

سنتز و تعیین مشخصات باکتریال سلولز با استفاده از *Acetobacter xylinum* ATCC 10245

سبا طلوعی^۱، مائده کوهی مفتخری اصفهانی^۲، سید ابراهیم علوی^۳، عظیم اکبرزاده^۴

۱- سبا طلوعی، کارشناسی ارشد، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی

۲- مائده کوهی مفتخری اصف هانی، کارشناس ارشد، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی

۳- سید ابراهیم علوی، کارشناس ارشد، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی

۴- عظیم اکبرزاده، پرفسور، تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: سلولز باکتریایی با الیافی حدود ۱۰۰ مرتبه کوچکتر از سلولز گیاهی دارای خصوصیات چوب الاستیسیته زیاد، استحکام مرطوب بالا و قابلیت تطبیقپذیری میباشد. یکی از کاربردهای عمده آن در مهندسی بافت به عنوان ماتریس خارج سلولی سه بعدی برای پیوسته نگه داشتن سلول ها و کنترل ساختار بافت و تنظیم رفتار سلولی است. این تحقیق با هدف تولید سلولز باکتریایی و بررسی مشخصات آن صورت گرفت.

مواد و روش ها: سلولز باکتریایی با کشت باکتری *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 تولید و سپس طی مراحل بعد داربست سلولزی آن ساخته شد و در این راستا خصوصیات سلولز باکتریایی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت. ریزساختارها با میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)، پیوند های تشکیل شده با طیف سنجی تبدیل فوریهی زیر قرمز (FT-IR) و ساختار کریستالی با آنالیز پراش اشعهی ایکس (XRD) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این تحقیق قطر الیاف سنتز شده متفاوت بود و از حدود ۳۰ نانومتر تا ۳۶۰ نانومتر گستردگی داشت. همچنین منافذ، اشکال متفاوتی داشتند و اندازه آن ها نیز در حدود ۱ میکرومتر به بالا بود. طول الیاف در حد میکرومتر گزارش شد. در این تحقیق مقدار سلولز تولید شده ارتباط مستقیمی با اندازه سطح محیط کشت در تماس با هوا داشت.

بحث: در این مطالعه، سلولز باکتریایی تولید شد و خواص آن مورد بررسی قرار گرفت. سلولز باکتریایی تولید شده، دارای الیافی نواری شکل و منافذی در ابعاد میکرونی بود.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این محصول قابل کاربرد در مهندسی بافت میباشد.

کلمات کلیدی: سلولز باکتریایی، *Acetobacter xylinum*، تولید، تعیین مشخصات

مقدمه

فزاینده های را به خود جلب کرده است (۸). ویژگی خاص این سلولز این است که اندازه الیافش حدود ۱۰۰ مرتبه کوچکتر از سلولز گیاهی است. این مورفولوژی نانوی بی نظیر در سطح مقطع بزرگ می تواند سبب ظرفیت بالای نگهداری آب (بیشتر از ۲۰۰ برابر وزن خشکش) و الاستیسیته ی زیاد، استحکام مرطوب بالا و قابلیت تطبیق پذیری گردد. به دلیل اندازه کوچک الیاف سلولز باکتریایی، این محصول در سیستم های ترمیم زخم و ایمپلنت های عروقی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳). علاوه بر این غشای سلولزی خشک نشده، ماده ای با

سلولز باکتریایی به دلیل ویژگی های بی نظیری مانند خواص مکانیکی جالب توجه در هر دو حالت خشک و خیس، تخلخل، جذب آب، شکل پذیری، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری بالا، توجه

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی
عظیم اکبرزاده: azimakbarzadeh1326@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱/۷

تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۳

سلولز باکتریایی تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم و محیط کشت

میکروارگانیسم مورد استفاده برای تولید سلولز باکتریایی ATCC ۱۰۲۴۵ *Acetobacter xylinum* بود که در محیط کشت مایع Hestrin-Schramm رشد داده شد. ترکیب محیط کشت Hestrin-Schramm به این صورت است: پپتون ۰/۵٪، عصاره مخمر ۰/۵٪، اسید سیتریک ۰/۱۱۵٪، Na_2HPO_4 ۰/۲۷٪، D-Glucose ۰/۲٪. با استفاده از NaOH ۱ نرمال مقدار pH برابر ۶ تنظیم گشت و سپس محیط کشت با حرارت 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید (۷).

تشکیل و جداسازی سلولز

میکروارگانیسم به مدت ۵ الی ۷ روز در انکوباتور با دمای 30°C کشت داده شد تا باکتری ها در خلال این مدت سلولز را به صورت لایه های در مرز هوا و مایع تشکیل دهند. پس از گذشت ۷ روز لایه سلولز تشکیل شده در مرز هوا و مایع با مقداری از محیط کشت خارج شده همراه آن ها جمع آوری شد و درون فالدکون هایی جهت انتقال به سانتریفوژ ریخته شد. سانتریفوژ کردن با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و محیط کشت اضافی خارج شده همراه سلولز، که در بالای آن درون فالدکون پس از سانتریفوژ شدن جمع شده بود، جدا گشت. سلولز سپس با آب دیونیزه شستشو داده شد و مجدداً سانتریفوژ گردید. بعد از انجام این مراحل، سلولز با محلول ۰/۱ مولار NaOH در دمای 90°C در بن ماری به مدت نیم ساعت قرار داده شد تا ناخالصی ها و باقیمانده های سلولی از آن جدا شوند. سپس مجدداً با آب دیونیزه شستشو و در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت یک ربع قرار داده شد و این عمل چندین بار تکرار گشت تا از خروج ناخالصی ها از آن اطمینان حاصل گردد. معیار تعداد دفعات انجام این کار در اینجا رنگ سلولز بود که پس از هر شستشو، از کدری و رنگ کرم آن کاسته شده و به سمت سفید نزدیک تر می شد (۶).

خشک کردن سلولز باکتریایی تولید شده

برای خشک کردن در Freeze-dryer، سلولز خیس درون ویال های کوچکی قرار داده شد و سپس در دستگاه گذاشته شده و خشک گردید و به شکل یک قرص پودری درون ویال در آمد. هنگام خشک کردن در خشک کن نیز سلولز مرطوب درون پلیت های کوچکی ریخته شد و پس از خشک شدن یک لایه ی بسیار نازک چسبیده به پلیت ایجاد

تخلخل نانوی بالا است که قابلیت عبور آنتی بیوتیک ها یا دیگر دارو ها به زخم را داشته و هم زمان یک سد فیزیکی موثر در مقابل هر نوع عفونت خارجی ایجاد می کند (۱). سلولز تولید شده به شکل غشای ژلاتینی می تواند به هر شکل و اندازه های بسته به روش های کشت و شرایط سنتز درآید. بر خلاف سلولز گیاهی، سلولز باکتریایی از لیگنین و همی سلولز ها عاری است، بنابراین یک بیومتریالی غیرحساسیت زاء، سلولز باکتریایی به دلیل غیرسمی و کاملاً زیست سازگار می باشد (۴). ویژگی هایش، قابلیت کاربرد در زمینه های مختلفی مثل محیط جداسازی در عملیات آب، حامل ویژه برای نگهداری مایعات باطری و سلول های سوختی، عامل مخلوط کننده، بهبود دهنده ویسکوزیته، پارچه ی مخصوص بدون پرز، وسایل نوری الکترونیکی، کاغذ ها، استریودیافراگم ها و ماتریس های تثبیت کننده پروتئین ها یا را دارد (۸). تحقیقاتی در زمینه ی ایمپلنت های مواد کروماتوگرافی دندان، گرافت های عروقی، پوشش کاتتر، غشا های دیالیز، پوشش هایی برای استنت های قلبی- عروقی، استنت های مجامع های غشا برای بازسازی هدایت شده ی بافت، جایگزینی بافت و حامل های انتشار کنترل شده دارو نیز انجام شده است (۱۶، ۱۰، ۳، ۱۰). گروه های متعددی نیز اخیراً سلولز باکتریایی را برای استفاده به عنوان رگ خونی مورد مطالعه قرار داد هاند (۳، ۱۰). همچنین سلولز خیس می تواند به طور موقت، به عنوان پوست مصنوعی در درمان سوختگی های شدید استفاده شود (۵). قابلیت های سلولز باکتریایی در بازسازی برون تنی و درون تنی برای بافت، در حال بررسی است و دورنمای روشنی را نشان داده است (۸).

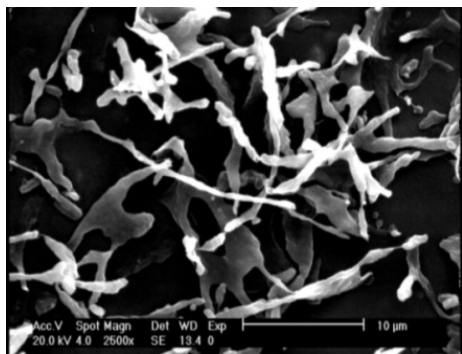
در مهندسی بافت معمولاً یک ماتریس خارج سلولی سه بعدی به کار گرفته می شود که به عنوان داربست عمل می کند و سلول ها را به صورت پیوسته نگه می دارد، تا ساختار بافت را کنترل کرده و رفتار سلول را تنظیم کند. سلولز باکتریایی یک داربست با ترکیب نانو است که از نانوالیاف سلولزی که زیست سازگاری بالا دارند، تشکیل شده است. سلولز باکتریایی به عنوان داربستی مستعد در مهندسی بافت غضروف و استخوان مطالعه شده است. لازم به ذکر است که تهیه داربست با اندازه ی ذره و منافذ مطلوب، اهمیت بالایی در مهندسی بافت دارد (۱۲).

باکتری *Acetobacter xylinum* در برخی مطالعات به منظور تولید سلولز باکتریایی مورد توجه قرار گرفت هاست. از آن جمله می توان به تولید سلولز باکتریایی با استفاده از محصولات کشاورزی و تولید آن در مقیاس بالا در بیوراکتور اشاره کرد (۱۱، ۲). با توجه به ضرورت تولید سلولز باکتریایی در داخل کشور و خلا تحقیق در این زمینه، در این مطالعه سلولز باکتریایی با کشت باکتری *Acetobacter xylinum* با ATCC ۱۰۲۴۵ انجام شده و داربست سلولزی ساخته شد و خصوصیات

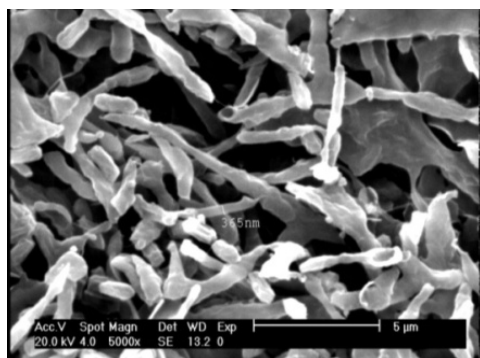
شد که شفافیت بالایی داشت (۶).

مشاهدات SEM

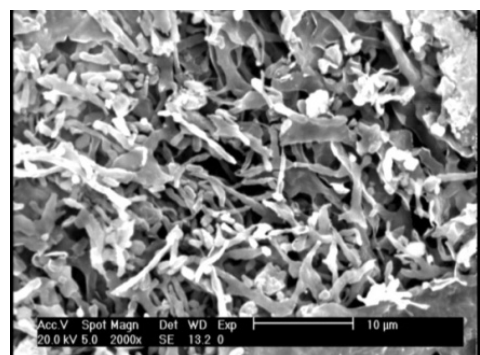
در شکل های ۲ تا ۸، تصاویر SEM گرفته شده از سلولز باکتریایی Freeze-dry شده که با میکروسکوپ الکترونی Philips XL۳۰ گرفته شده است، مشاهده می شود.



شکل ۲- تصویر SEM گرفته شده از BC در بزرگنمایی ۲۵۰۰



شکل ۳- تصویر SEM گرفته شده از BC در بزرگنمایی ۵۰۰۰



شکل ۴ - تصویر SEM گرفته شده از BC در بزرگنمایی ۲۰۰۰

طیف سنجی تبدیل فوریه ی زیر قرمز (FT-IR)

بدین منظور بر روی قرص KBr لایه ی نازکی از نمونه مورد نظر قرار داده شد. دستگاه مورد استفاده در این بخش BUKER – Equinox ۵۵ بود که با جدایی 4 cm^{-1} و 16 cm^{-1} اسکن طیف ها را ثبت می نماید. نمونه استفاده شده برای تست در این روش به صورت پودر خشک شده با Freeze-dryer بود (۹،۱۷).

مطالعات ریزساختاری با دستگاه میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM)

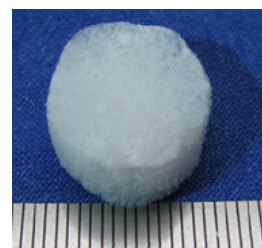
نانو ساختار تشکیل شده در سلولز باکتریایی با دستگاه Scanning Microscope XL۳۰ مورد ارزیابی و مشاهده قرار گرفت. بدین منظور از نمونه های خشک شده با Freeze-dryer به شکل پودر استفاده شد و بر روی آن ها لای های از طلا نشاندن شد و سپس درون محفظه ی دستگاه میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) قرار گرفت.

پراش اشعه ی ایکس (XRD)

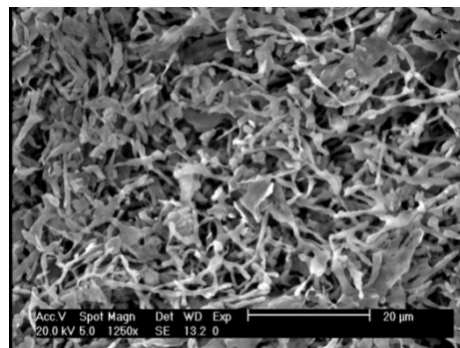
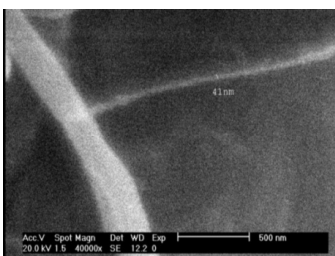
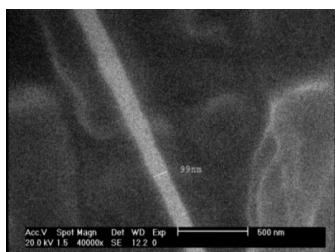
ساختار کریستالی و آمورف سلولز ساخته شده با دستگاه Philips PW ۱۱۴۰ با لامپ CuK_α با طول موج 1.54 \AA انگستروم و ولتاژ ۴۰ کیلو ولت و جریان ۳۰ میلی آمپر با فیلتر نیکل مورد بررسی قرار گرفت. در این تست، از نمونه لای های نازک قرار گرفته بر روی شیشه که در هوا خشک شده بود، استفاده شد و نمونه در محفظه ی دستگاه برای آزمایش قرار داده شد.

یافته ها

داربست سلولز باکتریایی سه بعدی با تخلخلات میکرونی، به شکل استوان های ساخته شد که در شکل ۱ مشاهده می گردد. نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده بر روی آن نیز در ادامه آمده است.



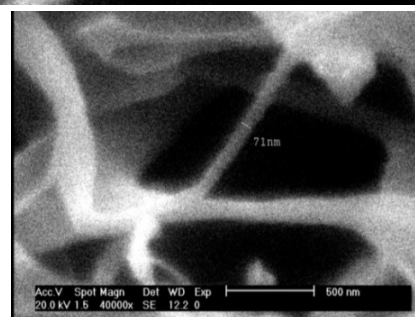
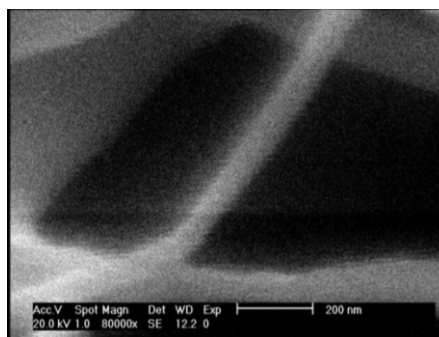
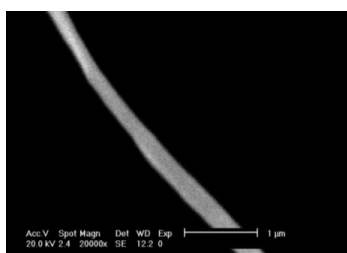
شکل ۱- داربست باکتریال سلولزی ساخته شده



شکل ۵- تصویر SEM گرفته شده از BC در بزرگنمایی ۱۲۵۰

بررسی تصاویر ۲ تا ۵ نشان می دهد که این الیاف با همدیگر برای تشکیل ساختاری متخلخل دسته می شوند. همچنین یک ساختار سه بعدی منظم قابل مشاهده است. نمونه های سلولز باکتریایی یک مورفولوژی متخلخل دارند.

شکل ۷- تصاویر SEM الیاف باکتریال سلولز تشکیل شده در بزرگنمایی ۴۰۰۰۰ با قطر ۹۹ نانومتر (تصویر بالا) و ۴۱ نانومتر (تصویر پایین)



شکل ۸- تصاویر SEM نشان داده شده از الیاف باکتریال سلولز در بزرگنمایی های ۲۰۰۰۰ (تصویر بالا) و ۴۰۰۰۰ (تصویر پایین)

قابل ذکر است که ساختار شبکه های سه بعدی سلولز باکتریایی می تواند باعث حمایت و افزایش چسبندگی سلول و تکثیر آن گردد. اندازه ی تخلخل ها در مقیاس میکرونی است که در محدوده ی مناسب هسته گذاری سلولی و رشد است. سلولز باکتریایی ساختاری با شبکه های پیچشی و نوار های الیافی زیادی است که شرایط کشت می تواند مورفولوژی نوار ها را تغییر دهد. قطر الیاف سلولزی پنبه و چوب در محدوده ی بین ۱۰۰ الی ۱۱۰ میکرومتر است و بنابراین در مقایسه با این الیاف، سلولز باکتریایی دارای ساختار بسیار ریزتری است (۱۲).

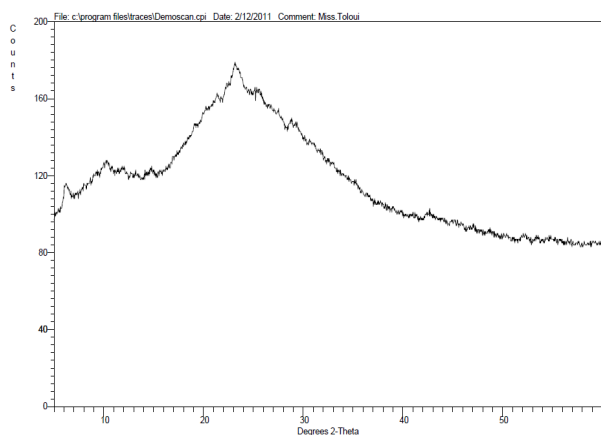
شکل ۶- تصاویر SEM گرفته شده در بزرگنمایی ۸۰۰۰۰ (بالا) تصویر و بزرگنمایی ۴۰۰۰۰ (پایین) که الیافی با قطر ۷۱ نانومتر را نشان می دهد.

همانگونه که در شکل ها نشان داده شده است، الیاف نواری تشکیل شده در این سلولز کاملاً مشخص است. قطر متوسط این الیاف متفاوت و بین ۳۰ نانومتر تا ۳۶۰ نانومتر است. منافذ این داربست سلولز باکتریایی نیز در اندازه های متغیر و نزدیک به چند میکرومتر است که این امر برای سلولز باکتریایی تولید شده جالب توجه است. طول الیاف نیز اندازه های در مقیاس میکرونی دارد.

در تصاویر SEM دیده می شود که نوار ها، برای تشکیل غشای سلولز باکتریایی در هم پیچید هاند. سلولز باکتریایی مشاهده شده با SEM

آنالیز XRD

در شکل ۱۰ نتایج این تست که بر روی نمونه ی لای های خشک شده در هوا انجام شده، نشان داده شده است. بر پایه نتایج دستگاه پراش اشعه ی X، سلولز باکتریایی تا حدی کریستالی بودن را از خود نشان داده هر چند که با توجه به شکل ۱۰ خالص سازی بیشتر نیز ممکن به نظر می رسد.



شکل ۱۰- نمودار به دست آمده از آنالیز XRD برای نمونه ی باکتریال سلولز تولید شده که در هوا خشک شده است.

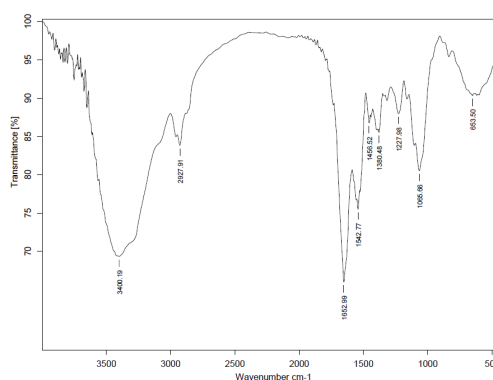
بحث

با توجه به اهمیت قابل توجه سلولز باکتریایی، مطالعات بسیاری در سطح دنیا برای تولید این محصول انجام شده است. با این حال با توجه به کمبود مطالعات در این زمینه در کشور، تولید بومی این محصول، ضروری به نظر می رسد. مطالعه انجام شده در این تحقیق، امکان تولید سلولز باکتریایی - که به لحاظ ریزساختار، کاملاً ریزتر از سلولز گیاهی است- را به کمک *Acetobacter xylinum* تایید نمود. محصول تولید شده به وسیله این باکتری دارای شفافیت مناسب بود. نکته ی قابل توجه در آزمایشات انجام گرفته که به صورت آزمون و خطا به آن پی برده شد و در سایر تحقیقات انجام شده اشاره ای به این قضیه نشده است، این بود که مقدار سلولز تولید شده ارتباط مستقیمی با اندازه ی سطح محیط کشت در تماس با هوا داشت. هر چه سطح تماس کوچک تر بود (مانند سطح تماس دایر های شکل اسلنت) سلولز تولید شده مقدار کمتری داشت و با افزایش سطح تماس محیط کشت با هوا (کشت باکتری در فلاسک با شکل مکعب مستطیل و سطح تماس مستطیل شکل بزرگ)، تولید سلولز بیشتر بود. در این حالت آخر حتی حجم کمتری از محیط کشت در ظرف ریخته می شد اما چون سطح در تماس با هوا زیاد بود، سلولز بیشتری هم تولید می گشت. این

تفاوتی را در ظاهر سطوح خارجی و داخلی لایه ها نشان می دهد. سطح بیرونی، دسته های بی نظمی از الیاف را دارد در حالی که سطوح داخلی منظم هستند.

نتایج آزمون FT-IR

سلولز یک پلی ساکارید است و مشخصه اصلی طیف آن به خاطر گروه های متعدد OH در ساختارش است. جذب بسیار قوی و بسیار پهن در 3400 cm^{-1} به خاطر ارتعاش کششی گروه های OH است. شایان ذکر است که وجود گروه OH مذکور، سبب ایجاد خصوصیات آب دوستی شدید در داربست سنتز شده می گردد. جذب قوی در ناحیه 1065 cm^{-1} مربوط به کشش باند های فراوان C-OH و C-O-C در ساختار است و باند جذبی شدید در 1652 cm^{-1} مربوط به گروه کربوکسیل است. جذب در 2927 cm^{-1} نشانگر پیوند C-H است. نمودار این طیف سنجی در شکل ۹ نشان داده شده است.



شکل ۹- نمودار طیف سنجی تبدیل فوریه ی زیر قرمز برای باکتریال سلولز ساخته شده

در جدول ۱ خلاص های از این طیف برای سلولز آورده شده است:

جدول ۱- نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه ی زیر قرمز برای سلولز باکتریایی ساخته شده

Wave Number ^{-1}cm	پیوند مربوطه
۳۴۰۰	پیوند کششی ارتعاشی O-H، پیوند هیدروژنی بین مولکول ها
۲۹۲۷	پیوند کششی ارتعاشی C-H از حلقه ی شکر
۱۶۵۲	پیوند کششی ارتعاشی (-CONH-)
۱۴۵۶/۵۲	پیوند کششی ارتعاشی C-H
۱۰۶۵	پیوند کششی ارتعاشی (C-O-H و C-O-C) از حلقه ی شکر

ایجاد فرصت های شغلی متعدد، حائز اهمیت است.

سیاسگزاری

تمامی مراحل آزمایشگاهی در بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتوپاستور ایران انجام شد. بدینوسیله از تمامی همکاران گرامی تقدیر و تشکر به عمل می آید.

امر احتمالاً به دلیل دسترسی بیشتر باکتری ها به اکسیژن و تبادل راحت تر اکسیژن است.

سلولز باکتریایی تولید شده با استفاده از باکتری استوباکتر زایلینوم با ATCC ۱۰۲۴۵، دارای الیافی نواری شکل با قطر های ۳۰ نانومتر به بالا بود و اندازه های منافذ هم بزرگتر و در ابعاد میکرونی بود که این امر برای مهندسی بافت سلولز باکتریایی حائز اهمیت است زیرا در کشت سلولی، منافذ با ابعاد بزرگ و میکرونی موجود در داربست، برای چسبندگی و تکثیر و فعالیت های سلولی مناسب هستند. قابل ذکر است که ساختار شبکه های سه بعدی نانوی سلولز باکتریایی می تواند باعث حمایت و افزایش چسبندگی سلول و تکثیر آن گردد. اندازه ی تخلخل ها در مقیاس میکرونی است که در محدوده ی مناسب هسته گذاری سلولی و رشد است. سلولز باکتریایی ساختاری با شبکه های پیچشی و نوار های الیافی زیادی است که شرایط کشت می تواند مورفولوژی نوار ها را تغییر دهد. قطر الیاف سلولزی پنبه و چوب در محدوده ی بین ۱۰۰ الی ۱۱۰ میکرومتر است و بنابراین در مقایسه با این الیاف، سلولز باکتریایی دارای ساختار بی نظیر و بسیار ریزتری است (۱). باکتریال سلولز شبکه های سه بعدی دارد که مقادیر زیادی آب را در خود نگه می دارد و عبور مواد مغذی را تسهیل می کند. Bodin عقیده دارد سطوح صاف باعث بهبود چسبندگی و تکثیر سلول ها می شود. ساختار متخلخل و شبکه ی الیافی باز از مزایای رشد درونی برای سلول ها هستند. در تصاویر SEM دیده می شود که نوار ها، برای تشکیل غشای باکتریال سلولزی بسیار در هم پیچید هاند که در هماهنگی با سایر مطالعات انجام شده است (۱۵). مشاهدات SEM نشان می دهد که باکتریال سلولز خشک شده با تکنیک Freeze-dryer توزیع اندازه ی منافذ یکنواخت و زیاد دارد که این نکته در سایر منابع نیز تایید شده است (۱۵) طراحی و ساخت مواد هیبریدی از سلولز باکتریایی تولید شده در این کار با دیگر سلولز ها و میکروبیال سلولز ها و بیوپلیمر ها پیشن هاد می گردد. ریزساختار سلولز باکتریایی حاصل شده در این کار به مراتب ریزتر و مطلوب تر از سلولز گیاهی است و این مسئله از مزایای ذاتی سلولز باکتریایی می باشد. سلولز باکتریایی تولید شده در این کار آمورف بود که این مورفولوژی، احتمالاً به مکانیزم رشد حین فعالیت باکتریایی بر می گردد (۱).

نتیجه گیری

به طور کلی با در نظر گرفتن خصوصیات سلولز باکتریایی تولید شده و مقایسه آن با سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه، می توان نتیجه گرفت سلولز باکتریایی مناسب تولید شده است که این مسئله به لحاظ خلا تحقیقاتی موجود در این زمینه در کشور و ارز آوری قابل توجه و

منابع

- (1) Cai Z, Kim J. Preparation and Characterization of Novel Bacterial Cellulose/Gelatin Scaffold for Tissue Regeneration Using Bacterial Cellulose Hydrogel. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, 2010;1(2): 021002.
- (2) Chao Y, Ishida T, Sugano Y, Shoda M. Biotechnology and Bioengineering. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnol Bioeng*, 2000;68(3):345-352.
- (3) Charpentier PA, Maguire A, Wan WK. Surface modification of polyester to produce a bacterial cellulose-based vascular prosthetic device. *Applied Surface Science*, 2006;252 (18):6360-6367.
- (4) Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM Jr. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 2006;27(2):145-1451.
- (5) Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC, Gallotti BJ, de Souza SJ, Narcisco GP, Bichara JA, Farah LF. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1990; 24-25:253-64.
- (6) Gao C, Wan Y, Yang C, Dai K, Tang T, Luo H, Wang J. Preparation and characterization of three-dimensional nanostructured macroporous bacterial cellulose/agarose scaffold for tissue engineering. *Journal of Porous Materials*, 2011;18(5):545-552.
- (7) Gao C, Wan Y, Yang C, Dai K, Tang T, Luo H, Wang J. Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold. *Journal of Porous Materials*, 2011;18(2):139-145.
- (8) Hui J, Yuanyuan J, Jiao W, Yuan H, Yuan Z, Shiru J. Potentiality of Bacterial Cellulose as the Scaffold of Tissue Engineering of Cornea. Paper presented at the 2nd international Conference on Biomedical Engineering and Informatics, Tianjin, China, 17- 19 October 2009.
- (9) Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesis cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci*, 2001;26:1561-1603.
- (10) Klemm D, Udhardt U, Marsch S, Schumann D. BASYC- Bacterial Synthesized Cellulose: Miniaturized Tubes for Microsurgery. *Polymer News*, 1999;24:377-379.
- (11) Kongruang S. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 2008;1(1):763-774.
- (12) Li J, Wan Y, Li L, Liang H, Wang J. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering*, 2009;29:1635-1642.
- (13) Millon LE, Mohammadi H, Wan WK. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res*. 2006;79(2):305-311.
- (14) Sokolnichi AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL. Permeability of bacterial cellulose membranes. *J Membr Sci*, 2006;272:15-27.

- (15) Tang W, Jia S, Jia Y, Yang H. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010;26(1):125-131.
- (16) Wan WK, Millon LE. Poly(vinyl alcohol)-bacterial cellulose nanocomposites. US Patent 2005037082 A1,16,2005.
- (17) Wan YZ, Hong L, Jia SR, Huang Y, Zhu Y, Wang YL, Jiang HJ. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2006;66(11-12):1825-1832.