

# 添加不同高分子聚合物原位培養以修飾細菌纖維素之結構

毛昱舜<sup>1</sup>、吳建一<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學生物產業科技學系研究生

<sup>2</sup>大葉大學生物產業科技學系副教授

\*[jjwu@mail.dyu.edu.tw](mailto:jjwu@mail.dyu.edu.tw)

## 摘要

本研究為藉由添加不同高分子聚合物聚麩胺酸(Gamma-Polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)、水溶性幾丁聚醣(Water-soluble Chitosan, WSC)及酸溶性幾丁聚醣(Acid-soluble Chitosan, ASC)至培養基,以原位培養方式探討細菌纖維素(Bacterial cellulose, BC)在不同濃度之高分子聚合物下所修飾細菌纖維素之結構與特性。結果顯示 BC-PGA 膜的乾重會隨  $\gamma$ -PGA 的添加量增加而有些微增加,然而 BC-WSC 及 BC-ASC 之乾重會隨著幾丁聚醣含量增加而遞減。另外,SEM 分析可觀察到三種複合材料隨著高分子聚合物之濃度增加,纖維與纖維之間緻密性也會增加,但其中 BC-PGA 的效果似乎比較不明顯;而濃度為 1% BC-PGA、BC-WSC 及 BC-ASC 之含水量分別增加至 374%、367%及 383%,在機械強度方面只有 BC-PGA 之強度有稍微的改善。經過修飾後的 BC 複合材料可應用在不同的領域上。

關鍵字: 細菌纖維素、聚麩胺酸、幾丁聚醣、性質。

## 1. 前言

纖維素(Cellulose)為植物體裡最基本的組成之一,亦為自然界中含量豐富的一種多醣,其特性為純淨、無毒、可再生以及可降解。來自於植物中未純化的纖維素常混有其他成分如木質素及半纖維素,然而細菌纖維素(Bacterial cellulose, BC)為純度最高的纖維素,其可藉由*Acetobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Grobacterium* sp.以及*Sarcina* sp.等菌株(Nattakan *et al.*, 2009; Omer *et al.*, 2009)培養在含有碳源及氮源培養基生成BC(Nakagaito *et al.*, 2005)。BC與植物纖維(Plant cellulose, PC)雖然有相同的化學結構,皆是以葡萄糖(glucose)為單位做 $\beta$ -1,4聚合而成,然而BC具有超緻密的網狀結構,其物理和化學性質皆優於植物纖維,如機械強度、結晶度及保水性等。在應用方面BC在生物醫學領域上的應用可做為人類大面積燒傷所用的人工皮膚(Fontana *et al.*, 1990)、手術中所用到的人工血管(Klemm *et al.*, 2001)、軟骨組織工程裡的支架(Svensson *et al.*, 2005)以及可用來治療皮膚來防止細菌或真菌引起感染的傷口敷料(Czaja *et al.*, 2007; Czaja *et al.*, 2006; Jonas and Farah, 1998)。由於BC有高含水量、極佳的液體吸附能力、非過敏性以及在全消毒後亦不改變其性質的特性,所以為了衍生BC領域的潛在應用,需進一步探討來將BC進行物理及生物性質上的修飾。

聚麩胺酸(Gamma-Polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)為由微生物代謝合成之生物聚合物,其結構是由一麩胺酸(glutamic acid, PG)上的胺基(-NH<sub>2</sub>)及另一麩胺酸上的羧基(-COOH)連結聚合而成。由於 $\gamma$ -PGA具有許多優點,如生物相容性、生物降解性、高吸水性、保濕性、無毒性等,因此在多方面有許多應用的價值,如食品、化妝品、生醫、環境等可作為增稠劑、保濕劑、藥物載體、維持釋放物質及絮凝劑(Haruhiko *et al.*, 1996; Haruhiko *et al.*, 1995; Karel and Vladimír, 2004)。

幾丁質(Chitin)含量在自然界中為僅次於纖維素的生物聚合物，其結構是由1000-3000個N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)之單體所組成，可普遍從甲殼類動物、昆蟲外骨骼、蕈類及細菌細胞壁獲得。幾丁聚醣(Chitosan)是經由幾丁質去去乙醯化(deacetylation)作用後所獲得，可溶解在酸中。由於幾丁聚醣具有生物降解性、生物相容性以及無毒性之優點，所以為一種用途很廣泛的材料(Rinaudo, 2006)，其可應用在食品加工、化妝品、紡織、工業材料等，且在生物醫學領域上亦是受到重視的高分子材料。已知幾丁聚醣亦有滲透的吸收性、抗真菌、抗微生物、抗病毒及促進傷口癒合的性質(Jeon *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006)，因此，幾丁聚醣可作為傷口處理來減少疤痕組織形成的材料。

本研究擬利用生物性聚合物的添加以原位培養方式來改善BC材料的物理及化學性質，而期望能將 $\gamma$ -PGA及幾丁聚醣與BC合成，來提高BC薄膜的物理、化學、機械及生物學上的性質，因此本研究以本實驗室自行篩選之菌株 *Gluconacetobacter* sp. Wu4 生長於添加不同濃度之高分子聚合物 $\gamma$ -PGA、水溶性幾丁聚醣(Water-soluble Chitosan, WSC)及酸溶性幾丁聚醣(Acid-soluble Chitosan, ASC)之培養基，以原位培養的方式形成新型奈米結構薄膜，並探討修飾後之BC膜微觀結構及機械強度性質。

## 2. 材料與方法

### 2.1 BC 複合材料之製備

以本實驗室自行篩選之菌株 *Gluconacetobacter* sp. Wu4 培養在 HS 培養基裡，並在培養期間分別添加不同濃度(0%、0.25%、0.75%及 1%)之高分子聚合物  $\gamma$ -PGA (Mw, 300kDa)、WHC (Mw, 50kDa) 及 ASC(Mw, 300kDa)至培養裡，並在 30°C 下培養 5 天。所生產出的 BC 薄膜先以去離子水清洗表面殘留的培養基，接著將 BC 薄膜浸泡在 NaOH 溶液中，並在 121°C 下殺菌 20 分鐘，其目的是為了薄膜裡面的細胞分裂後溶解出，再用去離子水徹底清洗至水的 pH 為中性為止，最後將純化後的薄膜放置 50°C 烘箱乾燥並保存。

### 2.2 拉力強度試驗

將薄膜剪成長度為 60 mm 寬為 20mm 長條狀後，以拉力測試機(VT-RX N101-300TS)在 15mm/min 速率下測試薄膜斷裂後的張力強度(Tensile strength)、楊氏模數(Young's modulus)與斷裂伸長率(Elongation at break)，至少重複三次後求其數值之平均值。

### 2.3 場發射掃描式電子顯微鏡(Field-Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM) 分析

為了觀察 BC 複合材料薄膜之表面及型態，而以 FE-SEM 來進行分析。將薄膜固定在試樣臺上，接著放置於離子覆膜機(Model IB-2, Eiko, Japan)覆蓋一層金箔後，再以場發射掃描式電子顯微鏡(JEOL JSM-6700F)進行拍攝觀察。

### 2.4 含水率分析(Water holding capacity, WHC)

要測定BC複合材料薄膜之WHC，先須將薄膜放置在去離子水中浸泡直到平衡為止，使用鑷子將薄膜從水中移出後，將多餘殘留在薄膜表面的水分以濾紙吸乾後秤重，並使用下列公式計算薄膜之WHC，其中 $W_h$ 及 $W_d$ 分別為薄膜含水重量與乾燥薄膜重量。

$$WHC(\%) = \frac{W_k - W_d}{W_d} \times 100\%$$

## 2.5 色澤分析

以自動色差計(Hunter lab colour parameters)測定純化後之細菌纖維之 L、a 和 b 值。L 值代表明亮度，數值越高代表物質的透光度越佳。a 值正數為紅色度，0 為灰色而負數為綠色。b 值正數為黃色度、0 為灰色而負數為藍色。所使用之標準白板之 L 值為 98.8、a 為-0.3、b 為 0.5。每個純化後樣品會重複三次的測定，最後取平均值。

## 3. 結果與討論

### 3.1 添加不同濃度高分子聚合物以原位培養方式修飾細菌纖維素之產量分析

圖 1 即為 BC 以原位培養方式添加生物性高分子修飾後之薄膜，由圖 1 可觀察到 BC-PGA 的乾重會隨  $\gamma$ -PGA 的添加量增加(0~1%)而有些微增加的趨勢，然而 BC-WSC 膜及 BC-ASC 膜之乾重會隨著幾丁聚醣含量增加而遞減。文獻曾指出幾丁聚醣為陽離子之聚合物，會與菌體表面產生靜電作用抑制菌體生長(Lim and Hudson, 2004)。另外，幾丁聚醣的分子量大小及濃度也會影響幾丁聚醣之抑菌效果。所以在培養過程中添加具有抑菌效果的幾丁聚醣，隨著幾丁聚醣分子量及濃度的增加，抑菌效果也越強，所以從圖 1 中可以明顯發現三種高分子聚合物的平均乾重大小為 BC-PGA > BC-WSC > BC-ASC，其中酸溶性幾丁聚醣分子量大於水溶性幾丁聚醣，由於前者的抑制菌效果比較好，所以可能導致菌體比較不容易生長，而纖維的產量也相對的較低。

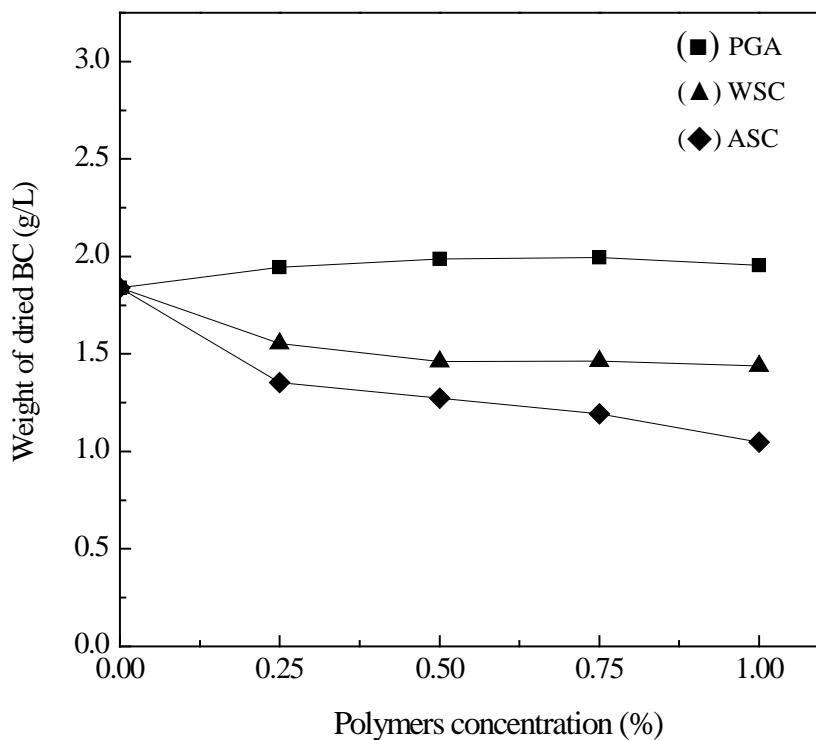


圖 1. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後細菌纖維素之產量

### 3.2 厚度及拉力強度分析

拉力試驗為測試薄膜強度的重要分析之一，材料的機械強度會與本身的結構有關係，其分子量大小、物質的熱塑性或熱固性、聚合度及結晶度等會影響材料本身的拉力值。因此可藉由拉伸試驗來確定所設計出的薄膜之實際強度數值以作為將來應用時之評估。

圖 2 為利用三種高分子聚合物原位修飾 BC 結構所製備出的複合材料之薄膜厚度與其機械強度關係圖。由圖 2 可知 BC-PGA 濕膜的厚度會隨  $\gamma$ -PGA 的添加量增加而有些微增加的趨勢，然而 BC-WSC 及 BC-ASC 濕膜之厚度則是隨著幾丁聚醣含量增加而減少。反之，經過乾燥程序後的薄膜厚度卻與濕膜呈現相反的趨勢，從圖 2 中可觀察到 BC-PGA 乾膜的厚度反而隨濃度增加而有些微的遞減，而 BC-WSC 及 BC-ASC 乾膜之厚度亦會隨著幾丁聚醣含量增加而增加。由 BC-PGA 與 BC-WSC 及 BC-ASC 比較亦可發現平均濕膜厚度大小依順為 BC-PGA > BC-WSC > BC-ASC。此結果與上述產量結果所提出幾丁聚醣具有抗菌效果的原因相似，含有幾丁聚醣之菌株較不易生長，BC 膜較不易生成且濕膜厚度也會隨分子量及濃度的增加而減少；然而經乾燥程序後之平均乾膜厚度大小依順卻為 BC-ASC > BC-WSC > BC-PGA，這能與 SEM 的結果(圖 3)同時來證實，從 SEM 的圖中可以觀察到 BC 原位修飾，幾丁聚醣比  $\gamma$ -PGA 修飾 BC 的效果更明顯，BC 表面明顯的幾丁聚醣所覆蓋，因此 BC 裡的孔隙亦被幾丁聚醣填滿；而  $\gamma$ -PGA 修飾 BC 的效果較不明顯，BC-PGA 表面的孔隙沒有被  $\gamma$ -PGA 所填滿，所以濕膜中纖維與纖維之間仍有較充足的空間，再經由乾燥程序後孔隙會隨著水分的移除孔隙也會降低而達到緻密的狀態，因此厚度會比孔隙被幾丁聚醣填滿之 BC-WSC 與 BC-ASC 還要薄。

複合材料之厚度亦與其本身的機械強度亦有相互的關係，可由圖 2 中觀察到，三種複合材料張力強度及楊氏模數會隨著濕膜的厚度增加或遞減而有相同的趨勢。而 BC-PGA 濕膜厚度隨  $\gamma$ -PGA 濃度增加而有些微的增加，濕膜厚度的增加及纖維的緻密程度增加，纖維強度也會稍微提升；然而，BC-WSC 與 BC-ASC 隨幾丁聚醣濃度增加而濕膜厚度降低，除了濕膜厚度會影響強度外，BC 孔隙雖然被幾丁聚醣填滿而增加緻密性，但幾丁聚醣分子本身具有高度結晶性會使 BC 薄膜變脆且延展性質較差，所以在強度及斷裂伸長率並不如 BC-PGA 複合材料。

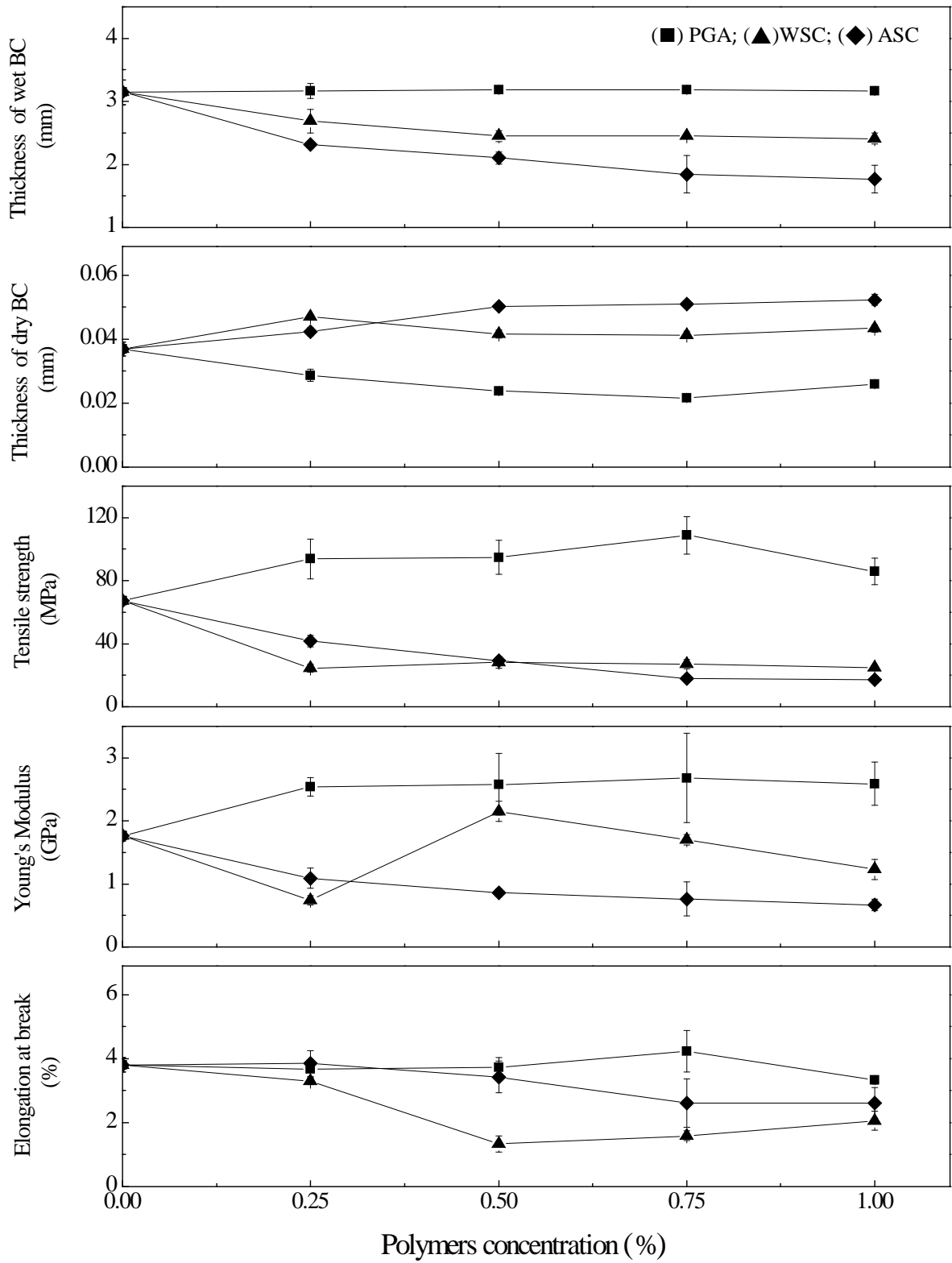


圖 2. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後細菌纖維素之厚度及機械強度分析

### 3.3 SEM 之微觀結構

為了進一步了解經三種高分子聚合物修飾細菌纖維素後之微觀結構，而藉由掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察 BC 表面微觀結構(圖 3)。由圖 3 可觀察 BC 薄膜由任意排列的 ribbon 纖維相互交錯形成網狀結構，而純 BC 薄膜之 SEM 影像可明顯顯示出纖維有充分的空間任意排列，此纖維的排列方式會使 BC 薄膜表面及內部會有不同的孔隙形成。另一方面，BC 與三種高分子聚合物以原位修飾方式所形成的複合材料中可發現隨著三種高分子聚合物之濃度增加，纖維與纖維之間緻密性也會增加，但其中 BC-PGA 的效果似乎比較不明顯。纖維緻密性增加會影響纖維的孔隙大小，進而導致 BC 纖維薄膜的孔隙度降低，所以很明顯的發現濃度 1% 高分子聚合物之纖維緻密性較高。由於 BC 與  $\gamma$ -PGA 及幾丁聚醣為有機物且為親水的性質，所以  $\gamma$ -PGA 與幾丁聚醣會與 BC 的 glucon chains 會有強烈的交互作用(Kim *et al.*, 2011)，所以會使 BC 在物理結構上達到修飾效果，且其物理性質上也會有所變化。先前研究指出纖維絲的厚度及密度會因培養時間、培養條件、碳源、接菌量處理方式及乾燥方式而有所影響(Guo and Catchmark, 2012; Tang *et al.*, 2010)，所以在培養期間添加不同高分子聚合物會影響培養條件，且會使 BC 的物理結構及性質上產生變化。

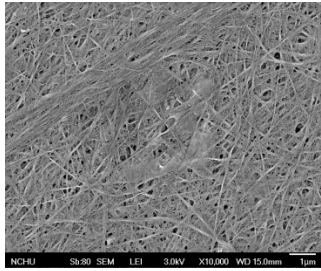
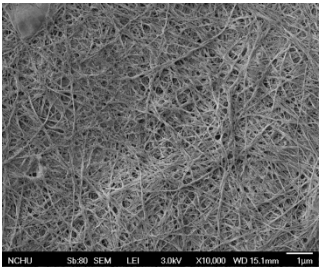
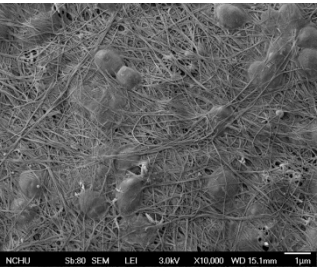
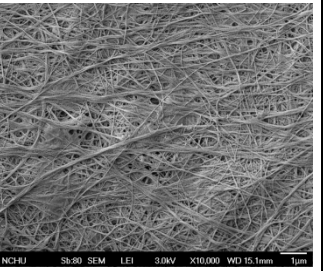
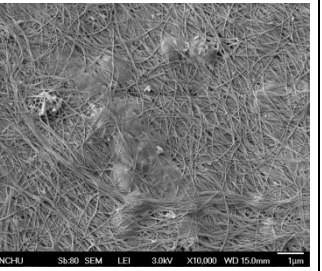
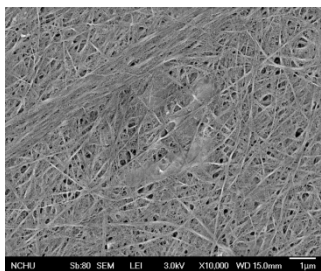
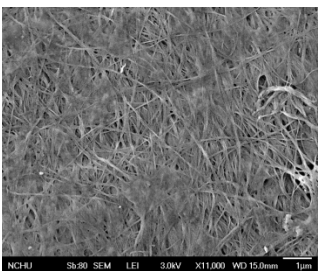
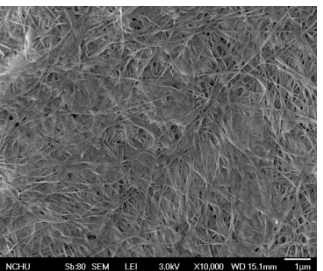
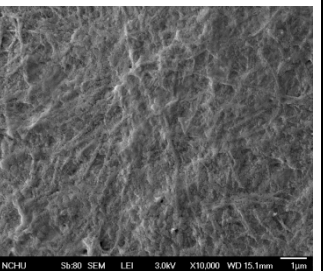
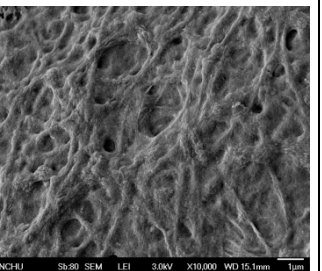
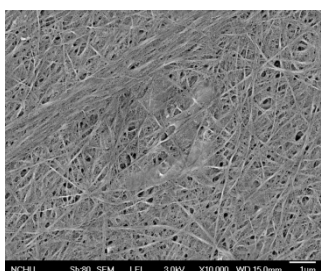
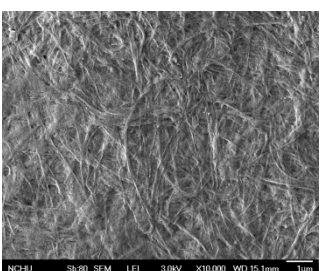
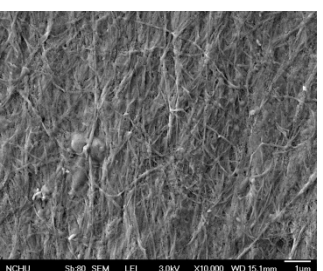
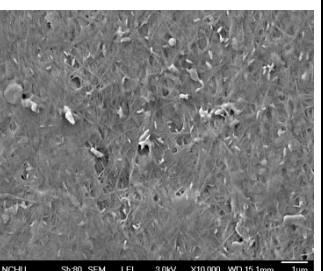
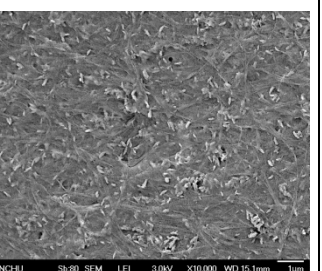
Membrane	Polymers concentration				
	0%	0.25%	0.5%	0.75%	1%
BC-PGA (PGA Mw:300kDa)					
BC-WSC (WSC Mw:50kDa)					
BC-ASC (ASC Mw:300kDa)					

圖 3. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後細菌纖維素之 SEM 微觀結構分析

### 3.4 含水率分析

BC 薄膜在物理結構上的修飾可能會使其本身物理性質產生改變，且 BC 的含水率(Water holding capacity, WHC)在生物醫學上作為敷材使用的重要性質，因敷材需要有適當的含水量才能加速傷口癒合且在癒合過程中能保護傷口不受到汙染(Cienchanska, 2004; Ul-Islam *et al.*, 2011)，且亦能幫助活性物質容易滲入傷口而能以無痛換藥的方式不傷害新皮膚生成，因此 BC 複合材料之結構在含水率上的影響為主要探討的目的。

圖 4 為 BC 以不同濃度之高分子聚合物原位修飾所製備成的複合材料之 WHC。由圖 4 可發現隨著高分子聚合物添加量增加 WHC 也會隨之增加。未添加高分子修飾的純 BC 之 WHC 為 334%，添加 1%之  $\gamma$ -PGA BC 之 WHC 增加至 374%。另外，分別添加水溶性幾丁聚醣及酸溶性幾丁聚醣之 BC-WSC 及 BC-ASC 之 WHC 分別為 367% 及 383%，兩者 WHC 亦高於未添加高分子之純 BC，而分子量為 300kDa 比 50kDa 幾丁聚醣之影響還要高。先前文獻顯示以分子量 80 kDa 及 30kDa 之幾丁聚醣進行 BC 原位修飾，而所測其含水率分子量 80 KDa 比 30 KDa 效果好(Phisalaphong and Nirun Jatupaiboon, 2008)。這研究出的結果與本研究相類似。雖然從 SEM 圖(圖 3)中亦可觀察到三種高分子之孔隙大小小於未添加高分子修飾的純 BC，然而  $\gamma$ -PGA 與幾丁聚醣有高親水性而能與水分子及 BC 支鏈同時交互作用，而這些交互作用能增加水分子至複合材料基體裡的吸附作用，因此三種高分子聚合物與 BC 形成的複合材料會比未添加高分子聚合物修飾的純 BC 有稍微高的 WHC。

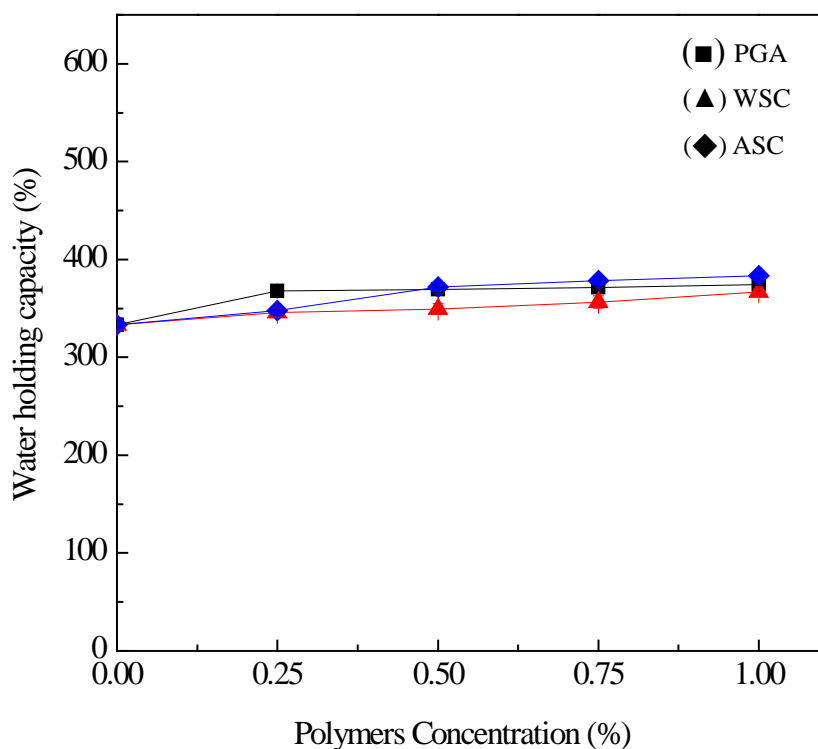


圖 4. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後細菌纖維素之含水率分析



### 3.5 BC 薄膜之色澤分析

以不同濃度之高分子聚合物以原位培養方式來修飾細菌纖維素結構，其在生產期間得到的細菌纖維素表面上會附著培養基的顏色，因此本研究以添加三種高分子聚合物修飾纖維後，再經純化及乾燥並比較其色澤上的變化。

在色彩表示方面主要具有三要素：明亮度、色相與彩度，而 L、a、b 表色系統即將此色彩顯示之三要素。L 值即為明亮度，在 L 值、a 值與 b 值皆為 0 時，色彩為全黑；L=100 時，色彩為全白，而 L=50 時，色彩為灰色；a 值與 b 值表示彩度，a 為正值(+)時，表示紅色度，負 a 值則表示綠色度；b 為正值(+)時，表示黃色度，負 b 值則表示藍色度。將所有經高分子聚合物修飾後的 BC 進行色差法分析，其結果如表 1。由表 1 來呈現不同色澤的差異，同時將無添加任何高分子聚合物之對照組所生產的 BC 與有添加高分子聚合物修飾後的 BC 來進行比較，可發現 BC- $\gamma$ -PGA 的 L 值與對照組的值相近表示其顏色較亮。從圖 5 亦可直接看出 BC- $\gamma$ -PGA 薄膜之外觀顏色與對照組沒有明顯的差異。而 BC-WSC 與 BC-ASC 之 L 值與對照組比較會有明顯的下降，另一方面 b 值也會隨著添加濃度提高而上升，表示黃色度越高，其亦可從圖 5 直接觀察到此兩種薄膜複合材料之外觀會有明顯的偏黃，隨著濃度提高，外觀呈現出的顏色也越來越深，表示幾丁聚醣濃度越高會使培養基的顏色越深，而所生產後的纖維經純化後的色素較難去除，明亮度相對會下降。

表 1. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後細菌纖維素之產量

Membranes	Polymers concentration (%)	Color analysis		
		L	a	b
Control	0	78.91±0.08	1.86±0.11	-3.57±0.26
BC- $\gamma$ -PGA	0.25	78.41±0.10	2.48±0.17	-4.31±0.22
	0.5	78.47±0.06	2.44±0.27	-4.06±0.24
	0.75	78.18±0.04	2.43±0.05	-2.59±0.20
	1	77.94±0.03	1.95±0.03	-2.74±0.24
BC-WSC	0.25	77.12±0.12	0.56±0.01	3.49±0.14
	0.5	73.08±0.06	-0.16±0.02	13.15±0.02
	0.75	72.06±0.03	-0.05±0.01	14.54±0.24
	1	70.60±0.08	1.02±0.11	19.69±0.10
BC-ASC	0.25	74.14±0.08	-0.17±0.02	10.49±0.27
	0.5	6.59±0.23	1.73±0.11	14.48±0.19
	0.75	66.91±0.04	1.17±0.11	19.51±0.15
	1	6.98±0.08	-0.28±0.01	20.07±0.04

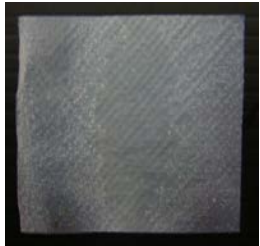


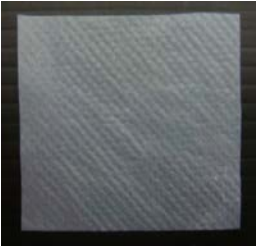

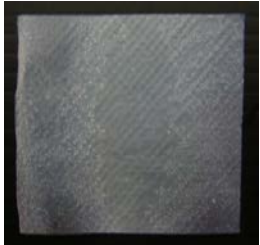


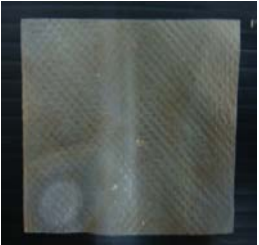

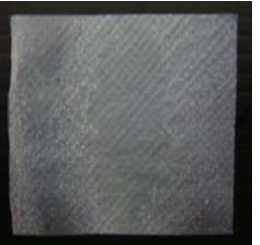

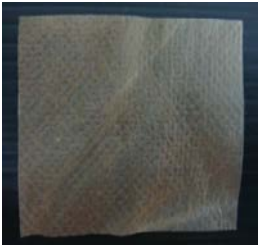
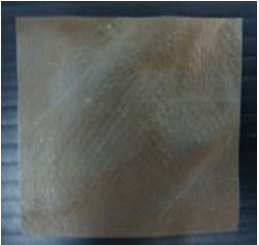

Membranes	Polymers concentration				
	0%	0.25%	0.5%	0.75%	1%
BC-PGA (PGA Mw:300kDa)					
BC-WSC (WSC Mw:50kDa)					
BC-ASC (ASC Mw:300kDa)					

圖 5. 添加不同高分子聚合物以原位培養方式所獲得修飾後之細菌纖維素

#### 4. 結論

經本研究以三種高分子聚合物探討原位培養方式修飾細菌纖維素之結構並分析其特性，結果顯示 BC-PGA 膜的乾重會隨  $\gamma$ -PGA 的添加量增加而有些微增加，然而因為幾丁聚糖具有抗菌效果而使菌體不易生長，所以 BC-WSC 及 BC-ASC 之乾重會隨著幾丁聚糖含量增加而遞減。以 SEM 分析可明顯觀察到隨著三種高分子聚合物之濃度增加，纖維與纖維之間緻密性也會增加，只有 BC-PGA 的效果似乎比較不明顯；機械強度方面 BC-WSC 及 BC-ASC 隨幾丁聚糖濃度增加而濕膜厚度降低外，幾丁聚糖本身的高結晶性會使 BC 薄膜變脆，所以在強度及斷裂延伸率方面並不如 BC-PGA 複合材料。三種經高分子聚合物修飾後的 BC 複合材料之含水率比未修飾的純 BC 有稍微高的含水率，在濃度為 1% BC-PGA、BC-WSC 及 BC-ASC 之含水量分別增加至 374%、367% 及 383%，另外，在色澤分析中 BC-PGA 薄膜外觀顏色與對照組比較無明顯差異，而 BC-WSC 與 BC-ASC 與對照組比較發現 L 值有明顯下降且會隨著幾丁聚糖濃度提高，b 值也會上升。

#### 5. 誌謝

感謝國科會計畫經費補助。以篩選之微生物利用廢水中有機物生合成奈米纖維薄膜以及奈米纖維薄膜應用在廢水處理之研究。計畫編號: NSC 100-2628-E-212-002-MY3。

#### 參考文獻

- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M. and Brown, R. M. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 8(1): 1–12.
- Czaja, W., Krystynowicz, A. and Bielecki, S. 2006. Microbial cellulose the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27: 145–151.
- Cienchanska, D. 2004. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 12: 69–72.
- Fontana, J. D., de Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C. and Gallotti, B. J. 1990. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25: 253–263.
- Guo, J. and Catchmark, J. M. 2012. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers* 87: 1026–1037.
- Haruhiko, Y., Arima, T., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Flocculation properties of poly( $\gamma$ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation Technology* 82: 84–87.
- Haruhiko, Y., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1995. Characteristics of a biopolymer flocculant production by *Bacillus* sp. PY-90. *Journal of Fermentation Technology* 79: 378–380.
- Jeon, Y. J., Park, P. J. and Kim, S. K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers* 44: 71–76.
- Jonas, R. and Farah, L. F. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59(1–3): 101–106.
- Kim, J., Cai, Z., Lee, H. S., Choi, G. S., Lee, D. H. and Jo, C. 2011. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research* 18:

739–744.

- Karel, U. and Vladimír, Š. 2004. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56: 1023-1050.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science* 26: 1561–1603.
- Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S. and Meng, X. H. 2006. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64: 60–65.
- Lim, S. H., Hudson, S. M. 2004. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiberreactive group. *Carbohydr Res* 339: 313-319.
- Nattakan, S., Chandeeep, S., Saharman, G., Takashi, N. and Ton, P. 2009. All-cellulose nanocomposites by surface selective dissolution of bacterial cellulose. *Cellulose* 16: 435–444.
- Nakagaito, A. N., Iwamoto, S. and Yano, H. 2005. Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. *Applied Physics A* 80: 93–97.
- Omer, S., Salman, K., Taous, K. and Joong, K. P. 2009. Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. *Korean Journal of Chemical Engineering* 26(6): 1689–1692.
- Phisalaphong, M. and Jatupaiboon, N. 2008. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose–chitosan film. *Carbohydrate Polymers* 74: 482–488.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31: 603–632.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L. and Brittberg, M. 2005. Cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 26: 419–431.
- Tang, W., Jia Shiru Jia, Y., and Yang, H. 2010. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World Journal Microbiology Biotechnology* 26: 125–131.
- Ul-Islam, M., Shah, N., Ha, J. H., and Park, J. K. 2011. Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28: 1025–1031.
- Wu, Y. B., Yu, S. H., Mi, F. L., Wu, C. W., Shyu, S. S. and Peng, C. K. 2004. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitsoan/cellulose blends. *Carbohydrate Polymers* 57: 435–440.