Divinyl Sulfone으로 가교된 히알루론산 마이크로비드의 특성평가

김진태^{1,2} · 이득용² · 장주웅³ · 김태형⁴ · 장용운²

¹충북대학교 신소재공학과, ²대림대학교 의공융합과, ³(주)셀루메드, ⁴강원대학교 방사선학과

Characterization of Cross Linked Hyaluronic Acid Microbeads by Divinyl Sulfone

Jin-Tae Kim^{1,2}, Deuk Yong Lee², Ju-Woong Jang³, Tae-Hyung Kim⁴ and Yong-Wun Jang²

¹Department of Advanced Material Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

²Department of Material Engineering, Daelim University, Anyang, 431-715, Korea

³Cellumed Co., Ltd., Seoul 153-782, Korea

⁴Department of Radiological Science, Kangwon National University, Samcheok 245-905, Korea

(Manuscript received 5 April 2013; revised 29 May 2013; accepted 28 June 2013)

Abstract: Hyaluronic acid(HA) microbeads were synthesized by dropping the sodium hyaluronate(*Streptococcus*) solutions in NaOH into a solution mixture of divinyl sulfone(DVS) in 2-methyl-1-propanol, followed by stirring, cleaning and drying process at room temperature. The initial experimental conditions are crosslinking time(CLTi) of 5 h, crosslinking temperature(CLTe) of room temperature, injection air pressure(IAPr) of 5 psi, and DVS concentration(DVSc) of 0.2 vol%, respectively. Then, parametric studies were performed by varying the parameters to investigate the morphology, the porosity, the swelling ratio and the size of the beads. The microbead size pattern was not regular to function of the degree of crosslink. It was observed that the swelling ratio, the degree of crosslink, and the pore size can be controlled by adjusting the CLTi, CLTe and DVSc. Among the parameters investigated, the smallest bead size can be achieved by varying the CLTi parameter. The lowest swelling ratio, as an indication of the highest degree of crosslink, can be obtained by varying CLTe.

Key words: Hyaluronic acid microbead, Tissue regeneration, Hydrogel

1. 서 론

히알루론산은 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 교대로 결합되어 선형으로 연결되어있는 Glycosaminoglycans의 천연고분자이며 약 50,000~10,000,000의 분자량을 갖는 수용성 다당류로, 인체 내에도 존재하는 물질로서 세포외기질의 주성분으로 세포간 분자의 3차원적인 가교역할을 하고, 인간의 피부 와 진피에 다량 분포되어 존재한다[1]. 히알루론산은 중간 특이성을 갖지 않으며 조직이

나 장기에 항원특성이 없기 때문에 감각, 면역반응에 대한 잠재력이 매우 낮아 생체적합성이 매우 우수한 안전한 재료이며 친수성으로서 하이드로겔제조에 장점이 있다. 그러나 천연 히알루론산은 체내에 존재하는 효소에 의해 수일내에 분해되므로 천연상태로는 조직수복, 또는 조직공학용 지지체, 약물전달용 담체로서 기능을 발휘하기에는 체내 유지기간이 매우 단시간이므로 사용이 제한적이다[2-4].

따라서 체내 지속성, 불용성 및 기계적 강도가 향상된 HA 하이드로겔을 제조하기 위하여 벤질, 또는 알킬기와 같은 다양한 유도체를 HA의 카르복시기에 붙이거나 또는 공유결합을 기본으로 하여 하이드록시기를 이용한 화학적 가교제를 이용하는 방법이 진행되어왔다[5-12].

결손된 조직의 재생 및 치유에 있어서 함수율이 높고 생물학적 체액 및 세포, 치료약물을 함유할 수 있는 조직공학

Corresponding Author : Jin-Tae Kim
Dept. of Automotive Engineering, 29, Imgok-Ro, Dongan-Gu, Anyang-Si, Gyeonggi-Do, 431-715, Korea
Tel: +82-31-467-4680 / Fax: +82-31-467-4840
E-mail: tooday01@naver.com

적인 담체로서 하이드로겔의 개발과 사용이 늘고 있으며, 특히 최근에는 생체적합성이 우수한 히알루론산, 콜라겐, 키토산 등의 천연고분자를 이용한 하이드로겔 개발이 활발하게 진행되고 있다[5-13].

조직공학용의 지지체로 사용되는 고분자 하이드로겔은 수소결합, 공유결합, Van der Waals 결합 및 물리적 결합 등으로 가교된 친수성 고분자로서 불용성이지만 친수성에 의해 매우 높은 함수율에 의해 높은 팽윤성을 갖는다[14-19].

생체조직공학용 하이드로겔의 설계에 있어서 중요한 요소로는 생체적합성, 다공성, 기계적인 강도, 분해성 등이 있다. 이들 요소들은 하이드로겔 설계에서 가장 먼저 고려되어야 한다[20].

본 연구에서는 생체적합성이 우수한 천연고분자중 히알루론산을 주성분으로 한 스캐폴드 제조를 위하여 히알루론산의 하이드록시기에 대한 공유결합 가교반응을 목적으로 OH를 활성화 하기 위해 pH를 조절한 후 divinyl sulfone을 사용하여 히알루론산의 주 사슬에 다관능기를 가지는 분자의 결합을 시행하여 마이크로비드를 생성시키고 재수화 하여 하이드로겔을 제조하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Materials and basic experimental

백색 분말상태의 히알루론산나트륨(*Streptococcus, Lancefield C type*, Mw = 1×10^6 Da, Shiseido Co., Japan)을 0.05 mol/L 농도의 NaOH 용액에 실온에서 용해하여 0.5 wt%, pH11-12의 HA 수용액을 제조하였다. 제조된 수용액은 정량공급기(Masterflex L/S, Cole Parmer, USA)에 의해 0.005 mL/min의 속도로 분사노즐에 유입되도록 하였다. 분사 노즐은 HA 수용액이 전달되는 니들과 압축공기가 전달되는 3-way 형태로 제조하였다. 가교제는 divinyl sulfone (DVS) ($\geq 97\%$, Aldrich, USA)을 사용하였으며 2-methyl-1-propanol(99% Junsei, Japan)에 다양한 농도로 맞추어 가교액을 제조하였다.

낙하된 HA 수용액방울을 가교액 중 에서 교반기(MST Digital, IKA, Germany)를 이용하여 200~400 rpm회전속도로 최소 5시간 동안 실온에서 가교를 시행하였다.

가교 후 필터링 하여 가교액을 흘려버리고 HA 마이크로비드를 얻었다. 증류수에 30분간 2회, 신선한 에탄올(99%, Samchun, Korea)에 30분간 3회에 걸쳐 가교된 HA 마이크로비드를 세척하여 미반응 잔류가교제를 제거하였으며, 세척이 완료된 마이크로비드는 60°C, 20 mmHg로 2시간 진공건조를 시행하였다[12].

건조된 마이크로비드중 일부를 채취하여 SEM(S-3000H, Hitachi, Japan)으로 비드의 분포상태와 형태, 미세다공층을 관찰하였으며 실체현미경(SV-55, SOMETECH, Korea)을 통하여 미세비드의 직경을 측정(I Solution lite System, Canada)하였다. 팽윤실험을 하기위하여 건조된 HA비드의 일부를 채취하여 중량을 측정하고 PBS(NaH_2PO_4)에 24시간 침지시킨 후 멤브레인 필터(Pore size 3.0 μm , Advantec, Japan)를 이용하여 비드만을 남겼으며 이때의 비드 중량을 측정하여 팽윤도를 구하였다. 팽윤도는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Swelling \%} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100[\%]$$

Ws : 팽윤된 비드의 무게

Wd : 건조된 비드의 무게

2. Cross linking method

실험 변수로는 가교시간(Cross Linking Time, 이하 CLTi), 가교액의 온도(Cross Linking Temperature, 이하 CLTe), 분사노즐에 유입되는 압축공기의 압력(Injecting Air Pressure, 이하 IAPr), 가교제인 DVS의 농도(DVS Concentration, 이하 DVSc)로 총 4개의 실험군을 설정하였다.

선행된 연구결과[9,12,21-24]에 의하여 각 실험군에 대하여 해당되는 변수를 제외한 기본 실험 조건은 가교시간을 5시간, 유입공기압력은 5 psi, 가교 온도: 실온, DVS 농도: 0.2 vol/%로 시행하였다. 가교시간조절 시험군은 5h, 10h,

표 1. 실험조건

Table 1. Experimental design

Classification	Cross-linking		Injecting air pressure[psi]	DVS concentration [vol%]
	Time[h]	Temperature[°C]		
CLTi	5(A), 10(B), 15(C), 20(D), 25(E)	room	5	0.2
CLTe	5	room(A), 30(B), 40(C), 50(D), 60(E)	5	0.2
IAPr	5	room	0(A), 3(B), 5(C), 7(D), 9(E)	0.2
DVSc	5	room	5	0.2(A), 0.4(B), 0.6(C), 0.8(D), 1.0(E)

15h, 20h, 25h로 구분하여 실온, 유입공기압력: 5 psi, DVS 농도: 0.2 vol%의 조건에서 가교를 시행하였다.

유입공기압력조절 시험군은 노즐로 유입되는 공기를 0 psi, 3 psi, 5 psi, 7 psi, 9 psi로 압력으로 각각 조정하여 정량펌프를 통해 노즐로 유입된 HA 수용액을 각각의 분사속도로 가교액에 낙하 시켰으며 온도: 실온, 가교시간: 5h, DVS농도: 0.2 vol%의 조건에서 시행하였다.

가교온도조절 시험군은 가교액을 각각의 온도로 예열하고 실온, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 가교 종료시점 까지 유지하였다. 가교시간: 5h, DVS농도: 0.2 vol%, 유입공기압력: 5 psi의 조건에서 시행하였다.

DVS의 농도별 시험군은 2-methyl-1-propanol에 DVS를 0.2 vol%, 0.4 vol%, 0.6 vol%, 0.8 vol%, 1.0 vol%의 농도의 가교액을 제조한 후 HA 수용액을 낙하시켰다. 온도: 실온, 가교시간: 5h, 유입공기압력: 5psi의 조건에서 시행하였다. 각각의 실험변수를 제외한 이 외의 조건 기본실험 방법과 동일하게 진행하였다(표 1).

III. 결과 및 고찰

각 실험군에서 나타난 마이크로비드의 직경은 특이하거나 규칙적인 결과는 보이지 않았고 직경의 크기가 불균일하였으며 실험군별로 관찰된 각각의 백여개의 비드중 직경이 80~150 μm 사이의 것만 결과에 포함하였고 그 이외의 직경(관찰된 직경범위: 60~240 μm)은 전체중에 약 5%를 차지하여 데이터에서 제외하고 측정된 직경의 평균을 구하였다(그림 1). 각 실험군의 결과에서도 마이크로비드의 직경에 대한 균일성은 나타나지 않았으며, 따라서 가교도와 마이크로

비드의 직경은 크게 관계가 없는 것으로 사료된다.

다수의 연구자들로 인해 발표된 기술의 결과에서 마이크로비드의 직경은 수십 μm 에서 수백 μm 의 비드가 관찰[25]되었으며 25~500 μm 의 크기로 불균일하게 나타나고 HA 분자량이 150,000~1,500,000으로 높아짐에 따라 직경의 크기가 커졌으며[26], 오일의 종류에따라 마이크로비드 직경이 106~500 μm , 1,000 μm 이상 관찰되었고 동일한 오일에서도 불균일한 직경이 나타났다[27]. 또한 HA 수용액의 농도가 높아질수록(약 120~450 μm), 가교제의 농도가 높아질수록(약 230~280 μm), 가교시 교반속도가 낮을수록(250~900 μm) 마이크로비드의 크기가 불규칙적으로 상승되었고 단, 가교제의 농도변화시 9.0 vol%에서 보다 10.0 vol%에서 크기가 감소함을 발표하였다[14].

상기한 기술들과 비교하였을 때 본 연구에서 제조하여 관찰된 HA 마이크로비드는 4가지의 모든 실험조건에서 임의 채취한 마이크로비드의 평균직경이 140 μm 이하로 형성되었으며 최소 60 μm , 최대 240 μm 로서 불균일성은 일치하지만 편차의 범위가 작고 평균적으로 미세한 마이크로비드가 관찰되었음을 보았을 때 비교적 미세하고 균일한 비드를 생성시켰다는 것을 알 수 있었다.

일반적으로 가교도가 높을수록 팽윤도는 낮아진다[12,14-15]. 본 연구에서도 각각의 실험군 에서 가교도가 높아질수록 팽윤도가 낮아졌으며 결과 대부분에서 실험조건 내에서의 가장 낮은 가교도 에서 다음단계로 가교도가 높아지는 단계에서 급격한 팽윤도의 감소가 측정되었으며 이후 가교도가 높아질수록 팽윤도가 완만한 감소율을 보이다가 평형상태로 진입 하는 것을 볼 수 있다(그림 2).

가교도의 상승에 따라 마이크로비드의 표면은 기공의 밀

그림 1. HA마이크로비드의 직경 (A) CLTi, (B) IAPr, (C) CLTe, (D) DVSc (표 1 참조)

Fig. 1. Diameter of HA microbeads. (A) CLTi, (B) IAPr, (C) CLTe, (D) DVSc show in x-axis (Refer to Table 1 for A,B,C,D)

그림 2. HA마이크로비드의 팽윤도 (A') CLTi, (B') IAPr, (C') CLTe, (D') DVSc (표 1 참조)

Fig. 2. Swelling rate of HA microbeads. (A') CLTi, (B') IAPr, (C') CLTe, (D') DVSc show in x-axis (Refer to Table 1 for A,B,C,D)

그림 3. CLTe 실험군의 다공망과 표면형태를 비교한 SEM관찰 결과 (a) 표면, (b) 실온조건에서의 내부 다공망 형태, (c) 표면, (d) 60°C 조건에서의 내부 다공망 형태

Fig. 3. SEM image of HA microbeads prepared by CLTe for compare the size of porous network and morphology of surface (a) surface, (b) inside of room temperature condition and (c) surface, (d) inside of 60°C condition

도가 높아지며 관찰되지 않는 경우도 있지만 내부에는 미세한 기공들이 개방연결형의 다공망이 높은 밀도로 치밀하게 존재하게 된다. 이것은 가교도가 기계적 강도에 미치는 요소 중에 하나이며 이런 현상과 더불어 저가교도의 마이크로비드 표면에 관찰되는 기공은 크거나 낮은 밀도를 가지며 내부 다공망 역시 고가교도보다 큰 기공의 다공망이 관찰되며 팽윤도가 높아진다는 것을 상관시키면 팽윤도와 기계적 강도는 반비례하는 것으로 상호 연관성이 높다는 것을 알 수 있다[12,14-15]. 또한 평형팽윤상태는 이들 마이크로비드를 하이드로겔화 하거나, 또는 약물적재에 있어 부피 및 약물적재량에 관계가 있으며 그것은 다공성 하이드로겔 내부에 형성된 미세공극들이 상호 개방구조로서 다공망을 이루어 속팽윤성 및 고 흡수성을 보이기 때문이다[15-18]. 이러한 다공성 하이드로겔은 물분자의 단순한 확산에 의존하지 않고 개방형 다공구조의 다공망을 통한 모세관 현상에 의하여 하이드로겔 내부로 빠른 물분자의 흡수가 가능하며 하이드로겔 부피에 의존하지 않으면서도 빠르고 높은 팽윤성을 갖는다. 따라서 본 연구에서 제조된 하이드로겔의 구성이 되는 다공성 마이크로비드는 약물전달 및 방출효과, 또는 조직공학용 담체로 사용하기에 적합하다(그림 2 and 3). 예로서, 본 연구 CLTe군에서 실온과 60°C에서 제조된 마이크로비드를 비교하였을 때 가교도가 낮은 경우 마이크로비드 표면에 많은 공극이 발생하며 내부의 다공망의 크기가 매우 큰 것을 볼 수 있고, 60°C에서 가교된 높은 가교도의 마이크로비드는 표면이 매끈한 반면 내부의 다공망은 매우 미세한 것을 볼 수 있다(그림 3).

1. Morphology of micro-beads

제작된 모든 마이크로비드는 저가교도에서 표면에 많은 기공이 관찰되었고, 가교도가 높아질수록 표면이 매끄러워지면서 기공이 관찰되지 않았으며 표면의 거칠기가 줄어드는 만큼 표면적도 감소함을 알 수 있다. 이러한 비드의 표면변화와 내부의 공극크기 변화(그림 3)는 가교도가 높을수록 팽윤도가 저하되는 현상을 잘 나타내주고 있다. 또한 비드의 형태도 완전한 구에 가까운 형상으로 변화되었다. 그

림 4에서는 CLTi실험군에서 20시간 가교를 시행한 시료로서 팽윤상태의 마이크로비드를 대표적으로 나타내었다.

2. crosslinking time(CLTi)

CLTi는 선행된 연구[12]결과를 참고하여 본 연구에서는 표 1,과 같이 5시간부터 5시간씩 간격을 두고 25시간까지 총 5종류의 시료를 제작하였다. 가교액 중에 HA 비드를 장시간 노출시키는 것으로도 가교도 상승효과가 나타났다. 팽윤도는 가교도가 증가할수록 원만한 하향곡선을 그리며 평형을 그렸다(그림 2).이러한 결과들은 화학적 가교제를 극소량 투여 하면서도 다량 투여되는 정도의 가교도를 실현할 수 있음을 증명할 수 있는 것이다.

3. Injecting Air Pressure(IAPr)

IAPr 실험군에서는 선행된 실험에서 10 psi 이상에서는 HA 수용액이 비산되어 비드의 형태가 아닌 입자 형태의 부유물들이 가교중에 엉켜 커다란 응집물로 침전되었다. 따라서 본 실험에서는 HA 수용액을 노즐에서 가교액으로 낙하시키는 공기의 압력을 표 1에서와 같이 0, 3, 5, 7, 9 psi로 각각 적용하여 HA 마이크로비드를 제조하였다. 이 조건에서는 마이크로비드의 표면이 다른 조건에 비교하여 특이한 양상을 나타냈다. 0 psi, 즉 노즐에 맺힌 HA수용액이 공급되는 속도에 의하여 저절로 낙하되게 한 조건과 본 실험에서

그림 4. CLTi 실험군 중 20시간 가교된 마이크로비드의 형태 (a) 건조된 마이크로비드의 SEM 관찰결과, (b) 팽윤 후 마이크로비드의 실제현미경 관찰결과

Fig. 4. Morphology of microbeads of CLTi, 20h (a) SEM image of dried microbeads, (b) stereo microscopic image of swollen microbeads

그림 5. IAPr 실험군의 마이크로비드에 대한 내부 다공망 SEM 관찰 결과 (a) 0 psi, (b) 9 psi

Fig. 5. SEM image of porous network on inside of HA microbeads prepared by IAPr (a) 0 psi, (b) 9 psi

의 최대공기유입량인 9 psi는 확연히 틀린 비드형태를 보였으나 3, 5, 7 psi에서는 서로 거의 유사한 형태임을 볼 수 있다.

또 다른 특이점은 본 연구의 팽윤도 결과에서 그림 3과 같이 각 실험조건에서 가교도가 높아지는 것에 반비례 하며 높은 가교도 그룹으로 갈수록 팽윤도가 감소되며 평형단계로 진입하는 양상을 볼 수 있지만 IAPr 조건에서는 0 psi의 압축공기에 의해 분사된 마이크로비드의 팽윤도는 매우 높고 3 psi로 분사된 비드는 급격하게 떨어져 7 psi까지는 완전한 감소를 보이다가 9 psi에서 또다시 급격한 감소를 보인다. 이 결과는 유입되는 압축공기가 HA 수용액이 가교액으로 낙하되는 속도와, 정량공급기에 의해 일정량 유입되는 HA 수용액이 분사노즐에 맺히는 과정에서 낙하되는 방울의 크기를 결정하는 변수임에는 틀림없으나 본 연구에서 중심이 되는 가교도에 따른 팽윤성에는 일치하지 않았다. 그러나 그림 5에서 비드의 내부에 대한 다공망의 형태와 크기를 보면 매우 미세하고 조밀하게 진행된 것을 볼 수 있으며 이 결과는 가교도에 영향을 미치고 있음을 나타내고 있다. IAPr조건에서의 가교도와 팽윤도에 대한 상관관계는 별도의 지속적인 연구를 진행할 예정이다.

4. Crosslinking Temperature(CLT_e)

CLT_e 실험군은 CLT_i에서 가교제의 투여량을 최소화 하고 유사한 가교도를 실현하도록 가교제에 대한 노출을 장시간 유지시킨 방법에 대하여 시간을 줄이고자 최소량의 가교제를 투여하면서도 가교시간을 단축시킬 목적으로 실온, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 가교를 시행 하였다.

그 결과 비드의 표면을 다른 시험군과 비교했을 때 가장 높은 가교도를 보여주었다. 비드의 표면이 가장 매끄러운 상태를 보였으며 그림 3(d)에서 보이는 다공망을 관찰하면 공극의 크기가 약 2~3 μm임을 확인 할 수 있다. 또한 팽윤도에서도 본 연구에서 진행된 4가지의 실험군에서 가장 낮게 나왔으며(그림 2) 선행연구[30]에서 실온과 40°C사이에서 급격한 팽윤저하를 나타내어 30°C 구간을 추가하여 실험한 결과 실온에서는 근소한 차이를 나타내지만 30°C 이후에는

유사한 결과가 나타났으며 평형팽윤도 진입이 가장 빨리 된 것으로 보아 실험군중 가장 높은 가교도를 보여주었다.

5. DVS concentration(DVSc)

DVSc 실험군은 일반적으로 가교제의 투여량이 높을수록 가교도가 증가하므로[28], 본 연구에서 기준점이 되는 실험으로서 각 실험군에 대한 대조군으로 사용할 목적으로 시행했다.

비드의 형태는 가교도가 증가할수록 비드의 표면이 매끄러워지며 구에 가까운 모습으로 변화되었으며 다른 실험군과 유사한 양상을 나타냈다. 팽윤도 평가에서는 완전한 하향곡선을 그리다 가교도가 증가할수록 평형을 보였다(그림 3).

IV. 결 론

모든 실험군에서 가교도와 비드의 직경은 상관관계가 없는 것으로 나타났으나 CLT_i그룹에서 다른 그룹과는 작은 직경을 갖는 것을 보았을 때 본 연구에서 선정한 제조변수 이외의 변수를 시도한다면 비드의 크기를 조절할 수 있다고 사료된다. 또한 본 연구에서 선정된 제조변수에서 도출된 결과로는 가교시간의 증가, 가교온도의 증가, 가교제의 농도증가로 비드표면의 기공은 감소하였으며 따라서 표면적도 감소하였다. 이러한 결과로 팽윤도역시 가교가 증가할수록 감소함을 알 수 있었다. 이 결과로 비드 표면 및 내부의 다공망에 대한 조밀도, 기공의 크기를 조절할 수 있었고 따라서 팽윤도 역시 조절 가능함을 시사한다. 특히 가교온도를 상승시킨 그룹(CLTe)이 뛰어난 가교효과 및 평형팽윤성을 보였으며 이 결과로서 최소량의 가교제를 투입하고도 단시간내에 높은 가교효과를 볼 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 본 연구에서 도출된 결과에 의해 가교도, 팽윤도에 따라 분해기간, 다공망의 조밀도, 기공의 크기를 조절하여 선택적인 하이드로겔의 제조가 가능하며 속방, 서방형 약물전달체 및 이 두가지 기능을 복합적으로 가진 속/서방형 약물전달체, 조직공학용 담체, 유착방지제에 응용할 수 있는 하이드로겔의 제조가 가능함을 알 수 있었다.

Reference

- [1] Chiara Schiraldi, Annalisa La Gatta and Mario De Rosa, "Biotechnological Production and Application of Hyaluronan", In *Biopolymers*; Elnashar, M., Ed.; Rijeka, Croatia, 387-412, 2010.
- [2] S.P. Zhong, D. Campoccia, P.J. Doherty, R.L. Williams, L. Benedetti, D.F. Williams, "Biodegradation of hyaluronic acid derivative by hyaluronidase", *Biomaterials*. vol. 15, no. 5, pp. 359-365, 1994.
- [3] Y. Tokita, A. Okamoto, "Hydrolytic degradation of hyalu-

- ronic acid", *Polymer Degradation and Stability*, vol. 48, no. 2, pp. 269-273, 1995.
- [4] A.M. Afify, M. Stern, M. Guntenhoner, R. Stern, "Purification and characterization of human serum hyaluronidase", *Biochem Biophys.* vol. 305, no. 2, pp. 434-441, 1993.
- [5] Oju Jeon, Su Jin Song, Kee-Jung Lee, Moon Hyang Park, Soo-Hong Lee, Sei Kwang Hahn, Sungjee Kim, Byung-soo Kim, "Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities", *Carbohydrate Polymers*, vol. 70, pp. 251-257, 2007.
- [6] Si-Nae Park, Jong-Chul Park, Hea Ok Kim, Min Jung Song, Hwal Suh, "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking", *Biomaterials*, vol. 23, pp. 1205-1212, 2002.
- [7] Yi Luo, Kelly R. Kirker, Glenn D. Prestwich, "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery", *J. of Controlled Release*, vol. 69, pp. 169-184, 2000.
- [8] Xiao Zheng Shu, Yanchun Liu, Yi Luo, Meredith C. Roberts, Glenn D. Prestwich, "Disulfid Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels", *Biomacromolecules*, vol. 3, pp. 1304-1311, 2002.
- [9] Jin-Tae Kim, Jae-Ha Choi, Deuk-Yong Lee, "Pyrogenicity of hyaluronic acid hydrogel cross-linked by divinyl sulfone for soft tissue augmentation", *Natural Science*, vol. 2, no. 7, pp. 764-768, 2010.
- [10] Sei Kwang Hahn, Jung Kyu Park, Takashi Tomimatsu, Tsuyoshi Shimoboji, "Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels", *Inter. J. of Biological Macromolecules*, vol. 40, pp. 374-380, 2007.
- [11] Kenji Tomihata, Yoshito Ikada, "Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content", *Biomaterials*, vol. 18, pp. 189-195, 1997.
- [12] Jin Tae Kim, Deuk Yong Lee, Jae Ha Choi, "Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid Microbeads", *Biomaterials Research*, vol. 14, no. 4, pp. 157-160, 2010.
- [13] A. Pourjavadi, M. Ayyari, M.S. Amini-Fazl, "Taguchi optimized synthesis of collagen-g-poly(acrylic acid)/kaolin composite superabsorbent hydrogel", *European Polymer Journal*, vol. 44, pp. 1209-1216, 2008.
- [14] Ji Young Kwon, Seong Ihl Cheong, "Synthesis and Characteristics of Hyaluronic Acid Bead Crosslinked by 1,3-Butadiene diepoxide", *Polymer(Korea)*, vol. 29, no. 5, pp. 445-450, 2005.
- [15] Chirag B. Shah, Stanley M. Barnett, "Swelling Behavior of Hyaluronic Acid Gels", *J. of Applied Polymer Science*, vol. 45, pp. 293-298, 1992.
- [16] F.A. Korkoosh, J. Brussee, J.C. Verhoef, F. Borchard, M. Rafiee-Tehrani, H.E. Junginger, "Preparation and NMR characterization of superporous hydrogels(SPH) and SPH composites", *Polymer*, vol. 41, pp. 8213-8220, 2000.
- [17] Jun Chen, Haesun Park, Kinam Park, "Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties", *J. of Biomed. Mater. Res.*, vol. 44, pp. 53-62, 1999.
- [18] Richard A. Gemeinhart, Haesun Park and Kinam Park, "Pore Structure of Superporous Hydrogels", *Polym. Adv. Technol.*, vol. 11, pp. 617-625, 2000.
- [19] Hossein Omidian, Jose G. Rocca, Kinam Park, "Advances in superporous hydrogels", *J. of Controlled Release*, vol. 102, pp. 3-12, 2005.
- [20] Hetal Patel, Minal Bonde, Ganga Srinivasan, "Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering", *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 25, no. 1, pp. 20-29, 2011.
- [21] Jin Tae Kim, Deuk Yong Lee, Jae Ha Choi, "Short Term Toxicity test of Tissue Augmentation Materials by Hyaluronic Acid Micro Bead", *Biomaterials Research*, vol. 14, no. 1, pp. 25-29, 2010.
- [22] Jin Tae Kim, Deuk Yong Lee, Jae Ha Choi, "Implanting Test of Re-hydrated Hydrogels by Hyaluronic acid Microbeads", *Biomaterials Research*, vol. 15, no. 3, pp. 125-128, 2011.
- [23] Jin Tae Kim, Jae Ha Choi, "Production and Evaluation of Hyaluronic Acid Gel for Soft Tissue Augmentation", *Biomaterials Research*, vol. 13, no. 3, pp. 105-108, 2009.
- [24] J.T. Kim, C.H. Kook, J.H. Choi, "Production Equipment and Method of Polymer Gel for Bio-Implanting", *J. of Korean Soc. of Mechanical Technology*, vol. 11, no. 3, pp. 89-94, 2009.
- [25] "Manufacturing process of cationic polymer/hyaluronic acid microbead and cationic polymer/hyaluronic acid microbead chelated with metal ion highly containing hyaluronic acid in the inside of microbead, and cationic polymer/hyaluronic acid microbead chelated with metal ion manufactured by the same" 1020110135690A, patent of Korea.
- [26] "Microbeads of natural polysaccharide and hyaluronic acid and processes for preparing the same", PCT/KR2003/001716.
- [27] "Microbead of hyaluronic acid derivatives for medical purpose and process for preparing the same", 1020070012002, patent of Korea.
- [28] J.T. Kim, D.Y. Lee, Y.S. Oh, J.W. Bang, C.Y. Hyun, T.H. Kim, "Swelling Properties for Cross-Linking Degree of Hyaluronic Acid Hydrogels", *Biomaterials Research*, vol. 17, no. 1, pp. 37-40, 2013.