

키토산-전해질 콤플렉스

손태원 · 이광순

1. 서론

고분자 콤플렉스 (polymer complex)는 두 개 또는 그 이상의 상호 보완적인 전하를 띠는 고분자의 조합에 의해서 형성된다. 이러한 콤플렉스는 정전기적인 힘, 소수성 상호작용, 수소결합, 반데르발스힘 등 여러 힘의 조합에 의해서 일어난다. 이들 힘에 의한 콤플렉스 형성을 **그림 1**에 나타내었다. 고분자의 긴사슬로 인하여, 상호보완적인 반복단위가 모여 세그먼트 콤플렉스를 형성하고, 이렇게 모인 많은 반복단위가 자유도의 손실 없이 쉽게 회합한다. 그러므로 콤플렉스 과정은 서로 반대전하를 가지는 이온들 간의 상호작용이라고 할 수 있다. 콤플렉스의 형성 여부는 고분자의 용해도, 고분자 용액의 레올로지, 전도도, 탁도 등에 영향을 받고, 고분자계의 기계적성질, 투과성, 전기 전도성은 형성된 콤플렉스에 의해 크게 영향을 받는다. 콤플렉스를 형성하는 상호작용의 성질에 따라서 hydrogen-bonding complexes, polyelectrolyte complexes (PEC), stereocomplexes 또는 charged-transfer complexes로 분류된다.^{1,2} 고분자 콤플렉스의 매커니즘과 성질은 고분자 사슬에 양이온과 음이온의 전하분포비, 중화도, 유연성, 작용기 구조, 전하밀도, 입체규칙성, 상용성에 의존한다. 또한, pH, 이온세기, 농도, 혼합비, 온도와 같은 반응조건에 의해서도 성질이 변한다. PEC는 멤브레인, 인공보형물, 정전기방지 코팅제, 응집제, 침전제, 약물전달시스템, 단백질 분리 등에 사용된다. 이러한 PEC를 다당류와 같은 천연고분자를 이용하여 만들면 비독성, 생체적합성이라는 추

가적인 이점도 가지게 된다. 본 고에서는 키토산이 가지는 아미노기가 다른 고분자나, 산과 콤플렉스를 형성할 수 있다는 데에 착안하여 여기에 관한 대략적인 소개를 하고자 한다.

2. 키토산-전해질 콤플렉스 (Chitosan-electrolyte complex)

2.1 키토산 (Chitosan)



손태원

1976 서울대학교 섬유공학과 (학사)
1978 영남대학교 섬유공학과 (석사)
1980~1984 서울대학교 섬유공학과 (박사)
1982~1994 KIST 고분자 연구부
1985~1985 일본 섬유고분자 재료연구소
1985~1993 객원연구원
1993~1994 University of Akron
1994~1994 객원연구원
1994~현재 영남대학교 섬유패션학부
정교수



이광순

1997~2003 영남대학교 섬유공학부
(학사)
2003~현재 영남대학교 섬유패션학부
석사과정

Chitosan-electrolyte Complex

영남대학교 섬유패션학부 (Tae Won Son and Kwang Soon Lee, School of Textiles, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea) e-mail: twson@yu.ac.kr, soon@yu.ac.kr

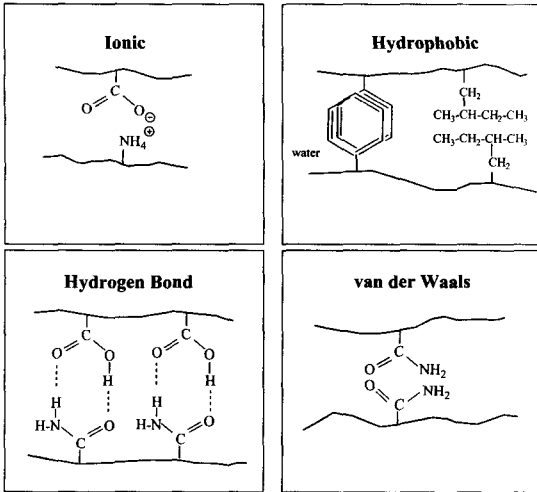


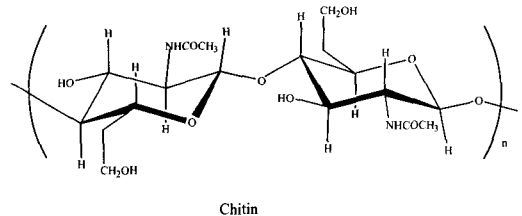
그림 1. Four fundamental attractive interactions in the biological nature.

키토산 (Chitosan)은 게, 새우, 가재 등의 갑각류의 껍질과 오징어 뼈, 곰팡이, 버섯류, 및 세균 등의 미생물의 세포벽에 함유되어 있는 키틴 (Chitin)을 고온, 강알칼리의 조건 하에서 탈아세틸화 (Deacetylation) 함으로써 얻어지는 다수의 아미노기를 가지는 천연 다당체열의 고분자이다. 이러한 키틴은 지구상에서 천연고분자 물질 중 셀룰로오스 다음으로 그 생산량이 풍부한 천연 고분자 물질이다. 그러나 키틴은 아세틸 아미노기가 분자간 수소결합을 하여 강한 결정구조를 형성하기 때문에 대부분의 유기용매에 대한 용해성이 좋지 않아 화학반응과 성형반응의 곤란 등의 이유로 사료에 첨가하는 것 외에는 오랫동안 쓸모없는 것으로 버려져 왔다. 그러나 1970년부터 시작된 새로운 생리활성 물질을 찾는 과정에서 키틴의 다양한 용도가 밝혀지면서 여러 가지 유도체와 응용방법이 일본, 미국 및 유럽 등에서 활발하게 진행되고 있다. 그 유도체 중의 하나가 키토산이다. 키토산은 구조 중에 아민기 (NH_2)를 포함하고 있기 때문에 쉽게 양이온화 (NH_3^+)하여, 음이온을 띠는 다른 고분자나 산들과 콤플렉스를 형성할 수 있다. 키토산은 생체적합성과 생분해성이 우수하며, 세포의 결합 및 생체 조직배양, 항균성, 항취성, 무독성, 지혈작용 등의 생체학적 특성이 있는 것으로 알려져 있다.³ 이런 우수한 성질을 가지는 키토산을 상처치료용 bandage, artificial tissue, gauze 등의 다공성의 생체재료에 사용되며, 이러한 것은 상처 분비물을 흡수하고, 치료를 촉진하며, 세포배양 시 구조물을 제공한다. 또한, 수술용 봉합사, 지혈제, 인공피부, 인공

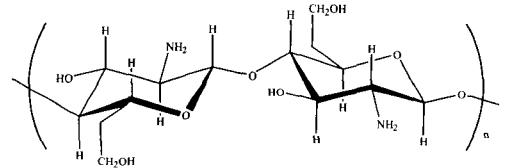
혈관 등의 의료용 및 섬유와 제지산업, 생명공학, 농업, 식품, 화장품, 폐수처리제, 복합재료 등의 산업용으로 널리 사용되는 기능성 천연고분자 물질이다. 이런 키틴과 키토산의 구조를 그림 2에서 나타내었다.

2.2 키토산-관능성기를 갖지 않는 산과의 콤플렉스

관능성기를 가지지 않는 산으로는 초산, 개미산, 묽은 염산, 황산 등이 있다. 이러한 산은 키토산과의 콤플렉스를 형성하면서 키토산을 용해시키는 역할을 한다. 그림 3에서 이렇게 형성된 콤플렉스 구조를 보이고 있다.

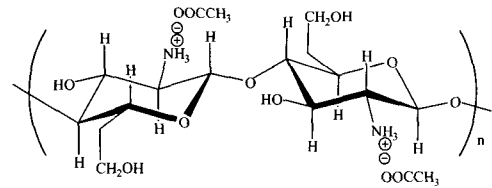


Chitin

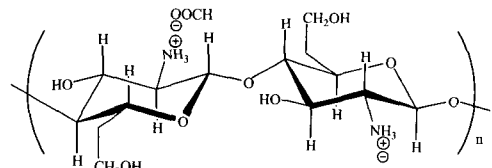


Chitosan

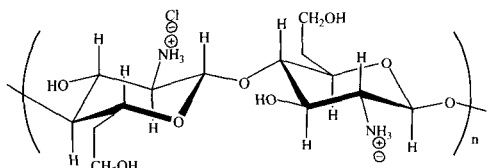
그림 2. Structure of chitin and chitosan.



chitosan-actinic acid complex



chitosan-formic acid complex



chitosan-hydrochloric acid complex

그림 3. Chitosan-general acid complexes.

2.3 키토산-관능성기를 갖는 산과의 콤플렉스

먼저 관능성기를 가지면서 키토산과 콤플렉스를 형성하는 산의 종류에는 살리실산 (salicylic acid), 락트산 (lactic acid), 니코틴산 (nicotinic acid), 아세틸살리실산 (acetylsalicylic acid), 4-히드록시벤조산 (4-hydroxy benzoic acid), 피루빈산 (pyruvic acid), 마노산 (hippuric acid), 아스코르브산 (ascorbic acid), 레불린산 (levulinic acid), 숙신산 (succinic acid), 감마-히드록시부틸산 (γ -hydroxybutyric acid) 등이 있다. 이같이 관능성기를 갖는 산과 키토산이 콤플렉스를 형성하여 관능성기를 가지는 산의 특성과 키토산의 특성을 이용하여 의료 분야, 식품분야, 화장품 분야 등 다양한 분야에 적용될 수 있을 것이라 생각된다. **그림 4**에서 살리실산, 아스피린, 젯산과 키토산에 의해서 형성된 콤플렉스 구조를 나타내고 있다.

2.4 키토산-고분자 콤플렉스

키토산은 천연고분자로서 폴리음이온을 띄는 카르복시메틸셀룰로오스 (carboxymethylcellulose),⁴ 알긴산 (alginic acid),⁵ 텍스트란 술페이트 (dextran sulfate),^{6,7} 카르복시메틸덱스트란 (carboxymethyl-dextran),⁸ 헤파린 (heparin),⁹ 카라기닌 (car-

rageenan),¹⁰ 펙틴 (pectin),¹⁰ 크산 (xanthan),^{11,12} 리소자임 (lysozyme),¹³ 리그노설포네이트 (ligno-sulfonate),⁵⁵ 천연고분자와 다양한 고분자전해질 콤플렉스를 형성할 수 있다. **표 1**에서는 키토산과 콤플렉스를 형성할 수 있는 고분자들에 대해서 나열하였다. **표 2**에 나오는 고분자들은 사슬 내에 키토산과 콤플렉스를 형성할 수 있는 반응성기를 가지고 있기 때문에 쉽게 키토산과 콤플렉스를 형성할 수 있다. 하지만, 반응성기를 가지지 않는 고분자는 키토산과 콤플렉스가 형성되지 않는데, 콤플렉스를 형성시키기 위해서는 반응성기를 도입해야 한다. 그 방법 중에 하나가 고분자를 개질시키는 것인데, 그 예로 poly(ethylene glycol) (PEG)를 개질시켜 키토산과 콤플렉스 시키는 것이다. PEG는 키토산과 반응성을 가지지 않기 때문에 콤플렉스를 형성하지 못한다. 따라서 키토산과 PEG를 콤플렉스를 시키기 위해서는 PEG를 개질시켜야 하는데, 개질시키는 방법으로는 PEG를 succinic anhydride와 반응시켜 PEG에 산기가 도입된 새로운 PEG-monosuccinate를 만든다. 이렇게 만들어진 PEG-monosuccinate 용액과 키토산이 반응하여 콤플렉스 새로운 키토산-PEG-monosuccinate 콤플렉스가 형성된다. 그 모

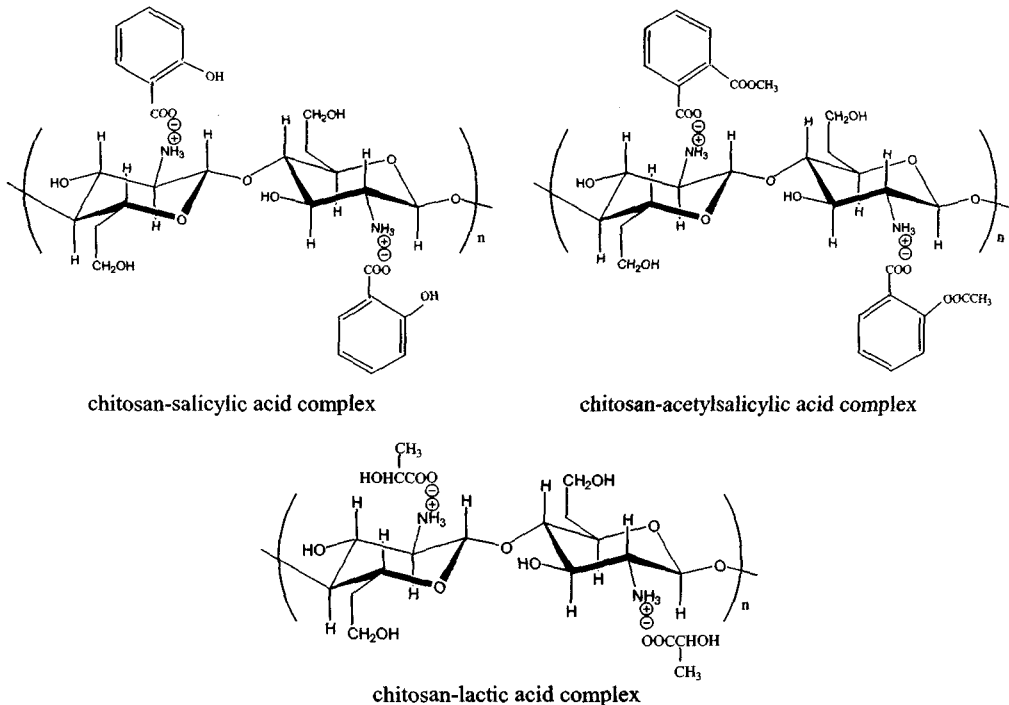
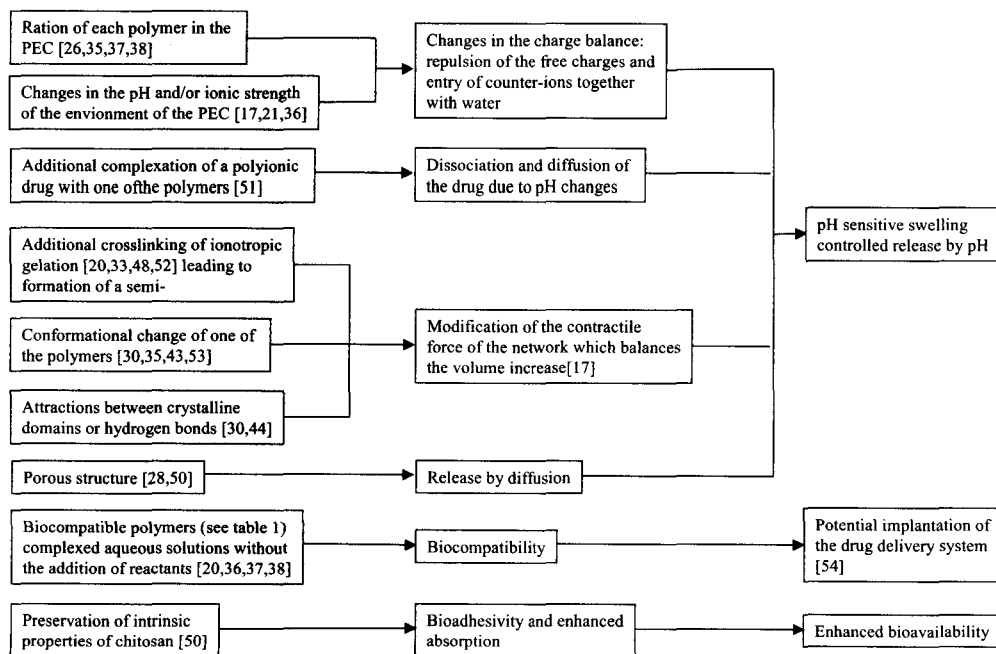


그림 4. Structures of chitosan-acid with functional group complexes.

표 1. Polyelectrolytes forming polyelectrolyte complexes with chitosan.

Chemical class	Polyelectrolyte	Acidic group	Complex type	Ref.
Polysaccharide	Acacia	-COO ⁻	Precipitate	[14]
	Alginate	-COO ⁻	Hydrogel, microparticles with Ca ²⁺	[15, 16]
	<i>K</i> -carrageenan	-OSO ³⁻	Precipitate, hydrogel with NaCl	[17, 18]
	Chondroitin sulfate	-COO ⁻ -OSO ³⁻	Hydrogel	[19]
	Carboxymethyl-cellulose	-COO ⁻ -OSO ³⁻	Precipitate, hydrogel with Al ³⁺	[20, 21]
	Chitin derivatives bearing negative charges	-COO ⁻ -OPO ³⁻	Hydrogel, film	[22]
	Dextran sulfate	-OSO ³⁻	Precipitate, hydrogel with NaCl	[17, 23]
	Gellan gum	-COO ⁻	Spherical droplets	[24]
	Heparin	-OSO ³⁻	Precipitate	[25]
	Hyaluronic acid	-COO ⁻	Precipitate	[19]
	Pectine	-COO ⁻	Hydrogel, film, microparticles with Ca ²⁺	[26, 27]
	Xanthane	-COO ⁻	Hydrogel	[28,29]
	Xylan	-COO ⁻	Hydrogel, film, microparticles with additional crosslinking	[30,31]
Protein	Collagen	-COO ⁻	Precipitate, film	[32, 33, 34]
	α -Keratose	-COO ⁻	Precipitate	[35]
Synthetic polymer	PAA	-COO ⁻	Precipitate	[36, 37, 38, 39]
	Polyphosphoric acid	-OPO ³⁻	Microparticles	[40]
	Polyphosphate	-OPO ³⁻	Microparticles	[41]
	Poly(L-lactide)	-OPO ³⁻	Porous matrices	[42]

* *Euro. J. Phar. Bio.*, **57**(1), 19-34 (2004).



* *Euro. J. Phar. Bio.*, **57**(1), 19-34 (2004).

표 2. Essential properties of polyelectrolyte complexes containing chitosan used in controlled release systems. ⁴⁸⁻⁵⁰

식도가 **그림 5**에서 나타난다.

3. 키토산-고분자전해질 하이드로겔

PEC는 서로 상반되는 전하를 가지는 고분자 전해질의 반응에 의해서 만들어진다. **그림 6**에서는 수분과 전하밀도가 높은 친수성 환경에서의 이온들의

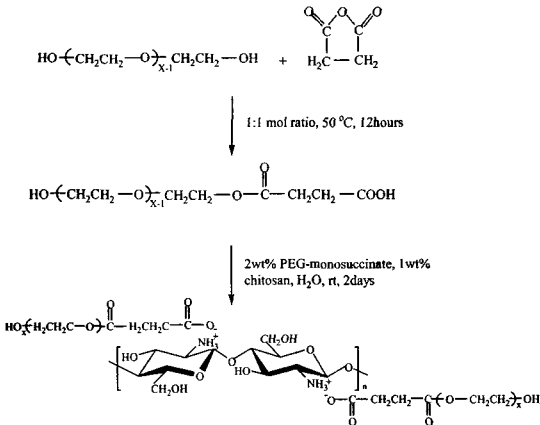
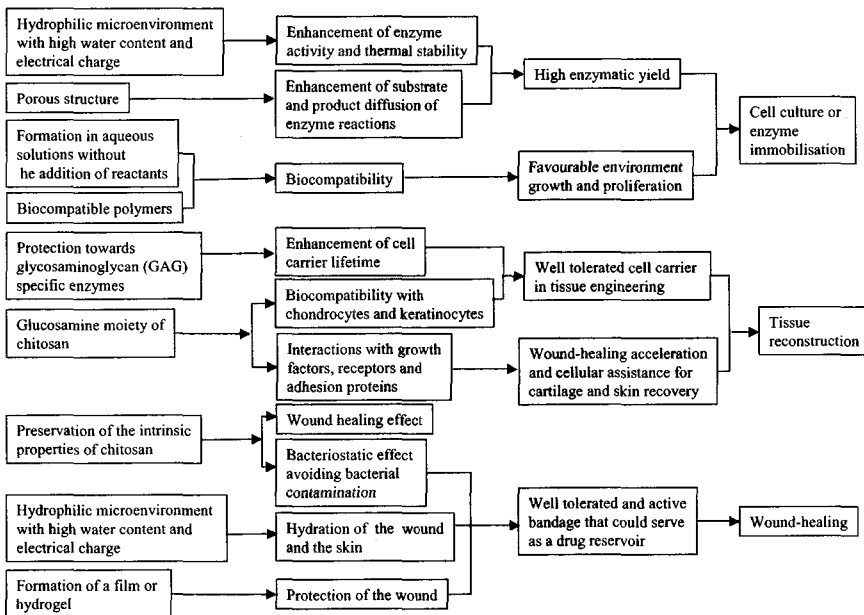


그림 5. Synthesis of Chitosan and PEG-monosuccinate.

상호작용에 의해서 형성된 네트워크 구조를 보여주고 있다. 이들은 모두 산성 조건에서나 염기성 조건 하에서 자극-감응하여 팽윤하는 것을 볼 수 있다. 이는 중성조건에서 고분자들끼리 콤플렉스를 형성하고 있다가, pH가 변하면서 두 고분자 사이의 상호작용도가 변하면서 콤플렉스가 해리되어 그 사이로 물이 침투하여 팽윤이 일어난다. 키토산의 아미노 양이온과 다른 고분자 전해질의 음이온 사이의 정전기적 상호작용이 PEC를 형성하는 주요결합력이다. 이 결합은 다른 이차적 결합력보다 더 강한데, 예를 들어 키토산/폴리비닐알코올이 콤플렉스를 형성할 때의 결합력이나 그라프트된 키토산이 화합할때의 결합력 보다 더 강하다. Xylan의³⁰ 결정영역 또는 hydrogen과 아미드결합⁴⁵ 사이에서 일어나는 부가적인 이차적 결합이 키토산과 다른 고분자에서 일어날 수 있다. 키토산은 벌크한 피라노이즈 고리를 가지면서 입체 규칙성 구조를 띄기 때문에 강직하다. 여기에 유연한 구조를 가지는 고분자 전해질 α -keratose, PAA, xylan, collagen 등을 콤플렉스 시키면 PEC가 형성되면서 유연한 구조를 가지는 고분자 전해질에서 형태학적 변화가 일어날 수 있을 것이다.

PEC는 조건의 적절한 선택에 의해서 변화 될 수 있는 팽윤성과 방출성 때문에 약물전달시스템 (drug

표 3. Essential properties of polyelectrolyte complexes containing chitosan used in enzyme immobilisation, tissue reconstruction or wound healing.



* Euro. J. Phar. Bio., 57(1), 19~34 (2004).

delivery system, DDS) 으로 사용되어 질 수 있는데, 표 2에서는 PEC가 약물전달시스템으로 사용될 때 필요한 조건들에 관해서 요약해 놓았으며, 표 3에서는 상처치료용, 효소고정화용, 조직재생용 PEC로 사용될 때 필요한 조건에 대해서 요약해 놓았다.

합성 고분자들 사이의 PEC의 형성과정을 그림 7에서 나타내고 있다. 형성 과정을 간단하게 설명하면 ① 1차적인 전하간의 전기력에 의해서 빠르게 콤플렉스 형성 ② 분자내 콤플렉스 간의 형성과정 ③ 분자간 회합과정으로 크게 세 과정으로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째 단계는 전하 간의 전기력 (Coulomb force)에

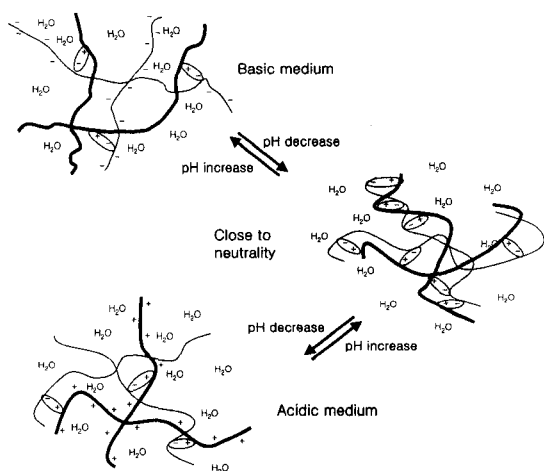


그림 6. Structure and pH-sensitive swelling of a poly-electrolyte complex containing chitosan; -, negative charge of the additional polymer; +, positive charge of chitosan; \circ , ionic interaction; —, chitosan; - - -, additional polymer.

* Euro. J. Phar. Bio., 57(1), 19~34 (2004)

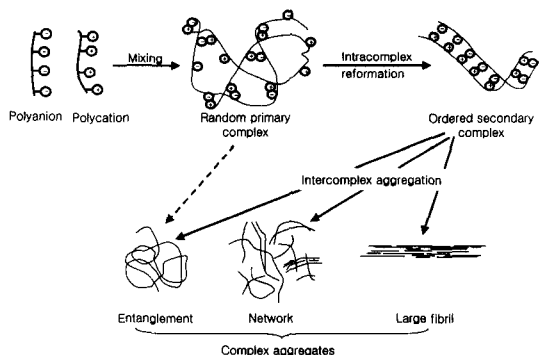


그림 7. Schematic representation of the aggregation of polyelectrolyte complexes.

* Adv. Drug. Deliv. Rew., 31, 223~246 (1998)

의해서 아주 빠르게 결합을 한다. 그리고 두 번째 단계에서는 새로운 결합이 형성되고 얽힌 고분자사슬이 재배열된다. 마지막으로 세 번째 단계에서는 주로 소수성 상호작용으로 인한 이차적인 콤플렉스 (secondary complexes) 회합이 일어난다.⁴⁶ Poly(vinylbenzyl trimethylammonium chloride)와 poly(methacrylic acid)에서 이러한 PEC가 형성된다.⁴⁷

4. 결론

지금까지 키토산과 콤플렉스를 이루는 산과 고분자들에 대해서 개략적으로 알아보았다. 고분자 콤플렉스의 잠재적인 적용분야로는 외부자극 감응형 멤브레인,⁵⁶⁻⁵⁸ 필름이나 섬유의 코팅제,⁵⁹ 의학적 보형물,⁶⁰⁻⁶² 마이크로캡슐,^{63,64} 단백질 분리 및 분류,^{65,66} 제약제품의 바인딩 등⁶⁷ 폭넓은 분야에서 적용될 수 있다. 앞에서 살펴본 키토산-전해질 콤플렉스들은 키토산과 콤플렉스 형성할 수 있는 물질들 중 일부분에 불과하다. 이는 아직 키토산-전해질 콤플렉스 형성에 관한 연구가 초기단계에 있으며, 키토산과 콤플렉스를 형성할 수 있는 고분자나 산에 대해서 연구가 미흡하기 때문이라고 사료된다. 따라서 향후 집약적인 연구가 수행됨에 따라서 더 많은 키토산-전해질 콤플렉스 물질이 발견될 수 있을 거라고 기대한다.

감사의 글 : 본 토픽은 산업자원부 한국산업기술재단의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. H. Dautzenberg, W. Jaeger, J. Kots, B. Philipp, Ch. Seidel, and D. Stscherbina, *Polyelectrolytes Formation, Characterization and Application*, Hanser Publishers, Munich Vienna New York, 1994.
2. Ronald S. Harland and Robert K. Prud'homme, *Polyelectrolyte Gels Properties, Preparation and Applications*, in ACS Symposium Series, 480, 1992.
3. Majeti N. V. Ravi Kumar, *Rea. Func. Polym.*, 46, 1-27 (2000).
4. H. Fukuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 837-840 (1980).

5. D. Knorr and M. Daly, *Progress Biochem.*, **48**, 48–50 (1998).
6. Y. Kikuchi and H. Fukuda, *Makromol. Chem.*, **175**, 3593–3596 (1974).
7. F. Hiroshi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **12**, 531–539 (1978).
8. H. Fukuda and Y. Kikuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 1142–1144 (1978).
9. Y. Kikuchi and A. Noda, *J. Appl. Sci.*, **20**, 2561–2563 (1976).
10. C. Mireles, M. Martino, J. Bouzas, and J. A. Torres, *Elsevier Appl. Sci. London*, 506–515 (1992).
11. S. Dumitriu, P. Magny, D. Montane, P. F. Vidal, and E. Chornet, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **9**, 184–209 (1994).
12. S. Dumitriu and S. Chornet, *Aec Edizioni, Italy.*, **2**, 543–564 (1996).
13. H. Colfen, S. E. Harding, K. M. Varum, and D. J. Winzor, *Carbohydr. Polym.*, **30**, 45–53 (1996).
14. M. M. Meshali and K. E. Gabr, *Int. J. Pharm.*, **89**, 177–181 (1993).
15. H. J. Kim, H. C. Lee, J. S. Oh, B. A. Shin, C. S. Oh, R. D. Park, K. S. Yang, and C. S. Cho, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **10**, 543–556 (1999).
16. O. S. Lee, B. J. Ha, S. N. Park, and Y. S. Lee, *Macromol. Chem. Phys.*, **198**, 2971–2976 (1997).
17. T. Sakiyama, H. Takata, M. Kikuchi, and K. Nakanishi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **73**, 270–277 (1999).
18. S. Y. Park, B. I. Lee, S. T. Jung, and H. J. Park, *Mater. Res. Bull.*, **36**, 511–519 (2001).
19. A. Denuziere, D. Ferrier, and A. Domard, *Ann. Pharm. Fr.*, **58**, 47–53 (2000).
20. D. D. Long and D. VanLuyen, *J. Macromol. Sci-Pure Appl Chem.*, **A33**, 1875–1884 (1996).
21. W. Arguelles-Monal, O. L. Hechavarria, L. Rodriguez, and C. Peniche, *Polym. Bull.*, **31**, 471–478 (1993).
22. T. Harnano, D. Chiba, K. Nakatsuka, M. Nagagata, A. Teramoto, Y. Kondo, A. Hachimori, and K. Abe, *Polym. Adv. Technol.*, **13**, 46–53 (2002).
23. H. Rukuda and Y. Kikuchi, *Makromol. Chem.*, **178**, 2895–2899 (1997).
24. M. Amaike, Y. Senoo, and J. Yamamoto, *Macromol. Rapid Commun.*, **19**, 287–289 (1998).
25. Y. Kikuchi, *Makromol. Chem.*, **175**, 2209–2211 (1974).
26. K. D. Yao, H. Tu, F. Cheng, J. W. Zhang, and J. Liu, *Angew Makromol. Chem.*, **245**, 63–72 (1997).
27. K. L. B. Chang, and J. Lin, *Carbohydr. Polym.*, **43**, 163–169 (2000).
28. S. Dumitriu, and E. Chornet, *Chitin Enzymol.*, **2**, 527–542 (2000).
29. C. H. Chu, H. Kumagai, T. Sakiyama, S. Ikeda, and K. Nakamura, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 627–1632 (1996).
30. I. Cabriellii, P. Gatenholm, W. G. Glasser, R. K. Jain, and L. Kenne, *Carbohydr. Polym.*, **43**, 367–374 (2000).
31. J. Manero, J. Filbey, and P. Boderke, *Patent DE*, **19810965** (1999).
32. M. N. Taravelm and A. Domard, *Biomaterials.*, **17**, 451–455 (1996).
33. Q. Q. Zhang, L. R. Liu, L. Ren, and F. J. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **64**, 2127–2130 (1997).
34. D. Thacharodi and K. Panduranga Rao, *Int. J. Pharm.*, **120**, 115–118 (1995).
35. W. H. Park, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 3567–3579 (1996).
36. H. Wang, W. Li, Y. Lu, and Z. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 1445–1450 (1997).
37. T. Takahashi, K. Takayama, Y. Machida, and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **61**, 35–41 (1990).
38. V. Chavasit, C. A. Kienzle–Sterzer, and J. A. Torres, *Polym. Bull.*, **19**, 223–230 (1998).
39. V. Crescenzi, G. Paradossi, P. Desideri, M. Dentini, F. Cavalieri, E. Amici, and R. Lisi, *Polym. Gels Netw.*, **5**, 225–239 (1997).
40. F. L. Mi, S. S. Shyu, C. Y. Kuan, S. T. Lee, K. T. Lu, and S. F. Jang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **4**, 1868–1879 (1999).
41. F. L. Mi, S. S. Shyu, T. B. Wong, S. F. Jang, S. T. Lee, and K. T. Lu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **74**, 1093–1107 (1999).
42. J. Y. Lee, S. H. Nam, S. Y. Im, Y. J. Park, Y. M. Lee, Y. J. Seol, C. P. Chung, and S. J. Lee, *J. Controlled Release.*, **78**, 187–197 (2002).
43. M. N. Taravel and A. Domard, *Biomaterials.*, **16**, 865–871 (1995).
44. M. M. Daly and D. Knorr, *Biotechnol. Prog.*, **4**, 76–81 (1998).
45. T. T. Nge, M. Yamaguchi, N. Hori, A. Takemura, and H. Ono., *J. Appl. Polym. Sci.*, **83**, 1025–1035 (2002).
46. E. Tsuchida, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*,

- A31**, 1–15 (1994).
47. J. C. Salamone, S. Poulin, A. C. Watterson, and A. P. Olson, *Polymer*, **20**, 2500–2506 (1979).
 48. S. Aiba, *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**, 40–44 (1991).
 49. S. Dumitriu, E. Chornet, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 539–545 (1997).
 50. K. Takayama, M. Hirata, Y. Machida, T. Masad, T. Sannan, and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **387**, 1993–1997 (1990).
 51. E. Chornet, S. Dumitriu, and P. Vidal, *Patent CA*, **2146192** (1995).
 52. L. Shahabeddin, O. Damour, F. Berthod, P. Rousselle, G. Saintigny, and C. Collombel, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **2**, 222–226 (1991).
 53. P. Cerrai, G.D. Guerra, and M. Tricoli, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 3567–3579 (1996).
 54. T. Koyano, N. Koshizaki, H. Umehara, M. Nagura, and N. Minoura, *Polymer*, **41**, 4461–4465 (2000).
 55. Guro E. Fredheim, and Bjorn E. Christensen, *Biomacromolecules*, **4**, 232–239 (2003).
 56. M. Senuma, S. Kuwabara, K. Kaeriyama, F. Hase, and Y. Shimura, *J. Appl. Polym. Sci.*, **31**, 1687–1697 (1986).
 57. H. Sato, M. Maeda, and A. Nakajima, *J. Appl. Polym. Sci.*, **31**, 1759–1767.
 58. L. V. Harris, *Protein Purification Methods*, E. L. V. Harris, S. Angel (Eds), Oxford University Press, New York, 1993.
 59. A. D. Virnik, I. F. Skokova, and T. N. Yudanov, *Khimicheskaya Volokna*, **5**, 10–21 (1995).
 60. R. E. Bannister, *Water Sci.*, **31**, 2491–2500 (1986).
 61. H. Ito, T. Shibata, T. Miyamoto, Y. Noishiki, and H. Imagaki, *J. Appl. Polym. Sci.*, **89**, 112–113 (1986).
 62. M. Sittinger, B. Lukanoff, G. R. Burmester, and H. Dautzenberg, *Biomaterials*, **17**, 1049–1051 (1996).
 63. M. A. Wheatley, M. Chang, E. Park, and R. Langer, *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 2123–2135 (1991).
 64. J. Mansfeld, M. Forster, T. Hoffman, and A. Schellenberger, *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 11–17 (1995).
 65. Y. Hirouki and K. Takeshi, *Chem. Eng. Japan*, **41**, B11–B15, (1989).
 66. P. L. Dubin, J. Gao, and K. Mattison, *Sep. Purif. Methods*, **23**, 1–16 (1994).
 67. J. Chen, S. Jo, and K. Park, *Carbohydr. Polym.*, **28**, 69–76 (1995).