

蠶絲絲膠蛋白之純化與應用及其奈米乳化之製備

毛文霖、施英隆

E-mail: 342134@mail.dyu.edu.tw

摘要

蠶絲絲膠蛋白是一種水溶性的高分子蛋白，在蠶絲絲膠蛋白的回收或製備過程中，因回收或製備方法不同，可以獲得各種不同分子量的蠶絲絲膠蛋白。雖然有文獻指出蠶絲絲膠蛋白具有抑制自由基、抗氧化功能，能抵禦日光中的紫外線對皮膚的侵蝕、且具有抑制酪氨酸酶活性的作用進而達到抑制皮膚黑色素的生成，因此可預防皮膚變黑及衰老等，但尚未有明確之研究數據。因此本研究由蠶繭萃取、製備及純化蠶絲絲膠蛋白，並探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白抑制自由基、黑色素之功能及奈米奈米乳化之製備。在抗氧化方面，本研究探討以不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對清除 DPPH 自由基、清除 ABTS 陽離子自由基、還原力、亞鐵離子螯合能力及抗亞麻油酸過氧化力，同時亦探討不同濃度、不同 pH 值及不同溫度對抑制酪氨酸酶能力之影響。結果顯示，經由超過濃縮可獲得不同分子量之蠶絲絲膠蛋白，其對清除 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 自由基、清除 ABTS (Agreement of Basic Telecommunications Services) 陽離子自由基、還原力、亞鐵離子螯合能力、抗亞麻油酸過氧化力、抑制酪氨酸酶能力普遍具有效果，其中以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白效果最佳，在 100 mg/mL 下 DPPH 自由基清除能力達 95.37%、在 100 mg/mL 下清除 ABTS 陽離子自由基達 94.01%、在 50 mg/mL 下還原力達 1.2079、在 50 mg/mL 下亞鐵離子螯合能力達 96.57%、在 50 mg/mL 下抗亞麻油酸過氧化力達 96.34%、在 100 mg/mL、(pH 7、4) 時，抑制酪氨酸酶能力達 94.72%。在奈米乳化方面，本研究探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度、不同 pH 值對奈米乳化粒徑、奈米乳化活性、奈米乳化安定性之影響，同時高壓均質處理次數對粒徑的影響亦加以探討。結果顯示不同分子量蠶絲絲膠蛋白與荷荷巴油形成奈米乳液、奈米乳化活性及奈米乳化安定性之效果佳。不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度下，以 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白之奈米乳液粒徑最小，在 50 mg/mL 奈米乳液之粒徑為 83.7 nm、奈米乳化活性能力為 99.4%；不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值下，以 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白之奈米乳液粒徑最小，在 pH 5.5 奈米乳液之粒徑為 80.4 nm，在 pH 7.5 奈米乳化活性能力為 99.8%。5 kDa 蠶絲絲膠蛋白在 50 mg/mL、pH 5.5 與荷荷巴油所形成奈米乳液之粒徑會隨高壓均質處理次數而改變，經 3 次處理可得為最小粒徑約 28.1 nm。本研究顯示蠶絲絲膠蛋白具有高抗氧化性及抑制酪氨酸酶之活性，同時可與荷荷巴油形成奈米乳液，應能易於皮膚吸收，因此極有潛力將蠶絲絲膠蛋白活性成分製作高活性美白及易吸收之化妝品，極具經濟價值。

關鍵詞：蠶絲絲膠蛋白、抗氧化性、抑制酪氨酸酶、奈米乳化

目錄

頁次	封面	內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	iv	Abstract	vi	誌謝	viii	目錄	ix	圖目錄	xiv	表目錄	xvi	第一章	前言	1	第二章	文獻回顧	3	2.1	自由基、抗氧化劑、黑色素形成對生物體之影響	3	2.1.1	黑色素的形成	3	2.1.2	老化的自由基學說	4	2.1.3	自由基的定義	5	2.1.4	自由基的產生	5	2.1.5	自由基的種類	6	2.1.6	自由基對於人體的傷害	7	2.1.7	抗氧化物的作用	8	2.1.8	抗氧化劑的種類	9	2.2	絲膠蛋白的結構及性質	11	2.2.1	絲膠蛋白的組成結構	11	2.2.2	絲膠蛋白的性質	14	2.2.2.1	絲膠蛋白的兩性性質	13	2.2.2.2	絲膠蛋白的膠體性質	16	2.2.2.3	絲膠蛋白的變性性質	16	2.2.2.4	絲膠蛋白的膨潤和溶解	16	2.3	絲膠蛋白的應用研究	18	2.3.1	絲膠蛋白於纖維與紡織的研究	18	2.3.2	絲膠蛋白於食品添加劑的研究	18	2.3.3	絲膠蛋白於醫藥功能的研究	19	2.3.4	絲膠蛋白於生物材料的研究	23	2.3.5	絲膠蛋白於化妝品添加劑的研究	23	2.4	抗氧化活性測定法	25	2.4.1	清除 DPPH 自由基能力測定	25	2.4.2	清除 ABTS 陽離子自由基能力測定	25	2.4.3	還原力測定	26	2.4.4	亞鐵離子螯合能力測定	27	2.4.5	抗油脂過氧化力測定-硫氰酸鐵法	27	2.4.6	抑制酪氨酸酶活性分析	28	2.5	乳化性質分析	30	2.5.1	乳化作用	30	2.5.2	影響乳化安定性的因素	31	2.5.3	奈米乳液	32	2.5.4	奈米乳液的類型	33	2.5.5	奈米乳液的製備	33	2.5.6	奈米乳液的應用優勢	34	第三章	材料與方法	36	3.1	實驗材料及儀器設備	36	3.1.1	實驗藥品	36	3.1.2	實驗儀器	38	3.2	實驗方法	40	3.2.1	蠶繭的前處理	40	3.2.2	蠶繭的脫膠處理	40	3.2.3	超過濃縮裝置系統	40	3.3	實驗分析方法	42	3.3.1	蛋白質電泳分析	42	3.3.1.1	試劑	42	3.3.1.2	膠片配製	42	3.3.1.3	電泳分析步驟	44	3.4	抗自由基之測定	45	3.4.1	清除 DPPH 自由基能力測定	45	3.4.2	清除 ABTS 陽離子自由基能力測定	46	3.4.3	還原力測定	47	3.4.4	亞鐵離子螯合能力測定	48	3.4.5	抗油脂過氧化力測定	49	3.4.6	抑制酪氨酸酶活性分析	50	3.4.6.1	試劑的配置	50	3.4.6.2	不同分子量絲膠蛋白在不同濃度對酪氨酸酶抑制之影響	50	3.4.6.3	不同分子量蠶絲絲膠蛋白(50mg/mL)在不同 pH 值對酪氨酸酶抑制之影響	52	3.4.6.4	不同分子量蠶絲絲膠蛋白(50mg/mL)在不同溫度對酪氨酸酶抑制之影響	53	3.5	奈米乳化學性質分析	54	3.5.1	不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度之奈米乳液性質分析	54	3.5.1.1	奈米乳液的製備及粒徑檢測	54	3.5.1.2	奈米乳化的測定	54	3.5.1.3	奈米乳化的安定性的測定	55	3.5.2	不同分子量蠶絲絲膠蛋白(50 mg/mL)在不同 pH 值之奈米乳液性質分析	56	3.5.2.1	奈米乳液的製備及粒徑檢測	56	3.5.2.2	奈米乳化的測定	56	3.5.2.3	奈米乳化的安定性之測定	57	3.5.3	高壓均質處理次數對奈米乳液粒徑之影響	58	第四章	結果與討論	59	4.1	蠶絲絲膠蛋白之純化及電泳分析	59	4.2	蠶絲	
----	----	----	-----	-----	-----	------	----	----------	----	----	------	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	----	---	-----	------	---	-----	-----------------------	---	-------	--------	---	-------	----------	---	-------	--------	---	-------	--------	---	-------	--------	---	-------	------------	---	-------	---------	---	-------	---------	---	-----	------------	----	-------	-----------	----	-------	---------	----	---------	-----------	----	---------	-----------	----	---------	-----------	----	---------	------------	----	-----	-----------	----	-------	---------------	----	-------	---------------	----	-------	--------------	----	-------	--------------	----	-------	----------------	----	-----	----------	----	-------	-----------------	----	-------	--------------------	----	-------	-------	----	-------	------------	----	-------	-----------------	----	-------	------------	----	-----	--------	----	-------	------	----	-------	------------	----	-------	------	----	-------	---------	----	-------	---------	----	-------	-----------	----	-----	-------	----	-----	-----------	----	-------	------	----	-------	------	----	-----	------	----	-------	--------	----	-------	---------	----	-------	----------	----	-----	--------	----	-------	---------	----	---------	----	----	---------	------	----	---------	--------	----	-----	---------	----	-------	-----------------	----	-------	--------------------	----	-------	-------	----	-------	------------	----	-------	-----------	----	-------	------------	----	---------	-------	----	---------	--------------------------	----	---------	----------------------------------------	----	---------	-------------------------------------	----	-----	-----------	----	-------	---------------------------	----	---------	--------------	----	---------	---------	----	---------	-------------	----	-------	----------------------------------------	----	---------	--------------	----	---------	---------	----	---------	-------------	----	-------	--------------------	----	-----	-------	----	-----	----------------	----	-----	----	--

絲膠蛋白抗自由基之能力測定 62 4.2.1 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對清除 DPPH 自由基能力之影響 62 4.2.2 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對清除 ABTS 陽離子自由基能力之影響 64 4.2.3 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度之還原能力測定 66 4.2.4 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對亞鐵離子螯合能力之影響 68 4.2.5 不同分子量蠶絲絲膠蛋白抗油脂過氧化力之測定 70 4.2.6 抑制酪胺酸?活性分析 72 4.2.6.1 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對抑制酪胺酸?之效率 72 4.2.6.2 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值對抑制酪胺酸?之效率 75 4.2.6.3 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同溫度對抑制酪胺酸?之效率 77 4.3 奈米乳化性質分析 81 4.3.1 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度之奈米乳化性質分析 81 4.3.2 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值之奈米乳化性質分析 87 4.3.3 高壓均質處理次數對奈米乳液液粒徑之影響 92 第五章 結論 94 參考文獻 96 圖目錄 圖 1-1 研究架構圖 2 圖 2-1 黑色素合成機制圖 27 圖 4-1 濃縮冷凍乾燥後的蠶絲絲膠蛋白粉末 58 圖 4-2 濃縮凍乾後不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮液之電泳圖 58 圖 4-3 濃縮凍乾後不同分子量蠶絲絲膠蛋白濾液之電泳圖 59 圖 4-4 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對清除 DPPH 自由基能力比較 61 圖 4-5 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對清除 ABTS 陽離子自由基能力比較 63 圖 4-6 不同分子量蠶絲絲膠蛋白及 BHA 在不同濃度之還原力比較 65 圖 4-7 不同分子量蠶絲絲膠蛋白及 EDTA 在不同濃度對亞鐵離子螯合能力的比較 67 圖 4-8 不同分子量蠶絲絲膠蛋白(50mg/mL)及 BHT 之抗油脂過氧化力之比較 69 圖 4-9 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白濃縮液、維生素 C 及 麩酸在不同濃度對抑制酪胺酸?之比較 72 圖 4-10 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對抑制酪胺酸?之比較 72 圖 4-11 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值對抑制酪胺酸?之比較 74 圖 4-12 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 4 對抑制酪胺酸?之比較 76 圖 4-13 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 25 對抑制酪胺酸?之比較 76 圖 4-14 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 28 對抑制酪胺酸?之比較 77 圖 4-15 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 31 對抑制酪胺酸?之比較 77 圖 4-16 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 34 對抑制酪胺酸?之比較 78 圖 4-17 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 37 對抑制酪胺酸?之比較 78 圖 4-18 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對奈米乳化活性 (EA) 的比較 82 圖 4-19 不同分子量蠶絲絲膠蛋白(50mg/mL)在不同 pH 值對奈米乳化活性 (EA) 之比較 87 圖 4-20 奈米乳液液粒徑圖 91 表目錄 表 2-1 水溶性絲膠蛋白的氨基酸組成 13 表 2-2 氨基酸的極性和親水性 15 表 2-3 氨基酸對人體作用的功能表 20 表 3-1 分離膠體溶液 41 表 3-2 焦集膠體溶液 42 表 4-1 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度奈米乳液液粒徑之比較 83 表 4-2 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度奈米乳化活性之比較 84 表 4-3 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值奈米乳液液粒徑之比較 88 表 4-4 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同 pH 值奈米乳化安定性之比較 89 表 4-5 高壓均質處理次數對奈米乳液液粒徑之影響 91

參考文獻

- 1.白亞之, 2008, 微乳液的製備及其在化妝品中的應用, 日用化學品科學 31(4): 26-29.
- 2.彭曉虹, 2005, 蠶絲氨基酸的組成與功能, 蠶桑茶?通訊, 第三期p.12-14.
- 3.田?峰、段?峰、尉艘, 絲綢工業廢水中絲膠蛋白質的回收技術, 絲綢學報, 第七期p.23-25.
- 4.李林甫譯, 1995, 分子鏈中有絲膠的生物可降解性聚氨酯的熱性能和機械性能, 絲綢學報, 第四十二期p.26-30.
- 5.李慶春, 2007, 蠶絲絲膠蛋白的回收及開發應用, 紡織科技進展, 第二期p.5-10.
- 6.呂慧鈴, 2007, 加味四物湯之製備及其抗氧化性之研究, 大葉大學生物產業科技所碩士論文, 彰化縣.
- 7.林玟仙, 2005, DoPa 之生物活性探討, 嘉南藥理科技大學生物科技所碩士論文, 台南縣.
- 8.林姿宏, 2002, 番瓜果實暨製品番茄紅素的生物活性之探討:1) 清除自由基作用 2) 抗氧化變異作用, 台北醫學大學醫學研究所碩士論文.
- 9.林天送, 2002, 你的生命活力-從自由基談起, 健康文化事業股份有限公司.
- 10.劉仲榮, 2000, 皮膚光老化的診斷, 國外醫學皮膚性病學分?, 26(3):138-141.
- 11.盧意淇, 2009, 以反應曲面法探討射流對撞式高壓均質法製備光甘草定奈米乳液之最適化條件, 大葉大學生物產業科技所碩士論文, 彰化縣.
- 12.羅珮文, 2001, 台灣數種特水果抗氧化活性及清除自由基能力之評估, 輔仁大學食品營養學所碩士論文.
- 13.洪千惠, 2004, 食用菇酪胺酸?抑制活性與其抗氧化性質之探討, 國立嘉義大學食品科學研究所碩士論文. 嘉義市.
- 14.?雪丹, 2001, 國?外關於抗衰老研究的進展, 海南醫學, 12 (12) :68-69.
- 15.黃英旭, 2005, 不同 HLB 值乳化劑對草本精油乳液之安定性與抗菌性的影響, 國立嘉義大學食品科學所碩士論文, 嘉義市.
- 16.黃文香, 2004, 美白聖經, 正中書局股份有限公司.
- 17.紀佩珍, 1994, 絲膠改性聚酯和聚醯氨纖維吸放濕的研究, 絲綢工學院學報, 11(2):23-26.
- 18.姜淑繡, 2001, 省產蘿蔔之抗氧化性研究, 大葉大學生物產業科技所碩士論文, 彰化縣.
- 19.姜宇宙、王英蓬、張丹丹, 2007, 易容膏外用對黑色素影?的實驗研究, 黑龍江中醫藥大學, 13 (9) 679-680.
- 20.小松計一著、周晦若譯, 絲膠溶解特性和結構特性的研究, 四川省綿陽地區紡織工程學會.
- 21.小川篤子等, 1999, 皮膚外用劑, 公開特許公報, 11~193210.
- 22.相入麗、張雨青、閻海波, 2008, 蠶絲絲膠蛋白的抗氧化作用, 絲綢學報, 第五期P.23-27.
- 23.周麗霞、張雨青、周珍禎、王元?, 2010, 蠶絲絲膠蛋白的純化及其體外活性, 絲綢學報, 第五期p.18-22.
- 24.周大鑫, 2005, 高壓均質技術應用簡介, 機械工業雜誌 267(1): 69-78.
- 25.張雨青, 2002, 絲膠在功能性合成材料和紡織品中的應用, 紡織學報, 第三期p.79-81.
- 26.張雨青, 2002, 絲膠蛋白的護膚、美容、營養與保健功能, 紡織學報, 第二期p.70-72.
- 27.張雨青, 2003, 絲膠蛋白的藥理作用及其醫用材料上的應用, 紡織學報, (3):98-100.
- 28.張惠淇, 2001, 中藥美白化妝品其安全與療效之評估, 中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文.
- 29.張為憲、李敏雄、呂政義、張永和、陳昭雄、孫璐西、陳怡宏、張基郁、顏國欽、林志城、李慶文, 1995, 食品化學, 華香園出版社.
- 30.朱良均、姚菊明、李幼祿, 1997, 蠶絲蛋白的氨基酸?成及其對人體的生理功能, 中國蠶業學報, 第69卷第一期p.42-44.
- 31.出村誠、竹之下仁子、朝?哲郎等, 1995, 酵素固定化不織布, 日蠶染學報, 第64卷第五期p.66-72.
- 32.陳準、朱良均、閔思佳、胡國梁, 2002, 蠶絲絲膠蛋白的利用研究, 東準大學學報自然科學版, 第28卷第三期p.132-134.
- 33.陳準、朱良均、閔思佳、胡國梁, 2001, 蠶絲絲膠蛋白的結構、性能及利用, 功能高分子學報, 第14卷第三期p.344-348.
- 34.陳怡蓓, 2005, 無患子種皮酪胺酸?抑制與抗氧化活性之探討, 國立嘉義大學生物科技研究所碩士論文, 嘉義市.
- 35.陳崇賢, 1996, 乳液概論, 界面科學會

誌 19(1): 1-11. 36.盛家鏞、林?、王磊等, 2000, 易溶性絲膠粉的微?結構及理化性能研究, 絲綢學報, 第六期p.6-9. 37.安田直之等, 1998, 皮膚炎症防止劑, 公開特許公報, 10~245345. 38.晏文潔、李家璞、杜平, 2000, 類黃酮抗氧化力與其結構之關係, 台灣農業化學與食品科學, 38 (1) :80-88. 39.姚穆主?, 1990, 紡織材料學, 中???出版社, 北京. 40.楊湘山、趙淑準、呂焱等, 2005, 香煙煙?中SO₂、NO和甲醛濃度的?定及評價, 安全與環境學報, 第三期p.45-46. 41.楊美桂, 2008, 絲膠蛋白棉纖維的製備及其性能研究, 蘇州大學紡織工程研究所. 42.楊光明、潘福奎、石寶?等, 絲膠回收方法, 山東紡織科技, 第二期p.48-50. 43.岩元淳、野口隆志、寺本彰等, 混合皮膜的物理的性?及酵素固定化性能, 日蠶染學報, 第64卷第五期p.427-434. 44. Abe K. Composition for External Use. EP Patent. 0965321A1. 45. Annamaria S., Maria K., Tullia M. 1998. The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. p.203-211. 46. Arnao M., Cano A., Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*. 73:239-244. 47. Becher P. 1966. *Emulsions: Theory and practice*. 2th ed. Reinhold, New York. 48. Bouchemal K., Briancon S., Perrier E. and Fessi H. 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics* 280: 241-251. 49. Butterworths. 1972. *International Thermodynamic Tables of the Fluid State*, Blackwells Scientific, London. 50. Cavalieri E., Rogan E. 1995. Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Xenobiotica*. 25(7): 677-688. 51. Cefarelli G., Ambrosca B., Fiorentino A., Izzo A., Mastellone C., Pacifico S., Piscopo V. 2006. Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened cv. annurca apple fruits. *J. Agric. Food Chem.* 54: 803-809. 52. Chen, J., Wei C., Rolle, R., Otwell, W., Balaban, M., Marshall, M. 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1396-1410. 53. Dickinson E., Murray B. and Stainsby G.. 1989. A Rapid Routine Method for Monitoring Creaming Behaviour in Small Samples of Food Emulsions. *Lebensm. Wiss. Technol* 22: 25-28. 54. Dominique B., eith S. 2008. A vitro approach to as-sess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: Nicotine, cadmim, formaldehyde and ttrethaille . *Toxlcology* , 244:66-76. 55. El-Domyati M., ttia S., aleh F . 2002. Intrinsic aging vs . photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin . *Exper Dermatol*: 11:398-405. 56. Engels T., Forster T. and Von Rybinski W. 1995. The influence of coemulsifier type on the stability of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 99: 141-149. 57. Fernandez P., Andre V., Rieger J. and Kuhnle, A. 2004. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 251: 53-58. 58. Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammourey N. and Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics* 55: 25-28. 59. Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative disease: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 40 (8):959-975. 60. Glickman R. 2002. Phototoxicity to the retina: mechanisms of damage. *Int J Toxicol*. 21(6):473-490. 61. Gutierrez J., Gonzalez C., Maestro A., Sole C. and Nolla J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13: 245-251. 62. Hearing, V., Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5: 2902-2909. 63. Jenkins R. 1988. Free radical chemistry: relationship to exercise sports medicine. 21:156-170. 64. Kadioglu E., Sardas S., Aslan S., Isik E., Esat Karakaya A. 2004. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*. 9 (2):203-209. 65. Kahn, V., Ben-Shalom., Zakin, V. 1995. Effect of kojic acid on the oxidation of N-acetyldopamine by mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4460-4465. 66. Karbstein H. and Schubert H. 1995. Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions. *Chemical Engineering and Processing* 34: 205-211. 67. Kato N., Kayashita J., Sasaki M. 2000. Physiological functions of buckwheat protein and sericin as resistant proteins . *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science.* (2):71-75. 68. Matsuura R., Ukeda H., Sawamura M. 2006. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2309-2313. 69. Meir S., kanner J., Akiri B. and Philosoph-Hadas S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various sencescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43(7): 1813-1819. 70. Minora N., Aiba S., Gotoh Y. 1995. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices . *Journal of Biomedical Materials Research* . (10):1215-1221. 71. Mitoma J., Furuya S., Hirabayashi Y . 1998. A noval metabolic communication between neurons and astrocytes ; non-essential amino acid L-serine released from astmcytes is essential for de-veloping hippoeampal neurons . *Neurosci Res.* (2):195-199. 72. Mitoma J., Kasama T., Furuya S. 1998. Occurrence of an un-usual phospholipid , phosphatidyl-L-threonine , in cultured hip-pocampal neurons. *J Biol Chem.* (31):19363-19366. 73. Norinisa K., Seiji S., Atsushi Y. 1998. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tryosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(1):145-147. 74. Osman A., Wong K., Fernyhough A. 2006. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. " *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 , 21-329. 75. Oyaizu M. 1986. Antioxidative activities of beowning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35:1426-1429. 76. Pitotti A., Elizalde B. and Anese M. 1995. Effect of caramelization and maillard reaction products on peroxidase activity. *J. Food Biochem.* 18(6): 445-457. 77. Poyer J., McCay P., Lai E., Janzen E., Davis E. 1980. Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 94 (4): 1154-1160. 78. Sachio M., Masaaki S. 1978. Properties IB-glucosidase immobilized in sericin membrane . *Journal of Ferment Technology.* (4) :303-308. 79. Sandy M., Moldeus P., Ross D., Smith M. 1986. Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity. Studies with a compromised isolated hepatocyte model system. *Biochem Pharmacol.* 35 (18): 3095-3101. 80. Santos-Magalhaes N., Pontes A., Pereira V. and Caetano M. 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 208: 71-80. 81. Sasaki M., Kato N., Watanabe H. 2000. Inhibitory Effect of Silk Protein , Sericin on Swelling and Ulcerating of Mouse Large Intestine. *Oncology Rep.*, (7):1049-1053. 82. Sasaki M., Kato N., Watanabe H. 2000. Silk

Protein, Sericin Suppresses Colon Carcinogenesis Induced by 1,2-dimethylhydrazine in Mice. *Oncol Rep* (5):1049-1052. 83.Sasaki M., Yamada H., Kato N. 2000. Consumption of Silk Protein, Sericin Elevates Intestinal Absorption of Zinc, Iron, Magnesium and Calcium in rats. *Nutrition Research*.(10):1505-1511. 84.Schulman J. 1943. The Theory of Emulsions and their Technical Treatment. By William Clayton. *The Journal of Physical Chemistry* 47: 294-295. 85.Seo S., Sharma V., Sharma N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. 51: 2837-2853. 86.Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthane on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 40: 945. 87.Simic M. 1988. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202 (2): 377-386. 88.Simsek M., Naziroglu M., Erdinc A. 2005. Moderate Exercise with a Dietary Vitamin C and E Combination Protects Against Streptozotocin-Induced Oxidative Damage to the Kidney and Lens in Pregnant Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 113 (1):53-59. 89.Soares D., Andreazza A., Salvador M. 2003. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem.* 51 (4):1077-1080. 90.Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N. and Garcia-Celma M. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10: 102-110. 91.Sonneville-Aubrun O., Simonnet J. and L'Alloret F. 2004. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109: 145-149. 92.Stang, M., Schuchmann, H. and Schubert, H. 2001. Emulsification in High-Pressure Homogenizers. *Engineering in Life Sciences* 1: 151-157. 93.Tadros T., Izquierdo P., Esquena J. and Solans C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109: 303-318. 94.Tan C. P. and Nakajima M. 2005. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry* 92: 661-671. 95.Taylor A., Shang F., Obin M. 1997. Relationships between stress, protein damage, nutrition, and age-related eye diseases. *Mol Aspects Med.*18 (5):305-414. 96.Taylor P. 1995. Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 99: 175-185. 97.Thamas J. 1995. The role of free radicals and antioxidants : How do we know that are working. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 21-39. 98.Van Overveld F., Haenen G., Rhemrev J., Vermeiden J., Bast A. 2000. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact.* 127 (2):151-161. 99.Walstra P. 1996. Emulsion stability, *Encyclopedia of Emulsion Technology* 4: 1-66. 100.Wu H., Ramachandran C., Weiner N. and Roessler B. 2001. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 220: 63-75. 101.Wu, L., Chen, Y., Ho J.; Yang, C. 2003. Inhibitory effect of red koji extracts on mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4240-4246. 102.Yamada H., Fuwa N., Nomura M. 1998. Use of Sericin as Antioxidants and Tyrosinase Inhibitors. EP Patent.0841065A2. 103.Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T. and Terao J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.*62:1201-1204. 104.Yasuda N., Yamada H., Nomura M. 1998. Agent for preventing dermatitis. Japan Patent.10-245345. 105.Yuan Y., Gao Y., Mao L. and Zhao J. 2008. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry* 107: 1300-1306.