

利用反應曲面法及藥物釋放動力學分析γ-聚麩胺酸微膠囊化薑黃素之包覆效果 = Studies on the microencapsulaton of curcumin ...

張兆凱、柯文慶；謝昌衛

E-mail: 9806849@mail.dyu.edu.tw

摘要

γ-聚麩胺酸 (γ-polyglutamic acid; γ-PGA) 乃 D-glutamic acid 及 L-glutamic acid 以胜?鍵鏈結聚合而成之生物性高分子聚合物，具有水溶性、可食性及生物可分解等特性，其降解產物對人體無害。此外 γ-聚麩胺酸亦具有乳化劑的特性，因此相當適合作為包覆壁材應用於微膠囊化技術中。

本研究首先利用反應曲面法探討 γ-聚麩胺酸包覆醇溶性薑黃素 (curcumin; 核蕊物質) 的能力；其次將高分子材料包括海藻酸鈉 (alginate)、聚離胺酸 (poly-L-lysine; PLL) 及轉麩胺酸醯胺基? (microbial transglutaminase; MTGase) 添加於 γ-PGA 中，探討此四混合系統之藥物釋放模式與穩定性，期能賦予 γ-PGA 於微膠囊化技術中作為包覆壁材的價值。所得結果如下：

1. 以反應曲面法求得 γ-PGA 包覆薑黃素之最適條件分別為：6% γ-PGA、15% 薑黃素、0.6% 界面活性劑(Span 80)，在此條件下製備之微膠囊之薑黃素包覆率為 78.7%。
 2. 添加海藻酸鈉、PLL 以及 MTGase 於 γ-PGA 製備不同殼膜類型之微膠囊，三混合系統對薑黃素之包覆率依次為 78.0%、72.4%、63.2%，以添加海藻酸鈉者影響最小，而 MTGase 之添加對 γ-PGA 之包覆效果有顯著劣化現象。
 3. γ-PGA 在 pH 1.3 及 pH 7 時所包覆薑黃素之釋放率分別為 12% 及 42%，添加 PLL 及海藻酸鈉時，pH 1.3 下之釋放率依次降至降至 5% 及 8%，pH 7 下則上升至 60% 及 78%，顯示此二化合物對 γ-PGA 微膠囊之 pH 應答能力具增進效果。
 4. 以藥物釋放動力學解析四種微膠囊於 2 hr 內模擬胃液釋放形式，只見添加海藻酸鈉的微膠囊符合零級以及一級釋放動力學，呈現穩定釋放模式，藉由 Higuchi 動力學模組可知膠囊型態為理想球狀，核蕊物質則均勻散佈其中。但四種微膠囊在模擬腸液環境中未見適用之模式，此有待進一步探討。
 5. 胃蛋白?分解試驗中，經 2 hr 作用的 γ-PGA 微膠囊其薑黃素保留率自 96% 下降至 55%，而添加海藻酸鈉、PLL 及 MTGase 之微膠囊，其薑黃素保留率均可維持在 70% 以上，顯示三者均有促進保護作用。
 6. 熱穩定性試驗顯示 γ-PGA 微膠囊在 35、55 以及 75 下處理 1 hr 後，薑黃素保留率依次為 51.6%、28.8%、22.9%，添加海藻酸鈉可增至 79.3%、79.8%、68.4%，添加 PLL 增至 75.9%、60.6%、51.5%，添加 MTGase 則僅增至 60.9%、55.4%、39.7%。三者對 γ-PGA 微膠囊之熱穩定性均有強化效果，但以海藻酸鈉最顯著，MTGase 較低。
- 綜合結果顯示 γ-PGA 本身為一良好微膠囊之殼膜物質，可以有效保護核蕊物質免於外界環境之破壞，且經由添加高分子材料及轉麩胺酸醯胺基?，可進一步改善控制釋放及熱穩定性，提升 γ-PGA 做為藥物包覆載體及食品微膠囊化工業之應用價值。

關鍵詞：γ-聚麩胺酸、薑黃色素、海藻酸鈉、聚離胺酸、轉麩胺酸醯胺基?、微膠囊化技術、釋放動力學

目錄

封面內頁
簽名頁
授權書iii
中文摘要iv
英文摘要vii
誌謝ix
目錄x
圖目錄xiv
表目錄xvii

1.前言1
2.文獻回顧3
2.1 聚麩胺酸之簡介3
2.1.1 聚麩胺酸之發展與特性3
2.1.2 γ-PGA之製備5
2.1.3 γ-PGA之特性9

2.1.4	-PGA之應用	9
2.2	薑黃素	13
2.2.1	薑黃素的來源及組成	13
2.2.2	薑黃素功用	14
2.2.3	薑黃素的特性	16
2.3	微膠囊	16
2.3.1	微膠囊之發明與定義	16
2.3.2	微膠囊包覆技術	17
2.3.3	微膠囊品質評估	23
2.3.4	微膠囊產品的儲藏安定重要性	27
2.3.5	微膠囊的功能性及應用	27
2.4	乳化液	29
2.4.1	乳化液的定義	29
2.4.2	界面活性劑	30
2.4.3	乳化安定性	30
2.4.4	乳化液的應用	30
2.5	高分子材料	31
2.5.1	高分子材料的特性	31
2.5.2	海藻酸鈉	31
2.5.3	-聚離胺酸	33
2.6	藥物釋放	33
2.6.1	控制釋放	36
2.6.2	控制釋放的形式	36
2.6.3	載體藥物釋出機制	37
2.6.4	影響釋放因子	38
2.6.5	控制釋放在食品上的應用	40
2.7	轉麩胺酸醯胺基	41
2.7.1	種類及特性	41
2.7.2	作用機制	42
2.7.3	食品加工的應用	42
3.	材料與方法	46
3.1	材料與試藥	46
3.2	儀器	46
3.3	實驗方法	47
3.3.1	實驗流程	47
3.3.2	微膠囊製備方式	47
3.3.3	液中固化法條件確立	50
3.3.4	薑黃素溶出測定	50
3.3.5	包覆率測定	50
3.3.6	最適化包覆條件探討	50
3.3.7	微膠囊特性評估	54
3.3.8	控制釋放特性試驗	57
3.3.9	溫度穩定試驗	58
3.4	統計分析	58
4.	結果與討論	59
4.1	-聚麩胺酸包覆薑黃色素最適化條件探討	59
4.2	液中固化法微膠囊化薑黃素反應曲面分析	62
4.3	液中固化法微膠囊化薑黃素最適化探討	68
4.4	不同殼膜微膠囊產品特性	76
4.5	表面型態及粒徑分佈	77
4.6	不同殼膜對包覆率的影響	82
4.7	pH 敏感性	88
4.8	藥物釋放動力學之解析	90

4.9 體內生物降解性	100
4.10 不同殼膜對溫度穩定性的影響	103
5. 結論	110
參考文獻	111

圖目錄

圖 1. 聚酞胺酸之結構	4
圖 2. Bacillus subtilis IFO3355的 -PGA 生成途徑	7
圖 3. 薑黃素之化學結構式	15
圖 4. 高分子生物性材料的機械特性以及與水之間的交互作用	32
圖 5. 海藻酸鈉結構示意圖	34
圖 6. 聚離胺酸結構示意圖	35
圖 7. 藥物釋放機制	39
圖 8. 轉酞胺酸醯胺基?所催化的反應	44
圖 9. 製作微膠囊之同軸生產器	48
圖 10. 以同軸微膠囊生產器製作微膠囊之剖面圖	49
圖 11. 實驗流程圖	51
圖 12. 同軸微膠囊生產器裝置圖	52
圖 13. 液中硬化法示意圖	53
圖 14. 固化五分鐘下不同介面活性劑對不同 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素之影響	60
圖 15. 固化十分鐘下不同介面活性劑對不同濃度 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素之影響	61
圖 16. 以 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素之包覆率實驗值與觀測值比較模型	66
圖 17. 固定核蕊量為15%條件下殼膜濃度與界面活性劑對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率影響之反應曲面圖	69
圖 18. 固定殼膜濃度為6%條件下, 核蕊量與界面活性劑對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率影響之反應曲面圖	70
圖 19. 固定界面活性劑量為0.6%條件下, 殼膜濃度與核蕊量對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率影響之反應曲面圖	71
圖 20. 不同殼膜濃度以及不同界面活性劑量對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率之等高圖線。固定核蕊為10、15、20%	72
圖 21. 不同核蕊量以及不同界面活性劑量對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率之等高圖線。固定殼膜量為3、6、9%	73
圖 22. 不同殼膜量以及核蕊量對 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素包覆率之等高圖線。固定界面活性劑濃度為0.3、0.6、0.9%	74
圖 23. 不同殼膜之微膠囊成品外觀圖(無核蕊)	78
圖 24. 不同殼膜之微膠囊成品外觀圖(有核蕊)	79
圖 25. -聚酞胺酸鈉膠囊化前後之電子顯微鏡圖	81
圖 26. 四種不同 -聚酞胺酸鈉膠囊之電子顯微鏡圖	83
圖 27. -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素微膠囊之粒徑分佈	84
圖 28. 添加海藻酸鈉於 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素微膠囊之粒徑分佈	85
圖 29. 添加轉酞胺酸醯胺基?於 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素微膠囊之粒徑分佈	86
圖 30. 添加聚離胺酸於 -聚酞胺酸鈉包覆薑黃素微膠囊之粒徑分佈	87
圖 31. 不同壁材對包覆率的影響	89
圖 32. 不同壁材之pH 應答敏感性	91
圖 33. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬胃液中零級釋放曲線	93
圖 34. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬腸液中零級釋放曲線	94
圖 35. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬胃液中一級釋放曲線	97
圖 36. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬腸液中一級釋放曲線	98
圖 37. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬胃液中Higuchi 間質化釋放模式	101
圖 38. 不同殼膜之薑黃素膠囊於模擬腸液中Higuchi 間質化 釋放模式	102
圖 39. 不同殼膜之薑黃素微膠囊於模擬體內胃液環境下其藥物保留率(含有胃蛋白?)	104
圖 40. 不同溫度對 -聚酞胺酸微膠囊藥物保留率之影響	106
圖 41. 不同溫度對添加海藻酸鈉於 -聚酞胺酸微膠囊之薑黃素保留率	107
圖 42. 不同溫度對添加聚離胺酸於 -聚酞胺酸微膠囊薑黃素保留率之影響	108
圖 43. 不同溫度對添加轉酞胺酸醯胺基?於 -聚酞胺酸微膠囊之藥物保留率影響	109

表目錄

- 表 1. 生產聚麩胺酸之菌株8
 表 2. 聚麩胺酸及其衍生物可能應用之領域10
 表 3. 微膠囊包覆技術22
 表 4. 微膠囊產品評估指標24
 表 5. 轉麩胺酸鹽基 γ -之種類及特性43
 表 6. 微生物轉麩胺酸鹽基 γ -之應用45
 表 7. 三階層三變數之實驗設計反應參數表55
 表 8. 三階層三變數之Box-behnken 實驗設計56
 表 9. γ -聚麩胺酸鈉包覆薑黃素包覆率之實驗質與預測值63
 表 10. 聚麩胺酸包覆薑黃素包覆率對合成變數之變異數分析65
 表 11. γ -聚麩胺酸包覆薑黃素變數之聯合檢測分析67
 表 12. 以脊型分析評估 γ -聚麩胺酸鈉包覆薑黃素之最佳包覆率75
 表 13. 不同殼膜之微膠囊成品特性80

參考文獻

- 王振照。1995。微膠囊與微膠囊包覆技術。微觀化學專刊。42(2):28。
- 王盈錦、莊亞欣。1995。微膠囊之製備與應用。生物產業。6(2):27-31。
- 王璐、許時嬰。1998。香精香料微膠囊化。食品與發酵工業。25(3):52-58。
- 王威、王春利。2000。常用食用防腐劑對食用天然色素影響的研究。食品與發酵工業。27(2):38-41。
- 王芙蓉、關建鬱、陸應生。2002。一種薑黃素的精製方法。中國專利。
- 方繼、賴明仁。1997。利用噴霧乾燥製造酸菜汁粉末及其特性之探討。中國農業化學會誌。35(2):132-141。
- 白壽雄。1997。簡介微膠囊及其應用。界面科學會誌。10(1):36-45。
- 史應武、婁愷、李春。2009。 γ -聚離胺酸的生物合成與降解及應用研究發展。中國農業科學。42(3):1009-1015。
- 宋健。2001。微膠囊化技術及應用。化學工業出版社。北京。
- 宋健、陳磊、李效軍。2001。微膠囊化技術及應用。化學工業出版社。北京。
- 呂家穎。2005。含薑黃素萃取物幾丁聚醣 γ -米 γ -之製備及其特性之探討。國立海洋大學食品科學系碩士論文。基隆。
- 呂玟蓓。2006。聚麩胺酸鈉鹽製造微膠囊技術之研發與包覆納豆激 γ -功效之評估。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。台中。
- 沈立言、林淑媛、蔡順仁。1992。利用相分離製備精油微膠囊及其性之討論。中國農業化學會誌。30(3):307-320。
- 吳家駒。2003。薑黃之功能與安全性。食品工業。財團法人食品工業發展研究所。新竹。35:40-52。
- 吳勇毅。2002。 γ -同方法製備幾丁聚醣 γ -之膨潤及其控制釋放特性。國 γ 台灣海洋大學食品科學研究所碩士學位 γ -文。台北。
- 李景倫。1997。探討微膠囊科技於生化戰之運用。核生化防護季刊。
- 馬光輝、蘇志國。2006。新型高分子材料。曉園出版社。
- 高宇紅、田磊、崔忻、薛毅瓏。2006。海藻酸鈣微球與海藻酸鈣-聚賴氨酸-海藻酸鈣微囊包裹對不同種類細胞生長的影響。中國臨床康復。10(9):51-53。
- 高群玉、黃立新、周俊俠、李文德。2000。薑黃素及微膠囊化的應用研究。食品科技。3:35-37。
- 郭先民。1997。微膠囊應用與發展。控制釋放專利。44(2):69-70。
- 徐輝碧、楊祥良。2003。奈米醫藥。清華大學出版社。北京。
- 秦芸樺、周濤。2006。聚賴氨酸在鮮切竹筍保鮮中的應用研究。食品科學。7(11):520-522。
- 許寶月。2004。Actinomycetes H12所產轉麩胺酸鹽基 γ -之生產、特性及加工製程之探討。國立中央大學生命科學研究所碩士學位論文。桃園。
- 許時嬰、張曉鳴、夏書芹、張文斌。2006。微膠囊技術-原理及應用。化學工業出版。北京。
- 梁治齊。1999。微膠囊技術及其應用。中國輕工業出版社。北京。
- 陳長豪、張志鵬。2002。利用液中硬包法製備海藻酸鈣微膠囊及其制放性之研究。華岡紡織期刊，第十卷，第三期，355-361。
- 陳碧君。1996。微膠囊包覆及其應用技術。紡織速報。
- 陳雅玲。2003。聚麩胺酸的物性與化妝品應用之研究。靜宜大學應用化學系碩士論文。
- 紺戶朝治。1989。微膠囊化工藝學。中國輕工業出版社。北京。
- 楊玉峰、韓春亮、胡小軍、劉樹興。2005。微膠囊化薑黃素化學穩定性的研究。河南工業大學學報(自然科學版)。26(2):48-50。河南。
- 崔正綱、殷福珊。1999。微乳化技術及應用。中國輕工業出版社。北京。
- 游銅錫。1986。微膠囊技術應用於食品添加物。科學與技術。18(1):25-27。
- 張鴻奇。2001。「微膠囊技術」之發展及應用回顧。化工資訊。15(8):28-35。
- 張淑真、張文忠。1998。生醫高分子之特殊應用-醫用微膠囊及微粒。工業材料。
- 程濤、吳超、嶽喜慶、武俊瑞、郭晨。2008。聚賴氨酸在食醋防腐中的應用。農業科技與裝備。第3期。71-73。
- 蔡順仁、沈立言。1991。噴霧乾燥微膠囊之膠囊壁物質。食品工業。23(9):28-31。
- 蔡燕鈴。2000。含水溶性藥物之乙基纖維素微膠囊的製備。國立中央大學化學工程研究所博士論文。桃園。
- 謝毓章。2003。生物膜包取面談性理論。上海科技技術出版社。上海。
- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A. and Nonaka, M. 1989. Purification and characteristics of novel transglutaminase derived from microorganisms. Agric. Biol. Chem. 53: 2613-2617.
- Anjani, K., Kailasapathy, K. and Phillips, M. 2006. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of chess ripening. Int. Dairy. J. 17:79-89.
- Anal, A. K., Stevens, W. F. and Remu??n - L?pez, C. 2006. Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. Int. J. Pharm. 312: 166-173.
- Benita, S. 1996. Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, New York, Marcel Dekker.
- Chung, P., Jae-Chul, C., Yoon-Ho, C., Hisaaki, N., Kazuya, S., Terumi, H., Haruo, M., Tomomitsu, S., Kenji, S., Makoto, A. and Moon-Hee, S. 2005. Synthesis of super-high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by Bacillus subtilis subsp. Chungkookjang. J. Molecular. Catalysis B: Enzymatic. 35: 128-133.
- Choi, H. J. and Kunioka, M. 1995. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by irradiation from microbial poly (γ -glutamic acid). Radiat. Phy. Chem. 46: 175-179.
- Candi, E., Melino, G., Mei, G., Tarcsa, E., Chung, S. I., Marekov, L. N. and Steinert, P. M. 1995. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human lorocrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. J. Biol. Chem. 270: 26382-26390.
- Cui, J. H., Goh, J. S., Kim, P. H., Choi, S. H. and Lee, B. J. 2000.

Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. *Int. J. Pharm.* 210: 51-59.

47. Cromwick, A. M., Birrer, G. A. and Gross, R. A. 1996. Effect of pH and aeration on gamma poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 50(2): 222-227.

48. Day, N. and Keillor, J. W. 1999. A continuous spectrophotometric linked enzyme assay for transglutaminase activity. *Anal. Biochem.* 274: 141-144.

49. Folk, J. E. 1980. Transglutaminase. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 517-531.

50. Fennema, O. R. 1996. *Food Chemistry*, Third edition, New York Marcel Dekker.

51. Gan, C. Y., Cheng, L. H. and Easa, A. M. 2008. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9: 263-269.

52. He, X. G., Lin, L. Z., Lian, L. Z. and Lindenmaier, M. 1998. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*) *J. Chromatography A.* 818: 127-132.

53. Huang, X. and Brazel, C. S. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Control. Release.* 73: 121-136.

54. Ito, Y. 1996. Glutamic acid independent production of Poly (L-glutamic acid) by *Bacillus Subtilis* TMA-4. *J. Biosci Biotechnol Biochem.* 60(18): 1239-1242.

55. Jiang, S. T. and Lee, J. J. 1992. Purification, characterization, and utilization of Pig plasma factor XIII a. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1101-1107.

56. Jie, Z., Bo, W., Weijun, T., Elena, M., Gang, Z., Rumen, K., Changyou, G., Helmuth, M. and Jiacong, S. 2008. Influence of assembling pH on the stability of poly (L-glutamic acid) and poly (L-lysine) multilayers against urea treatment. *Colloid Surface B.* 62: 250-257.

57. Kunioka, M. 1993. Properties of hydrogel prepared by irradiation in microbial poly (L-glutamic acid) aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 50: 755-760.

58. Kunioka, M. 1997. Biosynthesis and chemical reaction of (amino acids) from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* 47: 469-475.

59. Kondo, T. 1979. Microencapsulation New Techniques and Application, Proc. 3rd Intnl Symp, Techno Inc., Japan.

60. Ko, Y. H. and Gross, K. A. 1998. Effect of glucose and glycerol on gamma poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A. *Biotechnol Bioeng.* 57(4): 430-437.

61. Kutota, H., Nambu, Y., Takeda, H. and Endo, T. 1992. Poly-gamma- glutamic acid ester and shaped body thereof. US Patent 5118784.

62. Kutota, H., Nambu, Y. and Endo, T. 1993. Convenient and quantitative esterification of poly(L-glutamic acid) produced by microorganism. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 31: 2877-2878.

63. Kobayashi, K., Suzuki, S. I., Izawa, Y., Miwa, K. and Yamanaka, S. 1998. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 85-91.

64. Langer, R. 1990. New methods of drug delivery. *Science.* 249: 1527-1533.

65. Lilley, G. R., Skill, J., Griffin, M. and Bonner, P. L. 1998. Detection of Ca²⁺-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.* 117: 1115-1123.

66. Larsson, K. and Friberg, S. E. 1990. Food Emulsions. New York, Narcel Dekker.

67. Lorenzo-Lamosa, M. L., Remu?n-L?pez, C. Vila-Jato, J. L. and Alonso, M. J. 1997. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Release.* 52: 109-118.

68. Langer, G. 1969. Encapsulation of liquid and solid aerosol particles to fry powders. *J. Colloid. Interface.* 29: 450-457.

69. Langer Robeter. 2009. New methods of drug delivery. *AAS.* 249: 1527-1534.

70. George, M. and Abraham, T. E. 2007. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *Int. J. Pharm.* 335: 123-129.

71. Madan, P. L. 1981. Clofibrate microcapsules II: effect of wall thickness on release characteristics, *J. Pharm. Sci.* 70: 430-432.

72. Meijer, D. K. F., Molema, G., Moolenaar, F. D., Zeeuw, D. and Swart, P. J. 1996. (Glyco)-protein drug carriers with an intrinsic therapeutic activity: The concept of dual targeting. *J. Control Release.* 36(2): 163-172.

73. Mottahedeh, J. and Marsh, R. 1998. Characterization of 101-kDa transglutaminase from *Physarum polycephalum* and identification of LAV1-2 as substrate. *J. Biol. Chem.* 273: 29888-29895.

74. Margosiak, S. A., Dharma, A., Gonzales, A. P., Louie, D. and Kuehn, G. D. 1990. Identification of the large subunit of Ribulose 1,5- biphosphate Carboxylase/Oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa*. *L. Plant Physiol.* 92: 88-96.

75. Masahiro, F., Kumi, S., Kenichi, M., Yingchun, Z. and Yoshiko, N. 2008. Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules. *Chem. Eng., J.* 197: 14-22.

76. Bodnar, M., Kjoniksen, A-L., Molnar, R. M., Hartmann, J. F., Daroczi, L., Nystrom, B. and Borbely, J. 2008. Nanoparticles formed by complexation of poly-gamma-glutamic acid with lead ions. *J. Hazard. Mater.* 153: 1185-1192.

77. Nixon, J. R. 1976. Microencapsulation. Marcel Dekker NY.

78. Napper, D. H. 1977. Steric stabilization. *J. Colloid and Interfacial Sci.* 58(2): 390-422.

79. Nihant, N., Grandfils, C. and Jerome, R. 1997. Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-coglycolide) . *J. Controlled Release.* 35: 117-125.

80. Nixon, J. R. and Walker, S. E. 1971. The in vitro evaluation of gelatin coacervate microcapsules. *J. Pharm. Pharmacol.* 23: 147-156.

81. Orive, G., Tam, S. K., Pedraz, J. L. and Halle, J. P. 2006. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials.* 27: 3691-3700.

82. Otani, Y. and Tabata, Y. 1996. Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). *Biomaterials.* 17: 1387-1391.

83. Ogawa Y, Yamaguchi F. and Yuasa K. 1997. Effect production of gamma polyglutamic acid by *Bacillus Subtilis* (natto) in jar fermenters. *Biosci. Biochem.* 61(10): 1684-1687.

84. Ohtsuka, T., Umezawa, Y., Nio, N. and Kubota, K. 2001. Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *J. Food Sci.* 66: 25-29.

85. Piyush, G., Kavita, V. and Sanjay, G. 2002. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *DDT.* 7(10): 569-579.

86. Priyadarsini, K. I. 1997. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radical Bio. Med.* 23: 838-843.

87. Rodr?guez, D. E., Romero-Garc?a, C., Ram?rez-Vargas, E., Ledezma-P?rez, A. S. and Ar?as-Mar?n, E. 2006. Synthesis and swelling characteristics of semi-interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly (acrylamide) and poly (L-glutamic acid). *Mater Lett.* 60: 1390-1393.

88. Radek, J. T., Jeong, J. M., Murthy, S. N., Ingham, K. C. and Lorand, L. 1993. Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3152-3156.

89. Siger, J. W., De, V. P. and Bhatt, R. 2000. Conjugation of camptothecins to poly(L-glutamic acid). *Ann. NY Acad. Sci.* 922: 136-150.

90. Sara, J. R. and Gary, A. 1988. Encapsulation of flavors by Extrusion In " Flavor encapsulation " chapter 11 ed. American Chem. Soc.

91. Shih, I. L. and Van, Y. T. 2001. The production of poly(L-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technol.* 79: 207-225.

92. Tanimoto, H. H., Kuuraishi, C., Kido, K. and Seguto, K. 1995. High absorption mineral-containing composition and food. United States patent US5447732.

93. Pothakamury, U.

R., and Barbosa-Canovas, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci Technol.* 6: 397-406.94. Versic, R. J. 1987. Flavor Encapsulation. New Orleans. American Chemical Symposium Series. 370: 130-10995. Vistrup, P. 2001. Microencapsulation of food ingredients. England: Cambridge.96. Wang, Y. J., Pan, M. H. and Cheng, A. L. 1997. Stability of curcumin in buffer solution and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Ceut. Biomed.* 15: 1867-1876.97. Yamanaka, S. 1991. New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same. JP Patent. 3047087.98. Zheng, S., Beissinger, R. L. and Wasan, D. T. 1991. The stabilization of hemoglobin multiple emulsion for use as red blood cell substitute. *J. Colloid. Interface Sci.* 144: 72-85.99. Zhu, Y., Bol, J., Rinzema, A. and Tramper, J. 1995. Microbial transglutaminase- a review of its production and application in food processing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 277-282.