

누에고치에서 유래된 세리신(Sericin)의 화장품 소재로서 *In Vitro* 효능 연구

권현지^{1*} · 이지혜² · 정은미³ · 이은홍³ · 박진한⁴ · 오성음⁵ · 박상혁⁵ · 정지욱^{4,†}

¹건국대학교 일반대학교원 첨단중개의학과, 학생

²대구의대학교 산학협력단, 박사 후 연구원

³대구의대학교 일반대학교원 제약공학과, 학생

⁴대구의대학교 화장품제약대학 바이오산업융합학부, 교수

⁵가람오브네이처

(2023년 1월 12일 접수; 2023년 2월 24일 수정; 2023년 2월 26일 채택)

A Study on the Effectiveness of In Vitro as a Cosmetic Material of Sericin Originated from Silkworm Kochi

Hyun-Ji Kwon^{1*} · Jihye Lee² · Eunhong Lee³ · Eun-mi Jung³ · Jinhan Park⁴
Sung-Eum Oh⁵ · Sanghyeok Park · Ji Wook Jung^{4,†}

¹Advanced Translational Medicine, Konkuk University, Korea

²Daegu Haany University Industry Academic Cooperation Foundation, Korea

³Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu haany University, Korea

⁴Division of Biotechnology and Convergence, College of Cosmetics and Pharm,
Daegu Haany University

⁵Garam of Nature

(Received January 12, 2023; Revised February 24, 2023; Accepted February 26, 2023)

요 약 : 세리신은 누에고치에서 추출한 단백질로 많은 건강상의 이점을 가지고 있다. 본 연구는 화장품 소재로서 누에고치에서 유래된 세리신 표준품의 항주름 활성 및 항염증 활성을 평가하기 위해 수행되었다. 세리신의 항산화 효과는 DPPH 및 ABTS 측정법에 의해 측정되었다. 또한 대식세포인 Raw 264.7 cell에서의 세포 생존율을 확인하였으며, lipopolysaccharide를 이용하여 유도된 염증반응을 이용하여 세리신의 항염증 효과를 조사하였다. 그 결과 세리신은 DPPH, ABTS에서 항산화 활성을 보였으며 세포 독성을 가지지 않은 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 NO를 억제하였다. 종합하여 세리신은 항산화 활성을 가지며 항노화 및 항염증 화장품의 우수한 소재가 될 수 있음을 보여준다.

주제어 : 세리신, 누에고치, 화장품, 항노화, 항염증

[†]Corresponding author
(E-mail: jwjung@dhu.ac.kr)

Abstract : Sericin is a protein extracted from the cocoon and has many health benefits. This study was conducted to evaluate the anti-wrinkle and anti-inflammatory activity of sericin derived from cocoon as a cosmetic material. The antioxidant activity of sericin was measured by DPPH and ABTS assays. In addition, cell viability was confirmed in Raw 264.7 cells, which are macrophages, and the anti-inflammatory effect of sericin was investigated using the inflammatory response induced using lipopolysaccharide (LPS). It shows that sericin has antioxidant activity and can be an excellent material for anti-aging and anti-inflammatory cosmetics.

Keywords : sericin, cocoon, cosmetic, anti-aging, anti-inflammatory

1. 서론

최근 천연물을 중심으로 한 학문이 발전하면서 자연 친화적인 천연식물을 활용하여 질병의 예방 및 건강을 지키려는 경향이 증가하는 추세이다 [1,2]. 화장품 시장에서도 화학성분에 기초한 것이 아닌 자연 친화적인 원료를 사용한 화장품이 큰 영향을 보이고 이를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다[2].

누에로부터 생산되는 실크 섬유는 피브로인과 세리신이라는 두 단백질로 이루어져 있으며, 두 가닥의 피브로인을 세리신이 둘러싸고 있는 천연 유래 복합섬유 단백질이다[3,4]. 세리신은 누에가 방사하는 점착성을 가진 물질로서 약 25%를 차지하고 있는 천연자원이다[5]. 전 세계적으로 생산된 약 100만 톤의 고치 중에서 약 40만 톤의 건조한 고치가 생성되며 5만 톤의 세리신을 생산하는 것으로 추정된다[6]. 세리신은 섬유 산업을 위해 누에고치에서 부드럽고 광택이 나는 실크 필라멘트를 준비하기 위해 화학적, 효소적 등의 방법을 사용하여 정제과정에서 피브로인으로부터 분리되어 폐수에 주로 버려진다[7,8]. 버려지는 세리신은 환경문제 외에도 세리신을 분해하기 위해 사용되는 산소와 경제적 문제를 발생시킨다 [9].

따라서 이렇게 폐기되어지는 세리신을 재활용 하기 위한 시도가 계속해서 진행되고 있고 세리신 연구의 발전으로 세리신이 우수한 생물학적 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다[10]. 최근에 세리신이 세포 부착과 증식을 지원하고[11] 세포 분화를 촉진할 수 있음이 입증되었다[12].

세리신은 추출 방법이나 보관 방법 등이 분자량에 영향을 미치고 이에 따라 약리 효능이 다르게 나타난다. 효소, 고압, 알칼리를 이용한 방법

으로 세리신 추출 후 측정된 DPPH 효능 실험에서 320 $\mu\text{g}/4\text{ ml}$ -2.5 $\mu\text{g}/4\text{ ml}$ 범위에서 효과가 없었으나 혈당 강하, 알코올 대사 촉진 효능을 확인하였다[5]. 또한 고분자 세리신보다 저분자 세리신에서 항산화 효능이 있어 제약 및 화장품 산업에서 가수분해물을 피부, 모발, 네일 등 화장품으로 사용되고 있다고 보고되었다[13]. 하지만 누에고치의 종과 식이 종류등에 따른 항산화와 미백, 주름 개선 효능이 차이를 나타내어[14] 표준화된 sericin의 효능을 평가가 필요하다. 세리신은 reducing power, lipid peroxidation inhibition assay, hydroxyl radicals scavenging assay, superoxide radicals scavenging assay, electron donating ability, metal ion-chelating activity, anion acid composition 실험에서 다양한 항산화능을 나타냈고 특히 electron donating ability에서는 제일 고농도인 9.0 mg/mL에서 $79.0 \pm 1.00\%$ 의 활성을 보였으나[15] 대조군이 없어서 비교할 수 없었다.

따라서 본 연구에서는 가수분해하지 않은 표준품 세리신의 화장품 원료로서 활용 가능성을 확인하고자 항산화 활성, 항주름, 세포 생존율 평가, 항염증 효과를 실시하여 기능성 화장품 소재로서 효능을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 재료

본 실험에 사용한 세리신은 Sigma Aldrich Co(USA)에서 구매하였다.

2.2. Electron donation ability assay

Electron donating ability는 Blois의 방법[16]을

변형하여 실험을 진행하였다. 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 50 μL 를 각 시료 용액 100 μL 에 첨가한 뒤 상온에서 30분간 차광하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH는 시료 용액의 첨가군과 시료를 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소 비율로 표현되었다.

2.3. ABTS+ radical scavenging activity

ABTS radical scavenging assay는 Rice-Evans 등[17]에 따라 실험을 진행하였다. ABTS+ radical scavenging activity는 1:1 비율의 7.4 mM 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 암실 상태에서 하루 동안 반응시켜 사용하였으며 734 nm에서 흡광도 값이 0.700 ± 0.001 이 되도록 제조하여 사용했다. 시료 용액과 ABTS+ 용액을 100 μL 씩 첨가하여 1분간 상온에서 차광하여 734 nm 흡광도에서 측정하였다. ABTS radical scavenging activity는 시료 용액 첨가군과 시료를 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소 비율로 표현되었다.

2.4. Elastase 저해 활성 측정

Elastase inhibition 활성 측정은 Cannell 등[18]의 방법에 따라 측정하였다. 세리신을 각 농도별로 조제하여 0.5 ml씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(2.5 U/mL) 0.5 mL와 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide(0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 p-nitroanilide의 생성량을 흡광도 405 nm에서 측정하였다. Elastase inhibition 활성은 시료 용액의 첨가군과 시료를 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.5. 세포 생존율 측정(MTS assay)

Raw 264.7 세포를 100 μL 씩 96 well plate에 3×10^5 cell/mL의 밀도가 되도록 분주한 후 24 H 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 1-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 세리신을 24 H 동안 처리한 것과, 1-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 세리신을 2 H 동안 전처리한 후 lipopolysaccharide(LPS)를 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24 H 동안 처리하였다. 그 후 MTS 용액을 10 μL 첨가하여 1 H 동안 배양 후 반응액을 흡광도 490 nm에서 microplate reader(Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 세

포 생존율 측정은 시료 용액의 첨가군과 시료를 첨가하지 않은 군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.6. NO 생성 저해능 분석

Raw 264.7 세포를 3×10^5 cell/mL 비율로 24 well plate에 분주한 다음 24 H 동안 배양하였다. 1-1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 세리신을 2 H 동안 전처리한 후 lipopolysaccharide(LPS)를 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였다. 24 H 처리된 각 well의 상층액 100 μL 와 1% sulfanilamide와 0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride(NED)를 1:1 비율로 가하여 혼합한 후 흡광도 540 nm 조건에서 측정하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며 결과는 mean \pm standard deviation(SD)로 나타내었다. 항산화 실험 및 항주름, 항염증 실험 결과는 유의성을 검증하기 위해 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS) software package(version 22.0; IBM, NY, USA)을 이용하였으며 각 처리군 사이 유의성에 대한 검증은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 이용하여 유의성을 확인하고 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Electron donation ability (EDA)

Electron donating ability는 안정한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 항산화 활성을 검증하는데 사용된다. DPPH에 의해 산화성 물질을 만나 보라색이 연한 노란색으로 탈색되는 것으로 흡광도를 측정하여 시료의 항산화 활성능을 측정할 수 있다. 세리신의 항산화 활성을 측정한 결과 농도가 올라갈수록 DPPH의 전자공여 활성능이 올라가는 경향을 나타내었다. 각 농도 100, 500, 1,000, 5,000, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $-1.33 \pm 4.84\%$, $8.68 \pm 11.44\%$, $12.35 \pm 9.99\%$, $42.32 \pm 16.87\%$, $68.80 \pm 1.69\%$ 의 활성을 나타내었으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $96.17 \pm 3.23\%$ 의 활성을 나타냈다(Fig. 1). 세리신은 추출 방법에 따라 분자량에 많은 영향을 미치는데 효소, 고압, 알칼리를 이용하여 저분자화 시킨 세리신은

DPPH 효능 실험에서 320 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 효과가 없었으나[5] 본 연구에서 사용한 가수분해하지 않은 표준품 세리신은 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 효과가 미미하나 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

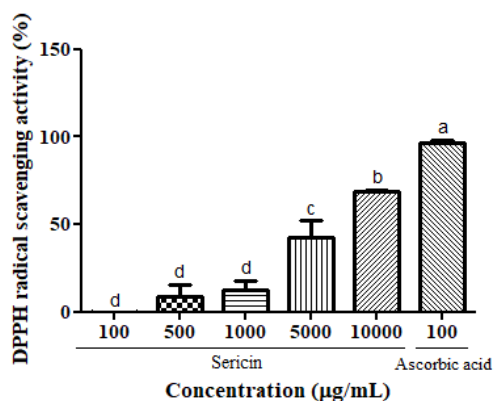


Fig. 1. Electron donating activity assay of sericin. The different letters indicate statistical differences at the $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value represents the mean \pm S.D of triplicates.

3.2. ABTS+ radical scavenging 효과

세리신의 항산화 활성을 확인하기 위해 ABTS의 radical 소거능을 측정하였다. ABTS radical 소거능은 산화를 일으키는 물질을 만나 청록색이 투명색으로 탈색되는 것을 통해 흡광도를 측정한다. 세리신의 측정 결과 농도 의존적으로 올라갈수록 ABTS radical 소거 활성능이 올라가는 경향을 나타내었다. 각 농도 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $-0.13 \pm 3.56\%$, $5.13 \pm 3.57\%$, $21.72 \pm 10.90\%$, $75.56 \pm 4.86\%$, $97.50 \pm 1.52\%$ 의 활성을 나타내었으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $96.51 \pm 2.16\%$ 의 활성을 나타냈다(Fig. 2). 따라서 세리신은 대조군으로 사용된 ascorbic acid보다 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 더 높은 ABTS radical 소거능이 확인되었다. *Bacillus sp.* 균주를 이용하여 생성해낸 세균성 세리신은 1.2 mg/ml의 농도에서 $72.59 \pm 2.34\%$ 의 활성을 보였으나[19] 본 연구에서 사용한 표준품인 세리신은 1.0 mg/ml의 농도에서 $97.50 \pm 1.52\%$ 의 활성을 보여 더 낮

은 농도에서 높은 ABTS radical 소거 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

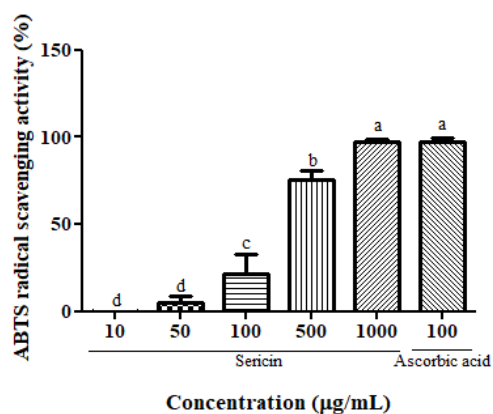


Fig. 2. ABTS+ radical scavenging assay of sericin. The different letters indicate statistical differences at the $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value represents the mean \pm S.D of triplicates.

3.3. Elastase 저해 활성 측정

Elastase는 피부에 탄력을 나타내는 구성 요소 중 하나인 elastin을 분해하는 효소로 elastase의 활성은 피부의 탄력 저하와 주름 형성에 주요한 원인이 된다. 피부 진피 조직 속에는 피부 탄력과 관련된 elastin 구조가 형성되어 있는데 elastin이 elastase에 의해 분해가 되 결합이 끊어짐으로 주름을 생성하는 주원인 효소로 알려져 있다(Re et al., 1999). 따라서 세리신에 의한 elastase 저해 활성을 측정하였다. 세리신의 elastase 저해 활성 측정 결과 각 농도 1,000, 5,000, 10,000, 30,000, 50,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $-1.49 \pm 1.65\%$, $1.02 \pm 0.49\%$, $20.71 \pm 2.04\%$, $20.33 \pm 0.06\%$, $42.18 \pm 1.27\%$ 의 활성을 나타내었다(Fig. 3). 세리신의 농도가 증가할수록 elastase 저해 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. 실크 섬유 폐기물에서 직접 추출해낸 세리신은 항 elastase 활성을 나타내며[20], 본 연구에서 사용된 표준품 세리신 또한 항 elastase 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다.

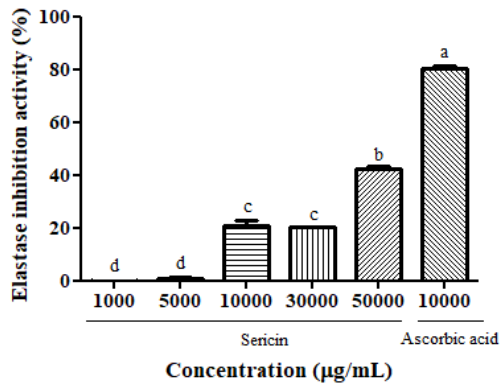


Fig. 3. Elastase inhibition activity of sericin. The different letters indicate statistical differences at the $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Each value represents the mean \pm S.D of triplicates.

3.4. 세포 생존율 측정(MTS assay)

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 100 µL 씩 3×10^5 cell/mL의 밀도가 되도록 분주한 후 24 H 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 1-1,000 µg/mL 농도의 세리신을 24 H 동안 전처리한 것과 1-1,000 µg/mL 농도의 세리신을 2 H 동안 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS)를 1 µg/mL 농도로 24 H 동안 처리하였다. 그 후 MTS 용액을 10 µL 첨가하여 1 H

동안 배양 후 반응액을 490 nm 파장에서 흡광도를 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 세포 생존율 결과는 시료 용액의 첨가군과 시료를 첨가하지 않은군의 흡광도 감소율로 나타내었다. 세리신의 세포 생존율 측정 결과 1,000 µg/mL 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 4). 따라서 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 1-1,000 µg/mL 농도에서 세포 염증 관련 실험을 진행하였다.

3.5. NO 생성 저해능 분석

NO는 신호분자로서 세포 내 반응에 관여하는 물질이며 NO의 증가는 염증 발생에 밀접한 관련이 있다. 따라서 Raw 264.7 세포에 LPS 처리로 NO 생성을 유발시킨 결과, LPS 단독 처리된 세포군에서 높은 NO 생성율을 보였으며, 세리신이 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포의 NO 생성을 저해시키는지를 측정하기 위해 세리신을 1-1,000 µg/mL의 농도로 처리하였다. 세리신의 NO 생성 저해능 측정 결과 각 농도 1, 10, 100, 1,000 µg/mL의 농도에서 8.83 ± 0.13 uM, 11.47 ± 0.28 uM, 11.04 ± 0.30 uM, 11.07 ± 0.20 uM, 7.93 ± 0.24 uM의 활성을 나타내었다. 세리신을 처리한 군에서 NO 생성을 감소시키는 것이 확인하였고 이는 세리신이 항염증 효과를 가진다는 것을 나타낸다(Fig. 5). 감소시키기 때문에 세리신은 항염증 효과가 있음을 입증하였다.

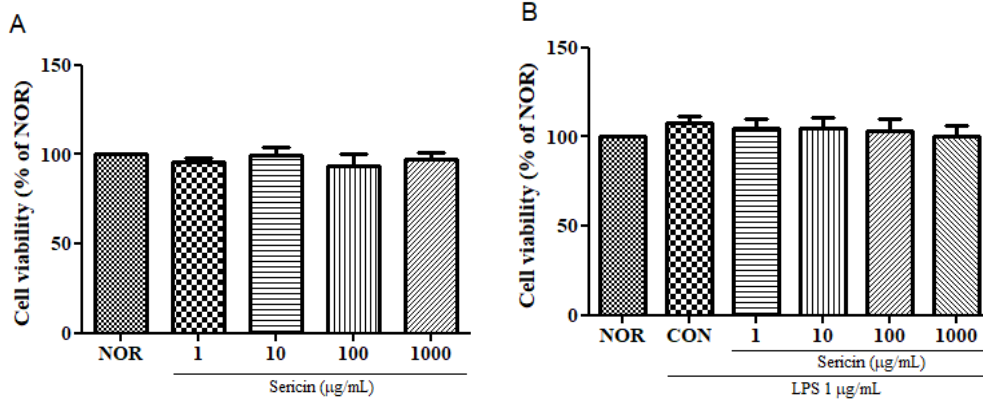


Fig. 4. Effect of sericin on LPS-treated Raw 264.7 cells viability. The viability of RAW 264.7 cells was determined by MTS assay after incubated with indicated concentrations of sericin for 24 h supplemented with or without 1 µg/ml of LPS. Results are presented as the mean \pm S.D.

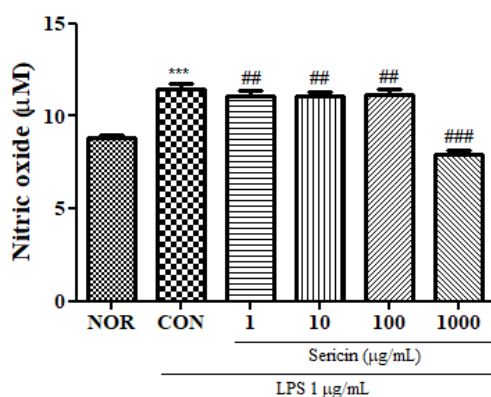


Fig. 5. Effect of sericin on nitric oxide (NO) production of LPS-treated Raw 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of sericin for 2 h before incubation with LPS for 24 h. The culture supernatants were subsequently isolated and analyzed for nitrite levels. Results are presented as the mean \pm S.D. *** p <0.001 compared with the NOR group. ## p <0.01, ### p <0.001 compared with the CON group.

4. 결론

본 연구에서는 누에고치에서 얻은 세리신을 항산화, 항주름 및 항염증에 대한 기능성 화장품 소재로서 활용하고자 DPPH, ABTS, elastase 저해 활성, 세포 생존율, NO 생성 저해능을 측정하였다.

세리신의 electron donating ability는 10,000 μ g/mL의 농도에서 68.80 \pm 1.69%의 활성을 나타냈으며, ABTS radical scavenging ability는 1,000 μ g/mL의 농도에서 97.50 \pm 1.52%의 활성을 보여 우수한 항산화 효능을 확인할 수 있었다. 또한, 피부의 탄력을 나타내는 구성 요소 중 하나인 elastine을 분해하는 효소인 elastase의 억제 활성은 50,000 μ g/mL의 농도에서 42.18 \pm 1.27%의 활성을 확인하였다. 또한 염증과 밀접한 관련 있는 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포에서 세리신의 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 1-1,000 μ g/mL의 농도에서 염증 유도 물질인

LPS로 자극을 한 경우 염증 매개하는 대표 인자인 NO의 생성 억제 효과를 확인한 결과 1,000 μ g/mL의 농도에서 세리신을 무처리한 컨트롤군에 비교하여 31%의 억제 효과를 확인하였다.

이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 세리신은 항산화, 항주름 효과뿐만 아니라 항염증 활성을 가져 기능성 화장품 소재로써 활용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2022년도 경상북도 및 경북테크노파크의 바이오 코스메틱 생태계 조성사업의 지원을 받아 수행한 연구입니다(과제번호-코스메틱 22-01).

References

1. B. G. Lee, J. H. Kim, S. G. Gyeong, C. E. Lee, "Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from lagerstroemia indica L. Branch", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol.27, No.1 pp. 29-34, (2014).
2. Y. J. Chon, H. S. Jung, H. S. Kim, J. H. Lee, S. H. Moh, "The effect on roots extract from potentilla chinensis as cosmeceutical material", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.59, No.1 pp. 13-17, (2016).
3. I. C. Um, "Recent research trend in the structure and properties of silk sericin", *Journal of Sericultural Entomological Science*, Vol.55, No.2 pp. 44-53, (2019).
4. K. H. Lee, M. K. Kim, H. J. Oh, J. Y. Lee, J. Y. Lee, "Enzymatic Hydrolysis of Silk Sericin and Its Anti-oxidative Effect", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.35, No.2 pp. 135-141, (2009).
5. K. G. Lee, J. H. Yeo, Y. W. Lee, H. Y. Kweon, J. H. Kim, "Bioactive and Skin-compatible Properties of Silk Sericin", *Journal of Sericultural and Entomological*

- Science*, Vol.43, No.2 pp. 109–115, (2001).
6. Y. G. Zhang, “Applications of natural silk protein sericin in biomaterials”, *Biotechnology Advances*, Vol.20, No.2 pp. 91–100, (2002).
 7. P. Aramwit, T. Siritientong, T. Srichana, “Potential application of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products”, *Waste Management Research*, Vol.30, No.3 pp. 217–224, (2012).
 8. W. H. Wang, W. S. Lin, C. H. Shih, C. Y. Chen, S. H. Kuo, W. L. Li, Y. S. Lin, “Functionality of Silk Cocoon (*Bombyx mori* L.) Sericin Extracts Obtained through High-Temperature Hydrothermal Method”, *Materials*, Vol.14, No.18 5314, (2021).
 9. H. Biganeh, M. Kabiri, Y. Zeynalpouurfattahi, R. M. Costa Brancalho, M. Karimi, M. R. Shams Ardekani, R. Rahimi, “*Bombyx mori* cocoon as promising pharmacological agent: A review of ethnopharmacology chemistry, and biological activities”, *Heliyon*, Vol.8, No.9 pp. 10496, (2022).
 10. J. Liu, L. Shi, Y. Deng, M. Zou, B. Cai, Y. Song, Z. Wang, L. Wang, “Silk sericin-based materials for biomedical applications”, *Biomaterials*, Vol.287, pp. 121638, (2022).
 11. P. Aramwit, S. Kanokpanont, T. Nakpheng, T. Srichana, “The effect of Sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production”, *Journal of Molecular Sciences*, Vol.11, No.5 pp. 2200–2211, (2010).
 12. S. Nayak, T. Dey, D. Naskar, S. C. Kundu, “The promotion of ossenointegration of titanium surfaces by coating with silk protein sericin”, *Biometaterials*, Vol.34, No.12 pp. 2855–2864, (2013).
 13. K. Jena, J. P. Pandey, R. Kumari, A. K. Sinha, G. P. Singh, “Free radical scavenging potential of sericin obtained from various ecoraces of tasar cocoons and its cosmeceuticals implication”, *Journal of Biological Macromolecules*, Vol.120, pp. 255–262, (2018).
 14. N. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, M. Nomura, “Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity”, *Biosci Biotechnol Biochem*, Vol.62, No.1 pp. 145–147, (1998).
 15. J. B. Fan, L. P. Wu, L. S. Chen, X. Y. Mao, F. Z. Ren, “Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *bombyx mori*”, *Journal of food biochemistry*, Vol.33, pp. 74–88, (2009).
 16. M. S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, Vol.181, pp. 1199–1200, (1958).
 17. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology Medicine*, Vol.26, No.9–10 pp. 1231–1237, (1999).
 18. Richard J. P. Cannell, S. J. Kellam, M. Ania, J. M. Walker, “Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors”, *Planta Medica*, Vol.54, No.1 pp. 10–14, (1988).
 19. E. M. El-Fakharany, G. M. Abu-Elreesh, E. A. Kamoun, S. Zaki, D. A. Abd-EL-Haleem, “In vitro assessment of the bioactivities of sericin protein extracted from a bacterial silk-like biopolymer”, *RSC Adv.*, Vol. 10, pp. 5098–5107, (2020).
 20. K. Jena, J. P. Pandey, Ruchi Kumari, A. K. Sinha, V. P. Gupta, G. P. Singh, “Tasar silk fiber waste sericin: New source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 114, pp. 1102–1108, (2018).