

실크방사

윤석호 · 명승준 · 강민성 · 진형준

1. 서론

2002년 초 캐나다 몬트리올에 위치한 넥시아바이오테크놀로지(Nexia Biotechnology)와 미육군 연구팀(Natick, Massachusetts)은 오랜 연구 결과로 거미의 유전자를 암소와 같은 포유동물 세포에 이식, 이로부터 거미가 없이 거미 실크(spiderless spider silk)를 만들어내는 실험에 성공하였다.¹ 보고된 바에 의하면 거미실크를 만드는 거미의 유전자를 암소와 햄스터의 세포에 이식, 이 포유동물의 세포를 속이 빈 기다

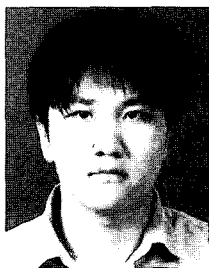
란 튜브 벽에 부착시킨 다음 튜브의 한 쪽 끝에서 성장 인자를 투여하면서 다른 쪽 끝에서 거미실크를 뽑아 낼 수 있었다고 밝혔다(그림 1). 거미 실크의 경우 같은 두께의 철사보다도 강한 강도를 가지고 있으며 합성섬유에 비교될 만한 우수한 탄성을 가진 물질로서 오랜 기간 동안 연구 대상이 되어 왔다.² 자연에서 1 파운드의 거미실크를 얻기 위해서는 약 27,000 마리의 거미가 필요하다는 점에서 다양한 용도로 이용될 수 있는 거미실크의 인공적 생산에 대한 결과는 주목할만 하다고 할 수 있다. 하지만 인공적 제조과정이 북



윤석호
2002 인하대학교 화공고분자생물공학부 (공학사)
2005~ 현재 인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공



명승준
2005 인하대학교 화공고분자생물공학부 (공학사)
2005~ 현재 인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공



강민성
2002 한국산업기술대학교 화학공학과 (공학사)
2005~ 현재 인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공



진형준
1994 인하대학교 고분자공학과(공학사)
1996 인하대학교 고분자공학과(공학석사)
2000 인하대학교 고분자공학과(공학박사)
2001~ 2003 Tufts University (박사후 연구원)
2003~ 2005 인하대학교 생명화학공학부 (전임강사)
2005~ 현재 인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공 조교수

Silk Spinning and Processing

인하대학교 나노시스템공학부 고분자신소재공학전공 (Seok Ho Yoon, Seung Jun Myung, Minsung Kang, and Hyung-Joon Jin, Department of Polymer Science and Engineering, Inha University, 253 Young-hyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea) e-mail: hjjin@inha.ac.kr

Transgenic transfer

Spider silk genes are injected into mammary cells of cows or into hamster kidney cells.

Protein harvest

The transgenic cells are placed in a tube and bathed with a media that nourishes the cells and flushes their waste, which includes silk proteins.

Precipitation

A salt added to the collected waste causes the silk protein to precipitate into a wet lump that looks a lot like chewing gum.

Extruding fiber

The solid is redissolved in a saline solution then pushed through a very fine tube (0.005 inches in diameter) into a dish of methanol, where it coagulates into a crude fiber.

The proteins are jumbled and not yet silky.

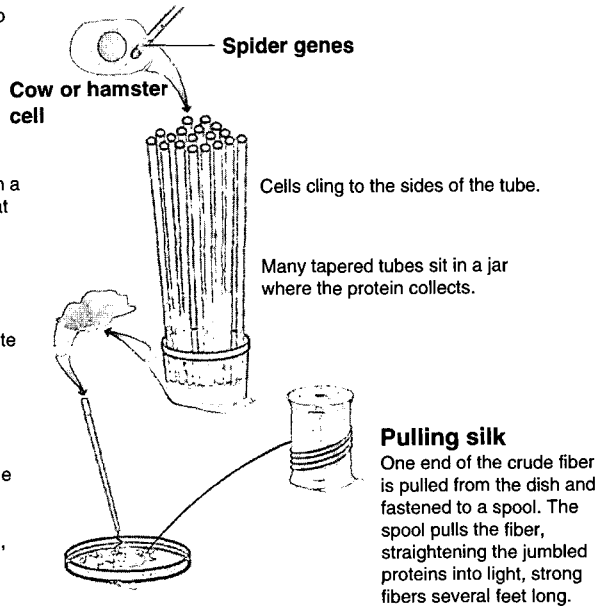


그림 1. Transgenic transfer에 의한 거미실크의 인공적 생산과정.

잡하고 거미 사육의 경우 서로를 해치는 습성으로 인하여 대량생산에 한계를 보여주는 반면, 누에고치 실크 (*Bombyx mori*)의 경우 한 해에 전 세계적으로 7만 톤 정도 생산되고 있으며 우수한 생체적합성 및 생분해성과 함께 비교적 높은 기계적 물성에 대한 새로운 보고가 계속 나오고 있다. 특히, 최근 보고에 의하면 누에고치 실크의 경우, 방사 조건(연신속도)에 따라 거미실크와 견줄 만한 기계적 물성을 가질 수 있다.³ 실크피브로인으로부터 제조된 인대 또는 연골재생 scaffold는 면역성 및 세포의 부착, 증식, 분화, 성장 등이 우수한 것으로 최근 생체재료 및 생명공학 관련 학회지에 계속해서 보고되고 있다.⁴⁻⁸

본 고에서는 누에실크에 관한 특성과 구조, 생체재료 및 기타재료로서 실크를 응용하기 위한 실크수용액의 제조과정, 자연에서 곤충이 실크피브로인으로부터 실크 섬유를 방사하는 공정에 대한 사항을 소개하고자 한다.

2. 실크

2.1 실크의 정의

실크는 일반적으로 곤충류의 생물들이 방사하는 섬유 형태의 단백질 분비물이며 누에(나방류의 애벌레 (*Lepidoptera larvae*)), 거미, 전갈, 진드기, 날벌레류

를 비롯한 다양한 생물들이 실크를 만들어 낸다.⁹ 실크의 구조와 기능은 실크를 만드는 곤충의 종류에 따라 다르며 그 중에서 누에실크 및 거미실크가 가장 집중적으로 연구되어 왔다. 이 중에서 누에실크는 누에 체내의 실샘에서 생성된 후 누에의 머리 부분에 있는 돌기에서 방사된다. 일부 수생 곤충들은 물 속에서 실크를 방사하지만 대부분의 곤충들은 공기 중에서 실크를 방사한다.¹⁰

2.2 일반적인 실크의 특성

농가에서 사용되는 누에, 즉 집누에(*B. mori*) 실크는 비교적 그 특성이 잘 연구되어 있는 편이다. 양잠은 5,000여 년 전 중국에서 기원되었으며 누에의 주된 먹이인 뽕나무를 재배하여 누에를 기르고 고치에서 실크를 얻는 농업의 형태로써 누에실크에서 유용한 섬유를 얻는 과정이다. 누에실크는 일생에서 한 번의 기간, 즉 탈피 후 번데기가 되기 전 1회 얻을 수 있다.¹¹

누에실크는 피브로인(fibroin)과 세리신(sericin)이라는 두 종류의 단백질로 되어 있으며 실샘내에서 수용액상태로 각각 분리되어 있다가 함께 방사되어 실크섬유를 형성한다. 이 때 방사되어진 실크섬유는 보통 두 가닥의 실크피브로인과 이의 겉을 에워싸고 있는 세리신으로 구성되어 있다(그림 2). 즉, 세리신은 실크피브로인 섬유들이 단단한 고치(cocoon) 형태를 유지할 수 있도록 아교 역할을 한다. 누에는 고치 짓기를

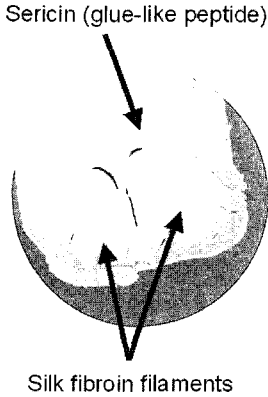


그림 2. 누에고치 실크섬유의 단면.

끝내고 나서 번데기로 탈바꿈을 하며 고치를 뚫고 나와 나방이 되기까지 고치 안에 머무르게 된다. 고치로부터 얻어진 실크 한 가닥의 지름은 대략 10~25 μm 이고, 길이는 300~1200 m에 이른다. 실크는 고급스러운 외양과 부드러운 감촉 및 우수한 생체적합성과 기계적 물성으로 인해 섬유 산업뿐만 아니라 기타 응용 분야에서도 새로운 재료로서 최근 관심을 모으고 있다.¹²

2.3 누에에서 만들어지는 실크

2.3.1 누에의 한살이

누에는 완전변태를 하는 곤충이다. 누에는 약 50일에 걸쳐서 알, 애벌레, 번데기, 성충(나방)으로 이어지는 동안 네 번의 변태를 거쳐서 한살이를 끝마친다. 겨울을 난 알은 자연에서 기온이 상승하는 시기인 4월에서 5월 사이에 부화하게 된다. 누에의 일생 중 애벌레 시기가 절반 정도이며 이 시기에 뽕나무 잎을 먹고 성장한다. 애벌레는 탈피할 때를 제외하고는 모든 애벌레 시기에 실크를 방사하지만 가장 많은 양은 5령(齡) 시기에 방사를 하여 고치를 제조하고 3~4일이 지나면 고치 안에서 번데기가 된다. 누에는 실샘에서 토사관을 거쳐 실크섬유를 방사하며 이때 머리를 8자 모양으로 움직여 자기 자신 주위를 에워싸듯 고치를 만든다(그림 3). 번데기는 고치 안에서 10~15일이 지나면 나방이 되어 밖으로 나온 직후 짝짓기를 하며 보통 300~600개 정도의 알을 낳은 후 생을 마감한다.^{13,14}

2.3.2 실크 단백질의 합성

누에는 4번째 탈피 후 5령에 실크를 왕성하게 만들기 위해 빠르게 발달된 실샘을 가지게 되며 이는 소화관 다음으로 큰 기관이 된다. 그림 4는 *B. mori*의 실크 실샘을 보여주고 있는데, 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 실크 단백질의 주성분이 되는 피브로인은



그림 3. 8자 모양으로 머리를 움직이며 실크섬유를 방사하는 누에(*B. mori*).

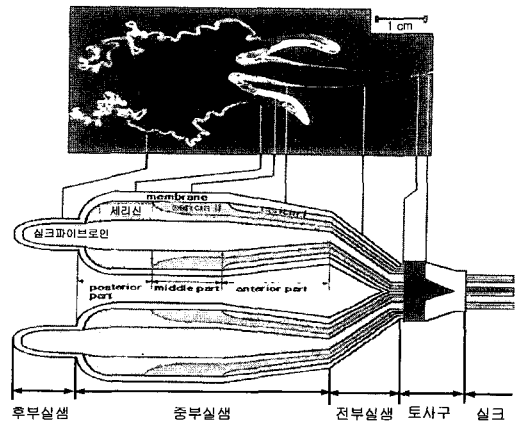


그림 4. 누에(*B. mori*) 실크의 실샘.

후부실샘(posterior region)에서 합성되고, 연동 운동을 통해서 중부실샘(middle region)으로 이동하여, 점성이 큰 수용액 상태로 저장되었다가 방사된다. 실샘 중심부의 벽에서는 또 다른 실크 단백질인 세리신이 만들어지는데 이 단백질은 실크피브로인을 감싸는 아교 역할을 한다. 피브로인과 세리신은 각각 고유의 특성을 가지며 아미노산 조성에 따라 쉽게 구분된다(표 1). 두 개의 실샘은 전부실샘 부분(anterior region)에서 인접하게 만난 후 함께 공기 중으로 실크를 방사하게 된다. 방사된 실크는 중심부분이 두 가닥의 실크피브로인으로 이루어져 있는 상태로 존재한다.^{15,16}

2.3.3 누에의 영양원

누에는 특별한 영양소나 화학 유인제, 식욕 자극제 등을 얻기 위해서 거의 대부분 뽕나무 잎을 먹기로 삼는다. 건조된 고치 1 g을 얻기 위해서는 약 12 g의 건조된 뽕나무 잎이 필요하다(약 8.26%의 수율). 5령 누에의 경우 실샘의 무게는 방사를 앞두고 8일 동안 약 100배가 증가한다. 이렇게 갑작스럽게 증가하는 이유

표 1. 누에실크(*B. mori*) 피브로인과 세리신의 아미노산 조성 (mol%)

Amino Acids	Fibroin	Sericin
Gly	42.9	13.5
Ala	30.0	5.8
Ser	12.2	34.0
Tyr	4.8	3.6
Asp	1.9	14.6
Arg	0.5	3.1
His	0.2	1.4
Glu	1.4	6.2
Lys	0.4	3.5
Val	2.5	2.9
Leu	0.6	0.7
Ile	0.6	0.7
Phe	0.7	0.4
Pro	0.5	0.6
Thr	0.9	8.8
Met	0.1	0.1
Cys	Trace	0.1
Trp	-	-

는 실샘에서 피브로인이 활발하게 합성되어 저장되기 때문이다. 피브로인을 구성하는 아미노산의 85%는 글리신(glycine), 알라닌(alanine), 세린(serine)이 차지하고 있다(표 1). 이 세 가지 아미노산은 뽕나무 잎에 들어있는 자유 아미노산에서 얻을 수도 있고 소화된 아미노산들의 상호 변환 과정을 통해서도 얻을 수 있다. 이들 아미노산의 약 70%는 5령 후반부에 새로 합성된다.¹⁴

누에실크 피브로인의 탄소는 주로 뽕나무 잎 속에 있는 슈크로오스(sucrose)로부터 얻어진다. 이 이당류는 두 개의 헥소스(hexose)로 분해되며 glycolytic pathway를 거쳐서 3-triphosphoglycerate와 pyruvate로 대사되고, tricarboxylic acid(TCA) cycle을 통해서 2-oxoglutarate로 대사된다(그림 5). 여기서 세린, 글리신, 알라닌이 glycolytic 중간생성물로부터 합성된다. 아미노산 합성을 위한 질소원은 섭취한 아미노산과 단백질이 분해된 암모늄으로부터 얻어진다. 암모늄은 glutamate 탈수소효소를 통해 2-oxoglutarate로부터 glutamate를 합성하는데 이용된다.¹¹

3. 실크의 구조

3.1 1차 구조

누에실크 피브로인은 큰 분자량을 갖는 폴리펩티드로 이루어져 있으며 산성 결사슬기는 염기성 결사슬기

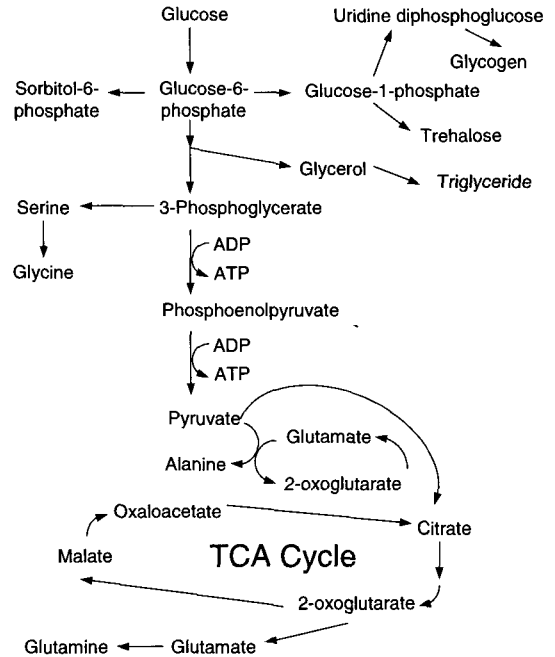


그림 5. Metabolic pathways of glucose in *B. mori* silk-worm related to the formation of silk fibroin through glycolysis and carbohydrate reserves. ADP(adenosine diphosphate), ATP(adenosine triphosphate).

보다 2.3 배 많이 나타난다. 세리신은 고치 무게의 약 30%를 차지하고 있으며 피브로인과는 아미노산의 조성비에서 많은 차이점을 보인다. 세리신의 아미노산 조성비는 세린, 아스파티산, 글리신, 트레오닌이 65% 정도로서 높은 비율을 차지하고 있다. 또한, 산성 결사슬기는 염기성 결사슬기 보다 2.6 배 많이 나타난다. 세리신은 비교적 친수성이기 때문에 끓는 물 속에서 비교적 쉽게 실크피브로인으로부터 분리 및 정제되어 질 수 있다. 또한, 누에고치에는 미량의 지방, 색소 및 탄수화물들이 함유되어 있다.

누에실크 피브로인은 2개의 1차 폴리펩티드로 구성되어 있으며 무거운 사슬(heavy chain)은 분자량이 약 325,000 Da이며 가벼운 사슬(light chain)은 약 25,000 Da이다. 누에실크는 두 가지 결정화영역(비교적 작은 결사슬기를 가진 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드영역)과 비결정화영역(비교적 큰(bulky) 결사슬기를 가진 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드영역)이 교대로 이루어져 있는 공중합체 형태로 되어 있다. 가벼운 사슬과 무거운 사슬을 합해서 피브로인의 약 70%는 'Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly'의 아미노산 서열로 이루어져 있다. 키모트립신에 의한 가수분해

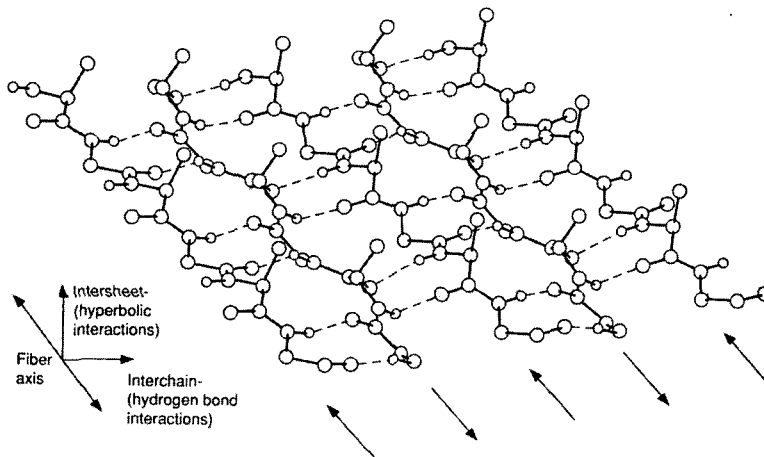


그림 6. 역평행 실크베타시트 구조(실선: 공유결합, 점선: 수소결합).

후 침전된 결정부분에 대해서는 더 확장된 서열이 보고되었는데, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-[Ser-Gly-(Ala-Gly)_n]₈-Tyr으로서 n값은 보통 2이다. 피브로인의 55%는 이 아미노산 서열로 이루어져 있다고 볼 수 있다. 이 외의 다른 영역에서의 피브로인 1차 구조는 Gly-Gly과 같은 서열은 없고 Gly-Tyr-Gly와 Gly-Val-Gly와 같은 서열로 이루어져 있다. 그러므로 누에실크 피브로인은 거미실크 피브로인과 마찬가지로 글리신의 공중합체로서 여겨지고 있다.

3.2 2차 구조

실크는 β -sheet, cross β -sheet, α -helix, 랜덤코일 등의 다양한 단백질 2차 구조를 나타낸다. 누에고치의 실크에서는 두 개의 단백질 사슬이 역평행으로 만나면서 상호간에 수소결합을 형성하는 β -sheet 2차 구조가 특징적으로 나타난다(그림 6). 그리고 주사슬은 실크의 섬유 축 방향으로 평행을 이루며 만난다. 2차 구조에서 겹쳐진 시트들은 구조를 더욱 안정시키기 위해서 소수성 인력에 의한 결합을 형성하게 된다. 겹쳐진 시트들이 조밀하게 채워진 구조를 이루는 것은 짧은 곁사슬을 갖는 아미노산의 비율이 높기 때문이다. 이 구조에서 아미노산의 85%는 글리신, 알라닌, 세린으로 약 3:2:1의 비를 갖는다.

실크의 두 가지 중요한 결정 구조는 silk I과 silk II 구조로 구분된다. Silk I 구조는 수화된 실크피브로인의 구조로서 후부실샘에서 처음 합성될 때 나타난다. Silk II는 실크피브로인이 실샘에서 공기 중으로 방사되어 고형화된 섬유에서 나타나는 구조이다. 천연 실크의 두 결정 구조에 대한 전형적인 X-ray 회절 패턴을

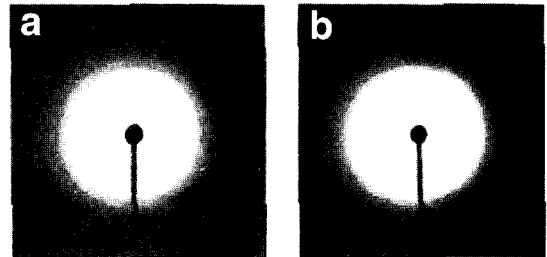


그림 7. 실크피브로인(*B. mori*)의 X-ray 회절패턴: (a) silk I; (b) silk II.

표 2. Spacing(Å) and Intensities of the X-ray Diffraction Patterns of *B. mori* Silk Fibroin^a

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R8
Silk I	7.29	5.61	4.50	4.02	3.62	3.15	2.73	2.44	2.24
ms	w	s	w	m	m	w	mw	vw	
Silk II	9.73	4.69	4.28	3.65	2.66	2.25	2.04		
ms	vs	vs	ms	w	w	w			

^aIntensities: vs, very strong; s, strong; ms, medium strong; m, medium; mw, medium weak; w, weak; vw, very weak.

턴을 그림 7에 나타내었다. Bragg식을 이용하여 계산된 면간 거리를 표 2에 요약하였다. 또한 silk I의 입체 구조는 글리신과 알라닌이 반복되는 구조의 입체 장에 에너지를 계산함으로써 예측할 수 있다. 실크가 방사될 때 silk I 구조에서 silk II 구조로 전이하며 단위입체 구조에서 일어나는 변화 중에서도 각 평면 간(intersheet plane)에서의 변화가 가장 크다. 이 때 겹쳐진 세 평면들 사이의 거리는 18.2% 감소하며 이 과정에서 물이 빠져 나오면서 용해도가 감소한다. 에너지

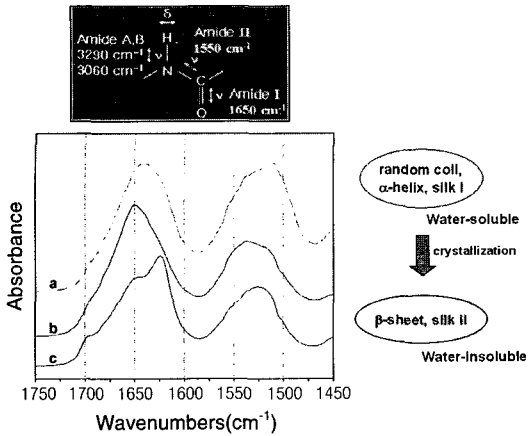


그림 8. 실크피브로인의 적외선스펙트럼. (a) random coil, (b) silk I and (c) silk II.

측면에서 보면 silk I이 silk II로 변할 때 에너지 장벽이 비교적 낮기는 하지만 silk II가 더욱 안정적이고, 이 전이과정은 보통 비가역적이다. 이러한 전이현상은 누에의 실샘에서 실크가 방사될 때 전단(shear)이 가해지면서 일어난다. 인공적으로는 기계적으로 전단을 가하는 방법, 연신, 가열, 메탄올과 아세톤과 같은 극성 용매의 사용, 전기장을 가하는 방법 등을 통해서 같은 현상을 유도할 수 있다.¹⁷⁻²³

그림 8은 실크피브로인의 적외선 스펙트럼(FT-IR)을 나타낸 것이다. Silk II 구조에서 특징적으로 흡수되는 파수는 1697 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} (amide I), 1528 cm^{-1} (amide II), 1265 cm^{-1} (amide III)이며 silk I 구조와 랜덤코일 혹은 α -나선구조 등의 경우 1658 cm^{-1} (amide I), 1652 cm^{-1} (amide I), 1538 cm^{-1} (amide II)에서 흡수되는 파수가 얻어진다. Silk I과 random coil 구조와의 구별은 적외선 스펙트럼으로는 한계가 있다.²⁴

4. 실크의 특성

4.1 일반적 특성

누에실크는 물, 약산 및 약알칼리 그리고 대부분의 유기 용매에 대하여 불용성을 보이며 대부분의 단백질 분해효소에 대해서도 저항성을 갖는다. 실크섬유는 습기를 잘 흡수하여 약 10~15%의 수분을 함유할 수 있다. 물리적 특성의 경우 반투명하고 높은 광택도를 가진다. 또한, 높은 내마모성 및 단백질 분해 효소에 대한 저항성으로 인하여 자연적으로 잘 분해되지 않는다.

4.2 기계적 특성

실크 섬유는 강하고 질긴 성질을 가지고 있다. 예를 들면, 누에실크는 높은 강도를 갖는 인조섬유에 가까운 인장강도를 가지면서 35%에 이르는 인장률을 나타낸다. 누에실크의 인장강도는 약 $6 \times 10^8\text{ N/m}^2$ 이고 인장탄성계수는 약 $5 \times 10^9\text{ N/m}^2$ 이며, 파괴에너지(energy to break)는 약 $7 \times 10^4\text{ N/kg}$ 이다. 이 값은 특히 실크에 연신을 가하여 분자의 배향성을 향상시킬 때 더욱 높은 값을 보여준다. 대부분의 섬유와는 달리 실크섬유를 일정한 속도로 연신을 시키면 인장률 뿐만 아니라 강도와 탄성계수가 모두 증가하는 경향을 보여준다. 즉, 실크의 기계적 물성은 피브로인내에 짧은 곁사슬의 아미노산에 대한 긴 곁사슬의 아미노산의 비와 인장율과 부분적으로 관련성을 갖는다.

5. 실크의 공정

5.1 수용액

실크를 생체재료 및 기타재료로 이용하기 위해서는 먼저 실크를 수용액화 하는 것이 중요하다.²⁵⁻²⁷ 분비샘에서 직접 용액을 얻는 것도 가능하며 농도의 경우 후부실샘에서는 12~15%이고 중부실샘에서는 20~30%이다. 또한 실크 수용액은 가공되지 않은 실크나 누에고치로부터 만들 수도 있다. 누에고치의 세리신을 제거하는 정련은 일반적으로는 끓는 비눗물이나 저농도의 탄산나트륨 용액(sodium carbonate solution) (0.3 wt%)을 이용한다(그림 9).²⁸ 실크피브로인의 보호를 위하여 최대한 빠른 시간 안에 sericin을 추출해야 하며 시간에 따른 피브로인의 분자량을 전기영동(gel electrophoresis)을 통하여 확인한다. 정련 후의

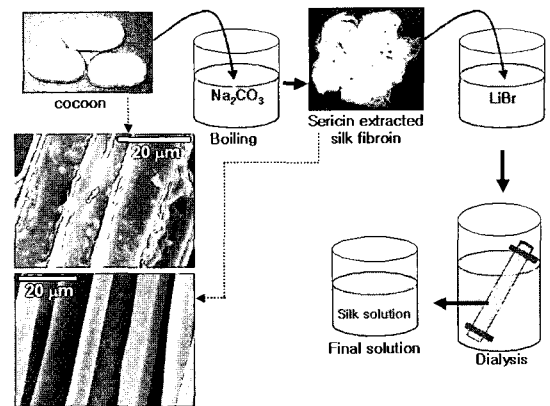


그림 9. 누에고치로부터 실크피브로인 수용액 제조 공정.

피브로인은 고농도 브롬화리튬용액(lithium bromide solution) (9.3 M)을 이용하여 65 °C에서 가열 용해시킨다. 이 외에도 티오시안화리튬(LiSCN) 또는 염화칼슘(CaCl₂) 등의 염을 이용할 수 있다. 이 피브로인용액은 투석막을 이용하여 탈염 한 후 순수한 피브로인 수용액이 된다.²⁹ 이 상태의 용액은 준안정 상태이나 약 7 °C 냉장 보관을 할 경우 3주간 안정한 용액상태를 유지하며, 상온에서 보관시 약 5일에서 7일 사이에 비가역적 하이드로겔(hydrogel) 형태로 변화한다.³⁰ 또한, poly(ethylene glycol) (PEG) 수용액을 이용하여 최대 20 wt% 피브로인 수용액을 만들 수 있으나 이 경우 고농도로 인하여 누에고치 몸 안의 실샘(후부실샘에서 약 25 wt%)에서 처럼 겔화되어 더 이상 수용액으로서의 역할을 하지 못한다. 이러한 고농도의 실크 수용액은 교반 등의 기계적 마찰응력이나, 친수성이 큰 알코올류와의 접촉으로 인하여 역시 실크섬유 고유의 베타 쉬트 구조를 가지게 되며 XRD 또는 FT-IR을 이용하여 쉽게 구조 변화를 관찰할 수 있다. 저농도의 실크 수용액에서는 피브로인이 랜덤 코일 구조로 존재한다. 그러나 실온에서 서서히 농축시키면 피브로인 주사슬의 요동이 감소하면서 피브로인 분자들이 응집되어 silk I의 구조가 형성된다. 중부실샘에 저장된 실크 피브로인 중 silk I 구조는 약 40%를 차지한다.

생체재료로서의 응용을 위하여 인체에 알레르기 반응성을 나타내는 세리신은 반드시 제거되어야 한다. 완벽하게 제거되지 못한 세리신으로 인하여 거미 실크와는 달리 누에고치 실크는 생체적합성이 떨어지는 재료로서 인식되어 왔다. 세리신이 완전히 제거된 실크 피브로인의 경우 생체적합성이 합성 생체고분자인 poly(L-lactic acid) (PLLA) 또는 이의 공중합체를 못지않으며 기계적 물성이 우수하여 사람의 인대 또는 뼈의 재생을 위한 scaffold로서의 우수성도 최근 보고되었다. 하지만 세리신의 제거 과정 중 일어날 수 있는 피브로인의 분자량 감소에 대한 연구 보고가 있으며 이는 재생 과정을 통해 얻게 되는 재생 실크 필름과 같은 성형품의 기계적 물성을 저하시키는 원인이 된다.

5.2 실크필름

누에실크 피브로인 필름은 제조된 수용액을 폴리스티렌(polystyrene), 폴리염화비닐리덴(poly(vinylidene chloride))이나 아크릴수지(acrylic resin)판 위에 부은 후 공기 중에서 건조시켜 얻는다. 이때 형성된 실크필름의 구조는 silk I과 랜덤코일로 이루어져 있으며 필름은 물에 녹을 수 있다.^{31,32} 필름을 상대습도가 100%인 폐쇄된 용기 안에 24시간 동안 방치하면 수화되어 silk I 구조를 안정시키므로 필름이 물에 잘 녹지 않게 된다(그림 10).³³⁻³⁵ 또한 수용성 필름(as-

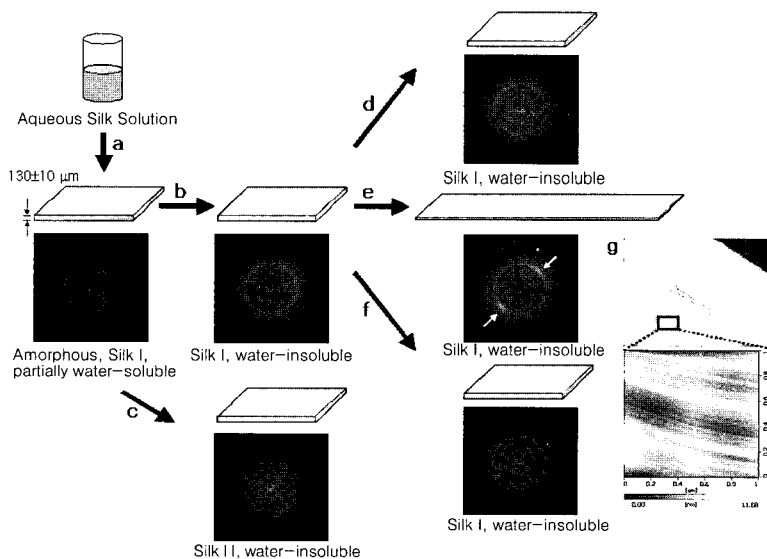


그림 10. 실크피브로인 수용액으로부터 제조된 실크피브로인 필름과 X-ray 회절패턴: (a) as-cast film, (b) annealed in water for 24 h, (c) annealed in methanol (50%) for 24 h, (d) annealed in methanol(50%) for 24 h, (e) stretched (300%) in water, and (f) treated in ethanol (70%) for 24 h. (g) Enhanced birefringence of stretched film by optical polarizing microscope and AFM image of stretched film surface(1 μm × 1 μm) by tapping mode. d—Spacing values of silk I (Å) 7.5, 5.7, 4.5, 3.7, 3.2, 2.8 and silk II (Å) 9.8, 4.3, 3.7.

표 3. 실크피브로인필름의 접촉각과 기계적 물성

Silk film	Contact angle (degree)	Tensile Modulus (GPa)	Tensile Strength (MPa)	Elongation at Break (%)
As cast	51.42.6	3.90.7	47.26.4	1.90.7
Silk I film	62.61.8	1.90.5	67.711.7	5.51.7
Silk II film	71.41.5	3.50.9	58.816.7	2.10.4

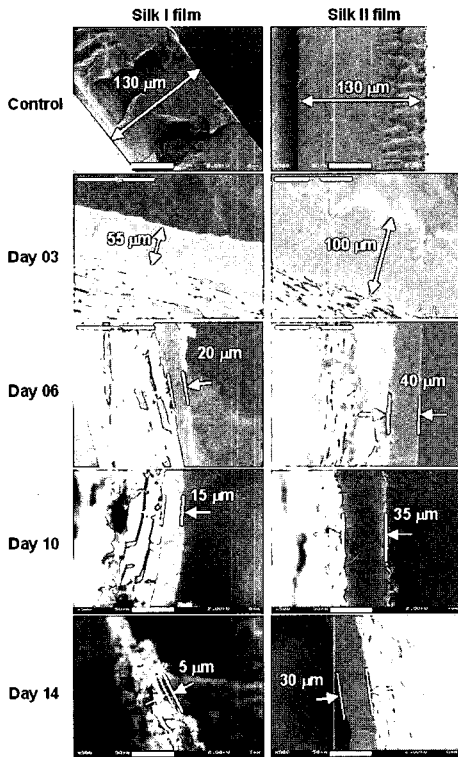


그림 11. SEM images of enzymatic degradation of silk film with time.

cast)을 메탄올이나 아세톤 같은 친수성 극성용매에 담가두면 필름 표면에서 silk II로 구조적 변화가 일어나면서 비수용성 필름이 얻어진다. 그러나 필름 안쪽의 피브로인 분자들은 여전히 랜덤 코일로 존재하여 주사슬이 자유롭게 움직이는 상태로 불균일한 구조를 갖게 된다. 또한, 수용성 필름을 연신하여 비수용성 필름을 얻을 수 있다. 고형화 후 silk I 구조를 가지는 필름과 silk II 구조를 가지는 필름 간에는 몇 가지 큰 물리적 차이를 보인다. 먼저 silk I 구조를 가지는 필름은 silk II 구조를 가지는 필름에 비해 인장에 의한 탄성계수는 작지만 인장강도와 연신율이 우수하며(표 3) 단백질 분해 효소에 의한 분해속도가 빠르므로 생분해성 재료로서의 응용에 있어 분해속도 조절이 가능하

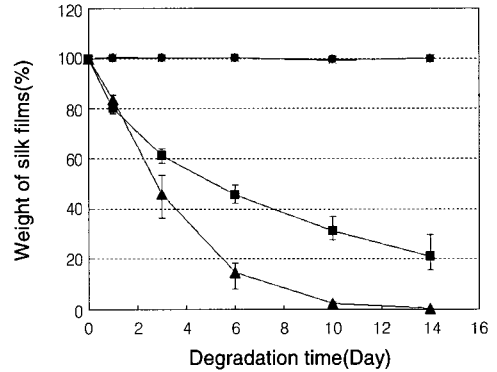


그림 12. Enzymatic degradation of silk films(silk I film (▲) and silk II film (■) in enzyme solution; silk I film(x) and silk II film (●) in PBS).

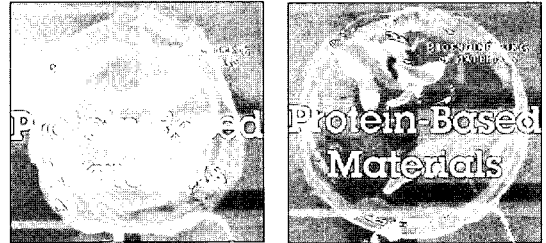


그림 13. Images of silk I film (left) and silk II film (right).

다(그림 11, 12).³⁶⁻³⁸ 투명도에 있어서도 확연한 차이를 보이는데 silk I 필름은 투명하지만 silk II 필름은 불투명하다(그림 12). 또한, 필름위의 물방울 접촉각 비교 실험에서 알 수 있듯이(표 3) silk I 필름의 친수성이 더 크게 나타나므로 조직공학용 재료로서의 응용에 있어 세포부착성에 대한 차이를 나타낸다.

실크피브로인 수용액에 폴리에틸렌글리콜(poly-ethylene glycol)을 첨가하여 다공성 필름을 제조할 수 있는데 이 과정에서 silk II로 구조 변화가 일어나며 건조시키면 비수용성 필름이 얻어진다. 이 필름을 다시 물 속에 담가두면 폴리에틸렌글리콜이 빠져 나가면서 순수한 다공성 피브로인 필름을 얻을 수 있다(그림 14).³⁹

5.3 실크섬유방사

수용성 실크에 대한 유연학적 연구를 통해 실크섬유의 결정화도는 방사시 전단속도 및 연신속도와 관련되어 있다는 사실을 알아내었다. Silk II로의 구조적 변화를 유도하고 복굴절 현상을 나타내기 위해서는 1 cm/sec 이하의 임계 방사 속도가 필요하다. 누에의 방사 과정에서는 후부실샘의 실크피브로인은 수용성이며 광학적 성질이 없고 랜덤 코일의 2차 구조를 보인다. 실크실샘에서 이 영역의 지름은 1 mm 이하이며 전단 속도가 낮다. 중부견사샘이나 저장 영역에서는 지름이 1.2~2.5 mm이며 전단 속도는 더욱 줄어든다. 실샘의 끝부분은 매우 협소해서 지름이 0.05~0.3 mm이므로 전단 속도가 매우 크다. 이 부분에서는 실샘 밖으로 활발한 물 수송이 일어나고 pH가 감소하며 칼슘, 칼슘, 인산염 등의 이온 교환이 일어난다. 이 단계에서

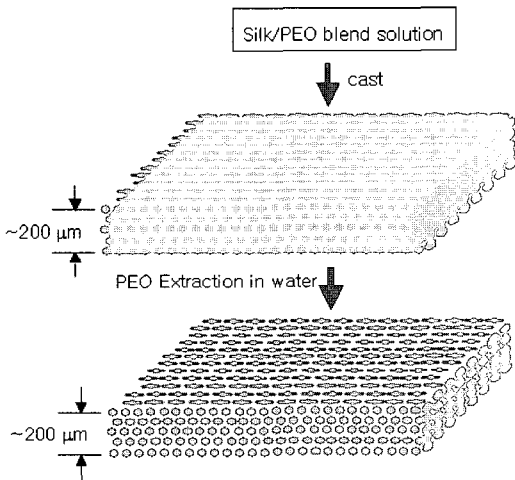


그림 14. 실크피브로인 수용액과 poly(ethylene oxide) (PEO, MW 900,000)를 이용한 다공성 필름의 제조.

는 실크의 β -sheet 2차 구조가 나타난다. 실크섬유의 지름은 방사 속도에 따라 변화하며 섬유의 총 길이는 단백질을 합성하는 속도와 시간을 통해서 대략적으로 알아 낼 수 있다.

실샘 끝부분에서는 리오토로픽(lyotropic) 액정상이 형성되어 실크 단백질의 점도가 감소한다. 이 상(phase)은 무기물의 흐름을 돕고 이 과정에 필요한 에너지를 감소시켜 방사기관이 미리 막히지 않도록 돕는다. 또한, 방사 과정에 의해서 분자의 배향과 배열을 높일 수 있다. 이러한 배향은 연신(drawing) 처리로도 얻을 수 있으며 기계적 물성을 향상시킨다. 네마틱 액정상은 실크실샘에서 얻어진 단백질 용액을 서서히 건조시키는 동안 광학현미경으로 관찰할 수 있다. 세리신은 실크가 방사될 때 두 피브로인섬유를 고정시키는 매트릭스 역할 외에도 실크 단백질이 방사돌기를 잘 통과할 수 있도록 돕는다. 또한, 2가 양이온의 저장고로써 피브로인에서 나오는 수분을 흡수하는 수용체로써의 역할을 한다. 실크실샘은 두 개의 관으로 이루어져 있으며 이들은 방적돌기에서 합쳐진다. 실샘은 크게 3부분으로서 전부실샘, 중부실샘, 후부실샘으로 나누어진다. 각 실샘에서의 실크피브로인의 농도 및 기타성분 그리고 물성을 표 5에 정리하여 나타내었다.

5.4 실크피브로인의 형태학적 관찰

실크는 거미나 누에의 체내의 실샘에 실크수용액을 저장하였다가 실젯(spinneret)을 통해 방사되어 형성된다. 하지만 주로 알라닌과 글리신으로 이루어진 실크피브로인이 어떻게 하여 높은 농도(~30%)의 수용액상태로 실샘에 저장되어 있다가 방사 후 물에 불용성이며 우수한 기계적 물성을 가진 섬유형태의 실크를 생산하는지에 대한 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았다. 실크피브로인은 누에실크의 경우 분자량이 약

표 4. States of Liquid Silk in Silk Gland

Silk gland	Posterior division	Middle division			Anterior division
		Posterior	Middle	Anterior	
Concentration (%)	12	25	26	26	30
Conformation	Random-coil		Random-coil		β -form
pH	6.9	5.6	5.2	5.0	4.8
Viscosity	Middle	High	High	High	Low
State	Gel	Gel	Gel	Gel-sol	Liquid crystal
K^+ ($10^{-3}\%$)	-	30.2	29.5	33.3	-
Ca^{2+} ($10^{-3}\%$)	-	17.7	46.0	59.7	-
Water content (%)	88	75	74	74	70
Freezing Water (%)	81.3	63.2	57.2	56.9	-
Non-freezing Water (%)	6.9	11.8	16.8	17.1	-

34만(Dalton)정도이며 단백질분자내에 커다란 소수성 영역과 그 사이 작은 친수성 영역이 반복적으로 형성되어 있다. 이러한 실크피브로인의 구조는 최근에 보고된 실크단백질의 전체 염기서열을 각 아미노산의 소수성 플롯에 의해 해석되었다. 이중 소수성 사이의 친수성 부분이 실크단백질 분자가 물 속에 안정하게 그리고 높은 농도로 녹아있을 수 있는 역할을 담당하고 있으며 수용액내의 농도가 증가됨에 따라 소수성 부분은 수용액안에서 실크단백질 분자들이 자가조립에 의해 약 100에서 200 nm 크기의 마이셀 형태를 형성하도록 하는 역할을 담당하고 있다(그림 15).⁴⁰ 즉 이러한 실크 단백질의 1차 구조적 특성에 의해 높은 농도의 실크 수용액은 리오토로픽 액정상(lyotropic liquid crystal phase)을^{41,42} 나타내며 마이셀은 수용액의 농도가 더욱 증가됨에 따라 서로 뭉치게 되어 약 1 μm 이상의 지름을 갖는 구형체(sphere)를 형성한다.^{43,44} 이러한 마이셀로 이루어진 구형체는 실크단백질 분자의 친수성 영역의 덕분으로 수용액안에서 유연한 하이드로겔(hydrogel)을 형성하며 방사과정에서 받는 높은 전단력과 연신에 의해 실크단백질 주위의 물분자들을 외부로 방출하여 실크섬유를 형성할 수 있게 해준다. 일단

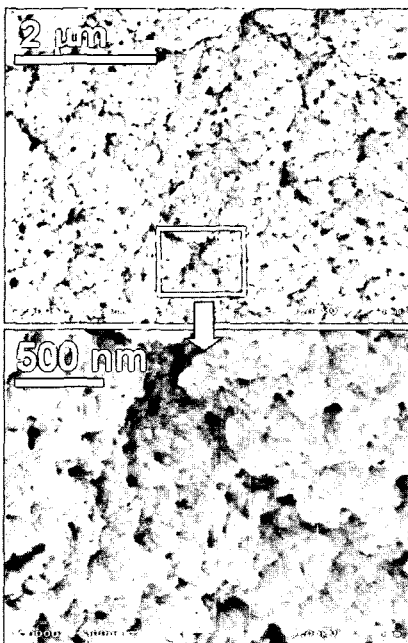


그림 15. SEM images of silk solution collected from the posterior region of the *B. mori* gland, illustrating micellar-like morphology(gland contents were separated in water and treated in methanol).

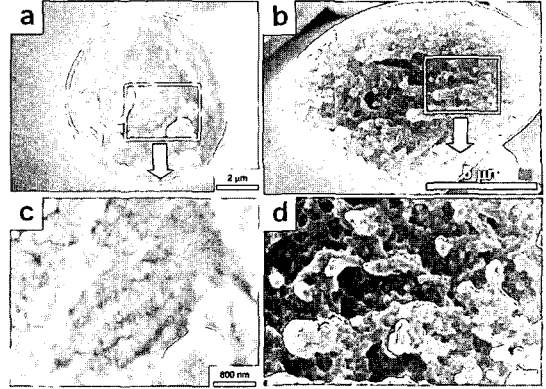


그림 16. SEM images of fracture surfaces of (a) *Argiope trifasciata* spider and (b) *B. mori* silkworm silk fiber; low magnification view showing the skin-core microstructure; (c) and (d) detail of the core fracture surface at higher magnification showing the globular structure.

한번 물 분자들이 실크단백질분자로부터 제거되어 실크단백질 내의 커다란 소수성 영역의 수소결합에 의해 형성된 실크병풍구조는 매우 안정하여 다시 물에 녹지 않으며 우수한 기계적 물성을 갖는 원동력이 되기도 한다. 농축된 실크수용액내에 존재하는 구형체 형태의 하이드로겔이 전단력과 신장에 의해 실크섬유의 내부의 미세구조를 이루고 있는 기존의 마이크로 피브릴(fibril)이라고 알려진 구조를 형성하게 된다.^{45,46} 이러한 실크섬유의 미세구조는 전자현미경(SEM)을 통해 확인할 수 있다(그림 16).⁴⁷⁻⁴⁹

6. 야생 누에 실크

6.1 분류

많은 야생 누에들은 실크를 생산한다. 그림 17은 누에의 일반적인 분류를 보여준다. 고치 생산을 위해서 사육되는 누에에는 천잠(*Antheraea yamamai*), 작잠(*A. pernyi*), 무가잠(*A. mylitta*), 피마잠(*Philosamia Cynthia ricini*) 등이 있다. 집누에(*B. mori*)를 포함하여 이들 누에들에 의해 형성된 고치들의 특성을 표 5에 요약하였다. 야생 누에의 고치도 실크피브로인과 세리신으로 구성되어 있으나 후부실샘보다 중부실샘의 크기가 더 작아 세리신의 함량이 비교적 낮은 편이다. 지방, 색소, 탄수화물 등의 함유량은 비교적 집누에고치에 비해 높다.

6.2 구조 및 특성

표 6은 피마잠, 작잠, 천잠 실크피브로인의 아미노산

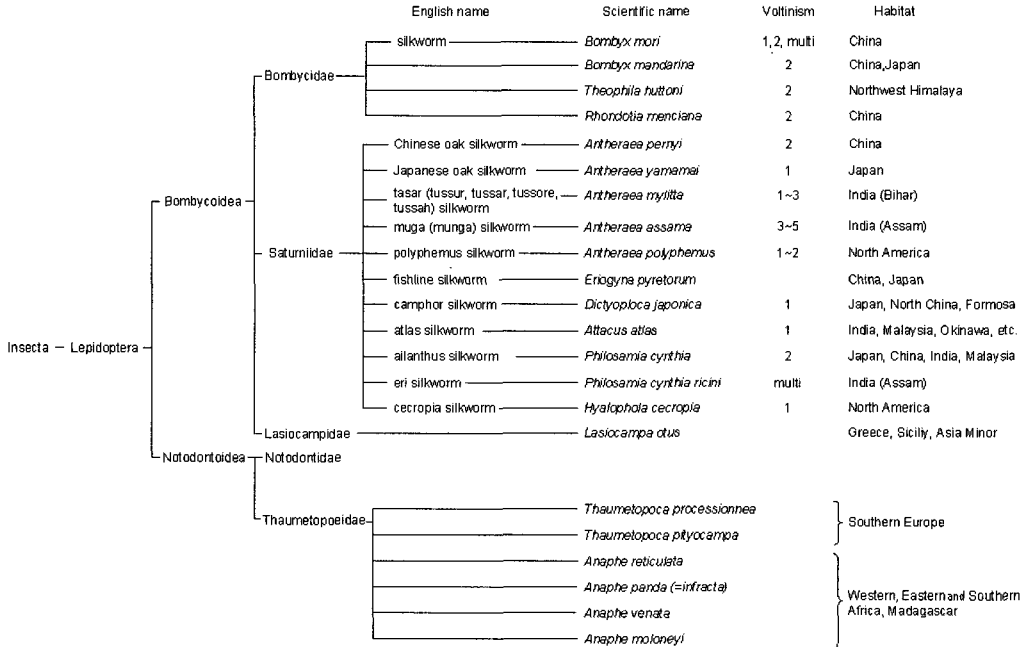


그림 17. 일반 누에의 분류.

표 5. 다양한 누에고치의 특성

	Cocoon Color	Thickness and Stiffness of Cocoon Shell	Size of Cocoon (width×length, cm)
<i>Bombyx mori</i>	White	Thick, hard	2.5×3.5
<i>Antheraea yamamai</i>	Greenish-yellow	Thin, hard	2.3×4.5
<i>Antheraea pernyi</i>	Brown	Thin, hard	2.3×4.5
<i>Antheraea mylitta</i>	Brown	Thick, hard	(2.3~3.5) × (3.5~6.5)
<i>Philosamia cynthia ricini</i>	Pale brown	Flossy	1.5×4.5

구성비를 보여주고 있다. 야생 누에피브로인을 이루는 주요 아미노산은 집누에와 마찬가지로 알라닌과 글리신이며 이 두 아미노산은 피브로인의 74~82%를 차지한다. 하지만 이들 야생누에의 실크피브로인은 집누에와는 대조적으로 알라닌이 글리신보다 더 많은 양을 함유하고 있어 실샘 혹은 수용액상에서 주로 α-나선 구조를 이루고 있다. 참고로 피마잠의 경우 α-나선 구조 영역에 존재하는 알라닌은 평균적으로 22개이다. 방사 후에는 실크 피브로인의 입체 구조는 α-나선 구조와 랜덤코일에서 대부분 역평행 β-sheet 구조로 변화한다(silk II). 야생누에 세리신의 아미노산 조성은 집누에와 비슷하다. 야생누에 실크피브로인의 특성은 집누에피브로인과 상당한 차이점을 보이며 물리적, 기계적 특성이 다르다. 예를 들어 작잠과 천잠 실크섬유의 탄성계수는 집누에실크 보다 작으며 연신에 따른

섬유의 기계적강도 증가율이 높지 않다. 또한, 집누에 실크보다 수분흡수력이 낮다.

7. 거미 실크

지금까지 약 35,000종의 거미들이 확인되었으며 그 종류와 양에 있어 자연계에서 가장 풍부한 생명체 중에 하나이다. 그 중에서 거미집(orb-web)을 짓는 거미들은 먹이를 잡기 위해서 실크를 만들어내지만 집누에와는 달리 실크생산을 위한 사육을 할 수 없다. 거미들은 전 일생을 통해 실크를 생산하며 다양한 종류의 실크를 만들어 낸다. 많은 거미 중 특히 golden orb weaver(다른 거미실크와는 달리 거미줄의 색이 황금색임)라고 하는 무당거미(Nephila clavipes)의 실크가

표 6. 야생누에 실크피브로인의 아미노산 조성

Amino acids	<i>P.c.ricini</i> fibroin	<i>A.pernyi</i> fibroin	<i>A.yamanai</i> fibroin
Gly	33.2	26.7	26.1
Ala	48.4	48.1	48.1
Ser	5.5	9.1	9.0
Tyr	4.5	4.1	3.9
Asp	2.7	4.2	4.5
Arg	1.7	2.9	3.5
His	1.0	0.8	0.8
Glu	0.7	0.8	0.7
Lys	0.2	0.2	0.1
Val	0.4	0.7	0.7
Leu	0.3	0.3	0.3
Ile	0.4	0.4	0.4
Phe	0.2	0.3	0.2
Pro	0.4	0.3	0.4
Thr	0.5	0.5	0.6
Met	Trace	Trace	Trace
Cys	Trace	Trace	Trace
Trp	0.3	0.6	0.7

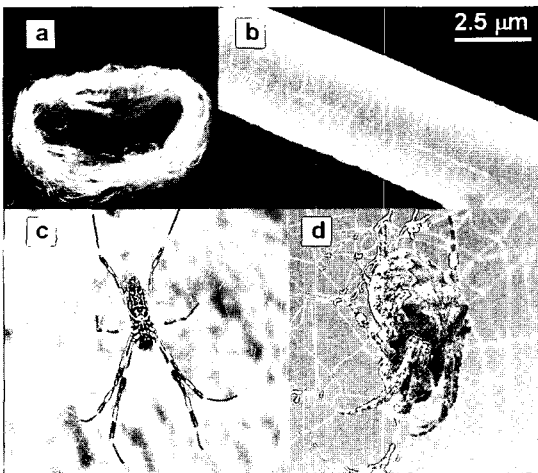


그림 18. (a) Images of golden dragline silk fibers of *N. clavipes* spider, (b) SEM image of dragline silk fibers of *N. clavipes* spider, and image of (c) *N. clavipes* and (d) *A. ventricosus* spiders.

집중적으로 연구대상이 되어왔다(그림 18). 주로 암컷이 거미그물을 만들며 한번 방사하는 동안 약 200 g의 실크를 생산할 수 있다. 거미는 먹이를 감지하고 사냥하기 위한 목적 이외에도 몸을 부착시키거나 새끼 거미들을 바람에 날려 보내는 등 다양한 용도의 거미실크를 생산한다. 거미그물의 모양은 일반적으로 원형이

며 stabilimenta라고 하는 지그재그 패턴을 갖는 것이 특징인 거미그물이 있다. 이는 거미줄을 안정화 강화시키고 자신의 몸을 위장하거나 거미줄에 손상을 입힐 수 있는 새들을 위협하며 수분을 흡수하는 등의 역할을 한다. 오직 한 종류의 실크를 생산하는 거미가 있는 한편, 서로 다른 다양한 기능을 가진 열 가지 이상의 실크를 만들어 내는 거미가 있다(그림 19). 이 실크들은 거미의 복부에 위치한 다양한 실크실샘에서 방사되어 생산된다(표 7). 이처럼 다른 기능과 역할을 하는 실크들의 아미노산 조성비는 서로 다르며 아미노산의 서열도 다르다. 일반적으로 거미줄의 직경은 누에 실크보다 작으며 대략 1~5 μm 정도이다. 드래그라인(dragline) 실크는 거미 실크 가운데서도 가장 강한 것으로 누에실크와는 달리 아교 역할을 하는 세리신이 없다. 거미실크의 기계적 특성은 날아가는 곤충들이 거미그물에 부딪힐 때의 충격을 흡수하기 위한 기능과 관련이 있으며 원형을 이루는 거미그물은 강도와 신장성을 적절히 조절하여 충격에너지를 넓게 분산시킬 수 있다. 즉, 충격에너지의 대부분은 거미그물의 탄성에 의해 회복되며 곤충들이 다시 튕겨져 나가는 것을 막

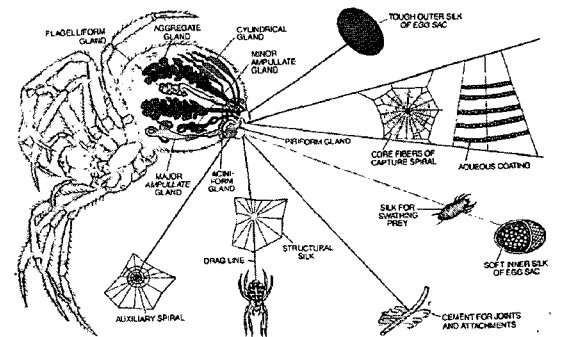


그림 19. 다양한 용도의 서로 다른 실크를 방사하는 거미.

표 7. Examples of the Different Types of Spider Silk Protein Polymers and Their Functions

Gland	Type	Function
Major ampullate	Dragline, orb frame, radii	Safety line, mechanical strength
Minor ampullate	Orb frame, dragline	Support fibers—frame and dragline
Flagelliform	Viscid	Prey capture
Aggregate	Gluelike	Prey capture and retention
Cylindrical	Cocoon	Reproduction
Aciniform	Wrapping	Captured prey
Piriform	Attachment	Coupling to environmental substrates

아준다. 드래그라인을 이루는 실크피브로인의 분자량은 약 300,000 Da을 넘는 것으로 보고되어 있다. 무당거미(*N. clavipes*)의 드래그라인 실크는 짧은 결사슬을 가진 아미노산(글리신, 알라닌, 세린)의 비율이 63%로서 85%인 누에실크에 비해 낮아 상대적으로 낮은 결정화도를 보인다.

8. 결론

곤충의 실샘에서 방사 과정을 통해 얻어지는 실크 중 거미 실크와 누에고치 실크는 그들의 기계적 물성과 같은 독특한 특성들로 인하여 오랜 기간 동안 연구대상이 되어왔다. 거미실크의 경우 합성섬유보다도 가볍고 강한 기계적 물성으로 인하여 미 국방과학연구소에서 군수물자로서의 개발을 위하여 많은 투자를 해왔으나 아직도 생산비용 대비 효과적인 생산 방법에 더 많은 연구를 요구하고 있다. 한편, 누에고치 실크의 경우, 최근 들어 생체재료로서의 응용을 위하여 많은 연구 결과가 보고되기 시작하고 있으며, 특히, 기존에 잘못 알려졌던 이들의 생체적합성과 생분해성에 대한 새로운 보고가 계속 되어지고 있다. 하지만 재생 실크를 이용한 새로운 생체재료의 보고는 아직 미비한 편이며, 특히, 재생 후 성형된 필름은 물에 대한 용해도를 줄이기 위하여 알코올 처리에 의해 실크 고유의 베타쉬트 구조를 가질 경우 천연실크와는 달리 깨지기 쉬운 취약한 물성을 보여준다. 이러한 문제점은 재생 과정 중 발생하는 실크단백질의 분자량감소에 의한 것으로 판단되어진다. 이러한 취약한 물성은 천연실크피브로인의 고유분자량을 유지하면서 재생과정을 통하여 실크수용액을 얻을 경우 해결될 수 있다. 실크피브로인 수용액으로부터 필름 또는 전기방사법을 이용하여 나노섬유부직포의 제조 또한 가능하다. 이러한 필름과 나노섬유 부직포들은 인공 피부, 인공 혈관 등의 생체재료로써 응용되어 질 수 있다. 또한, 실크피브로인은 천연 친수성/소수성 멀티 블록 공중합체로서 또는 액정고분자 및 액정탄성체(liquid crystalline elastomer)로서의 연구도 최근 들어 선진 연구자들에 의해 활발히 진행되고 있다. 이러한 새로운 재료개발 및 특성 연구를 통해 실크의 새로운 응용분야를 찾는 데 일조를 할 수 있을 것이라 판단된다. 뿐만 아니라 현재까지 옷감 또는 한방 재료로서만 사용이 되어지고 있던 실크의 새로운 소재 개발을 통하여 우리나라 잠사농업의 경제에도 큰 발전을 가져다 줄 것이다.

감사의 글: 본 연구를 위해 매년 신선한 누에 및 누에고치를 공급해주고 있는 충북보은 토종누에농장에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. Lazaris, S. Arcidiacono, Y. Huang, J. F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares, and C. N. Karatzas, *Science*, **295**, 472. (2002).
2. F. Vollrath and D. P. Knight, *Nature*, **410**, 541 (2001).
3. Z. Shao and F. Vollrath, *Nature*, **418**, 741 (2002).
4. S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, *J. of Biomedical Materials Research*, **54**, 139 (2001).
5. G. H. Altman, R. L. Horan, H. H. Lu, J. Moreau, I. Martin, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **23**, 4131 (2002).
6. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. S. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
7. H. J. Jin, J. S. Chen, V. Karageorgiou, G. H. Altman, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **25**, 1039 (2004).
8. J. S. Chen, G. H. Altman, V. Karageorgiou, R. Horan, A. Collette, V. Volloch, T. Colabro, and D. L. Kaplan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **67 A**, 559 (2003).
9. D. L. Kaplan, et. al. in *Protein Based Materials*, K. McGrath, and D. L. Kaplan, Editor, Birkhauser, Boston, p. 103 (1997).
10. D. L. Kaplan, W. W. Adams, B. Farmer, and C. Viney, *Polymers Materials Science and Biotechnology*, D. L. Kaplan, W. W. Adams, B. Farmer and C. Viney, Editor, 2-16 ACS Symposium Series 544 ; American Chemical Society, Washington DC (1994).
11. C. J. Arntzen and E. M. Ritter, in *Encyclopedia of agricultural science*, Academic Press, New York, Vol. 4, p. 1, 1994.
12. J. Magoshi, Y. Magoshi, M. A. Becker, and S. Nakamura, in *Polymeric Materials Encyclopedia*, J. C. Salamone, Editor, CRC Press, NewYork, p. 667 (1996).
13. R. D. B. Fraser and T. P. MacRae, in *Conformation*

- in *Fibrous Proteins*, Academic Press, New York, 1973.
14. T. Ito, Silkworm Nutrition. in *The Silkworm*, Y. Tazima, Editor, Kodansha, Tokyo, 1978.
 15. D. L. Kaplan, S. J. Lombardi, W. S. Muller, and S. A. Fossey, I Silks. in *Biomaterials : Novel Materials from Biological Source*, D. Byrom, Editor, Stockton, New York, 1991.
 16. C. D. Livengood, Silk. in *Polymers-Fibers and Textiles : A Compendium*, J. I. Kroschwitz, Editor, Encyclopaedia Reprint Series, Wiley, New York, p 789 (1990).
 17. J. Magoshi, M. Mizuide, and Y. Magoshi, *J. Polymer Science: Polymer Physics Edition*, **17**, 515 (1979).
 18. M. Ishida, T. Asakura, M. Yoko, and H. Saito, *Macromolecules*, **23**, 88 (1990).
 19. A. Seidel, O. Liivak, S. Calve, J. Adaska, G. Ji, Z. Yang, D. Grubb, D. B. Zax, and L. W. Jelinski, *Macromolecules*, **33**, 775 (2000).
 20. R. Valluzzi, S. Szela, P. Avtges, D. Kirschner, and D. L. Kaplan, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 11382 (1999).
 21. D. Wilson, R. Valluzzi, and D. Kaplan, *Biophysical Journal*, **78**, 2690 (2000).
 22. Y. Shen, M. A. Johnson, and D. C. Martin, *Macromolecules*, **31**, 8857 (1998).
 23. T. Asakura, A. Kuzuhara, R. Tabet, and H. Saitô, *Macromolecules*, **18**, 1841 (1985).
 24. X. Chen, A. Shao, N. S. Marinkovic, L. M. Miller, P. Zhou, and M. R. Chance, *Biophysical Chemistry*, **89**, 25 (2001).
 25. T. Asakura, M. Demura, Y. Watanabe, and K. Sato, *Journal of Polymer Science Part B, Polymer Physics*, **30**, 693 (1992).
 26. J. M. Yao, H. Masuda, C. H. Zhao, and T. Asakura, *Macromolecules*, **35**, 6 (2002).
 27. R. Nazarov, H. J. Jin, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 718 (2004).
 28. H. Yamada, H. Nakao, Y. Takasu, and K. Tsubouchi, *Material Science and Engineering C*, **14**, 41 (2001).
 29. A. Ochi, K. S. Hossain, J. Magoshi, and N. Nemoto, *Biomacromolecules*, **3**, 1187 (2002).
 30. U.-J. Kim, J. Park, C. Li, H.-J. Jin, R. Valluzzi and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 786 (2004).
 31. J. Magoshi, M. Mizuide, and Y. Magoshi, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, **17**, 515 (1979).
 32. M. Ishida, T. Asakura, M. Yoko, and H. Saito, *Macromolecules*, **23**, 88 (1990).
 33. H.-J. Jin, J. Park, V. Karageorgiou, U.-J. Kim, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, *Advanced Functional Materials*, **15**, 1241 (2005).
 34. P. Monti, G. Freddi, A. Bertoluzza, N. Kasai, and M. Tsukada, *Journal of Raman Spectroscopy*, **29**, 297 (1998).
 35. M. Tsukada, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **24**, 457 (1986).
 36. N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Biomaterials*, **11**, 430 (1990).
 37. M. Li, M. Ogiso, and N. Minoura, *Biomaterials*, **24**, 357 (2003).
 38. G. Forlani, A. M. Seves, and O. Ciferri, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **46**, 271 (2000).
 39. H. J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 711 (2004).
 40. H. J. Jin and D. L. Kaplan, *Nature*, **424**, 1057 (2003).
 41. D. P. Knight, and F. Vollrath, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 155 (2002).
 42. D. P. Knight, and F. Vollrath, *Proceedings Royal Soc. London Series B-Biol. Sci.*, **266**, 519 (1999).
 43. Lele, A. K., Y. M. Joshi, and R. A. Mashelkar, *Chemical Eng. Sci.*, **56**, 5793 (2001).
 44. Tanaka, T., T. Tanigami, and K. Yamaura, *Polymer Internatl.*, **45**, 175 (1998).
 45. S. Putthanarat, N. Stribeck, S. A. Fossey, R. K. Eby, and W. W. Adams, *Polymer*, **41**, 7735 (2000).
 46. J. D. van Beek, S. Hess, F. Vollrath, and B. H. Meier, *National Academy of Sciences*, **99**, 10266 (2002).
 47. J. Perez, Rigueiro, C. Viney, J. Llorca, and M. Elices, *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, 2439 (1998).
 48. P. Poza, J. Pérez Rigueiro, M. Elices, and J. Llorca, *Engineering Fracture Mechanics*, **69**, 1035 (2002).
 49. X. Auvray, T. Perche, C. Petipas, R. Anthore, M. J. Marti, I. Rico, and A. Lattes, *Langmuir*, **8**, 2671 (1992).
 50. F. Vollrath, *Reviews in Molecular Biotechnology*, **74**, 67 (2000)
 51. S. Winkler, and D. L. Kaplan, *Reviews in Molecular Biotechnology*, **74**, 85 (2000)