

# 황산기가 도입된 피브로인의 제조 및 특성

정대철 · 이신영 · 허 원\*

강원대학교 공과대학 생물공학과

## Preparation and Characterization of Sulfated Fibroin

Dae-Cheol Jeong, Shin-Young Lee, and Won Hur\*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-271, Korea

**Abstract** Silk fibroin is a structural protein from *Bombyx mori* and can be sulfated to provide biofunctional polypeptides showing antiviral and anticoagulating activities. However, the sulfated fibroins have not been characterized enough to present their compositions and structures. In this report, sulfation reaction was investigated by varying the reaction temperature and sulfuric acid concentration and analysis of the resulting peptides were carried out. The degree of sulfation was proportion to sulfuric acid concentration but the maximum product yield was obtained at 60°C and 5% of sulfuric acid concentration. FT-IR spectrum, UV absorption and NMR spectrum support that o-sulfate ester was formed at the hydroxyl group of serine and tyrosine residues. Size exclusion chromatography identified that sulfated fibroin was composed of a highly hydrolyzed polypeptide mixtures and peptides of relatively higher molecular weight.

**Keywords:** fibroin, sulfation, sulfated fibroin

### 서 론

피브로인은 양잠누에 (*Bombyx mori*)의 고치에서 생산되는 섬유의 중심가닥을 구성하는 antiparallel  $\beta$ -sheet의 구조를 가지는 불용성 단백질이다 [1]. 피브로인은 heavy chain, light chain 및 P25 단백질로 구성되어 있으며, 이중 피브로인의 대부분을 차지하는 heavy chain은 글리신, 알라닌 및 세린이 반복되는 결정성 영역을 형성하는 11개의 도메인과 중간 부분 및 C-말단 N-말단의 비결정성 영역으로 구성되어 있으며 다른 단백질과 비교하여 비교적 크기가 작은 아미노산인 글리신, 알라닌 및 세린의 조성 비율이 약 86%로 매우 높다 [2]. 구조 단백질인 피브로인은 오랫동안 수술용 봉합사로 사용되어 생체적합성이 확인되었으며 [3] 세포 배양용기를 코팅하여 동물세포증식을 촉진시키거나 [4] 세포 배양 입체 지지체로 사용되며 [5] 우수한 생체적합성을 나타내어 미세혈관을 제조하는 소재로 개발되고 있다 [6]. 나아가 피브로인의 알기닌 잔기를 공수성으로 만들어 섬유아 세포의 증식에 도움을 주고 [7] 키토올리고당으로 수식하여 피브

로인의 특성을 변화시키거나 [8] poly-caprolactone으로 수식하여 피브로인의 생체적합성을 향상시킬 수 있다고 [8] 보고되었다. 특히 황산기를 도입하고 피브로인을 수식하여 제조된 황산-피브로인은 항혈전 작용 [9,10] 및 시험관에서 에이즈 바이러스의 증식 억제 작용 [11]을 나타내었다. 이외에도 실크섬유에 직접 황산기를 도입하여 섬유의 특성을 변화시키기도 하였다 [12]. 전술한 바와 같이 황산기가 도입된 피브로인은 다양한 기능성을 가지게 되는데 반하여 황산기가 도입되어 변화되는 피브로인에 대한 분자 수준에서의 변화 및 반응 조건에 대한 연구에 대한 보고는 찾아보기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 가용화된 재생 피브로인에 황산기를 도입하는 반응을 조건을 달리하여 황산기가 도입된 피브로인을 제조하고 이를 분석하여 황산기의 도입 정도, 피브로인 펩타이드의 화학적 변화 및 이 과정에서 수반되는 가수분해에 의한 분자량의 분포의 변화를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

본 실험에서는 FineCo., Ltd. (Chonchon, Korea)에서

#### \*Corresponding author

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

e-mail: wonhur@kangwon.ac.kr

생산되는 동결건조된 재생 피브로인을 사용하였다. 재생 피브로인은 고농도의 염용액에 가용화시키는 방법 [13]을 일부 변형하여 실크사 혹은 실크제직 과정의 부산물을 탄산나트륨 수용액 0.3% (w/v)에 침지 후 가열하여 세리신을 제거하고 회수하여 건조시킨 후 끓는  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  수용액 50%에 투입하여 가용화시키고 Molecular weight cut-off (MWCO)가 10 kDa인 투석막을 사용하여  $\text{CaCl}_2$ 를 제거하여 제조되었다.

### 황산기의 도입 반응

재생 피브로인 분자에 황산기를 도입하기 위하여 희석한 황산용액에 피브로인을 녹이고 가열하여 황산을 용매와 동시에 촉매로 이용하여 반응을 진행시켰다. 소규모의 반응은 0.4 g의 피브로인을 황산용액 20 mL에 녹이고 항온수조에서 온도를 일정하게 유지시키면서 2시간 동안 반응시킨다. 반응후 NaOH를 첨가하여 반응액의 pH가 7 이상이 되도록 중화시키고 미 반응된 불용성 피브로인 및 염 침전물은 필터페이퍼를 사용하여 걸러내었다. 반응액에 남아있는 염 및 저분자 피브로인 분자는 셀룰로스 투석막 (Dialysis tubing #21-152-9, MWCO 3500, Fisher Scientific, UK)을 사용하여 5시간 동안 증류수 용액을 3회 교체하면서 제거하였다. 이후 동결건조기 (FD8505, Ilshin Lab, Korea)를 이용하여 황산기가 도입된 피브로인 (황산-피브로인)을 얻고 중량을 측정하여 수율을 계산하였다.

### 피브로인의 황산기 도입 분석

피브로인으로부터 얻어진 황산-피브로인 시료에 황산기가 도입되었는지 확인하기 위하여 FTIR (FT/IR-3000, Bio-rad, Cambridge, USA)로 적외선영역에서의 스펙트럼을 측정하여 비교하였다. 그리고 시료의 각 10 mg을 1 mL의  $\text{D}_2\text{O}$  solution에 녹인 후 600 MHz NMR (Bruker Avance, NMR-Bruker, Germany)을 이용하여 피브로인 및 황산-피브로인 양성자 공명 스펙트럼을 분석하였다.

피브로인 및 황산-피브로인 시료의 분자량 분포를 알아보기 위해 HPLC (MP30 System, Younglin, Korea)를 이용하여 gel permeation chromatography (GPC)를 실시하였다. 사용된 칼럼은 분획범위가 250-28,000 Da인 Macrosphere GPC 60 Å (300 x 7.5 mm, Alltech, USA)이고 이동상은 20 mM Tris 완충용액 (pH 7.0)을 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 실험하였다. UV detector (model 930, Waters, USA)를 사용하여 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사용된 분자량 표준물질은 각각 blue dextran (2000 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), albumin (66 kDa), papain (23 kDa), cytochrome C (12.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa) 및 ampicillin (371 Da)이었다.

## 결과 및 고찰

### 황산기가 도입된 피브로인의 제조

황산기가 도입된 피브로인을 제조하기 위하여 2.5, 5, 10 및 20%의 황산 용액에 0.4 g의 피브로인을 투입하고 70°C에서 2시간 동안 가열하여 반응시킨 후 NaOH로 중화시켜 반응을 종료하였다. 각각의 황산용액 반응액으로부터 동결 건조 후 0.22, 0.2, 0.15 및 0.152 g의 건조시료를 회수하였다. 따라서 반응 수율은 황산의 농도가 가장 낮은 2.5%의 황산용액에서 55% (w/w)로 가장 높았으며 황산의 농도가 20%로 증가하면 수율은 38% (w/w)까지 감소하였다. 각 시료에 도입된 황산기를 확인하기 위하여 피브로인과 각각의 시료의 적외선 흡광 스펙트럼을 조사하였다 (Fig. 1). 2.5% 시료의 피브로인의 흡광 스펙트럼에 비하여 5%, 10% 및 20%의 시료에서는 1109 및 1141  $\text{cm}^{-1}$ 에서 강한 흡광을 나타내었다. 그리고 10% 이상의 황산농도에서 제조된 황산-피브로인 시료는 997  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡광을 나타내었다. 반면 1238, 1516, 1645 및 3300  $\text{cm}^{-1}$  부근의 흡광도는 사용된 황산의 농도의 비례하여 감소하였다.

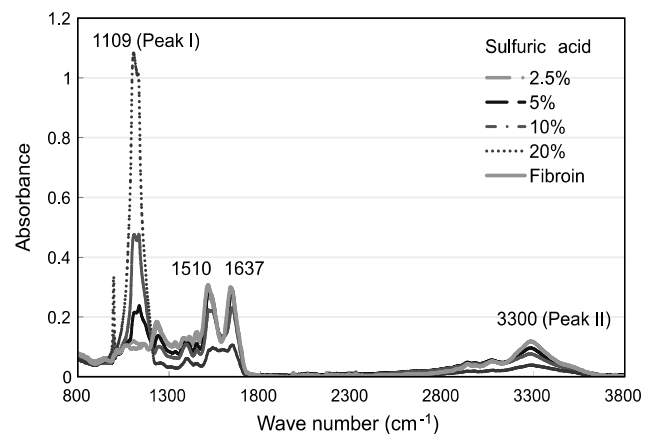


Fig. 1. FTIR spectra of fibroin and the sulfated fibroin samples prepared using varying sulfuric acid concentration at 70°C.

황산이온의 S=O 결합의 신축진동의 적외선 스펙트럼은 일반적으로 1080-1130  $\text{cm}^{-1}$ 의 영역에서 관찰되므로 1109 및 1141  $\text{cm}^{-1}$ 에서 흡광 피크는 황산기가 피브로인 분자쇄에 도입되었음을 알려주고 있으며 반응용액의 황산의 농도가 높을수록 최고 흡광 파장수는 1141에서 1109  $\text{cm}^{-1}$ 로 이동하였다. 반면 1521 및 1645  $\text{cm}^{-1}$ 의 흡광도는 단백질의 펩타이드 결합의 amide I 및 amide II의 C=O bending 및 N-H stretching에 해당하는 것으로 [14], 반응에 사용된 황산의 농도에 비례하여 흡광도가 감소하는 것은 펩타이드 결합이 분해되고 있음을 나타낸다. O-H 및 N-H 결합의 공통적인 적외선 흡광 영역에 해당하는 3300  $\text{cm}^{-1}$  부근의 흡광이 감소되었는데 이는 황산기의 도입으로 인한 O-H 및 N-H 결합의 개수가 감소하였음을 나타내고 있다.

피브로인에 chlorosulfonic acid 및 황산을 이용하여 황산기를 도입한 Tamada 등은 1200-1400  $\text{cm}^{-1}$ 의 범위에서 흡광도가 증가하고 분자량이 감소하였음을 보고하고 있다 [10]. 마찬가지로 시료의 적외선 흡광 스펙트럼으로부터 황산기가 피브로인 분자에 도입되었음을 확인 할 수 있으며 피브로인 분자가 황산에 의하여 분해되었음을 추정할 수 있다. 이점은 MWCO 3,500 Da의 투석막으로 시료를 회수하는 과정에서 저분자로 가수분해된 피브로인이 손실되어 반응에 사용된 황산의 농도가 증가할수록 수율이 감소하는 것과 일치한다.

### 온도 및 황산 농도에 따른 수율 및 황산기의 도입 정도

황산-피브로인의 전환 수율과 황산기의 도입 정도를 측정하여 반응 온도 및 황산의 농도가 피브로인의 황산기의 도입에 미치는 영향을 분석하였다. 황산기가 도입된 피브로인의 수율은 MWCO 3,500 Da의 셀룰로스막으로 투석하여 얻어진 용액을 동결 건조시켜 얻은 건조물의 중량을 반응에 사용된 피브로인의 량으로 나누어 계산한 것으로 수율은 70, 60 및 50°C에서 평균 45.1, 62.1 및 42.5% (w/w)로 60°C에서 가장 높았으며 최고의 수율은 같은 온도에서 5%의 황산용액을 사용하였을 때 얻어졌다 (Fig. 2). 황산용액의 농도가 2.5, 5, 10 및 20%로 증가 할수록 황산-피브로인의 수율은 63.3, 60.8, 39.2 및 36.3% (w/w)로 감소하였으며 황산용액이 10% 증가하면 수율은 큰 폭으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

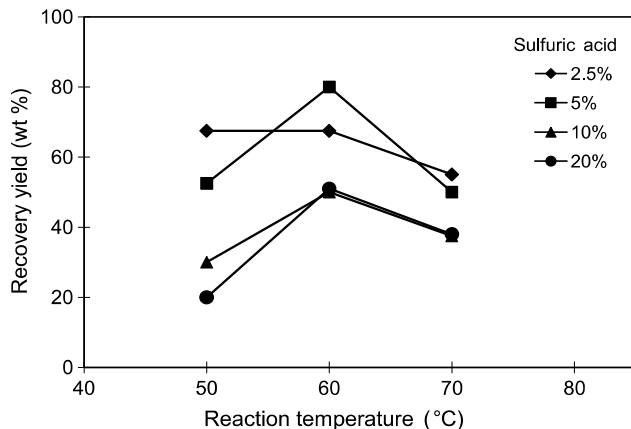


Fig. 2. Recovery yield of the sulfated fibroin prepared from regenerated fibroin under varying concentration of sulfuric acid at 50, 60 and 70°C.

황산기가 도입된 정도를 추정하기 위하여 적외선 흡광 스펙트럼에서 S=O 결합의 흡광과정에 해당하는 1200에서 1060  $\text{cm}^{-1}$ 까지의 피크의 흡광도가 전체의 흡광도에서 차지하는 비율을 계산하고 마찬가지로 O-H 결합에 해당하는 3500에서 2500  $\text{cm}^{-1}$ 까지의 피크의 흡광도가 전체의 흡광도에서 해당하는 비율을 계산하여 Fig. 3에 나타내었다. 흡광

도로 추정된 황산기의 도입 정도는 황산의 농도에 따라 증가하였으며 반응온도가 60°C일 때 가장 높았다. 반응물 비 생성물의 중량으로 측정된 수율 역시 60°C에서 황산의 농도와 관계없이 가장 높은 값을 보이고 있다. 따라서 수율 뿐만 아니라 황산기의 도입 정도 역시 60°C 부근이 최적 온도를 알 수 있다. 그리고 60°C 반응에서 수율은 5%의 황산 용액을 사용하였을 때 80% (w/w)로 2.5% 황산용액의 67.5% (w/w)보다 높아 수율 면에서는 최적조건임을 알 수 있다. 반면 적외선 흡광도로 추정된 황산기의 도입량은 2.5%에서 10%까지 황산의 농도에 비례하여 선형적으로 증가하므로 반응온도는 60°C로 고정하고 황산의 농도를 5%에서 10% 사이의 조건에서 필요한 황산기의 도입비율을 고려하여 결정할 수 있다.

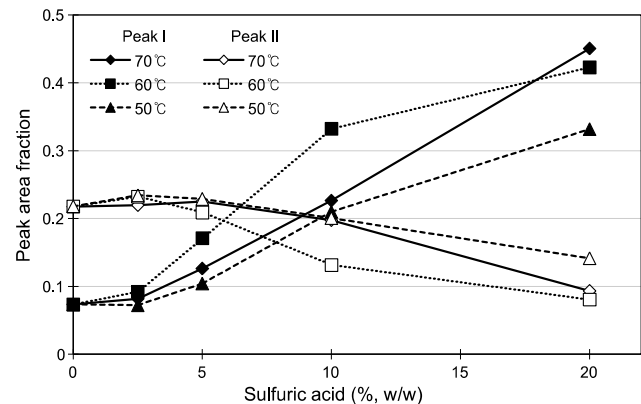


Fig. 3. The fractions of peak I in the range between 1200 and 1060  $\text{cm}^{-1}$  and of peak II between 3500 and 2500  $\text{cm}^{-1}$  under varying concentration of sulfuric acid at 50, 60 and 70°C.

### 황산기의 도입에 따른 피브로인 분자의 변화

피브로인과 황산피브로인을  $\text{D}_2\text{O}$ 에 녹인 후 양성자의 핵자기공명 (NMR)을 분석하여 피브로인 분자의 변화를 관찰하였다 (Fig. 4). 물 분자의 양성자에 해당하는 4.8 ppm에서 피크를 제외하고 피브로인과 황산피브로인 시료에서 공통적으로 1.40, 3.95, 4.33, 4.46, 6.80 및 7.08 ppm에서 관찰되었으나 양성자의 공명 강도는 피브로인이 황산-피브로인 시료보다 높았다. 피브로인의 구성 아미노산 중 비율이 높은 알라닌, 세린 및 글리신은 펩타이드로 존재할 때  $\alpha$  카본의 수소는 4.4, 4.5 및 3.8-4.2 ppm에서 그리고 알라닌과 글리신의  $\beta$  카본의 수소는 1.4와 3.6-3.7 ppm에서 양성자 공명을 나타낸다 [15]. Fig. 4에서는 알라닌의  $\text{CH}_3$ -가 1.4 ppm, 세린의  $\beta$  수소와 글리신의  $\alpha$  수소가 3.95 ppm, 그리고 각각의 아미노산의  $\alpha$  수소가 4.33 및 4.46 ppm에서 양성자의 공명을 보이는 것으로 판단할 수 있다. 따라서 반응에 사용된 황산의 농도가 5%에서 20%로 증가하면서 상기의 화학적 이동값에서 양성자의 공명이 감소하는 것은 피브로인의 가수분해가 진행되어 알라닌 세린 글리신의 양성자가 펩타이드에

서 가지는 양성자 공명을 가지지 못하는 것으로 판단된다.

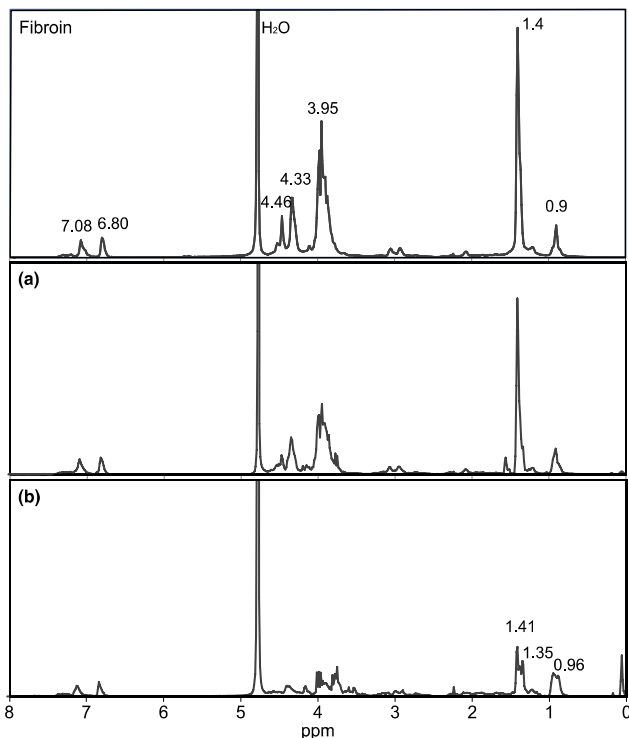


Fig. 4. H NMR spectra of fibroin and the sulfated fibroin samples prepared using (a) 5% and (b) 20% sulfuric acid.

피브로인과 황산-피브로인 시료를 각각 0.04%의 수용액을 만들고 자외선 흡광도의 변화를 관찰하였다. 모든 시료의 최고 흡광도는 모두 274 nm에서 관찰되었으나 황산-피브로인 시료의 274 nm에서의 흡광도는 0.35 OD<sub>274</sub>로서 피브로인의 1.25 OD<sub>274</sub>에 비하여 28%로 감소하였다. 피브로인을 구성하고 있는 아미노산 중 타이로신의 비율이 페닐알라닌이나 트립토판에 비하여 높기 때문에 274 nm에서 최고의 자외선 흡광을 가진다. 따라서 피브로인 분자의 세린 및 타이로신의 잔기에 황산기가 도입되었음을 추정할 수 있다.

일반적으로 단백질에 황산기를 도입되면 주로 세린, 트레오닌 및 타이로신에 O-sulfate ester를 형성하는 것으로 보고되고 있다 [16]. 황산-피브로인 시료의 FTIR스펙트럼에서 O-H 결합의 진동을 나타내는 3300 cm<sup>-1</sup> 영역에서의 흡광도의 감소, 아마이드 I, II 결합에 특징적인 1510 및 1637 cm<sup>-1</sup> 영역의 흡광 감소와 NMR 및 UV 스펙트럼으로부터 황산기가 피브로인을 구성하는 비중이 큰 아미노산인 세린과 타이로신의 O-H 잔기와 O-sulfate ester를 형성하고 있음을 추정할 수 있다. 뿐만 아니라 이 과정에서 피브로인 분자가 가수분해되어 분자량 분포가 변화했을 것으로 추정된다.

따라서 GPC로 60°C에서 2.5, 5, 10, 20%의 황산용액에서 얻어진 황산-피브로인 시료의 분자량 분포를 조사하였다 (Fig. 5). 피브로인은 칼럼의 최대 분획 범위보다 큰 5.6분에서 나타났으나 황산-피브로인 시료는 칼럼의 최저

분획 한계 근처에서 넓은 피크를 나타내었으며 9분을 경계로 왼쪽에 중첩된 피크가 관찰되고 있다. 중첩된 피크는 약 6분에서 9.5분까지 관찰되며 반응에 사용된 황산의 농도가 증가할수록 감소하였다. 칼럼의 분획한계는 28 kDa에서 250 Da으로 제조사에서 제시하고 있으나 피브로인과 blue dextran은 각각 5.6 및 5.76분에서 관찰되었으며 분자량이 150 kDa 및 66 kDa인 alcohol dehydrogenase 및 albumin도 각각 7.74 및 7.7분에서 관찰되어 실제 실험에서는 분획한계가 더 넓은 것으로 확인되었다. 따라서 황산 피브로인은 칼럼의 최저 분획 한계에 가까운 저분자 물질로 대부분을 구성되어 있고 동시에 약 20 kDa을 중심으로 분포하는 고분자 물질을 포함하고 있다. 그러나 황산-피브로인은 MWCO 3,500 Da의 투석막을 사용하여 회수되므로 황산 피브로인의 분자량은 3,500 Da 보다 크다고 추정할 수 있다. 따라서 비록 칼럼의 분획한계 이하에서도 피브로인 및 황산-피브로인 시료의 흡광이 관찰되나 GPC의 분획한계가 정확하지 않은 것으로 보면 황산-피브로인은 3,500 Da 보다 큰 저분자 물질과 약 20 kDa 크기의 고분자 물질로 구성되어 있다고 할 수 있다. GPC의 보유시간 8.5분을 기준으로 저분자와 고분자 황산-피브로인 펩타이드를 구분한다면, 2.5% 및 5%의 황산농도에서는 고분자 황산-피브로인 펩타이드의 양은 변화가 없지만 10% 및 20%에서는 급격하게 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 황산의 농도가 증가하면 가수분해가 증가하는 NMR 분석 결과와 일치한다.

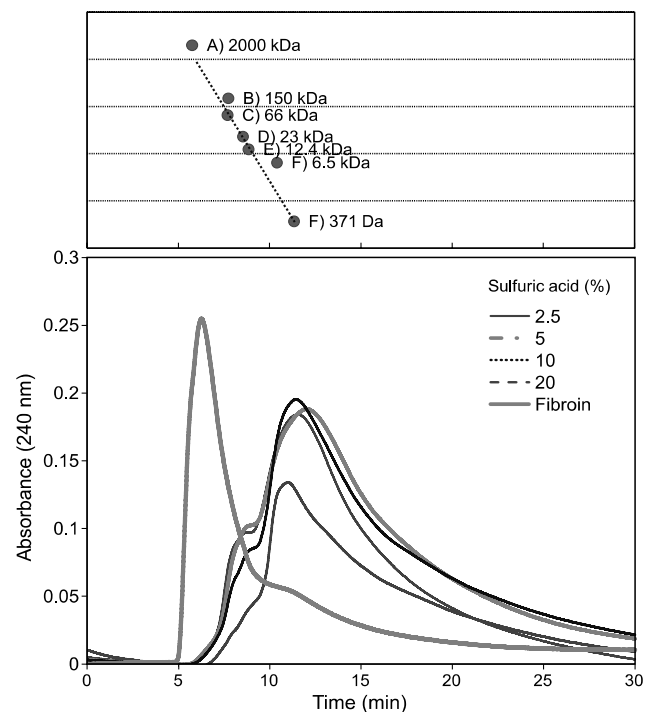


Fig. 5. Gel permeation chromatogram of fibroin and the sulfated fibroin samples prepared using varying levels of sulfuric acid.

## 요 약

황산 수용액에 재생 피브로인을 녹이고 가열하여 황산을 반응물과 동시에 촉매로 사용하여 황산-피브로인을 제조하였다. 황산의 농도 및 반응온도를 달리하여 얻어진 시료로부터 적외선 흡광 스펙트럼, UV 흡광 스펙트럼, NMR 및 GPC를 사용하여 반응조건에 따른 황산기의 도입 정도 및 피브로인 분자의 분해 정도를 분석하였다. 황산-피브로인의 수율은 5%의 황산을 사용하여 60°C에서 반응시킬 때 가장 높았으며 적외선 흡광 스펙트럼의 1109  $\text{cm}^{-1}$ 의 피크가 나타내는 도입된 황산기의량은 황산의 농도가 증가하면 같이 증가하였다. 단백질에 도입된 황산기는 피브로인 분자를 주로 구성하고 있는 세린 및 타이로신의 hydroxyl 그룹과 반응하여 O-sulfate ester를 형성할 것으로 예상되는데, 이는 274 nm에서의 UV 흡광도의 감소 및 3300  $\text{cm}^{-1}$ 의 적외선 흡광 스펙트럼의 감소가 관찰되는 결과와 일치하였다. GPC 분석을 통하여 황산-피브로인이 가수분해되어 원래 피브로인의 분자량 보다 분자량이 작으며 동시에 가수분해된 저분자 황산 피브로인 펩타이드와 덜 가수분해된 비교적 분자량이 큰 펩타이드로 구성되어 있음이 확인되고 있다.

## 감 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단에서 시행한 지역혁신인력양성사업 (2007~2010)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 8월 27일, 게재승인 : 2009년 10월 15일

## REFERENCES

- Zhou, C., F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li, and J. Janin (2001) Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 44: 119-122.
- Inoue, S., K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, and S. Mizuno (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of h-chain, l-chain, and p25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275: 40517-40528.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan (2003) Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416.
- Inouye, K., M. Kurokawa, S. Nishikawa, and M. Tsukada (1998) Use of *Bombyx mori* silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 37: 159-164.
- Mandal, B. B., and S. C. Kundu (2009) Cell proliferation and migration in silk fibroin 3d scaffolds. *Biomaterials* 30, 2956-2965.
- Lovett, M., C. Cannizzaro, L. Daheron, B. Messmer, G. Vunjak-Novakovic, and D. L. Kaplan (2007) Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* 28: 5271-5279.
- Murphy, A. R., P. S. John, and D. L. Kaplan (2008) Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation. *Biomaterials* 29: 2829-2838.
- Gotoh, Y., M. Tsukada, S. I. Aiba, and N. Minoura (1996) Chemical modification of silk fibroin with n-acetyl-chito-oligosaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 18: 19-26.
- Tamada, Y. (2003) Sulfation of silk fibroin by sulfuric acid and anticoagulant activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 87: 2377-2382.
- Tamada, Y. (2004) Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity. *Biomaterials* 25: 377-383.
- Gotoh, K., H. Izumi, T. Kanamoto, Y. Tamada, and H. Nakashima (2000) Sulfated fibroin, a novel sulfated peptide derived from silk, inhibits human immunodeficiency virus replication *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1664-1670.
- Ma, X., C. Cao, and H. Zhu (2006) The biocompatibility of silk fibroin films containing sulfonated silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 78: 89-96.
- Sugino, R., H. Masuda, J. Yao, T. Kameda, K. Enomoto, S. Amiya, A. Suzuki, and T. Asakura (2000) Structural characterization of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin. *Polymer preprints, Japan* 49: E 529.
- Zhang, Y. P., R. N. Lewis, R. S. Hodges, and R. N. McElhaney (1992) FTIR spectroscopic studies of the conformation and amide hydrogen exchange of a peptidemodel of the hydrophobic transmembrane alpha-helices of membrane proteins. *Biochemistry* 31: 11572-11578.
- Gupta-Bhaya, P. (1975) NMR study of the structure of short-chain peptides in solution. *Biopolymers* 14: 1143-1160.
- Previero, A., J. C. Cavadore, J. Torreilles, and M. A. Coletti-Previero (1979) Specific sulfonation of tyrosine, tryptophan and hydroxy-amino acids in peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 581: 276-282.