

단백질에 대한 그라프트 공중합(제2보). 세리신의 분리,
정제 및 아크릴로니트릴의 그라프트 공중합

趙 義 煥 · 金 光 蓮

한국과학원 화학 및 화학공학과

(1976. 4. 13 접수)

Graft Copolymerization to Proteins(II). Separation
and Purification of Sericin, and Its Graft
Copolymerization with Acrylonitrile

Iwhan Cho and Kwang-Kun Kim

Department of Chemical Science, Korea Advanced Institute of Science,
Seoul, Korea

(Received April 13, 1976)

요 약. 누에고치로부터 온수로 추출된 세리신을 Sephadex G-75와 G-150을 사용하여 25°C와 70°C의 두 온도에서 겔 여과함으로써 분자량 분포를 조사한 결과, 온수추출 세리신의 분자크기에 따른 분포는 가열시 가수분해를 고려한다면 한가지 프랙슨임이 밝혀졌다.

수용성 단백질인 세리신과 아크릴로니트릴의 공중합반응에서 세리신/아크릴로니트릴/물-계는 균일계를 이루며 개시제로서는 단백질에 대하여 효과적이라고 알려진 ceric ammonium nitrate를 사용하였다. 개시제 농도가 증가함에 따라 공중합체의 수득량도 증가하나 어느 특정농도 (0.03 M 세륨염)에서 최대 수득량을 주고 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 세리신 농도의 증가, 아크릴로니트릴 단위체 농도의 증가에 따라서는 일반적으로 공중합체의 수득량도 증가하였다.

그라프트 공중합체의 확인과 조성은 주로 IR 스펙트럼에 의하였고 그라프트율은 200% 내지 1,900%의 넓은 분포를 보였다. 공중합체의 세리신 부분을 가수분해한 후 그라프트된 아크릴로니트릴 중합체의 분자량을 측정된 결과 약 7,000 정도였다.

ABSTRACT. An efficient separation method and the utilization of sericin are searched. Sericin was extracted with hot water from cocoons under atmospheric pressure. The separated sericin was gel-filtrated with Sephadex G-75 and G-150 at room temperature and at 70°C. The results indicated that sericin is consisted of only one fraction in elution diagram.

In the graft copolymerization of acrylonitrile to sericin ceric ammonium nitrate was chosen as an initiator. A maximum yield was obtained at certain concentration of the initiator confirming our previous experiments. Viscosity measurement of alkali-hydrolyzed graft copolymers indicated that the polyacrylonitrile graft had the molecular weight in the range of 7,000.

1. 서 론

세리신은 누에의 중부 견사선에서 분비되는 두정형의 구상단백질이며 비단의 제직, 계편사 피브로인의 보호역할을 하는 정도의 것으로 알려져 왔다. 세리신에 관한 연구로서는 과거에는 주로 고치의 폴립새와 관련해서 세리신과 계면활성제의 상호작용, 세리신용액의 안정도에 미치는 이온세기의 영향, 세리신의 정착등이 연구보고 되었으며¹⁻³ 세리신 분자 자체에 관한 연구는 거의 없었다. 최근에 石川등이 적외선 분광분석, DTA, X-ray 등을 사용하여 관심을 보이는 정도이다⁴⁻⁶. 한편 세리신 프랙손에 관한 연구도 여러 방면에서 시도되어 왔으나⁷⁻¹⁰, 분자량 분포를 조사한 예는 없었다.

본 실험에서는 Sephadex G-75 와 G-150 으로 분자량 분포를 조사하였으며 세리신 분자의 성질변형을 위해 AN과의 그래프트 공중합 반응을 시도했다. 개시제로서는 단백질에 대하여 효과적이라고 알려진 ceric ammonium nitrate (CAN) 를 사용했다. 세륨(Ce^{IV}) 이온은 강한 일전자 산화제로서 산화 중간과정에서 생성된 자유 라디칼이 중합을 개시하게 된다^{11, 27}.

세리신/아크릴로니트릴/물은 균일계를 이루며 개시제, 단위체 및 세리신 농도가 전 수득량에 미치는 영향을 조사하였다. 과거 비단의 개질을 목적으로 피브로인의 화학반응은 많이 연구되어 왔는데¹¹, 본 연구에서는 이러한 실험을 세리신에 적용하여 보았으며 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

2. 실험

2.1. 세리신의 분리

누에고치 (1974년도 춘잠견)을 약 4 × 4 mm 크기로 썰은 후 삼각플라스크에서 50배량의 증류수에 넣고 80 ± 5 °C로 48시간 삶는다. 이액을 여과한 후 여액을 -17 °C 이하로 15시간 이상 방치해 둔다. 얼린 세리신용액을 녹이면 세리신이 침전하는데, 이 침전을 진공하에서 동결 건조시켜 분말화하였다. 이렇게 하여 얻은 세리신 시료는 담황색을 띤 분말이었다.

2.2. 겔 거르기(Gel Filtration)

기구 및 재료. Sephadex G-75, G-150은 Pharmacia (Uppsala, Sweden)제품을 사용 하였고, 칼럼은 파이렉스 유리관 (1.2 × 60 cm)을 사용하였다. Fraction collector로는 Buchler Fractotomette 200을 사용했으며 자외선 분광기는 Varian Cary 17 spectrophotometer를 사용하였다. 한편 용리액(eluant)은 0.03 M NaCl을 포함하는 0.02 M tris-HCl (Merck 제품)로써 완충용액을 제조하여 사용하였다 (25 °C에서 pH 9.05, 70 °C에서 pH 8.3). 시료용액은 시험관에 약 4 ml의 완충용액(eluant)을 넣고 분말 세리신을 과잉량 넣어 80 °C에서 한시간 녹인다음 침전을 원심분리기에서 분리한 후 상층액만 2 ml 취해 사용했다.

실험방법. Sephadex G-75를 약 5 배량의 용리액에서 자석젓개로 서서히 저어주며 하룻밤 평운시킨 후, 겔을 칼럼에 충전시켰다. Gel bed의 균일성을 blue dextran 2,000용액 (2 mg/ml의 농도)으로써 조사한 후, 시료 용액을 gel bed 위에 조심스럽게 엷는다. 이때 시료 용액의 양은 gel bed 부피의 20% 이내였다. 칼럼에 계속 용리액을 통과시켜 세리신을 용리시켰다. Sephadex G-150을 사용한 경우 흐름속도를 조금 느리게 하였다.

용리온도를 70 °C로 하였을 경우 칼럼의 온도를 유지하기 위하여 자켓을 장치하여 항온조로부터 온수를 계속 통과시켰다. 겔의 충전도가 가능하면 70 °C의 조건하에서 행하였다. 통과된 용리액을 분석하기 위하여 4 ml 단위로 용액을 채취하여 자외선 파장 276 nm의 흡광도를 측정하였다.

2.3. 그래프트 공중합 반응

기구 및 시약. Acrylonitrile (AN) 단위체는 히드로퀴논을 가하여 중류하였고, CAN은 영국 B.D.H. 제 분석용 시약을 사용하였다. 세리신은 위에서 기술한 분말 시료를 사용하였다. 적외선 분광기는 Perkin-Elmer Model 267을 사용하였다.

실험방법. 대표적인 반응예를 들면, 먼저 항온조를 60 ± 1 °C로 유지시킨 후 앰플에 45 ml의

물과 세리신 0.110 g을 넣어 균일용액을 만들었다. 다음에 0.1 M 농도로 희석시킨 질산 9 ml와 AN 1 ml를 넣은 후 고무 마개로 앰플 입구를 막고 항온조에 넣어 가열하면서 15분간 질소 가스를 통과시켰다. 그후 CAN 1.208 g을 2 ml의 물에 녹여서 (2.4 ml가 됨) 주사기로 1 ml를 취해 앰플에 주입했다. 주입과 동시에 앰플을 흔들어서 주고 계속 질소 가스를 통하면서 3시간 동안 반응시켰다. 중합반응이 진행하면서 서서히 연한 황색의 침전이 생성되었다. 반응이 끝난 후 침전물을 70°C 온수로 5시간 이상 세리신을 용출시킨 후 1% Na₂CO₃로 한시간 삶고 다시 70°C 온수로 3, 4회 세척하였다. 이렇게 세리신을 제거한 그라프트 공중합체를 DMF에 0.2% 중량비로 섞어 하루 이상 팽윤 용출시키고 진공건조기(약 1 mmHg)에서 건조시켰다. 측정된 그라프트 공중합체의 무게는 0.4121 g이었다.

그라프트 공중합의 확인 및 그 공중합체 조성의 분석. DMF에서의 용해도를 보면 호모 아크릴로니트릴 중합체 (PAN)는 잘 용해하나, 공중합체는 용해하지 않고 분산된 입자로 남아 있었다. 적외선 스펙트럼을 조사하여 보면 호모 PAN에서의 니트릴 흡수띠 (2,250 cm⁻¹)와 세리신에서의 아마이드 I과 II 흡수띠 (1,660과 1,525 cm⁻¹)가 모두 분리된 공중합체의 스펙트럼에서도 명백함으로 그라프트 공중합 되었다고 보았다.

공중합체 조성의 분석은 세리신과 PAN을 적당량 혼합한 다음 KBr 정제법으로 적외선 스펙트럼을 얻고 카르보닐 흡수띠 (A_{CO})와 니트릴 흡수띠 (A_{CN})의 흡광도비 (absorbance ratio: A_{CN}/A_{CO})를 비교하여 PAN 함량을 base line density 법¹²으로 계산하였다.

점성도 측정. 세리신-PAN 그라프트 공중합체 물 20% 염산으로 110±3°C에서 30시간 가열하여 세리신을 가수분해시킨 다음 알카리로 중화시켜 생긴 침전을 진공건조기에서 건조시켰다. 이것을 질산(60%) 10 ml에 50 mg씩 용해시켜 20°C와 50°C에서 점성도를 측정하였다. 가수분해시키지 않은 그라프트 공중합체의 경우는 4% LiBr-DMF용액 10 ml에 0.36 g의 중합체

시료를 가하여 기름중탕에서 100°C로 48시간 가열한 후 용해된 시료는 25°C에서 점성도를 측정하였다. 점도계는 Cannon-Fenske 형을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세리신의 분리

본 실험에서는 세리신을 80°C의 증류수에서 48시간 추출 하였는데, 이것은 세리신의 용해도가 60°C를 경계로 급격히 증가한다는 것¹³과 세리신의 변성을 고려하여 택하였다. 그러나 추출된 세리신의 파괴와 분해가 예상되며 섬유 피브로인도 소량 분해되어 있을 것으로 생각된다¹⁴. 이렇게 온수 추출한 세리신용액에서 세리신만을 수집하는 데는 알코올에 의한 침전석출법, 전기투석법 등이 있으나 본 실험에서는 동결건조법을 썼다¹⁵. 이 방법에 의하면 90% 이상의 세리신을 수집할 수 있었으며 팽윤 다공질의 세리신을 얻을 수 있다. 여기서 얻어진 세리신은 약한 황색분말이며 셀로판 막 투석으로 정제를 시도했으나 약간의 색소가 추출되었을 뿐 순백색의 세리신 시료는 얻지 못하였다.

3.2. 겔 거르기

Sephadex G-75에 의한 겔 거르기. Fig. 1에서 보면 V₀ (void volume)가 17.2 ml인데 V_e (elution volume)는 25.8 ml이다. Sephadex G-75의 분리영역이 분자량 3,000~70,000이며 세리신의 분자량은 약 20,000정도^{16,17} 라고 알려져 있으므로 V_e가 V₀보다 큰 것은 당연하다. 또한 V_t (total bed volume)를 지난 후 516 ml에서 작은 피크가 한개 더 나오는데 이것은 세리신 분자의 가수분해물이 겔과 결합했다가 서서히 용리된 것으로 여겨진다. 세리신 폴리펩티드체의 가수분해 현상은 이미 보고된 바 있으며 그 근거로서는 세리신의 아미노산 조성¹⁸에서 알 수 있듯이, Asp, Glu 같은 산성아미노산 잔기를 풍부히 가지며 적으나마 His, Lys, Arg 같은 염기성 아미노산 잔기를 갖고 있고 말단기로 카르복실기와 아민기를 가져 산 가수분해나 알카리 가수분해를 할 수 있기 때문이다. 이 같은 폴리펩티드체의 가수분해 현

상은 수용성 단백질인 젤라틴이나 콜라겐 등에서도 볼 수 있다. 70°C에서도 V_0 는 25.8 ml 였으나 뒤의 피크는 353 ml에서 용리됨으로써 25°C에서 보다 빨랐다. 이것은 온도가 단백질 분자의 공간채우기 성질 (spacefilling property) 및 겔의 팽윤 정도에 미치는 영향이 큼을 의미하며 뒤의 피크가 높은 온도에서 빨리 용리되는 직접적 원인은 단백질 분자 사슬의 꼬임이 풀어져서 분자의 실제 크기가 커진데도 원인이 있으리라 여겨진다¹⁹.

Sephadex G-150에 의한 겔여과. Fig. 2에서 보면 V_0 가 76 ml인데 비해 V_e 는 148 ml이며 피크는 G-75에 비교해서 넓다. 이것은 G-150의 분리 영역이 분자량 5,000~400,000이어서, 분자가 구멍 (pore) 크기에 비해 작음으로 겔 내부에 쉽게 침투하여 상당히 지연될 수 있고 gel

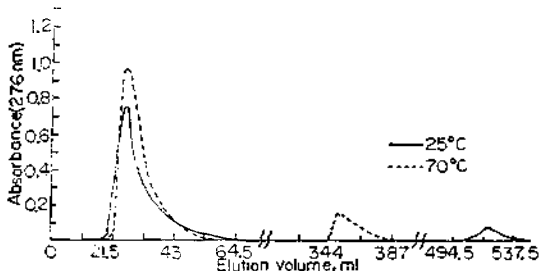


Fig. 1. Elution diagram of sericin on Sephadex G-75 at 70°C and at 25°C. Bed dimensions 1.2×46 cm, eluant 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 9.05 at 25°C, pH 8.3 at 70°C) with ionic strength 0.03. Flow rate 0.74 ml/min.

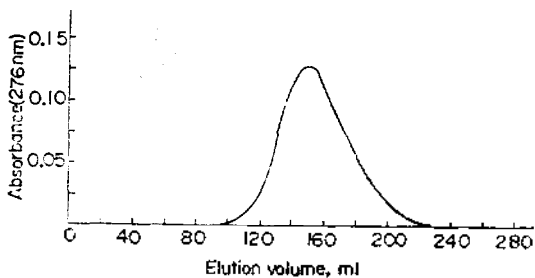


Fig. 2. Elution diagram of sericin on Sephadex G-150 at 25°C. Bed dimensions 2.2×36 cm, eluant 0.02M tris-HCl buffer (pH 9.05 at 25°C) with ionic strength 0.03, flow rate 20 ml/hr.

bed의 부피가 커져서 넓게 된 것으로 생각된다. 한편 뒤의 피크가 안보이는 것은 흡착이 심해서 빠져 나오지 않았거나 UV에 검지되지 않을 정도로 분산되어 버린 듯 하다.

지금까지 세리신 프랙손에 관한 연구는 Shelton과 Johnson⁷, Mosher⁸에 의해 A, B 등의 프랙손으로 나누어져 있다고 알려졌으나, 高¹⁰는 세리신 A, B의 아미노산 조성을 조사해서 이들의 아미노산 조성이 같은 것을 알았다. 본 실험에서는 온수추출 세리신의 분자량 분포를 겔 여과로서 조사해 본 결과 소량의 가수분해물을 고려하면 프랙손은 역시 하나라고 믿어진다.

3.3. 세리신-AN 그래프트 공중합

CAN 농도의 전수득량에 대한 영향. CAN 농도에 대한 전수득량의 변화를 Fig. 3에 나타냈다. 여기서 전수득량과 호모 중합체를 제외한 공중합체만의 수득량은 같다고 볼 수 있었다. 이것은 Rao²⁰나 Mino²¹ 등의 Ce^{IV} 염개시에 의한 균일계에서의 실험에서도 인정된 바 있다. 한편 본 실험에서 반응속도와 무게 생성량이 비례한다면 반응속도론적 연구에서 알려진 바와 같이²⁷ CAN 농도에 따른 최대수득량이 존재할 것이라 생각하고 실험한 결과 Fig. 3에서와 같이 0.03 M의 CAN 농도에서 최대수득량이 얻어졌다. 이러한 현상은 鈴木²²와 宋²³ 등이전 피브로인의 그래프트 공중합반응에서도 지적한 바 있다. 또 전수득량은 공중합체의 그래프트율과도 비슷한 경

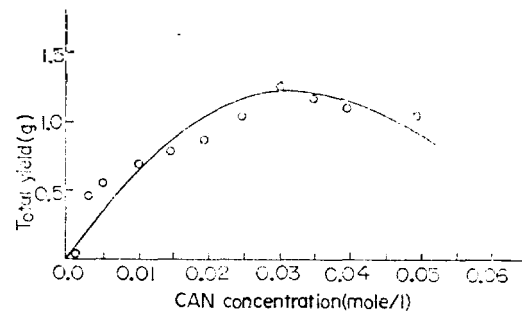


Fig. 3. Influence of CAN concentration in graft copolymerization of acrylonitrile to sericin. Reaction condition: sericin 0.16%, AN 2.19%, HNO_3 0.013 M total volume 55.5 ml (density=1.0), temperature $60^\circ \pm 1^\circ C$, time 5.5 hrs.

향을 보인다. 즉 Table 1에서 보여주는 바와 같이 시료 2, 5, 7, 9의 PAN과 세리신의 무게 퍼센트를 비교하면 83, 95, 93, 83 %의 PAN함량을 보이는데 실험 오차를 생각한다면 비슷한 경향이라는 점을 알 수 있다.

AN 농도의 영향. AN 단위체의 농도가 증가하면 수득률도 증가하는 경향을 보였으며 CAN 농도가 낮을 때는 반응 속도가 단위체 농도의 3/2승에 비례한다고 생각되므로²⁷ Fig. 4에서도 비슷한 경향을 알 수 있다. 한편 생성물에서 호모 중합체를 DMF로 용출한 후 무게를 검사하였던 바 약간의 무게의 감소는 있었으나 전수득량과 거의 같은 경향을 보였다.

세리신 농도의 영향. Fig. 5에서 세리신 농도를 0 %에서 0.6 %까지 변화시켰을 때 CAN 농도를 0.03 M로 하면 직선관계를 나타내었는데, 이는 본 연구 제 3보의 메카니즘과 잘 일치하는 결과이다²⁷. 한편 세리신이 없는 경우, 즉 호모 중합반응에서는 전 수득량은 직선에서 크게 벗어나서 소량이 생성되었다. 이것은 Mino와 Kaizermann²¹의 보고에서와 같이 Ce^{IV} 염은 유기환원체가 없을지라도 AN의 중합을 개시하지만 더 긴 유발기간을 가질 것이므로 같은 시간에 소량의 중합체가 생긴 것이라 생각된다.

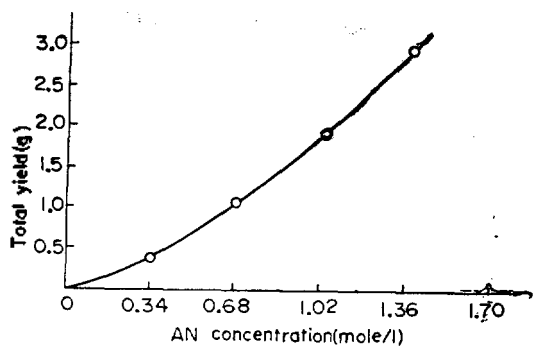


Fig. 4. Effect of acrylonitrile concentration on the cation initiated graft copolymerization of acrylonitrile to sericin. Reaction condition: sericin 0.109 g/sample, CAN 0.0164 M, HNO_3 0.1 M solution 9 ml, total volume 56 ml temperature $60 \pm 1^\circ C$, time 3 hrs.

그라프트 공중합율. 앞에서 기술한 적외선의 흡광도 비를 이용하여 여러가지 시료에 대하여 PAN 함량과 그라프트율을 계산한 것이 Table 1에 표시되어 있다. 여기서 보면 PAN 함량은 대개 65~95 % 정도이고 그라프트율은 200 % 내지 1,900 % 가량 되었다. 이것은 건 퍼브로인과의 공중합에서 그라프트율이 대개 100 % 미만인 것과 비교해서 대조적이다¹¹. 즉 세리신은 퍼브로인과 달리 수용성 단백질이어서 물에서 극히 잘 팽윤되고 대부분이 용해된 균일체를 이룬다. 따라서 단위체와 개시제가 쉽게 침투해서 들어갈 수 있고 반응후 표면에 호모 PAN이 축적되지도 않아서 개시제 각 분자가 대부분 세리신에 라디칼을 형성하고, 이 라디칼은 즉시 주위에 산재하는 단위체와 반응을 일으키는 것으로 보이며 이렇게 생긴 중합체중 그라프트된 PAN은 물에 불용이므로 침전으로 가라 앉는다.

그라프트 공중합체와 가지 PAN의 점성도 측정 및 분자량. AN 단위체만을 Ce^{IV} 염 개시로 중합하여 (중합조건: H_2O 35 ml, AN 2.5 ml (0.81 M), HNO_3 0.1 M 용액 9 ml, CAN 0.7g (0.027 M), 반응온도 $60 \pm 1^\circ C$, 반응 시간 2 hrs) 얻은 호모 PAN을 $20^\circ C$ 의 50 % HNO_3 수용액에서 점성도를 측정할 결과 0.5 g/dl 농도에서 inherent viscosity는 0.60이었다. 여기서 inherent viscosity를 intrinsic viscosity로 보고 분자량

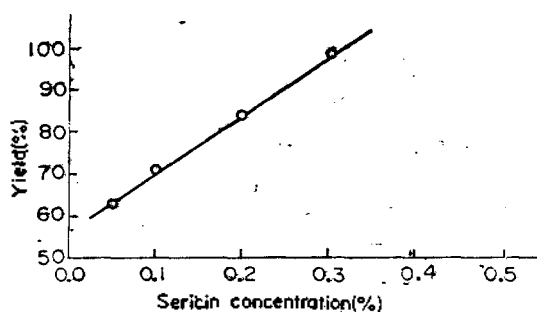


Fig. 5. Effect of sericin concentration on the cation initiated graft copolymerization of acrylonitrile to sericin. Reaction condition: CAN 0.03 M, AN 1.5 ml, H_2O 35 ml, HNO_3 0.1 M solution 9 ml, total volume 46.5 ml, temperature $40^\circ C$, time 3 hrs.

Table 1. Weight percentage of PAN in representative samples and their percent degree of grafting.

Sample No.	A_{CN}^*	A_{CO}^*	Ratio of A_{CN}/A_{CO}	PAN(%)	Degree of grafting (%)
2	0.173	0.291	0.597	83	488
5	0.107	0.121	0.881	95	1900
7	0.182	0.222	0.822	93	1330
9	0.154	0.246	0.640	83	488
61	0.101	0.233	0.434	67	203
63	0.181	0.044	0.416	66	194
64	0.150	0.266	0.563	79.5	389
42	0.191	0.261	1.095	85	566

* A_{CN} , A_{CO} : IR absorbance at $2,240\text{ m}^{-1}$ and at $1,660\text{ cm}^{-1}$.

을 계산하여 보면 ($K=3.07 \times 10^{-4}$, $a=0.747$ in Mark-Houwink Equation²⁶) 약 25,500이 된다.

한편 세리신 가수분해 후의 그래프트 PAN은 20°C 의 60% HNO_3 수용액에서 약간의 침전이 생기고 50°C 로 가열하면 녹아서 진용액이 되는 데 그 이유로서는 가수분해 과정에서 화학변화가 일어났거나 세리신의 가수분해가 완전히 못 되어 잔류 세리신의 용해도 차이에 의한 침전 생성이 아닌가도 여겨지나 확인하여 보지는 못하였다.

따라서 본 실험에서 그래프트 PAN의 분자량을 확인하기 위하여 Mark-Houwink Equation에서 a 값은 온도에 따라 큰 변화가 없고 K 값만이 변한다고 생각하여 50°C 에서 측정된 PAN의 inherent viscosity와 20°C 에서 계산한 PAN의 분자량으로부터 50°C 에서의 K 값을 계산하여 ($K=2.615 \times 10^{-4}$) 가지 PAN의 분자량을 추측했다. 즉 Table 2로 부터 가지 PAN의 50°C 에서의 inherent viscosity를 0.20이라 가정하면 가지 PAN의 분자량은 약 7,300이 된다.

세리신의 분자량은 20,000 정도라고 알려져 있으므로¹⁶, 그래프트 PAN의 분자량을 7,300이라 보고 공중합체의 PAN 함량을 85%라고 본다면 세리신 한분자에 15.5개의 PAN 가지가 붙은 것으로 계산된다. 대부분의 공중합체는 어떠한 용매에도 용해되지 않고 팽윤될 뿐인데 이는 이 공중합체가 이 많은 가교결합을 하고 있기 때문이라고 여겨진다. 즉 개시제인 CAN의 농도가 낮을 때는 AN의 중합은 작지음으로 종결될 것

Table 2. Inherent viscosity* of some samples at 50°C .

Sample No.	Degree of grafting (%)	η_{rel}	η_{inh}
Homo-PAN	—	1.29	0.51
3	—	1.11	0.22
5	1900	1.10	0.18
8	900	1.10	0.18
9	488	1.07	0.13

*Solvent: 60% aq. HNO_3

이며 이는 세리신 분자들이 그래프트 PAN에 의하여 가교 결합이 되는 결과를 가져온다. 또한 CAN은 산화제이므로 그 농도가 클 경우 세리신의 산화에 의한 가교 결합도 생각할 수 있다. 여기서 지적할 것은 개시제의 농도가 매우 적을 경우 ($<0.003\text{ M}$)엔 소량의 공중합체를 얻게 되는데, 이러한 시료는 4% LiBr/DMF 용매에 용해됨이 관찰되었다.

세리신 분자량의 조절, 그래프트 길이의 조절 등은 앞으로 계속하여 저자의 연구실에서 추구될 것이다.

IV. 결 론

결 여과에 의한 세리신분자의 분자량 분포는 한 가지 프랙슨이었으며 소량의 가수분해물(분자량 5,000이하)이 존재했다. 분리는 상온보다 70°C 에서 더 잘되었고 온도 상승에 따라 흡광도가 증가되었다. CAN 개시에 의한 세리신/AN의 그래프트 공중합 반응에서 최대수득량은 0.03

M CAN 농도에서 관찰되었으며 세리신의 대부분이 AN과 그래프트 되었다. 모노머 농도와 세리신 농도에 따라서 전수득량도 증가했으며 특히 세리신농도에 따라서는 직선적으로 증가했다.

그래프트 공중합체에서 PAN 함량은 약 65~95 % 이었으며 그래프트율은 200~1,900 %로 범위가 넓었다. 이것은 세리신 한 분자에 15.6개의 그래프트된 PAN이 존재함을 의미하므로 가교 결합이 일어난 것으로 생각된다. 그리고 염산으로 가수분해하여 측정된 그래프트된 가지 PAN의 분자량은 7,300 정도였다.

인용 문헌

1. 青木, 織學誌, 28, 129 (1972).
2. 青木, 渡邊, 日蠶雜, 38, 444 (1969).
3. 柿木, 石板, *ibid.*, 41, 99 (1972).
4. I. Hiroshi, H. Kiyoshi, and M. Tomoko, 織學誌, 28, 167 (1972).
5. 石川, 平林, 諸岡, *ibid.*, 30, 178 (1974).
6. 平林, 塚田, 杉浦, 石川, 安村, 日蠶雜, 41, 349 (1972).
7. E. M. Shelton and T. B. Jhonson, *J. Amer. Chem. Soc.*, 47, 412 (1925).
8. 井上, 農學, 183 (1917); 259 (1924).
9. H. H. Mosher, *Amer. Dyestuff Repr.* 21, 341 (1932).
10. 고석원, 韓國纖維工學會誌, 11, 102 (1974).
11. 趙義煥, 安光德, 대한화학회지, 20, 299 (1976).
12. 日本分析化學會編, “機器による化學分析” 4 改正版

- P. 125. 丸善(株), 東京, 日本, 1968.
13. 崔炳熙, 製糸學, P. 43, 郷文社, 서울, 1972.
14. 徳武, 奥山, 生化學, 42, 904 (1970).
15. 崔炳熙, “蠶糸化學” P. 116, 郷文社, 서울, 1972.
16. J. Passent, *Biochim. Biophys. Acta*, 147, 595 (1967).
17. S. Tokutake, T. Okuyama, *J. Biochem.*, 71, 737 (1972).
18. H. Neurath, Ed., “The Proteins”, Vol. IV, P. 201, Chapter 20, Academic Press, New York, 1968.
19. J. R. Whitaker, *Anal. Chem.*, 35, 1950 (1963).
20. K. P. Rao, K. T. Joseph, and Y. Nayudamma *J. Polymer Sci. Part A-1*, 9, 3199 (1971).
21. G. Mino, S. and Kaizermann, *J. Polymer Sci.*, 31, 242 (1958).
22. 鈴木, 木戸, 青柳, 福井大織工試報, 7, 25(1969).
23. 宋泰玉, 金英德, 盧益三, 연구보고(국립공업 연구소), 16, 7 (1966).
24. R. J. Ceresa, Ed., “Block and Graft Copolymerization”, Vol. I, P. 193, Chapter 7, John Wiley and Sons, London, 1973.
25. J. Bandrup and E. H. Immergut, Ed., “Polymer Handbook”, 2nd Ed., P. IV-10, Wiley-Interscience, New York, 1975.
26. D. Braun, H. Cherdron, W. Kern, “Techniques of Polymer Syntheses and Characterization”, P. 66, Wiley-Interscience, New York, 1972.
27. 趙義煥, 安光德, 대한화학회지, 20, 316 (1976).