

**PREPARATION OF ALGINATE FIBER CONTAINING
CARBOXYMETHYLATED CHITOSAN AND CHITOSAN AS
ANTIBACTERIAL AGENTS**

Ms. Wadcharawadee Noohom

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
Case Western Reserve University, The University of Michigan,
The University of Oklahoma, and Institut Français du Pétrole
2004
ISBN 974-9651-70-7

R 21616371

Thesis Title: Preparation of Alginate Fiber Containing Carboxymethylated
Chitosan and Chitosan as Antibacterial Agents
By: Ms. Wadcharawadee Noohom
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Asst. Prof. Ratana Rujiravanit
Prof. Seiichi Tokura

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

K. Bunyakiat.

College Director

(Assoc. Prof. Kunchana Bunyakiat)

Thesis Committee:

Ratana Rujiravanit

(Asst. Prof. Ratana Rujiravanit)

Seiichi Tokura

(Prof. Seiichi Tokura)

Nantaya Yanumet

(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Manit Nithitanakul

(Dr. Manit Nithitanakul)

ABSTRACT

4572026063: POLYMER SCIENCE PROGRAM
Wadcharawadee Noohom: Preparation of Alginate Fiber
Containing Carboxymethylated Chitosan and Chitosan as
Antibacterial Agents
Thesis Advisors: Asst. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Seiichi
Tokura, 78 pp. ISBN 974-9651-70-7
Keywords: Alginate / Fiber / CM-chitosan / Chitosan / Antibacterial agent

Carboxymethylated chitosan (CM-chitosan) and chitosan were used in order to introduce antibacterial property to alginate fiber. Alginate fibers modified by coating with chitosan and blending with CM-chitosan were prepared by wet spinning. The effects of chitosan coating and CM-chitosan blending on mechanical properties, morphology and antibacterial property of the modified alginate fibers were investigated in comparison with pure alginate fiber. Compared to uncoated alginate fiber, the surfaces of chitosan-coated fibers became uneven as observed by SEM. The increases in tensile strength and elongation at break were obtained by coating alginate fiber with chitosan. SEM micrographs of CM-chitosan/alginate blend fibers showed no remarkable change in surface morphology compared to that of pure alginate fiber. Blending of CM-chitosan in alginate fiber resulted in a decrease in tensile strength and an increase in elongation at break. Both CM-chitosan/alginate blend fibers and chitosan-coated alginate fibers showed antibacterial activities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as evidenced by the clear zone.

บทคัดย่อ

วัชรวัติ หนูหอม: การเตรียมอัลจินตไฟเบอร์ที่มีคาร์บอกซีเมทิลเลดเตดโคโตแซน และโคโตแซนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเป็นองค์ประกอบ (Preparation of Alginate Fiber Containing Carboxymethylated Chitosan and Chitosan as Antibacterial Agents) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. รัตนา รุจิรวนิช และ ศ. ดร. เซอิจิ โทคุระ 78 หน้า ISBN 974-9651-70-7

คาร์บอกซีเมทิลเลดเตดโคโตแซน (ซีเอ็มโคโตแซน) และโคโตแซนถูกใช้เพื่อเป็นสารยับยั้งแบคทีเรียในอัลจินตไฟเบอร์โดยการเคลือบโคโตแซนบนอัลจินตไฟเบอร์และผสมซีเอ็มโคโตแซนเข้ากับอัลจินตก่อนที่จะขึ้นรูปเป็นไฟเบอร์ อัลจินตไฟเบอร์ที่ถูกเคลือบด้วยโคโตแซนและไฟเบอร์ของสารผสมระหว่างอัลจินตและซีเอ็มโคโตแซนถูกเตรียมโดยใช้วิธีการปั่นด้ายแบบเปียก ผลของการเคลือบโคโตแซนและผสมซีเอ็มโคโตแซนต่อสมบัติเชิงกล พื้นผิว และสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียของอัลจินตไฟเบอร์ที่ถูกเคลือบด้วยโคโตแซน และไฟเบอร์ของสารผสมระหว่างอัลจินตและซีเอ็มโคโตแซนถูกศึกษาโดยเปรียบเทียบกับอัลจินตไฟเบอร์ ภาพจากกล้องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคปพบว่า พื้นผิวของอัลจินตไฟเบอร์ที่ถูกเคลือบด้วยโคโตแซนมีลักษณะขรุขระกว่าอัลจินตไฟเบอร์ จากผลของการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลพบว่า สมบัติการทนแรงดึงและค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงความยาวต่อความยาวเดิมที่จุดขาดของอัลจินตไฟเบอร์เพิ่มขึ้น เมื่อถูกเคลือบด้วยโคโตแซน ภาพจากกล้องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคปพบว่า พื้นผิวของไฟเบอร์ของสารผสมระหว่างอัลจินตและซีเอ็มโคโตแซนไม่แตกต่างกับพื้นผิวของอัลจินตไฟเบอร์ จากผลของการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของไฟเบอร์ของสารผสมระหว่างอัลจินตและซีเอ็มโคโตแซนพบว่า มีสมบัติการทนแรงดึงลดลง แต่ค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงความยาวต่อความยาวเดิมที่จุดขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอัลจินตไฟเบอร์ อย่างไรก็ตาม อัลจินตไฟเบอร์ที่ถูกเคลือบด้วยโคโตแซนและไฟเบอร์ของสารผสมระหว่างอัลจินตและซีเอ็มโคโตแซนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเอสเชอริเชียโคไลและสแตปฟีโลคอกคัสออเรียสได้ โดยสังเกตจากเคลียร์โซน

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to the Development and Promotion for Science and Technology Talents Project of Thailand (DPST) for providing the scholarship. This thesis work is partially funded by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium). The author would like to thank the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, where the author has gained the knowledge in polymer science. The author would like to express her grateful appreciation to her advisors, Prof. Seiichi Tokura and Asst. Prof. Ratana Rujiravanit, for their support, valuable suggestion and continuous encouragement throughout this research work. It is her honor and pleasure to work with both of them.

The author would like to thank Assoc. Prof. Nantaya Yanumet and Dr. Manit Nithitanakul for their kind advice and for being on the thesis committee. The author would also like to thank Surapon Foods (Public) Co., Ltd., Thailand, for kindly supplying shrimp shells and KPT Corporation, Thailand, for kindly supplying 50% (w/w) sodium hydroxide solution. The author would like to express her special thanks to all Petroleum and Petrochemical College's staff for their assistance.

Finally, the author would like to thank her friends, Ph.D. and first-year students for their helpfulness and encouragement. The author is also greatly indebted to her family for their financial support, love, and understanding during her study.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	x
List of Figures	xi
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
 II LITERATURE REVIEW	
2.1 Fiber and Fiber Production	4
2.2 Alginate and Alginate Fiber Preparation	6
2.3 Antibacterial Action of Chitosan and its Derivatives	9
2.4 <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteria	13
 III EXPERIMENTAL	
3.1 Materials	16
3.2 Equipment	16
3.2.1 Restch Sieving Machine	16
3.2.2 Capillary Viscometer	17
3.2.3 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer	17
3.2.4 UV/Visible Spectrophotometer	17
3.2.5 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry	17
3.2.6 Elemental Analysis	17
3.2.7 Scanning Electron Microscope	18
3.2.8 Atomic Absorption Spectrophotometer	18
3.2.9 Universal Testing Machine	18

CHAPTER	PAGE
3.3 Methodology	18
3.3.1 Preparation of Chitin, CM-chitin, and CM-chitosan	18
3.3.1.1 Preparation of chitin	18
3.3.1.2 Preparation of CM-chitin	19
3.3.1.3 Preparation of CM-chitosan	19
3.3.2 Characterization of Chitin	19
3.3.2.1 Degree of deacetylation of chitin	19
3.3.2.2 Viscosity-average molecular weight of chitin	20
3.3.3 Characterization of CM-chitin	21
3.3.3.1 Degree of substitution of CM-chitin	21
3.3.3.2 Viscosity-average molecular weight of CM-chitin	21
3.3.4 Characterization of CM-chitosan	22
3.3.4.1 Degree of substitution of CM-chitosan	22
3.3.4.2 Viscosity-average molecular weight of CM-chitosan	22
3.3.5 Characterization of Sodium Alginate	23
3.3.6 Fiber Spinning	23
3.3.6.1 Preparation of spinning solution	23
3.3.6.2 Spinning process	24
3.3.7 Fiber Analysis	25
3.3.7.1 Confirmation of chitosan coating	25
3.3.7.2 Calcium content	25
3.3.7.3 SEM micrographs	26
3.3.7.4 Linear density	26
3.3.7.5 Antibacterial properties	26
3.3.7.6 Mechanical properties	27
IV RESULTS AND DISCUSSION	28
4.1 Characterization of Chitin	28

CHAPTER	PAGE
4.1.1 Structural Characterization	28
4.1.2 Degree of Deacetylation	29
4.1.3 Viscosity-Average Molecular Weight	29
4.2 Characterization of CM-chitin	30
4.2.1 Structural Characterization	31
4.2.2 Degree of Substitution	31
4.2.3 Viscosity-Average Molecular Weight	31
4.3 Characterization of CM-chitosan	32
4.3.1 Structural Characterization	33
4.3.2 Degree of Substitution	34
4.3.3 Viscosity-Average Molecular Weight	34
4.4 Characterization of Sodium Alginate	35
4.5 Preparation and Characterization of CM-chitosan/alginate Blend Solution	36
4.5.1 Preparation of CM-chitosan/alginate Blend Solution	36
4.5.2 Interaction in CM-chitosan/alginate Blend Solution	36
4.6 Characterization of CM-chitosan/alginate Blend Fiber	38
4.6.1 SEM Micrographs of CM-chitosan/alginate Blend Fiber	38
4.6.2 Calcium Content in CM-chitosan/alginate Blend Fiber	39
4.6.3 Mechanical Properties of CM-chitosan/alginate Blend Fiber	39
4.6.4 Antibacterial Properties of CM-chitosan/alginate Blend Fiber	40
4.7 Characterization of Chitosan-Coated Alginate Fiber	43
4.7.1 Confirmation of Chitosan Coating	43
4.7.2 SEM Micrographs of Chitosan-Coated Alginate Fiber	45
4.7.3 Calcium Content in Chitosan-Coated Alginate Fiber	46
4.7.4 Mechanical Properties of Chitosan-Coated Alginate Fiber	47

CHAPTER	PAGE
4.7.5 Antibacterial Properties of Chitosan-Coated Alginate Fiber	48
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	52
REFERENCES	54
APPENDICES	58
Appendix A Test Results of Chitin	58
Appendix B Test Results of CM-chitin	60
Appendix C Test Results of CM-chitosan	62
Appendix D Test Result of Alginate	64
Appendix E Test Results of CM-chitosan/alginate Blend Fibers	65
Appendix F Test Results of CM-chitosan and Alginate Films	70
Appendix G Test Results of Chitosan-Coated Alginate Fibers	71
CURRICULUM VITAE	78

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Antimicrobial activities of chitosan	12
4.1 Yield of chitin production from shrimp shell	28
4.2 Yield of CM-chitin production from chitin	30
4.3 Yield of CM-chitosan production from CM-chitin	32
4.4 Calcium content in alginate and CM-chitosan/alginate blend fibers	39
4.5 Mechanical properties of alginate and CM-chitosan/alginate blend fibers	40
4.6 Antibacterial test against <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> of CM-chitosan/alginate blend fibers	43
4.7 Calcium content in alginate fibers spun through the first coagulation bath containing different chitosan concentrations	47
4.8 Mechanical properties of the alginate fibers spun through the first coagulation bath containing different chitosan concentrations	47
4.9 Antibacterial test against <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> of chitosan-coated alginate fibers spun through the first coagulation bath containing different chitosan concentrations	51

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Chemical structure of alginate	6
2.2 Egg-box model for binding of divalent cation to alginates	7
2.3 Chemical structure of chitin	10
2.4 Chemical structure of chitosan	10
2.5 Common cell structure of Gram-negative and Gram-positive bacteria	14
2.6 Cytoplasmic membrane	14
2.7 Negative charge on hydrophilic head of the phospholipid	15
3.1 Spinning apparatus	25
4.1 FTIR spectrum of chitin	29
4.2 Plot of reduced viscosity and inherent viscosity versus concentration of chitin solution	30
4.3 FTIR spectrum of CM-chitin	31
4.4 Values of reduced viscosity and inherent viscosity of CM-chitin plotted against concentrations	32
4.5 FTIR spectrum of CM-chitosan	33
4.6 ¹³ C-NMR spectrum of CM-chitosan	34
4.7 Plot of reduced viscosity and inherent viscosity versus concentration of CM-chitosan solution	35
4.8 Values of reduced viscosity and inherent viscosity of sodium alginate plotted against concentrations	35
4.9 FTIR spectra of alginate, CM-chitosan and CM-chitosan/alginate blend films with 0.5 and 1.0% CM-chitosan contents	37
4.10 SEM micrographs of (a) alginate fiber, (b) 0.5% CM-chitosan/alginate blend fiber and (c) 1.0% CM-chitosan/alginate blend fiber	38

FIGURE	PAGE
4.11 Antibacterial test against <i>E. coli</i> of (a) alginate fiber, (b) 0.5% CM-chitosan/alginate blend fiber and (c) 1.0% CM-chitosan/alginate blend fiber	41
4.12 Antibacterial test against <i>S. aureus</i> of (a) alginate fiber, (b) 0.5% CM-chitosan/alginate blend fiber and (c) 1.0% CM-chitosan/alginate blend fiber	42
4.13 UV/Visible spectra of ninhydrin-tested chitosan solutions that extracted from alginate fibers spun through the first coagulation bath containing different chitosan concentrations: (a) $2.2 \times 10^{-2}\%$, (b) $6.7 \times 10^{-2}\%$, and (c) $11.1 \times 10^{-2}\%$	44
4.14 SEM micrographs of chitosan-coated alginate fibers spun through the first coagulation bath containing different chitosan concentrations: (a) 0%, (b) $2.2 \times 10^{-2}\%$, (c) $6.7 \times 10^{-2}\%$ and (d) $11.1 \times 10^{-2}\%$	46
4.15 Antibacterial test against <i>E. coli</i> of chitosan-coated alginate fibers. Chitosan concentrations in the first coagulation bath (a) 0%, (b) $2.2 \times 10^{-2}\%$, (c) $6.7 \times 10^{-2}\%$ and (d) $11.1 \times 10^{-2}\%$	49
4.16 Antibacterial test against <i>S. aureus</i> of chitosan-coated alginate fibers. Chitosan concentrations in the first coagulation bath (a) 0%, (b) $2.2 \times 10^{-2}\%$, (c) $6.7 \times 10^{-2}\%$ and (d) $11.1 \times 10^{-2}\%$	50