

전기 방사법을 통해 제조된 Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) /Marine Collagen 나노파이버의 특성 및 세포친화력 평가

김우진*** · 신영민* · 박종석* · 권희정* · 김용수*** · 신흥수** · 노영창* · 임윤목*† · 정무삼***

*한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소 방사선공업환경연구부,
한양대학교 응용화학생명공학부 생명공학과, *제주한라대학교 임상병리과
(2011년 5월 30일 접수, 2011년 7월 5일 수정, 2011년 8월 29일 채택)

Characteristics and Biocompatibility of Electrospun Nanofibers with Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone)/Marine Collagen

Woo-Jin Kim***, Young Min Shin*, Jong-Seok Park*, Hui-Jeong Gwon*, Yong-Soo Kim***,
Heungsoo Shin**, Young-Chang Nho*, Youn-Mook Lim*†, and Moo Sang Chong***

*Radiation Research Division for Industry and Environment, Advanced Radiation Technology Institute,
Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Sinjeong-dong, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 580-185, Korea
**Department of Bioengineering, Division of Applied Chemical and Bio Engineering, Hanyang University,
17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

***Department of Clinical Pathology, Cheju Halla University, Jeju Special Self-Governing Province 690-708, Korea
(Received May 30, 2011; Resived July 5, 2011; Accepted August 29, 2011)

초록: 본 연구의 목적은 전기방사법을 사용하여 poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL)과 marine collagen (MC) 이 혼합된 나노섬유를 제조하는 것이다. 전기방사된 나노섬유의 직경과 형태는 여러 공정 변수에 의해서 변화되는데, PLCL과 MC의 혼합비, 노즐과 콜렉터와의 거리, 노즐의 직경, 용액의 방출 속도 그리고 전기장의 세기 변화에 따라 나노파이버의 직경을 주사전자현미경을 통해서 분석하였다. 또한 제조된 나노파이버의 표면변화를 확인하기 위해 물과의 접촉각을 측정하였으며, 나노파이버의 세포 친화성을 평가하기 위해 MG-63을 이용하여 생존율과 흡착형태를 주사전자현미경과 형광현미경을 통해서 관찰하였다. 이와 같은 연구 결과, 방사거리, MC의 함량, 전기장의 세기가 증가할수록 제조된 나노파이버의 평균직경은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 MC의 함량이 증가할수록 나노파이버의 친수성이 증가하였고 세포독성은 관찰되지 않았다. 이에 따라 해양유래 생물에서 추출한 콜라겐은 조직공학용 소재에 새롭게 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

Abstract: The uniform nanofibers of poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) with different contents of marine collagen (MC) were successfully prepared by electrospinning method. The effects of the major parameters in electrospinning process such as tip to target distance (TTD), voltage, nozzle size and flow rate on the average diameter of the electrospun nanofiber were investigated in generating composite nanofiber. The diameter and morphology of the nanofibers were confirmed by a scanning electron microscopy (SEM). Also, we measured a water contact angle to determine the surface wettability of the nanofibers. The average diameter of the nanofibers decreased as the value of TTD, MC contents, and voltages increased in comparison with that of pristine PLCL nanofiber. In contrast, the diameter of the nanofibers increased as the flow rate and inner diameter of nozzle increased in comparison with that of pristine PLCL. In addition, the hydrophilicity of the nanofiber and attachment of MG-63 cells on the sheets increased as incorporated collagen contents increased. Therefore, the marine collagen would be a potential material to enhance cellular interactivity of synthetic materials by mimicking the natural tissue.

Keywords: poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone), marine collagen, nanofiber, electrospinning.

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ymlim71@kaeri.re.kr

서 론

전기방사법은 고분자용액을 이용하여 수백 나노미터부터 수 마이크로미터까지 미세한 섬유를 제조할 수 있는 매우 효과적이며 편리한 제조 기술이며,¹ 매우 간결하면서도 저렴한 설치 비용을 요구한다. 일반적으로, 구성 부품으로는 실린지 펌프(syringe pump), DC 고전압 발생기(power supply), 콜렉터(aluminum collector) 등으로 구성되며, 전기방사할 경우에 주 공정변수로는 용액의 농도, 점도, 표면장력, 방출속도, 전기장의 세기, 노즐의 크기, 노즐 끝에서 콜렉터까지의 거리 등이 대표적이다.²

전기방사의 기본원리로서 노즐 끝의 반구형 방울 표면에는 전하 또는 쌍극자 반발로 인해 테일러 콘(Taylor cone)이 형성되며, 임계 전기장 세기에서 반발 정전기력이 표면장력을 극복하게 되면 고분자용액은 테일러 콘 끝에서 제트(jet)를 형성하면서 방출된다. 방출된 제트는 용액 특유의 점도성 때문에 공기 중으로 날아가면서 용매는 증발하게 되고 콜렉터에는 고분자 섬유가 쌓게 된다.³

이러한 전기방사법은 최근 10여년 전부터 조직공학 연구 분야에서 나노섬유형 지지체를 만드는데 사용되었는데, 대표적인 생체적합성, 생분해성 합성 고분자 물질로써 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA),⁴ poly(ε-caprolactone) (PCL),⁵ poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL),⁶ poly(lactide) (PLA)⁷ 가 사용되었으며, 키토산(chitosan),⁸ 젤라틴(gelatin),^{9,11} 콜라겐(collagen)¹⁰ 등과 같은 천연고분자도 사용되었다. 합성고분자는 기계적으로 우수한 특성을 갖는 반면 생체적합성은 낮으며, 천연고분자는 합성고분자와 반대의 특성을 보여주어 각각 제작된 지지체는 제한적인 기능성만을 보여주었으나, 최근 이들 고분자들의 혼합물을 이용하여 기존 지지체의 단점을 개선하는 연구가 다수 진행되고 있으며, 이는 약물전달시스템, 상처치료분야¹² 등 여러 분야에서 널리 사용되고 있다.

본 실험에 사용된 PLCL은 lactide와 caprolactone(CL)의 공중합체로 고무처럼 부드러운 탄성을 갖고 있으며,^{13,14} 이와 같은 특성 때문에 피부, 근육, 혈관과 같은 탄성력이 뛰어난 조직공학 분야에서 사용 빈도가 증가하고 있다.¹⁵ 그러나 PLCL은 탄성력과 같은 뛰어난 기계적인 강도를 지니고는 있으나 낮은 표면 친수성으로 세포의 흡착에 제한적이며 결과적으로 증식력과 분화능을 제한하는 문제점이 있다.¹⁶ 이에 따라 본 실험에서는 PLCL의 세포부착력을 향상시키기 위한 방법으로 천연고분자 물질인 콜라겐을 혼합한 나노파이버를 개발하였다.

콜라겐은 피부, 뼈, 힘줄, 인대 등의 조직과 세포 외 기질에 많이 분포되어 있는 물질이며, 혈관평활근세포의 활성을 조절하는 생체모방형 지지체가 이미 개발되었다.^{17,18} 일반적으로, 실험에서 사용되는 콜라겐은 송아지의 피부나 뼈를 통해서 획득되지만, 이렇게 얻어진 콜라겐은 광우병(BSE, bovine spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(TSE, transmissible spongiform encephalopathy), 그리고

구제역(FMD, foot-and-mouth disease) 등의 발생 가능성이 있어 최근 동물성 콜라겐의 사용에 대한 위험성이 증가되었으며,^{19,20} 이에 대한 대안으로 해파리에서 추출된 해양성 콜라겐의 연구가 증가하고 있다.²¹

본 실험에서는 해파리에서 추출한 콜라겐과 PLCL을 일정 비율(10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10)로 용매에 용해시켜 일반적인 전기방사법과 동일한 방법으로 전기방사를 실시하였다. 다양한 공정변수의 변화를 통해서 형성된 나노파이버 시트의 섬유 직경 변화와 형태를 관찰하였으며 MG-63 세포를 이용하여 해양생물에서 추출된 콜라겐이 함유된 PLCL의 세포독성평가를 실시하였다. 또한 주사전자현미경, 형광현미경을 이용하여 나노파이버 시트의 표면상의 세포부착여부를 관찰하였다.

실 험

재료. 본 연구에서는 poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)의 합성에 필요한 L-lactide는 Purac Biochem(Gorinchem, Netherlands)에서 구입하였고, ε-caprolactone, 1,6-hexanediol, stannous octoate, chloroform, methanol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP)는 Sigma-Aldrich(St.Louis, USA)에서 구매하였다. Marine collagen(MC)은 네비온(Seoul, Korea)에서 구매하였다.

PLCL의 합성. PLCL을 합성하기 위해서 단량체인 lactide(LA)와 caprolactone(CL)를 150 °C에서 24시간 동안 촉매제인 stannous octoate를 첨가하여 개환 중합반응을 실시하였다. 반응을 마친 산물은 클로르포름에 녹여서 마이크로 필터링을 실시 후에 진공건조를 실시하였으며, 평균 분자량은 약 320000이었다.

실험 조건 및 장비. 전기방사를 실시하기 위해서 HFIP 용액에 전체 고분자의 농도를 3, 5 wt%로 용해시켜 사용하였으며, 용액 내 PLCL과 MC은 10:0, 7:3, 5:5, 3:7 (P10M0, P7M3, P5M5, P3M7) 비율로 혼합하여 각각의 샘플을 제조하였다. 기본적인 전기방사장치의 구성 요소로는 DC 전압 공급장치(DC voltage power supply, NNC-60K-2 mA, nanoNC, Korea), 콜렉터(collector), 노즐(nozzle), 시린지펌프(infusion pump, ESR-200RD, nanoNC, Korea)를 사용하였으며 전기방사 공정변수조건으로는 용액의 방출속도(0.001, 0.003, 0.005 ml/min), 노즐과 콜렉터와의 거리(10, 15, 20 cm), 자기장의 세기(10, 15 kV), 노즐의 직경의 차이(21, 25 G)를 변화시키면서 각각의 혼합고분자를 일정시간 방사하여 적층시키는 방식을 사용하였다.

분석. 전기방사 공정을 통해서 제작된 나노파이버 시트의 섬유 직경을 측정하기 위해 sputter를 사용하여 15 mA로 60초 동안 백금코팅을 실시하였으며 주사전자현미경(SEM, JSM-6390, JEOL, Japan)을 사용하여 5000배에서 나노파이버를 관찰하였다.

제조한 나노파이버 시트의 MC의 함량비에 따른 물과의 친수화도를 확인하기 위해서 PLCL/MC 시트를 접촉각

측정기(phoenix-300, Korea)를 이용하여 측정하였다.

나노파이버 쉬트의 세포 독성을 확인하기 위해서 각각의 쉬트를 96-well 크기로 일정하게 샘플링을 한 뒤 MG-63 세포(1×10^5 cell/well)를 37°C에서 24시간 동안 배양 (DMEM-high glucose, 10% FBS, 1% PS)시킨 후에 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo, Tokyo)을 이용하여 450 nm에서 micro plate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 또한 나노파이버 쉬트를 직경 1.5 cm의 원형으로 일정하게 제작한 후에 MG-63 세포를 24 well plate(4×10^4 cell/well)에서 37°C, 24시간 동안 배양시킨 후 나노파이버에 부착된 세포를 고정화와 형광염색을 실시하여 전자주사현미경과 형광현미경을 통해서 나노파이버 쉬트의 세포부착여부를 관찰하였다.

결과 및 토론

HFIP를 이용하여 고분자혼합용액을 전기방사 실시하는 동안 제트의 형성이 균일하게 이루어지는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 공정변수의 다양한 변화를 통해서 PLCL 나노파이버의 직경의 변화를 관찰할 수 있었다.

용액의 농도 변화에 따른 나노파이버의 직경의 변화는 Figure 1에서 관찰할 수 있다. 혼합고분자용액의 전체농도가 3, 5 wt%로 증가할수록 평균 직경의 크기가 230 ± 47 , 263 ± 76 nm로 증가되며 분포범위가 넓어지는 것을 통해서 용액의 농도가 증가할수록 나노파이버의 직경은 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 농도가 높은 고분자용액의 전기방사 시에 형성되는 나노파이버의 직경의 크기는 낮은 농도의 고분자용액의 나노파이버의 직경에 비해서 큰 것이 일반적이다.²² 이는 농도의 변화가 용액의 표면장력, 점도, 전도성에 영향을 미쳐 형성되는 나노파이버의 형태와 직경의 변화에 중요한 변수로 작용하기 때문이다.²³

혼합된 고분자용액 내의 천연고분자 물질의 함량에 따

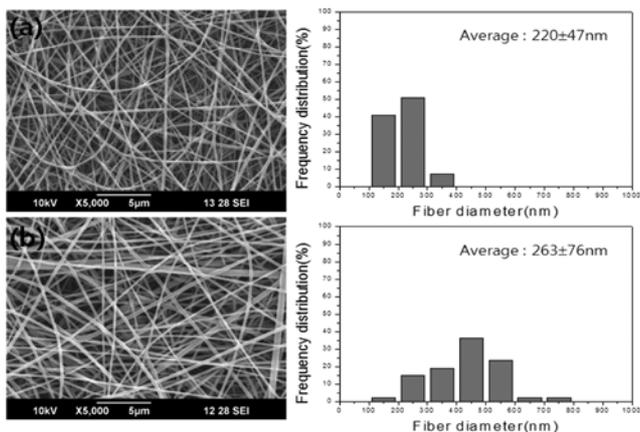


Figure 1. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as a function of polymer solution concentration (a) 3 wt%; (b) 5 wt% (PLCL/MC=7/3 (w/w), electric voltage=10 kV, flow rate=0.001 mL/min, tip-target distance=15 cm, needle size=25 G).

른 나노파이버의 직경의 변화를 조사하기 위하여 전체 고분자 용액 내 천연고분자 MC의 혼합비율을 0, 30, 50, 70, 100%로 변화시켜 나노파이버를 제조하였다. Figure 2에 나타나는 바와 같이 MC의 혼합비율이 점점 증가함에 따라 나노파이버의 길이가 207 ± 45 , 166 ± 40 , 116 ± 59 nm로 평균적으로 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 이는 순수 MC만으로 실시한 전기방사의 경우에는 섬유화가 이루어지지 않았기에 섬유의 직경이 아닌 비드의 직경을 측정함으로 MC의 비율이 70%인 샘플에 비해서 직경분포도가 커지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2(e)). 일반적으로 합성

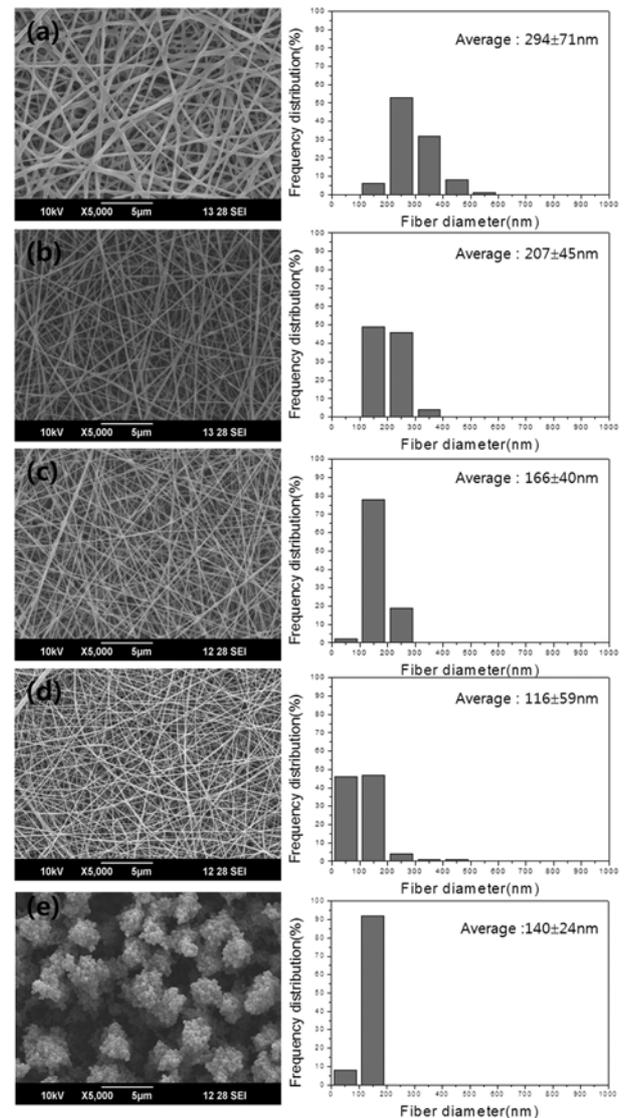


Figure 2. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as a function of the MC content of total polymer solution (a) PLCL/MC=10:0; (b) PLCL/MC=7:3; (c) PLCL/MC=5:5; (d) PLCL/MC=3:7; (e) PLCL/MC=0:10 (concentration=3 wt%, electric voltage=10 kV, flow rate=0.001 mL/min, tip-target distance=10 cm, needle size=25 G).

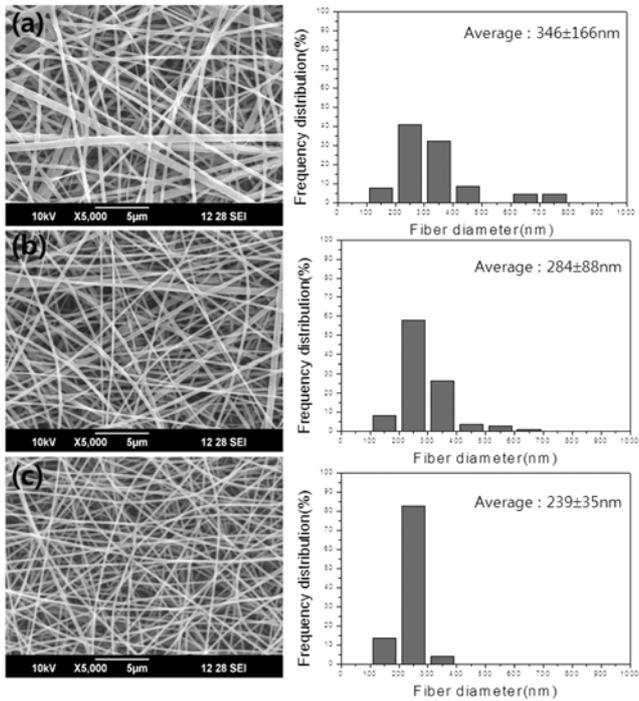


Figure 3. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as tip-target distance (a) 10 cm; (b) 15 cm; (c) 20 cm (PLCL/MC=7/3 (w/w), electric voltage=10 kV, flow rate=0.001 mL/min, needle size=25 G).

고분자와 천연고분자의 혼합에 의한 전기방사의 나노파이버는 합성고분자만을 단일로 사용한 나노파이버보다 직경이 작아짐을 확인할 수 있다.²³ 이러한 현상의 원인으로서는 전하의 밀도가 증가함에 따라 나노파이버의 직경이 얇아진 것으로 사료된다.²⁴

전기방사 장치의 팁과 콜렉터와의 거리가 생성되는 PLCL/MC 나노파이버에 미치는 영향에 대한 형태와 직경의 분포를 확인할 수 있었다(Figure 3). 팁과 콜렉터 사이의 거리가 10, 15, 20 cm으로 증가함에 따라 생성된 나노파이버의 직경은 346±166, 284±88, 239±35 nm으로 직경은 얇아지고 분포도가 균일해지는 것을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 현상은 증가된 거리가 용매의 증발 속도에 영향을 주어 재결합 시간에 영향을 주기 때문인 것으로 생각된다.²⁵ 따라서 팁과 콜렉터 사이의 거리증가는 나노섬유의 직경을 줄이는 주요 공정변수라고 할 수 있다.^{26,27}

일반적으로 나노파이버의 직경은 전기장의 변화가 초기 제트의 안정성에 영향을 주기 때문에 전압이 높아질수록, 높은 정전기적 힘이 초기 제트에 작용하게 되어 직경이 감소한다.²⁸ 그러나 Figure 4에서 나노파이버의 직경의 차이는 평균적인 값을 비교해보았을 때 전기장의 세기가 10, 15 kV로 증가함에 따라 생성되는 나노파이버의 평균직경은 207±45, 266±41 nm 증가한 것으로 볼 수 있으나, 이는 편차정도가 크기 때문에 나타나는 수치상의 증가일 뿐이며

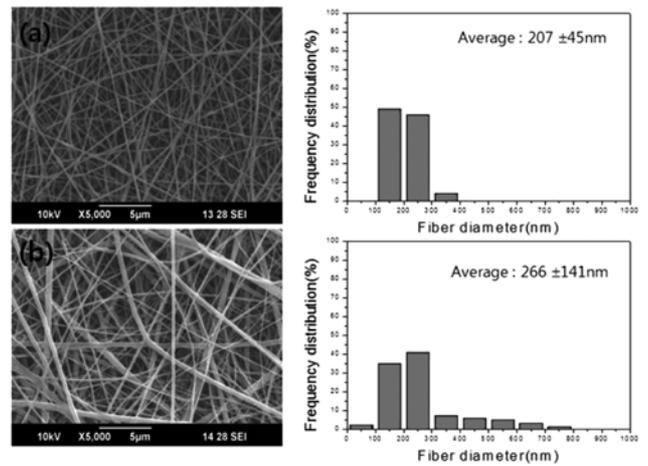


Figure 4. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as a function of electric voltage (a) 10 kV; (b) 15 kV (concentration=3 wt%, PLCL/MC=7/3 (w/w), tip-target distance=10 cm, flow rate=0.001 mL/min, needle size = 25 G).

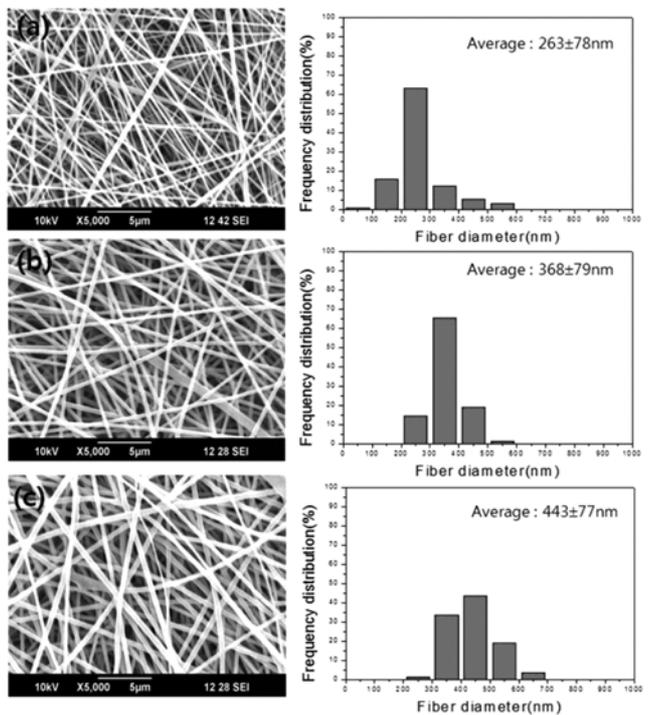


Figure 5. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as a function of flow rate (a) 0.001 mL/min; (b) 0.003 mL/min; (c) 0.005 mL/min (concentration=5 wt%, PLCL/MC=7/3 (w/w), tip-target distance=10 cm, flow rate=0.001 mL/min, needle size=21 G).

분포도를 확인해 보았을 때 전기방사에 따른 섬유 직경의 변화는 없는 것으로 사료된다. 따라서 일정한 팁-콜렉터 거리에서 높은 전압은 제트의 안정성에 영향을 주어 파이버의 직경 편차를 크게하여 넓은 분포도를 갖게 된 것

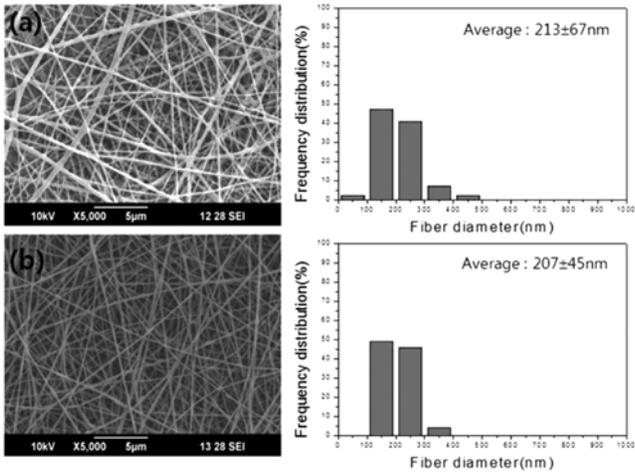


Figure 6. SEM images and fiber diameter distribution of PLCL/MC fibers as a function of needle size (a) 21 G; (b) 25 G (concentration=3 wt%, PLCL/MC=7/3 (w/w), tip-target distance=10 cm, flow rate=0.001 mL/min, electric voltage=10 kV).

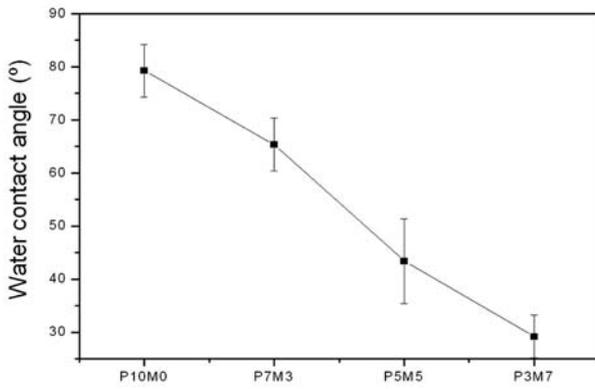
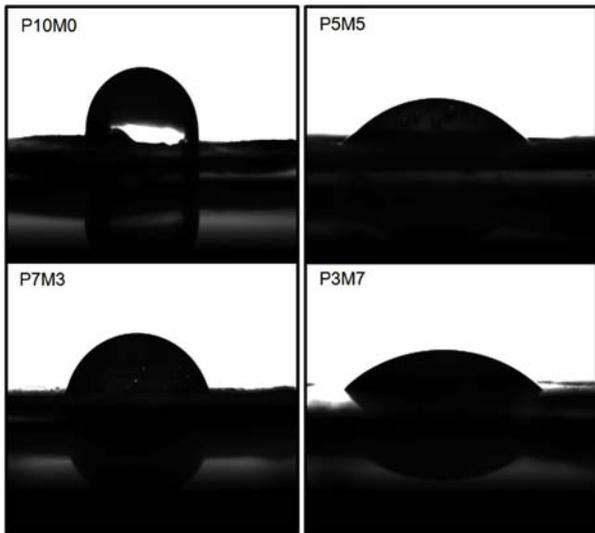


Figure 7. Water contact angles of pristine PLCL and PLCL/MC nanofibers.

로 사료된다.

용액의 방출 속도에 따른 직경의 변화에 대해서 분석한 결과는 Figure 5에 나타내었다. 일반적으로, 용액의 방출 속도는 노즐의 끝에 맺히는 용액의 양을 증가시키게 되고 맺혀진 용액 내의 전하밀도가 감소하는 경향을 띠는데, Figure 5에서 알 수 있듯이 용액의 방출 속도가 0.001, 0.003, 0.005 mL/min으로 증가함에 따라 평균직경의 크기는 263±78, 368±79, 443±77 nm으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 증가된 속도에 의해 맺혀지는 용액의 양의 증가로 전하밀도가 감소하게 되어 생성되는 나노파이버의 직경은 커졌다고 할 수 있다.^{29,30}

Figure 6은 전기방사 공정시 니들의 내경 차이에 따른 파이버의 영향을 관찰한 것으로 21, 25 G로 노즐의 내경의 크기가 감소함에 따라 평균직경은 213±67, 207±45 nm으로 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. 내경의 크기가 작아짐에 따라 평균직경의 크기가 감소하였으나 노즐의 내경의 차이가 크지 않아 파이버 직경에 큰 영향을 나타내지 않았다.³¹⁻³³

전기방사공정을 통한 나노파이버 시트의 표면의 친수성의 변화여부를 확인하기 위해서 접촉각 실험을 실시하였다. Figure 7은 MC의 함량에 대한 나노파이버 시트 표면의 친수성의 변화정도를 나타낸 결과이다. P10M0 나노파이버 시트는 약 80°의 접촉각 결과를 보여주어 높은 표면 소수성을 보여주었으나, MC의 함량이 30, 50, 70%로 증가함에 따라 접촉각이 65, 45, 30°으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 친수성 결사슬을 갖는 콜라겐의 특성에 따른 결과로 MC의 함량이 증가할수록 친수성이 높아진다는 것을 보여준다. 그러므로 MC의 함량의 차이가 PLCL 표면의 친수성에 영향을 주어 세포친화력을 증가시켜 줄 수 있을 것으로 사료된다.

PLCL/MC의 나노파이버의 세포독성여부를 평가하기 위해서 MG-63 cell을 시트에 분주한 후 CCK-8 kit를 사용하여 평가한 결과를 Figure 8에 나타내었다. P10M0을 비롯한 모든 시료에서 생존율 80%이상의 결과를 확인할 수 있었으며, 모든 시료가 세포독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

나노파이버 시트에서 세포의 부착여부는 주사전자현미

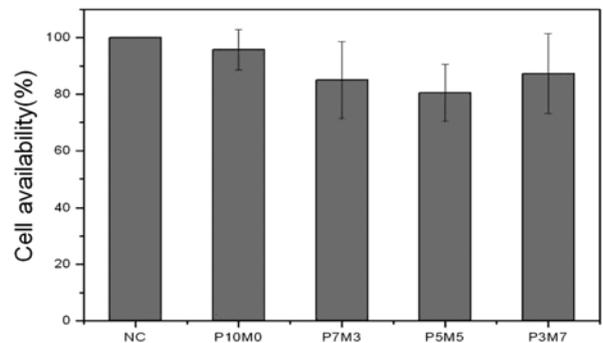


Figure 8. Cell viability on the PLCL/MC nanofibers (CCK-8 assay).

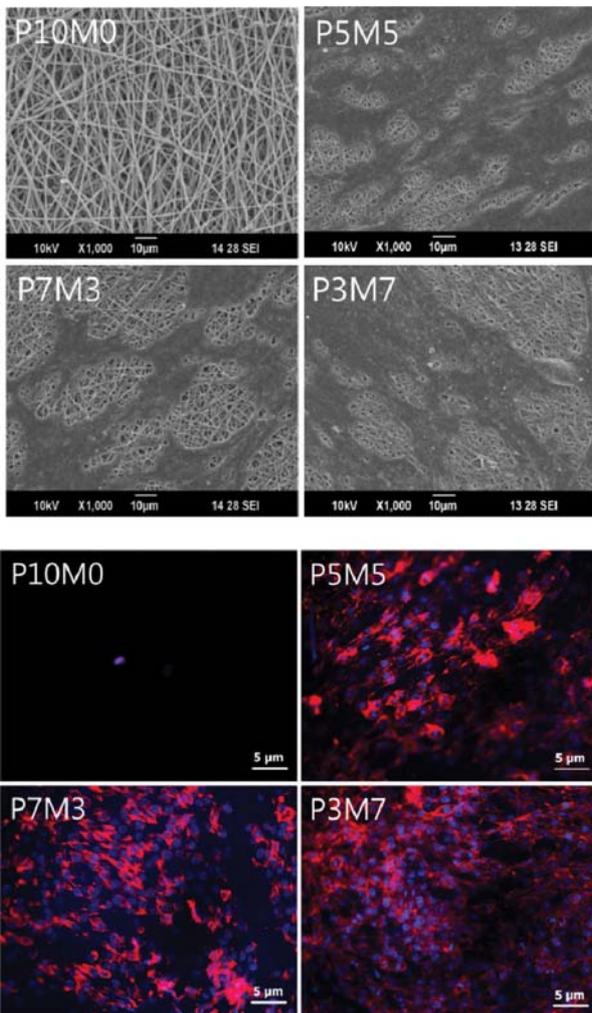


Figure 9. SEM and fluorescence microscope images of MG-63 cells on PLCL/MC nanofibers (red color: actin filament, blue color: nucleic acid).

경과 형광현미경을 통해서 육안으로 확인할 수 있었다 (Figure 9). 콜라겐의 함량이 많을수록 순수 PLCL 나노파이버 쉬트에 비해서 더욱 많은 세포가 분포되어있는 것을 전자주사현미경에서 확인할 수 있었으며 형광현미경으로 관찰한 이미지에서는 파란색 형광을 띤 핵의 존재를 육안으로 확인할 수 있었다. 상기 두 가지 방법의 관찰 결과 P10M0의 세포의 생존율은 P3M7, P5M5, P7M3에 비해서 현저히 낮은 것을 육안으로 관찰할 수 있었으며 이는 단일 합성 고분자보다 콜라겐이 함유된 시료의 경우 높은 친수성 표면의 변화로 인해 세포의 정착가능성의 증가 때문인 것으로 사료된다.

결론

이 실험에서 전기방사를 이용하여 다양한 함량비의 해

양생물 추출 콜라겐을 갖는 PLCL/MC의 나노파이버 쉬트를 제조하였고, 함량비에 따른 나노파이버 쉬트의 표면의 변화를 관찰하였다. 천연고분자량이 증가할수록 친수성이 증가하였으며, 이들 쉬트의 독성평가 및 세포 부착성 실험결과에서 콜라겐의 함유가 세포의 증식을 위한 기본조건을 제공해 줄 수 있는 것으로 확인되었다. 또한 이는 동물 유래성 콜라겐과 유사한 결과임을 확인할 수 있었기 때문에 해양생물 추출 콜라겐을 사용함으로써 PLCL/MC 나노파이버 쉬트는 인체에 무해한 조직공학적인 재료로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 전망한다.

감사의 글: 본 연구는 교육과학기술부에서 주관하는 원자력연구개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. T. Uyar and F. Besenbacher, *Polymer*, **49**, 5336 (2008).
2. D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, *J. Appl. Phys.*, **87**, 4531 (2000).
3. J. A. Matthews, E. D. Boland, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **18**, 125(2003).
4. X. Xin, M. Hussain, and J. J. Mao, *Biomaterials*, **28**, 316 (2007).
5. H. Yoshimoto, Y. M. Shin, H. Terai, and J. P. Vacanti, *Biomaterials*, **24**, 2077 (2003).
6. S. I. Jeong, J. H. Kwon, J. I. Lim, S. W. Cho, Y. Jung, W. J. Sung, S. H. Kim, Y. H. Kim, Y. M. Lee, B. S. Kim, C. Y. Choi, and S. J. Kim, *Biomaterials*, **26**, 1405 (2005).
7. K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. S. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, *Biomaterials*, **24**, 4977 (2003).
8. B. Duan, X. Yuan, Y. Zhu, Y. Zhang, X. Li, Y. Zhang, and K. Yao, *Eur. Polym. J.*, **42**, 2013 (2006).
9. H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, *Carbohydr. Polym.*, **77**, 656 (2009).
10. J. Venugopal, L. L. Ma, T. Yong, and S. Ramakrishna, *Cell. Biol. Int.*, **29**, 861 (2005).
11. J. Lee, G. Tae, Y. H. Kim, I. S. Park, and S. H. Kim, *Biomaterials*, **29**, 1872 (2008).
12. M. Spasova, O. Stoilova, N. Manolova, I. Rashkov, and G. Altankov, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **22**, 62 (2007).
13. I. K. Kwon, S. Kidoaki, and T. Matsuda, *Biomaterials*, **26**, 3929 (2005).
14. S. I. Jeong, B. S. Kim, S. W. Kang, J. H. Kwon, Y. M. Lee, S. H. Kim, and Y. H. Kim, *Biomaterials*, **25**, 5939 (2004).
15. K. Garkhal, S. Verma, K. Tikoo, and N. Kumar, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **82**, 747 (2007).
16. M. Honda, N. Morikawa, K. Hata, T. Yada, S. Morita, and M. Ueda, and K. Kimata, *Biomaterials*, **24**, 3511 (2003).
17. K. S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. M. Seo, Y. J. Park, S. D. Hong,

- S. Roh, J. J. Cho, W. H. Park, and B. M. Min, *Biomaterials*, **27**, 1452 (2006).
18. J. D. Stitzel, K. J. Pawlowski, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, *J. Biomater. Appl.*, **16**, 22 (2001).
19. M. Ogawa, R. J. Portier, M. W. Moody, J. Bell, M. A. Schexnayder, and J. N. Losso, *Food Chem.*, **88**, 495 (2004).
20. E. Song, S. Y. Kim, T. Chun, H. J. Byun, and Y. M. Lee, *Biomaterials*, **27**, 2951 (2006).
21. S. I. Jeong, S. Y. Kim, S. K. Cho, M. S. Chong, K. S. Kim, H. Kim, S. B. Lee, and Y. M. Lee, *Biomaterials*, **28**, 1115 (2007).
22. Z.-M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.*, **63**, 2223 (2003).
23. I. K. Kwon and T. Matsuda, *Biomacromolecules*, **6**, 2096 (2005).
24. Z. Chen, X. Mo, and F. Qing, *Mater. Lett.*, **61**, 3490 (2007).
25. P. Heikkil and A. Harlin, *Eur. Polym. J.*, **44**, 3067 (2008).
26. L. Yan, H. Zhengming, and L. Yandong, *Eur. Polym. J.*, **42**, 1696 (2006).
27. S. Zhao, X. Wu, L. Wang, and Y. Huang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **91**, 242 (2004).
28. T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, *J. Appl. Polym. Sci.*, **96**, 557 (2005).
29. V. Beachley and X. Wen, *Mater. Sci. Eng. C*, **29**, 663 (2009).
30. S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, *Macromolecules*, **35**, 8456 (2002).
31. J. Zeng, X. Chen, X. Xu, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, *J. Appl. Polym. Sci.*, **89**, 1085 (2003).
32. W. Cui, X. Li, S. Zhou, and J. Weng, *J. Appl. Polym. Sci.*, **103**, 3105 (2007).
33. J. Acoosay, A. Marruffo, R. Rincon, T. Eubanks, and A. Kuang, *Polym. Adv. Technol.*, **18**, 180 (2007).