层并用二氧化钛(TiO_2)染色的琼脂"胶水"胶合而成,二氧化钛是一种常见的白色食品着色剂。琼脂胶可以放置在各层之间,或者放入沿着气凝胶表面切割的薄凹槽中,以产生存在于肌肉层之间的筋膜的线性图案,如实施例9中描述;

[0277] 图120显示了实施例10中描述的采用浸碱AA的针阻塞测试。在(A)中,显示了27G针和注射器。(B)显示了浸碱AA的挤出。(C)显示了例如用于3D打印或受控注射/挤出的实例;

[0278] 图121显示了实施例10中描述的从1cc注射器(N=10次)挤出水的力-位移曲线;

[0279] 图122显示了实施例10中描述的从1cc注射器中(N=10次)挤出的20%浸碱AA在盐水混合物中的力-位移曲线;

[0280] 图123显示了实施例10中描述的从1cc注射器(N=10次)挤出的未稀释浸碱AA的力-位移曲线;

[0281] 图124显示了实施例10中描述的仅水、在0.9%盐水中稀释的20%浸碱AA溶液和未稀释的浸碱材料的最大挤出力;

[0282] 图125显示了第II代真皮填充剂。(A)显示了MER,(B)显示了MER20SAL80,(C)显示了MER20COL80,且(D)显示了MER20REG80。如实施例10描述的,注射剂含有0.3%利多卡因,在1cc注射器中制备为600μL注射剂;

[0283] 图126显示了在大鼠模型中用作真皮填充剂的第II代真皮填充剂的结果。(A)显示了注射前,并且(B)显示了注射后,如实施例10中描述。黑色轮廓用于每周跟踪植入部位。测量了皮肤下肿块。使用游标卡尺测量肿块尺寸。椭球估计用于估计注射剂的面积和体积;

[0284] 图127显示了实施例10中描述的大鼠模型注射剂的真皮填充剂尺寸测量结果。(A)显示归一化高度,(B)显示归一化椭球面积,(C)显示归一化椭球体积;

[0285] 图128显示了描述在低压冻干之前或之后使用交联制备气凝胶/泡沫的说明性实例的流程图;

[0286] 图129显示了使用5mm活检打孔凿切割的气凝胶支架(A),然后使用细线移除(B),得到最终的支架(C和D);

[0287] 图130显示了用交联的再生纤维素(D1)和琥珀酰化纤维素生产的气凝胶;

[0288] 图131显示了用交联的浸碱纤维素(AS4)和琥珀酰化纤维素生产的气凝胶;

[0289] 图132显示了由交联再生纤维素(AD1CLS)制备的气凝胶底层圆形底表面的明视场显微镜图像；

[0290] 图133显示了图132的气凝胶底层的圆形顶表面的明视场显微镜图像；

[0291] 图134显示了由交联的浸碱纤维素(AS4)制备的气凝胶顶层圆形底表面的明视场显微镜图像；

[0292] 图135显示了图134的气凝胶底层的圆形顶表面的明视场显微镜图像；

[0293] 图136显示了由交联的浸碱纤维素(样品S6、S9和S10)与琥珀酰化浸碱纤维素混合制备的气凝胶AS6、AS9和AS10；

[0294] 图137显示了每个气凝胶AS6、AS9和AS10的底层底表面的显微镜图像；

[0295] 图138显示了与t＝0时的气凝胶相比，每种气凝胶AS6、AS9和AS10在PBS中45分钟后的稳定性；

[0296] 图139显示了在两个50mL注射器中混合的水凝胶，这两个注射器与f/f路厄锁定连接器连接(A)，并在定向冷冻前插入钢管中(B和C)；

[0297] 图140显示了定向冷冻后、交联前的气凝胶Merc.AA、D1A和Merc.AA+D1A；

[0298] 图141显示了交联后的气凝胶Merc.AA、D1A和Merc.AA+D1A；

[0299] 图142显示了图141的Merc.AA气凝胶的显微镜图像；

[0300] 图143显示了图141的D1A气凝胶的显微镜图像；

[0301] 图144显示了图141的Merc.AA+D1A气凝胶的显微镜图像；

[0302] 图145显示了图141的Merc.AA+琥珀酰化气凝胶的显微镜图像；

[0303] 图146显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后，用低压冻干后交联的Merc.AA制备的气凝胶；

[0304] 图147显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后，用低压冻干后交联的D1A制备的气凝胶；

[0305] 图148显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后，用低压冻干后交联的Merc.AA+D1A制备的气凝胶；

[0306] 图149显示了在PBS中孵育24小时后，用低压冻干后交联的Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备的气凝胶；

[0307] 图150显示了通过Merc.AA与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像；

[0308] 图151显示了通过再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像；

[0309] 图152显示了通过Merc.AA+再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像；

[0310] 图153显示了用于优化如上所述制备的气凝胶中孔隙形成的硅酮模具和针(30G)；

[0311] 图154显示了在与柠檬酸交联之前(A、B)和交联之后(C、D)使用硅酮模具针由Merc.AA制备的气凝胶；

[0312] 图155显示了在与柠檬酸交联之前(A、B、C)和交联之后(D)使用硅酮模具针由Merc.AA+再生纤维素制备的气凝胶；

[0313] 图156显示了在低压冻干后(左)和从针模中取出后(右)，使用硅酮模具针由Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备的气凝胶；

[0314] 图157显示了将图156(左)的交联气凝胶切成薄片(右)以进行后续成像；

[0315] 图158显示了通过Merc.AA与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像，比例尺＝2000μm(A)、1000μm(B)和500μm(C、D、E)；

[0316] 图159显示了图158的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像，显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面；

[0317] 图160显示了通过Merc.AA+再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像，比例尺＝2000μm(A)、1000μm(B)和500μm(C)；

[0318] 图161显示了图160的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像，显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面；

[0319] 图162显示了通过Merc.AA+琥珀酰化纤维素与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像，比例尺＝1000μm(A)和500μm(B)；

[0320] 图163显示了图162的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像，显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面；

[0321] 图164显示了用不同浓度的柠檬酸交联的浸碱琥珀酰化纤维素的傅里叶变换红外光谱(FTIR)；

[0322] 图165显示了由Merc.AA、Merc.AA+再生纤维素和Merc.AA+琥珀酰化纤维素与10％柠檬酸交联制备的气凝胶的傅立叶变换红外光谱(FTIR)，并与浸碱纤维素(Merc.AA 151)进行了比较；

[0323] 图166显示了在60mm TC平皿中由Merc.AA、Merc.AA+琥珀酰化纤维素和Merc.AA+再生纤维素制备的气凝胶，然后在110℃下交联1.5小时；

[0324] 图167显示了在机械测试前在盐水中浸泡30分钟的图166的5mm湿气凝胶样品；

[0325] 图168显示了压缩测试前(左)和压缩测试后(右)的干Merc.AA+再生纤维素(A)和湿Merc.AA+再生纤维素(B)支架；

[0326] 图169显示了干燥的气凝胶的机械性质，这些机械性质是使用单轴压缩测试获得的应力-应变曲线的线性部分斜率计算的；

[0327] 图170显示了湿气凝胶的机械性质，这些机械性质是使用单轴压缩测试获得的应力-应变曲线的线性部分斜率计算的；

[0328] 图171显示了沿着一排(n＝6)的24孔TC平皿铺板的每个气凝胶制剂；

[0329] 图172显示了交联前的低压冻干气凝胶；

[0330] 图173显示了交联后的低压冻干气凝胶；

[0331] 图174显示了在与气凝胶孵育的10分钟内，生长介质的颜色从红色变为黄色；

[0332] 图175显示了在中和和随后水洗后，气凝胶在MEMα(左)中孵育24小时时没有颜色变化。相对于储备培养基管，没有观察到颜色变化(右)；

[0333] 图176显示了由Merc.AA、Merc.AA+琥珀酰化纤维素和Merc.AA+再生纤维素制备产生的气凝胶；

[0334] 图177显示了图176的气凝胶，在该气凝胶上将100uL的最终细胞悬浮液铺板并孵育2.5小时，然后每孔加满1.5mL生长培养基；

[0335] 图178显示了用Hoechst在(A)MercAA气凝胶、(B)MercAA+琥珀酰化纤维素气凝胶和(C)MercAA+再生纤维素气凝胶上染色的GFP-NIH3T3细胞，比例尺＝100μm。紫色＝支架，

黄色点＝细胞核；

[0336] 图179显示了使用80℃的10％碳酸氢盐溶液进行一小时的浸碱；

[0337] 图180显示了碳酸氢盐浸碱苹果(底部)与氢氧化钠浸碱苹果(顶部)的对比；

[0338] 图181显示了在室温下使用10％碳酸氢盐溶液进行的五天浸碱反应；

[0339] 图182显示了碳酸氢盐浸碱的苹果浸碱的苹果(mer AA)产品；

[0340] 图183显示了浸碱AA，使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)；

[0341] 图184显示了浸碱AA的1％海藻酸盐冰球，使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)；

[0342] 图185显示了在低压冻干后(6.3倍)浸碱AA的暗视场显微镜图像，使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)；

[0343] 图186显示了浸碱AA的FTIR，使用碳酸氢盐在室温下5天(红色)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(黄色)和使用NaOH在80℃下1小时(蓝色)；

[0344] 图187显示了浸碱AA的单颗粒的荧光显微镜图像，使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(C)；

[0345] 图188显示了使用碳酸氢盐在室温下5天的浸碱AA的粒度分布直方图；

[0346] 图189显示了使用碳酸氢盐在80℃下1小时的浸碱AA的粒度分布直方图；

[0347] 图191显示了在脱细胞前在厨房使用食品加工机加工的MacIntosh苹果；

[0348] 图192显示了AA 136使用80℃的10％碳酸氢盐和15％ H_2O_2储备溶液，每隔15分钟进行一次浸碱总共进行60分钟；

[0349] 图193显示了使用碳酸氢盐浸碱并用30％ H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图；

[0350] 图194显示了使用NaOH浸碱并用30％ H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图；

[0351] 图195显示了使用碳酸氢盐浸碱并用15％ H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图；

[0352] 图196显示了在10倍放大率下用刚果红染色的浸碱AA的单细胞的荧光显微镜图像，所述AA用碳酸氢盐浸碱并用30％ H_2O_2(A)和15％ H_2O_2(B)储备溶液漂白；

[0353] 图197显示了与使用NaOH浸碱并用30％ H_2O_2漂白的浸碱AA相比的用碳酸氢盐浸碱并用15％ H_2O_2或30％ H_2O_2漂白的浸碱AA的FTIR；

[0354] 图198显示了使用碳酸氢盐浸碱并用15％ H_2O_2漂白的浸碱AA或使用NaOH浸碱并使用脱细胞或生苹果的浸碱AA的FTIR；

[0355] 图199显示了在大型霍巴特立式搅拌碗中的生苹果加工；

[0356] 图200显示了在脱细胞过程期间在0.1％ SDS中加工的苹果；

[0357] 图201显示了在0.1M $CaCl_2$溶液中加工的苹果；

[0358] 图202脱细胞苹果在灶台上的浸碱；

[0359] 图203显示了使用25μl不锈钢筛对脱细胞苹果的筛分；

[0360] 图204显示了在灶台上制备的2％海藻酸盐溶液；

[0361] 图205显示了通过立式搅拌机得到的浸碱苹果和2％海藻酸盐的混合物；

[0362] 图206显示了沉积到硅酮模具中的生物材料；

[0363] 图207显示了在低压冻干机中含有冷冻生物材料的硅酮模具；

[0364] 图208显示了煮熟的生物材料；

[0365] 图209显示了通过真空低温烹饪(A)、煎炸(b)和烘焙(C)烹饪的60mm海藻酸盐/merAA冰球；

[0366] 图210显示了苹果(AA138)加工；

[0367] 图211显示了加工的苹果(Mer 138)的脱细胞和浸碱；

[0368] 图212显示了支架制造；

[0369] 图213显示了油炸生物材料(A)和鱿鱼(B)；

[0370] 图214显示了真空低温烹饪、烧焦的生物材料(A)和鳕鱼(B)；

[0371] 图215显示了生生物材料(RB)、熟生物材料(CB)、生鳕鱼(RC)、熟鳕鱼(CC)、生鱿鱼(RS)、熟鱿鱼(CS)的颜色测试；

[0372] 图216显示了6个样品和研磨咖啡的气味站；

[0373] 图217显示了生的和煮熟的生物材料与鳕鱼和鱿鱼的质地比较站；

[0374] 图218显示了AA139的苹果切碎和脱细胞；

[0375] 图219显示了脱细胞AA 139的浸碱；

[0376] 图220显示了支架制造；

[0377] 图221显示了冷冻前漂白的MerAA139(左)和未漂白的1％海藻酸盐/AA139生物材料(右)；

[0378] 图222显示了味道的感官结果-单词频率；

[0379] 图223显示了质地/口感的感官结果-单词频率；

[0380] 图224显示了1％海藻酸盐处理物的单向冷冻；

[0381] 图225显示了在0.7倍(左)和1.6倍(右)放大率下1％海藻酸盐生物材料在单向冷冻后的顶面显微镜图像；

[0382] 图226显示了在0.7倍(左)和1.25倍(右)放大率下1％海藻酸盐生物材料在单向冷冻后的底面显微镜图像；

[0383] 图227显示了在皮氏培养皿中的Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)的单向冷冻；

[0384] 图228显示了在单向冷冻后“在皮氏培养皿中的Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)”生物材料的边缘(左)和中心(右)的显微镜图像；

[0385] 图229显示了在0.7倍放大率下在单向冷冻后“在皮氏培养皿中的Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)”生物材料的边缘(左)和中心(右)的显微镜图像；

[0386] 图230显示了处理物A(左)、UF处理物(中间)和低压冻干生物材料(右)的生物材料制备；

[0387] 图231显示了使用1倍的处理物A的纵向切口的显微镜图像；

[0388] 图232显示了处理物B的生物材料制备；

[0389] 图233显示了处理物B的单向冷冻；

[0390] 图234显示了处理物B的低压冻干生物材料；

[0391] 图235显示了1.6倍(左)和0.7倍(右)放大率下的低压冻干处理物B的显微镜图像；

[0392] 图236显示了0.7倍(左)和1.6倍(右)放大率下的交联处理物B的显微镜图像；

[0393] 图237显示了金属模具中的浸碱/脱细胞棕榈心共混物；

[0394] 图238显示了交联前脱细胞和浸碱棕榈心的低压冻干生物材料；

[0395] 图239显示了脱细胞和浸碱棕榈心的生交联生物材料“鱼条”(左)和“扇贝”(右)；

[0396] 图240显示了脱细胞和浸碱棕榈心的熟交联生物材料“鱼条”(左)和“扇贝”(右)；

[0397] 图241显示了煮熟的棕榈心生物材料的剥皮层；

[0398] 图242显示了生物材料的制备和处理物C的各层；

[0399] 图243显示了处理物B的胶合过程和两个不同片状物的制造；

[0400] 图244显示了处理物C的胶合过程和两个不同片状物的制造；

[0401] 图245显示了1％$CaCl_2$在室温下1小时或在冰箱中24小时的交联步骤；

[0402] 图246显示了处理物B在室温下交联1小时；

[0403] 图247显示了交联(左)和平底锅烹饪处理物C；

[0404] 图248显示了平底锅烹饪过程和平底锅烹饪处理物B；

[0405] 图249显示了处理物B在冰箱中交联24小时；

[0406] 图250显示了煮沸过程和煮沸处理物B；

[0407] 图251显示了成分混合和产品制造——鱼A和鱼B；

[0408] 图252显示了真空低温烹饪处理后的鱼A；

[0409] 图253显示了平底锅烹饪和煮熟的鱼A；

[0410] 图254显示了平底锅烹饪的鱼A-横截面；

[0411] 图255显示了放置在inox模具中的鱼B；

[0412] 图256显示了低压冻干鱼B；

[0413] 图257显示了交联的鱼B；

[0414] 图258显示了在真空低温烹饪(左)之前和真空低温烹饪(右)期间真空密封的鱼B；

[0415] 图259显示了平底锅烹饪和平底锅烹饪的鱼B的横截面；

[0416] 图260显示了可注射复合材料的高通量连续交联。A:可注射果胶和MerAA混合物。B:将水凝胶材料装载到用穿孔板挤出的压板中。C:挤出到交联浴中。D:所得到的具有预定形状的交联水凝胶。E:物理性质可以调节;在这里可以很容易地处理材料。F:收集并准备低压冻干(如果需要)；

[0417] 图261显示了连续进料交联的示意图；

[0418] 图262显示了皮下植入4周后4倍和10倍切除的定向冷冻支架-HE(A、B)和MT(C、D)；

[0419] 图263显示了皮下植入12周后4倍和10倍切除的定向冷冻支架-HE(A、B)和MT(C、D)；

[0420] 图264显示了在0.9％无菌盐水溶液中进行手术皮下植入之前的气凝胶材料；

[0421] 图265显示了Sprague Dawley大鼠在缝合前将气凝胶材料皮下植入其各自的部位；

[0422] 图266显示了皮下植入4周后4倍和10倍切除的非定向冷冻气凝胶支架-HE(A、B)和MT(C、D)；

[0423] 图267显示了皮下植入12周后4倍和10倍切除的非定向冷冻气凝胶支架-HE(A、B)和MT(C、D)；

[0424] 图268显示了在0.9％无菌盐水溶液中植入之前的定向冷冻支架；

[0425] 图269显示了植入Sprague Dawley大鼠脊髓中的定向冷冻支架;

[0426] 图270显示了手术植入颅骨缺损之前的气凝胶生物材料;

[0427] 图271显示了植入了与海藻酸盐和氯化钙交联的气凝胶材料的Sprague Dawley大鼠;和

[0428] 图272显示了8周前植入气凝胶材料后切除的Sprague Dawley大鼠的切除颅骨伴颅骨缺损的CT扫描。

具体实施方式

[0429] 本文描述了衍生自和/或包含脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞的气凝胶、水凝胶和泡沫。应当理解,提供实施方案和实施例是为了旨在用于本领域技术人员的说明性目的,而不意味着以任何方式进行限制。

[0430] 本文提供了衍生自和/或包含脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞的气凝胶、水凝胶和泡沫。如下文详细描述的,现在已经开发出气凝胶、水凝胶和泡沫,它们可以衍生自和/或可以包括脱细胞的植物或真菌组织或其结构细胞,并且可以包括感兴趣的植物或真菌微观结构和/或架构;可以通过易于规模化的生产方法来生产;可以提供多种支架微观结构和/或宏观结构和/或生物化学;可提供可调的机械性质;可以提供可调的孔隙率、密度、架构(无定形、对准的、通道化的等)、和/或取向;可以在体外和/或体内具有生物相容性;可以对各种条件(例如在食品的情况下的烹饪条件)稳定;可大规模生产,并且控制微观和/或宏观结构性质;可以允许对密度、远程架构和/或大量制造进行控制;可以在生产的材料数量以及产品尺寸和/或形状方面是可缩放的;可以用GRAS组分生产以保持可食用性;可以冷冻干燥以提供货架稳定性和/或可运输性;或其任何组合。通过使用分布在衍生自一种或多种脱水、低压冻干(lyophilized)或冷冻干燥的水凝胶的载体内的衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者(具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组),现在已经开发并制备了各种具有期望性质的气凝胶、水凝胶和泡沫。在某些实施方案中,使用本文描述的浸碱处理,可以从植物或真菌组织(通常是脱细胞的植物或真菌组织)衍生单结构细胞、结构细胞组或两者,这允许可重复和可规模化生产。本文还详细描述了相关的方法和用途以及生产方法(这些部分或全部可能是自动化的)。

[0431] 在一个实施方案中,本文提供了一种气凝胶或泡沫,包括:

[0432] 衍生自植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者,所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构;

[0433] 所述单结构细胞、结构细胞组或两者分布在载体内,所述载体衍生自脱水、低压冻干或冷冻干燥的水凝胶。

[0434] 可以理解,气凝胶或泡沫通常可以包括任何三维支架或基质。通常,本文描述的气凝胶和泡沫是高度多孔和轻质(低密度)的,尽管也如本文描述的,孔隙率和密度可以根据需要进行调节。气凝胶和泡沫通常是亲水性的,并且可以作为干气凝胶或泡沫,或再水化或润湿的气凝胶或泡末(有时在本文中也称为水凝胶)提供,其另外包含水、水溶液(例如细胞培养缓冲液、盐溶液、缓冲液或另一种水溶液)、或另一种液体(例如醇,例如乙醇,或非水性液体)。

[0435] 可以理解,植物或真菌组织可以包括形成为扩展的3D结构的多个连接的植物细胞。这样的植物或真菌组织可以进行脱细胞(例如,通过使用WO2017/136950,标题为“Decellularised Cell Wall Structures From Plants and Fungus and Use Thereof as Scaffold Materials”中描述的脱细胞方法,其全部内容通过引用并入本文),以便提供缺乏植物或真菌细胞的细胞材料和核酸的脱细胞的植物或真菌组织,但保持三维结构基本上完整。这种脱细胞的植物或真菌组织(例如脱细胞的托杯或果肉组织,或任何其他合适的感兴趣的植物或真菌组织/结构/组分)可以包括扩展的3D结构(它可以由纤维素、半纤维素、果胶、木质素等中的任何一种或多种组成;通常,扩展的3D结构可以包括木质纤维素结构/材料),它可以包括多个连接的结构细胞。如本文描述的,单结构细胞、结构细胞组(包括多个连接的单结构细胞)或两者可衍生自扩展的3D结构,所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构。在某些实施方案中,单结构细胞或结构细胞组可以包括分离的结构细胞,或小的簇状结构细胞组,该结构细胞具有基本上完整的三维结构,通常类似于图3所示的中空细胞或口袋。可以理解,这样的结构通常可以包括木质纤维素材料,例如纤维素和/或基于木质素的结构。应当理解,在某些实施方案中,这样的结构可以包括其他结构单元,例如甲壳素和/或果胶。

[0436] 在一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫的某些实施方案中,衍生出单结构细胞或结构细胞组的植物或真菌组织可以包括脱细胞的植物或真菌组织。

[0437] 如本文描述的,单结构细胞、结构细胞组或两者可优选衍生自脱细胞的植物或真菌组织,且可以甚至更优选衍生自使用本文详细描述的浸碱处理的脱细胞的植物或真菌组织。然而,应当理解,在某些实施方案中,例如,单结构细胞、结构细胞组或两者可以反而衍生自植物或真菌组织,然后随后脱细胞,或者可以以同时提供脱细胞的方式衍生自植物或真菌组织。在某些实施方案中,结构细胞可以包括脱细胞的结构细胞,所述脱细胞的结构细胞包括在脱细胞之前先前包含一个或多个植物细胞的细胞壁。

[0438] 在某些实施方案中,本文描述的气凝胶、泡沫、水凝胶和其他此类材料可以包括在植物和/或真菌界中发现的细胞壁架构和/或血管结构,以产生3D支架,所述3D支架可促进细胞浸润、细胞生长、骨组织修复、骨重建、再生治疗、脊髓修复等。可以理解,本文描述的生物材料可以由植物或真菌生物体的任何合适部分生产。生物材料可以包括例如,一种或多种物质,例如纤维素、甲壳素、木质素、木脂素、半纤维素、果胶、木质纤维素和/或在这些生物体中天然存在的任何其他合适的生物化学品/生物聚合物。

[0439] 可以理解,除非另有说明,否则本文中使用的植物和真菌界的含义/定义基于Cavalier-Smith分类法(1998)。

[0440] 在某些实施方案中,植物或真菌组织通常可以包括适合于特定应用的任何合适的植物或真菌组织或部分。在某些实施方案中,植物或真菌组织可以包括苹果托杯(苹果(Malus pumila))组织、蕨类植物(单系蕨类植物(Monilophynts))组织、芜菁(Brassica rapa)根组织、银杏枝组织、马尾(木贼属(equisetum))组织、hermocallis杂交叶组织、羽衣甘蓝(甘蓝(Brassia oleracea))茎组织、针叶树花旗松(花旗松(Pseudotsuga menziesii))组织、仙人掌果实(火龙果)果肉组织、蔓长春花(Maculata Vinca)组织、Aquatic Lotus(莲花(Nelumbo nucifera))组织、郁金香(Tulipa gesneriana)花瓣组织、车前草(香蕉(Musa paradisiaca)组织、花椰菜(甘蓝(Brassica oleracea))茎组织、枫叶

(桐叶槭(Acer psuedoplatanus))茎组织、甜菜(Beta vulgaris)初生根组织、绿洋葱(洋葱(Allium cepa))组织、兰花(兰科植物(Orchidaceae))组织、芜菁(Brassica rapa)茎组织、韭菜(韭葱(Allium ampeloprasum))组织、槭树(槭属(Acer))树枝组织、芹菜(Apium graveolens)组织、绿洋葱(洋葱(Allium cepa))茎组织、松组织、芦荟组织、西瓜(Citrullus lanatus var.lanatus)组织、草甸排草(Lysimachia nummularia)组织、仙人掌组织、毛剪秋罗(Lychnis Alpina)组织、大黄(波叶大黄(Rheum rhabarbarum))组织、南瓜肉(西葫芦(Cucurbita pepo))组织、匐地仙人掌(天门冬科(Asparagaceae))茎组织、紫露草(无毛紫露草(Tradescantia virginiana))茎组织、芦笋(石刁柏(Asparagus officinalis))茎组织、蘑菇(真菌)组织、茴香(Foeniculum vulgare)组织、玫瑰(蔷薇属(Rosa))组织、胡萝卜(Daucus carota)组织、或梨(苹果类(Pomaceous))组织。WO2017/136950,标题为“Decellularised Cell Wall Structures from Plants and Fungus and Use Thereof as Scaffold Materials”的实施例18中描述了植物和真菌组织的其他实例,其全部内容通过引用并入本文。

[0441] 在某些实施方案中,脱细胞的植物或真菌组织可以是基于纤维素的、基于甲壳素的、基于壳聚糖的、基于木质素的、基于木脂素的、基于半纤维素的或基于果胶的、或其任何组合。在某些实施方案中,植物或真菌组织可以包括来自苹果托杯(苹果(Malus pumila))组织、蕨类植物(单系蕨类植物(Monilophynts))组织、芜菁(Brassica rapa)根组织、银杏枝组织、马尾(木贼属(equisetum))组织、hermocallis杂交叶组织、羽衣甘蓝(甘蓝(Brassia oleracea))茎组织、针叶树花旗松(花旗松(Pseudotsuga menziesii))组织、仙人掌果实(火龙果)果肉组织、蔓长春花(Maculata Vinca)组织、Aquatic Lotus(莲花(Nelumbo nucifera))组织、郁金香(Tulipa gesneriana)花瓣组织、车前草(香蕉(Musa paradisiaca)组织、花椰菜(甘蓝(Brassica oleracea))茎组织、枫叶(桐叶槭(Acer psuedoplatanus))茎组织、甜菜(Beta vulgaris)初生根组织、绿洋葱(洋葱(Allium cepa))组织、兰花(兰科植物(Orchidaceae))组织、芜菁(Brassica rapa)茎组织、韭菜(韭葱(Allium ampeloprasum))组织、槭树(槭属(Acer))树枝组织、芹菜(Apium graveolens)组织、绿洋葱(洋葱(Allium cepa))茎组织、松组织、芦荟组织、西瓜(Citrullus lanatus var.lanatus)组织、草甸排草(Lysimachia nummularia)组织、仙人掌组织、毛剪秋罗(Lychnis Alpina)组织、大黄(波叶大黄(Rheum rhabarbarum))组织、南瓜肉(西葫芦(Cucurbita pepo))组织、匐地仙人掌(天门冬科(Asparagaceae))茎组织、紫露草(无毛紫露草(Tradescantia virginiana))茎组织、芦笋(石刁柏(Asparagus officinalis))茎组织、蘑菇(真菌)组织、茴香(Foeniculum vulgare)组织、玫瑰(蔷薇属(Rosa))组织、胡萝卜(Daucus carota)组织、或梨(苹果类(Pomaceous))组织的组织、或通过直接基因组修饰或通过选择性育种产生的基因改变的组织、或其任何组合。

[0442] 还将理解,植物或真菌组织的细胞材料和核酸可以包括细胞内内容物,例如细胞器(例如叶绿体、线粒体)、细胞核、细胞核酸和/或细胞蛋白。这些可以从植物或真菌组织和/或从结构细胞中基本去除、部分去除或完全去除。将认识到,如本文所述,微量的此类组分可能仍然存在于脱细胞的植物或真菌组织和/或结构细胞中。还将理解,本文中对脱细胞的植物或真菌组织的提及旨在反映在组织的植物或真菌来源中发现的这种细胞材料已被基本去除,这并不排除脱细胞的植物或真菌组织或结构细胞在某些实施方案中可能含有或

包括随后引入或重新引入的细胞、细胞材料和/或通常任何种类的核酸，例如动物或人类细胞，例如骨或骨祖细胞/组织的可能性。

[0443] 如本文所述，可以使用各种方法来生产脱细胞的植物或真菌组织。例如，在某些实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织可以包括已经通过热冲击、用洗涤剂(例如SDS、Triton X、EDA、碱性处理、酸、离子洗涤剂、非离子洗涤剂和两性离子洗涤剂)处理、渗透冲击、低压冻干、物理裂解(例如静水压力)，电破坏(例如非热不可逆电穿孔)、或酶消化，或其任何组合脱细胞的植物或真菌组织(多种)。在某些实施方案中，本文描述的生物材料可以通过采用脱细胞过程从植物和/或真菌获得，所述脱细胞过程可以包括几种方法中的任一种(单独地或组合地)，包括但不限于热冲击(例如，快速冻融)、化学处理(例如，洗涤剂)、渗透冲击(例如蒸馏水)、低压冻干、物理裂解(例如，压力处理)、电破坏和/或酶消化。

[0444] 在某些实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织可以包括已经通过用洗涤剂或表面活性剂处理而脱细胞的植物或真菌组织。洗涤剂的实例可包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、Triton X、EDA、碱性处理、酸、离子洗涤剂、非离子洗涤剂和两性离子洗涤剂。在优选的实施方案中，可以使用SDS和$CaCl_2$对植物或真菌组织进行脱细胞。

[0445] 在进一步的实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织可以包括已经通过用SDS处理而脱细胞的植物或真菌组织。在另一个实施方案中，可以通过用二价盐水溶液洗涤从植物或真菌组织中去除残留的SDS。二价盐水溶液可用于将含有SDS胶束的盐残留物沉淀/碰撞出溶液/支架，并且dH_2O、乙酸或二甲基亚砜(DMSO)处理或超声处理可用于去除盐残留物或SDS胶束。在某些实施方案中，二价盐水溶液的二价盐可以包括例如$MgCl_2$或$CaCl_2$。

[0446] 在另一个实施方案中，植物或真菌组织可以通过在溶剂(如水、乙醇)或另一种合适的有机溶剂中用0.01％至10％，例如约0.1％至约1％，或例如约0.1％SDS或约1％SDS的SDS溶液处理来脱细胞，并且可以使用浓度为约100mM的$CaCl_2$水溶液去除残留的SDS，然后在dH_2O中孵育。在某些实施方案中，SDS溶液的浓度可以高于0.1％，这可以促进脱细胞，并且可以伴随着增加的洗涤以去除残留的SDS。在特定的实施方案中，植物或真菌组织可以通过用约0.1％SDS在水中的SDS溶液处理来脱细胞，并且可以使用浓度为约100mM的$CaCl_2$水溶液去除残留的SDS，然后在dH_2O中孵育。

[0447] 可适用于生产本文所述的脱细胞材料的脱细胞方案的进一步实例可在WO2017/136950，标题为“Decellularised Cell Wall Structures from Plants and Fungus and Use Thereof as Scaffold Materials”中找到，其全部内容通过引用并入本文。

[0448] 在某些实施方案中，本文描述的气凝胶、泡沫和/或水凝胶可以包括分布在载体内的单结构细胞、结构细胞组或两者。在某些实施方案中，载体可以衍生自脱水的、低压冻干的或冷冻干燥的水凝胶。可以理解，载体通常可以包括任何合适的载体材料、结构或基质，用于向气凝胶、泡沫和/或水凝胶提供支撑和/或结构，并且可以用于支撑、携带、连接或保持气凝胶、泡沫和/或水凝胶的单结构细胞、结构细胞组或两者。本领域技术人员根据本文的教导将知道可以使用的各种不同的载体，并且可以选择这些载体以适合感兴趣的特定应用(多种)。在某些实施方案中，载体可以包括水凝胶，单结构细胞、结构细胞组或两者混合在该水凝胶中，或者载体可以衍生自脱水的、低压冻干的或冷冻干燥的水凝胶，单结构细胞或结构细胞组或两者分布/混合在其中。多种不同的水凝胶可用于提供载体，例如但不限于包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、

羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素中的任何一种或多种、或其任何组合的水凝胶(多种)。在某些实施方案中,水凝胶/载体可以任选地交联。

[0449] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种的某些实施方案中,水凝胶可以包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素、或其任何组合;其中所述水凝胶是任选交联的。

[0450] 在本文描述的气凝胶或泡沫的某些实施方案中,可以任选地用水、水溶液、缓冲剂、细胞缓冲剂、醇(例如乙醇)或适合于感兴趣的应用(多种)的另一种水性或非水性液体或溶液对气凝胶或泡沫进行再水化。替代地,气凝胶或泡沫可以以干燥形式提供。

[0451] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫的优选实施方案中,单结构细胞、结构细胞组或两者可以通过浸碱从植物或真菌组织,优选脱细胞的植物或真菌细胞组织衍生。也可以考虑用于获得单结构细胞、结构细胞组或两者的其他方法,例如浸碱或其他基于液体的提取;然而,如本文所述,浸碱是优选的。

[0452] 可以理解,浸碱可以包括用于处理植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌细胞组织)以获得单结构细胞、结构细胞组或两者的任何合适的方法,通常使用采用碱且优选进一步采用过氧化物的液体提取溶液。通常,植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌的组织)的浸碱将植物或真菌分解成组织/细胞组分(包括单结构细胞、结构细胞组或两者)。在某些实施方案中,浸碱可以使用碱性/碱溶液和过氧化物。在某些实施方案中,可以同时或顺序地使用多于一种处理或溶液。

[0453] 在某些实施方案中,浸碱处理可以包括用碱溶液进行至少一次处理。可以理解,碱溶液通常可以包括任何合适的碱,例如能够渗透冲击和/或破坏氢键和/或聚合物晶体结构以提取完整组织结构的任何合适的碱。可以理解,特别是对于食品和/或医学应用,可以根据需要选择适合于特定应用的碱,并且可以例如选择为生理上存在的、容易洗掉的、无害的和/或根据与特定应用相关的各种因素进行选择的碱。在某些实施方案中,碱可以包括NaOH、KOH或其组合。在一个实施方案中,可以将碱溶解/混合在合适的溶剂中,以形成碱溶液。通常,溶剂可以包括水,尽管也可以考虑其他溶剂或溶剂的组合(诸如例如,水和乙醇的混合物)。可以调整碱溶液中的碱浓度以适合感兴趣的特定应用。通常,碱溶液可包含约0.1至10M的碱浓度,或其间的任何浓度(任选四舍五入到最接近的0.1),或跨越这些浓度中的任何两个之间的任何子范围。在某些实施方案中,碱浓度可为约0.5M至3M,或其间的任何值

(任选地四舍五入到最接近的0.1),或跨越这些浓度中的任何两个之间的任何子范围。例如,在某些实施方案中,碱溶液可以包括浓度为约0.5M-3M的NaOH水溶液。可以理解,根据需要,可以调整碱溶液以及处理条件(即加热、搅拌)以适应特定的应用、待提取的期望结构、正在使用的植物或真菌组织等。

[0454] 在某些实施方案中,碱可以包括选自由以下组成的组的碱:碳酸盐;硝酸盐;磷酸盐;硫酸盐;氨;氢氧化钠;氢氧化钙;氢氧化镁;氢氧化钾;氢氧化锂;氢氧化锌;碳酸钠;碳酸氢钠;丁基锂;叠氮化钠;氨基钠;氢化钠;硼氢化钠;或二异丙基胺锂。例如,根据碱和/或产品的预期用途,可以进行中和和/或洗涤以去除残留的碱和其他试剂,从而防止不希望的污染。

[0455] 在优选的实施方案中,浸碱可以包括使用氢氧化钠和过氧化氢通过加热处理植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌组织)。

[0456] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种的又一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以包括单结构细胞的粒度分布,所述单结构细胞的平均费雷特直径在约1μm至约1000μm,例如约100至约500μm,例如约100至约300μm的范围内。

[0457] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中,植物组织可以包括苹果组织或梨组织。

[0458] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中,当气凝胶或泡沫处于水合形式时,气凝胶或泡沫可以包括约5%至约95%m/m,例如约10-50%m/m(或更大)的单结构细胞、结构细胞组或两者。

[0459] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中,水凝胶可以包括海藻酸盐、果胶或两者,并且气凝胶或泡沫可以用提供交联的$CaCl_2$溶液再水化。

[0460] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以具有在约0.1至约500kPa的范围内,例如约1至约200kPa的体积模量。

[0461] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以被再水化,并且可以进一步包括一个或多个动物细胞。

[0462] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的另一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以再水化,并且可以进一步包括选自成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞、内皮细胞,或其任何组合的一种或多种细胞。可以选择适合感兴趣的特定应用(多种)的细胞。在其中食品应用受关注的某些实施方案中,例如,一种或多种细胞可以包括肌肉细胞、脂肪细胞、结缔组织细胞(即成纤维细胞)、软骨、骨、上皮或内皮细胞,或其任何组合。

[0463] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中,气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)可以通过物理交联(例如使用甘氨酸)和/或化学交联(例如在热存在下使用柠檬酸)进行交联;其中气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)用接头(例如琥珀酸)官能化,一个或多个官能部

分任选地连接到所述接头(例如含胺基团,其中交联可以进一步任选地用一种或多种蛋白质交联剂如福尔马林、甲醛、戊二醛和/或转谷氨酰胺酶实现);或其任何组合。在某些实施方案中,预期交联可赋予本文所述的气凝胶、泡沫和/或水凝胶额外的结构完整性,并且可控制交联程度以调整所得产物的物理性质。在某些实施方案中,气凝胶或泡沫的结构细胞的纤维素或纤维素衍生物或其他材料可以是交联的;载体材料(通常衍生自水凝胶)可以是交联的;或其组合。下面的实施例8提供了物理和化学交联方法的说明性实例,包括那些使用接头的方法。本领域技术人员受益于本文教导并考虑到在特定气凝胶/泡沫中使用的结构细胞和载体/水凝胶,将意识到实现交联的合适方法。

[0464] 在某些实施方案中,本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫的载体可以是交联的,也可以不是交联的。在某些实施方案中,载体可以在脱水、低压冻干或冷冻干燥之前进行交联;在脱水、低压冻干或冷冻干燥之后进行交联;或两者。在其中载体交联的实施方案中,载体通常可以在其中混合或分布单结构细胞、结构细胞组或两者之后,以及在混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥之前或之后进行交联。图128显示了描述在冷冻和低压冻干之前或之后使用交联制备气凝胶/泡沫的说明性实例的流程图。

[0465] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中任一种的又一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以包括通过以下产生的模板化或对准的微通道:定向冷冻;或者通过使用具有微观尺度和/或宏观尺度特征的模具成型;通过在至少一个表面内和/或表面上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征;或其任何组合。

[0466] 在下面的实施例中详细描述了定向冷冻的方法。简言之,通过在水凝胶的一侧产生更大的热梯度,可以从冷侧形成线性和高度对准的冰晶。这可能迫使周围的水凝胶聚合物在冰晶周围形成,从而形成对准的微观尺度通道。在将所得材料低压冻干后,可以形成具有许多微通道的支架。可以理解,定向冷冻可用于在气凝胶和/或泡沫内部、在气凝胶和/或泡沫的表面上或两者模板化或形成通道和/或其他结构特征。

[0467] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,通过定向冷冻产生的微通道的微架构可以通过产生混合物来控制,该混合物包括含有不同量的一种或多种其他溶解化合物的溶剂,例如蔗糖、葡萄糖、海藻糖、玉米淀粉、甘油、乙醇、甘露醇、氯化钠、$CaCl_2$、明胶、柠檬酸、PVA、PEG、葡聚糖、NaF、NaBr、NaI、磷酸盐缓冲液、另一种糖或盐或其他此类试剂,这可改变从热梯度的冷侧生长的对准的冰晶的结构性质。

[0468] 在某些实施方案中,定向冷冻(也称为冷冻铸造、冰模板化)可以包括一种过程,通过该过程可以在包括水凝胶、聚合物、生物大分子等的气凝胶中产生控制良好的微观尺度特征(通道、孔等)。在某些实施方案中,该过程通常可以包括水溶液的受控凝固、悬浮液或溶胶-凝胶、然后在低压冻干机中升华。经过受控冷冻的溶液通常可以放置在冷板上,这产生通常从一侧开始的不均匀热梯度。冰晶从冷侧形成,并在远离冷表面的地方线性生长。随着冰晶生长,它们取代了溶液组分(聚合物、水凝胶、胶体、单结构细胞等),并且它们聚集在生长的冰晶之间。在完全冷冻后,通常可以在低压冻干机中进行升华,这可以去除留下的具有各向异性模板化纳米到微米尺度特征(例如对准的通道)的气凝胶或泡沫的冰晶。因此,这些特征的最终结构性质可能取决于溶液中形成的冰晶的结构。因此,其他会影响冰结晶的溶质可以控制气凝胶的最终架构。在这种情况下,可以想到将其他盐、脂质、糖和/或其他

添加剂溶解到水溶液中可能影响冰晶形成。在某些实施方案中，这样的化合物可以单独或组合地包括以下任何一种：蔗糖、葡萄糖、海藻糖、玉米淀粉、甘油、乙醇、甘露醇、氯化钠、$CaCl_2$、明胶、柠檬酸、PVA、PEG、葡聚糖、NaF、NaBr、NaI、磷酸盐缓冲液等。除了溶液中的添加剂外，还可以想到，在某些实施方案中，温度和冷冻速率也可以影响冰晶的几何形状。在某些实施方案中，可以使用-195℃至0℃的温度，在某些实施方案中，更通常使用-30℃至-10℃的操作温度来产生对准的定向冷冻支架。

[0469] 如本文描述的气凝胶、泡沫和水凝胶的成型也在下面的实施例中详细描述。在某些实施方案中，可以将气凝胶/泡沫/水凝胶前体混合物引入容器或模具中，随后进行脱水、低压冻干或冷冻干燥。在优选的实施方案中，可以在脱水、低压冻干或冷冻干燥之前将气凝胶/泡沫/水凝胶前体混合物在容器或模具内冷冻。在某些实施方案中，模具或容器可以被设计为提供具有期望形状和/或尺寸的气凝胶/泡沫/水凝胶。在某些实施方案中，容器或模具可以被设计为向其中包含的气凝胶/泡沫/水凝胶的表面呈现微观和/或宏观特征(例如，模具可以在其内壁上具有结构特征，例如突起/凹陷，以在气凝胶和/或泡沫的表面上和/或内部形成结构)，和/或可被设计为将微观尺度和/或宏观尺度特征伸出到其中包含的气凝胶/泡沫/水凝胶中，以便通过成型将期望的结构赋予气凝胶/泡沫/水凝胶。微观尺度和/或宏观尺度特征的实例可以包括几何图案、通道、凹陷、隧道或孔，或者期望或适合于感兴趣的特定应用(多种)的任何其他微观尺度和/或宏观尺度特征。

[0470] 在某些实施方案中，宏观尺度和/或微观尺度结构特征可以通过机械加工赋予气凝胶/泡沫/水凝胶，例如在气凝胶/泡沫/水凝胶的至少一个表面内和/或表面上通过穿孔、按压、冲压、钻孔或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井、或其他结构特征。在一些实施方案中，可以想到这样的机械加工可以是例如使用自动化机械的计算机辅助设计(例如，通过数字控制)。例如，机械加工可以在冷冻和/或低压冻干或冷冻干燥之前、期间和/或之后进行。

[0471] 在又一个实施方案中，本文提供了通过脱细胞的植物或真菌组织的浸碱而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸和缺乏植物或真菌组织的一种或多种碱溶性木质素组分的脱细胞三维结构。可以理解，使用碱(例如NaOH，以及例如任选地另外在过氧化氢存在下)浸碱可以去除一种或多种碱溶性木质素组分，然而，如下面的实施例所示，衍生自脱细胞的植物或真菌组织的得到的单结构细胞、结构细胞组或两者的整体三维结构可以保持基本上完整。来自浸碱的所得结构细胞可以不同于以替代方式获得的结构细胞，例如采用酸浸碱的方法获得的结构细胞，例如采用酸浸碱可以去除某些酸溶性木质素组分而不是碱溶性木质素组分，并因此提供具有不同木质素含量的结构细胞。在某些实施方案中，单结构细胞、结构细胞组或两者可以以干燥的形式提供，或悬浮在水性或非水性液体或溶液中，例如但不限于水、水性缓冲液或乙醇。

[0472] 在某些实施方案中，本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种可以另外包括在其中/其上培养或定位的一个或多个细胞。在某些实施方案中，一个或多个细胞可以包括肌肉细胞、脂肪细胞、结缔组织细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂

肪细胞、软骨细胞、骨细胞、上皮细胞、内皮细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞或内皮细胞中的任何一种或多种、或其任何组合。

[0473] 在某些实施方案中，本文描述的气凝胶和泡沫通常可以是生物相容的。例如，在某些实施方案中，可以想到本文描述的气凝胶和泡沫可以与与组织工程化和/或食品应用相关的各种不同细胞类型相容，并且可以与来自许多不同物种和界的细胞生物相容，包括但不限于人、啮齿类动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠)、兔类(例如兔子、野兔)、卡尔皮内(carpine)(山羊)、绵羊类(例如绵羊、羊羔、羊肉)、猪类(例如猪、生猪、野猪)、牛类(例如奶牛、野牛、水牛)、猫科动物、犬类、鱼类(例如三文鱼、金枪鱼、鲷鱼、鲭鱼、鳕鱼、鳟鱼、鲤鱼、鲶鱼和沙丁鱼)、软体动物类、甲壳类动物(例如螃蟹、龙虾、小龙虾、虾、对虾)、禽类(例如鸡、火鸡、鸭)、爬行动物、两栖动物、昆虫，和/或植物物种。可以理解，可以基于感兴趣的特定应用(多种)来选择细胞，所述特定应用可以包括但不限于治疗(人类或兽医)、食品或其他这样的应用。

[0474] 在又一个实施方案中，本文提供了一种制备气凝胶或泡沫的方法，包括：

[0475] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0476] 通过对脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组，从脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两者；

[0477] 将单结构细胞、结构细胞组或两者混合或分布在水凝胶中，以提供混合物；以及

[0478] 对混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫。

[0479] 上文已经详细描述了气凝胶、泡沫、植物或真菌组织、脱细胞、结构细胞和结构细胞组以及水凝胶。

[0480] 可以理解，通过进行浸碱，可以从植物或真菌组织(优选从脱细胞的植物或真菌组织)获得单结构细胞、结构细胞组或两者。浸碱可以包括用于处理植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌细胞组织)以获得单结构细胞、结构细胞组或两者的任何合适的方法，通常使用采用碱且优选进一步采用过氧化物的液体提取溶液。通常，植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌的组织)的浸碱将植物或真菌分解成组织/细胞组分(包括单结构细胞、结构细胞组或两者)。在某些实施方案中，浸碱可以使用碱性/碱溶液和过氧化物。在某些实施方案中，可以同时或顺序地使用多于一种处理或溶液。在某些实施方案中，可以想到可以在植物或真菌组织上进行浸碱，然后可以进行脱细胞，或者可以在植物或真菌组织上进行浸碱，并且可以选择浸碱条件以同时提供脱细胞。然而，如本文所述，优选对先前已经被脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱。

[0481] 在某些实施方案中，浸碱处理可以包括用碱溶液进行至少一次处理。可以理解，碱溶液通常可以包括任何合适的碱，例如能够渗透冲击和/或破坏氢键和/或聚合物晶体结构以提取完整组织结构的任何合适的碱。可以理解，特别是对于食品和/或医学应用，可以根据需要选择适合于特定应用的碱，并且可以例如选择为生理上存在的、容易洗掉的、无害的和/或根据与特定应用相关的各种因素进行选择的碱。在某些实施方案中，碱可以包括NaOH、KOH或其组合。在一个实施方案中，可以将碱溶解/混合在合适的溶剂中，以形成碱溶液。通常，溶剂可以包括水，尽管也可以考虑其他溶剂或溶剂的组合(诸如例如，水和乙醇的混合物)。可以调整碱溶液中的碱浓度以适合感兴趣的特定应用。通常，碱溶液可包含约0.1

至10M的碱浓度，或其间的任何浓度(任选四舍五入到最接近的0.1)，或跨越这些浓度中的任何两个之间的任何子范围。在某些实施方案中，碱浓度可为约0.5M至3M，或其间的任何值(任选地四舍五入到最接近的0.1)，或跨越这些浓度中的任何两个之间的任何子范围。例如，在某些实施方案中，碱溶液可以包括浓度为约0.5M-3M的NaOH水溶液。可以理解，根据需要，可以调整碱溶液以及处理条件(即加热、搅拌)以适应特定的应用、待提取的期望结构、正在使用的植物或真菌组织等。

[0482] 在某些实施方案中，碱可以包括选自由以下组成的组的碱：碳酸盐；硝酸盐；磷酸盐；硫酸盐；氨；氢氧化钠；氢氧化钙；氢氧化镁；氢氧化钾；氢氧化锂；氢氧化锌；碳酸钠；碳酸氢钠；丁基锂；叠氮化钠；氨基钠；氢化钠；硼氢化钠；或二异丙基胺锂。例如，根据碱和/或产品的预期用途，可以进行中和和/或洗涤以去除残留的碱和其他试剂，从而防止不希望的污染。

[0483] 在优选的实施方案中，浸碱可以包括使用氢氧化钠和过氧化氢通过加热处理植物或真菌组织(优选脱细胞的植物或真菌组织)。

[0484] 可以收集由浸碱产生的单结构细胞或结构细胞组(具有脱细胞的三维结构)。所得到的单结构细胞或结构细胞组可以以干燥的形式提供，或者以糊状物或凝胶的形式提供，或者根据需要以另一种合适的形式提供。

[0485] 其他行业中(如纸浆和造纸行业中)的浸碱工艺，剥离成纤维素聚合物/纤维(即完全破坏植物结构)。相反，本文描述的浸碱工艺(无论植物或真菌组织是在浸碱之前、期间还是之后脱细胞)可以提供完整的单结构细胞或具有三维结构的结构细胞组的保留。虽然浸碱可以在植物或真菌组织脱细胞之前进行，但这不是优选的，因为预计需要更长的时间，效率较低，并且可能导致不太纯的所得材料被脱细胞。因此，优选对已经脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱。根据需要，本文描述的浸碱工艺可用于获得脱细胞但完整的单结构细胞和/或感兴趣的植物组织结构(例如，薄壁组织、基本组织、表皮组织、维管束、筛管、叶柄、静脉、根、根毛等)以适合感兴趣的特定应用(多种)。

[0486] 在本文所述方法的实施方案中，由浸碱产生的单结构细胞或结构细胞组(具有脱细胞的三维结构)可以混合或分布在水凝胶中以提供混合物。

[0487] 在某些实施方案中，将单结构细胞、结构细胞组或两者混合或分布到其中的水凝胶可以包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如，胶原、明胶或纤连蛋白，或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素水凝胶(多种)中的任何一种或多种、或其任何组合。在某些实施方案中，水凝胶/载体可以任选地交联。

[0488] 在本文描述的方法的进一步实施方案中，可以将单结构细胞、结构细胞组或两者与水凝胶的混合物脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫。本领域技术人员受益于本文所述教导(包括以下提供的实施例)，将意识到用于脱水、低压冻干或冷冻干燥，或以其他方式干燥或从混合物中去除至少一些液体/溶剂的各种合适的技术和设备，以提供本

文描述的气凝胶和/或泡沫。

[0489] 在上述方法的某些实施方案中，浸碱可以包括用碱和过氧化物处理脱细胞的植物或真菌组织，优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱，和过氧化氢作为过氧化物。浸碱可以将脱细胞的植物或真菌组织化学分解为单结构细胞、结构细胞组或两者，而不会破坏产生单结构细胞的三维结构的木质纤维素结构。

[0490] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，浸碱可以包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理脱细胞的植物或真菌组织。

[0491] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，浸碱可以在加热至约80℃的情况下进行。在某些实施方案中，这种加热可以允许减少反应时间，特别是例如当使用氢氧化钠时。

[0492] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，脱细胞的植物或真菌组织可以在将过氧化氢加入反应之前用氢氧化钠水溶液处理第一时间段。在某些实施方案中，第一时间段可为约1分钟至约24小时，或其之间的任何时间点，或跨越任何两个这样的时间点之间的任何子范围。

[0493] 在某些实施方案中，过氧化物可以间隔地添加到反应中，例如以约15分钟的时间间隔。这种过氧化物间隔方法的说明性非限制性实例可以如下进行：

[0494] 每隔15分钟添加过氧化物的方案：

[0495] 此处提供的体积用于4L烧杯反应容器。可以理解，可以针对不同的设置来调整体积。

[0496] A.使用Accel TB溶液，然后使用70％乙醇对工作站进行清洁。

[0497] B.使用设置在废物烧杯顶部的无菌筛，将脱细胞材料中的水压出。用天平将其分成各组为500g。所有加工都是在带无菌外科手套的生物安全柜中使用无菌技术完成的。

[0498] C.将500g的材料放入干净且无菌的4L烧杯中。

[0499] D.向烧杯中加入2.5L的1M NaOH。将温度升高到80℃。

[0500] E.加入125mL的30％过氧化氢。注意：该30％过氧化氢溶液为储备溶液浓度。加入原样的30％储备溶液。在整个1小时的反应中，从t＝0开始，每15分钟以25mL等分试样进行加入过氧化氢。

[0501] F.将干净、无菌的磁力搅拌棒放入烧杯中。

[0502] G.在80℃下搅拌1小时。确保搅拌足以使材料移动，但不会飞溅。

[0503] H.检查以确保颜色透明或呈灰白色。如果它仍然是黄色的，让反应继续进行，直到颜色消失。

[0504] I.关闭加热，将烧杯从热源上取下。将溶液冷却至室温。

[0505] J.用储备盐酸中和溶液，直到pH为6.8-7.2。

[0506] K.使用Avanti J-26XPI离心机以8000rpm离心材料15分钟。确保离心机适当平衡，并使用正确的转子。使用与转子匹配的干净、无菌的1L离心机容器。它们被确定为最高转速(8000rpm)。

[0507] L.通过将液体倒入干净的废物烧杯中来去除上清液。用无菌抹刀将颗粒打碎。对于每个离心机容器(1L容器)，将材料重新悬浮在0.75L水中。密封离心机容器的盖子，并摇动以使材料重新悬浮。倒回到4L烧杯中进行中和。

[0508] M.重复中和和离心重复,直到pH保持在6.8-7.2内,以便在离心和重新悬浮后进行连续(back-to-back)测量。

[0509] N.记录最终pH和循环次数。

[0510] O.最后一次对材料进行离心,以浓缩浸碱的材料。

[0511] P.样品储存在4℃的冰箱中。

[0512] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,过氧化氢可以作为30%的过氧化氢水溶液加入。

[0513] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,用于浸碱的过氧化氢可以按以下比例使用:

[0514] 约20mL至约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0515] 例如:

[0516] 约20mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0517] 约10mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;或

[0518] 约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液。

[0519] 可以理解,这些比率可以根据需要放大或缩小,以适应特定的应用,提供所述数量是为了显示相对比例,而不是绝对数量。

[0520] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,该方法还可以包括用一种或多种中和处理来中和pH的步骤。在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,中和处理可以包括用酸溶液,优选HCl水溶液进行处理。

[0521] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,对于1M氢氧化钠水溶液,可以使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行浸碱,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,可以使用当量比进行浸碱。可以理解,这些比率可以根据需要放大或缩小,以适应特定的应用,提供所述数量是为了显示相对比例,而不是绝对数量。

[0522] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,浸碱可以进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

[0523] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,可以通过离心收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

[0524] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,单结构细胞、结构细胞组或两者可以混合或分布在水凝胶中,所述水凝胶包括海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基甲基纤维素、琼脂、普朗尼克酸、聚(环氧乙烷)(PEO)和聚(环氧丙烷)(PPO)的三嵌段PEO-PPO-PEO共聚物、溶解的或再生的植物纤维素、溶解的纤维素基水凝胶、透明质酸、细胞外基质蛋白(例如,胶原、明胶或纤连蛋白,或其任何组合)、单丙烯酸酯化聚(乙二醇)、聚(乙二醇)二丙烯酸酯、聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA、聚(乙烯醇)、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(乳酸-共聚-乙醇酸)、壳聚

糖、甲壳素、黄原胶、弹性蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素衍生物、角叉菜胶或微晶纤维素水凝胶、或其任何组合；其中所述水凝胶是任选交联的。

[0525] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，该方法可以进一步包括对混合物进行定向冷冻的步骤，以在混合物的表面上、混合物内部或两者上引入模板化或对准的微通道；使用具有微观尺度特征的模具模制混合物的步骤，所述模具接触混合物和/或由混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥产生的气凝胶或泡沫的一个或多个表面，以引入模板化或对准的微通道；在混合物的脱水、低压冻干或冷冻干燥之前、期间或之后，在混合物和/或气凝胶或泡沫的至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征的步骤；或其任何组合。

[0526] 用于将微观尺度和/或宏观尺度结构赋予气凝胶、泡沫和/或水凝胶的定向冷冻、成型和机械加工已经在上文中详细描述，并且在下面列出的实施例中进一步描述。

[0527] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，可以通过从一个或多个方向在混合物上产生热梯度来进行定向冷冻，以便从热梯度的冷侧(多个)开始形成对准的冰晶。

[0528] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，可将混合物定向冷冻至少约30分钟的时间段，优选约2小时的时间段。

[0529] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，混合物可以通过冷却至约-190℃至约0℃的温度，例如至少约-15℃，优选约-25℃的温度进行定向冷冻。

[0530] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，对混合物进行脱水、低压冻干或冷冻干燥以提供气凝胶或泡沫的步骤可以包括冷冻混合物，然后低压冻干或冷冻干燥混合物。

[0531] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，该方法可以包括交联水凝胶的另外步骤、再水化气凝胶或泡沫，或两者；任选地在存在海藻酸盐或果胶或琼脂水凝胶的情况下使用$CaCl_2$溶液提供交联。

[0532] 可以理解，在需要的情况下，可以使用各种技术进行交联，并且可以基于感兴趣的特定气凝胶/泡沫/水凝胶和/或应用(多种)进行选择。在某些实施方案中，结构细胞可以与单个水凝胶或水凝胶的组合混合，并且可以进行交联，也可以不进行交联。在某些实施方案中，然后可以将混合物冷冻，然后低压冻干或冷冻干燥以形成气凝胶或泡沫。

[0533] 在需要任选交联的实施方案中，为了本领域技术人员的说明性和非限制性目的，以下提供水凝胶的说明性列表和潜在交联剂的相应列表。在某些实施方案中，如果需要，可以使用这样的交联方法，但可以理解，交联可以是可选的，并且可以做出是否进行交联的决定以适合感兴趣的应用(多种)及其具体细节或要求。在某些实施方案中，可以使用水凝胶的组合，进行或不进行额外的交联。在下面的实施例中，特别是在实施例2中提供了各种说明性实施例。

[0534] 表1：水凝胶和相应的潜在交联剂的实例

[0535]

水凝胶：	**潜在的交联剂（如果需要）**
海藻酸盐	$CaCl_2$、$MgCl_2$
果胶	$CaCl_2$、$MgCl_2$
琼脂	DDI（4,4 二苯基二异氰酸酯）和 HDI（1,6 六亚甲基二异氰酸酯）、或不交联。
普朗尼克酸，聚环氧乙烷（PEO）和聚环氧丙烷（PPO）的三嵌段 PEO–PPO–PEO 共聚物	α-羟基或氨基酸如丙氨酸
甲基纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸（物理交联剂）、PVA、EVA、乙二醛
羧甲基纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸（物理交联剂）、PVA、EVA、乙二醛

[0536]

微晶纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸(物理交联剂)、PVA、EVA、乙二醛
羟丙基纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸(物理交联剂)、PVA、EVA、乙二醛
羟丙基甲基纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸(物理交联剂)、PVA、EVA、乙二醛
羟乙基甲基纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、甘氨酸(物理交联剂)、PVA、EVA、乙二醛
溶解或再生的植物纤维素	柠檬酸、二乙烯基砜、物理缠结
细胞外基质蛋白，如胶原、明胶和纤连蛋白	戊二醛、核黄素、福尔马林、甲醛、转谷氨酰胺酶、EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)，或根本不交联。
透明质酸	BDDE：1,4-丁二醇二缩水甘油醚，DVS：二乙烯基砜，DEO：2,7,8-二环氧辛烷，CPM：内聚多致密化基质。
单丙烯酸化聚(乙二醇)	
聚(乙二醇)二丙烯酸酯	UV
聚(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)-共聚-PEGMA	UV
聚(乙烯醇)或聚(乙烯吡咯烷酮)	UV、γ、电子束
聚(乳酸-共聚-乙醇酸)	
壳聚糖、甲壳素	甲基丙烯酸化、UV、离子、京尼平、醛类、

[0537]

	物理、
黄原胶	物理交联、$FeCL_3$、柠檬酸
弹性蛋白	戊二醛、核黄素、福尔马林、甲醛、转谷氨酰胺酶、EDC（1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐），或根本不交联。
纤维蛋白	戊二醛、核黄素、福尔马林、甲醛、转谷氨酰胺酶、EDC（1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐），或根本不交联。
纤维蛋白原	戊二醛、核黄素、福尔马林、甲醛、转谷氨酰胺酶、EDC（1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐），或根本不交联。
纤维素衍生物。	如下所述的甲基纤维素、羧甲基纤维素、溶解的和再生的纤维素。上述纤维素，但用酯、酰亚胺、酰胺、胺、醚、烷基、苯基、侧基和活性位点修饰。
角叉菜胶	温度（可逆的）、钙、钾

[0538] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，该方法可以包括在气凝胶或泡沫上或其中培养动物细胞的另外步骤。在某些实施方案中，该方法可以包括在气凝胶或泡沫之上或之中培养肌肉细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞或内皮细胞、或其任何组合的另外步骤。

[0539] 在另一个实施方案中，本文提供了通过本文描述的一种或多种方法中的任一种生产的气凝胶或泡沫。

[0540] 可以理解，本文描述的气凝胶、泡沫和/或水凝胶可以被配置和/或用于各种不同的应用。作为非限制性示例，可以想到，在某些实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于骨组织工程的用途；用于模板化或对准细胞生长的用途；用于再生医学的用途；用于脊髓损伤修复的用途；用于制备食品的用途；或其任何组合。

[0541] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于细胞的模板化或对准生长的用途。在某些实施方案中，细胞可以包括肌

肉细胞、神经细胞或两者。

[0542] 在又一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种用于修复脊髓损伤的用途。

[0543] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种作为绝缘或包装泡沫的用途。

[0544] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于在有此需要的受试者中进行骨组织工程或修复的方法，包括：

[0545] 将本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种植入有此需要的受试者的受累部位；

[0546] 使得气凝胶或泡沫促进骨组织生成或修复。

[0547] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于模板化或对准细胞生长的方法，包括：

[0548] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种上培养细胞，其中所述气凝胶或泡沫包括在气凝胶或泡沫的至少一个表面上、在气凝胶或泡沫内或两者的模板化或对准的微通道，任选地通过定向冷冻形成；通过使用具有微观尺度特征的模具成型；通过在至少一个表面内和/或其上冲孔、按压、冲压或以其他方式形成几何图案、凹陷、孔、通道、凹槽、脊、井或其他结构特征；或其任何组合；

[0549] 使得培养的细胞沿着微通道对准。

[0550] 在上述方法的另一个实施方案中，所述细胞可以包括肌肉细胞或神经细胞或两者。

[0551] 在又一个实施方案中，本文提供了一种用于在有此需要的受试者中修复脊髓损伤的方法，包括：

[0552] 在有此需要的受试者的受累部位植入本文所定义的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种，其中所述气凝胶或泡沫包括任选形成的定向冷冻的模板化或对准的微通道；

[0553] 使得气凝胶或泡沫通过促进和/或对准神经细胞沿着模板化或对准的微通道的生长来促进脊髓修复。

[0554] 在另一个实施方案中，本文提供了一种食品，其包括本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫的泡沫，所述气凝胶(多种)或泡沫(多种)被设计/选择为食品安全的和可食用的。在又一个实施方案中，食品可以另外包括染料或着色剂；防腐剂；调味剂；盐；腌料；或其他感兴趣的食品相关成分或试剂。

[0555] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，食品可以包括胶合在一起的两个或多个气凝胶或泡沫亚基。在某些实施方案中，胶水可包括琼脂。

[0556] 在某些实施方案中，食品可以被设计或配置为模拟传统肉制品。例如，金枪鱼、三文鱼和类似鱼类的特征是在肉片之间发现了穿插的线。这些线是由于脂肪(ω-3)的存在。野生三文鱼的白线通常更少且更细，因为野生三文鱼通常比养殖三文鱼燃烧更多的卡路里。同样，由于血液供应增加，他们的肉变得更红。因此，这些白线的存在及其外观和厚度将取决于要达到的肉的理想外观。如本文描述的在气凝胶生物材料中产生这些线的方案的说明性和非限制性实例可以如下进行：

[0557] A.如本文详细描述的那样，用设定浓度的浸碱苹果材料(结构细胞)和结合剂载体

如海藻酸盐生产气凝胶生物材料。

[0558] B.将材料充分混合,然后倒入期望尺寸的容器中并冷冻过夜。

[0559] 然后将材料低压冻干直至干燥。

[0560] D.然后通过添加足够的氯化钙将材料浸没并充分水合至少30分钟至1小时,将其与氯化钙交联(如果与海藻酸盐、或果胶或类似物结合的话)。

[0561] E.然后将材料从其容器中切除并制备。这需要将材料切割到期望的尺寸。

[0562] F.为了实现金枪鱼或三文鱼“线”外观,使用锋利的刀、手术刀或切片机刀片切割所得材料。

[0563] a.对于三文鱼生鱼片模拟品,将生物材料切成长方形片状物,剩下的材料被切掉。

[0564] b.然后,以不同的穿插长度在材料上进行轻微的对角线切割,而不以(沿着片状物长度为5mm-1cm增量)的方式直到切断材料(约3/4深度)。

[0565] G.一旦在整个材料上进行了切割,就通过将另一种结合剂(如2%琼脂)与二氧化钛粉末结合来产生白线。比例可能取决于所需的白色外观。100mL琼脂中少于0.1g的二氧化钛就足以达到白色。

[0566] H.然后可以对预混合的琼脂和二氧化钛进行涂漆,或者在切口之间轻轻地移液到由步骤(F)中形成的预切割线形成的孔中。

[0567] I.允许材料短暂凝固(约3-5分钟)。

[0568] J.一旦干燥、甚至在干燥过程中,如果有琼脂溢出或没有足够的琼脂,可以对线进行校正、整形或切割。

[0569] a.应根据原始支架材料的含水量进行谨慎处理。太湿的样品可能会吸收大部分琼脂,或者可能会阻止琼脂快速干燥。样品优选是水化的,但不要过湿。

[0570] 在一种或多种食品中的任一种的又一个实施方案中,气凝胶或泡沫可以包括任选地通过定向冷冻形成的模板化或对准的微通道。

[0571] 在某些实施方案中,气凝胶或泡沫可以包括任选地沿着模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、神经元、背根神经节细胞、神经元结构如轴突、神经前体细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、内源性干细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌管、肌肉祖细胞、脂肪细胞、前脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、前成骨细胞、肌腱祖细胞、腱细胞、牙周膜干细胞或内皮细胞,或其任何组合;优选地,其中所述气凝胶或泡沫包括任选地通过定向冷冻形成的模板化或对准的微通道,并且其中所述气凝胶或泡沫包含沿着模板化或对准的微通道对准的肌肉细胞、脂肪细胞、结缔组织细胞(例如成纤维细胞)、软骨、骨、上皮或内皮细胞或其任何组合。

[0572] 在另一个实施方案中,本文提供了如本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫在食品中的用途,气凝胶(多种)和/或泡沫(多种)被设计/选择为食品安全的和可食用的。

[0573] 在又一个实施方案中,本文提供了一种从脱细胞的植物或真菌组织制备单结构细胞、结构细胞组或两者的方法,包括:

[0574] 提供脱细胞的植物或真菌组织;

[0575] 通过对脱细胞的植物或真菌组织进行浸碱并收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组,从脱细胞的植物或真菌组织获得单结构细胞、结构细胞组或两

者。

[0576] 在上述方法的又一个实施方案中,浸碱可以包括用碱和过氧化物处理脱细胞的植物或真菌组织,优选氢氧化钠或另一种氢氧化物碱作为碱,和过氧化氢作为过氧化物。

[0577] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,浸碱可以包括在加热的同时用氢氧化钠水溶液和过氧化氢处理脱细胞的植物或真菌组织。

[0578] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,脱细胞的植物或真菌组织可以在将过氧化氢加入反应之前用氢氧化钠水溶液处理第一时间段。

[0579] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,过氧化氢可以作为30%的过氧化氢水溶液加入。

[0580] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,用于浸碱的过氧化氢可以按以下比例使用:

[0581] 约20mL至约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0582] 例如:

[0583] 约20mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0584] 约10mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;或

[0585] 约5mL的30%过氧化氢溶液:约100g的脱细胞的植物或真菌组织:约500mL的1M NaOH溶液;

[0586] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,该方法还可以包括用一种或多种中和处理来中和pH的步骤。

[0587] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中,中和处理可以包括用酸溶液,优选HCl水溶液进行处理。

[0588] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,浸碱可以在加热至约80℃的情况下进行。

[0589] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,对于1M氢氧化钠水溶液,可以使用约1:5的脱细胞的植物或真菌组织:氢氧化钠水溶液的比例(m:v,以g:L计)进行浸碱,或者对于另一种氢氧化钠水溶液浓度,可以使用当量比进行浸碱。

[0590] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,浸碱可以进行至少约30分钟,优选进行约1小时。

[0591] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中,可以通过离心收集所得的具有脱细胞三维结构的单结构细胞或结构细胞组。

[0592] 在又一个实施方案中,本文提供了通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的单结构细胞、结构细胞组或两者。

[0593] 本文还提供了可以具有各种不同应用的纤维素基水凝胶。在某些实施方案中,作为非限制性实例,本文描述的这种纤维素基水凝胶可以用作用于制备本文描述的气凝胶和/或泡沫的水凝胶。

[0594] 在一个实施方案中,本文提供了一种纤维素基水凝胶,其包含通过用二甲基乙酰

胺和氯化锂溶解，然后用乙醇再生而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。在下面的实施例3中进一步详细描述了这种溶解的说明性实施例。

[0595] 在又一个实施方案中，本文提供了一种制备纤维素基水凝胶的方法，包括：

[0596] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0597] 通过用二甲基乙酰胺(DMAc)和氯化锂(LiCl)处理来溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素；以及

[0598] 通过与乙醇的溶剂交换从溶解的纤维素再生纤维素基水凝胶，

[0599] 从而提供纤维素基水凝胶。

[0600] 可以理解，纤维素基水凝胶可以包括含有一种或多种纤维素或纤维素衍生物的水凝胶。通常，纤维素和/或纤维素衍生物可以通过从脱细胞的植物或真菌组织中溶解纤维素和/或纤维素衍生物来获得。可以理解，纤维素和/或纤维素衍生物可替代地通过溶解在某些实施方案中未脱细胞的真菌组织的植物来获得，但如本文所述，优选从脱细胞的植物或真菌组织中溶解纤维素和/或纤维素衍生物。脱细胞的植物或真菌组织的制备已经在上文中详细描述，并且在下面的实施例中进一步描述。

[0601] 脱细胞的植物或真菌组织的纤维素和/或纤维素衍生物可以通过用DMAc和LiCl处理来溶解。在下面的实施例3中进一步详细描述了这种溶解处理的说明性实施例。

[0602] 在上述方法的另一个实施方案中，与乙醇的溶剂交换可以使用透析膜进行，或者通过在溶解的纤维素上部添加乙醇来促进溶剂交换。

[0603] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，该方法可以进一步包括用过氧化氢漂白纤维素基水凝胶。

[0604] 在另一个实施方案中，本文提供了一种纤维素基水凝胶，其包含通过用二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(例如1-丁基氯化吡啶和氯化铝，与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓，优选室温离子液体)、或其任何组合溶解而衍生自脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。

[0605] 在又一个实施方案中，本文提供了一种制备纤维素基水凝胶的方法，包括：

[0606] 提供脱细胞的植物或真菌组织；

[0607] 通过用二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(例如1-丁基氯化吡啶和氯化铝，与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓，优选室温离子液体；估计有10^{12}种离子液体)、或其任何组合处理而溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素；

[0608] 获得溶解的纤维素，并使用溶解的纤维素制备纤维素基水凝胶。

[0609] 可以设计或选择用于溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素和/或纤维素衍生物的处理以适合感兴趣的特定应用(多种)。可用于溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素和/或纤维素衍生物的试剂的实例可包括但不限于二甲基乙酰胺和氯化锂、$LiClO_4$、黄原酸酯、EDA/KSCN、H_3PO_4、NaOH/尿素、$ZnCl_2$、TBAF/DMSO、NMMO、离子液体(IL)(例如1-丁基氯化吡啶和氯化铝，与硝酸盐缔合的烷基咪唑鎓，优选室温离子液体)、或其任何组合处理而溶解脱细胞的植物或真菌组织的纤维素。

[0610] 在另一个实施方案中，本文提供了一种通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的纤维素基水凝胶。

[0611] 在本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种的另一个实施方案中，水凝胶可以包括本文描述的一种或多种中的任一种纤维素基水凝胶。

[0612] 在又一个实施方案中，本文提供了一种食品，包括本文描述的一种或多种气凝胶、或一种或多种泡沫或一种或多种结构细胞中的任何一种，其中所述食品是肉模拟品，并且包括多条线，所述多条线提供在金枪鱼、三文鱼或另一鱼类肉中发现的脂肪白线外观。

[0613] 在上述食品的又一个实施方案中，食品可以是金枪鱼、三文鱼或另一种鱼肉的模拟品。

[0614] 在又一个实施方案中，本文提供了一种食品，包括本文描述的一种或多种气凝胶、或一种或多种泡沫或一种或多种结构细胞中的任何一种，其中所述食品是肉模拟品，并且可以任选地包括多条线或其他图案，这些线或图案提供天然肉中发现的脂肪物质或脂肪沉积物外观。

[0615] 在上述食品的又一个实施方案中，食品可以是家禽、牛、鱼或猪肉或任何其他合适的肉模拟品。在某些实施方案中，例如，食品可以模拟牛排、鸡肉、猪肉或另一种这样的肉。

[0616] 在上述一种或多种食品中任一种的另一个实施方案中，食品可以含有一种或多种提供金枪鱼、三文鱼或另一种鱼肉或另一种肉的颜色的染料或着色剂。

[0617] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，多条线可以形成在气凝胶或泡沫中形成的切口或通道中。

[0618] 在上述一种或多种食品中任一种的又一个实施方案中，多条线可以包括二氧化钛，任选地与琼脂结合剂或另一种这样的结合剂组合。

[0619] 在上述一种或多种食品的另一个实施方案中，任选地与琼脂结合剂组合的二氧化钛可以被施加到形成在气凝胶或泡沫中的切口或通道中以提供金枪鱼、三文鱼或另一种鱼类肉或另一种肉中发现的脂肪白线外观。

[0620] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于制备食品的方法，所述食品是金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉模拟品或另一种肉模拟品，所述方法包括：

[0621] 提供本文描述的一种或多种气凝胶或一种或多种泡沫中的任一种；

[0622] 任选地，将气凝胶染色或着色为金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉或其他肉的颜色；

[0623] 切割或以其他方式处理气凝胶，以便沿着气凝胶的表面形成切口或通道；以及

[0624] 将染料或着色剂施加到切口或通道，以提供金枪鱼、三文鱼或其他鱼肉或另一种肉特有的脂肪白线外观。

[0625] 在上述方法的另一个实施方案中，施加到切口或通道的染料或着色剂可以包括二氧化钛。

[0626] 在上述一种或多种方法中任一种的另一个实施方案中，施加到切口或通道的染料或着色剂可与结合剂组合。

[0627] 在上述一种或多种方法中任一种的又一个实施方案中，结合剂可以包括琼脂。

[0628] 在另一个实施方案中，本文提供了一种通过本文描述的一种或多种方法中的任一种制备的食品。

[0629] 在另一个实施方案中，本文提供了一种不可吸收的真皮填充剂，所述真皮填充剂包括本文描述的气凝胶、泡沫、结构细胞或纤维素基水凝胶；或其任何组合。

[0630] 在又一个实施方案中，本文提供了一种真皮填充剂，所述真皮填充剂包括衍生自

植物或真菌组织的单结构细胞、结构细胞组或两者，所述单结构细胞或结构细胞组具有缺乏植物或真菌组织的细胞材料和核酸的脱细胞三维结构，所述单结构细胞或结构细胞组或两者通过浸碱从植物或真菌组织中衍生。

[0631] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以进一步包括载体流体或凝胶。

[0632] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，载体流体或凝胶可以包括水、水溶液或水凝胶。

[0633] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，载体流体或凝胶可以包括盐水溶液，或胶原、透明质酸、甲基纤维素和/或溶解的植物衍生的脱细胞纤维素基水凝胶。

[0634] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以进一步包括麻醉剂。

[0635] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，麻醉剂可以包括利多卡因、苯佐卡因、丁卡因、波洛卡因(polocaine)、肾上腺素或其任何组合。

[0636] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以包括PBS(盐水)、透明质酸(交联或非交联)、海藻酸盐、胶原、普朗尼克酸(例如普朗尼克F127)、琼脂、琼脂糖或纤维蛋白、羟基磷灰石钙、聚-L-乳酸、自体脂肪、硅酮、葡聚糖、甲基纤维素或其任何组合。

[0637] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以包括以下的至少一种：2％利多卡因凝胶；包括20％苯佐卡因、6％利多卡因和4％丁卡因的三重麻醉凝胶(BLT凝胶)；3％波洛卡因；或2％利多卡因与肾上腺素的混合物。

[0638] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，结构细胞可以具有至少约20μm的尺寸、直径或最小费雷特直径。

[0639] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，结构细胞可以具有小于约1000μm的尺寸、直径或最大费雷特直径。

[0640] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，结构细胞可具有在约20μm至约1000μm的范围内的尺寸、直径或费雷特直径分布。

[0641] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，结构细胞可以具有峰值在约200-300μm的粒度、直径或费雷特直径分布。

[0642] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，结构细胞可具有在约200μm至约300μm的范围内的平均粒度、直径或费雷特直径。

[0643] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，结构细胞可具有在约30,000至约75,000μm^2的范围内的平均投影颗粒面积。

[0644] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，真皮填充剂可以被灭菌。

[0645] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，灭菌可以通过γ灭菌。

[0646] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的又一个实施方案中，真皮填充剂可配制用于真皮下注射、深层真皮注射、皮下注射(例如皮下脂肪注射)或其任何组合。

[0647] 在上述一种或多种真皮填充剂中任一种的另一个实施方案中，真皮填充剂可以在注射器或注射装置中提供。

[0648] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种作为软组织填充剂、用于重建手术或两者的用途。

[0649] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种用于改善有此需要的受试者的美容外观的用途。

[0650] 在另一个实施方案中，本文提供了本文描述的一种或多种真皮填充剂中任一种用于增加有此需要的受试者的组织体积、抚平皱纹、或两者的用途。

[0651] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于改善有此需要的受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合的方法，所述方法包括：

[0652] 向有此需要的区域施用或注射本文描述的一种或多种真皮填充剂中的任一种；

[0653] 从而改善受试者的美容外观、增加组织体积、抚平皱纹或其任何组合。

[0654] 在上述一种或多种用途或一种或多种方法的另一个实施方案中，受试者的原生细胞可以渗入真皮填充剂。

[0655] 在上述一种或多种用途或一种或多种方法的又一个实施方案中，真皮填充剂可以是不可吸收的，使得脱细胞的植物或真菌组织在受试者体内保持基本上完整。

[0656] 与植物来源的真皮填充剂相关的其他细节描述在标题为“Dermal Fillers”的美国临时专利申请第63/036,126号中，该申请的全部内容通过引用并入本文。

[0657] 实施例1-从脱细胞的植物组织制备气凝胶

[0658] 植物衍生支架可以提供理想的生物/物理性质(例如体外/体内生物相容性)，易于生产，并且可以提供固定的机械/结构性质。然而，例如，许多植物衍生支架并不能对诸如表面生物化学、可调机械性质、可调微观尺度/宏观尺度架构和/或可规模化生产方法的参数提供相当程度的控制。

[0659] 本实施例描述了植物衍生支架的开发，重点是提供以下一种或多种(或全部)特征：衍生自脱细胞的植物材料；保留所需植物微观架构的能力；可调整为可规模化生产方法(多种)；提供多种支架生物化学的能力；能够提供可调的机械性质；提供可调孔隙率的能力；体外生物相容性；体内生物相容性；和/或在烹饪条件期间稳定(在需要食品应用的情况下)。

[0660] 本实施例描述了满足上述所有特征的支架的开发。这些支架材料在本实施例中是通过首先将植物材料脱细胞，随后进行浸碱处理来制备的，其中在高温下在碱性条件下处理脱细胞的材料以将植物组织分离成单个完整的脱细胞的植物结构细胞(或包括小簇的连接结构细胞的结构细胞组)。然后引入强氧化剂，使所得的细胞浆液呈白色。进行白化以生产最终产品，该最终产品为可能需要着色的各种应用(例如，在食品等中)提供空白画布。然后，将浆液中和并离心，得到包含高浓度脱细胞的植物结构细胞的稠糊状物。然后，将所得产物与各种具有不同生物化学性质的水凝胶混合，以生成复合水凝胶混合物(多种)。此时，可以将水凝胶放入大型模具中并低压冻干，以生产轻质、稳定和大尺寸格式的气凝胶或泡沫形式的最终产品。在本实施例中，创建了这些气凝胶或泡沫库，其具有不同的机械、结构和生物化学性质，可用于各种不同的应用。此外，在(再)水化时，气凝胶和泡沫(在液体(最通常是水或水溶液)中再水化时，本文中也称为水凝胶)可以进一步交联和/或进一步改性

以供下游使用。

[0661] 材料和方法：

[0662] 用于生产本实施例的气凝胶制剂的过程如下：

[0663] 脱细胞：

[0664] PCT专利公开WO2017/136950,标题为“Decellularised Cell Wall Structures From Plants and Fungus and Use Thereof as Scaffold Materials”中描述了进行植物组织的脱细胞,其全部内容通过引用并入本文。使用的5天方案如下：

[0665] 第1天:苹果去皮,然后在曼陀林(mandolin)上切片为1mm厚。将切片加入到含有0.1％SDS溶液的4L烧杯中,并在130RPM下振荡。分配了适当的批号,并保存了生产批号记录。

[0666] 第2天:将0.1％ SDS溶液从烧杯中取出,并用新鲜的0.1％ SDS溶液替换。继续在130RPM下振荡。

[0667] 第3天:将0.1％ SDS溶液从烧杯中取出,并用新鲜的0.1％ SDS溶液替换。继续在130RPM下振荡。

[0668] 第4天:将0.1％ SDS溶液从烧杯中取出,并用新鲜的0.1M $CaCl_2$溶液替换。继续在130RPM下振荡。

[0669] 第5天:取出0.1M $CaCl_2$溶液,并用1L无菌水将内容物洗涤3次。在去除水之后,用1L的70％乙醇填充烧杯,孵育30分钟。最后,去除乙醇,并用1L无菌水将内容物洗涤3次。

[0670] 浸碱：

[0671] 浸碱最通常在上述方案的第5天在最后用无菌水洗涤之后进行。然而,在第5天步骤中获得的产品可以替代地储存在冰箱中,直到需要为止。通常,这些研究中使用的脱细胞的植物材料在冰箱中储存不超过2周;然而,如果需要或期望的话,预计这种植物材料可以储存更长的时间。冷冻脱细胞的植物材料或将其低压冻干也是保存第5天产品的预期步骤;然而,这一步骤在这些研究中通常并未进行。

[0672] 在本实施例中,浸碱如下进行：

[0673] 第5天(续):浸碱如下进行：

[0674] 关键化学品和溶液：

[0675] • 无菌水(Baxter,目录号JF7624)

[0676] • 氢氧化钠(Acros Organics 259860010)

[0677] • 盐酸(Fisher,CAS 7732-18-5)

[0678] • 过氧化氢(30％水溶液,Fisher chemical,CAS 7722-84-1)

[0679] 工具和材料：

[0680] • 通风柜

[0681] • 4L烧杯

[0682] • pH计

[0683] • 标签贴纸

[0684] • 离心机:1L容量,8000rpm。

[0685] • 用于初始脱水的无菌筛。

[0686] 程序:遵循以下方案：

[0687] A.使用Accel TB溶液,然后使用70%乙醇对工作站进行清洁。

[0688] 使用设置在废物烧杯顶部的无菌筛,手动压出脱细胞材料中的水。用天平将其分成各组为500g。所有加工都是在带无菌外科手套的生物安全柜中使用无菌技术完成的。

[0689] 将500g的材料放入干净且无菌的4L烧杯中。

[0690] 向烧杯中加入2.5L的1M NaOH。将温度升高到80℃。

[0691] 加入125mL的30%过氧化氢。注意:该30%过氧化氢溶液为储备溶液浓度。仅加入原样的30%储备溶液。

[0692] 将干净、无菌的磁力搅拌棒放入烧杯中。

[0693] 在80℃下搅拌1小时。确保搅拌足以使材料移动,但不会飞溅。

[0694] 检查以确保颜色透明或呈灰白色。如果它仍然是黄色的,让反应继续进行,直到颜色消失。

[0695] 关闭加热,将烧杯从热源上取下。将溶液冷却至室温。

[0696] 使用pH计,用储备HCl中和溶液,直到pH为6.8-7.2。记录pH值。

[0697] 以8000rpm将材料离心15分钟。确保离心机适当平衡,并使用正确的转子。使用与转子匹配的干净、无菌的1L离心机容器。它们被确定为最高转速(8000rpm)。

[0698] 通过将液体倒入干净的废物烧杯中来去除上清液。用无菌抹刀手动打碎颗粒。对于每个离心机容器(1L容器),将材料重新悬浮在0.75L水中。密封离心机容器的盖子,并摇动以使材料重新悬浮。倒回到4L烧杯中进行中和。

[0699] 重复中和和离心重复,直到pH保持在6.8-7.2内,以便在离心和重新悬浮后进行连续(back-to-back)测量。

[0700] 记录最终pH和循环次数。

[0701] 最后一次对材料进行离心,以浓缩浸碱的材料。

[0702] 丢弃上清液,并将浸碱的材料颗粒转移到无菌的50mL猎鹰管中。

[0703] 对容器内容物进行适当的标记和识别。

[0704] P.样品储存在4℃的冰箱中。

[0705] 结果:

[0706] 结果如图1-4所示。

[0707] 图1显示了较小AA样品(图像中为100g)中AA(苹果)浸碱和变色的结果。将100g的脱细胞AA(苹果)材料在500mL的1M NaOH中于80℃下浸碱1小时。在整个浸碱过程中总共加入75mL的H_2O_2以使样品变色(反应形成Na_2O_2(过氧化钠),它是一种强氧化剂)。图1(A)显示了在NaOH中的AA样品(T=0分钟)。图1(B)显示了在刚加入25mL的H_2O_2后,在NaOH中的AA样品。变色过程在添加后立即开始。(T=2分钟)。在图1(C)中,样品呈黄色(T=10分钟)。在图1(D)中,AA样品在NaOH和H_2O_2添加中浸碱60分钟后呈灰白色。

[0708] 图2(A)显示了用作浸碱工艺起始材料的脱细胞的AA组织。图2(B)显示了浸碱后获得的产品。显示了后续中和和离心后的产物。图2(B)所示的获得的产品材料非常粘稠,类似于一种苹果“糊状物”。

[0709] 图3显示了在浸碱后获得/分离的苹果衍生的脱细胞单结构细胞(以及包括连接在一起的一小部分单结构细胞的一些结构细胞组)的图像。在图3中,用刚果红染料稀释和荧光染色结构细胞,发现细胞的微架构是完整的。

[0710] 图4显示了通过添加H_2O_2浸碱(1M NaOH)的脱细胞AA的粒度分布(分析的N＝10个图像)。平均尺寸证实了完整的单结构细胞的存在,这些细胞保持了其微架构特征。

[0711] 进行了一项检查干燥后材料产率的研究,其中从正上方所述制备的浸碱材料制备了7个样品,每个样品的初始质量为1g。在低压冻干后,收集并称重干物质,平均质量为0.052±0.005g或约5%。这表明浸碱的糊状物含约95%的水。

[0712] 浸碱:优化

[0713] 基于大量实验、观察和结果分析,确定/优化了上述程序中的几个制备步骤。

[0714] 首先,在用于其他应用的传统浸碱/浸渍方案中,H_2O_2通常在工艺开始时与碱/酸(分别为浸碱/浸渍)一起添加。在本研究中,现在发现早期使用过氧化物可能会引起高度放热的反应,这会使溶液更难处理,重要的是,该反应会产生明显更多的泡沫。通过将过氧化物步骤留到浸碱过程的后期,现在已经发现产生更少的泡沫。此外,在随后的中和和离心步骤中,当过氧化物留在加工步骤结束时,会发生较少的泡沫和气体积聚。

[0715] 其次,进行了研究,以研究反应中使用的NaOH的最佳量,目前将其设定为AA:NaOH比例为1:5(质量:体积,例如500g:2.5L)。为了评估这些比例,进行了一系列实验,以确定AA材料与氢氧化钠溶液(NaOH)的最小比例,这将产生适当的浸碱AA。使用浸碱方案测试了三种不同的比例(即1:1、1:2和1:5);所有样品在80℃下浸碱60分钟,然后中和并离心,直到达到稳定的pH。方案如下:

[0716] 1.称重三份脱细胞的AA:20g、50g、和100g。对所有AA(苹果)材料进行按压以去除多余的水分。

[0717] 2.将三个1L烧杯装满100mL的1M NaOH,并放置在磁力搅拌板上。

[0718] 3.将所有溶液加热至80℃;然后,将搅拌棒和一部分脱细胞的AA加入每个溶液中,并对应于加入的AA重量进行适当标记。

[0719] 4.向每个烧杯中加入5mL的30%过氧化氢(H_2O_2)。

[0720] 5.将所有三种溶液在80℃下搅拌1小时。

[0721] 6.在浸碱后,将所有烧杯从它们各自的热板中取出并完全冷却。

[0722] 7.冷却后,将所有三种溶液分别中和和离心,直到获得中性和稳定的pH。

[0723] 8.测试的三种条件(即,在100mL的NaOH中20g的AA,在100mL的NaOH中50g的AA,和在100mL的NaOH中100g的AA)分别储存在它们各自的50mL的猎鹰管中,并储存在冰箱中进行显微镜检查。

[0724] 9.对于颗粒分析,将针对NaOH条件的三种AA中的每一种重新悬浮在蒸馏水中,并用刚果红染色10分钟,然后安装在显微镜载玻片上。

[0725] 10.使用SZX16 Olympus显微镜,使用荧光显微镜(BV滤光器)对载玻片进行成像,并保存以供将来使用ImageJ软件进行分析。

[0726] 图5显示了在所有三种配比条件(即在100mL的1M NaOH中的20g、50g和100g AA)的整个60分钟浸碱过程中,AA-NaOH溶液的颜色变化。图6显示在各种溶液中浸碱后,对分离的单个AA细胞进行成像,并测量它们的费雷特直径。结果表明,在各个条件下,分离的浸碱细胞的平均尺寸、数量和分布没有显著差异。

[0727] 尽管AA:NaOH的1:1溶液可以处理最多量的脱细胞的AA,因此是最有效的,但在测试的条件下,这不是最佳方法。在1:1稀释时,发现溶液变得非常粘稠,并且需要更多的过氧

化物,从而导致起泡困难。因此,优选可行且可安全规模化的溶液,并且确定1:5稀释是这些研究中生产生浸碱材料的优选方法。

[0728] 气凝胶、泡沫和水凝胶制造

[0729] (气凝胶、泡沫和水凝胶制备的相关实验结果也在下面的实施例2中描述)

[0730] 可以想到,如本文描述的产生浸碱的苹果“糊状物”的工艺可以提供多种优点。首先,这种粗产品可以从开始到结束完全通过基于液体的步骤生产。除了最初的苹果剥皮和脱细胞制备(这是一种可以使用自动化工业设备的工艺)外,如果需要,所有其他步骤都可以在液体溶液中大规模实施。这可以提供大量经验证的脱细胞植物组织衍生的结构细胞的粗产品,其具有完整的微架构(单细胞单元),而不是完全溶解的纤维素。其次,本文制定并描述了将粗产品与其他水凝胶混合以产生具有可控结构性质的复合生物材料的方案。

[0731] 一旦混合或分布到水凝胶中,本文制定并描述了冷冻和低压冻干工艺,允许控制可用于生产高度多孔和超轻干燥“泡沫”和“气凝胶”的材料的架构。气凝胶和泡沫格式方便且理想,因为它们可能高度稳定,可以在真空下储存,可能非常轻,并且还可能具有与组织工程化相关的机械性质(例如,10-100kPa)。此外,为了在生物环境中使用,可以考虑随后将它们再水化成水凝胶形式,同时保持它们的结构完整性。

[0732] 气凝胶、泡沫和水凝胶制备的其他材料在下面的实施例2中描述。图7-9显示了本实施例中制备的一些此类气凝胶制剂的结果。图7显示了气凝胶的图像,所述气凝胶包括通过其浸碱从脱细胞的苹果组织衍生的单结构细胞、结构细胞组或两者,所述单结构细胞或结构细胞组或两者分布在载体内,所述载体衍生自低压冻干水凝胶,在该情况下为5%海藻酸盐水凝胶。在该实施例中,将单结构细胞、结构细胞组或两者与5%海藻酸盐水凝胶混合,然后将混合物在模具中冷冻,随后低压冻干以提供描述的气凝胶,其直径为6cm,厚度为0.7cm。图8显示了类似制备的气凝胶的显微镜图像,这次使用50%的海藻酸盐水凝胶(比例尺=500μm)。图9显示了使用50%海藻酸盐水凝胶制备的类似气凝胶的交联和水化形式,水化的气凝胶(本文也称为水凝胶或水凝胶复合物)直径为约1cm,厚度为约4mm。

[0733] 气凝胶、泡沫和水凝胶应用实例

[0734] 骨组织工程

[0735] 考虑到气凝胶、泡沫和水凝胶的高度多孔性,以及它们与骨组织的相似性,可以想到本文描述的气凝胶、泡沫和水凝胶可用于骨组织工程。正在进行的小规模颅骨缺损研究评估了基于藻酸盐和果胶的再水化气凝胶(包括所述的脱细胞的单结构细胞和/或结构细胞组)在骨组织工程中的有效性,支持了这些应用。气凝胶支架的SEM和光学成像在下面的实施例2中进一步描述。用于骨修复的支架的生产和短期稳定性也在下面的实施例12中描述。

[0736] 食品应用与烹饪

[0737] 还开发了各种食品制剂,并进行了烹饪测试。正在进行的研究结果表明,再水化气凝胶可以用甜菜汁和/或食品染料染色。

[0738] 结果还表明,再水化气凝胶可以与黄油一起煎炸。含有海藻酸盐的制剂已经过测试(额外的测试正在进行中),到目前为止获得的结果表明,形状稳定,产生了松脆外皮,并观察到了视觉上看起来坚硬/固体内部。

[0739] 此外,还可以考虑通过将气凝胶支架“胶合”在一起以制造更大的结构来生产复合

材料。琼脂已经作为胶水进行了测试，结果是有利的。

[0740] 还考虑对这些材料进行改性以将胺基团添加到纤维素和/或纤维素衍生物中。在下面的实施例3中描述了初始的基于甘氨酸的改性化学。可以想到，将该官能团添加到材料中的一个目的可能是使用转谷氨酰胺酶（又称“肉胶”），这可能提供使用可食用肉胶（转谷氨酰胺酶）将气凝胶支架彼此胶合在一起或与大尺寸真实肉切片胶合在一起的可能性，并有可能控制远程结构、机械性质和/或其他相关性质。

[0741] 图10显示了在烹饪开始时，在煎锅上加入黄油的本文描述的水化气凝胶（在本实施例中是基于海藻酸盐的）的实例。图11显示了相同气凝胶，经过几分钟的烹饪后，观察到气凝胶保持其形状和完整性，并形成了硬皮。图12显示了“生的”（左）和熟的（右）气凝胶的比较。

[0742] 定向冷冻在气凝胶、泡沫和水凝胶中产生结构特征

[0743] 定向冷冻方法将在下文中进一步详细描述。例如，这些方法可以提供肌肉细胞的模板化，以在气凝胶支架上生长成对准的肌管。可以想到，定向冷冻可用于在气凝胶、泡沫和水凝胶中产生结构特征，这可用于各种应用，包括例如在脊髓修复中。定向冷冻在下文中主要根据在一个方向上的定向冷冻来描述，然而应当理解，也可以根据需要使用多方向定向冷冻来提供结构特征的各种布置。通常，可以通过将含有待冷冻溶液的容器放置在冷板上来实现定向冷冻，以确保冰晶在一个边缘形成并远离冷边缘线性生长。然而，也可以考虑以这种方式开始冷冻铸造过程，并缓慢移动容器，以便冷侧的位置随时间变化。相反，冷板本身可以移动到容器上的不同位置，以使另一组冰晶成核，这些冰晶在与初始凝固不同的方向上生长。在另一个实施方案中，容器可以具有连接到其上的两个或多个冷板，它们可以在冷冻过程中同时开启，或者在单独的点开启，以便在所得气凝胶中产生高度复杂但可控的架构。

[0744] 定向冷冻方法已被应用于聚合物科学应用中，并在本文中被设想为例如为组织工程化应用创建对准的生物材料的策略。通过在水凝胶的一侧产生更大的热梯度，可以从冷侧形成线性和高度对准的冰晶。这可能迫使周围的水凝胶聚合物在冰晶周围形成，从而形成对准的微观尺度通道。在将所得材料低压冻干后，可以形成具有许多微通道的支架。

[0745] 为了在本实施例中实现定向冷冻，围绕珀尔帖模块设计了定制的设备。简单地说，使用具有140mm风扇的Phanteks CPU冷却器（PH-TC14PE）来转移热量，并以倒置配置定向（可以使用任何类似的大型CPU冷却器和风扇）。珀尔帖元件（TEC-12706）的热侧朝下放置在CPU块上，冷侧朝上。最后，将4x4”铜板然后安装在珀尔帖元件的顶部，成为一个有效的冷却表面。在每个界面之间放置热化合物（Arctic MX-4），以确保有效的热传递。

[0746] 珀尔帖元件来源于AEP零件集合。基于其用电量（12V/4.2A），假设该元件是TEC-12706元件；然而，元件本身没有代码。最后，将k型热电偶嵌入铜板的底侧，尽可能靠近珀尔帖元件，以跟踪温度和冷冻速率。

[0747] 为了给装置供电，12V被直接提供给珀尔帖元件，并且还被馈送到降压转换器。降压转换器用于向风扇提供12V电压。这允许最终使用更高的电压来驱动珀尔帖，同时仅向风扇提供12V。

[0748] 图13显示了定制的定向冷冻设备的图像，且图14显示了定向冷冻设备的示意图。为了这项研究的目的，该设备本身是在冰箱中操作的，因为当环境温度更低时，珀尔帖元件

将能够达到较低的温度。将装置冷却并平衡几小时。铜板达到约5℃的初始温度。作为初始测试(铜板上没有材料),用12V/10A电源供电。在约15分钟内,铜板的温度达到约-20℃。在一小时后,板在大约-25℃下达到平衡。

[0749] 将(从浸碱的脱细胞植物组织中获得的)单结构细胞、结构细胞组或两者与水凝胶混合或分布以提供混合物:

[0750] 通过在浓度为5%(w/v)的dH_2O中高压灭菌海藻酸盐粉末来制备海藻酸盐水凝胶。海藻酸盐的最终浓度为1%。制备复合生物材料凝胶,该凝胶包含7.5g的浸碱苹果(即从浸碱的脱细胞苹果组织中获得的单结构细胞、结构细胞组或两者)、3mL的1%海藻酸盐和4.5mL的水。使用连接有f/f路厄锁定连接器的两个50mL注射器将海藻酸盐水凝胶和复合生物材料凝胶混合。将混合物来回传递30次。注射器混合如图15所示。

[0751] 冷冻和脱水、低压冻干或冷冻干燥混合物以提供气凝胶或泡沫:

[0752] 为了创建用于定向冷冻的容器,将15mL猎鹰管的尖端切掉,并用双层石蜡膜将盖端紧密密封。这使得上面制备的水凝胶混合物能够从顶部开口端递送,而底部端留在铜板顶部上。石蜡膜层确保了冷表面和凝胶之间的边界非常薄。在这种情况下,将约3-4mL的水凝胶混合物递送到试管中(垂直站立时约3cm高)。在打开电源之前,首先让这些管在冰箱中的铜板上冷却至少一个小时。冷却后,将装置通电两小时以使整个样品有时间冷冻。在冷冻时,可以在冷冻材料中看到线性特征;然而,拍摄它们很困难。冷冻后,立即将管放置在操作36小时的低压冻干机中。在去除所得气凝胶样品后,观察到多孔生物材料。拍摄了多张图像。

[0753] 随后确定,在低压冻干之前进行额外的冷冻是有益的。具体地,在定向冷冻器上冷冻后,将样品置于-20℃的冷冻机中过夜,以确保整个样品都已冷冻。第二天,样品然后被低压冻干。这种方法确保了所产生的气凝胶和泡沫不会塌陷。

[0754] 图16-18显示了低压冻干后产生的所得气凝胶的图像。图16显示了仍在猎鹰管中的气凝胶的俯视图,其中可以观察到多孔结构;图17显示了从猎鹰管中取出后两个气凝胶的图像。图18显示了在定向冷冻后和低压冻干前未进行额外冷冻而获得的气凝胶(左)(其中气凝胶在低压冻干过程中塌陷),以及在定向冷冻之后和低压冻干之前在-20℃的冰箱中进行额外冷冻过夜的气凝胶(其中未观察到塌陷)。所描绘的支架大约有3cm高。

[0755] 结果

[0756] 进行了光学显微镜和SEM。将两个支架垂直或平行于其长轴进行切片,随后在0.1M $CaCl_2$中交联/再水化,并用光学显微镜或SEM成像。图19显示了整个气凝胶横截面的反射光图像(1倍聚光器,0.75倍放大率)。图20显示了垂直于圆柱体轴线的明视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦)。图21显示了平行于圆柱体轴线的明视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦)。图22显示了垂直于圆柱体轴线的暗视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦)。图23显示了平行于圆柱体轴线的暗视场横截面(立体显微镜2倍聚光器,1.25倍变焦)。图24显示了垂直于圆柱体轴线的SEM横截面,露出微通道。图25显示了垂直于圆柱体轴线的SEM横截面,露出微通道。图26显示了垂直于圆柱体轴线的SEM横截面。图27显示了垂直于圆柱体轴线的SEM横截面。图28显示了平行于圆柱体轴线的SEM横截面,露出远程对准。图29显示了平行于圆柱体轴线的SEM横截面。图30显示了平行于圆柱体轴线的SEM横截面。图31显示了平行于圆柱体轴线的SEM横截面。

[0757] 图32显示了干燥气凝胶部分(左)和0.1M $CaCl_2$处理的再水化气凝胶部分(右)的图像。图像是在大致相同的高度和放大率下采集的。气凝胶部分保持完整,保持其微观结构,并且可以被拾取和操纵。在这种情况下,$CaCl_2$溶液中的再水化使再水化气凝胶的海藻酸盐交联并稳定(右)。

[0758] 还尝试了其他定向冷冻方法。另一个装置是以与上述装置几乎相同的方式定制的。然而,珀尔帖元件连同所有电子设备和风扇一起被移除。然后,可以将被动定向冷冻机放置在泡沫聚苯乙烯盒中,并将液氮倒入盒中,仅覆盖CPU冷却器翅片。在本实施方案中,LN_2通过CPU冷却器的热翅片和热管将热量从安装有样品的铜表面上带走。板温度在几分钟内达到约-130℃,与在原始装置上2小时相比样品在约15分钟内冷冻。冷冻设备如图33所示。

[0759] 图34显示了制备的气凝胶的三种制剂,其中溶剂为A)PBS、B)0.9%盐水或C)水,以评估盐是否会在定向冷冻过程中改变冰晶形成和通道对准/架构(比例尺=2mm,适用于所有情况)。在所有情况下,材料冻结得如此之快,没有明显的冰晶形成,以至于没有观察到对准的通道。从该过程得到非常致密和柔软的泡沫。

[0760] 图35显示了(A)在LN_2系统上定向冷冻的水性海藻酸盐混合物(比例尺=2mm)。支架非常致密和柔软,在肉眼看来是均匀的。这与上述基于珀尔帖的定向冷冻平台上创建的支架形成了鲜明对比,在该平台上,通道化架构肉眼清晰可见。然而,例如,如(B)所示,在高分辨率(比例尺=200um)下,支架的小孔径变得可见,这为细胞侵袭和组织工程和食品科学中的几个潜在的其他应用创造了机会。

[0761] 结果表明,由于用LN_2达到的温度而导致的非常快速的冷冻阻止了大规模、远程冰晶的产生,因此阻止了水凝胶混合物组织化成为通道状、对准的结构。结果得到了致密、高度均匀的气凝胶支架。可以想到,例如以这种方式产生的无定形和均匀的支架可用于组织工程化和食品应用。这些结果进一步扩展了潜在支架架构的目录,并提供了额外的可调谐性选项,并提供了可用于各种应用的材料性质。

[0762] 根据本文选择的结果,可以想到定向冷冻可用于向本文描述的气凝胶、泡沫和水凝胶赋予微观结构,这可为各种不同应用提供各种有益的性质。

[0763] 例如,定向冷冻可用于提供用于脊髓修复的气凝胶、泡沫和/或水凝胶。在某些实施方案中,可以想到通过可控定向冷冻(如在上面使用珀尔帖的第一种方法中)产生的对准结构可以产生支架,该支架可以通过提供具有定向微通道的生物相容性支架用于在植入气凝胶之后对准/引导脊髓细胞以促进愈合来特别好地适用于脊髓修复。这种气凝胶支架可以以可规模化和可控的方式生产。

[0764] 又例如,定向冷冻可用于提供用于各种食品应用的气凝胶、泡沫和/或水凝胶。进一步观察到,当将上述相同的水凝胶混合物放入比猎鹰管更浅并且更宽的更大尺寸的容器中时(例如,直径60mm的皮氏培养皿)时,远程对准往往平行于冷冻板的表面发生。这是一个出乎意料的结果,对于许多应用来说这可能是可取的。例如,在这种情况下,例如,对于人造肉和植物肉的应用,可能需要创建具有与片材平面平行的远程对准的大而平的材料“片材”。在这些应用中,可以想到细胞将与气凝胶/水凝胶支架中的结构对准,以产生更接近类似真实组织的人造肌肉组织。此外,这些高度结构化的支架还可能具有与真实肉相似的结构和机械性质,和/或可能在纯植物肉类中具有价值。此外,在某些实施方案中,可以想到可

以产生人造和纯植物支架，其中它们与真实肉相结合，以提供例如部分基于植物和部分基于动物的新型替代肉制品。

[0765] 又例如，可以想到，对定向冷冻中使用的制剂进行微调可以对气凝胶/泡沫中的所得结构特征提供额外的控制。例如，可以想到在制剂中包含各种盐可以通过增加冰晶形成来改变并潜在地控制对准结构特征的微架构。还可以想到，通道化模具可用于在柱周围形成对准的结构，柱可以随后从支架中移除以赋予具有更大尺寸的通道阵列。替代地或者除此之外，可以想到，例如，通过支架按压针阵列可以用于产生替代通道尺寸，该替代通道尺寸补充了定向冷冻的对准结构。

[0766] 在本实施方案中，根据4天工艺生产脱细胞的AA(苹果)，并将其用作起始材料。然后，在为1天基于液体的浸碱工艺中，将湿的脱细胞AA分解成单个完整的AA结构细胞的浆液。在最后的离心步骤之后，分离干净、湿润的糊状物并用于进一步的加工步骤。该糊状物具有延展性，但会保持它自己的形状(不容易沉淀或流动，粘性很高)。材料是白色的。30个苹果产生约150g的湿润糊状物(95％的水)。所用浓度的化学品被认为是GRAS(SDS、NaOH、HCl、H_2O_2、$CaCl_2$、H_2O)。由于大量的洗涤和中和步骤，最终产品被设计为含有零或仅含有微量的这些化学物质中的任何一种。虽然没有像苹果那样被广泛分析，但在上述工艺中，梨和芦笋也以类似于脱细胞的AA的方式做出反应。可以想到可以使用许多不同的植物类型。

[0767] 可以根据本文描述的方法制备各种不同的气凝胶、泡沫和水凝胶产品及其前体。

[0768] 例如，可以提供从脱细胞的植物或真菌组织的浸碱获得的所得产物，如本文所述，该产物包括单结构细胞、结构细胞组或两者，并且该产物可以以糊状物或凝胶的形式提供，或者可以以干粘性粉末的形式提供(当在没有载体水凝胶的情况下低压冻干或以其他方式干燥时)。这样的产品通常可以是稳定的，可以用EtOH灭菌，或者可以想到这样的产品在某些实施方案中可以通过伽玛灭菌进行灭菌。在某些实施方案中，这样的产品可以与其他液体或凝胶混合。通常，这样的产品不容易溶解在基于水溶液或基于醇的溶液中。

[0769] 还可以提供气凝胶产品或气凝胶前体。例如，在某些实施方案中，可以将上述段落中描述的糊状物、凝胶、干粘性粉末或其他此类产品与一种或多种(任选食品级)水凝胶混合，例如但不限于明胶、琼脂、普朗尼克酸、海藻酸盐、果胶、甲基纤维素(MC)和/或羧甲基纤维素(CMC)水凝胶，从而提供气凝胶前体。在某些实施方案中，气凝胶前体产品可包含约10％至约50％(例如约10％、约20％或约50％)(m/m)的上文段落中所述的糊状物、凝胶、干粘性粉末或其他此类产品，但也可以考虑其他浓度，因为这可在全范围内控制。然后可以将气凝胶前体放入任何合适尺寸的容器或模具中，这将决定其最终尺寸和厚度。气凝胶前体产品可以冷冻(通常在-20℃下过夜)，然后低压冻干(通常持续至少约24小时)，得到高度多孔的干气凝胶或泡沫产品。控制冷冻温度(例如，-20℃、-80℃、-130℃)和制剂％(m/m)可以控制所得气凝胶和泡沫的孔隙率。结果表明，对孔隙率的控制可以从与原始AA支架相当的水平或低于该水平开始实现。10％(m/m)制剂具有非常低的孔隙率，但非常脆弱，因此可以保留用于不考虑脆弱性的应用。50％制剂为用户提供大多数应用的最佳体验。根据特定应用或产品的需要，可以使用冷冻方法(定向与非定向)来提供对微架构几何形状的控制(对准多孔与均匀多孔)。初步研究表明，溶剂(例如DMSO与H_2O)也可以允许控制孔隙率和微架构。这样的产品可以用EtOH灭菌，并且可以想到伽马灭菌也是可能的。

[0770] 还考虑了其他产品，如本文描述的再水化气凝胶或泡沫，其中引入了液体，如水或

水溶液(如细胞缓冲液)或另一种液体或溶液(如醇)。在本文描述的研究中,气凝胶和泡沫的再水化产生了微架构完整的稳定水凝胶。基于海藻酸盐和果胶的气凝胶和泡沫可以在$CaCl_2$中再水化以提供交联。再水化气凝胶和泡沫在水溶液和基于乙醇的溶液中振荡数小时/数天的情况下是稳定的。基于果胶的气凝胶和泡沫在0.9%的盐水中不稳定,并经历了快速降解,然而它们在PBS、H_2O和EtOH中是稳定的。在正在进行的研究中,这种再水化气凝胶和泡沫也已经用NIH3T3和C2C12细胞进行了长达至少2周的细胞培养验证。事实上,结果表明,本文描述的再水化气凝胶和泡沫在细胞培养方面的行为预计与WO2017/136950中描述的脱细胞的植物衍生支架生物材料类似。在测试的条件下,基于海藻酸盐和明胶的再水化气凝胶和泡沫优于基于果胶的气凝胶和泡沫(它们随着时间的推移会分解)。基于海藻酸盐和果胶的再水化气凝胶和泡沫预计非常适合体内植入(例如,用于骨组织工程应用)。这种产品可以用EtOH灭菌(例如,在EtOH中振荡60分钟),并且可以想到伽马灭菌也是可能的。

[0771] 本文描述的结果表明,如本文所述,气凝胶和泡沫以及再水化的气凝胶和泡沫可以允许控制表面生物化学,特别是因为可以根据需要用定义的生物化学(明胶、海藻酸盐、果胶、MC、CMC等)配制气凝胶和泡沫以及再水化成的气凝胶和泡沫。主要由糖组成的各种“植物基”烃聚合物可以用作水凝胶或载体。结果还表明,还可以实现对气凝胶、泡沫、再水化气凝胶和再水化泡沫的力学控制。本文描述的气凝胶、泡沫、再水化气凝胶和再水化泡沫可能具有可控的机械性质,这些机械性质可能作为制剂%的函数而变化。通常,在测试的条件下,观察到机械性质在约1至约200kPa之间变化。精确值可能取决于水凝胶类型和气凝胶或泡沫的干/湿形式/状态。一个观察到的经验法则是,再水化气凝胶和泡沫比它们的等效干气凝胶或泡沫软了约10倍。还可以实现对孔隙率的控制。结果表明,孔隙率可以通过改变制剂%、冷冻温度、冷冻方法和/或使用的溶剂来控制。一个观察到的经验法则是,在测试的条件下,孔隙率等于原始AA支架(在脱细胞后,在通过浸碱等进一步加工之前),或者可以由此降低(即更高的密度,更低的孔径)。结果表明,还可以实现对尺寸的控制。水凝胶混合物在低压冻干和交联之前的冷冻容器/模具决定了所得气凝胶或泡沫产品的最终尺寸。另外还想到,灭菌也可以很容易地实现。可以想到,通常所有产品类型都可以进行EtOH灭菌,并且可以想到伽马灭菌也是可能的。结果进一步表明,本文描述的再水化气凝胶和泡沫可能适用于体外细胞培养。在基于海藻酸盐、果胶和明胶的再水化气凝胶和泡沫上成功地进行了细胞培养。在迄今为止测试的条件下,基于琼脂和普朗尼克酸的再水化气凝胶和泡沫似乎与细胞培养物不兼容,然而,例如,这也可能有利于其中不希望细胞生长的应用。在测试的条件下,基于海藻酸盐的再水化气凝胶和泡沫是迄今为止用于体外细胞培养应用的性能最好的产品。

[0772] 实施例2-从脱细胞的植物组织制备其他气凝胶和泡沫

[0773] 在本实施例中,使用通过浸碱从脱细胞的植物组织中获得的各种水凝胶和单结构细胞和/或结构细胞组,制备并测试不同气凝胶和泡沫库。

[0774] 材料和方法:

[0775] 储备溶液:

[0776] 5%海藻酸盐储备溶液:

[0777] 10g海藻酸钠(Modernist Pantry;LOT#14933)

[0778] 200ml蒸馏水

[0779] A.称取10g的海藻酸钠。

[0780] B.将粉末混合到200mL的蒸馏水中。

[0781] C.高压釜溶液灭菌约1小时。

[0782] D.使用前,在水浴(37-50℃)中保温。

[0783] 5%果胶储备溶液:

[0784] 10g低甲氧基果胶(Modernist Pantry;LOT#14896)

[0785] 200ml蒸馏水

[0786] A.称取10g低甲氧基果胶。

[0787] B.将粉末混合到200mL的蒸馏水中。

[0788] C.高压釜溶液灭菌约1小时。

[0789] D.使用前,在水浴(37-50℃)中保温。

[0790] 最终5%的海藻酸盐和果胶原液如图36所示。

[0791] 5%琼脂储备溶液:

[0792] 10g超级琼脂(Modernist Pantry;LOT#13198)

[0793] 200ml蒸馏水

[0794] A.称取10g低甲氧基果胶。

[0795] B.将粉末混合到200mL的蒸馏水中。

[0796] C.高压釜溶液灭菌约1小时。

[0797] D.使用前,在水浴(37-50℃)中保温。

[0798] 40%普朗尼克储备溶液:

[0799] 40g普朗尼克F-127(Sigma Aldrich;LOT#BCCC2327)

[0800] 100ml蒸馏水

[0801] 冰浴(约0℃)

[0802] A.称取40g的普朗尼克F-127。

[0803] B.向300mL烧杯中加入100mL的蒸馏水,并将其置于冰浴中直到水温在4-10℃之间。

[0804] C.将烧杯从冰浴中取出,放在带有搅拌棒的搅拌板上;一边搅拌一边缓慢倒入40g的普朗尼克。

[0805] D.继续搅拌,直到普朗尼克粉末完全混合到溶液中(看不到大块);通过频繁地将烧杯放回冰浴中,确保溶液保持在低温。

[0806] E.使用前保持低温(约4-10℃)。

[0807] 普朗尼克储备溶液的制备程序如图37所示。

[0808] 甲基纤维素储备溶液:

[0809] 甲基纤维素

[0810] NaOH溶液(氢氧化钠,超纯,50%wt%水溶液,Acros Organics,CAS 1310-73-2,LOT#A0408208)

[0811] 甘氨酸(甘氨酸,Fisher,BP381-1,CAS 56-40-6,LOT#121382)

[0812] A.称取4g的甲基纤维素,并在烧杯中将其与80mL的2M NaOH混合。

[0813] B.将装有混合物的烧杯置于冰浴中,搅拌一小时。

[0814] C.向样品中加入40mL的在2M NaOH中制备的10％w/v甘氨酸溶液。

[0815] B.将烧杯再次置于冰浴中,搅拌一小时。

[0816] E.收集样品。

[0817] 20％明胶储备溶液:

[0818] 40g鱼明胶粉(250胶冻强度(Bloom);Modernist Pantry;LOT#14048)

[0819] 200ml蒸馏水

[0820] A.称取40g的低甲氧基果胶。

[0821] B.将粉末混合到200mL的蒸馏水中。

[0822] C.高压釜溶液灭菌约1小时。

[0823] D.使用前,在水浴(37-50℃)中保温。

[0824] 20％普朗尼克储备溶液:

[0825] 20g普朗尼克F-127(Sigma Aldrich;LOT#BCCC2327)

[0826] 100ml蒸馏水

[0827] 冰浴(约0℃)

[0828] A.称取20g的普朗尼克F-127。

[0829] B.向300mL烧杯中加入100mL的蒸馏水,并将其置于冰浴中直到水温在4-10℃之间。

[0830] C.将烧杯从冰浴中取出,放在带有搅拌棒的搅拌板上;一边搅拌一边缓慢倒入20g的普朗尼克。

[0831] D.继续搅拌,直到普朗尼克粉末完全混合到溶液中(看不到大块);通过频繁地将烧杯放回冰浴中,确保溶液保持在低温。

[0832] E.使用前保持低温(约4-10℃)。

[0833] AA(苹果)浸碱和中和:

[0834] NaOH溶液(氢氧化钠,超纯,50％wt％水溶液,Acros Organics,CAS1310-73-2,LOT#A0408208)

[0835] 过氧化氢溶液(30％水溶液,Fisher chemical,CAS 7722-84-1,LOT#197718)

[0836] 脱细胞的AA材料

[0837] 中和用HCl溶液(盐酸溶液6N,Fisher scientific,CAS 7732-18-5,LOT#116660,Exp:2013年11月,用dH_2O稀释至1N)

[0838] A.通过按压样品去除脱细胞的AA样品中多余的水,并称取100克这种材料。

[0839] B.制备500mL的1M NaOH,加热至80℃(300RPM)。

[0840] C.将AA样品加入NaOH溶液中,并加入25mL的H_2O_2(在整个浸碱过程中将溶液保持在80℃)。

[0841] D.20分钟后,加入另外25mL的H_2O_2。

[0842] D.再过20分钟后,加入另外25mL的H_2O_2。

[0843] F.浸碱1小时后,让样品冷却。此时,将AA样品浸碱,溶液应为灰白色。

[0844] G.用1M HCl溶液中和(pH 7)样品。

[0845] H.将溶液以5000RPM离心15分钟,以使浸碱AA成为颗粒。

[0846] I.去除上清液。通过将颗粒化的样品与dH_2O混合并使用pH计来验证pH仍为7。如果

样品不是中性的，则将它重新中和并重复步骤H。

[0847] J.重复步骤H和I，直到样品被中和。将样品保持在4℃，直到进一步用于气凝胶制备。

[0848] 气凝胶制备-混合、冷冻干燥、加工：

[0849] 海藻酸盐气凝胶：

[0850] A.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2)，并在适当体积的海藻酸盐储备溶液和蒸馏水中混合(最终体积为15mL)。

[0851] B.将每个AA样品溶液(共6个：3X1.5 g的AA和3X7.5 g的AA)直接放入60mm培养皿中。

[0852] C.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合

[0853] D.将样品在-20℃的冷冻机中冷冻。

[0854] E.将样品安装在LabConco冷冻干燥机上，在55mBar和-47℃下冷冻干燥48小时。

[0855] F.48小时后，从冷冻干燥机中取出样品。

[0856] G.用10mm的活检打孔凿，从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0857] H.将打孔凿置于0.1M的$CaCl_2$中一个小时以进行交联。

[0858] I.将样品在70％乙醇中灭菌30分钟。

[0859] J.用PBS洗涤气凝胶3次，然后将其置于DMEM介质(10％FBS，1％P/S)中。将用于湿机械测试的气凝胶放置在60mm培养皿中(5-6个样品)，并将用于细胞接种的样品放置在24孔板中(6个样品)。

[0860] 果胶气凝胶：

[0861] A.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2)，并在适当体积的果胶储备溶液和蒸馏水中混合(最终体积为15mL)。

[0862] B.将每个AA样品溶液(共6个：3X1.5 g的AA和3X7.5 g的AA)直接放入60mm培养皿中。

[0863] C.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0864] D.将样品在-20℃的冷冻机中冷冻。

[0865] E.将样品安装在LabConco冷冻干燥机上，在55mBar和-47℃下冷冻干燥48小时。

[0866] F.48小时后，从冷冻干燥机中取出样品。

[0867] G.用10mm的活检打孔凿，从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0868] H.将打孔凿置于0.1M的$CaCl_2$中一个小时以进行交联。

[0869] I.将样品在70％乙醇中灭菌30分钟。

[0870] J.用PBS洗涤气凝胶3次，然后将其置于DMEM介质(10％FBS，1％P/S)中。将用于湿机械测试的气凝胶放置在60mm培养皿中(5-6个样品)，并将用于细胞接种的样品放置在24孔板中(6个样品)。

[0871] 琼脂气凝胶：

[0872] A.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2)，并在适当体积的琼脂储备溶液和蒸馏水中混合(最终体积为15mL)。

[0873] B.将每个AA样品溶液(共6个：3X1.5 g的AA和3X7.5 g的AA)直接放入60mm培养皿中。

[0874] C.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0875] D.将样品在-20℃的冷冻机中冷冻。

[0876] E.将样品安装在LabConco冷冻干燥机上,在55mBar和-47℃下冷冻干燥48小时。

[0877] F.48小时后,从冷冻干燥机中取出样品。

[0878] G.用10mm的活检打孔凿,从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0879] H.将打孔凿置于0.1M的$CaCl_2$中一个小时以进行交联。

[0880] I.将样品在70%乙醇中灭菌30分钟。

[0881] J.用PBS洗涤气凝胶3次,然后将其置于DMEM介质(10%FBS,1%P/S)中。将用于湿机械测试的气凝胶放置在60mm培养皿中(5-6个样品),并将用于细胞接种的样品放置在24孔板中(6个样品)。

[0882] 普朗尼克气凝胶:

[0883] A.称取40克的普朗尼克F-127,用于达到40%(w/v)普朗尼克溶液的最终浓度。

[0884] B.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2),并在适当体积的蒸馏水中混合。

[0885] C.将100mL的蒸馏水倒入烧杯中,置于冰浴中,直到温度达到4-10℃。

[0886] D.一旦达到适当的温度,将烧杯从冰浴中取出,放在搅拌板上;将40g的普朗尼克粉末混合到蒸馏水中,充分搅拌,直到没有大块的普朗尼克,确保普朗尼克溶液保持在低温下。

[0887] E.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0888] F.在溶液充分混合后,将所需体积的40%(w/v)普朗尼克(如下表2中所述)倒入6个平皿中的每一个。

[0889] G.将所有平皿储存在温度为约37℃的孵化器或烘箱中1小时。

[0890] H.最后,将所有平皿储存在-20℃的冷冻机中冷冻1小时,然后安装在冷冻干燥机上进行低压冻干。

[0891] I.注意:最终的冷冻干燥的泡沫由于在70% EtOH中崩解而无法灭菌,因此不用于细胞培养。

[0892] 甲基纤维素气凝胶:

[0893] A.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2),并在适当体积的甲基纤维素凝胶中混合(最终体积为约15mL)。

[0894] B.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0895] C.将每个AA样品溶液(共6个:3X1.5 g的AA和3X7.5 g的AA)直接放入60mm培养皿中。

[0896] D.让样品在室温下孵育24小时。

[0897] E.将样品在-20℃的冷冻机中冷冻。

[0898] F.将样品安装在LabConco冷冻干燥机上,在55mBar和-47℃下冷冻干燥48小时。

[0899] G.48小时后,从冷冻干燥机中取出样品。

[0900] H.用10mm的活检打孔凿,从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0901] I.注意:最终的冷冻干燥的泡沫由于在70% EtOH中崩解而无法灭菌,因此不用于细胞培养。

[0902] 明胶气凝胶:

[0903] A.称量适当质量的浸碱的AA(根据下表2),并在15mL猎鹰管中在相应体积的蒸馏水中混合。

[0904] B.接下来,将AA溶液转移到50mL的塑料注射器中,并加入适当体积的20%明胶储备溶液(参见表2)和约150uL的戊二醛(GA)进行交联。

[0905] C.使用路厄锁定连接器将第二个50mL的空注射器连接到第一个注射器上,并在两个注射器之间来回(约30次)转移总体积(约15mL)的AA溶液,充分混合。

[0906] D.将最终AA溶液(总体积15mL)分配到60mm培养皿中,并在4℃冷冻机中储存24小时。

[0907] E.用10mg/mL的硼氢化钠在冰上孵育1小时,然后用PBS洗涤3次。

[0908] F.在-20℃的冷冻机中储存4小时。

[0909] G.将样品安装在LabConco冷冻干燥机上,在55mBar和-47℃下冷冻干燥48小时。

[0910] H.48小时后,从冷冻干燥机中取出样品。

[0911] I.用10mm的活检打孔凿,从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0912] J.将样品在70%乙醇中灭菌30分钟。

[0913] K.用PBS洗涤气凝胶3次,然后将其置于DMEM介质(10%FBS,1%P/S)中。将用于湿机械测试的气凝胶放置在60mm培养皿中(5-6个样品),并将用于细胞接种的样品放置在24孔板中(6个样品)。

[0914] 图38显示了如上所述的明胶-AA气凝胶气凝胶的制备。

[0915] 普朗尼克+果胶气凝胶:

[0916] 制作AA样品溶液:

[0917] A.称出7.5g的浸碱的AA;重复直到总共有3份的7.5g AA。

[0918] B.制备5%果胶(w/v)的储备溶液和第二种20%普朗尼克储备溶液。

[0919] C.向注射器中加入4.5mL的5%果胶。

[0920] D.接下来,加入7.5mL的20%普朗尼克储备溶液,总体积为19.5mL。

[0921] E.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0922] 制作普朗尼克-AA凝胶:

[0923] G.一旦所有组分在它们各自的培养皿中混合在一起,将所有平皿储存在孵化器或烘箱中,在37℃下放置1小时。

[0924] H.从孵化器中取出平皿,在每个平皿中加入2mL的0.1M $CaCl_2$进行交联;混合均匀,让所有平皿在室温下胶凝1小时。

[0925] I.最后,将所有平皿储存在-80℃的冷冻机中,彻底冷冻2-3天,然后安装在冷冻干燥机上进行低压冻干。

[0926] J.冷冻干燥后,从冷冻干燥机中取出泡沫,并用10mm活检打孔凿切下小泡沫气凝胶,用于干燥机械测试。

[0927] K.注意:最终的冷冻干燥的泡沫由于在70% EtOH中崩解而无法灭菌,因此不用于细胞培养。

[0928] 普朗尼克+海藻酸盐气凝胶:

[0929] 制作AA样品溶液:

[0930] A.称出7.5g的浸碱的AA;重复直到总共有3份的7.5g AA。

[0931] B.制备5％海藻酸盐(w/v)的储备溶液和第二种20％普朗尼克储备溶液。

[0932] C.将每份7.5g AA放入注射器中。

[0933] D.加入4.5mL的5％海藻酸盐。

[0934] E.接下来,加入7.5mL的20％普朗尼克储备溶液,总体积为19.5mL。

[0935] F.使用连接有路厄锁定连接器的注射器充分混合以将AA与凝胶结合。

[0936] 制作普朗尼克-AA凝胶:

[0937] G.一旦所有组分在它们各自的培养皿中混合在一起,将所有平皿储存在孵化器或烘箱中,在37℃下放置1小时。

[0938] H.从孵化器中取出平皿,在每个平皿中加入2mL的0.1M $CaCl_2$进行交联;混合均匀,让所有平皿在室温下胶凝1小时。

[0939] I.最后,将所有平皿储存在-80℃的冷冻机中,彻底冷冻2-3天,然后安装在Labconco冷冻干燥机上。将样品在55mBar和-47℃下放置48小时。

[0940] J.48小时后,从冷冻干燥机中取出样品。

[0941] K.用10mm的活检打孔凿,从冷冻的气凝胶中切下样品。

[0942] L.将打孔凿置于0.1M的$CaCl_2$中一个小时以进行交联。

[0943] M.将样品在70％乙醇中灭菌30分钟。

[0944] N.用PBS洗涤气凝胶3次,然后将其置于DMEM介质(10％FBS,1％P/S)中。将用于湿机械测试的气凝胶放置在60mm培养皿中(5-6个样品),并将用于细胞接种的样品放置在24孔板中(6个样品)。

[0945] 混合

[0946] 为了制备浸碱材料和碱性水凝胶的均匀混合物,将组分装入通过F/F路厄锁定连接器连接的注射器中。将溶液穿过注射器30X。基于注射器的混合设备如图39所示。

[0947] 细胞培养

[0948] 将灭菌和水化的气凝胶放置在具有2mL的DMEM的24孔板(每孔1个样品)中。在100mm皮氏培养皿中将GFP 3T3细胞在DMEM培养基(10％ FBS,1％ P/S)中在37℃和5％CO_2下培养。用PBS洗涤细胞,并用0.25％胰蛋白酶进行胰蛋白酶化。将细胞制粒并以$2x10^6$个细胞/毫升的浓度重新悬浮在DMEM中。将25μL的细胞重悬液移液到每个灭菌和水化的气凝胶上,这意味着每个气凝胶都接种了50,000个细胞。在37℃和5％CO_2下孵育4小时后,将2mL的DMEM添加到每个含有接种的气凝胶的孔中,并将板放回到孵化器中。

[0949] 孵化7天后,使用与上述相同的方法将气凝胶再次接种GFP 3T3细胞。自第一次接种以来总共两周后(有两次接种,即第1天和第7天),将细胞固定在气凝胶上。将样品用1mL的PBS洗涤两次。将细胞在3.5％多聚甲醛中孵育10分钟用于固定。再次用1mL的PBS洗涤样品两次,并用0.1％刚果红染色10分钟。最后,用PBS洗涤样品,并在4℃下储存在2mL的PBS中。

[0950] 机械测试

[0951] 所有不同气凝胶制剂的10mm活检打孔凿都已使用CellScale的Univert仪器进行了机械测试(干样品)。此外,用GFP 3T3细胞接种的制剂也用相同的设置/压缩循环进行机械测试(湿)。

[0952] 在20秒期间(拉伸持续时间),将样品压缩到其高度的90％(1次重复)。对每个制剂

机械测试5或6个样品。

[0953] 结果：

[0954] AA浸碱

[0955] 由100g湿的脱细胞AA的浸碱得到约30-40g的浸碱AA材料。

[0956] 在浸碱过程中使用过氧化氢而不是分离浸碱和脱色步骤节省了时间(在少了约4倍的时间内获得相同量的浸碱AA材料)。当同时结合这两个步骤时，需要约一个小时才能获得灰白色的浸碱材料。上述实施例1中描述的图1和图2显示了AA浸碱和变色，以及起始材料和浸碱所得产品。

[0957] 表2显示了在本实施例中为库制备的各种气凝胶制剂。图40描述了作为本实施例中产生的库的一部分制备的不同气凝胶制剂的示意图。显示了样品冷冻干燥之前和之后的气凝胶。表3显示了在本实施例中测试的气凝胶的细胞培养结果的总结。

[0958] 表2:为库制备的各种气凝胶制剂

[0959]

浸碱AA的质量（g）	凝胶类型	储备凝胶浓度。（%m/v））	储备凝胶溶液的体积（mL）	dH_2O的体积（mL）	最终体积（mL）	交联剂
1.5	海藻酸盐	5	3	10.5	15	0.1M $CaCl_2$
7.5	海藻酸盐	5	3	4.5	15	0.1M $CaCl_2$
1.5	果胶	5	3	10.5	15	0.1M $CaCl_2$
7.5	果胶	5	3	4.5	15	0.1M $CaCl_2$
1.5	琼脂	5	3	10.5	15	热
7.5	琼脂	5	3	4.5	15	热
1.5	普朗尼克	40	7.5	6	15	热
7.5	普朗尼克	40	7.5	0	15	热

1.5	甲基纤维素	3.33	约 13.5	0	15	甘氨酸
7.5	甲基纤维素	3.33	约 7.5	0	15	甘氨酸
1.5	明胶	20	3.75	9.6	15	GA
7.5	明胶	20	3.75	3.6	15	GA
1.5	普朗尼克+果胶	40（普朗尼克），5（果胶）	7.5（普朗尼克），3（果胶）	3	15	0.1M $CaCl_2$
1.5	普朗尼克+海藻酸盐	40（普朗尼克），5（海藻酸盐）	7.5（普朗尼克），3(海藻酸盐）	3	15	0.1M $CaCl_2$
7.5	普朗尼克+果胶	20（普朗尼克），5（果胶）	7.5（普朗尼克），4.5（果胶）	0	19.5	0.1M $CaCl_2$
7.5	普朗尼克+海藻酸盐	20（普朗尼克），5（海藻酸盐）	7.5（普朗尼克），4.5（海藻酸盐）	0	19.5	0.1M $CaCl_2$

[0960]

[0961] 表3:细胞培养结果汇总

[0962]

浸碱的 AA 质量（g）	凝胶类型	细胞生长（Y、S、N、N/A）
1.5*	海藻酸盐	Y
7.5**	海藻酸盐	Y

[0963]

1.5***	果胶	Y
7.5**	果胶	Y
1.5*	琼脂	S 或 N
7.5****	琼脂	S 或 N
1.5	普郎尼克	N/A
7.5	普郎尼克	N/A
1.5	甲基纤维素	N/A
7.5	甲基纤维素	N/A
1.5	明胶	Y
7.5	明胶	Y
7.5	普郎尼克+果胶	N/A
7.5	普郎尼克+海藻酸盐	S 或 N

[0964] *5个冰球成像

[0965] **6个冰球成像

[0966] ***1个冰球成像

[0967] ****3个冰球成像

[0968] 琼脂和果胶(1.5)气凝胶在水化后非常脆弱,它们会碎成更小的碎片。

[0969] 有些制剂不太适合细胞生长,因为它们要么太脆弱;它们一旦水化就碎了;要么它们在灭菌步骤期间崩解。普朗尼克、甲基纤维素和普朗尼克+果胶气凝胶就是这样。因此,这些主要产品没有接种GFP 3T3细胞。

[0970] 图41显示了将GFP 3T3细胞(绿色)接种到用刚果红(红色)染色的某些气凝胶气凝胶(如图所示)上的结果。将琼脂、海藻酸盐、果胶和明胶水凝胶与1.5g的脱细胞浸碱苹果(10%)或7.5g的脱细胞、浸碱苹果(50%)(比例尺=200μm)组合使用。在BX53立式显微镜上以10倍放大率采集图像,其中GFP滤光器用于细胞,TXRED滤光器用于支架。

[0971] 干气凝胶样品的机械测试结果如图42-54所示,水化气凝胶样品机械测试结果如图55-64所示,如下:

[0972] 图42显示了含有1.5g浸碱AA的干琼脂基凝胶的应力-应变曲线;

[0973] 图43显示了含有7.5g浸碱AA的干琼脂基凝胶的应力-应变曲线;

[0974] 图44显示了含有1.5g浸碱AA的干海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线;

[0975] 图45显示了含有7.5g浸碱AA的干海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线;

[0976] 图46显示了含有1.5g浸碱AA的干果胶基凝胶的应力-应变曲线;

[0977] 图47显示了含有7.5g浸碱AA的干果胶基凝胶的应力-应变曲线;

[0978] 图48显示了含有1.5g浸碱AA的干明胶基凝胶的应力-应变曲线;

[0979] 图49显示了含有7.5g浸碱AA的干明胶基凝胶的应力-应变曲线;

[0980] 图50显示了含有1.5g浸碱AA的干甲基纤维素基凝胶的应力-应变曲线;

[0981] 图51显示了含有7.5g浸碱AA的干甲基纤维素基凝胶的应力-应变曲线;

[0982] 图52显示了含有1.5g浸碱AA的干普朗尼克基凝胶的应力-应变曲线；

[0983] 图53显示了含有7.5g浸碱AA的干普朗尼克和海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0984] 图54显示了具有水合物对应物的干燥样品的杨氏模量。浸碱AA的体积由1.5和7.5表示；两者均以克为单位，并且分别对应于10％和50％的溶液。使用1％琼脂、海藻酸盐和果胶的基础水凝胶。明胶是5％的最终溶液；

[0985] 图55显示了含有1.5g浸碱AA的水化琼脂基凝胶的应力-应变曲线；

[0986] 图56显示了含有7.5g浸碱AA的水化琼脂基凝胶的应力-应变曲线；

[0987] 图57显示了含有1.5g浸碱AA的水化海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0988] 图58显示了含有7.5g浸碱AA的水化海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；

[0989] 图59显示了含有1.5g浸碱AA的水化果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0990] 图60显示了含有7.5g浸碱AA的水化果胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0991] 图61显示了含有1.5g浸碱AA的水化明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0992] 图62显示了含有7.5g浸碱AA的水化明胶基凝胶的应力-应变曲线；

[0993] 图63显示了含有7.5g浸碱AA的水化普朗尼克和海藻酸盐基凝胶的应力-应变曲线；和

[0994] 图64显示了水化样品的杨氏模量。浸碱AA的体积由1.5和7.5表示；两者均以克为单位，并且分别对应于10％和50％的溶液。使用1％琼脂、海藻酸盐和果胶的基础水凝胶。明胶是5％的最终溶液。

[0995] 图42-64中的结果表明，可以控制材料的机械性质。这些结果还显示了双峰机械性质，其中刚度在小应变时的较低值和高应变时的较高值之间增加(即压缩期间机械性质发生变化)。具有不同状态的能力是令人感兴趣的。线性弹性状态是令人感兴趣的；然而，不同塑性状态和分解点的机制对于某些应用可能是更感兴趣的，例如对于食品应用和定制的口感。

[0996] 溶胀

[0997] 为了确定溶胀对气凝胶尺寸的重要性，测量了用于干和湿机械测试的气凝胶的近似直径。泡沫气凝胶在孵化器中在DMEM中储存几天后，观察到了液体保留的效果。由于在灭菌过程中崩解的一些气凝胶类型(即甲基纤维素和普朗尼克)，没有获得所有气凝胶制剂的直径数据。获得了琼脂、海藻酸盐和果胶AA制剂气凝胶的干直径和湿直径测量结果。根据这些测量结果，确定了AA气凝胶的近似面积、高度和体积，如下表4、5和6所示。

[0998] 为了统计分析，在每种气凝胶类型的干测量结果和湿测量结果之间进行t检验。除了海藻酸盐和明胶气凝胶(均为1.5g和7.5g条件)外，所有气凝胶面积测量结果的大小在潮湿后都会减小，这可能是由于样品在液体中有一定程度分解并失去一些稳定性。还进行了方差分析(ANOVA)，以确定凝胶类型和AA浓度(即1.5g AA和7.5g AA)之间相互作用的显著性。总体而言，用于气凝胶的AA浓度之间没有观察到显著差异。然而，当比较凝胶类型时，存在显著差异。

[0999] 海藻酸盐和明胶制剂是唯一的由于浸入DMEM后气凝胶溶胀而证实气凝胶高度显著增加的AA气凝胶类型。海藻酸盐和明胶气凝胶在水化后也同样观察到体积的增加；其余的气凝胶制剂都证实，一旦润湿，气凝胶体积会显著减小，这可能是由于一些气凝胶降解。此外，高度的方差分析揭示了不同浓度之间的显著差异，表明冷冻干燥过程或填充方法的

可变性可能以某种方式影响气凝胶高度。此外，凝胶类型和相互作用效应在0.05水平时也很显著。这些发现可以在下表4、表5和表6中观察到。

[1000] 表4：用于干和湿机械测试的几种AA气凝胶类型的近似面积测量。T检验结果在下面显示为p值，其中显著性阈值<0.05

[1001]

		平均面积（mm）	标准偏差	平均值标准误差（SEM）
琼脂 1.5g AA	*干的*	124.86	25.820	10.541
	水化的	46.652	20.074	8.1950
	p 值	0.00020157		
琼脂 7.5g AA	*干的*	113.01	10.520	3.9760
	水化的	28.298	9.6680	3.9470
	p 值	0.000000011400		
海藻酸盐 1.5g AA	*干的*	82.112	6.8154	3.0480
	水化的	88.278	19.505	8.7227
	p 值	0.53437		
海藻酸盐 7.5g AA	*干的*	75.720	5.7165	2.1606
	水化的	92.010	21.048	9.4128
	p 值	0.16004		
果胶 1.5g AA	*干的*	81.164	11.919	4.5050
	水化的	37.136	5.7964	2.8982
	p 值	0.000018642		
果胶 7.5g AA	*干的*	80.688	2.4705	0.93377
	水化的	74.508	4.2650	1.9073

[1002]

	***p* 值**	0.0274		
	干的	79.180	4.1013	1.6743
	水化的	93.866	11.102	4.5322
明胶 1.5g AA	***p* 值**	0.0213		
	干的	78.983	1.6822	0.68675
	水化的	88.096	8.2013	3.3482
明胶 7.5g AA	***p* 值**	0.0411		

[1003] 表5:用于干和湿机械测试的几种AA气凝胶类型的近似高度测量。T检验结果在下面显示为p值,其中显著性阈值<0.05

[1004]

		平均高度（mm）	标准偏差	平均值标准误差（SEM）
琼脂 1.5g AA	*干的*	3.418	0.8267	0.3375
	水化的	3.002	0.8155	0.3329
	***p* 值**	0.4001		
琼脂 7.5g AA	*干的*	4.817	0.5564	0.2103
	水化的	3.825	0.4229	0.1726
	***p* 值**	0.003907		
海藻酸盐 1.5g AA	*干的*	2.851	0.1786	0.07986
	水化的	4.262	0.6963	0.3114
	***p* 值**	0.008919		
海藻酸盐 7.5g AA	*干的*	6.264	0.5252	0.1985
	水化的	5.949	0.8409	0.3760

[1005]

	***p* 值**	0.4867		
果胶 1.5g AA	*干的*	5.437	0.3733	0.1411
	水化的	2.630	0.6745	0.3372
	***p* 值**	0.001429		
果胶 7.5g AA	*干的*	5.985	0.3315	0.1253
	水化的	5.511	0.7656	0.3424
	***p* 值**	0.2489		
明胶 1.5g AA	*干的*	5.007	0.9632	0.3932
	水化的	5.792	0.6963	0.2843
	***p* 值**	0.1397		
明胶 7.5g AA	*干的*	6.919	1.213	0.4950
	水化的	7.178	1.369	0.5587
	***p* 值**	0.7356		

[1006] 表6:用于干和湿机械测试的几种AA气凝胶类型的近似体积测量。T检验结果在下面显示为p值,其中显著性阈值<0.05

[1007]

		平均体积（mm）	标准偏差	平均值标准误差（SEM）
琼脂 1.5g AA	*干的*	436.39	185.71	75.815
	水化的	152.50	109.45	44.683
	***p* 值**	0.011932		
琼脂 7.5g AA	*干的*	543.78	72.229	27.300
	水化的	109.46	44.646	18.227

[1008]

	***p* 值**	0.00000010185		
海藻酸盐 1.5g AA	*干的*	233.21	10.464	4.6795
	水化的	374.07	98.443	44.025
	***p* 值**	0.032454		
海藻酸盐 7.5g AA	*干的*	473.56	46.413	17.543
	水化的	539.91	101.83	45.538
	***p* 值**	0.22994		
果胶 1.5g AA	*干的*	441.79	76.359	28.861
	水化的	98.346	32.278	16.139
	***p* 值**	0.0000035528		
果胶 7.5g AA	*干的*	483.42	38.270	14.465
	水化的	410.40	59.001	26.386
	***p* 值**	0.048984		
明胶 1.5g AA	*干的*	397.22	85.648	34.966
	水化的	540.40	64.122	26.178
	***p* 值**	0.0091976		
明胶 7.5g AA	*干的*	546.50	97.021	39.609
	水化的	626.74	103.98	42.450
	***p* 值**	0.19719		

[1009] 图65显示了具有1.5g(10%)和7.5g(50%)脱细胞和浸碱AA的海藻酸盐基气凝胶的SEM。图66显示了具有1.5g(10%)和7.5g(50%)脱细胞和浸碱AA的果胶基气凝胶的SEM。

[1010] 用共聚焦显微镜对含有7.5g的AA的海藻酸盐气凝胶进行成像。图67显示了具有7.5g浸碱AA(50%)的海藻酸盐泡沫的共焦图像的最大强度z投影。红色是刚果红染色的支架。绿色为稳定转染的3T3细胞的GFP,蓝色为GFP 3T3细胞的细胞核。

[1011] 该实施例提供的数据表明,可以制备具有不同性质的气凝胶和泡沫的不同制剂阵列。用于各种应用的气凝胶和泡沫的领先者是海藻酸盐和明胶凝胶中50%的脱细胞和浸碱AA,其次是果胶凝胶。此外,除明胶凝胶外,大多数这些凝胶都是通过手动搅拌手动混合的。明胶样品用带有两个注射器的路厄锁定连接系统更彻底地混合。可以想到,将该技术应用

于其他制剂将导致更少的样品变化和更均匀的凝胶。

[1012] 实施例3-由脱细胞的植物组织和/或其他纤维素来源制备的溶解的纤维素水凝胶

[1013] 本实施例描述了从脱细胞的植物组织和其他合成纤维素来源产生溶解的纤维素基水凝胶的多种方法。在以下实施例中,目的是将浸碱的植物纤维素材料(如上文所述的结构细胞)与新开发的纤维素基水凝胶相结合,以产生复合气凝胶、泡沫和其他支架。这在许多不同的应用中可能是可取的,因为得到的气凝胶(例如结构细胞和载体/水凝胶两者)将完全由脱细胞的植物组织产生。

[1014] 纤维素溶解和再生:

[1015] 本实施例描述了使用二甲基乙酰胺和氯化锂从脱细胞的苹果支架中溶解纤维素,以及使用95%乙醇通过溶剂交换对它进行再生。

[1016] 材料和方法:

[1017] 溶剂制备:

[1018] • 将二甲基乙酰胺(DMAc)在115℃下干燥15分钟。

[1019] • 将LiCl在180℃下干燥48小时,然后保持在80℃。

[1020] 溶剂交换:

[1021] • 获得50g的脱细胞苹果。

[1022] • 用丙酮转移到50mL的猎鹰管中。

[1023] • 放入超声波浴中15分钟。

[1024] • 去除丙酮

[1025] • 重复3次

[1026] • 去除丙酮并加入DMAc

[1027] • 放入超声波浴中15分钟。

[1028] • 离心以交换丙酮和DMAc

[1029] • 去除丙酮

[1030] • 重复3次

[1031] LiCl添加:

[1032] • 比例:每50mL的DMAc加入6g的LiCl

[1033] • 用磁力搅拌棒将支架转移到杜兰瓶中的干燥DMAc中。

[1034] • 在100℃下保持1小时,然后在连续搅拌的情况下降至50℃时间为72小时。

[1035] 纤维素再生:

[1036] • 用95%乙醇交换

[1037] • 将溶解溶液离心以去除未溶解的物质。然后,将溶解的纤维素倒入60mm的皮氏培养皿中以覆盖底部表面。然后将95%的乙醇倒在上面,并且开始形成薄晶片。

[1038] • 在膜中可以看到小的褶皱和扰动。

[1039] • 膜可以用抹刀推动,然后堆成凝胶块。

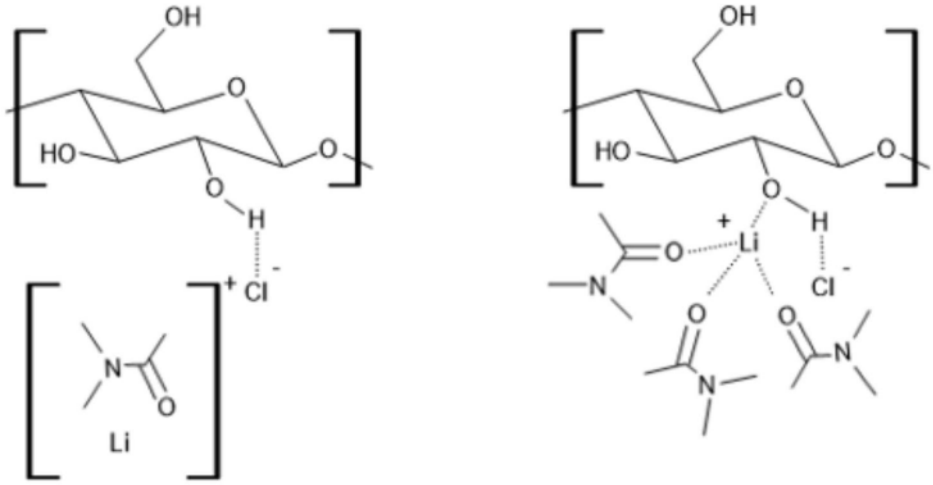
[1040] • 如果不受干扰,就会形成可以操纵的平圆盘形式。

[1041] • 这种材料很软,但像凝胶一样。

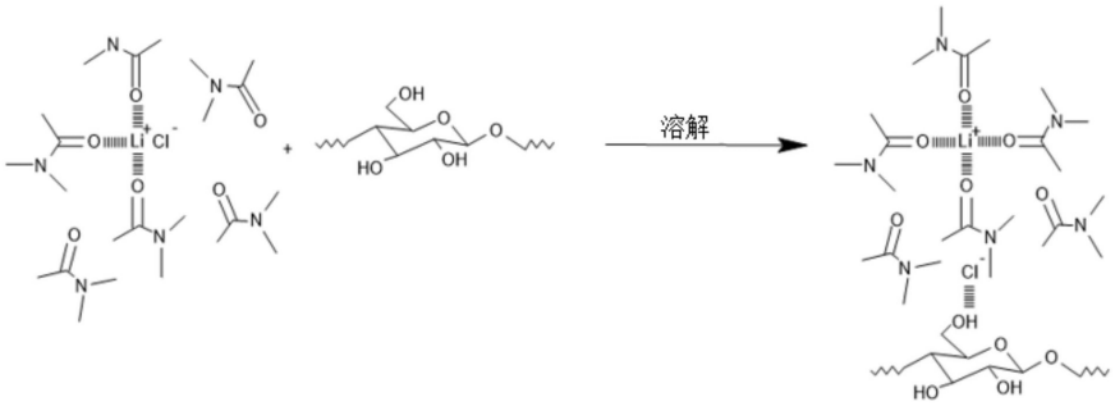
[1042] • 替代地,将溶解的纤维素放入猎鹰管中,在盖子上开一个孔。将透析膜放置在管开口上,然后将切开的盖子固定在顶部。将该管倒置在95%乙醇中,以便进行溶剂交换。

[1043] 结果

[1044] McCormic等人(a)和Morgenstern等人(b)提出的纤维素在DMAc/LiCl中溶解的设想机制如下所示：

[1045] 

[1046] 纤维素用DMAc和LiCl溶解的可能反应方案也可以如下进行(当纤维素溶解到DMAc/LiCl系统中时，显示Li^+阳离子、Cl^-阴离子和DMAc之间的相互作用)：

[1047] 

[1048] 图68显示了在72小时反应后DMAc和LiCl与脱细胞苹果的溶解溶液。图69显示了离心去除未溶解的物质后DMAc和LiCl与脱细胞苹果的溶解溶液。图70显示了纤维素膜再生。将溶解的纤维素倒入60mm的皮氏培养皿中以覆盖底部表面。将95％的乙醇倒在溶解溶液的顶部以促进溶液交换并使纤维素再生。膜形成时会观察到褶皱。图71显示了在加入乙醇的5分钟内，可以用抹刀推动膜并将其捆扎。图72显示了收集的再生纤维素凝胶。图73显示了不受干扰时的再生纤维素膜。图74显示了再生纤维素膜，倾斜以显示皮氏培养皿中的载玻片。图75显示了具有密度梯度的再生纤维素。用透析膜完成溶剂交换。再生发生在50mL猎鹰管中。圆柱形端部与膜接触并且具有最大量的溶液交换。与不太坚硬和密度较小的尾部区域相比，它更坚硬并保持其形状。图76显示了再生纤维素膜设置，透析膜由盖子固定，盖子的中心开有一个孔。图77显示了图76中质密区域的低压冻干切片。低压冻干导致支架塌陷。图78显示了用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔。这些材料在处理前是浅棕色的，用过氧化物处理后是透明的。事实上，由于它们的透明度，它们很难被看到。图79显示了通过暗场成像成像的用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔。图80显示了用刚果红染色以使微观结构可视的用H_2O_2(30％)漂白的再生膜的再生纤维素5mm穿孔。表面非常平坦，有小孔。这是一张带有TRITC的荧光图像。

[1049] 将浸碱材料(即,如上所述从脱细胞的苹果组织的浸碱处理获得的单结构细胞、结构细胞组或两者)与上述在本实施例中获得的再生纤维素混合。为了避免过早再生,将浸碱材料(1g)与丙酮混合并超声处理5分钟。然后将材料以5000rpm离心7分钟。将浸碱的纤维素(水换成丙酮)与DMAc LiCl溶解的纤维素混合物(5mL)混合。在双重注射器、路厄锁定连接器装置中混合该组合。图81显示了与浸碱AA混合的DMAc LiCl溶解的纤维素(颜色来自DMAc LiCl溶解的纤维素溶液;浸碱材料为白色)。

[1050] 图82显示了溶解的纤维素,其中混合了浸碱AA。通过用一层95%乙醇涂布过夜使膜再生。获得了复合膜。图83显示了其中混合了浸碱材料的再生纤维素的荧光显微镜图像。可以看到来自浸碱材料的苹果结构细胞紧密地堆积在一起。这种形貌不同于从纯再生纤维素获得的光滑材料。

[1051] 由再生纤维素和浸碱材料的混合物生产的低压冻干复合气凝胶:

[1052] 在生产再生纤维素和浸碱材料的混合物后,将水凝胶冷冻和低压冻干(如上所述),以生产可以保持干燥或再水化的气凝胶/泡沫。如下制备几种制剂:

[1053]

样品	溶解的纤维素(%v/v)	浸碱 AA (%v/v)	5%海藻酸盐	5%琼脂糖
P1	100	0	0	0

[1054]

P2	80	20	0	0
P3	50	50	0	0
P4	0	100	0	0
P5	50	0	50	
P6	50	0	0	50
P7	20	80	0	0

[1055] 图115显示了用上述列出的制剂生产的低压冻干气凝胶(样品P1、P2、P3、P4、P5、P6),直径为约1cm。图116显示了用上述列出的制剂生产的更大规模的低压冻干(直径3cm)气凝胶(P2(左)、P7(中)、P3(右)图像)。

[1056] 还制备了甲基纤维素基凝胶。在下一个实施例中,使用甲基纤维素和浸碱材料(即,从如上所述的脱细胞苹果组织的浸碱处理获得的单结构细胞、结构细胞组或两者)制备全纤维素材料。

[1057] 浸碱的脱细胞材料的制备

[1058] 脱细胞的苹果在1M NaOH中浸碱1小时。为了使颜色变浅,在1小时的浸碱过程中,将过氧化氢(30%储备溶液)添加到混合物(5%v/v的30%储备溶液)中。然后用HCl中和溶液并离心以收集材料。为了确保pH保持稳定,将颗粒重新悬浮于dH_2O中,并再次中和溶液。

重复该过程，直到pH保持在6.8至7.2进行后续循环。

[1059] 凝胶制剂

[1060] 胶凝过程包括将甲基纤维素溶解在10mL的2M NaOH中1小时，同时在冰上搅拌。还通过将甘氨酸溶解在2M NaOH中来制备甘氨酸溶液。1小时后，加入5mL的甘氨酸溶液，并将混合物在冰上搅拌另外一小时。浸碱的苹果是在两个不同阶段中的一个阶段引入的。一种引入方法包括在甘氨酸处理的第二个小时后，将浸碱的苹果与粘性溶液混合。这种特殊的混合方法包括使用与F/F路厄锁定系统连接的注射器。对于较高的甲基纤维素浓度(1g)，与注射器的混合极其困难。因此，开发了第二种制备方法。在这种方法中，在反应开始时，将浸碱的苹果与甲基纤维素一起直接添加到2M NaOH中。混合是通过磁力搅拌完成的。测试的制剂见表7。观察到，当加入甘氨酸时，混合物的粘度增加；然而，这似乎主要是由于温度升高引起的物理交联。将凝胶在室温下放置过夜以进行交联。

[1061] 表7：使用甲基纤维素和浸碱的苹果结构细胞的凝胶制剂

[1062]

甲基纤维素（g）	甘氨酸储备溶液%（w/v）	浸碱AA（g）	浸碱AA添加
0.5	20	1.5	甘氨酸之后
0.5	30	1.5	甘氨酸之后
1	20	1.5	甘氨酸之后
1	30	1.5	甘氨酸之后
1	30	1	甘氨酸之前
1	0	1	含甲基纤维素

[1063] 结果：

[1064] 图84显示了反应布置。反应在带有磁力搅拌棒的小烧杯中进行。这些烧杯用石蜡膜覆盖，并放入一个较大的烧杯中，烧杯中含有冰浴。图85显示了甲基纤维素和浸碱AA。与甘氨酸(在称重舟皿的上部)和浸碱AA(在皮氏培养皿的下部)混合的甲基纤维素。1g甲基纤维素比0.5g(左两幅图像)更粘稠(右两幅图像)。图86显示了在室温下孵育过夜交联后，具有浸碱AA(苹果)和甘氨酸(添加甘氨酸后引入的AA)的甲基纤维素凝胶。凝胶可以从皮氏培养皿中取出并保持其形状。1g的甲基纤维素凝胶更坚硬。图87显示了甲基纤维素和浸碱AA凝胶。在冰浴中通过磁力搅拌将1g甲基纤维素、1g Aa在10mL的2M NaOH中混合1小时，然后在冰上加入5mL的30％甘氨酸在2M NaOH中的溶液并搅拌另外1小时。在60mm皮氏培养皿中在室温下交联过夜。凝胶可以被处理并保持其形状。图88显示了用手术刀片将图87中的相同凝胶切成两半。一个被保留，另一个被用于测试中和。用5％乙酸中和1小时，然后用10水洗涤。还测试了在这样做之后是否会有NaOH的缓慢释放，这将导致pH增加。这确实发生了。结果，将半气凝胶洗涤70次，并且还用30％乙酸中和。

[1065] 图89显示了图88中过度洗涤的“半气凝胶”在-20℃下冷冻，然后在-46℃和

0.050mbar下低压冻干(上图)。干燥的材料看起来很脆弱,但实际上摸起来相当坚硬。还观察到了定向冷冻。然后将切片撕下并浸入dH_2O中(下面图像)。它保持完整并且具有柔软、粘性质地。图90显示了从图88中切割的气凝胶的后半部分被中和。立即用30%的乙酸进行中和。这产生了类似但相反的结果:随着时间的推移,pH会漂移到酸性值,且乙酸的缓慢释放使pH漂移到较低值。这是用1M NaOH缓慢滴定来校正的。然而,这表明5%至30%乙酸之间的最佳中和步骤可能是更快、更有效的方法。将中性样品保留以供将来的染色测试。

[1066] 研究发现,这种尺寸的气凝胶的中和是一个挑战,因为NaOH或中和溶液的释放缓慢。5%乙酸不足以完全中和NaOH(如上所示)。这令人惊讶。相比之下,加入30%的乙酸会产生相反的效果:用于中和的酸从气凝胶中缓慢释放,需要额外的碱处理。发现12-15%的乙酸是用于中和的合适浓度,而不会使pH改变太大到达一个极端。

[1067] 图91显示了甲基纤维素与用15%乙酸中和的浸碱AA(1:1)半气凝胶。还发现甲基纤维素凝胶(含有和不含有AA)膨胀很大。这也可以在冷冻和冷冻干燥时发生。图92显示了甲基纤维素与用15%乙酸中和的浸碱AA(1:1)半气凝胶。图92所示的气凝胶被中和为半气凝胶(图91)。在冷冻过程中,它们膨胀以填充60mm的皮氏培养皿。一旦冷冻干燥,它们就会产生一种白色泡沫,很容易处理,而且相对较硬。一旦水化,它们就膨胀,如果它们继续膨胀,就会变成具有粘性稠度的松散材料。

[1068] 图93显示了具有浸碱AA(1:1)膨胀的甲基纤维素。将半气凝胶放置在其原始的60mm皮氏培养皿上进行比较。图94显示了甲基纤维素与浸碱AA(1:1)持续膨胀成松散材料。

[1069] 为了控制溶胀,试图增加甘氨酸的浓度。发现30%的甘氨酸溶液已接近饱和点。在40%时,需要加热来溶解甘氨酸。由于凝胶具有温敏性,甘氨酸在加入甲基纤维素和浸碱AA混合物之前需要冷却;然而,在冷却溶液时,甘氨酸从溶液中冲出。图95显示了甘氨酸在降低的温度(约4℃)下从40%的溶液中结晶。与微晶纤维素相比,温度对甲基纤维素的剧烈影响以及疏水性的增加,导致对甘氨酸作用的测试。甘氨酸可以交联微晶纤维素;然而,我们测试了是否可以简单地通过温度效应获得类似的凝胶。这一点得到实现。

[1070] 图96显示了羧甲基纤维素凝胶在不存在甘氨酸的情况下产生类似的物理交联材料。

[1071] 实施例4-气凝胶和泡沫在骨组织工程中的用途

[1072] 本实施例描述了本文描述的气凝胶和泡沫(例如在实施例1和2中制备的那些)用于骨组织工程的用途。

[1073] 内容

[1074] 本实施例描述了将脱细胞的生物材料植入和切除成环钻颅骨缺损的标准操作程序。进行这项研究是为了评估本文描述的气凝胶和泡沫在大鼠临界尺寸双侧缺损模型中用于骨再生应用的潜力。生物材料(基于海藻酸盐和果胶的气凝胶)在大鼠体内植入4周和8周的时间。在大鼠颅盖中产生5mm的双侧圆形缺损。一旦切除骨缺损,将气凝胶(海藻酸盐或果胶气凝胶制剂,表2提供了骨组织工程实例中使用的5%海藻酸盐气凝胶和5%果胶气凝胶的制剂)生物材料(5mm直径×1mm厚度)放置在缺损内。缝合覆盖的皮肤,让大鼠恢复4至8周的时间。在每个时间点采集标本,并进行计算机断层扫描(CT扫描)、植入物脱位机械测试和组织学检查。

[1075] 关键化学品和溶液

[1076] 1.由脱细胞的McIntosh苹果制成的浸碱苹果糊状物,中和的2.5%海藻酸盐

[1077] 3.5%果胶

[1078] 4.氯化钙

[1079] 表2提供了用于该骨组织工程实例中的5%海藻酸盐气凝胶和5%果胶气凝胶的制剂。

[1080] 手术-植入

[1081] 1.对大鼠进行麻醉准备,并施用异氟烷直至观察到无意识

[1082] 2.然后将大鼠转移到准备区,通过注射器施用生理盐水,并在眼睛上施用泪液凝胶以减少角膜干燥。

[1083] 3.从眼睛之间的鼻梁到头骨尾端,头顶被剃光,然后毛皮用吸尘器吸掉。

[1084] 4.然后将大鼠转移到手术区域并固定在立体定向设备上。

[1085] 5.用水清洗皮肤,并用氯己定灭菌。

[1086] 6.生物材料在无菌盐水中放在尺子旁边拍照。

[1087] 7.将环锯固定在钻头上,并放置在手术区域旁边。

[1088] 8.一旦研究人员穿上无菌长袍和手套,就用手术刀从鼻骨到中矢状嵴的尾部,沿着头皮上的骨膜切开。

[1089] 9.使用5.5mm的alm牵开器,将皮肤暴露在下面的骨骼中。

[1090] 10.骨膜沿着矢状中线向下被切开。

[1091] 11.用无菌棉签清洁骨头,

[1092] 12.在无菌生理盐水的持续冲洗下,在1500rpm下,用5mm的环锯对左顶骨进行评分

[1093] 13.随着升降机叶片在缺损边缘周围周向移动,通过施加温和的压力来完成缺损

[1094] 14.升降机叶片用于向下滑动以取出骨头

[1095] 15.右侧骨头也同样被取出

[1096] 16.一名非无菌研究人员将生物材料带到手术区,并按照指示放置它们

[1097] 17.仔细地将每一种生物材料放置在每一块顶骨的缺损处。

[1098] 18.生物材料放在尺子旁边拍照。

[1099] 19.移除alm牵开器,并使用间断缝线闭合切口。

[1100] 20.将布比卡因施加到缝线,并将大鼠转移到回收站。

[1101] 图97显示了在植入环钻的缺损中之前的海藻酸盐(左)和果胶(右)气凝胶支架。图98显示了植入顶骨的环钻缺陷中的海藻酸盐(左)和果胶(右)气凝胶生物材料。

[1102] 切除手术:

[1103] 在允许大鼠恢复所需的时间(例如8周)后,收集样品并用计算机断层扫描(CT)进行扫描。然后还进行了组织学检查。

[1104] 1.将动物转移到CO_2安乐死箱中,并设置合适流速

[1105] 2.在至少5分钟后,并且已经确定大鼠停止呼吸至少一分钟,将其从盒子中取出。

[1106] 3.检查生命体征,进行开胸手术,然后放血

[1107] 4.将老鼠肚皮朝上放置,抬起颅骨上方的皮肤,用剪刀剪掉,露出植入物

[1108] 5.用手术刀切除颅骨两侧的肌肉

[1109] 6.然后,用钻头将颅盖的前部与头骨的其余部分切断

[1110] 7.然后用镊子将颅盖提起,从下面切掉组织。

[1111] 8.移除后,在颅盖左下角制作一个小切口,以指示样品的方向性,并拍摄环钻区域内植入物的照片

[1112] 9.然后将颅盖放入装有福尔马林溶液的试管中72小时,然后加入70%乙醇,然后在4C下储存。

[1113] 10.一旦在乙醇中,样品就被输送用于CT扫描。每个样品旋转180°,每0.7°成像一次

[1114] 图99显示了切除前大鼠颅盖中的海藻酸盐气凝胶植入物。图100显示了切除的大鼠颅盖。图101显示了8周后切除并用计算机断层扫描(CT)扫描的具有环钻缺陷的大鼠颅盖。海藻酸盐生物材料(左)和果胶生物材料(右)。结果表明气凝胶生物材料支持体内细胞浸润和再生。

[1115] 实施例5-浸碱的过氧化物比例

[1116] 本实施例描述了本文所述的浸碱工艺的过氧化物比例的研究,例如用于制备本文所述的气凝胶和泡沫的结构细胞的那些研究,例如实施例1和2中的那些研究。

[1117] 为了测试不同比例的过氧化物,使用了脱细胞的苹果与NaOH的恒定比例。这是500mL 1M NaOH使用100g的脱细胞苹果。以该恒定比例添加的30%过氧化氢储备溶液的量为20mL、10mL和5mL。这些量分别对应于1.15%、0.58%和0.30%的最终浓度(相对于1M NaOH中的浓度)。显然,如图102-105所示,当苹果被添加到溶液中时,苹果的体积会稍微改变这些浓度。

[1118] 图102显示了在1小时时间内用20mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白。图103显示了在1小时时间内用10mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白。图104显示了在1小时时间内用5mL的过氧化氢进行浸碱过程中的漂白。

[1119] 应该注意,过氧化物处理也可以在浸碱之后进行;然而,观察到浸碱的高温和碱性条件加快了发光过程。

[1120] 图105显示了(A)在用不同量的过氧化物进行1小时浸碱后,对于较高的过氧化物浓度,颜色稍微更清晰;(B)中和后,轻微的颜色变化消失,所有三者都有清晰/灰白色;和(C)对于三种过氧化氢比例,最终浓缩产物是可比较的。

[1121] 结果表明,可以使用不同的过氧化物比例来获得类似的最终产品。将过氧化物的浓度从1.15%降低到0.3%不会影响中和后最终产物的漂白。

[1122] 实施例6-气凝胶和泡沫中结构细胞的质量比例

[1123] 本实施例描述了本文描述的气凝胶和泡沫的结构细胞的质量比例的研究,例如实施例1和2中的那些研究。如本文所述,在某些实施方案中,当气凝胶或泡沫为水化形式时,气凝胶或泡沫可以包括约10-50%m/m(或更多)的单结构细胞、结构细胞组或两者。

[1124] 可以理解,气凝胶和泡沫在干燥时的质量将与再水化(或湿的)气凝胶和泡沫的质量显著不同。在一些实验测量的实例中,制备的气凝胶的干质量为相同气凝胶的湿质量的约5.18%。

[1125] 如将进一步理解的,本文描述的气凝胶和泡沫的结构细胞可以具有宽尺寸范围,并且可以是基本均匀的,也可以是不同尺寸的混合物。在某些实施方案中,结构细胞的尺寸可以在约20μm至约1000μm的范围内。如果需要,可以想到,例如,通过减少浸碱时间或改变

具有不同尺寸范围的植物细胞的原料，可以获得更大的颗粒。通常，对于苹果脱细胞组织，结构细胞提供约200μm的平均粒径，然而可以理解，也可以考虑其他尺寸。

[1126] 图106显示了三种不同AA:NaOH比例条件(即浸碱条件)的荧光显微镜图像。(A)-1:5、(B)-1:2和(C)-1:1。使用BV滤光器和刚果红染色，用Olympus SZX16显微镜以2.5倍放大率捕获图像。

[1127] 粒度分析：

[1128] 使用Fiji ImageJ对图像进行阈值处理和分割。将图像转换为二进制图像后，将分水线应用于图像。费雷特直径是使用Analyze Particles插件计算的。每种情况下的粒度直方图都非常相似(图107)。图107显示了不同比例的脱细胞AA与1M NaOH的浸碱的粒度分布直方图。

[1129] 为了进一步研究粒度，在0.05的显著性水平下进行了方差分析和Tukey事后分析。数据汇总见表8和表9。

[1130] 表8:粒度分布的描述性统计

[1131]

比例(AA:NaOH)	N	平均	标准偏差	平均 SE
1：5	2237	199.81148	106.08425	2.24294
1：2	2158	228.0239	106.3168	2.28863
1：1	1878	219.72194	109.23839	2.52074

[1132] 表9:粒度分布的方差分析

[1133]

比例	平均差异	SEM	q值	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
1：2和1：5	28.21242	3.23208	12.34451	3.33E-16	0.05	1	20.63741	35.78744
1：1和1：5	19.91046	3.35247	8.39907	8.60E-09	0.05	1	12.05327	27.76764
1：1和1：2	-8.30197	3.38036	3.47323	0.03739	0.05	1	-16.2245	-0.37942

[1134]

[1135] 这些结果还表明，脱细胞苹果与NaOH的不同比例可以导致类似的最终产物。例如，

生产过程中的这种灵活性允许在放大过程中进行实际调整。

[1136] 实施例7-气凝胶和泡沫的机械测试方案

[1137] 本实施例描述了用于本文描述的气凝胶和泡沫的机械测试的方案，例如实施例1和2中的那些。在某些实施方案中，如本文描述的气凝胶或泡沫可以具有在约0.1至约500kPa的范围内的体积模量，例如约1至约200kPa，如通过本实施例中所述的方案测定的。

[1138] 样品制备

[1139] 1.样品由气凝胶泡沫制成，如图108所示。

[1140] 2.使用期望尺寸的活检打孔凿切割样品圆盘(例如10mm活检打孔凿)

[1141] 3.样品要么保持干燥(图109左图)，要么用氯化钙交联(图109右图)

[1142] 4.然后将样品加载到机械测试仪上，并压缩至期望的尺寸或样品尺寸的百分比。

[1143] 机械测试程序

[1144] 1.准备用于机械测试的样品，并测量所有尺寸

[1145] 2.样品安装在压台上

[1146] 3.在进行接触之前，将执行器移动到位于样品正上方的指定尺寸

[1147] 4.每次测试开始时，将测力传感器调零，以确保测量准确

[1148] 5.样品放置得尽可能平，以便与压台完全接触

[1149] 6.测试在所需的压缩次数后开始并完成。根据感兴趣的机械性质，可以按照用户指定的速率(通常<0.1mm/sec到>10mm/sec)将样品从其初始厚度的5-100％压缩。在压缩过程中，使用具有适当最大值(通常在0.1-100N之间)的测力传感器测量力数据。

[1150] 7.完成后，将样品丢弃

[1151] 8.收集数据，并在曲线的初始弹性区域中评估体积模量。

[1152] 体积模量提取

[1153] 为了计算体积模量，提供原始数据作为施力伸长关系曲线，该曲线基于样品的测量尺寸转换为应力-应变图。对压缩曲线的线性部分进行评估，并以kPa为单位确定斜率。

[1154] 实施例8-气凝胶和泡沫中的水凝胶交联

[1155] 本实施例描述了本文描述的气凝胶和泡沫中水凝胶的交联方法，例如实施例1和2中以及本文其他地方的方法。在某些实施方案中，气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)可以通过以下方式交联：

[1156] 物理交联(例如使用甘氨酸)；或

[1157] 化学交联(例如在加热存在下使用柠檬酸)；或

[1158] 其中所述气凝胶或泡沫的至少一些纤维素和/或纤维素衍生物(多种)用接头(例如琥珀酸)官能化，一个或多个官能部分任选地连接到所述接头上(例如含胺的基团，其中交联可以进一步任选地用一种或多种蛋白质交联剂如福尔马林、甲醛、戊二醛和/或转谷氨酰胺酶实现)；

[1159] 或其任何组合。

[1160] 纤维素基材料可以以多种方式交联。从广义上讲，交联可以通过物理交联或化学交联，或两者。

[1161] 物理交联：

[1162] 物理交联的一个实例是甘氨酸的使用，这通过说明性实例可以如下实施：

[1163] 凝胶制剂

[1164] 胶凝过程可包括将甲基纤维素溶解在10mL的2M NaOH中1小时，同时在冰上搅拌。还通过将甘氨酸溶解在2M NaOH中来制备甘氨酸溶液。1小时后，加入5mL的甘氨酸溶液，并将混合物在冰上搅拌另外一小时。浸碱的苹果结构细胞是在两个不同阶段中的一个阶段引入的。一种引入方法包括在甘氨酸处理的第二个小时后，将浸碱的苹果与粘性溶液混合。这种特殊的混合方法包括使用与F/F路厄锁定系统连接的注射器。应该注意，对于较高的甲基纤维素浓度(1g)，与注射器的混合极其困难。因此，开发了第二种制备方法。在这种方法中，在反应开始时，将浸碱的苹果与甲基纤维素一起直接添加到2M NaOH中。混合是通过磁力搅拌完成的。测试的制剂见表7。观察到，当加入甘氨酸时，混合物的粘度增加。将凝胶在室温下放置过夜以进行交联。

[1165] 参考表7和图84-90，在上述实施例3中已经详细描述了与甘氨酸的这种物理交联。

[1166] 化学交联

[1167] 化学交联的一个实例是使用柠檬酸和加热，其中羧酸基团可以与羧甲基纤维素反应以形成化学交联的基质，这通过说明性实例可以如下实施：

[1168] 与柠檬酸交联的羧甲基纤维素凝胶与浸碱的苹果材料组合(如结构细胞)的制备：

[1169] CMC制备

[1170] • 2％CMC的水溶液(w/w)

[1171] • 20％柠檬酸(按聚合物重量计)

[1172] • 对于与浸碱材料的组合，添加与CMC相等的质量

[1173] • 在室温下搅拌至透明

[1174] • 在80℃下加热5、8和16小时

[1175] 结果

[1176] • 5小时后，开始形成小凝胶；然而，其中大部分仍然是液体。

[1177] • 8小时后，形成了适量的凝胶。CMC对照是透明的，而具有浸碱材料的CMC是半透明的，具有白色色调。这些凝胶具有细胞培养实验中常用的低浓度胶原凝胶的稠度。

[1178] 图110显示了描述的CMC与柠檬酸交联的结果。CMC对照为透明凝胶，而具有浸碱材料(结构细胞)的CMC为半透明白色凝胶。

[1179] 16小时后，获得坚硬的“玻璃或环氧树脂”状材料。将其再水化并形成膜材料。

[1180] 图111显示了用柠檬酸膜交联的CMC的结果。CMC对照(左)是透明膜，而具有浸碱材料(结构细胞)的CMC是半透明的白色膜(其更硬)，它具有虾壳质地。

[1181] 在化学交联上扩展，本文还设想纤维素结构可以用接头分子官能化，接头分子然后可以用于将特定部分添加到纤维素链中以用于交联目的(以及其他目的)。例如，可以想到使用琥珀酸将羧酸基团添加到纤维素结构。琥珀酰化的材料可以用于添加胺基团。可以想到胺基团然后可以用可用的蛋白质交联剂如福尔马林、甲醛、戊二醛和/或转谷氨酰胺酶交联。

[1182] 琥珀酰化方案的说明性实例：

[1183] a)溶剂和样品制备

[1184] • 溶剂

[1185] 二甲基乙酰胺(DMA)在通风柜中干燥以去除水分

[1186] 温度:115℃

[1187] 时间45分钟

[1188] •LiCl

[1189] LiCl一直保持在烘箱中以防止水化。

[1190] 温度:210℃

[1191] •样品

[1192] 脱细胞苹果-溶剂交换

[1193] 步骤1.将苹果片状物在超声波浴中在乙醇或丙酮中保存20分钟。进行三次与乙醇的溶剂交换循环。

[1194] 步骤2:将苹果片状物在超声波浴中在DMA中浸泡20分钟。进行三次与DMA的溶剂交换循环。

[1195] b)使用DMA和LiCl对纤维素进行琥珀酰化

[1196] •支架:更换溶剂(后)的苹果纤维素质量=360mg

[1197] •化学品和试剂:

[1198] DMA=30mL

[1199] LiCl=271mg

[1200] As(琥珀酸酐)=3.1g

[1201] •条件

[1202] 温度:80℃

[1203] 持续时间:6小时(在旋转搅拌下)

[1204] 在溶剂制备(DMA和LiCl)之后,将纤维素片状物浸入DMA中。然后加入LiCl。将混合物搅拌30小时。30分钟后,加入琥珀酸酐(AS)。将混合物放置在80℃的烘箱中6小时。在该过程之后,去除溶剂,并用水强烈洗涤纤维素,直到支架清洁且没有可见残留物。图112中的图像显示了反应后和过度洗涤后的纤维素。

[1205] c)结果

[1206] 反应完成后的纤维素如图112所示。在用水强烈洗涤完成后的纤维素如图113所示。

[1207] FTIR分析:

[1208] 为了证实化学交联完成,使用傅立叶变换红外光谱。光谱位移表明琥珀酸酐成功地与支架化学结合。这种接头分子可以用来连接其他分子,例如胶原。FTIR光谱如图114所示,显示了脱细胞的支架(2AP-DECEL)和琥珀酰化的植物衍生纤维素的化学结合复合物(5AP-AS)的FTIR光谱。

[1209] 化学改性和官能化过程实例

[1210] 第一步-纤维素酰化

[1211] 方法:通过使用琥珀酸酐的均相琥珀酰化

[1212] 方法1:

[1213] 使悬浮在DMAc/LiCl中的纤维素在CO_2(2-5巴)的存在下搅拌,以获得透明的溶液。然后,将琥珀酸酐加入纤维素的透明溶液中,并在室温下搅拌。将所得反应混合物倒入剧烈搅拌的水(200mL)中。然后,用稀释的(0.05M)盐酸溶液将水稍微酸化以获得白色沉淀。收集

粗产物并将其溶解在DMAc/LiCl中，并在水(200mL)中再沉淀。将白色产物用水(200×3mL)进一步洗涤以去除DMAc/LiCl。将纯白色产物在70℃下真空干燥，以进行进一步的酯化过程。

[1214] 方法2：

[1215] 在静态系统中，使用琥珀酸酐、吡啶在二氯甲烷中进行纤维素琥珀酰化。反应在回流下进行。在反应一段时间后，通过加入MeOH使反应猝灭。然后，将材料洗涤几次以去除吡啶。

[1216] 第二步-酯化过程

[1217] 纤维素的化学改性，如酯化、醚化和接枝(从纤维素接枝或接枝到纤维素上)是最常见的技术。这样的衍生化可以通过非均相或均相方法来实现。由于纤维素的溶解性挑战，纤维素纤维表面上的非均相改性更为常见。另一方面，纤维素的均相改性是可取的，因为后者可以通过调节反应条件来控制DS。表10显示了酯化过程的实例。

[1218] 表10:酯化过程的实例

[1219]

反应类型	**酯化剂**	**催化剂**
无机酯化	硫酸、磷酸	N/A
Fischer 酯化	乙酸、丁酸、柠檬酸、苹果酸、丙二酸	盐酸
机械化学酯化	琥珀酸酐、十二烷基琥珀酸酐、己酰氯五氟苯甲酰氯	N/A 吡啶
酯交换	乙酸乙烯酯、肉桂酸乙烯酯、菜籽油脂肪	碳酸钾

[1220]

	酸甲酯	
无溶剂酯化	棕榈酰氯 异十八烯基琥珀酸酐、n-十四碳烯基琥珀酸酐 乙酸酐 芳香族羧酸	N/A N/A 柠檬酸 硫酸

[1221] 方法

[1222] 酯化可能涉及高温和交联剂。1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、柠檬酸和富马酸通常用于酯化反应以形成水凝胶。

[1223] EDC促进羧基与羟基或胺基之间的交联,形成无毒的水溶性尿素衍生物。EDC由于转化效率高、反应条件温和、无毒、副产物易于分离以及与材料的相容性而优选用于交联反应。此外,在纤维素和柠檬酸的酯化过程中,会形成酸酐中间体。

[1224] 因此,在应用转谷氨酰胺酶之前,可以使用琥珀酰化(酰化)对纤维素进行化学改性,然后制备活化的NHS酯及其与蛋白质中存在的亲核氨基酸残基的反应。

[1225] 转谷氨酰胺酶方案:

[1226] 以下程序概述了MooGloo(即转谷氨酰胺酶)在食品应用中的一般用途的说明性实例,例如用于AA气凝胶和其他生物材料的结合和胶合。

[1227] 关键化学品和溶液

[1228] 1.MooGloo RM转谷氨酰胺酶配方奶粉(Modernist Pantry)

[1229] 2.MooGloo TI转谷氨酰胺酶配方奶粉(Modernist Pantry)

[1230] 3.MooGloo GS转谷氨酰胺酶配方奶粉(Modernist Pantry)

[1231] 4.蒸馏水

[1232] 程序-RM配方奶粉

[1233] 1.打开装有转谷氨酰胺酶粉末的真空密封包装。

[1234] 2.将转谷氨酰胺酶粉末与蒸馏水按1:4的比例(重量/体积,w/v)配制成溶液(即5g干粉与20mL蒸馏水混合);充分混合。

[1235] 3.将浆液倒入待胶合的生物材料的指定区域,并均匀展开。

[1236] a.如果生物材料是凝胶/液体溶液,还可以将转谷氨酰胺酶粉末以0.5-1.0%w/v的浓度直接混合到溶液中,以使生物材料增稠或结合成均匀的形状。

[1237] 4.在混合或胶合生物材料后,用石蜡膜紧紧包裹或储存在气密容器中。

[1238] 5.将材料转移到冰箱中,在约4℃下储存6-24小时以结合。

[1239] 6.将剩余的转谷氨酰胺酶粉末在冷冻机中储存6个月。

[1240] 程序-TI配方奶粉

[1241] 1.打开装有转谷氨酰胺酶粉末的真空密封包装。

[1242] 2.将转谷氨酰胺酶粉末与蒸馏水按1:4的比例(重量/体积,w/v)配制成溶液(即5g干粉与20mL蒸馏水混合);充分混合。

[1243] 3.将浆液倒入待胶合的生物材料的指定区域,并均匀展开。

[1244] a.如果生物材料是凝胶/液体溶液,还可以将转谷氨酰胺酶粉末以0.5-1.0%w/v的浓度直接混合到溶液中,以使生物材料增稠或结合成均匀的形状。

[1245] 4.在混合或胶合生物材料后,用石蜡膜紧紧包裹或储存在气密容器中。

[1246] 5.将材料转移到冰箱中,在约4℃下储存6-24小时以结合。

[1247] 6.将剩余的转谷氨酰胺酶粉末在冷冻机中储存6个月。

[1248] 程序-GS配方奶粉

[1249] 1.打开装有转谷氨酰胺酶粉末的真空密封包装。

[1250] 2.将转谷氨酰胺酶粉末与蒸馏水按1:4的比例(重量/体积,w/v)配制成溶液(即5g干粉与20mL蒸馏水混合);充分混合。

[1251] 3.将浆液倒入待胶合的生物材料的指定区域,并均匀展开。

[1252] a.注意:GS制剂不能作为干粉使用;如果生物材料是凝胶/液体溶液,则将浆液以0.75-1%v/v的浓度直接混合到溶液中。

[1253] 4.在混合或胶合生物材料后,用石蜡膜紧紧包裹或储存在气密容器中。

[1254] 5.将材料转移到冰箱中,在约4℃下储存6-24小时以结合。

[1255] 6.将剩余的转谷氨酰胺酶粉末在冷冻机中储存6个月。

[1256] 实施例9-基于细胞和基于植物的肉制品和模拟肉的食品

[1257] 在某些实施方案中,本文描述的气凝胶和/或泡沫材料可用于制备基于细胞和/或基于植物的肉制品、肉模拟品、细胞人造肉、基于细胞的肉、其他食品应用、细胞农业应用等。本文描述的浸碱材料(如结构细胞)可以与多种不同的水凝胶(如上所述)组合,例如海藻酸盐、果胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、溶解和再生的纤维素等。然后可以将混合物放入通常任何合适尺寸的容器中,冷冻,然后低压冻干以去除所有的水。一旦完全脱水,材料可以用(例如)氯化钙或另一种交联剂交联。该步骤可以在冷冻干燥之前或之后进行,并且可以产生期望的材料形式。这个实施例显示了气凝胶在生产植物性肉制品中的用途。

[1258] 在某些实施方案中,气凝胶可用于通过定制它的制备方法来生产植物性肉制品,例如它的制备容器。例如,为了生产金枪鱼生鱼片片状物,将浸碱材料模制成100mm的盘状物,然后在-20℃下冷冻24小时。然后将冷冻的材料低压冻干48小时,然后用氯化钙交联。在一个实施方案中,一旦交联,然后可以将材料着色、染色或切割成任何期望的形状,例如生鱼片片状物。通过向装有水的容器中加入几滴(2-6滴,或期望量的期望颜料),使水完全覆盖材料(例如,用于形成100mm盘状物的材料,为10-20mL有色水或食用染料)而用食用着色剂对材料进行染色。染色后,用手术刀、刀或其他锋利的刀片将材料切成矩形。可以在切片上切下垂直切片以模拟金枪鱼或三文鱼中存在的白线。食品级胶合剂,如琼脂、琼脂-琼脂、明胶或类似试剂可用于填充由刀片切割的线。在一个实施方案中,1-5%琼脂可用于将材料片状物胶合在一起,或者填充通过切割材料穿过大约一半到四分之三的距离形成的线。琼脂也可以与食品级二氧化钛(Pan Tai,PTR-630)(0.1-1g/100mL琼脂)混合,使线颜色呈白色。

[1259] 图117显示了一种“金枪鱼”寿司模拟品(红色),它是通过将气凝胶(交联的50%海藻酸盐)支架片状物分层并用更多的海藻酸盐胶合而成。然后将构建体切成3×2cm的片状物(近似),并用红色食品染料着色,以模拟真正的金枪鱼。沿着其长度切割小的对角切片以模拟肌肉层之间的界面。

[1260] 图118显示了一种“金枪鱼”寿司模拟品(红色),它是通过将之前染色的气凝胶(交联的50%海藻酸盐)片状物分层并用二氧化钛(TiO_2)染色的琼脂“胶水”胶合而成,二氧化钛是一种常见的白色食品着色剂。这种构建体允许更令人信服地模拟真实金枪鱼中存在于不同肌肉组织层之间的筋膜。

[1261] 图119显示了一种“金枪鱼”(红色),它是通过将之前染色的气凝胶(交联的50%海藻酸盐)片状物分层并用二氧化钛(TiO_2)染色的琼脂“胶水”胶合而成,二氧化钛是一种常见的白色食品着色剂。琼脂胶可以放置在各层之间,或者放入沿着气凝胶表面切割的薄凹槽中,以产生存在于肌肉层之间的筋膜的线性图案。

[1262] 烹饪方法:

[1263] 一旦切割、染色和制备成期望的外观和质地,就可以烹饪得到的生物材料。材料可以是煎炸、烘焙或用另一种方法(例如在真空下、真空低温烹饪)制备,也可以未经烹饪。在一个实施方案中,可以在加热到200℃的铸铁煎锅上,用少量(1/4茶匙)黄油将材料每面煎炸约1-10分钟(见图9-12)。将材料炸至金黄色(对于直径为10mm-100mm的材料,炸大约3分钟),然后从锅中取出,放入盘中。

[1264] 烹饪后的机械测试:

[1265] 一旦煮熟,可以对材料进行机械测试,以确定其体积压缩模量。在一个实施方案中,将材料切割成1cm×1cm尺寸的片状物。将其放置在机械测试仪(如CellScale的Univert)上的压板顶部并压缩。速率(每秒的压缩力或尺寸)、最大载荷(取决于测力传感器)、压缩位移(从其尺寸的5%到95%)以及其他特征都可以定制。在一个实施方案中,通过在轴向和径向方向上的压缩对直径为约10mm且厚度为约5mm的圆形样品进行机械测试。将生物材料切割成规定的尺寸,并放置在机械测试仪上。记录尺寸测量结果,然后将材料压缩三次至其尺寸的50%。

[1266] 从10cm煮熟和未煮熟的生物材料测量的体积模量如下:

[1267]

	干的(kPa)	湿的(kPa)	煮熟的(kPa)
轴向	168.12 ± 39.34	4.10 ± 2.06	5.61 ± 3.06
径向的	n/a	9.58 ± 4.41	9.58 ± 4.96

[1268] 目前的数据表明,浸碱的气凝胶可用于生产植物性支架,用于开发食品的无肉替代品。所得材料可以定制,其中它的尺寸、形状、外观、质地和/或机械性质都可以调整以生产期望的材料,诸如例如鱼(例如三文鱼或金枪鱼)片状物或牛排或鸡肉片状物。此外,数据支持烹饪可能导致体积模量的增加或材料变硬。这可能是一种理想的特性,因为基于细胞的肉也可能因烹饪而变硬。这些结果对开发各种植物性食品很有前景。最后,由于气凝胶可

能与细胞培养相容(见图41),它可以很容易地用作例如细胞农业应用中的基于细胞的肉、细胞人造肉、培养肉的支架。

[1269] 实施例10-真皮填充剂产品

[1270] 在另一个实施方案中,浸碱材料、结构细胞、气凝胶、泡沫、溶解的纤维素和/或本文描述的其他此类材料可用于真皮填充剂应用。例如,浸碱材料可以单独用作真皮填充剂水凝胶,或者它可以与其他载体凝胶和/或流体(例如盐水、胶原、透明质酸、甲基纤维素和/或溶解的植物衍生的脱细胞纤维素)组合。此类制剂可与例如利多卡因或与真皮填充剂应用相关的另一种此类制剂组合使用。本实施例提供了浸碱的脱细胞苹果结构细胞作为用于真皮填充剂的颗粒用途的数据。

[1271] merAA(浸碱苹果)的针阻塞测试:

[1272] 浸碱材料的尺寸分析表明,该方法(如上文已经详细描述的)可以将支架分离成单结构细胞。这些苹果细胞壁的尺寸与真皮填充剂中使用的HA粒度相当。因此,浸碱材料被选为真皮填充剂应用的候选。这可以单独或者与下文讨论的其他凝胶/制剂组合作为材料使用。第一个测试是通过27G针进行的阻塞测试。研究发现,除了被过滤掉的大块之外,针没有阻塞。这是一个显著性结果,因为HA填充剂通常使用27-30G针,而BellaFill使用26G针。

[1273] 图120显示了采用浸碱AA的针阻塞测试。在(A)中,显示了27G针和注射器。(B)显示了浸碱AA的挤出。(C)显示了例如用于3D打印或受控注射/挤出的实例。

[1274] 混合物在5ml注射器中制成,并转移到体积为0.3ml的1cc注射器中。通过在5ml注射器上使用互锁连接器,我们可以通过混合30倍将浸碱AA与盐水溶液充分混合。

[1275] 制剂如下:

[1276]

比例 ID	组分
水	水
Mer20Sal80	在 0.9%盐水中稀释的 20%（v/v）浸碱的脱细胞 AA
Mer100	未稀释的浸碱、脱细胞 AA

[1277] 图121、122和123显示了施力伸长关系曲线。图121显示了从1cc注射器(N=10次)挤出水的力-位移曲线。图122显示了从1cc注射器中(N=10次)挤出的20%浸碱AA在盐水混合物中的力-位移曲线。图123显示了从1cc注射器(N=10次)挤出未稀释浸碱AA的力-位移曲线。

[1278] 最大力:

[1279] 使用最大挤出力来比较三种制剂。描述性统计数据如下所示,并在图124中进行了视觉比较,图124显示了只有水、在0.9%盐水中稀释的20%浸碱AA溶液和未稀释的浸碱材料的最大挤出力。

[1280] 1cc注射器最大挤出力的描述性统计数据:

[1281]

溶液	N	平均	标准偏差	标准误差
水	10	0.41	0.09	0.03
100% Mer AA	10	1.81	0.47	0.15
20% Mer AA + 80%盐水	10	0.54	0.11	0.04

[1282] 该数据表明,未稀释的浸碱材料具有比稀释的浸碱材料和水对照明显更大的挤出力。此外,结果表明,稀释的浸碱材料和水对照之间没有显著差异。这提供了对测量灵敏度的深入了解。稀释材料的粘度与蒸馏水的粘度不同;然而,这种微小的差异在目前的方法中是无法辨别的。

[1283] 真皮填充剂应用-大鼠模型注射和尺寸测量:

[1284] 由于阻塞测试成功,在一项测试大鼠研究中,该材料被认为是真皮填充剂。注射体积为600μL,每只动物注射4次。所有制剂均含有0.3%利多卡因。这种情况下使用了利多卡因,但也可以使用一些其他麻醉剂。典型的麻醉剂可包括例如,2%利多卡因凝胶和由20%苯佐卡因、6%利多卡因和4%丁卡因组成的三重麻醉剂凝胶(BLTgel)。在注射前,用30G针给牙块施用3%波洛卡因以麻醉上唇、下唇和口周区域。也可以使用2%利多卡因与肾上腺素的混合物。

[1285] 第一种制剂是单独的浸碱AA。第二种填充剂是用0.9%盐水稀释的浸碱材料,得到最终浓度为20%体积的浸碱材料。类似地,第三种制剂包括20%的浸碱材料和3.5%的胶原混合物。最后,第四种填充剂是20%的浸碱材料和再生纤维素混合物。再生纤维素衍生自脱细胞的苹果组织,并根据上述方法用DMAc和LiCl溶解。制剂分别编码为MER、MER20SAL80、MER20COL80、和MER20REG80。

[1286] 真皮填充剂制剂组分如下:

[1287]

代码	浸碱材料（v/v%）	0.9%盐水（% v/v）	胶原（% m/v）	再生纤维素（% v/v）	利多卡因（m/v %）
MER	85	0.0	0.0	0.0	0.3
MER20SAL80	20	65	0.0	0.0	0.3
MER20COL80	20	11	3.5	0.0	0.3
MER20REG80	20	11	0.0	54	0.3

[1288] *注意，利多卡因的体积为制剂的15％。使用2％液体利多卡因储备溶液。

[1289] 图125显示了第II代真皮填充剂。(A)显示了MER，(B)显示了MER20SAL80，(C)显示了MER20COL80，且(D)显示了MER20REG80。注射剂含有0.3％利多卡因，在1cc注射器中制备为600μL注射剂。

[1290] 图126显示了在大鼠模型中用作真皮填充剂的第II代真皮填充剂的结果。(A)显示了注射前，并且(B)显示了注射后。黑色轮廓用于每周跟踪植入部位。测量了皮肤下肿块。使用游标卡尺测量肿块尺寸。椭球估计用于估计注射剂的面积和体积。

[1291] 图127显示了大鼠模型注射剂的真皮填充剂尺寸测量结果。(A)显示归一化高度，(B)显示归一化椭球面积，(C)显示归一化椭球体积。

[1292] 实施例11-与柠檬酸交联

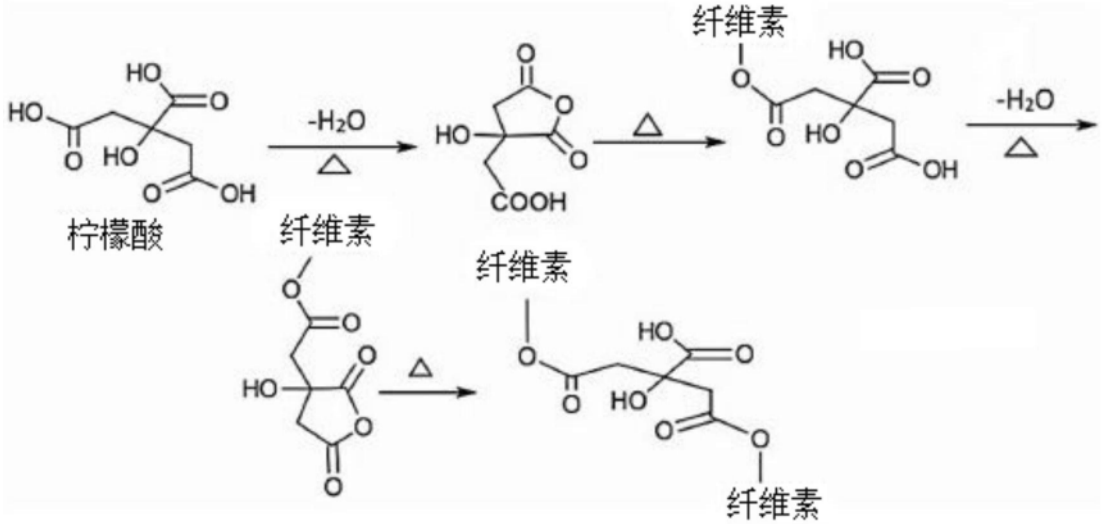
[1293] 纤维素是一种具有大量羟基的聚合物，可用于制备具有极大吸引力的结构和性质的水凝胶。根据交联方法，水凝胶可分为化学凝胶和物理凝胶。物理凝胶是通过离子或氢键的分子自组装形成的，而化学凝胶是通过共价键形成的。

[1294] 纤维素和纤维素衍生物定义了它们在不同应用中的广泛用途，纤维素酯和纤维素醚是两大类纤维素衍生物，具有不同的物理化学和机械性质。纤维素酯是一种水不溶性聚合物，具有良好的成膜特性，它具有多种应用。

[1295] 多官能羧酸通过与纤维素羟基的酯化及其与另一纤维素羟基的酯化而附接，产生交联的纤维素链。通过第一环状酸酐的酯化反应将羧酸部分附接到纤维素的羟基上将暴露出羧酸中的新羧酸单元，该单元具有适当的化学连接性以与相邻的羧酸单元形成新的分子内酸酐部分。

[1296] 柠檬酸(CA)被认为是一种无毒且相对便宜的交联剂，已被用于修饰诸如纤维素的多糖。

[1297] 关于在酸催化剂存在下使用柠檬酸进行纤维素的常规交联，纤维素与柠檬酸的交联过程的建议机理如下所示：

[1298] 

[1299] 纤维素与柠檬酸交联制备气凝胶

[1300] 在本实施例中，评估了由与柠檬酸交联的纤维素生产的气凝胶的各种特性，如孔径和对准以及气凝胶稳定性。气凝胶是由再生纤维素或与柠檬酸交联的浸碱纤维素制备的，以比较在气凝胶制备中两种形式的纤维素对下游应用的影响。目的是生产一种气凝胶，该气凝胶可作为骨修复和/或脊髓再生的支架。第一种气凝胶由1)与柠檬酸交联的再生纤维素(AD1CLS)和2)通过单向冷冻产生的琥珀酰化纤维素的混合物制成。第二种气凝胶由1)与柠檬酸交联的浸碱纤维素(Merc.AA)(S4)和2)通过单向冷冻产生的琥珀酰化纤维素制成。然后比较了两种气凝胶的稳定性。

[1301] 方法

[1302] 与柠檬酸交联

[1303] 通过将浸碱纤维素(Merc.AA)(0.1g/mL)和琥珀酰化纤维素(0.1g/mL)以根据下表的不同比例混合来制备四种不同的样品，并与2％柠檬酸混合以评估2％柠檬酸是否足够在PBS中产生稳定的气凝胶。简言之，在加入柠檬酸之前，将聚合物悬浮在50mL水中以形成凝胶，并用玻璃棒在剧烈搅拌下保持15分钟。反应在100℃下在热板振动器上进行20分钟，并去除所有表面水分。将材料从烘箱中取出，并在室温下保存过夜。第二天，将材料在105℃的烘箱中孵育2小时。然后将反应产物在水(60ml)中浆化30分钟，将pH调节至7，并通过以4500rpm离心10分钟洗涤三次以去除未反应的组分。

[1304] 所用交联样品、纤维素和柠檬酸浓度的名称。

[1305]

聚合物（%）	柠檬酸浓度	样品名称
浸碱 AA-50 琥珀酰化浸碱-50	2%	S1
琥珀酰化浸碱-75 浸碱 AA-25	2%	S2
琥珀酰化浸碱-25 浸碱 AA-75	2%	S3

[1306]

浸碱 AA-100	2%	S4

[1307] 气凝胶生产

[1308] 将琼脂(1％)在热水(70℃)中液化，并与40％羟基磷灰石(HP)混合。将交联的Mer.AA(20g)和琥珀酰化纤维素与12mL的液化琼脂糖和HP一起装入注射器中。使用两个60mL注射器和路厄锁定连接器混合聚合物。琥珀酰化纤维素的量根据表1中所述的比例进行调节。

[1309] 将所得材料置于60mm的TC平皿中，在-20℃下孵育至少2小时以使材料完全冷冻，然后将其低压冻干24小时。

[1310] 如图129所示，然后使用5mm活检打孔凿(A)凿出冷冻干燥的气凝胶，然后使用细线(B)取出，并评估气凝胶在PBS中的短期稳定性。

[1311] 使用再生纤维素制备气凝胶，以将孔隙率与由Mer.AA CL制备的其他气凝胶进行比较。

[1312] 通过比较由交联的再生纤维素(D1CL)和交联的浸碱纤维素(S4)产生的气凝胶来评估气凝胶的粒度，这两种纤维素都与琥珀酰化浸碱纤维素混合。评估这些材料的目的是在定向冷冻下获得更均匀的悬浮液和进一步对准的多孔形成。如下表2中所述制备样品。

[1313] 气凝胶样品的制剂和名称。

[1314]

聚合物 1	聚合物 2	H_2O	气凝胶名称
琥珀酰化浸碱纤维素-5g	用柠檬酸交联的浸碱纤维素(2%)(**S4**)-5g（浸碱纤维素**-0.1 g/mL**）	4 mL	SS4
琥珀酰化浸碱纤维素-5g	D1（D1CL）-5g交联的（柠檬酸（2%））再生纤维素	4 mL	AD1CLS

[1315] 如上所述制备气凝胶。简言之，使用采用f/f路厄锁定连接的两个50mL注射器将聚合物以上表中所示的量混合。将预先制备的样品(S4-交联的浸碱纤维素)与水(4mL)混合，并与琥珀酰化纤维素一起插入注射器中，将聚合物混合至少30倍。对于交联的再生纤维素(D1)实现了相同的程序。将样品放入定向冷冻机上的钢管中2小时。

[1316] 在定向冷冻后，将材料转移到-20℃的冷冻机中，保持24小时，然后低压冻干至少24小时。

[1317] 结果

[1318] 图130显示了用交联的再生纤维素(D1)和琥珀酰化纤维素生产的气凝胶。

[1319] 图131显示了用交联的浸碱纤维素(AS4)和琥珀酰化纤维素生产的气凝胶。

[1320] 由交联的再生纤维素(D1)制备的气凝胶被命名为“AD1CLS”，并呈现两层。先前的结果表明，对准的孔通常只在底部形成，因此在底部(与用于定向冷冻的铜板直接接触的部分)和底层的顶表面中进行显微镜成像以进行分析，如图132至133中用于ADS1气凝胶的圆圈区域所示。检查了由交联的浸碱纤维素(AS4)制备的气凝胶的其他区域，如图134-135所示，因为它们在定向冷冻和低压冻干后破裂。

[1321] 图132显示了由交联再生纤维素(AD1CLS)制备的气凝胶底层圆形底表面的明视场显微镜图像。

[1322] 图133显示了图132的气凝胶底层的圆形顶表面的明视场显微镜图像。

[1323] 图134显示了由交联的浸碱纤维素(AS4)制备的气凝胶顶层圆形底表面的明视场显微镜图像。

[1324] 图135显示了图134的气凝胶底层的圆形顶表面的明视场显微镜图像。

[1325] 结果表明，样品S4产生了更多孔和更有组织的结构，其区域显示出对准的多孔性。然而，当评估稳定性时，样品在水中高度不稳定。因此对交联过程进行了进一步的优化。

[1326] 实施例12-用于交联的柠檬酸浓度的优化

[1327] 最终材料的密度(或孔隙率)取决于浸碱纤维素的初始质量。因此，纤维素质量增加，并评估了交联过程期间柠檬酸浓度对气凝胶的影响。选择浸碱纤维素来制备这些样品。

[1328] 方法

[1329] 如上所述在水中制备浸碱纤维素(Merc.AA)。在烧杯中将不同浓度的柠檬酸溶于最少量的水(3mL)中。然后将柠檬酸加入到Merc.AA凝胶中并剧烈混合。交联过程如上所述进行。用于制备样品S6-S10的不同浓度的柠檬酸如下表所示。

[1330] 根据柠檬酸浓度的交联样品名称

[1331]

柠檬酸%	纤维素交联样品名称	组合物
2	S6	merAA + 2%柠檬酸
4	S7	merAA + 4%柠檬酸
5	S8	merAA + 5%柠檬酸
10	S9	merAA + 10%柠檬酸
20	S10	merAA + 20%柠檬酸

[1332] 将反应产物在水中制浆,并将pH调节至pH 7。将柠檬酸纤维素产物进行空气干燥。

[1333] 然后通过将S6、S9和S10与琥珀酰化的浸碱纤维素混合来制备水凝胶。由于使用S7和S8生产的凝胶相对不稳定,因此丢弃这些样品,不在随后的实验中使用。选择琥珀酰化浸碱纤维素是因为它具有更亲水的特性,这可以生产更均质和均匀的水凝胶,这可以改善定向冷冻下孔的对准。

[1334] 如上所述制备聚合物。简言之,这两种聚合物(交联的Merc.AA+琥珀酰化浸碱纤维素)使用f/f路厄锁定连接器连接的两个50mL注射器混合。将交联的浸碱纤维素(S6、S9或S10)与水混合,然后加入琥珀酰化纤维素并插入注射器中,并将聚合物混合。将样品放入定向冷冻机中。气凝胶是根据下表制备和命名的。

[1335] 每种气凝胶中的聚合物浓度

[1336]

聚合物	聚合物	气凝胶名称
琥珀酰化浸碱纤维素	浸碱纤维素柠檬酸（2%） = **S6**	AS6
琥珀酰化浸碱纤维素	浸碱纤维素柠檬酸（10%） = **S9**	AS9
琥珀酰化浸碱纤维素	浸碱纤维素柠檬酸（20%） = **S10**	AS10

[1337] 结果

[1338] 图136显示了由交联的浸碱纤维素(样品S6、S9和S10)与琥珀酰化浸碱纤维素混合制备的气凝胶AS6、AS9和AS10。

[1339] 图137显示了每个气凝胶AS6、AS9和AS10的底层底表面的显微镜图像。

[1340] 如图136所示，这些制剂产生了气凝胶的硬和脆特性，所有样品在定向冷冻和低压冻干后都呈现出两层(底层和顶层)。

[1341] 图137显示了每个气凝胶AS6、AS9和AS10的底层底表面的显微镜图像。底层的底表面是与定向冷冻板直接接触的层。这些图像显示了不同尺寸但未对准的孔。

[1342] 然后评估每种气凝胶在PBS中的稳定性。图138显示了与t＝0时的气凝胶相比，每种气凝胶AS6、AS9和AS10在PBS中45分钟后的稳定性。图像显示柠檬酸浓度的增加增加了气凝胶的稳定性。事实上，图138显示，在45分钟后，样品AS6(柠檬酸2％)完全破碎成小片状物，而样品AS9(柠檬酸10％)虽然它开始溶解，但更稳定。相比之下，样品AS10(柠檬酸20％)在整个45分钟内是稳定的，表明当使用更高的柠檬酸浓度时具有更高的交联功效。

[1343] 实施例13-定向冷冻(低压冻干)后的交联

[1344] 所有先前的样品都是在气凝胶生产之前通过用柠檬酸交联聚合物来制备的。通过交联气凝胶来制备以下气凝胶，以评估气凝胶形成后的交联效果。因此，在低压冻干后进行交联反应作为最后一步。

[1345] 方法

[1346] 根据上述发现对某些参数进行调整。简言之，根据上述结果，提高纤维素的浓度，将柠檬酸浓度调节到10％。此外，使用FisherBrand 850均质器分散粘性悬浮液，试图提高均匀性。

[1347] 水凝胶根据下表由浸碱纤维素、再生纤维素、琥珀酰化浸碱纤维素或其组合制备。

[1348] 用于气凝胶制备的聚合物组合。

[1349]

纤维素	H_2O（mL）	气凝胶名称
浸碱纤维素	8 mL	Merc.AA
再生纤维素	8 mL	D1A
浸碱纤维素 再生纤维素	8 mL	Merc.AA + D1A
浸碱纤维素 琥珀酰化浸碱纤维素	8 mL	Merc.AA+琥珀酰化纤维素

[1350] 上表中描述的水凝胶是如前面描述那样进行制备，但没有交联。图139显示了在两个50mL注射器中混合的水凝胶，这两个注射器与f/f路厄锁定连接器连接(A)，并在定向冷冻前插入钢管中(B和C)。

[1351] 结果

[1352] 图140显示了定向冷冻后、交联前的气凝胶Merc.AA、D1A和Merc.AA+D1A。

[1353] 与其中在制备气凝胶之前对聚合物进行交联的先前气凝胶相比，图140显示除了用再生纤维素(较低尺寸颗粒)生产的气凝胶破裂(B)外，在定向冷冻后，未交联的情况下产生的气凝胶保持完整。

[1354] 然后如上所述使用10％柠檬酸溶液进行交联过程，得到的气凝胶如图141所示。

[1355] 图141显示了交联后的气凝胶Merc.AA、D1A和Merc.AA+D1A。

[1356] 图142显示了图141的Merc.AA气凝胶的显微镜图像。

[1357] 图143显示了图141的D1A气凝胶的显微镜图像。

[1358] 图144显示了图141的Merc.AA+D1A气凝胶的显微镜图像。

[1359] 显微镜图像突出显示了每种气凝胶之间在形态上的差异。使用Merc.AA生产的气凝胶呈现出一些在其他两种气凝胶(D1A和Merc.AA+D1A)中无法观察到的对准结构。与用Merc.AA+D1A制备的气凝胶相比，仅用再生纤维素制备的气凝胶的形态显示出更大的孔，并且材料欠压实，这显示出更紧凑和均匀的结构。

[1360] 然后检测了用Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备的气凝胶。

[1361] 图145显示了图141的Merc.AA+琥珀酰化气凝胶的显微镜图像。这种特殊的气凝胶在样品边缘显示出存在对准的孔，而其他气凝胶中没有这种对准的孔。

[1362] 对上表中描述的每种气凝胶的稳定性进行了分析，图像如图146-149所示。当在低压冻干之前进行交联时，这些样品的稳定性与用交联纤维素制备的气凝胶有很大不同。在pH 5.5的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中孵育5分钟、6小时或24小时后，评估气凝胶的稳定性。

[1363] 图146显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后，用低压冻干后交联的Merc.AA制备的气凝胶。

[1364] 图147显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后，用低压冻干后交联的D1A制

备的气凝胶。

[1365] 图148显示了在PBS中孵育5分钟(A和B)和6小时(C)后,用低压冻干后交联的Merc.AA+D1A制备的气凝胶。

[1366] 图149显示了在PBS中孵育24小时后,用低压冻干后交联的Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备的气凝胶。

[1367] 由于琥珀酰化材料更具亲水性,因此在PBS中进行24小时的较长孵育时间以证实气凝胶的稳定性。

[1368] 气凝胶的图像显示,在该过程的最后一步,使用网状结构,所有气凝胶在盐水溶液、PBS和水中都是稳定的。

[1369] 实施例14-在气凝胶生产后使用针获得多孔结构

[1370] 在本实施例中,针被用来在气凝胶中产生多孔结构。

[1371] 方法

[1372] 由1)Merc.AA、2)D1A、3)Merc.AA+D1A和4)Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备四种水凝胶,孔径在图150-152中进行评估。水凝胶根据下表中给出的制剂制备,并使用设置为10.000rpm的FisherBrand 850均质器使用尖端附件7x 110mm塑料探针分散10分钟。然后将聚合物插入采用f/f路厄锁定连接器连接的两个50mL注射器中,并混合至少30倍。

[1373] 然后将样品放入定向冷冻机上的钢管中2小时。

[1374] 然后通过将样品在110℃下的烘箱中孵育2小时来进行与柠檬酸的交联。还进行1.5小时的交联,并检查了所得物的稳定性。由于在气凝胶PBS的形态和稳定性方面没有观察到显著差异,因此交联反应的持续时间在110℃的烘箱中标准化为1.5小时。然后使用这些针来获得多孔结构。将4cm的圆形硅酮模具倒置,并将30G针尖小心地(垂直地)插入其底部;针被排列成3组,每组4个,以确保每个气凝胶包含4个“孔”。为了制作底部,用两层石蜡膜包裹每个HDMC模具/金属管的底部,然后直接放置在每组针上。每个针的尺寸如下表所示。

[1375] 气凝胶的名称和制剂

[1376]

纤维素(2.5 g/mL)	柠檬酸	H_2O (mL)	气凝胶名称	针尺寸

[1377]

	(%)			
浸碱纤维素 - 20g	10	8	Merc.AA	25G 0.5 mm
浸碱纤维素 - 20g	10	8	D1A	30G 0.5 mm
浸碱纤维素 - 10 g 浸碱纤维素（D1A）- 10 g	10	8	Merc.AA + D1A	30G 0.3mm
浸碱纤维素 - 10 g 琥珀酰化浸碱纤维素 - 10 g	10	8	Merc.AA + 琥珀酰化纤维素	30G 0.3m

[1378] 结果

[1379] 通过显微镜检查气凝胶以评估多孔结构。

[1380] 图150显示了通过Merc.AA+再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像AA与柠檬酸交联2小时。

[1381] 图151显示了通过再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像。

[1382] 图152显示了通过Merc.AA+再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联2小时制备的气凝胶的显微镜图像。

[1383] 显微镜图像显示了每种气凝胶的形态差异。使用Merc.AA显示了针产生的清晰的孔,这些孔在图150中容易观察到。由Merc.AA+再生纤维素的混合物产生的气凝胶中的孔也是清晰的。

[1384] 实施例14-在气凝胶生产之前使用针获得多孔结构

[1385] 在本实施例中,将针(30G/0.3mm)插入硅酮模具中,并在模具中加入水凝胶。然后检查水凝胶中的孔。

[1386] 方法

[1387] 由与实施例13相同的制剂制备四种水凝胶,并在上表中进行描述。这四种气凝胶是:1)Merc.AA、2)D1A、3)Merc.AA+D1A、和4)Merc.AA+琥珀酰化纤维素,并如图154-157所示。与柠檬酸交联在110℃下进行1.5小时。使用明视场显微镜和扫描电子显微镜(SEM)评估孔径,如图158-163所示。

[1388] 图153显示了用于优化如上所述制备的气凝胶中孔隙形成的硅酮模具和针(30G)。

[1389] 结果

[1390] 使用硅酮模具和针(30G)制备的气凝胶如图154-157所示。

[1391] 图154显示了在与柠檬酸交联之前(A、B)和交联之后(C、D)使用硅酮模具针由Merc.AA制备的气凝胶。

[1392] 图155显示了在与柠檬酸交联之前(A、B、C)和交联之后(D)使用硅酮模具针由Merc.AA+再生纤维素制备的气凝胶。

[1393] 图156显示了在低压冻干后(左)和从针模中取出后(右),使用硅酮模具针由Merc.AA+琥珀酰化纤维素制备的气凝胶。

[1394] 图157显示了将图156(左)的交联气凝胶切成薄片(右)以进行后续成像。

[1395] 然后,通过显微镜检查气凝胶以评估多孔结构。

[1396] 图158显示了通过Merc.AA与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像,比例尺=2000μm(A)、1000μm(B)和500μm(C、D、E)。

[1397] 图159显示了图158的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像,显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面。

[1398] 图160显示了通过Merc.AA+再生纤维素(D1A)与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像,比例尺=2000μm(A)、1000μm(B)和500μm(C)。

[1399] 图161显示了图160的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像,显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面。

[1400] 图162显示了通过Merc.AA+琥珀酰化纤维素与柠檬酸交联制备的气凝胶的显微镜图像,比例尺=1000μm(A)和500μm(B);

[1401] 图163显示了图162的气凝胶的顶视图(A)的扫描电子显微镜(SEM)图像,显示了垂直于(B)和平行于(C)气凝胶轴的横截面。

[1402] 显微镜图像显示在由Merc.AA和Merc.AA+再生纤维素(D1A)制备的气凝胶中获得的孔是清晰的,表明针的位置稳定,产量提高了孔形成。更具体地,由Merc.AA生产的气凝胶的形态呈现出尺寸为约700μm的较大孔,而由AMerc.AA+再生纤维素生产的气凝胶显示出不同的结构,较小的孔径为约420μm。这些结果突出了再生纤维素对气凝胶形态组织的影响。

[1403] 此外,图像显示,在制备气凝胶中使用针时会形成更大的孔。

[1404] 实施例15-气凝胶结构评估-FTIR分析

[1405] 在本实施例中,通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)检查各种样品以评估柠檬酸浓度的影响,以及所使用的条件是否有效地获得通过酯键共价交联的纤维素。

[1406] 方法

[1407] 在2800cm^{-1}和3500cm^{-1}之间检测到有机酸的CH和OH基团的化合价振动。3500-3200cm^{-1}区域的复合吸收带源于OH基团的化合价振动。柠檬酸的游离OH基团的化合价振动产生最大值在3495cm^{-1}的带,而参与分子内和分子间氢键的OH基团的化合价振动分别在3448cm^{-1}和3293cm^{-1}处观察到(2)。

[1408] 来自酸基团的C=O基团的化合价振动在约1760cm^{-1}处产生带,这在柠檬酸的情况下出现在1753cm^{-1}处(根据参考数据(2、3)),如果C=O基团参与氢键的形成或分子被二聚化,则振动发生在较低的频率,即1714cm^{-1}处的键(4)。

[1409] 在纤维素的葡萄糖环上,主要有三个羟基位点,即O(2)-H(2)(2-羟基)、O(3)-H(3)(3-羟基)和O(6)-H(6)(6-羟基)。3700-3000cm^{-1}之间的区域是与分子内和分子间氢键发展相关的最有趣和清晰可见的变化。

[1410] 结果

[1411] 所分析的样品S6-S10如先前在实施例12中所述和根据下表所述。

[1412] 浸碱纤维素和相应的柠檬酸浓度

[1413]

柠檬酸%	纤维素交联样品名称
2	S6
4	S7
5	S8
10	S9
20	S10

[1414] 图164显示了用不同浓度的柠檬酸交联的浸碱纤维素的傅里叶变换红外光谱(FTIR)。

[1415] 所有样品的FTIR图谱相似,但可以清楚地观察到,具有低浓度柠檬酸(2%和4%)的样品相似,而具有5%、10%和20%柠檬酸的其他样品产生非常相似的FTIR,主要是S8和S10。所有样品均显示1730cm^{-1}处的带(酯羰基),证实了酯键。此外,样品(S8、S9和S10)中1587cm^{-1}处的带显示存在羧酸根离子。在样品S6和S7中,在波数1630cm^{-1}处观察到O=C-OH基团的对称振动,并且既不存在在1392cm^{-1}处的O=C-OH基团的不对称振动,也不存在1082cm^{-1}处的柠檬酸C-OH基团的化合价振动。

[1416] 根据下表中描述的制剂的其他样品通过FTIR进行分析。根据上述先前的结果,选择10%的柠檬酸作为交联的浓度,这提供了PBS中形态/稳定性的最佳关系。

[1417] FTIR分析的气凝胶名称和制剂

[1418]

纤维素	柠檬酸(%)	H_2O (mL)	气凝胶名称
浸碱纤维素 - 20g	10	8 mL	Merc.AA

[1419]

浸碱纤维素 - 10 g 再生纤维素（D1A） - 10 g	10	8 mL	Merc.AA + 再生
浸碱纤维素 - 10 g 琥珀酰化浸碱纤维素 - 10 g	10	8 mL	Merc.AA + 琥珀酰化

[1420] 图165显示了由Merc.AA、Merc.AA+再生纤维素和Merc.AA+琥珀酰化纤维素与10％柠檬酸交联制备的气凝胶的傅立叶变换红外光谱(FTIR)，并与浸碱纤维素(Merc.AA 151)进行了比较。

[1421] 浸碱纤维素(Merc.AA 151)呈现宽带，在110℃下与柠檬酸交联后，该带减小。如上所述，柠檬酸游离OH基团的化合价振动产生最大值为3495cm^{-1}的带，而在较低的波数下观察到参与分子内的OH基的化合价振动。

[1422] 在所有样品中都可以观察到3411cm^{-1}的较窄位移(图164)，表明反应后分子内键中涉及的游离羟基和OH基团的释放。

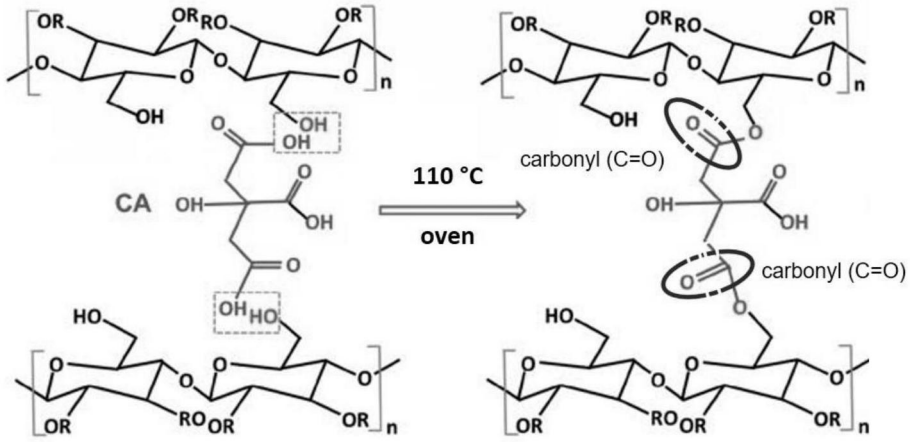
[1423] 参考图165，可以看到范围从3000到3500cm^{-1}的较窄峰，最大值为约3424cm^{-1}，这来自没有参与酯化过程的OH基团的化合价振动。

[1424] 参考图164，在1729cm^{-1}处出现一个带，源自纤维素和柠檬酸酯化反应中形成的酯羰基。此外，还有1000至1260cm^{-1}范围内的带，这是C-O化合价振动的结果。

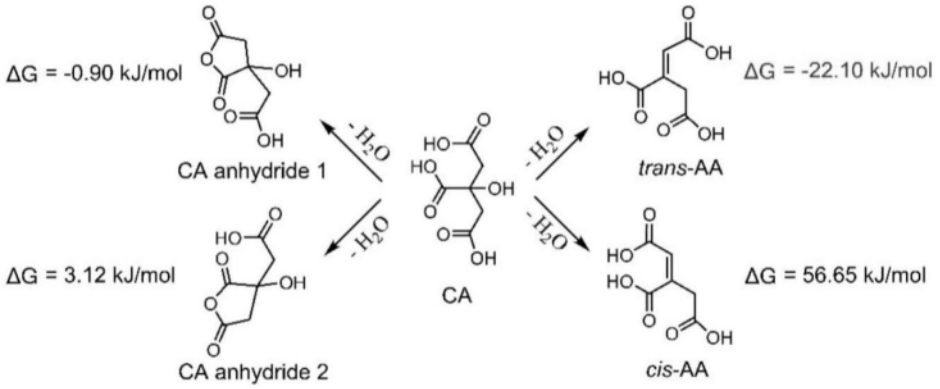
[1425] C＝O基团的吸收带位置从柠檬酸(1753cm^{-1})变化到最大值为1729cm^{-1}(商业来源-文献数据)和1735cm^{-1}(图165)(酯C＝O基)的带清楚地表明在所有制备的样品中，柠檬酸的羧基与纤维素的羟基的反应，并形成酯键。

[1426] 由纤维素和柠檬酸制备气凝胶的合成反应基于柠檬酸的羧基与纤维素a的羟基的酯化反应，如下所示。

[1427]



[1428] Yang及Wang,1996(5)表明柠檬酸(CA)首先失去一摩尔的水，形成乌头酸(AA)异构体，这然后释放第二摩尔的水，形成AA酸酐用于在升高的温度下的交联反应。还出现了1630cm^{-1}处的带，即C＝C。在样品S6和S7中可以清楚地观察到该带(图165)。

[1429] 

[1430] Yang等人,(1996)分析了纯CA在150℃的温度下不会形成C=C键和酸酐结构。将样品从室温加热至160℃,并再次通过FT-IR进行测量。在CA样品中,在1858cm^{-1}和1793cm^{-1}处可能出现代表形成的酸酐基团的新峰(5)。这些峰不存在于任何样品中,因为只观察到1630cm^{-1}处的带,即C=C(图164)。

[1431] Lu及Yang,(1999)(6)已经证明,柠檬酸(CA)处理的棉织物的变黄问题是由高温下不饱和酸顺式或反式乌头酸(AA)的形成引起的。在所分析的样品中,在交联和中和过程之后观察到变黄。这些材料在某种程度上都是黄色的,但从不那么强烈、苍白、半透明的黄色过渡到更暗、更鲜艳的黄色,使得(S6=S9=S10)<AMerc.AA<AMerc.AA+琥珀酰化AMerc.AA+再生)。这一观察结果需要通过准备更多的样品来证实。

[1432] 关键要点

[1433] • 显微镜图像显示,每种气凝胶获得的形态都有差异,当水凝胶在模具中通过针低压冻干时,针的使用更好。

[1434] • 使用Merc.AA(Merc.AA)和琥珀酰化浸碱纤维素制备的气凝胶在材料的边缘呈现出一些对准的结构,并且该气凝胶在盐水溶液中是稳定的,

[1435] • 低压冻干后,用针制备的孔径在纤维素类型的功能上有所不同。使用再生纤维素的样品比仅使用浸碱纤维素生产的气凝胶具有更小的孔。

[1436] • 用于与柠檬酸交联的两种方法(在低压冻干之后和之前)都能有效地产生酯键合键。

[1437] • 将实现更多的实验来评估取代度,即不饱和酸的存在,这些不饱和酸可以导致发色团的形成,发色团在随后的老化/变黄时形成。

[1438] 实施例16-气凝胶支架的机械测试

[1439] 在本实施例中,使用来自每种气凝胶制剂的干样品和湿样品(Merc.AA、Merc.AA+琥珀酰化纤维素和Merc.AA++再生纤维素)进行机械测试。

[1440] 方法

[1441] 条件:

[1442] -压缩90%

[1443] -干气凝胶10N测力传感器

[1444] -湿气凝胶1N测力传感器

[1445] -2.5应变%/s

[1446] 分析的样品名称和制剂.

[1447]

样品	纤维素组分（多种）	无水柠檬酸	ddH₂O
Merc.AA	10g merAA151	1g	4mL
Merc.AA + 琥珀酰化	5g merAA151 5g 琥珀酰化纤维素	1g	4mL
Merc.AA + 再生	5g merAA151 5g 再生纤维素	1g	4mL

[1448]

[1449] 图166显示了在60mm TC平皿中由Merc.AA、Merc.AA+琥珀酰化纤维素和Merc.AA+再生纤维素制备的气凝胶，然后在110℃下交联1.5小时。

[1450] 使用5mm活检打孔凿切割所有样品(每个制剂n＝16)，并在机械测试前将5mm湿样品在盐水中浸泡30分钟。

[1451] 图167显示了在机械测试前在盐水中浸泡30分钟的图166的5mm湿气凝胶样品。

[1452] 图168显示了压缩测试前(左)和压缩测试后(右)的干Merc.AA+再生纤维素(A)和湿Merc.AA+再生纤维素(B)支架。

[1453] 结果

[1454] 图169显示了干燥的气凝胶的机械性质，这些机械性质是使用单轴压缩测试获得的应力-应变曲线的线性部分斜率计算的。

[1455] 图170显示了湿气凝胶的机械性质，这些机械性质是使用单轴压缩测试获得的应力-应变曲线的线性部分斜率计算的。

[1456] 力学分析显示，所有干燥样品的杨氏模量都很高。用浸碱纤维素和再生纤维素制备的气凝胶(AMerAA+Regen.)呈现出更高的杨氏模量(504kPa)，其次是仅用浸碱纤维素(AMerc.AA-306kPa)制备的气凝胶和用琥珀酰化纤维素(AMerc.AA+succ.)制备的气凝胶显示出220kPa的杨氏模量。再生纤维素的较高杨氏模量的可能解释可归因于纤维素粒度的变化以及晶体构象的变化(这将通过NMR评估)可能有助于与柠檬酸更容易进行交联反应和产生更具抵抗力的压缩结构。

[1457] 在盐水溶液中浸泡30分钟后，湿气凝胶显示出显著降低的杨氏模量(图3)。一个有趣的观察结果是，对于所有三个样品，每个样品的杨氏模量降低了10kPa。应力-应变数据揭示了湿样品MercAA+Regen.的弹性模量为50KPa，MercAA为30kPa且MercAA+Succ.为30KPa。

[1458] 每个样品的杨氏模量汇总

[1459]

样品	杨氏模量(干)	杨氏模量(湿)
Merc.AA	306kPa	30kPa
Merc.AA+Succ.	220kPa	21kPa
Merc.AA+Regen.	504kPa	50kPa

[1460] 使用柠檬酸作为交联剂，通过共价连接纤维素链形成的三维水凝胶网络可以作为制备为用于传统手术植入的预成型支架的生物材料的替代品。在下面的实施例中进一步评估了生物相容性，这些实施例测试了不同的后处理过程以去除交联剂的任何潜在毒性。

[1461] 实施例17-气凝胶支架的生物相容性测试

[1462] 在本实施例中，对pH进行了检查以评估用于下游用途的样品的生物相容性。检查的样品如下表所述。

[1463] 方法

[1464]

样品	纤维素组分（多种）	无水柠檬酸	ddH_2O
Merc.AA	4g merAA151	0.4g	1.6mL
Merc.AA + 琥珀酰化	2g merAA151 2g 琥珀酰化纤维素	0.4g	1.6mL
Merc.AA + 再生	2g merAA151 2g 再生纤维素	0.4g	1.6mL

[1465] 在24孔TC平皿中制备气凝胶，然后灭菌并接种MC3T3细胞。如实施例18所述，将样品在培养基中生长4周，并染色进行荧光显微镜成像，以测量细胞粘附和增殖。

[1466] 制备气凝胶并将其放置在24孔板中，低温冻干并小心地从板中取出，用于与柠檬酸进行交联反应。

[1467] 图171显示了沿着一排(n＝6)的24孔TC平皿铺板的每个气凝胶制剂。

[1468] 图172显示了交联前的低压冻干气凝胶。

[1469] 图173显示了交联后的低压冻干气凝胶。

[1470] 结果

[1471] 首先对气凝胶进行灭菌，并将其放入生长培养基(GM)中，以评估中和前的酸度。如图174所示，GM在孵育约10分钟后从亮红色变为亮黄色。

[1472] 图174显示了在与气凝胶孵育的10分钟内，生长介质的颜色从红色变为黄色。

[1473] 残留柠檬酸的中和

[1474] 将低压冻干气凝胶在碳酸氢钠溶液(28.8g/L)中在4℃下孵育过夜，以中和任何残留的柠檬酸。

[1475] 由于细胞培养基含有碳酸氢钠(2.2g/L)和酚红(一种pH指示剂染料)，人们认为碳酸氢钠与残留的柠檬酸反应，从而将其释放到溶液中。结果，培养基的总pH降至低于正常水平，这引发了颜色的快速变化。

[1476] 然后将支架在DMEM中在4℃下孵育过夜，并在第二天早上测量溶液的pH。所有3种溶液的pH均为约6.52。

[1477] 然后去除碳酸氢钠溶液，并用30mL的水填充管。然后将样品放置在平台摇杆上，每

5分钟更换一次水，直到总共完成5次水洗。

[1478] 图175显示了在中和和随后水洗后，气凝胶在MEMα(左)中孵育24小时时没有颜色变化。相对于储备培养基管，没有观察到颜色变化(右)。

[1479] 为了对气凝胶进行灭菌，将每组样品(每个气凝胶制剂n＝5)在20mL的70％EtOH中孵育30分钟。

[1480] 在染色和成像之前，将GFP-NIH3T3细胞生长1周。气凝胶在初始接种后再接种两次(在第4天和第6天)。使用Hoechst染料对细胞核进行染色。

[1481] 图176显示了由Merc.AA、Merc.AA+琥珀酰化纤维素和Merc.AA+再生纤维素制备产生的气凝胶。

[1482] 图177显示了图176的气凝胶，在该气凝胶上将100uL的最终细胞悬浮液铺板并孵育2.5小时，然后每孔加满1.5mL生长培养基。

[1483] 然后用Hoechst对具有GFP-NIH3T3细胞的气凝胶进行染色并进行显微镜成像。

[1484] 图178显示了用Hoechst在(A)MercAA气凝胶、(B)MercAA+琥珀酰化纤维素气凝胶和(C)MercAA+再生纤维素气凝胶上染色的GFP-NIH3T3细胞，比例尺＝100μm。紫色＝支架，黄色点＝细胞核。

[1485] 对于所有样品，观察到单个细胞和细胞簇，表明气凝胶支持细胞生长，因此在体外具有生物相容性。

[1486] 一种被认为可安全食用的生物材料的开发和表征

[1487] 食品级生物材料制造

[1488] 建立一个完全食品安全的过程是通过在公用厨房中进行整个制造(苹果加工、脱细胞、浸碱、支架制造和烹饪)来进行的，利用食品级类别的所有化学品来制造与食品工业兼容的生物材料。浸碱是制造生物材料过程中的关键步骤。目前，这一步骤使用高温以及浓酸和浓碱，这需要使用通风柜，并使用不同类型的个人防护设备(PPE)，无法在厨房安全执行。为了解决这一障碍，食品安全的化学替代品，如广泛应用于食品制剂的碳酸氢钠($NaHCO_3$)(通常称为小苏打)、乙酸(CH_3COOH)(通常称为醋(稀释时))和柠檬酸($C_6H_8O_7$)将分别用于替代NaOH和HCl。Mukhtar等人，(2018)表明，碳酸氢钠对糖棕榈纤维的理化性质有显著影响，因此与现有的碱性化学品相比，该化学品可能是用于处理纤维素纤维的替代品，代表了食品安全生物材料版本的一种有成本效益高且环保的选择。

[1489] 一旦结晶纤维素链高度有序并紧密地包裹在微原纤维中，这些微原纤维就必须被破坏或溶胀，以使纤维素链更容易与染料、香料、蛋白质、纤维、油、脂肪酸等相互作用。碳酸氢钠($NaHCO_3$)用于纤维素的预处理过程，并被证明不仅能有效分解纤维素结构，还能促进结晶纤维素的无定形化以及对整合木质素的长期去除(Morehead,1950)。使用碳酸氢钠制备“基材”的新方法是一种去除木质素和分解微原纤维的方法，具有较少的纤维素降解/损失。其他研究已经表明，碳酸氢钠预处理可以有效地溶胀纤维结构(Kahar等人，2013)，大原纤维和微原纤维的溶胀有助于使纤维素链更容易获得。

[1490] 此外，医用级化学品的替代代表开发食品安全型生物材料的关键步骤。此外，使用被普遍认为安全的成分或添加剂(GRAS)对于生产被认为是安全的食品替代品的材料是必要的。根据FDA，“GRAS”被认为是故意添加到食品中的任何物质(食品添加剂)，需要经过FDA的上市前审查和批准，除非有资格的专家普遍认为该物质在其预期使用条件下被充分证明

是安全的,或者除非该物质的使用在食品添加剂的定义中是否有其他例外。此外,还进行了不同的试验,用厨房的设备有效地替代实验室中使用的设备,以创建一种食品安全生物材料制造工艺,该工艺在传统厨房中复制切实可行(FDA,2019)。

[1491] 实施例18-使用碳酸氢钠在80℃下对脱细胞AA进行浸碱

[1492] 在本实施例中,如Mukhtar等人,2018所述,使用碳酸氢钠对脱细胞AA进行浸碱,并进行如下修改,以开发厨房安全的浸碱工艺。通过使用80℃的10%碳酸氢钠($NaHCO_3$)代替1M NaOH进行碱性处理,使浸碱步骤适用于厨房安全的替代方案。目的是创建一个完全食品级的浸碱步骤。

[1493] 方法

[1494] 将10%碳酸氢钠(2.5L)加入到初始pH为7.84的标记的4L烧杯中,并加热至达到80℃。

[1495] 在达到80℃后,加入250g的脱细胞AA并将其混合到10%碳酸氢钠溶液中。

[1496] 对于漂白过程,每15分钟加入25mL的30%过氧化氢(H_2O_2)储备溶液,直到在搅拌1小时的同时达到总计125mL。

[1497] 关闭加热,pH为8.65。

[1498] 对于中和反应,将冰醋酸(CH3COOH)加入到溶液中直到达到pH为7.10。

[1499] 由于碳酸氢钠和乙酸反应的碳酸化程度很高,因此通过摇动和在烧杯之间倾倒来搅拌溶液,以最大限度地减少处理和离心过程中压力积聚的机会。将50mL的猎鹰试管中的25mL等分试样以5000rpm离心5分钟,以观察离心后管中是否存在任何残余压力积聚。没有发生气泡或气体释放。

[1500] 然后将样品在1L管中以8000rpm旋转15分钟。增加了5分钟后任何压力积聚的检查步骤。

[1501] 丢弃上清液,加入蒸馏水,用校准的pH计检查pH,并再次中和溶液。

[1502] 离心过程重复4次。pH值为:

[1503] 第一次中和后离心前为7.10,

[1504] 在第一次离心后第二天早上第一次测量为8.76(中和至6.82)

[1505] 第二次离心后为7.70(中和至6.91)

[1506] 第三次离心后为6.88

[1507] 在此之后,材料再次被旋转减慢,并储存在50ml猎鹰管中。

[1508] 250g的脱细胞苹果的最终重量为55.30g的浸碱苹果(mer AA)。

[1509] 图179显示了使用80℃的10%碳酸氢盐溶液进行一小时的浸碱。

[1510] 图180显示了碳酸氢盐浸碱苹果(底部)与氢氧化钠浸碱苹果(顶部)的对比。

[1511] 实施例19-使用碳酸氢钠在室温下对脱细胞AA进行浸碱

[1512] 在本实施例中,如Mukhtar等人,2018所述,使用碳酸氢钠对脱细胞AA进行浸碱,并进行如下修改,以开发厨房安全的浸碱工艺。通过在室温下使用10%碳酸氢钠($NaHCO_3$)时间为5天代替1M NaOH进行碱性处理,使浸碱步骤适用于厨房安全的替代方案。目的是创建一个完全食品级的浸碱步骤。

[1513] 方法

[1514] 将10%碳酸氢钠(2L)加入到含有脱细胞苹果(277.40g)的标记的4L烧杯中,并在

室温下混合5天。

[1515] 在第0、1、2和5天进行pH测量，如下所示：

[1516] 第0天：7.94

[1517] 第1天：8.25

[1518] 第2天：8.54

[1519] 第5天：8.98

[1520] 5天后，每15分钟加入25ml的30％过氧化氢(H_2O_2)储备溶液，加入总计125ml。

[1521] 添加125mL后，未发现漂白，因此在1小时内将温度升高至80℃(温度缓慢升高)。

[1522] 对于中和反应，将冰醋酸(CH3COOH)加入到溶液中直到达到pH为7.10。

[1523] 由于碳酸氢钠和乙酸反应的冒泡程度很高，因此通过摇动和在烧杯之间倾倒来搅拌溶液，以最大限度地减少处理和离心过程中压力积聚的机会。

[1524] 然后将样品在1L管中以8000rpm旋转15分钟。样品总共旋转8次以达到目标pH，这可能是由于碳酸氢钠缓冲容量的原因。

[1525] 丢弃上清液，加入蒸馏水，用校准的pH计检查pH，并再次中和溶液。

[1526] 离心过程重复8次。pH值为：

[1527] 第一次中和后离心前为7.10，

[1528] 在第一次离心后第二天早上第一次测量为8.62(中和至7.10)

[1529] 第二次离心后为7.63(中和至7.17)

[1530] 第三次离心后为7.85(中和至7.12)

[1531] 第四次离心后为7.69(中和至6.87)

[1532] 第五次离心后为7.29(中和至6.87)

[1533] 第六次离心后为7.53(中和至6.77)

[1534] 第七次离心后为7.10

[1535] 在此之后，材料再次被旋转减慢，并储存在50ml猎鹰管中。

[1536] 277.40g的脱细胞苹果的最终重量为63.90g的浸碱苹果(mer AA)。

[1537] 图181显示了在室温下使用10％碳酸氢盐溶液进行的五天浸碱反应。

[1538] 图182显示了碳酸氢盐浸碱的苹果浸碱的苹果(mer AA)产品。管中含有使用碳酸氢钠生产的离心浸碱的产品。

[1539] 实施例20-浸碱程序的比较

[1540] 在本实施例中，比较了三种浸碱程序：1)使用碳酸氢钠在80℃下1小时，2)使用碳酸氢钠在室温下5天，以及3)使用NaOH在80℃下1小时。目的是开发一种与厨房兼容的浸碱工艺，以获得与NaOH浸碱对应物类似的产品。碳酸氢钠，通常被称为小苏打，是1M NaOH的潜在替代品，NaOH不能在厨房使用。乙酸也被用于食品中的许多应用，被用作中和浸碱产品的酸。

[1541] 目的是评估10％碳酸氢钠是否是1M NaOH的可行替代品。将三个样品的显微镜图像进行比较以确定粒度。还对三个样品进行了FTIR。

[1542] 方法

[1543] 处理物

[1544] • 处理物A：在室温下在10％碳酸氢盐中浸碱5天，加热至80℃，每15分钟加入25mL

的30％H_2O_2储备溶液(总计125mL)

[1545] • 处理物B:在80℃下在10％碳酸氢盐中加热1小时,每15分钟加入25mL的30％H_2O_2储备溶液(总计125mL)

[1546] • 处理物C(对照):在80℃下在1M NaOH中加热1小时,每15分钟加入25mL的30％H_2O_2储备溶液(总计125mL)

[1547] 程序

[1548] 将3个处理物(来自室温碳酸氢盐5天、80℃碳酸氢盐1小时和80℃NaOH 1小时的Mer AA)与1％海藻酸盐溶液和浸碱苹果混合。

[1549] 制备1％海藻酸钠溶液(3mL)、蒸馏水(4.5mL)和浸碱苹果(7.5g)的混合物。

[1550] 将来自每次处理的混合物冷冻。

[1551] 冷冻样品冷冻干燥48小时。

[1552] 通过显微镜和红外光谱对冷冻干燥的样品进行分析。

[1553] 显微镜检查:

[1554] 使用两种不同的放大率在暗视场中对样品进行可视化:1倍和6.3倍。

[1555] 显微镜检查后,使用图像J程序添加图像比例尺。

[1556] 单一浸碱纤维素颗粒成像(定方向接线尺寸(Feret size)):

[1557] 制备0.5mL刚果红(0.2％)与0.5g MerAA(管1)的混合物。

[1558] 使用1mL的管1在7mL的dH_2O(管2)中稀释混合物。

[1559] 使用1mL的管2在7mL的dH_2O(管3)中稀释管2上的混合物。

[1560] 将几滴管3加入到载玻片中并用盖玻片覆盖。

[1561] 使用适当的荧光滤光器进行成像(TXRED)。

[1562] 对图像进行处理,并在ImageJ中添加红色。

[1563] 使用图像J获得费雷特直径(ferret diameter)。

[1564] 傅里叶变换红外光谱(FTIR):

[1565] 首先制备溴化钾(KBr)样品,并在烘箱中放置至少24小时,然后形成片剂。

[1566] 对KBr进行了分析,并利用它来消除背景。

[1567] 然后利用以下设置制备和分析样品:范围(起始4000.0和结束:400.0;扫描:32;分辨率:2)。

[1568] 结果

[1569] 图183显示了浸碱AA,使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)。

[1570] 图184显示了浸碱AA的1％海藻酸盐冰球,使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)。

[1571] 图185显示了在低压冻干后(6.3倍)浸碱AA的暗视场显微镜图像,使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(对照)。

[1572] 图186显示了浸碱AA的FTIR,使用碳酸氢盐在室温下5天(红色)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(黄色)和使用NaOH在80℃下1小时(蓝色)。

[1573] 图187(197)显示了浸碱AA的单颗粒的荧光显微镜图像,使用碳酸氢盐在室温下5天(A)、使用碳酸氢盐在80℃下1小时(B)和使用NaOH在80℃下1小时(C)。

[1574] 图188(198)显示了使用碳酸氢盐在室温下5天的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1575] 图189(199)显示了使用碳酸氢盐在80℃下1小时的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1576] 图190显示了使用NaOH在80℃下1小时的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1577] 图183-190中所示产品的表征使用了不同的技术分析,包括显微镜检查、产率、FTIR和纤维素颗粒费雷特直径。

[1578] 在80℃下使用10%碳酸氢钠进行1小时浸碱处理,在用酸中和后产生大量碳酸化,需要在离心前进行脱碳步骤。物理外观与先前的NaOH浸碱AA样品相似,差异较小。碳酸氢钠浸碱的AA比NaOH浸碱的AA液体略多,有轻微的绿色/黄色,不透明度较低。

[1579] 在室温下使用10%碳酸氢钠进行5天的浸碱处理也证明了在离心之前需要压力释放。在第五天,与10%碳酸氢钠在80℃处理1小时的浸碱相比,脱细胞的苹果和10%碳酸氢钠的混合物表现出更明显的颜色(红色/棕色)。此外,还观察到较大的苹果块,并且比处理物B有更多的沉淀。

[1580] 总之,根据显微镜图像和化学结构分析,使用10%碳酸氢钠的浸碱步骤产生具有与NaOH处理类似结构的Mer AA。此外,没有观察到两种碳酸氢钠处理之间的差异(P>0.05)。

[1581] FTIR

[1582] FT-IR分析显示,所有3个样品的趋势相似,表明存在的官能团相似性,这意味着碳酸氢盐浸碱可以作为厨房中NaOH浸碱的可行替代方案。FTIR分析显示在3600至2925-cm^{-1}范围内的峰,其与纤维素分子中OH基团的游离O-H伸缩振动和氢键合OH伸缩振动有关。2925至2880cm^{-1}之间的峰对应于与纤维素中的亚甲基相关的脂肪族饱和C-H伸缩。木质素也可以被分配一个宽的区域,包括3300-3600cm^{-1}的区间(酚类基团中的分子内氢键,醇类、酚类、酸类和弱结合吸收水的OH伸缩)。此外,木质素由三个基本单元组成,即对羟基苯基(H)、愈创木基(G)和丁香酚基(S)[78]。愈创木基(G)和丁香酚基(S)是木质素的主要单元,但S/G的比例因植物而异。

[1583] 1241cm^{-1}和1317cm^{-1}处的带可以分别被归属为G环伸缩和S环伸缩。仅在生纤维素和脱细胞纤维素中存在1241cm^{-1}处的带(木葡聚糖中的C-O伸缩振动)表明用碳酸氢盐实现的过程对去除木质素是有效的。

[1584] FTIR光谱中的吸收,包括1750-1700cm^{-1}之间的间隔(在非共轭基团中的C=O伸缩)反映了木质素和半纤维素中各种官能团(羰基、酯基、酮、醛、羧酸)的变化。浸碱和碳酸氢盐材料中1740cm^{-1}处的带的缺失也证实了我们的工艺有效地从原料和脱细胞材料中去除木质素和半纤维素。

[1585] 1628cm^{-1}处的带可以归属于吸收的水,对葡萄糖环伸缩振动特异的897cm^{-1}处的带在从两个过程获得的样品中略有减少。这可能是由于β-(1,4)糖苷键的热降解。在该带处的吸收减少表明纤维素的无定形形式减少。

[1586] 费雷特直径

[1587] 三种不同Mer AA方法中的单颗粒费雷特直径比较

Mer AA 方法	平均费雷特直径（μm）	SD 费雷特直径（μm）
NaOH/80°C	227.0[B]	82.8
Bicarb/80°C	300.6[A]	89.7
Bicarb/RT	278.2[A]	94.8

[1588]

[1589] SD-标准偏差;Xlstat 2014

[1590] 当与两种碳酸氢盐浸碱样品相比时,NaOH-对照中的Mer AA单细胞费雷特直径更小(P<0.05)。此外,碳酸氢盐处理之间的费雷特直径没有差异(P>0.05)。NaOH对照显示出正态分布,而室温和加热的碳酸氢盐观察到轻微的左偏。对于所有三种浸碱,每个颗粒都在500μm以下。实施例21-15% H_2O_2与30% H_2O_2漂白浸碱苹果的比较

[1591] 在本实施例中,使样品制备适用于厨房(去心器和食品加工机),并对所得Mer AA进行表征。漂白步骤也通过将15%的H_2O_2储备溶液与30%的储备溶液进行比较来调整。

[1592] 方法

[1593] 检查9个McIntosh苹果(955g)(AA 136),洗涤,去皮,并使用去心器取出果核。

[1594] 将苹果切成四等分,然后用食品加工机研磨。

[1595] 将磨碎的苹果(700g)加入到4L烧杯中。

[1596] 使用振动器(130rpm)进行脱细胞步骤。

[1597] 浸碱步骤用10%碳酸氢钠和15%过氧化氢储备溶液加热1小时进行。将冰醋酸用于酸化步骤。

[1598] 使用25μm筛代替离心步骤。使材料通过筛,直到将pH稳定/中和在6.8-7.2之间的范围内。

[1599] 单一浸碱纤维素颗粒成像(最大费雷特直径):

[1600] 制备0.5mL刚果红(0.2%)与0.5g MerAA(管1)的混合物。

[1601] 使用1mL的管1在7mL的dH2O(管2)中稀释混合物。

[1602] 使用1mL的管2在7mL的dH2O(管3)中稀释管2上的混合物。

[1603] 将几滴管3加入到载玻片中并用盖玻片覆盖。

[1604] 使用适当的荧光滤光器进行成像(TXRED)。

[1605] 对图像进行处理,并在ImageJ中添加红色。

[1606] 使用图像J获得费雷特直径(ferret diameter)。

[1607] 傅里叶变换红外光谱(FTIR):

[1608] 首先制备溴化钾(KBr)样品,并在烘箱中放置至少24小时,然后形成片剂。

[1609] 对KBr进行了分析,并利用它来消除背景。

[1610] 然后利用以下设置制备和分析样品:范围(起始4000.0和结束:400.0;扫描:32;分辨率:2)。

[1611] 图191显示了在脱细胞前在厨房使用食品加工机加工的MacIntosh苹果。

[1612] 图192显示了AA 136使用80℃的10%碳酸氢盐和15% H_2O_2储备溶液,每隔15分钟

进行一次浸碱总共进行60分钟。

[1613] 结果

[1614] 图193(201)显示了使用碳酸氢盐浸碱并用30% H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1615] 图194显示了使用NaOH浸碱并用30% H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1616] 图195显示了使用碳酸氢盐浸碱并用15% H_2O_2储备溶液漂白的浸碱AA的粒度分布直方图。

[1617] 三种不同Mer AA方法的单颗粒费雷特直径

[1618]

浸碱/漂白方法	平均费雷特直径（μm） μm	SD 费雷特直径（μm）
NaOH，30% H_2O_2	227.0[B]	82.8
碳酸氢钠，30% H_2O_2	267.9[A]	105.6
碳酸氢钠，15% H_2O_2	266.9[A]	76.3

[1619] SD-标准偏差;Xlstat 2014

[1620] 图196显示了在10倍放大率下用刚果红染色的浸碱AA的单细胞的荧光显微镜图像,所述AA用碳酸氢盐浸碱并用30% H_2O_2(A)和15% H_2O_2(B)储备溶液漂白。

[1621] 图197显示了与使用NaOH浸碱并用30% H_2O_2漂白的浸碱AA相比的用碳酸氢盐浸碱并用15% H_2O_2或30% H_2O_2漂白的浸碱AA的FTIR。

[1622] 图198显示了使用碳酸氢盐浸碱并用15% H_2O_2漂白的浸碱AA或使用NaOH浸碱并使用脱细胞或生苹果的浸碱AA的FTIR。

[1623] 尝试降低苹果浸碱的漂白步骤中的H_2O_2储备溶液浓度,并对最终材料进行表征。基于这些结果,可以推断用15%H_2O_2储备溶液制备的Mer AA气凝胶的产率为25%。此外,将10%碳酸氢盐与15%H_2O_2储备溶液、10%碳酸氢盐与30%H_2O_2储备溶液及1M NaOH与30%H_2O_2储备溶液进行比较,FTIR分析表明,用不同浓度的H_2O_2储备液处理的Bicarb Mer AA的化学结构相似。此外,颗粒细胞分析表明,当与Bicarb 30%和Bicarb 15%过氧化氢储备溶液相比时,NaOH-对照中的Mer AA单颗粒费雷特直径更小($P<0.05$)。此外,两种碳酸氢盐处理物在费雷特直径方面彼此之间没有差异($P>0.05$)。因此,降低漂白步骤的H_2O_2最终浓度与对照相比没有表现出任何主要差异。

[1624] 实施例22-厨房中食品级生物材料的整个制造

[1625] 在本实施例中,食品级生物材料的整个制造是在厨房里用厨房设备和食品级化学品进行的。针对可食用生物材料的步骤包括:

[1626] (A)脱细胞

[1627] (B)浸碱

[1628] (C)生物材料制造

[1629] 方法

[1630] A-脱细胞-在5天过程中进行的第1天

[1631] McIntosh苹果购自Fresh Start食品供应商。

[1632] 对生苹果进行检查,用自来水(macintosh苹果)洗涤,用0.1ml/L的氯溶液消毒(Stevanato等人,2020),并提供批次代码。

[1633] 所有厨房用具都彻底清洗。

[1634] 用剥皮机将苹果去皮,取出果核,将苹果切成四等分,并用Hobart buffalo切碎机切碎。

[1635] 在大型霍巴特立式搅拌碗中制备8L的0.1% SDS(FCC),并使用和面钩以速度1混合。

[1636] 将苹果转移到含有8L的FCC 0.1%十二烷基硫酸钠溶液(SDS)的10L搅拌碗中。

[1637] 容器上贴有标签,并标有材料和溶液的紫露草(Spiderwort)批号和有效期,以及研究人员的首字母缩写和日期。

[1638] 图199显示了在大型霍巴特立式搅拌碗中的生苹果加工。

[1639] 第2天

[1640] 24小时后,停止搅拌器,将SDS溶液倒入设置在废物容器顶部的筛子上。

[1641] 容器中充满8L的新鲜制作的食品级0.1%SDS溶液。

[1642] 容器上贴有标签,并标有材料和溶液的紫露草(Spiderwort)批号和有效期,以及研究人员的首字母缩写和日期。

[1643] 图200显示了在脱细胞过程期间在0.1% SDS中加工的苹果。

[1644] 第3天

[1645] 24小时后,停止搅拌器,将SDS溶液倒入设置在废物容器顶部的筛子上。

[1646] 容器中充满8L的新鲜制作的食品级0.1%SDS溶液。

[1647] 容器上贴有标签,并标有材料和溶液的紫露草(Spiderwort)批号和有效期,以及研究人员的首字母缩写和日期。

[1648] 第4天

[1649] 24小时后,停止搅拌器,将SDS溶液倒入设置在废物容器顶部的筛子上。

[1650] 将搅拌碗装满8L水,并倒入设置在废物容器顶部的筛子上。这个步骤重复7次,直到没有肥皂残留物为止。

[1651] 将切碎的生苹果加入到搅拌碗中新鲜制备的8L的0.1M $CaCl_2$(FCC)溶液中,并以速度1与和面钩附件混合。

[1652] 容器上贴有标签,并标有材料和溶液的紫露草(Spiderwort)批号和有效期,以及研究人员的首字母缩写和日期。

[1653] 第5天

[1654] 24小时后,停止搅拌器,将$CaCl_2$溶液倒入设置在废物容器顶部的筛子上。

[1655] 将搅拌碗装满8L水,并倒入设置在废物容器顶部的筛子上。这个步骤重复7次,利用漏勺排出多余的水,并称重进行浸碱。

[1656] B-脱细胞苹果的浸碱

[1657] 脱细胞的苹果在煤气炉上的大锅中进行浸碱,用温度探针确保浸碱温度的变化最小。溶液是手动混合的。

[1658] 在开始浸碱工艺之前,打开排气风扇并使用PPE。

[1659] 使用设置在废物烧杯顶部的筛子,手动压出脱细胞苹果中的水。对于每500g的脱细胞材料,使用2.5L的浸碱溶液。

[1660] 将脱细胞的材料放入一个干净的大锅中。

[1661] 新鲜制备10%碳酸氢钠溶液,并加入干净的锅中。将温度升高到80℃,然后加入脱细胞的苹果。

[1662] 通常,在溶液中加入脱细胞材料进行浸碱会降低温度。

[1663] 将温度升高到80℃。

[1664] 将25mL的15%过氧化氢储备溶液添加五次,总计125mL溶液。

[1665] 将溶液在锅中在80℃下手动搅拌1小时。

[1666] 反应应继续进行直到颜色消失。目标颜色为透明或灰白色。

[1667] 关闭加热,把溶液放在冰箱里冷却。

[1668] 使用pH计,用乙酸(30%)中和溶液直到pH为6.8-7.2

[1669] 记录pH值。

[1670] 将溶液通过25μl的不锈钢筛,通过将液体倒入干净的废物容器中丢弃上清液。

[1671] 将筛中的颗粒重新悬浮在水中,并再次中和。

[1672] 进行重复的中和和筛分循环步骤,直到pH稳定在6.8-7.2范围内,以便在筛分和重新悬浮后进行连续测量。

[1673] 记录最终pH和筛分循环次数。

[1674] 浸碱的苹果最后一次过筛1小时,通过粗棉布以浓缩材料。

[1675] 将材料以8000rpm离心15分钟,丢弃上清液,将颗粒转移到干净的真空袋中,并真空密封。

[1676] 含有浸碱材料的真空袋已正确贴上标签,并标有紫露草(Spiderwort)批号和有效期。

[1677] 将样品储存在4℃的冰箱中。

[1678] 图201显示了在0.1M $CaCl_2$溶液中加工的苹果。

[1679] 图202脱细胞苹果在灶台上的浸碱。

[1680] 图203显示了使用25μl不锈钢筛对脱细胞苹果的筛分。

[1681] C-支架制造

[1682] 在这个步骤中,将浸碱的苹果与组织化处理剂混合,然后交联。

[1683] 将浸碱的苹果与2%的海藻酸钠溶液(组织化处理剂)以1:1的比例混合。

[1684] 将生物材料放入硅酮模具中,用塑料包裹膜包裹模具,并放入厨房冷冻机中过夜。

[1685] 然后将冷冻样品在Buchi L-200低压冻干机中在-55℃、0.100mbar下低压冻干48小时。

[1686] 然后将生物材料在1%(w/v)$CaCl_2$二水合物(FCC)浴中在冰箱中交联过夜。

[1687] 图204显示了在灶台上制备的2%海藻酸盐溶液。

[1688] 图205显示了通过立式搅拌机得到的浸碱的苹果和2%海藻酸盐的混合物。

[1689] 图206显示了沉积到硅酮模具中的生物材料。

[1690] 图207显示了在低压冻干机中含有冷冻生物材料的硅酮模具。

[1691] 图208显示了煮熟的生物材料。

[1692] 实施例23-生物材料的烹饪方法

[1693] 在本实施例中，对生物材料的不同烹饪方法进行测试，以研究物理和感官性质的影响，包括质量产率、视觉外观和显微镜检查。

[1694] 方法

[1695] 处理物(一式两份)：

[1696] 煎炸-中火

[1697] 烘焙-350°F/40min

[1698] 真空低温烹饪-46℃/30min

[1699] 程序

[1700] 制造5％的海藻酸钠储备溶液。

[1701] 制造5％海藻酸钠溶液(3mL)、蒸馏水(4.5mL)和浸碱的苹果(7.5g)的混合物。

[1702] 混合物用0.1M $CaCl_2$交联30分钟。

[1703] 将支架带到厨房，称重，并采用3种不同的烹饪方法。

[1704] 对于煎炸方法，将支架用植物油用中火煎炸15分钟。

[1705] 对于真空低温烹饪，设置与鱼类相同-46℃/30min，然后将样品烧灼直到表面呈褐色。

[1706] 对于烘焙方法，将支架在350℃下烘焙40分钟。在该方法中，每15分钟检查一次样品直到它们被认为完全煮熟。

[1707] 在每种烹饪方法之后，对样品进行称重。

[1708] 计算产率。

[1709] 使用暗视场进行显微镜检查。

[1710] 图209显示了通过真空低温烹饪(A)、煎炸(b)和烘焙(C)烹饪的60mm海藻酸盐/merAA冰球。

[1711] 结果

[1712] 对支架进行不同烹饪方法以研究对物理和感官性质的影响，包括质量产率、视觉外观和显微镜检查。测试三种不同的烹饪方法(真空低温烹饪、煎炸和烘焙)，并对产量和显微镜检查进行分析。质量产率在各方法之间有很大差异，用具有以下数字表示：真空低温烹饪-74.29％，煎炸-59.94％，烘焙-32.87％，真空低温烹饪显示出更高的产率($p<0.05$)。结果在下表中概述。此外，在用油煎炸时观察到褐变。具体地，考虑到产率、显微镜检查和视觉特征，每种处理的亮点，对于烘焙来说：样品尺寸开始缩小，没有发生褐变，烹饪后三者的平均质量产率最低，为32.87％，样品呈不透明白色，烹饪后的冰球外表干燥，而内部仍然呈凝胶状。对于煎炸来说：冰球形状不均匀导致褐变不均匀，平均质量产率为59.94％。对于真空低温烹饪来说：真空密封和烹饪后，外观几乎没有变化，冰球呈半透明白色，在烧灼过程中出现褐变，最大平均质量产率为74.29％。所有样品在烹饪后内部呈凝胶状。

[1713] 三种不同烹饪方法的产率比较

[1714]

烹饪方法	平均产率%	SD %
真空低温烹饪	74.29[A]	4.93
煎炸	59.94[B]	4.45
烘焙	32.87[B]	8.90

[1715] SD-标准偏差;Xlstat 2014

[1716] 实施例22-食品级生物材料的感官表征

[1717] 在本实施例中,苹果加工是在厨房里进行的,脱细胞和浸碱是在实验室里进行的。目的是评估用10%碳酸氢钠和15%过氧化氢储备溶液生产的生物材料的颜色、气味和触觉特征(质地)。

[1718] 方法

[1719] • 将43个McIntosh苹果洗涤、去皮并取出果核。

[1720] • 将苹果(3.5Kg)切成四等分,并使用商用食品切碎机霍巴特(3.4kg)研磨20秒。

[1721] • 将磨碎的苹果(3.4Kg)均匀地分开,并添加到四个不同的4L烧杯中(每个烧杯850g)。

[1722] • 使用振动器(130rpm)进行脱细胞步骤。

[1723] • 对于浸碱步骤,将总计1,860g的脱细胞的苹果分到四个不同的烧杯中:2个烧杯各自含有500g的脱细胞的苹果,另外2个烧杯各自含有430g的脱细胞的苹果。所有四个烧杯用10%碳酸氢钠和15%过氧化氢储备溶液处理,并加热1小时。冰醋酸用于酸化步骤。

[1724] • 使用25μm筛代替离心步骤。使材料通过筛,直到将pH稳定/中和在6.8-7.2之间。

[1725] • 在浸碱工艺结束时,总共制造了854.5g的Mer AA 138。

[1726] 图210显示了苹果(AA138)加工。

[1727] 图211显示了加工的苹果(Mer 138)的脱细胞和浸碱。

[1728] 支架制造

[1729] • 2%的海藻酸钠(1L)是在厨房中制造的。

[1730] • 使用搅拌机(KitchenAid定制立式搅拌机-4.5Qt)以速度6将854.5g的Mer AA 138与854.5g的2%海藻酸钠溶液均质化5分钟(200mL)。

[1731] • 在这个试验中,使用了圆形、椭圆形和“鱿鱼”模具形状。

[1732] • 将模具冷冻(24小时),然后冷冻干燥(48小时)。

[1733] • 将生物材料样品交联1小时。

[1734] 图212显示了支架制造。

[1735] 感官测试

[1736] • 对于感官测试,使用了:18个“鱿鱼”模具;22个圆形模具和8个椭圆形模具。

[1737] • 用于测试的参考品为:鳕鱼(1Kg)和鱿鱼(0.7Kg)。

[1738] • 使用圆形金属模具切割相同尺寸生物材料的参考品。

[1739] • 感官测试由两个不同部分组成:第一个部分称为“戏法站”,小组成员不知道展示的两个样品中哪一个是生物材料。

[1740] • 进行了一项适应性配对比较测试,以分析小组成员在两种不同烹饪方法中正确猜测生物材料特性的能力。

[1741] • 使用的两种烹饪方法是:油炸和真空低温烹饪,然后用黄油烧灼。

[1742] • 在油炸方法中,鱿鱼被用作生物材料的配对。将两种不同的处理物在鱼汤中腌制,目的是为生物材料添加风味,深入面糊(小麦粉、大米粉、碳酸氢钠、盐、胡椒粉和巴黎矿泉水)中,油炸2分钟。然后,这两种处理物显示在有密码的盘子中,因此小组成员不知道每种处理物的标识。在这种分析中,生物材料是在“鱿鱼”模具中成型的。

[1743] • 对于真空低温烹饪处理,使用的配对是鳕鱼,鳕鱼被切成圆形,看起来与生物材料相似。将两种处理物放入真空袋中,加入鱼汤以增加生物材料的风味,将袋真空密封,并放入46℃下的真空低温烹饪机中30分钟。30分钟后,用黄油将处理物烧灼2分钟,并放入盘子中进行分析。在这种分析中,生物材料是在“圆形”模具中成型的。

[1744] • 在感官分析测试的第二部分,小组成员对生物材料、参考品(鳕鱼和鱿鱼)进行鉴定,目的是利用参考品帮助进行感官分析和描述。

[1745] • 在第二次感官测试中分析了颜色、气味和触觉特征。

[1746] • 对于每个感觉参数,都使用了两个参考品。

[1747] • 先分析生样品,然后分析煮熟的样品。始终按以下顺序从左到右:生物材料、鳕鱼和鱿鱼。

[1748] • 对于煮熟的样品,使用的烹饪方法是真空低温烹饪,使用鱼类的设置(46℃/30min)。

[1749] • 对于颜色参数,一个生样品和另一个煮熟的样品用于生物材料和参考品。对于该参数,生物材料是在圆形模具中成型的。

[1750] • 对于气味参数,将样品(生物材料、鳕鱼和鱿鱼)切成小片状物,放入带盖的杯子中。每次处理使用10个杯子,共计30个杯子。在样品之间,小组成员闻了闻咖啡粉,以清理品尝力。先分析生样品,然后分析煮熟的样品,并始终使用以下顺序:生物材料、鳕鱼和鱿鱼。对于该参数,生物材料是在椭圆形模具中成型的。对于气味,在交联之前将椭圆形生物材料切成条状。

[1751] • 对于触觉参数,两个参考品都被切成圆形,并且所有3个处理物都被放置在待分析的盘子中。还将一把刀和一把叉子与样品一起放置,以帮助小组成员更好地表征样品。

[1752] • 所有小组成员都使用了表格https://docs.google.com/document/d/1a22Kk6yrkmycCyK1g-hxJsUW2B46a0n_-8Hu7B5wJxI/edit?usp=sharing以输入经调整的配对比较猜测、感官参数描述和评论。

[1753] 图213显示了油炸生物材料(A)和鱿鱼(B)

[1754] 图214显示了真空低温烹饪、烧焦的生物材料(A)和鳕鱼(B)。

[1755] 图215显示了生生物材料(RB)、熟生物材料(CB)、生鳕鱼(RC)、熟鳕鱼(CC)、生鱿鱼(RS)、熟鱿鱼(CS)的颜色测试。

[1756] 图216显示了6个样品和研磨咖啡的气味站。

[1757] 图217显示了生的和煮熟的生物材料与鳕鱼和鱿鱼的质地比较站。

[1758] 结果

[1759] 进行感官分析小组，以深入了解Spiderwort Inc.的生物材料的感官特征以确定颜色、气味、触觉参数、味道和质地的特征。此外，分析加工过程中可能存在的任何残留风味，如SDS、$CaCl_2$、碳酸氢钠和任何酸性中和剂(乙酸、柠檬酸)，并了解各种烹饪方法如何影响产品的风味和口感。为此目的，进行了两种不同的感官分析。对于第二次分析，生物材料制造的整个过程都是在厨房里进行的。

[1760] 第一个感官测试(生物材料是利用Mer AA 138制造的)由两个不同的部分组成：第一个部分称为“戏法站”，小组成员不知道展示的两个样品中哪一个是生物材料，并进行了适应性配对比较测试。在感官分析测试的第二部分，小组成员对生物材料、参考品(鳕鱼和鱿鱼)进行鉴定，并分析了颜色、气味和触觉特征。用于第一次感官分析支架制造的Mer AA 138与生苹果相比的产率为25.13％，与脱细胞的苹果相比的产率为45.94％。在第一测试中，9名小组成员参加了测试(4名女性和5名男性，年龄在小于20岁到50岁之间)。在参与适应性配对比较测试的小组成员中，超过50％的小组成员无法获得两种烹饪方法的完美评分组合，每种烹饪处理有28.54％的错误答案。此外，可以推断烹饪处理没有效果(油炸和真空低温烹饪)。此外，为了表征颜色、气味和触觉参数(生的和熟的)，生成了词语，并选择最频繁的词语来描述参数，如下所示：

[1761] 根据结果，基线制剂有一个良好的起点。超过50％的小组成员无法获得两种烹饪方法的完美评分组合，表明了这种材料模拟肉类基质的潜力。此外，通过分析最常见的评论，可以推断添加植物蛋白对制剂有益，使材料具有更大的弹性、更自然的形状和更少的半透明颜色。

[1762] 结果在下表中概述。

[1763] 感官参数描述中流行更高的词语

[1764]

c					
原始颜色	煮熟的颜色	原始气味	煮熟的气味	原始触觉	煮熟的触觉
透明/半透明（8）	均匀颜色（6）	金属味的/涩的（5）	金属味的/涩的（5）	湿的/微湿的（6）	表层（3）

[1765]

		（4）			
多孔/气泡（5）	透明/半透明（5）	无气味（4）	无气味（4）	多汁/水分释放（3）	湿的/微湿的（3）
		甜的（2）	弱于未煮熟的（3）	湿软的/松软的（4）	多汁/水分释放（3）
				难以切割/刺穿（4）	湿软的/松软的（4）
				易以切割/刺穿（2）	易以切割/刺穿（5）

[1766] 烹饪方法描述中流行更高的词语

[1767]

烹饪方法评论	
油炸	**真空低温烹饪**
相似的气味\（2）	薯条/薯角（4）
不太有弹性/更容易切割、撕裂（4）	柔软/糊状内部（8）
相似的外观（4）	非片状（5）
完美形状（2）	相似的气味（3）
很少/很难看到生物材料（3）	

[1768] 实施例23-食品级生物材料的味觉表征

[1769] 在本实施例中，味觉用于评估用10％碳酸氢钠和15％的H_2O_2生产的生物材料的味道和质地特征。脱细胞和浸碱的所有步骤都适用于厨房。目的不仅是评估碳酸氢钠、H_2O_2和柠檬酸是否存在任何残留味道，还旨在开发新的制剂。

[1770] 方法

[1771] 脱细胞

[1772] • 对于批次AA 139，包括脱细胞、浸碱、支架制造、交联、烹饪和品尝分析的整个过程都是在厨房中使用厨房设备和FCC化学品进行的。

[1773] • 对于批次139，由于缺乏有关H_2O_2残留物的信息，1.1kg的脱细胞材料没有漂白。只有123g被漂白以测试来自新供应商的H_2O_2，并在厨房中测试这一步骤。

[1774] • 溶液(0.1％SDS和0.1M $CaCl_2$)使用和面钩在大型霍巴特立式搅拌碗中制备，并以速度1混合。

[1775] • 将42个McIntosh苹果洗涤、去皮并取出果核。

[1776] • 将苹果(3.6Kg)切成四等分,并使用商用食品切碎机霍巴特(3.4kg)研磨20秒。

[1777] • 将切碎的苹果(3.6Kg)与8L的0.1%SDS在大型霍巴特立式搅拌碗中混合,并使用和面钩以速度1混合。

[1778] • 连续3天,制备新的SDS溶液,并在混合物中用切碎的苹果代替。

[1779] • 将苹果洗涤七次,直到没有肥皂残留。

[1780] • 在洗涤步骤之后,将8L的0.1M $CaCl_2$加入到霍巴特立式搅拌机碗中,并使用和面钩以速度1与苹果混合1天。

[1781] • 在$CaCl_2$步骤之后,将苹果洗涤七次,并且将脱细胞的苹果准备好进行浸碱处理。

[1782] 图218显示了AA139的苹果切碎和脱细胞。

[1783] 浸碱

[1784] • 对于浸碱步骤,将总共1,223g的脱细胞苹果分到两个不同的锅中,并在炉子上进行:1个含有1.1kg的未接受漂白处理的脱细胞苹果,另一个含有123g的用15%的H_2O_2储备溶液进行漂白处理的脱细胞苹果。

[1785] • 用10%碳酸氢钠处理两个样品,使用适合食物的温度计控制温度,并加热1小时。柠檬酸(50%)用于中和步骤。

[1786] • 加热1小时后,将锅在冰箱中冷却15分钟。

[1787] • 使用25μm筛代替离心步骤。使材料通过筛,直到将pH稳定/中和在6.8-7.2之间。

[1788] • 中和前的漂白处理的最终pH为9.1,且未漂白处理的最后pH为8.8。

[1789] • 在pH中和后的最后筛分步骤中,使用粗棉布施加中等压力以释放过量的水。

[1790] • 在浸碱工艺结束时,总共制造了767.5g的Mer AA 139。

[1791] 图219显示了脱细胞AA 139的浸碱。

[1792] 支架制造

[1793] • 2%的海藻酸钠(1L)是在厨房中制造的。

[1794] • 对于未漂白的处理物,使用带有桨附件的搅拌机(KitchenAid定制立式搅拌机-4.5Qt)以速度6将750g的Mer AA 139与750g的2%海藻酸钠溶液均质化5分钟。

[1795] • 在这个试验中,只使用了圆形和圆顶形状(硅酮模具)。

[1796] • 将模具冷冻(24小时),然后在Buchi L-200中在-55℃、0.100mbar下低压冻干(48小时)。

[1797] • 将生物材料样品在冰箱中放置过夜的1%(w/v)$CaCl_2$浴中进行1小时交联。

[1798] 图220显示了支架制造。

[1799] 漂白AA139

[1800] • 作为参考品,AA139的一部分在浸碱过程中使用15%的H_2O_2储备溶液单独漂白,作为与未漂白的生物材料的对比。对方案不进行其他改变。

[1801] 图221显示了冷冻前漂白的MerAA139(左)和未漂白的1%海藻酸盐/AA139生物材料(右)。

[1802] 用于品尝测试的烹饪方法

[1803] • 真空低温烹饪:50℃/30min

[1804] • 烘箱:400°F/25min

[1805] • 油炸:370°F/2min

[1806] 感官测试

[1807] • 对于感官测试,使用了:21个圆形模具和3个圆顶模具。

[1808] • 用于测试的味道参考品为:

[1809] oW-自来水

[1810] oDAS-稀释的苹果炖锅

[1811] o1SB-1%碳酸氢钠

[1812] o0.5SB-0.5%碳酸氢钠

[1813] o1CA-1%柠檬酸

[1814] • 用于测试的质地参考品为:

[1815] oSB-真空低温烹饪生物材料(50℃,30min)

[1816] oSS-真空低温烹饪扇贝(50℃,30min)

[1817] oBB-烘焙生物材料(400°F,25min)

[1818] oBS-烘焙扇贝(400°F,25min)

[1819] oDFB-油炸生物材料

[1820] oDFS-油炸扇贝

[1821] oSC-松糕

[1822] oJ-果冻(14g/L)

[1823] oM-蛋白脆饼(merengue)

[1824] • 使用圆形金属模具切割与生物材料相同尺寸的参考品。

[1825] • 在品尝分析中,小组成员对生物材料和参考品进行鉴定。目的是使用参考品来帮助进行感官分析和描述。

[1826] • 对味道和质地参数进行了分析,小组成员使用了表格

[1827] https://docs.google.com/document/d/1wTtGqmYHxZxh38702WxTo_s_qLCh4SbcWnyhU2TkAd4/edit?usp＝sharing以输入味道和质地参数描述以及评论。

[1828] 结果

[1829] 在第二次感官测试中(生物材料是利用Mer AA 139制造的),小组成员对生物材料和参考品(味道和质地的不同参考品)进行了鉴定。目的是使用参考品来帮助进行感官分析以及味道和质地参数的表征。用于第二次感官分析支架制造的Mer AA 139与生苹果相比的产率为21.30%,与脱细胞的苹果相比的产率为62.71%。在第二测试中,7名小组成员参加了感官分析测试(4名女性和3名男性,年龄在小于20岁到50岁之间)。牛肉味是在采用真空低温烹饪方法的支架中观察到的最常见的味道,这可能是由于与使用黄油烧灼后可能发生的美拉德反应有关(糖上的羰基和氨基之间的反应)(Boekel等人,2006)。此外,在真空低温烹饪和油炸处理物中也注意到了鱼/扇贝的味道。油炸处理中最明显的是油/黄油,而在烤箱处理物中注意到残留的碳酸氢钠味道,这可能是由于碳酸氢盐的浓度,表明需要更多的洗涤步骤来避免这种味道。根据结果,关于风味,支架证明了有效吸收风味的能力。

[1830] 关于质地,在真空低温烹饪和油炸处理物中最引人注目的质地特征是肉质化,而在烤箱方法中则是干燥。此外,在所有三种处理物中检测到的质地参数是粘结性。油炸扇贝和生物材料是最相似的。通过分析最常见的评论,可以推断添加植物蛋白对制剂有益,使材

料具有更大的弹性、更自然的形状和更少的半透明颜色。此外，对“牛肉”口味进行更深入的调查应该对产品开发也有价值。

[1831] 图222显示了味道的感官结果-单词频率。

[1832] 图223显示了质地/口感的感官结果-单词频率。

[1833] 实施例24-支架中形成纤维以模拟肉纤维

[1834] 在本实施例中，使用不同的技术在支架中产生类似于肉类中发现的纤维的纤维，以开发出具有独特质地的产品。

[1835] 方法

[1836] 策略：

[1837] A-单向冷冻(UF)

[1838] 目的是使用单向冷冻技术来制造类似肉纤维的对准多孔。

[1839] 处理：

[1840] • 1％海藻酸钠+Mer AA(试验1)

[1841] • UF-Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)-皮氏培养皿(试验2)

[1842] • 处理物A:UF-Mer Aa:2％海藻酸钠(1:1)-inox圆柱形模具(试验3)

[1843] • 处理物B:UF-Mer AA:2％海藻酸钠(在酸性pH下用红甜菜着色)(1:1)-inox圆柱形模具(试验3)

[1844] 程序：

[1845] 试验1

[1846] • 在5天的过程中对整个罐装棕榈心进行脱细胞。

[1847] • 海藻酸钠处理:制备2％海藻酸钠(7.5g)和Mer AA(7.5g)。

[1848] • 创建了泡沫聚苯乙烯支架来接收样品。

[1849] • 将处理物置于单向冷冻机中，并在其中保持3小时。

[1850] • 单向冷冻后，将处理物转移到常规冷冻机中，并在其中保持48小时。

[1851] • 将处理物低压冻干(在-55℃下0.100mbar下)48小时，并在显微镜下观察。

[1852] 图224显示了1％海藻酸盐处理物的单向冷冻。

[1853] 图225显示了在0.7倍(左)和1.6倍(右)放大率下1％海藻酸盐生物材料在单向冷冻后的顶面显微镜图像。

[1854] 图226显示了在0.7倍(左)和1.25倍(右)放大率下1％海藻酸盐生物材料在单向冷冻后的底面显微镜图像。

[1855] 程序：

[1856] 试验2

[1857] • 使用1:1比例的2％海藻酸钠和Mer AA制备处理物，并将其倒入皮氏培养皿中。

[1858] • 对于处理物，使用20mL高度为1mm的材料。

[1859] • 将处理物置于单向冷冻机中，并在其中保持3小时。

[1860] • 单向冷冻后，将处理物转移到常规冷冻机中，并在其中保持48小时。

[1861] • 将处理物低压冻干(在-55℃下0.100mbar下)48小时，并在显微镜下观察。

[1862] 图227显示了在皮氏培养皿中的Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)的单向冷冻。

[1863] 图228显示了在单向冷冻后“在皮氏培养皿中的Mer AA:2％海藻酸钠(1:1)”生物

材料的边缘(左)和中心(右)的显微镜图像。

[1864] 图229显示了在0.7倍放大率下在单向冷冻后“在皮氏培养皿中的Mer AA:2%海藻酸钠(1:1)”生物材料的边缘(左)和中心(右)的显微镜图像。

[1865] 试验3

[1866] 程序:

[1867] • 两种不同的处理物分别使用1:1比例的2%海藻酸钠和Mer AA制备,并倒入inox圆柱形模具中。

[1868] • 在处理物B中,将2g的甜菜根粉直接添加到20mL的2%(w/v)海藻酸盐溶液中,pH在5-5.3之间。在制备具有Mer PH的混合物之后。

[1869] • 对于inox模具容器,使用30mL的混合物。

[1870] • 将处理物置于单向冷冻机中,并在其中保持4小时。

[1871] • 单向冷冻后,将处理物转移到常规冷冻机中,并在其中保持48小时。

[1872] • 将处理物低压冻干(在-55℃下0.100mbar下)48小时,并在显微镜下观察。

[1873] 结果

[1874] 图230显示了处理物A(左)、UF处理物(中间)和低压冻干生物材料(右)的生物材料制备。

[1875] 图231显示了使用1倍放大率的处理物A的纵向切口的显微镜图像。

[1876] 图232显示了处理物B的生物材料制备。

[1877] 图233显示了处理物B的单向冷冻。

[1878] 图234显示了处理物B的低压冻干生物材料。

[1879] 图235显示了1.6倍(左)和0.7倍(右)放大率下的低压冻干处理物B的显微镜图像。

[1880] 图236显示了0.7倍(左)和1.6倍(右)放大率下的交联处理物B的显微镜图像。

[1881] 单向冷冻代表了一种制造类似肉纤维的对准多孔的技术。冷冻对准是一种用于在蛋白质的水溶液或浆液中产生具有定向结构的多孔材料的技术。无机颗粒或聚合物在水中的分散与生长速度控制和冰晶取向相结合,在冰晶升华后产生单向多孔支架,留下孔(Zhang等人,2005)。聚合物的浓度以及交联剂的浓度是可以影响多孔对准和尺寸的因素(Wu等人,2010)。时间、pH和模具设备是测试的因素,以确定在Spiderwort Inc.制剂中获得对准多孔样子的纤维的最佳条件。所有测试的条件都产生了一种对准的多孔。然而,到目前为止,最好的制剂是红甜菜(10%)在2%海藻酸钠中与Mer棕榈心的混合物,酸性pH,单向冷冻4小时,并放置在inox圆柱形模具中。inox模具(模具材料)显然对水平对准的多孔的产生产生了积极影响。在UF过程中,两种制剂都被放置在inox模具中,证实贯穿所有生物材料的水平对准的多孔。在着色材料中,水平对准的多孔类纤维更为明显,并在生物材料的表面和中心被注意到。

[1882] 实施例24-天然纤维(棕榈心)到模拟肉纤维

[1883] 在本实施例中,棕榈心被用来模拟肉。

[1884] 方法

[1885] • 罐装的棕榈心是沿着纵向方向切开的。

[1886] • 在5天的过程中对棕榈心进行脱细胞。

[1887] • 将部分脱细胞的棕榈心纤维保留为用作支架中的整个纤维,并使用10%碳酸氢

钠对另一部分进行浸碱，并使用15% H_2O_2储备溶液进行漂白。

[1888] • 将脱细胞的纵向纤维(50g)与Mer PH(70g)和2%海藻酸钠(70g)混合。

[1889] • 使用搅拌机混合混合物，并将其放入两种不同的模具形状(圆形和矩形)中。

[1890] • 将生物材料冷冻48小时，然后低压冻干48小时(在-55℃下0.100mbar)。

[1891] • 冷冻的生物材料在鱼汤中使用1%$CaCl_2$交联30分钟。

[1892] • 用黄油将生物材料的每面煎炸2分钟。

[1893] 结果

[1894] 图237显示了金属模具中的浸碱/脱细胞棕榈心共混物。

[1895] 图238显示了交联前脱细胞和浸碱棕榈心的低压冻干生物材料。

[1896] 图239显示了脱细胞和浸碱棕榈心的生交联生物材料“鱼条”(左)和“扇贝”(右)。

[1897] 图240显示了脱细胞和浸碱棕榈心的熟交联生物材料“鱼条”(左)和“扇贝”(右)。

[1898] 图241显示了煮熟的棕榈心生物材料的剥皮层。

[1899] 棕榈心是一种从某些棕榈树的内核和生长芽中收获的蔬菜，具有天然纤维状外观，被广泛用作纯素食海鲜。桃棕榈(Bactris gasipaes Kunth)是一种热带棕榈，是果实和棕榈心的来源，最后一种由棕榈茎的可食用内核组成，具有以下特征：圆柱形、柔软、嫩且略带甜味。桃棕榈心是棕榈心的中心部分，分为三个部分(基底、中心和顶端)，硬度不同。中心部分被认为质量更高，是市场上最常见的罐装版本，富含纤维。中心部分的总膳食纤维含量为45.62(g $100g^{-1}$)，而纤维素、半纤维素和木质素分别为37.76、5.38和0.44(g $100g^{-1}$)。此外，在棕榈心的中心部分观察到2.21(N)的硬度和8.47(mm)的弹性(Stevanato等人，2020)。因此，来自棕榈心的罐装脱细胞纤维(棕榈心纤维)被试探性地用于模拟在肉中观察到的纤维。此外，还对棕榈心(纵向)进行了浸碱，以观察该工艺是否可以制造出未来可以使用的纤维材料。浸碱棕榈心(PH)呈现出乳白色的纤维状外观，与生扇贝相似。在Mer PH中发现的纤维在支架中不明显。

[1900] 素食产品(鱼排和扇贝)是利用脱细胞的PH纤维、浸碱PH和2%海藻酸钠的混合物精心制作的。使用上述材料制成的“鱼排”和“扇贝”显示出与目标常规产品相似的生物材料外观，并形成了类似鱼肉的片状结构。另一方面，生物材料在切口中仍然呈现松软质地可能是由于所使用的海藻酸盐的浓度。海藻酸盐(Alg)是(1→4)连接的β-D-甘露糖醛酸(M)和α-L-古罗糖醛酸(G)残基的线性共聚物，被认为是海洋褐藻(褐藻纲(Phaeophyceae))的主要结构组分。海藻酸盐与特定浓度的Ca^{2+}结合可以产生粘性或坚硬的凝胶(Yang等人，2020)。

[1901] 实施例25-使用不同类型的胶水模拟整个肌肉

[1902] 在本实施例中，海藻酸钠被用来胶合不同的支架片状物和/或层，以形成“整个肌肉”，并测试胶水在不同类型的烹饪中的功效。

[1903] 处理物

[1904] • 处理物B:UF-Mer AA:2%海藻酸盐-红甜菜(1:1):平底锅烹饪，和煮沸

[1905] • 处理物C:UF-Mer AA:2%海藻酸盐-(1:1)-5种不同的复制品:平底锅烹饪。

[1906] 程序

[1907] • 将低压冻干处理物B切成四个不同的部分，并使用2%海藻酸钠薄层作为在模拟两个“肉片状物”的两个不同的生物材料片状物中的胶水胶合在一起。

[1908] • 使用以下制剂制造处理物C:Mer AA+2% SA-1:1，分成五个不同的复制品，形成

五个不同层。将所有复制品置于60mm皮氏培养皿中，冷冻48小时。

[1909] • 冷冻步骤后，将复制品低压冻干，也使用2%海藻酸钠薄层胶合在一起。

[1910] • 两种处理物在室温下使用1% $CaCl_2$交联1小时，其中一个着色的生物材料片状物在冰箱中继续交联过夜(24小时)。

[1911] • 两种处理物都是每面用黄油平底锅烹饪1分钟。

[1912] • 将在冰箱中交联过夜的着色片状物在100℃下煮沸8分钟。

[1913] 结果

[1914] 图242显示了生物材料的制备和处理物C的各层。

[1915] 图243显示了处理物B的胶合过程和两个不同片状物的制造。

[1916] 图244显示了处理物C的胶合过程和两个不同片状物的制造。

[1917] 图245显示了1%$CaCl_2$在室温下1小时或在冰箱中24小时的交联步骤。

[1918] 图246显示了处理物B在室温下交联1小时。

[1919] 图247显示了交联(左)和平底锅烹饪处理物C。

[1920] 图248显示了平底锅烹饪过程和平底锅烹饪处理物B。

[1921] 图249显示了处理物B在冰箱中交联24小时。

[1922] 图250显示了煮沸过程和煮沸处理物B。

[1923] 利用不同类型的GRAS“胶水”代表不同的基于植物的制剂开发模拟肉类制剂的复杂结构的关键步骤。由于海藻酸盐作为食品添加剂具有独特的性质，因此它们被广泛应用于不同的食品中。最近，科罗拉多州立大学的一项研究利用海藻酸盐将牛肉片状物“胶合”在一起，并证明了这种组织化处理在常温下将片状物固定在一起的能力，使形状不规则的肉片状物重组为整个肌肉，从而生产出更有利可图的产品(Yimin等人，2018)。为此，2%的海藻酸钠被用来胶合不同的支架片状物和/或层，以形成“整个肌肉”。此外，还测试了“胶水”在不同类型烹饪中的功效。2%海藻酸钠溶液证明了将低压冻干生物材料的片状物和/或层胶合在一起的功效。此外，海藻酸钠作为胶水能够在平底锅烹饪和煮沸过程中保持胶合的支架。在平底锅烹饪中，在处理物B上没有观察到颜色变性，而在煮沸过程中观察到热变性。在处理物B的交联过程中失去了多余的颜色，但支架即使在煮沸过程中也没有失去颜色，证实了之前的试验。

[1924] 实施例26-素食制剂

[1925] 在本实施例中，使用Mer AA开发了一种基于植物的鱼排。

[1926] 方法

[1927] 处理物：

[1928] • 制剂鱼A

[1929] • 制剂鱼B

[1930] 程序：

[1931] • 罐装的棕榈心是沿着纵向方向切开的。

[1932] • 在5天的过程中对棕榈心进行脱细胞。

[1933] • 制作了一种制剂，并将其细分为两种不同的处理物：

[1934] 鱼A

[1935] o脱细胞的棕榈心

[1936] o78g Mer AA

[1937] o15g豌豆蛋白

[1938] o5mL葵花油

[1939] o9mL海藻酸钠

[1940] o1g NaCl

[1941] o1g转谷氨酰胺酶

[1942] o0.1g郁金香粉

[1943] o真空低温烹饪50℃/3小时

[1944] 鱼B

[1945] o脱细胞的棕榈心

[1946] o78g Mer AA

[1947] o15g豌豆蛋白

[1948] o5mL葵花油

[1949] o9mL海藻酸钠

[1950] o1g NaCl

[1951] o1g转谷氨酰胺酶

[1952] o0.1g郁金香粉

[1953] o0.1g郁金香粉

[1954] o冷冻24小时

[1955] o低压冻干48小时

[1956] o与1%$CaCl_2$交联

[1957] o真空低温烹饪50℃/3小时

[1958] •使用厨房搅拌机将成分均质化,并将混合物放入真空低温烹饪中。

[1959] •将鱼B面团置于真空袋内的inox模具中,并在冷冻步骤之前进行真空密封。

[1960] •在真空低温烹饪之后,两种处理物的每面都煎炸1分钟。

[1961] 结果

[1962] 图251显示了成分混合和产品制造——鱼A和鱼B。

[1963] 图252显示了真空低温烹饪处理后的鱼A。

[1964] 图253显示了平底锅烹饪和煮熟的鱼A。

[1965] 图254显示了平底锅烹饪的鱼A-横截面。

[1966] 图255显示了放置在inox模具中的鱼B。

[1967] 图256显示了低压冻干鱼B。

[1968] 图257显示了交联的鱼B。

[1969] 图258显示了在真空低温烹饪(左)之前和真空低温烹饪(右)期间真空密封的鱼B。

[1970] 图259显示了平底锅烹饪和平底锅烹饪的鱼B的横截面。

[1971] 利用脱细胞的棕榈心可以重现具有纤维状质地的素食制剂,如鱼排和鱼产品。鱼排和鱼产品的近似组成可以在水分为66.30至82.30、蛋白质为8.20至25.90、脂肪为0.1至21.0和灰分为0.96至2.85的范围内变化(Reddy等人,2012;Atanasoff等人,2013;Venugopal&Shahidi,1996)。为了模拟鱼排或鱼产品,使用脱细胞的棕榈心来再现纤维,使

用浸碱的苹果作为支架，而在制剂中添加分离的植物蛋白(豌豆蛋白)代替动物蛋白，并用葵花油代替动物油。鱼肌肉由肌质蛋白组成，如肌红蛋白、血红蛋白、球蛋白、白蛋白和各种酶，这些酶被认为是水溶性最强的酶。此外，构成鱼肌肉的其他类型的蛋白质是基质蛋白、胶原和弹性蛋白，它们是最不可溶的部分(Venugopal&Shahidi,1996)。将浸碱的苹果掺入制剂中，以便为最终产品提供更好的质地。对于鱼排项目，开发了一种制剂，并将其细分为两种处理物，在这两种处理物中，进行不同的方法来测试对最终质地的影响。然而，两种处理物都表现出相似的质地。对处理物B使用低压冻干经证实没有必要。两种不同处理物的质地与鱼产品相似，但与鱼排不同。因此，该制剂需要一种成分来增加制剂的弹性和硬度，例如利用其他类型的植物蛋白或魔芋粉。

[1972] 罐装是一种广泛应用的技术，由诸如浸泡在酸性盐水中、热处理、抽气和气密密封的工艺组合而成，它有助于食品保存和保质期提高。然而，罐装可能影响机械性质。Stevanato等人，(2020)表明，总纤维和纤维素含量下降。此外，显示棕榈心机械性质降低也降低了硬度和弹性(Stevanato等人，2020)。

[1973] 实施例27-连续进料交联

[1974] 目前的挑战是将产品的可规模化提高到商业上可行的水平。在这里，我们提出了一种连续进料交联的替代方法，该方法包括将材料挤出到交联剂浴中，以便“正在生产中”交联。当材料离开挤出机时，它可以以这种形状交联。材料通过的筛、模具或穿孔板决定了交联材料的形状。交联部分后面的散装材料保持在流体、凝胶或溶胶相中，直到它们被推入交联剂中。因此，散装材料可以储存在注射器中，或者可以输送到形状限定器和交联浴(例如泵和压板)的其他配置中。这种批量加工允许高通量材料制造。它与围绕间隔物成型和交联的逆方法是互补的。

[1975] 潜在的应用包括但不限于：包装材料、绝缘材料、密封剂(血管、胸膜、胃、肌肉、筋膜)、髓核、组织填充剂、伤口修复、半月板、设计组织、神经支架。

[1976] 方法

[1977] • 与低甲氧基果胶混合的浸碱脱细胞苹果(MerAA)。

[1978] • 制剂：7.5g的MerAA+4.5mL的水+3mL的5％(m/v)果胶。

[1979] • 生产：在路厄锁定连接的注射器中混合，通过针递送挤出到$CaCl_2$(0.1M)交联浴中或转移到压板和穿孔板挤出机(如下所示)。

[1980] 图260显示了可注射复合材料的高通量连续交联。A：可注射果胶和MerAA混合物。B：将水凝胶材料装载到用穿孔板挤出的压板中。C：挤出到交联浴中。D：所得到的具有预定形状的交联水凝胶。E：物理性质可以调节；在这里可以很容易地处理材料。F：收集并准备进行低压冻干(如果需要)。

[1981] 图261显示了连续进料交联的示意图。

[1982] 实施例28-泡沫生物材料的皮下植入

[1983] 为了测试气凝胶材料的生物相容性，进行了一项研究，将支架皮下植入Sprague Dawley大鼠的皮肤下，并在4周和12周后切除。对支架进行了细胞外显率和炎症检查。

[1984] 方法

[1985] 关键化学品和溶液

[1986] 1.由脱细胞的McIntosh苹果制成的浸碱苹果糊状物，中和的2.5％海藻酸盐

[1987] 3.氯化钙

[1988] 植入

[1989] 1.在手术植入之前,给大鼠皮下注射0.9%生理盐水和丁丙诺啡(0.05mg/kg)。

[1990] 2.使用异氟烷对大鼠进行麻醉。

[1991] 3.使用眼用液体凝胶保护眼睛不干燥

[1992] 4.老鼠从臀部到肩膀,背部两侧都被剃光

[1993] 5.使用无菌溶液对皮肤进行洗涤和灭菌。进行了四个1-2cm的切口(两个在上背部,两个在脊柱两侧的下背部)

[1994] 6.通过表皮、真皮和皮下脂肪层直到下面的肌肉制造切口。

[1995] 7.将生物材料植入每个切口(每个切口1个植入物)。

[1996] 8.对切口进行缝合,并将2%的布比卡因透皮应用于缝合部位。

[1997] 9.此外,然后将丁丙诺啡在第一次注射后4-6小时皮下施用。

[1998] 10.让大鼠恢复,然后分别在4周和12周后切除植入物

[1999] 切除手术

[2000] 1.将动物转移到安乐死箱中。

[2001] 2.当同时进行两只大鼠(两个箱子连接起来)时,将CO_2的初始流速设置为6,然后当大鼠失去知觉时增加到12。

[2002] 3.监测动物的呼吸模式。等待至少5分钟。

[2003] 4.确保呼吸停止1分钟。

[2004] 5.关闭CO_2。

[2005] 6.将大鼠从安乐死箱中取出,并将大鼠仰卧。

[2006] 7.定位剑突并在皮肤上做一个切口。

[2007] 8.刺穿隔膜。心脏应该可见。

[2008] 9.切开心脏,确保血液开始淤积。

[2009] 10.让动物俯卧,露出背部。

[2010] 11.从臀部,沿着脊椎的中心,一直切到肩膀的皮肤。剥去皮肤,切掉结缔组织。皮瓣应包含植入物/注射材料。

[2011] 12.用标尺拍下皮瓣中的材料的照片。

[2012] 13.在4周和12周后收集标本,并将其放入填充有4%PFA的50mL猎鹰管中72小时,然后放入70%乙醇,然后在4C下储存。

[2013] 14.一旦在乙醇中,将样品进行石蜡包埋、切片和用不同水平的苏木精、伊红和马森三色染色。

[2014] 15.切割连续切片并用苏木精-伊红(H&E)或马森三色染色(MT)染色。

[2015] 图262显示了皮下植入4周后4倍和10倍切除的定向冷冻支架-HE(A、B)和MT(C、D)。

[2016] 图263显示了皮下植入12周后4倍和10倍切除的定向冷冻支架-HE(A、B)和MT(C、D)。

[2017] 图264显示了在0.9%无菌盐水溶液中进行手术皮下植入之前的气凝胶材料。

[2018] 图265显示了Sprague Dawley大鼠在缝合前将气凝胶材料皮下植入其各自的部位。

[2019] 结果显示,在植入材料的周围和中心,细胞对支架材料有显著的渗透性。与4周相比,在12周后切除的植入物中也可以看到更多的细胞。此外,没有发现明显的炎症,因此表明移植可接受。

[2020] 图266显示了皮下植入4周后4倍和10倍切除的非定向冷冻气凝胶支架-HE(A、B)和MT(C、D)。

[2021] 图267显示了皮下植入12周后4倍和10倍切除的非定向冷冻气凝胶支架-HE(A、B)和MT(C、D)。

[2022] 将非定向冷冻支架切成5μm厚的切片,并用H&E和MT染色。与定向冷冻支架类似,染色显示支架在整个研究期间都保留在其植入部位,并显示早在4周血管形成为天然组织。纤维蛋白密封剂似乎已经降解,并且还存在胶原沉积。

[2023] 与定向冷冻的支架相比,明显有更多未被支架或细胞占据的开放空间。因此,尽管与4周相比,12周后细胞浸润的量更明显,但仍明显少于定向冷冻支架。这表明纤维素支架为细胞浸润和迁移到组织中提供了明显更好的支撑结构。

[2024] 实施例29-脊髓植入

[2025] 考虑到气凝胶的高度多孔性和结构线性,可以想到本文描述的气凝胶将适用于脊髓损伤修复。进行了小规模横断损伤研究,评估支架的有效性和生物相容性。在这里,定向冷冻的气凝胶支架被植入大鼠横断的脊髓中。这样做是为了确定该材料是否能为轴突再生提供合适的支撑结构。将生物材料植入大鼠体内4周和12周。在Sprague Dawley大鼠中,在T9-T10之间诱导完全的脊髓横断,并使其顶死10分钟。测量与顶死的距离,并将适当尺寸的气凝胶支架切割成一定尺寸,然后在切割端之间植入。

[2026] 方法

[2027] 如前所述,用Pelletier设备定向冷冻支架,然后在氯化钙溶液中低压冻干和交联。灭菌后,从较大的样品中凿除4mm的片状物,产生圆柱形样品。支架在1倍无菌PBS溶液中被带到手术室,并在手术植入前在0.9%盐水溶液中洗涤。

[2028] 关键化学品和溶液

[2029] 由脱细胞的McIntosh苹果制成的浸碱苹果糊状物,中和的5%海藻酸盐

[2030] 氯化钙

[2031] 横切面

[2032] 1.使用解剖显微镜,定位脊髓周围的层。

[2033] 2.用细鼻镊,只捏住脊髓周围的硬脑膜,然后轻轻抬起。

[2034] 3.另一只手用显微剪在硬脑膜上做一个小切口,垂直切开,露出所需的脊髓部分。

[2035] 4.暴露后,使用脊髓钩抬起所需的脊髓区域

[2036] 5.使用垂直于脊髓的显微剪,在脊髓上做一个横向切口,然后释放器械。用一小块无菌凝胶泡沫止血,记录使用了多少块,以便取出相同数量。

[2037] 6.在测量端部之间的距离之前,让横切脊髓顶死10分钟。

[2038] 7.测量切割端和切割支架之间的距离,使其达到所需长度。

[2039] 植入

[2040] 1.准备相同尺寸的生物材料进行植入(保持无菌条件)。

[2041] 2.将生物材料置于无菌盐水溶液中,并靠近手术区域

[2042] 3.将生物材料放置在脊髓横切端之间,确保没有多余的碎片残留

[2043] 4.一旦生物材料被正确插入,使用制备的市售纤维蛋白Tisseel密封剂(Cat# 1503152,Baxter)将其密封到脊髓末端。

[2044] 5.通过组装duploject系统并将组合的密封剂溶液直接喷射到伤口部位来涂抹纤维蛋白密封剂。

[2045] 6.让密封剂交联3-4分钟,然后开始闭合切口部位。

[2046] 灌注和切除

[2047] 1.设置灌注设备,通过冲洗管路并确保没有空气滞留来准备泵

[2048] 2.打开手术台上的排风罩和冷水

[2049] 3.调整桌子的面板,形成一条沟,让老鼠仰卧而不动

[2050] 4.停止泵,然后在管内放置止血夹

[2051] 5.将封闭式管转移到冷冻的0.9%肝素化盐水25U.I/mL罐中

[2052] 6.只有当管浸没在盐水管线下方时,才能松开止血夹,以确保管中没有气泡。

[2053] 7.将10号针连接到灌注泵的外管上

[2054] 8.冲洗系统4分钟,以确保管中有0.9%肝素化盐水

[2055] 9.使用早晨的重量,在带有23号针的(目录号)10Cc注射器中抽取必需体积的安乐死(750mg/kg)。

[2056] 10.用“卷饼技术”抓住动物,将动物放在一条粗麻布巾的中心,然后把每一面都叠在动物身上,然后轻轻抓住毛巾的外侧抓住动物,确保脊椎得到支撑。

[2057] 11.将安乐死注射到动物右侧最靠近脐部中线的位置(见图3)。

[2058] 12.将动物放回笼子里进行监测。动物应该在大约20分钟内开始死于安乐死,脚趾被捏时变得毫无反应。

[2059] 13.将动物仰卧放在两个面板之间的尸检罩中。

[2060] 14.进行最后一次捏脚趾,以确认没有反应。

[2061] 15.迅速用止血钳将腹部皮肤向上拉,用剪刀从腹部一直剪到胸骨,露出膈肌。

[2062] 16.切开膈肌和肋骨,直到前肢的肩关节。

[2063] 17.抬起胸骨,放在大鼠前臂的后面。

[2064] 18.切开围心膜,露出心脏。

[2065] 19.将一根10号针插入左心室底部,直到针斜面末端,然后用止血钳夹住针

[2066] 20.打开泵。

[2067] 21.用手术剪刀剪下心脏的右心房。

[2068] 22.用冷冻肝素化盐水继续灌注12.5分钟。

[2069] 23.记录肝脏颜色从深红色变为棕色的时间

[2070] 24.停止泵,然后在管内放置止血夹

[2071] 25.将封闭的管从盐水烧杯中提起至PFA储液罐。在管通过PFA的水管线之前,不要拆除止血钳

[2072] 26.打开泵13分钟(额外的半分钟用于管中剩余的盐水)。

[2073] 27.动物将开始从PFA溶液中抽搐。大约13分钟后,身体应该僵硬。

[2074] 28.从动物身上取下10号针,用水冲洗系统。

[2075] 29.将动物从通气罩中带到尸检台。

[2076] 切除

[2077] 1.动物的脊柱和头骨被从剩下的组织中切除。

[2078] 2.从剩余的脊柱和头骨中取出剩余的结缔组织和肌肉组织

[2079] 3.从吻端开始,将截骨器(bone snapper)插入椎孔,将脊柱剪断至后突。

[2080] 4.脊柱的背侧面逐渐向上抬起,露出下一个要切割的尾椎骨。

[2081] 5.进行椎板切除术,直到到达初始损伤部位T8-T9。

[2082] 6.脊柱被完全切除

[2083] 7.小心地将脊髓从剩下的脊柱上抬起,切断周围神经

[2084] 8.然后将整个脊髓放入填充有4%PFA的50mL猎鹰管中72小时,然后放入70%乙醇,然后在4C下储存

[2085] 9.一旦在乙醇中,将样品进行石蜡包埋、切片和用不同水平的苏木精、伊红和马森三色染色。

[2086] 图268显示了在0.9%无菌盐水溶液中植入之前的定向冷冻支架。

[2087] 图269显示了植入Sprague Dawley大鼠脊髓中的定向冷冻支架。

[2088] 实施例30-骨再生

[2089] 在本实施例中,还检查了气凝胶支架作为骨组织再生的支持材料的能力,在大鼠临界尺寸双侧缺损模型中支持周围组织的复钙。在这里,环锯术被用来在Sprague Dawley大鼠的头盖上产生两个直径5mm的孔。一旦骨缺损被切除,气凝胶制剂就被放置在缺损内。缝合覆盖的皮肤,让大鼠恢复4至8周的时间。在每个时间点采集样本,并进行计算机断层扫描(CT扫描)。

[2090] 方法

[2091] 关键化学品和溶液

[2092] 由脱细胞的McIntosh苹果制成的浸碱苹果糊状物,中和的5%海藻酸盐

[2093] 氯化钙

[2094] 植入

[2095] 1.对大鼠进行麻醉准备,并施用异氟烷直至观察到无意识

[2096] 2.然后将大鼠转移到准备区,通过注射器施用生理盐水,并在眼睛上施用泪液凝胶以减少角膜干燥。

[2097] 3.从眼睛之间的鼻梁到头骨尾端,头顶被剃光,然后毛皮用吸尘器吸掉。

[2098] 4.然后将大鼠转移到手术区域并固定在立体定向设备上。

[2099] 5.用水清洗皮肤,并用氯己定灭菌。

[2100] 6.生物材料在无菌盐水中放在尺子旁边拍照。

[2101] 7.将环锯固定在钻头上,并放置在手术区域旁边

[2102] 8.一旦研究人员穿上无菌长袍和手套,就用手术刀从鼻骨到中矢状嵴的尾部,沿着头皮上的骨膜切开。

[2103] 9.使用5.5mm的alm牵开器,将皮肤暴露在下面的骨骼中。

[2104] 10.骨膜沿着矢状中线向下被切开。

[2105] 11.用无菌棉签清洁骨头,

[2106] 12.在无菌生理盐水的持续冲洗下,在1500rpm下,用5mm的环锯对左顶骨进行评分

[2107] 13.随着升降机叶片在缺损边缘周围周向移动,通过施加温和的压力来完成缺损

[2108] 14.升降机叶片用于向下滑动以取出骨头

[2109] 15.右侧骨头也同样被取出

[2110] 16.一名非无菌研究人员将生物材料带到手术区,并按照指示放置它们

[2111] 17.仔细地将每一种生物材料放置在每一块顶骨的缺损处。

[2112] 18.生物材料放在尺子旁边拍照。

[2113] 19.移除alm牵开器,并使用间断缝线闭合切口。

[2114] 20.将布比卡因施加到缝线,并将大鼠转移到回收站。

[2115] 切除

[2116] 在允许大鼠恢复所需的时间(例如8周)后,收集样品并用计算机断层扫描(CT)进行扫描。然后还进行了组织学检查。

[2117] 1.将动物转移到CO_2安乐死箱中,并设置合适流速

[2118] 2.在至少5分钟后,并且已经确定大鼠停止呼吸至少一分钟,将其从盒子中取出。

[2119] 3.检查生命体征,进行开胸手术,然后放血

[2120] 4.将老鼠肚皮朝上放置,抬起颅骨上方的皮肤,用剪刀剪掉,露出植入物

[2121] 5.用手术刀切除颅骨两侧的肌肉

[2122] 6.然后,用钻头将颅盖的前部与头骨的其余部分切断

[2123] 7.然后用镊子将颅盖提起,从下面切掉组织。

[2124] 8.移除后,在颅盖左下角制作一个小切口,以指示样品的方向性,并拍摄环钻区域内植入物的照片

[2125] 9.然后将颅盖放入装有福尔马林溶液的试管中72小时,然后加入70%乙醇,然后在4C下储存。

[2126] 10.一旦在乙醇中,样品就被输送用于CT扫描。每个样品旋转180°,每0.7°成像一次。

[2127] 图270显示了手术植入颅骨缺损之前的气凝胶生物材料。

[2128] 图271显示了植入了与海藻酸盐和氯化钙交联的气凝胶材料的Sprague Dawley大鼠。

[2129] 图272显示了8周前植入气凝胶材料后切除的Sprague Dawley大鼠的切除颅骨伴颅骨缺损的CT扫描。

[2130] 已经通过实施例描述了一个或多个说明性实施方案。本领域技术人员将理解,在不脱离权利要求所限定的本发明范围的情况下,可以进行许多变化和修改。

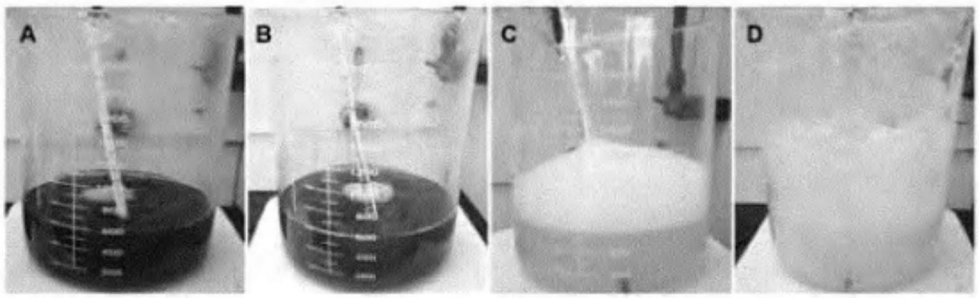


图1

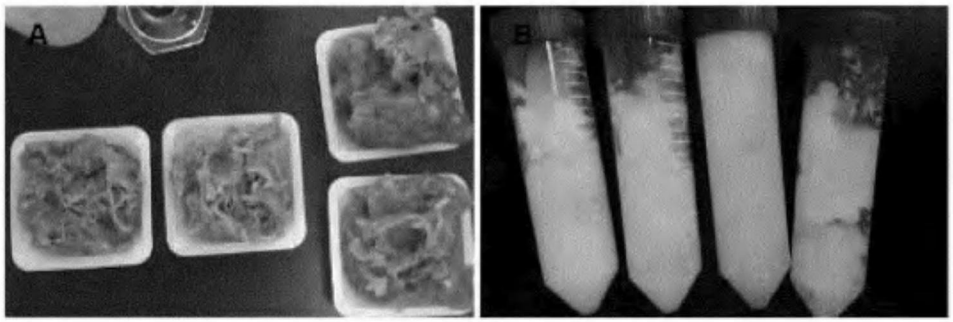


图2

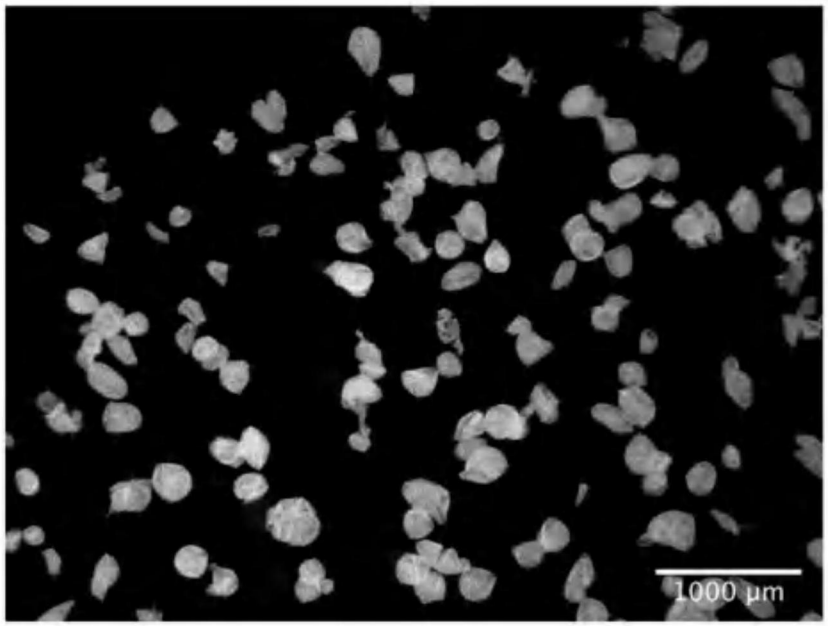


图3

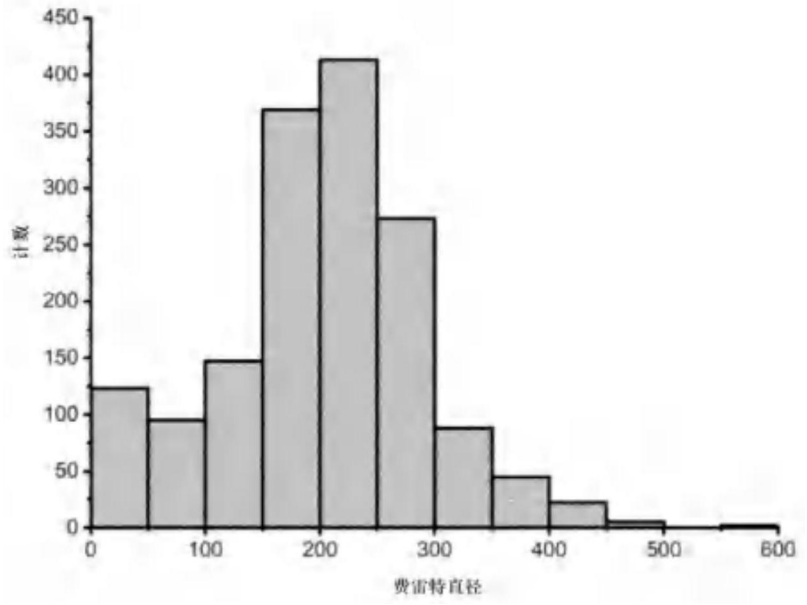

计数
费雷特直径
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
0
100
200
300
400
500
600

图4

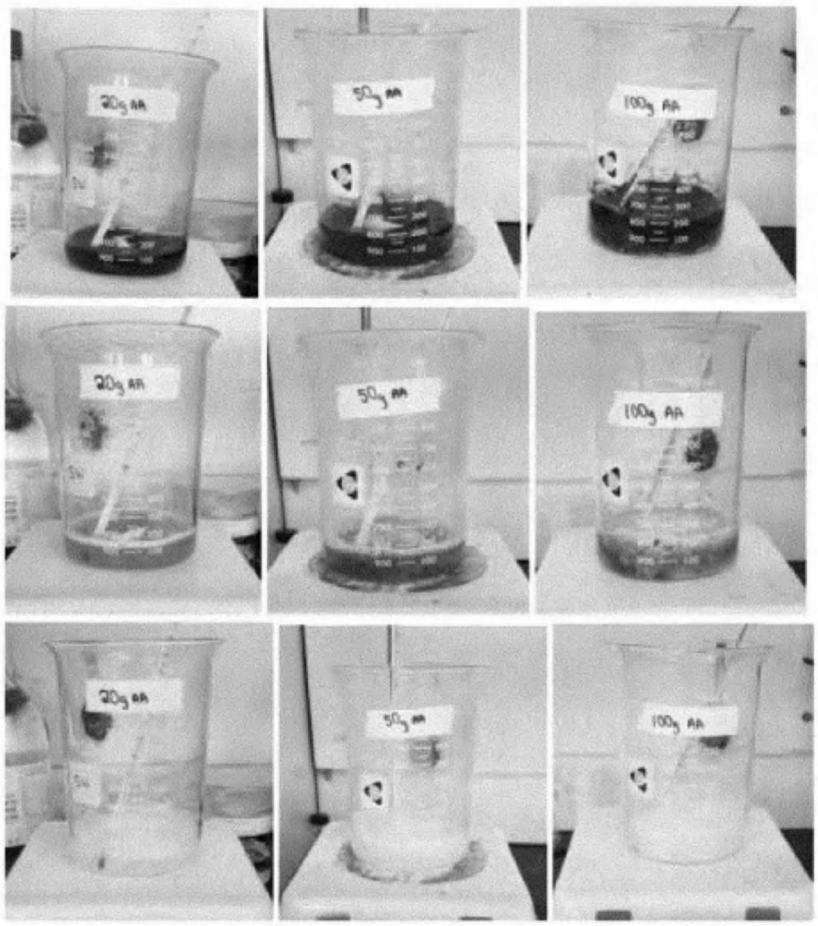

20g AA
50g AA
100g AA
20g AA
50g AA
100g AA
20g AA
50g AA
100g AA

图5

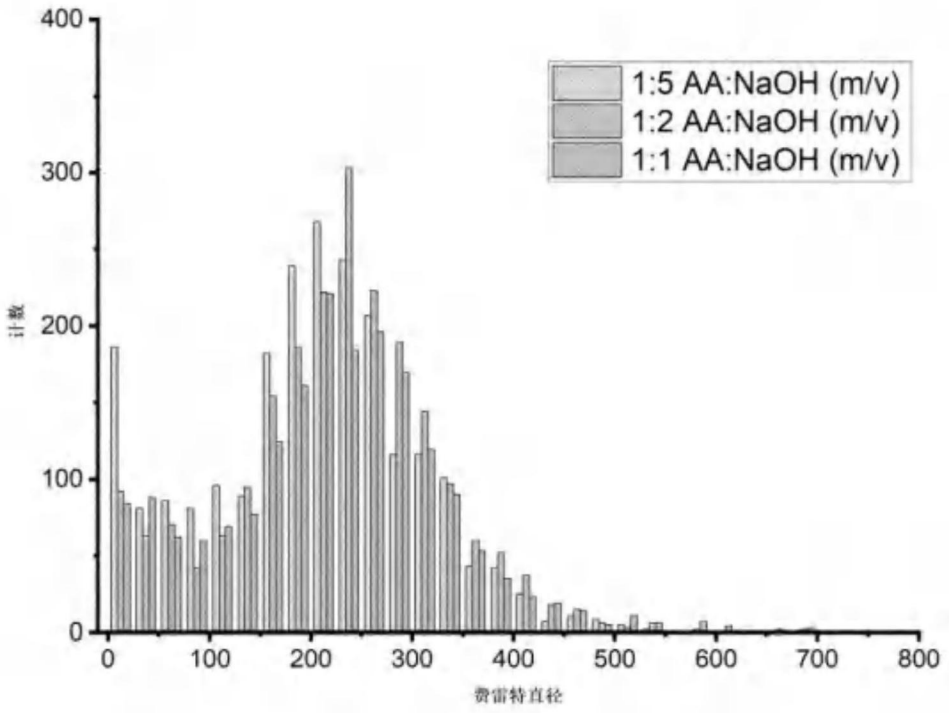

1:5 AA:NaOH (m/v)
1:2 AA:NaOH (m/v)
1:1 AA:NaOH (m/v)
计数
费雷特直径
0
100
200
300
400
500
600
700
800

图6



图7

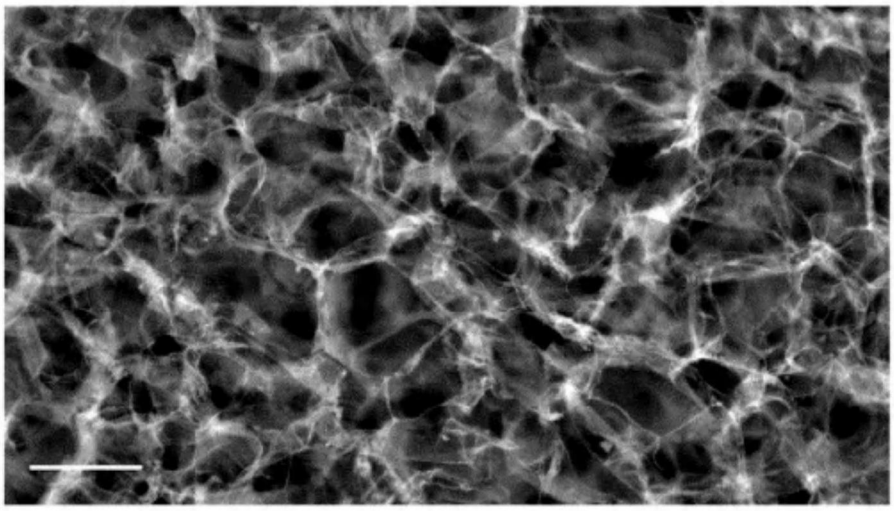


图8

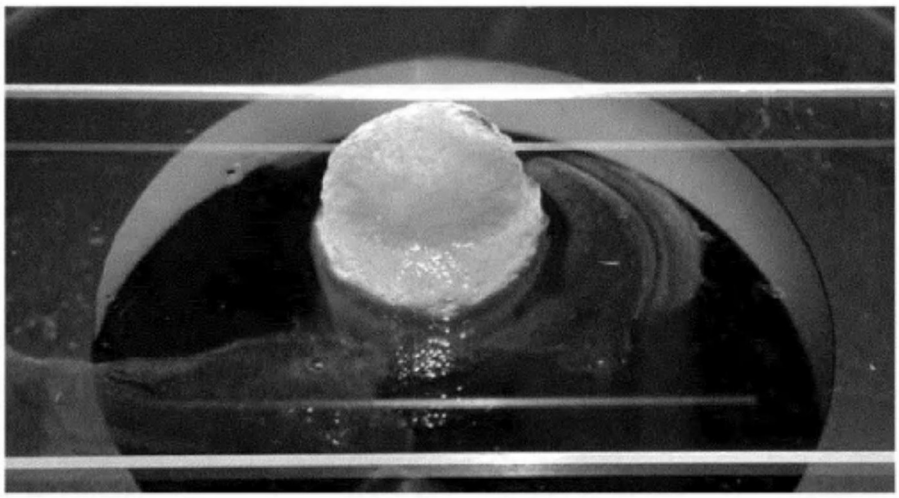


图9

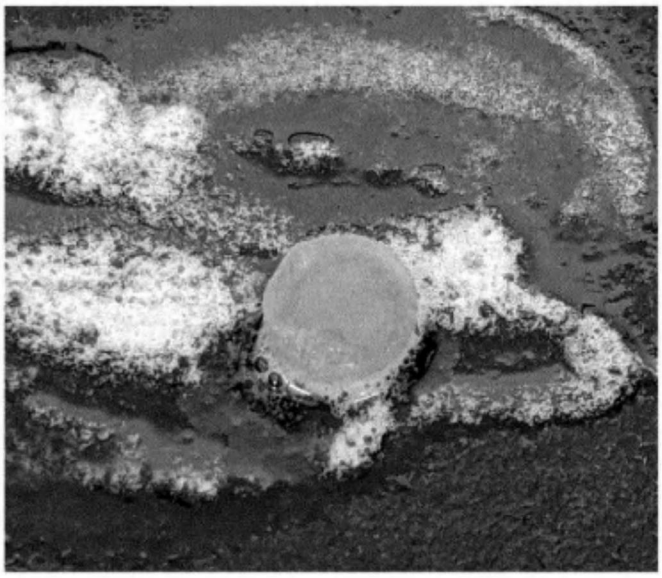


图10

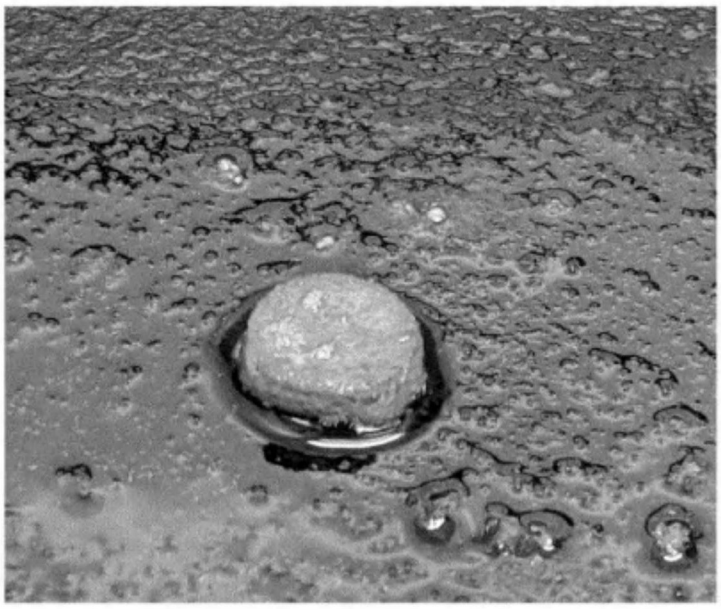


图11

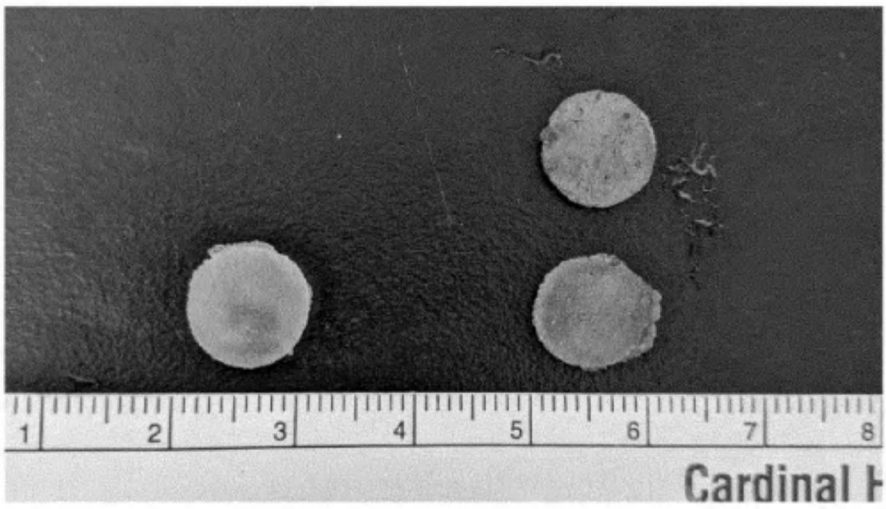


图12

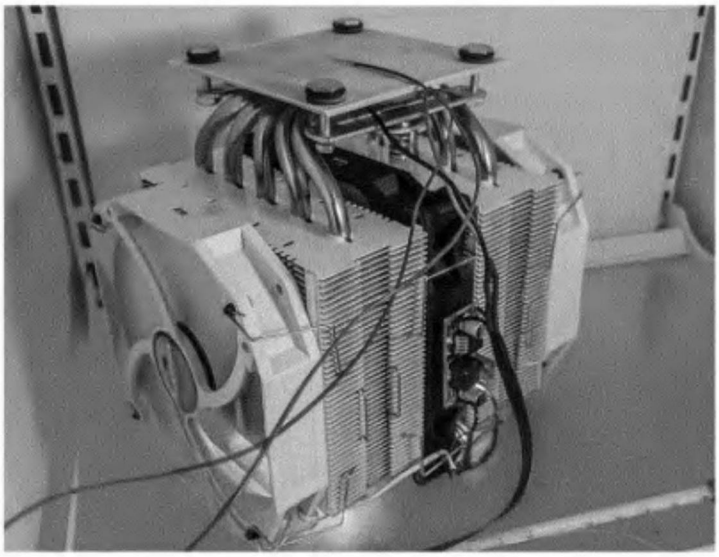


图13

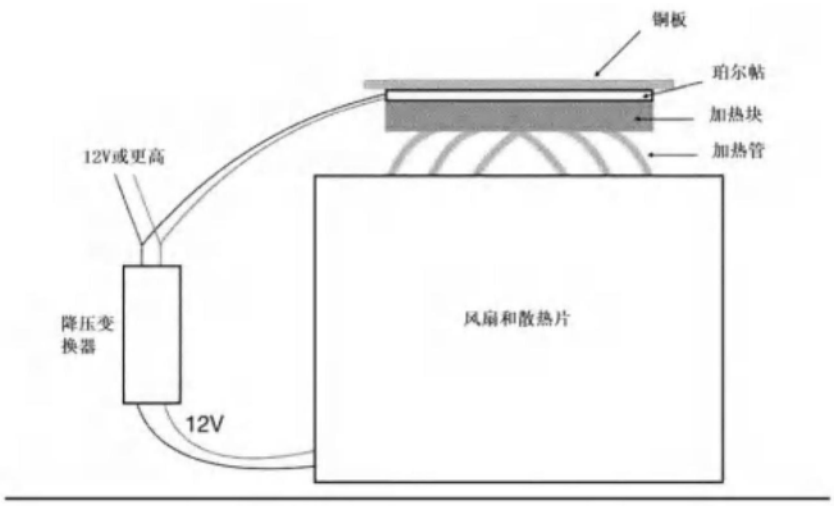


图14

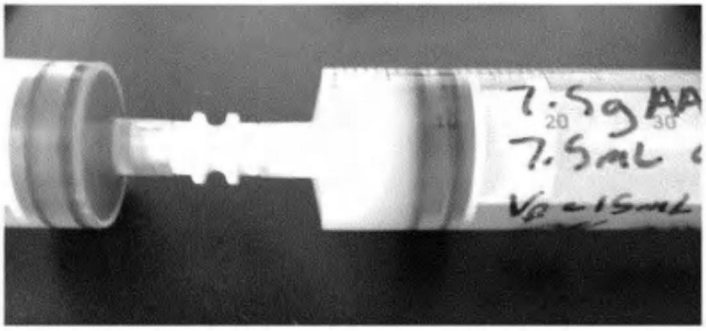


图15

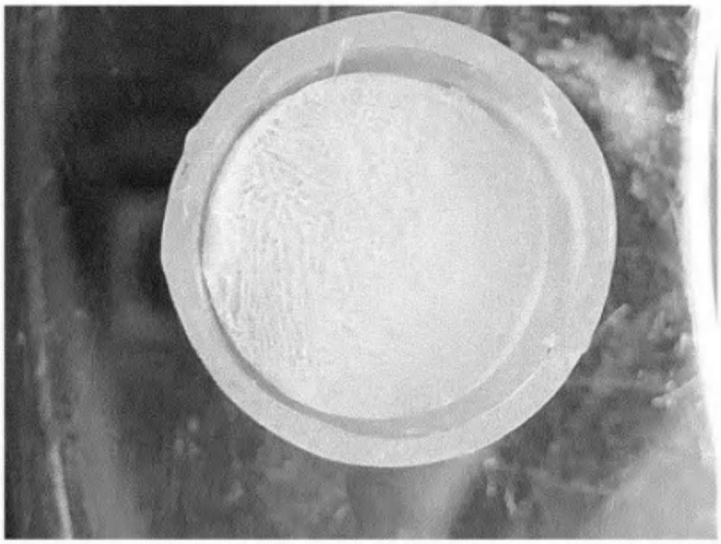


图16

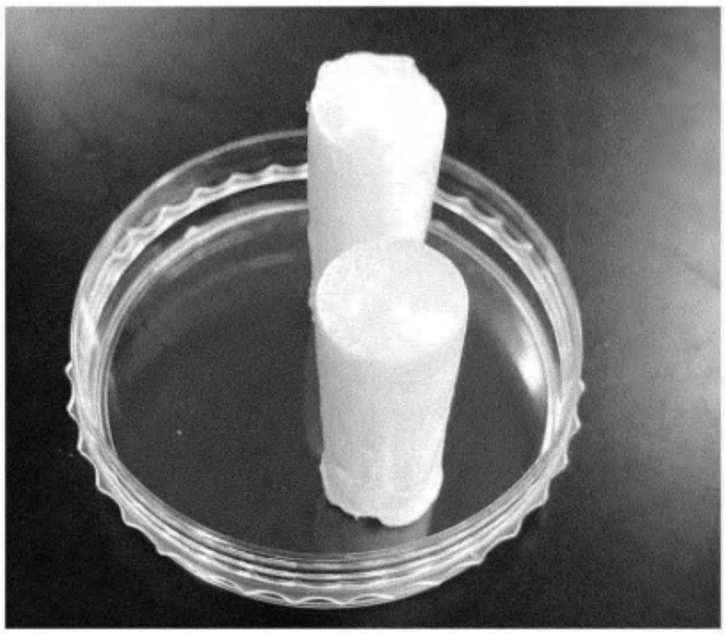


图17

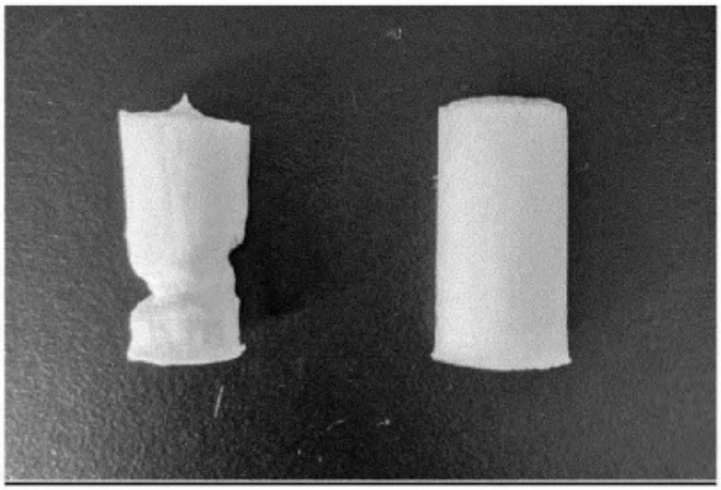


图18

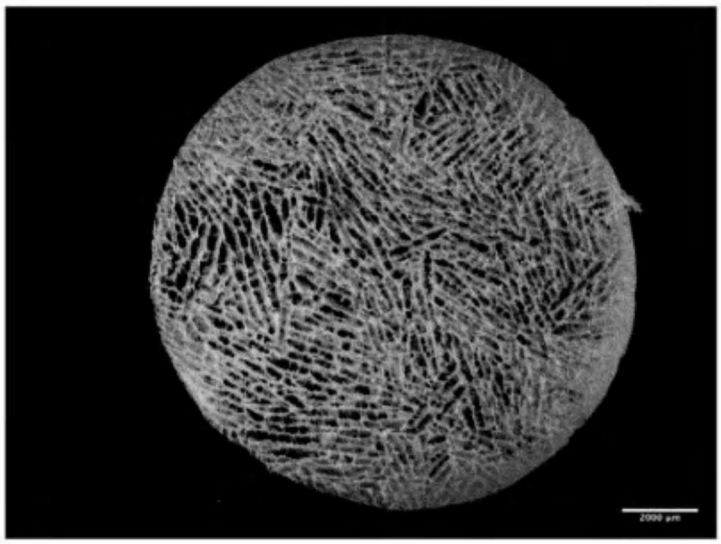


图19

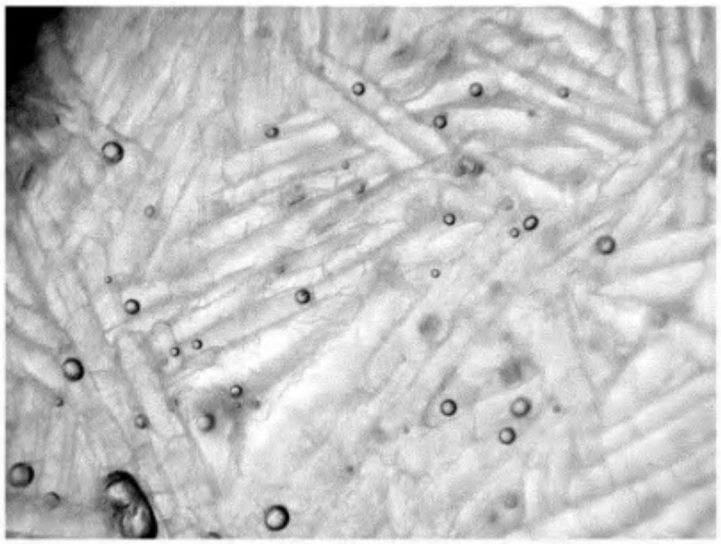


图20

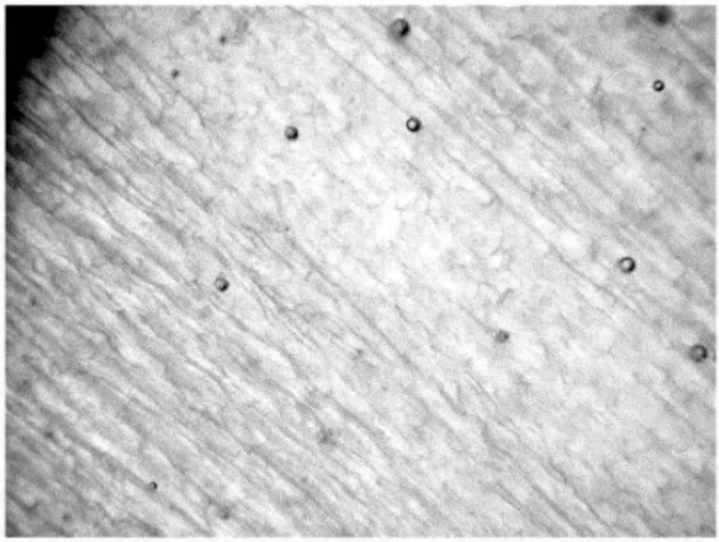


图21

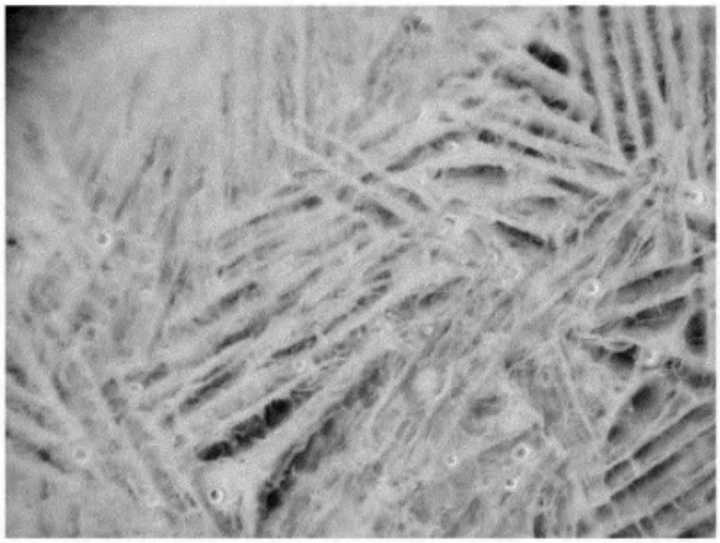


图22

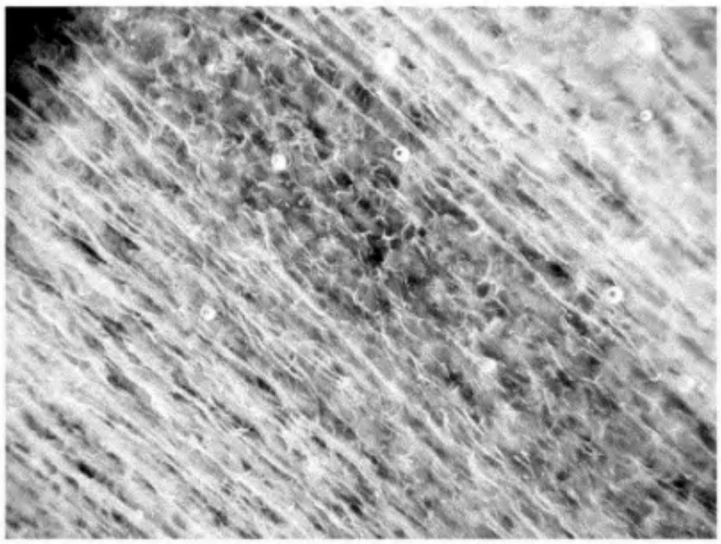


图23

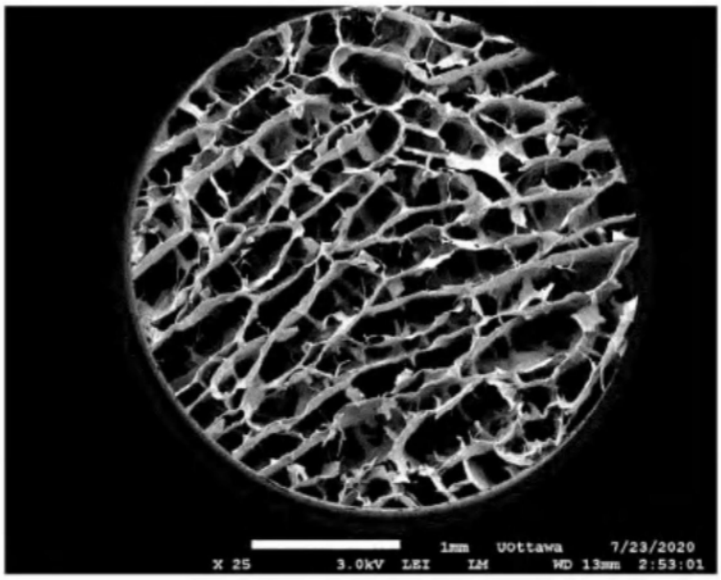


图24

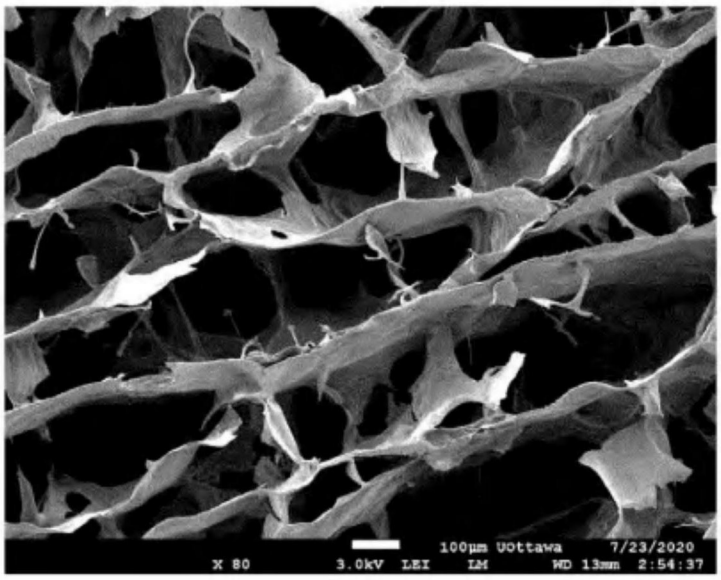

100µm Uottawa 7/23/2020
X 80 3.0kV LEI LM WD 13mm 2:54:37

图25

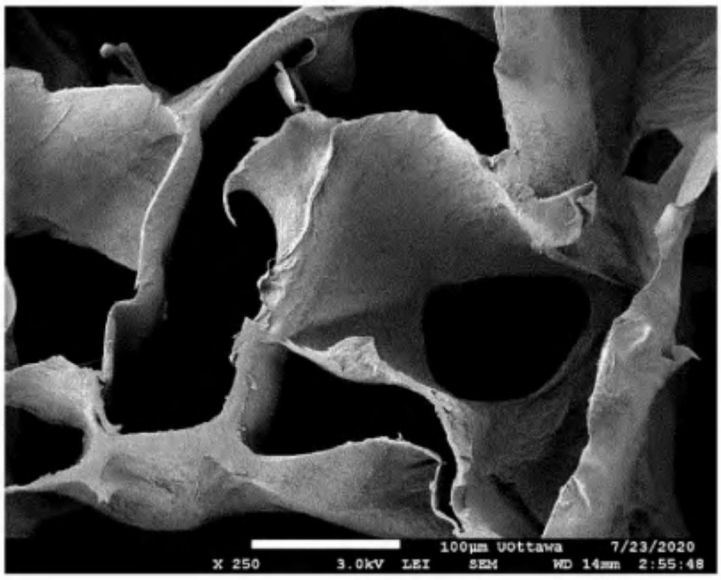

100µm Uottawa 7/23/2020
X 250 3.0kV LEI SEM WD 14mm 2:55:48

图26


10μm Uottawa 7/23/2020
X 400 3.0kV LEI SEM WD 14mm 2:57:17

图27

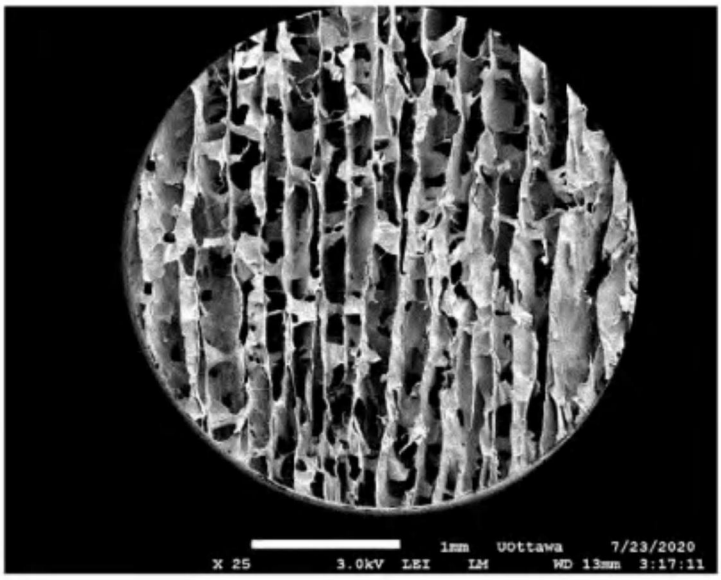

1mm Uottawa 7/23/2020
X 25 3.0kV LEI LM WD 13mm 3:17:11

图28

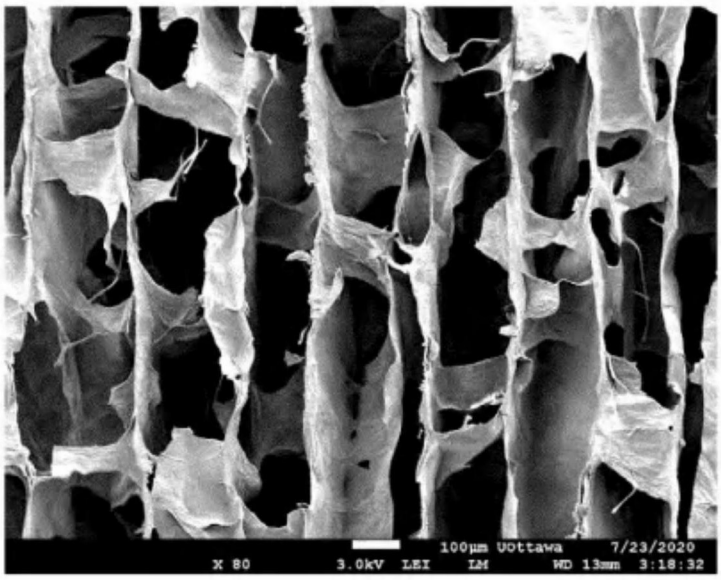

100µm Uottawa 7/23/2020
X 80 3.0kV LEI LM WD 13mm 3:18:32

图29

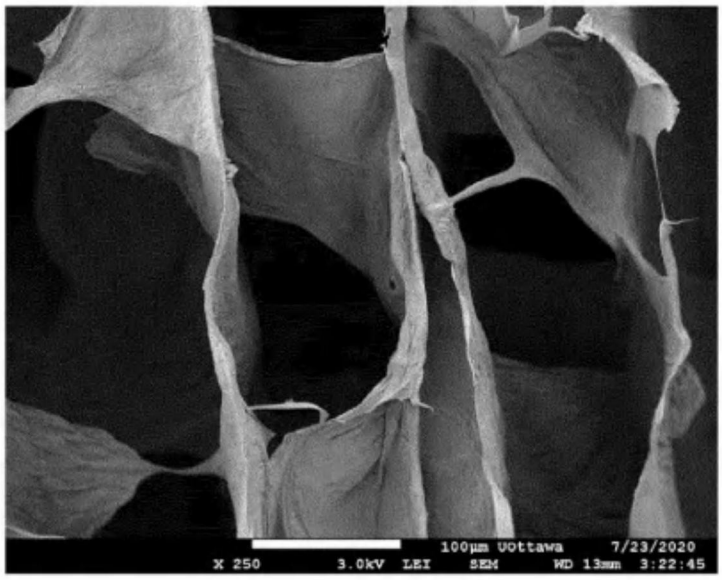

100µm Uottawa 7/23/2020
X 250 3.0kV LEI SEM WD 13mm 3:22:45

图30



图31

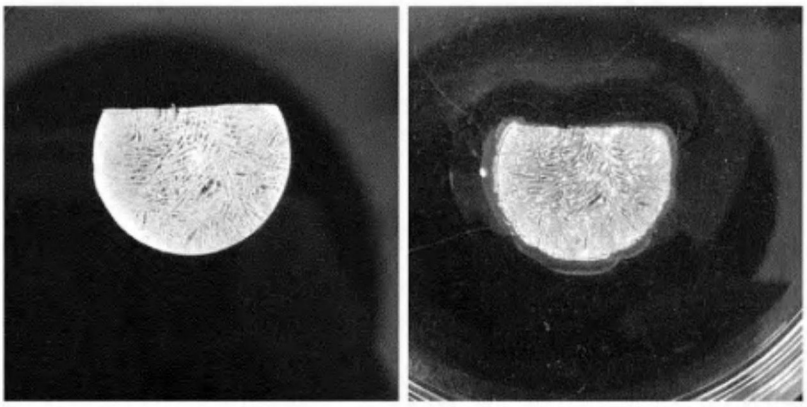


图32

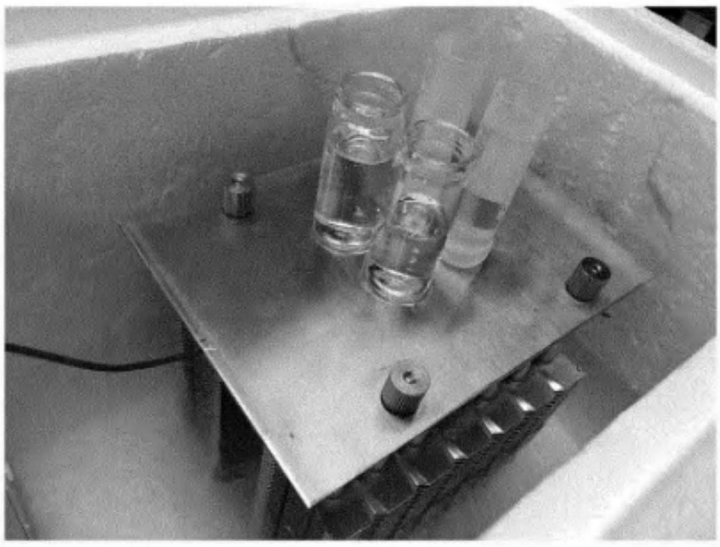


图33

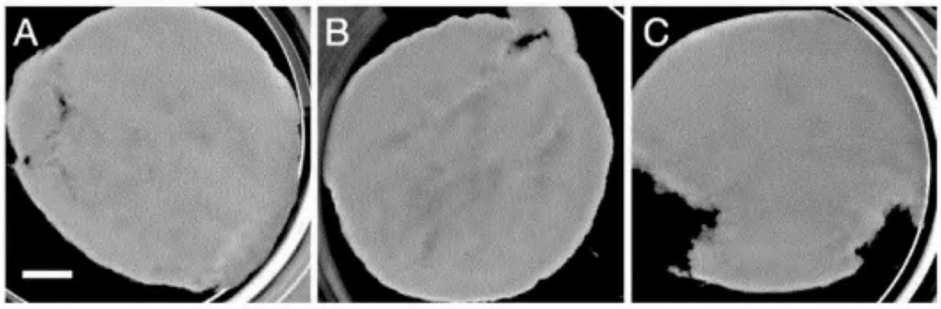


图34

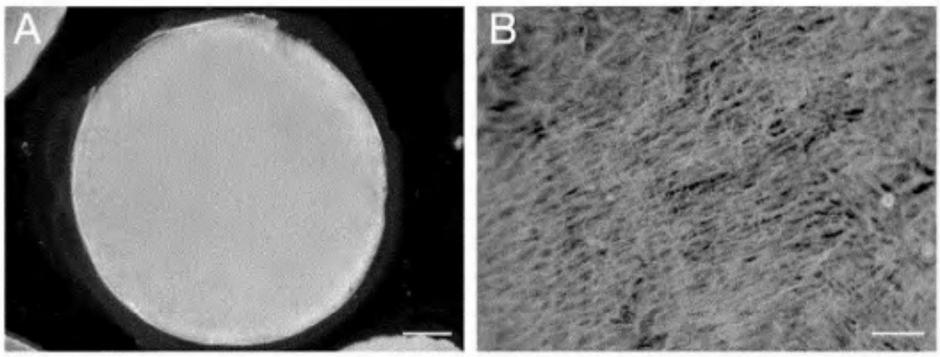


图35

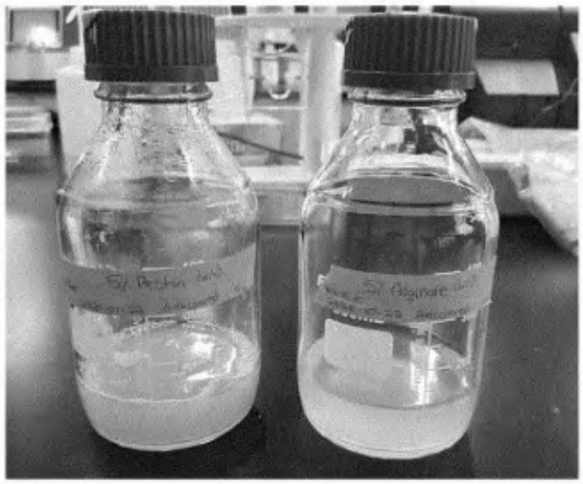


图36



图37

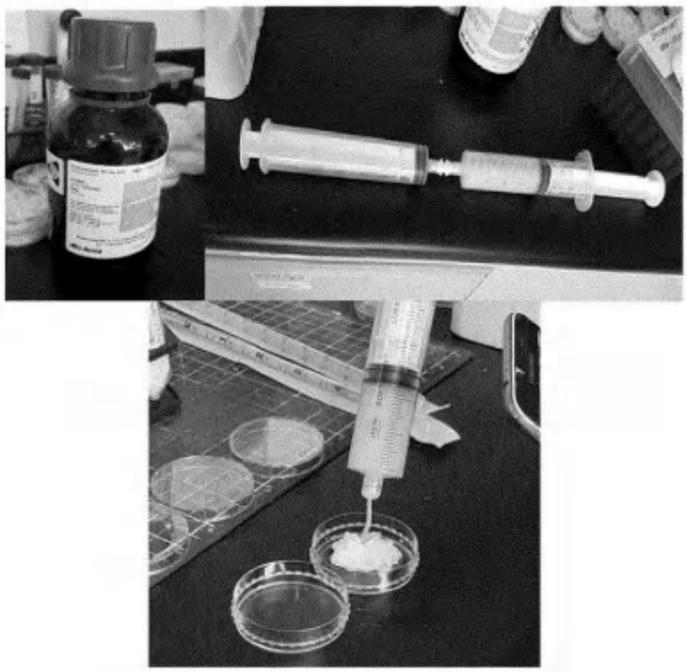


图38

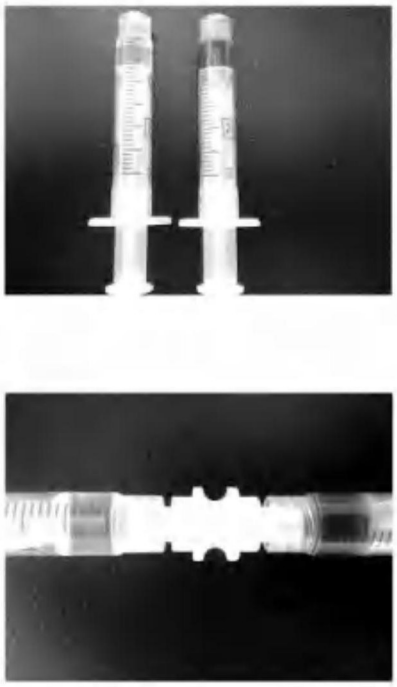


图39

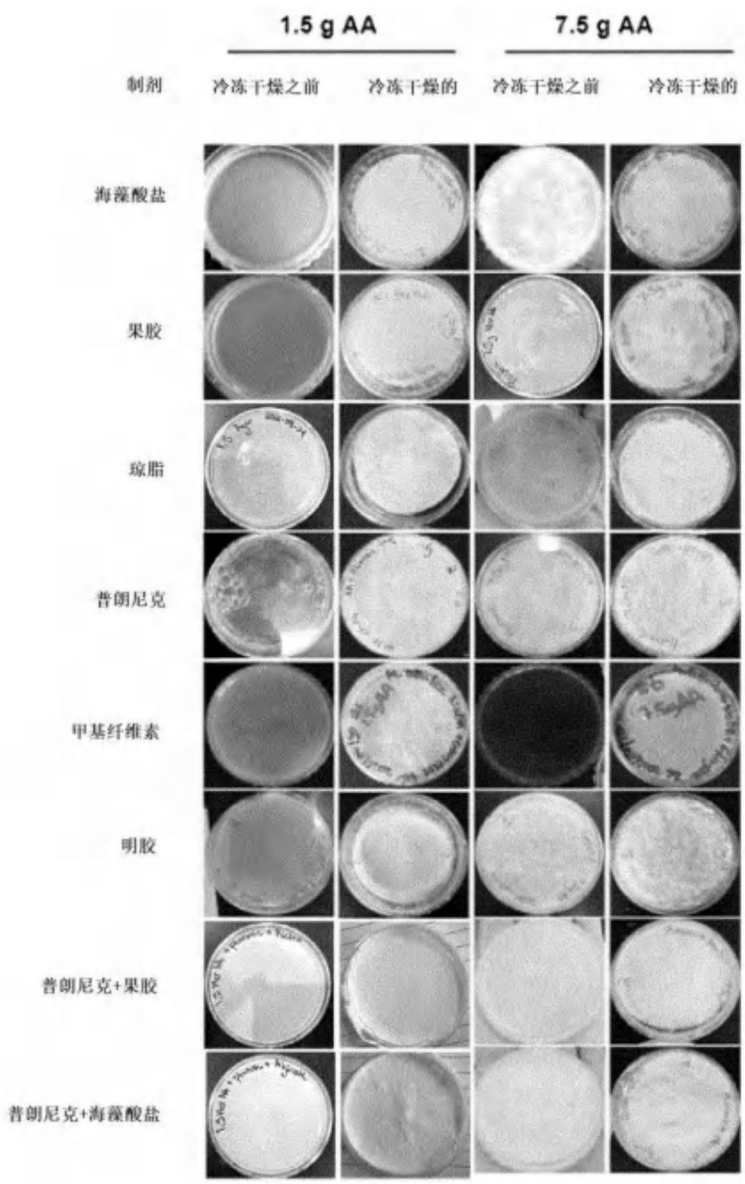

1.5 g AA
7.5 g AA
制剂
冷冻干燥之前
冷冻干燥的
冷冻干燥之前
冷冻干燥的
海藻酸盐
果胶
琼脂
普朗尼克
甲基纤维素
明胶
普朗尼克+果胶
普朗尼克+海藻酸盐

图40

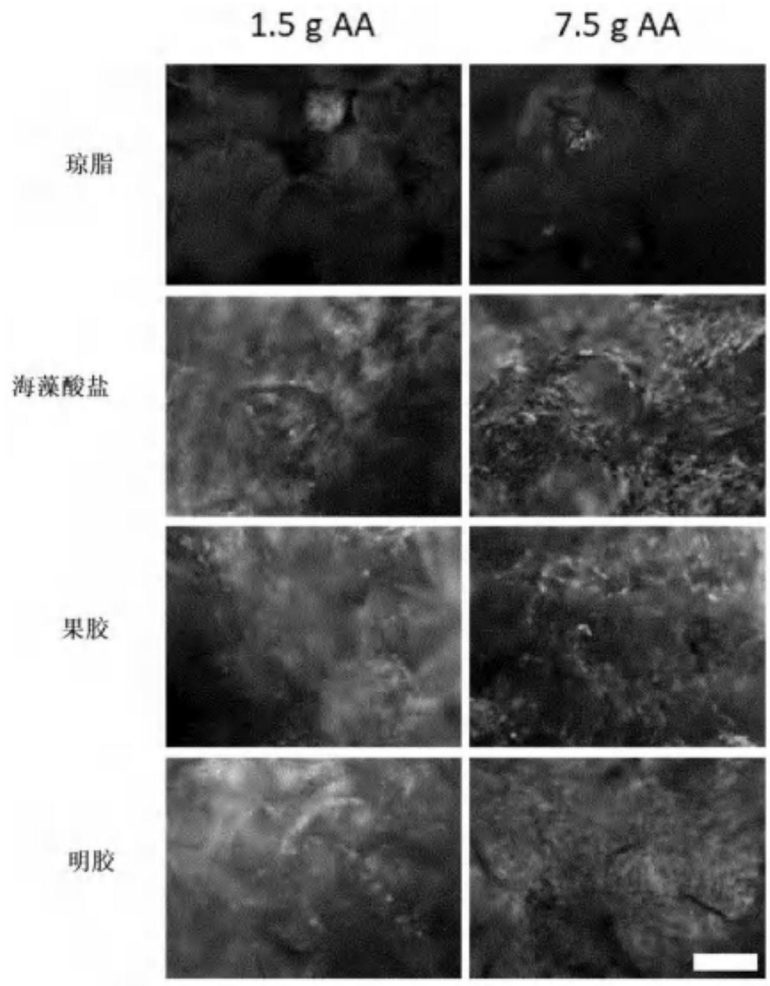


图41

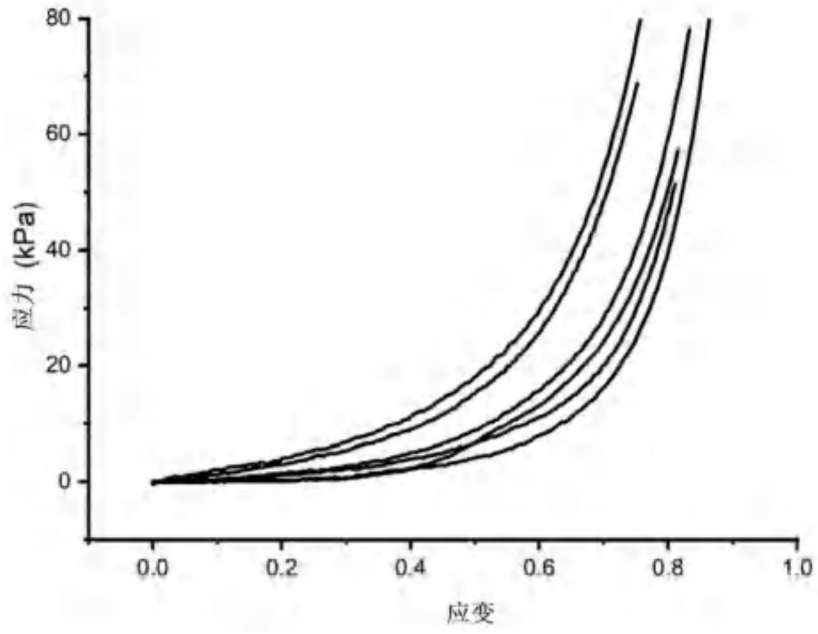

80
60
40
20
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图42

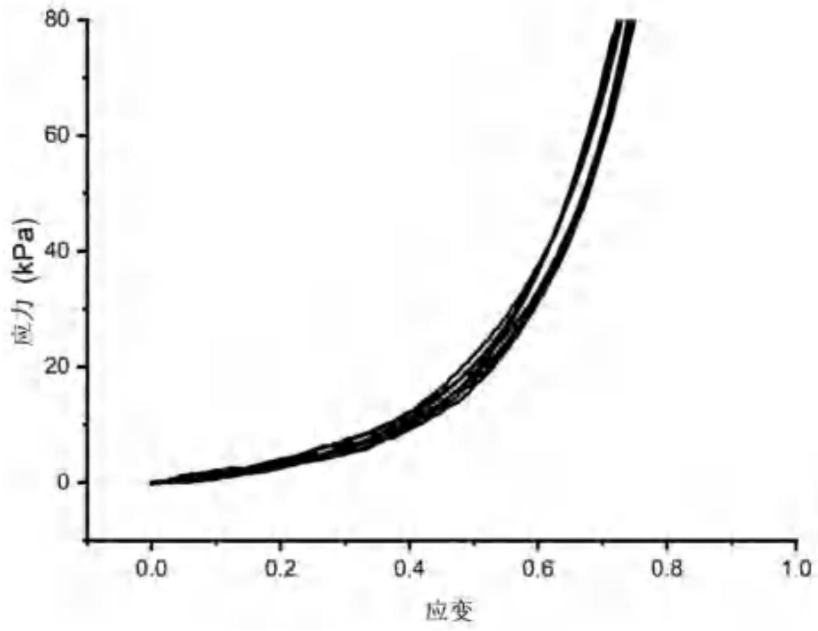

80
60
40
20
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图43

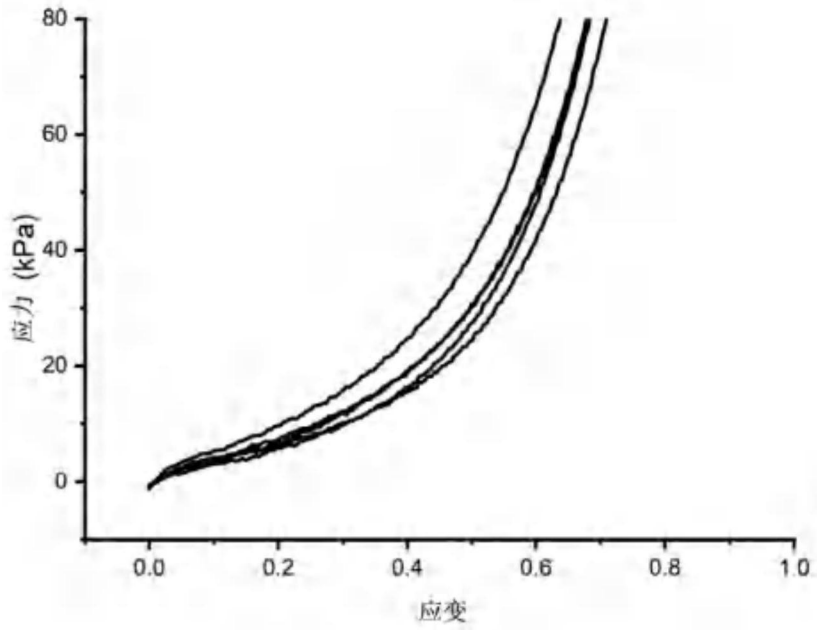

80
60
40
20
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图44

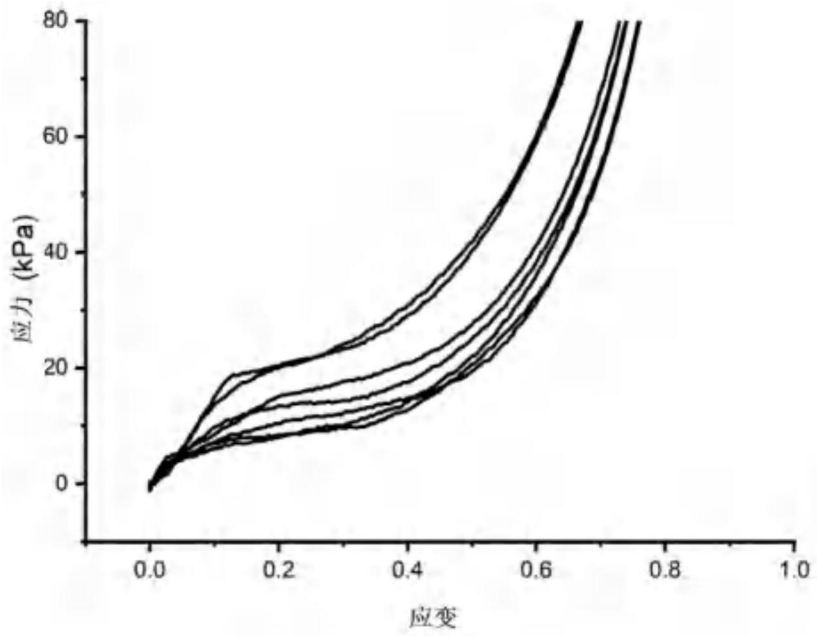

80
60
40
20
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图45

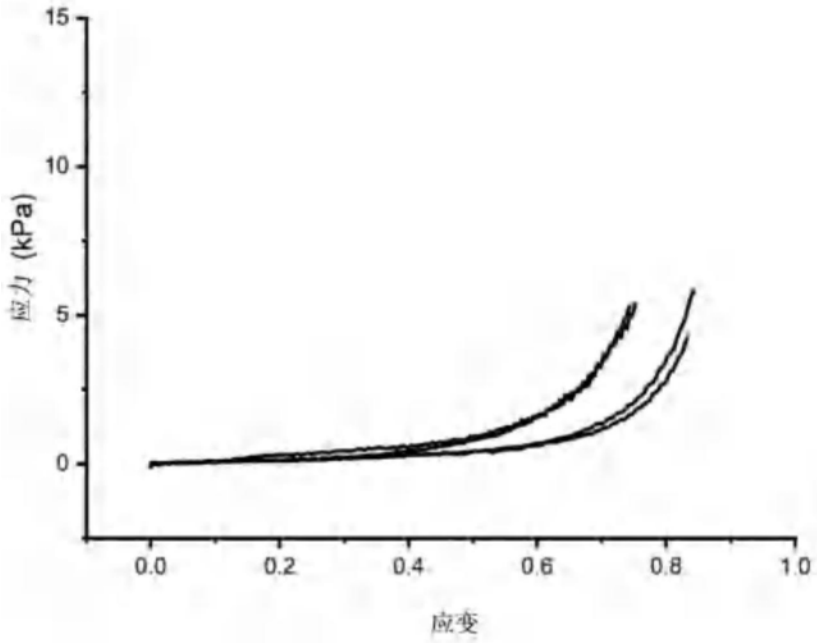

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图46

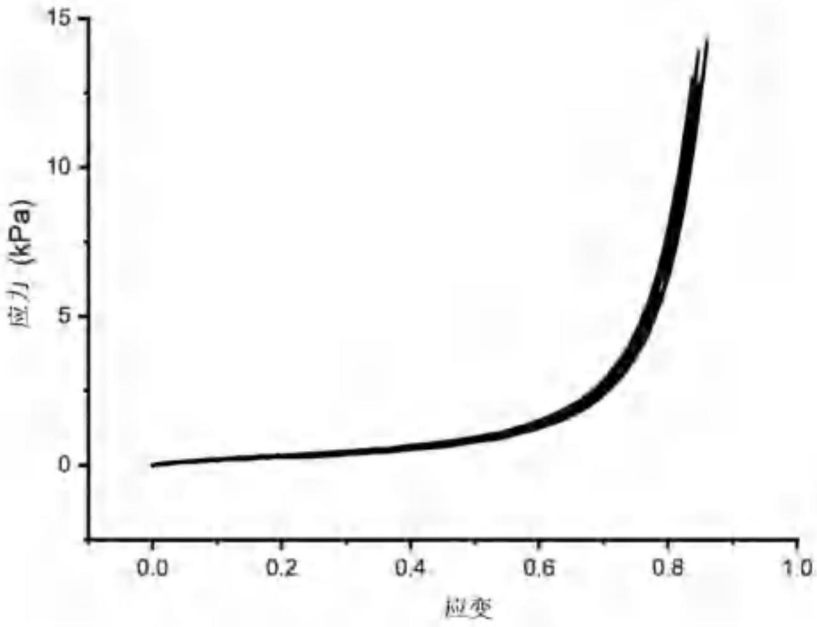

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图47

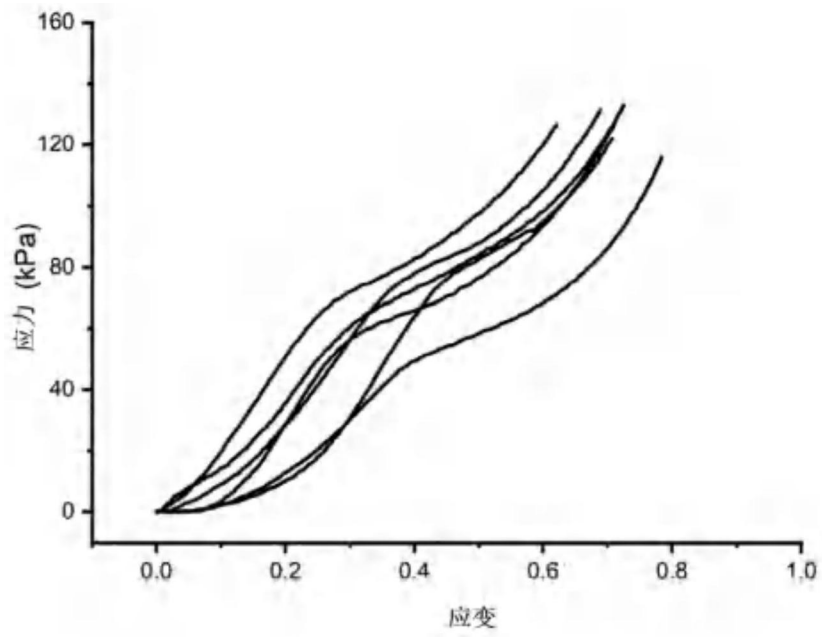

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图48

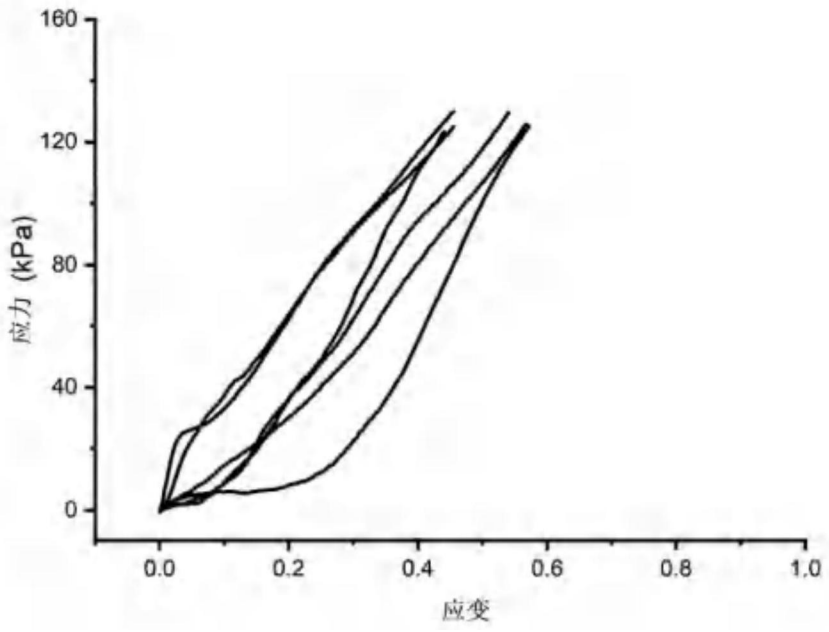

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图49

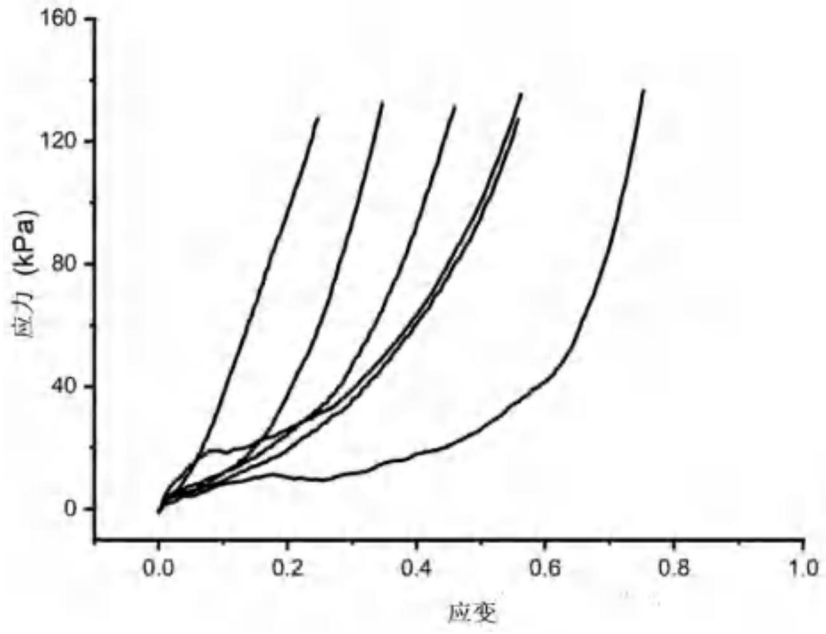

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图50

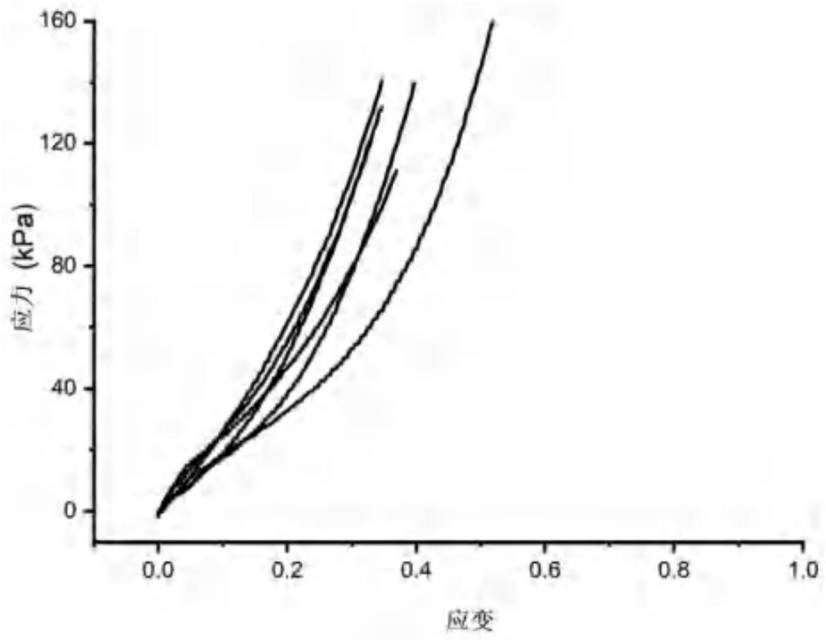

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图51

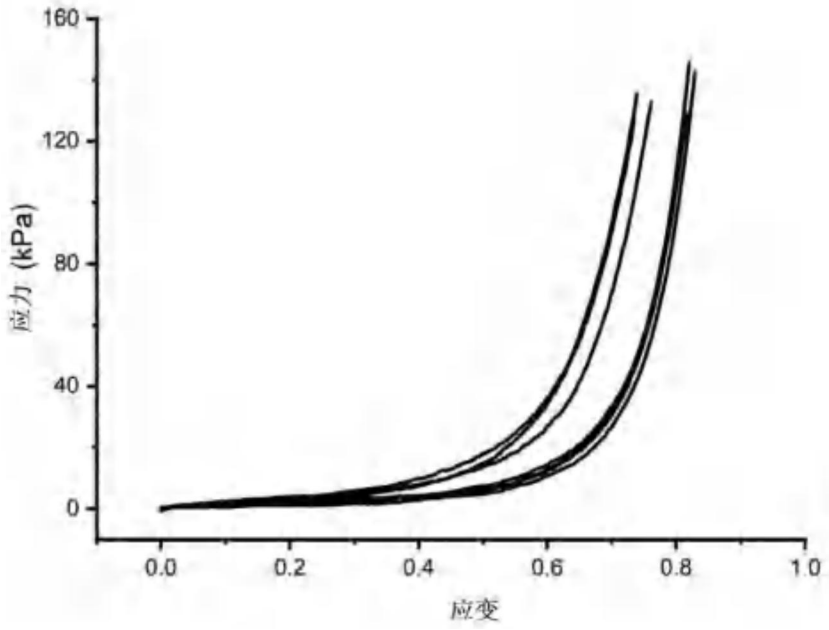

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图52

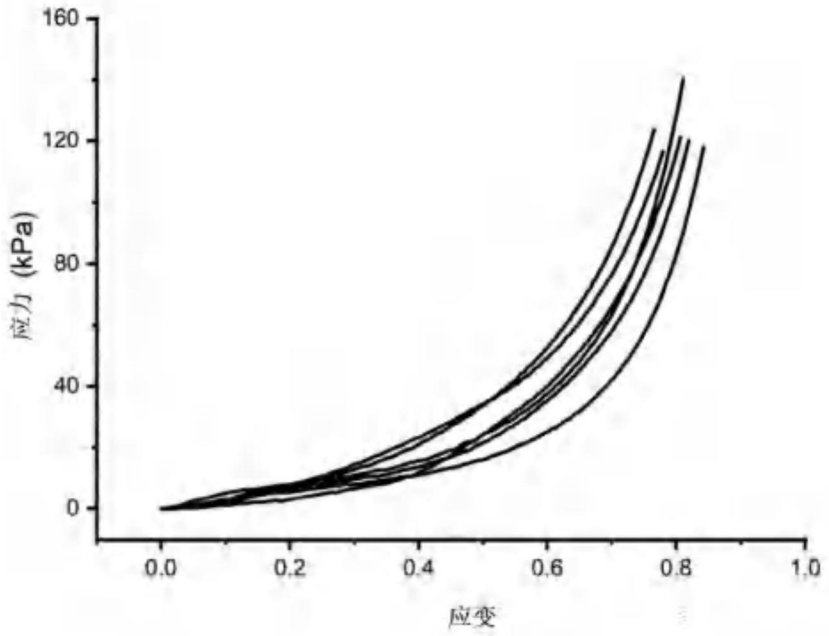

160
120
80
40
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图53

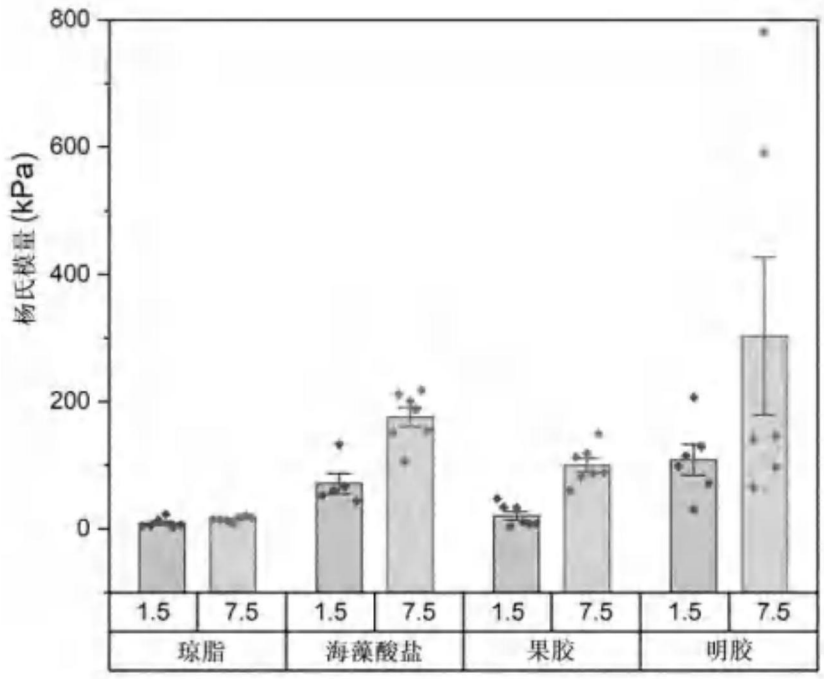

800
600
400
200
0
杨氏模量 (kPa)
1.5
7.5
1.5
7.5
1.5
7.5
1.5
7.5
琼脂
海藻酸盐
果胶
明胶

图54

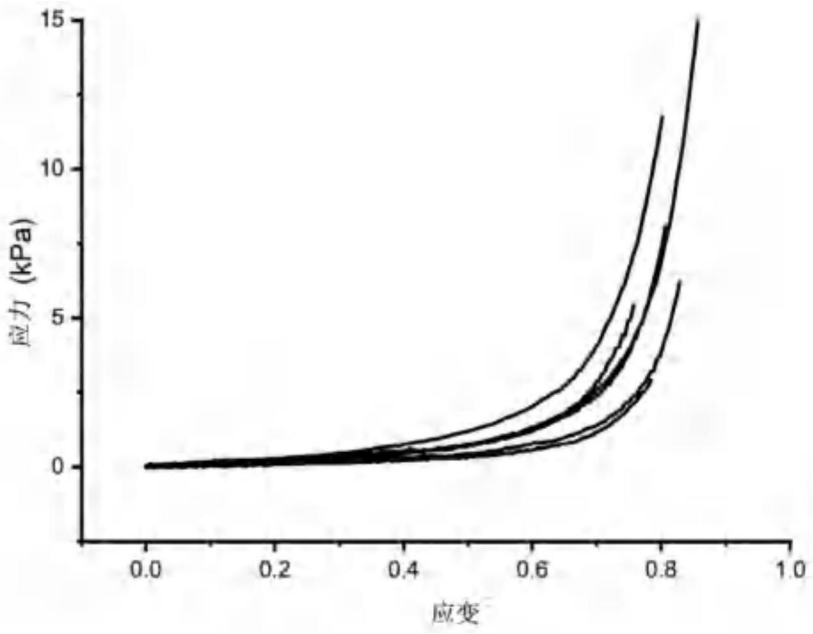

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图55

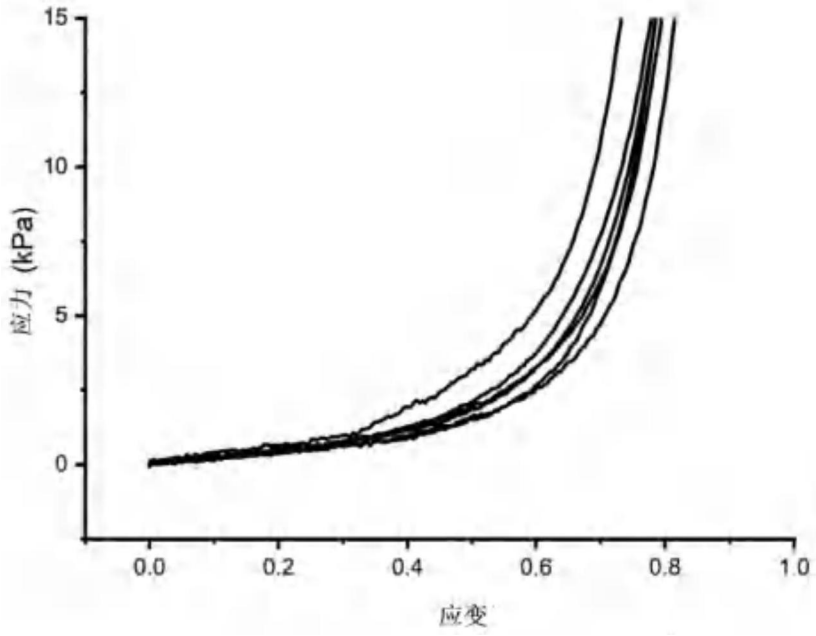

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图56

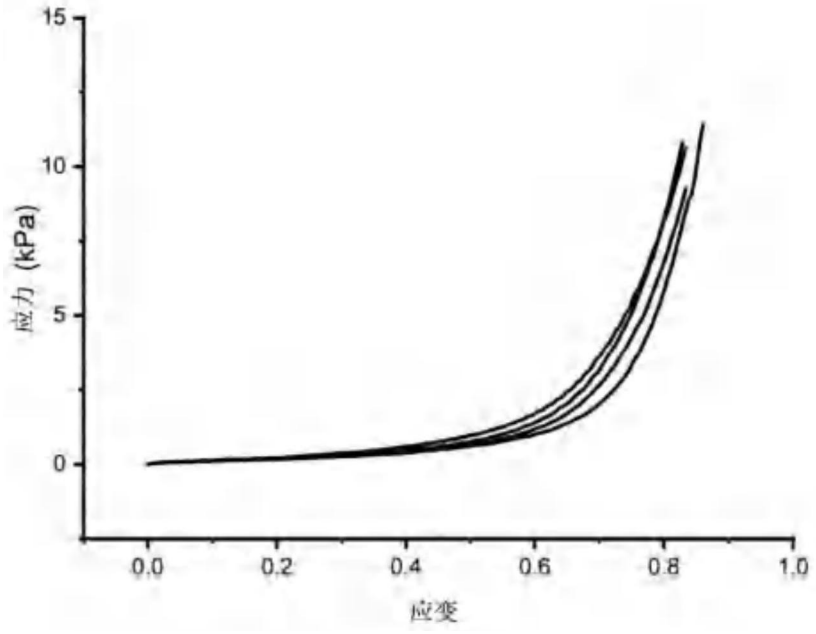

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图57

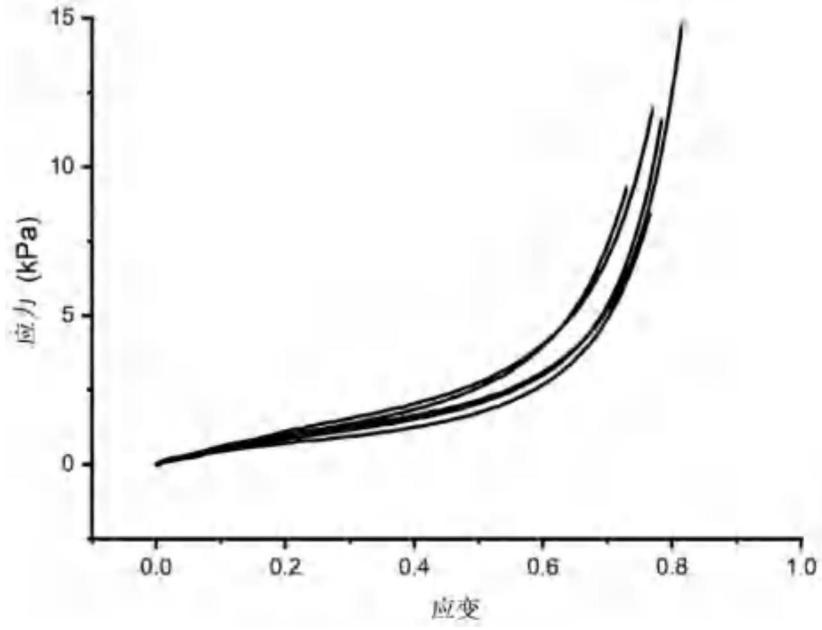

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图58

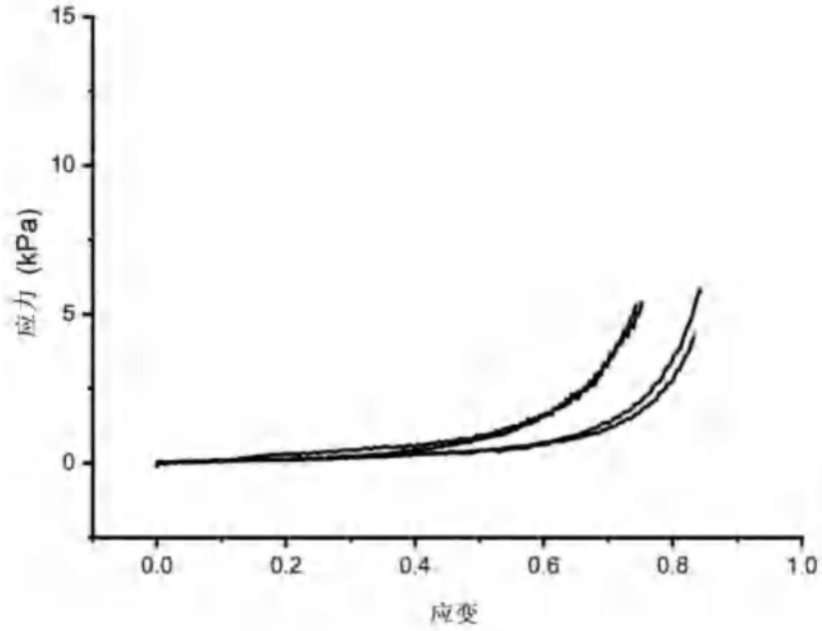

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图59

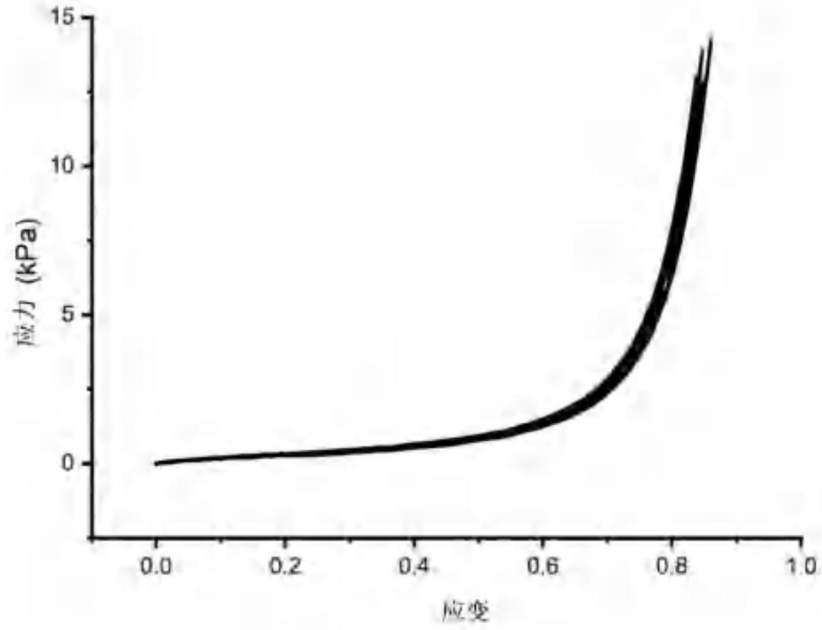

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图60

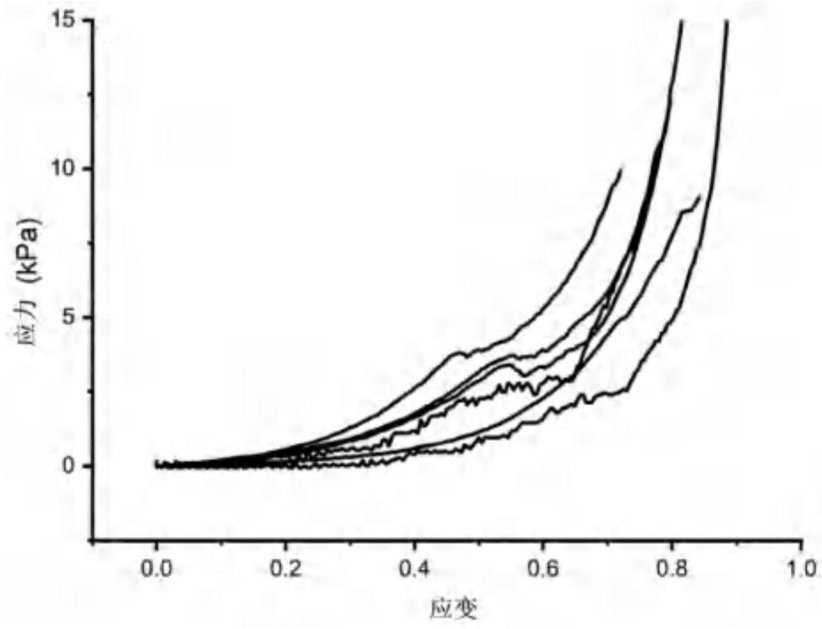

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图61

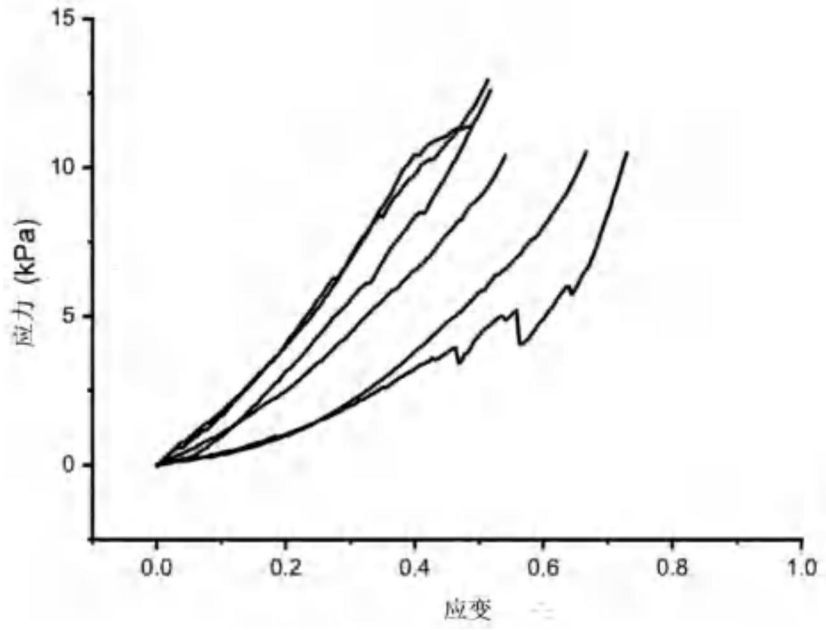

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图62

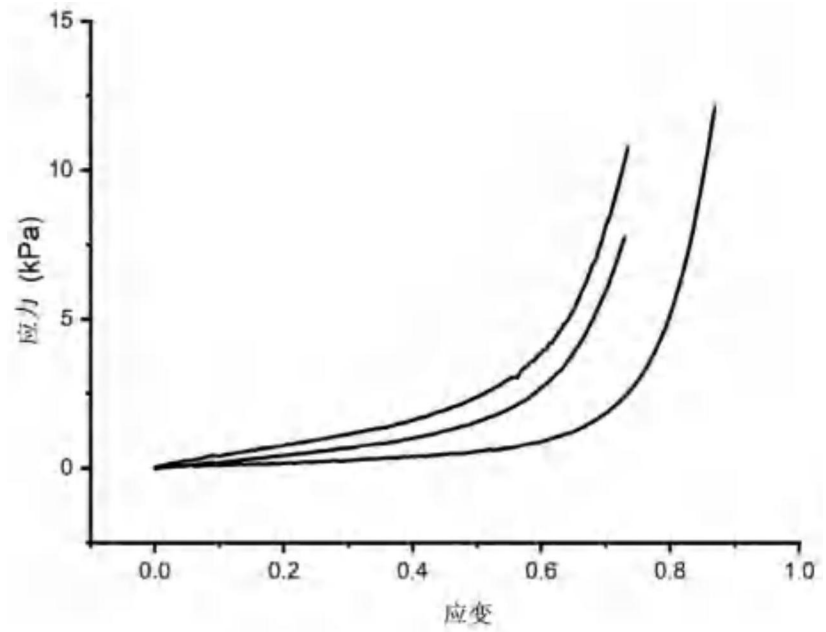

15
10
5
0
应力 (kPa)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
应变

图63

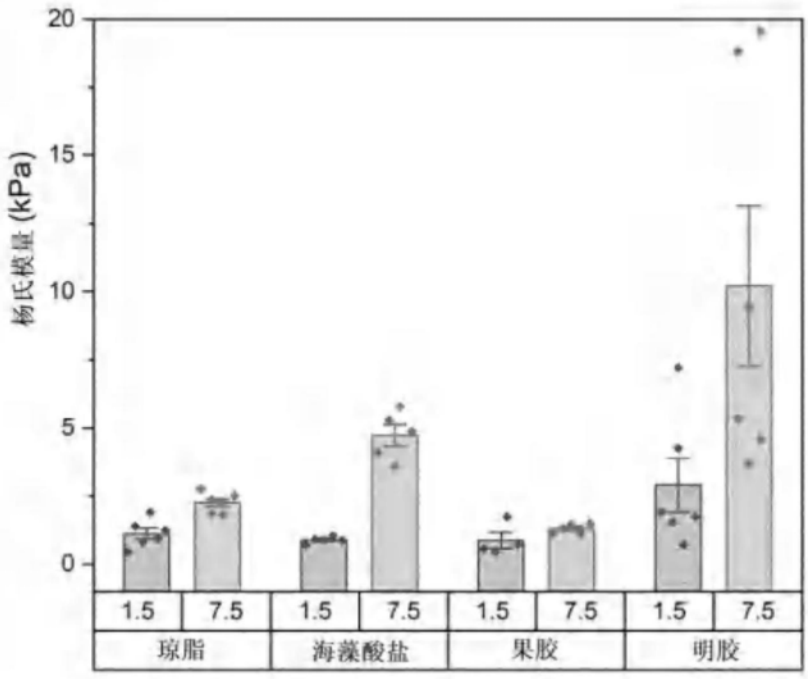


图64

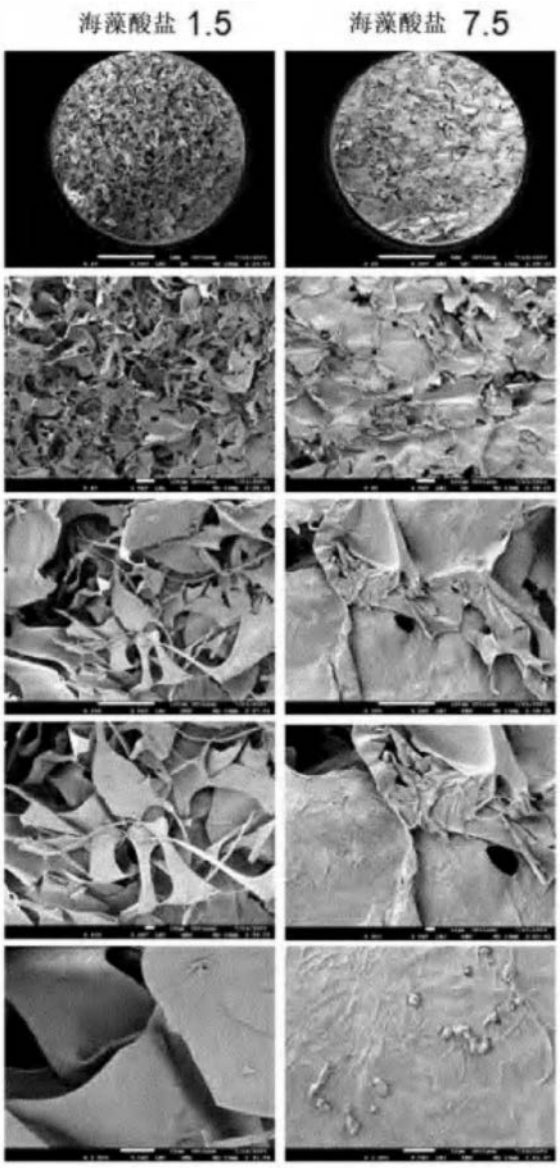


图65

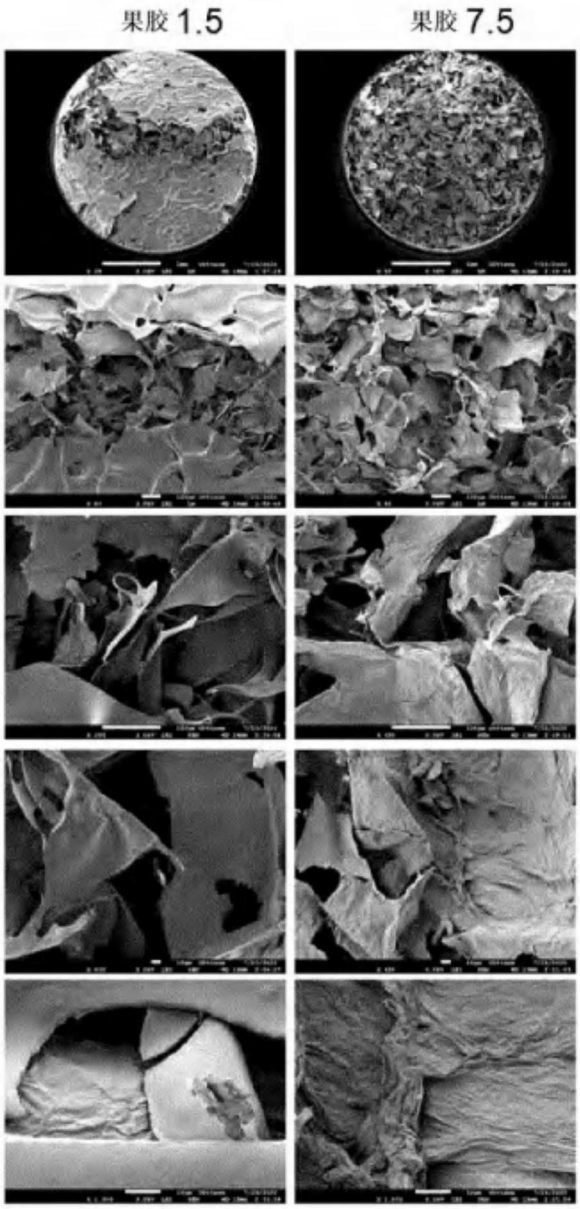


图66

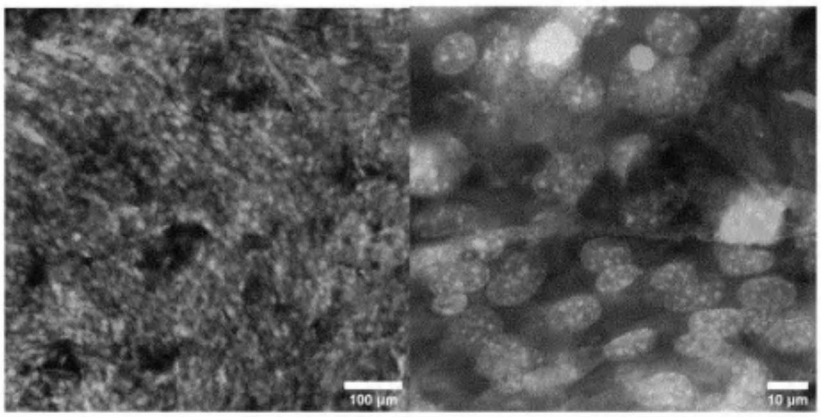


图67



图68

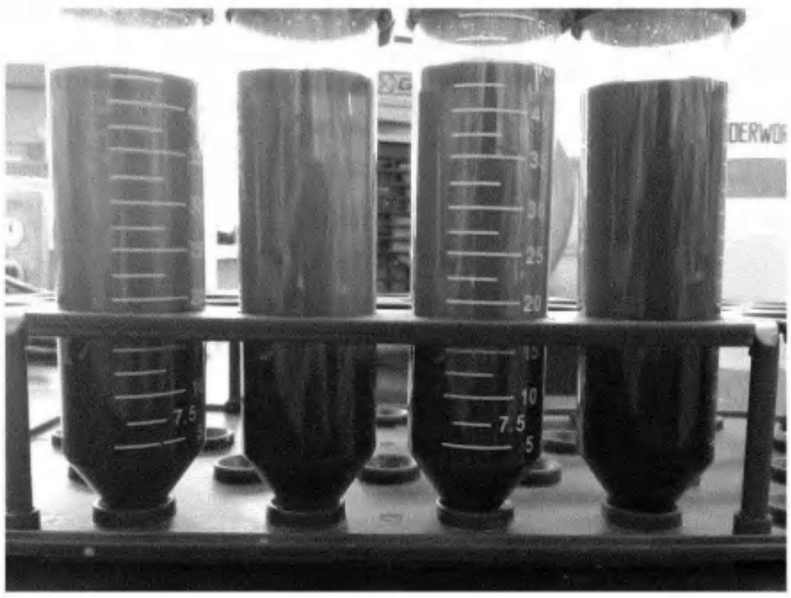


图69



图70



图71

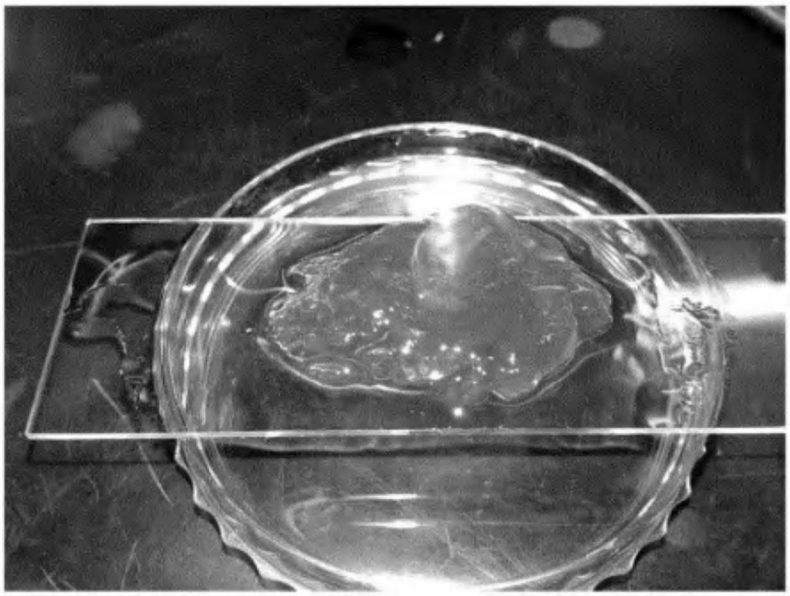


图72

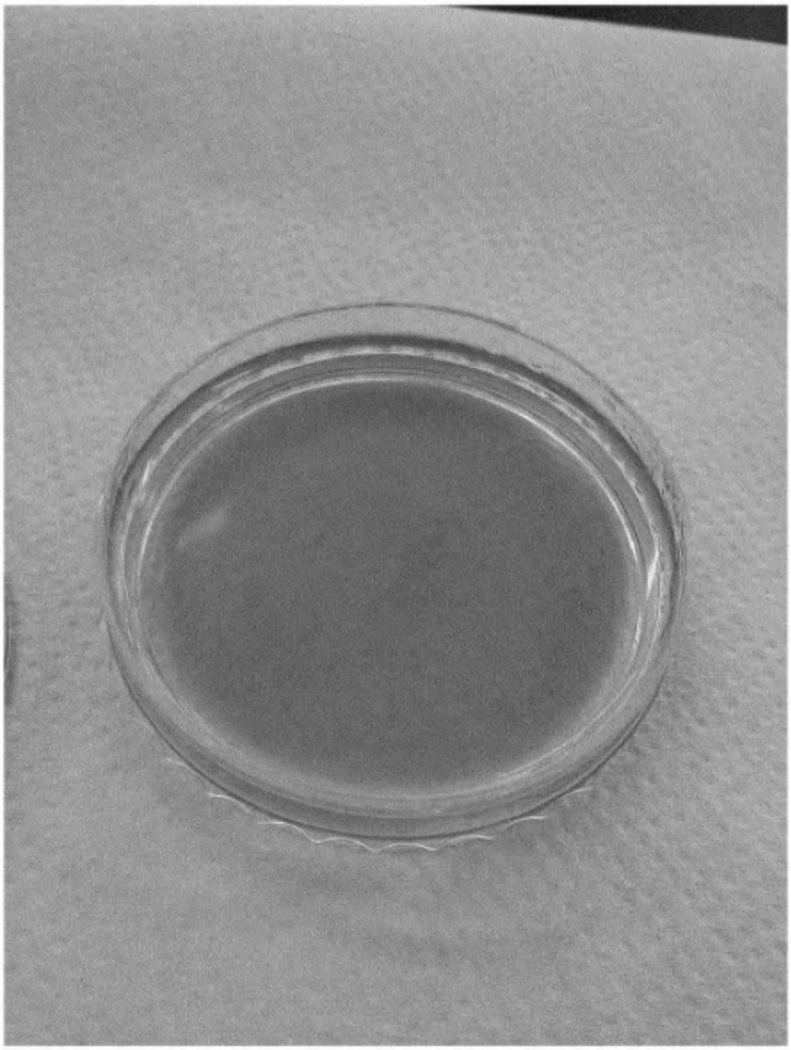


图73

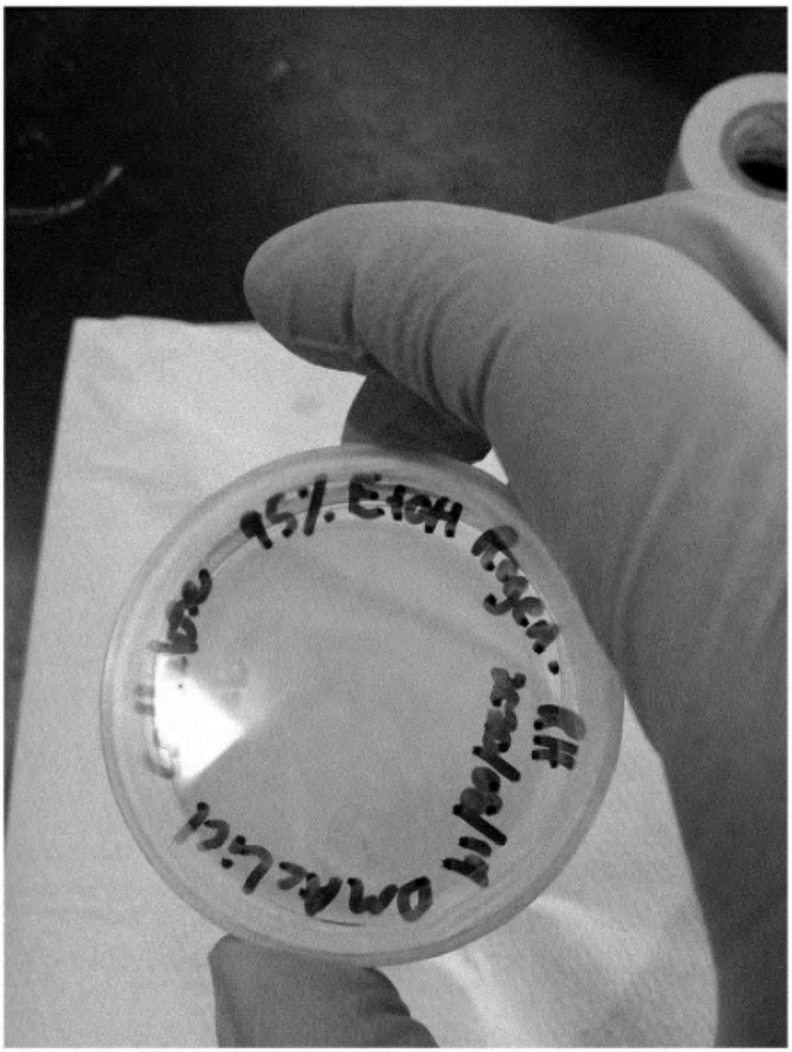


图74

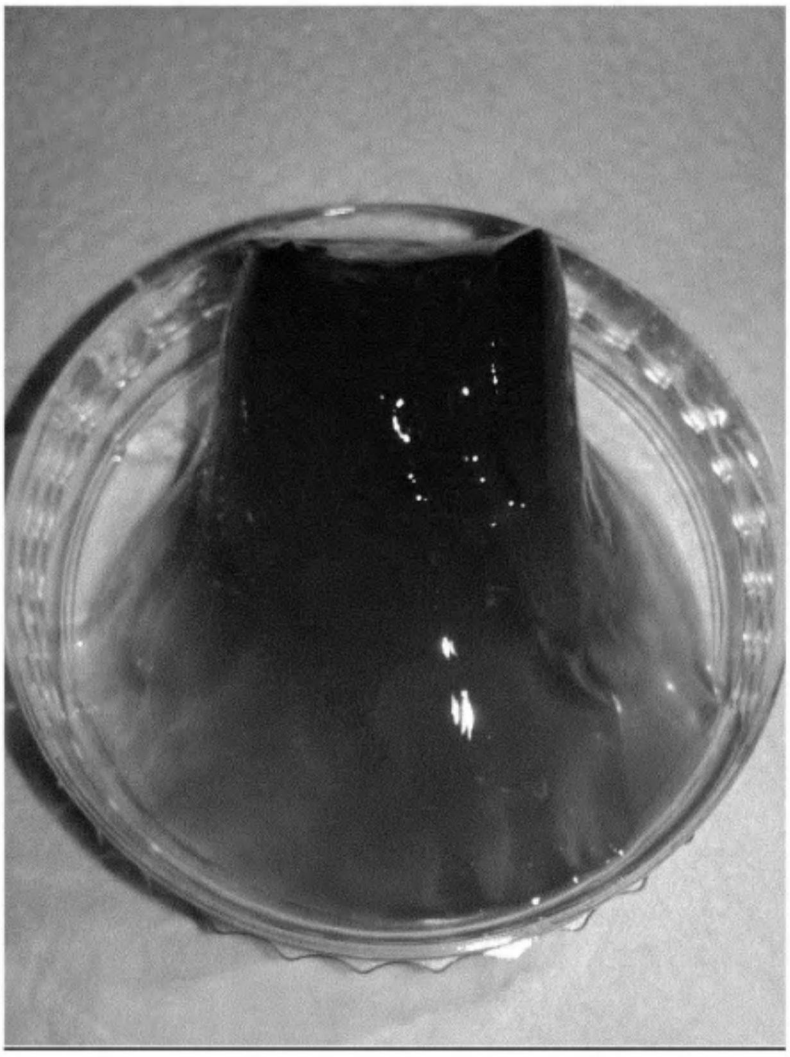


图75



图76

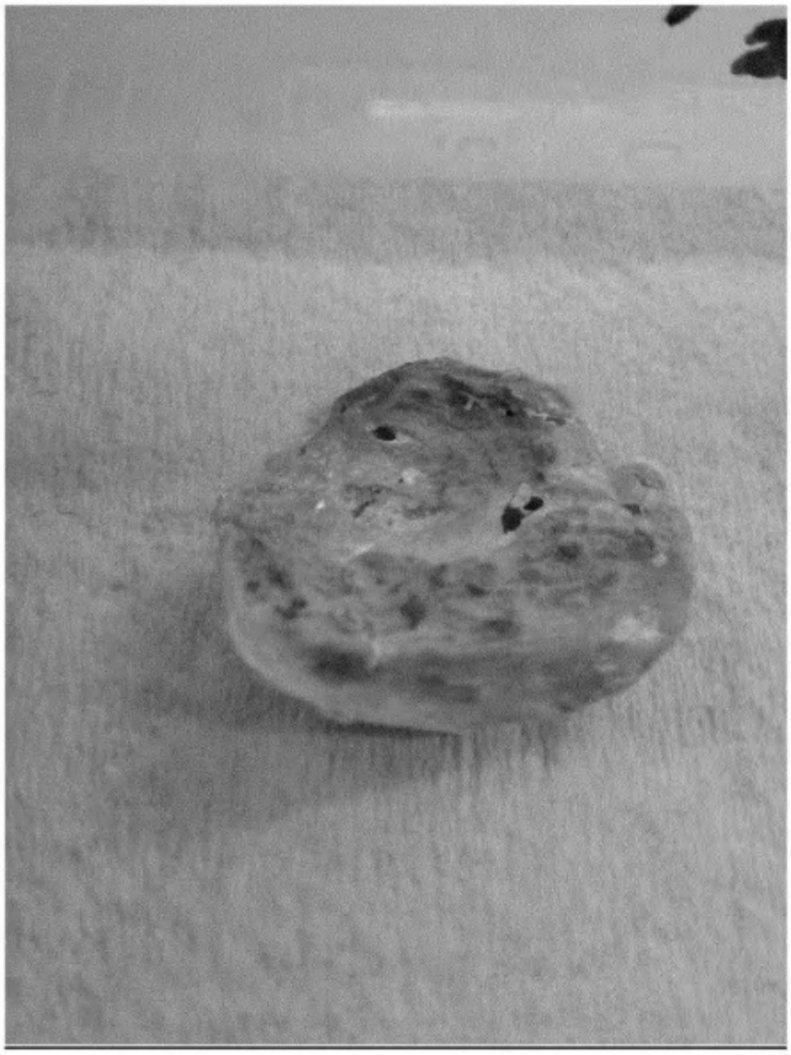


图77

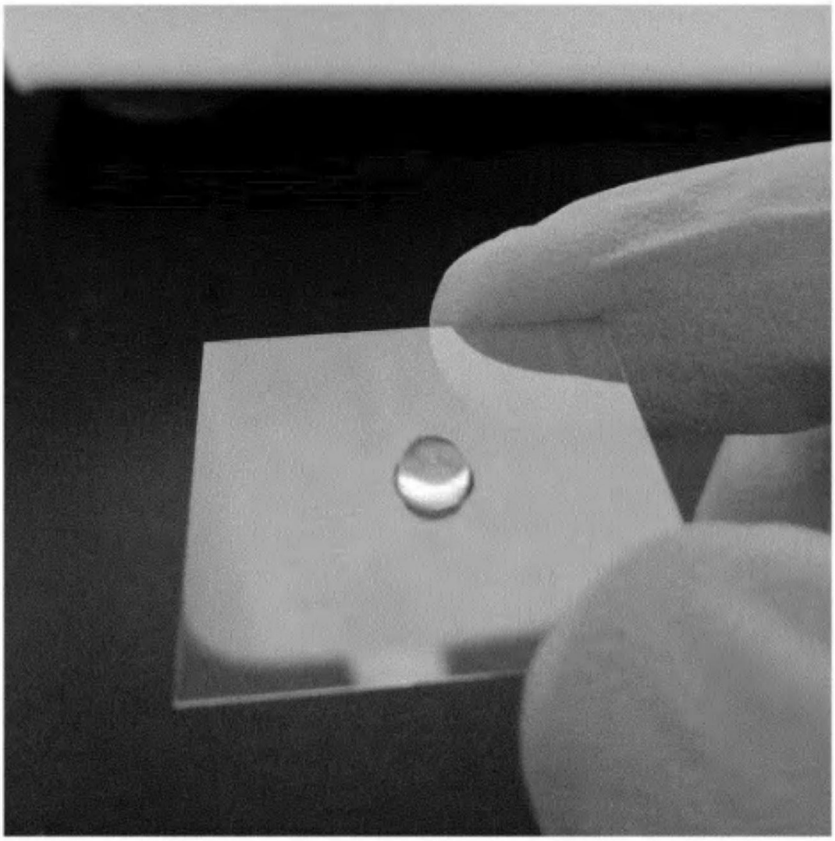


图78

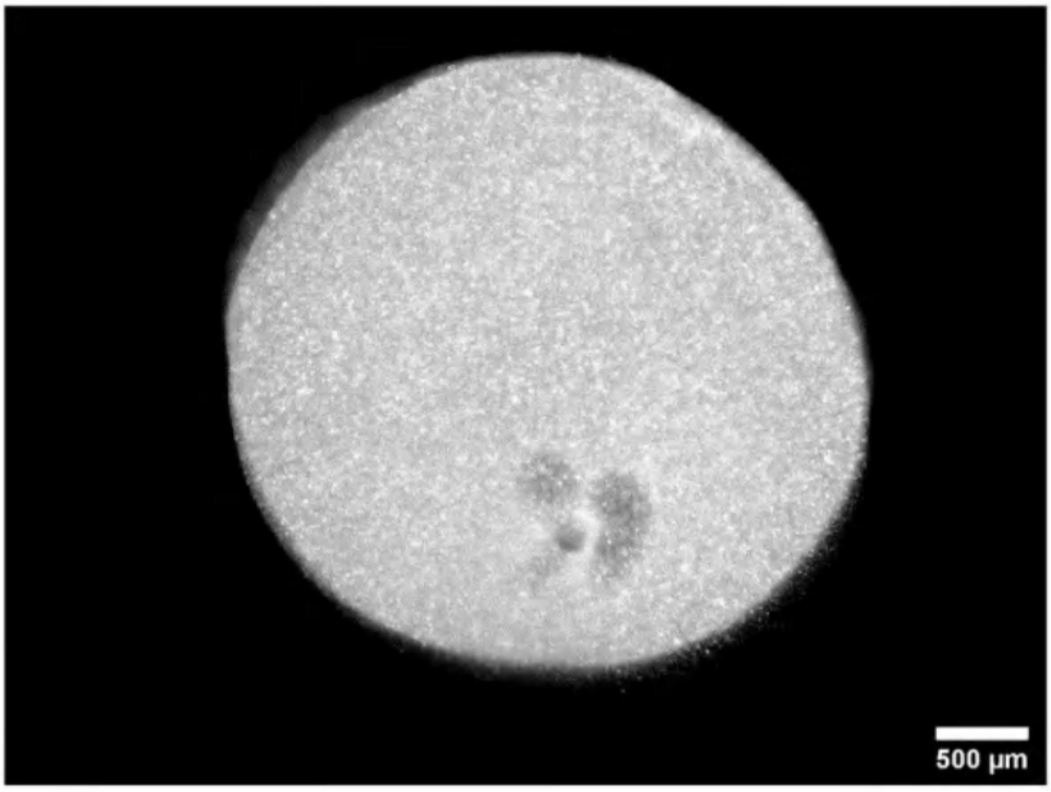


图79

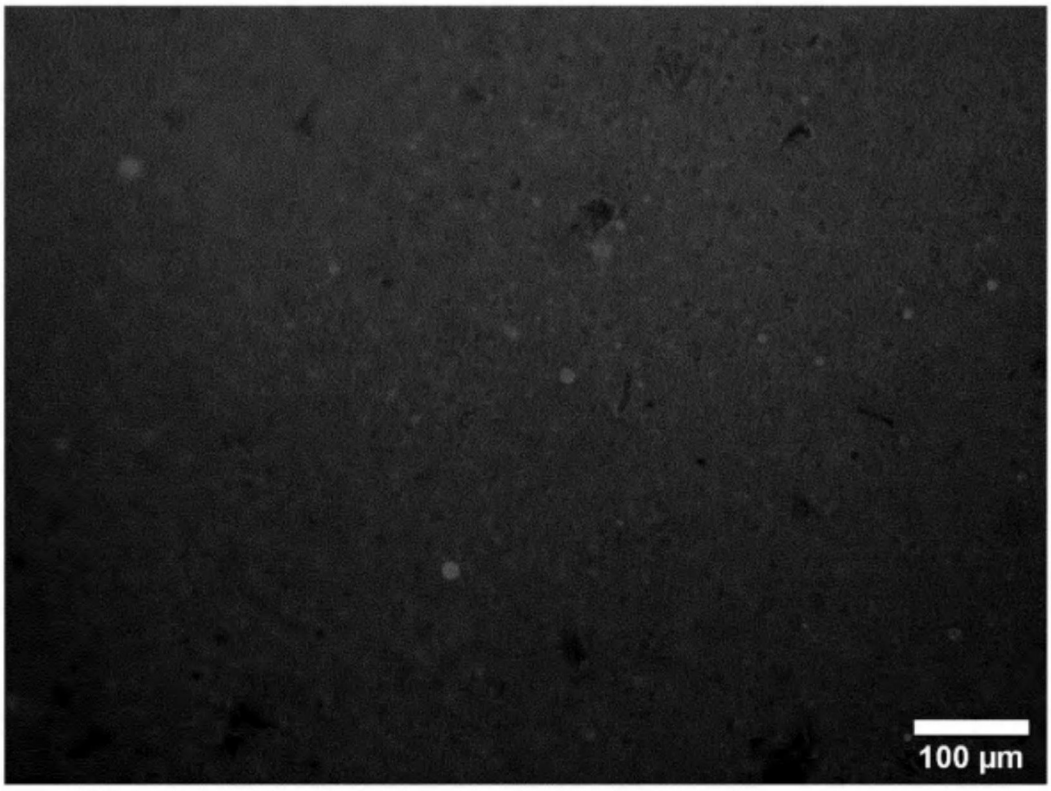


图80

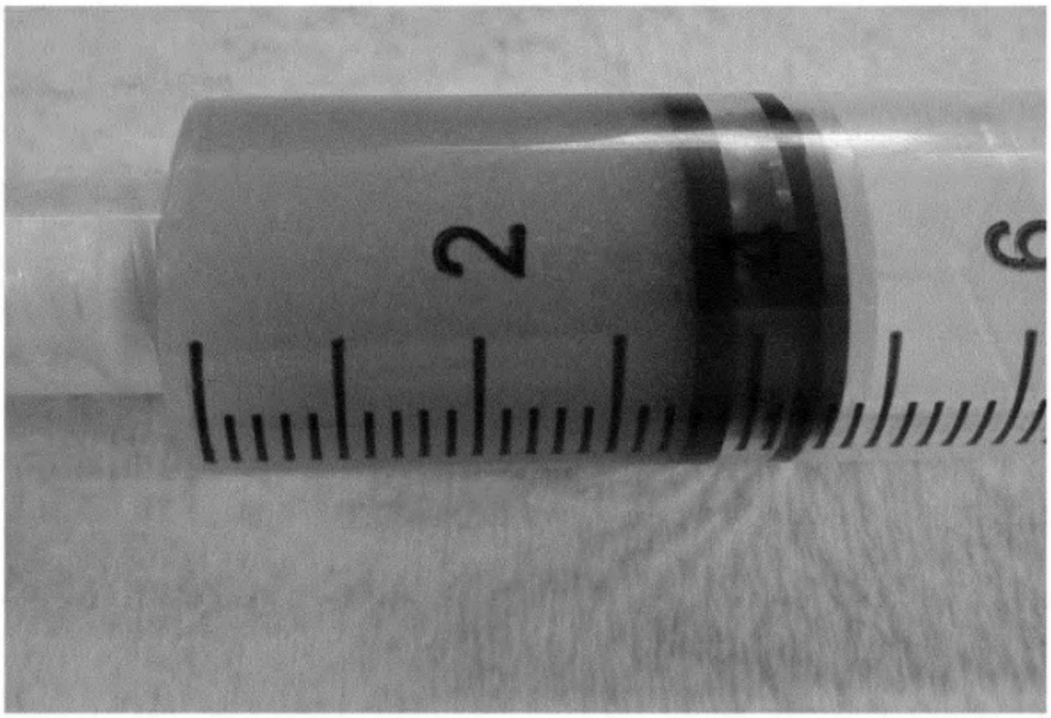


图81

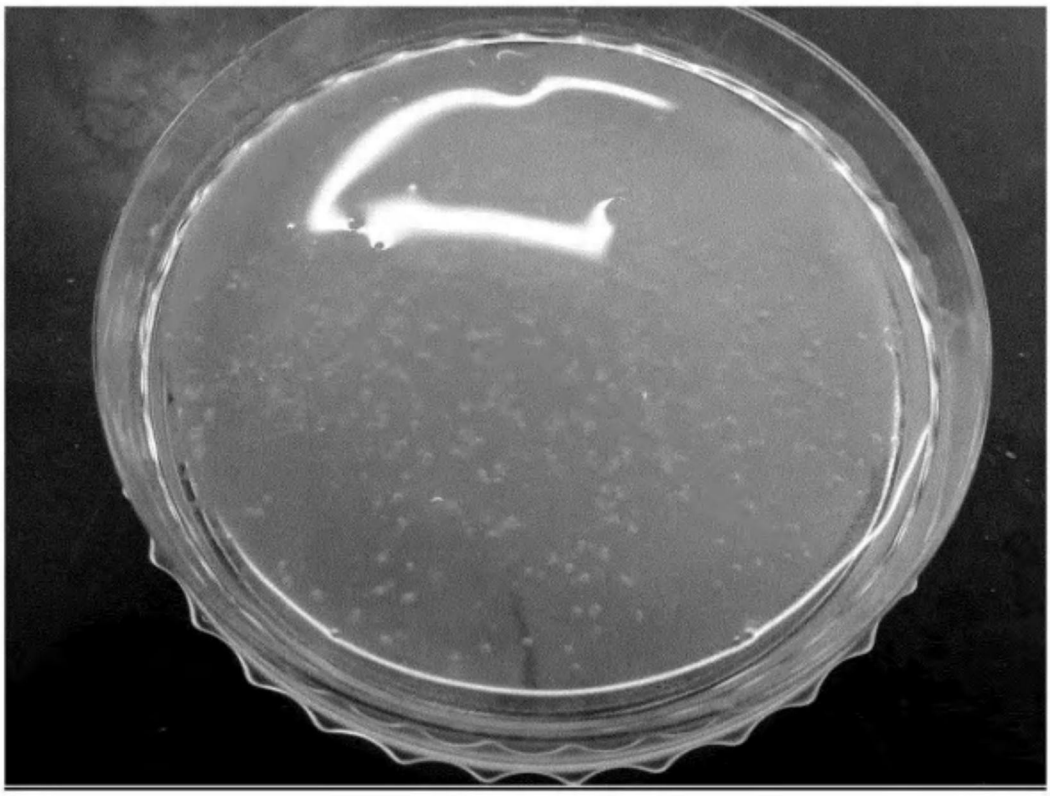


图82



图83

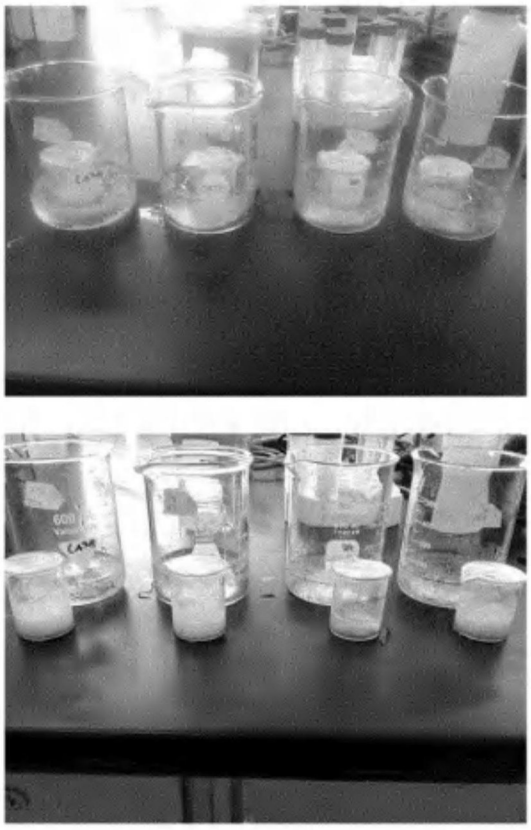


图84



图85

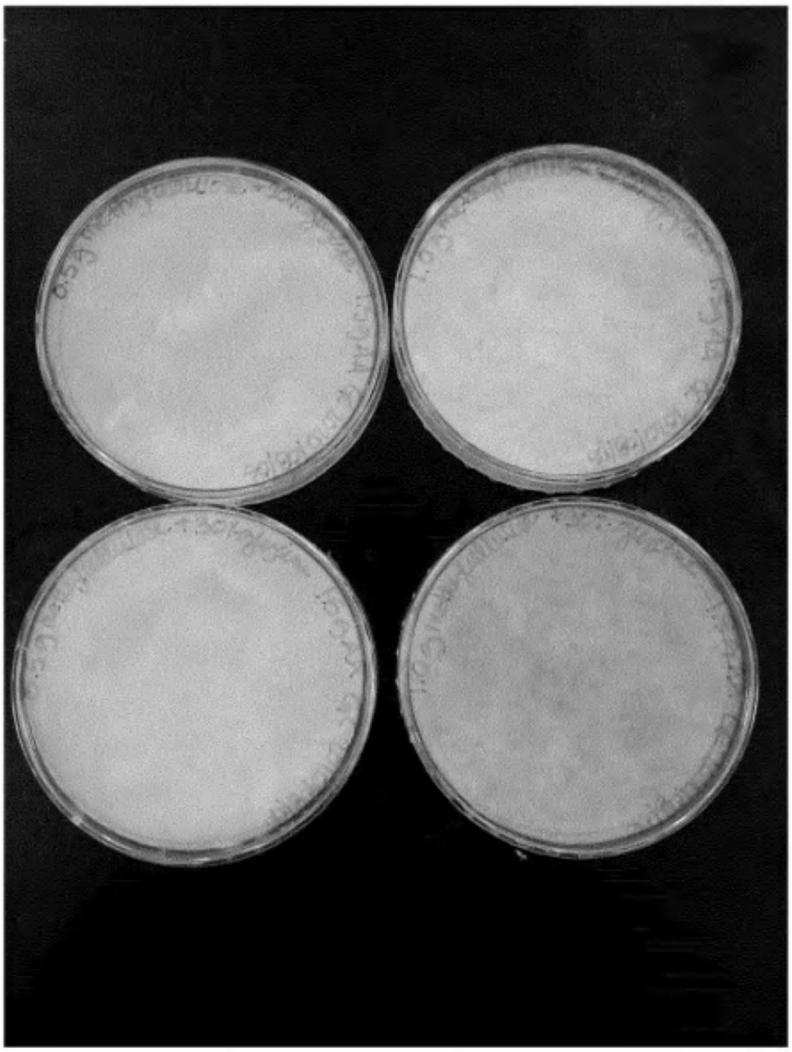


图86



图87

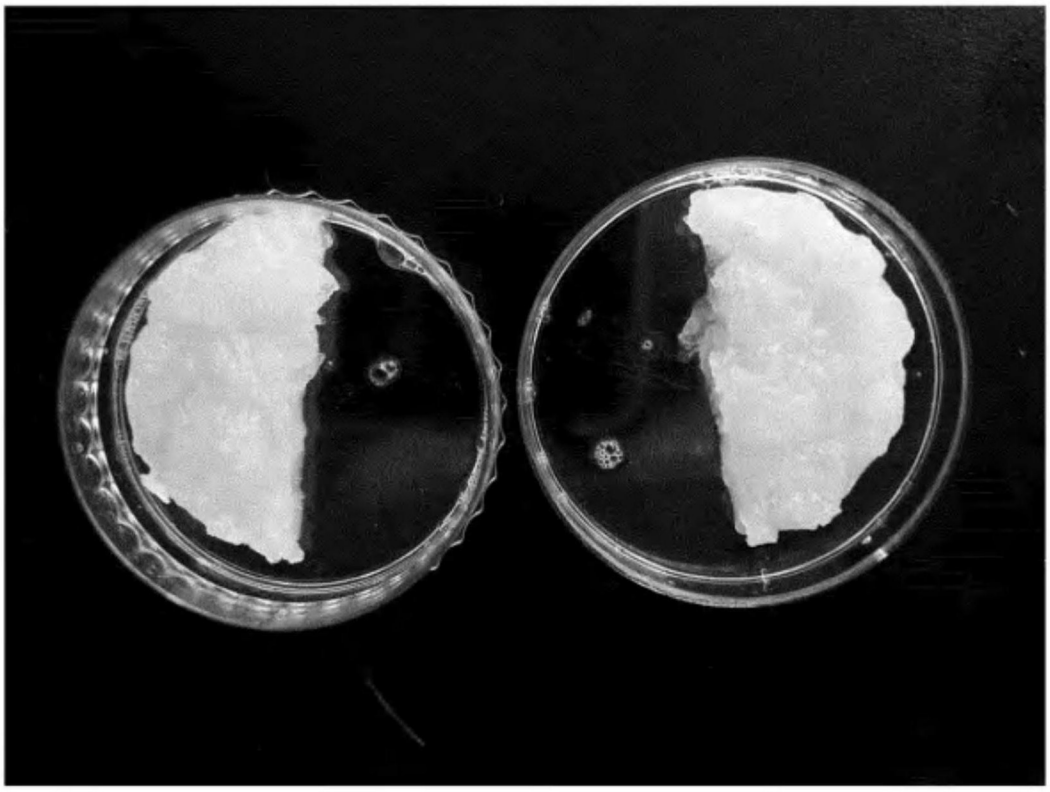


图88

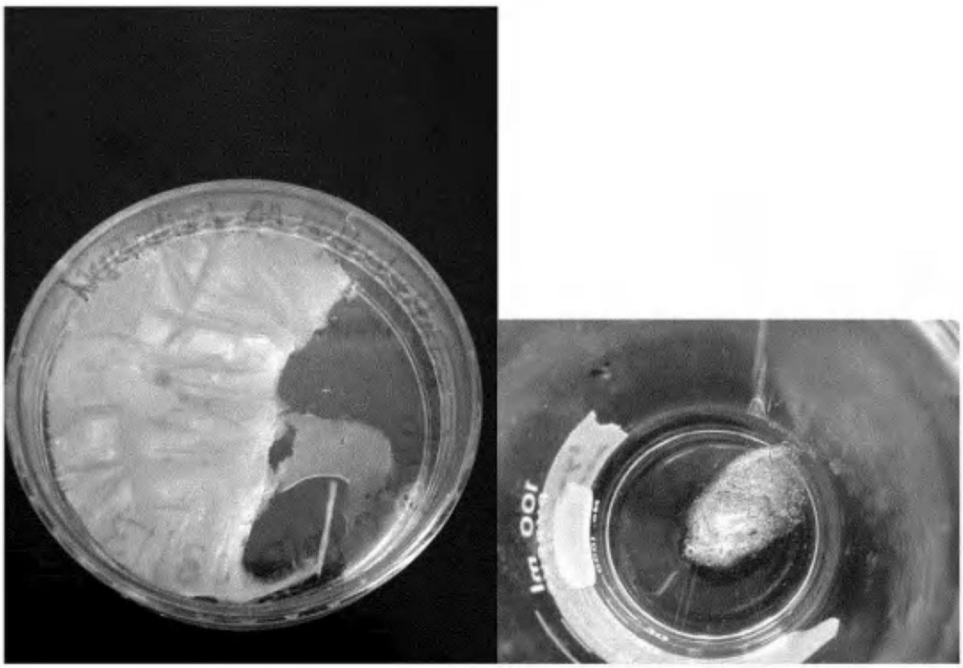


图89



图90



图91

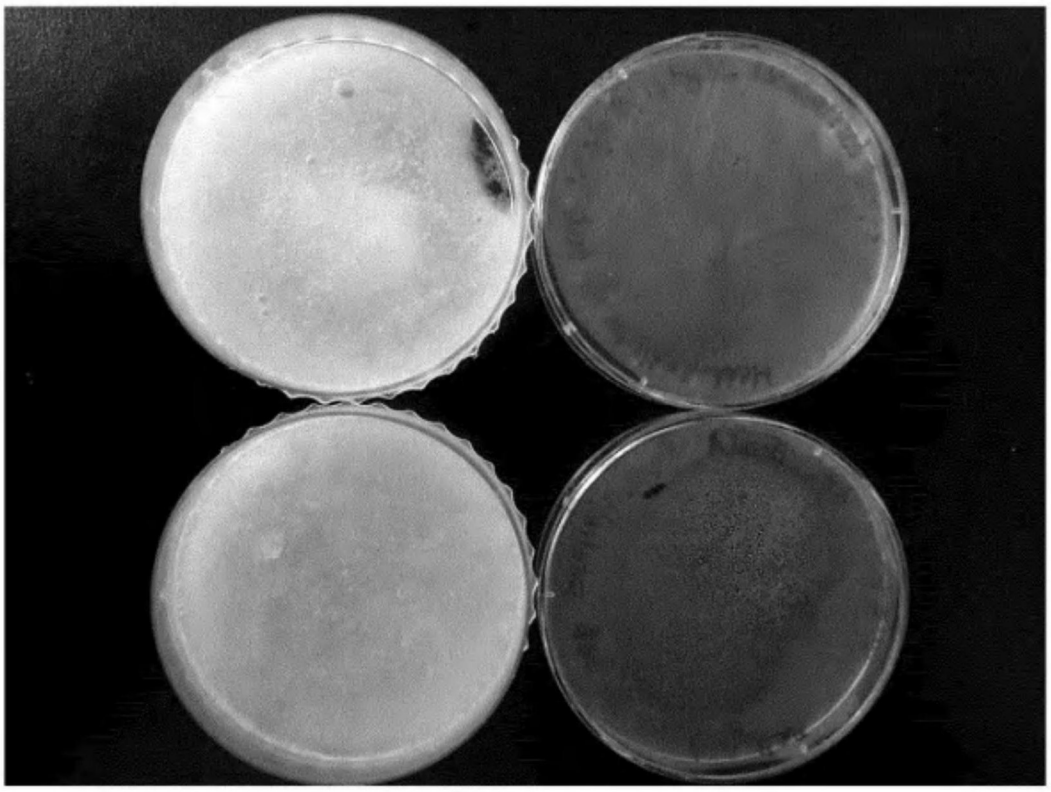


图92

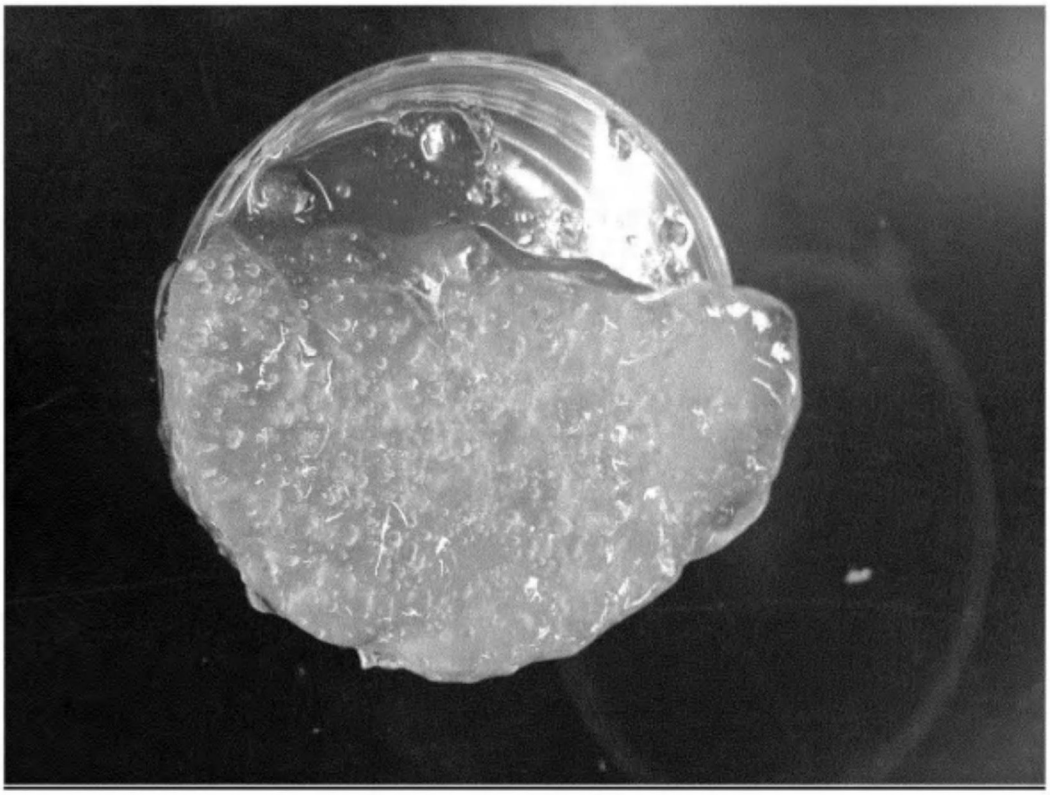


图93

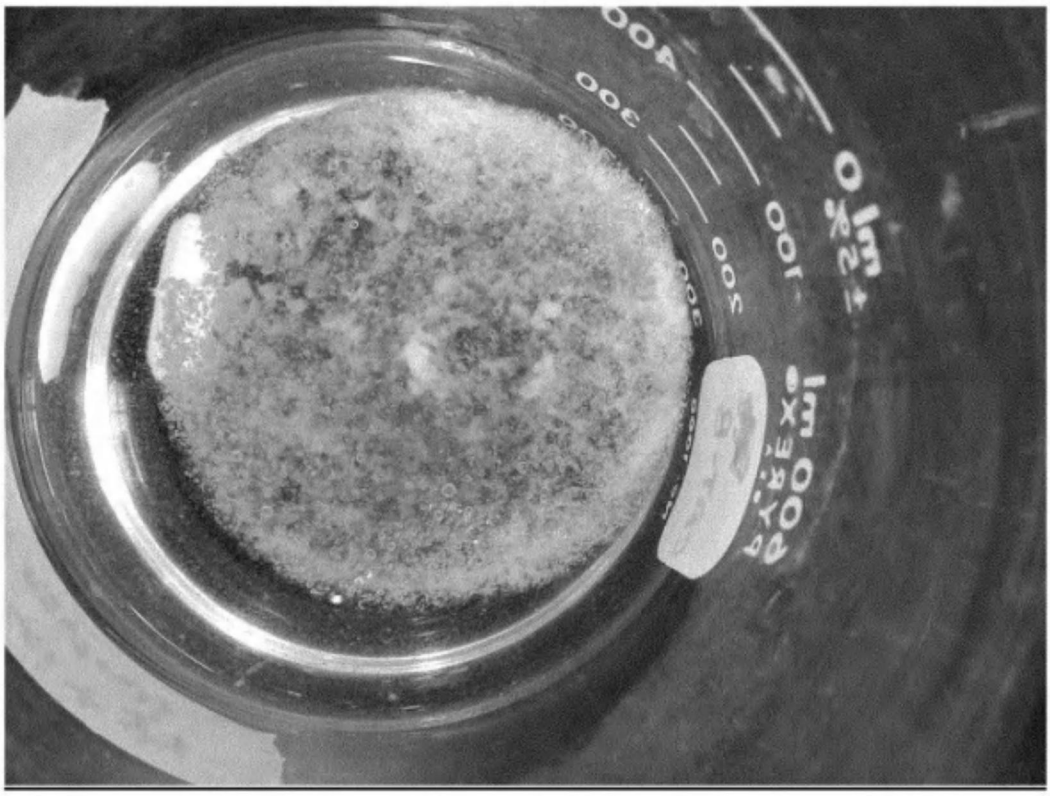


图94



图95

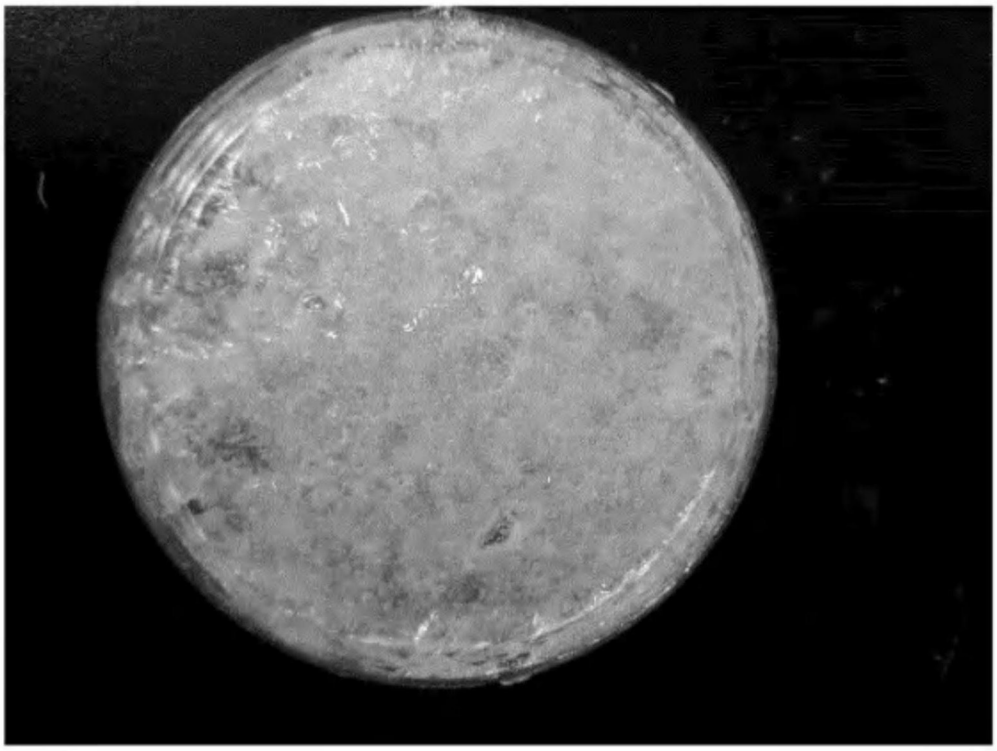


图96

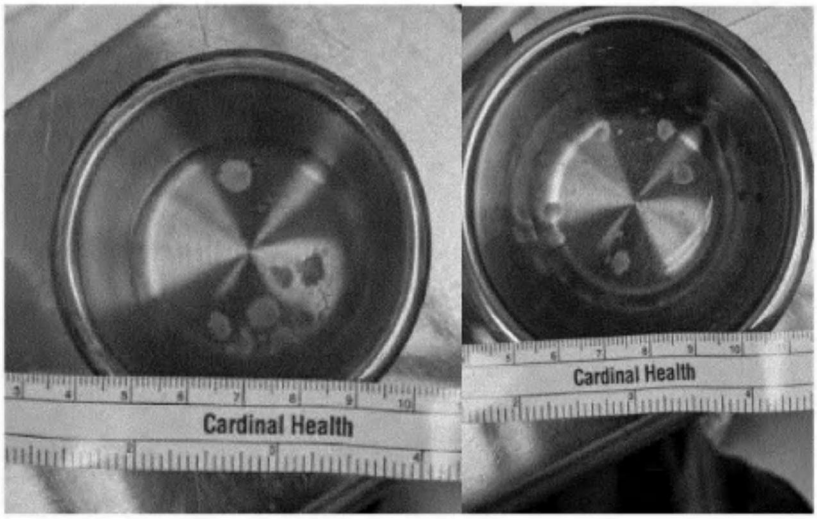


图97

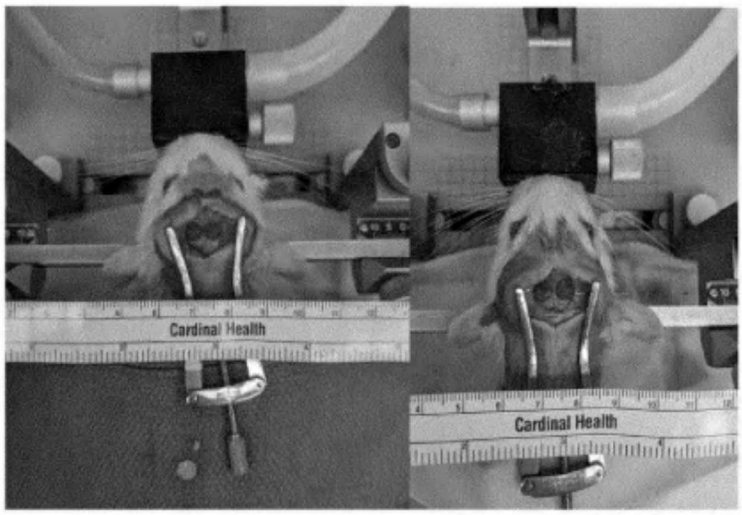

Cardinal Health
Cardinal Health

图98

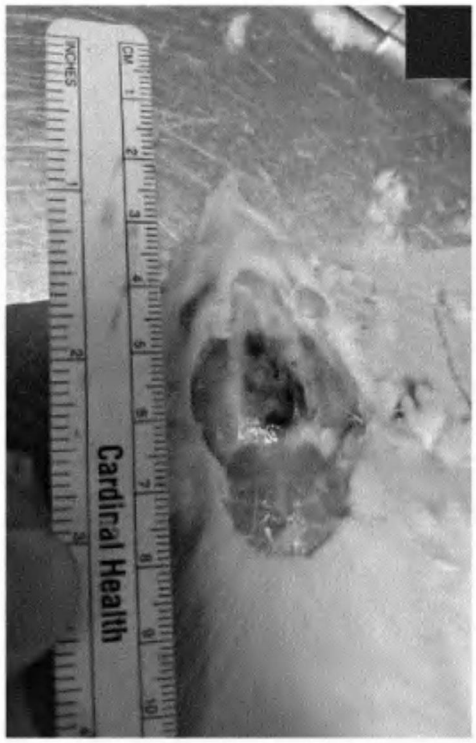

INCHES
CM
Cardinal Health

图99

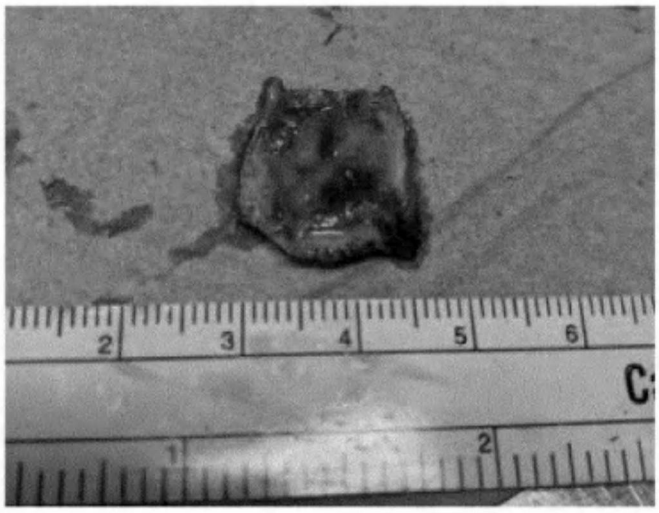


图100

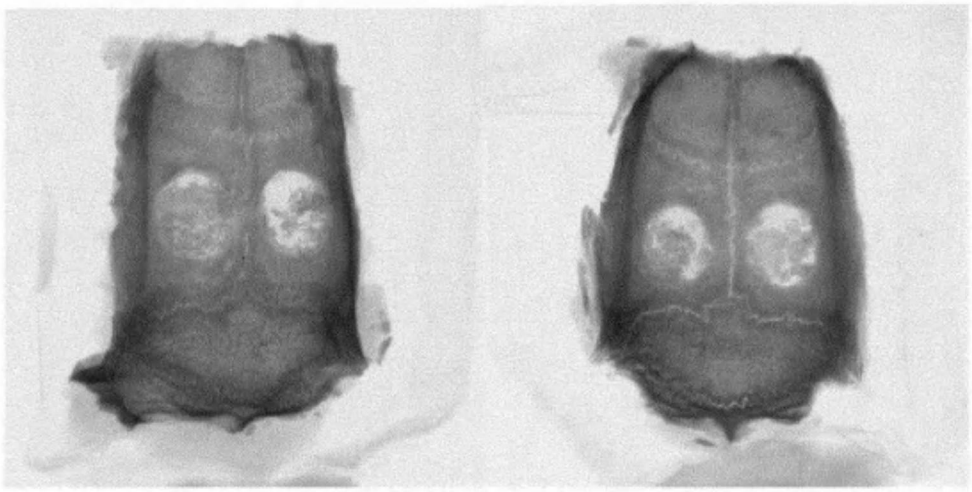


图101

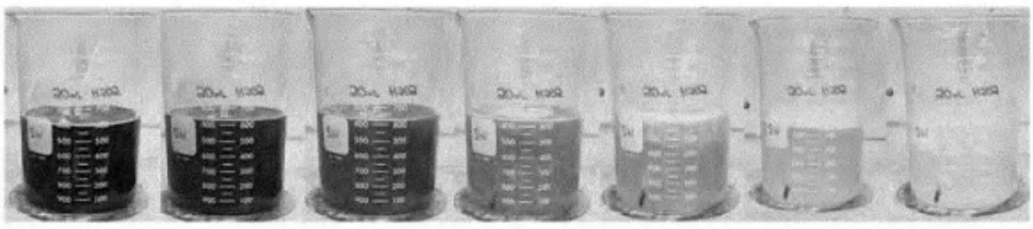


图102

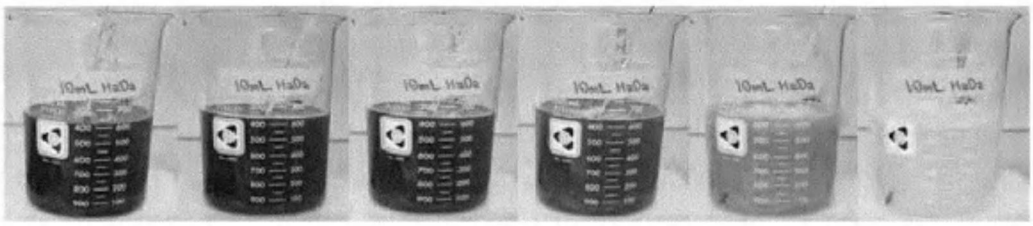

10mL H2O2
10mL H2O2
10mL H2O2
10mL H2O2
10mL H2O2
10mL H2O2

图103


5mL H2O2
5mL H2O2
5mL H2O2
5mL H2O2
5mL H2O2
5mL H2O2
5mL H2O2

图104

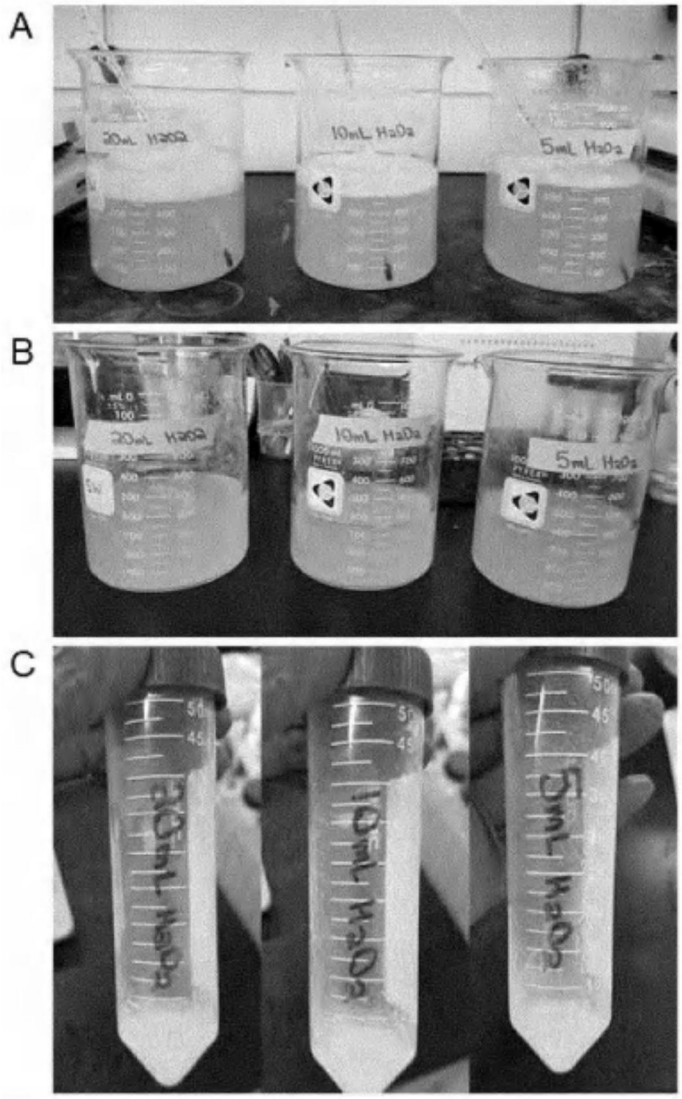

A
20mL H2O2
10mL H2O2
5mL H2O2
B
20mL H2O2
10mL H2O2
5mL H2O2
C
20mL H2O2
10mL H2O2
5mL H2O2

图105

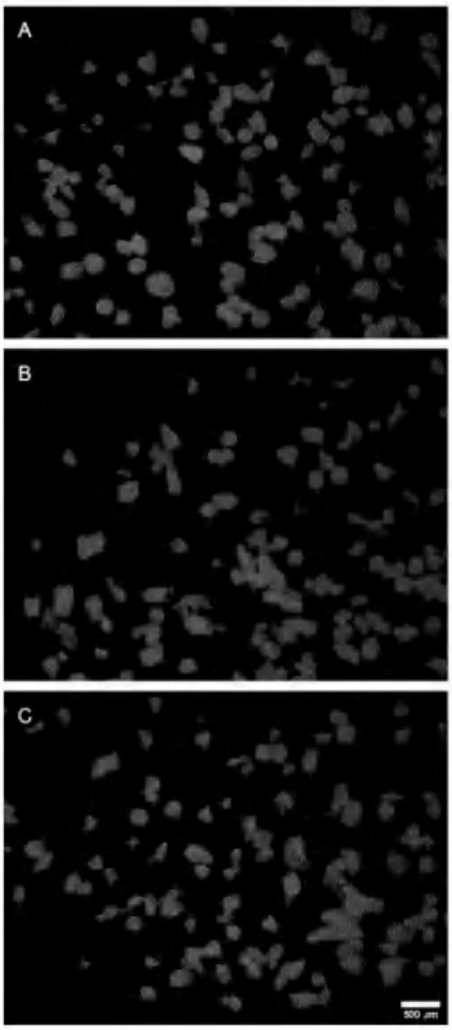


图106

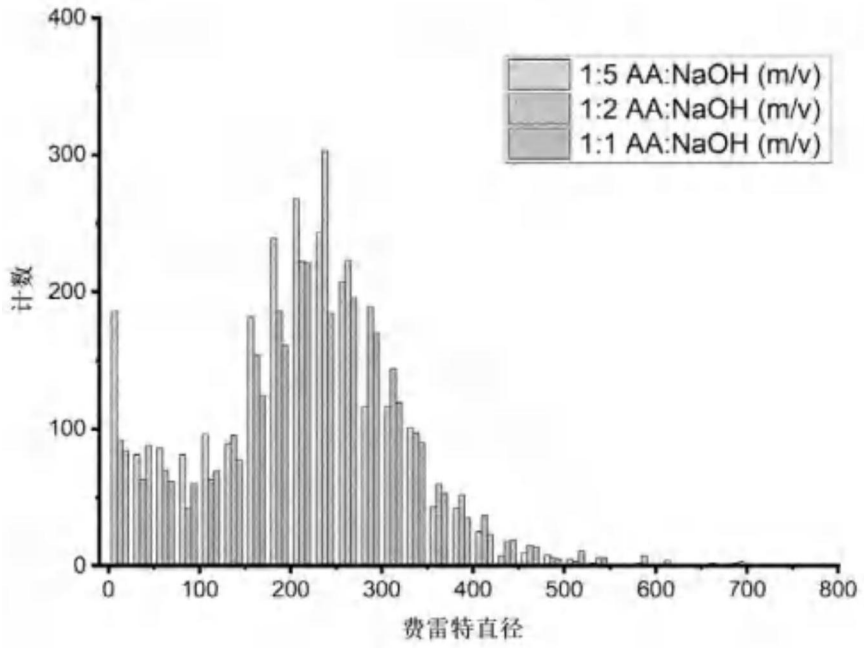


图107

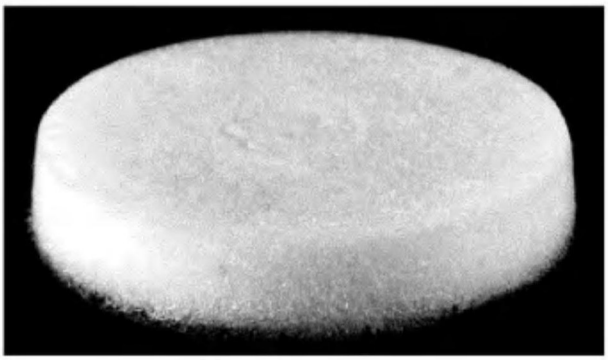


图108

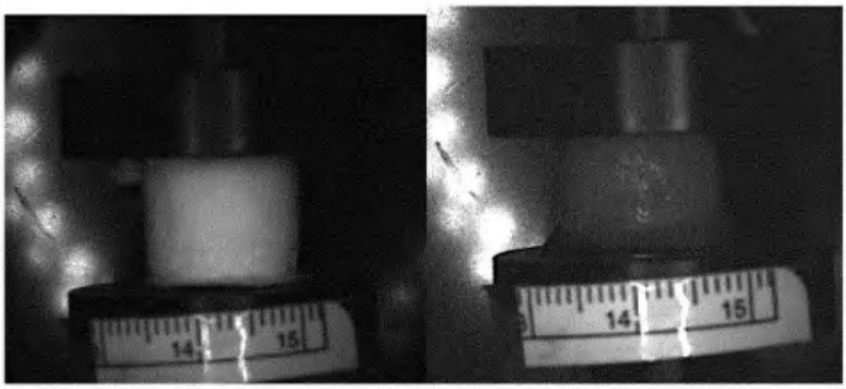


图109



图110

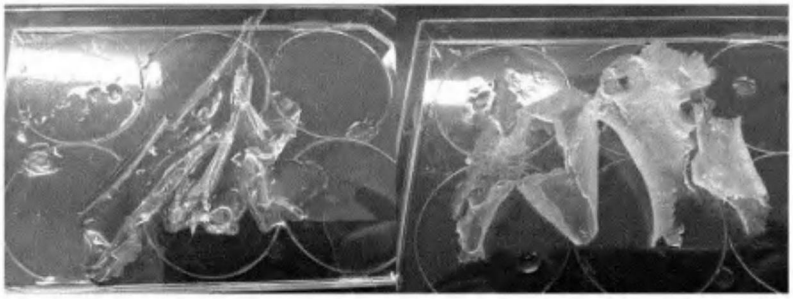


图111

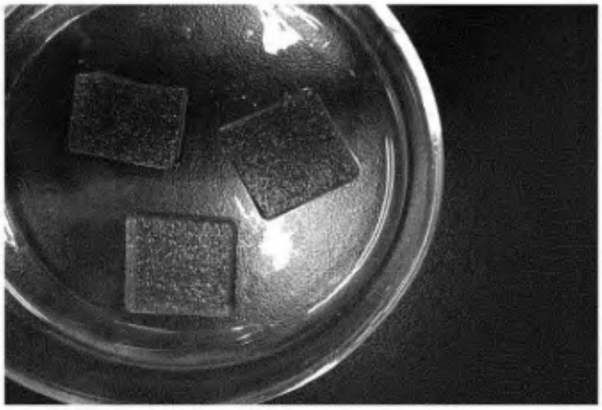


图112

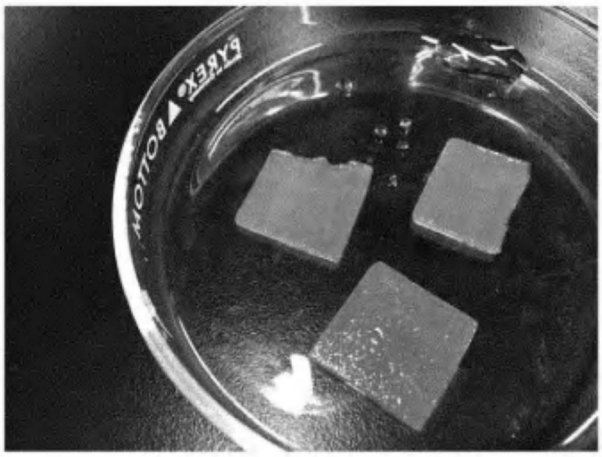


图113

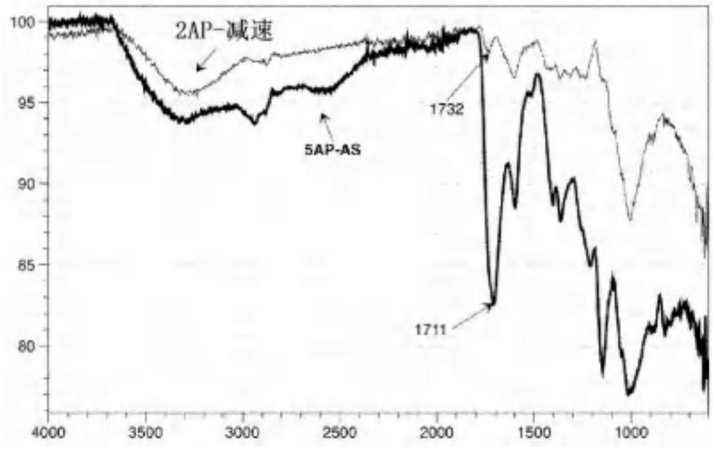


图114

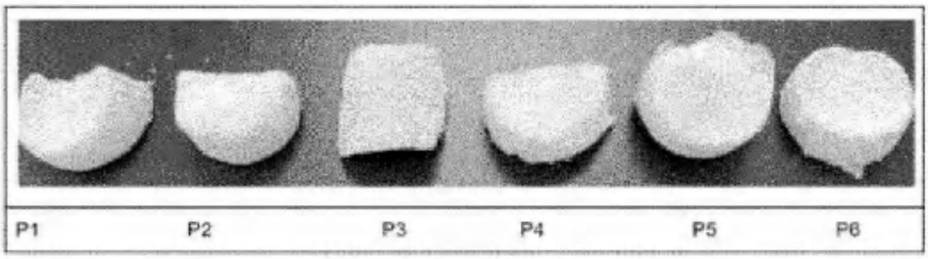


图115

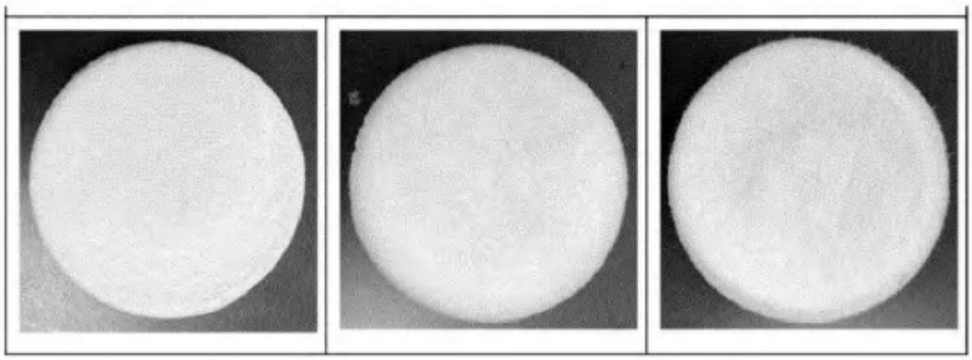


图116



图117

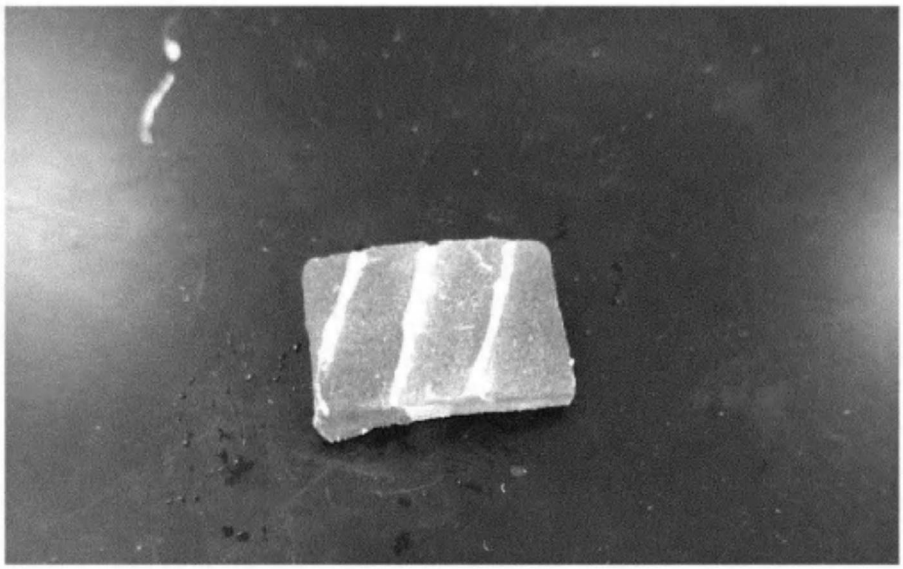


图118

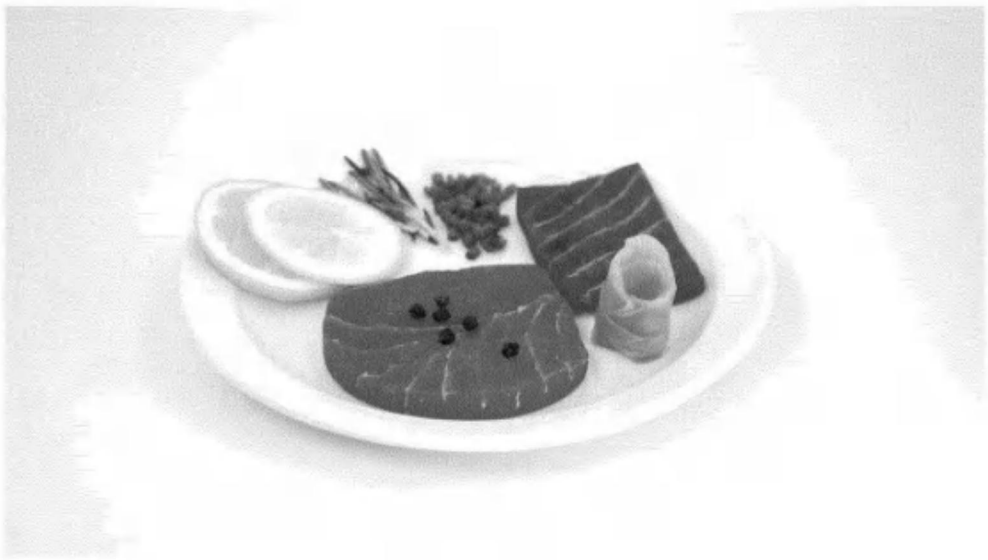


图119

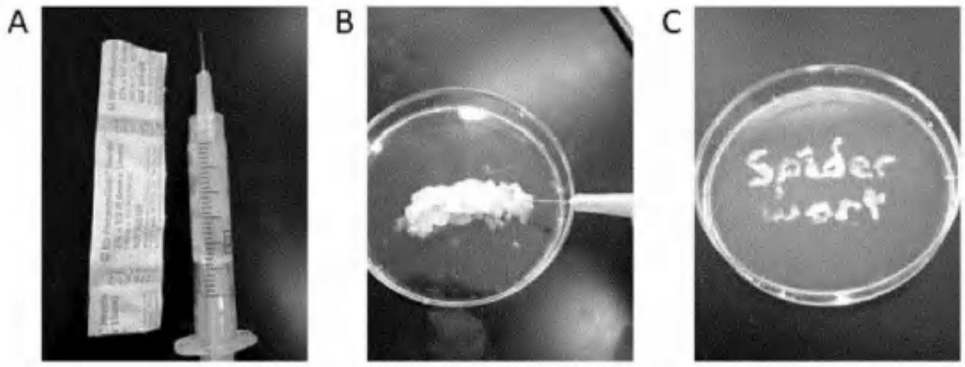


图120

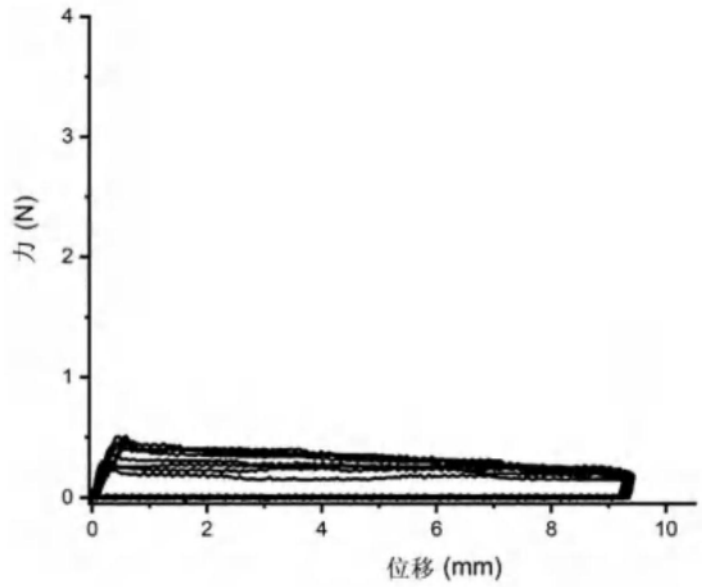


图121

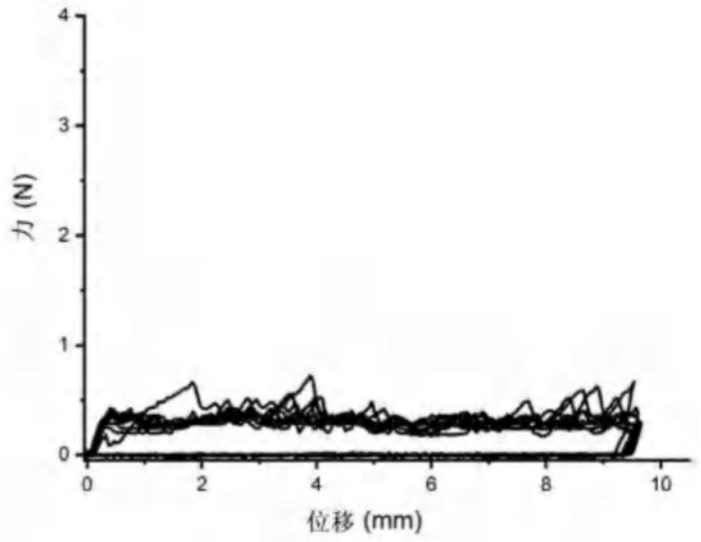


图122

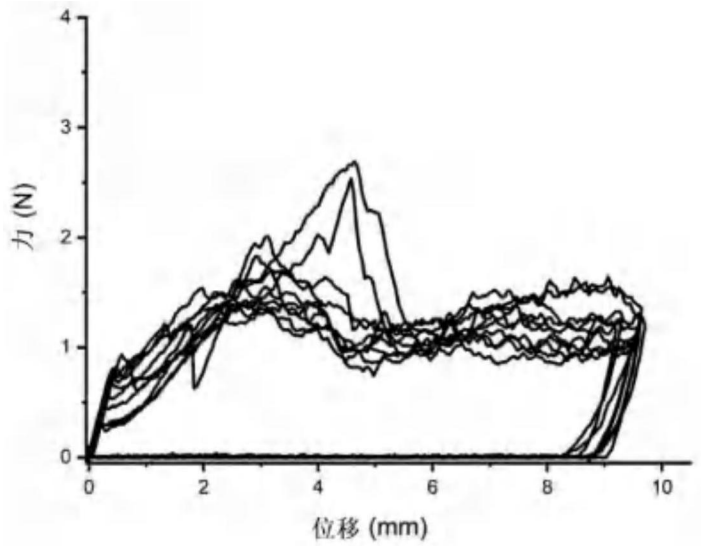


图123

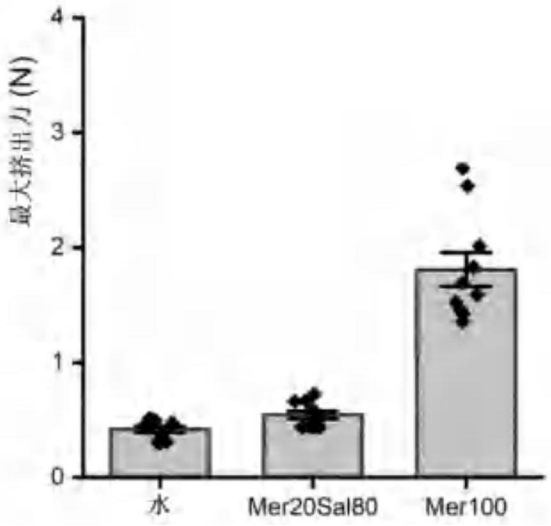


图124

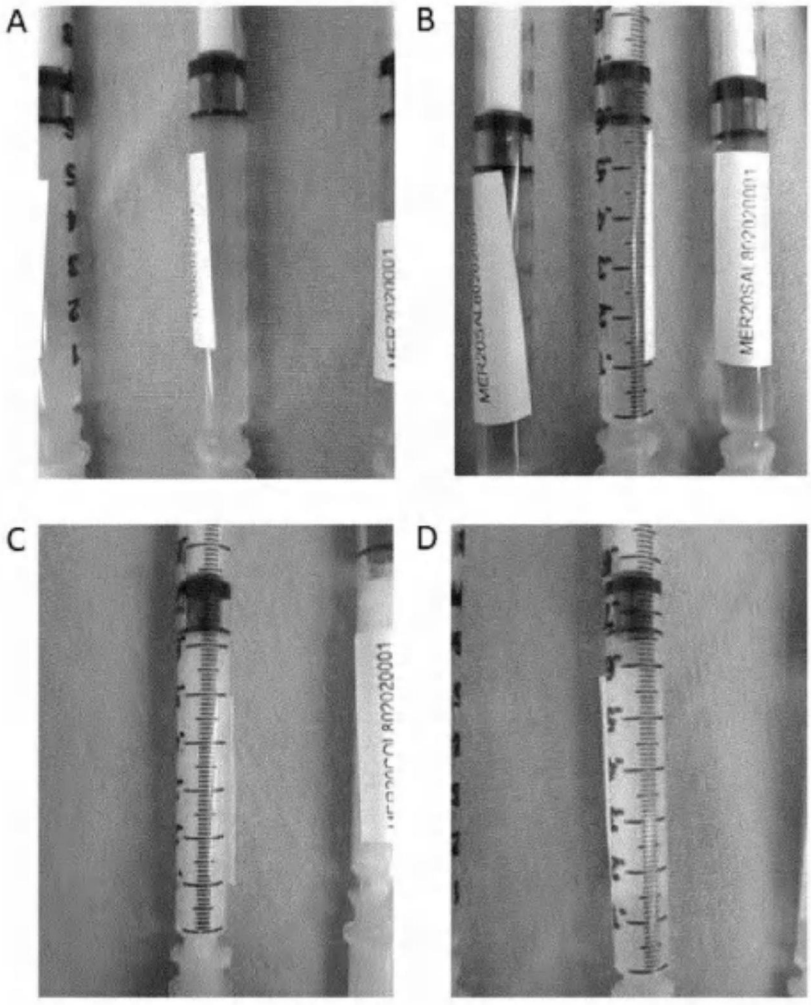


图125

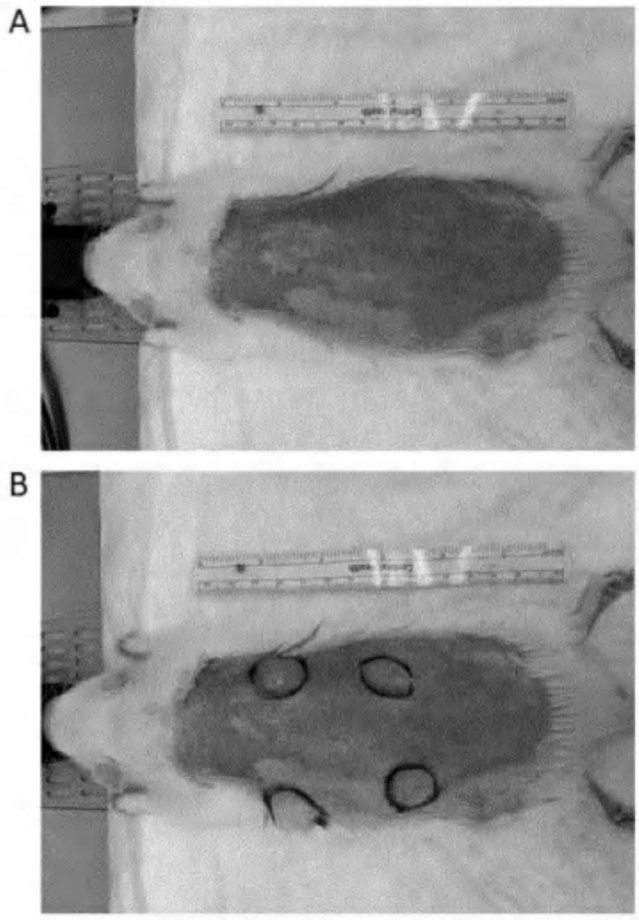


图126

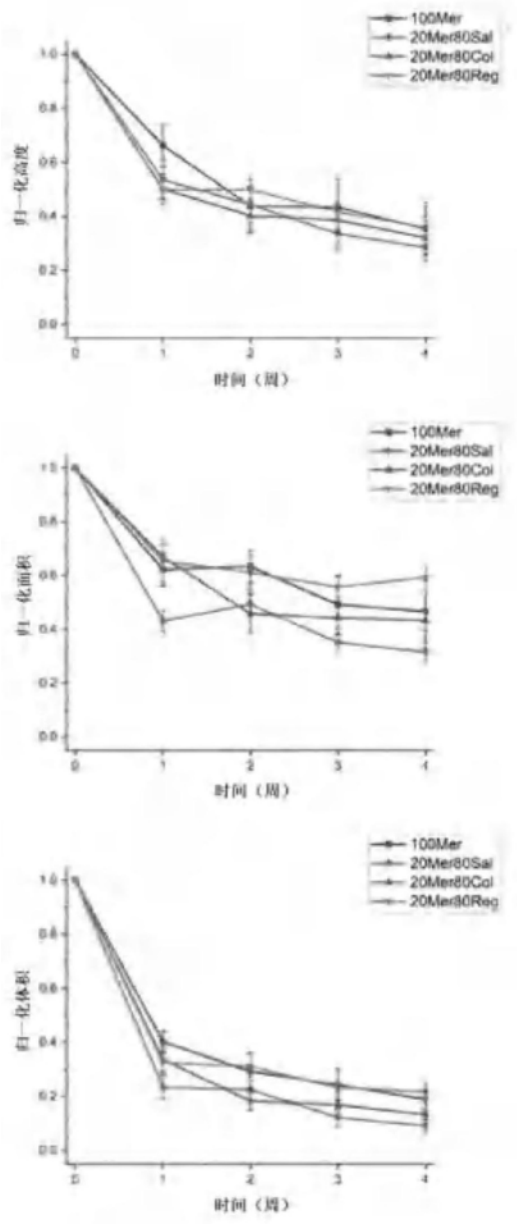

100Mer
20Mer80Sal
20Mer80Col
20Mer80Reg
归一化高度
时间（周）
归一化面积
归一化体积

图127

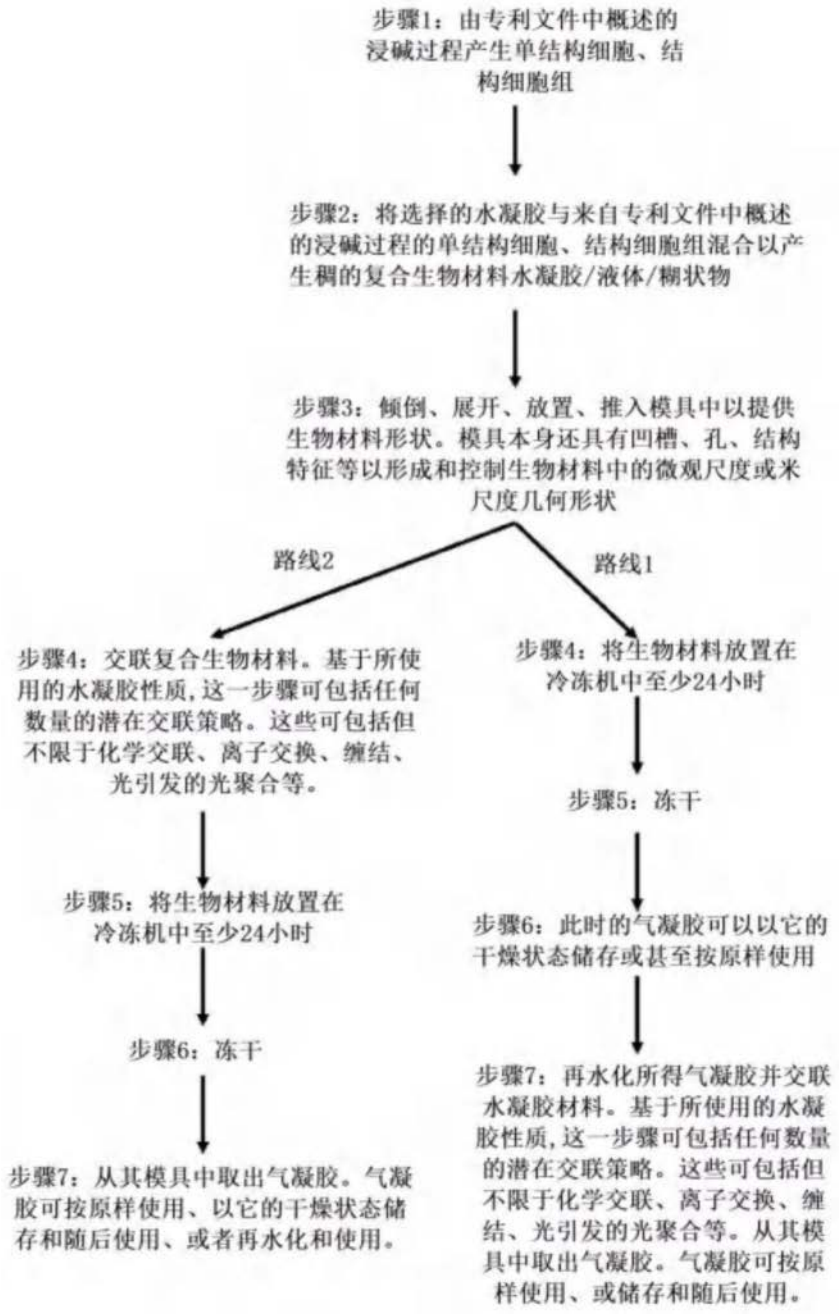

步骤1：由专利文件中概述的浸碱过程产生单结构细胞、结构细胞组
步骤2：将选择的水凝胶与来自专利文件中概述的浸碱过程的单结构细胞、结构细胞组混合以产生稠的复合生物材料水凝胶/液体/糊状物
步骤3：倾倒、展开、放置、推入模具中以提供生物材料形状。模具本身还具有凹槽、孔、结构特征等以形成和控制生物材料中的微观尺度或米尺度几何形状
路线2
路线1
步骤4：交联复合生物材料。基于所使用的水凝胶性质,这一步骤可包括任何数量的潜在交联策略。这些可包括但不限于化学交联、离子交换、缠结、光引发的光聚合等。
步骤5：将生物材料放置在冷冻机中至少24小时
步骤6：冻干
步骤7：从其模具中取出气凝胶。气凝胶可按原样使用、以它的干燥状态储存和随后使用、或者再水化和使用。
步骤4：将生物材料放置在冷冻机中至少24小时
步骤5：冻干
步骤6：此时的气凝胶可以以它的干燥状态储存或甚至按原样使用
步骤7：再水化所得气凝胶并交联水凝胶材料。基于所使用的水凝胶性质,这一步骤可包括任何数量的潜在交联策略。这些可包括但不限于化学交联、离子交换、缠结、光引发的光聚合等。从其模具中取出气凝胶。气凝胶可按原样使用、或储存和随后使用。

图128

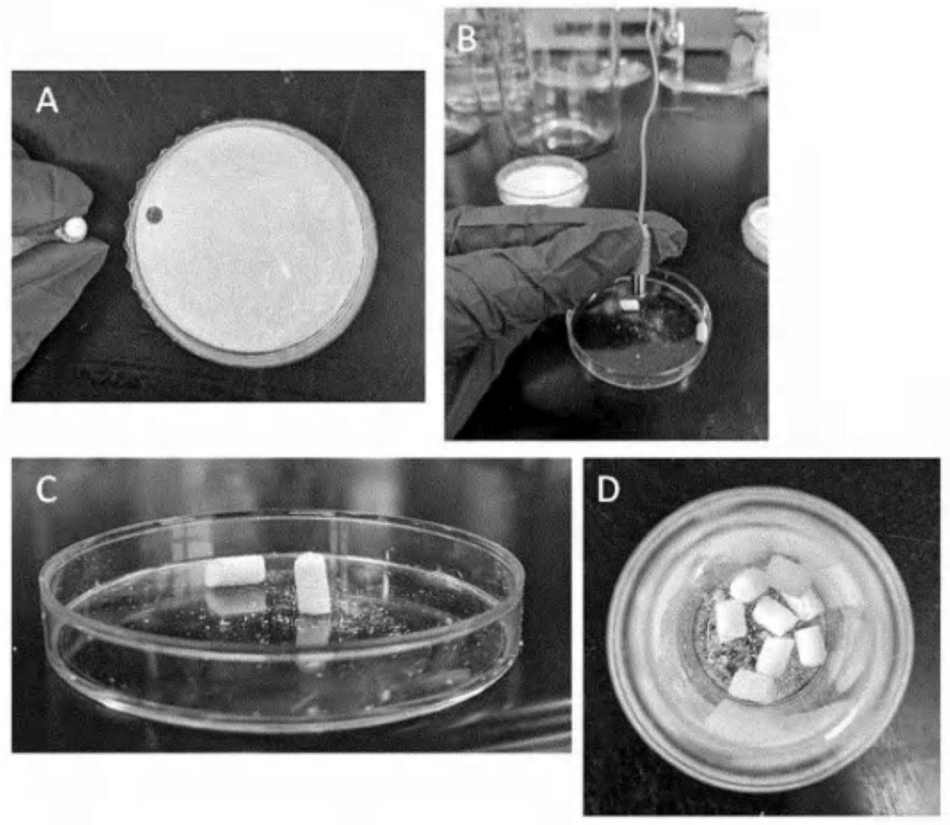


图129

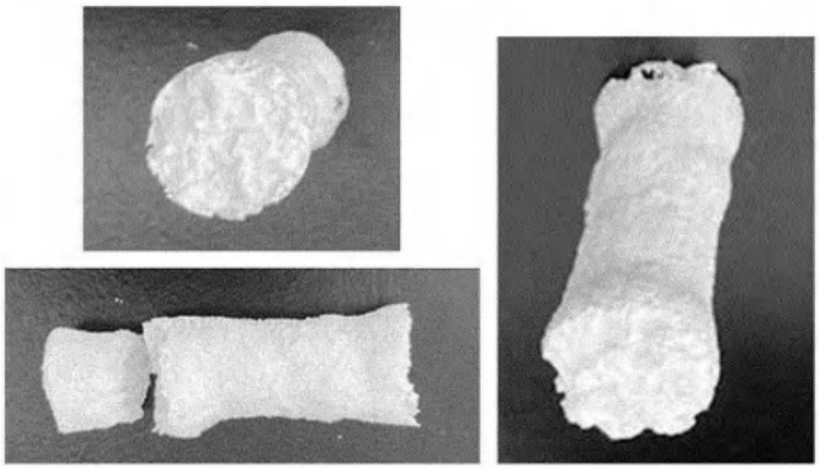


图130

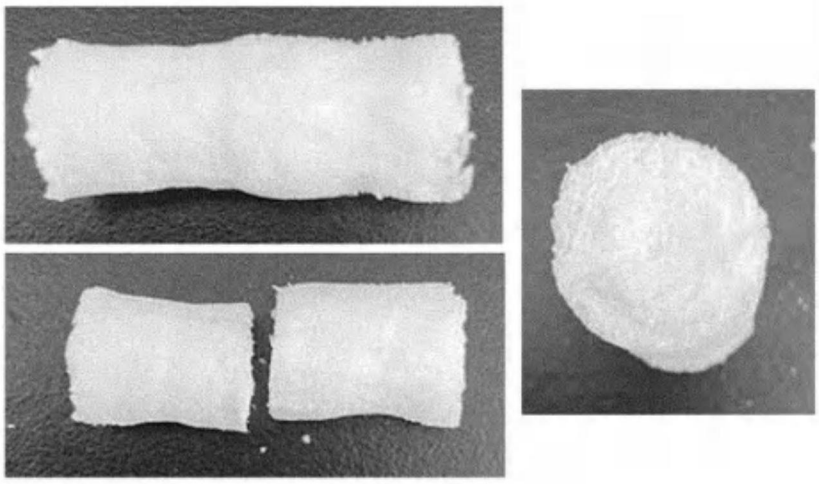


图131

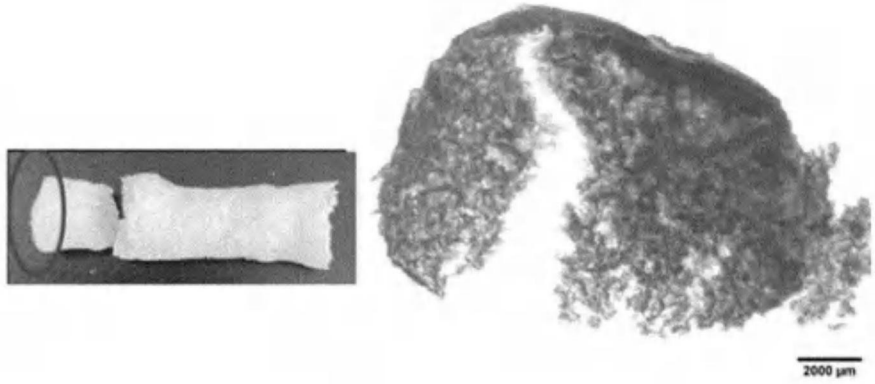


图132

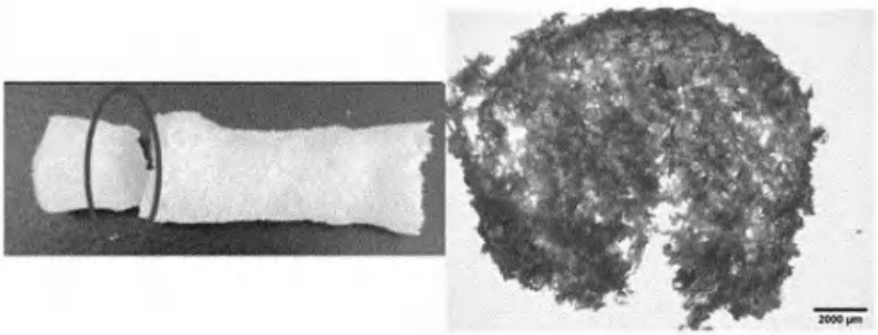


图133

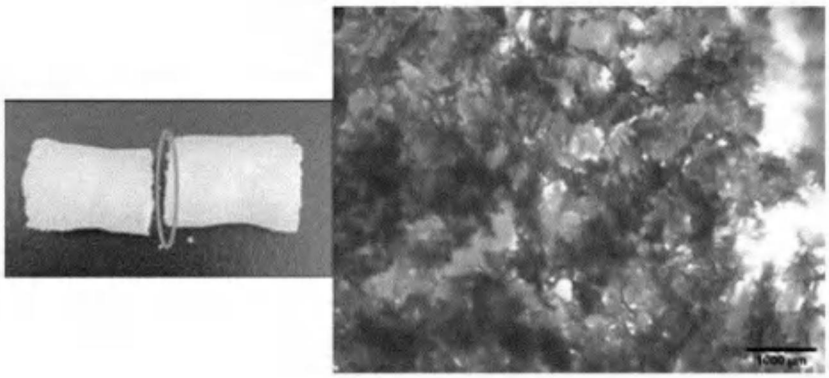


图134

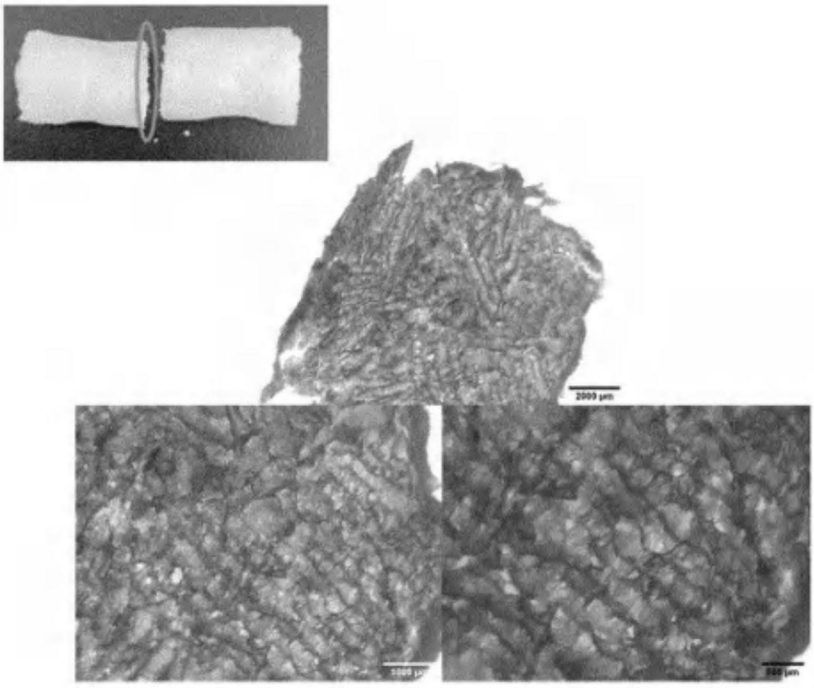


图135

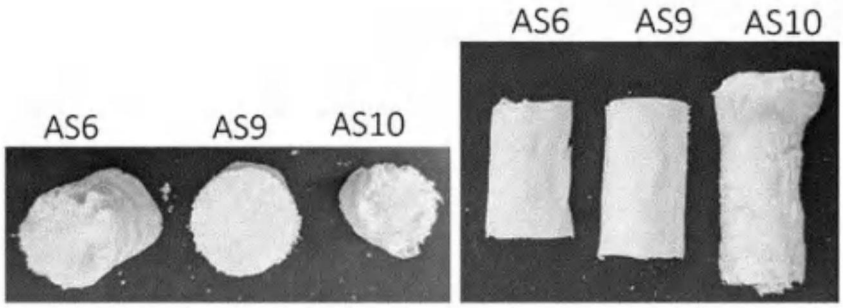


图136

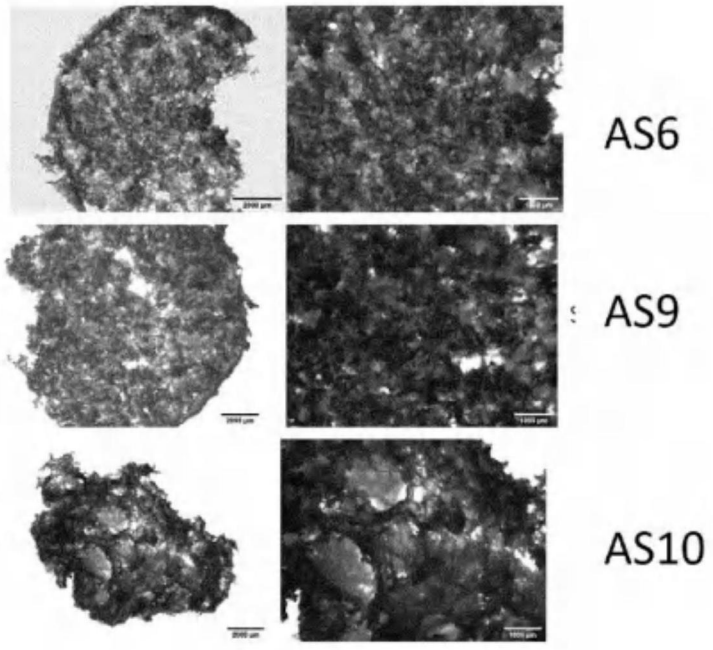


图137

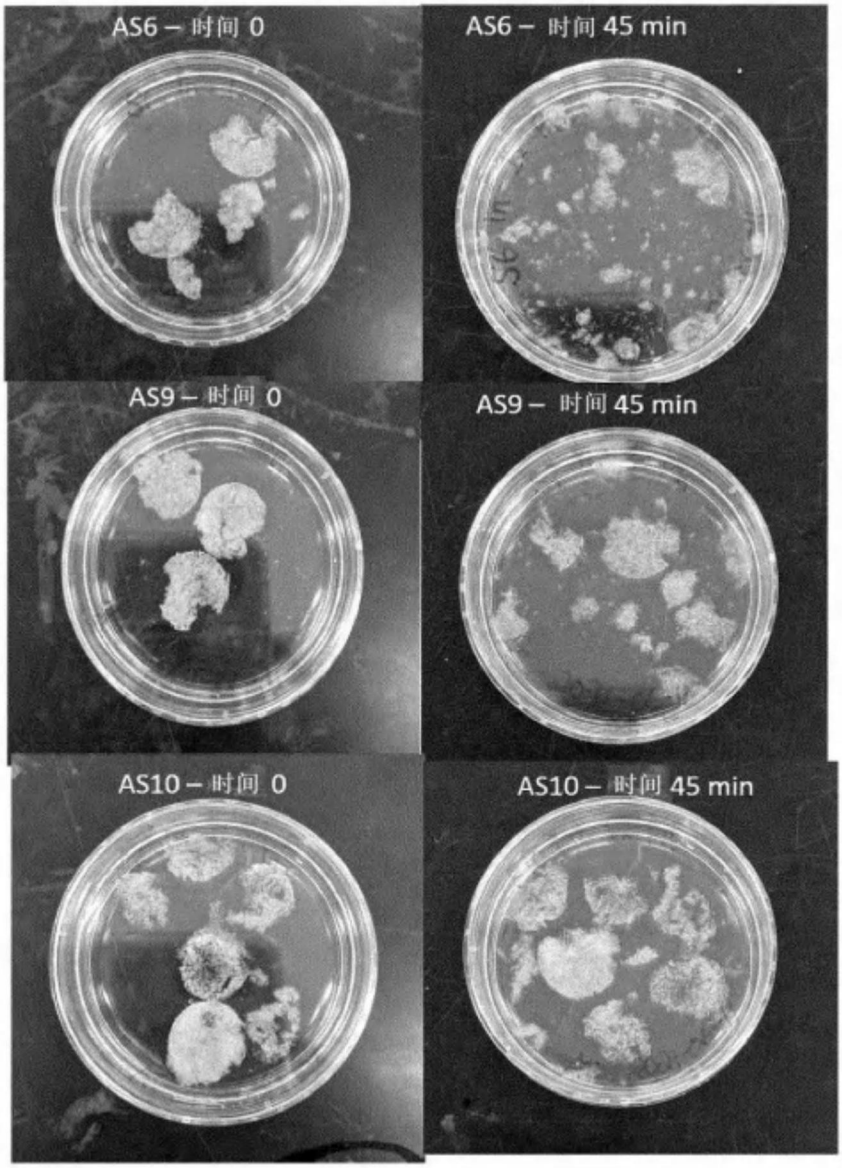

AS6 – 时间 0
AS6 – 时间 45 min
AS9 – 时间 0
AS9 – 时间 45 min
AS10 – 时间 0
AS10 – 时间 45 min

图138

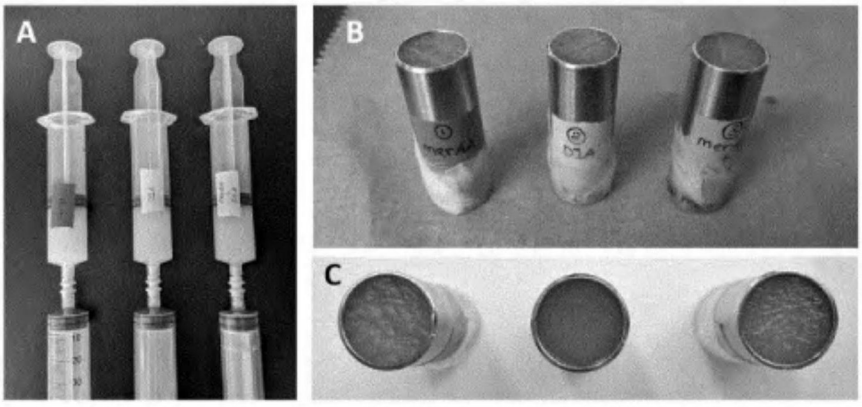

A
B
C

图139

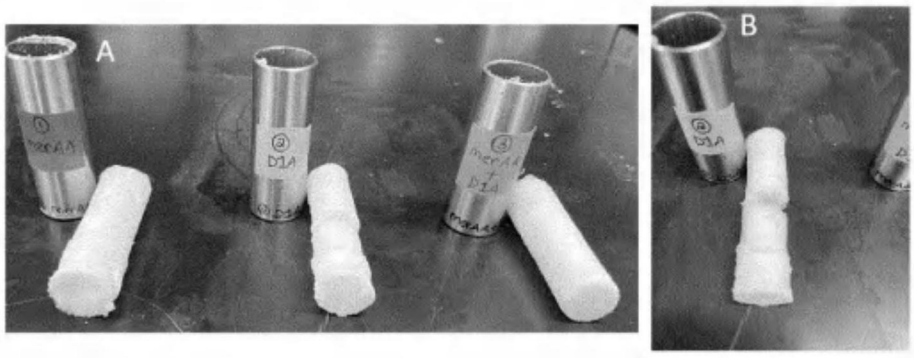


图140

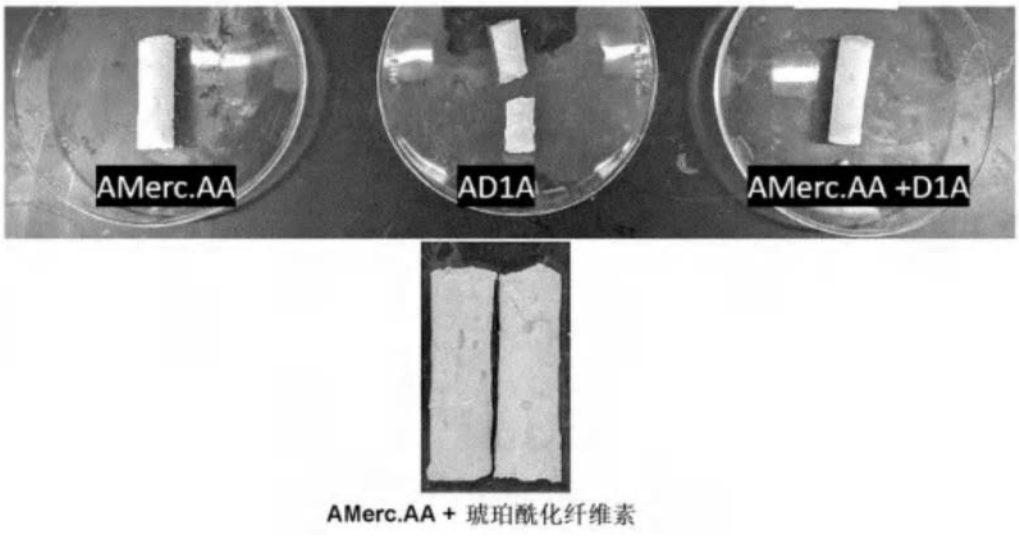


图141

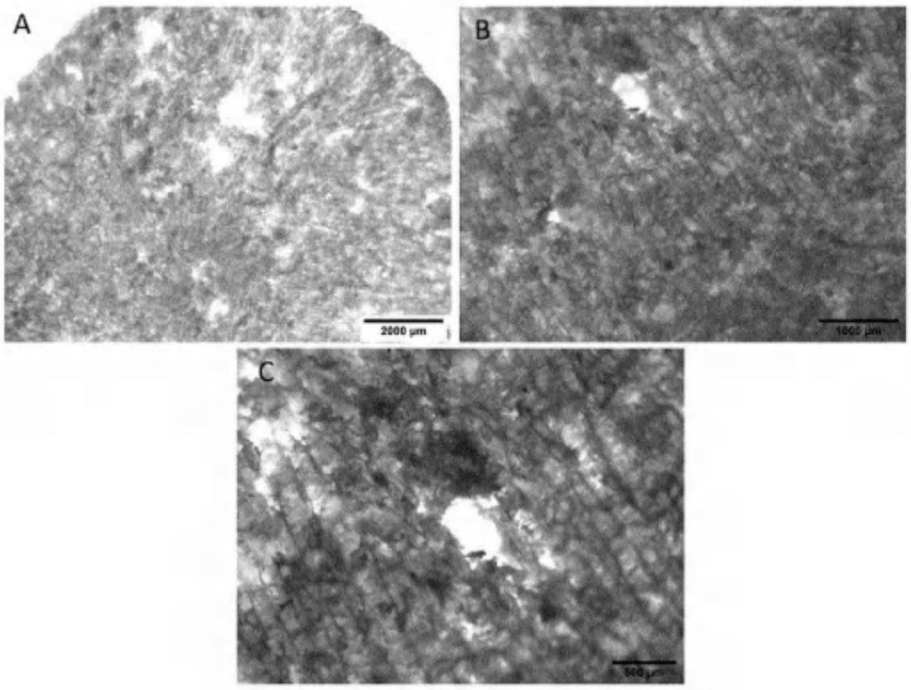


图142

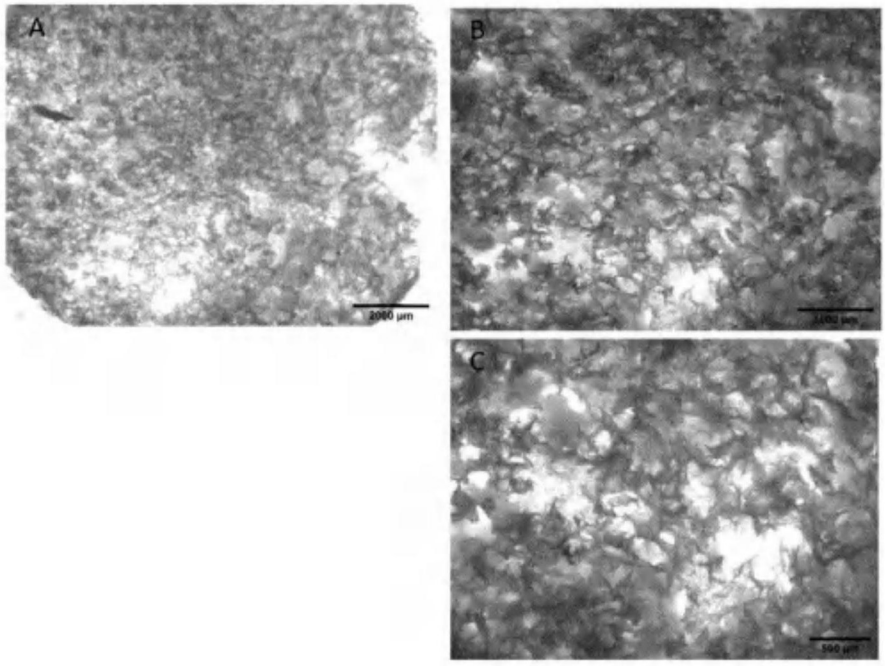


图143

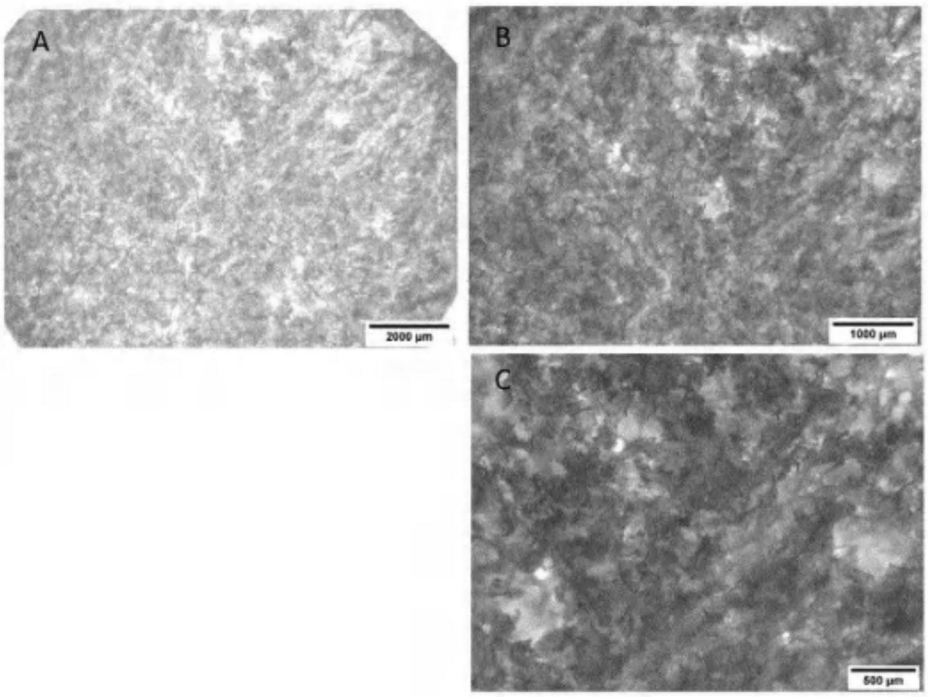


图144

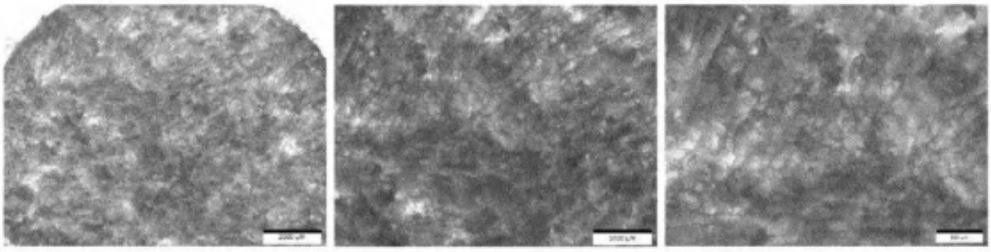


图145

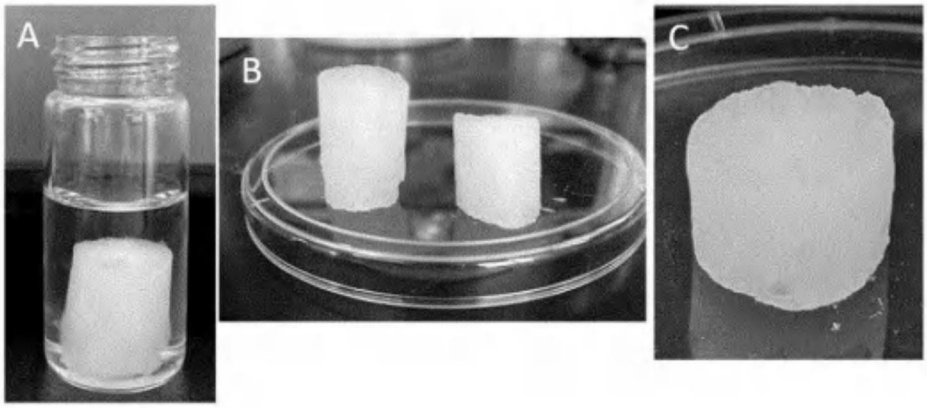


图146

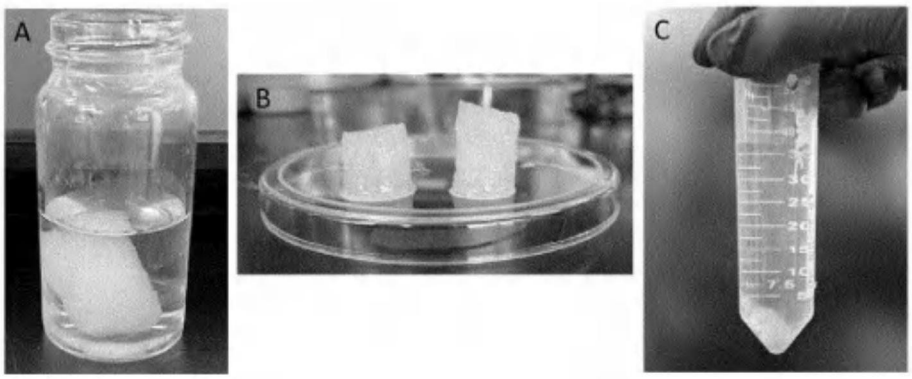


图147

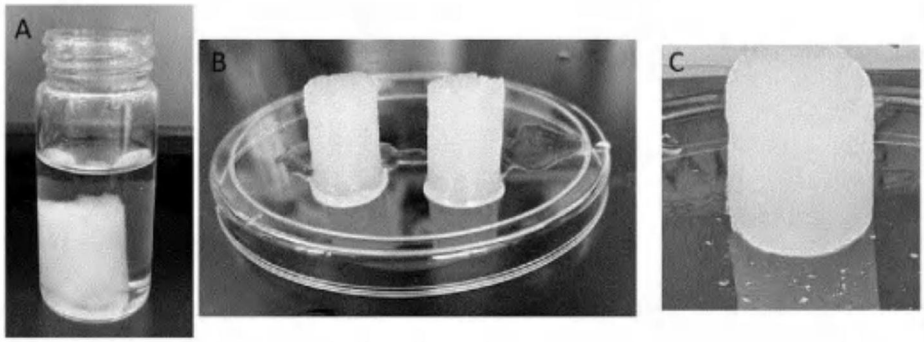


图148

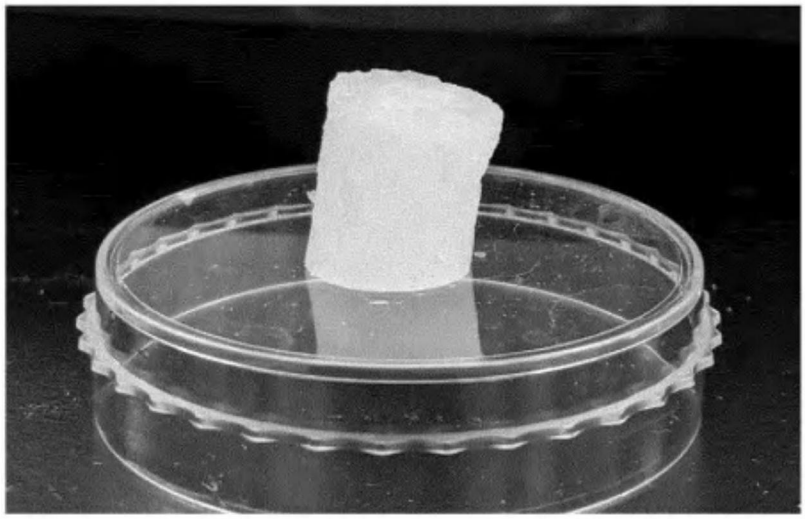


图149

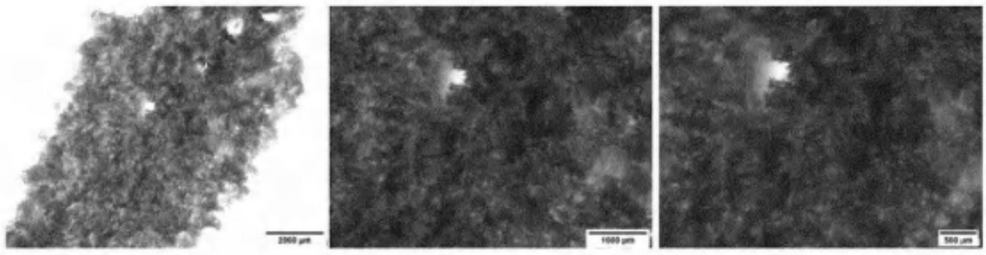


图150

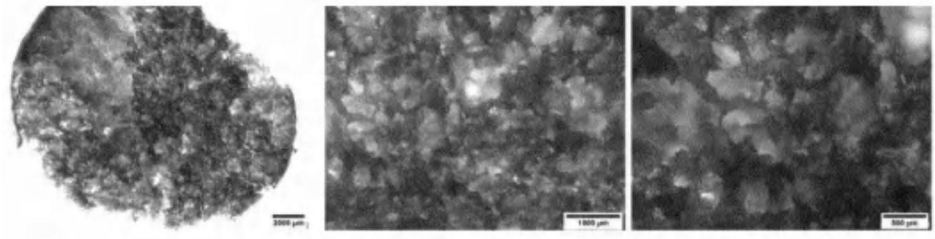


图151

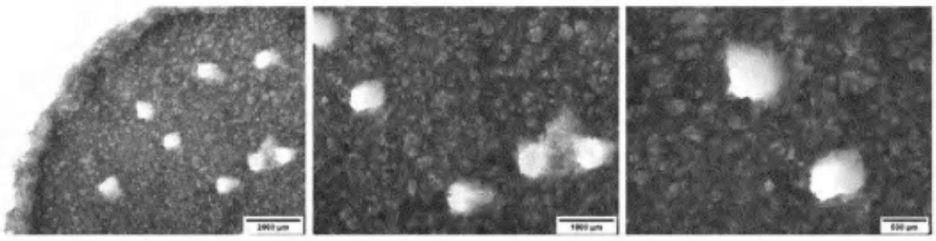


图152

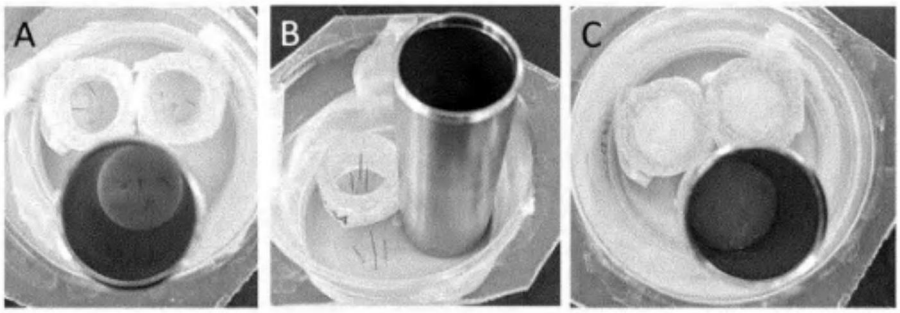


图153

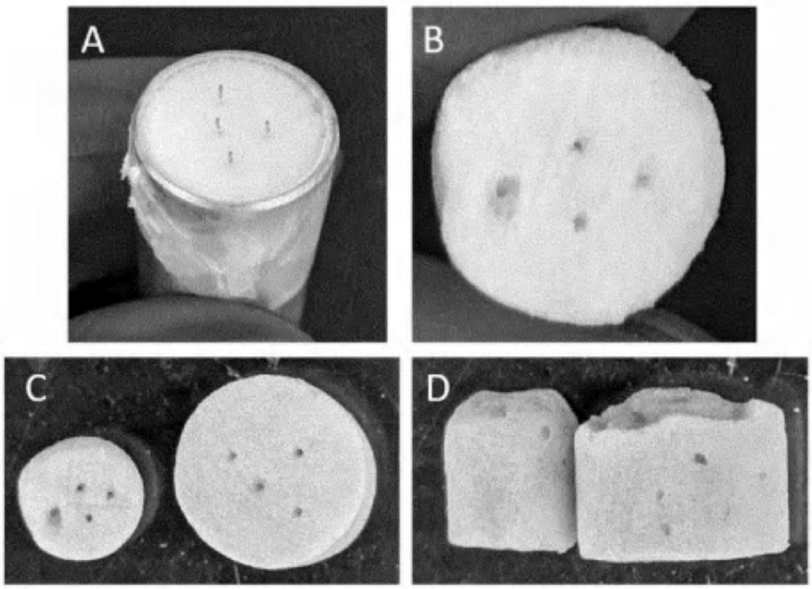


图154

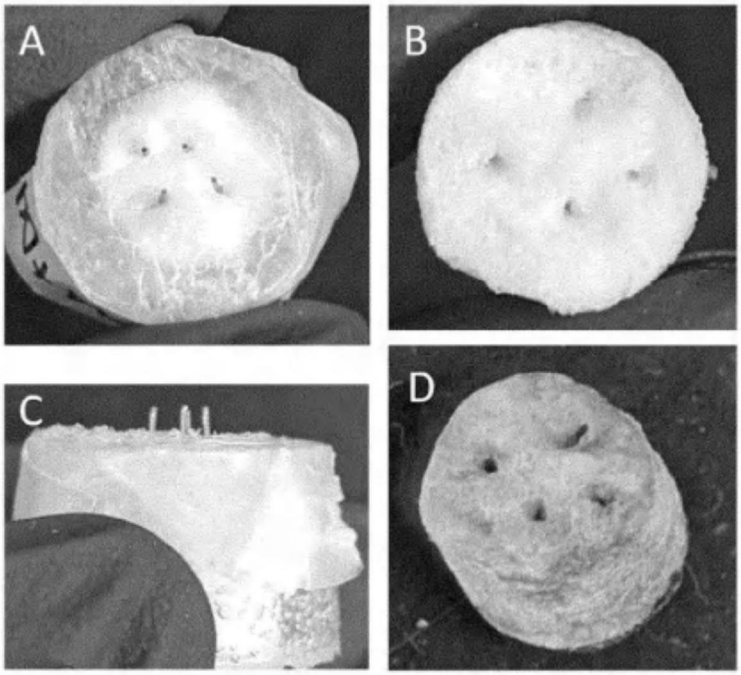


图155

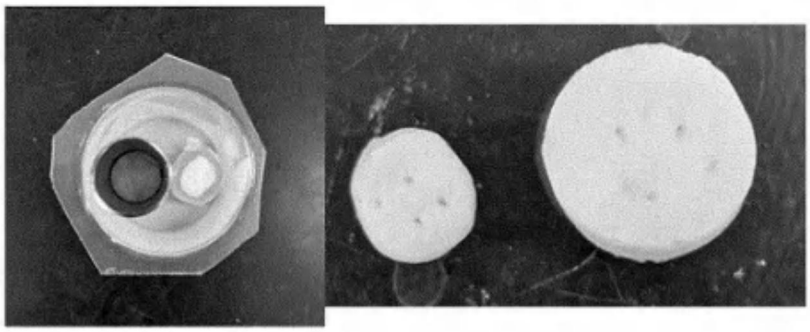


图156

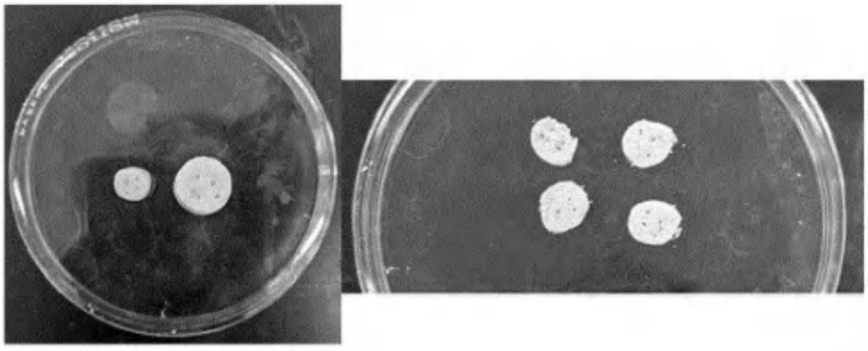


图157

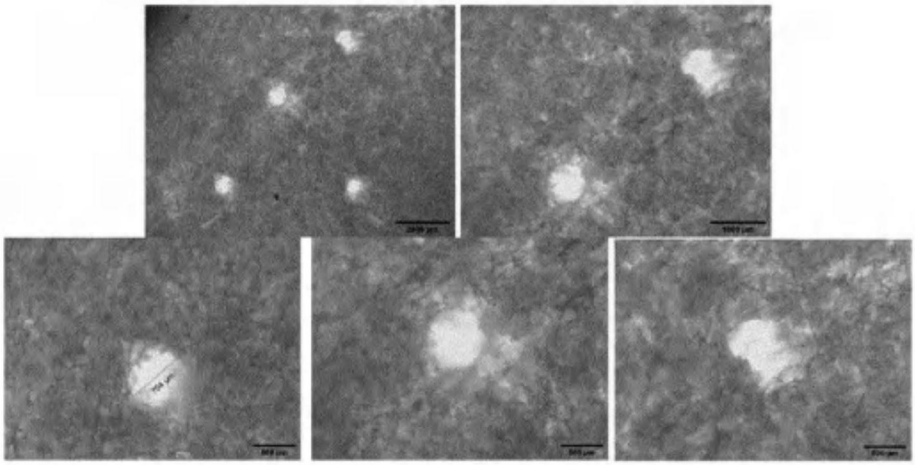


图158

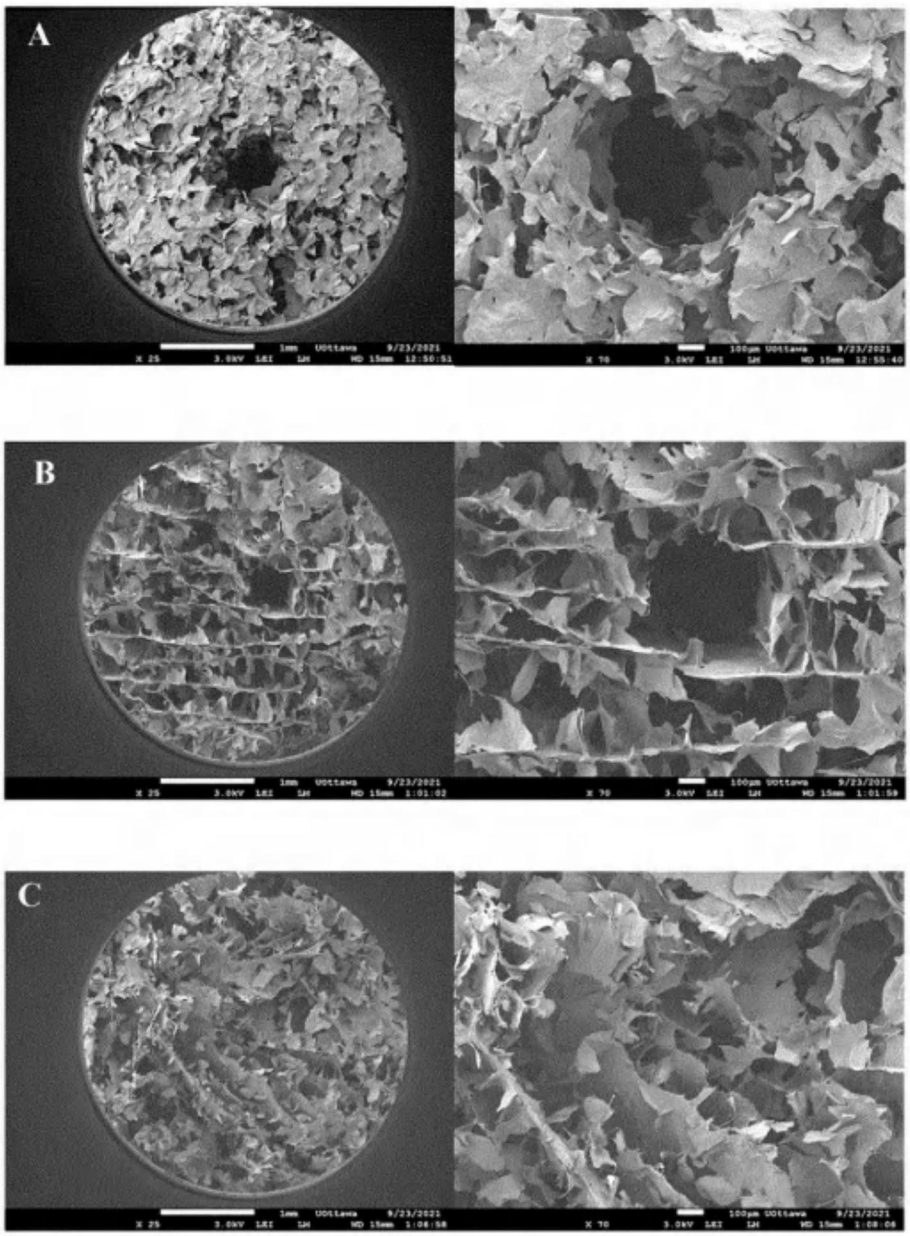


图159

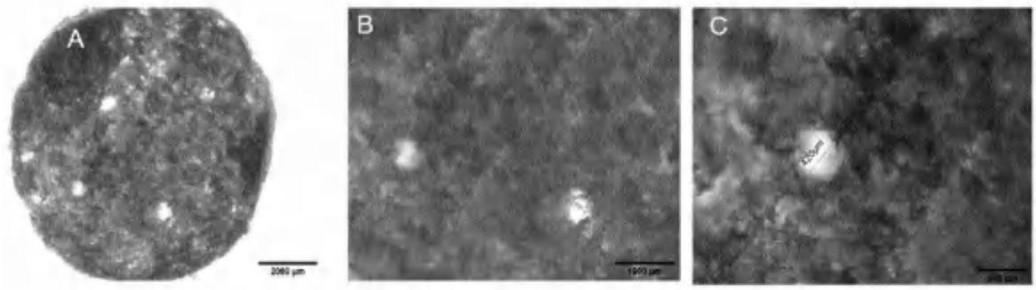


图160

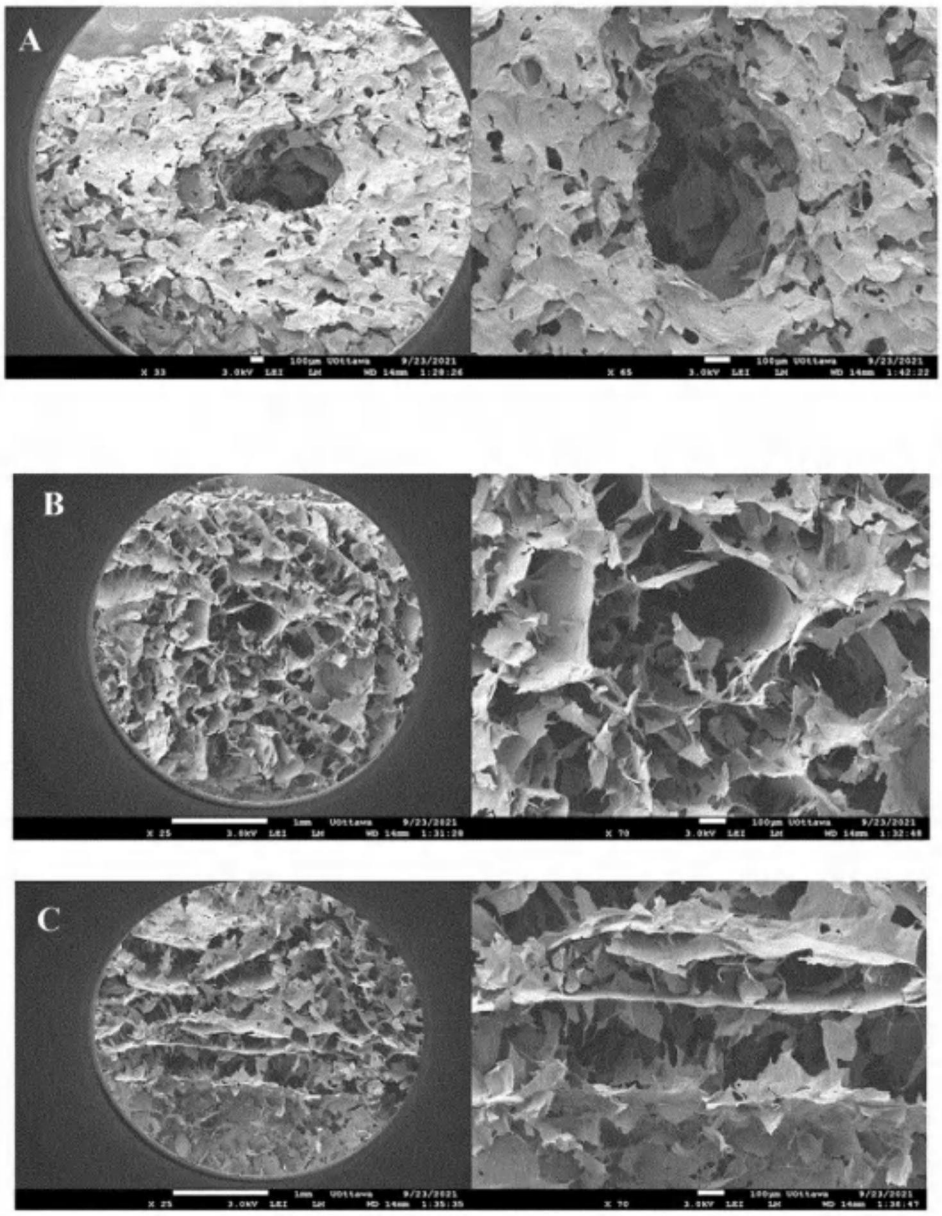


图161

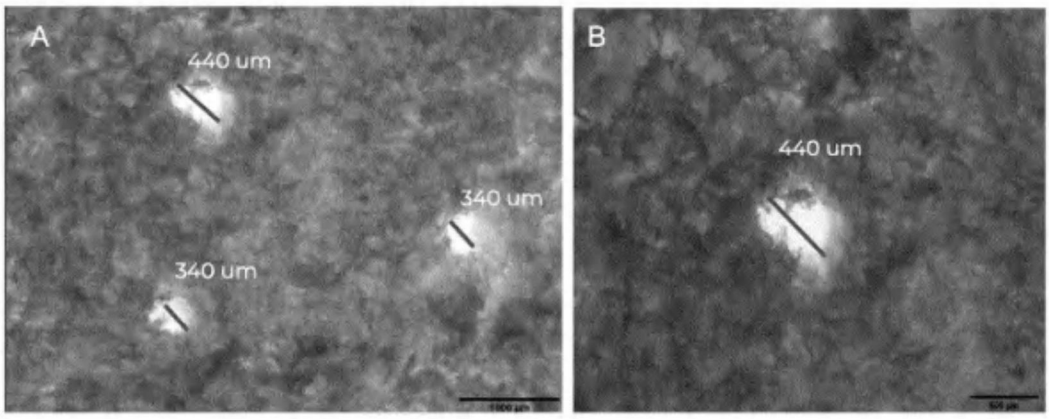


图162

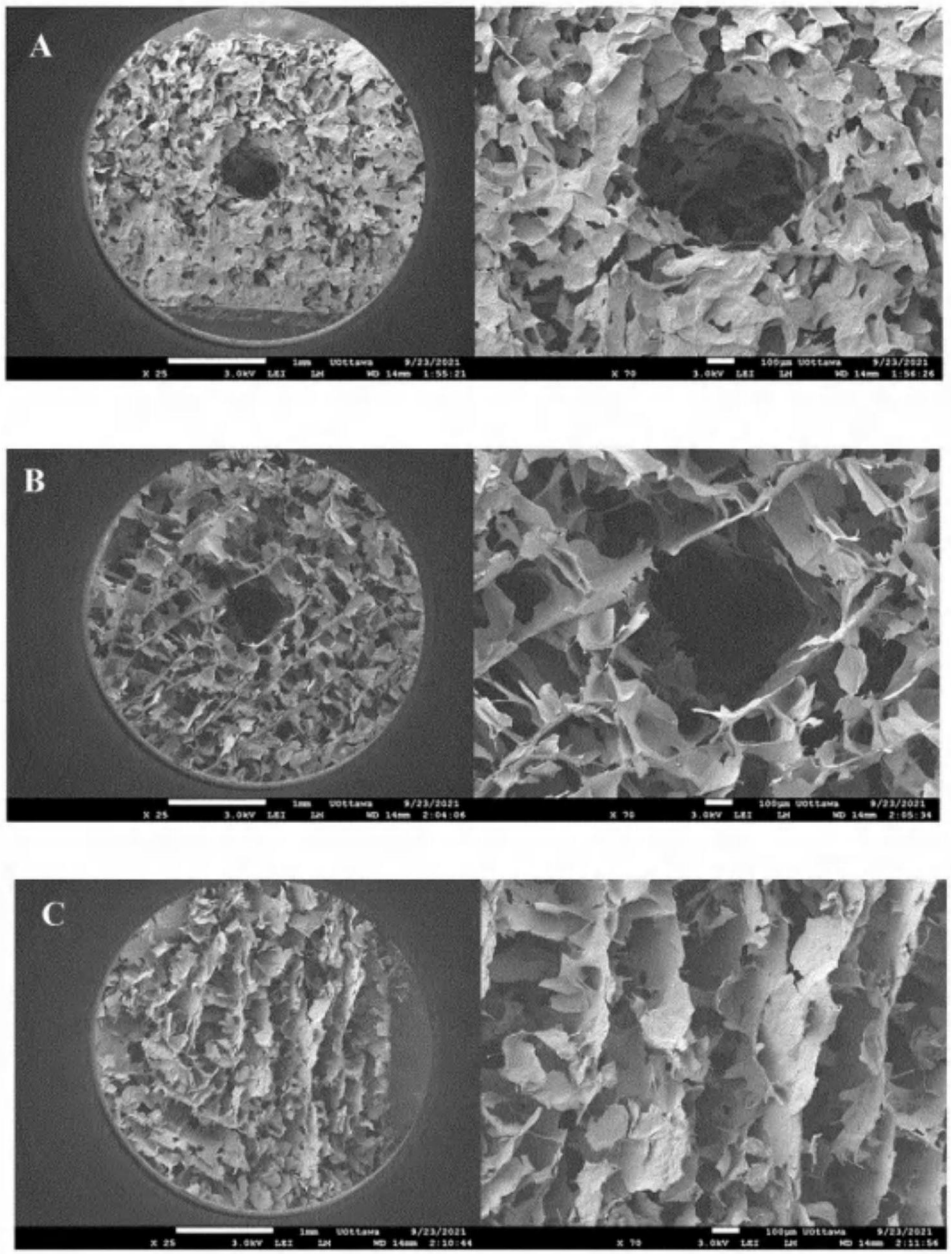


图163

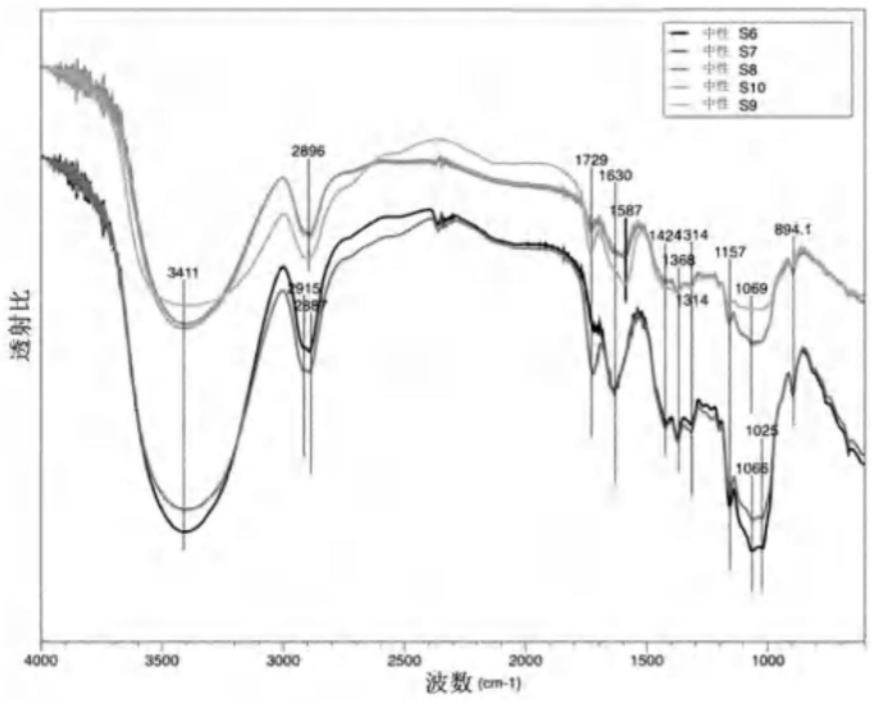

S6
S7
S8
S10
S9
2896
1729
1630
1587
1424
314
1157
894.1
1368
1314
1069
3411
2915
2847
1025
1068
透射比
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
波数 (cm-1)

图164

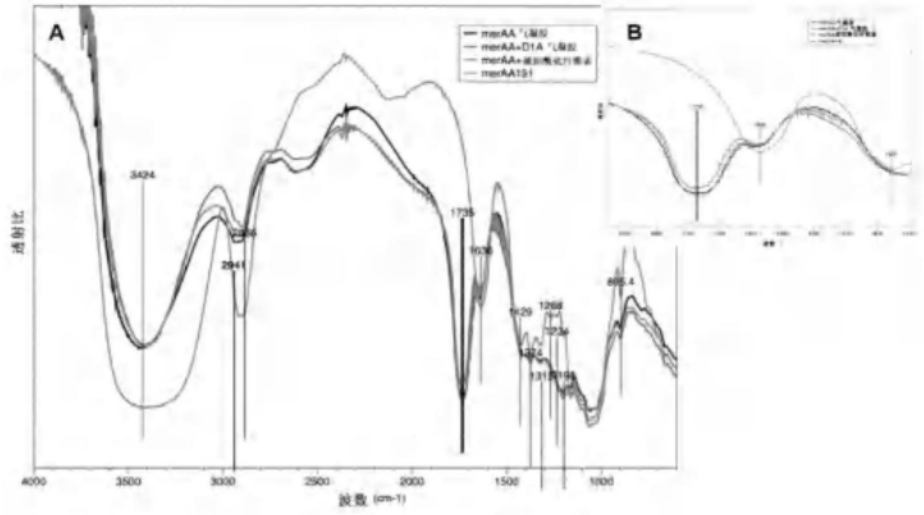

A
B
3424
2941
1735
1629
1268
1234
透射比
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
波数 (cm-1)

图165

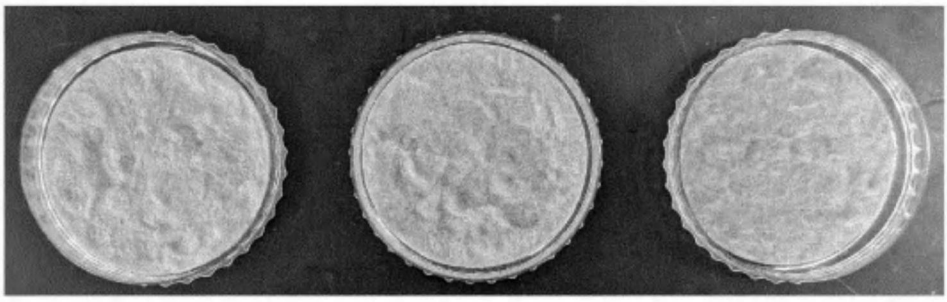


图166

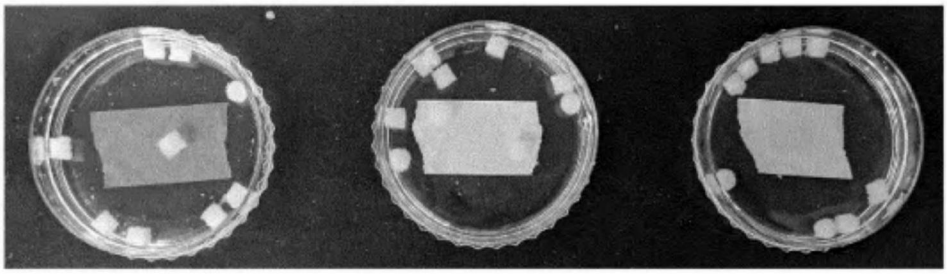


图167

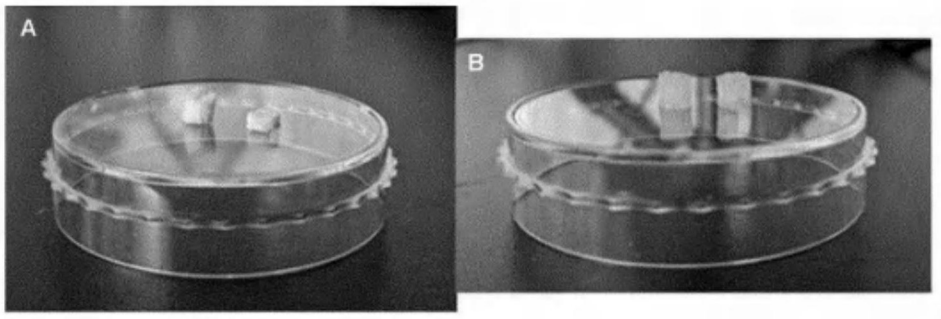


图168

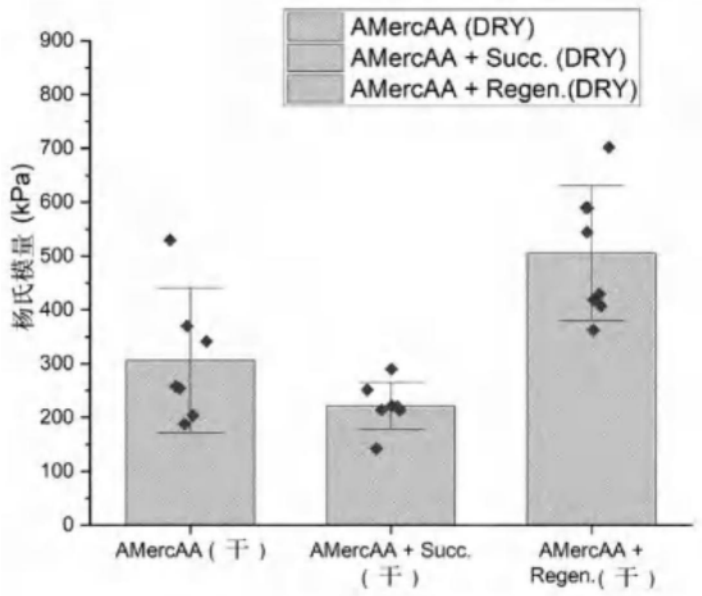

AMercAA (DRY)
AMercAA + Succ. (DRY)
AMercAA + Regen.(DRY)
杨氏模量 (kPa)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
AMercAA (干)
AMercAA + Succ. (干)
AMercAA + Regen.(干)

图169

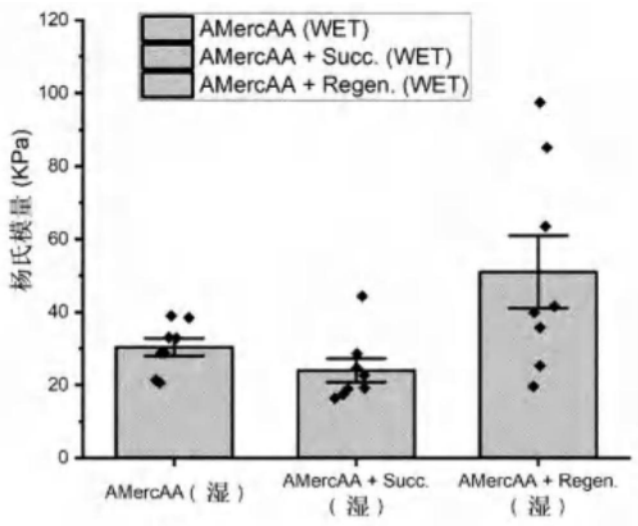

AMercAA (WET)
AMercAA + Succ. (WET)
AMercAA + Regen. (WET)
杨氏模量 (KPa)
120
100
80
60
40
20
0
AMercAA (湿)
AMercAA + Succ. (湿)
AMercAA + Regen. (湿)

图170

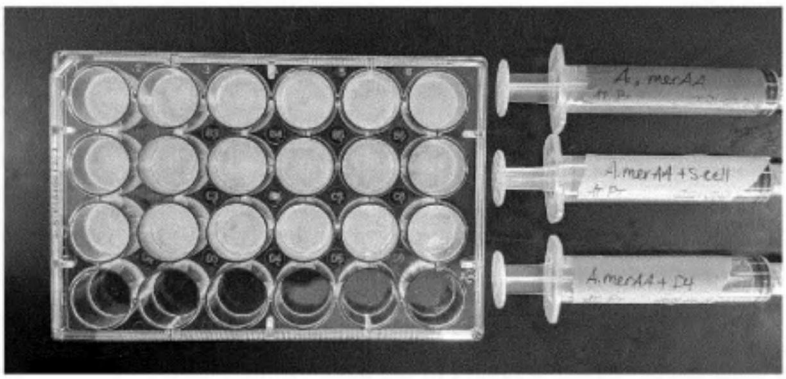


图171

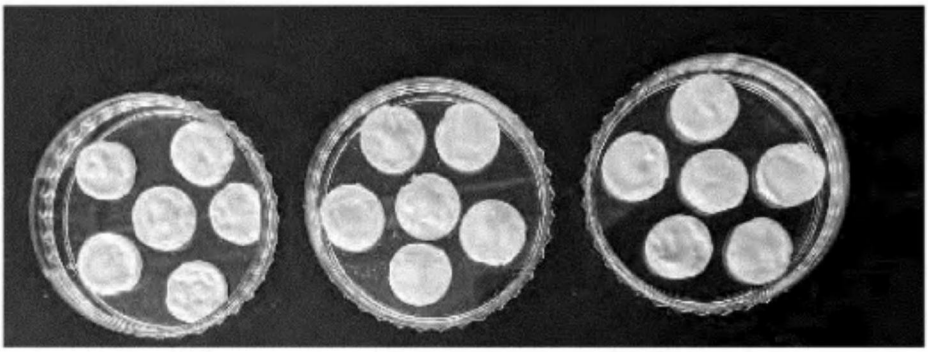


图172

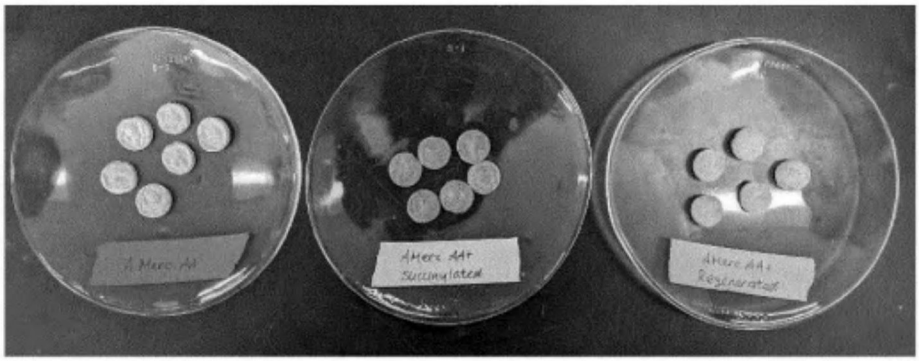


图173

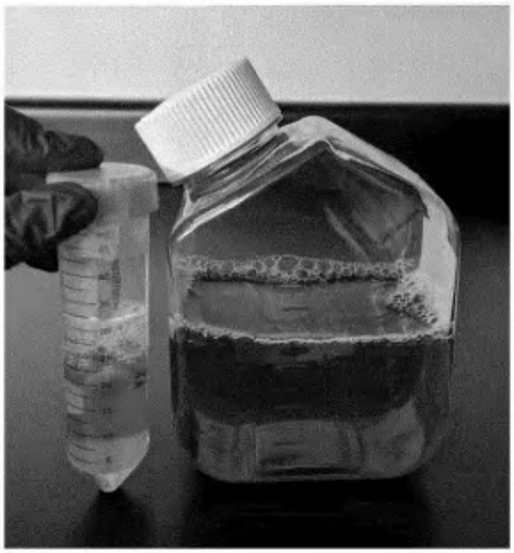


图174

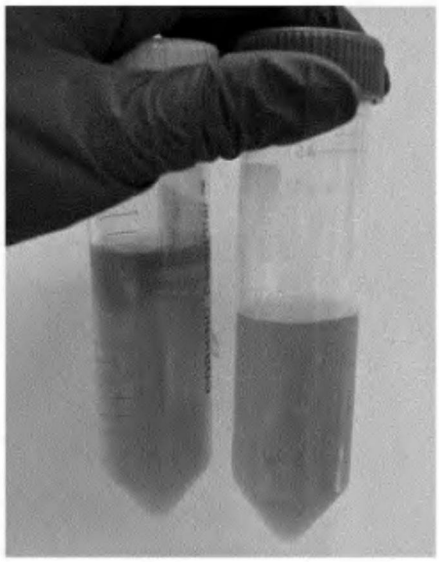


图175

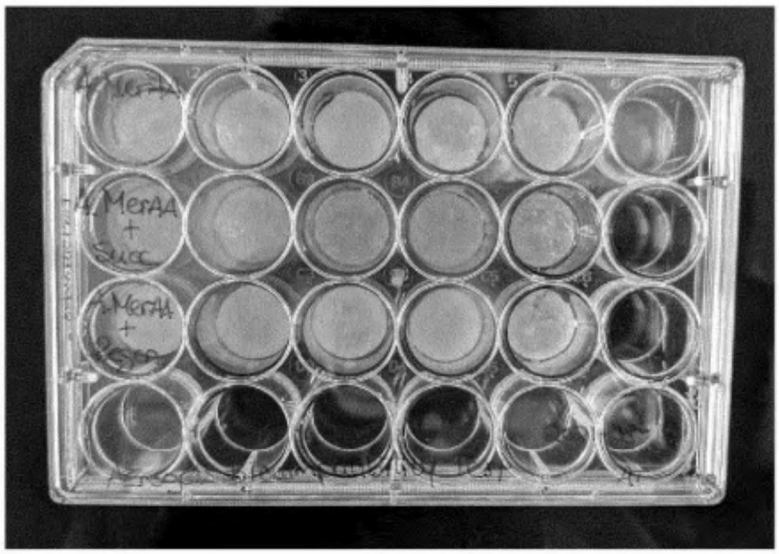


图176

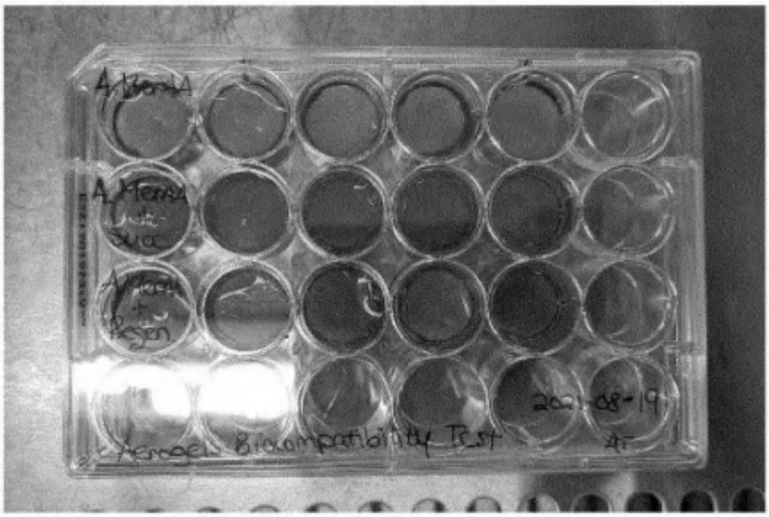


图177

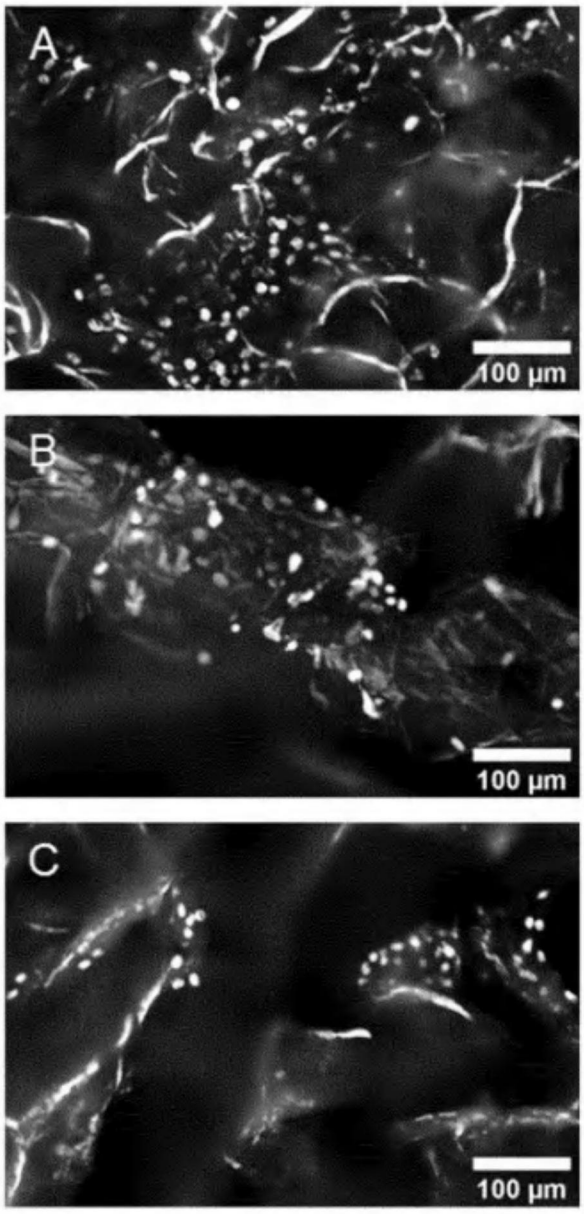


图178

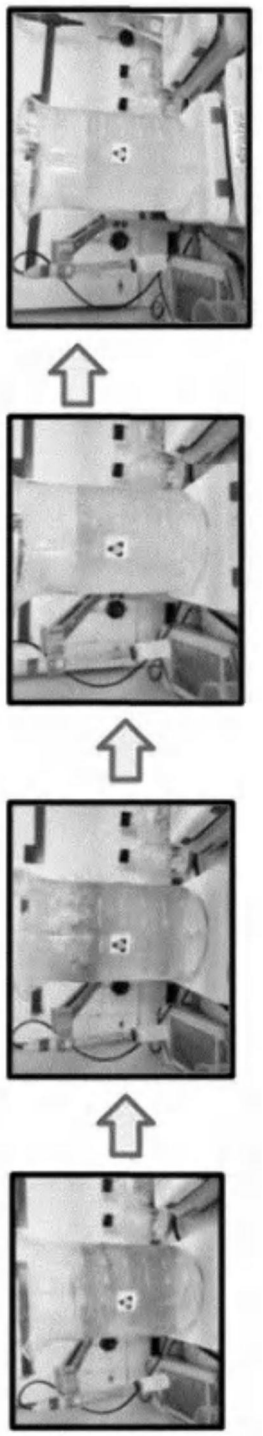


图179

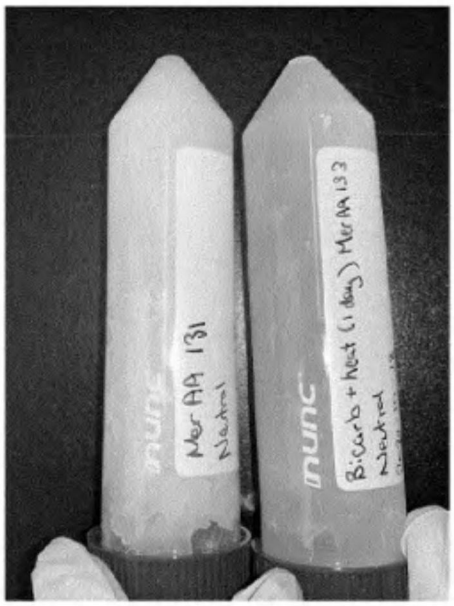


图180

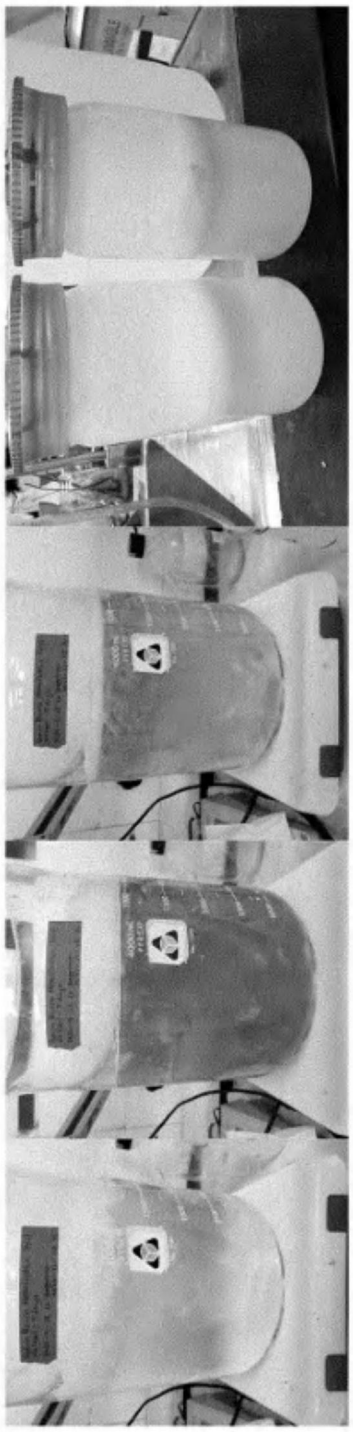


图181

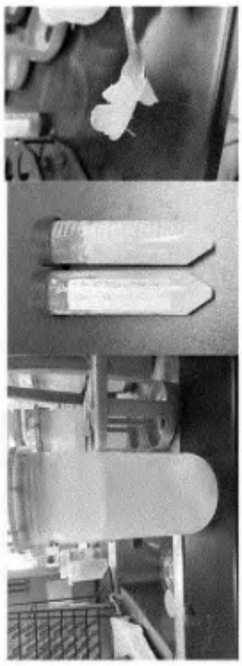


图182

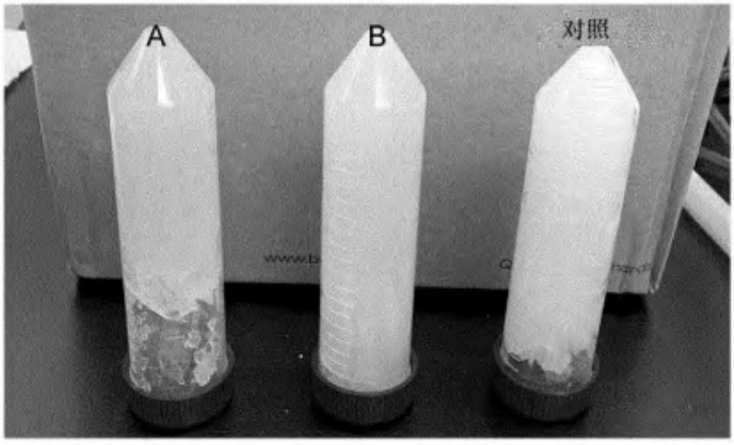


图183

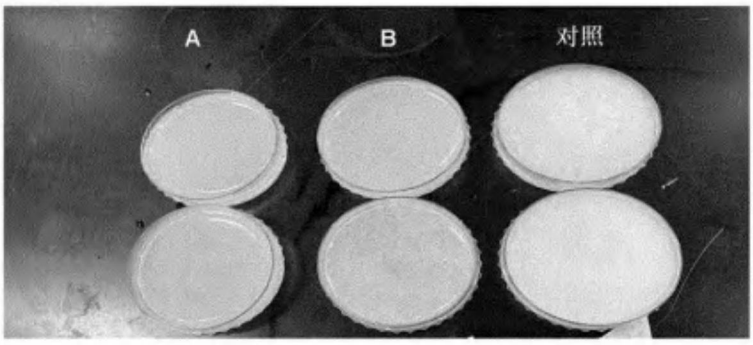


图184

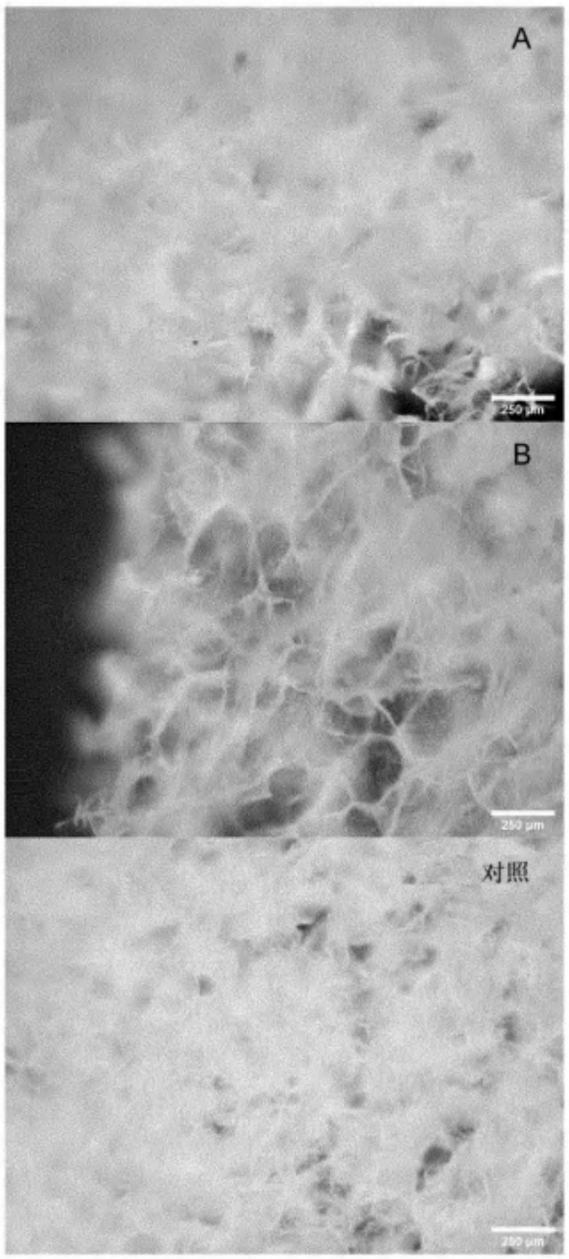


图185

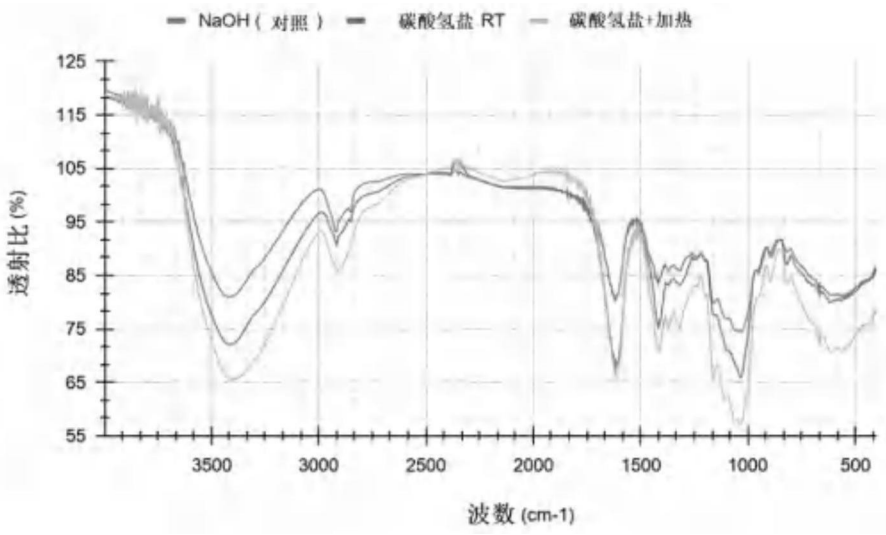

NaOH（对照）
碳酸氢盐 RT
碳酸氢盐+加热
透射比 (%)
125
115
105
95
85
75
65
55
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
波数 (cm-1)

图186

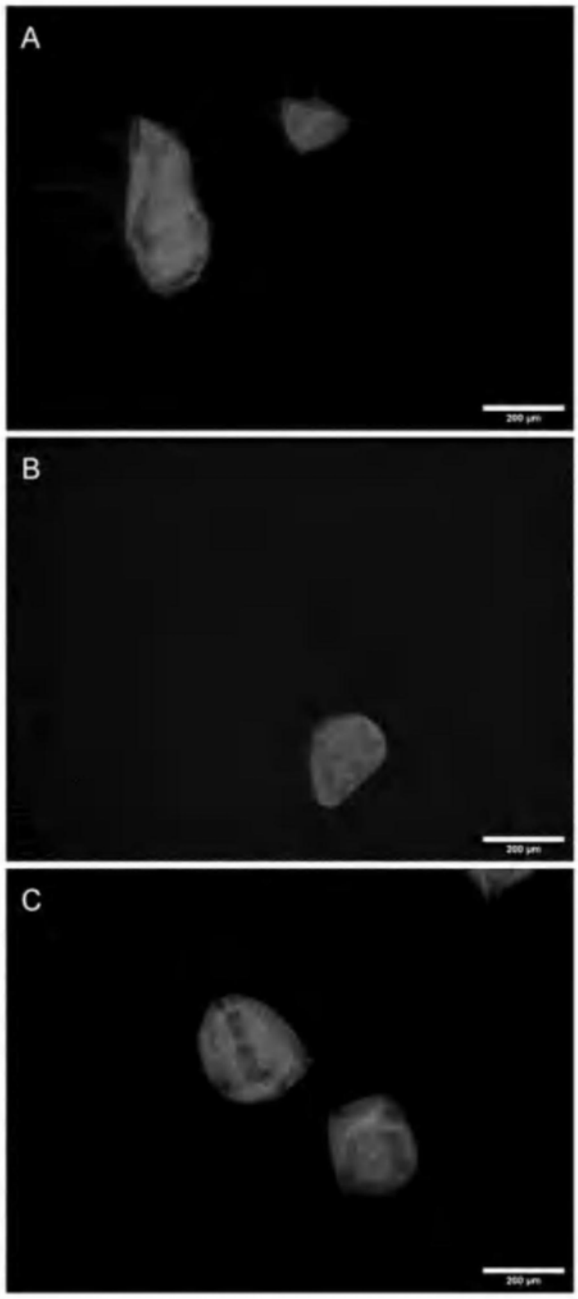


图187

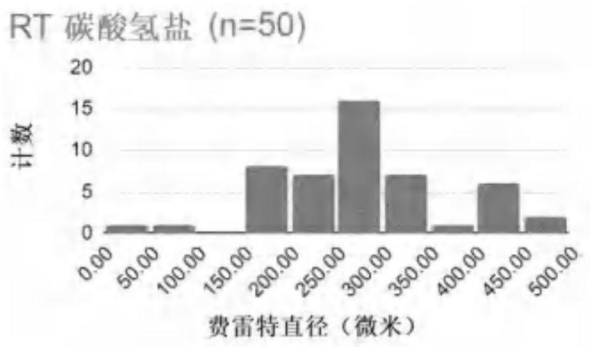


图188

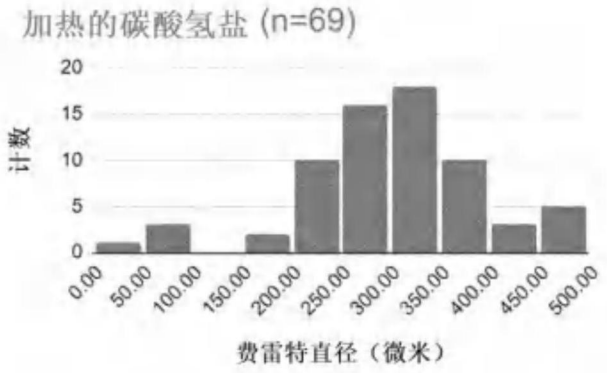


图189

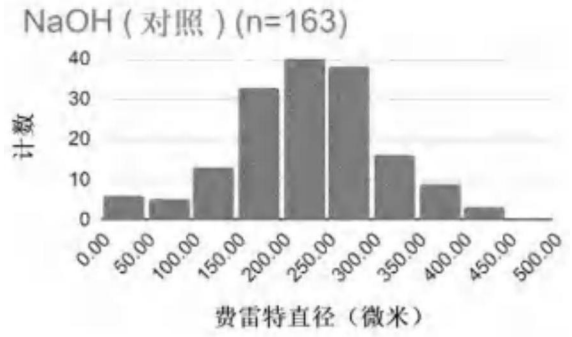


图190

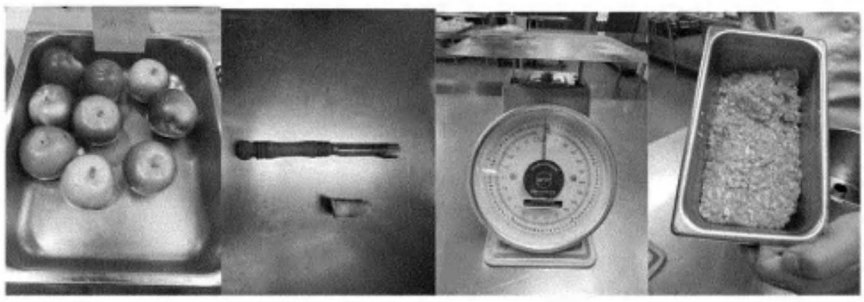


图191

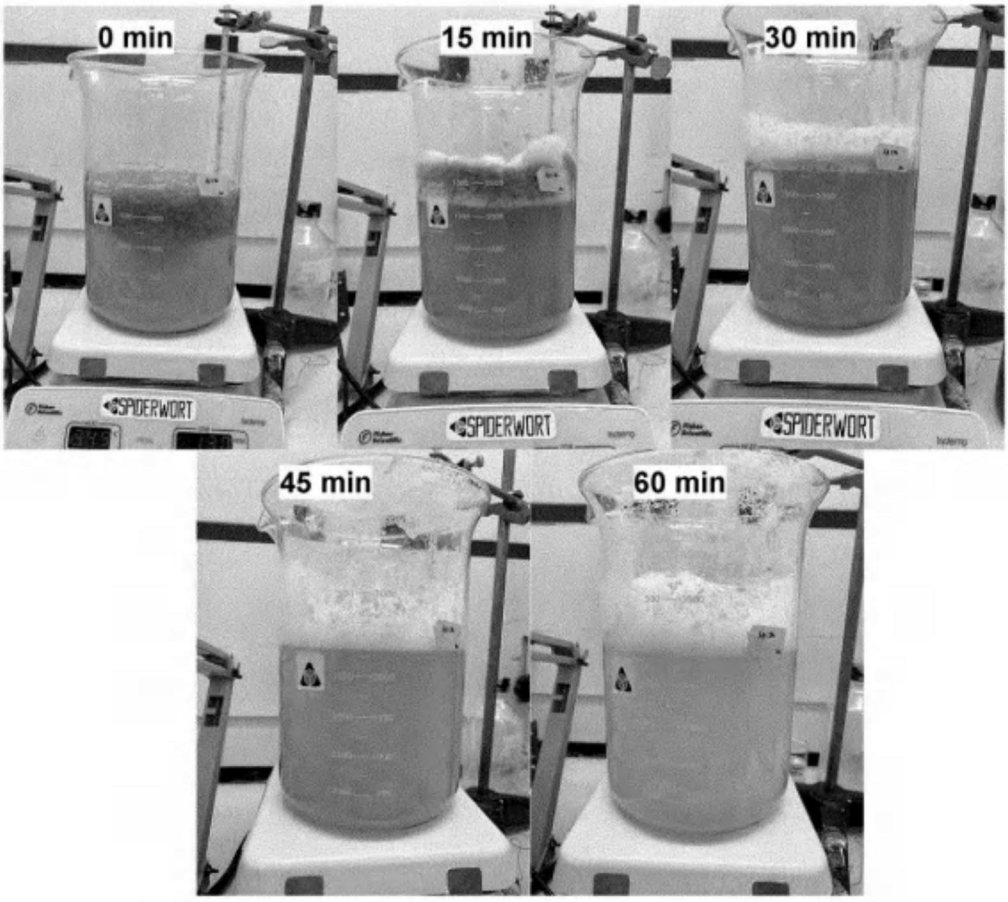


图192

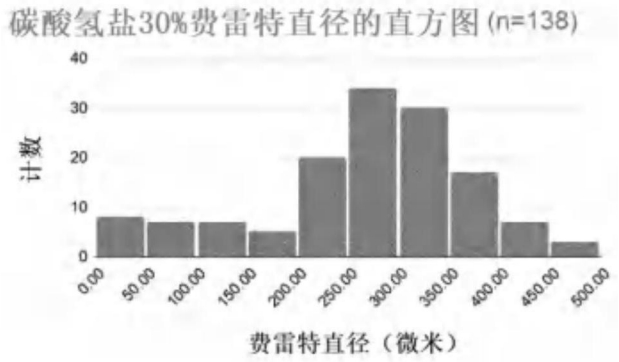


图193

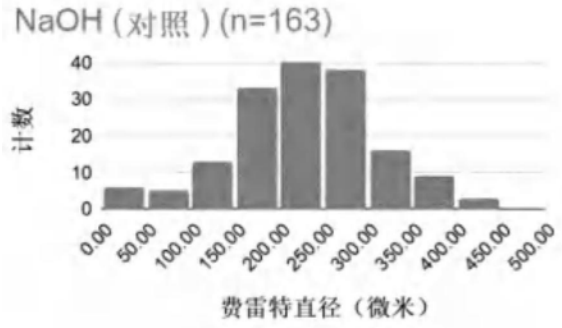


图194

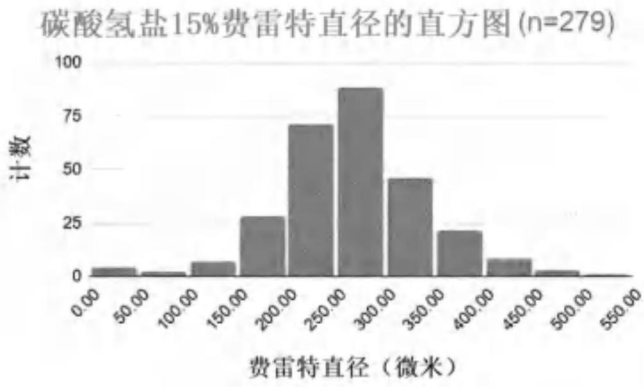


图195

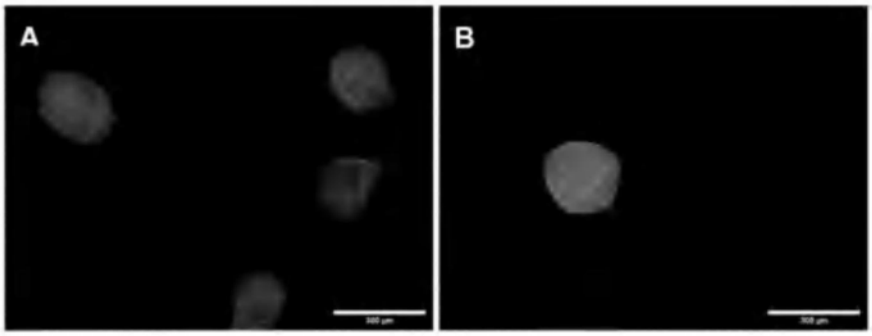

A
B

图196

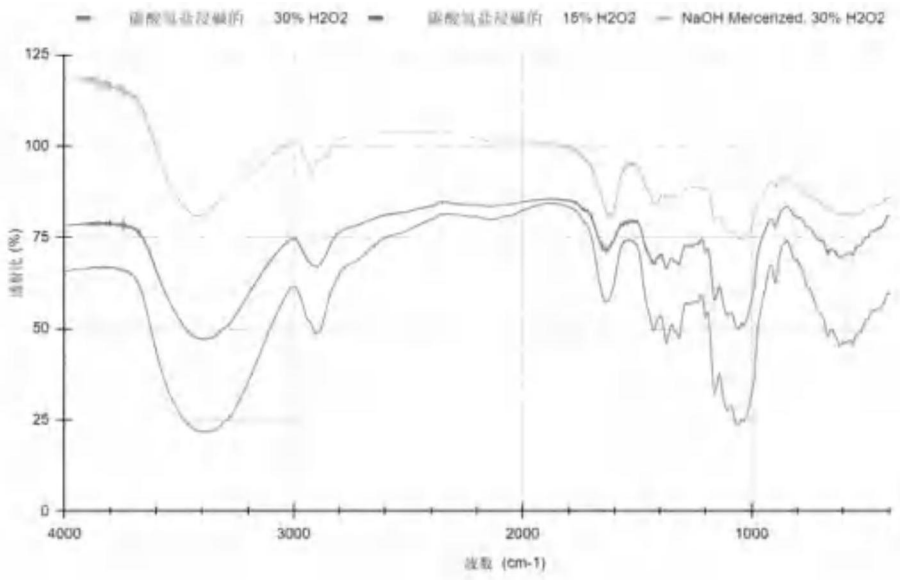

30% H2O2
15% H2O2
NaOH Mercerized, 30% H2O2
125
100
75
50
25
0
4000
3000
2000
1000
(%)
(cm-1)

图197

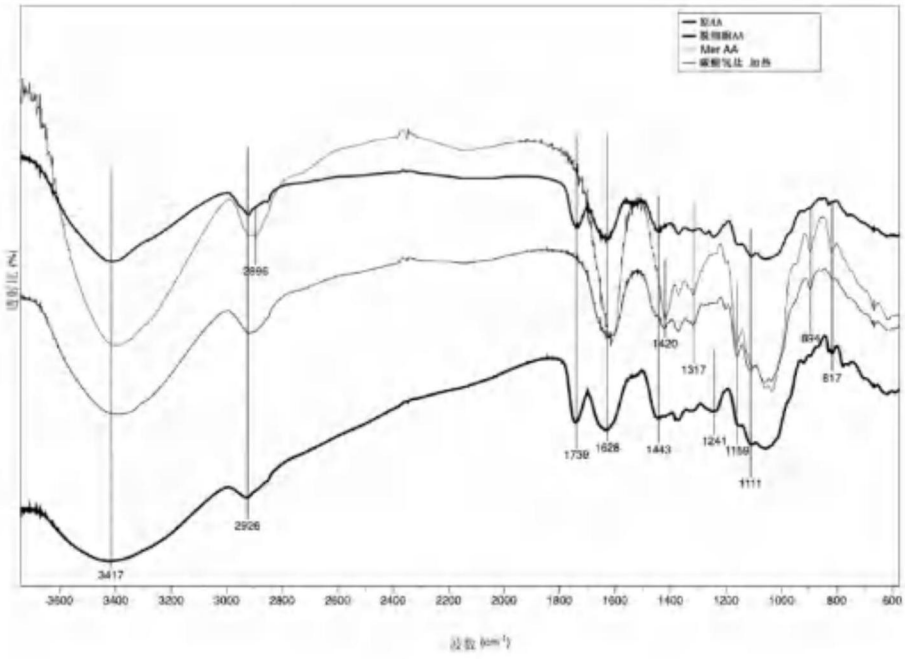

3417
2926
1739
1628
1443
1420
1317
1241
1159
1111
817
3500
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600

图198

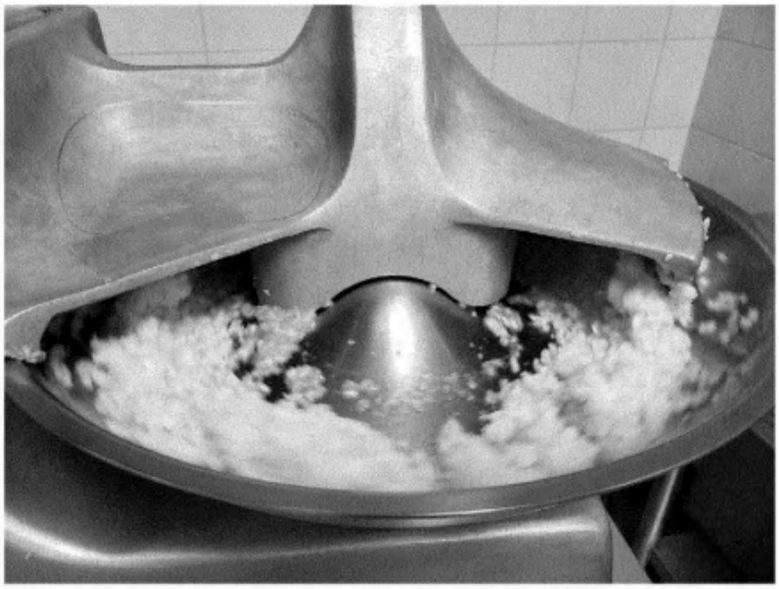


图199

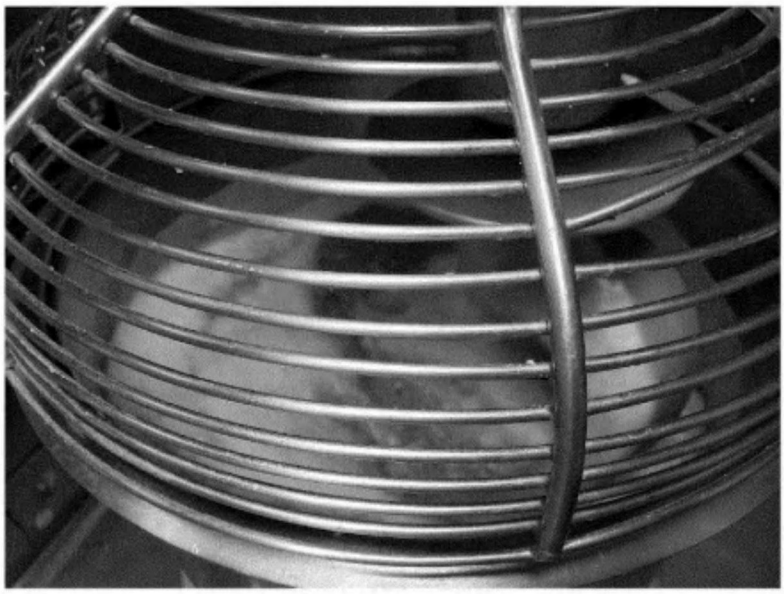


图200



图201

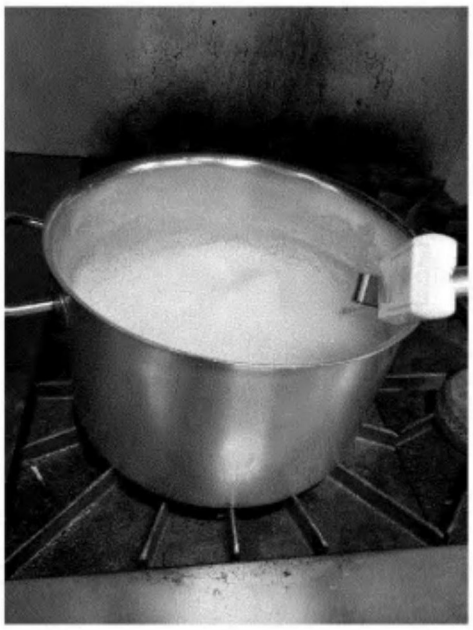


图202

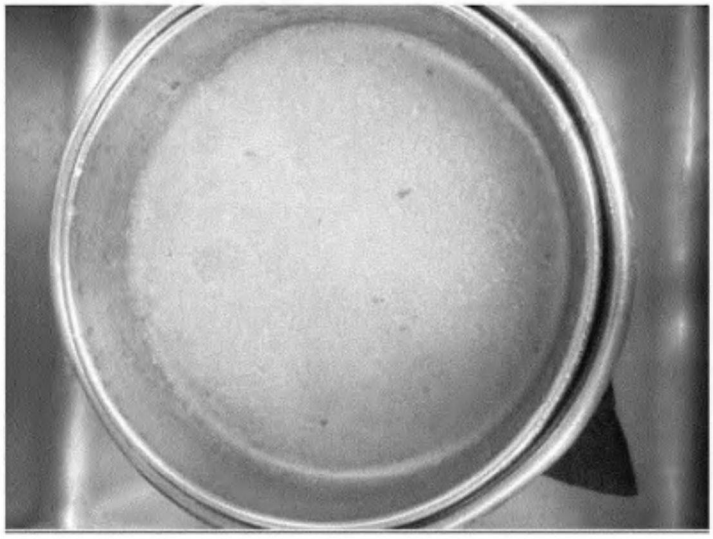


图203

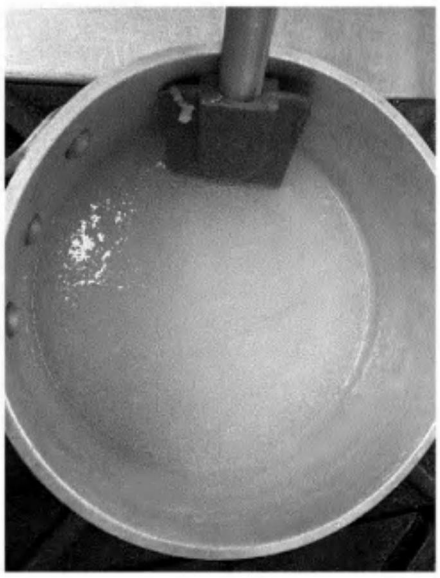


图204



图205

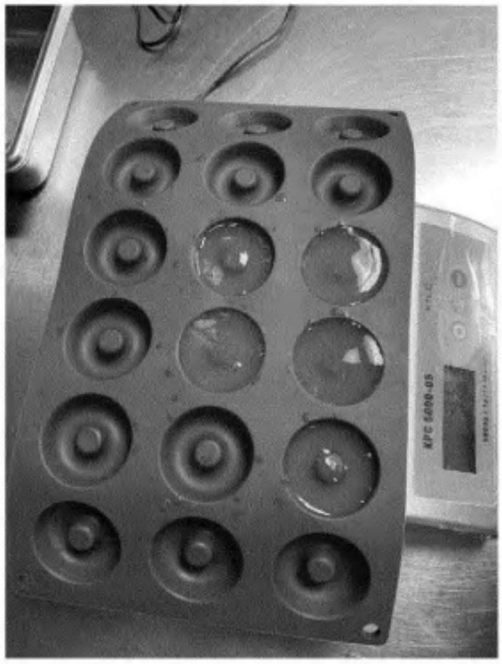


图206

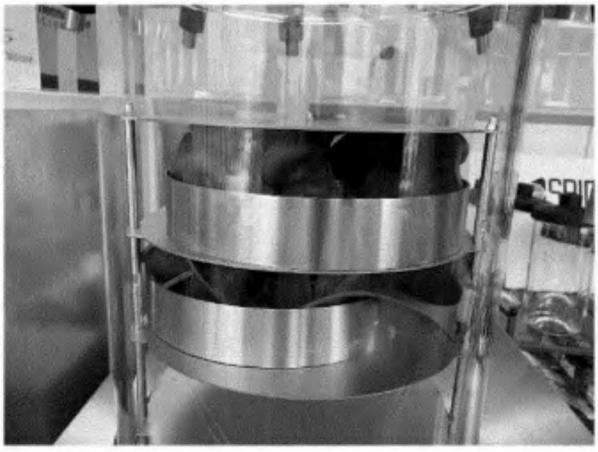


图207

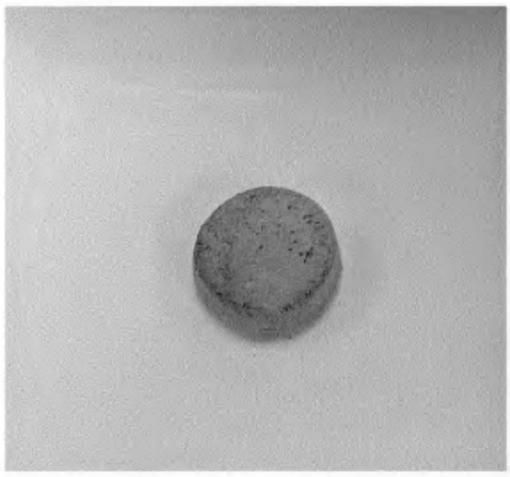


图208

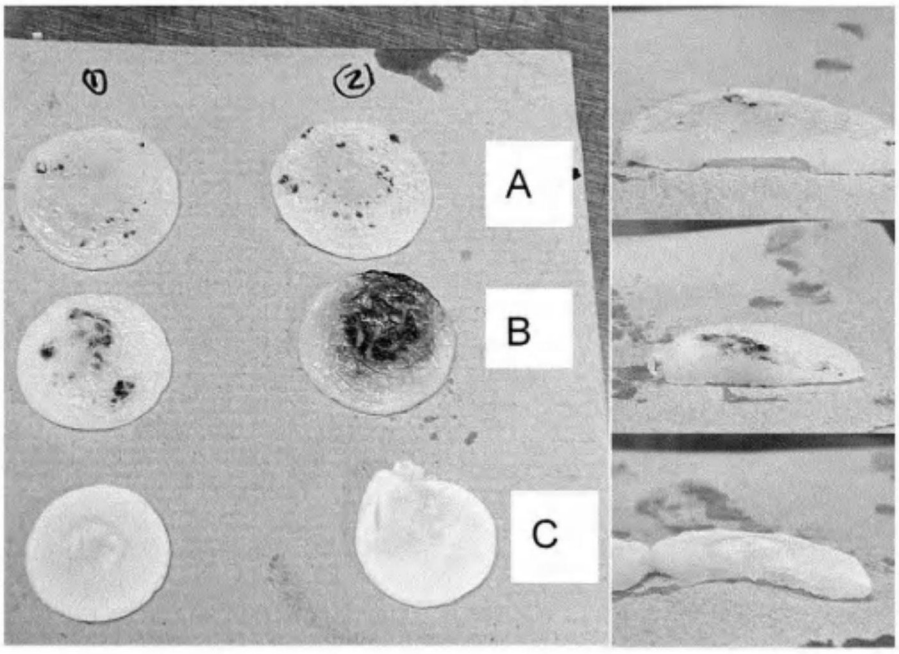


图209



图210



图211

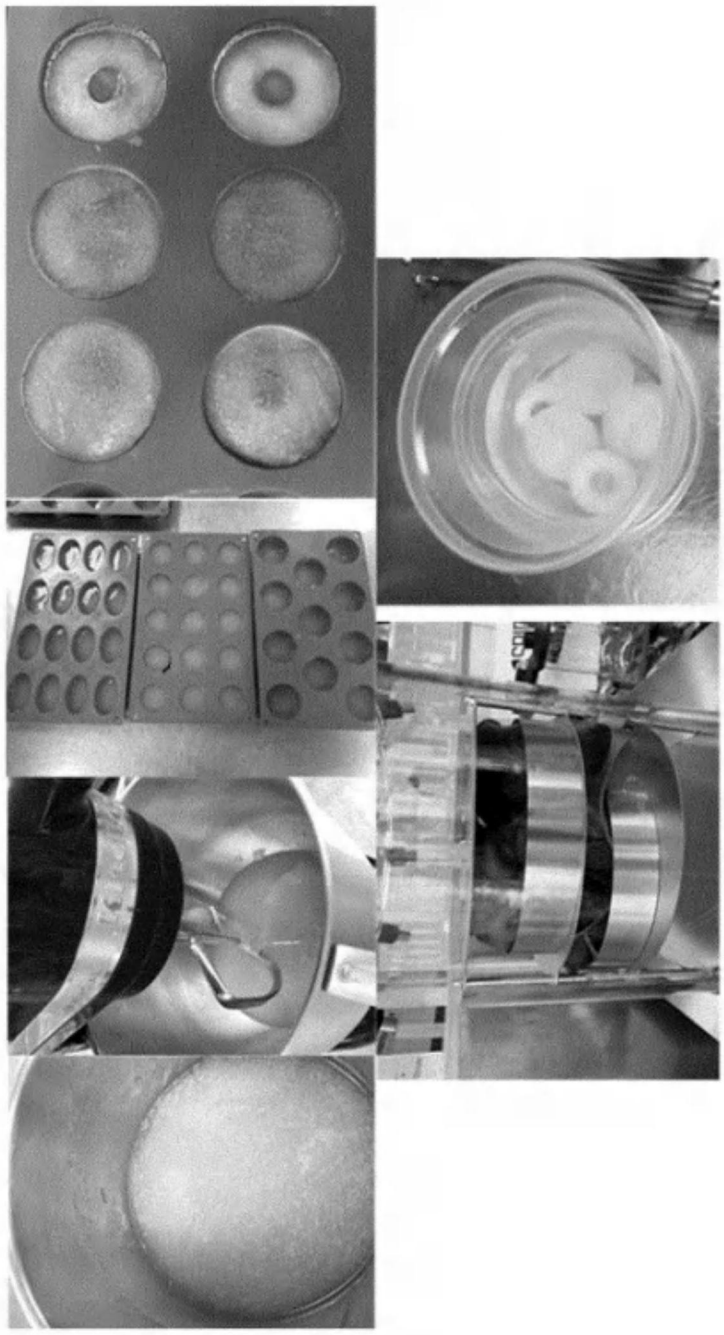


图212

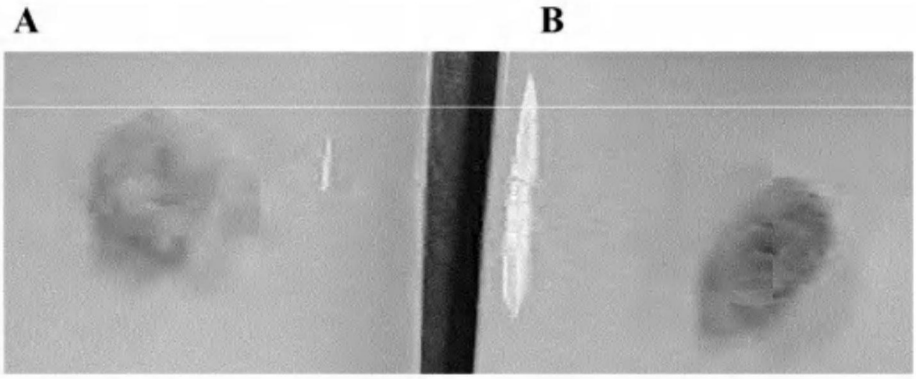


图213

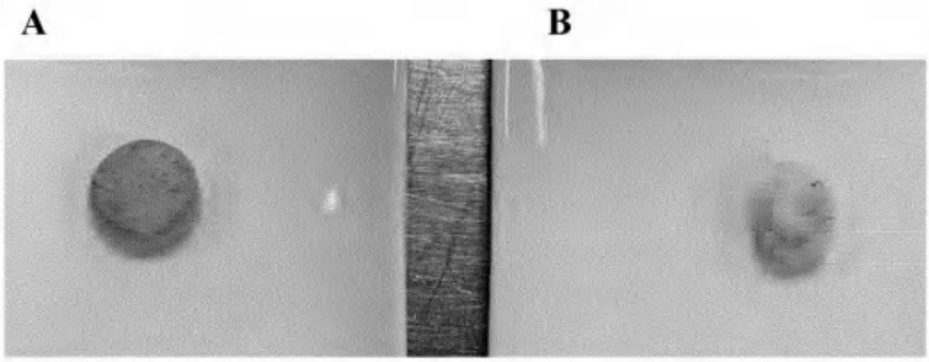


图214

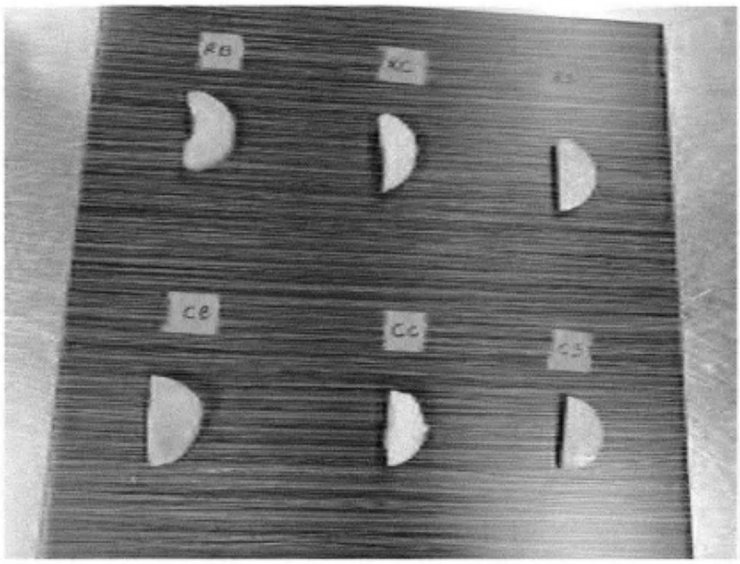


图215

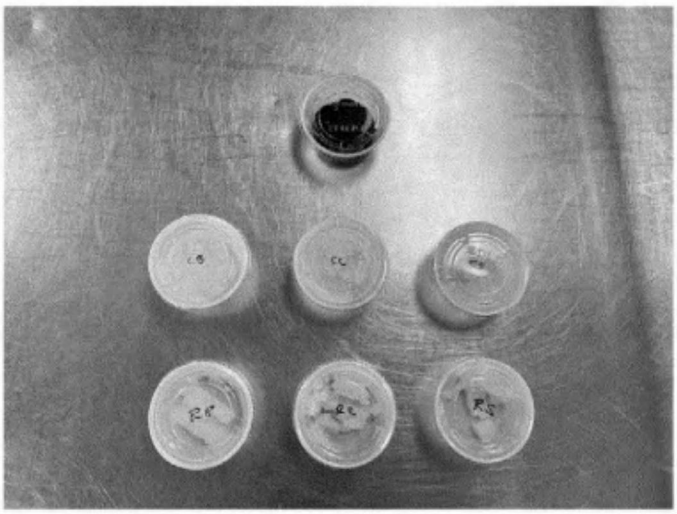


图216

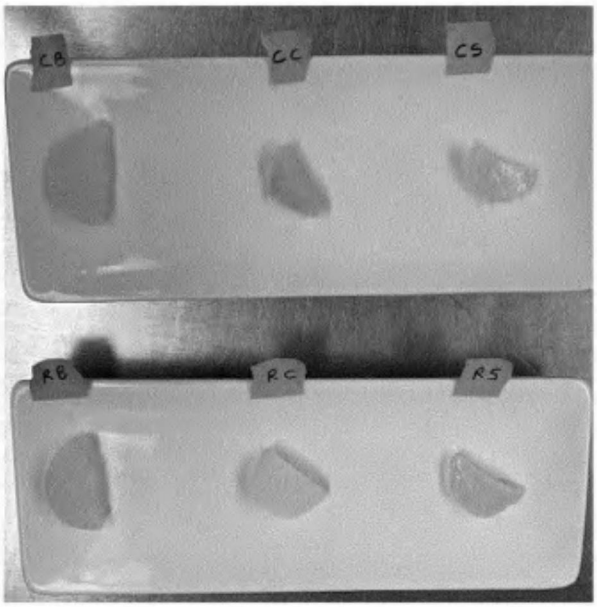


图217



图218



图219



图220



图221

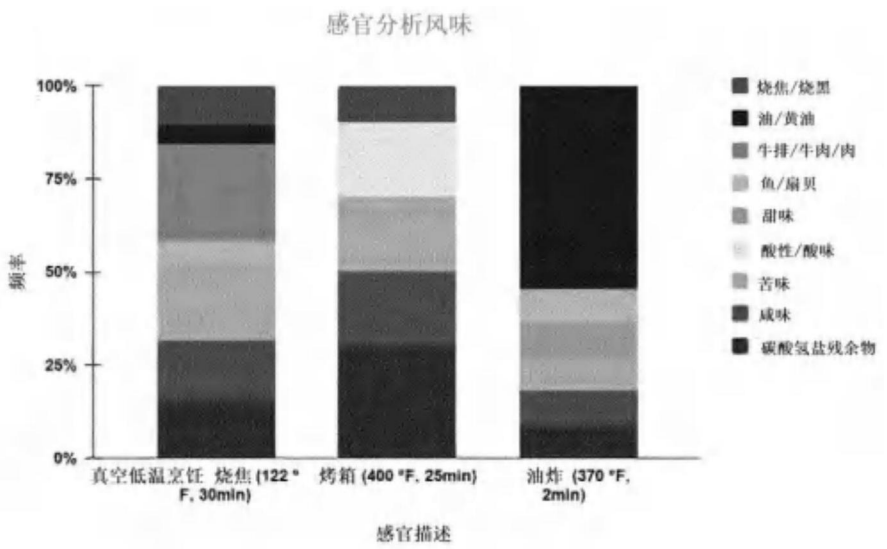


图222

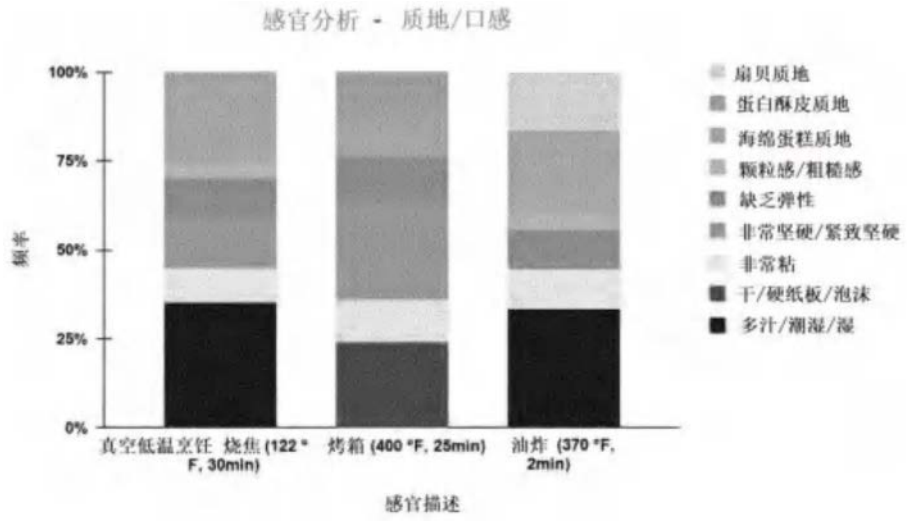


图223

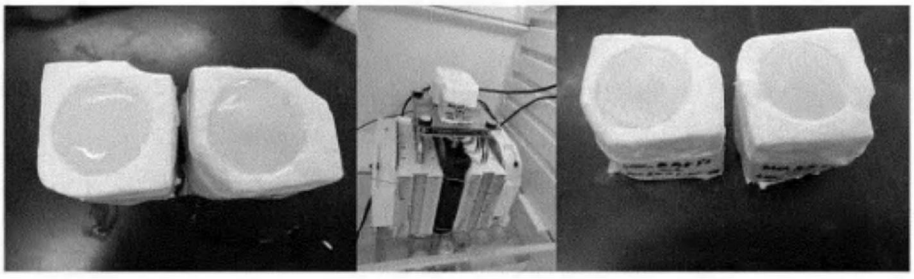


图224

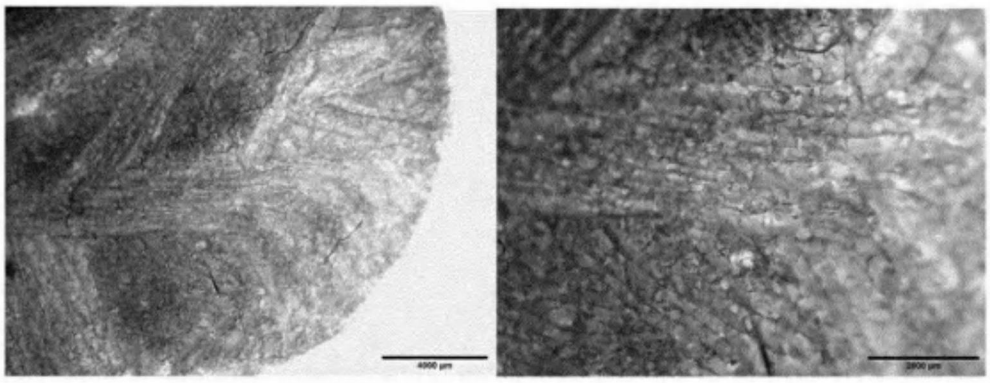


图225

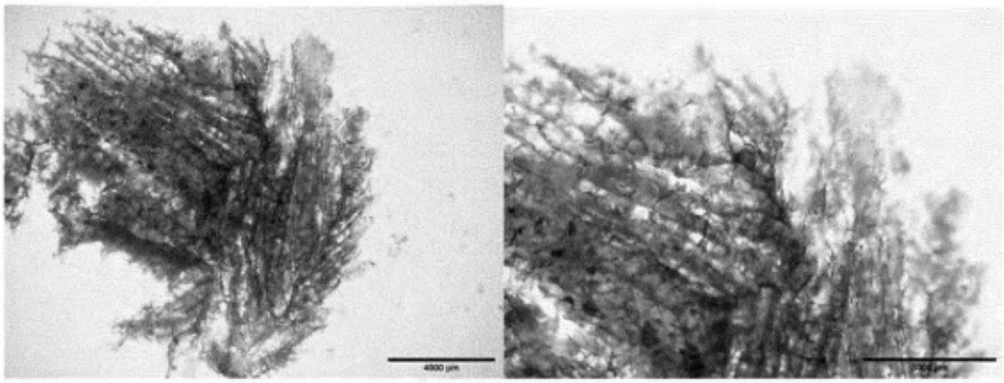


图226

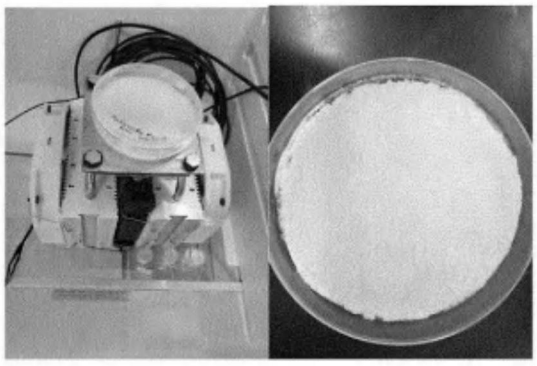


图227

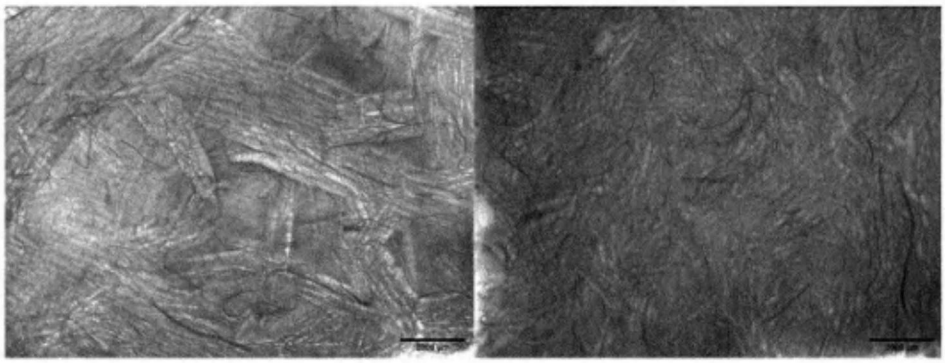


图228

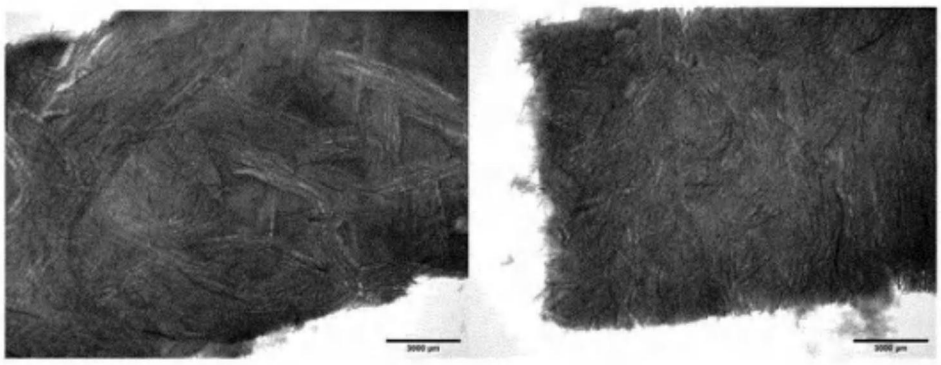


图229

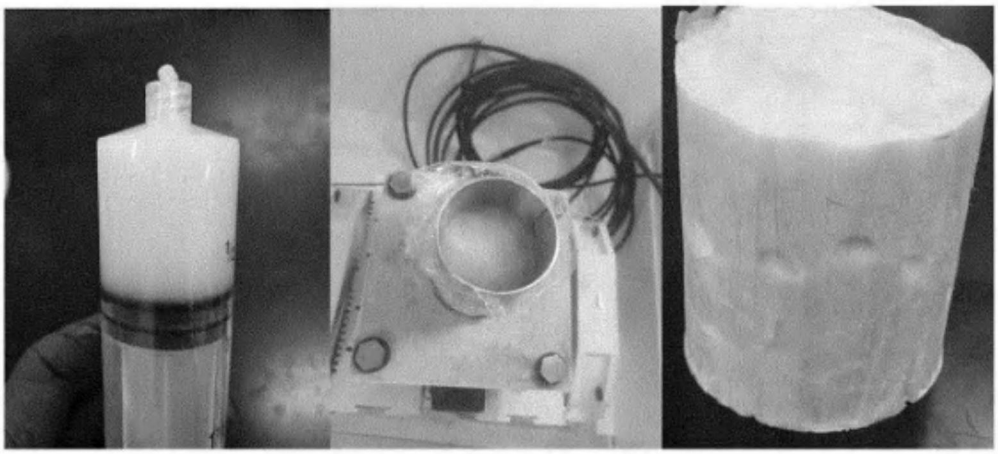


图230

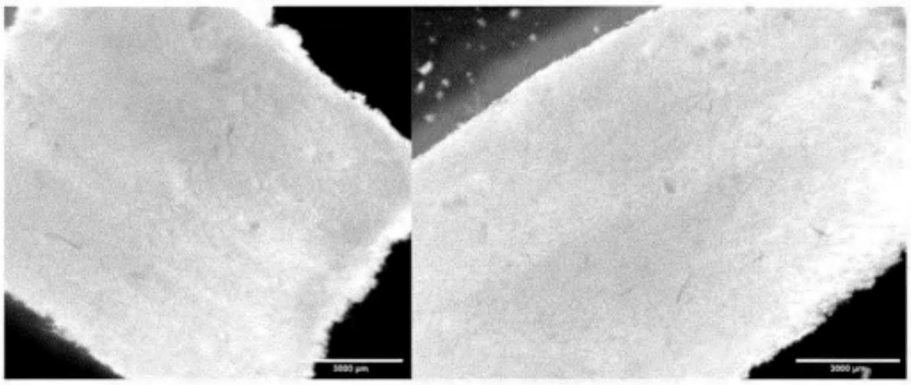


图231

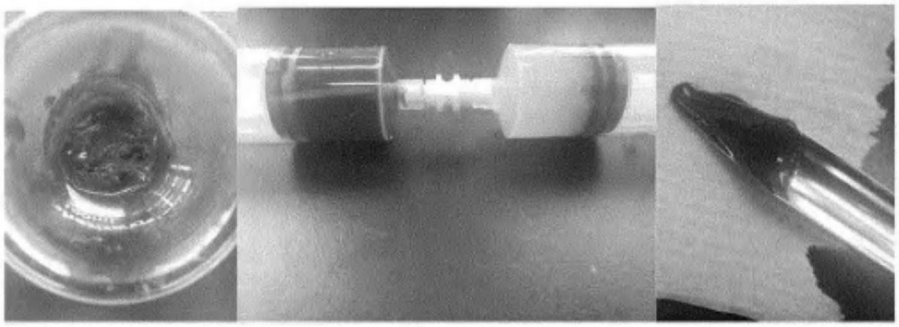


图232

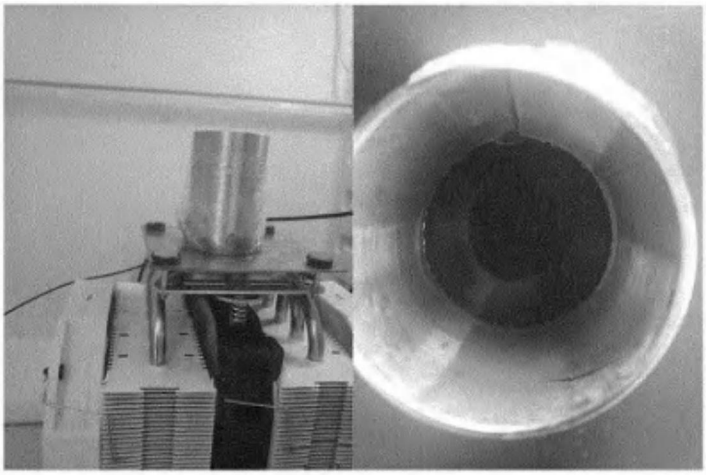


图233

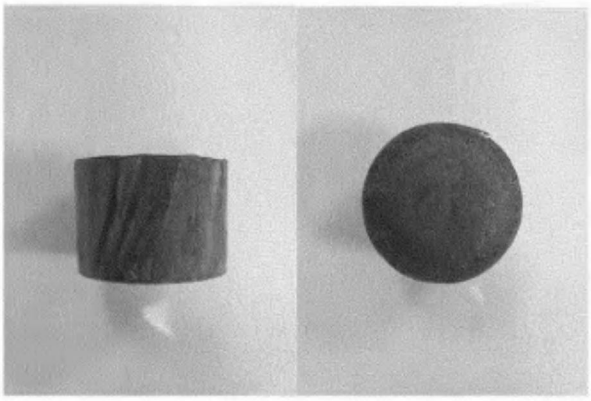


图234

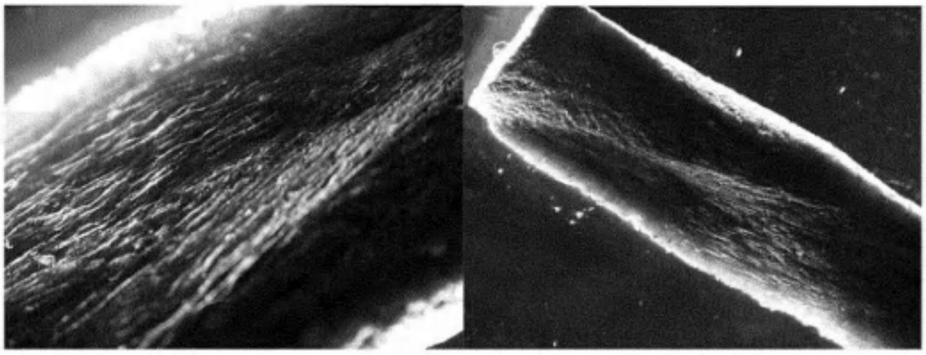


图235

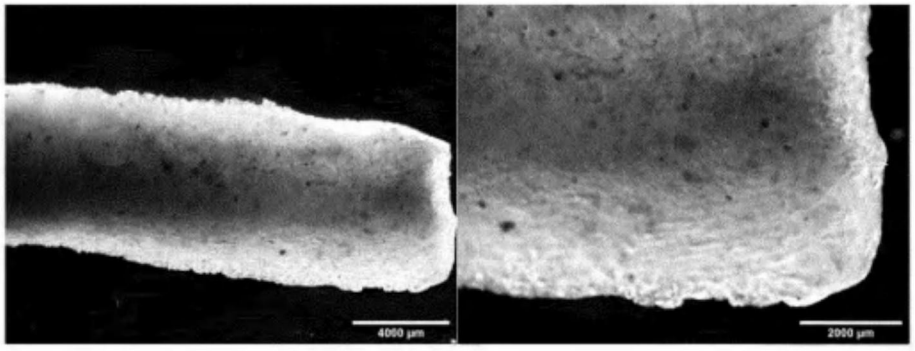


图236

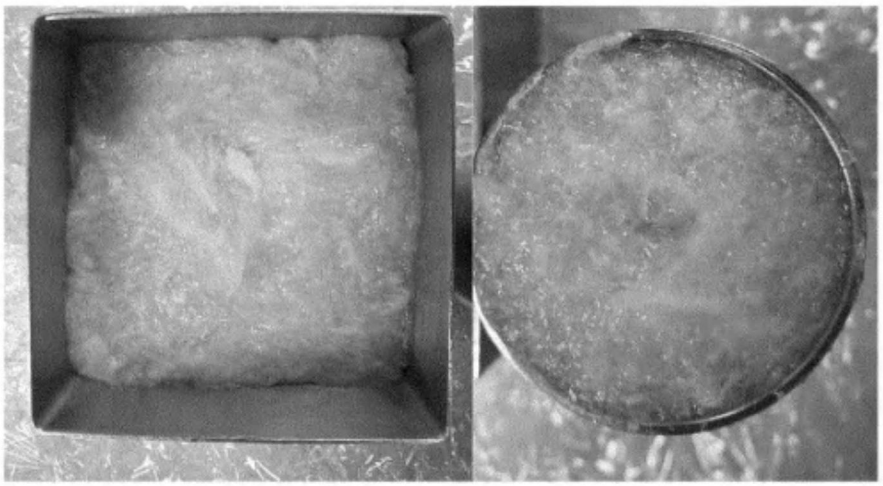


图237

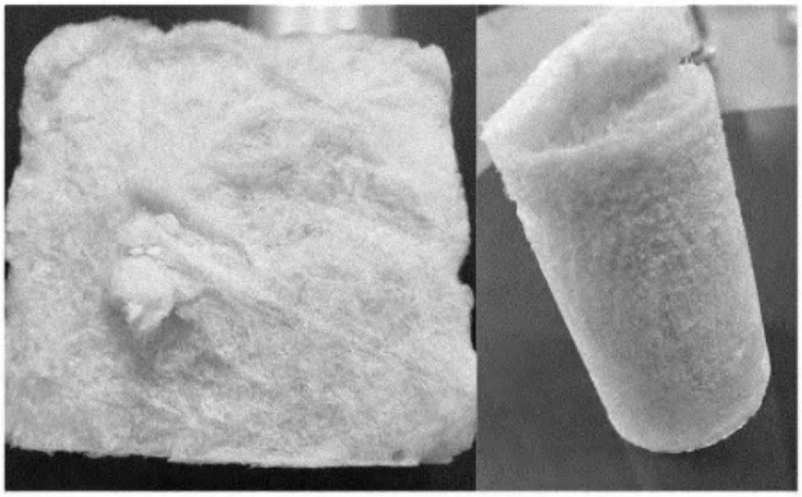


图238

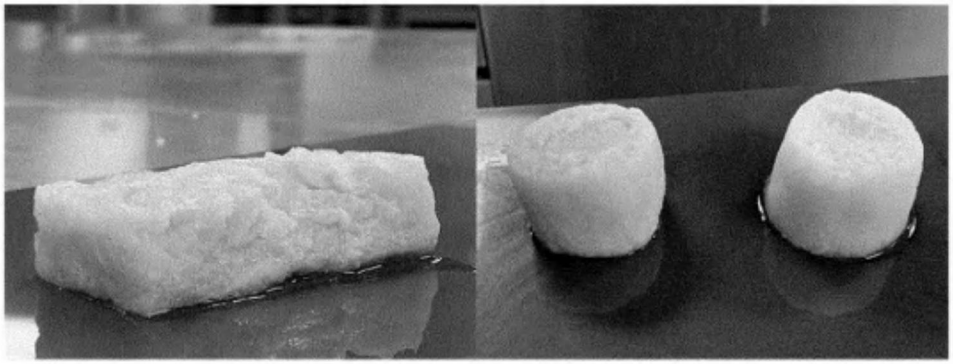


图239

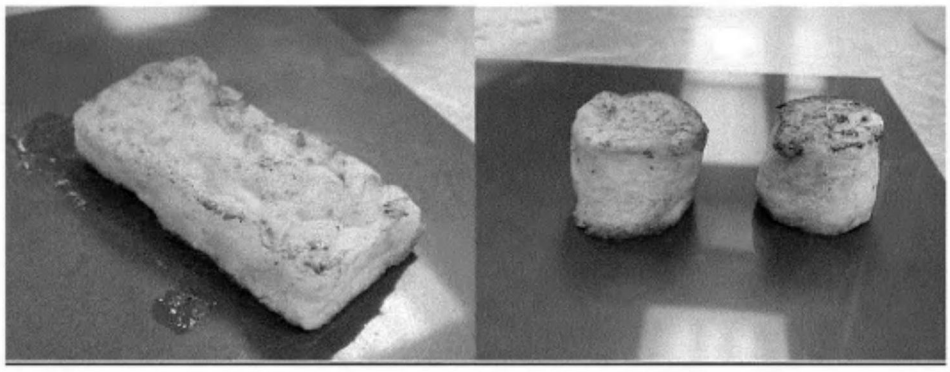


图240

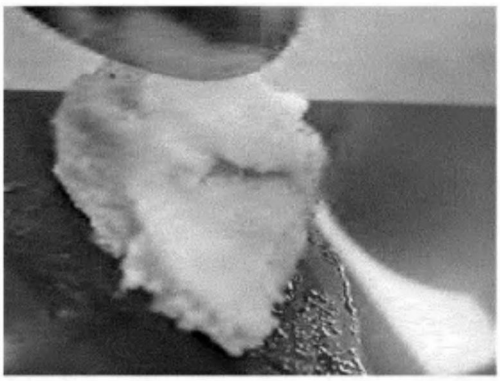


图241

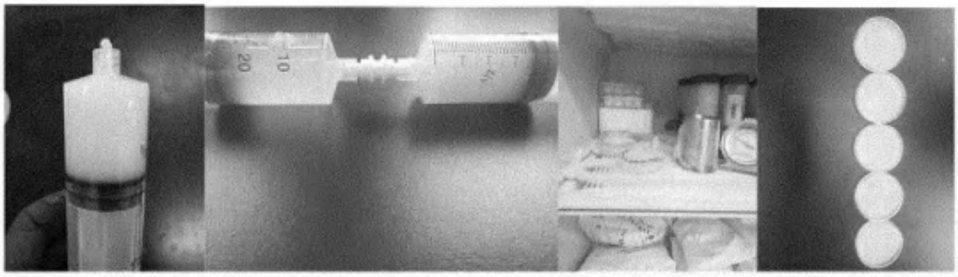


图242

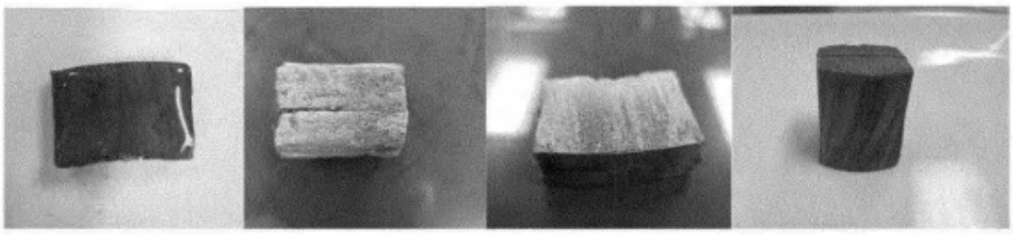


图243

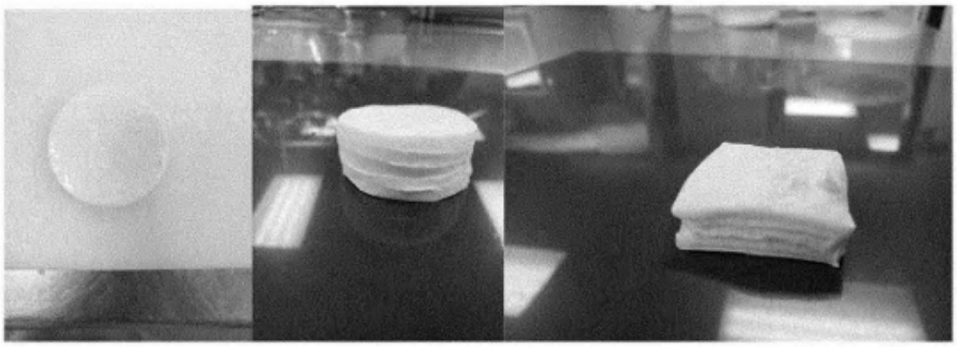


图244



图245

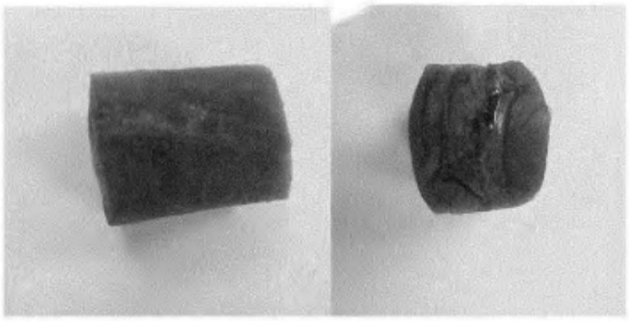


图246

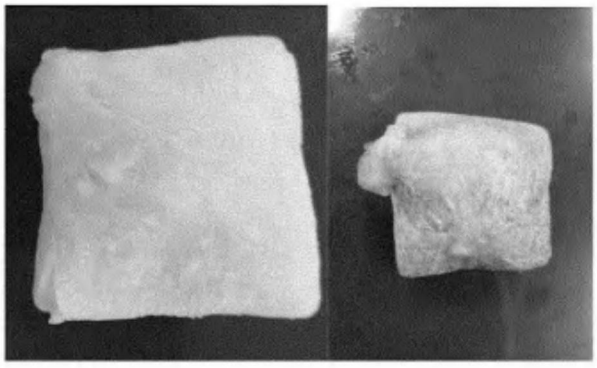


图247

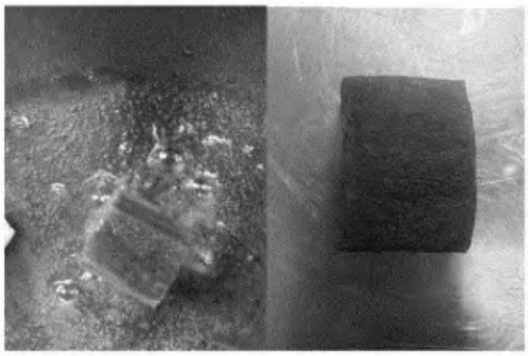


图248

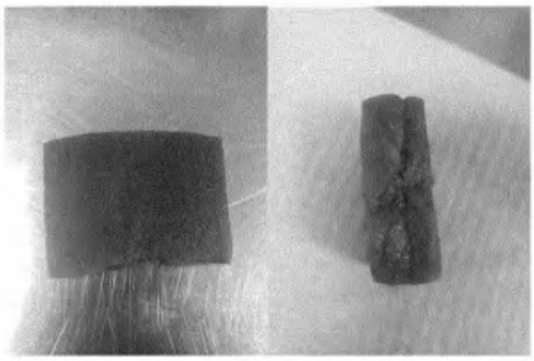


图249

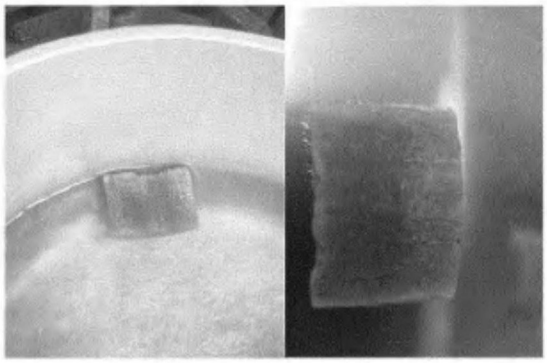


图250



图251

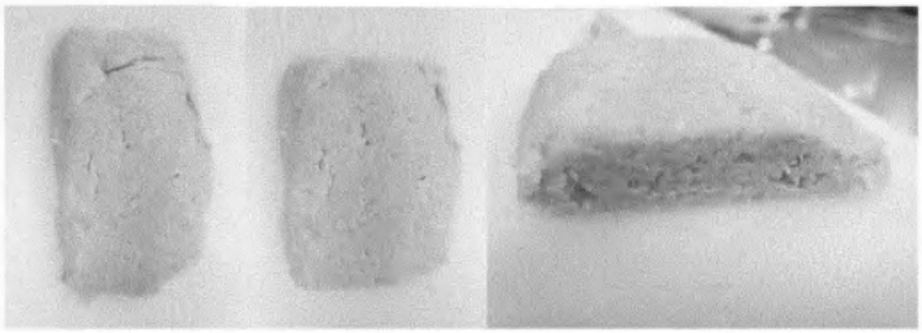


图252



图253

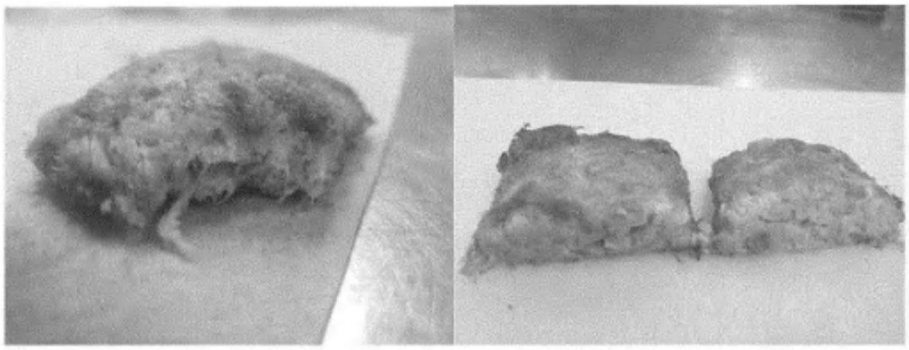


图254



图255

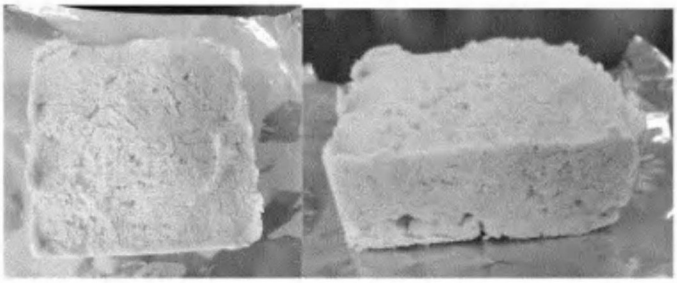


图256



图257



图258

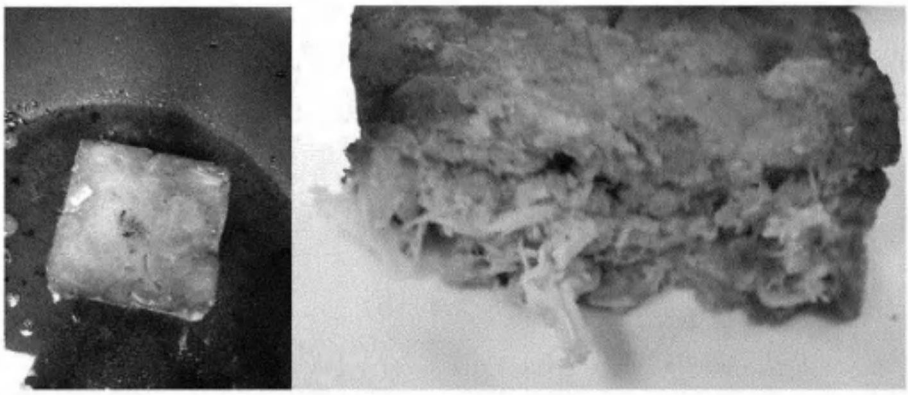


图259

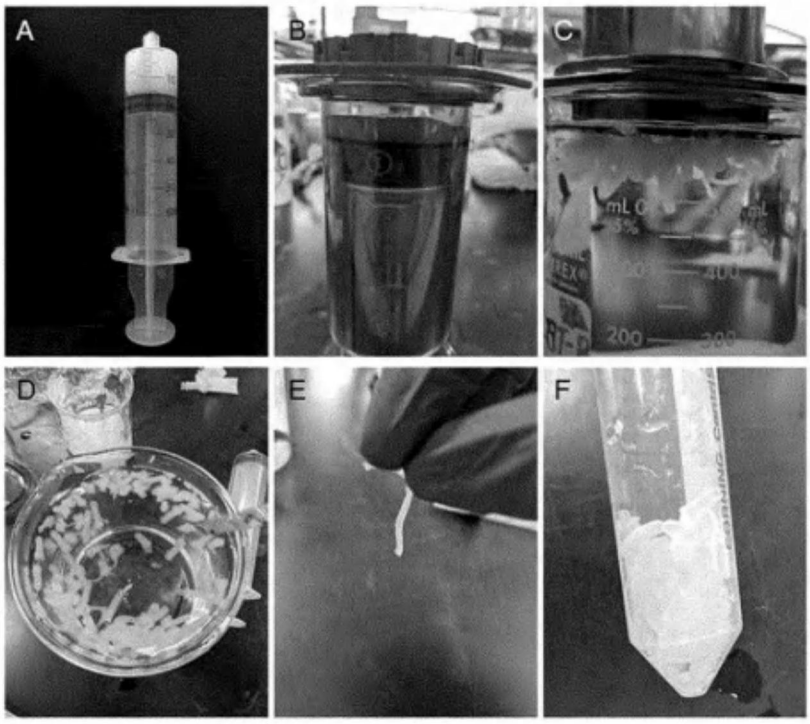


图260

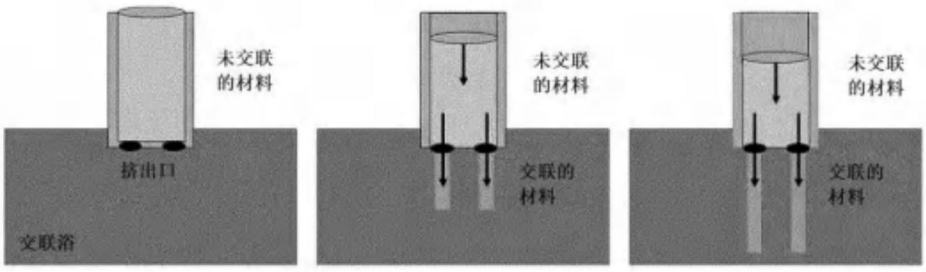


图261

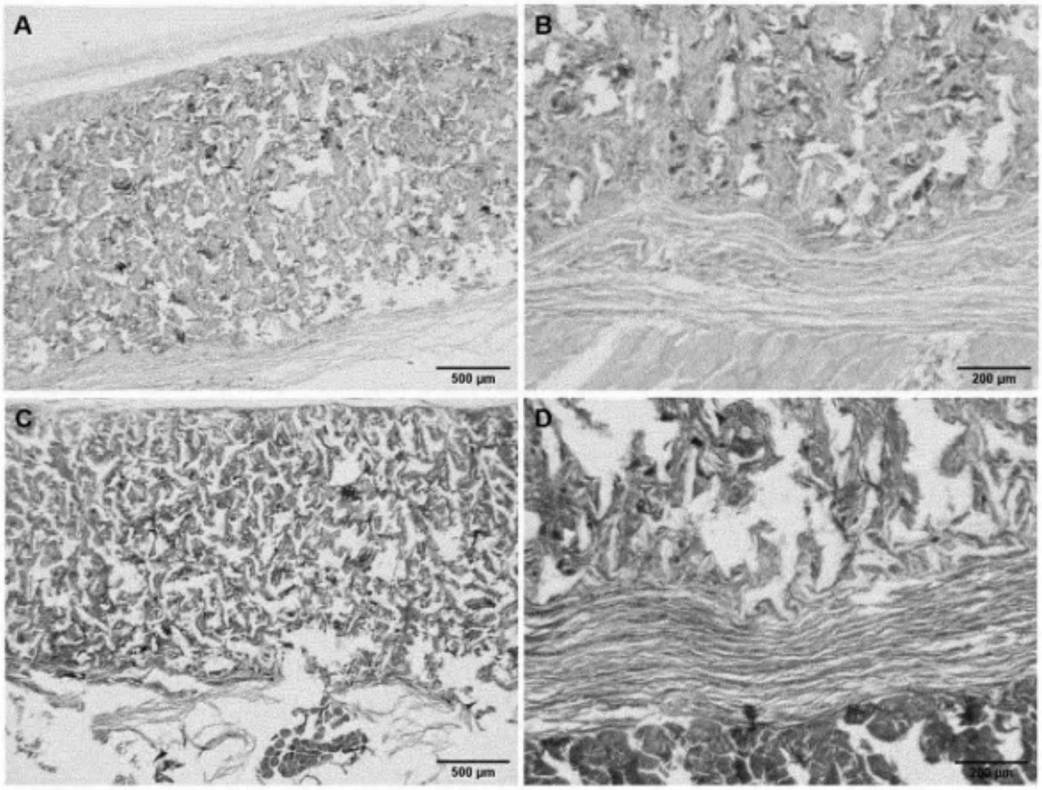


图262

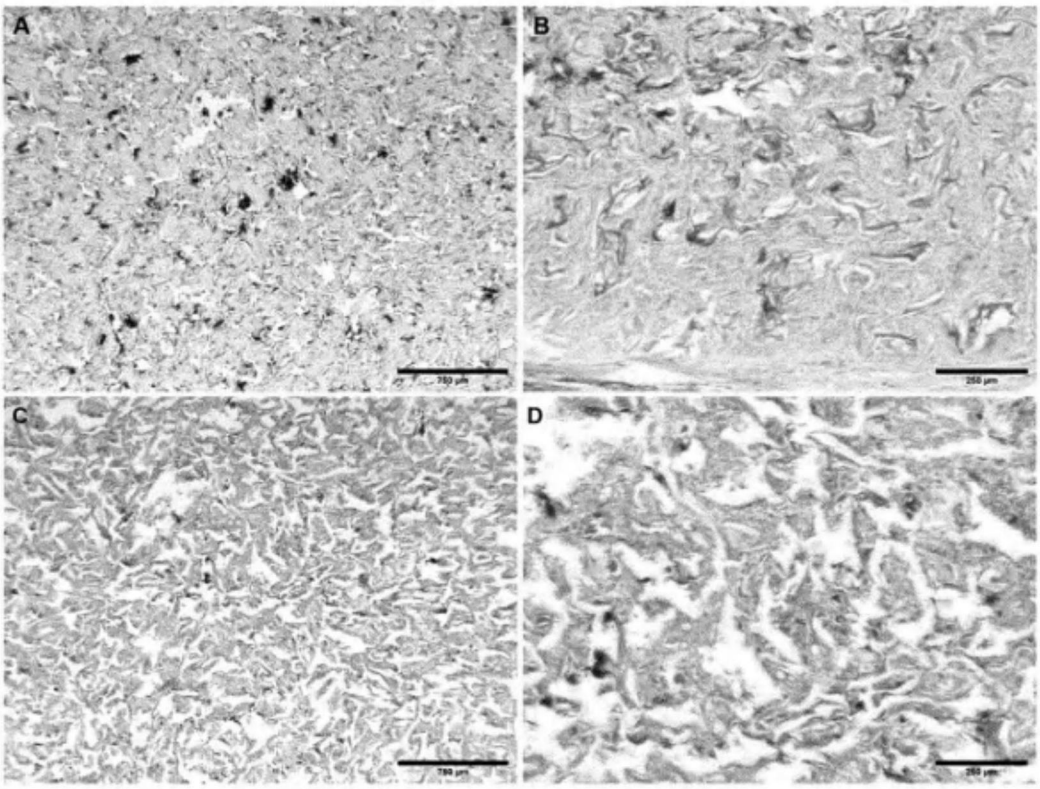


图263

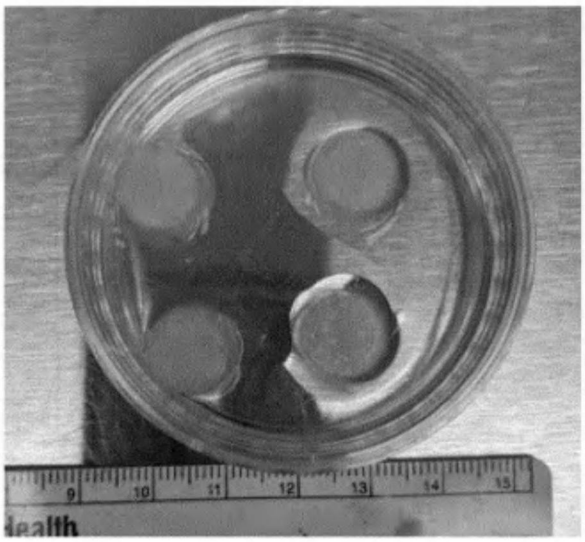


图264



图265

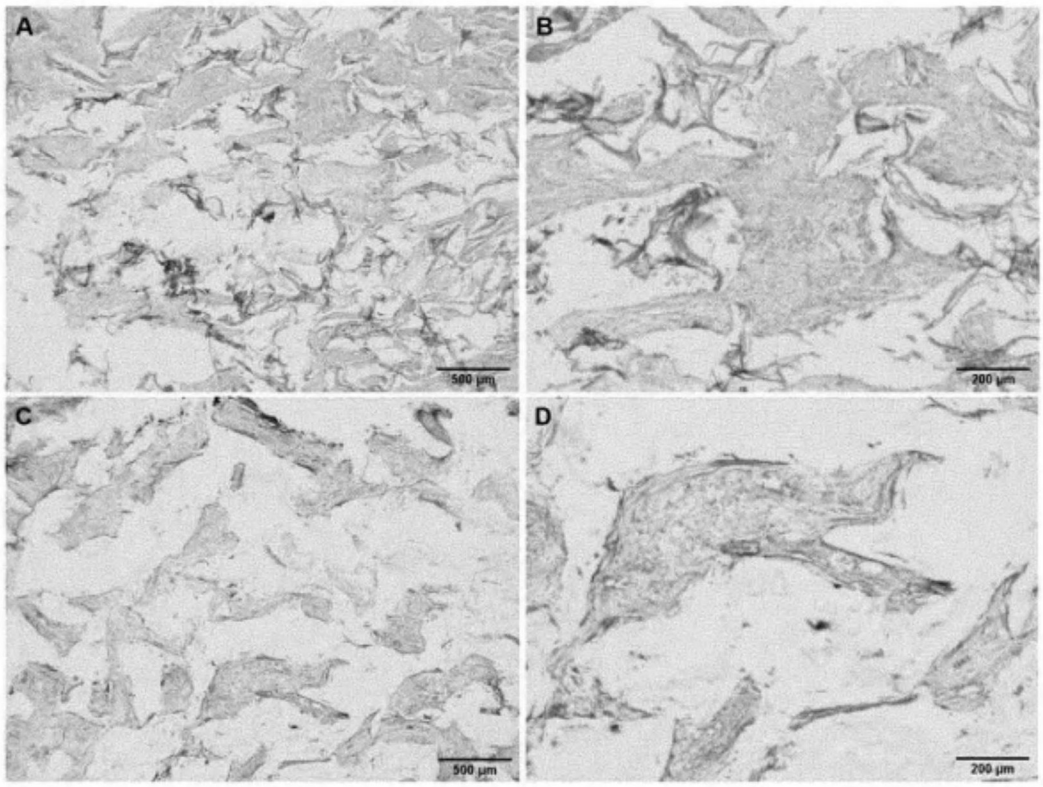


图266

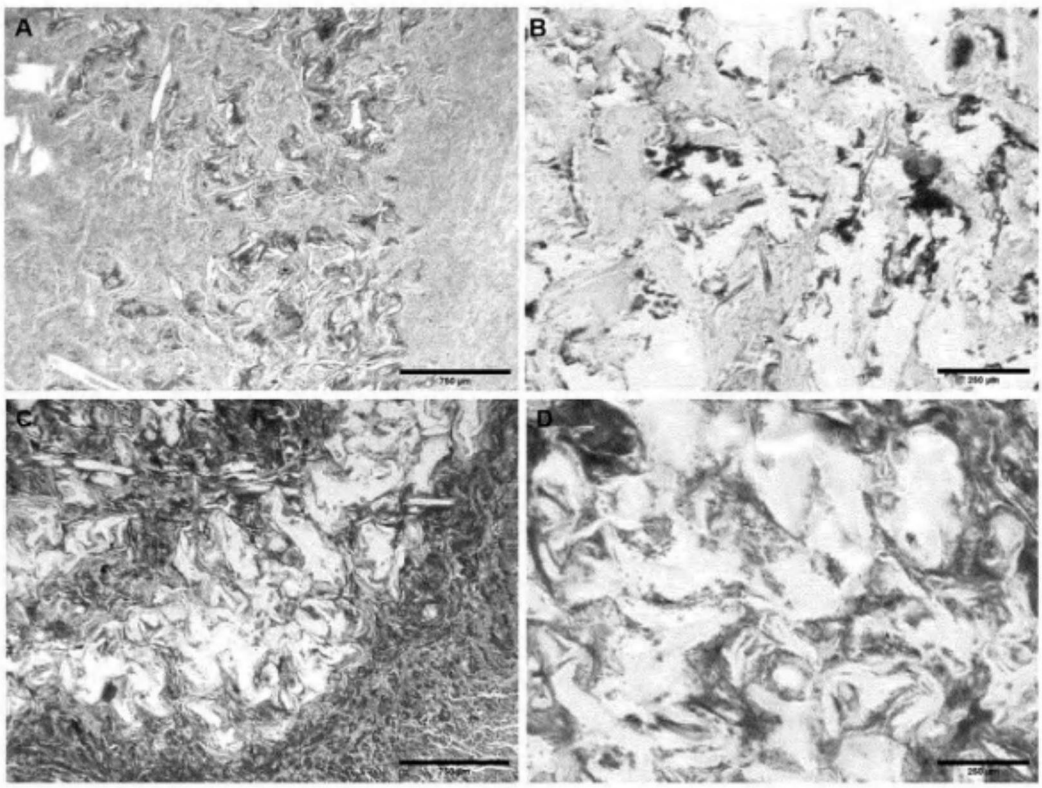


图267

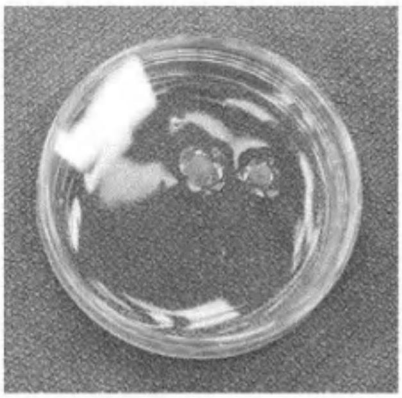


图268

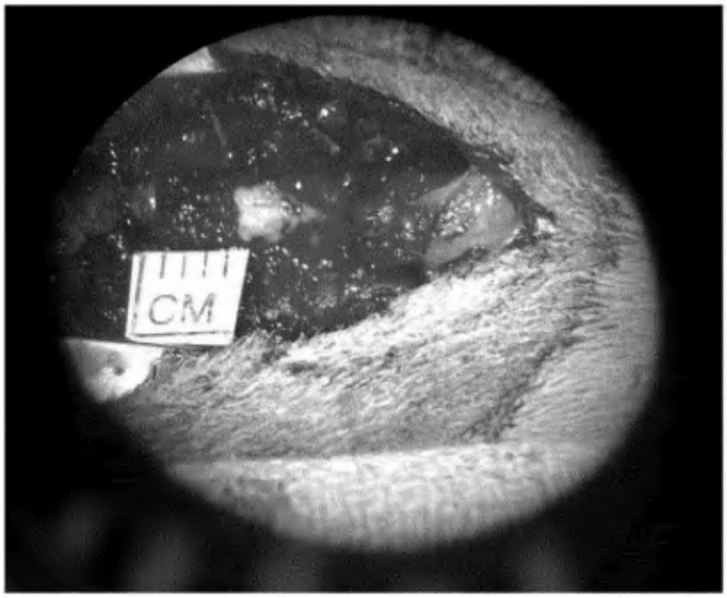


图269

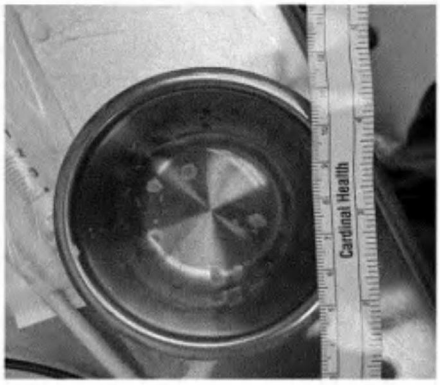


图270

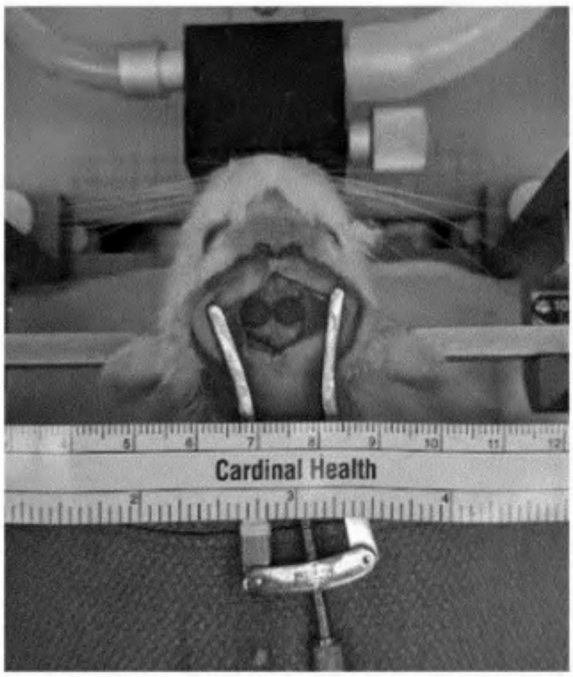


图271

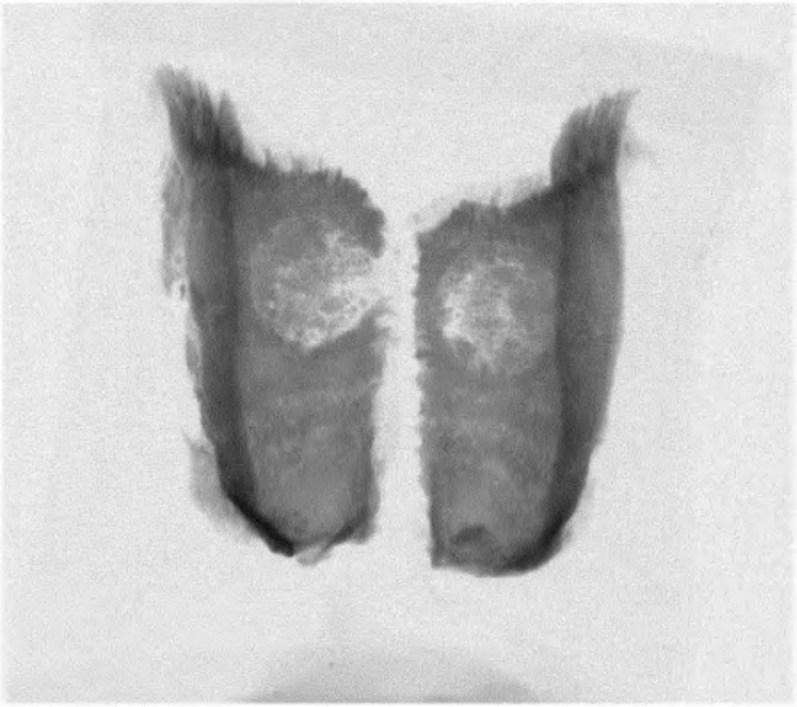


图272