

## 실크의 가용화 조건이 효소분해 실크 펩타이드의 분자량 분포에 미치는 영향

† 채 희 정 · 인 만 진 · 김 의 용

대상(주) 중앙연구소, <sup>1</sup>서울시립대학교 화학공학과  
(접수 : 1997. 12. 5., 게재승인 : 1997. 12. 23.)

### Effect of Solubilization Conditions on Molecular Weight Distribution of Enzymatically-Hydrolyzed Silk Peptides

Hee Jeong Chae<sup>†</sup>, Man-Jin In, and Eui Yong Kim<sup>1</sup>

R&D Center, Daesang Corp., Icheon, Kyongki 467-810, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received : 1997. 12. 5., Accepted : 1997. 12. 23.)

The effects of fibroin solubilization conditions on molecular weight distribution of enzymatically-hydrolyzed silk peptides were investigated. The weight-averaged molecular weights of silk proteins prepared by solubilization with calcium chloride, ethylenediamine and sulfuric acid were 41600, 3308, and 1268 dalton, respectively. Silk peptides in the average molecular weight range of 600-1200 dalton were obtained by protease treatment from solubilized silk fibroin. After the acid hydrolysis of silk protein using hydrochloric acid for 24 hr, silk protein was hydrolyzed to peptides whose average molecular weight and free amino acid content were 145 dalton and 80%, respectively. It was possible to control molecular weight distribution of silk peptides by the combination of solubilization and hydrolysis methods. Among the various treatment methods, acid solubilization followed by protease treatment had an advantage of molecular weight control for the peptide production.

Key Words : silk peptide, enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis, molecular weight distribution

### 서 론

누에고치로부터 얻는 실크 피브로인(fibroin)은 필수아미노산 8종(Val, Leu, Ile, Thr, Met, Lys, Phe, Trp)을 포함하여 18종류의 천연 아미노산으로 이루어져 있는 분자량 100,000이상인 거대 단백질로서 오래전부터 천연섬유인 실크의 원료 뿐만 아니라 수술용 봉합사 등 의료용 소재로서 사용되어 왔다. 실크 피브로인은 antiparallel  $\beta$ -sheet로 구성되어 있으므로 물에 녹지 않는 특성이 있으나 특수한 가공에 의하여 막, 분말, 겔 등의 형태로 변형이 가능하며, 흡습성, 염색성, 기체 투과성, 생체 적합성 등이 우수하여 효소고정화 막, 콘택트렌즈, 인공장기 등의 소재로서의 이용 가능성이 매우 높다(1, 2).

자연 상태의 실크 피브로인은 매우 큰 단백질로 생체에 흡수되지 않기 때문에 실크 자체로는 이용되기 곤란하므로 적당한 작은 크기의 실크 펩타이드(silk peptide)로 분해하는 것이 필요하다. 이렇게 저 분자량으로 가용화된 실크 펩타이드는 알라닌,

글리신, 세린, 타이로신 등의 아미노산으로 구성된 올리고 펩타이드(oligopeptide)를 대량 함유하고 있어 혈중 알코올 분해 촉진, 혈중 콜레스테롤 농도의 감소, 혈당치 억제 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(3,4), 자외선 차단 효과가 알려지면서 화장품 원료로도 널리 사용되고 있는 기능성 생물 소재이다(5, 6).

일본에서는 실크 펩타이드의 다양한 용도 개발이 이루어져 다양한 종류의 식품과 화장품에 첨가물로 이용되고 있다. 국내에서는 시장 수요가 활발하게 형성되어 있지는 않지만 소비자들의 기능성 건강식품 및 기능성 화장품에 대한 관심의 증대와 더불어 수요가 확대되리라 예상된다.

실크 섬유를 가용화 시키기 위한 방법으로는 산을 이용한 용해법과 칼슘염에 의한 용해법이 있다. 칼슘염을 이용한 방법은 실크를 뜨거운 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 용액에 용해시키고 탈염하여 젤화한 후 냉동건조하면 분자량이 약 3만5천 정도의 비교적 고분자량의 분말을 제조할 수 있다. 이렇게 하여 얻은 분말은 보습성이 있고 자외선을 잘 흡수하여 화장품 첨가물로 이용되나, 소화 흡수율이 낮아 (30% 수준) 식품첨가물로는 이용하기 곤란하다. 또한 염화칼슘 용액에 용해 가능한 실크의 양이 적기 때문에 수율상의 효율성이 문제점으로 지적되고 있다. 현재까지 알려진 방법 중 주로 많이 이용되는 방법은 산분해법이다. 산분해에 의해 얻은 실크 펩타이드는 분자량이 적어 흡수율이 높은 반

† Corresponding Author: R&D Center, Daesang Corp., Icheon, Kyongki 467-810, Korea  
Tel : 0336-39-2083, Fax : 0336-638-2800  
E-mail : hjchae@elim.net

면 담황색을 띠며 특이한 향을 갖는 특성이 있다(7). 또한 적당한 분자량의 펩타이드만을 얻기 곤란하며 중화 과정에서 다량의 염이 형성되는 단점이 있다. 실크 수용액을 단백질 분해효소로 처리하는 효소분해법은 산분해법에 비해 두 배 이상의 공정과 시간이 소요되고 가공비용이 많이 드는 단점이 있으나, 실크 단백질의 평균 분자량이 수천에서 수백에 이르는 펩타이드로 가수분해되므로 산분해법에 의해 얻은 펩타이드보다 더 긴 사슬, 즉 분자량이 큰 펩타이드를 얻을 수 있는 장점이 있다(8). 따라서 효소분해법으로 제조된 백색의 무취한 실크 펩타이드는 유리 아미노산의 함량이 낮고 펩타이드의 함량이 높기 때문에 다양한 소재로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 식품 및 화장품 소재용 실크 펩타이드의 제조를 목적으로 실크 섬유의 가용화 조건이 효소분해 실크 펩타이드의 분자량 분포에 미치는 영향 및 산분해법과 효소분해법을 비교 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 원료 및 재료

피브로인이 주성분인 원료 실크 섬유(건사)는 호남제면(한국)으로부터 구하였고, 단백질 분해효소로는 Novo사(Bagsvaerd, Denmark)의 Alcalase™를 사용하였다. 분석 시약은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 제품이었으며, 실크 용해 및 산분해에 사용한 염화칼슘, ethylenediamine, 염산과 황산은 시약 일급의 것이었다.

### 실크 가용화

실크의 가용화는 염화칼슘, ethylenediamine 및 황산에 의해 다음과 같이 실시하였다.

1-2cm로 절단된 견사를 50% 염화칼슘 용액에 10%(W/V) 되도록 넣고 100℃에서 1시간 동안 가열 처리한 다음 4배수의 증류수를 첨가하여 가열한 후 냉각하였다. 투석막(Satorius MWCO=2,000)을 이용하여 흐르는 물에서 3일간 투석하여 염을 제거하였다. 투석한 액을 10 N의 NaOH를 사용하여 pH를 7.0으로 조절한 다음 Whatman No.2의 여과지로 여과한 후 -30℃에서 48시간 동안 동결건조하여 분말화하였다.

Ethylenediamine을 9배의 증류수로 희석한 혼합용매 100mL에 Cu(OH)<sub>2</sub> 6g을 용해한 후 1-2cm로 절단된 견사 5g을 첨가하여 교반하면서 용해하였다. 30분 간 교반한 후 3N의 초산을 첨가하여 pH를 7.0으로 조절한 다음 염화칼슘에 의한 가용화 방법과 동일하게 투석, 여과하여 건조하였다.

1-2cm의 크기로 절단된 견사 10g을 4 N 황산 용액 200mL에 조금씩 넣어서 용해하였다. 견사가 균일하게 용해되면 약 50℃의 shaking incubator에서 30분 간 교반(150rpm)한 후 200mL의 증류수를 첨가하고 10 N의 NaOH로 중화하였다. 견사 중화 용액을 염화칼슘에 의한 가용화 방법과 동일하게 투석, 여과하여 건조하였다.

### 실크의 효소 분해

염화칼슘, ethylenediamine과 황산으로 용해한 후 동결건조하여 각각 제조한 실크 분말(3.2g)을 100 mL 완충액(pH 7.2)에 용해하여 50℃의 항온수조에서 Alcalase (0.6 U/g)를 고정분 기

준으로 1.0% 첨가하여 효소분해하였다.

### 분석 방법

총 아미노산 함량은 6 N HCl로 105℃에서 24시간 산분해한 시료를 OPA법(9)으로 분석하였다. 분자량 분포는 gel permeation chromatography(GPC, column : Shodex™ Protein KW-802.5, Showa Denko, Japan)로 분석하였다(10). 이동상으로는 0.15 M NaCl과 0.01 M NaN<sub>3</sub>(pH 6.8)를 함유하는 0.05 M 인산 완충액을 사용하였다. 검출 파장은 210 nm이었고 분자량 마커(marker)로 blue dextran(MW=1,000,000), ovalbumin(MW=43,000), ribonuclease A(MW=13,700), vitamin B<sub>12</sub>(MW=1355.4), phenylalanine(MW=165.2)을 사용하였고 질소 함량은 총 질소(total nitrogen)를 Kjeldahl분석기로 정량함으로써 계산하였다(질소 계수는 6.25).

### 평균 분자량 계산

GPC(gel permeation chromatogram) 데이터의 retention volume(V<sub>R</sub>)으로부터 분자량(M<sub>i</sub>)을 추정하고 피크의 높이(H<sub>i</sub>)로부터 일정 분자량의 상대적 분자수(N<sub>i</sub>=H<sub>i</sub>/M<sub>i</sub>)를 계산하여 식(1)과 식(2)로부터 수평균 분자량(number-averaged molecular weight)  $\bar{M}_n$ 과 중량평균 분자량(weight-averaged molecular weight)  $\bar{M}_w$ 을 각각 계산하였다(11).

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2)$$

분자량 분포(molecular weight distribution, MWD)의 분산 계수(polydispersity index, PDI)와 중량비(weight fraction, W<sub>i</sub>)는 각각 다음과 같이 계산하였다(11).

$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad (3)$$

$$W_i(\%) = \frac{N_i M_i}{\sum N_i M_i} \times 100 \quad (4)$$

## 결과 및 고찰

### 원료 실크의 성분 분석

물에 녹지 않는 실크를 다양한 형태로 변형시켜 기능성 소재로 개발하기 위해서는 먼저 수용액상으로 용해시켜야 한다. 본 연구에서 사용된 실크 섬유의 총 아미노산 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다. Gly, Ala, Ser이 각각 34.3%, 33.2%, 12.8% 함유되어 있는 것으로 나타났으며 다른 실크 단백질의 아미노산 조성과 유사하였다(12). 단백질과 회분은 각각 98%, 2% 함유되어 있는 것으로 나타났다.

Table 1. Amino acid composition of silk protein.

Table 1. Amino acid composition of silk protein.

Amino acid	Amino acid content (%)
Asp	0.30
Thr	1.18
Ser	12.8
Glu	1.54
Gly	34.3
Ala	33.2
Cys	- <sup>1)</sup>
Val	3.16
Met	-
Ile	-
Tr p	-
Leu	0.82
Tyr	5.93
Phe	0.76
Lys	0.37
His	-
Arg	-
Total	94.33

<sup>1)</sup> - : Not detected.

**실크의 가용화가 분자량 분포에 미치는 영향**

실크를 저분자화하기 위한 전단계로 염화칼슘(50%), ethylenediamine(10%) 및 황산(4 N)에 의해 가용화한 실크 용액을

GPC로 분석한 결과, 염화칼슘을 사용하였을 경우 가장 짧은 retention time (RT)의 피크를 얻었으며 황산을 사용하였을 경우 RT가 큰 여러 개의 피크로 구성된 크로마토그램을 얻을 수 있었다(Figure 1). 이것은 황산에 의해 단순한 용해만 일어나는 것이 아니라 단백질 성분이 산분해되어 나타난 현상으로 보인다.

여러 가지 분자량 마커를 이용한 검량곡선으로부터 두 종류의 평균 분자량과 분산계수를 계산한 결과는 Table 2와 같다. 염화칼슘, ethylenediamine 및 황산에 의해 가용화된 실크 용액의 중량평균 분자량은 각각 41600, 3308과 1268 dalton으로서 염화칼슘을 제외한 나머지 두 가용화 방법에서 평균 분자량이 수천 dalton인 실크 용액을 얻을 수 있었으며 분자량 분포의 중요한 지표인 분산계수(PDI)는 3-4의 범위를 보였다. Ethylenediamine과 황산에 의한 가용화 방법은 비교적 저 분자량의 펩타이드 혼합물을 얻을 수 있으므로 실크를 소재로 사용하는 용도 중 펩타이드 사슬의 수가 10-15인 실크 가수분해물을 필요로 하는 경우, 즉 보습성 및 피부 건조 방지효과가 요구되는 화장품 소재로 사용될 경우(13)에 적합한 방법으로 판단되었다. 이 경우 추가적인 효소나 산 등에 의한 처리가 필요 없을 것으로 보인다. 2-6 N의 황산 용액을 이용하여 실크를 용해하였을 경우 용매 200 mL당 5-20 g의 실크를 용해할 수 있었으며 염산 수용액보다 용해가 잘 되었다. 그러나 용해 후 NaOH 중화 시 염이 많이 생성되며, 4℃ 보관 시 젤화되었다. 실험한 농도 범위에서 용해시 사용한 황산의 당량 당 12-15 g의 실크 피브로인을 용해할 수 있는 것으로 나타났다. 8 N 이상의 황산 용액을 용매로 사용하면 염이 석출되어 재용해가 거의 되지 않는 문제점을 갖는 것으로 나타났다.

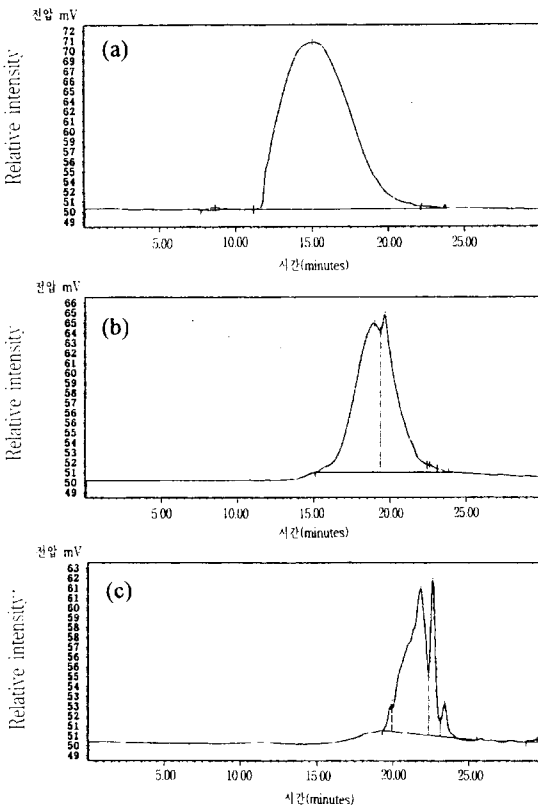


Figure 1. GPC chromatogram of silk peptides prepared by different solubilization methods. Solvents were (a) 50% CaCl<sub>2</sub> (b) 10% ethylenediamine (c) 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Table 2. Average molecular weights and polydispersity index of silk peptides prepared by different solubilization methods followed by protease treatment.

Solubilization method	Protease treatment time (hr)	$\bar{M}_n$ (dalton)	$\bar{M}_w$ (dalton)	PDI
CaCl <sub>2</sub>	0	9518	41600	4.37
	6	136	1155	8.48
Ethylenediamine	0	964	3308	3.43
	6	109	778	7.17
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	340	1268	3.73
	6	70	651	10.1

**가용화 실크의 효소분해**

실크 펩타이드의 분자량을 조절하기 위하여 가용화 후 동결건조하여 제조한 실크 분말에 단백질 분해효소를 처리하여 분자량 분포를 분석하였다. 본 연구에서는 상업화되어 있는 효소 중 비교적 저렴하고 활성이 높으며 식품용 규격으로도 적합하여 식품소재의 제조(14)에 널리 사용되는 endoprotease의 일종인 Alcalase를 사용하였다. Alcalase를 고형분 기준으로 1%의 농도로 첨가하여 6시간 분해했을 경우의 GPC는 Figure 2와 같으며 이로부터 중량평균 분자량과 수평균 분자량을 계산하여 Table 2에 정리하였다. 효소처리 6시간 경과 후 실험한 세 종류의 실크 분말 모두 중량평균 분자량이 1200이하인 실크 펩타이드를 얻을 수 있었다. 이 때 PDI값은 초기 값의 2-3배 증가하

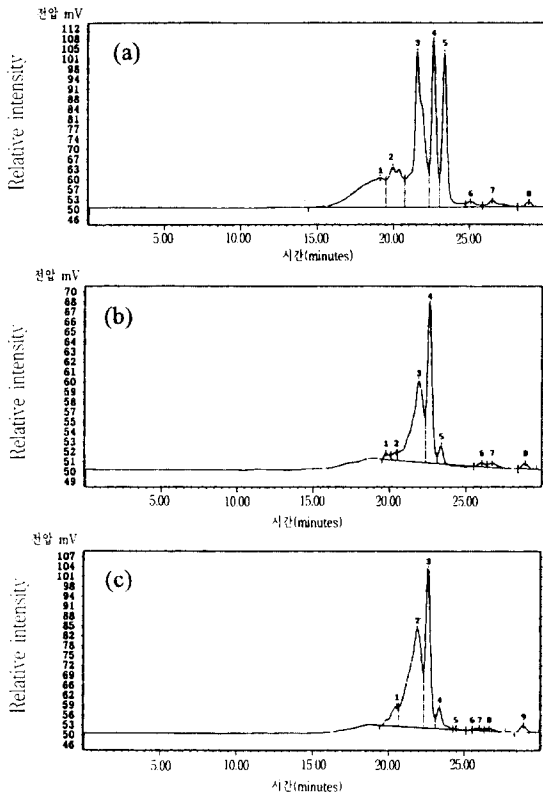


Figure 2. GPC chromatogram of silk peptides prepared by different solubilization methods followed by protease treatments. Solvents were (a) 50% CaCl<sub>2</sub> (b) 10% ethylenediamine (c) 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

었는데 이것은 단백질 가수분해효소에 의한 가수분해 작용으로 중량평균 분자량만 감소했을 뿐 아니라 작은 분자량의 펩타이드가 증가하여 수평균 분자량도 큰 폭으로 감소하였기 때문인 것으로 판단된다.

일정 분자량 이하의 펩타이드를 얻기 위한 가수분해조건을 확립하는 데 있어서 특히 산을 사용하지 않는 효소분해법에서는 실크 원료의 가용화 방법 뿐 아니라 효소 사용량, 효소 처리시간 등이 중요한 변수가 될 수 있다. 효소의 사용량을 일정하게 하고 효소 처리시간을 증가시킴에 따라 저 분자량의 펩타이드로 분자량 분포가 변화함을 관찰할 수 있었다. 이를 정량화하기 위하여 각각의 크로마토그램으로부터 중량 평균 분자량을 계산하여 시간 경과에 따른 분자량 감소를 도시하였다(Figure 3). 염화칼슘, ethylenediamine과 황산으로 각각 가용화한 세 종류의 시료 모두 효소 첨가 후 1-2시간 만에 급격한 저분자화가 일어났으며 5시간이 경과한 후 가수분해 속도가 매우 감소하였고 20시간 경과 후 얻은 가수분해물의 중량 평균 분자량은 각각 973, 754, 561 dalton이었다. 따라서 이와 같은 방법으로 20시간 효소처리에 의해 얻은 효소분해 실크 펩타이드는 펩타이드의 사슬 길이가 4-8로서 식품 소재로의 이용성이 높은 가수분해물로 판단된다. 이 펩타이드 혼합물로부터 기능성을 갖는 특정 분획의 펩타이드를 순수분리하여 기능성 펩타이드의 탐색재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 효소분해 전에는 가용화 방법에 따라 얻어지는 가수분해물의 평균 분자량이 매우 큰 차이를 보였으나

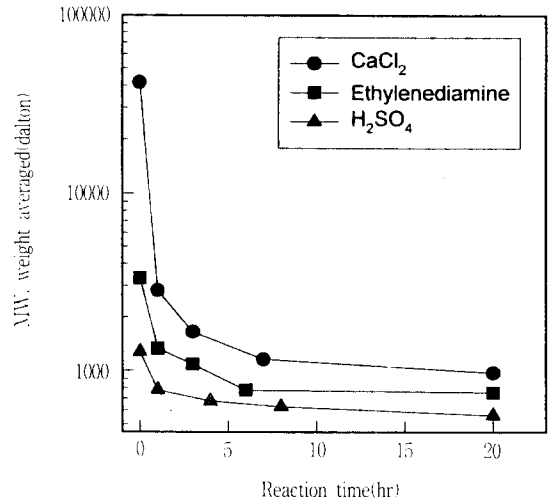


Figure 3. Time course of average molecular weight of silk peptides by different solubilization methods followed by protease treatments.

효소분해 후 얻은 가수분해물은 평균 분자량의 차이가 크지 않는 것으로 나타났다. 따라서 추가적인 효소처리에 의해 실크 펩타이드를 저분자화하고자 하는 경우, 적절한 가용화 방법의 선정은 가용화 방법 자체의 용이성 및 공정의 복잡성, 부산물의 유무 등에 의해 결정될 수 있을 것으로 보인다.

**실크의 산분해**

효소분해법을 산분해법과 비교하기 위하여 염산으로 실크 섬유를 분해하였다. 염산 용액의 농도가 증가함에 따라 용해도는 비례적으로 증가하지 않았으므로 실크 가용화를 위해 높은 농도의 염산 용액을 이용할 필요가 없었다(데이터 제시 생략). 오히려 산 농도가 높을수록 NaOH 중화 시 많은 양의 NaOH가 소모되며, 또한 염 생성량이 많았다. 따라서 최적의 실크 용해 및 가수분해 조건은 2-4 N HCl 용액을 이용하는 것이 유리하였으며, 상온보다는 55℃ 정도로 가열하여 용해시키는 것이 효율적이었다. 2 N의 염산으로 55℃에서 각각 14시간, 24시간 동안 가수분해한 실크 분해물의 GPC로부터 분자량 분포를 구하였다(Figure 4). 14시간 분해하였을 경우 120-270 dalton의 분자량을 갖는 펩타이드가 주성분인 가수분해물을 얻었으며 24시간 가수분해하였을 경우에는 분자량이 80-160 dalton인 가수분해물을 얻었다. 이때 중량평균 분자량은 각각 210과 145 dalton이었으며 두 시료에 대한 유리 아미노산함량을 분석한 결과 각각 40%, 80%의 함량치를 보였다. 24시간 동안의 염산분해에 의해 얻은 실크 가수분해물의 평균 분자량이 앞서 시험한 여러 가지 가용화 및 효소분해에 의해 얻은 실크 펩타이드의 평균 분자량보다 매우 작은 값이며 이는 실크 단백질이 대부분 유리 아미노산 단위로 가수분해되었음을 의미하였다. 이렇게 작은 분자량의 펩타이드를 주성분으로 하는 가수분해물의 경우에는 멜라닌 생성 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있어서 미백효과를 기대한 화장품 소재로의 응용이 가능하다(15).

이상의 결과로부터 실크의 가수분해에 의하여 펩타이드를 생

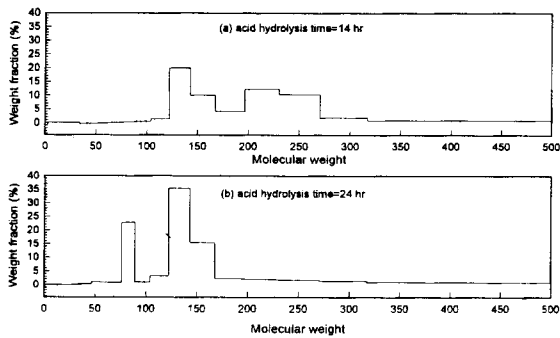


Figure 4. Molecular weight distribution of acid-hydrolyzed silk peptides at (a) 14 hr and (b) 24 hr.

산하고자 하는 경우 원하는 분자량(또는 펩타이드 사슬 길이)의 가수분해물을 얻기 위하여 적절한 가용화 방법의 선정 및 효소 분해 시간의 조절 또는 산분해법의 사용에 의하여 분자량의 조절이 가능함을 알 수 있었다. 염화칼슘, ethylenediamine, 황산 및 염산을 사용하여 가용화 및 가수분해하는 경우에는 가용화과정에 사용한 용매 및 염을 제거하기 위하여 공히 투석의 과정이 필요하며, 특히 염화칼슘과 ethylenediamine에 의해 가용화할 경우는 용매의 쓴 맛 또는 유독성 때문에 투석공정이 필수적이라 할 수 있다. 황산이나 염산을 이용할 경우 가용화뿐 아니라 가수분해를 동반하므로 효소처리 등의 추가 공정 없이 저분자의 실크 펩타이드를 얻을 수 있는 장점이 있다. 반면 이러한 산분해 공정은 가수분해가 신속히 진행되어 유리 아미노산의 함량이 높아지고 분자량의 조절이 용이하지 않는 단점을 갖고 있다. 효소분해법은 분자량의 조절이 용이하다는 장점과 별도의 전처리 과정으로서 용해 과정이 필요하다는 단점을 갖고 있으므로 산분해법과 효소분해법을 혼용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 즉 낮은 농도의 황산용액으로 우선 실크를 가용화한 후 중화 및 효소처리에 의해 펩타이드로 가수분해하는 것이 과도한 아미노산의 유리를 억제하면서 분자량의 조절도 용이할 것이다.

## 요 약

실크의 피브로인 단백질의 가수분해에 의한 실크 펩타이드의 제조를 위하여 실크의 가용화 조건이 분자량 분포에 미치는 영향을 고찰하였다. 염화칼슘, ethylenediamine 및 황산에 의해 가용화된 실크의 평균 분자량은 각각 41600, 3308과 1268 dalton으로서 염화칼슘을 제외한 나머지 두 가용화 방법에서 평균 분자량이 수천 dalton인 실크 용액을 얻을 수 있었으며 분산계수는 3-4의 범위를 보였다. 가용화 및 분말화한 후 6시간 동안 단백질 분해효소 처리에 의하여 600-1200 dalton의 중량평균 분자량을 갖는 실크 펩타이드를 얻을 수 있었다. 24시간 염산에 의한 산분해 처리에 의해 얻은 실크 펩타이드의 평균 분자량은 145 dalton으로 80%의 높은 유리 아미노산 함량을 나타내었다.

여러가지 가용화 방법 및 가수분해 방법 중 낮은 농도의 황산용액으로 우선 실크를 가용화한 후 중화 및 효소처리에 의해 펩타이드로 가수분해하는 방법이 과도한 아미노산의 유리를 억제하면서 분자량의 조절도 용이할 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

- Demura, M. and T. Asakura (1989), Immobilization of Glucose-oxidase with *Bombyx mori* Silk Fibroin by Only Stretching Treatment and Its Application to Glucose Sensor Characterization of Immobilized Enzyme, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 598-603.
- Demura, M., T. Asakura, E. Nakamura, and H. Tamura (1989), Immobilization of Peroxidase with a *Bombyx mori* Silk Fibroin and Its Application to Biophotosensors, *J. Biotechnol.*, **10**(2), 113-119.
- 野田信三 (1997), 桑葉抽出物の機能性と其の利用, *食品と開発*, **32**(4), 44-47.
- 平林潔 (1997), 次のベイト食品は桑と絹だ!, *New Food Industry*, **39**(1), 49-54.
- Ohshina, K., H. Ogino, and H. Hirota (1991), Cosmetic Compositions, UK Patent 2,242,198A.
- Ohshina, K., H. Ogino, and H. Hirota (1991), Hair Cosmetics Containing Silk Derivatives, UK Patent 2,242,129A.
- Chen, K., R. Takano, and K. Hirabayashi (1992), Production of Silk Powder and Method of Decolorization, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **61**(1), 32-35.
- Hirabayashi, K., Y. Miyagawa, and M. Kusuyama (1995), Preparation of Silk Fibroin Peptide of Low Molecular Weight by Silk Fiber Waste Hydrolysis Using Protease, Nucleisin, Papain or Trypsin, Japanese Patent 7067686.
- Waters Associate (1990), Waters Amino Acid Analysis System, pp. 24-32, Youngin Scientific Co., Ltd. Seoul.
- Richter, W. O., B. Jacob, and P. Schwandt (1983), Molecular Weight Determination of Peptides by High-performance Gel Permeation Chromatography, *Anal. Biochem.*, **133**, 288-291.
- Rabek, J. F. (1980), Experimental Methods in Polymer Chemistry, pp. 419-442, John Wiley & Sons, Chichester.
- 平林潔, 陳開利, 勢旗毅 (1991), *New Food Industry*, **33**(11), 1-4.
- 安藏谷 (1983), 可溶化シルクペプチド含有皮膚化粧料, Japanese Patent 15905.
- 채희정, 인만진, 김민홍 (1997), 단백질 첨가물로서의 효소 분해 대두 단백질의 특성, *한국농화학회지*, **40**(5), 404-408.
- 安藏谷 (1982), 可溶化シルクペプチド含有皮膚化粧料, Japanese Patent 4910.