ฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลส-เจลาติน จากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ *ACETOBACTER XYLINUM*

นางสาวศิริพร เต่าแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BACTERIAL CELLULOSE-GELATIN FILM FROM MICROBIAL SYNTHESIS BY *ACETOBACTER XYLINUM*

Miss Siriporn Taokaew

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

521124

Thesis Title	BACTERIAL CELLULOSE-GELATIN FILM FROM MICROBIAL SYNTHESIS BY *ACETOBACTER XYLINUM*
By	Miss Siriporn Taokaew
Field of Study	Chemical Engineering
Thesis Advisor	Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Anongnat Somwangthanaroj, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Chanchana Tangwongsan, Ph.D.)

..... External Examiner
(Sopee Sanguandekul, Ph.D.)

ศิริพร เต่าแก้ว: ฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลส-เจลาติน จากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ *ACETOBACTER XYLINUM* (BACTERIAL CELLULOSE-GELATIN FILM FROM MICROBIAL SYNTHESIS BY *ACETOBACTER XYLINUM*)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, 94 หน้า

จากคุณสมบัติที่ดีและโดดเด่นทั้งของแบคทีเรียเซลลูโลสและเจลาตินทำให้ มีการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย ในงานวิจัยนี้แผ่นฟิล์มองค์ประกอบผสมของแบคทีเรียเซลลูโลส-เจลาตินถูกพัฒนาขึ้นโดยการเตรียมที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ (ก) การเติมสารละลายเจลาตินในระหว่างการชีวสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* และ (ข) การแช่แผ่นฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลสในสารละลายเจลาตินในน้ำ แล้วจึงทำการเชื่อมขวางต่อด้วยกรดแทนนิค จากนั้นแผ่นฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลส-เจลาตินที่ได้จากทั้งสองวิธีจะถูกนำไปวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและชีวภาพ

พบว่าแผ่นฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้ค่อนข้างบาง อย่างไรก็ตามหลังจากที่เติมเจลาตินในปริมาณ 7 และ 10% w/v ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เส้นใยของแผ่นฟิล์มมีขนาดหนาขึ้น จากผลของอินฟราเรดทางโครงสร้างโมเลกุลพบว่า โมเลกุลของแบคทีเรียเซลลูโลสและเจลาตินมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่างๆ ของแผ่น มีค่าแตกต่างไปจากเดิม กล่าวคือ แผ่นฟิล์มที่ถูกปรับปรุงสามารถดูดซับน้ำได้มากขึ้น แต่มีคุณสมบัติทางกลและความเป็นผลึกลดลง โดยที่การผ่านของไอน้ำและการผ่านของออกซิเจนมีค่าไม่แตกต่างไปจากเดิม ในขณะที่เมื่อปรับปรุงฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยวิธีการแช่ โมเลกุลของเจลาตินจะตกตะกอนบนเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส จากการทดสอบด้วยอินฟราเรดทางโครงสร้างโมเลกุลพบว่า โมเลกุลแบคทีเรียเซลลูโลส และ เจลาตินมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันค่อนข้างต่ำ ดังนั้นสมบัติทางกล ความสามารถในการดูดซับน้ำ ความเป็นผลึก การผ่านของไอน้ำและการผ่านของออกซิเจน จึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากสมบัติของฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลส อย่างไรก็ตามเฉพาะแผ่นฟิล์มแบบแช่แสดงสมบัติในการต่อต้านแบคทีเรีย*Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ฟิล์มแบคทีเรียเซลลูโลสเจลาตินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต ศิริพร เต่าแก้ว
สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2552

5170631021: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING
KEYWORDS: BACTERIAL CELLULOSE/ GELATIN/ WOUND DRESSING
SIRIPORN TAOKAEW: BACTERIAL CELLULOSE-GELATIN FILM FROM MICROBIAL SYNTHESIS BY *ACETOBACTER XYLINUM*
THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., 94 pp.

Based on the advantageous and unique properties of bacterial cellulose (BC) and gelatin, those substances have many medical applications. In this study, the bacterial cellulose–gelatin (BCG) composite films were developed by two different preparation methods, (i) supplementation of gelatin during the BC biosynthesis by culture of *Acetobacter xylinum* (Biosyn) and (ii) impregnation of BC films with gelatin aqueous solution, and subsequently cross-linking them with tannic acid (Impreg). The films obtained by both techniques were then characterized for physical and biological properties.

It was found that the BC film was rather thin; however, after addition of 7 and 10% w/v of gelatin in the culture medium, the fibrils of the Biosyn-BCG films became thicker. The FTIR result indicated the intermolecular interaction between BC and gelatin. Some properties of Biosyn-BCG films were different from the BC film. For examples, the water absorption capacity was improved whereas, the crystallinity index and mechanical properties were relatively decreased, without significant changes in water vapor and oxygen transmission. In case of modification of BC film by means of Impreg method, the cross-linked gelatin molecules were precipitated on the BC fibrils. The FTIR result indicated the weak intermolecular interaction between BC and gelatin was detected. Consequently, the mechanical properties, water absorption capacity, crystallinity index, water vapor and oxygen transmission rate of Impreg-BCG films had no significant difference from those of the BC film. Nevertheless, only Impreg-BCG films showed antimicrobial activity against the growth of *Staphylococcus aureus*. Additionally, BC-gelatin film had no cytotoxic activity against Vero cells.

Department: Chemical Engineering Student's Signature Siriporn Taokaew
Field of Study: Chemical Engineering Advisor's Signature M.P.Phisalaphong
Academic Year: 2009

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to all those who gave me the possibility to complete this thesis. I am particularly grateful for the thesis advisor Associate professor Muenduen Phisalaphong to provide assistance, nice advice information and valuable supervision during the course of the thesis.

In addition, I extended my appreciation to the members of thesis examination committee, Assistant Professor Anongnat Somwangthanaroj, Assistant Professor Chanchana Tangwongsan and Dr. Sopee Sanguandekul, who provided suggestions and information, Pramote Thammarad, the institute of Research and Development of Food product, Kasetsart University for bacterial cell culture, Natural Products Research Section, National cancer institute of Thailand for skin cell proliferation analysis and Polymer Engineering Laboratory, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University for permitting the use of tensile properties testing equipment. I also thank the Thailand Research Fund (TRF) and Chulalongkorn University (RSA 5080011) for financial support.

Special thanks are extended to my family for their always support and encouragement as well as my friends in the Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES x

LIST OF FIGURES xi

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II THEORY 5

2.1 Cellulose 5

2.2 Bacterial Cellulose (BC) 6

2.3 Gelatin 9

III LITERATURE REVIEWS 18

3.1 Medical Application of BC 18

3.2 Gelatin for Wound Dressing 21

3.3 Gelatin-Carbohydrate Blends 23

3.4 Gelatin Cross-linked by Tannic Acid 25

CHAPTER PAGE

IV EXPERIMENTAL 27

4.1 Materials 27

4.2 Culture Media and Method 28

4.3 Characterizations of BC-Gelatin Film 30

4.4 Cell Study 35

V RESULTS AND DISCUSSIONS 36

5.1 Characterization of Biosynthesized BC-Gelatin Films 36

5.1.1 Morphology 37

5.1.2 FTIR Analysis 43

5.1.3 XRD Analysis 45

5.1.4 Mechanical Property 47

5.1.5 Water Absorption Capacity 50

5.1.6 Oxygen Permeability Test 51

5.1.7 Water Vapor Permeability Test 53

5.2 Characterization of Gelatin-Impregnated BC Films 55

5.2.1 Morphology 55

5.2.2 FTIR Analysis 58

5.2.3 XRD Analysis 60

5.2.4 Mechanical Property 62

5.2.5 Water Absorption Capacity 64

5.2.6 Oxygen Permeability Test 66

5.2.7 Water Vapor Permeability Test 67

5.2.8 Antibacterial Ability 68

CHAPTER PAGE

5.2.9 Antifungal Ability 71

5.3 Cell Study 72

VI CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 74

6.1 Conclusions 74

6.2 Recommendations for Future Studies 75

REFERENCES 76

APPENDIX 87

VITAE 94

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	BC producers	8
4.1	The chemicals used in this experiment	27
5.1	The oxygen transmission rate of Biosynthesized gelatin-BC films (Mean value form duplicate test) and commercial wound dressings	52
5.2	The oxygen transmission rate of Biosynthesized gelatin-BC films (Mean value form duplicate test) and commercial wound dressings	66
5.3	The antibacterial activity of BC and BC-gelatin film on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at the end of the incubation for 24 h	69
5.4	The antifungal activity of BC and BC-gelatin film on *Aspergillus niger* activity at the end of the incubation for 7 days	71

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

2.1 Structure of Cellulose 5

2.2 A comparison of microfibrillar organization between BC (a) and wood pulp (b) 7

2.3 Structure of gelatin 11

5.1 Optical photographs of BC-based films: BC (a), Biosyn-BCG1 (b), Biosyn-BCG3(c), Biosyn-BCG5 (d), Biosyn-BCG7 (e), Biosyn-BCG10 (f) and Gelatin (g) 37

5.2 SEM images of surface morphology at magnification 10,000X of BC-based films: BC(a), Biosyn-BCG1(b), Biosyn-BCG3(c), Biosyn-BCG5 (d), Biosyn-BCG7 (e) and Biosyn-BCG10 (f) 38

5.3 SEM images of cross section at 10,000X: BC (a), Biosyn- BCG1 (b), Biosyn- BCG 3(c), Biosyn- BCG5 (d), Biosyn- BCG7 (e) and Biosyn- BCG10 (f) 40

5.4 SEM images of surface morphology of: BC (a) and Biosyn-BCG10 (b) and SEM images of cross section of: BC(c) and Biosyn-BCG10(d) 41

5.5 The FTIR spectra of BC (a), Biosynthesized gelatin-BC films which were supplemented of 1%, 3%, 5%, 7% and 10% w/v of gelatin powder in culture medium (b-f), gelatin film (g) and gelatin powder (h) 44

5.6 The XRD patterns of BC (a) and Biosynthesized BC-gelatin films (b-f) 46

5.7 The tensile strength of the Biosynthesized BC-gelatin dried films (●) and reswollen films (■) as a function of gelatin concentration in culture medium. 48

5.8 The elongation at break of the Biosynthesized BC-gelatin dried films (●) and reswollen films (■) as a function of gelatin concentration in culture medium 49

5.9 The water absorption capacity of Biosynthesized gelatin-BC films as a function of gelatin concentration in culture medium 51

FIGURE PAGE

5.10 The water vapor transmission rate of Biosynthesized BC- gelatin films compared with commercial dressing 54

5.11 Optical photographs of BC-based films: BC (a), Impreg-BCG15 (b), Impreg-BCG30 (c) and gelatin films (d) 55

5.12 SEM images of surface morphology of BC (a), Impreg-BCG15 (b) and Impreg-BCG30 (c) film in reswollen form from Gelatin Impregnation method 56

5.13 SEM images of cross section of BC (a, e), Impreg-BCG15 (b, f) and Impreg-BCG30 (c, g) film in reswollen form from Gelatin Impregnation method 57

5.14 The FTIR spectra of BC (a), gelatin impregnated BC films which were immersed in 15% (b) and 30% w/w aqueous gelatin solution (c), gelatin film (d) and gelatin powder (f) 59

5.15 The XRD patterns of BC (a) and Gelatin impregnated BC films (b-c) 61

5.16 The tensile strength of the Biosynthesized BC-gelatin dried films (●) and reswollen films (■) as a function of gelatin concentration in impregnated solution 63

5.17 The elongation at break of the Biosynthesized BC-gelatin dried films (●) and reswollen films (■) as a function of gelatin concentration in impregnated solution 64

5.18 The water absorption capacity of Gelatin impregnated BC films as a function of gelatin concentration in impregnated solution 65

5.19 The water vapor transmission rate of Impregnated BC- gelatin films compared with commercial dressing 67

5.20 Inhibition tests of samples on bacteria for 24 h. incubated at 37°C 70

5.21 The growth *of Aspergillus niger* on the specimens, at 30°C at the end of the incubation 7 days 72

5.22 MTT results of viability of Vero cells on BC (control) and modified BC films 73