没食子酸改性壳聚糖水凝胶抑制细菌生物被膜及胞外多糖作用的评价

李文化，赵冰可，王军泽，陈敬华，邱立朋*
（江南大学生命科学与健康工程学院，江苏无锡 214122）

摘要：该研究制备了没食子酸改性壳聚糖水凝胶系统，并评估其体外抗菌性能、抑制细菌生物被膜及胞外多糖的作用。首先采用酰胺反应合成了没食子酸化壳聚糖（CS-GA），然后溶解在去离子水中即可形成水凝胶。采用红外光谱、紫外光谱、核磁共振氢谱确定了 CS-GA 的分子结构，且通过紫外吸收光谱测得 CS-GA 中没食子酸的接枝率可达到（52.94±0.62）%。以大肠埃希菌、表皮葡萄球菌为模型考察水凝胶抑制细菌生物被膜及胞外多糖的作用。结果显示，32 mg/mL 的 CS-GA 水凝胶对大肠埃希菌的细菌生物被膜及胞外多糖抑制率分别为（81.91±0.00）%、（29.57±3.00）%；对表皮葡萄球菌则分别为（52.86±0.01）%、（37.14±0.31）%。由此可见，CS-GA 水凝胶具有良好的抑制细菌生物被膜和胞外多糖的作用。

关键词：水凝胶；壳聚糖；没食子酸；抑菌作用；细菌生物被膜；胞外多糖
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)04-0595-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.017

Evaluation of Inhibition Effect of Gallic Acid Modified Chitosan Hydrogel on Bacterial Biofilm and Extracellular Polysaccharides

LI Wenhua, ZHAO Bingke, WANG Junze, CHEN Jinghua, QIU Lipeng*
(*School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122*)

ABSTRACT: In this study, a gallic acid-modified chitosan hydrogel system was constructed, and its *in vitro* antibacterial capability, inhibition effects on bacterial biofilm and extracellular polysaccharides were investigated. Gallic acid modified chitosan (CS-GA) was synthesized by amide reaction, and the CS-GA hydrogel was formed by dissolving in water. The structure of CS-GA was confirmed by the infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, and ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Moreover, the grafting efficiency of gallic acid in CS-GA was (52.94±0.62) %, measured by UV-Vis. Then the inhibition effect of CS-GA on the bacterial biofilm and extracellular polysaccharides were investigated with *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* as models. The inhibition rates of the CS-GA hydrogel at 32 mg/mL against bacterial biofilm and extracellular polysaccharide of *E. coli* were (81.91±0.00) % and (29.57±3.00) %, respectively; while for *S. epidermidis* were (52.86±0.01) % and (37.14±0.31) %, respectively. The results indicated that the constructed GA-CS hydrogel showed good inhibition effects on bacterial biofilm and extracellular polysaccharides.

Key Words: hydrogel; chitosan; gallic acid; bacteriostasis; bacterial biofilm; extracellular polysaccharide

生物被膜形成的一个主要特征是细菌自身产生的胞外聚合物（extracellular polymeric substance，EPS）。EPS 主要由多糖、核酸（细胞外 DNA）和蛋白质组成，有助于保护微生物免受外界威胁，包括免疫系统成分和抗菌剂[1]。生物被膜的形成增加了细菌对抗菌药的抗性，能形成生物被膜的致病菌包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等[2]。生物被膜可以在非生物和生物表面形成，由于其降低各类表面与细菌之间的斥力，有利于微生物黏附；而抗菌剂通常无法穿透生物被膜基质，因此使细菌的耐

收稿日期：2023-02-25
基金项目：江苏省自然科学基金面上项目(BK20201344)
作者简介：李文化(1996—)，男，硕士研究生，专业方向：药物创新制剂。
通信作者：邱立朋(1984—)，男，副教授，硕士生导师，从事药物创新制剂研究。
E-mail：qiulp@jiangnan.edu.cn

药性增加，不利于人类健康[3—4]。

壳聚糖（chitosan，CS）是自然界中存在的阳离子多糖，形成的聚阳离子可以与带负电荷的细菌膜相互作用，影响细菌的代谢活性，从而产生广谱抗菌活性[5]。然而，CS只溶于酸性水溶液，其抑菌活性也是基于氨基质子化形成的阳离子，这限制了其在中性环境，特别是人体组织微环境中的应用[6]。CS可与带负电荷的大分子或交联剂形成聚电解质复合物[7]，也可通过与其他分子进行酰基化、羧甲基化、季铵盐化、烷基化、接枝等反应产生不同的衍生物，以提升或扩展CS基材料的性能，引入新的性质，但一般不会改变CS的基本性质[8—9]。能与CS缀合的多酚类化合物包括儿茶素、表儿茶素、槲皮素、姜黄素、没食子酸（gallic acid，GA）、阿魏酸、咖啡酸和单宁酸等[10—12]，这类缀合物的抗氧化活性来自酚环中羟基的还原性[13]。

GA是一种从植物中提取的羟基苯甲酸，抗菌作用强，可诱导大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌的生物被膜特性发生不可逆变化[14]，对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌具有有效的抗菌和抗生物被膜活性，并可通过调节Ica操纵子的表达而影响生物被膜的形成。GA对大肠埃希菌Pag操纵子、EPS的产生和生物被膜的形成有潜在的抑制作用[15]。据报道[16—17]，GA化多糖可增强细菌外膜和内膜的通透性，从而破坏细菌细胞膜的通透性和完整性。因此，本研究构建了GA改性的CS（CS-GA）水凝胶，并深入研究其抑制生物被膜及胞外多糖的效果，以期为构建用于慢性创伤修复的新型外用CS水凝胶提供新思路。

1　仪器与试药

FreeZone 2.5 L型台式小型冷冻干燥机（美国Labconco公司）；UV-2700i型紫外分光光度计［岛津（上海）国际贸易有限公司］；TENSOR Ⅱ型傅里叶变换红外光谱（FT-IR）仪（英国布鲁克公司）；HR-3系列混合型流变仪（美国TA仪器公司）；CMT5000系列万能拉力试验机（美国MTS系统公司）；Avance Ⅲ 400 MHz型核磁共振波谱仪（德国布鲁克公司）。

CS（黏度>400 Pa·s，批号F2213472）、GA（含量≥99.0%，批号G2113135）和Folin-ciocalteu试剂（≥98.0%）均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺（EDC，含量≥97.0%，批号P2252862）和*N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS，含量≥98.0%，批号P2041950）均购于上海泰坦科技股份有限公司；盐酸、氯化钠、氯化钾、琼脂糖、十二水磷酸二氢钾均为分析纯）均购于国药集团化学试剂有限公司，酵母提取物、胰蛋白胨均购于北京拜尔迪生物技术有限公司。

雄性小鼠，体质量（25.0±0.4）g，斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物合格证编号202277201。

大肠埃希菌BL21为本实验室保存；表皮葡萄球菌（ATCC 12228）购于美国典型培养物保藏中心（ATCC）。

2　方法与结果

2.1　CS-GA水凝胶的合成与结构表征

2.1.1　CS-GA的制备方法

精密称取CS（0.01 mmol）溶于0.1 mol/L盐酸50 mL中，用1 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 5.5，然后加入去离子水50 mL，使CS完全溶解。精密称取GA（0.01或0.02 mol）溶于无水乙醇25 mL中，将EDC、NHS各0.02 mol溶于另一份无水乙醇25 mL中，待溶解后充分混合。将上述无水乙醇混合液加至CS溶液中，调至pH 5.5，搅拌（400 r/min）下室温反应24 h，然后用去离子水透析48 h，将样品冷冻干燥[18]，即得低或高接枝率CS-GA。

2.1.2　CS-GA的结构确证

取CS、CS-GA约10 mg，溶解在1%氘代乙酸/氘代水600 μL中，对其进行核磁共振氢谱（^{1}H NMR）表征，测试温度为25 ℃，频射条件为400 MHz[19]。

^{1}H NMR表征结果显示，CS的氨基和GA的羧基发生了酰胺化反应（图1）。在CS的^{1}H NMR图谱中，δ 2.06（H1）处为CS葡萄糖单元上C2位氨基的特征吸收峰，δ 3.89～3.16（H6～H3）处为CS葡萄糖单元上C6～C3位氢的特征吸收峰。而在CS-GA的图谱中，由于羰基对葡萄糖单元的影响，化学位移向高场偏移，H3～H6的特征吸收峰出现在δ 3.90～3.17处。与此同时，δ 7.16（H-a）处出现GA苯基氢的特征吸收峰，由此初步判断CS-GA

被成功制备。

取少量干燥的 CS、GA、CS-GA 样品，用红外光谱仪检测，记录 4 000 ～ 400 cm^{-1} 的 FT-IR 数据，分析其特征官能团。CS、GA 和 CS-GA 的红外图谱如图 2 所示，CS 在 3 500 ～ 3 100 cm^{-1} 处有 N-H 伸缩振动吸收峰，在 3 650 ～ 3 600 cm^{-1} 处有自由羟基—OH 的伸缩振动吸收峰；CS-GA 在 1 680 ～ 1 630 cm^{-1} 处出现了 C=O 的伸缩振动吸收峰，在 3 500 ～ 3 100 cm^{-1} 处的 N-H 明显减弱，表明 CS 的氨基与 GA 的羧基发生了酰胺化反应，产生了酰胺键。对比 CS、CS-GA 的红外图谱，CS-GA 不仅有新的吸收峰出现，而且也保留了 CS 的吸收峰，证明 CS-GA 合成成功，同时 CS-GA 也保持了 CS 的基本结构。

通过 Folin-ciocalteu 比色法计算 GA 的接枝率。用磷酸盐缓冲液（PBS，pH 5.0）200 μL 溶解不同浓度的 GA，分别加入 20%碳酸钠溶液 2 mL 和 Folin-ciocalteu 溶液 1 mL，37 ℃反应 15 min 后，于 760 nm 处测定吸光度[20]。以吸光度（D）为纵坐标、GA 质量浓度（c）为横坐标线性回归，所得标准曲线方程为 D=0.001 05c－0.147，R^2=0.999 5，线性范围为 0.25 ～ 3 mg/mL。

使用 0.1 mol/L 盐酸配制 24、28、32 mg/mL 的 CS 溶液（CS-24、CS-28、CS-32），按“**2.1.1**”项下方法制备的低接枝率 CS-GA（CS-LGA-24、CS-LGA-28、CS-LGA-32）及高接枝率 CS-GA（CS-

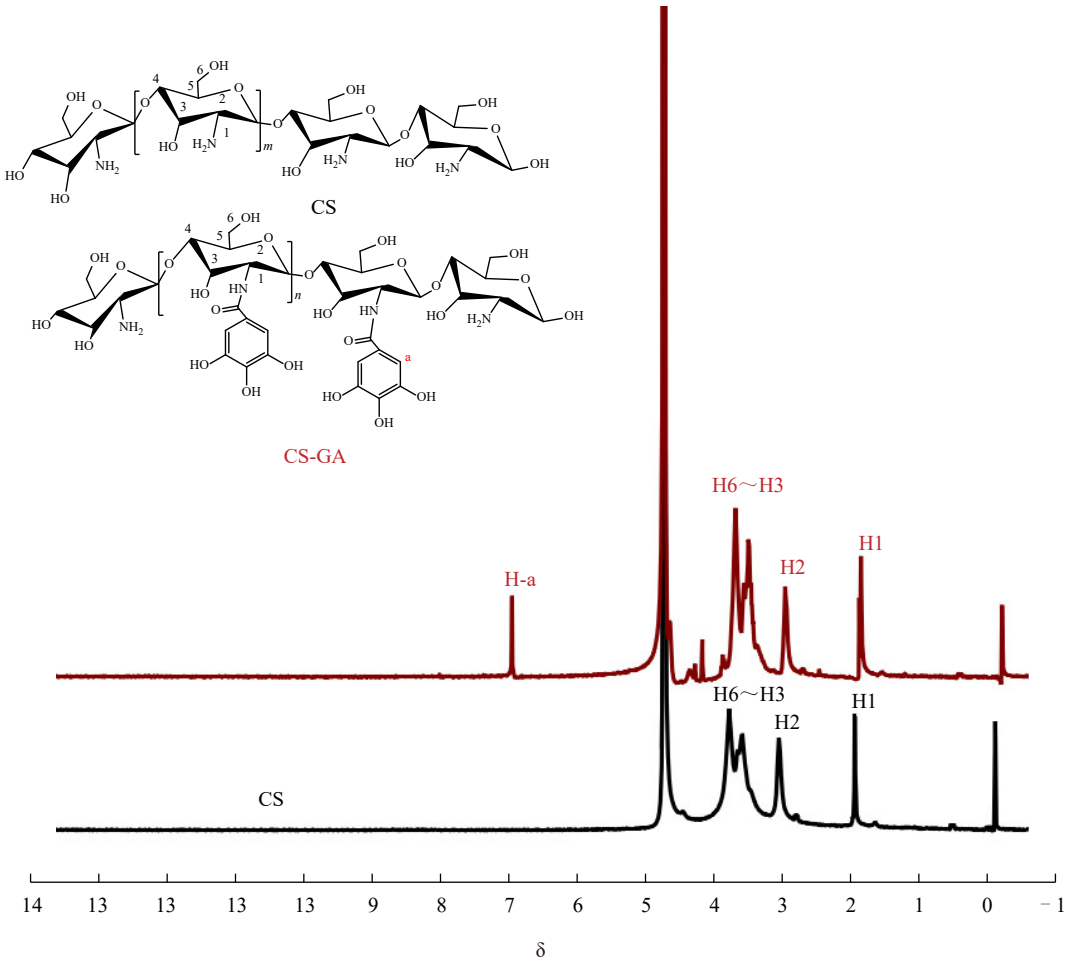


图 1　CS 和 CS-GA 的核磁共振氢谱

Fig.1　^{1}H NMR Spectra of CS and CS-GA

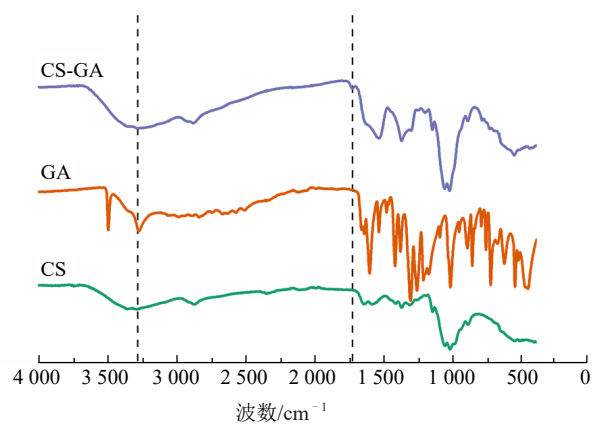
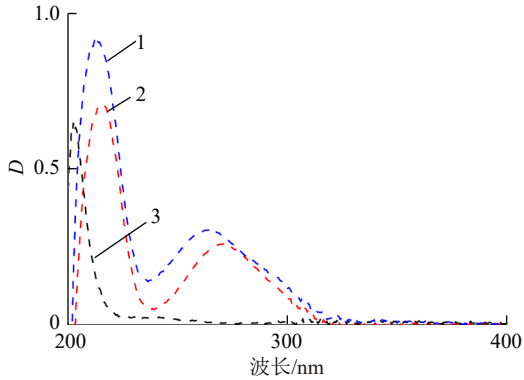


图 2　CS、GA 和 CS-GA 的 FT-IR 图谱

Fig.2　FT-IR Spectra of CS, GA and CS-GA

HGA-24、CS-HGA-28、CS-HGA-32），按 Folin-ciocalteu 比色法测量 760 nm 处吸光度，计算得高、低接枝率的 CS-GA 水凝胶中 GA 的接枝率分别为 (52.94±0.62) %和 (35.37±0.16%) (*n*=3)。

室温下分别用 1 mol/L 乙酸溶液、PBS（pH 5.0）和去离子水溶解 CS、GA、CS-GA，在 200 ～ 800 nm 进行全波长扫描，得紫外 - 可见 (UV-Vis) 吸收光谱。结果显示，CS 在 220 ～ 800 nm 没有特征紫外吸收峰，而 CS-GA 在 210 ～ 220 和 260 ～ 280 nm 出现了与 GA 接近的紫外吸收峰且明显发生了峰的跃迁（图 3），说明上述合成方法可合成高接枝率且可在去离子水中溶解 CS-GA 水凝胶。



1—CS-GA；2—GA；3—CS。

图 3　CS、GA 和 CS-GA 的 UV-Vis 图谱

Fig.3　UV-Vis Spectra of CS, GA and CS-GA

2.2　CS-GA 水凝胶的黏附性能试验

水凝胶需要有一定的黏附能力才能保证发挥药效。按“**2.1.2**”项下方法制备低接枝率 CS-GA（CS-LGA-24、CS-LGA-28、CS-LGA-32）及高接枝率 CS-GA（CS-HGA-24、CS-HGA-28、CS-HGA-32）。采用混合型流变仪进行测试，选用 40 mm 转子，在振幅频率 10 rad/s、振动应变 5%的条件下测量。结果如图 4 所示，不同质量浓度的水凝胶在相同剪切率的条件下，GA 接枝率越高的水凝胶黏度越大，且呈现出剪切稀化能力，说明 CS-GA 水凝胶具有 GA 浓度依赖性。

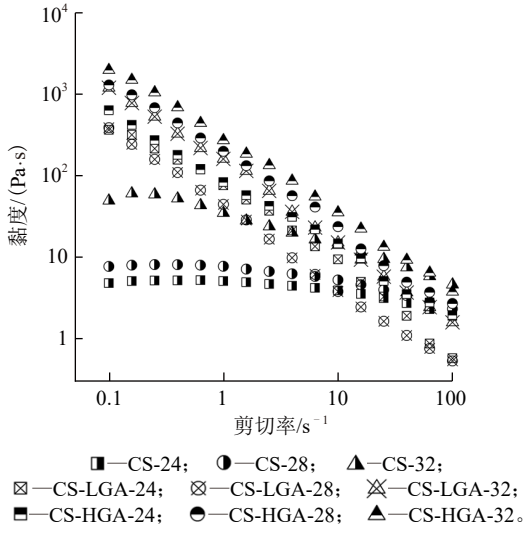


图 4　不同规格 CS、CS-LGA、CS-HGA 水凝胶的黏度曲线

Fig.4　Viscosity Curves of CS, CS-LGA and CS-HGA Hydrogels with Different Specifications

采用万能拉力试验机测试其黏附性能。将水凝胶制备成长 25 mm、宽 12.5 mm、厚 1 mm 的长条凝胶试样黏附于猪腹部皮肤（已剔除毛发，购于市场）上，以 5 mm/min 的拉伸速率测试其黏附性能。另将水凝胶制备成直径为 5 mm、高度为 5 mm 的圆柱状，黏附在小鼠不同器官上以测试组织黏附性。结果如图 5A 所示，CS-HGA-32 水凝胶（CS-GA-3）最大拉伸应力可达到 (10.0±0.3) kPa (*n*=5)，CS-

HGA-28 水凝胶（CS-GA-2）可达到（5.0±0.3）kPa（n=5），而 CS-HGA-24 水凝胶（CS-GA-1）则达到（3.0±0.4）kPa（n=5）。此外，该水凝胶具有良好的生物组织黏附性能，如图 5B 所示，CS-GA-2 可以黏附于新鲜的小鼠心、脾、肺、肾脏表面，黏附时间达 1 ～ 2 h。综上所述，该水凝胶具有良好而广泛的黏附性能，在生物黏接剂方面具有潜在的应用前景。

2.3 CS-GA 流变性能试验

取 CS-GA 冻干品，溶于 PBS（pH 7.4）中制备成水凝胶，利用混合型流变仪测定其流变性能，选用 40 mm 转子，固定扫描频率为 5 rad/s，在应变范围 0.01%～ 1 000%条件下进行测试，以确定凝胶的线性黏弹区。另外，将线性应变值固定为 2%，在 0.1 ～ 100 rad/s 条件下进行频率扫描，以测定水凝胶的储能模量 G' 及损耗模量 G''。

所得水凝胶的机械性能关系如图 6 所示。如图 6A 所示，在较小的应变（低于临界应变）范围内，G' 大于 G''，说明 CS-GA 水凝胶表现出弹性行为；当振荡应变高于临界应变，G'' 大于 G'，说明 CS-GA 水凝胶处于黏性状态。如图 6B 所示，在整个 2%频率扫描范围内，G' 是相对独立的，所有水凝胶均显示 G' 大于 G''，说明水凝胶具有凝胶状态。本试验表明，GA 改性的 CS 可以溶于水溶液，CS-GA 水凝胶在有效的能量耗散范围内能保持稳定，这在实际应用中具有重要意义。

2.4 CS-GA 对组织液的吸收能力及 GA 释放量

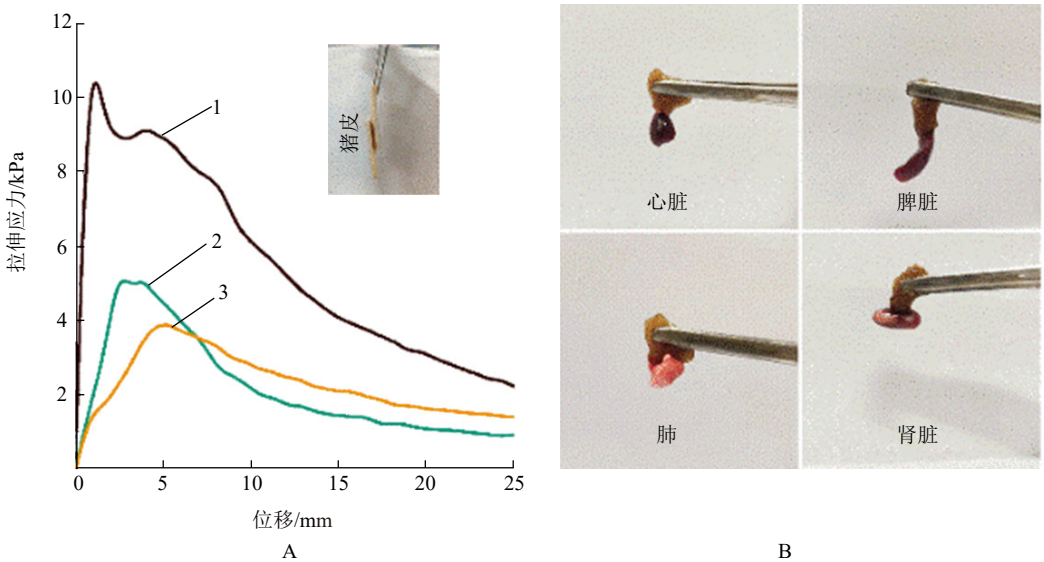
为了证明水凝胶具有出色的吸水性能，将水凝胶样品分别置于温度 37 ℃、pH 7.4 的 PBS 中浸泡 24 h，使水凝胶达到溶胀平衡，计算水凝胶的溶胀率；同时，记录不同时间内水凝胶中 GA 的释放量（m_i），按式①计算溶胀率，按式②计算 GA 的累积释放率。

$$溶胀率=(m-m_0)/m_0\times100\% \quad ①$$

$$累积释放率=\frac{\sum_{i=1}^{6} m_i}{m_{总}}\times100\% \quad ②$$

式中：m_0 为凝胶原始质量，m 为凝胶吸水后的质量；$m_{总}$为水凝胶中 GA 的总量。

结果如图 7A 所示，CS-GA 水凝胶能在短时间内吸收大量的水分，并在 1 ～ 6 h 达到溶胀平衡，表明它能在伤口治疗过程中迅速吸收渗出的组织液。如图 7B 所示，随时间的增加，CS-GA 中的 GA 能不断地从水凝胶中释出，具有缓释特性。



A　　B

1—CS-GA-3；2—CS-GA-2；3—CS-GA-1。

图 5　CS-GA 水凝胶的拉伸应力（A）及对小鼠不同器官表面的黏附效果（B）

Fig.5　Tensile Stress of CS-GA Hydrogels（A）and Adhesion onto Different Organic Surfaces of the Mice（B）

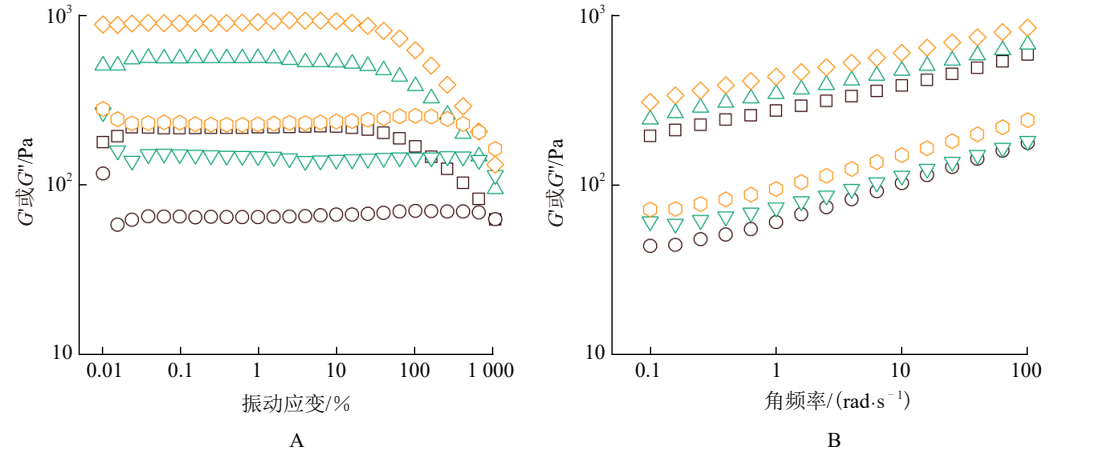


图 6　CS-GA 水凝胶的应变扫描曲线（A）和频率扫描曲线（B）

Fig.6　Strain Sweep Curves (A) and Frequency Sweep Curves (B) of CS-GA Hydrogels

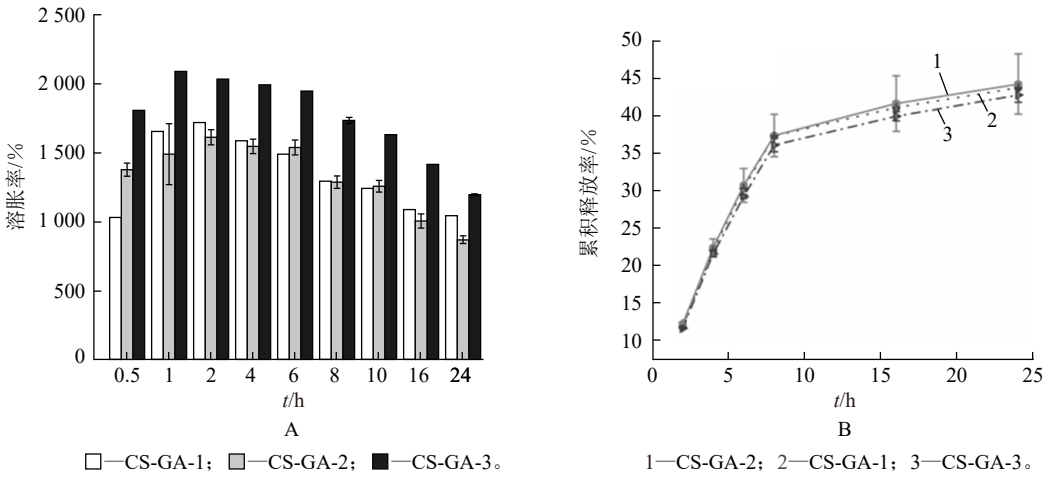


图 7　CS-GA 水凝胶不同时间的溶胀度（A）和 GA 的释放曲线（B）（*n*=3）

Fig.7　Swelling Degree of CS-GA Hydrogels (A) and Release Curves of GA (B) (*n*=3)

2.5　CS-GA 水凝胶的抑菌性能试验

采用牛津杯法验证 CS-GA 水凝胶的抑菌性能。首先将水凝胶用去离子水溶解，用 1 mL 注射器将水凝胶注射进牛津杯中，使牛津杯中充满水凝胶，经紫外照射杀菌后，将菌液稀释至 10^6 cfu/mL，涂布平板。将带有凝胶的牛津杯轻放在带菌平板上，37 ℃恒温孵育 24 h 后，测定抑菌圈半径。结果如图 8 所示。

与 PBS 组相比较，水凝胶在体外对大肠埃希菌和表皮葡萄球菌有不同程度的抑制作用。CS-GA 水凝胶不仅抑菌效果良好，且呈剂量依赖性。如图 8 所示，相比 CS，CS-GA 水凝胶抑菌效果明显，CS-GA-3 对表皮葡萄球菌的抑菌圈能达到 1.87 cm、对大肠埃希菌的抑菌圈最高能达到 1.77 cm；相较于 CS-GA-1，CS-GA-3 对大肠埃希菌和表皮葡萄球菌抑制作用明显的增加，说明具有浓度依赖。比较 2 个菌种可知，CS-GA 水凝胶对革兰阳性菌抑制效果略高于革兰阴性菌。

2.6　CS-GA 水凝胶的生物被膜抑制试验

LB 培养基（1 L）的配制：NaCl 10 g、酵母提

取物 5 g、胰蛋白胨 10 g。

用结晶紫染色法对试验菌株生物被膜的形成总量进行测定。加入稀释的 LB 培养液（用去离子水按体积比 1 ∶ 7 稀释，以模拟促进生物被膜形成的低营养条件），在 24 孔板中加入菌悬液（1×10^7 cfu/mL）100 μL，再加入不同浓度 CS-GA 水凝胶，37 ℃静置孵育 12 h。弃去培养上清，剩余物用 PBS（pH 7.4）轻轻洗涤，以除去浮游菌。采用多聚甲醛固定后，再用 1%结晶紫染色 15 min，用 95%乙醇溶解染料。用紫外分光光度计读取 D_{570} 值，设置不加水凝胶作为空白对照，按式③计算生物被膜抑制率。

$$抑制率=[D_{570}(空白对照组)-D_{570}(试验组)]/D_{570}(空白对照组)\times100\% \quad ③$$

结果如图 9 所示，CS-GA-1、CS-GA-2 和 CS-GA-3 对大肠埃希菌 BL21 生物被膜的抑制率分别为（58.02±0.22）%、（60.61±0.067）%、（81.91±0.00）%（n=3），对表皮葡萄球菌生物被膜的抑制率分别为（42.92±0.02）%、（50.94±0.01）%、（52.86±0.01）%（n=3）。结果表明，CS-GA 水凝胶可在体外释放 GA，且具有良好的生物被膜抑制效果；随水凝胶浓度增加，抑制率增加，说明抑制率具有浓度依赖性。

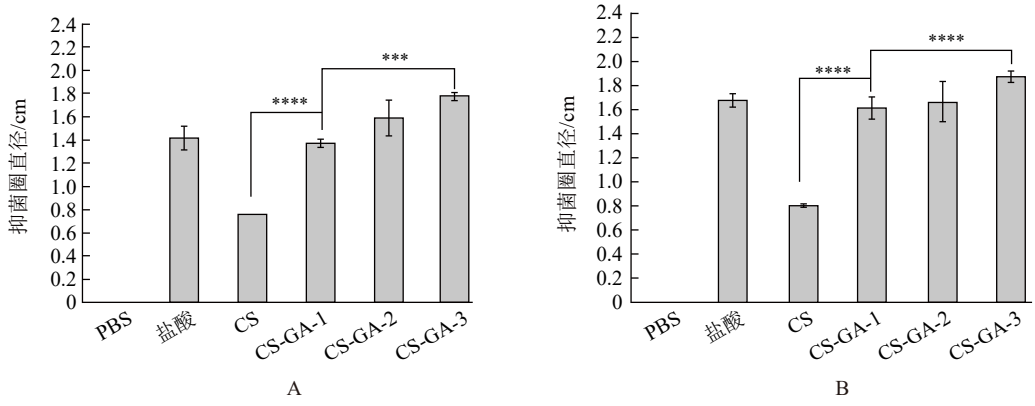


图 8 CS-GA 水凝胶对大肠埃希菌（A）和表皮葡萄球菌（B）的抑菌圈直径

（相较于 CS-GA-1，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；n=3）

Fig.8 Inhibition Zone Diameters of CS-GA Hydrogels against *Escherichia coli*（A）and *Staphylococcus epidermidis*（B）

（Compared with CS-GA-1, *** Represents P<0.001, **** Represents P<0.000 1; n=3）

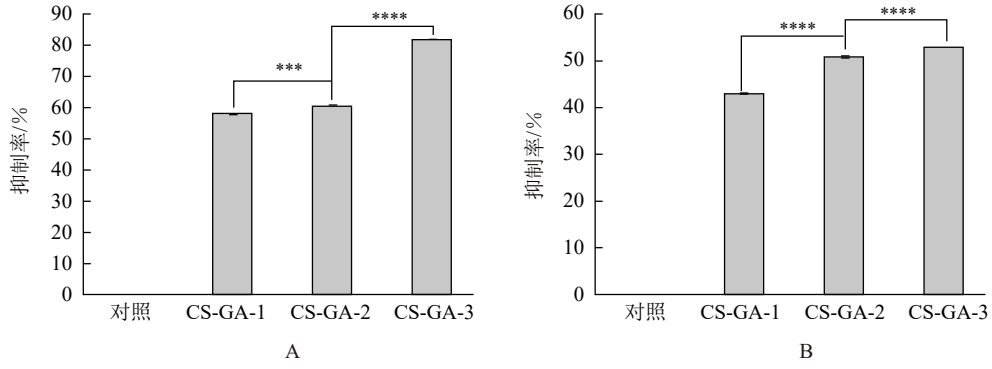


图 9 CS-GA 水凝胶对大肠埃希菌（A）和表皮葡萄球菌（B）生物被膜的抑制

（相较于 CS-GA-1，*** 表示 P<0.001，**** 表示 P<0.000 1；n=3）

Fig.9 Biofilm Inhibition of *E. coli*（A）and *S. epidermidis*（B）by CS-GA Hydrogels

（Compared with CS-GA-1, *** Represents P<0.001, **** Represents P<0.000 1; n=3）

2.7 CS-GA 的细菌胞外多糖抑制试验

胞外多糖是生物被膜的重要组成部分，能增加生物被膜的厚度和硬度，主要负责细菌与接触表面的黏附。本试验通过苯酚 - 硫酸法测定 CS-GA 水凝胶对试验菌胞外多糖的抑制效力。将菌悬液（1×10^7 cfu/mL）加至含有不同水凝胶的培养液中，于 37 ℃静置孵育，以 CS 为对照组。分别在 24 h 后收集混合物 1 mL，4 ℃离心（11 300×*g*）10 min，用 0.22 μm 滤膜过滤。在上清中加入冰乙醇 3 mL，于 4 ℃静置 24 h 以沉淀出胞外多糖，4 ℃离心（12 857×*g*）10 min，收集沉淀，最后用去离子水 1 mL 溶解沉淀出来的胞外多糖，在 490 nm 处测定吸光度，按式④计算抑制率。结果如图 10 所示。

$$抑制率=[D_{490}(对照组)-D_{490}(试验组)]/D_{490}(对照组)\times100\% \quad ④$$

结果表明，经过 6 h 的孵育，与对照组相比，CS-GA-1、CS-GA-2、CS-GA-3 对大肠埃希菌胞外多糖的抑制率分别为（16.15±2.26）%、（18.54±3.66）%、（29.57±3.00）%；对表皮葡萄球菌菌胞外多糖的抑制率分别为（1.84±1.23）%、（10.61±0.32）%、（37.14±0.31）%，表明不同水凝胶对 2 种菌株产生的胞外多糖抑制率有显著差异。并且，CS-GA 水凝胶在受试浓度范围内对胞外多糖的抑制作用呈剂量依赖特性。

3 讨论

本研究合成的 CS 衍生物水凝胶在生理条件不仅表现出良好的抗菌活性，而且对细菌生物被膜及细菌表达的胞外多糖抑制作用显著。化学改性不仅可以改善 CS 的物理化学性质，还可以保留 CS 的独特性质，扩大 CS 衍生物的应用范围[21]。结果显示，当 GA 接枝率超过 50%时，水凝胶呈现高黏性状态且能维持 CS 的基础结构。体外抑菌试验中，高浓度水凝胶能够抑制大肠埃希菌和表皮葡萄球菌。CS-GA 水凝胶浓度为 32 mg/mL 时，对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌生物被膜的抑制率分别达（81.91±0.00）%、（52.86±0.01）%，对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌胞外多糖的抑制率分别为（29.57±3.00）%、（37.14±0.31）%，这些结果表明 GA 改性 CS 的水凝胶具有潜在的抗菌效果。

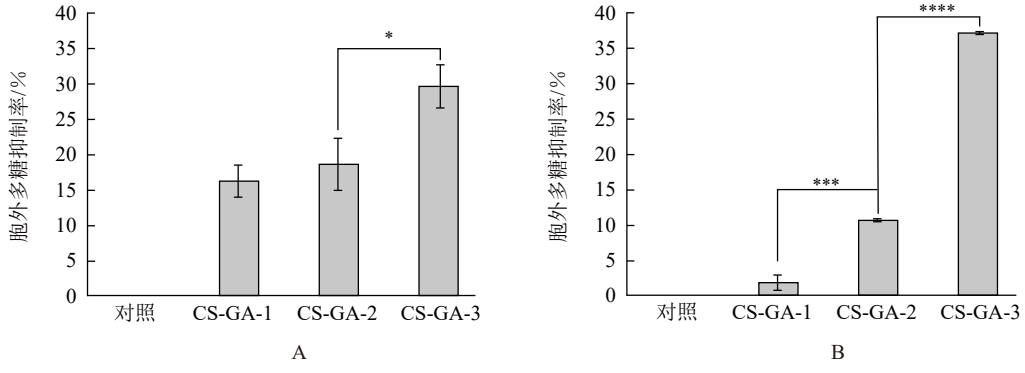


图 10　CS-GA 水凝胶对大肠埃希菌（A）和表皮葡萄球菌（B）胞外多糖的抑制作用

（相较于 CS-GA-1，* 表示 $P<0.05$，*** 表示 $P<0.001$，**** 表示 $P<0.000\,1$；$n=3$）

Fig.10　Inhibition Effects of CS-GA Hydrogels on Extracellular Polysaccharides from *E. coli*（A）and *S. epidermidis*（B）

（Compared with CS-GA-1, * Represents $P<0.05$, *** Represents $P<0.001$, **** Represents $P<0.000\,1$; $n=3$）

参考文献：

[1] MARANGON C A, MARTINS V C A, LING M H, *et al*. Combination of rhamnolipid and chitosan in nanoparticles boosts their antimicrobial efficacy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(5): 5488-5499.

[2] CHUNG P Y, KHANUM R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2017, **50**(4): 405-410.

[3] ABISADO R G, BENOMAR S, KLAUS J R, *et al*. Bacterial

quorum sensing and microbial community interactions [J]. *mBio*, 2018, **9**(3): e02331-17.

[4] JAKOBSEN T H, TOLKER-NIELSEN T, GIVSKOV M. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(9): 1970.

[5] ZOU W J, GU J W, LI J N, *et al*. Tailorable antibacterial and cytotoxic chitosan derivatives by introducing quaternary ammonium salt and sulfobetaine [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, **218**: 992-1001.

[6] LI J H, ZHAO L Q, WU Y G, *et al*. Insights on the ultra high antibacterial activity of positionally substituted 2'-*O*-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride chitosan: a joint interaction of $-NH_2$ and $-N^+(CH_3)_3$ with bacterial cell wall [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, **173**: 429-436.

[7] LUO Y C, WANG Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, **64**: 353-367.

[8] BRAZ E M A, SILVA S C C C, BRITO C A R S, *et al*. Spectroscopic, thermal characterizations and bacteria inhibition of chemically modified chitosan with phthalic anhydride [J]. *Mater Chem Phys*, 2020, **240**: 122053.

[9] QIN Y K, LI P C, GUO Z Y. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: a review of structural optimization and applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, **236**: 116002.

[10] LI Q, MI Y, TAN W, *et al*. Highly efficient free radical-scavenging property of phenolic-functionalized chitosan derivatives: chemical modification and activity assessment [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **164**: 4279-4288.

[11] İLYASOĞLU H, GUO Z. Water soluble chitosan-caffeic acid conjugates as a dual functional polymeric surfactant [J]. *Food Biosci*, 2019, **29**: 118-125.

[12] LIU S X, JIANG N, CHI Y Q, *et al*. Injectable and self-healing hydrogel based on chitosan-tannic acid and oxidized hyaluronic acid for wound healing [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, **8**(9): 3754-3764.

[13] LUNKOV A, SHAGDAROVA B, KONOVALOVA M, *et al*. Synthesis of silver nanoparticles using gallic acid-conjugated chitosan derivatives [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, **234**: 115916.

[14] LI K J, GUAN G L, ZHU J X, *et al*. Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan-gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2019, **96**: 234-243.

[15] KANG J M, LI Q Q, LIU L, *et al*. The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating pgaABCD genes expression [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(4): 1837-1846.

[16] BAI J R, ZHANG Y S, TANG C, *et al*. Gallic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, **133**: 110985.

[17] LIU J, YONG H M, LIU Y P, *et al*. Recent advances in the preparation, structural characteristics, biological properties and applications of gallic acid grafted polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **156**: 1539-1555.

[18] 王琴梅, 洪育冰. 一种多重交联可注射水凝胶的制备方法及其制备方法和应用: 中国, 113318276A [P]. 2021-08-31.

[19] SUN C Y, ZENG X L, ZHENG S H, *et al*. Bio-adhesive catechol-modified chitosan wound healing hydrogel dressings through glow discharge plasma technique [J]. *Chem Eng J*, 2022, **427**: 130843.

[20] ABRAMOVIČ H, GROBIN B,ULRIH N P, *et al*. Relevance and standardization of *in vitro* antioxidant assays: ABTS, DPPH, and folin-ciocalteu [J]. *J Chem*, 2018, **2018**: 4608405.

[21] PAVONI J M F, LUCHESE C L, TESSARO I C. Impact of acid type for chitosan dissolution on the characteristics and biodegradability of cornstarch/chitosan based films [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **138**: 693-703.