

**DEVELOPMENT OF WOUND DRESSING WITH ENHANCED WOUND
HEALING PROPERTIES: PREPARATION OF CHITOSAN AND SILK
SERICIN-INCORPORATED BACTERIAL CELLULOSE**

Thus La-ongnuan

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma, and
Case Western Reserve University
2013

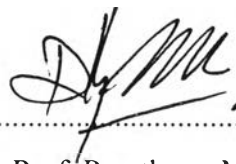
Thesis Title: Development of Wound Dressing with Enhanced Wound Healing Properties: Preparation of Chitosan and Silk Sericin-incorporated Bacterial Cellulose

By: Thus La-ongnuan

Program: Polymer Science

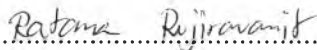
Thesis Advisor: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit

Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

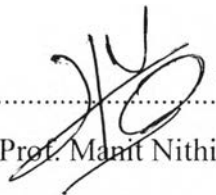


..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

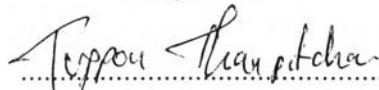
Thesis Committee:



.....
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)



.....
(Asst. Prof. Manit Nithitanakul)



.....
(Dr. Tuspon Thanpitcha)

ABSTRACT

5472005063: Polymer Science Program

Thus La-ongnuan: Development of Wound Dressing with Enhanced Wound Healing Properties: Preparation of Chitosan and Silk Sericin-incorporated Bacterial Cellulose

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit 95 pp.

Keywords: Bacterial cellulose/ Silk Sericin/ Wound dressing/ Chitosan

Chitosan and silk sericin were incorporated into bacterial cellulose pellicles in order to develop a bacterial cellulose-based wound dressing having both antimicrobial and antioxidant activities. Bacterial cellulose pellicles were produced under a static culture condition. Due to its three-dimensional non-woven nanofibrillar network structure, bacterial cellulose can provide a moist environment, therefore, promoting the wound healing process. It is known that chitosan, a chitin derivative, is a polysaccharide with antimicrobial properties while, the water-soluble protein in raw silk fibers has antioxidant properties. By incorporation of chitosan and silk sericin into bacterial cellulose pellicles, a novel wound dressing with antimicrobial and antioxidant activities could be achieved. The effect of the amount of chitosan and silk sericin incorporated into bacterial cellulose pellicles on water vapor transmission rate, and antimicrobial and antioxidant activities were investigated. Moreover, the surface and cross-sectional morphologies of the chitosan and silk sericin-incorporated bacterial cellulose were examined by scanning electron microscope. The antimicrobial activities of the samples were tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

บทคัดย่อ

ชรรศ ละอองนวล : การพัฒนาแผ่นปิดแผลเพื่อเพิ่มคุณสมบัติการรักษาบาดแผล: การเตรียมแผ่นปิดแผลจากเส้นใยแบคทีเรียเซลลูโลส ไคโตซาน และเซริซิน (Development of Wound Dressing with Enhanced Wound Healing Properties: Preparation of Chitosan and Silk Sericin-incorporated Bacterial Cellulose) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. รัตนา รุจิรวนิช 95 หน้า

งานวิจัยนี้ วัสดุนาโนคอมโพสิตชีวภาพ (Bio-nanocomposite) สำหรับการใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลโดยมีองค์ประกอบหลักเป็นแบคทีเรียเซลลูโลส ไคโตซานและเซริซินถูกพัฒนาสำเร็จ โดยแบคทีเรียเซลลูโลสซึ่งสังเคราะห์จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ในรูปของโครงสร้างสามมิติที่ไม่มีการถักทอ (3-Dimensional Non-woven Network) ซึ่งใช้เป็นวัสดุรองรับสำหรับเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผล (Wound dressing matrix) ส่วนไคโตซานและเซริซินใช้เป็นสารออกฤทธิ์ (Active ingredient agent) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตามลำดับ จากผลการทดสอบด้วย FT-IR ของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไคโตซานและเซริซินแสดงพิกเอกลักษณะของทั้งสามองค์ประกอบ คือแบคทีเรียเซลลูโลส ไคโตซาน และเซริซิน และผลพลาภิณะสถานะจาก SEM แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของไคโตซานและเซริซินเข้าไปอยู่ในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของแบคทีเรียเซลลูโลสและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และปริมาณไนโตรเจนของไคโตซานและเซริซินในแบคทีเรียเซลลูโลสมิเนวโน้มเป็นไปตามสัดส่วนของไคโตซาน/เซริซิน ซึ่งไคโตซานและเซริซินสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* และสามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากสารออกซิไดส์แรงสูง เช่น hydroxyl radical และ peroxy radical ได้ในส่วนของอัตราการซึมผ่านของไอน้ำของแบคทีเรียเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไคโตซานและเซริซินสามารถสร้างสภาวะชุ่มชื้นให้กับบาดแผลได้ โดยปริมาณการปลดปล่อยไคโตซานและเซริซินซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียและสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันตามลำดับนั้น เป็นไปตามสัดส่วนของไคโตซานและเซริซิน ในทางตรงกันข้าม ไคโตซานและเซริซินที่ยังคงอยู่ในแบคทีเรียเซลลูโลสยังสามารถกระตุ้นการผลิตคอลลาเจนและสามารถสร้างสภาวะชุ่มชื้นให้กับบาดแผลได้อีกด้วย ในการเปรียบเทียบระหว่างไคโตซานทั้ง 2 ชนิดนั้น ไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำแสดงผลการต้านเชื้อแบคทีเรียและการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าไคโตซานมวลโมเลกุลสูง ในทางกลับกัน ไคโตซานมวลโมเลกุลสูงสามารถสร้างสภาวะชุ่มชื้นให้กับบาดแผลได้ดีกว่าไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ ดังนั้นแบคทีเรียเซลลูโลสที่ประกอบด้วยไคโตซานและเซริซินสามารถใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลที่แสดงคุณสมบัติเด่นขององค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิด

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit for her sincere assistances. She gave very useful guidance, support and the great encouragement throughout this research. I would also like to extend my appreciation to the thesis examination committee, Asst. Prof. Manit Nithitanakul and Dr. Tuspon Thanpitcha for the useful suggestion and information.

I am grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College, and by the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, Thailand.

I would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University where I gained many good experiences. I greatly appreciate all professors, lecturers for the valuable knowledge and also thank to all staffs and college members for serving the convenient during stay in this college.

Finally, I would like to thank all my good friends for their friendship, helpfulness, and encouragement. I would like to give special thank to senior of my group for their help and suggest throughout this research work. Last but not least, I would like to express extreme appreciation to my family for their love, understanding, support, and encouragement. Without all of them, this work would not have been possible successful.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	ix
List of Figures	xi
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
 II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	
2.1 Wound and Type of Wound	3
2.2 Wound Healing Process	3
2.2.1 Haemostasis and Inflammation	3
2.2.2 Migration	4
2.2.3 Proliferation	4
2.2.4 Remodelling	4
2.3 Bacterial Cellulose	4
2.3.1 Cellulose	4
2.3.2 Principal Pathways to Cellulose	6
2.3.3 Cellulose Synthesis Using <i>Acetobacter xylinum</i>	6
2.3.4 Structure of Bacterial Cellulose	10
2.3.5 The Physical and Mechanical Properties of Bacterial cellulose	12
2.3.6 Bacterial Cellulose in Wound Dressing Applications	12

CHAPTER	PAGE
2.4 Chitosan	15
2.4.1 Background of Chitosan	15
2.4.2 Characteristics of Chitosan	16
2.4.3 Biomedical Application of Chitosan	
17	
2.5 Sericin	21
2.5.1 Background of Sericin	21
2.5.2 Characteristics of Silk Sericin	24
2.5.3 Biomedical Applications of Silk Sericin	25
III EXPERIMENTAL	30
3.1 Materials	30
3.2 Methodology	30
3.2.1 Bacterial Cellulose Pellicle Preparation	30
3.2.2 Sericin Solution Preparation.	31
3.2.3 Chitosan and Sericin-incorporated Bacterial Cellulose	31
3.3 Characterization and Testing	31
3.3.1 Fourier Transformation Infrared Spectroscopy (FTIR)	31
3.3.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)	32
3.3.3 Kjeldahl Analysis	32
3.3.4 Water Vapor Transmission Rate	33
3.3.5 Antioxidant Activity	33
3.3.6 Antibacterial Activity	34
3.3.7 Chitosan and Sericin Releasing Behavior	34
IV RESULTS AND DISCUSSION	36
4.1 Preparation of Bacterial Cellulose from <i>A. xylinum</i>	
Fermentation	36

CHAPTER	PAGE
4.2 Preparation of Chitosan and Sericin-incorporated Bacterial Cellulose	36
4.3 Chemical Analysis	37
4.4 Morphological Analysis	40
4.5 Amido Black 10B Staining	43
4.6 Chitosan and Sericin Content Determination	44
4.7 Water Vapor Transmission Rate	46
4.8 Antioxidant Activity	47
4.9 Antibacterial Activity	50
4.10 Chitosan and Sericin Releasing Behavior	52
 V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATION	 55
 REFERENCES	 57
 APPENDICES	 69
Appendix A Nitrogen Content of Different Chitosan/Sericin Blend Ratio in Bacterial Cellulose	69
Appendix B Antioxidant Activity of Chitosan and Sericin- incorporated Bacterial Cellulose	71
Appendix C Antibacterial Activity of Chitosan and Sericin- incorporated Bacterial Cellulose	72
Appendix D Water Vapor Transmission Rate	74
Appendix E Sericin Releasing Behavior	75
Appendix F Chitosan Releasing Behavior	85
 CURRICULUM VITAE	 95

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Bacterial cellulose producers	8
2.2	Cellulose I _α and I _β content (%) and Percent crystallinity	12
2.3	Properties of bacterial cellulose and how they relate to the properties of an ideal wound dressing materials	13
2.4	Classification for amino acid of silk sericin	23
2.5	Amino acid composition of sericin	23
A1	Raw data of nitrogen content of chitosan/sericin solution different chitosan/sericin blend ratio	69
A2	Raw data of nitrogen content of chitosan/sericin different chitosan/sericin blend ratio in bacterial cellulose	69
A3	Raw data of chitosan content in different chitosan/sericin blend ratio in bacterial cellulose	70
A4	Raw data of sericin content in NaOH solution in different chitosan/sericin blend ratio	70
B1	Raw data of antioxidant activity of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose	71
C1	Raw data of antibacterial activity of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose against <i>S. aureus</i>	72
C2	Raw data of antibacterial activity of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose against <i>E. coli a</i>	73
D1	Raw data of water vapor transmission rate of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose	74

TABLE		PAGE
E1	Raw data of sericin releasing profile of 100/0 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	75
E 2	Raw data of sericin releasing profile of 75/25 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	77
E3	Raw data of sericin releasing profile of 50/50 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	79
E4	Raw data of sericin releasing profile of 25/75 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	81
E5	Raw data of sericin releasing profile of 0/100 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	83
F1	Raw data of chitosan releasing profile of 100/0 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	85
F2	Raw data of chitosan releasing profile of 75/25 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	87
F3	Raw data of chitosan releasing profile of 50/50 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	89
F4	Raw data of chitosan releasing profile of 25/75 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	91
F5	Raw data of chitosan releasing profile of 0/100 chitosan/sericin blend ratio in acetic/acetate buffer at pH 5.5	93

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 The structural unit of cellulose.	5
2.2 Representation of inter- and intra-chain hydrogen bonding network.	5
2.3 Pathways to synthesize cellulose.	7
2.4 Pathways of carbon metabolism in <i>Acetobacter xylinum</i> .	9
2.5 Formation of bacterial cellulose.	9
2.6 TEM image of bacterial cellulose ribbon produced by a bacterial cell.	9
2.7 SEM image of a bacterial cellulose network including the bacterial cells.	10
2.8 Schematic model of BC microfibrils (right) drawn in comparison with the ‘fringed micelles’; of PC fibrils (left).	10
2.9 BC pellicle formed in static culture.	11
2.10 BC pellets formed in agitated culture.	11
2.11 The structural of chitosan.	16
2.12 The Structural of chitin.	16
2.13 Deacetylation of chitin.	16
2.14 Structure of silk.	22
2.15 Structure of primary protein.	22
4.1 Appearance of bacterial cellulose: (a) NaOH untreated-bacterial cellulose pellicle (b) NaOH treated-bacterial cellulose pellicle.	36
4.2 FT-IR spectra of pure bacterial cellulose.	37
4.3 Chemical structure of cellulose	38

FIGURE	PAGE
4.4 FT-IR spectra of chitosan	39
4.5 FT-IR spectra of silk-sericin.	39
4.6 FT-IR spectra of chitosan and silk sericin-incorporated bacterial cellulose at different chitosan/sericin blend ratio: (a) 100/0, (b) 75/25, (c) 50/50, (d) 25/75, and (e) 0/100.	40
4.7 SEM images of (c) surface (left) and (d) cross-section (right) of pure bacterial cellulose at a magnification of 10,000 and 5,000, respectively.	41
4.8 SEM images of surface (left) ($\times 5,000$) and cross section (right) ($\times 2,000$) of chitosan and silk sericin-incorporated bacterial cellulose at the different chitosan/sericin blend ratio: (c,d) 100/0, (f,e) 75/25, (h,i) 50/50, (j,k) 25/75, and (l,m) 0/100, respectively.	43
4.9 Appearances of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose after amido black 10B staining at different chitosan/sericin blend ratio: (a) 100/0, (b) 75/25, (c) 50/50, (d) 25/75, and (e) 0/100.	44
4.10 Nitrogen content of different chitosan/sericin blend ratio.	45
4.11 Water vapor transmission rate of pure bacterial cellulose and bacterial cellulose containing sericin.	47
4.12 Antioxidant activity of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose.	49
4.13 Aromatic amino acids.	50
4.14 Bacterial reduction rate of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose at various chitosan/sericin blend ratio against (a) <i>S. aureus</i> and (b) <i>E. coli</i> .	52

FIGURE		PAGE
4.15	A modified Franz diffusion cell.	53
4.16	(a) Chitosan and (b) sericin releasing profile of chitosan and sericin-incorporated bacterial cellulose in acetic/acetate buffer at pH 5.5.	54