

## 表面パターン転写で疎水性を付与した 酢酸菌産生セルロースナノファイバーシートの創製

九州大学バイオアーキテクチャーセンターおよび大学院生物資源環境科学府 富田陽子・辻 翼・近藤哲男

### Fabrication of Microbial Cellulose Nanofiber Network Sheets Hydrophobically Enhanced by Introduction of a Heat-printed Surface

Yoko Tomita, Tsubasa Tsuji, and Tetsuo Kondo

Bio-Architecture Center & Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,  
Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

**Abstract :** *Acetobacter xylinum*, a Gram-negative bacterium, secretes a cellulose nanofiber into the culture medium, and thereafter the individual secreted nanofibers are assembled to form a 3D network structure as termed “pellicle.” The pellicle has unique properties including high water retention ability, biocompatibility, high strength and so on. Therefore, a hydrophobic cellulose nanofiber network sheet was attempted to be fabricated by heat-pressing of metal molds having a micro pattern in order to open further pathways of the pellicle towards potentially versatile materials. From the contact angle measurements, a heating condition at 130°C for 24 hours was the optimal condition for the treatment. ESCA analyses indicated that the increase in hydrophobicity was due to introduction of the ether bonds on the surface. Furthermore, a structural hydrophobic effect such as “Lotus effect” on this sheet was examined by introduction of micro-lattice patterns onto the surface. Finally, the synergistic effect of the heating and micro-patterning was examined. The surface of the sheet was more hydrophobic when the two effects were combined together. This successful method could be generally extended for bio-based materials to provide nano/micro structures with a surface hydrophobic property.

(Received 13 November, 2008 ; Accepted 8 December, 2008)

#### 1. 緒 言

セルロースはグルコピラノース環が $\beta$ -1,4結合した天然高分子である。セルロースは主に樹木の成分として知られているが、微生物によっても産生される。酢酸菌 *Acetobacter xylinum* (= *Gluconacetobacter xylinus*) はセルロースナノファイバーを産生する微生物として研究されている代表的な細菌である。酢酸菌は、幅 0.5-1 $\mu$ m 長さ 2-10 $\mu$ m 程度の円柱状の桿菌で、培地中の糖類を炭素源として用い、菌体表面の長軸方向に一系列に 50-100 個存在するセルロース合成酵素複合体[1]から、菌体外へセルロースマイクロフィブリルを産生する。このマイクロフィブリルは凝集し、幅 40-60nm、厚み 10nm のリボン状のセルロースナノファイバーを形成する。これをマイクロビアルセルロース(MC)と呼ぶ。酢酸菌は偏性好気性菌であり、静置培養条件下では液体培地の気-液界面でこのセルロースナノファイバーによる三次元ネットワーク構造を有するゲル状膜(ペリクル)を形成する。これは食品では“ナタデココ”と呼ばれる。

MC は生分解性、生体適合性、高結晶性、低熱膨張性等の様々な性質を有している。これらの性質を利用して、

創傷被覆材[2-4]、細胞培養足場[5-7]、電子ペーパー[8]、スピーカーコーン[9]、分離膜[10,11]、コンポジット材料[12-14]など様々な応用がMCペリクルに関して模索されている。MCペリクルのシート材料化を検討する場合、寸法安定性や表面の性質の安定性が重要と考えられる。ペリクルを構成するセルロースナノファイバー(MC)は上記のように高結晶性で低熱膨張性であり、強度や熱的寸法安定性は有していることから、さらに濡れに対する表面寸法安定性が向上すれば機能材料として新たな展開が期待される。

セルロースの分子構造において、構成単位であるグルコピラノース環のC-H結合はグルコピラノース環に対して垂直なアキシアル結合であり、全てのOH基はグルコピラノース環に対して平行なエクソトリアル結合である。このことから、セルロース分子の垂直方向はC-H結合に由来する疎水性、水平方向はOH基に由来する親水性を示す[15]。このようにセルロースは分子中で親水部分と疎水部分が局在しており、親水部のみが表面に配列した場合、その表面張力は42mN/m(高分子素材中最も親水性)となり、疎水部のみが表面に配列した場合、その表面張力は19.8mN/m(テフロン並の疎水性)となることが計算さ

れている[16]. つまり, 表面に露出しているセルロース分子の親水部分と疎水部分の配列や集合形態を変化させる, もしくは物質表面のセルロース分子の親水部分が疎水部分のどちらかの性質を変化させると, その分子集合体全体の性質も大きく変化することになる.

分子レベルでの疎水化に加えて, 表面のさらなる疎水化のために着目すべきは「ハスの葉効果」[17]に代表されるパターン構造による効果である. ハスの葉効果とは, ドイツの Barthlott らによってはじめて報告された自浄効果である. この効果はハスの葉が超撥水性を有しているためとされる. ハスの葉の表面は, ワックスのナノ/マイクロスケールの凹凸構造を有していることが分かっており, 疎水性物質が特定のパターン構造を有することによって, さらに疎水性を向上させることを示唆している.

本研究では, 上記の分子レベルならびにマイクロパターン構造の疎水化効果をふまえ, ナタデココから疎水表面を有するシートを複雑な化学反応や表面改質法を用いることなく簡便に製造することを目的にした. そのため, シート状 MC ペリクル表面の熱処理を検討し, さらに熱転写による表面へのマイクロサイズのパターン導入に起因する疎水効果を検討した. すなわち, この調製で得られるマイクロ構造の中にナノファイバーネットワーク由来のナノ構造が存在するナノ/マイクロ構造を有する疎水表面を形成することで, 一種のハスの葉効果を期待した. このように, 熱処理によるセルロース分子の化学構造変化とセルロースシート表面のマイクロパターン構造変化を同時に行うという分子およびマイクロサイズの効果の相乗効果による疎水化法を検討した.

## 2. 実験

### 2.1 マイクロビアルセルロース(MC)ペリクルの調製

Shramm-Hestrin(SH)液体培地中にて3日程度静置して酢酸菌(ATCC53582)の前培養を行った.  $15 \times 10 \times 5$  cmのポリプロピレン製の滅菌容器中にSH液体培地[18]を300ml調製し, その中に前培養した菌を3ml接種し, インキュベーター中で $30^{\circ}\text{C}$ , 2週間静置培養した. 培養後, 培養液表面から厚さ約1cm程度のゲル状膜のMCペリクルが得られた. このMCペリクルを超純水中に投入し, 攪拌しながら数日間水交換を繰り返すことにより, 残存するSH培地を除去した. さらに, 0.1%(w/w)NaOH水溶液中で $80^{\circ}\text{C}$ で4時間攪拌を行い, タンパク質と水洗で除ききれなかったSH培地の残存物を除去した. 最後に, NaOH処理後の試料を精製するため, 超純水中で攪拌しながらpHが中性付近になるまで水交換を行った.

### 2.2 MCシートの調製

得られたMCペリクルを大きさ $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ の正方形に切り, 鏡面加工を行ったナイロン樹脂製の型枠( $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ )の中に入れ, 上から同じ材料, 大きさと鏡面処理が施されたブロックをかぶせることによりはさみこんだ.

プレス機(テスター産業社製卓上型テストプレス SA-303)を用いて, ブロックごと徐々に圧縮し, MCペリクル中に存在する水の除去を行った. この時の最大圧力を, それぞれ5, 10, 15MPaに設定し, 保持時間を1時間及び24時間とした. 圧縮後, 試料をブロックから外し, これを超純水で湿らせて柔らかくしたのち, 二軸延伸器に固定し, ひずみや収縮が起こらないように緊張乾燥させて, シートを調製した. このシートをここではMCシートと呼ぶことにする. MCシートの厚さはマイクロメーター(ミツトヨ株式会社製 MDC-25M)を用いて測定した. 測定は, 各試料10回以上行った.

## 2.3 MCシートの疎水化における最適温度の検討

### 2.3.1 MCシートの疎水化

2.2で調製されたMCシートをサイズ $1\text{cm} \times 8\text{cm}$ の短冊形に切り出し, 温度条件をそれぞれ105, 130, 150, 170,  $190^{\circ}\text{C}$ と設定した通風乾燥機中で放置した. この際の処理時間をそれぞれ3, 6, 12, 24, 48時間とした. ただし,  $105^{\circ}\text{C}$ は絶乾状態の試料として処理は3時間のみ行った.

### 2.3.2 接触角による疎水性の評価

室温 $20^{\circ}\text{C}$ , 湿度65%の恒温恒湿室にて, 2.3.1で得られた試料表面に内径 $0.17\text{mm}$ の針を装着したシリンジから蒸留水を $1\mu\text{l}$ 滴下させ, 1秒放置した後, 接触角測定装置(協和界面科学株式会社 FACE自動接触角計 CA-Z型)を用いて $\theta/2$ 法にてそれぞれの試料の接触角を測定し, シート表面の疎水性を評価した. 測定は各試料10回以上行った.

## 2.4 原子間力顕微鏡(AFM)を用いたシート表面の観察

AFM(島津製作所製 SPM-9500J3)を用いて, 2.3で調製された試料表面の構造を大気中にて観察した. カンチレバー(Olympus社製 OTR8)は, 曲率半径 $20\text{nm}$ 未満, 円錐角 $35^{\circ}$ , バネ定数 $0.15\text{N/m}$ のものを使用した. 観察条件は, スキャン範囲 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ , スキャン速度 $1\text{Hz}$ とし, コンタクトモードで測定し, デジタル画像としてtifファイルにて保存した. これを装置内臓のデータ処理ソフトウェアでの画像解析に供した.

## 2.5 X線光電子分析装置(ESCA)を用いたシート表面の元素分析

ESCA(ULVAC-PHI q600/3057-XPS)を用いて2.3で調製された試料表面の元素分析を行った. 測定は, X線源としてモノクロ $\text{AlK}\alpha$ 線を用い,  $0.8\text{mm}\phi$ の分析面積に対しパスエネルギー $160\text{eV}$ (Wide scan),  $20\text{eV}$ (Narrow scan)で傾斜角度 $75^{\circ}$ を保ち, 中和銃を使用して行った. 測定は各試料5回ずつ行った.

## 2.6 シートの力学試験

シートの強度は, 引張試験機(東洋精機社製 STROGRAPH E-S)を用いて検討した. 試験片の大きさは $50\text{mm} \times 5\text{mm}$ とし, 引張速度 $5\text{mm/min}$ にて試験を行い, 引張弾性率と破断伸びを算出した. 比較対照として汎用合成高分子素材のポリプロピレン(PP)およびポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムも同様の測定に供した. 測定は各試料5回以上行った.

## 2.7 マイクロパターンの転写による MC シート表面の疎水化

3種類の金型(3cm×3cm×1cm)として、フラットおよび2種類の格子状で凸部が300および500 $\mu\text{m}$ 四方、凹部が幅300 $\mu\text{m}$ のパターンを有するものを作製した(Fig.1:プロデュバイス社製)。2.2で得られた未加熱のMCシート表面に、プレス機を用い130 $^{\circ}\text{C}$ で1MPaの圧力で上記の金型を押し当てることでパターンを熱転写した。転写はそれぞれ1, 3, 6, 12, 18, 24時間行った。また、コントロールとして、室温のまま同様の条件下、格子状のパターンを転写した。

得られたシート表面の疎水性の評価は2.3.2と同様に行った。

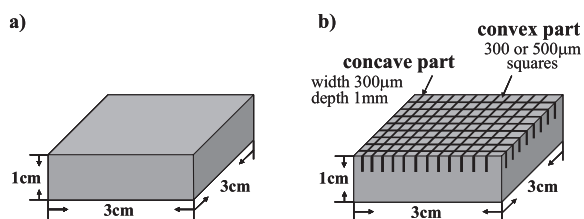


Fig. 1 Patterns of the mold : a) flat surface, and b) two kinds of lattice patterned molds.

## 3. 結果と考察

### 3.1 MC シートの調製

MCペリクルならびにその圧縮により得られたMCシートをFig. 2 a, bに示す。厚さ約1cmの膜状のMCペリクルから、厚さ70 $\mu\text{m}$ 程度のプラスチック様のMCシートが調製された。MCシート表面のAFM像(Fig. 2c)より、圧縮後もナノファイバーのネットワーク構造は保たれていることが示された。圧縮圧力と時間を変化させて調製した各MCシートの厚さ変化をFig. 3に示す。まず同じ圧縮圧の時間経過にともなう厚みの減少を比較すると、時間の経過とともに必ずしも厚みが顕著に変化することはなかった。また、検討した条件では、圧縮の際の圧力と時間にそれほどシートの厚さは依存しておらず、ほぼ60-85 $\mu\text{m}$ の値を示した。すなわち、シートの厚さは圧縮する前のMCペリクルの厚さに依存することが示唆された。圧縮によるシートのネットワーク構造の変化を観察するため、AFMを用いてFig. 3の条件で調製したシート表面を観察した(Fig. 4)。圧縮の際の圧力や保持時間に対し、表面形態に著しい変化はみられず、二乗平均粗さ(RMS)にも大きな変化はなかった。以上のことから、シート調製に際して、圧縮条件ではなく圧縮する前のMCペリクルの状態、すなわち構成するセルロースナノファイバーの太さや絡まり具合によって形成されるネットワークの状態がシート表面の構造やシートの厚さに大きく影響するものと推定された。

### 3.2 MC シートの疎水化

MCペリクルは高含水率であることが知られているため、

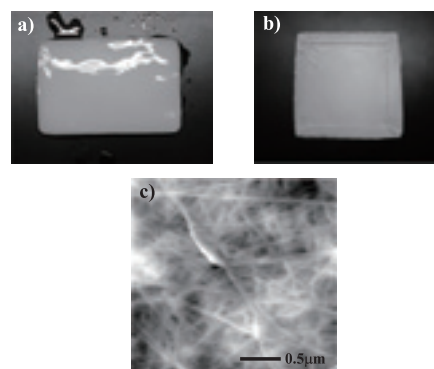


Fig. 2 Prepared MC pellicle and the MC sheet prepared from a). a) MC pellicle, b) MC sheet, and c) AFM image of the surface of a MC sheet.

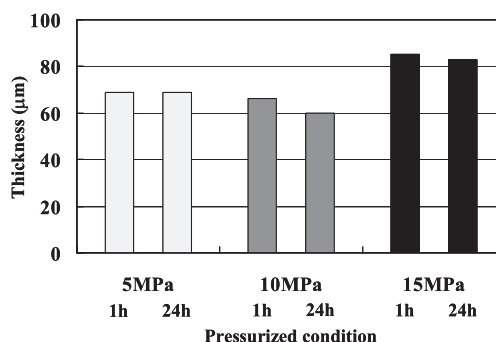


Fig. 3 Thickness of MC sheets depending on the press conditions.

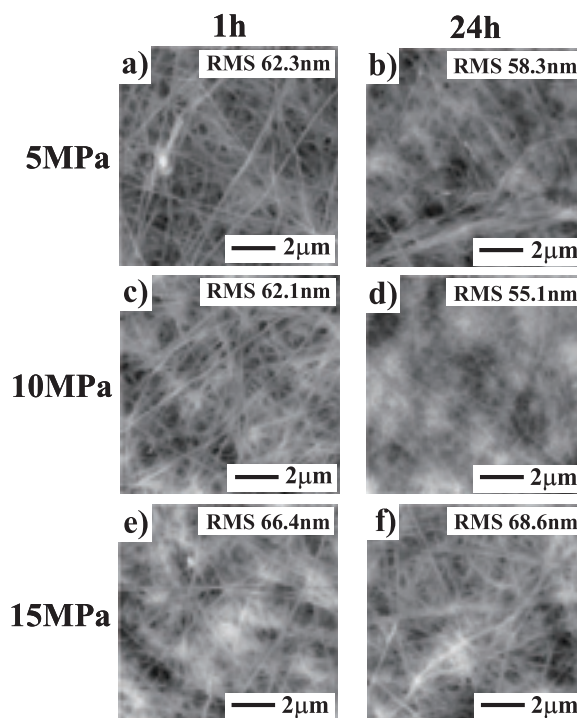


Fig. 4 Surface morphology of MC sheets under various pressurized condition corresponding to those of Fig.3. (a : 5MPa 1h, b : 5MPa 24h, c : 10MPa 1h, d : 10MPa 24h, e : 15MPa 1h, and f : 15MPa 24h)

圧縮した後も依然として水分の吸着が強いものと考えられる。そこでMCシート表面の疎水化を検討するために、脱水する目的で熱処理を行った。各温度での熱処理時間を変化させた時の接触角を Fig. 5 に示す。Fig. 5 より明らかなように、どの処理温度と比較しても 130°C 処理の際の接触角は最大を示した。また、加熱各温度 130, 150, 170°C

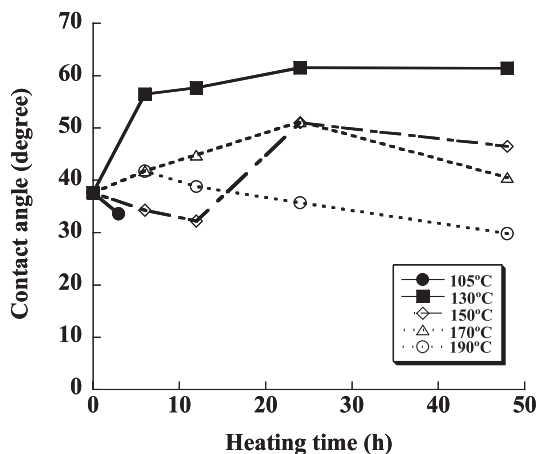


Fig. 5 Dependence of contact angles of MC sheets on the heating time for the preparation.

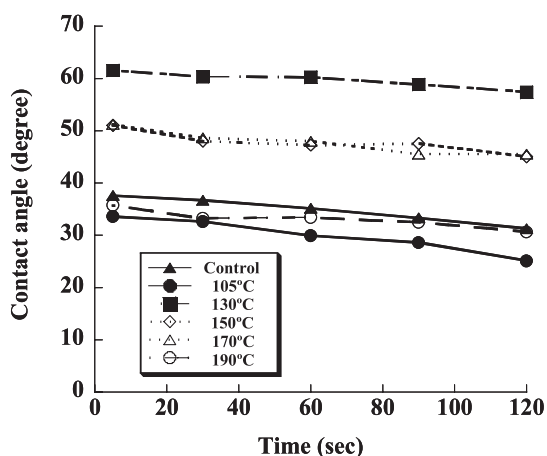


Fig. 6 Successive changes of contact angles of MC sheets prepared under various heating temperatures for 24 hours.

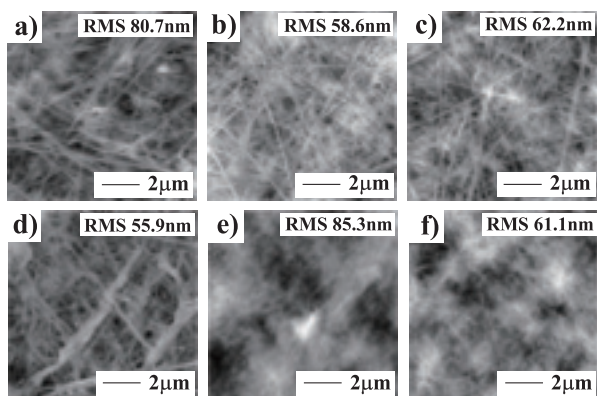


Fig. 7 Surface morphology of MC sheets at various heating temperatures for 24 hours. (a: control, b: 105°C, c: 130°C, d: 150°C, e: 170°C, f: 190°C)

において、処理時間が24時間のとき接触角が最大になった。さらに、処理温度の上昇に伴って接触角が小さくなった。また、絶乾条件である 105°C, 3 時間では接触角は小さくなった。加熱温度 190°C では、処理時間 6 時間のときわずかに接触角は大きくなったが、処理時間の延長に伴い接触角は小さくなった。これらのことにより、加熱温度 130°C がシートの疎水化に最も適しているものと推察された。この試料の特徴については、後述の AFM 像, ESCA の結果で述べる。

次に、24 時間加熱処理した各試料について、液滴滴下後の接触角の継時変化を Fig. 6 に示す。全ての試料において緩やかに約 5° 接触角が単調に減少したことから、表面の疎水化の度合いに関わらず、シートを構成するセルロースナノファイバーネットワーク中への水の浸透速度はほぼ一定であると推察された。そこで Fig. 7 に示すように、各温度で 24 時間加熱を行ったときのシート表面を、AFM を用いて観察した。Fig. 7 a)~d) においてファイバーの太さや密集状態などのシート表面のネットワークパターンは類似していたが接触角は異なっており、RMS の数値にもばらつきがみられ、接触角と表面粗さの関係性は見出せなかった。また、e) と f) は a)~d) と比較してネットワーク構造中のファイバーが細く、密に存在しているという違いがみられるものの、RMS の数値は a)~d) と大きな違いはなく、接触角と表面粗さの関係性も見出せなかった。接触角が最大を示した c) は、1 本 1 本のファイバーがランダムに三次元網目状に張った状態で存在していた。さらに 130°C 処理を施した c) は、低い接触角を示した a), b) とファイバーの太さやネットワークパターンが類似していたが、a), b) と同程度の接触角を示した f) とは全くネットワークパターンが類似していなかった。これらのことは、MC シートの疎水化が、セルロースナノファイバーの太さや密集状態というネットワーク構造に起因するというよりもむしろ、ナノファイバー自体の化学的改質に依存することを示唆している。

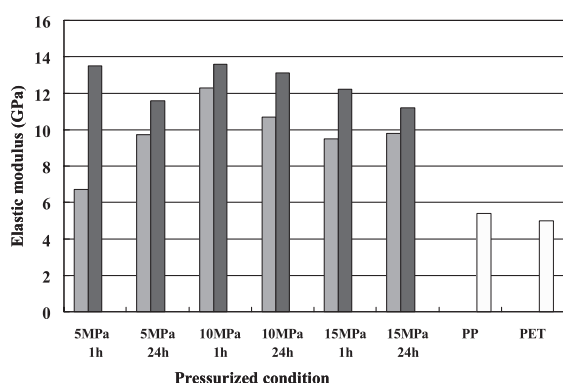
また、加熱処理を行ったサンプルの色は、加熱温度が上昇するに従って乳白色から褐色へと変化した。このことは、加熱によってセルロースの化学構造に変化を生じた可能性を示唆した。そこで、シート表面の元素分析を ESCA を用いて行った。C1s と O1s の強度比(O/C)の変化を Table1 に示す。未加熱のコントロールに比べ、加熱によって O1s が相対的に増加したことが示された。加熱による O1s の増加する要因として、脱水によるエーテル結合の形成と酸化によるカルボニル基の形成が考えられた。カルボニル基は親水基であるため、試料の接触角が大きくなったことに矛盾する。したがって、本加熱条件では、脱水によりエーテル結合の形成が促進され、それが試料表面の水酸基の減少による疎水化を導いたものと考えられた。傍証として通風状態での加熱から、酸化が起こりにくくなると考えられる真空状態での加熱へと加熱条件を変化させて熱処理を行った。通風状態での加熱で調製



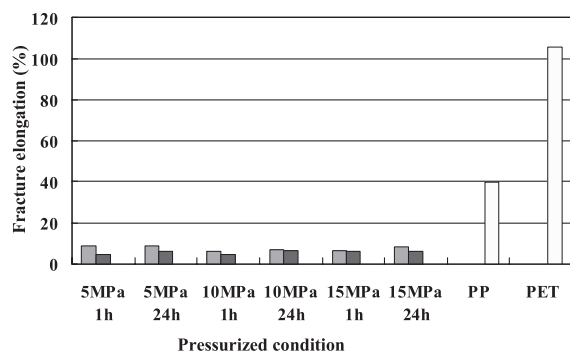
されたサンプルと比較して、真空中 130℃、24 時間処理後の試料の接触角は大きくなった(データ未掲載)。このことも酸化による効果より脱水によるエーテル結合形成による疎水性の向上の可能性を支持している。ここで、一般に MC は 95% 以上の結晶化度を有しているため、セルロースの分子構造や結晶構造を考慮するとこのエーテル結合は、ファイバー表面の結晶内で分子鎖中の隣り合うグルコース環の C6 位と C2 位の水酸基間の分子内水素結合あるいは分子鎖間のグルコース環どうしの C6 位と C

**Table 1** Comparison of Oxygen/Carbon (O/C) ratio based on ESCA analysis depending on the heating conditions in the preparation of MC sheets.

O/C	
Control	1.471
105 °C	1.707
130 °C	1.785
150 °C	1.734
170 °C	1.784
190 °C	1.856



**Fig. 8** Comparison of the elastic modulus of MC sheets and synthetic polymer films before and after heating at 130°C. (left bar : before heating, right bar : after heating for 24hrs)



**Fig. 9** Comparison of the fracture elongation of MC sheets and synthetic polymer films before and after heating at 130°C. (left bar : before heating, right bar : after heating for 24hrs)

2 位および C3 位の水酸基間での分子間水素結合部分で形成されるものと推定される。

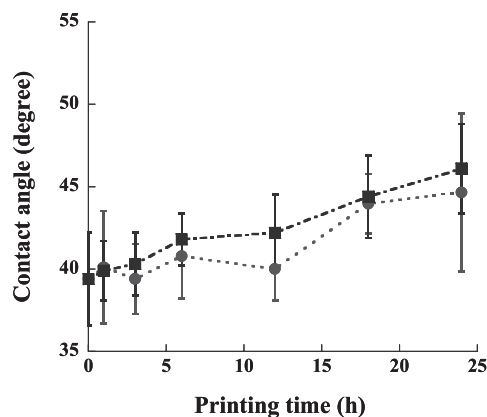
### 3.3 MC シートの力学的性質

Fig. 8 に各圧縮条件で調製された試料の 130℃ で熱処理前後の弾性率, ならびに Fig. 9 に破断伸度を示す. 汎用合成高分子である PP 及び PET フィルムと比較して, 130℃ での加熱, 未加熱に関わらず MC シートの弾性率は著しく高かった. しかも, 加熱処理を行うことにより, MC シートの弾性率は向上した. 一方, 破断伸度は汎用合成高分子と比較して著しく小さく, 加熱を行うとさらに小さくなった. これらの結果と Fig. 7 の AFM 像から明らかのように, 産生時のセルロースナノファイバーの強固なネットワーク構造が MC シートの力学的性質に大きく作用しているものと考えられた. そのため, 圧縮後の MC シートは弾性率, 破断伸度のいずれにおいても, 加熱および圧縮条件に依存した違いは見られなかったと推定される. これらのことは, 圧縮および 130℃ での加熱により疎水化 MC シートへと変換され, しかも高弾性率で形状固定されたシートへ変換されたことを示している.

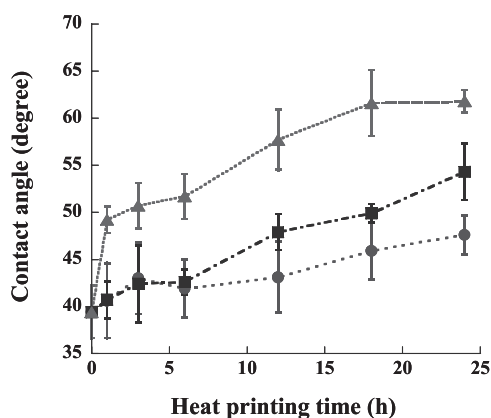
### 3.4 疎水化パターンニング MC シートの調製

緒言で述べたように, 疎水化には「ハスの葉効果」に代表される表面構造を形成させる手法もある. そこで, 表面への格子型のマイクロパターン形成のみによる MC シートの疎水化効果を検討するため, 室温下でマイクロサイズの格子パターンをシート表面に転写した. Fig. 10 に示すように, 転写時間が増加するにつれて接触角は緩やかに上昇した. これは転写時間の延長により金型が MC シート表面から深く入りこみ, 転写面と非転写面の高低差の増加をもたらし, 表面粗さを大きくした結果によるものと考えられた. すなわち, マイクロサイズのパターンの表面粗さを大きくすることで, 水滴とシート表面との接触面積が減少し, 疎水化が向上するものと推定された.

次に, 130℃ で金型のパターンを熱転写することによる



**Fig. 10** Dependence of contact angles of micro-patterned MC sheets on the printing time of the 3D lattice patterns without heating. ■ : 500µm squares lattice, ● : 300µm squares lattice



**Fig. 11** Dependence of contact angles of MC sheets on the heat printing time of the 3D patterns at 130°C. ▲: flat pattern, ■: 500µm squares lattice pattern, ●: 300µm squares lattice pattern.

MCシートの疎水化の向上を検討した。熱転写時間に伴うMCシートの接触角の変化をFig. 11に示す。Fig. 10と比較して、パターンの転写効果より、熱による接触角上昇への寄与が大きいと考えられた。このことは3.2の項に述べたように、熱処理にともなう表面のセルロース分子中へのエーテル結合導入の効果がより大きいことを意味する。接触角の経時変化は3.2の項と同様な減少を示したことから、シートへのパターンの転写によりもたらされる水の浸透速度の変化は小さいと考えられた。また、同じ処理条件では、フラットパターンを熱転写したMCシートが最も高い接触角を示した。しかし、熱転写によって生じる疎水面の面積比は、300µm四方の格子パターン転写:500µm四方の格子パターン転写:フラットパターン転写=1:1.5:3.8とフラットパターンの転写面積が最も大きい。このことを考慮すると、凹凸パターンを熱転写した方が単位面積あたりの疎水化度は高くなっていることになる。さらに、格子サイズを大きくしたところフラットパターンを超える接触角を示した(データ未掲載)。以上の結果から、パターンを転写した後にシート全面の熱処理を130°Cで24時間行うことが最も疎水性を向上させる方法であると考えられた。

#### 4. 結論

酢酸菌の産生するセルロースナノファイバー(マイクロビアルセルロース:MC)が3次元ネットワーク化したペリクル(=ナタデココ)の基板としての応用展開を目的に、圧縮と熱処理およびパターン熱転写という非常に簡便な疎水化方法を検討した。MCペリクルを圧縮してシート状にする際、調製されるシートの厚さや表面粗さは圧縮条件に依存するというよりもむしろ、構成するセルロースナノファイバーの太さや、存在形態に影響を受けることが示唆された。疎水性、弾性率等の検討の結果、加熱条件として、130°C、24時間処理が最もシートの疎水化に適し

ていた。このとき、セルロース分子内及び分子間で脱水によるエーテル結合が生じたことによって疎水化が起こったことがESCAによる表面分析から示唆された。

疎水性をさらに向上させるためにハスの葉の表面構造を模倣してMCシートの表面にパターン転写を行った。加熱せずにパターンのみを転写した場合の接触角の上昇程度に比べ、加熱しながらパターン転写を行った場合のほうが接触角は大きく上昇した。このことは、表面構造の変化よりも加熱によるセルロース分子の構造変化の効果が疎水化に大きく寄与していることを示す。

さらにフラットパターンと格子型パターンの熱転写において、疎水面の単位面積あたりの接触角の上昇を比較すると、格子型パターンの熱転写の方が疎水化の効率は良好であった。これらのことから、格子型パターンを非加熱で転写した後に、シート表面を全面加熱することにより表面のマイクロ構造変化とセルロースの分子構造変化の両者の相乗効果をもたらす、さらに疎水性が向上したMCシートが調製される可能性が示唆された。

#### 謝辞

ESCAの測定についてご指導いただきました静岡大学教育学部総合科学教室の澤渡千枝教授、合成高分子フィルムをご提供くださいました東洋紡績株式会社へ厚く御礼申し上げます。

#### 文献

1. A. Hirai, H. Horii, *Sen'I-Gakkaishi*, **59**(5), 9 (2003).
2. W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, and R. M. Brown Jr., *Biomaterials*, **27**, 145 (2006).
3. W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown Jr., *Biomacromolecules*, **8**, 1 (2007).
4. D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer, N. Hebler, M. Hornung, H-P. Schmauder, and S. Marsch, *Adv. Polym. Sci.*, **205**, 49 (2006).
5. A. Svensson, E. Nicklasson, T. Harrah, B. Panilaitis, D. L. Kaplan, M. Brittberg, and P. Gatenholm, *Biomaterials*, **26**, 419 (2005).
6. G. Helenius, H. Bäckdahl, A. Bodin, U. Nannmark, P. Gatenholm, and B. Risberg, *J. Biomed. Mater. Res.*, **76A**, 431 (2006).
7. K. Watanabe, Y. Eto, S. Takano, S. Nakamori, H. Shibai, and S. Yamanaka, *Cytotechnology*, **13**, 107 (1993).
8. J. Shah and R. M. Brown Jr., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 352 (2005).
9. Y. Nishi, M. Uryu, S. Yamanaka, K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, and S. Mitsuhashi, *J. Mater. Sci.*, **25**, 2997 (1990).
10. H. Shibazaki, S. Kuga, F. Onabe, and M. Usuda, *J. Appl.*

- Polym. Sci.*, **50**, 965 (1993).
11. L. K. Pandey, C. Saxena, and V. Dubey, *Sep. Purif. Technol.*, **42**, 213 (2005).
  12. L. E. Millon and W. K. Wan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **79B**, 245 (2005).
  13. H. Maeda, M. Nakajima, T. Hagiwara, T. Sawaguchi, and S. Yano, *J. Mater. Sci.*, **41**, 5646 (2006).
  14. L. Hong, Y. L. Wang, S. R. Jia, Y. Huang, C. Gao, and Y. Z. Wan, *Mater. Lett.*, **60**, 1710 (2006).
  15. T. Kondo, In : A. Isogai (ed.), “*Seruro-su no Kagaku*”, Asakura-Syoten, Tokyo, p.83 (2003).
  16. T. Yamane, In : A. Isogai (ed.), “*Seruro-su no Kagaku*”, Asakura-Syoten, Tokyo, p.162 (2003).
  17. W. Barthlott and C. Neinhuis, *Planta*, **202**, 1 (1997).
  18. S. Hestrin and M. Schramm, *Biochem. J.*, **58**, 345 (1954).