

한천 마이크로캡슐의 제조 및 내부구조 분석

박철완 · 이신영 · †허원

강원대학교 공과대학 생물공학과

(접수 : 2007. 5. 9., 게재승인 : 2007. 8. 10.)

Preparation of Agar Microcapsules and Analysis of Their Internal Structure

Chul-Wan Park, Shin-Young Lee, and Won Hur†

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received : 2007. 5. 9., Accepted : 2007. 8. 10.)

A method of forming agar microcapsule with fibroin coating was developed in this report. The capsules were prepared from a W/O emulsion of hot agar in mineral oil and were subsequently coated by fibroin. The capsules were harvested as precipitated aggregates, which can be dispersed in an aqueous media. The diameter of the microcapsule was less than 10 μm by microscopic observation and 90% of them were between 1.32 μm and 6.0 μm . The structure of the aggregates and their dispersed microspheres were investigated by scanning electron microscope. Confocal microscopy was applied to visualize the core-shell structure of the agar microcapsule with fibroin coating. Thermogravimetric analysis (TGA) measured their composition to be agar 51.2%, fibroin 13.8%, Span 80 1.4% by weight.

Key Words : Agar microcapsule, fibroin coating, confocal microscope, redispersion

서론

한천 (agar)은 홍조류 우뚝가사리에서 얻어지는 중성 다당인 아가로오스 (agarose)와 산성 다당인 아가로펙틴 (agaropectin)이 약 7 : 3으로 구성된 갈락탄 (galactan)의 혼합물이다. 상온에서 겔을 형성하는 성질을 이용하여 미생물을 배양하는 배지의 제조에 오랫동안 사용되어 왔다. 최근에는 마이크로캡슐의 소재로 활용되어 미생물의 고정화 (1-3), 화장품 소재용 소프트캡슐 (4) 및 동물세포를 캡슐화한 인공장기 (5, 6)의 제조에 활용되고 있다. 한천 혹은 아가로오스 마이크로캡슐은 40°C 이하에서 겔을 형성하는 성질을 이용하여 구형의 틀을 사용하거나 분무 냉각 (spray cooling) 및 W/O 에멀전으로부터 제조된다. W/O 에멀전 방법은 먼저 온도를 높여서 한천을 용융된 상태로 만들어 기름을 연속상인 W/O 에멀전을 만들고 이를 냉각시켜 한천 마이크로캡슐을 필터 등의 수단으로 회수하는 것으로 잘 알려져 있다. 분무냉각법에 비하여 작은 크기의

마이크로캡슐을 제조할 수 있다는 장점이 있으며 대량으로 제조할 수 있다. Miyazawa (4)는 W/O 에멀전으로 제조되는 한천마이크로 캡슐의 크기는 온도 및 교반속도로 조절 가능하였으며, 온도와 교반속도를 높이면 캡슐의 크기가 작아진다고 보고하였다. 그리고 Esquisabe (7)는 아가로오스를 점도가 다른 기름을 사용하여 마이크로캡슐을 제조할 때 입자의 크기는 유화단계에서 사용하는 기름의 점도에 의하여 정해지는 것으로 보고하고 있다. 한천 겔의 투과성은 매우 높기 때문에 미생물이나 동물세포와 같이 매우 크기가 큰 물질을 포괄적으로 고정화시키는데 유리하다. 그러나 원하는 물질의 방출을 제한하거나 조절하기 위하여 마이크로캡슐의 표면에 다른 물질로 피막을 형성시켜 투과율을 조절하는 방법도 시도되고 있다. 같은 해조류 유래의 알긴산 겔로 제조된 마이크로캡슐에 폴리라이신을 처리하는 정도를 달리하여 투과한계 분자량을 100,000과 50,000으로 조절할 수 있다고 보고되어 있다 (8).

본 연구에서는 크기가 작은 한천 마이크로캡슐을 W/O 에멀전으로 제조하고, 여기에 실크 피브로인 단백질로 캡슐에 피막을 형성시켜 투과율의 조절이 가능하게 제조할 수 있는 방법을 연구하였다. 과량의 유화제를 사용하여 에멀전의 한천 겔 캡슐의 크기를 작게 만들 수 있으나 이것을 회수하고 서로 엉기지 않게 유지하는 방법은 알려지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 W/O 형태의 한천 에멀

† Corresponding Author : Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6276, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : wonhur@kangwon.ac.kr

전을 만들어 온도를 낮추어 한천을 구형의 입자를 만들고 여기에 피브로인 수용액을 첨가하여 감압 건조시켜 피브로인 피막을 형성시키고 에탄올로 세척하여 피막을 경화시키면서 마이크로캡슐이 뭉쳐진 형태의 분말로 회수할 수 있는 공정을 연구하였다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용된 한천은 미생물 배지 제조용으로 판매되는 정제 분말 한천을 Junsei Chemical (Japan)에서 구입하였다. 실크 피브로인은 견사를 고농도의 염에서 가용화시키고 이를 투석을 통하여 탈염시킨 후 동결건조된 분말을 Fineco Co., Ltd. (Chunchon, Korea)에서 제공받아 사용하였다.

한천 마이크로캡슐의 제조

미네랄 오일 45 mL에 유화제 Sorbitan monooleate (Span 80) 5 mL을 250 mL 비이커에 첨가한 후 마그네틱 바를 이용하여 일정한 속도 (600 rpm)로 30분간 교반을 하였다. 한천 용액은 0.2 g의 한천 분말을 10 mL의 증류수에 녹인 후 70°C의 열을 가하여 제조하였다. 일정한 속도로 교반중인 미네랄 오일 용액에 한천 용액을 분당 1 mL의 속도로 총 6 mL을 주입하였다. 증류수 10 mL에 실크 피브로인 0.2 g을 녹인 실크 피브로인 수용액을 교반중인 한천 현탁액에 분당 1 mL의 속도로 나누어 총 6 mL을 주입하였다. 약 40분간 교반 후 회전식 감압 증발기 (JP/N 1000S-W, Eyela, Japan)를 사용하여 30분 동안 55°C에서 건조시켰다. 건조한 현탁액을 50 mL 튜브에 옮긴 후 2000 rpm으로 원심분리하고 침전물을 2~3회 에탄올로 세척을 하였으며, 세척이 끝난 시료는 건조하여 분말형태로 회수하였다.

한천 현탁액의 점도관찰

한천 현탁액 및 미네랄오일과 유화제의 혼합액의 점도는 회전점도계 Brabender viscometer (Brabender Instruments, Inc., Germany)를 사용하여 상온에서 측정하였다. 측정용컵 (E17)에 시료액 8 mL을 넣고 0~130 rpm의 회전속도로 변화시키며 shear stress를 측정하여 점도를 계산하였다.

주사 전자 현미경 (SEM)을 통한 한천 피브로인 마이크로캡슐의 관찰

한천 마이크로캡슐의 표면과 형태는 주사 전자 현미경 (S-4300, Hitachi, Japan)을 통하여 진공 상태에서 골드 코팅을 한 후 관찰하였다.

공초점 현미경 (CLM)을 통한 한천 피브로인 마이크로캡슐의 관찰

한천 마이크로캡슐을 탄산나트륨 완충용액 (0.1 M, pH 9)에 2 mg/mL으로 녹인 후 50 µL의 FITC 용액 (1 mg/mL, DMSO)과 혼합한다. 암실에서 4시간의 반응시간을 거친 샘플을 0.45 µm 필터지에 인산 완충용액을 통과시키며 세척을 한 후 건조를 한다. 건조된 샘플을 공초점 현미경

(Olympus, FLUROVIEW- FV300, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

열 중량 분석기 (TGA)를 통한 마이크로캡슐의 조성 관찰

제조된 한천 마이크로캡슐의 조성을 알아보기 위하여 thermogravimetric analysis (SDT2960, TA Instruments, USA)를 사용하였다. 질소가스를 이용하였으며 상온에서부터 1000°C까지 분당 10°C의 속도로 온도를 증가시키면서 캡슐의 무게감소를 측정하였다. 한천과 피브로인, Span 80의 각각의 단일 중량변화와 분해온도를 마이크로캡슐에 대한 결과와 비교하여 캡슐의 성분의 조성을 계산하였다.

결과 및 고찰

한천 현탁액의 제조

한천마이크로 캡슐을 제조하기 위하여 먼저 가열된 미네랄 오일에 유화제인 Span 80을 혼합한 후 용융된 한천 용액을 첨가하여 W/O 에멀전을 제조하고 서서히 냉각시켜 한천 현탁액을 제조하였다. 광학현미경으로 한천현탁액을 관찰한 결과, 유화제의 농도가 높으면 구형의 한천 입자뿐만 아니라 미세한 한천 입자들이 공존하였다. 따라서 유화제의 최적농도를 찾기 위하여 유화제의 함량을 미네랄 오일과 혼합액 전체 부피의 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 30%로 첨가하여 점도와 광학현미경으로 현탁액의 성상을 관찰하였다. 유화제가 전혀 첨가되지 않으면 한천 마이크로캡슐이 생성되지 않았기에 실험에서 제외하였다. 동시에 미네랄 오일과 유화제 (Span 80)가 혼합된 분산상의 점성을 측정하여 비교하였다(Fig. 1).

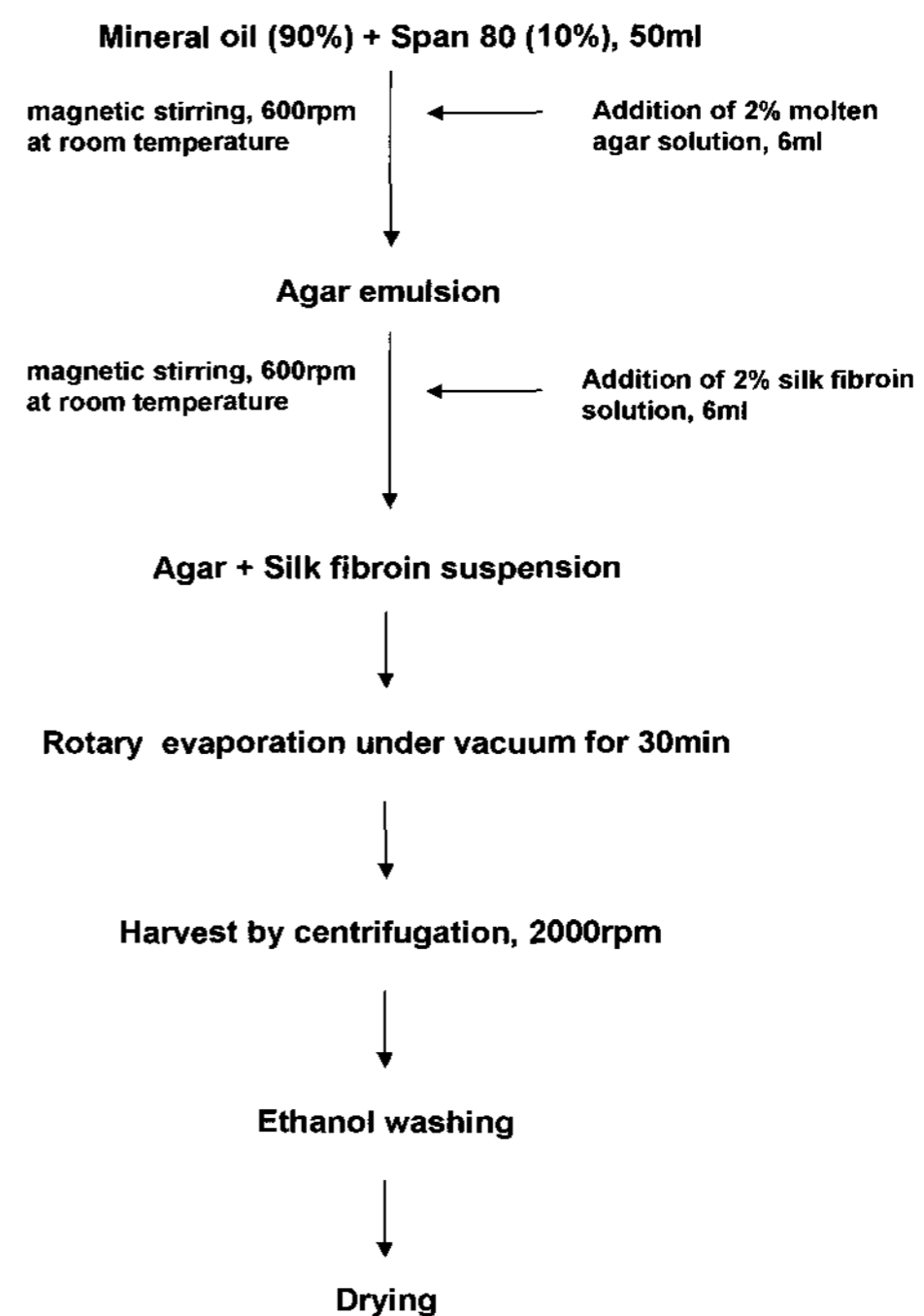


Figure 1. Process for the preparation of agar microcapsules.

미네랄 오일과 유화제만이 혼합된 분산상의 점성은 유화제의 농도가 상승함에 따라 점성도 상승하였으며 한천 현탁액의 점성도 유화제의 농도가 증가함에 따라 역시 점성이 증가하였다. 유화제의 농도가 10% 이하에서는 20 mPa/s 이하의 점도를 나타내었으나 유화제의 농도가 15% 이상일 때부터는 현탁액의 점도가 매우 빠르게 증가하였다. 그리고 큰 입자사이의 연속상이 탁하게 변하는 것을 광학현미경으로 관찰할 수 있었다. 따라서 마이크로캡슐의 균일도를 향상시키기 위하여 유화제의 농도를 10% 이하로 결정하였다.

Esquisabe(7)의 연구는 각각 점도가 다른 sweet almond oil (67.1 mPa/s)과 jojoba oil (37.7 mPa/s)을 사용하여 각각 23.1 μm 와 42.6 μm 크기의 아가로오스 마이크로캡슐을 얻었다고 보고하고 있다. 본 실험에서 한천으로 W/O 에멀전을 형성시키는데 사용된 미네랄 오일의 점도는 8 mPa/s로서 다른 기름에 비하여 점도가 낮은 조건에서 제조되었으나 캡슐의 크기는 오히려 10 μm 이하로 작았다. 이것은 제조과정에서 한천 마이크로캡슐을 건조시켜 수분을 감소시키는 과정이 있고 유화제를 사용한 점이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

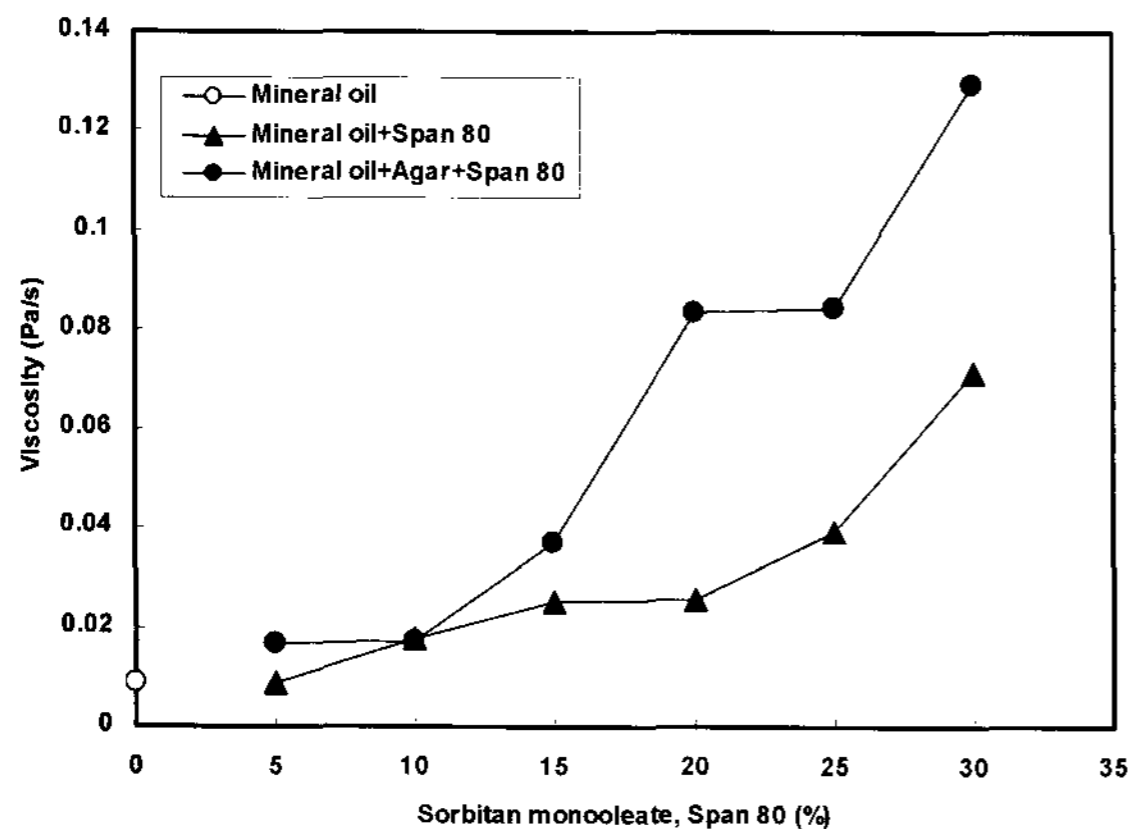


Figure 2. Viscosity of agar suspension of mineral oil in the presence of varying detergent concentrations.

한천 마이크로캡슐의 제조

미네랄 오일에 Span 80을 10% 첨가하고 한천용액과 첨가하여 W/O 에멀전을 만들고 온도를 낮추어 현탁액 상태에서 피브로인을 투입하여 한천 마이크로캡슐을 제조하였다(Fig. 2). 유화제가 10% 첨가된 50 mL의 미네랄 오일에 6 mL의 2% 한천을 용융상태에서 주사기로 서서히 투입하여 한천 현탁액을 제조하였다. 이 용액을 식힌 후 한천 마이크로캡슐이 형성된 것은 광학 현미경을 통하여 확인하였다. 이 현탁액에 다시 6 mL의 2% 피브로인 수용액을 서서히 첨가하였다. 서서히 나누어 첨가하지 않고 일시에 투입할 경우 고르게 분산되지 않고 한천 겔 덩어리를 형성하여 분당 1 mL의 속도로 나누어 투입하였다. 6 mL의 2% 한천 겔과 0.2 g의 피브로인이 한천 마이크로캡슐의 제조에 사용되었으나 회전 감압 증발기를 이용한 건조 과정에서 약 8.7 mL의 수분이 제거되고 에탄올 세척과정을 통하여 얻은 침전물을 건조시켜 최종적으로 0.141 g의 한천 마

이크로캡슐을 회수하였다. 피브로인과 한천은 각각 0.12 g씩 모두 0.24 g이 사용되었으므로 투입된 피브로인과 한천을 기준으로 수율은 0.59 (g/g)이다. 제조된 한천 마이크로캡슐을 구성하는 조성을 알기위하여 열 중량 분석기를 사용하여 상온에서 1000 $^{\circ}\text{C}$ 까지 가열하면서 제조된 마이크로캡슐과 한천, 피브로인, Span 80의 질량 감소 곡선을 구하였다. 각각의 질량감소곡선으로부터 마이크로캡슐의 조성은 한천 51.2%, 피브로인 13.8% 및 Span 80은 1.4%로 관찰되었다. 한천과 피브로인은 0.12 g씩 같이 투입되었으나 캡슐의 성분은 피브로인의 함량이 더 적은 것으로 나타났다. 캡슐의 수율이 0.59 (g/g)인 점을 고려해보면 상당량의 피브로인은 원심분리를 통한 회수과정에서 손실된 것으로 판단된다.

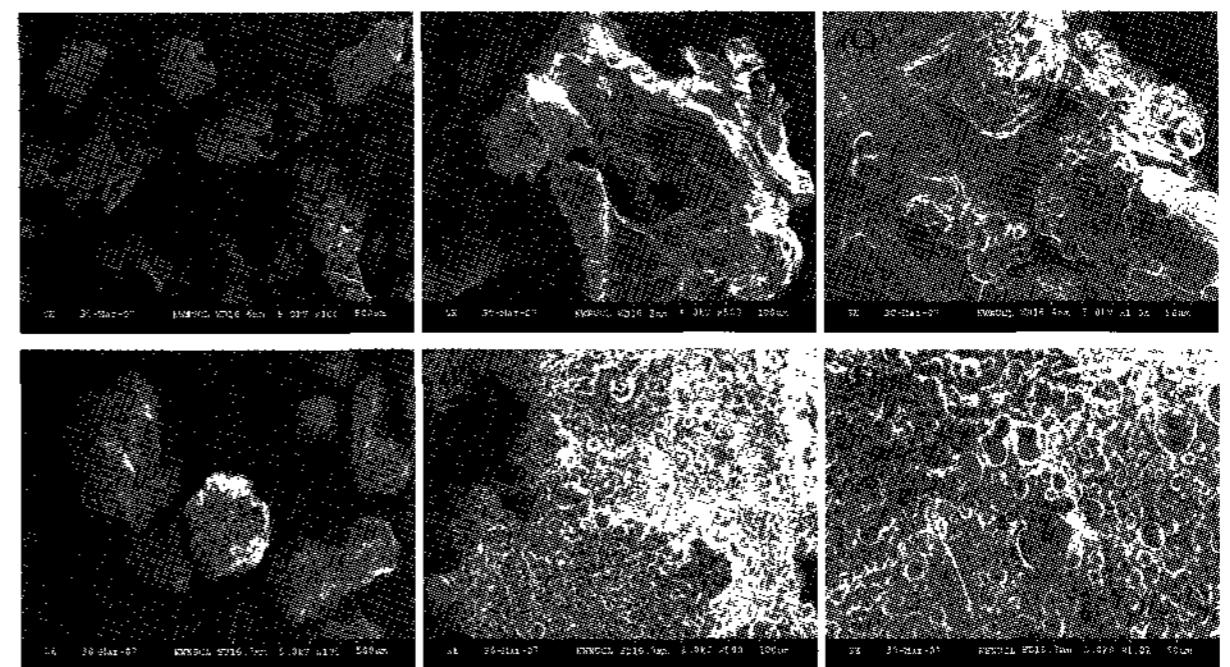


Figure 3. Scanning electron microscope (SEM) images of agar microcapsules (A, B, C) and agar fibroin microcapsules (D, E, F) after evaporation under vacuum ((A) and (D) were observed by 100 magnifications, (B) and (E) were observed by 500 magnifications, (C) and (F) were observed by 1000 magnifications).

한천 피브로인 마이크로캡슐의 형태 및 재분산

Fig. 3은 제조된 한천 마이크로캡슐의 에탄올 침전물과 피브로인을 첨가하지 않은 한천현탁액의 에탄올 침전물의 주사 전자 현미경사진이다. 각각의 시료들은 100배, 500배 및 1000배의 배율로 관찰을 하였다. 한천 마이크로캡슐의 에탄올 침전물의 크기는 약 300~400 μm 로 불규칙한 모양을 가지고 있다. 피브로인이 첨가된 한천 마이크로캡슐의 침전물은 구형의 작은 입자들이 뭉쳐져 큰 덩어리를 형성하고 있는 것으로 관찰되는 반면, 피브로인이 첨가되지 않은 경우에는 이와 같은 표면을 관찰할 수 없었다. 따라서 한천 마이크로캡슐의 에탄올 침전물은 피브로인 피막으로 쌓인 미세한 구형의 한천입자들이 뭉쳐진 것으로 판단된다. 뭉쳐진 한천 마이크로캡슐의 덩어리를 물에 녹여 분산시키고 분산되는 과정 및 각각의 입자를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 4(B)는 한천 마이크로캡슐 응집체의 광학 현미경 사진이고 (C)는 분산된 캡슐의 사진이다. (D)와 (E)는 주사 전자 현미경사진이다. Fig. 4(A)는 한천 캡슐을 피브로인이 포집하고 있는 상태에서 물에 첨가하여 재분산이 이루어는 과정을 도식화한 것이다. 현미경 사진 상으로 한천 캡슐은 다양한 크기 분포를 나타내며 크기는 10 μm 이하가 대부분이었다.

피브로인은 실크 섬유의 중심가닥을 형성하는 대표적인 구조단백질로서 고온 고농도의 염화칼슘 용액에서 용융시

키고 이를 투석하여 수용액을 얻을 수 있으며(9) 피브로인 수용액을 건조시키면 피브로인 필름을 얻을 수 있는데 이 필름을 에탄올 등의 용매를 처리하면 단백질의 3차구조가 random coil 형태에서 β -sheet 형태로 변하고 분자사슬 사이의 수분이 제거되어 물에 더 이상 녹지 않게 된다(10). 따라서 캡슐을 제조하는 과정에서 감압 건조 동안에 피브로인이 첨가되지 않은 상태의 한천 캡슐은 형태를 유지하지 못하고, 수분이 증발될 때 서로 응집되어 매우 매끄러운 한천 겔 덩어리로 변화하지만 피브로인이 첨가되면 피브로인이 한천 캡슐 표면의 흡착하여 피막을 형성하고 에탄올 세척과정에서 캡슐들이 서로 뭉쳐져서 침전물로 회수되는 것으로 판단할 수 있었다. 피브로인 역시 에탄올에 녹지 않으므로 피브로인으로 피막이 형성된 마이크로캡슐은 서로 덩어리져 침전하게 되고 필터지를 사용하여 간단하게 회수할 수 있었다. 따라서 피브로인 피막은 한천 마이크로캡슐의 형태를 유지해 줄 뿐만 아니라 캡슐들이 응집된 덩어리 형태로 회수할 수 있다는 장점을 제공하고 있다.

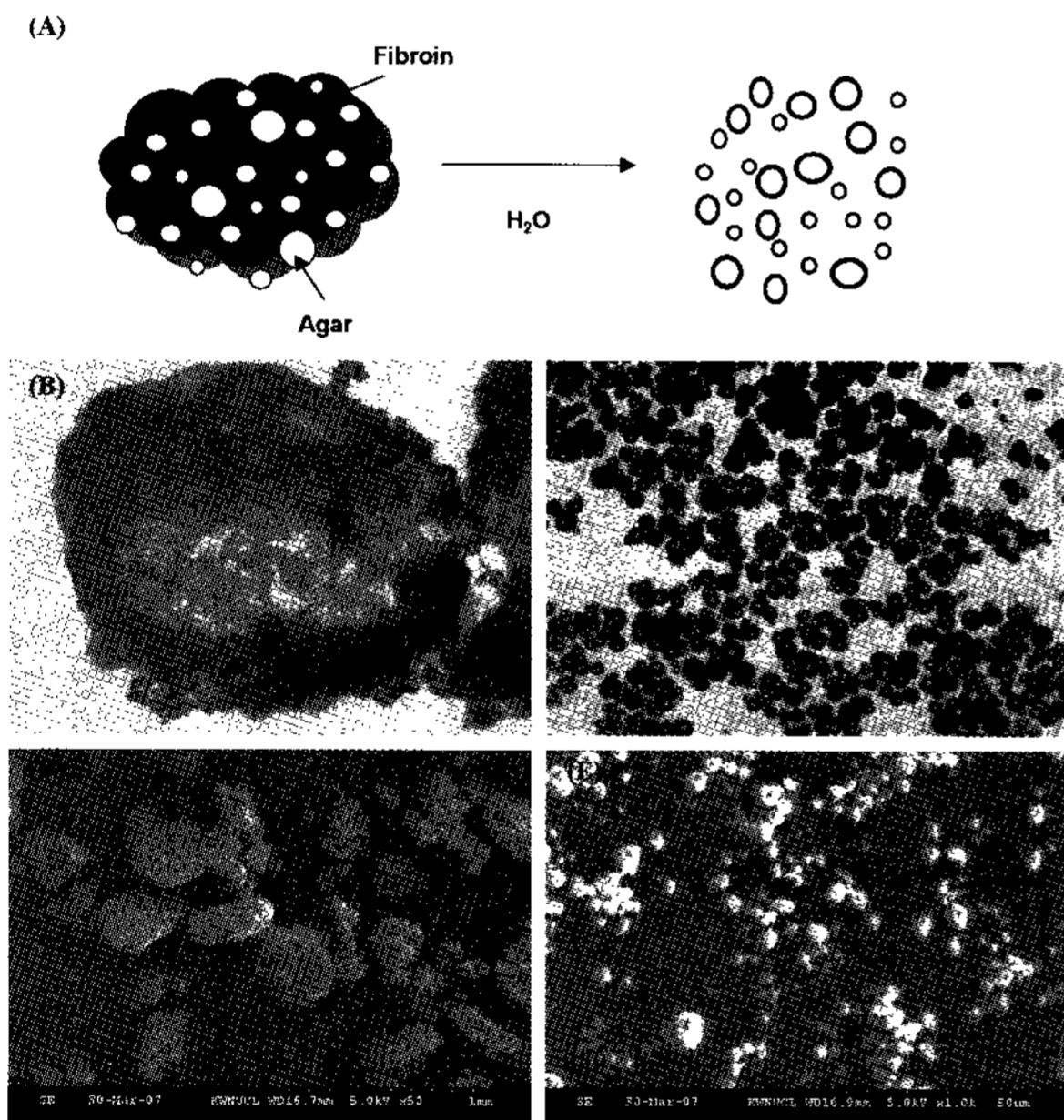


Figure 4. Schematic illustration (A), optical microscopy images (B, C), scanning electron microscope (SEM) images (D, E) and of redispersion of agar silk fibroin microcapsules. Optical microscopy images were observed by 200 magnifications.

아울러, 한천 캡슐 내부의 물질의 방출을 제한하거나 조절하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 한천 마이크로캡슐에서 50~1000 Å의 크기에 해당하는 거대분자 (리포프로테인-콜레스테롤)의 확산속도를 측정할 때 물질전달이 반응속도의 제한요인이 아닌 것으로 이미 실험을 통하여 잘 증명되고 있다(3). 따라서 한천과 유사한 해조류 유래의 다당인 알긴산 겔 마이크로캡슐의 단백질의 투과율을 제한하기 위하여 폴리라이신으로 피막을 형성시킨 후 물질의 투과속도를 조절하여 내부물질이 서서히 방출될 수 있도록 조절하고 있다(11). Chang(5)의 연구는 마이크로 캡슐화된 간세포 및 최장 세포의 일부가 캡슐 밖으로 노출되어 면역거부반응을 일으키

지 않도록 아가로오스/폴리라이신/아가로오스 형태의 다층 마이크로캡슐을 개발하여 마이크로캡슐 표면의 피막형성이 물질전달 뿐만 아니라 인공세포의 피막으로도 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

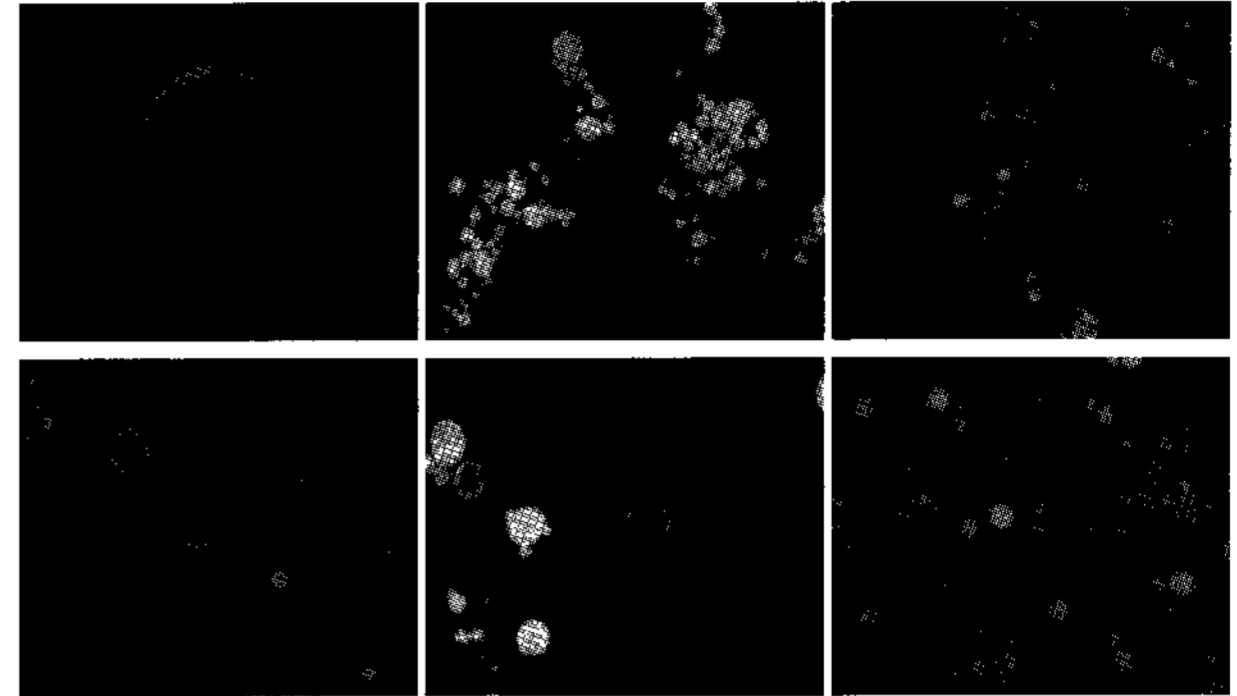


Figure 5. Confocal microscope images of agar fibroin capsules were produced by addition of 0.5% (B), 1% (C), 2% (A, D), 3% (E) and 4% (F) silk fibroin solution. The white bar represents 10 μ m in the figure.

한천 마이크로캡슐의 공초점 현미경 관찰

한천 마이크로캡슐이 피브로인에 의하여 피막이 형성되었는가를 확인하기 위하여 한천 마이크로캡슐을 단백질을 형광 염색시키는 FITC로 처리한 후 공초점 현미경을 사용하여 관찰하였다. 먼저 마이크로캡슐을 제조하는 과정에 첨가하는 피브로인 용액의 농도는 0.5%에서 4%까지 변화시켜 마이크로캡슐을 제조하고 이를 FITC로 염색한 후 공초점 현미경으로 1800배로 초점면을 상하로 이동시키며 관찰하였다. Fig. 5(A)는 초점면을 캡슐의 중간에 위치하였을 경우 촬영한 사진을 확대한 것이다. 형광이 캡슐의 외부의 표면에서 주로 나타나므로 FITC에 염색되는 단백질은 주로 캡슐의 표면에 위치하고 있음을 알려주고 있다. Fig. 5의 (B)와 (F)는 피브로인의 농도를 각각 0.5%, 1%, 2%, 3% 및 4%로 변화시켜 제조한 마이크로캡슐의 공초점 현미경 사진이다. 초점면이 통과하지 않는 캡슐은 표면이 보이므로 캡슐전체가 밝게 보이지만 초점면이 통과하는 캡슐은 FITC에 의하여 염색되지 않은 내부가 어둡게 보여 피브로인으로 피막이 형성되어 있음을 나타내고 있다. 피브로인 농도를 증가시킬 경우 피막이 두꺼워질 것으로 예상하였으나 초점면이 캡슐의 중앙을 통과하는 사진의 수가 적고 시료간 편차가 심하여 공초점 현미경으로 피막의 두께를 신뢰성있게 측정할 수 없었다. 그러나 사진을 육안으로 관찰하여도 피브로인의 농도를 증가시켜도 피막의 두께가 뚜렷하게 증가하는 것으로 확인할 수 없었다. 그리고 열중량분석의 결과에서도 피브로인의 성분은 13.8%로서 상당 부분 제조과정에서 손실되는 것을 보아 일부분만 피막을 형성하는데 사용되는 것으로 판단된다.

본 연구에서 사용한 한천 및 피브로인과 유사한 재료인 알긴산을 폴리라이신으로 피막을 형성시킨 마이크로캡슐의 내부구조에 대하여 공초점 현미경을 사용하여 폴리라이신 피막 층의 두께의 변화 및 캡슐 내에서의 분포가 보고되어 있다(11). 이 논문에서는 폴리라이신의 농도를 증가

시킨 것이 아니라 알긴산을 겔화시키는데 사용되는 Ca^{++} 이온을 Ba^{++} 이온으로 대체하여 피막의 두께가 2배 증가시키고 캡슐내부의 폴리라이신의 분포가 감소시켰다. 따라서 본 연구의 피브로인 피막의 두께를 변화시키기 위해서는 농도변화 외의 다른 방법을 시도해 보아야 할 것으로 판단된다. 공초점 현미경사진을 이미지분석을 통하여 마이크로캡슐의 크기를 분석하였다. 4%의 피브로인을 사용하였을 때 제조된 마이크로캡슐의 90%가 1.32 μm 에서 6.0 μm 의 범위에 포함되었다.

요 약

본 연구에서는 미네랄오일에 유화제를 사용하여 한천 현탁액을 제조하고 여기에 피브로인을 첨가하여 마이크로캡슐을 제조하는 방법을 개발하였다. 먼저 한천 유화액에 첨가될 유화제의 농도를 10%로 결정하였고 피브로인을 투입하는 속도를 조절하여 피브로인으로 피막이 형성된 마이크로캡슐을 감압건조를 통하여 수분을 제거하고 에탄올 침전물로 회수하였다. 공초점 현미경으로 피브로인 피막이 형성되어 있음과 마이크로캡슐의 90%가 1.32 μm 에서 6.0 μm 사이에 존재함을 확인하였다. 에탄올 침전물 형태의 마이크로캡슐과 이들이 분산되는 것을 전자현미경으로 확인하였으며 열중량 분석을 통하여 마이크로캡슐은 중량비로 한천이 51.2%, 피브로인이 13.8%, Span 80이 1.4%로 구성 되어있음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업 (RT105-01-02) 지원으로 수행된 것으로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Linko, Y. Y., H. Kautola, S. Uotila, and P. Linko (1986), Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast, *Biotechnol. Letters* **8**, 47-52.
2. Tonkova1, A., V. Ivanova1, E. Dobreva1, M. Stefanova1, and D. Spasova1 (1994), Thermostable α -amylase production by immobilized *Bacillus licheniformis* cells in agar gel and on acrylonitrile/acrylamide membranes, *Appl. Biotechnol. Biochem.* **41**, 517-522.
3. Garofalo, F. A., T. M. Chang (1991), Effects of mass transfer and reaction kinetics on serum cholesterol depletion rates of free and immobilized *Pseudomonas pictorum*, *Appl. Biotechnol. Biochem.* **27**, 75-91.
4. Miyazawa, K., I. Yajima, I. Kaneda, and T. Yanaki (2000), Preparation of a new soft capsule for cosmetics, *J. Cosmet. Sci.* **51**, 239-252
5. Chang, T. M. S. (1997), Artificial cells and bioencapsulation in bioartificial organs, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **831**, 249-259.
6. Stegemann, J. P., J. J. O'Neil, and C. J. P. Mullon (2002), US patent, 6,399,341
7. Esquisabel, A., R. M. Hernandez, M. Igartua, A. R. Gascon, B. Calvo, and J. L. Pedraz (2002), Preparation and stability of agarose microcapsules containing BCG, *J. Microencapsul.* **19**, 237-244.
8. Brissova, M., M. Petro, I. Lacik, A. C. Powers, and T. Wang (1996), Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography, *Anal. Biochem.* **242**, 104-111.
9. Takano, R., K. Hirabayashi, and K. Chen (1991), Preparation of soluble silk fibroin powder by hydrochloric acid hydrolysis, *Soviet. Phys. Crystallogr.* **60**, 358-362.
10. Valluzzi, R., S. P. Gido, W. Muller, and D. L. Kaplan (1999), Orientation of silk III at the air-water interface, *J. Biol. Macromolecules*, **24**, 237-242
11. Strand, B. L., Y. A. Morch, T. Espevik, and G. Skjak-Braek (2003), Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy, *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 386-394.