

L-Proline 의 불균일계 중합

金 啓 用

漢陽大學校 工科大学 高分子工學科

(1977년 8월 16일 접수)

Heterogeneous Polymerization of L-Proline

Kea Yong Kim

Dept. of Polymer Engineering, College of Engineering,

Hanyang University, Seoul 133, Korea

〈Received August 16, 1977〉

요약 : 불균일계로 폴리펩티드를 중합할때 폴리펩티드중의 수소결합의 영향을 검토하기 위하여 proline NCA 를 극성용매인 아세토니트릴 (ACN)과 비극성용매인 벤젠용매중에서 중합하여 생성하는 poly-L-proline 의 분자형태를 적외선분광 (IR), X-선회절법 및 백광회절분산 (ORD)법으로 측정하였다.

벤젠에서 중합한 poly-L-proline 은 poly-L-proline II (PP II) 형이고 ACN 에서 중합한 것은 poly-L-proline (PP I) 형이 우세한 것으로 간주된다. 한편, PP I 은 중합률이 높은 것으로 보아서 extended chain crystal 을 형성하며 pp II 는 중합률이 낮은것으로 보아서 chain folded crystal 을 형성하는 것으로 간주된다.

결과적으로, 폴리펩티드분자쇄중에 수소 결합이 없어도 extended chain crystal 을 형성할 수 있다.

Abstract: In order to examine the effect of hydrogen bond of polypeptide in the course of polymerization, the heterogeneous polymerization of L-proline -N-carboxy anhydride (NCA) was carried out in acetonitrile and in benzene as a polar and a non-polar solvent respectively.

The conformation and structure of polypeptides were investigated by IR spectroscopy, X-ray diffraction and optical rotatory dispersion (ORD) method. The polypeptide obtained from the polymerization of L-proline NCA in acetonitrile gave predominantly poly-L-proline I (PP I) type and whereas the polymerization in benzene gave poly-L-proline II (PP II) type.

While PP I seemed to give the extended chain crystal due to a high conversion, PP II seemed to give the chain folding crystal resulting from the lower conversion.

Consequently, the extended chain crystal could be built without forming the hydrogen bond.

1. 서 론

종래에는 폴리머를 용융 또는 용매에 용해한 다음 온도차로 재결정화하여 얻은 폴리머나 폴리머 용액에 빈용매를 첨가하여 침전시켜서 얻은 폴리머를 시료로 중합과정에서 생성하는 폴리머의 구조를 연구하는 경향이 있었는데 이와 같은 방법은 용해과정과 결정화과정중 온도의 영향과 폴리머와 용매와의 상호작용때문에 구조가 변함으로 중합과정에서 생성하는 폴리머의 구조를 연구하는 좋은 방법이라고 할 수 없다. 그러므로, 필자등^{1~6}은 올리고머 단계부터 불균일제로 폴리머가 침전하는 방법으로 중합하여 생성하는 폴리머를 시료로 어떤 물리적 조작없이 그대로 구조연구를 하고있다.

아미노산무수물, *N*-carboxy- α -aminoacid anhydride (NCA)를 아세토니트릴 (ACN)중에서 개시제인 1 차아민으로 중합하면 모노머와 개시제의 비와 같은 중합도를 가진 분자량분포가 단분산성인 폴리펩티드를 얻을 수 있다². 이렇게 합성한 폴리펩티드를 IR, X-ray, NMR 및 ORD 등으로 분석한 결과 α -helix와 β -구조를 가지고 있음이 알려져있다^{7~8}. 폴리펩티드에는 분자쇄중에 카르보닐기와 아미노기가 있으므로 분자내 또는 분자간에 수소결합을 형성할 수 있다. 아미노산의 α -탄소의 수소원자 한개가 직쇄상 알킬기(-CH₃, -C₂H₅, -C₃H₇)로 치환된것, -CH₂COOH와 -CH₂CH₂COOH로 치환된 L-aspartic acid나 L-glutamic acid 또는 이들의 카르복시기이 벤질기로 에스테르화된 β -benzyl-L-aspartate나 γ -benzyl-L-glutamate 등으로 부터 중합한 폴리펩티드는 helical conformation을 형성한다^{7~8}. 그러나, L-아미노산의 β -탄소의 수소원자 두개가 알킬기로 치환된 L-valine, L-isoleucine 등은 측쇄의 입체장애 때문에 폴리펩티드의 분자내 수소결합을 가진 helix를 형성하지 못하고 분자쇄간 수소결합을 형성하여 zigzag chain conformation을 가진 나일론 6 또는 나일론 66와 유사한 구조를 형성하며 결정성장시 chain folding함으로 α -helical conformation의 폴리펩티드보다 중합도가 낮고 lamella나 구정형의 몰포로지

를 가진 결정성장을 한다⁶.

polysarcosine, poly-*N*-phenylglycine 및 poly-L-proline 등은 폴리펩티드쇄에 있는 질소원자에 수소가 없으므로 카르보닐기와 수소결합을 형성할 수 없다. polysarcosine은 ACN중에서 용해도가 커서 불균일계중합은 불가능하며, poly-*N*-phenylglycine은 phenyl기의 입체장애 때문에 중합이 어렵다. 이 셋중에서 L-proline NCA만이 불균일제로 중합이 가능하다. poly-L-proline

중에는 펩티드쇄중에 $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{N}-\text{C}- \end{array}$ 결합을 중심으로 시스구조를 가진 우선성인 나선의 poly-L-proline (PP I)과 좌선성인 나선구조이며 폴리펩티드의 $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{N}-\text{C}- \end{array}$ 결합을 중심으로 트란스구조를 가진 poly-L-proline (PP II)의 두 구조가 있다^{9~10}. PP I의 비광회전도는 아세트산에서 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +40$ 이고 PP II의 아세트산에서의 비광회전도, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -400 \sim -600$ 이다^{11~12}. Sasisekharan¹¹ 등은 PP I을 포름산, 아세트산 또는 크레졸등에 녹이면 PP II로 전이된다고 보고하고있다. Kawai¹³ 등은 NCA를 불균일제로 중합할때의 결정성장기구를 연구한 결과, α -helical conformation을 형성하는 NCA들은 extended chain crystal을 형성함으로 중합률은 거의 100%에 달하는데 비하여 β -conformation을 형성하는 NCA들은 chain folded crystal을 형성함으로 중합률은 전자보다 훨씬 낮다는것을 보고하고있다.

본연구에서는 폴리펩티드의 중합과정에서 수소결합의 영향을 검토하기 위하여 수소결합을 형성할 수 없는 폴리펩티드인 poly-L-proline의 중합과정을 검토하였다. L-proline NCA를 극성용매인 ACN과 비극성용매인 벤젠중에서 1 차아민인 부틸아민을 개시제로 불균일계중합을 시켰다.

2. 실험

2-1 시료 합성

L-proline NCA를 합성하기 위하여 L-proline 10 g를 200ml의 무수 테트라히드로푸란에서 교반하면서 45~50°C로 30분간 포스겐을 주입, 반응시켜 생성한 반응물을 감압탈용매시키고 이

소프로필에테르를 넣어 L-proline NCA의 유상 물을 용해시켰다. 여기에 트리에틸아민을 넣어 L-proline NCA에 붙어있는 염산을 탈리시켰다. 침전된 트리에틸아민 염산염은 여과하여 제거하고 여액을 -20°C 의 냉장고에서 하루동안 방치하여 생성된 L-proline NCA 결정을 아세트산에 킬-헥산과 에틸에테르-헥산의 혼합용매로 재결정하여 얻은 순수한 L-proline NCA(CI 함량 0.01% 이하)를 중합원료로 하였다.

2-2 중합

ACN과 벤젠에서의 모노머의 농도는 0.217 mol/dm^3 , 온도는 30°C 로 유지하고 중합도 $= [M]/[I]$ ($[M]$: 모노머의 몰농도, $[I]$: 개시제의 몰농도) 되게 모노머와 개시제인 부틸아민의 비율 변화하여 중합시켰다. 중합물은 유리필터로 여과하고 ACN으로 여러번 씻은다음 감압건조하여 중합수율을 계산하였다.

2-3 전자현미경 관찰

중합시료를 초음파로 ACN에 분산시키고 이것을 구리망에 부착시킨 탄소막에 분산고정시킨 다음, 30도 각도로 크롬금속을 진공증착시켜 물

2-5 IR 측정

IR-G형의 일본광학회사제를 사용하여 KBr 법으로 측정하였다.

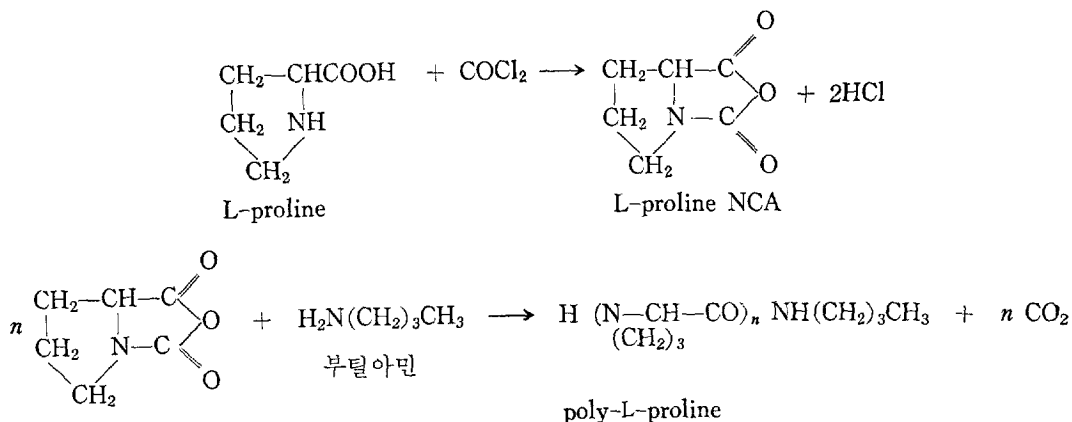
2-6 광회전분산측정

JASCO 제 ORD/UV-5를 사용하여 $589 \text{ m}\mu$ 에서 측정하였다. 광원은 Xe 등, 온도는 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 농도는 0.3 g/dl 로 하고 석영셀 10 mm 각형셀로 측정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

L-proline에 포스젠을 반응시켜 proline NCA를 만드는 반응과 이 NCA를 ACN중에서 부틸아민을 개시제로 중합할때의 반응식은 다음과 같다.

L-proline NCA를 함유한 ACN용액에 개시제인 부틸아민을 주입하면 개시반응이 일어나서 즉시 용매에 불용화된 폴리머의 백탁이 생긴다. 그런데, 개시반응은 빠르지만 초기의 반응속도는 다른 NCA보다 비교적 느려서 중합시간 180분과 360분에서의 중합률은 5.7%와 11%였고



포토지를 관찰하였다. 전자현미경은 일본전자광학회사제인 JEM-7을 사용하였다.

2-4 점도측정

아세트산을 용매로 $25 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 에서 Ubbelohde형 점도계로 측정하였다.

1주일에는 99%에 달하였다. 이와같이 개시반응이 비교적 빠르는데 비하여 초기의 중합속도가 다른 NCA보다 느린것은 1차아민인 부틸아민에 의하여 쉽게 NCA의 개환반응이 일어나지만 펩티드말단에 붙은 개시제에 의해서는 NCA의 개환반응이 비교적 느린것으로 간주된다. 역

시 벤젠용매에서도 비슷한데 NCA 에서 보다 반응이 더 느려서 반응시간 1 주일에 중합률은 70 % 이하였다.

3-2 중합체의 콘포메이션

비극성용매와 극성용매에서 불균일제로 중합한 poly-L-proline 의 콘포메이션을 검토하기 위하여 IR 측정을 하였다. Fig.1 은 중합률이 1

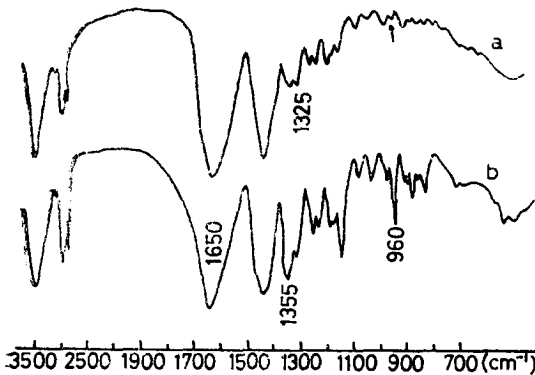


Figure 1. Infrared spectra of poly-L-proline obtained by heterogeneous polymerization ($[M]/[I]=200$)

a: Benzene
b: Acetonitrile

주일에 66 %와 99 %인 벤젠(a)과 ACN(b)에서 중합한 poly-L-proline 의 IR 스펙트럼인데 이들은 서로 다르다. 2955 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} 및 1438 cm^{-1} 의 스펙트럼은 pyrrolidine 고리의 CH_2 신축 진동에 기인되는 것으로 PP I 과 PP II 에서 다 같다¹⁴. 이 두 폴리머의 콘포메이션의 차이는 단지 1355 cm^{-1} , 1325 cm^{-1} 및 960 cm^{-1} 에서 볼 수 있다. PP I 은 1355 cm^{-1} 와 960 cm^{-1} 에서 강한 흡수스펙트럼을 나타내며 PP II 는 1325 cm^{-1} 에서 중간 정도의 세기를 가진 흡수스펙트럼을 나타내는데 이들이 무엇에 기인하는 것인지 아직 확인되어 있지 않다¹⁴. IR 측정 결과, 극성용매인 ACN 에서 중합한 poly-L-proline 은 PP I 콘포메이션이며 비극성용매에서 중합한 poly-L-proline 은 PP II 콘포메이션으로 간주된다. 초기중합물인 $[M]/[I]=4$ 로 ACN 에서 중합한 poly-L-proline 의 IR 스펙트럼 (Fig. 2. b)은 Fig. 1. b 와 같이 ACN

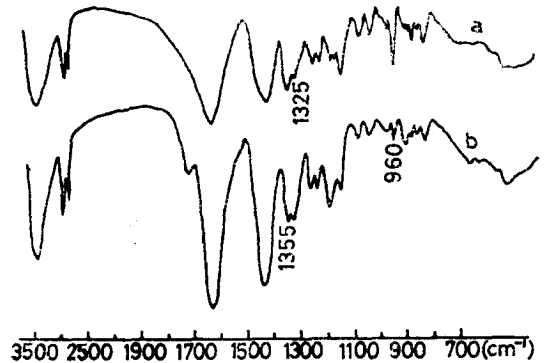


Figure 2. Infrared spectra of the poly-L-proline obtained by heterogeneous polymerization ($[M]/[I]=4$)

a: Acetonitrile
b: Benzene

에서 중합하여 얻은 분자량이 큰 poly-L-proline 과 콘포메이션이 유사함을 알 수 있다.

PP I 과 PP II 의 혼합물 또는 PP I 에서 PP II 로 전이할때의 중간단계인 PPIA 의 ACN 에서의 비광회전도, $[\alpha]_D^{25}$ 는 $-50 \sim -100^\circ$ 이다¹¹. 한편, PP II 는 PP I 을 포름산에 녹이면 즉시 PP II 로 전이하지만 크레졸이나 아세트산에 녹이면 1주일정도 있어야 완전히 전이한다¹². 그러므로, 중합한 시료를 아세트산에 녹여 즉시 비광회전도를 측정하면 poly-L-proline 의 콘포메이션을 알 수 있다. Table 1 에 모노머와 개시제의 몰비를 변화시키면서 ACN 과 벤젠에서 중합한 시료를 아세트산에 녹여 비광회전도를 측정한 결과를 나타냈다. ACN 에서 중합한 $[M]/[I]=4$ 와 200인 poly-L-proline 의 $[\alpha]_D^{25}$ 는 각각 15° 와 20° 였다. 이 값은 폴리머가 PP I 에 가까운 콘포메이션임을 반영하는 것이며 $[M]/[I]=8$ 인 때는 $[\alpha]_D^{25}$ 가 -15° 임으로 PP I 에 가까운 구조라고 생각된다. 모노머와 개시제의 몰비에 따라 중합한 폴리머의 비광회전도가 무엇때문에 틀린지 알 수 없다. 이 시료들을 아세트산에 녹이고 1주일간 방치한 다음에 비광회전도를 측정한 결과 PP II 의 문헌값과 (Table I) 비슷한 것으로 보아서 PP II 구조로 전이했음을 알 수 있다.

한편, 비극성용매인 벤젠에서 중합한 ($[M]/$

Table I. The specific rotation of poly-L-proline obtained by heterogeneous polymerization of NCA.

Initiator: n-butylamine

Monomer concentration: 0.217 mole/dm³

The ratio of monomer to initiator ([M]/[I])

[M]/[I]	Solvent of polymerization	Conversion (%)	$[\alpha]_{589}^{25^{\circ}}$	$[\alpha]_{589}^{25^{\circ}}$	η_{sp}/C^a	Form ^c
200	Acetonitrile	99.0	15	-520	0.83	I
4	Acetonitrile	82.0	20	-480	0.14	I
200	Benzene	66.0	-300	-460	0.16	II
8	Acetonitrile	49.0	-15	-440	0.11	IA
4	Benzene	87.0	-259	-280	0.21	II

a) measured immediately after the sample was dissolved in acetic acid

b) measured three weeks after the sample was dissolved in acetic acid

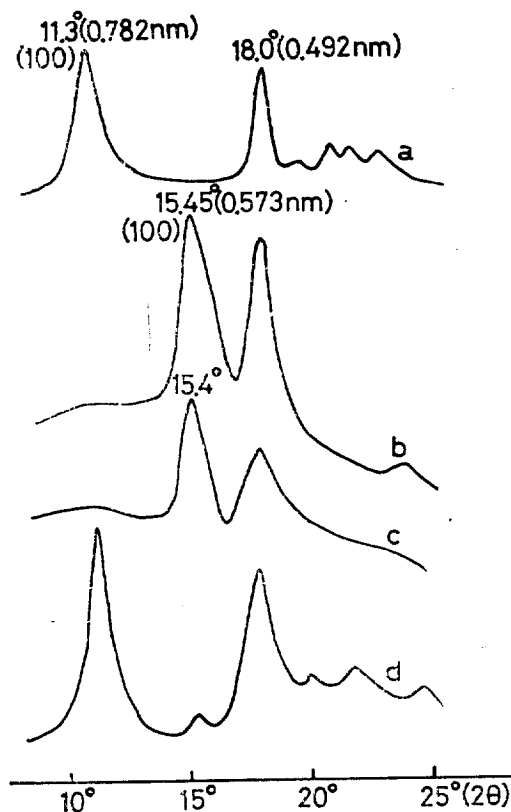
c) assumed from obtained samples

[I]=4, 200) poly-L-proline 의 비광회전도, $[\alpha]_{589}^{25}$ 는 각각 -250 과 -300 이었다. 이 시료를 아세트산에서 완전히 전이시킨후(1주일방치)의 $[\alpha]_{589}^{25}$ 는 각각 -280 과 -460 인것으로 보아서 이들의 구조는 PP II 에 가까운 구조이거나 PP I 과 PP II 의 혼합물 또는 PP I 에서 PP II 로 전이 하는 중간단계인 PP I A 로 간주된다.

3-3 중합체의 구조

중합한 poly-L-proline 의 구조를 알기 위하여 X-선 회절실험을 하였다. Fig. 3의 a는 ACN에서 [M]/[I]=200, 1주일간 중합시킨 poly-L-proline 의 분말 X-선회절도로 $2\theta=11.3^{\circ}$ 와 18.0° 는 각각 면간격이 0.782 nm와 0.492 nm로 0.782 nm는 PP I 의 helix 의 분자간 거리가 0.905 nm 인때의 (100) 면간격에 해당한다. 그런데, Traub 등⁹ 이 결정한 PP I 구조는 $P2_1$ 의 공간군을 가진 의사六방정계로 $a=b=0.905$ nm, $c=1.900$ nm, $\gamma=120^{\circ}$ 이다. 본실험에서 필름법으로 측정한 X-선회절값과 문헌값을 Table II 에 나타내었다.

Table 2에서 보는바와 같이 본실험값과 문헌값들 간에 약간의 차이가 있는것은 문헌값들은 중합한 시료를 유기용매에 녹여서 재결정한후에 필름법으로 X-선 회절 측정한 것인데 본실험에서 중합한 시료는 재결정없이 그대로 측정하였기 때문이다. 이상의 결과로부터 ACN에서 중합한 poly-L-proline(Fig. 3.a)은 PP I 구조임이 확실

**Figure 3.** X-ray diffraction curves of the poly-L-proline obtained by heterogeneous polymerization.

a, b: obtained in acetonitrile, [M]/[I]=200, 8

b, c: obtained in benzene, [M]/[I]=200, 4

Table II. X-Ray Data

d spacing, nm							
PPI ^a	PPII ^b	PPIA ^c	[M]/[I]=200 ACN*	[M]/[I]=4 ACN*	[M]/[I]=200 Benzene	[M]/[I]=8 ACN*	[M]/[I]=4 Benzene
0.784s		0.783s	0.850s	0.783s	0.850w	0.783s	0.582s
	0.576s	0.576w		0.492s	0.575s	0.579w	0.492s
	0.490s	0.496s	0.407s	0.441w	0.490s	0.492s	
0.489s		0.442m		0.406w		0.442w	
0.449w		0.410m		0.390w	0.370w	0.406w	
0.406w		0.390w		0.362w		0.362w	
0.364w	0.365m	0.362m					
0.294w							
0.270w							
	0.275m	0.292m					
0.259w	0.271m						
0.234w	0.245vw						
0.214w	0.228vw						
	0.215m						

*) Acetonitrile

a) Data of Traub and Shmueli

b) Data of Sasisekharan

c) Data of Steinberg and Sasisekharan

s: strong

w: weak

vw: very weak

하다.

벤젠용매에서 $[M]/[I]=200$ 으로 중합한 시료의 X-선회절피크(Fig. 3. b)는 $2\theta=15.45^\circ$ 와 18.0° 에 강한 피크를 나타내고있는데 이것은 Cowan 등¹⁵의 분말법에 의한 PP II의 X-선회절값과 일치한다. 그에 의하면 PP II는 六방정제로 $a=b=0.662$ nm, $c=0.936$ nm 인데 본실험에서 측정한 $2\theta=15.45^\circ$ 는 0.573 nm 로 이값은 0.662 nm 가 PP II의 helix의 분자간거리인데 (100) 면 간격에 해당하는것이므로 ACN에서 중합한 poly-L-proline 이 PP I 인 것처럼 벤젠에서 중합한 poly-L-proline 은 PP II 구조로 간주된다. Fig. 3. d의 피크는 ACN에서 $[M]/[I]=8$ 로 중합시킨 시료의 X-선회절피크인데 PP I 을 반영하는 11.3° 에 강한 피크와 PP II 를 반영하는 피크인 15.4° 부근의 약한 피크가 있는것으로 보아서 PP I 과 PP II 가 혼합된 구조이거나 PPIA 구조를 나타내는것으로 생각되는데 이것은 ORD 측정 결과와 일치한다.

3-4 중합체의 물포로지

Fig. 4 와 Fig. 5 는 ACN에서 중합한 $[M]/[I]$

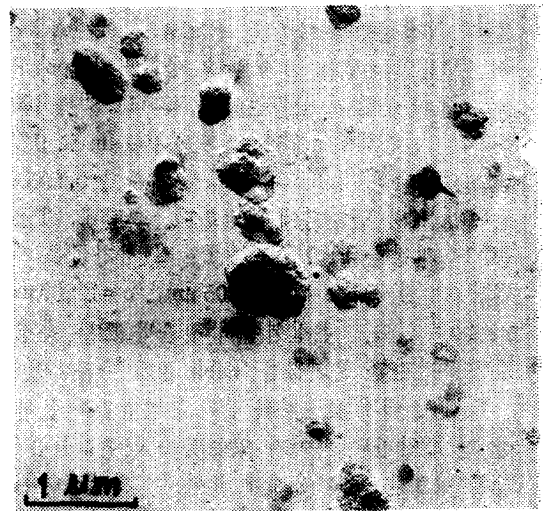


Figure 4. An electron micrograph of poly-L-proline crystals formed during the heterogeneous polymerization in acetonitrile. $[M]/[I]=4$

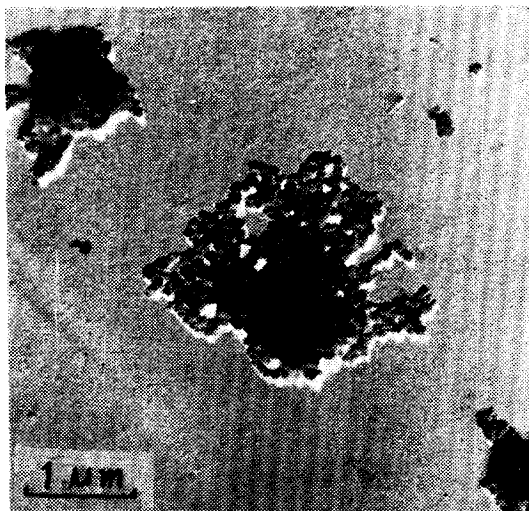


Figure 5. An electron micrograph of poly-L-proline crystals formed during the heterogeneous polymerization in acetonitrile. $[M]/[I]=200$

=4 와 200 인때의 poly-L-proline 의 전자현미경 사진이다. 이들은 hexagonal 의 모양을 가진 작은 결정들이 무수히 겹쳐서 두터운 lamella 로 되어 있는데 두께는 수백 nm 의 길이를 가지고 있다. L-alanine NCA 를 ACN 에서 중합할때 poly-L-alanine 의 분자쇄가 lamella 면에 대하여 수직 방향으로 성장되는것처럼¹³ PP I 의 섬유축방향이 lamella 면에 수직인것¹²을 적용하면 ACN 에서 불균일계로 중합한 poly-L-alanine 이 100 %에 가까운 중합률을 가져오는 것으로 보아서 poly-L-proline I (PP I)에서도 poly-L-alanine 의 구조 발생때와 같이 extended chain crystal 을 형성하면서 결정성장쇄말단이 생성하는 결정의 lamella 사이 또는 결정내에 침몰함이 없이 결정이 성장하는 것으로 간주된다. 그러나, 벤젠에서 중합한 poly-L-proline (PP II 로 간주됨)은 polyglycine 이나 poly-L-valine 의 결정성장에서처럼 성장분자쇄가 chain folding 이 일어나기 때문에 중합과정에서 분자쇄말단이 lamella 또는 이미 생성한 결정내에 침몰되어 모노머와 반응하지 못하고 정지반응이 일어나기 때문에 중합률은 66 %밖에 안되는 것으로 간주된다. Fig. 6 에서 보는바와 같이 벤젠에서 중합한것은 ACN 에서 중합한

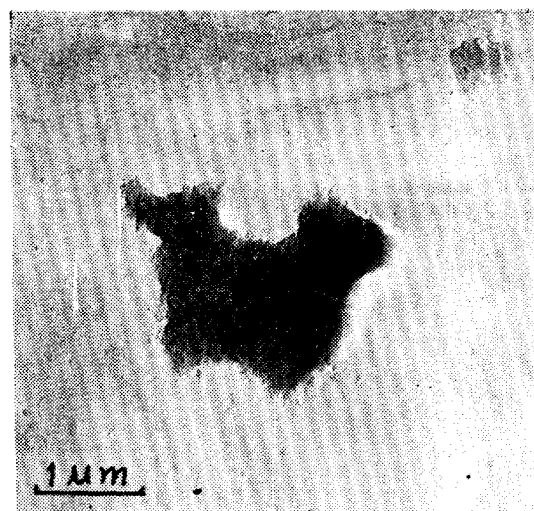


Figure 6. An electron micrograph of poly-L-proline crystals formed during the heterogeneous polymerization in benzene. $[M]/[I]=4$

poly-L-proline 의 몰포로지와는 틀리는 구상으로 된 피상의 형태를 나타내고 있으며 결정성도 낮은 것으로 보인다.

이상의 결과로부터 L-proline NCA 를 비극성 용매와 극성용매에서 중합할때 생성하는 폴리머의 구조가 상이한것은 폴리머와 분자간에 작용이 있는것으로 간주된다.

poly-L-alanine 이나 poly(gly-L-ala)의 중합 과정에서처럼 성장분자쇄 단면적이 크면 extended chain crystal 을 형성하고 반대로 작으면 chain folded crystal 을 형성할 수 있다는 설을^{5,6,7,13} 적용하면, ACN 에서 중합한 poly-L-proline 의 PP I 구조는 helix 분자간거리가 $9.05 \text{ \AA}$ 이므로 (100) 면간격은 $7.82 \text{ \AA}$ 이 되기 때문에 결정중에서 분자쇄 한개의 단면적은 약 $71 \text{ \AA}^2$ 이되고 PP II 에서의 helix 분자간거리는 $6.62 \text{ \AA}$ 이므로 (100) 면간격은 $5.73 \text{ \AA}$ 이되어 분자쇄단면적은 약 $38 \text{ \AA}^2$ 이 됨으로 단면적이 큰 PP I 구조는 extended chain crystal 을 형성하며 반대로 작은것은 chain folded crystal 을 형성하게 될것이다. 이상과 같이 수소결합을 형성할 수 없는 poly-L-proline 의 결정성장과정에서도 수소결합을 형성할 수 있는 다른 폴리펩티드에서처럼 성장분자쇄의 단면적이 크면

extended chain crystal 을 형성하여 중합률은 100 %에 가깝게되고 이와는 반대로 성장분자쇄 단면적이 작으면 chain folding 하여 중합률은 낮아지는 것으로 간주된다.

인 용 문 헌

1. M. Iguchi, H. Kanetsna, T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **128**, 63 (1969)
2. Y. Iwakura, K. Uno, M. Oya, *J. Polym. Sci.*, **A-1**, **5**, 2867 (1967)
3. Y. Iwakura, K. Uno, M. Oya, *J. Polym. Sci.*, **A-1**, **6**, 2165 (1968)
4. T. Komoto, K. Y. Kim, Y. Minoshima, M. Oya and T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **168**, 261 (1973)
5. K. Y. Kim, T. Komoto, R. Katakai, M. Oya and T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **176**, 373 (1975)
6. T. Komoto, K. Y. Kim, M. Oya, T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **175**, 283 (1974)
7. C. H. Bamford, A. Elliott, W. E. Hanby, "Synthetic Polypeptides", Academic Press, New York, 1956
8. G. D. Fasman, "Poly- α -amino Acids", ed., G. D. Fasman, Marcel Dekker, Inc., New York, U. S. A., (1967)
9. W. Traub and U. Shmueli, "Aspect of Protein Structure", p.81, ed., G. N. Ramachandran, Academic, New York, (1963)
10. P. M. Cowan and S. McGavin, *Nature* **176**, 501 (1955)
11. V. Sasisekharan, *J. Polym. Sci.*, **47**, 373 (1960)
12. J. C. Andries and A. G. Walton, *Biopolymers*, **8**, 523 (1969)
13. T. Kawai and T. Komoto, *Kobunshi*, **250**, 22 (1973)
14. E. R. Blout and G. D. Fasman in Recent Advan. Gelatin Glue Res., Proc. Conf. Univ Cambridge, 1957, **1**, 122 (1957)
15. P. M. Cowan and S. McGavin, *Nature*, **176**, 501 (1955)