

Silk Fibroin Gel의 제조조건에 따른 구조특성

이광길 · 이용우 · 여주홍 · 남 진 * · 권해용 * · 박영환 *

농업과학기술원 잠사곤충부
* 서울대학교 농업생명과학대학

Structural Characteristics of Silk Fibroin Gel on The Preparation Conditions

Kwang Gill Lee, Young Woo Lee, Joo Hong Yeo, Jin Nam*,
Hae Young Kweon* and Young Hwan Park*

Department of Sericulture & Entomology, National Institute of Agriculture
Science & Technology, Suwon, 441-744, Korea

*College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

ABSTRACT

Silk fibroin dissolved in highly concentrated calcium chloride and ethanol mixture aqueous solution turned into gel under suitable conditions. Preparation conditions and properties of gel were investigated as a function of parameters such as pH of solution, fibroin concentration, glycerol concentration and molecular weight. When pH of silk fibroin aqueous solution was near the isoelectronic point(pH 3.9-4.0), gelation occurred rapidly and strength of gel was stronger than that of pH-unadjusted due to electrostatic repulsion decrease between silk fibroin macromolecules. As concentration of silk fibroin and glycerol was higher, gelation occurred more rapid. FT Infra-red spectra of freeze-dried fibroin gel showed that gelation was derived by intermolecular anti-parallel β -sheet structure formation. In addition to, it was found that white-precipitate occurred instead of gelation when aqueous silk fibroin was treated by enzyme(flavouzyme), however, after flavouzyme-treated silk fibroin aqueous solution was centrifuged gelation occurred instantly. The results of differential scanning thermal analysis and infra-red spectroscopy showed that thermal stability and crystallinity of enzyme-hydrolyzed fibroin are superior to those of unhydrolyzed fibroin.

Key words : Silk fibroin Gel, Isoelectronic point, Flavouzyme

서 론

견은 오래 전부터 의복 재료 외에 여러 가지 용도로 이용되는 등 안전하고 생체친화성이 우수한 것으로 확인된 재료로서 그 구성 단백질인 견피브로인의 특성을 이용한 각종 용도로서의 새로운 바이오소재로서 주목받고 있을 뿐만 아니라 다른 응용소재로서의 연구가 활발히 이루어져 오고 있다. 특히 제사, 제직등의 과정에서 필연적으로 발생하는 부잡사를 유용하게 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다(Sugiyama *et al.*, 1981). 견피브로인은 glycine, alanine, serine, tyrosine 등의 아미노산으로 구성되어 있으며 이들 아미노산은 혈중콜레스테롤 저하

(Chen *et al.*, 1991) 및 알코올 대사를 촉진시키는 효과가 있다는 보고(順田等, 1987) 등 그 응용상에 관심을 갖고 여러 분야에서 계속적인 연구가 진행되고 있다. 근래에 들어서는 실크의 생체 적합성과 기능성을 바탕으로한 새로운 biomaterial로서의 그 응용범위가 확대되고 있는데 실크피브로인의 비섬유적 응용 특히, 기능성 식품, 화장품 및 의약품 등의 신소재 개발을 위해서는 견피브로인 단백질을 재생형화합에 있어서 형태학적 구조특성을 먼저 고찰해야 한다. 재생 견피브로인의 처리조건 변화에 따른 형태학적 구조학적 특성에 관한 연구들이 진행되어 왔는데 용액상, 분말상, 필름상 등에 관하여는 많은 연구가 진행되어온 반면에 피브로인 겔

에 대하여는 극히 단편적인 연구결과만이 보고되어 있다.

견피브로인 단백질에 대한 겔체 형상을 간단히 정의하기는 어려우나 일반적으로 강도 등에 의해서 설명되어지고 있으며 과량의 중성염 용액에 용해되어 얻어진 견피브로인 수용액으로부터 겔을 형성하기 위한 여러 조건들과 조건변화에 따른 겔의 물성과 분자구조특성들을 규명하기 위한 연구가 이루어져 왔다(Hirabashi *et al.*, 1990).

견피브로인 겔의 응용상의 관심을 갖고 경구투약용 약물담체로서의 가능성을 검토하기 위한 시도로써 견피브로인 겔 제조조건에 따른 겔의 특성과 약물 방출거동간의 관계를 고찰하였으며(Hanava *et al.*, 1995), 실크피브로인 겔을 부직포 상에 코팅하여 glucose oxidase(GOD)를 고정화시켰을 때 열, pH 등 조건변화에 따른 효소의 안정성과 활성을 고찰하여 glucose sensor로의 가능성을 제시하였다. (Asakura *et al.*, 1992) 최근 들어 고농도 견피브로인 용액이 색전물질로서 이용가능성이 *in vivo* 검증을 통하여 확인된 바 있으나 견피브로인 용액의 처리조건별 겔 형성시간 및 형상에 관하여는 지속적인 연구가 필요하다. 그러나 지금까지의 연구결과를 바탕으로 제조된 견피브로인 겔은 과량의 중성염에 용해되어 얻어진 분자량이 수만 내외의 고분자이므로 견피브로인 단백질을 이용한 기능성 식품, 의약품, 화장품 등의 응용에 제한이 있다. 그러므로 저분자화된 견피브로인을 이용하여 겔을 제조하기 위한 조건 규명이 요구되고 있다.

이에 본 연구에서는 겔 제조시 견피브로인 수용액의 pH, 피브로인 농도 그리고 겔화 축진을 위해 사용되는 글리세롤의 첨가량 등을 변화시키므로써 겔화시간과 강도면에서 겔의 물성을 설명하였고 효소 처리에 의한 분자량변화에 따른 겔 제조조건 변화를 고찰하였다. 또한 적외선흡광분석과 시차주사열분석을 이용하여 견피브로인 겔의 구조특성을 파악해 얻은 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

가잠고치(*Bombyx mori cocoon*)를 0.2%(o.w.f) sodium carbonate와 0.2%(o.w.f) 마르세이유비누용액에 용비 1:50으로 비등점에서 50분간 2회 정련한 후 반복 수세하여 얻은 정련견사를 사용하였다.

2. Silk Fibroin Solution의 제조

정련견사를 CaCl₂:H₂O:Ethanol(1:8:2 몰비) 혼합용매에 용비 1:20으로 하여 비등점에서 3시간 동안 용해한 후 원심분리하여 남아 있는 불순물을 제거하였다. 이를 셀룰로오스투스석막(MWCO=3,500)으로 3일간 투석을 실시하여 염과 에탄올을 제거한 후 폴리에틸렌글라이콜을 이용하여 적당한 농도로 농축시켜 견피브로인 수용액을 제조하였다.

3. 견피브로인 수용액의 효소처리

견피브로인 수용액에 단백질 분해효소로서 flavo-uzyme을 2%(v/v)농도로 55°C에서 2시간동안 효소가 수분해하여 저분자화된 견피브로인 수용액을 제조하였다.

4. Silk Fibroin Gel의 제조

견피브로인 수용액내의 피브로인함량은 농축정도를 달리하여 25%(w/w)까지 하였다. 견피브로인 수용액의 pH조절은 acetic acid와 sodium hydroxide를 이용하여 pH 2~13까지 조정하였으며, 글리세롤은 0~50%(w/w)까지 혼합하여 표준조건(20°C, RH 65%)에서 겔을 제조하였다.

5. 겔의 강도측정

겔의 형성은 45° 기울인 상태에서 1분 동안 형태의 변화가 없을 때를 기준으로 하였으며 겔의 강도 측정은 Universal tensile testing machine(DY, 21B Adamel-Rhomargy, France)을 이용하였다. 측정은 반지름 3 cm, 높이 3 cm의 원기둥 형태의 겔을 각각 조건에 따라 제조하여 지름 1.5 cm 원판을 압축속도 10 cm/min으로 겔 표면으로부터 깊이 10 mm 들어갈 때까지의 최대강도를 5회 측정하여 평균값을 구하였다.

6. 적외선흡광분석

겔화에 따른 구조전이와 결정화도의 변화를 조사하고자 FT-IR spectrometer(Perkin Elmer, Paragon-1000, England)를 이용하여 적외선분광분석을 행하였다. 시료는 적당량의 KBr과 혼합하여 펠렛을 제조하였으며 wave number는 4000~400 cm⁻¹, scan 회수는 60회로 측정하였다. 결정화지수는 Bhat & Nadiger (1980)의 방법에 따라 피브로인의 분자쇄중에서 random coil의 특성(A_{1265 cm⁻¹})과 anti-parallel β-sheet (A_{1235 cm⁻¹})의 특성이 가장 뚜렷하게 나타내는 amide III의 흡수대의 흡광도비로서 표시하였다.

$$IR\text{결정화지수} = \frac{A_{1265\text{ cm}^{-1}}}{A_{1235\text{ cm}^{-1}}} \times 100$$

여기서,

$A_{1265\text{ cm}^{-1}}$: 1265 cm^{-1} 에서의 흡광도

$A_{1235\text{ cm}^{-1}}$: 1235 cm^{-1} 에서의 흡광도

7. 시차주사열분석

제조 조건에 따른 피브로인 겔의 열적거동을 조사하기 위하여 Differential Scanning Calorimeter(TA 2910, TA Instruments, USA)를 사용하였다. 시료를 aluminium hermetic pan으로 밀봉하고 45ml/min의 질소기류하에서 60~365°C 범위에서 10°C/min의 승온 속도로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. pH의 영향

그림 1과 2는 건피브로인 수용액의 pH 변화에 따른 겔의 생성시간과 생성 후 강도를 나타낸 것으로 고농도 CaCl_2 혼합용액에 용해된 후 탈염 과정을 거친 건피브로인 수용액은 중성(pH 6.8)이었으며 겔화 되는 데 장시간이(약 7일) 걸리는 데 비하여 초산을 이용하여 용액의 pH를 3으로 조정하였을 때는 겔화 시간이 2시간 내외로 크게 단축되었고 생성된 겔의 강도도 가장 크게 나타났다. 이는 건피브로인의 등전점(isoelectronic point, pH=3.8~3.9)과 유사한 값으로서, 건피브로인을 포함한 단백질은 등전점 부근에서 분자쇄들의 양전하와 음전하가 같은 zwitter ion을 형성하여 분자쇄간 이온 반발력이 최소화하므로 거대 분자쇄들 사이에 상호작용할 수 있는 기회가 증가되고 이에 따라 소수성결합, 수소결합, 이온결합 등에

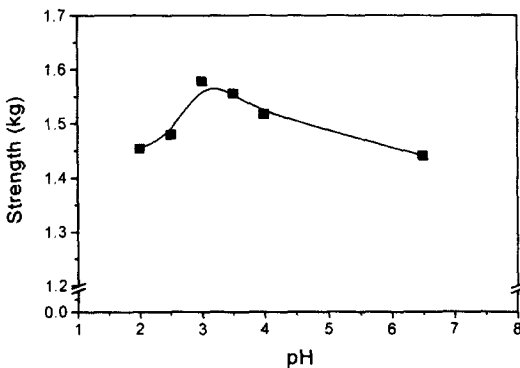


Fig. 1. Effect of pH on the strength of fibroin gel.

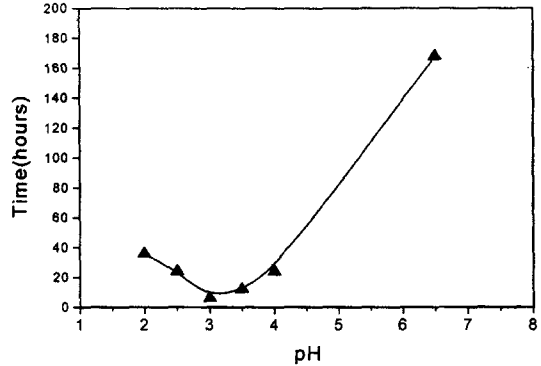


Fig. 2. Effect of pH on the gelation time.

의해 건피브로인 분자들간에 회합이 발생하여 β -sheet 구조가 형성되고 이는 망상구조로 발달하여 겔의 형태로 나타나게 된다. 한편, pH 1 미만이나 13 이상에서는 겔이 형성되지 않았는데 이는 등전점에서 크게 벗어남에 따라 음전하 또는 양전하가 우세하게 되어 발생하는 분자간 강한 이온 반발력으로 인하여 분자쇄들 사이에 회합이 이루어지지 못하는 데 그 원인이 있는 것으로 생각된다(Hirabayashi *et al.*, 1990).

pH 변화에 따른 구조 특성을 관찰하기 위하여 겔을 냉동건조하여 분말을 제조하였으며 제조된 분말에 대한 적외선분광분석 결과를 그림 3에 나타냈다. IR Spectrum 상에는 큰 변화가 나타나지 않았으나 피브로인의 결정화지수를 나타내는 흡광도비(A_{1265}/A_{1235})를 구한 결과(그림 4), pH 3.0에서 다소 크게 나타났다. 이는 알려진 피브로인의 등전점과 유사한 pH 3.0 부근의 범위에서 겔의 강도가 가장 크게 나타난

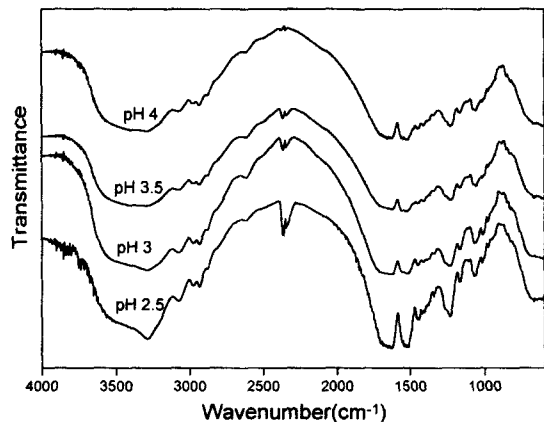


Fig. 3. Infrared spectra of freeze-dried fibroin gels prepared at pH 2.5, 3, 3.5 and 4.

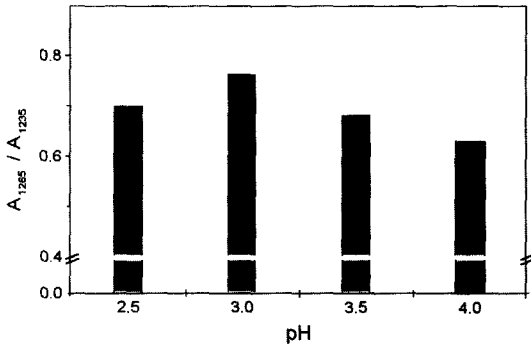


Fig. 4. Crystalline Index calculated from Infrared spectra of freeze-dried fibroin gels formed at various pH-conditions.

것과 일치하는 결과로서, pH 3.0 부근에서 anti-parallel β-pleated sheet로의 구조전이가 가장 잘 일어났다고 볼 수 있으며 이러한 구조전이에 의해서 겔 생성시간이 단축되었고 생성된 겔의 강도가 증가하였음을 알 수 있다.

2. 피브로인 농도의 영향

그림 5는 건피브로인 수용액중의 피브로인 함량에 따른 겔의 강도를 측정된 것으로서 피브로인의 농도가 15%(w/w) 이상으로 증가함에 따라 겔의 강도는 급격히 증가되었다. 이는 어느 한계 이상의 피브로인 농도에서는 피브로인 분자쇄간 상호결합 능력이 급격히 증대되기 때문인 것으로 보인다.

3. Glycerol의 영향

건피브로인 수용액이 겔화하는 데 있어서 글리세롤이 미치는 효과를 조사하기 위하여 글리세롤의 첨

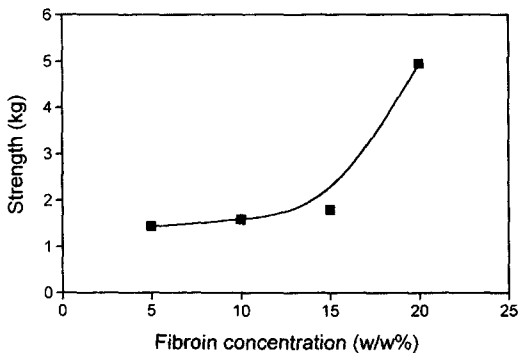


Fig. 5. Effect of fibroin concentration on the strength of fibroin gel at pH 3.5.

가량에 따른 겔화시간 및 강도를 측정하여 그림 6에 나타내었다. 중성염으로 용해하여 얻어진 건피브로인 수용액의 pH를 조정하지 않으면 겔화에 7일 이상의 상당한 시간이 걸리는 데(그림 2) 비하여, 건피브로인 수용액에 글리세롤을 첨가하면 겔화시간이 10시간내외로 단축되었으며 글리세롤 함량이 증가함에 따라 겔화시간이 서서히 감소하는 결과를 나타내었다. 이는 글리세롤의 강한 친수성작용으로 단백질영역 내에서 물을 배제시켜 단백질의 소수성을 증가시킴으로 소수성결합에 영향을 미치는 구조로 되어 안정화된다는 보고와 일치하는 것으로(Hanawa, et al., 1995, Gekko, et al., 1981), 글리세롤 함량비가 클수록 겔화시간은 크게 줄일 수 있었으나 강도는 크게 떨어졌다. 이는 글리세롤 함량이 증가됨에 따라 글리세롤에 의한 수분흡착량이 커지고 상대적으로 피브로인의 함량비가 낮아져서 분자쇄간 결합력이 작아지는

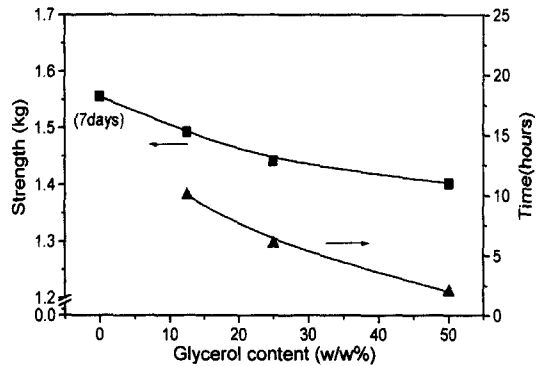


Fig. 6. Effect of glycerol content on the strength of fibroin gel(■) and gelation time(▲).

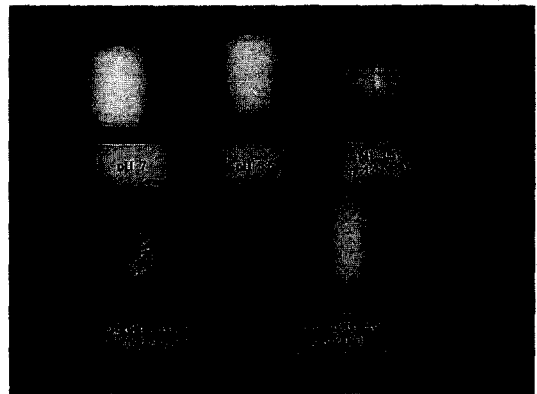


Fig. 7. Photographs of Fibroin gel prepared at various conditions.

Table 1. Relationship between gelation time and preparation condition of gel (● solution, ◆ powder and paste, ■ gel(solid), ▲ powder precipitation state)

Preparatin Conditon		Days for leaving	2 days	4 days	6 days	longer than 8 days
Untreated	pH 7		●	●	●	■
	pH 3.5		■	■	■	■
	Glycerol(25%)		■	■	■	■
Flavouzyme Treated	pH 7		●	▲	▲	▲
	Untreated		▲	▲	▲	▲
	pH 3.5	Glycerol(25%)	◆	◆	◆	◆
		Centrifugation	■	■	■	■

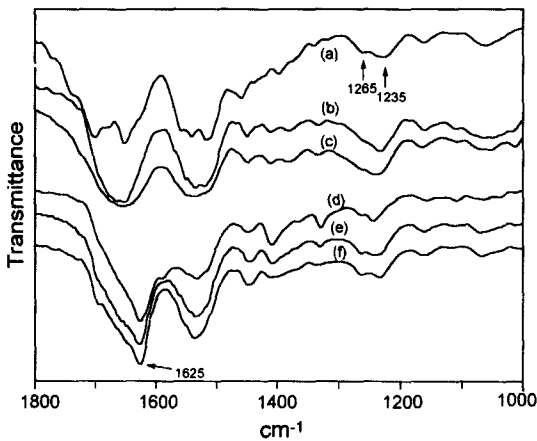


Fig. 8. Infrared spectrum of enzyme treated fibroin gels formed at pH 3.5. SFS-Enzyme untreated : (a) Degummed Silk Fibroin, (b) pH7.0 and (c) pH3.5. SFS-Enzyme treated : (d) pH 7.0, (e) pH 3.5 and (f) pH3.5 (Centrifuged).

데 그 원인이 있다고 생각된다. 또한 견피브로인 수용액에 친수성인 글리세롤을 첨가함으로써 견피브로인은 상대적으로 더 큰 소수성을 띠게 되어 polypeptide 쇠간에 비극성기에 의한 소수성결합이 일어나 망상구조를 형성하게 되므로 겔화하는 데 글리세롤을 사용하지 않았던 경우보다 겔화시간이 단축되었다고 볼 수 있다.

4. 효소처리의 영향

견피브로인 분자량 차이에 따른 겔화 형성조건을 고찰하고자 단백질 가수분해효소의 일종인 flavouzyme 효소를 처리한 결과를 표 1에 나타내었다. 그림 8은 견피브로인 수용액을 pH 3.5로 조정하여 얻

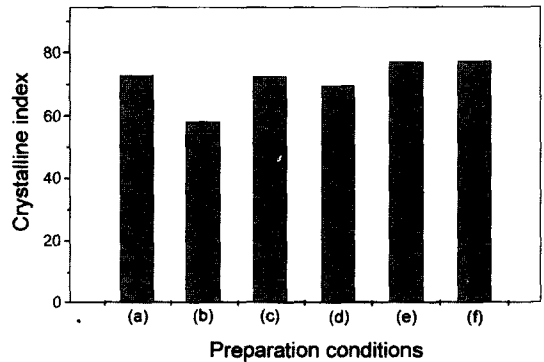


Fig. 9. Crystalline Index of freeze-dried fibroin gels and powders formed at various conditions. SFS-Enzyme untreated : (a) Degummed Silk Fibroin, (b) pH7.0 and (c) pH3.5. SFS-Enzyme treated : (d) pH 7.0, (e) pH 3.5 and (f) pH3.5 (Centrifuged).

어진 겔과 Flavouzyme 효소처리 후 pH 3.5로 조정하여 얻어진 침전물을 각각 동결 건조하여 얻어진 분말시료에 대한 IR spectrum으로서 효소처리시 β-sheet 구조를 나타내는 amide III 흡수대에서의 1265 cm⁻¹과 amide I 흡수대에서의 1625 cm⁻¹에서 피크가 나타나고 있다. 이는 효소가수분해에 의하여 분자량이 저하되는 경우 새로운 말단이 생성돼 열역학적으로 안정한 위치로 전이가 일어나 결정화가 쉬워진다는 보고와 잘 일치한다(최 · 남 1995). Spectrum 으로부터 IR결정화지수를 계산한 결과(그림 9)에서도 효소처리구가 효소를 처리하지 않은 경우에 비하여 높은 결정화지수를 나타내었으며, 효소처리 이후에도 초산으로 pH를 3.5로 조정하였을 때는 결정화가 좀 더 증가하였다.

한편, 견피브로인 수용액에 효소를 처리한 후 원심

분리한 상등액을 그대로 방치하였을 때에는 겔이 형성되지 않고 흰색의 분말상 침전물만을 형성하였는데 이는 분자량저하로 망상구조에 의한 겔화가 어렵고 다만 일부분의 응집에 의한 분말상의 침전이 생기기 때문으로 생각된다. 효소처리후 얻은 상등액의 pH를 등전점 부근으로 조정했을 때에도 겔이 형성되지 못하고 같은 분말상의 침전이 형성되었고 앞서 건피브로인 수용액을 강하게 겔화시키는 것으로 밝혀진 글리세롤을 첨가하는 경우에 있어서도 작은 입자상들의 집합체가 페이스트상을 이루었으나 겔화는 미약하였다.

효소분해에 의한 저분자량의 분자쇄들이 결합에 의한 망상구조를 생성하여 겔화를 이루기 위해서는 외부로부터 영향을 미칠 수 있는 강한 인자 등이 요구되어지며 이러한 인자를 밝혀내는 연구는 지속적으로 수행되어야 할 것이며 한 예로 효소처리구 상등액을 pH 3-4로 조정하여 전하에 의한 반발력을 최소화한 후 2시간 동안 10,000 rpm으로 강한 원심분리를 하면 약한 강도를 가진 겔상을 얻을 수가 있으며 시간이 경과함에 따라 겔의 강도는 다소 증가하였다.

그림 10은 제조조건변화에 따른 겔의 열적특성을 고찰하기 위해 시차주사열분석을 실시한 결과이다. 정련건피브로인의 열적거동은 100°C 부근에서 내부수분 증발에 의한 흡열피크가 나타나고 314°C 부근에서 건피브로인 분자쇄의 결정부분을 형성하고 있는 β -sheet 구조 분자쇄의 열분해에 따른 최대 열분해

흡열피크가 나타나고 있는데 반하여, CaCl₂ 혼합용매로 용해하여 얻은 겔은 최대 열분해가 278°C 부근으로 낮아지고 있다. 정련건사의 잘 배향된 결정구조가 CaCl₂ 혼합용매에 의한 용해로 파괴되어 random coil 구조를 이루며 분자쇄가 절단되어 분자량이 감소한 건피브로인 수용액이 겔화하면서 분자쇄 상호간의 결합력 약화와 결정화정도의 감소로 인해 열적 안정성이 낮아졌기 때문이다. 또한 200°C 부근에서 재결정화에 의한 발열피크가 나타나고 있어 정련건피브로인에 비하여 결정화정도가 낮음을 알 수 있다.

반면에 등전점으로 조절한 후 겔을 제조한 경우에 있어서는 197°C 부근에서 발열피크가 나타나지 않아 재결정화가 일어날 수 있는 비결정부분이 등전점으로 조절하지 않은 겔에 비하여 상대적으로 더 적음을 알 수 있다. 이는 IR 결정화지수가 높았던 것과 일치하는 결과이다. 또한 최대 열분해 흡열피크 역시 282°C로 다소 높게 나타나 β -sheet 구조전이에 따른 열적 안정성이 증가하였을 알 수 있다. 한편, 효소가 수분해에 있어서는 226°C 부근과 286°C 부근에서 발열피크가 나타나고 있는데 가수분해에 의한 분자량저하로 낮은 온도 부근에서 일부 열분해가 일어나는 것으로 보이며 저분자화된 분자쇄들이 좀더 안정한 새로운 결합을 형성하여 결정성이 증가하였기 때문에 효소 미처리구에 비하여 최대 열분해피크가 다소 높은 온도에서 관찰되었다.

적 요

1. 중성염에 용해한 후 얻어진 건피브로인 수용액의 pH를 3.0으로 조정하였을 때 피브로인 분자쇄들간에 정전기적 반발력이 감소하여 피브로인 분자쇄 상호간에 결합력이 증가하므로 겔화시간이 단축되었고 적외선분광분석 결과 β -sheet 구조로의 전이가 빨리 일어나고 있음을 확인하였다.
2. Silk fibroin 용액내에 glycerol 함량비가 클수록 겔화의 시간은 크게 단축되었으나 상대적 수분함량의 증가로 강도는 낮아졌다.
3. Silk fibroin 용액내에 피브로인의 농도가 높을수록 겔의 강도는 증가하였다.
4. 효소분해된 Silk fibroin 용액을 pH 3.0으로 조정 후 실온에서 보관하였을 때 분자량저하에 따른 분자쇄간 결합력 약화로 겔상을 이루지 못하고 흰색의 분말상 침전을 형성하였으나 pH 3.0 조정 후 원심분리하면 겔상을 얻을 수가 있었다.

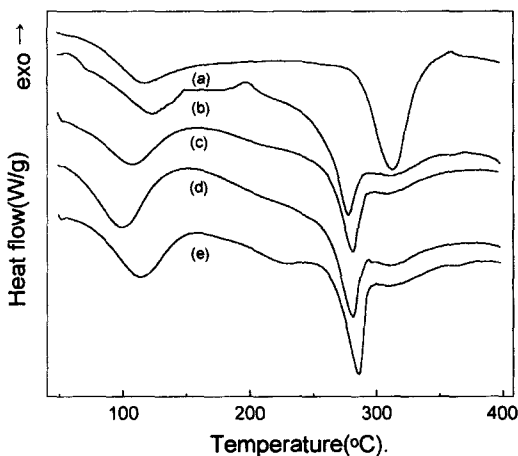


Fig. 10. DSC thermogram of Silk Fibroin prepared at various conditions. (a) Degummed Silk Fibroin, (b) pH7.0, (c) pH 3.5, (d) pH 3.0 and (e) Enzyme treated.

5. 시차주사열분석 결과, 건피브로인 수용액을 등전점 조절하였을 때에는 재결정화에 의한 발열피크가 나타나지 않았고 결정성이 좀더 높았으며 효소처리한 경우에는 분자량감소로 낮은 온도 부근에서 일부 열분해가 일어났으나 저분자화된 분자쇄들이 새로운 결합을 형성하여 열적안정성이 다소 높게 나타났다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구개발과제의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Ayub, Z. H., K. Hirabayashi and M. Arai(1992) Effect of pH on Silk Fibroin Gelation. *Sen-i Gakkaishi*. **48**(3): 141-143.
- Ayub, Z. H., M. Arai and K. Hirabayashi(1994) Quantitative Structural Analysis and Physical Properties of Silk Fibroin Hydrogels. *POLYMER*. **35**(10): 2197-2200.
- Asakura, T., M. Kitaguchi, M. Demura, H. Sakai and K. Komatsu(1992) Immobilization of Glucose Oxidase on Nonwoven Fabrics with *Bombyx mori* Silk Fibroin Gel. *J. Appl. Polym. Sci.* **46**: 49-53.
- Bhat, N. V. and G. S. Nadiger(1980) Crystallinity in Silk Fiber: Partial Acid Hydrolysis and Related Studies. *J. Appl. Polym. Sci.* **25**: 921-932.
- Chen, K., R. Takano and K. Hirabayashi(1991) Production of Soluble Fibroin Powder by Hydrolysis with Hydrochloric Acid and Physical Properties. *J. Seric. Sci. Jpn.* **60**(5): 358-362.
- Gekko, K. and S. N. Timascheff(1981) Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-water Mixtures. *Biochemistry*, **20**: 4667-4676.
- Hanava, T., A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka and M. Sugihara(1995) New Oral Dosage Form for Elderly Patients: Preparation and Characterization of Silk Fibroin Gel. *Pharm. Soc. Jp.* **43**(2): 284-288.
- Hanava, T., A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, and M. Sugihara(1995). New Oral Dosage Form for Elderly Patients. II.: Release Behavior of Benfotamine from Silk Fibroin Gel. *Pharm. Soc. Jp.* **43**(5): 872-876.
- Hirabayashi, K., Z. H. Ayub and Y. Kume(1990) Gelation of Silk Fibroin. *Seni-Gakkaishi*, **46**(11): 521-524.
- Magoshi, J. (1974) *Koubunshi Ronbunshu*, **31**: 765.
- Sugiyama, K., Y. Kunhima and K. Muramatsu(1980) Effects of Sulfur Containing Amino Acids and Glycine on Plasma Cholesterol Level on Rats on a High Cholesterol Diet. *Agric. Biol. Chem.* **49**(10): 3455-3461.
- 최해경, 남중희 (1995) 건피브로인 분말과 필름의 제조 및 구조분석. *한국잠사학회지*. **37**(2): 142-152.
- 順田都三南, 文豊, 堀田正晴(1987) *Pharma. Medica*. **5**, 75.