

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士

盧錫祺 博士

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

Hsi-Chi Lu, Ph.D.

不同靈芝菌絲體萃取物對酪胺酸酶抑制活性
之影響

Effect of mycelial extracts on tyrosinase activity inhibition
by *Ganoderma lucidum*

研究生：林志昇 撰

Graduate student : Jhih-Sheng Lin

中華民國 九十九年 七月

July, 2010

中文摘要

酪胺酸酶是催化黑色素生成反應的關鍵酵素，因此酪胺酸酶抑制劑是美白化妝品開發中重要的一項課題。本研究將靈芝菌絲體進行液態及固態培養，取其發酵液、菌絲體萃取物來做酪胺酸酶活性抑制之測定，期望可以得到抑制黑色素生成之有效成份並減少黑色素之產生。萃取溶劑以蒸餾水、甲醇、75%乙醇、50%乙醇為主。

實驗內容主要包括上清液與均質發酵液抑制 DOPA 生成效果之比較，以及液態及固態培養之菌絲體萃取物抑制 DOPA 生成效果之比較。另外，在有效成份方面做一探討。細胞試驗部分則觀察以萃取液抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素的影響。

結果顯示，發酵液經均質後，其抑制 DOPA 生成效果較好。液態培養之菌絲體以蒸餾水萃取的抑制效果最好，可達 86%。固態培養中則以以薏仁為基質培養基，利用蒸餾水萃取之抑制效果最佳，可達 89.2%。整體來說，固態培養之菌絲體萃取物其抑制效果比液態培養之菌絲體萃取物好。由總酚含量測定結果顯示，此有效成分可能為多酚類化合物。在萃取液抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素的影響試驗方面，皆可達到 70%以上之抑制效果。顯示靈芝菌絲體萃取液在黑色素生成抑制上具有不錯之功效。

關鍵字：靈芝、酪胺酸酶、美白、黑色素、黑色素細胞

Abstract

Because tyrosinase is a key enzyme to the synthesis of melanin, tyrosinase inhibitors are considered to be effective to cosmetic skin-whitening. The purpose of this study is to investigate the effectiveness of tyrosinase inhibitors prepared from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures and solid-state fermentations. Different extracts of mycelium and fermentation broths were compared for the inhibitory effect of tyrosinase activity. The experiment could be categorized mainly into four parts, which were the comparison of various fermented product for DOPA inhibition, and the comparison of extracts of mycelium of submerged culture and solid-state culture for DOPA inhibition, then analyzed the effective components. In the Cell culture experiments, we can observe the inhibitory effect of extracts of *Ganoderma lucidum* on the formation of melanin by B16-F10 melanocyte. The results show that the polytron treatment of fermentated broth could improve the DOPA inhibition. Mycelia extracts by distilled water from the submerged culture was demonstrated to have the best bleaching effect of 86%. For solid-state fermentation, the bleaching effect could reach to 89.2% by distilled water extracts, which was more effective than that of submerged cultures. In additions, the effective component for bleaching was considered to be polyphenols. By the cell culture of B16-F10 melanoma cells, the

formation of melanin was estimated to have 70 % reduction by the addition of mycelia extracts of *Ganoderma lucidum*. The results reveal that the mycelia extracts of *Ganoderma lucidum* had good efficacy on the inhibition of melanin formation.

Keywords : *Ganoderma lucidum*, tyrosinase, bleaching effect, melanin, melanoma cells.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	IV
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2-1 靈芝簡介.....	3
2-1-1 靈芝的分類與介紹.....	3
2-1-2 靈芝的栽培方式.....	4
2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果.....	7
2-2 皮膚的構造.....	11
2-3 黑色素細胞及黑色素的形成.....	14
2-4 黑色素生合成機轉.....	15
2-5 酪胺酸酶的生化特性與反應機制.....	17
2-6 防止或抑制黑色素形成之機制.....	18
2-7 美白成分.....	21

2-8 美白相關研究	27
第三章 實驗材料與分析方法	29
3-1 實驗菌株及細胞	29
3-2 實驗藥品	29
3-3 實驗儀器與設備	31
3-4 分析方法	32
3-4-1 pH 值測定	32
3-4-2 菌體 Biomass	32
3-4-3 葡萄糖濃度測定	32
3-4-4 多醣濃度測定	32
3-4-5 總酚類含量測定	33
3-4-6 離體抑制酪胺酸酶活性試驗試藥配製	34
3-4-7 離體抑制酪胺酸酶活性試驗測定方法	34
3-4-8 細胞毒性測試	35
3-5 實驗方法	36
3-5-1 靈芝菌種培養與保存	36
3-5-1-1 菌種斜面試管保存	36
3-5-1-2 培養皿平面培養與接菌活化	36
3-5-1-3 種菌製備	36

3-5-2 三角瓶液態培養試驗.....	37
3-5-3 三角瓶固態培養試驗.....	37
3-5-4 胞外多醣體之萃取與濃度測定.....	38
3-5-5 胞內多醣體之製備與濃度測定.....	38
3-5-5-1 胞內多醣之萃取.....	38
3-5-5-2 胞內多醣濃度測定.....	38
3-5-6 靈芝菌絲體萃取物之製備.....	39
3-5-7 細胞培養與繼代.....	39
3-5-8 細胞存活率之測試 (WST-1 assay).....	40
3-5-9 抑制 B-16 黑色素細胞生成黑色素試驗.....	41
第四章 結果與討論.....	42
4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗.....	42
4-1-1 培養時間之影響.....	42
4-1-2 發酵液濃度的變化及均質與否對 DOPA 抑制率的影響.....	44
4-1-3 靈芝菌絲體萃取物對 DOPA 抑制率之關係.....	47
4-2 靈芝三角瓶固態培養試驗.....	49
4-2-1 培養時間之影響.....	49
4-2-2 不同菌絲型態 DOPA 抑制率與總多酚含量之比較.....	51
4-2-3 不同基質培養基與培養天數及不同萃取法對 DOPA 之影響.....	53

4-3 有效成分之歸納討論：多醣與多酚類	55
4-4 靈芝菌絲體萃取物之細胞效應	59
4-4-1 靈芝菌絲體萃取物對細胞存活率之影響	59
4-4-2 靈芝菌絲體萃取物抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素之影響	62
第五章 結論與未來展望	64
5-1 結論	64
5-2 未來展望	65
參考文獻	66
附錄	72

圖目錄

圖 2-1 靈芝固態平面培養	6
圖 2-2 靈芝液態培養 7 天形成之菌絲球(pellet).....	6
圖 2-3 表皮層主要結構和細胞型態	11
圖 2-4 黑色素細胞將形成的黑色素送往角質細胞	14
圖 2-5 黑色素生合成途徑	16
圖 2-6 酪胺酸酶活性中心結構	18
圖 2-7 影響黑色素生合成路徑之作用機轉	19
圖 2-8 評估減少色素生成之實驗流程模式	20
圖 4-1 靈芝菌絲體之生長曲線圖.....	43
圖 4-2 不同濃度發酵上清液對 DOPA 抑制率關係.....	45
圖 4-3 不同濃度均質發酵液對 DOPA 抑制率關係.....	45
圖 4-4 發酵上清液與均質發酵液對 DOPA 抑制率關係.....	46
圖 4-5 不同靈芝菌絲體萃取物對 DOPA 抑制率之比較.....	48
圖 4-6 固態培養時間對靈芝菌絲體萃取物之 DOPA 抑制率影響.....	50
圖 4-7 不同菌絲型態之 DOPA 抑制率及總多酚含量變化.....	52
圖 4-8 不同固態基質培養基之菌絲體甲醇萃取物對 DOPA 抑制率的比較.....	54
圖 4-9 不同固態基質培養基之菌絲體水萃取物對 DOPA 抑制率的比較.....	54

圖 4-10 多醣生成與靈芝發酵上清液 DOPA 抑制率之關係.....	57
圖 4-11 靈芝菌絲體萃取物多醣與多酚含量與 DOPA 抑制率關係.....	57
圖 4-12 固態培養之靈芝菌絲體萃取物多醣生成與 DOPA 抑制率關係.....	58
圖 4-13 不同靈芝菌絲體萃取物對細胞存活率之影響	60
圖 4-14 不同靈芝菌絲體萃取物對細胞存活率之影響.....	61
圖 4-15 靈芝菌絲體萃取物抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素之影響.....	63

表目錄

表 2-1 靈芝的生理作用與藥理效果	7
表 2-2 干擾黑色素生合成之美白成分作用機制	22
表 2-3 行政院衛生署公告核准之美白成分與限量	25
表 3-1 實驗藥品	29
表 3-2 實驗儀器與設備	31
表 3-3 細胞培養基組成	39

第一章 緒論

過去化妝保養品被社會大眾視為奢侈品，近來由於社會經濟的發展，國民生活水準的提升，化妝保養品已被視為日常生活中不可或缺的必需品。同時隨著高齡化社會的來臨，以及使用者年齡層的下降，化妝保養品市場規模逐年擴大。在生物技術開發中心報告中提及，依 Euromonitor IMIS 調查，2004 年全球化妝保養品(Cosmetics & Toiletries, C&T)的銷售額，約為 2300 億美元，較 2003 年成長 4.2%，預期以 3.6%之年平均成長率擴展至 2009 年，屆時市場銷售額將達 2750 億美元。(楊等人，2005)

二次大戰結束之後，由於化學工業的興起，使許多物質藉由化學合成的技術而大量製造，化妝品因此成為重要的民生產業。近年來人們逐漸意識到合成化學品對環境與人體所造成的負面影響，強調自然與健康則是目前的潮流。由於化粧品保養品裡往往含有人工合成的添加劑或化學成份，較易引起使用者皮膚過敏的現象及安全上的疑慮。因此，尋求有效又安全的物質作為化妝品之原料，是目前化妝保養品研究開發努力的方向。在化妝保養品中添加天然萃取物或中草藥的有效成分，是一個非常流行的發展方向，項目涵蓋美白、防曬、抗老化、細胞活化、抗消炎、除皺紋等等機能性產品(陳，2007)，此類強調天然訴求的「天然化粧品」，已成為極具發展潛力的商品。

靈芝(*Ganoderma lucidum*)具有廣泛的藥理作用及臨床應用，包括對中樞神

經、呼吸、心血管疾病、內分泌及免疫系統之作用，例如鎮靜、祛痰、保肝解毒及抗腫瘤等。1996 年臺北醫學大學蘇慶華博士研究室自松杉靈芝(*Ganoderma tsugae* Merri)子實體的殘渣中萃取出一種特殊成分 Sacchachitin，經研究指出其可減少 B16 細胞產生黑色素與降低 B16 細胞之酪胺酸酶活性(蘇，2006)。另外，有文獻指出，將靈芝菌絲體利用不同萃取方法所得之萃取物經測試能有效抑制酪胺酸酶活性，具有美白之功效(Chien et al.,2008)。

目前以人工栽培的食用菇，雖可以在配合菌種的篩選及改良，和菇場栽培管理技術不斷提升後獲得較大量的收成，但同時仍需消耗大量的人力、栽培的空間和設備，以及由接種到達子實體收成需時長達數月餘的時間成本等投資。因此，在加強食用菇類的利用方面，根據抗生素發酵生產的經驗，以深層培養(submerged culture)方式生產菇類菌絲體及其它有用的代謝產物，就成為十分值得開發的途徑(王等人，1998)。另外微生物在固態基質上生長時較接近自然生長狀態，可能會產生一些無法自液態發酵中所獲得的物質。因此本研究嘗試以靈芝液態發酵培養及固態發酵培養的方式，利用其培養時間較短的優點，進行靈芝菌絲體與多醣等活性物質的生產，希望能達到與子實體培養相類似的功效。本實驗主要目的即為：希望藉由靈芝液態發酵培養及固態發酵培養生成具有抑制黑色素合成的美白抑制劑，並透過不同萃取方式來萃出更多有效成分，再將其應用於 Mouse B16 細胞培養實驗，觀察待測成份是否具有抑制黑色素生成的功效。

第二章 文獻回顧

2-1 靈芝簡介

2-1-1 靈芝的分類與介紹

靈芝(Ling Zhi)在過去中國傳統觀念視為一種中藥材，具有肉眼可見之子實體型態。於東漢末年中國古老藥物典籍「神農本草經」中即對靈芝有詳細描述，並根據型態與顏色分成赤芝、黑芝、青芝、白芝、黃芝及紫芝六種。根據 1979 年 Alexopolus 及 1881 年 Karsten 所建立的真菌分類系統中，靈芝屬於真菌界(Myceteae)，無鞭毛菌門(Amastigomycota)，擔子菌綱(Basidiomycetes)，無菌褶目(Aphyllorphorales)，多孔菌科(polyporaceae)的靈芝屬。而上述之六芝，事實上僅赤芝與紫芝屬靈芝屬(Ganoderma)。

在漢方中，靈芝被認為具有強壯、補血、安定精神、利尿、補肝等功能(徐、謝，2001)。現代醫藥學界經過三十年的藥理研究結果確認靈芝的萃取物中，具有鎮靜、鎮痛、鎮咳、強心、保肝、降血壓、降血脂、降血糖、降膽固醇、抗過敏、抗發炎、抗腫瘤、抗病毒、抗氧化與免疫調節功能等的活性成分，而廣受各國的重視(許，2005)。

2-1-2 靈芝的栽培方式(詹，2003)

靈芝的來源可分為野生與人工栽培，其敘述如下：

(一) 野生靈芝：野生靈芝在台灣の平地及高海拔山區皆有分布，常常生於闊樹、針葉樹、相思樹及豆科植物，大部分為一年生の子實體。

(二) 人工栽培靈芝：有子實體栽培和菌絲體液態培養二種方法，分述如下：

(1) 子實體栽培

目前已有大規模靈芝子實體培養，所使用的方法與菇類培養相似，即椴木或太空包培養，經過適當環境控制，2-3個月左右即可採收。即便如此，栽培時間仍是偏長，如能縮短培養時間，將可大幅增進經濟效益。栽培方法分述如下：

椴木栽培：將靈芝的生長菌絲種植在櫟木或枹木的枯木段上。

木屑培養瓶或太空包栽培：於廣口瓶或太空包中填裝木屑與生長培養基，將靈芝菌絲接入後塞上棉塞培養，在 30°C 栽培 70-90 天即可採收子實體。

(2) 菌絲體液態培養(楊，2006)

所謂液態培養，一般是指使用固定組成的液態培養基，在控制適當的 pH、溫度以及通氣和攪拌(或震盪)的條件下，進行為生物的發酵培養，以製造生質(biomass)或其他代謝物(metabolite)。培養流程如下：

菌種→試管斜面培養→三角瓶培養→發酵槽培養

從靈芝的生活史來看，靈芝菌體形態包含孢子、菌絲與子實體三部分，一般認知，靈芝的療效都是子實體的利用，事實上靈芝的孢子與菌絲體的藥效近年來

被大量研究與試驗，證實其亦有生產價值。工業界對於真菌的液態培養技術自從抗生素盤尼西林大規模生產以來，到現在已是一成熟的技術。如能利用液態培養，進行大量的靈芝菌絲體與胞外多醣的生產，將有助於靈芝的經濟利用。

菇類液態培養最大的特色在於發酵過程中並無孢子萌發期(sporulation)，所生產之菌絲體是以菌絲球(pellets)形式存在，因為菌絲體的生長是輻射狀向四周擴散，所以菌體呈現球形懸浮在培養液中。這也使得培養液中營養源及氧氣之傳送程度，較一般低等真菌或酵母菌的液態培養來得更為複雜化。

圖 2-1 為靈芝固態平面培養之菌絲體生長型態，圖 2-2 為靈芝液態培養 7 天後形成之菌絲球(pellet)型態。

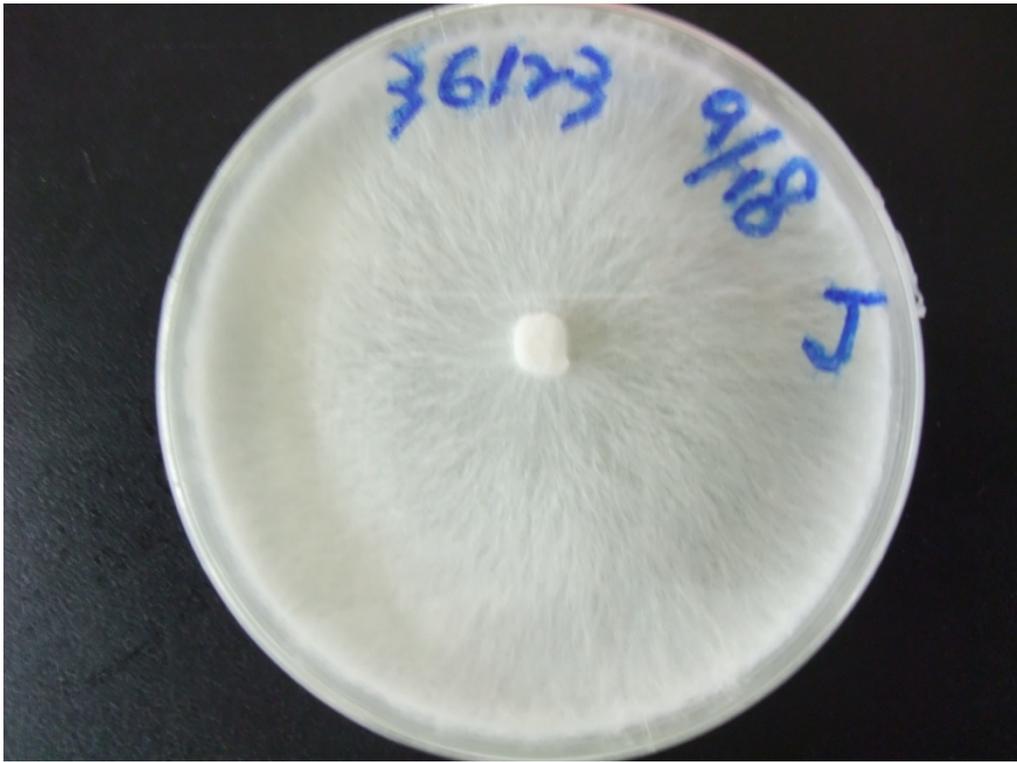


圖 2-1 靈芝固態平面培養

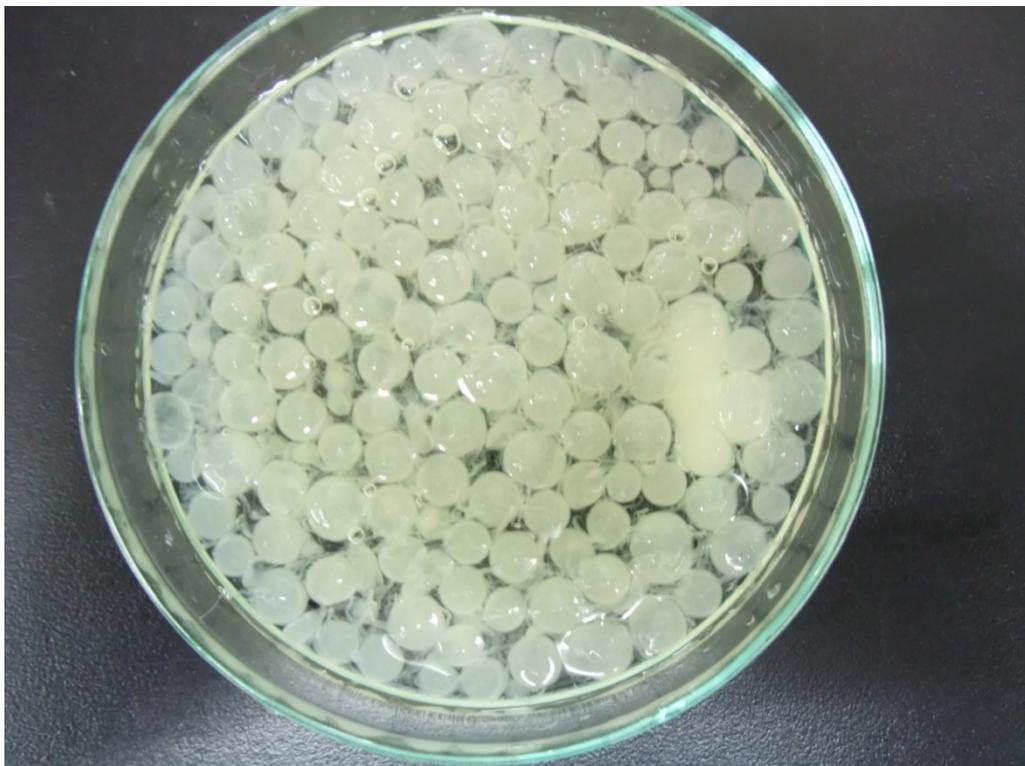


圖 2-2 靈芝液態培養 7 天形成之菌絲球(pellet)

2-1-3 靈芝的生理活性與藥理效果

靈芝是珍貴的食藥用真菌，其主要原因是靈芝含有多種具有生物活性與療效的物質，如表 2-1 所示，並於下頁簡述主要藥理作用。

表 2-1 靈芝的生理作用與藥理效果(蔡，2008)

活性物質名稱	主要藥理活性	參考文獻
多醣體(Polysaccharide)	抗腫瘤、降低血糖、保肝 解毒、消炎	(Huie et al.,2004) (Sone et al.,1985)
三帖類(Triterpenoids)	抑制癌細胞、降低血壓、 抑制血小板凝集、抑制組 織胺釋放、抗過敏反應	(Huie et al.,2004) (Mahato et al.,1997)
超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)	防止人體 DNA 受傷害 或致癌、老化、病變	(Alexotolus,1979)
免疫調節蛋白 (Immunomodulatory proteins)	促進末稍血液細胞增 殖、促使末稍淋巴球 (peripheral lymphocytes) 之增生	(林，1996)
蛋白多醣(Proteoglycan)	降血糖、加快受損細胞及 組織的修復和肝臟解毒 能力	(Hikino et al.,1985) (Wang et al., 2002)
有機鍺(Germanium)	緩和癌症末期痛感、促進 新陳代謝、防止老化、改 善體質、治療愛滋病	(劉，1990)
腺苷(Adenosine)	鎮靜、血管擴張、降溫、 鎮痛、抗缺氧、降低膽固 醇	(Misiki and Kututa,1981)
類固醇(Steroid)	抑制肝癌細胞活性、抑制 人體 PLC/PRF/5 細胞和 KB 細胞之作用	(劉，1990)
靈芝多醣幾丁質 (SACCHACHITIN)	皮膚組織再生、抑制青春 痘之細菌、抑制 tyrosinase 以及黑色素細胞之黑色 素產生	(蘇，2006) (Hung et al.,2001)

(一) 抗癌作用

在靈芝的藥理研究中，抗癌活性是最早被發現的。而靈芝多醣體被認為是抗癌活性的主要成份，且必須具有C-6側枝，(1-3)- β -D-glucopyranosyl-(1-3)-A-D-glucopyranosyl之結構，才有抗癌的效果；如有Polyol基接(1 \rightarrow 3)之連接體架之結構則可增加抗癌的效果 (王等人，1998)。

目前已知靈芝多醣體並非是直接殺死或抑制癌細胞，而是經由提高免疫力來間接表現其抗癌活性。靈芝多糖體對免疫細胞具有廣泛的作用，可促進T細胞增殖，誘導自然殺手細胞 (Natural killer cell) 數量增加，刺激巨噬細胞使其表現出吞噬能力增強、溶酶體活性增高及促進產生抑制腫瘤生長的細胞激素如IL-1,IL-2,IL-6,IFN- α ,IFN- γ 等的合成與釋放。並經由強化自然殺手細胞和巨噬細胞直接攻擊不正常的腫瘤細胞，達到防癌、抗癌的效果(許，2005)。

(二) 降血壓作用

主要為 lanostane 類之衍生物及某些三萜類化合物，可以抑制 Angiotensin converting enzyme 而達到降血壓之目的。另外三萜類化合物亦具 Cytotoxic 作用及抑制 Histamine 釋放的功能，而此即靈芝的苦味來源(王等人，1998)。

(三) 降血糖與血脂作用

主要為多醣體 glucan 之結構化合物，除具降血糖之功能外，亦具有抗發炎作用。另外 β -glucan 結構則具有降低膽固醇及血脂之功能(王等人，1998)。

(四) 保肝作用

對肝受損之動物，靈芝能降低血清中麩丙酮酸轉胺酶(Serum Glutamic Pyruvic Transaminase；SGPT)，具有消炎解毒作用，可促進肝細胞活化再生。赤芝中 ganoderic acid A 可抑制血清中 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)濃度，具有保肝作用。

(五) 免疫作用

靈芝多醣體能抑制人類單核白血球增殖，促使其分化成成熟之巨噬細胞，具有吞噬及生成細胞質超氧化物功能。並能促進介白素(interleukin IL-2)生成，顯著增強 T 淋巴細胞之活性，具有提升免疫力，改善體質功能(徐、謝，2001)。

(六) 抗氧化作用與清除自由基

赤芝中 ganoderic acid A、ganoderic acid B、ganoderic acid C 和 ganoderic acid D、lucidenic acid B 及 ganodermanontriol 具有抗氧化活性。Liu 等人(1997)認為赤芝多醣體具有強烈抗氧化與清除自由基活性(徐、謝，2001)。

(七) 抗病毒作用

赤芝子實體萃取之 ganoderic acid α 、ganoderiol F 及 ganodermanontriol 與赤芝孢子所含 ganoderic acid β 、lucidumol B、ganodermanondiol、ganodermanontriol 及 ganoleucidic acid A 等成份具有抑制人類免疫不全病毒 HIV-1 活性(徐、謝，2001)。

(八) 抑制黑色素形成作用

1996 年臺北醫學大學蘇慶華博士研究室自松杉靈芝(*Ganoderma tsugae* Merri)子實體的殘渣中萃出一種特殊成分 Sacchachitin。事實上靈芝的細胞壁除了幾丁質(佔 40%-50%)之外，還有 50%-60%的多醣，稱之為幾丁聚醣(Sacchachitin)，經過分析，其中主要含有 40 % 乙醯葡萄糖胺(N-Acetyl-Glucosamine)以及 60 %多醣體(β -1,3-D-glucan)，其結構類似蝦、蟹、昆蟲外骨骼部分及真菌所分離出不溶於水的幾丁質(Chitin)。除了將靈芝幾丁聚醣開發成癒傷敷料，還發現其具有治療青春痘與美白的功效，在美白功效方面是透過對酪胺酸酶活性的抑制進而阻止黑色素的形成(蘇，2006)。

Chien 等人(2008)將靈芝、樟芝等相關菇類之菌絲體利用不同萃取方法所得之萃取物，經體外蘑菇酪胺酸酶抑制試驗得知能有效抑制酪胺酸酶活性，其有效成份為具有美白功效之酪胺酸酶抑制劑(Chien et al.,2008)。

2-2 皮膚的構造

皮膚是人類身體最大的器官，大約佔體重的 16% ，負責保護身體的內部組織、提供免疫功能、幫助調節維持體溫以及合成維他命 D 等作用(Wickett et al, 2006)。皮膚的結構主要可以分為表皮層(Epidermis)、真皮層(Dermis)、以及皮下組織(Hypodermis)三大部份。

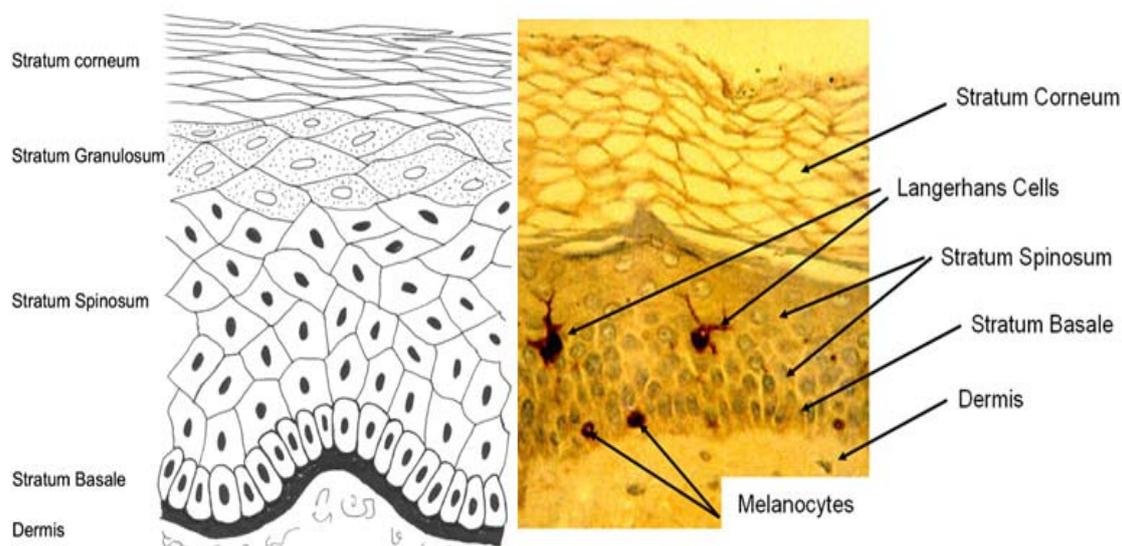


圖 2-3 表皮層主要結構和細胞型態(Wickett et al.,2006)

(一) 表皮層(Epidermis)(黃，1990)

表皮層厚度大約為 $60\ \mu\text{m}$ ~ $300\ \mu\text{m}$ ，基本構造是由兩種細胞所組成，依型態可分為角質細胞(keratinocyte)與樹突狀細胞(dendritic cell)。表皮層存在於皮膚最外層，又可分為五層，由表層至深層分別為角質層(stratum corneum)、透明層(stratum lucidum)、顆粒層(stratum granulosum)、有棘層(stratum spinosum)與基底層(stratum basale)。

1. 角質層(stratum corneum)：

由好幾層薄的角質板重疊排列在一起而形成。這層細胞是由下往上生長的顆粒及細胞質乾燥變性後形成的纖細的角質板。角質的主要成份是一種稱為「角蛋白」的蛋白質，它存在有保濕作用因子(moisturizing factor)，可防止表面的水份蒸發，並有很強的吸水性，而使得皮膚表面不至於太乾燥。角質層通常可藉由體內的新陳代謝而很快的更新。

2. 透明層(stratum lucidum)：

位於角質層與顆粒層之間，為一種透明的薄層，只存在於手掌或腳掌處。此層帶陽性靜電，作用為中和外來的鹼性物質。

3. 顆粒層(stratum granulosum)：

在手掌和腳掌有人體最厚的顆粒層，這層大約由一至二層扁平、紡錘狀的細胞所構成，這些細胞的細胞質中含有多量的角質層透明質(keratohyaline)，此層帶陰性靜電，可中和外來的酸性物質。

4. 有棘層(stratum spinosum)：

有棘層是由數層稍不規則的多面體或圓形的細胞所構成。愈往外層移動，細胞愈呈扁平狀。因為細胞的外面有上皮纖毛突出而形成棘狀，故得有棘層之名。其細胞之間有空隙，空隙中流著淋巴液，這是補給表皮的營養物。此外，有棘層與基底層會進行細胞分裂，製造新的細胞。

5. 基底層(stratum basale)：

是由一系列圓柱型的細胞和穿插於其中的色素形成細胞所構成的。黑色素細胞大多位於基底層，其中的色素形成細胞能夠產生黑色素。此外，基底層也是製作表皮細胞的根基，只要這層不被破壞，皮膚即具有再生能力，即使角質層、顆粒層及有棘層受創傷，仍有完全回復且不留下任何痕跡的可能。

(二) 真皮層(Dermis) (中村，1992)(吳，2002)

真皮層緊連在基底層之下，是皮膚主要功能運作的地方，由結締組織所構成。真皮層佔皮膚厚度約 95% 的比例，包含了膠原纖維、彈性纖維、基底質、纖維母細胞、神經、血管、淋巴管和皮膚的附屬器官等，其中以膠原纖維、彈性纖維、基底質三項，佔了真皮的大部分，其功能與維持皮膚的彈性與張力有著密不可分的關係。

(三) 皮下組織(Hypodermis) (中村，1992)(吳，2002)

皮下組織位於皮膚最底層，構成皮下組織的主要是脂肪，又稱皮下脂肪。具保存體溫，並且提供緩衝機械性撞擊的功能。

2-3 黑色素細胞及黑色素的形成

黑色素細胞是存在於所有哺乳動物的皮膚和毛髮中的色素生成細胞。它們位於皮膚表皮的基底層，在這裡，它們製造出含有黑色素的色素顆粒，又稱為黑色素體。黑色素細胞中的黑色素體會藉由細胞質的流動或受到細胞骨架的推擠，慢慢往樹突狀方向移動，最後轉移至表皮的角質細胞，這些黑色素可以幫我們阻隔掉陽光，避免皮膚受到紫外線的傷害，並且形成我們的膚色(Brenner et al.,2006)。黑色素合成和黑色素體轉移的過程不斷地於表皮層進行更新代謝，但若皮膚長期曝露在紫外線照射下，黑色素細胞便會不斷過量的被刺激活化，產生所謂的曬黑現象(Wickett et al.,2006)。

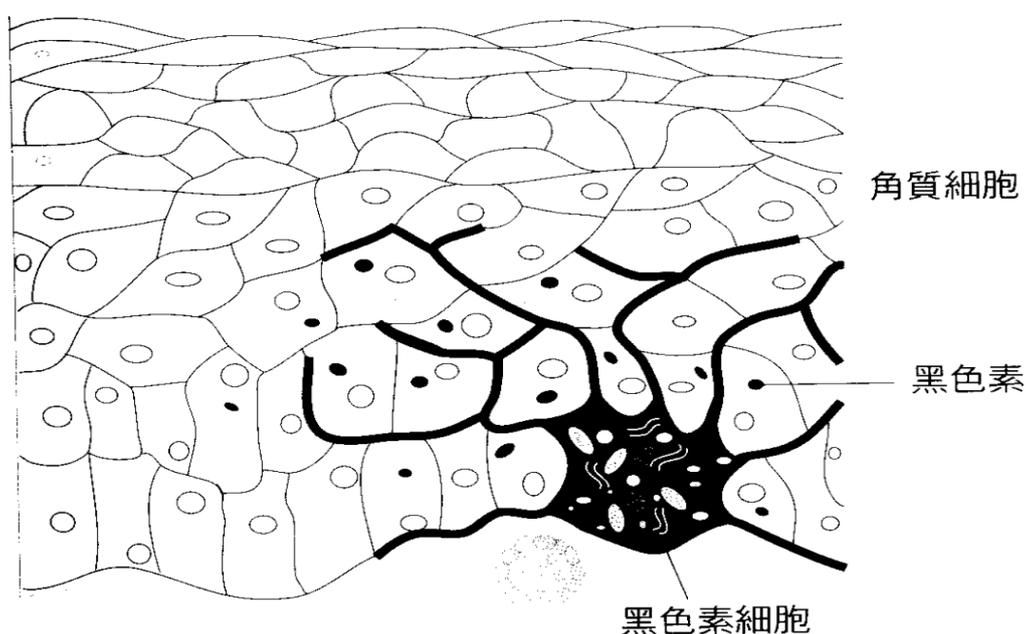


圖 2-4 黑色素細胞將形成的黑色素送往角質細胞(吳，2002)

2-4 黑色素生合成機轉

黑色素的形成是由黑色素細胞內被稱為黑色素體(melanosome)的小顆粒所合成。主要以酪胺酸酶(tyrosinase)促使黑色素形成之重要酵素，進行兩種不同催化黑色素生成反應(Prota,1988)。黑色素生成啟動的第一個步驟是由酪胺酸酶催化酪胺酸氧化形成 dopaquinone。在黑色素合成過程中，第一步是速率控制步驟，因為其餘的反應程序可以在生理 pH 值下自發反應。隨後 dopaquinone 會自氧化轉換為 dopa 和 dopachrome，而 dopa 也可透過酵素的催化再次氧化為 dopaquinone。接著，dopachrome 透過自發性脫羧基作用形成 dihydroxyindole (DHI)，或經由 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)催化異構作用為更穩定的 dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)，DHI 會經酪胺酸酶氧化為 indole-5,6-quinone，最後聚合為真黑色素(eumelanin)(Tomohiro et al.,2005)。因為 cysteine 和 glutathione 的存在，dopaquinone 與之結合形成 cysteinyl-dopa 和 glutathionyl-dopa，最後衍生為褐黑色素(pheomelanin)。除了真黑色素(eumelanin)與褐黑色素(pheomelanin)，其它具有與酪胺酸不同酚單體的「黑色素」稱為異黑色素(allomelanin)。黑色素在人體上扮演著很重要的角色，它可保護人體皮膚遠離有害的紫外線輻射影響，而且也決定我們的表型的外觀(Chang,2009)。

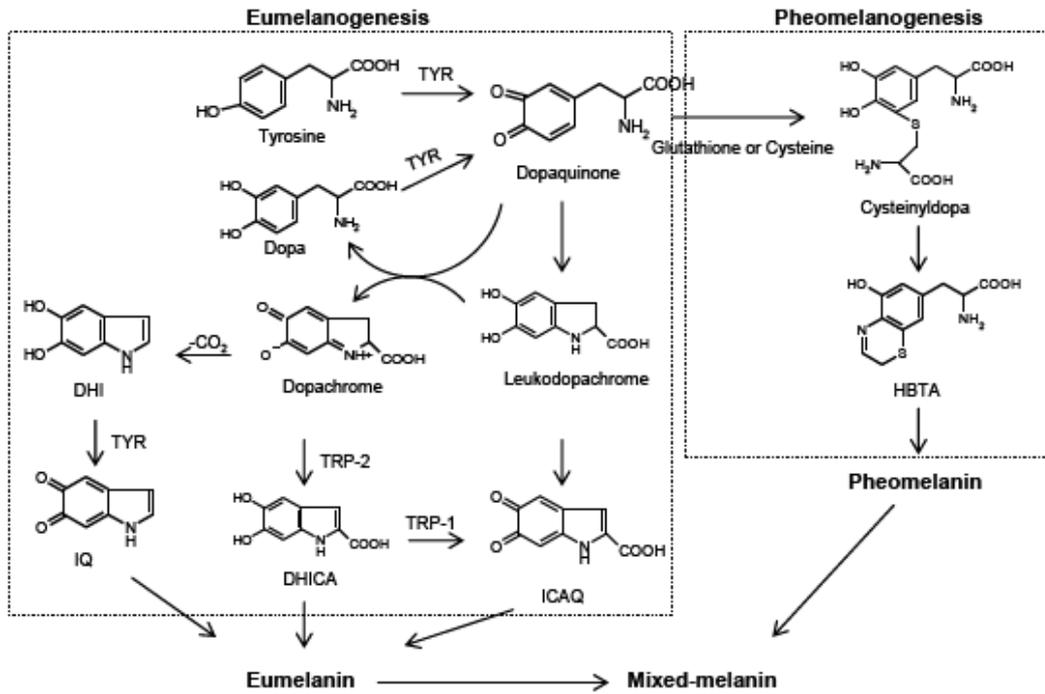


圖 2-5 黑色素生合成途徑(Chang, 2009)

註：TYR, tyrosinase； TRP, tyrosinase related protein；

Dopa, 3,4-dihydroxyphenylalanine； DHICA, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic

acid； DHI, 5,6-dihydroxyindole； ICAQ, indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone；

IQ, indole-5,6-quinone； HBTA, 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine .

2-5 酪胺酸酶的生化特性與反應機制

最早在 1895 年研究發現 *Russula nigricans*，其切口處之果肉，因曝露在空氣中而由紅轉黑。一些研究已發現，造成此顏色變化的酵素廣泛分布於微生物、植物、動物乃至人體中，之後確認此酵素為酪胺酸酶。在一般菇類、人體黑色素細胞中皆可發現酪胺酸酶的存在，其活性中心為含有雙核銅離子的集團，在高等植物及真菌中則是以不同異構型態如成熟態、不成熟態、激發態存在(Seo et al.,2003)。

酪胺酸酶(tyrosinase , EC 1.14.18.1)是一種含銅的多酚氧化酶(polyphenol oxidase)，為催化黑色素(melanin)生合成的關鍵酵素，在黑色素生合成之過程中扮演重要角色。此過程分為二部份，酪胺酸酶先將 monophenol 羥化後變成 o-diphenol (monophenolase or cresolase activity)；再將 o-diphenol 去氫氧化成 o-quinones (diphenolase or catecholase activity)，形成 o-quinones 後會以自發性作用再經環化反應形成黑色素(Chang , 2009)。

由於酪胺酸酶在黑色素生成中有著關鍵的作用，因此，要達到美白效果其機轉為減少酪胺酸酶活性及其功能性，主要有以下幾種機制：(1)阻止酪胺酸酶轉譯與醱化作用(2)抑制不同型態之酵素(3)黑色素的還原作用(4)調控基因轉錄作用(Briganti et al.,2003)。

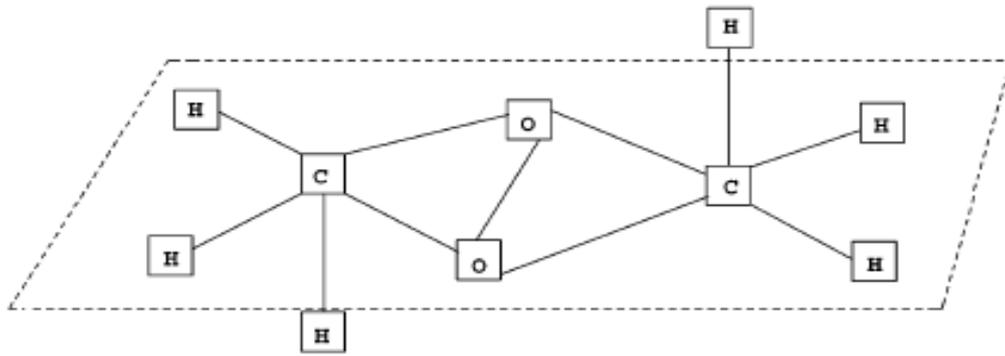


圖 2-6 酪胺酸酶活性中心結構 C = Cu ion, O = oxygen, and H = His-N (Seo et al., 2003)

2-6 防止或抑制黑色素形成之機制

黑色素是形成人體膚色的主要色素之一，它是由位於表皮基底層的黑色素細胞所分泌。但若過度曝曬於陽光下，可能造成黑色素過度分泌，產生如黃褐斑、曬斑、炎症、色素沉著等，易導致日後惡性致命皮膚癌(Wang et al.,2006)。

通常要防止黑色素生成而達到美白目的，其方法有以下幾種：(1) 避免曝曬於紫外線下 (2) 抑制黑色素細胞代謝和增殖 (3) 抑制酪胺酸酶 (tyrosinase) 活性 (4) 促進黑色素淡化，或還原黑色素 (5) 加速黑色素細胞代謝，使其剝離表皮(Wang et al.,2006)。

若要達到減少色素形成(depigmentation)可藉由調控 (1) tyrosinase 的轉錄及其活性、tyrosinase related protein-1 (TRP-1)和 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 之表現或 peroxidase 活性 (2) 角質細胞對黑色素顆粒體(melanosome)攝入和分佈

情況 (3) 黑色素和黑色素顆粒體(melanosome)分解情形與其轉移到角質細胞造成色素形成之狀況如圖 2-7 所示(Briganti et al.,2003)。

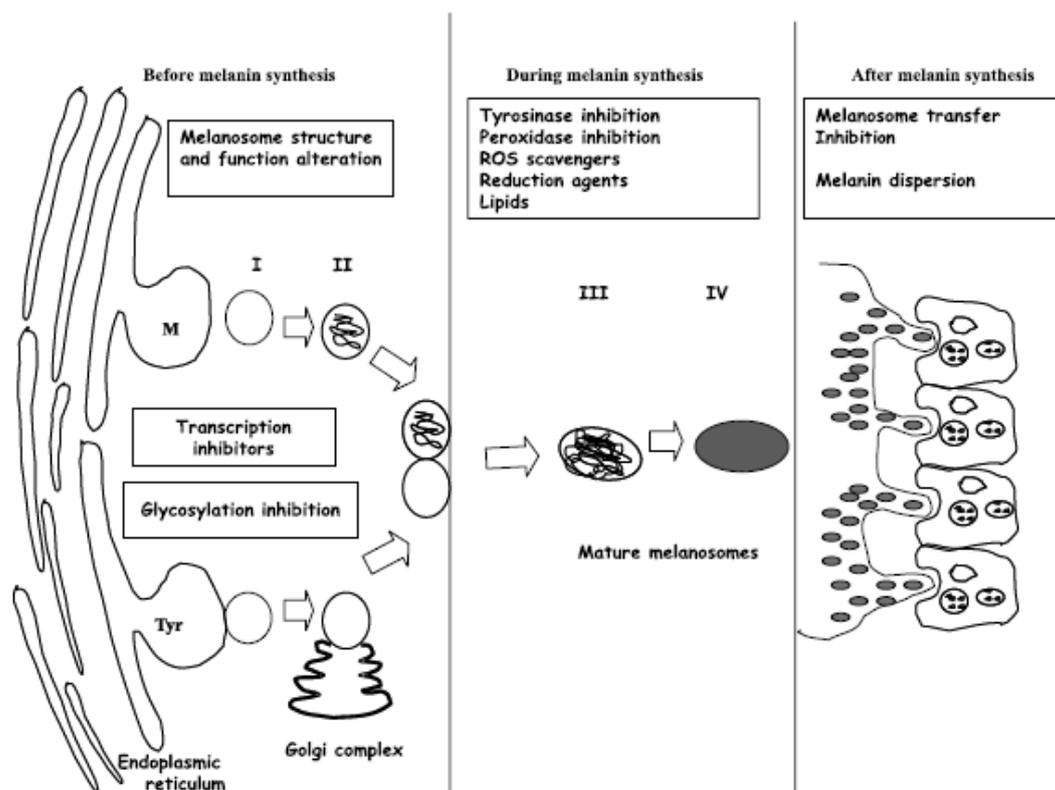


圖 2-7 影響黑色素生成路徑之作用機轉(Briganti et al., 2003)

關於降低色素沉著功效之評估，可參考圖 2-8 所示，利用不同實驗模式及方法來進行分析；初步評估減少色素之形成特性可利用純化的 tyrosinase 和其他黑色素生成酶包括 peroxidase 來測試其抑制作用，之後利用培養黑色素細胞進行細胞毒性測定與黑色素生成作用的評估；另外，可利用細胞圖像分析技術測定黑色素細胞中黑色素含量；建立細胞共培養系統，模擬人體皮膚狀況來進行試驗；亦可藉由 UV 照射、 α -MSH 誘導或發炎前驅物之細胞激素的刺激作用下，篩

選具有抑制色素形成作用能力之試劑；後期在生物體內評估模式以非侵入性技術

來測定減少色素生成之活性，例如：分光光譜法和色素形成之比值等。

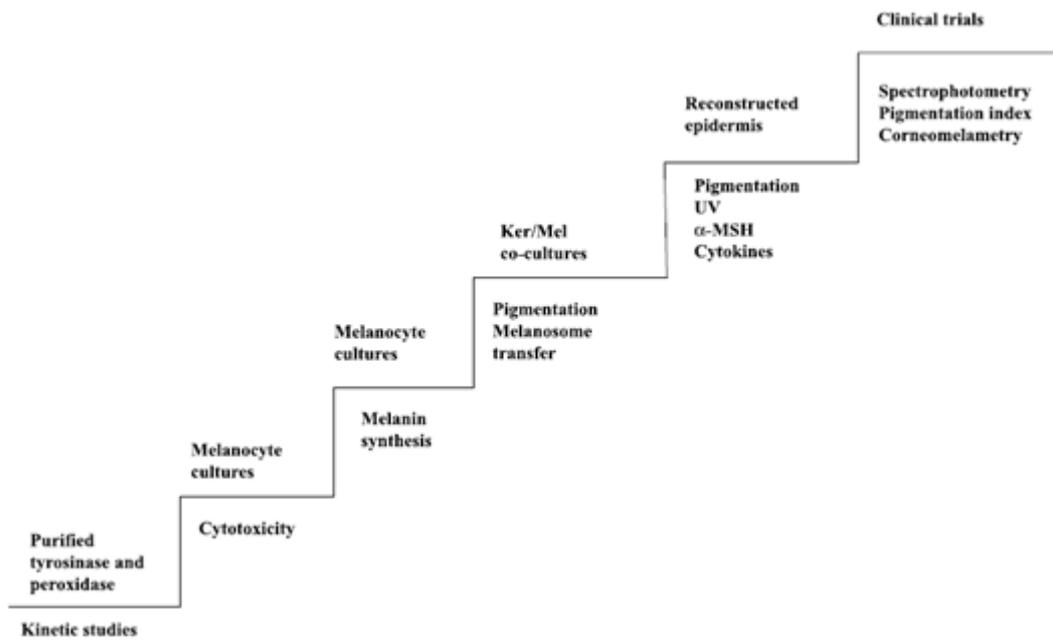


圖 2-8 評估減少色素生成之實驗流程模式(Briganti et al., 2003)

2-7 美白成分(楊等人，2005)(Briganti et al.,2003)

目前美白成分種類眾多，其主要依據美白化粧品中常用有效成分的作用原理，分類如下：

1. 黑色素生合成前

- a. 酪胺酸酶的轉錄：維生素 A 酸(Tretinoin)
- b. 酪胺酸酶糖基化：PaSSO₃Ca

2. 黑色素生合成中

- a. 抑制酪胺酸酶的活性：對苯二酚(hydroquinone)、熊果素(Arbutin)、維生素 C、壬二酸(Azelaic acid)
- b. 抑制過氧化酶的活性：酚類(Phenols)、鄰苯二酚(catechols)
- c. 還原氧化型黑色素及抑制活性氧(Reactive oxygen species,ROS):維生素 C 衍生物、硫辛酸(Thioctic acid)

3. 黑色素生合成後

- a. 酪胺酸酶的降解：亞油酸(Linoleic acid)
- b. 抑制黑色素顆粒體的轉移：Serine protease inhibitors、Niacinamide
- c. 加速角質細胞的代謝，促進黑色素脫落剝離：乳酸(Lactic acid)、乙醇酸(Glycolic acid)、甘草苷(Liquiritin)

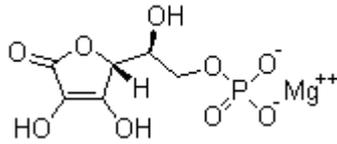
表 2-2 干擾黑色素生合成之美白成分作用機制(Briganti et al.,2003)

<i>Before melanin synthesis</i>	
Tyrosinase transcription	
C ₂ -ceramide	Tretinoin
Tyrosinase glycosylation	
PaSSO ₃ Ca	
<i>During melanin synthesis</i>	
Tyrosinase inhibition	
Hydroquinone	Kojic acid
4-hydroxy-anisole	Methyl Gentisate
4-S-CAP & derivatives	Ellagic Acid
Arbutin	Resveratrol
Aloesin	Oxyresveratrol
Azelaic acid	
Peroxidase inhibition	
Methimazole	Phenols/catechols
Product reduction and ROS scavengers	
Ascorbic acid	α-Toc
Ascorbic Acid Palmitate	D, L-α TF
VC-PMG	Hydrocumarins
Thioctic acid	
<i>After melanin synthesis</i>	
Tyrosinase degradation	
Linoleic acid	α-Linolenic acid
Inhibition of melanosome transfer	
Serine protease inhibitors	Niacinamide
Lecthins and Neoglycoproteins	RW-50353
Soybean/milk extracts	
Skin turnover acceleration	
Lactic acid	Retinoic acid
Glycolic acid	Linoleic acid
Liquiritin	
PaSSO ₃ Ca, Calcium D-pantetheine-S-sulphonate; 4-SCAP, 4-S-cyst-aminylphenol; VC-PMG, magnesium-L-ascorbyl-2-phosphate; α-Toc, α-tocopherol; α-Toc-F, α-Tocopherol ferulate.	

目前依行政院衛生署核准，可使用在化妝品且可訴求美白之成份(表 2-3)包括：維生素 C 磷酸鎂(Magnesium ascorbyl phosphate, MAP)、維生素 C 磷酸鈉(Sodium ascorbyl phosphate)、維生素 C 糖苷(Ascorbyl glucoside, AA-2G)、麴酸(Kojic acid)、熊果葉素(Arbutin)、鞣花酸(Ellagic acid)、洋甘菊提取物(Chamomile ET)、Potassium Methoxysalicylate、傳明酸(Tranexamic acid)、氧乙基維生素(3-O-Ethyl Ascorbic Acid)、二丙基聯苯二醇(5,5'-Dipropyl-Biphenyl-2,2'-Diol)等。

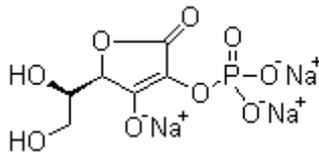
以下針對這些美白成分做介紹：

1. 維生素 C 磷酸鎂



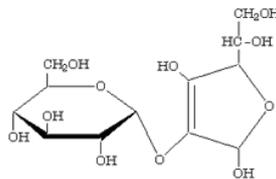
維生素 C 磷酸鎂鹽(Magnesium L-Ascorbyl-2-Phosphate)經皮膚吸收後，可以被皮膚內的磷酸鹽分解酵素所分解，而釋出維生素 C 來執行還原的工作。而 MAP 較維生素 C 安定，較不易氧化，且有抑制酪胺酸酶酵素活化的功能。能還原黑色素及抑制黑色素的生成。我國衛生署規定產品添加維生素 C 磷酸鎂濃度在 3% 以下者可標美白產品。

2. 維生素 C 磷酸鈉



維生素 C 磷酸鈉(Sodium ascorbyl phosphate)為維生素 C 衍生物，能淡化斑點，抑制黑色素形成。我國衛生署規定產品添加維生素 C 磷酸鈉濃度在 3% 以下者可標美白產品。

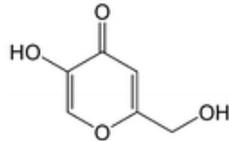
3. 維生素 C 糖苷



維生素 C 糖苷(Ascorbyl glucoside, AA-2G) 是一種高機能性維生素 C 誘導體，可將 Dopaquinone 還原成 Dopa 或將深色氧化型黑色素還原成淺色的黑色素，減緩黑色素的合成。其還原美白的作用原理溫和，且維生素 C 能預防光老化，

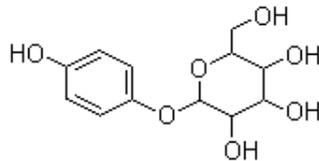
並刺激肌膚膠原蛋白增生。我國衛生署規定產品添加維生素 C 糖苷濃度在 2% 以下者可標美白產品。

4. 麴酸



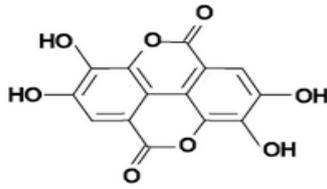
麴酸(Hydroxyl-methyl-5-hydroxy- σ -pyrone)是由麴黴菌屬(*Aspergillus*)和青黴菌(*Penicillium*)的發酵液中提煉而得，其作用機制為藉由與酪胺酸酶活性關係密切之銅離子螯合，因而抑制酪胺酸酶活性，使黑色素分泌量減少，因而具有美白效果。我國衛生署規定產品添加麴酸濃度在 2% 以下者可標美白產品。

5. 熊果葉素



熊果葉素(Hydroquinone- β -D-glucopyranoside)，其作用機制與對苯二酚相同，都是阻止酪胺酸酶的活化作用，而抑制黑色素生成，淡化已形成的黑色素達到美白效果，因比對苯二酚多帶了葡萄糖分子，所以刺激性較低，副作用較對苯二酚溫和。我國衛生署規定產品添加熊果苷濃度在 7% 以下者可標美白產品。

6. 鞣花酸



鞣花酸為一種多元酚，廣泛存在蔓藤類漿果(Cane berry)、天竺葵、尤加利、綠茶中，具有強抗氧化能力。日本獅王公司(Lion Corporation, Japan)分別以鞣花酸對菇類及老鼠 B16 細胞之酪胺酸酶進行抑制試驗，發現鞣花酸可與酪胺酸酶活性中心銅離子結合，而抑制酪胺酸酶活性。此外，利用褐色天竺鼠(guinea pig)進行皮膚試驗，結果顯示鞣花酸對天竺鼠皮膚之酪胺酸酶具有抑制效果。我國衛生署規定產品添加鞣花酸濃度在 0.5%以下者可標美白產品。

7. 傳明酸

又稱氮甲環酸，在醫學上本作為凝血劑用途，之後被發現用於美容上有極佳的美白效果，能有效抑制酪胺酸酶的活性，減緩黑色素的合成。我國衛生署規定產品添加傳明酸濃度限量為 2%~3%。

表 2-3 行政院衛生署公告核准之美白成分與限量

成分名稱	限量	效用說明
維生素 C 磷酸鎂 (Magnesium Ascorbyl Phosphate)	3%	美白
維生素 C 磷酸鈉 (Sodium Ascorbyl Phosphate)	3%	美白
維生素 C 糖苷 (Ascorbyl Glucoside)	2%	美白
麴酸 (Kojic Acid)	2%	美白
熊果葉素 (Arbutin)	7%	美白(製品中所含之不純物(對苯二酚

鞣花酸(Ellagic Acid)	0.5%	Hydroquinone)應在 20ppm 以下) 美白
洋甘菊提取物(Chamomile ET)	0.5%	防止黑斑、雀斑成分
Potassium Methoxysalicylate	1~3%	抑制黑色素形成及防 止色素斑的形成，美 白
傳明酸(Tranexamic acid)	2~3%	抑制黑色素形成及防 止色素斑的形成，美 白
氧乙基維生素(維生素 C 衍生物)(3-O-Ethyl Ascorbic Acid)	1~2%	抑制黑色素形成及防 止色素斑的形成，美 白
二丙基聯苯二醇(5,5'-Dipropyl-Biphenyl-2,2'-Diol)	0.5%	抑制黑色素形成及防 止色素斑的形成，美 白

2-8 美白相關研究

愛美是人的天性，由於東方人屬於黃膚色人種，所以美白產品在東方地區國家可說是最熱門之產品。而在美白抑制劑之研究試驗上，多以測試(一) 是否對蘑菇酪胺酸酶(mushroom tyrosinase)具有抑制活性；(二) 利用老鼠 B16 細胞試驗是否可以減緩黑色素生成；(三) 利用動物試驗偵測產品實際使用效果，來進行效果分析。近來人們對化妝保養品觀念逐漸轉向天然不傷害皮膚且具療效，因此許多天然萃取物或中草藥之有效成份的開發愈趨熱絡。

Chien(2008)等人針對幾種擔子菌屬之菇類進行酪胺酸酶抑制活性之試驗，所測試之菇類有靈芝(*Ganoderma lucidum*)，樟芝(*Antrodia camphorata*)，姬松茸(*Agaricus brasiliensis*)和蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)，其中靈芝(*Ganoderma lucidum*)呈現出顯著抑制酪胺酸酶活性之效果(IC₅₀ 值 0.32 mg/ml)(Chien et al.,2008)。亦有相關研究將適量中藥添加至藥食用真菌之培養基中，利用真菌強大的分解代謝能力，不僅可對中藥中的纖維、糖類、蛋白質等營養物質加以利用，且在代謝過程中可能對中藥的一些成分(如黃酮、多酚以及三萜皂甘等)進行轉化與修飾，從而提高有效成份在複合劑中的比例和效價；中藥的某些成份亦可促進藥用真菌的生長或活性物質的積累，發酵後的代謝產物可能會起到某種協同增效作用。大陸學者丁重陽等人在添加黃芩對靈芝發酵液中酪胺酸酶抑制劑活性的影響試驗中，證明了中藥的添加對於靈芝發酵產物的酪胺酸酶抑制活性有顯著提高(丁等人，2009)。

文獻記載，許多中草藥具有各種美膚效能，且其屬於天然物，較一般使用化學物添加之化妝品安全性更為提高。有研究將中草藥經由米麴菌發酵作用，探討不同中草藥經米麴菌代謝後功能性的改變，並將之應用於酪胺酸酶活性抑制試驗及 B16 小鼠黑色素細胞試驗上(胡，2007)(曾，2007)。另有學者研究 25 種傳統的中藥材，可能是有益於皮膚美白和皮膚健康的，發現其中 4 種中草藥，牽牛(*Pharbitis nil*)，國槐(*Sophora japonica*)，雞血藤(*Spatholobus suberectus*)，及桑葉(*Morus alba*)，具有抑制酪胺酸酶活性之作用(Wang et al.,2006)。大陸則有學者研究 27 味中藥醇提物對酪胺酸酶體外活性的影響，結果顯示，在各種中藥的 50% 乙醇(v/v)提取液中，紅花(*Carthamus tinctorius L.*)、楊梅葉(*Myrica rubra S.*)、黃芩(*Scutellaria baicalensis G.*)和綠茶(*Camellia sinensis L.*)皆具有不錯之酪胺酸酶活性抑制效果，在美白化妝品領域有潛在的應用價值。

此外，韓國有學者研究一種鹽生植物 *Salicornia herbacea* (SH)，對 SH 水提取物在人體皮膚纖維細胞 (HDFs) 和 B16 黑色素瘤細胞的抗氧化和美白效果進行了調查。SH 在蘑菇酪胺酸酶試驗上證明具有抑制 DOPA 氧化酶活性之效果，且為 dose-dependent，SH (100 $\mu\text{g/ml}$)之酪胺酸酶抑制率為 54%。與熊果素(arbutin)(50 μM)相比具有顯著之功效(Sung et al.,2009)。日本亦有許多利用天然物之水提取物或酒精萃取物在酪胺酸酶活性抑制或老鼠黑色素瘤細胞抑制黑色素生成之試驗(Tomohiro et al.,2005)(Masuda et al.,2007)。此類以「天然」為訴求之化妝保養品的開發將是未來深具潛力之商品。

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗菌株及細胞株

本實驗所採用之菌株為靈芝屬之赤靈芝 *Ganoderma lucidum* (BCRC36123)，係購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，菌株以生物資源中心所建議之 PDA 做為斜面培養基，接菌完畢後於 30°C 培養箱生長，之後置於 4°C 冰箱中保存備用，每 2 個月更新一次。

細胞株為購買自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心之 B16-F10 小鼠黑色素瘤細胞(BCRC60031)，屬於貼附型細胞(adherent-type cell)，培養於 37 °C、5%CO₂ 的細胞培養箱。

3-2 實驗藥品

本研究所使用藥品名稱規格如表 3-1 所示：

表 3-1 實驗藥品

藥品名稱	廠牌	規格
Glucose	華興化學有限公司	for cultivation
D-(+)-glucose	SIGMA	for standard curve
Yeast extract	DIFCO	
KH ₂ PO ₄	SHOWA	試藥特級
MgSO ₄ · 7H ₂ O	聯工化學試藥	EP 級
Potato dextrose agar (PDA)	DIFCO	

NaOH	SHOWA	EP 級
HCl	林 純藥工業株 式會社	試藥 1 級
H ₂ SO ₄	SHOWA	昭和 1 級
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	聯工化學試藥	EP 級
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	SHOWA	EP 級
L-tyrosine	SIGMA	
Tyrosinase mushroom (5370 units/mg)	SIGMA	
Phenol	林 純藥工業株 式會社	試藥 1 級
Na ₂ CO ₃	SHOWA	試藥特級
Papain	雙安	
Celluclast	恒洲實業股份有 限公司	700EGU/g EGU is short for Endo-Glucanase Units
Neutrase	恒洲實業股份有 限公司	
Folin & Ciocalteus phenol reagent	德國 Merck 公司	
維生素 C(Ascorbic acid)	SIGMA	
麴酸(Kojic acid)	SIGMA	
95% Ethanol	景明	
99% Ethanol	景明	
Methanol	ECHO	
DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO	Cat.No. 12100.038
FBS (Fetal bovine serum)	Biological	Cat.No. SV30096.03
Penicillin/Streptomycin	Biological	
L-Glutamine	BioWhittaker	200mM/100X

3-3 實驗儀器與設備

本研究所使用實驗儀器與設備如表 3-2 所示：

表 3-2 實驗儀器與設備

儀器設備名稱	廠牌	規格型號
桌上型 pH-mV-°C 酸鹼度計	美國 EUTECH 公司	Cyberscan pH 510
電磁加熱攪拌器	德國 IKA 公司	C-MAG HS7
無塵無菌操作台	台灣亮盛公司	JW-4N
高壓滅菌釜	台灣宏霖儀器公司	HL-340
試管震盪機	德國 IKA 公司	MSI minishaker
迴轉式震盪培養箱	台灣健鑫儀器	OSI-500
往復式震盪恆溫水槽	台灣健鑫儀器	SB-302
均質乳化機 (polytron)	德國 IKA 公司	ULTRA-TURRAX T25
高速中型離心機	德國 HETTICH 公司	Universal-32R
高速冷凍離心機	日本 SANYO	HARRIER18/80
紫外光-可見光譜儀	美國 Thermo 公司	GENESYS UV10
微電腦蒸餾水製造機	英國 FISTREEM 公司	WSC044
超純水製造機	美國 MILLIPORE 公司	Simplicity
超音波震盪機	美國 BRANSON 公司	5210
葡萄糖分析儀	YSI	2300 STAT
冷凍乾燥機	丹麥 HETO	CT-110
烘箱	台灣日升	DV-452
CO ₂ 培養箱	美國 Thermo	
微孔盤分析儀	英國 Dynex	MRX II

3-4 分析方法

3-4-1 pH 值測定

使用 SUNTEX pH meter 測其 pH 值。

3-4-2 菌體 Biomass

取培養發酵液，以 100mesh 篩網過濾，再以蒸餾水沖洗菌體 3-5 次，之後將過濾後的菌體冷凍乾燥抽乾後，即可測量其菌體乾重量。

3-4-3 葡萄糖濃度測定

吸取適量的發酵過濾液，經適當稀釋後，再利用 YSI 2300stat 測定 glucose。

3-4-4 多糖濃度測定

酚-硫酸比色法(Phenol-sulfuric acid assay)

1.測定原理

利用許多醣類具有的還原能力：單醣、寡糖、多醣與它們的衍生物，包括二甲醚自由基團或具有還原能力的基團，其與酚及濃硫酸作用時會反應生成橙黃色溶液，再以分光光度計測量其在可見光 490nm 波長的吸光值。

2.標準曲線製作

(1) 標準品為 D(+)-glucose，配製其濃度範圍為 0.01~0.2mg/ml，並以蒸餾水做為空白對照組。

(2) 取以上溶液 2ml 置於試管中，各加入 1ml 濃度 5% 酚溶液，並於 10-20

分鐘內各加入 5ml 濃度 95.5%濃硫酸溶液，均勻混合後靜置 10 分鐘。

(3) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測

其在波長 490nm 下之吸光值，即可繪出糖濃度與吸光值關係圖。

3. 樣品分析

(1) 將多醣回溶於同體積(發酵液)的蒸餾水中，離心後取上清液，用適量的

蒸餾水加以稀釋。

(2) 取以上經稀釋的多醣溶液 2ml 置於試管中，加入 1ml 濃度 5% 酚溶液，

並於 10-20 分鐘內各加入 5ml 濃度 95.5%濃硫酸溶液，均勻混合後靜置

10 分鐘。

(3) 放入 25°C 恆溫水槽水浴反應 15 分鐘，待呈色穩定後，以分光光度計測

其在波長 490nm 下之吸光值，對照標準曲線即可求得樣品的多醣濃度。

3-4-5 總酚類含量測定(Determination of Total Phenolics)

總酚類含量測定係採 Folin-Ciocalteu 法(Wang,2006)。取 0.3ml 甲醇萃取液，加入 6ml 2% 的 Na_2CO_3 ，混合均勻反應 2 分鐘。再加入 0.3ml 50% 的 Folin-Ciocalteus reagent，混合均勻反應 30 分鐘。以分光光度計測其在 730nm 下的吸光值。再由已知濃度的標準 Gallic acid 檢量線即可算出每克樣品中所含沒食子酸當量 Gallic acid equivalent(GAE)，得知總酚含量。

3-4-6 離體抑制酪胺酸酶活性試驗試藥配製

(1) Sorensen 氏磷酸緩衝溶液(pH6.8)：

配製(I) 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.34g/200ml 和(II) 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.52g/200ml，取(I) 122.5 ml、(II) 127.5 ml 混合後定容至 500 ml，以 pH meter 測其 pH 值。

(2) L-tyrosine solution (0.3 mg/ml)：

精秤 L-tyrosine (30 mg)以磷酸緩衝溶液定容至 100 ml，以超音波震盪機震盪 5 min，置於 4°C 冷藏。

(3) 425 units/ml tyrosinase：

取 5.4mg (3933units/mg)，加磷酸緩衝溶液定量至 50ml，震盪混合均勻後，分裝並置於-20°C 保存待用。實驗操作時須置於碎冰上解凍，以維持其活性。

(4) 樣品萃取物溶液

將各萃取物溶液 pH 調至 6.8。

3-4-7 離體抑制酪胺酸酶活性試驗測定方法(Chien et al., 2008)

取不同之待測物上清液 1ml 至試管中，控制組以磷酸緩衝溶液代替代測樣品。再各加入 0.9ml pH6.8 磷酸緩衝溶液及 1ml L-tyrosine 溶液混合，置於 37°C 往復式震盪恆溫水槽中震盪 10 分鐘後，再加入 0.1ml tyrosinase 後使其反應 20 分鐘，之後以紫外光-可見光譜儀檢測其在 475nm 下的吸光值。

	實驗組		控制組	
	B	Bo	A	Ao
待測物溶液	1ml	1ml	0ml	0ml
磷酸緩衝液	0.9ml	0.9ml	1.9ml	1.9ml
L-tyrosine	1ml	1ml	1ml	1ml
Tyrosinase	0.1ml	0.1ml 純水	0.1ml	0.1ml 純水

酪胺酸酶抑制率計算公式：

$$\text{Tyrosinase Inhibition(\%)}=[1-(B-Bo)/(A-Ao)]\times 100\%$$

A：控制組添加 Tyrosinase 反應於 475nm 所測得吸光值。

Ao：控制組未添加 Tyrosinase 反應於 475nm 所測得吸光值。

B：實驗組添加 Tyrosinase 反應於 475nm 所測得吸光值。

Bo：實驗組未添加 Tyrosinase 反應於 475nm 所測得吸光值。

3-4-8 細胞毒性測試

利用 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent 來進行細胞存活率的測定。

於 96 孔盤加入 B16-F10 細胞懸浮液(5×10^3 cells/well)，培養 24 小時使細胞貼附，

之後加入各濃度樣品，使總體積為 100 μ l，反應 24 及 48 小時後，加入 10 μ l 的

WST-1 溶液，再培養 4 小時，然後以 ELISA reader 測其在 450nm 下的吸收值。

$$\text{細胞存活率(\%)}=\text{樣品組吸收值}/\text{控制組吸收值}\times 100\%$$

3-5 實驗方法

3-5-1 靈芝菌種培養與保存

3-5-1-1 菌種斜面試管保存

本實驗以試管斜面保存菌種。配製 39g/l 濃度的 PDA (Potato Dextrose Agar) 作為斜面培養基，滅菌後，置於無塵無菌操作檯中，待 PDA 冷卻硬化，將靈芝菌種接種於試管斜面培養基上，於 30°C 培養七天後，放入 4°C 冰箱中保存備用，約二個月更新一次。

3-5-1-2 培養皿平面培養與接菌活化

配製 39g/l 濃度的 PDA 作為培養皿平面培養基，接菌時取一已長有靈芝菌絲之斜面菌種，以白金鉤刮取一小塊移至空白培養皿中央，之後放入 30°C 培養箱中靜置活化培養。

3-5-1-3 種菌製備

本實驗研究所採用的液態培養基成份如下：Yeast extract 3.0g/l、Glucose 20.0g/l、 KH_2PO_4 1.0g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l，並利用 0.1N HCl，將液態培養基之 pH 調整為 4。

裝於 250ml 三角瓶的培養基經滅菌過後，取已經生長活化之平面培養菌絲，以自製菌絲切割器切成四個單位菌絲塊(0.5cm×0.5cm)，以白金鉤將菌絲塊接入

液態基礎培養基中，並置於 30°C 迴轉式恆溫培養箱，以轉速 100rpm 培養 7 天做為種菌。

3-5-2 三角瓶液態培養試驗

此試驗之主要目的，為探討不同培養天數，發酵液對黑色素生成抑制之影響。培養條件為，使用 250 ml 三角瓶，其操作體積為 100 ml，培養溫度為 30°C。試驗方法，配置 100 ml 液態培養基，並利用 0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH，將液態培養基之 pH 調整為 4，倒入 250 ml 三角瓶中，用矽膠塞將錐形瓶口塞緊，至直立式滅菌釜在 120°C 滅菌 20 分鐘後，放置於無菌操作台，冷卻至室溫。之後，把三角瓶前培養的種菌，利用滅過菌的均質機(polytron)攪碎菌絲球 10 秒後，取 5 ml 的接菌量接種於 250 ml 三角瓶中，於 100 rpm、30°C 迴轉式恆溫培養箱中培養，每天記錄 pH、菌體濃度、葡萄糖濃度及 DOPA 抑制率。

3-5-3 三角瓶固態培養試驗

此試驗之主要目的，為探討固態培養與液態培養，兩種不同型態之菌絲體對黑色素生成抑制之差異。固態培養基之基質分別為小薏仁(pearl barley)、燕麥(oats)、蕎麥(buckwheat)各 15g，分別加入蒸餾水 25ml，料水比為 3：5。固態培養基殺菌後，將培養 7 天之液態種菌以均質機打碎，吸取 5ml 均質液，接入固態基礎培養基中。之後將其置於 30°C 迴轉式恆溫培養箱中培養。

3-5-4 胞外多醣體之萃取與濃度測定

將發酵液與 95% 的酒精以體積比 1:4 之比例進行萃取，於 4°C 冰箱中靜置 24 小時以沉澱多醣體。以 8000rpm 離心 10 分鐘，收集其沉澱物，置於烘箱中去除殘餘的酒精。將此沉澱物加入二次蒸餾水回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其多醣濃度。

3-5-5 胞內多醣體之製備與濃度測定

3-5-5-1 胞內多醣之萃取

取經冷凍乾燥後之菌絲體粉末加入 10ml 蒸餾水，置於振盪水槽，於 90°C 熱水浴中振盪(100 rpm)萃取 12 小時，再以 8000rpm，離心 10 分鐘，收集上清液即為胞內多醣粗萃液。

3-5-5-2 胞內多醣濃度測定

取胞內多醣粗萃液與 95 %酒精以體積比 1:4 之比例混合，於 4°C 冰箱中靜置 24 小時以沉澱多醣體。以 8000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，將沉澱物烘乾。將此沉澱物加入二次蒸餾水回溶，並將樣品經適度稀釋後，以酚-硫酸法測定其多醣濃度。

3-5-6 靈芝菌絲體萃取物之製備

將靈芝菌絲體用 100mesh 篩網過濾分離後，以去離子水沖洗 3~5 次，裝於 50ml 之玻璃樣品瓶，放置於-20°C 冰箱冷凍，之後以冷凍乾燥機進行乾燥。

各取 10ml 蒸餾水、甲醇、75%酒精、50%酒精四種溶劑，分別加入 1g 冷凍乾燥後的靈芝菌絲體，於室溫下萃取三天，之後將萃取液以 8000rpm 離心 10 分鐘，取其上清液保存備用。

3-5-7 細胞培養與繼代

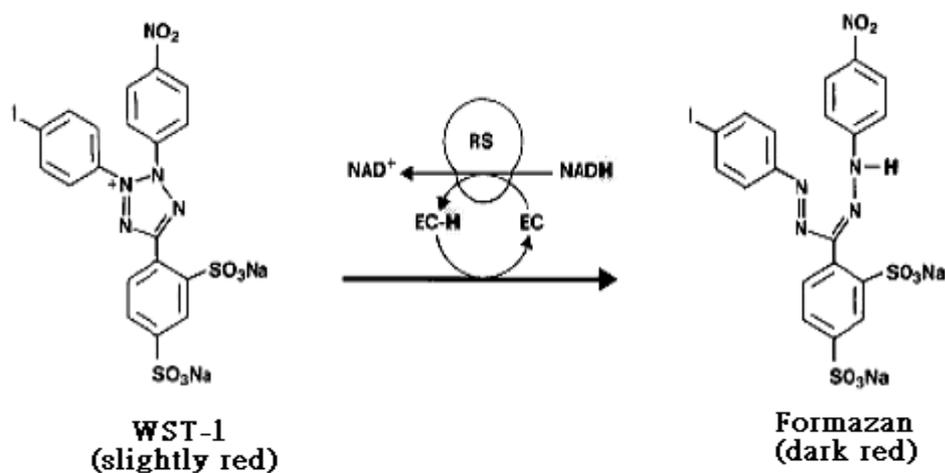
本實驗所用細胞株為購自食品工業研究所之 B16-F10 黑色素瘤細胞(BCRC 60031)，屬於貼附型細胞(Adherent cell)，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱，以顯微鏡觀察細胞生長狀況，長至 8~9 分滿進行繼代。

表 3-3 細胞培養基組成

培養基成份	廠牌	添加量
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO	88%
FBS (Fetal bovine serum)	Biological	10%
Penicillin/Streptomycin	Biological	1%
L-Glutamine	BioWhittaker	1%

3-5-8 細胞存活率之測試 (WST-1 assay)

本實驗利用 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent(Clontech)來進行細胞毒性測試。WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)是一種 tetrazolium salts，可以用來測量活細胞受生長因子、細胞激素、營養素刺激後的增殖，也可以用來分析細胞毒性化合物，如抗癌或其他毒性藥物對細胞的影響。此測試利用活細胞粒線體中的酵素(succinate dehydrogenase)可將淡紅色的 WST-1 代謝轉化成深紅色結晶狀的 formazan，以藉由 WST-1 被代謝的情況來評估活細胞量的多寡。此反應如下：



在 96 孔盤中置入每孔 5×10^3 cells/100 μ l，培養 24 小時使細胞貼附後，加入不同樣品溶液，於 37°C、5% CO₂ 培養 24、48 小時後，加入 10 μ l 之 WST-1 溶液，再培養 3 小時，然後以 microplate reader 於 450 nm (reference 650 nm) 波長下讀取吸光值，並與控制組比較計算得到細胞存活率。

3-5-9 抑制 B-16 黑色素細胞生成黑色素試驗(白，2006)

將 B-16 cells 均勻懸浮在 DMEM 的培養液中，再分別抽取 0.5 ml 體積置入 24-well plate，於 37°C 的 Incubator 中培養一天。再把已配製好不同濃度(0.1、0.05、0.025mg/ml) 之待測樣品用 0.22 μ m 的過濾器過濾，分別加入待測樣品與細胞一同培養 72 小時。之後收集細胞分泌培養液 100 μ l 置於 96-well plate 中，以 ELISA reader 偵測波長 450nm 的吸光值。

計算公式：

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(\text{Control 450nm}) - (\text{Sample 450nm})}{(\text{Control 450nm})} \right] \times 100$$

Control 450nm：為不加樣品之 blank，在波長 450nm 的吸光值。

Sample 450nm：為樣品扣除干擾顏色後，在波長 450nm 的吸光值。

第四章 結果與討論

4-1 靈芝三角瓶液態培養試驗

4-1-1 培養時間之影響

此實驗之目的是為了探討在菌體培養過程中，培養天數對菌體生長及有效成份生成之影響。所以利用三角瓶液態培養試驗，觀察在不同培養天數下，其液態發酵產物對 DOPA 抑制之影響。

由圖 4-1 顯示，隨著培養時間增加，菌體濃度不斷往上生長，發酵上清液對 DOPA 的抑制活性也隨著增加，於 2-5 天這段時間內，可觀察到 DOPA 抑制率快速的提升，表示在這期間應為有效成份的生成期，培養 5 天之後，抑制效果的提升漸緩，到第 7 天達最大值，為 70.83%。因此本實驗之菌體液態培養設定為 7 天。

就菌體濃度與 DOPA 抑制效果來看，發現產物(DOPA 抑制物)與菌體是生長聯動(growth-associated)關係，即產物隨著菌體生長而產生。當菌體生長快速時，DOPA 抑制率也快速提升；菌體濃度成長趨緩後，DOPA 抑制率的增加亦隨著減緩。

碳源對微生物的生長非常重要，主要作用是構成細胞物質和供應蕈類生長所需的能量，在培養過程中，葡萄糖的消耗速率很緩慢，培養 8 天後，葡萄糖濃度從 20g/L 降至 11.85g/L，顯示碳源的供應是充足的。

針對 pH 值而言，發酵初期隨培養時間增加而增加，到了發酵中期，菌絲體生長旺盛，菌體乾重和有效成份累積增加，造成 pH 值下降，進入發酵後期菌絲生長緩慢，可能發生菌體自溶現象，使得 pH 值回升。

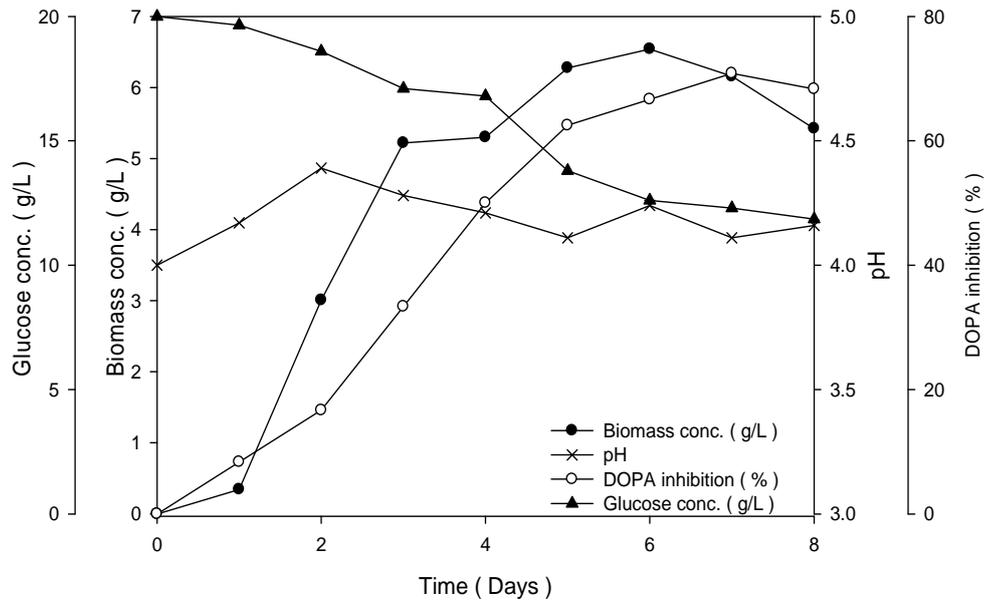


圖 4-1 靈芝菌絲體之生長曲線圖與發酵上清液對 DOPA 抑制率之影響

培養條件：基礎培養基

初始 pH4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

4-1-2 發酵液濃度的變化及均質與否對 DOPA 抑制率的影響

本實驗將不同濃度發酵液(發酵上清液)加入酪胺酸酶及酪胺酸反應混合液中，評估在抑制酪胺酸酶活性之效果如圖 4-2，結果顯示，在未稀釋下，發酵液對酪胺酸酶活性抑制率為 52.17%，稀釋二倍後，酪胺酸酶抑制率降低至 26.09%，當稀釋到 4 倍時，幾乎已無酪胺酸酶活性的抑制效果了。

若將發酵液(含菌絲體)均質後再去測試抑制酪胺酸酶之作用，結果如圖 4-3 所示，未稀釋下，發酵液對酪胺酸酶活性抑制率提升為 82.61%，稀釋二倍後，酪胺酸酶抑制率為 47.83%，當稀釋至 4 倍後，酪胺酸酶抑制率下降至 15.94%。由此結果顯示，先將含菌絲體的發酵液均質後其抑制效果會比單純只有發酵上清液的效果好(圖 4-4)。所以除了液態發酵產物(胞外)，菌絲體內(胞內)亦含有能對酪胺酸酶活性具抑制效果的有效成份。

另外，在靈芝液態培養過程中，多醣體是其主要產物，所以我們同時測發酵液中的多醣濃度，觀察多醣濃度與酪胺酸酶活性抑制效果之關係。且有文獻指出 (Chang, 2009)，多酚類化合物在酪胺酸酶抑制劑成分中佔了很大的比例。透過 Folin-Ciocalteu 法將靈芝發酵產物於 730nm 下測吸光值，再由已知濃度的標準 Gallic acid 檢量線即可算出每克樣品中所含 Gallic acid equivalent (GAE)，得知總酚含量，並觀察多酚含量與酪胺酸酶活性抑制效果之關係。由圖 4-2、圖 4-3 發現，多醣濃度與總多酚含量之變化跟酪胺酸酶抑制率間關係密切，因此推測多醣體與多酚類物質可能為靈芝發酵產物中能有效抑制酪胺酸酶作用的活性成份。

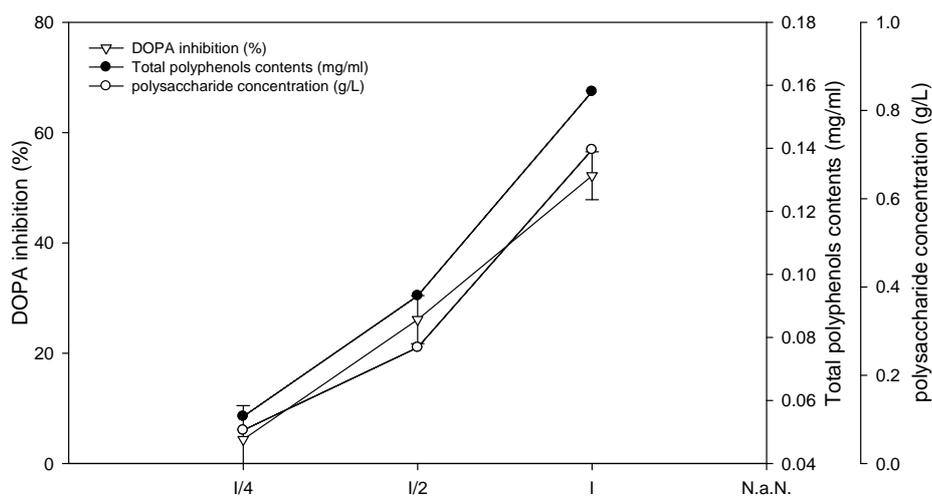


圖 4-2 不同濃度發酵上清液對 DOPA 抑制率關係

註：I：initial (初始濃度)；I/2、I/4：稀釋 2 倍、4 倍。

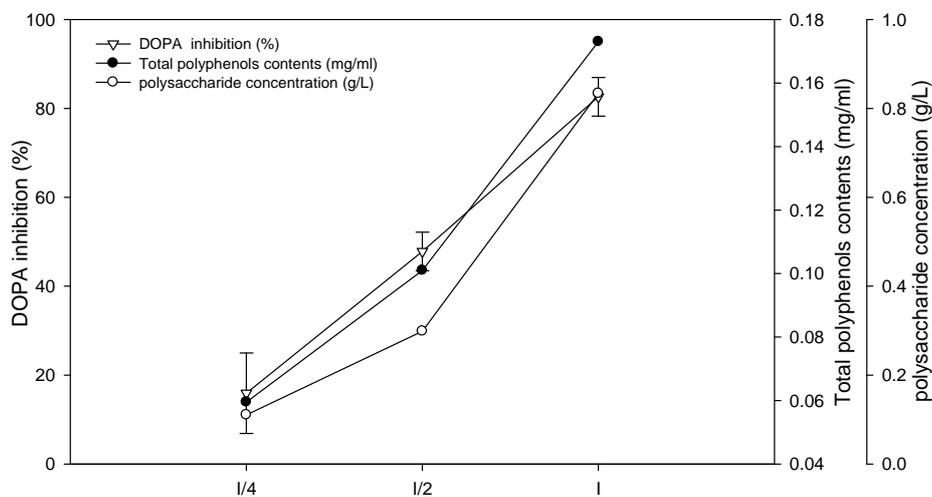


圖 4-3 不同濃度均質發酵液對 DOPA 抑制率關係

註：I：initial (初始濃度)；I/2、I/4：稀釋 2 倍、4 倍。

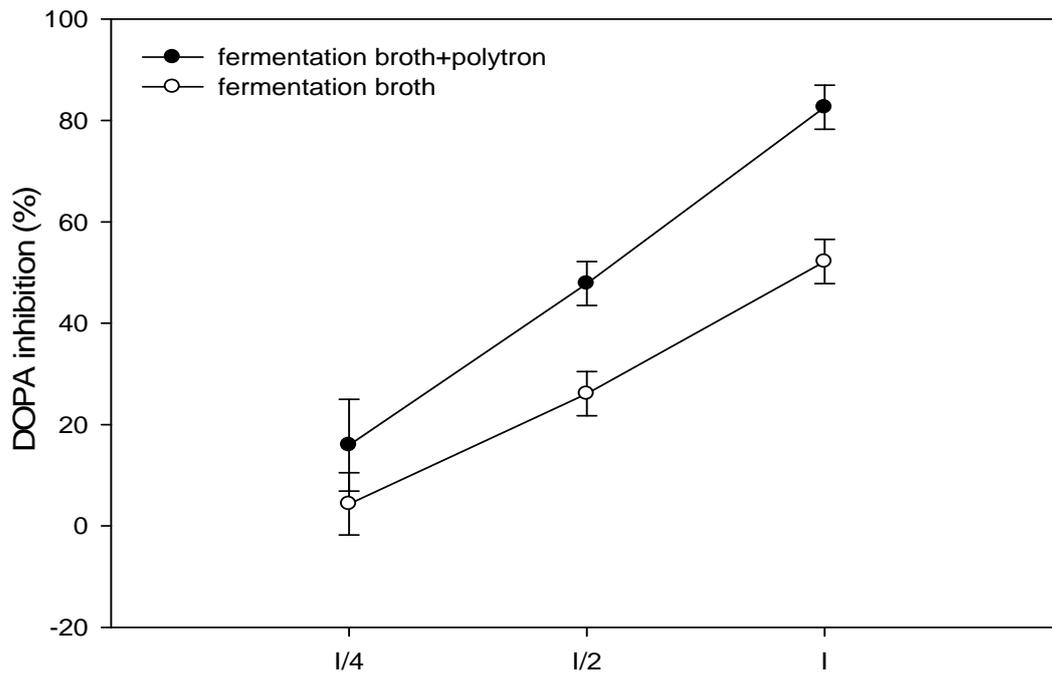


圖 4-4 發酵上清液與均質發酵液對 DOPA 抑制率關係

註：I：initial (初始濃度)；I/2、I/4：稀釋 2 倍、4 倍。

Fermentation broth+polytron：均質發酵液

Fermentation broth：發酵上清液

黑色素生成之反應條件：溫度 37°C pH 6.8 $\lambda=475\text{nm}$

4-1-3 靈芝菌絲體萃取物對 DOPA 抑制率之關係

靈芝菌絲體萃取物之 DOPA 抑制試驗如圖 4-5，結果顯示，在四種不同溶劑(蒸餾水、甲醇、75%乙醇、50%乙醇)萃取下，以水萃取物的 DOPA 抑制效果最佳，為 85.96%，而甲醇、75%乙醇、50%乙醇之萃取物其 DOPA 抑制率分別為 59.21%、32.23%、38.60%。與已知美白成分維生素 C 比較，水萃取物的 DOPA 抑制率已有不錯的效果。

利用蒸餾水萃取出來的萃取物具有較佳的抑制效果，可以推測靈芝菌絲體萃取物中能有效抑制酪胺酸酶活性的成份中，大部分可能為水溶性物質。以有機溶劑萃取的話，甲醇萃取物的抑制效果又比乙醇佳，低濃度乙醇溶劑的萃取物抑制效果又比高濃度乙醇溶劑萃取物佳。

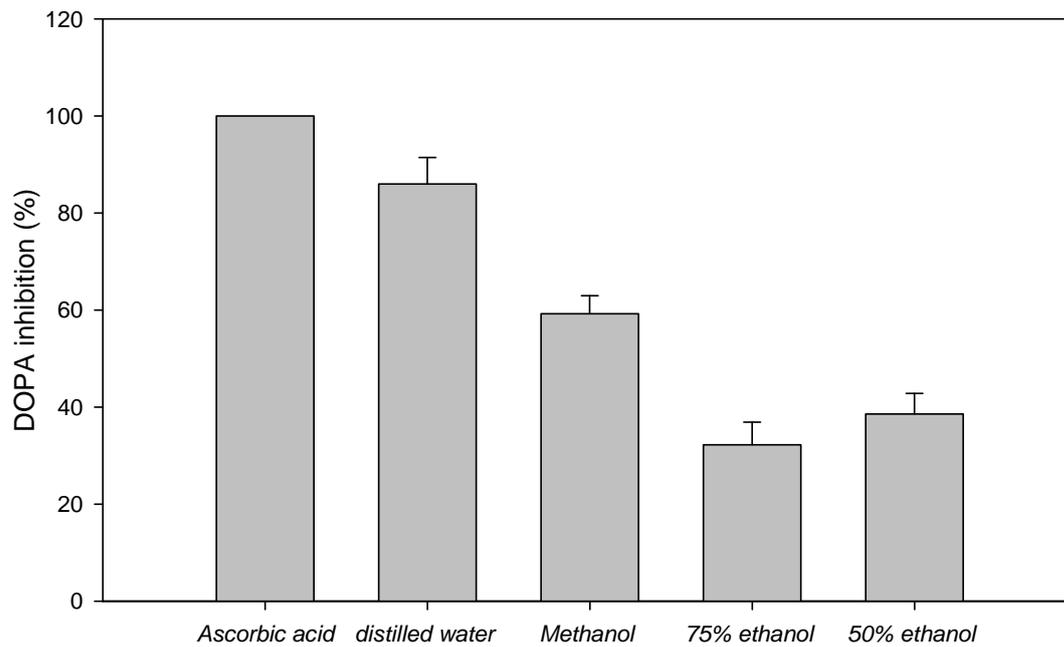


圖 4-5 不同溶劑靈芝菌絲體萃取物對 DOPA 抑制率之比較

註：4 種萃取法皆取 1g 菌絲體+10ml 溶劑室溫萃取

Ascorbic acid 取 1g 溶於 10ml 蒸餾水中做測試

黑色素生成之反應條件：溫度 37°C pH 6.8 $\lambda=475\text{nm}$

4-2 靈芝三角瓶固態培養試驗

4-2-1 培養時間之影響

除了三角瓶液態培養試驗，我們也嘗試利用固態培養的方式，觀察其利用固態基質培養所生長之菌絲體在 DOPA 抑制效果上與液態培養之菌絲體間之差異。固態基質除了提供菌體生長所必須之營養物質，將靈芝培養在固態基質上，可利用藥食用真菌強大的分解代謝能力，不僅可對這些天然物中的纖維、醣類、蛋白等營養物質加以利用，而且在代謝過程中可能對其中的一些成分(如黃酮、多酚類化合物等)進行轉化與修飾，從而提高有效成份的比例與效果。

結果如圖 4-6 顯示，以薏仁(pearl barley)為基質，培養 18 天，其 DOPA 抑制效果與總多酚含量大致隨時間增加而上升，在第 14 天可達 89.2% DOPA 抑制率，總多酚含量為 8.24mg/g substrate。且從圖 4-6 可發現總多酚含量之變化與 DOPA 抑制率之增減相關，說明固態培養之靈芝菌絲體萃取物中，亦具有多酚類物質且為抑制酪胺酸酶活性之有效成份之一。

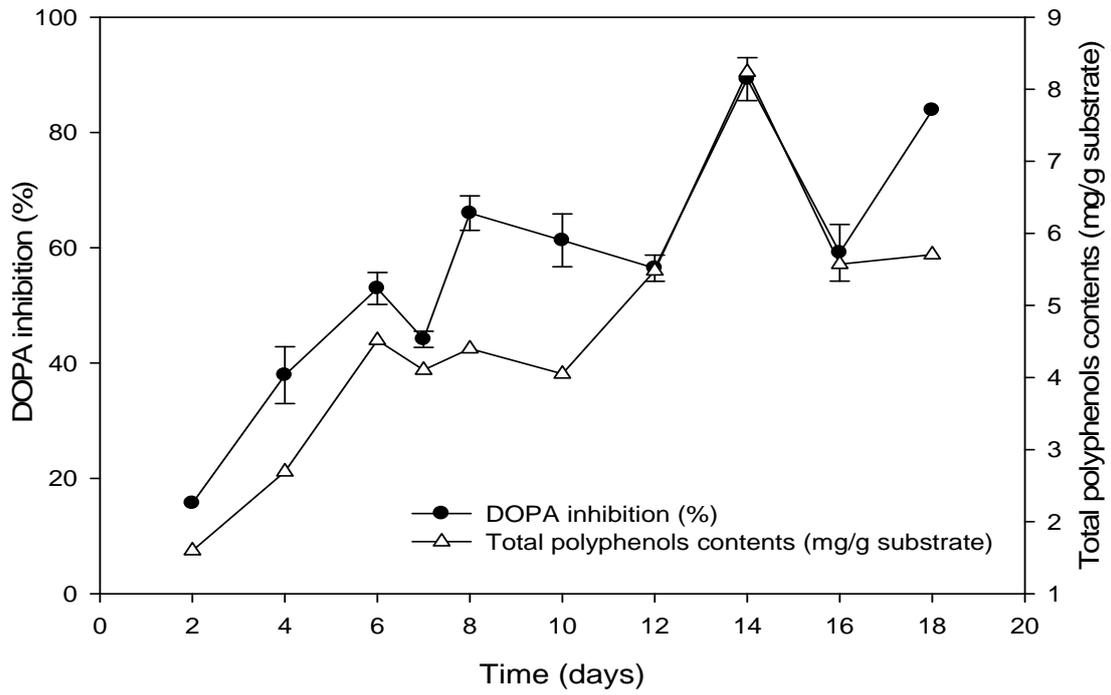


圖 4-6 時間對靈芝菌絲體甲醇萃取物之 DOPA 抑制率影響與總酚濃度變化

註：空白基質(薏仁)DOPA 抑制率=-23.53%

黑色素生成之反應條件：溫度 37°C pH 6.8 $\lambda=475\text{nm}$

4-2-2 不同菌絲型態 DOPA 抑制率與總多酚含量之比較

將固態培養之菌絲體與液態培養之菌絲體以甲醇萃取後，測定其 DOPA 抑制效果(圖 4-7)，固態培養第 7 天及第 14 天之菌絲體甲醇萃取物抑制率分別為 44.1%、89.2%，液態培養第 7 天之菌絲體甲醇萃取物抑制率為 59.2%，固態培養第 7 天及第 14 天之菌絲體甲醇萃取物總多酚含量分別為 3.73mg/g substrate、7.86 mg/g substrate，液態培養第 7 天之菌絲體甲醇萃取物總多酚含量為 7.25mg/g substrate。由圖 4-7 結果顯示，當培養至第 7 天時，液態培養的 DOPA 抑制效果較佳，總多酚含量也比較高，說明了液態培養其有效成份之生成較快速，能較快達到功效，而固態培養則需耗時較久，但能達到較好的效果。

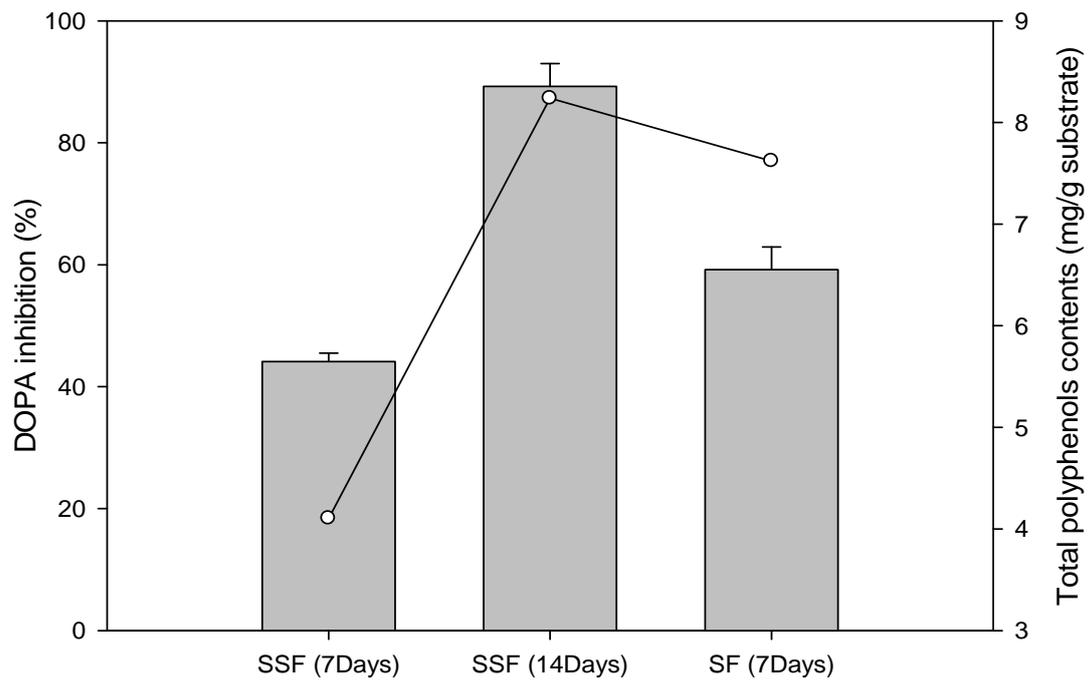


圖 4-7 不同菌絲型態之 DOPA 抑制率及總多酚含量變化

註：SSF：Solid state Fermentation

SF：Submerged Fermentation

空白基質(薏仁)DOPA 抑制率=-23.53%

黑色素生成之反應條件：溫度 37°C pH 6.8 $\lambda=475\text{nm}$

4-2-3 不同基質培養基與培養天數及不同萃取法對 DOPA 之影響

本實驗主要以蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)三種天然穀物作為基質培養基進行培養，因為這些穀類本身營養相當豐富，希望透過固態發酵培養，利用藥食用真菌的分解代謝能力將這些營養物質加以利用，進而提升美白的有效成份之生成。在不同的基質培養基之比較方面，結果如圖 4-8 與圖 4-9 顯示，三種基質培養基中以薏仁(pearl barley)的效果最好，其次為蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)則較差。

不同培養天數方面則以培養 7 天與 14 天來做比較，如圖 4-8 顯示，以甲醇萃取之結果，培養 7 天時，蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)之 DOPA 抑制率分別為 41.18%、28.43%、49.02%，培養 14 天時，蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)之 DOPA 抑制率分別為 76.47%、70.59%、85.29%。另外，以水萃取之結果(如圖 4-9)，培養 7 天時，蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)之 DOPA 抑制率分別為 59.80%、48.04%、69.61%，培養 14 天時，蕎麥(buckwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)之 DOPA 抑制率分別為 79.41%、72.55%、89.22%，皆顯示出培養時間增加，有效成份亦累積增加，使得抑制效果明顯提升。

不同萃取方法則分別以甲醇及蒸餾水來做萃取，由圖 4-8 及圖 4-9 可以看出，以水萃取的效果皆比甲醇萃取效果好，因此可以推測固態培養之靈芝發酵產物中其活性有效成分大部分為水溶性成份。

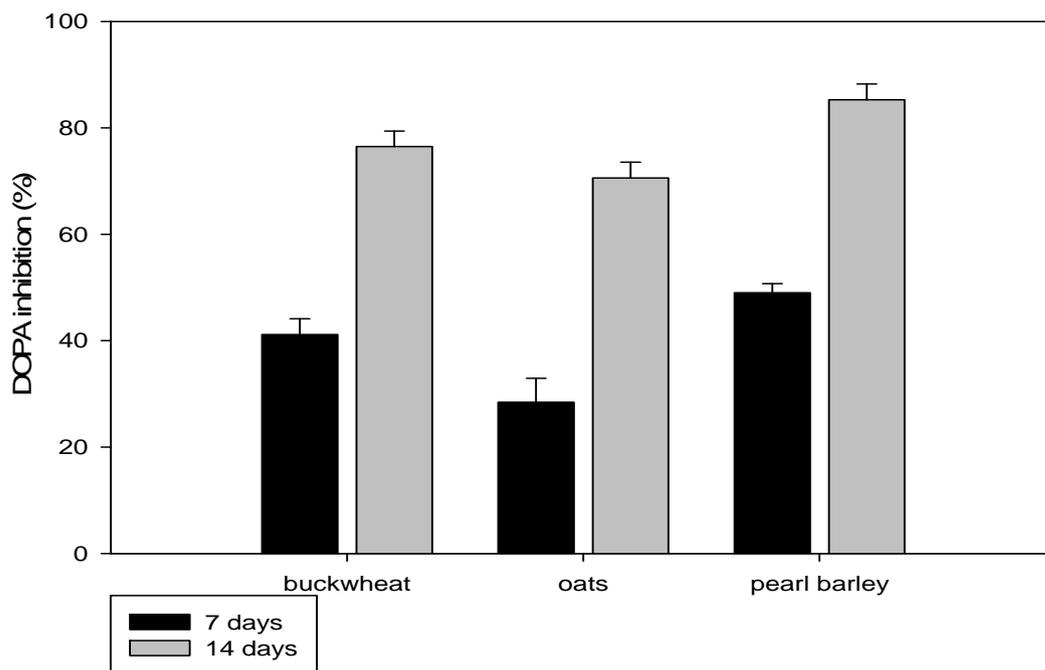


圖 4-8 不同固態基質培養基之菌絲體甲醇萃取物對 DOPA 抑制率的比較

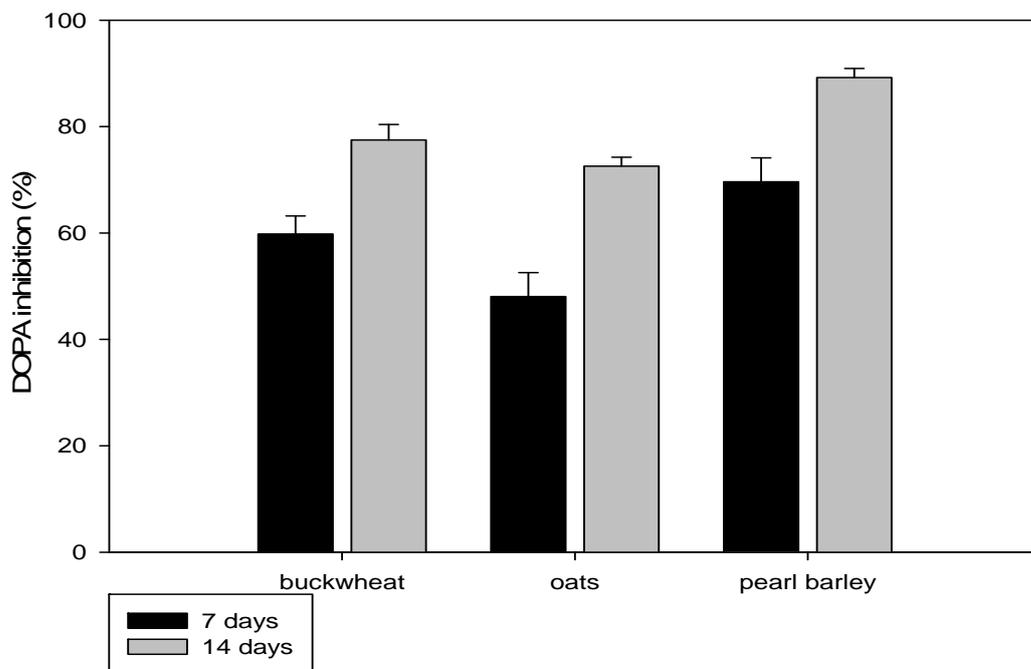


圖 4-9 不同固態基質培養基之菌絲體水萃取物對 DOPA 抑制率的比較

4-3 有效成分之歸納討論：多醣與多酚類

由於相關文獻指出酚類化合物可用來當成脫色劑，因其具有與酪胺酸相似的結構，所以會與酪胺酸競爭酪胺酸酶的催化作用，而抑制原本黑色素的生成反應 (Chang,2009)(McMahon et al.,2005)。所以我們根據 Folin-Ciocalteu 法，參考 2006 年 Wang 等人方法，去測定靈芝發酵產物或萃取物中的總酚類含量，結果顯示(如圖 4-2、圖 4-3、圖 4-6、圖 4-7、圖 4-11)，多酚類化合物的確與酪胺酸酶的活性抑制效果有一定比例相關。說明了含有多酚類化合物成份在抑制酪胺酸酶活性上是有一定的效果。

由於靈芝生長過程中會分泌許多多醣，且過去許多研究也指出多醣體具有許多功效，如抗腫瘤、降血糖等。在有效成份未知情況下，先做多醣測試，在靈芝培養過程中，多醣體隨培養時間增加而增加(圖 4-10)，因此猜測多醣體可能為有效成份之一。但是在後續實驗中發現多醣含量多寡與酪胺酸酶活性效果並無相關(圖 4-11、圖 4-12)，由於未能確定析出的有效多醣量以及回溶的有效多醣量，且固態培養方面，因為無法將基質與菌絲體有效分離，會有澱粉多醣之干擾，所以測得之多醣濃度並非完全是靈芝多醣，因此無法確定多醣是否為抑制黑色素生成之有效成份之一。

根據研究指出(鄭，2005)，多醣體分子量大小會影響生物體生理活性，不單只是多醣體的濃度，與分子量的範圍亦有相當密切的關係，不同的來源與萃取的方式也會影響到其中的多醣體含量及有效成分。且以不同濃度酒精所萃取出的多

醣分子量範圍也不同，不同結構多醣功效也不同。因此，要確定多醣是否為抑制黑色素生成之有效成份，仍須將酒精萃取後之粗多醣體加以純化、分析，在去探討活性多醣在黑色素生成抑制上的有效性。

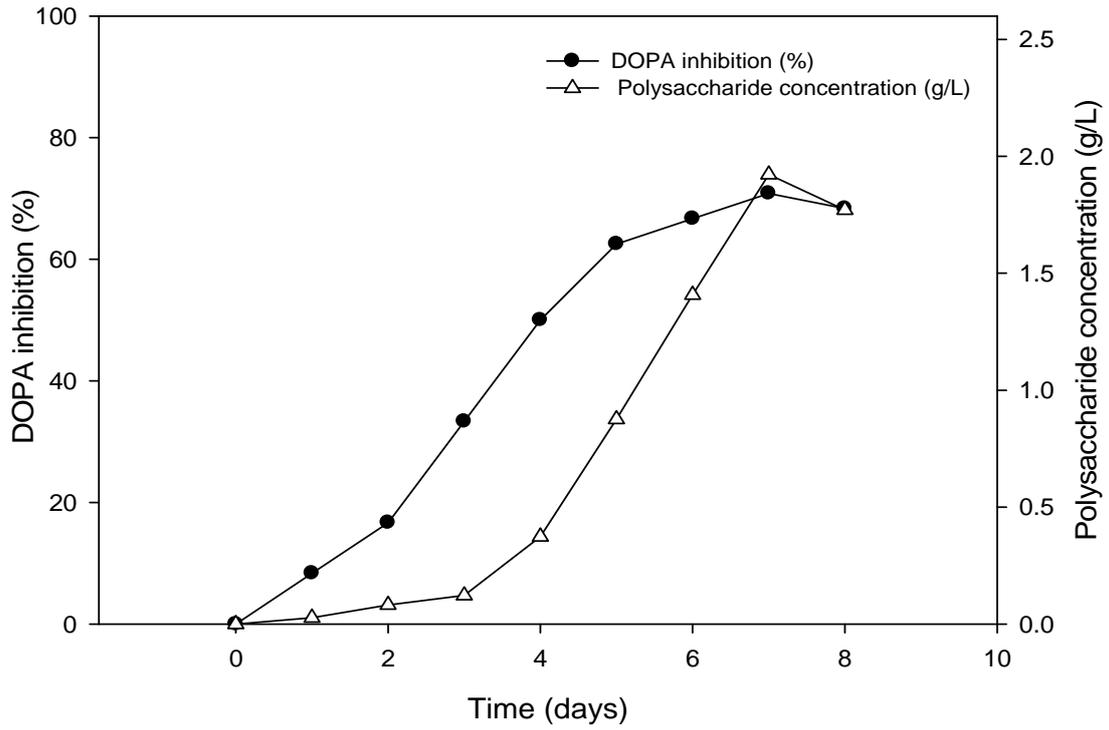


圖 4-10 多醣生成與靈芝發酵上清液 DOPA 抑制率之關係

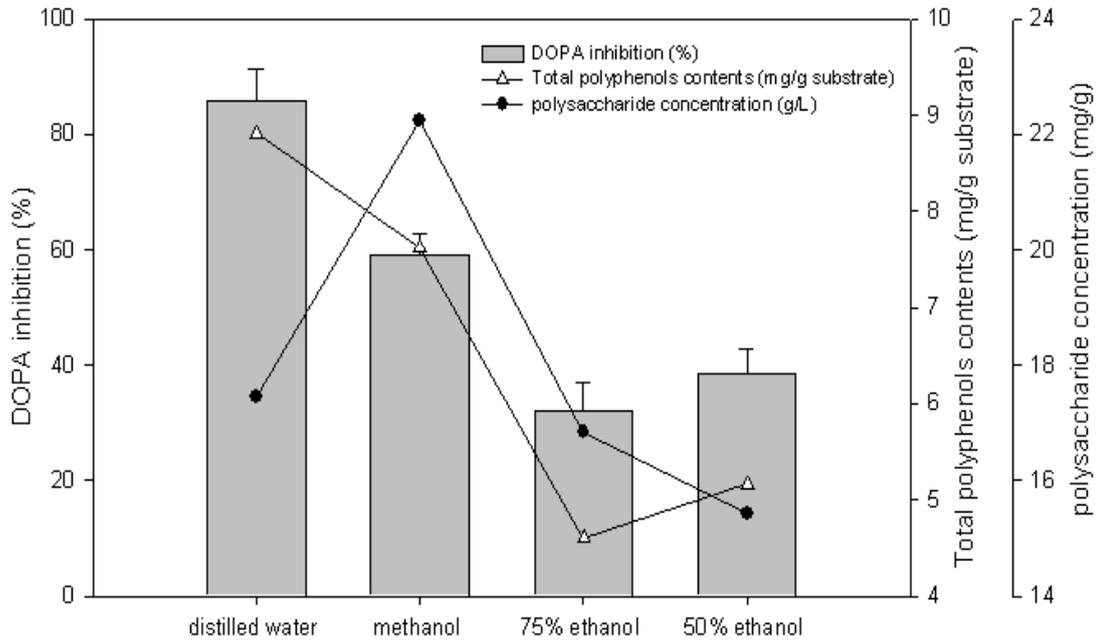


圖 4-11 不同溶劑靈芝菌絲體萃取物之多醣與總酚含量與 DOPA 抑制率關係

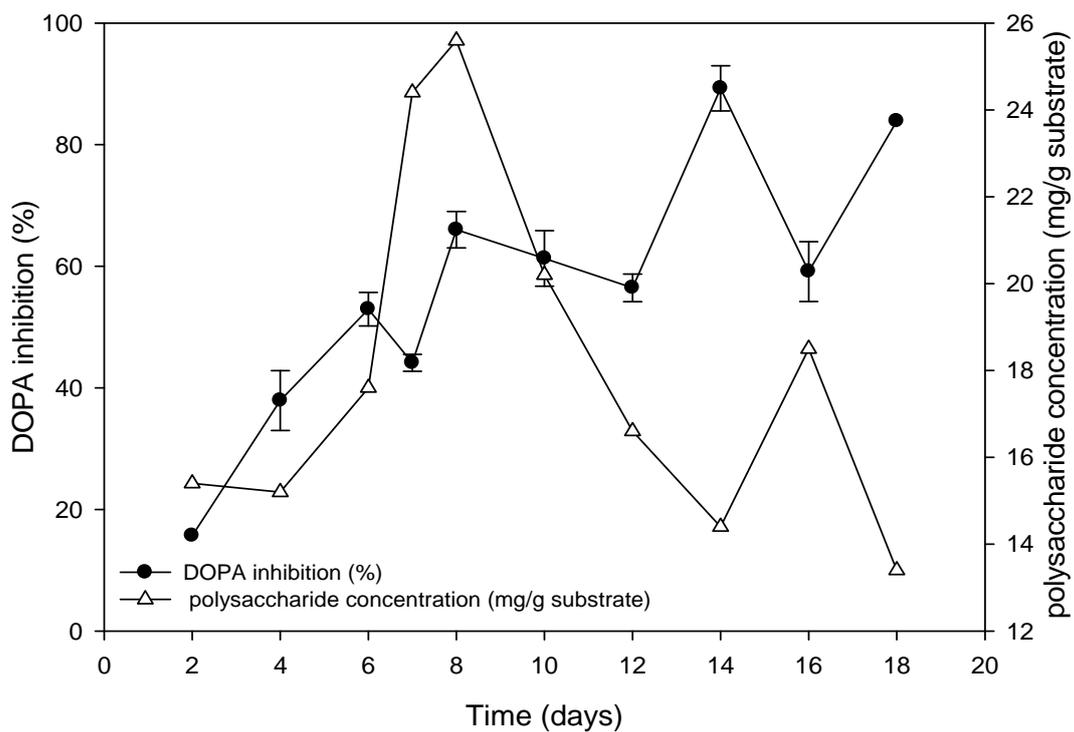


圖 4-12 固態培養之靈芝菌絲體甲醇萃取物多醣含量與 DOPA 抑制率關係

4-4 靈芝菌絲體萃取物之細胞效應

4-4-1 靈芝菌絲體萃取物對細胞存活率之影響

在以樣品處理 B16-F10 細胞進行實驗前，必須先做細胞毒性測試，以確認不同濃度的靈芝菌絲體萃取物樣品，不會對細胞造成毒性傷害。此毒性分析主要在偵測經靈芝菌絲體萃取物樣品處理過後的細胞存活率，以 WST-1 assay 來進行測試。

將液態培養之後的靈芝菌絲體冷凍乾燥，分別以蒸餾水、甲醇、75%乙醇、50%乙醇四種萃取溶劑進行萃取，離心後收集其上清液，之後冷凍乾燥得到萃出物粉末，再以細胞培養液回溶並稀釋成 0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml 三種濃度。另外將固態培養 7 天及 14 天之發酵產物以甲醇萃取，如以上方法一樣製備成三種濃度，然後將樣品加入含有 B16-F10 老鼠黑色素瘤細胞之 96 孔盤，培養 24 及 48 小時後，加入 WST-1 試劑進行測試。從圖 4-13、圖 4-14 結果可以看出，在 0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml 三種濃度下，各萃取物樣品均不會對細胞造成毒性，因此在之後的實驗中可以直接使用，為安全劑量。

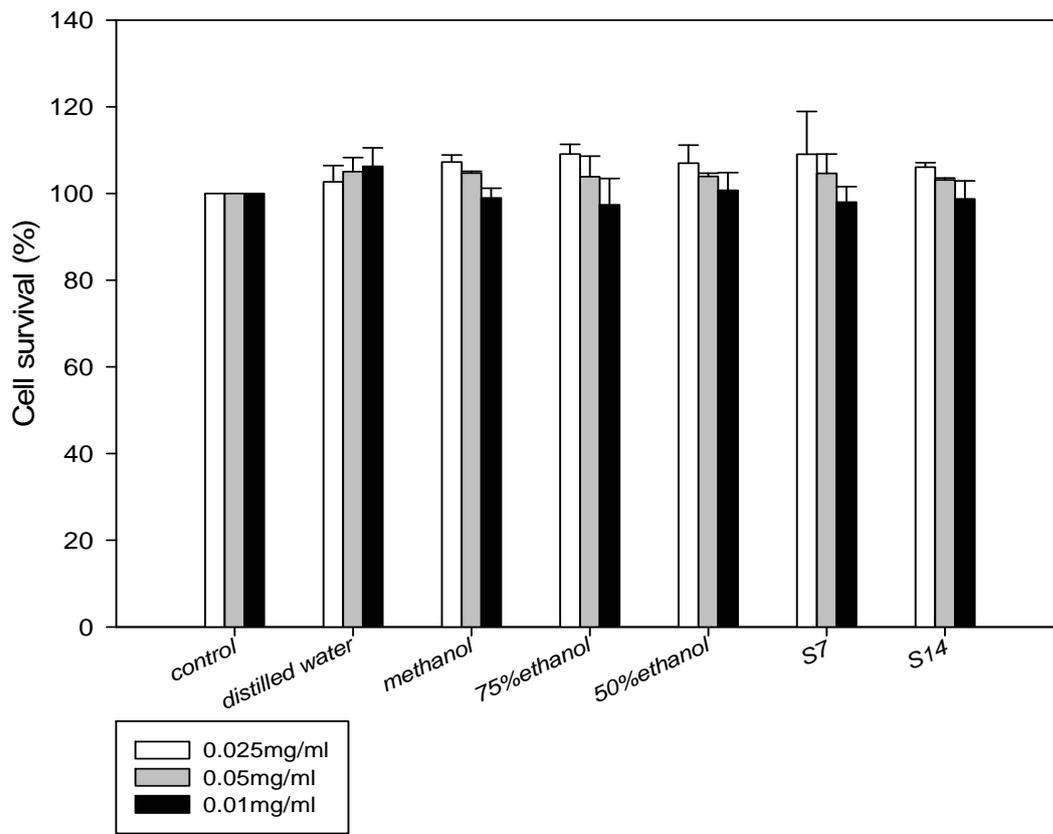


圖 4-13 不同溶劑靈芝菌絲體萃取物對細胞處理 24 小時後存活率之影響

Control 組：未添加靈芝菌絲體萃取物之 B16-F10 細胞存活率，以此設定為 100%

註：S7：固態培養 7 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

S14：固態培養 14 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

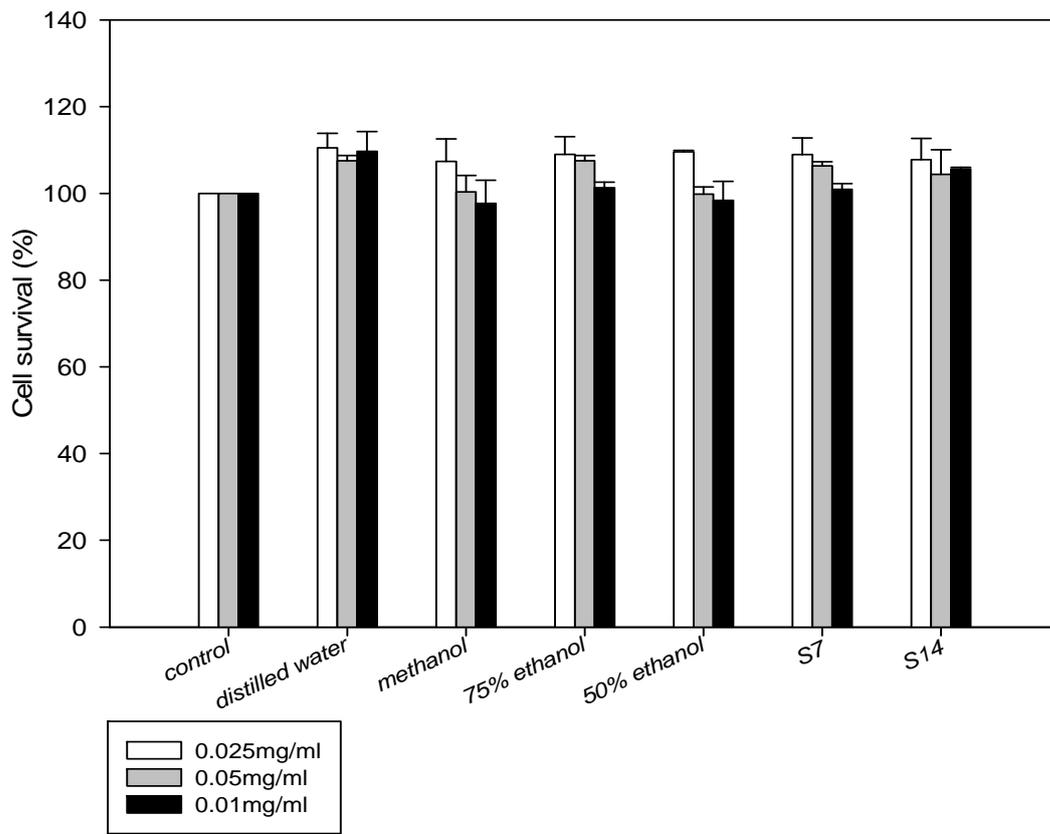


圖 4-14 不同溶劑靈芝菌絲體萃取物對細胞處理 48 小時後存活率之影響

Control 組：未添加靈芝菌絲體萃取物之 B16-F10 細胞存活率，以此設定為 100%

註：S7：固態培養 7 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

S14：固態培養 14 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

4-4-2 靈芝菌絲體萃取物抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素之影響

經 WST-1 測試之後，發現濃度為 0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml 之靈芝菌絲體萃取物均不會對 B16-F10 黑色素細胞產生毒性，因此我們將這些樣品添加在 B16-F10 黑色素細胞進行體外美白抑制試驗，以評估其在 B16-F10 黑色素細胞中抑制黑色素生成的效果。首先，添加不同濃度的菌絲體萃取物樣品於 B16-F10 黑色素細胞，經 72 小時培養後，再藉由吸光值的差異，代入抑制率公式中，計算萃取液對生成黑色素的抑制率(如圖 4-15)。

結果顯示，在 0.1mg/ml 濃度下，甲醇萃取物與水萃取物分別有 87.5%、81.8% 的抑制黑色素生成效果，其他萃取物也有 75%以上之抑制率。濃度降低至 0.05mg/ml、0.025mg/ml 時，靈芝菌絲體萃取物仍有 70%以上黑色素生成抑制率，與左旋維生素 C 相比皆具有較好的抑制黑色素生成效果。觀察細胞培養液其外觀顏色顯示，當 B16-F10 黑色素細胞添加樣品培養 72 小時後，其細胞培養液外觀顏色與空白對照組相比有明顯淡化，顯示靈芝菌絲體萃取物在 B16-F10 黑色素細胞之體外美白抑制試驗方面，對於抑制黑色素生成有不錯的效果。



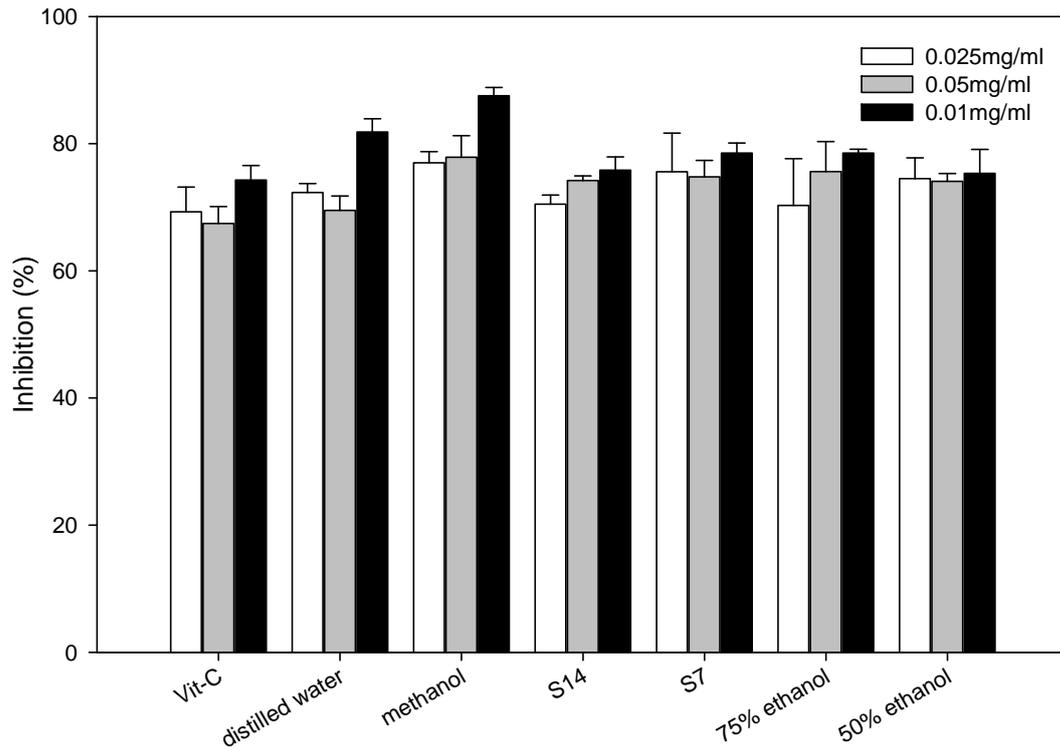


圖 4-15 不同溶劑靈芝菌絲體萃取物抑制 B16-F10 黑色素細胞生成黑色素之影響

註：S7：固態培養 7 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

S14：固態培養 14 天之靈芝發酵產物之甲醇萃取物

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

本研究主要探討靈芝液態培養之發酵產物與菌絲體萃取物，以及固態培養之發酵產物的萃取物在抑制酪胺酸酶活性及減少 B16-F10 黑色素細胞之黑色素生成上是否具有效果。

在前面討論中，可以了解到發酵液中的上清液具有抑制 DOPA 生成之成份，且將含菌絲體之發酵液均質後，發現其 DOPA 之抑制效果更為顯著，顯示出，除了菌體生長時會分泌有效成分等產物至發酵液中，其菌絲體本身亦有有效成份之存在。

將靈芝液態培養之菌絲體以甲醇、蒸餾水、75%酒精、50%酒精四種溶劑加以萃取，以蒸餾水萃取效果最佳，而有機溶劑則以甲醇萃取效果較好，因此可以推測其中之有效成份大部分為水可溶性物質。

固態培養方面採用三種培養基質，分別為蕎麥(backwheat)、燕麥(oats)、薏仁(pearl barley)，另外，萃取方式則以純水和甲醇二種溶劑來做萃取，結果皆以薏仁(pearl barley)基質培養基的靈芝發酵產物所萃取出之成份的 DOPA 抑制效果最佳。而純水萃取物又比甲醇萃取物的抑制效果好。與液態培養之菌絲體比較，固態培養的抑制效果比較佳，應是基質的利用增加了有效成份之生成。

在培養過程中，多醣量與總多酚量皆與 DOPA 抑制率成正比，但所析出之

多醣經回溶，卻無抑制 DOPA 生成之效果，不過因為實際析出和回溶的有效多醣量未知，所以不能排除多醣的可能性。而抑制 DOPA 生成效果愈好，其所含之總多醣量越高且成一定比例。因為酚類化合物具有與酪胺酸相似之結構，與酪胺酸酶有良好的親和力，所以會去和酪胺酸競爭，而抑制黑色素生成之反應。

5-2 未來展望

本研究利用不同溶劑萃取出靈芝菌絲體中之有效成份，此有效成份之一為多醣類化合物，是否含有更多其他有效成份，有待後續更深入分析探討。對於美白功效之探討，本研究僅對體外抑制酪胺酸酶活性試驗及對黑色素細胞之影響做初步探討，有待後續對黑色素細胞之影響更多方面測試及受測樣品在保養品配方中實際應用，以及探討對實驗動物皮膚美白可能之效用。

參考文獻

王伯徹、陳啟楨、華傑(1998)。食藥用菇類的培養與應用。財團法人食品工業發展研究所。

中村敏郎著、黃玉儒譯(1992)。醫學美容指南。青春出版社。台北市。

白宜巧(2006)。台灣小葉桑在化粧品應用之研究。嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所碩士論文。

吳貞宜(2002)。寶貝肌膚百分百。遠流出版社。台北市。

林榮耀(1996)。靈芝及菇類等真菌類免疫調節蛋白質之研究及探討其臨床應用性。生命科學簡訊，10(2)：2-5。

胡依婕(2007)。探討以米麴菌發酵中草藥應用於抑制酪胺酸酶及抗氧化活性之研究。臺南大學環境生態研究所碩士論文。

徐泰浩、謝建元(2001)。靈芝生物活性成分與生物活性之療養品觀。生物產業(Bioindustry)，12(2)：117-135。

許瑞祥(2005)。靈芝在生技領域研發的新趨勢。農業生技產業季刊，第三期，37-44。

陳進成(2007)。從奈米技術談中草藥在機能性化妝保養品之研究思路與方法。化工技術，15(2)：120-128。

陳健生、陳韻文(2007)。機能性保養品成分的發展與應用。化工技術，15(2)：

105-111。

黃美月(1989)。皮膚與美容。民生報社。台北市。

曾慧敏(2007)。天然物經米麴菌發酵後產物之美白機轉探討。嘉南藥理科技大學化妝品科技研究所碩士論文。

詹宏偉(2003)。不同培養方式對靈芝菌絲體抗氧化活性成分與多醣體生成之影響。東海大學化學工程研究所碩士論文。

楊昭順、陳政蓉、陳俊瑜(2005)。生物技術在化妝保養品工業上之應用。化工技術，13(7)：133-138。

楊明哲(2006)。控制菌絲體型態對於靈芝液態培養之影響。東海大學化學工程研究所博士論文。

鄭懿芳(2005)。樟芝菌絲體培養之胞外多醣體應用於抗老化化妝品成份之研究。嘉南藥理科技大學生物科技研究所碩士論文。

蔡秀玲(2008)。利用靈芝菌絲體培養生成美白成分之研究。東海大學化學工程研究所博士論文。

劉國柱(1990)。現代科學看靈芝。雙利實業公司。台北市。

蘇慶華(2006)。靈芝子實體之完全利用—三萜類、多醣體及幾丁多醣。全球華人Ganoderma 研討會。

Alexotolus C.J., Mims C.W. (1979). Introductory mycology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

- Brenner M., Hearing V. J. (2008). Modifying skin pigmentation –approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discovery Today : Disease Mechanisms*, 5, e189–e199.
- Briganti S, Camera E, Picardo M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16, 101–110.
- Chang TS. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440–2475.
- Chien CC, Tsai ML, Chen CC, Chang SJ, Tseng CH. (2008). Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. *Mycopathologia*, 166, 117–120.
- Ding ZY, Xu P, Wang YH, Zhang L, Shi GY, Zhang KC. (2009). Effect of adding *Scutellaria baicalensis* G. on tyrosinase inhibition in submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Natural Product Research and Development*, 21, 21–26.
- Hikino H., Lomnno C., Mirin Y. (1985). Isolation and hypoglycemic activity of *Ganoderans A and B*, glycans of *Ganoderan lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, 4, 339-340.
- Huie CW, Di X. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812, 241–257.

- Hung WS, Fang CL, Su CH, Lai WF, Chang YC, Tsai YH. (2001). Cytotoxicity and immunogenicity of SACCHACHITIN and its mechanism of action on skin wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 56, 93–100.
- Liu F., Ooi V. E., Chang S. T.(1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60, 763–771.
- Mahato SB., Sen S. (1997). Advances in triterpenoid research, 1990–1994. *Phytochemistry*, 44, 1185–1236.
- Masuda T, Fujita N, Odaka Y, Takeda Y, Yonemori S, Nakamoto K, Kuninaga H (2007). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2316–2320.
- McMahon A. M., Doyle E. M., O'Connor K. E.(2005). Detection and quantification of 4-substituted phenols: a comparison of mushroom tyrosinase and cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 808-812.
- Misiki A., Kututa M. (1981). Studies in interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 92, 115-129.
- Prota G.(1988). Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Medical Research Reviews*, 8, 525–556.

- Seo S. Y., Sharma V. K., and Sharma N. (2003). Mushroom tyrosinase : recent prospects. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 51, 2837–2853.
- Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A. (1985). Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agriculture and Biology Chemistry*, 49, 2641–2653.
- Sung JH, Park SH, Seo DH, Lee JH, Hong SW, Hong SS. (2009). Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 552–556.
- Itoh Tomohiro, Furuichi Yukio. (2005). Hot-Water extracts from adzuki beans (*Vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 873–882.
- Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 353–359.
- Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH. (2002). Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing

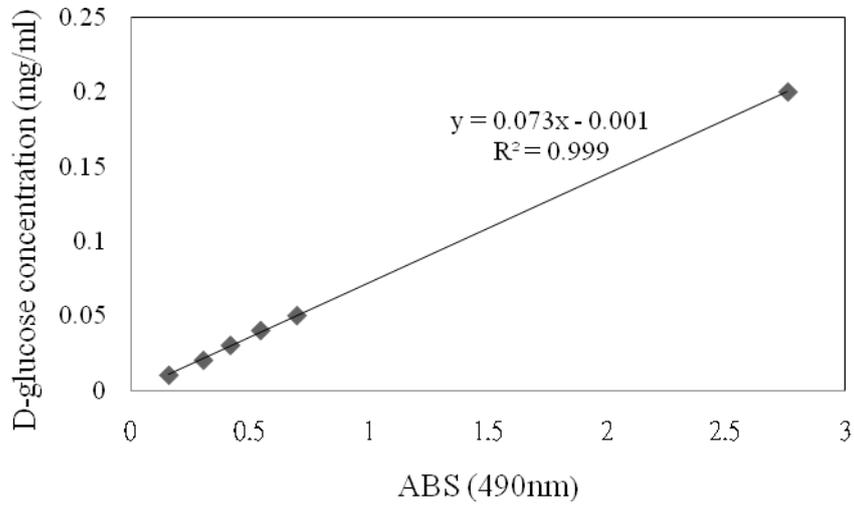
glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 1057–1062.

Wickett R. R., Visscher M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*. 34 : S98–110.

Xu P, Qian Z, Zhang KC, Wang YH. (2006). In vitro tyrosinase inhibitory effect of 27 traditional Chinese medicinal herbs extracted with ethanol. *Natural Product Research and Development*, 18, 986–988.

附錄

附錄一、多醣含量檢量線



附錄二、總多酚含量檢量線

