

細菌性 Sericin 分解 酵素에 의한 生絲精練에 관한 研究

(第 1 報) 有用細菌의 分離 選定 및 生成 Sericinase 의 酵素學的
性質에 對하여

奇 宇 京* 徐 正 埏**

*晉州農科大學 農化學科 **慶北大學校 農科大學 農化學科

(1969, 7, 31 受理)

Studies on the scouring of raw silk by the application of bacterial enzyme of sericinase.

(Part 1.) Isolation and selection of proper bacteria and some studies of properties
of this bacterial enzyme.

By.

Woo-Kyung Ki* Jung-Hwn Seu**

**Department of agricultural chemistry, agricultural college, Kyung-Pook University.

*Department of agricultural chemistry, Jin-Ju agricultural college.

Summary

In order to obtain a method of scouring of raw silk and degumming of cocoon by the applying of bacterial enzyme of sericinase, a strain of proper bacteria was isolated and some properties of the enzyme produced by the isolated bacteria were studied and the following results were obtained.

- 1) Optimum pH and temperature were indicating 7.5 and 50°C. and on these conditions, the silk fibroin will get no modification at all.
- 2) Sericinase activity was inhibited by calcium ion in the free incubation but same ions reacted as an activator in the reaction with substrate. So, degumming of Tussah cocoon which contains calcium oxalate in the cocoon layer will be possible by the treatment of this enzyme.
- 3) This bacterial sericinase never gives any affection to the fibroin layer of the silk.
- 4) The factors of smooth-surface condition, dam-

age of fibroin layer, touching, luster and degumming effect of the silk resulting by the enzyme treatment were more appropriate than the results of other scouring methods, saponin, alkali and saponin-alkali using methods. We expect to get the same scouring result that compared with the papain or pancreatin were applied.

I. 緒 言

生絲의 繰絲 或은 絹織物의 精練이란 絹絲를 둘러싸고 있는 Sericin 層의 一部 或은 全部를 溶解 除去함을 말한다.

이 中 繰絲라 함은 繭의 絹纖維 相互間의 結締性 Sericin 을 溶解하여 纖維를 各各 遊離시켜 繰絲를 可能케 하는 것이고 精練이란 生絲 或은 生絲製品에서 Sericin 을 完全 除去함으로써 Fibroin 이 가지는 纖維로서의 特有性을 나타내는 工程으로 이 絹의 加工에 있어서 가장 重要한 作業이다.

위의 繰絲 方法에 있어서 一般의 使用하고 있는 方法은 熱水 或은 蒸氣로서 繭을 處理하여

Sericin 을 除去하는 方法을 使用하고 있다. 그러나 이와같은 煮繭 線絲에 있어서는 班煮 及 生絲의 膠着物을 生하여 品質을 低下시키며^(1,2) 또 解舒 不良 繭에 에어서는 고치의 解舒가 잘 되지 아니하여 生絲의 收量이 減少하는 등⁽³⁾ 여러가지 隘路가 따른다. 이에 對해 細川⁽⁴⁾ 中川^(5,6) 등의 報文이 있으며 나아가서 萩原⁽⁷⁾ 堀久⁽⁸⁾ 中川^(9,10) 등은 加壓低溫 煮繭에 對하여 研究한 바가 있으며 一互⁽¹¹⁾ 加藤⁽¹²⁾ 등은 滲透劑로서 比較的 좋은 結果를 報告하고 있다. 그리고 特히 精練에 있어서 他 方法에 있어서의 여러가지 絹의 損傷 等을 勘索하여 最近 酵素에 依한 精練의 優秀性이 알려져 Pancreatin의 利用에 是 角口⁽¹³⁾의 研究가 있고 또 Mosher⁽¹⁴⁾에 依해 여러 酵素使用에 對한 結果가 研究 發表된 바 있으며 三谷⁽¹⁵⁾ 片桐^(16,21) 後藤⁽²²⁾ 美馬⁽²³⁾ 土屋⁽²⁴⁾ 등의 植物性인 Papain과 細菌性 酵素 利用 研究結果實用化되고 있다한다.

그러나 우리나라에서는 아직 熱處理로써 線絲하고 있으며 精練에서도 Saponin을 使用하고있는 實情이다. 그러므로 우리들은 Sericin을 Degumming 作用이 強力한 菌을 分離하여 繭의 線絲와 生絲 精練에 利用하기 爲하여 이 菌의 酵素 處理結果石鹼法⁽²⁵⁾, Alkali法⁽²⁶⁾ 熱處理法⁽²⁷⁾과 比較 檢討하여 實用化를 爲한 基礎로서 몇 가지 實驗을 하였기에 報告하는 바이다.

끝으로 本 實驗에 많은 指導와 協助를 해주신 本 大學校 農科大學 金潤植 教授님과 慶北道 蠶業 檢査所 尹赫燮 所長님께 深甚한 謝意를 表하는 바입니다.

II. 實驗方法

1) Sericinase 生成菌의 分離

有用菌의 分離는 下記 三種의 分離用培地를 使用하였으며 菌源을 分離 培地에 接種後 30°C에서 3日間 培養하여 Pupae Extract Media와 Pupae Media에서는 繭의 腐化가 甚한 것 中에서, Sericin Media에서는 Sericin의 液化가 甚한 것에서 菌을 Bacto Beef Agar(pH 7.0)로 純粹分離하였다.

○Pupae Powder Media

線絲한 後의 家蠶의 Pupae를 60~70°C에서 完全 乾燥 磨碎한 Pupae dry powder에 水를 等量 加하여 Final pH 6.6으로 하여 100 ml 溶 三角 flask에 一定量씩 加하여 15 Lb에서 30分間 殺菌하여 使用하였음.

○Pupae Extract Media

上記 Pupae powder와 水를 4 : 1로 混合하여 67

~70°C에서 4 hrs. 抽出 後 80°C에서 10分間 加熱한 後 濾過하여 使用하였다(殺菌은 15 Lb에서 30分間).

○Sericin Media

Sericin은 繭層을 加熱 處理하여 이 Sericin液에 Aceton을 加하여 얻었으며 이 Sericin 4%에 Glucose 2%를 加하여 Final pH를 7.1로 하고 100°C에서 30分씩 3日間 常法에 依해 殺菌하여 使用함.

2) 有用菌의 選別

有用菌의 選別은 前述한 Pupae powder medium에 30°C에서 酵素를 生成시킨 後 Medium의 10倍의 H₂O를 加하고 2時間 常溫에서 抽出하여 이 酵素液에 Cocoon 一粒씩을 넣어 37°C, 24時間 處理 後 解膠 作用이 강한 菌과 線에 特別한 Melanin⁽²⁸⁾ 色素等을 生成하지 않는 菌을 五種一次로 選別하고 이들 菌에 對해서는 生絲에 對한 練減率 Fibroin損傷에 依한 Lousinus 生成⁽³²⁾有無 繭의 解舒 狀態等을 調查하여 그 結果 S₄₋₁₋₁, L₃₋₂, L₈. 三株를 選別하고 다시 生絲에 對한 練減率을 時間別로 檢討하여 短時間에 거의 最高值에 이르는 S₄₋₁₋₁을 最終 選別 하였다. 이때 酵素生成培地는 Pupae power, Wheat Bran 및 물을 2 : 1 : 3의 比率로 섞어 30°C에서 5日間 酵素를 生成시킨 後 同量의 물을 加하여 室溫에서 3時間 抽出 遠心後 上澄液을(pH 5.4) 酵素液으로 하였으며 여기에 Toluol을 加하고 이 酵素液으로 生絲를 24時間 處理시킨 後 다시 酵素液을 바꾸어 40時間까지 練減率을 調查하였다.

3) 選別菌 Sericinase의 性質

A) 酵素液의 調製

Wheat Bran Medium(Wheat Bran 1 : H₂O 1)에 7日間 培養한 培地에 適當量의 물로 抽出, 遠心分離 後 上澄液을 使用하거나 Medium 80%로써 沈澱, 遠心分離後 眞空乾燥한 酵素를 適當量의 buffer에 溶解시켜 使用함.

B) 活性度測定

萩原氏의 Gelatin 液化力⁽²⁹⁾과 Casein Folin 呈色法⁽²⁹⁾으로 力價를 測定 하였으며 Gelatin 液化力에 있어서는 Gelatin 1 mg을 1分間에 液化하는 活性度를 [LP]mg/Gel 1 unit로 表示하였으며 Casein Folin 呈色法에서는 酵素反應後 常法에 依하여 處理後 Erma photo electric photometer Type N-5로써 吸光度 測定하여 -log T로써 나타내었다.

C) 反應液의 調製

Sericinase의 酵素學的 性質을 調查하기 爲하여 最適作用 pH와 最適作用溫度 및 酵素의 熱安定性等에 있어서는 基質로써 6% Gelatin 4 ml와 酵素 1

ml를 사용하였으며 最適 pH Ca⁺⁺의 影響等에서는 基質液으로 0.6% Casein 4 ml와 Acetone 乾燥酵素의 水溶液 1 ml를 사용하였다.

4) 選別菌 酵素의 Fibroin 에 對한 影響

Sericin 含量이 21.14%인 6合絲 21 denier의 生絲를 120°C 高壓處理를 2時間씩 4回 反復하여 完全히 Sericin을 除去한 生絲를 力價 Gelatin [LP] 40°C mg/Gel 50 unit인 酵素液을 生絲量에 策하여 100倍를 加하여 檢査했으며 Lousinus 生成有無도 常法에 依해서 檢査하였다.

5) S₄₋₁₋₁ 菌株 酵素의 生絲에 對한 精練效果

生絲의 Sericin 含量 21.14%인 生絲에 McIlvaine Buffer 로써 稀釋한 酵素를 使用하여 時間當 生絲의 練減率과 最高 練減率을 調查하였다. 이때 酵素液의 力價는 Gelatin 에 對해 [LP]40°C mg/Gel 14.27 unit 이었다.

6) 酵素作用에 미치는 Ca Ion의 影響

柞蠶等의 解膠에 있어서 柞蠶繭層의 Ca-Oxalate 等이 酵素作用에 어떠한 影響을 미치는 가를 알기 爲하여 Ca⁺⁺에 對하여 여러 Ca 鹽을 使用하여 酵素와 Ca⁺⁺와의 關係를 調查하였다.

A) Free incubation 에 있어서 Ca Ion이 酵素에 미치는 影響

Ca[#] 溶液과 酵素液을 同量 混合하여 Ca[#]의 最終 濃度가 各各 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ M 이 되게 하여 30°C에서 4時間 free incubation 시킨 後 Casein 0.6%(McIlvaine Buffer pH 7.5) 4.0 ml와 前記 酵素液 1 ml를 反應液으로 하여 40°C에서 20分間 作用시켰으며 各 Blank는 Ca[#]를 넣지않고 30°C에서 4時間 free incubation 한 後 酵素와 基質을 作用시키기 前에 同一 濃度の Ca[#] ion을 加해준 것이 며 Control은 Ca[#]을 넣지않은 것이다.

B) 酵素作用에 있어서 Ca ion의 影響

II-(3)-A와 같이 調製한 酵素液을 同量的 各 濃度別 Ca[#]와 混合 그 중 1 ml와 0.6% Casein 4.0 ml(McIlvaine Buffer pH 7.5)에 넣어 40°C에서 20分間 作用시켰으며 Blank는 金屬 ion을 酵素作用을 시킨 後에 前記와 같이 添加해준 것이다. 여기에서의 Control은 金屬 ion을 넣지 않은 것이다 金屬 ion의 最終濃도는 5×10⁻²M, 5×10⁻³M, 5×10⁻⁴M, 5×10⁻⁵M로 되게 하였다.

7) S₄₋₁₋₁ 菌株가 生成한 酵素에 依한 生絲의 酵素精練과 他 精練과의 比較

A) 精練方法⁽⁶⁰⁾ 生絲(Raw silk: Sericin 含量 21.74%, 6合絲 21 denier)의 精練에 있어서 高壓法은 生絲 無水物의 100倍의 蒸溜水를 加해 15 Lbs에서

2時間씩 4回 處理 하였으며 Saponin-Na₂CO₃ 練에 있어서 生絲 無水物의 18% 相當의 Soap와 生絲 無水物의 3% 相當의 Na₂CO₃를 生絲 無水物의 30倍의 蒸溜水에 溶解한 溶液으로 98°C에서 2時間 處理하고 溫水와 常溫水로서 5週 洗淨한 後 0.2% Acetic Acid 溶液으로 洗滌한 後 다시 水洗하여 乾燥 시킨 것이며 NaOH 練은 生絲의 50倍의 0.1% NaOH로 30分間 煮熱精練한 것이다. 熱水法은 生絲 5g을 물 200ml를 加해 6時間 煮熱한 後 水洗 乳燥한 것이고 Pancreation 法은 生絲量의 1/2量의 Pancreation(Tokyo Pham 製品)을 pH 7.5 Phosphate Buffer에 溶解 生絲量의 50倍 溶液으로 40°C에서 24時間 作用시킨 後 다시 同量的 酵素液을 바꾸어 48時間 作用시키고 洗滌 乳燥한 것이며 Trypsin 精練은 Trypsin은 Wako. Co.製를 使用하였으며 處理方法은 Pancreation과 同一하였다.

S₄₋₁₋₁ 酵素精練은 II-(3)-A의 遠心分離 後의 上澄液으로 燥作은 [II]-5와 같이 處理 洗滌 乾燥한 것이다.

B) 他 精練과의 比較檢討

生絲의 除膠率은 高壓精練에서 除膠(Degumming)되는 Sericin 含量을 100%로 하여 各各의 %를 求하였으며 觸感和 色澤은 檢査에 依하여 絹 本然의 觸感(feeling)과 色澤(luster)이 좋은 것을 +로 하였으며 Fibroin의 損傷與否는 0.1% Acid Eosin으로 染色하여 Fibroin의 破壞 與否와 Lousinus 生成 與否等を 檢査⁽⁸²⁾하였다.

III. 結果及 考察

1) 有用菌의 分離 및 選別

A) 菌의 分離

II-1의 方法으로 Pupae extract medium와 Pupae medium에서는 繭層의 Sericin 分解에 依한 Degumming 效果가 큰 것 그리고 Sericin medium에서는 Sericin의 液化가 심한 것에서 分離한 結果 Pupae extract medium에서는 20株, Pupae medium에서는 10株 Sericin medium에서는 18株의 菌을 分離하였다.

B) 選 別

各 培地에서 分離한 菌 48株에 策하여 選別한 結果 一次 選別에서는 Cocoon의 Degumming이 強하고 絹에 나쁜 色澤을 나타내지 않는 melanin 色素 生成有無를 檢査한 結果 우수한 菌 S₄₋₁₋₁, S₆₋₁, Re 2, L₄₋₅, L₈에 對하여 練減率과 解舒利用을 爲한 Cocoon Reeling 狀態等を 調查한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Result of Second Screening Test

Strains	Scouring loss%	Tenacity	Cocoon Reeling	Microscopic Test		
				Lousinus	Gum	Surface
L-8	17.5%	++	###	##	-	+
S ₄₋₁₋₁	10.5	##	++	-	##	++
RE ₄₋₅	12.5	+	##	-	++	##
L ₈₋₃	13.5	++	##	##	-	+
S ₄₋₁₋₁	17.5	##	##	-	-	-

※ Surface +.....rough
 -.....smooth

위의 Table 1에서 보는바와 같이 菌株 L-8은 精練作用은 물론 고치의 解舒도 잘되나 Fibroin의 損傷이 심하였으며 菌 S₄₋₁₋₁은 生絲의 精練作用도 좋을뿐만 아니라 고치의 解舒狀態도 비교적 좋았으며 他 菌株에서 나타나는 Fibroin의 Gum質이나 表面이 粗惡한 現象도 나타나지 않았다. 上記 結果가 相當히 良好한 S₄₋₁₋₁, L₈₋₃, Re-2에 策하여 時間當 精練效果를 調査하여본 結果는 Fig. 1과 같으며 單位時間에 많은 精練效果를 가져오는 S₄₋₁₋₁ 菌株을 最終 選別 하였다.

2) 選別菌 S₄₋₁₋₁의 Sericinase의 性質

選別된 菌 S₄₋₁₋₁의 最適作用 條件을 알기 爲하여 Sericin과 가장 유사한 基質인 Gelatin⁽⁸³⁾으로 最適 pH를 檢討하여본 結果는 Fig. 2와 같다.

위 圖에서 보면 最適作用 pH는 7.5附近인 Alkali性 쪽에 位置함을 알수있다. 그리고 最適作用 溫度는 各溫度에서 20分間 作用시킨 結果 Fig. 3에서 보는 바와 같이 45~55°C附近이 었다.

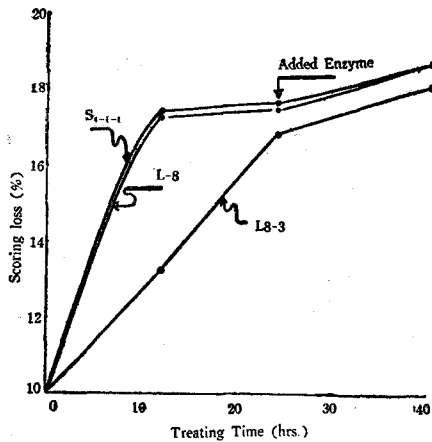


Fig. 1. Scouring loss applying of various bacterial sericinase

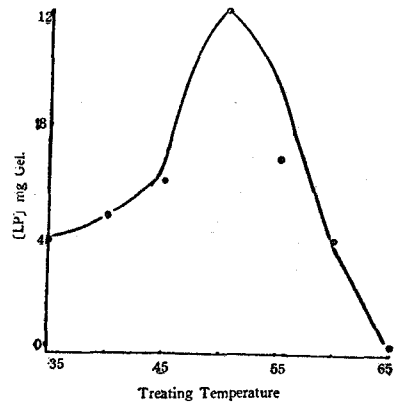


Fig. 3. Optimum temperature

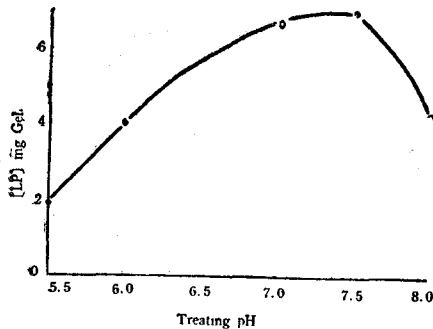


Fig. 2. Optimum pH.

本 Sericinase의 熱에 對한 安定性은 pH 7.5에서 各 一時間씩 前處理하여 調査한 結果 Fig. 4에서 보는바와 같이 40°C까지는 거의 90%가 殘存하나 40°C를 超過 할때는 急格히 失活하므로 實地 生絲 精練에 利用 時는 40°C程度에서 處理 함이 가장 좋으리라 생각된다.

本 酵素의 安定 pH는 Mellvaine's Buffer와 酵素液을 同量 取하여 30°C에서 3時間 處理한 後 NaOH로 pH를 7.5로 調節하여 作用시킨 結果는 Fig 5와 같이 最適 安定 pH는 8.0附近 인것을 알 수있다.

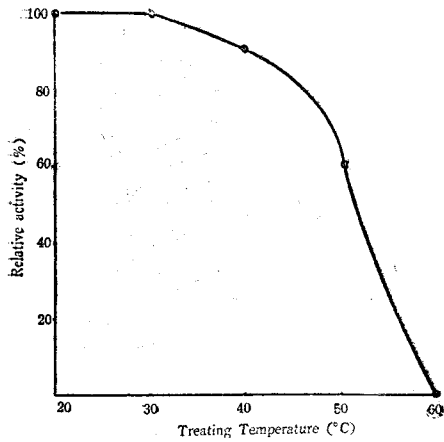


Fig. 4. Thermal stability

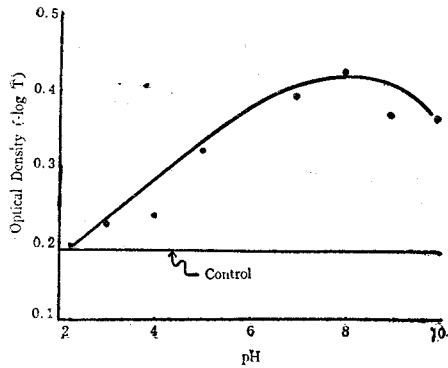


Fig. 5. pH stability

本 酵素의 作蠶 精練 等を 고려하여 Ca^{++} 이온에 對한 影響을 檢討해본 結果 Ca^{++} 와 酵素를 같이 Free Incubation 시켰을 때는 Fig. 6에서와 같이 Ca^{++} 가 이 酵素의 失活의 原因이 됨을 알 수 있으며 酵

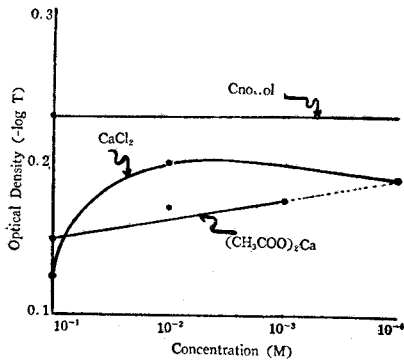


Fig. 6. Effects of Ca ion on the free incubation of Sericinase

素가 基質과 作用 할때의 Ca^{++} 의 影響은 Fig. 7에서와 같이 低 濃度에서는 酵素의 作用을 促進하며 Ca -oxalate 일 경우 溶解度가 적으므로 濃度에 關係 없이 酵素作用을 促進함을 알 수 있었다.

이로서 作蠶에 많이 含有되어 있는 Ca -Oxalate는 本 Sericinase 作用을 오히려 促進함을 알 수 있었다.

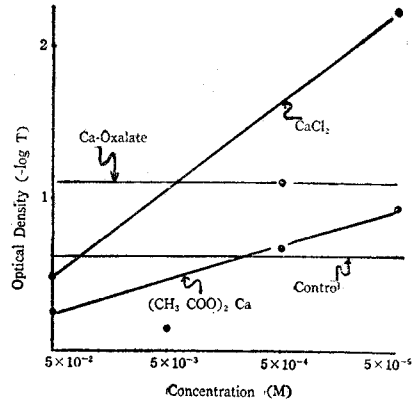


Fig. 7. Effects of Ca ion on the sample sericinase reaction

3) 選別 菌 酵素의 Fibroin 에 對한 影響

II-4의 方法으로 完全 除膠한 絹에 對하여 酵素作用을 2回 反復 시켜도 酵素 處理 前後의 重量 差등이 없었고 Lousinus 등도 生하지 않았다.

4) S_4-1-1 菌株 酵素에 依한 生絲의 精練 效果

本 酵素에 依한 生絲에 對한 練減 效果를 여러 時間에 對하여 調查한 結果는 Fig 8과 같이 Sericin A層에는 아주 強力하게 作用하고 Sericin B,C層에 對해서도 잘 作用 함을 알 수 있다. 이러한 現象은 S. Glanzman⁽³⁴⁾에 依한 研究와 一致하며 土屋⁽²⁴⁾ 등의 結果와도 一致한다.

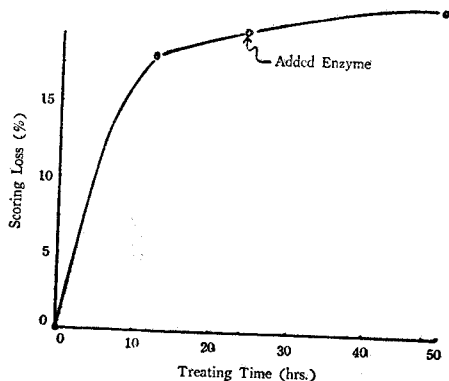


Fig. 8. Scouring loss on the treating time

5) S₄₋₁₋₁ 菌株 Sericinase 와 他 精練法과의 比較
 II-5 에 서와 같이 精練한 結果를 他各精練法의 結果와 比較해 보면 高壓熱處理 時는 Sericin 은 完全히 除去 할 수 있으나 Fibroin Modification⁽³¹⁾ 에 의한 色澤 及 觸感이 좋지 못 하였으나 NaOH 練도⁽²⁶⁾ 色澤과 觸感은 좋으나 Fibroin 의 損傷이 顯著하여 Fibroin 을 非選擇的으로 損傷하므로 그 結果가 理想的이라 할 수 없으며 Saponin-Na₂CO₃ 法은 練減率도 色澤도 좋았으나 殘在하는 Alkal 性⁽²⁶⁾

物質은 絹纖維에 나쁜 影響을 미치며 또 價格이 비싼 缺點等이 있다. 또 100°C에서 6時間 熱處理 亦是 좋은 結果를 얻지 못 하였으나 그中 Pancreatin 에 의한 方法은 精練作用도 좋고 觸感및 色澤도 좋으며 Fibroin 의 損傷도 없을 것으로 생각되나 高價이므로 使用 할 수 없으며 本酵素를 使用하여 精練한 結果는 Fibroin 의 損傷도 나타나지 않고 觸感과 色澤도 좋았으며 Trypsin 에 비해 높은 練減率을 나타내었다. 이 結果를 綜合하면 Table 2 와 같다.

Table 2. Effect of the Scouring of Rawsilk with S4-1-1's Sericinase treatment and other Method.

Treating Method	Scouring Loss of Sericin in Raw Silk	Touching*	Color	Fibroin	
				Attack	Modification
Boiling in Autoclave (120°C 2hrs) × 4	100.0%	+	++	+	###
Saponin-Na ₂ CO ₃	90.1	++	++	+	-
NaOH	97.2	###	###	###	-
Boiling (100°C, 6hrs.)	93.6	+	+	+	++
Trypsin	91.2	###	###	-	-
Pancreatin	94.7	###	###	-	-
Sample Enzyme	93.7	###	++	-	-

※ + mean favorite Touching

要 約

細菌性 Sericinase 를 生絲의 精練과 고치 解舒에 利用하고자 有用菌을 分離 選別하였으며 이 菌이 生成하는 Sericinase 의 여러 酵素學的 性質을 調査하여 生絲精練에 適用한 結果를 他精練法과 比較 檢討하였다.

1. 生絲精練作用과 菌除膠作用이 强하며 絹 Fibroin 에 對해서는 全然 作用하지 아니하는 Sericinase 를 生成하는 細菌 一株를 分離 選別하였다.

2. 本 菌株에 의해 生成된 Sericinase 의 最適作用 pH는 7.5 에 位置하였으며 最適作用 溫度는 50°C 였다. 이 溫度에서는 絹纖維의 modification 等은 일어나지 않을 것으로 믿어지며

3. 本 酵素는 free incubation 에 있어서는 Ca⁺ 이 酵素失活을 促進하며 基質에 使用할 때는 Ca-oxalate 일 境遇 酵素作用을 促進하므로 柞蠶等의 解舒에 有用한 것으로 믿어지며

4. 本 酵素는 絹絲 中の Sericin 을 거의 完全하게 分解하는 것으로 믿어지며

5. 本 酵素를 使用하여 精練한 絹을 調査한 바그 生絲表面의 狀態, Fibroin 의 損傷, 觸感, 精練效果 등이 他 精練法 即 石鹼法, Alkali 法, Alkali 石鹼法보다 優秀하였으며, 高級精練法에만 利用하는

papain 이나 pancreatin 과 같은 效果를 얻을 수 있으리라 期待된다.

參 考 文 獻

1. 中川房吉; 日本蠶絲學雜誌. 23. 3. 212(1954).
2. 河倉義安; 蠶絲試驗場彙報. 49 號 (1936).
3. 木暮楨太; 生絲의 品質と 織物. 54. (1958).
4. 細川豐; 製絲. 188 (1940).
5. 中川房吉; 製絲 188 (1940).
6. 中川房吉; 生絲의 國. 9 卷 6 號(1936).
7. 萩原清治; 生絲. 24(1953).
8. 堀久三郎; 蠶絲科學 No. 9. 25 (1948).
9. 中川房吉; 蠶絲科學 9. 25. (1948).
10. 中川房吉; 東蠶研究報告 1.2 165~168 (1936).
11. 一井由藏, 忍足義足; 蠶絲 科學研究所彙報 2.2. 47 (1948)
12. 加藤康雄; 日蠶絲學雜誌 23.6. 394~398 (1954).
13. 角替利策; 絹絲時報, 2. (1921).
14. Hugh. H. Mosher; Chemical Abstrbst. 1447. 9. (1932).
15. 三谷賢三郎; 蠶絲科學研究所彙報 (1942).
16. 片桐英郎, 中濱敏雄; 1937 日農化 13, 1002.

17. 片桐英郎, 中濱敏雄; 1937 日農化 13. 1007
18. " ; 1937 日農化 13. 1017
19. " ; 1938 " 14. 1017
20. " ; 1939 " 15. 1042
21. " ; 1941 " 17. 165
22. 後藤泰一; 纖維工學雜誌. 5.4 (1931).
23. 美馬 大工原建; (1923) 製絲絹集錄 13.
24. 土屋幾雄; 日本蠶絲學雜誌. 36. (21).120—124 (1967).
25. 角替利策; 絹絲試驗場報告. 第六卷, 第一號 19 32.
26. 中西正喜; 纖維學會誌. 8. 612~617 (1952).
27. Advance in Protein Chem. Vol. XIII. 178 (1958). Academic Press
28. 赤堀四郎; 酵素研究法. 2卷 253 (1960)
29. " ; 2卷 242 (1930)
30. 京都大學; 日本農藝化學實驗書三卷(1967)
31. Advance in Protein. Chem. Vol. XIII 127 Academic Press; (1958)
32. 大塚重藏; 蠶絲層物と其精練法 189.
33. 副島正美; 日農化 35卷 13號 (1961).
34. S. Glanzman; Helv. Chem. Acta. 30. 155. (1951).