

蠶絲絲膠蛋白之純化與應用研究

吳芳禎¹ 毛文霖² 施英隆^{2*}

¹大葉大學生物產業科技學系

^{2*}大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*ils@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究由廢蠶繭萃取、純化並製備不同分子量之蠶絲絲膠蛋白，同時探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白之抗氧化性與抑制酪胺酸酶之能力。結果顯示，經由超過濃縮所獲得不同分子量之蠶絲絲膠蛋白對清除 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 自由基、清除 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)陽離子自由基、抑制酪胺酸酶能力普遍具有效果，其中以分子量為 100 kDa 之蠶絲絲膠蛋白效果最佳，在濃度為 25 mg/mL 時清除 DPPH 自由基能力已達 90.52%，清除 ABTS 陽離子自由基能力已達 91.06%，而抑制酪胺酸酶能力為 84.04%，若在 100 mg/mL 下 DPPH 自由基清除能力達 95.37%、清除 ABTS 陽離子自由基能力達 94.01%，抑制酪胺酸酶能力達 94.72%。在奈米乳化方面，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，若在 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%。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 28.1nm。本研究顯示蠶絲絲膠蛋白具有高抗氧化性及抑制酪胺酸酶之活性，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，抑制酪胺酸酶，奈米乳化。

Purification and Application of Silk Protein

FANG-CHEN WU¹, WEN-LIN MAO² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University

^{2*}Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168 University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a sample preparation protocol for extracting silk protein (sericin) and to examine the feasibility of its inhibition of free radical and melanin formation as well

as the preparation of its nanoemulsion. Various molecular weights of sericin were observed at different concentrations regarding its 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) cation scavenging activity. In addition, its inhibition of tyrosinase was also studied. For sericin of different molecular weights that was obtained after fractionation by ultrafiltration, the DPPH scavenging activity, ABTS cation scavenging activity, and tyrosinase-inhibiting activity was observed. However, sericin of 100 kDa showed the highest levels of activity; at a concentration of 25 mg/mL, the scavenging activity of DPPH free radicals and ABTS cation free radicals reached 90.52% and 91.06% capacity, respectively, whereas the tyrosinase inhibition reached 84.04% capacity. At 100 mg/mL, the scavenging activity of DPPH free radicals and ABTS cation free radicals was 95.37% and 94.01%, respectively, whereas the tyrosinase inhibition capacity was 94.72%. Furthermore, when mixed with jojoba oil, the sericin of different molecular weights formed nanoemulsions that displayed excellent activity and stability. The minimum particle size could be obtained when sericin with a molecular weight of 5 kDa was applied at a concentration of 50 mg/mL; the resulting particle size was 83.7 nm, and the nanoemulsifying capacity was 99.4%. The size of nanoemulsions varied by the number of high-pressure homogenization treatments. When 5 kDa sericin was mixed with jojoba oil at 50 mg/mL and pH 5.5, the minimum diameter of 28.1 nm was obtained after three treatments. This study demonstrated that sericin has high antioxidation and tyrosinase-inhibition ability. When mixed with jojoba oil, nanoemulsions may form, which might be easily absorbed through the skin. Therefore, the active component of sericin has potential for use as an ingredient in the production of whitening cosmetics that have high activity and may be easily absorbed.

Key Words: Sericin, Antioxidation, Inhibition of tyrosinase, Nanoemulsion.

一、前言

蠶絲為一種天然生物高分子蛋白，它的主要成分是絲膠蛋白（sericin）和絲素蛋白（fibroin），絲膠蛋白約占絲蛋白總量的20%~30% [3]。在絲綢廠或在絲素蛋白新功能材料的研究與開發中，必須完全或部分去除絲膠才能進行後續加工與處理。有效回收和綜合利用各種絲膠蛋白及絲膠水解物具有重要的研究和開發價值。絲膠蛋白的回收可大大減少對環境的污染，另一方面將絲膠資源開發利用，對保護環境和增加經濟效益具有深遠的意義[2]。

蠶絲絲膠蛋白是一種水溶性的高分子蛋白，具有良好生物分解性和生物相容性，是優良的天然生物材料，在化妝品、醫藥、食品等領域具有潛在的用途 [2, 7, 11, 13-14]。雖然曾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[1, 10]，因此可預防皮膚變黑及衰老等，但還尚未有明確之研究數據。

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。不同分

子量的蠶絲絲膠蛋白是否具備不同之生理活性較少有文獻探討，因此本研究探討由廢蠶繭中萃取、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和黑色素之功能。另外，由於奈米乳液的表面積大，油/水（O/W）液滴的界面張力小，可增加活性成分滲透皮膚，使成分能更有效的通過皮膚表層，而這些特性使得奈米乳液在製藥和化妝品工業上被廣泛的應用及發展[8]。奈米乳液為透明的乳劑，可提供較美的外觀，且不油膩使皮膚感覺清爽[8]。雖然已有很多文獻資料報導絲膠蛋白在化妝品中的應用[5]，但絲膠蛋白奈米乳液之製備在文獻資料中較少報導，因此本研究亦試圖探討蠶絲絲膠蛋白奈米乳液製備之可能性。

二、材料與方法

（一）廢蠶繭之前處理與脫膠

廢蠶繭係購自泉明生態教育養蠶農場（苗栗，台灣）。將蠶繭剪成1 cm²的碎片，並置於設定100°C的烘箱中烘乾5小時，直至重量不再改變。秤取30 g蠶繭碎片後，先在溫水

中漂洗除去雜質和塵埃，置於1.5升0.5%的碳酸鈉溶液中，在90℃恆溫水浴槽中加熱1.5小時，取出脫膠蠶繭用蒸餾水重複清洗數次後，將洗滌液與脫膠液混合。其脫膠液用活性炭過濾脫色，然後過濾獲得絲膠蛋白溶液。於設定100℃的烘箱中烘乾5小時，並秤重，求出蠶絲絲膠蛋白的重量。

(二) 超過濾濃縮裝置系統

超過濾濃縮裝置為一種掃流式 (cross flow) 分離膜設備，配具有截斷分子量 (molecular weight cut off, MWCO) 為 1 KDa、5 KDa、50 KDa、100 KDa、300 KDa 之分離陶瓷膜 (Tami, 10 mm × 600 mm 管柱)。分離操作時，使用循環幫浦使粗過濾之絲膠蛋白萃取液在系統裝置內循環，以適當的流速流經膜面，並在膜面上形成掃流作用，當循環絲膠蛋白萃取液流經膜面時，部分的小分子物質與水分子會穿透膜面成為濾液，而無法穿過膜面的大分子物質，則會留在循環液中。隨著實驗操作的進行，蠶絲絲膠蛋白萃取液會被分成兩種液體，一為被截流於膜內含有高濃度大分子物質的循環液 (此時稱為濃縮液)，一為被過濾於膜外含有小分子物質及水的濾液。將粗過濾之蠶絲絲膠蛋白經 300 KDa 分離陶瓷膜將會獲得 300 KDa 濃縮液及 300 KDa 濾液；取 300 KDa 濾液經 100 KDa 分離陶瓷膜將會獲得 100 KDa 濃縮液及 100 KDa 濾液；取 100 KDa 濾液經 100 KDa 分離陶瓷膜則獲得 50 KDa 濃縮液及 50 KDa 濾液；取 50 KDa 濾液經 50 KDa 分離陶瓷膜則獲得 5 KDa 濃縮液及 5 KDa 濾液；取 5 KDa 濾液經 1 KDa 分離陶瓷膜則獲得 1 KDa 濃縮液及 1 KDa 濾液。取 5 種不同分子量之蠶絲絲膠蛋白濃縮液及粗過濾蠶絲絲膠蛋白，進行冷凍乾燥，可得不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮後的粉末固體，並進行下述蠶絲絲膠蛋白抗氧化活性和奈米乳化分析實驗。

(三) 分子量測定

應用 SDS-聚丙烯醯胺凝膠 (SDS-PAGE) 電泳分析方法測定絲膠蛋白的分子量範圍。選用 4% 濃縮膠和 15% 分離膠，加樣量為 15 mL，試驗條件：電泳電壓為 110 V、電流為 300 mA，電泳約 90 分鐘。電泳結束後進行固定、染色和脫色 (固定液/染色液：1.5 g Coomassie brilliant blue R-250 加入 250 mL 去離子水，再加入 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸，混合均勻；脫色液：冰醋酸 70 mL，甲醇 70 mL，加蒸餾水定容至 1 000 mL)。

(四) 清除 DPPH 自由基能力測定

清除自由基能力是參考文獻之方法 [9]。將不同分子量

之蠶絲絲膠蛋白粉末配製成 1、5、10、25、50、100 mg/mL 之濃度，分別取 3 mL 不同分子量之蠶絲絲膠蛋白溶液加入 3 mL 100 mM 醋酸緩衝液及 3 mL DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 溶液 (精秤 25 mg DPPH，溶入 1000 mL 95% 乙醇溶液中 (呈現紫色)，避光冷藏於 4℃ 保存)，充分混合震盪後，置於陰暗處 (室溫下) 30 分鐘。製作扣色組是將蠶絲絲膠蛋白溶液以去離子水取代以扣除蠶絲絲膠蛋白干擾色，反應完成後，以可見光/紫外光分光光度計檢測在波長 517 nm 之吸光值。自由基被清除越多時，其吸光值會下降越多，利用相對於空白對照組的吸光值減少百分比，可判斷不同分子量之蠶絲絲膠蛋白清除 DPPH 自由基能力的強弱。每次實驗均處理重複三次。

清除 DPPH 自由基能力 (Scavenging activity %) =

$$\left[\frac{\text{Control OD}_{517 \text{ nm}} - \text{Sample OD}_{517 \text{ nm}}}{\text{Control OD}_{517 \text{ nm}}} \right] \times 100$$

Control OD_{517 nm}：不加樣品的空白組在波長 517 nm 的吸光值。

Sample OD_{517 nm}：樣品在波長 517 nm 的吸光值。

(五) 清除 ABTS 陽離子自由基能力測定

清除 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 陽離子自由基能力是參考文獻之方法 [12] 加以修改。將不同分子量之蠶絲絲膠蛋白粉末配製成 1、5、10、25、50、100 mg/mL 之濃度。取 6 mL 去離子水加入試管內，分別加入 1 mL ABTS 溶液 (精秤 5.4 mg ABTS，溶入 10 mL 去離子水中)，再加入 1 mL H₂O₂ (取 60 μl 30% H₂O₂ 加入 9.94 mL 去離子水；再取 100 μl 稀釋溶液加入 9.9 mL 去離子水) 及 44 unit / mL Peroxidase。利用震盪機將試管中的液體混合均勻，放置陰暗處靜置 1 小時。反應完成後，取出試管，分別加入 1 mL 已配製好的待測不同分子量之蠶絲絲膠蛋白，利用震盪機將試管中的液體混合，使其反應 10 分鐘。每次實驗均處理重複三次。製作扣色組是將蠶絲絲膠蛋白溶液以去離子水取代以扣除蠶絲絲膠蛋白干擾色，反應完成後，以可見光/紫外光分光光度計檢測在波長 734 nm 之吸光值。吸光值越低，表示測試液對清除 ABTS⁺ 陽離子自由基能力越強。

清除 ABTS 陽離子自由基計算 (Scavenging effect %) =

【(Control OD_{734 nm} - Sample OD_{734 nm}) ÷ Control OD_{734 nm}】
×100

Control OD_{734 nm}：不加樣品的空白組在波長 734 nm 的吸光值。

Sample OD_{734 nm}：樣品在波長 734 nm 的吸光值。

(六) 抑制酪氨酸酶活性分析

1. 濃度之影響

抑制酪氨酸酶活性分析是參考文獻之方法[15]加以修改。將不同分子量之蠶絲絲膠蛋白粉末配製成 1、5、10、25、50、100 mg/mL 之濃度。取 2 mL 不同分子量之蠶絲絲膠蛋白，加入 7.9 mL 酪氨酸緩衝溶液，置於 37°C 之恆溫振盪槽中震盪 10 分鐘均勻混合，最後加入 1 mL 25unit / mL 的酪氨酸酶溶液，後其反應 25 分鐘，以分光光度計檢測在波長 475 nm 之吸光值，並與維生素 C 及麴酸作比較。每次實驗均處理重複三次。製作扣色組，將蠶絲絲膠蛋白溶液以去離子水取代，以扣除蠶絲絲膠蛋白干擾色，反應完成後，以可見光/紫外光分光光度計檢測在波長 475 nm 之吸光值。吸光值越低，表示其生成的量越少，亦即黑色素的生成被抑制。

抑制酪氨酸酶活性計算 (Tyrosinase inhibition %) =

【(Control OD_{475 nm} - Sample OD_{475nm}) ÷ Control OD_{475nm}】
×100

Control OD_{475 nm}：不加樣品的空白組在波長 475 nm 的吸光值。

Sample OD_{475 nm}：樣品在波長 475 nm 的吸光值。

2. 在不同溫度儲存下之影響

不同分子量之蠶絲絲膠蛋白置於不同溫度中，分別為 4°C、25°C、28°C、31°C、34°C、37°C，於 0、2、4、6、10 星期取出 2 mL，放置室溫中，再依上述方法分別測定酪氨酸酶抑制率。每次實驗均處理重複三次。

(七) 奈米乳化學性質分析

1. 奈米乳化液的製備及粒徑檢測

將不同分子量之蠶絲絲膠蛋白粉末配製成 1、5、10、25、50、100 mg/mL 之濃度。各取 10 mL 及荷荷巴油 10 mL，分別加熱至乳化學溫度 65°C 後，緩慢將水相倒入油相中並以均質機 5000 rpm 下均質 10 分鐘，即得粗乳化液，再將 10 mL

粗乳化液緩緩倒入高壓均質系統（壓力設定 130 MPa），並於出料口接收，處理完的奈米乳化液，將其存於 4°C 備用。製備完的奈米乳狀液以雷射粒徑儀（laser diffraction submicron particle size analyzer N-4）進行檢測。以超純水稀釋乳液 1000 倍來分析粒徑大小並以粒徑（diameter, nm）表示[17]。

2. 奈米乳化活性 (EA) 的測定

乳化活性分析是參考文獻之方法加以修改[16]。取不同濃度之各分子量絲膠蛋白乳化液裝入具有刻度之離心管中，以轉速 1300 x g 離心 20 分鐘，反應完成後，放置室溫使其平衡並測量離心後乳化層及分離層（水層、沉澱層及油層）之體積及所佔乳化物之百分比。每次實驗均處理重複三次。

奈米乳化液活性能力計算 (Emulsifying activity %) =

(乳化層體積 / 總體積) × 100

3. 奈米乳化安定性 (ES) 之測定

乳化安定性分析是參考文獻之方法加以修改[16]。取不同濃度之各分子量絲膠蛋白乳化液裝入具有刻度之離心管中，置於 80°C 的恆溫水浴槽，加熱 30 分鐘。冷卻後以轉速 1300 x g 離心 20 分鐘，反應完成後，放置室溫使其平衡並測量離心後乳化層及分離層（水層、沉澱層及油層）之體積及所佔乳化物之百分比。每次實驗均處理重複三次。

奈米乳化液安定性計算 (Emulsion stability %) =

【(乳化層體積/總體積)_{加熱後} / (乳化層體積/總體積)_{加熱前}】 × 100

(八) 統計分析

本實驗數據使用 SPSS 20.0 軟體進行資料的統計與分析，實驗結果之數值以平均值±標準偏差 (mean±SD) 表示。以單向變方分析 (ANOVA) 檢測其變異性，以最小顯著差異法 (LSD, Least Significant Difference) 比較兩者平均值之差異。

三、結果與討論

(一) 蠶絲絲膠蛋白之萃取純化及電泳分析

廢蠶繭經碳酸鈉溶液脫膠處理後，將蠶絲烘乾，秤其重

量為 21.84g (72.8%)，而將萃取之蠶絲絲膠蛋白溶液經粗過濾、超過濃縮及冷凍乾燥後，可獲得蠶絲絲膠蛋白濃縮粉末 (圖 1)，其中經 300 kDa 濾膜之濃縮粉末為 1.38g (4.6%)、經 100 kDa 濾膜之濃縮粉末 1.47g (4.9%)、經 50 kDa 濾膜之濃縮粉末 1.26g (4.2%)、經 5 kDa 濾膜之濃縮粉末 1.51g (5.0%) 及經 1 kDa 濾膜之濃縮粉末 1.49g (5.0%)，蠶絲絲膠蛋白濃縮粉末共獲得 7.11g (23.7%)。這些不同分子量之蠶絲絲膠蛋白經由原子吸收光譜儀檢測，發現並無任何金屬殘留。經 SDS-PAGE 電泳分析，並對照蛋白質標準品，其分析結果如圖 2 所示，在電泳膠片中，粗過濾分子量為 0 kDa - 300 kDa 以上有明顯的顯色，300 kDa 濃縮液分子量為 300 kDa 以上；100 kDa 濃縮液在 100 kDa - 300 kDa 之間有明顯的顯色；50 kDa 濃縮液在 50 kDa - 100 kDa 之間有明顯的顯色；5 kDa 濃縮液在 5 kDa - 50 kDa 之間有明顯的顯色；1 kDa 濃縮液在 1 kDa - 5 kDa 之間有明顯的顯色，表示不同分子量蠶絲絲膠蛋白均落在預測範圍之內，並且與先前超過濃縮實驗的結果比對，更加驗證其分子量均在預測範圍之內。已知絲膠蛋白約占絲蛋白總量的 20% ~ 30% [3]，因此本研究以碳酸鈉溶液脫膠處理已經能非常有效的將蠶絲絲膠蛋白去除以利其進行後續加工與處理，此方法有別於過去高溫鹼性水脫膠方法 [1]，而脫膠液中之絲膠蛋白可經超過濃縮裝置系統濃縮及回收。在生技產業方面，超過濃縮裝置系統已大量使用在發酵程序中以進行分離發酵液中之蛋白質，而不會破壞蛋白質的活性，這種方法已用來工業純化抗生素、疫苗等，因此利用本研究之絲膠蛋白純化方法，具產業應用性。



圖 1. 濃縮冷凍乾燥後的蠶絲絲膠蛋白粉末

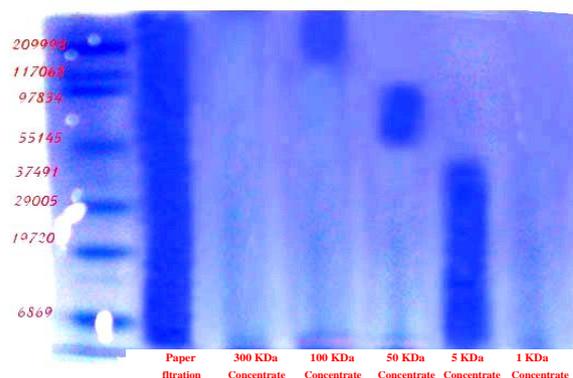


圖 2. 濃縮凍乾後不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮液之電泳圖 (由左而右：第一排：不同分子量之蛋白質標準品、第二排：粗過濾、第三排：300 kDa 濃縮液、第四排：100 kDa 濃縮液、第五排：50 kDa 濃縮液、第六排：5 kDa 濃縮液、第七排：1 kDa 濃縮液)。

(二) 不同分子量絲膠蛋白在不同濃度清除 DPPH 自由基能力之影響

將不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮粉末配製成各種濃度 (1、5、10、25、50、100 mg/mL)，並分析其清除 DPPH 自由基的效果，實驗結果如圖 3 所示。由圖 3 得知，不同分子量蠶絲絲膠蛋白清除 DPPH 自由基普遍具有效果，其中以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液效果最佳，在濃度為 25 mg/ml 時清除 DPPH 自由基能力已達 90.52%，而在 100 mg/mL 時清除 DPPH 自由基能力為 95.37%；其次為 300 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液，在濃度為 25 mg/ml 時清除 DPPH 自由基能力已達 85.21%，而在 100 mg/mL 時清除 DPPH 自由基能力為 92.01%。雖然清除 DPPH 自由基能力隨濃度增加而上升，但濃度在 25 mg/mL 時，即具有很強的清除 DPPH 自由基能力，因此再增加濃度活性增加有限，其有可能於 25 mg/mL 時，就已達到飽和狀態，故呈持平狀。以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液為例，其清除 DPPH 自由基能力在 1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、25 mg/mL、50 mg/mL 及 100 mg/mL 分別為 56.18%、75.08%、84.25%、90.52%、91.09% 及 95.37%。因此在應用時 25 mg/ml 應該是適宜濃度。不同分子量之蠶絲絲膠蛋白清除 DPPH 自由基能力在該濃度下，其排列順序為 100 kDa > 300 kDa > 50 kDa > 5 kDa > 1 kDa > 粗過濾 (<math>p < 0.05</math>)。未經超過濃縮、純化之粗過濾蠶絲絲膠蛋白 (100 mg/mL)，清除 DPPH 自由基能力僅為 63.42%，顯然粗過濾蠶絲絲膠蛋白清除 DPPH 自由基能力遠不及純化後之蠶絲絲膠蛋白。

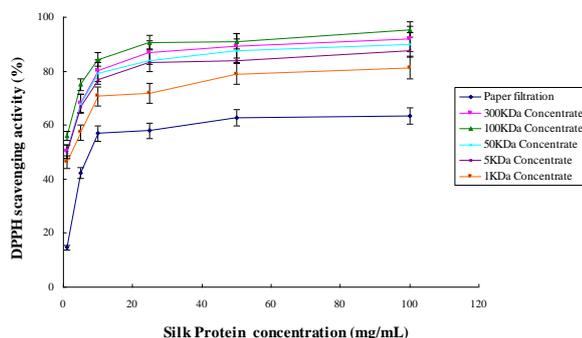


圖 3. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度清除 DPPH 自由基能力比較

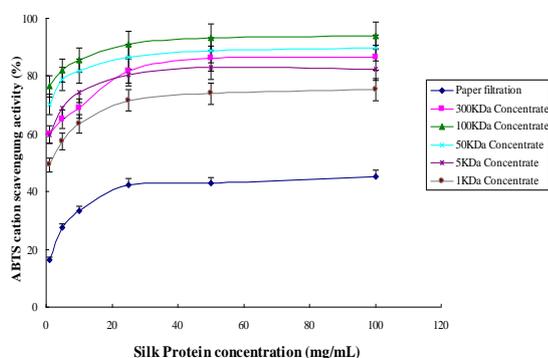


圖 4. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度清除 ABTS 陽離子自由基能力比較

(三) 不同分子量絲膠蛋白在不同濃度清除 ABTS 陽離子自由基能力之影響

將不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮粉末配製成各種濃度 (1、5、10、25、50、100 mg/mL)，並分析其清除 ABTS 陽離子自由基的效果，實驗結果如圖 4 所示。由圖 4 得知，不同分子量蠶絲絲膠蛋白清除 ABTS 陽離子自由基普遍具有效果，其中以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液效果最佳，在濃度為 25 mg/ml 時清除 ABTS 陽離子自由基能力已達 91.06%，而在 100 mg/mL 時清除 ABTS 陽離子自由基能力為 94.01%；其次為 50 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液，在濃度為 25 mg/ml 時清除 ABTS 陽離子自由基能力已達 83.05%，而在 100 mg/mL 時清除 ABTS 陽離子自由基能力為 89.63%。雖然清除 ABTS 陽離子自由基能力亦隨濃度增加而穩定的上升，但濃度在 25 mg/mL 時，即具有很強的清除 ABTS 陽離子自由基能力，因此再增加濃度活性增加有限，其有可能於 25 mg/mL 時，就已達到飽和狀態，故呈持平狀。以 100 kDa

蠶絲絲膠蛋白溶液為例，其清除 ABTS 陽離子自由基能力在 1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、25 mg/mL、50 mg/mL 及 100 mg/mL 分別為 76.46%、81.93%、85.62%、91.06%、93.29% 及 94.01%。因此在應用時 25 mg/ml 應該是適宜濃度。不同分子量之蠶絲絲膠蛋白清除 ABTS 陽離子自由基能力在該濃度下，其排列順序為 100 kDa > 50 kDa > 300 kDa > 5 kDa > 1 kDa > 粗過濾 ($p < 0.05$)。

(四) 不同分子量蠶絲絲膠蛋白抑制酪胺酸酶活性分析

1. 濃度之影響

本實驗探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度對抑制酪胺酸酶能力之影響，並與維生素 C 及麩酸作比較。將不同分子量蠶絲絲膠蛋白濃縮粉末配製成各種濃度 (1、5、10、25、50、100 mg/mL)，並分析其抑制酪胺酸酶能力，實驗結果如圖 5 及圖 6 所示。由圖 5 得知，蠶絲絲膠蛋白之抑制酪胺酸酶能力普遍具有效果，其中以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液效果最佳，在濃度為 25 mg/ml 時抑制酪胺酸酶能力為 84.04%，而在 100 mg/mL 時抑制酪胺酸酶能力為 94.72%；其次為 50 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液，在濃度為 25 mg/ml 時抑制酪胺酸酶能力為 82.12%，而在 100 mg/mL 時抑制酪胺酸酶能力為 90.43%。雖然抑制酪胺酸酶能力隨濃度增加而穩定的上升，但濃度在 25 mg/mL 時，即具有很強的抑制酪胺酸酶能力，因此再增加濃度活性增加有限，以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液為例，其抑制酪胺酸酶能力在 1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、25 mg/mL、50 mg/mL 及 100 mg/mL 分別為 61.78%、77.85%、84.04%、88.24%、91.63% 及 94.72%。不同分子量之蠶絲絲膠蛋白抑制酪胺酸酶能力在 25 mg/mL 濃度下，其排列順序為 100 kDa > 50 kDa > 300 kDa > 5 kDa > 1 kDa > 粗過濾 ($p < 0.05$)。

由圖 6 得知，維生素 C 於濃度 25 mg/mL 時即具有很強的抑制酪胺酸酶能力 (98.70%)，並未隨著濃度的增大而增加，其有可能因為維生素 C 於 25 mg/mL 時，就已達到飽和狀態，故呈持平狀，這表示維生素 C 為一極佳的抑制酪胺酸酶能力者，可抑制酪胺酸酶活性而達到抑制黑色素形成。麩酸抑制酪胺酸酶能力為 68.45% (25 mg/mL)、83.46% (100 mg/mL)，而 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液抑制酪胺酸酶能力為 84.04% (25 mg/mL)、94.72% (100 mg/mL)，所以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液抑制酪胺酸酶能力遠大於麩酸，並較維生素 C 之抑制酪胺酸酶能力稍低。

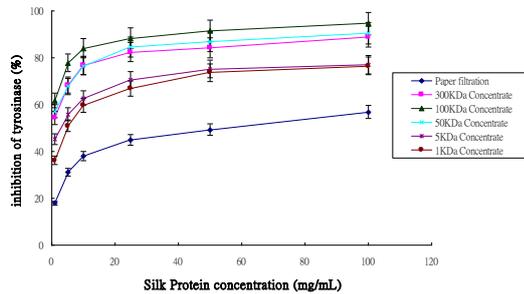


圖 5. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度抑制酪胺酸酶之比較

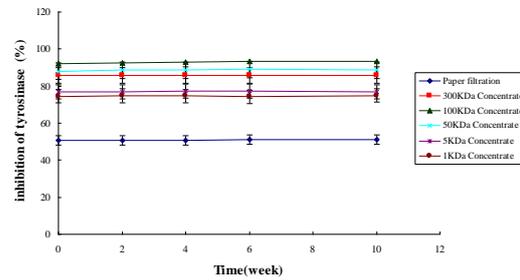


圖 7. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 4°C 儲存一段時間後抑制酪胺酸酶能力之比較

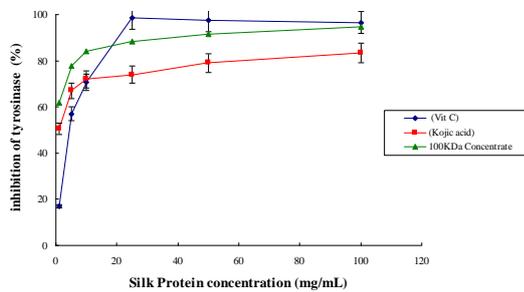


圖 6. 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白濃縮液、維生素 C 及麴酸在不同濃度抑制酪胺酸酶之比較

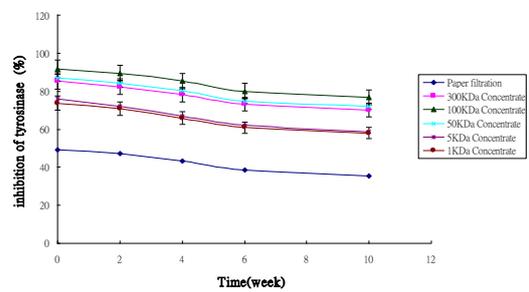


圖 8. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在 37°C 儲存一段時間後抑制酪胺酸酶能力之比較

2. 在不同溫度儲存下之影響

為瞭解蠶絲絲膠蛋白在不同溫度儲存之穩定性，本實驗探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白（50 mg/mL、pH 7）在不同溫度（4°C、25°C、28°C、31°C、34°C及 37°C）儲存一段時間（0、2、4、6、10 星期）後，其抑制酪胺酸酶之能力。結果顯示，蠶絲絲膠蛋白之抑制酪胺酸酶能力普遍具有效果，不同分子量蠶絲絲膠蛋白於 4°C、25°C及 28°C下，經 10 星期儲存後，抑制酪胺酸酶能力幾乎無變化，仍具有很強的抑制酪胺酸酶能力（圖 7 為儲存在 4°C之數據圖，25°C及 28°C之數據圖無顯示）。不同分子量蠶絲絲膠蛋白抑制酪胺酸酶能力效果最好之儲存溫度皆為 4°C，其中 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液置於 4°C下經 10 星期後效果最佳，抑制酪胺酸酶能力為 93.19%，其次為 50 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液，其置於 4°C下經 10 星期後，抑制率為 88.72%。但隨溫度的上升，在 31°C、34°C及 37°C，經 10 星期儲存後，抑制酪胺酸酶能力則明顯的下降（圖 8 為儲存在 37°C之數據圖，31°C及 34°C之數據圖無顯示）。以 100 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液為例，經 10 星期儲存後，其抑制酪胺酸酶能力在 4°C、25°C、28°C、31°C、34°C及 37°C分別為 93.41%、92.16%、

92.27%、90.69%、82.68%及 76.81%。因此不同分子量蠶絲絲膠蛋白溶液長時間保存於 4°C、25°C及 28°C下，不會影響抑制酪胺酸酶能力。

（五）不同分子量蠶絲絲膠蛋白奈米乳化性質分析

1. 不同濃度之下奈米乳化粒徑分析

本實驗探討不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度與荷荷巴油形成奈米乳化液之粒徑的影響。由表 1 得知，不同濃度之不同分子量蠶絲絲膠蛋白與荷荷巴油製備的奈米乳化液，皆可形成奈米粒徑，在相同濃度下，不同分子量樣品組間有顯著差異（ $p < 0.05$ ），其中以 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液之粒徑最小，雖然不同分子量蠶絲絲膠蛋白奈米乳化液之粒徑隨濃度增加而微量變小，但除了在濃度為 1 mg/mL 時粒徑顯著高於其他濃度，其他濃度下粒徑則無明顯差異（ $p < 0.05$ ），未經過濾純化之粗蠶絲絲膠蛋白乳化液在任何濃度之粒徑顯著高於經過濾濃縮及純化之不同分子量之蠶絲絲膠蛋白乳化液之粒徑（ $p < 0.05$ ），未經過濾純化之粗蠶絲絲膠蛋白乳化液之粒徑在 1-100 mg/L 之濃度下粒徑介於 589.6 nm 至 641.6 nm 間，而經過濾濃縮及純化之

不同分子量之蠶絲絲膠蛋白其奈米乳化液之粒徑均分布在 1~100 nm 之間，具有良好穩定性，由於此粒徑小，因此應較容易被皮膚吸收，文獻曾指出奈米乳液粒徑 10-100 nm 具有良好穩定性，容易被皮膚所吸收[6]；葉思儀論文中亦發現奈米級粒徑 80nm 之微脂粒經皮膚吸收可達真皮層[4]。

2. 不同濃度下之奈米乳化液活性

不同濃度對蠶絲絲膠蛋白與荷荷巴油形成之奈米乳化液活性之影響，如圖 9 所示。由圖 9 得知，不同分子量蠶絲絲膠蛋白奈米乳化液活性普遍較好，其中以 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白溶液（50 mg/mL）效果最佳，奈米乳化液活性能力為 99.4%。蠶絲絲膠蛋白是一種表面活性蛋白質，當濃度增加時，吸附於界面上的蠶絲絲膠蛋白分子也會增加，奈米乳化液活性能力亦隨濃度增加而穩定的上升，但蠶絲絲膠蛋白濃度添加至 25 mg/mL 後，蠶絲絲膠蛋白在界面上的吸附達到飽和，即使添加量再增大，其結合油的量變化亦不明顯，以 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白（50 mg/mL）為例，其奈米乳化液活性能力在 1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、25 mg/mL、50 mg/mL 及 100 mg/mL 分別為 43.2%、76.9%、87.5%、96.2%、99.4% 及 98.7%。不同分子量之蠶絲絲膠蛋白奈米乳化液活性能力在（50 mg/mL）為最佳，在此濃度下其排列順序為 5 kDa > 1 kDa > 100 kDa > 50 kDa > 300 kDa > 粗過濾（ $p < 0.05$ ）。

3. 不同濃度下之奈米乳化安定性

不同濃度對蠶絲絲膠蛋白與荷荷巴油形成之奈米乳化液安定性之影響，如表 2 所示。在相同濃度下，未經超過濾及純化之粗蠶絲絲膠蛋白奈米乳化安定性顯著低於純化後之蠶絲絲膠蛋白（ $p < 0.05$ ），其安定性在任何濃度皆小於 73.1%。超過濾純化過之不同分子量蠶絲絲膠蛋白之奈米乳

化安定性，雖然在不同濃度間無明顯差異（ $p < 0.05$ ），但安定性在任何濃度皆大於 96.3%，顯然，不同分子量蠶絲絲膠蛋白不會因置於 80°C 加熱 30 分鐘而改變其奈米乳化安定性。

4. 高壓均質處理次數對奈米乳化液粒徑之影響

由前述實驗結果得知，5 kDa 蠶絲絲膠蛋白在 pH 5.5 時，可製得最小粒徑之乳化液，本實驗探討高壓均質處理次數對粒徑之影響。取 5 kDa 蠶絲絲膠蛋白（50 mg/mL、pH 5.5）與荷荷巴油經由高壓均質處理 5 次，結果如表 3 所示，均質次數 3 次時粒徑最小，約 28.1 nm（如圖 10 所示）（ $p < 0.05$ ）。超過 3 次時粒徑有些微回升之現象，回升之原因目前仍不清楚。

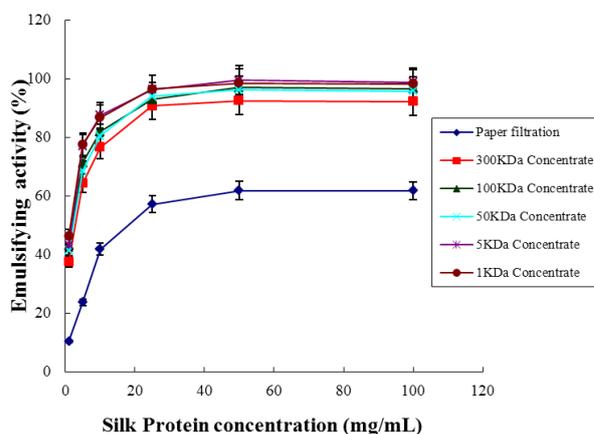


圖 9. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度奈米乳化活性 (EA) 之比較。

表 1. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度奈米乳化液粒徑之比較 (nm)

| 樣品 | 濃度 mg / mL | | | | | |
|---------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| Paper filtration | 641.2±2.2 | 627.5±2.5 | 625.0±2.0 | 614.6±3.9 | 589.6±2.2 | 591.3±1.1 |
| 300 KDa Concentrate | 106.2±1.2 | 104.3±1.5 | 103.9±2.1 | 101.3±1.0 | 99.5±1.5 | 99.8±1.8 |
| 100 KDa Concentrate | 97.8±1.3 | 97.5±1.6 | 97.1±1.0 | 96.4±0.8 | 95.4±1.3 | 95.8±1.5 |
| 50 KDa Concentrate | 97.6±1.7 | 97.2±1.9 | 96.5±1.0 | 96.7±0.9 | 94.9±1.0 | 95.3±1.7 |
| 5 KDa Concentrate | 89.7±1.9 | 87.0±1.4 | 85.4±2.5 | 85.9±1.6 | 83.7±0.6 | 84.1±2.9 |
| 1 KDa Concentrate | 94.0±0.8 | 93.3±1.6 | 93.1±1.0 | 91.5±1.5 | 89.0±2.4 | 90.4±1.5 |

表 2. 不同分子量蠶絲絲膠蛋白在不同濃度奈米乳化安定性 (ES) 之比較

| 樣品 | 濃度 mg / mL | | | | | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| Paper filtration | 63.7±3.1% | 70.4±1.9% | 72.1±2.2% | 72.7±1.7% | 73.1±2.0% | 72.3±2.7% |
| 300 KDa Concentrate | 96.8±1.2% | 99.3±0.6% | 98.8±1.5% | 100.0±1.8% | 100.0±2.0% | 100.0±1.0% |
| 100 KDa Concentrate | 96.3±1.4% | 100.0±1.8% | 100.0±1.6% | 99.6±1.7% | 100.0±2.2% | 99.4±1.6% |
| 50 KDa Concentrate | 97.9±1.6% | 99.8±1.4% | 100.0±2.2% | 100.0±2.5% | 100.0±1.6% | 99.6±2.2% |
| 5 KDa Concentrate | 97.5±1.4% | 100.0±1.4% | 99.7±1.9% | 99.3±2.4% | 100.0±2.2% | 100.0±1.6% |
| 1 KDa Concentrate | 98.4±1.4% | 99.2±1.7% | 99.7±1.4% | 98.9±1.2% | 100.0±1.8% | 99.4±1.2% |

表 3. 高壓均質處理次數對奈米乳液液粒徑之影響

| Size (nm) | 均質處理次數 (Homogenization passes) | | | | |
|-----------|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | 80.6±2.1 | 57.9±2.5 | 28.1±1.5 | 34.0±1.3 | 32.0±0.5 |

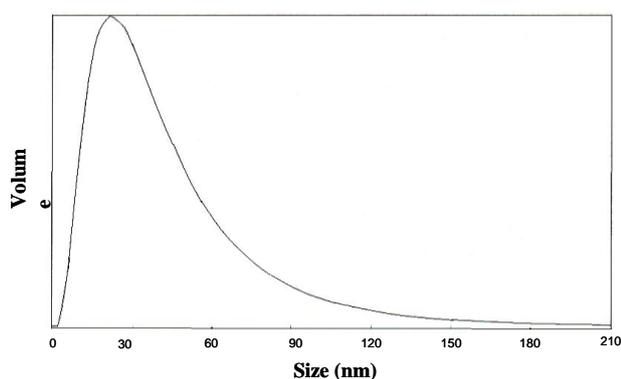


圖 10. 奈米乳液液粒徑圖 (5 kDa 蠶絲絲膠蛋白 (50 mg/mL) 在 pH 5.5 下, 經高壓均質處理次數 3 次)

四、結論

本研究探討由廢蠶繭萃取、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對清除 DPPH 自由基、清除 ABTS 陽離子自由基、抑制酪胺酸酶能力之影響。結果顯示，經由超過濃縮及純化可獲得不同分子量之蠶絲絲膠蛋白，其對清除 DPPH 自由基、清除 ABTS 陽離子自由基、抑制酪胺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，在濃度為 25 mg/mL 時清除 DPPH 自由基能力已達 90.52%，清除 ABTS 陽離子自由基能力已達 91.06%，而抑制酪胺酸酶能力為 84.04%，若在 100 mg/mL 下 DPPH 自由基清除能力達 95.37%、清除 ABTS 陽離子自

由基能力達 94.01%，抑制酪胺酸酶能力達 94.72%；由以上結果證實不同分子量蠶絲絲膠蛋白具有抑制自由基、抗氧化功能，且具有抑制酪胺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。而未經過過濾及純化之粗過濾蠶絲絲膠蛋白其清除 DPPH 自由基、清除 ABTS 陽離子自由基及抑制酪胺酸酶能力明顯偏低，遠不及純化後之蠶絲絲膠蛋白。

在奈米乳化方面，結果顯示不同分子量蠶絲絲膠蛋白與荷荷芭油形成奈米乳液、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液粒徑最小，5 kDa 蠶絲絲膠蛋白在 50 mg/mL、pH5.5 與荷荷芭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胺酸酶之活性，同時可與荷荷芭油形成奈米乳液，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。

參考文獻

1. 相入麗、張雨青、閻海波 (民 87)，蠶絲絲膠蛋白的抗氧化作用，絲綢學報，5，3-27。

2. 陳準、朱良均、閔思佳、胡國梁 (民 81), 蠶絲絲膠蛋白的利用研究, 東華大學學報(自然科學版), 28(3), 132-134。
3. 張雨青 (民 81), 絲膠蛋白的護膚、美容、營養與保健功能, 紡織學報, 23(2), 70-72。
4. 葉思儀 (民 91), 奈米微脂粒作經皮吸收之研究, 臺灣大學醫學工程研究所碩士論文, 台灣。
5. 趙林、謝豔招、鄭貽德、蔡聰育、肖華山 (民 101), 蠶絲蛋白在化妝品中的應用研究進展, 日用化學工業, 42(6), 452-456。
6. 盧意淇 (民 99), 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研究所碩士論文, 台灣。
7. Aramwit P., T. Siritientong and T. Srichana (2012) Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry. *Waste Management Research*, 30 (3), 217-224
8. Bouchemal K., S. Briançon, E. Perrier and H. Fessi (2004) Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), 241-251。
9. Gyamfi, M. A., M. Yonamine and Y. Aniya (1999) Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology*, 32(6), 661-667。
10. Kato, N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa and M. Nomura (1998) Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62(1), 145-147.
11. Nayak, S. and S. C. Kundu (2014) Sericin-carboxymethyl cellulose porous matrices as cellular wound dressing material. *Journal of Biomedical Materials Part-A*, 102, 1928-1940.
12. Osman A., K. Wong and A. Fernyhough (2006) ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 346(1), 321-329.
13. Shen J. Y., J. Xu, Y. Zhuang, D. Q. Sun, T. L. Xing and G. Q. Chen (2013) Study on the application of sericin in cosmetics. *Advanced Materials Research*, 796, 416-423.
14. Wang Z., Y. Zhang, J. Zhang, L. Huang, J. Liu, Y. Li, G. Zhang, S. C. Kundu and L. Wang (2014) Exploring natural silk protein sericin for regenerative medicine: an injectable, photoluminescent, cell-adhesive 3D hydrogel. *Scientific Reports*, 20(4), 7064.
15. Wu, L., Y. Chen, J. Ho and C. Yang (2003). Inhibitory effect of red koji extracts on mushroom tyrosinase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51(15), 4240-4246.
16. Yasumatsu, K., K. Sawada, S. Maritaka, M. Mikasi, J. Toda, T. Wada, and K. Ishi (1972) Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 719-727.
17. Yuan Y., Y. Gao, L. Mao and J. Zhao (2008) Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(3), 1300-1306.

收件：104.07.29 修正：104.09.10 接受：104.11.11