

## 황색 형광견 중 Tyrosine 잔기 거동의 분광학적 분석

여주홍 · 이인전\* · 한명세\*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, \*경북대학교 농과대학

## Spectrophotometric Analysis of Behavior to Tyrosine Residue in the Yellow Fluorescent Cocoon of *Bombyx mori*

Joo Hong Yeo, In Jeon Rhee\* and Myung Sae Han\*

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon 441-100, Korea  
\*College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

### ABSTRACT

The behavior of tyrosine(Tyr.) residue of *Bombyx mori* silk fiber from yellow fluorescent cocoon has been examined for the dependence of pH in aqueous silk solution under the presence of orange II salt. Through the peak separation of angular dependence of spectral pattern of  $^{15}\text{N}$ -Tyr. and  $[1-^{13}\text{C}]$ -Tyr. between the fiber axis and the molecular bond direction, N-H bond in fiber as well as the orientation distribution around the fiber axis were analyzed. Also, and sericin component was obtained from these angular dependence of oriented spectral pattern. The pH dependence of the  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift of *B. mori* silk fibroin was examined in aqueous solution in the presence of orange II hydrophobic interaction such as stacking between the Tyr.-ring and the orange II. All peaks of orange II are broad at  $\text{pH} \geq 7.0$ . However, these become sharper at  $\text{pH} \geq 8.0$  and remain sharp at higher pH. In these higher pH range, a chemical shift change occurs due to the deprotonation of the Tyr. side group of fibroin. At higher pH, such a hydrophobic cluster is destroyed because of the electrostatic interaction according to the deprotonation of the Tyr.-OH group.

Key words : Fluorescent cocoon, Tyrosine residue

### 서 론

집누에(*Bombyx mori*) 고치의 견섬유는 생체 친화성을 지니며 구조 전이가 용이하여, 의류용 외의 섬유 및 분말, gel의 형태로 식품이나 화장품첨가물 등에 이용되고 있으며, silk fibroin film에 효소를 고정화한 bio-sensor(Demura & Asakura, 1989; Demura *et al.*, 1989)를 비롯하여 고기능성 신소재로서의 개발 가능성이 높다. 이와같은 미래형 대체 신소재로서 활용가치가 기대되는 견섬유는 물리화학적 구조와 기능적 특성의 연관성을 구명함으로써 용도 개발을

위한 체계적이고 과학적인 접근이 가능하다. 집누에 견단백질을 구성하는 아미노산 중 Tyrosine(Tyr.)은 피브로인의 비결정 부분을 구성한다는 이론과 함께 이와 상반된 주장도 제기되고 있다(Takahashi, 1983). Tyr. 함량은 5% 정도로서, Tyr. 잔기는 탄소골격의 왜운동(chain dynamic)과 결합부위의 강화등에 중요하며(Asakura, 1994), Tyr. 방향환의 거동은 열 및 광선에 의한 견섬유의 황변현상에 관여하는 것으로 밝혀져 있다(Matsubara, 1993). 이러한 사실을 감안할 때, 고체 및 용액 상태의 견단백질에 대하여 국소적 환경에서 Tyr. 잔기의 거동을 파악하는 것은 중요하다. 본 연구에서는 분광학적 방법에 의하여 견단백질의 Tyr 잔기에 대한 정량적 해석을 검토하였다. 또한,

본 논문은 농림부 시행 특정연구사업의 결과임.

고치실에 함유된 형광물질은 고유의 결합방식이 염료와의 반응기구에 대한 단서를 제공해줄 수 있는 가능성을 가지고 있으므로, 균일한 형광색을 띠는 집누에계통(Han, 1997)을 이용하여 견섬유의 Tyr. 잔기와 orange II 염료 간의 상관관계에 의한 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험용 원료건 및 $[1-^{13}\text{C}]$ -Tyr. 및 $^{15}\text{N}$ -Tyr. labeling

균일한 형광색의 원료건은 경북대학교 농과대학 곤충병리연구실에서 일본계 원종 누에 Cj19로부터 순계분리 및 누대선발에 의해 육성된 누에계통 Cy 19의 황색형광 고치를 이용하였고, 정련 효과를 청색형광인 Cb19 계통의 누에고치와 비교하였다. 견단백질의 Tyr. 거동은  $[1-^{13}\text{C}]$ -Tyr. 및  $^{15}\text{N}$ -Tyr. 부분이 labeling 된 원료건(isotopic labeled *Bombyx mori* cocoon)을 사용하여 조사하였으며, labeling 은 10%의  $[1-^{13}\text{C}]$ -Tyr. 및  $^{15}\text{N}$ -Tyr. (99.5%  $^{13}\text{C}$  enrichment, Isotech Co., Miamisburg, Ohio, U.S.A)을 뿔잎에 도말하여 5령 5일째 누에 한 마리 당 10~12 mg을 첨식하였다.

### 2. 고체시료 및 액체시료 제조

고체 분말시료 및 배향시료는 Rhee & Yeo(1996)와 동일한 방법으로 조제하였다. 액체시료는 정련된 피브로인 섬유를 9M LiBr 수용액과 함께 40°C에서 1시간 처리한 후, 흐르는 물에서 4일간 투석하여 완전히 염을 제거하고, 5%(w/v)가 되도록 농축시킨 후 여기에 orange II염(Tokyo Kasei Co. Ltd.)을 넣어 최종적으로 각각 3%(w/v) 및 1.6%(w/v)의 농도가 되도록 최종적으로 조절하였다. 또한 수소이온 농도에 따른 Tyr. 잔기의 거동은 orange II염과의 혼합용액의 pH 7.0~12.0의 범위에서 조사하였다.

### 3. Solution NMR 및 CP NMR 측정

$^{13}\text{C}$  NMR의 측정은 25°C의 상태에서 JEOL FX-90Q NMR 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 이때의 화학적 이동의 기준은 tetramethyl-silane,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ 을 외부기준으로 하여 benzene 피크를 기준으로 나타내었다. 또한,  $[1-^{13}\text{C}]$ -Tyr. 및  $^{15}\text{N}$ -Tyr. 정련건사와 미정련 건사의 배향시료는 그 섬유축을 배향축으로  $4.5 \times 4.5 \times 12(\text{mm})$ 의 크기로 만든 후에 JEOL EX-400 NMR 분광기를 사용하여 25°C에서 각각의 고체 CP (cross polarization) 배향 NMR 스펙트럼을 측정하였다. 시료는 정련건사와 미정련건사에 대하여 섬유축(배향축)의 각도를 정자장 방향에서 0°, 30°, 60°, 90°

의 각도에서 측정된 스펙트럼의 simulation으로 부터 성분의 정량적인 차 및 microfibril 섬유 배향의 배향을 조사하였으며, 그 외의 조건은 Rhee & Yeo(1996)의 방법과 동일하게 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. $^{15}\text{N}$ 및 $[1-^{13}\text{C}]$ CP NMR 스펙트럼

청색형광 누에고치는 세리신 함량과 무관하게 항상 청색을 나타내었지만, 황색형광 고치는 정련공정을 통하여 황색형광이 소실되고 피브로인 고유의 청색형광만이 관찰되었다. 황색형광 고치를 정련하여 366 nm 자외선(UV) 하에서 황색형광이 완전히 소실된 경우 연감율은 27%였다. 그러므로 정련 견섬유에서는 미시구조상 피브로인 분자 내에 황색형광 물질이 존재하고 있지 않는 것으로 판단되었다. 따라서, 견섬유에 함유된 세리신이 제거된 정도를 용이하게 판별할 수 있는 황색형광검을 이용하여 Tyr. 잔기의 거동을 분석하였다.  $^{15}\text{N}$ -Tyr.의 고체 CP NMR의 스펙트럼에서 정련건사에는 피브로인만의 구조에 관한 정보가 관찰되었으며(그림 1A), 미정련 건사의 경우

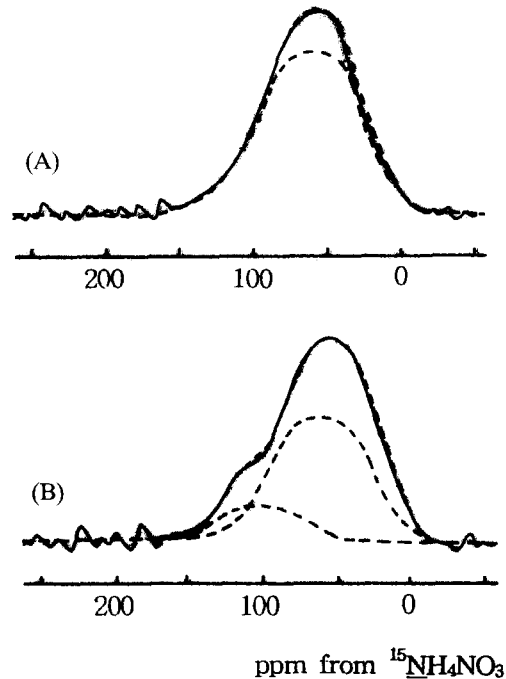


Fig. 1. Comparison of the experimental(solid line) and calculated(broken line)  $^{15}\text{N}$ -Tyr. CP-NMR spectra parallel to the magnetic field for degummed (A) and non-treated silk fibroin fiber (B).

세리신에 함유된 황색형광이 관찰되므로 세리신 분자를 구성하는 Tyr. 신호와 피브로인을 구성하는 Tyr. 신호가 동시관측된 것으로 판단되었다(그림 1B).

이 스펙트럼은 미시적 차원에서 섬유분자 내의 결정 또는 비결정 부위를 반영하므로, <sup>15</sup>N은 수소결합에 의한 분자축 간의 각도를 추정할 수 있는 정보를 제공하는 동시에 그 분자축의 각도를 달리하는 성분이나 배향의 정도를 달리하는 집합체의 존재를 파악할 수 있다(Asakura *et al.*, 1984). 결정 및 비결정의 구조는 서로 다르며, 세리신과 피브로인의 구조 또한 다를 것이므로 그림 1에서 A 및 B의 두 스펙트럼을 비교하고 그 성분을 분리하므로써 <sup>15</sup>N-Tyr.의 분자축에 대한 해석이 가능하였다. 즉, 피브로인 중 Tyr.의 미시적 분자의 성분을 나타내는 동시에 피브로인을 구성하는 microfibril의 배향의 정도를 나타내는 그림 1A의 스펙트럼 simulation에서는 배향의 정도를 나타내는 성분(P)이 54°로 나타났다. 본 결과는 결정상태인 <sup>15</sup>N-Gly 잔기가 배향된 부분이 83°로 82% 존재한다는 사실(Rhee & Yeo, 1996)과 비교할 때, 무정형은 아니면서 결정인 경우와도 차이가 난다는 점에 주목할 필요가 있다(표 1).

한편, <sup>15</sup>N-Tyr.에서 섬유축과 N-H의 각도는 <sup>15</sup>N-Gly 잔기와 같은 83°로 산출되었으므로 분자축의 각도를 달리하는 집합체의 성분은 인정되지 않았다. 따라서, <sup>15</sup>N-Tyr.의 경우 <sup>15</sup>N-Gly.과 같은 긴 섬유축을 중심으로 N-H의 방향은 변함이 없으면서 다소 완화된 배향을 나타내는 것으로 볼 수 있다. 본 연구만으로 <sup>15</sup>N-Tyr.의 잔기가 결정 또는 비결정부분을 형성한다고 단정지을 수는 없으나 polyamide 계의 어떤 섬유는 비결정의 부분이 집합체로 존재할 수 있다는 연구결과를 고려할 필요가 있다(Asakura *et al.*, 1994). 그러므로, 만일 피브로인의 Tyr. 잔기가 비결정부분을 형성한다고 가정할 경우라도 고치실의 토사 과정에서 견단백질에 작용되는 물리적인 영향을 감안할 때, 배향을 이를 가능성은 충분하다. 따라서, <sup>15</sup>N-Tyr.

은 무정형 상태에 가까우면서도 어느정도의 배향을 이룬 집합체로 간주할 수 있었다. 집누에 견단백질의 결정부분을 구성하는 아미노산 조성은 glycine, alanine, serine 성분이 약 85% 이상을 차지하는 것으로 확인된 바 있다(Kweon & Park, 1994). 그러나, Tyr. 잔기는 연구자에 따라 결정부위, 혹은 비결정부위를 구성한다는 상이한 의견이 제기되고 있어서 정확한 결론을 내리지 못한 상태이다(Takahashi, 1983; Asakura *et al.*, 1994). 그런데, 그림 1의 결과를 종합할 때 피브로인의 Tyr. 잔기가 결정부분을 구성한다고 보기에는 미흡하며, 비결정부분을 구성한다는 견해가 더 타당한 것으로 밝혀졌다.

세리신은 섬유상 단백질이 아닌 구상단백질 및 수용성의 단백질이며, sericin I-V의 층상구조를 형성하고(小松, 1980), 또한 세리신 만으로는 배향 시료를 만들기 어렵다. 미정련 견사의 <sup>15</sup>N-Tyr.에는 약 30% 정도의 세리신 분자축 배열이 포함될 것이므로 그림 1B의 스펙트럼에서 피브로인의 스펙트럼을 구별하므로써 세리신에 관한 정보를 추적하였다. 그림 1B의 두 성분 중 그림 1A와 유사한 스펙트럼은 피브로인의 성분이며, 피브로인의 스펙트럼과 명확한 차이를 보이며 저자장 측에서 관측되는 작은 스펙트럼은 세리신의 <sup>15</sup>N-Tyr 잔기 배향을 나타낸 것으로 동정하였다. N-H의 각도는 저자장 측으로 갈수록 섬유축을 중심으로 벌어지기 때문에(Rhee & Yeo, 1996), 그림 1B의 simulation에서 저자장측의 半幅(half width)이 넓고 크기가 비교적 작은 스펙트럼 성분은 섬유축을 중심으로 N-H의 각도가 벌어졌다고 볼 수 있다. 피브로인의 배향 54°(그림 1A)를 기준으로 그림 1B의 simulation에서 배향의 분포를 산출한 결과, 세리신의 Tyr.으로 추정되는 성분이 40% 존재하고 그 배향의 정도는 훨씬 낮은 23°로 나타났다. 또한 N-H의 각도의 계산치는 50°였다(표 1).

Tyr.이 40%로 계산된 결과는 연감률 27%와 다소 거리가 있으나, 배향의 분포를 나타내는 23°는 분자축의 배향이 거의 무정형에 가깝다고 말할 수 있을 것이다. 분포각도가 낮을수록 거의 무정형(비결정)에 가깝다는 이론을 고려하는 동시에 피브로인 주위를 피복하고 있는 세리신이 또한 누에가 토사할 때의 배향 상태를 감안할 때, 세리신의 Tyr.은 무정형에 가까운 것으로 인정할 수 있다. 이러한 결과를 재확인하기 위하여 [<sup>13</sup>C]-Tyr. 배향시료의 몇가지 각도 의존 스펙트럼 결과, 정련견사(그림 2A)와 미정련 견사(그림 2B) 모두 <sup>15</sup>N-Tyr.의 경우(그림 1) 보다 복잡한 스펙트럼이 관측되었다. 특히 배향축이 정자장의 방향과 평행(0°)인 경우와 수직(90°)인 경우 명확하게 다른 양상

Table 1. Comparison of the spectra simulation data of <sup>15</sup>N-Tyr. and [<sup>13</sup>C]-Tyr. labelled *B. mori* silk fiber.

Items	<sup>15</sup> N-Tyr.		[ <sup>13</sup> C]-Tyr.	
	degu-mmed	non-treated	degu-mmed	non-treated
content(%)	100*	60*, 40**	100*	55*, 45**
P(degree)	54	54, 23	58	56, 20
N-H(degree)	83	83, 50	-	-

\* : component of silk fibroin

\*\* : component of silk sericin

P : orientational distribution around the silk fibroin

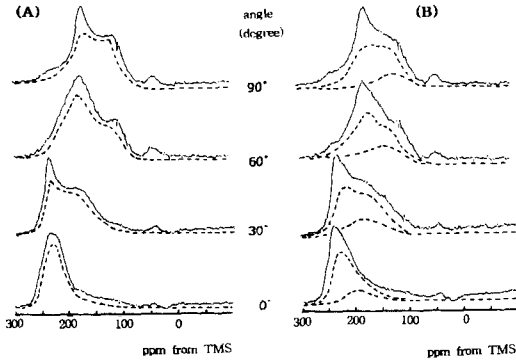


Fig. 2. Angular dependence of spectral pattern of [1- $^{13}\text{C}$ ]-Tyr. silk fibroin fiber: A, degummed; B, non-treated silk fibroin fiber.

의 스펙트럼을 보였다. 그림 2A의 정련건사는 단일 성분으로 simulation이 가능하였으며, 그 함량 및 배향의 정도(P)는 그림 1의 성분을 기준으로 거의 같은 정도였다. 그림 2에서 점선으로 표현된 스펙트럼의 simulation 결과를 그림 1과 비교 검토하였으며, 동정 결과는 실선(실측의 스펙트럼)과 점선(simulation 결과)의 계산치가 가장 작게 나오게 하는 이론을 바탕으로 최종결과를 확정하고, 그 결과를 종합하여 정리하였다(표 1).

## 2. [1- $^{13}\text{C}$ ]-Tyr.잔기와 orange II와의 상관관계

전단백질에 orange II 염이 존재할 경우 피브로인 분자의 일정 부위와 반응하여 결합할 것이므로, 결합된 상태에 대한 수소이온 농도 의존성은 NMR의 특성을 이용함으로써 결합 분자의 국소적 환경에 대한 변화를 감지할 수 있었다(그림 3). orange II 염료를 함유하는 집누에고치 피브로인 수용액의 방향환 및 Tyr.내 탄소의 신호를 나타내는 NMR 스펙트럼에서, Tyr.의 분자구조에 착안하여 벤젠환의 운동을 추적함으로써 OH 그룹의 탈수소화 거동이 관측되었다. 여기서 carbonyl 탄소의 화학적 이동(chemical shift) 범위를 170~177 ppm(Rhee & Yeo, 1996)으로 동정하였고, 표기되어 있지 않는 그 외의 피크는 전부 orange II의 피크로 동정되었다. 그림 3에서 주목할 부분은 Tyr.의 골격을 구성하는 벤젠환의 탄소 신호로서, C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup>, C<sup>3</sup>, C<sup>4</sup>의 피크이며, 그 중에서도 특히 Tyr. 분자에서 벤젠환의 회전 가능성이 높은 C<sup>1</sup>, C<sup>2</sup>부분의 신호로부터 화학적 이동에 관한 거동을 파악할 수 있다. orange II의 피크 중 pH 7에서는 다른 pH 영역에 비하여 피크의 半値幅이 넓은 편인데, 이와 비교할 때 중성영역을 벗어나는 pH 8 이후 부터 점차적으로 좁아지는 양

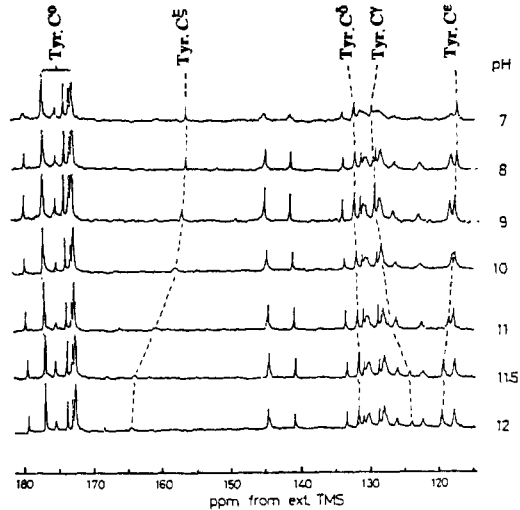


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the aromatic and carbonyl regions of *B. mori* silk fibroin-orange II in aqueous solution as a function of pH.

상을 나타내고 있다. 또한 orange II의 피크는 pH 8 이상으로 높아질수록 그 분리의 양상이 더 빠르게 나타나게 되며, 그것은 어떤 영향 또는 상호작용의 결과 orange II 분자가 분해되고 있음을 의미한다. 이러한 변화는 Tyr. 잔기의 탈 수소화에도 영향을 미친다고 볼 수 있는데, 특히 pH 10에서 부터 pH 11, pH 11.5 부근에서 급격한 화학적 이동(shift)을 나타내는 곡선이 관찰 된다.

pH 10 이하의 조건에서 화학적 이동의 변화가 일어나지 않았던 것은 Tyr.과 orange II분자 간에 별도의 소수적 상호작용에 따른 영향을 받고 있음을 의미하고, 그것이 탈 수소화로부터 Tyr. 잔기의 OH 그룹을 보호하고 있기 때문인 것으로 해석할 수 있다. 이는 또한 Tyr. 측쇄와 orange II 분자 간 환의 집적(모임)의 효과에 기인하는 것으로 추정된다.

피브로인 수용액은 산성영역에서 gel화가 일어나므로, Tyr.의 수소이온 농도 의존성은 중성영역을 기점으로 알칼리측의 범위에서 추적하였다. 또한 orange II 염료는 전형적인 이온결합형으로서 염료분자는 하전되기 쉬운 상태이므로, 일반적으로는 pH 3 내외의 산성 조건에서 염색한다. 그러므로, 염착량이 현저히 저하되는 알칼리 조건에서 orange II와 피브로인 간의 화학결합에 관한 정보는 입수하기 어렵다. 한편, 피브로인은 알칼리 조건에서 쉽게 용해되는 동물성 단백질이므로 알칼리 조건에서의 황변현상과 관련된 분자차원의 화학반응 또한 해명된 바 없다. 본 실험에서 밝혀진 Tyr. 잔기의 탈 수소화 반응을 참작

할 때, 알칼리 조건에서 일어날 수 있는 황변은 중성 영역을 벗어나는 pH 8 이후 부터 시작되고, pH 10 부터 가속화 되며, pH 11.5 부터 정점을 이룬다고 추정 할 수 있다. 이 결과는 높은 pH 영역일수록 현저한 화학적 이동은 Tyr. 잔기 내의 O 그룹과 Orange II 분자의 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 간의 정전기적 반발에 의하여 탈 수소화가 용이하게 일어난다는 의미로 해석할 수 있었다.

orange II와 결합된 집누에 견단백질을 이용한 NMR 스펙트럼은 분자 수준에서 Tyr. 방향환의 거동이 견섬유의 황변에 작용한다는 이론(Matsubara, 1993)을 뒷받침하는 실험적 증거를 제공하였다. 그리고, 분광학적 방법에 의한 정량적 해석을 통하여 견 피브로인에 존재하는 소수 작용기의 상호작용이 분자화학 반응에 상당한 영향을 준다는 사실도 밝혀졌다. 집누에 견단백질의 화학적 구조를 해명함에 있어서 다양한 관점과 방법이 도입될 수 있지만, 아미노산 배열과 특정 아미노산의 역할에 착안한다면, 용도 개발 및 염색 가공기술 개선을 위해 보다 체계적인 접근방식을 제공할 수 있을 것이다. 특히 화학구조 상 수소성을 띠는 Tyr.은 효소반응에서 활성부위로서의 기능에 관하여 보다 체계적으로 追究할 필요가 있으며, 아울러 피브로인 분자와 염료 및 주요 가공제 간의 화학반응 등에 관한 분자 화학적 구조 해명에 관한 연구에 있어서도 분광학적 방법은 크게 기여할 수 있을 것이다.

## 적 요

특이 형광색 원료견을 이용하여 tyrosine 잔기의 거동을 분광학적 방법에 의하여 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. [1-<sup>13</sup>C]-Tyr. 및 <sup>15</sup>N-Tyr. 부분의 고체 NMR배향 시료의 스펙트라 시뮬레이션의 결과로부터 정련 실크 피브로인의 경우 54°의 배향을 나타내었다. 또한 미 정련 전사로 부터는 세리신 내의 Tyr. 부분이라고 생각되어지는 부분이 40% 존재하고 섬유축을 중심으로 23°의 낮은 배향의 분포를 하고 있음을 알았다. 즉, Tyr. 잔기의 경우는 어느정도의 집합체상태를 이루나, 무정형에 가까운 형태인 것으로 확인되었다.

2. 정련을 실시한 황견형광 집누에 견단백질의 피브로인에서는 특이 형광을 발견할 수 없는 점으로 미루어 누에고치의 형광색을 나타내는 물질이 세리신 분자내에 흡착 혹은 존재하고 있는 것으로 확인되었으며, 황색형광의 누에고치는 세리신의 정련 여부를 쉽게 판별할 수 있고 형질이 균일하므로 견물질의 분

자구조 해명 등을 위한 연구재료로서 유용한 것으로 인정되었다.

3. Orange II와 견 피브로인 내에 존재하는 Tyr. 잔기의 거동은 수소이온 농도가 알칼리 측으로 갈수록 Tyr.에 존재하는 OH 그룹의 탈 수소화가 일어나기 쉬워져서, pH 10부터 급격한 변화를 보였다. 이것은 알칼리 측의 pH 영역이 될수록 Tyr. 잔기의 O 그룹과 Orange II 분자의 SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 간의 정전기적 반발에 의하여 탈 수소화가 일어난 결과로 해석되었다.

## 인용문헌

- Asakura, T., Watanabe, Y., Uchida, A., and Minagawa H. (1984) NMR of silk fibroin. 2: <sup>13</sup>C NMR study of the chain dynamics and solution structure on *Bombyx mori*. *Macromolecules*, **17** : 1075-1081.
- Asakura, T., Yeo, J. H. and Ando, I., (1994) Structure of polyamide fibers in the non-crystalline domain studied by <sup>15</sup>N solid state NMR. *Polymer Journal*, **26** : 229-233.
- Demura M., and Asakura T. (1989) Immobilization of glucose oxidase with *Bombyx mori* silk fibroin by only stretching treatment and its application to glucose sensor. *Biotech. and Bioengin.*, **3** : 598-603.
- Demura, M., Asakura, T., and Kuroo T. (1989) Immobilization of biocatalysts with *Bombyx mori* silk fibroin by several kinds of physical treatment and its application to glucose sensors. *Biosensors*, **4** : 361-372.
- Han, M. S. (1997) Variation and sex-limited expression of fluorescent color by ultraviolet spectrum on the silkworm cocoon. *Korean J. Seric. Sci.*, **39** : 22-29.
- Kweon, H. Y. and Park, Y. H. (1994) Structural characteristics and physical properties of wild silk fibers; *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*. *Korean J. Seric. Sci.*, **36** : 138-146.
- Matsubara, F., Chen, R., Mori, H., Sumida, M., Yamazaki, T., and Ito, H. (1993) Study on yellowing of cocoon filament obtained from the silkworm reared on artificial diets and mulberry leaves. *J. Seric. Sci. Japan*, **62** : 162-164.
- Rhee, I. J. and Yeo, J. H. (1996) Characterization of fibroin biosynthesis in the 5th instar of *Bombyx mori*. *Korean J. Seric. Sci.*, **38** : 180-185.
- Takahashi, Y. (1983) Crystal structure of silk of *Bombyx mori*, ACS symposium series 544, *Silk Polymers* : 168-175.
- 小松計一 (1980) (續) 絹絲の構造 (北條舒正 編) 信州大學 纖維學部 : 379-415.