

私立東海大學化學工程研究所
Graduate Institute of Chemical Engineering
TUNGHAI UNIVERSITY

碩士論文

Master Thesis

指導教授：楊芳鏘 博士

Advisor : Fan-Chiang Yang , Ph.D.

利用靈芝菌絲體培養生成美白成分之研究



研究生：蔡秀玲 撰

Graduate student : Hsiu-Lin Tsai

中華民國九十七年七月

July,2008

中文摘要

酪胺酸酶是黑色素合成的關鍵酵素，藉由酪胺酸酶之抑制，可以達到美白功效。本研究將靈芝菌絲體進行液態培養，取上清液、菌絲體與含菌絲體之發酵液，分別以酸(H_2SO_4)、鹼($NaOH$)萃取與酵素分解。選用的酵素包括Neutrased、Celluclast、Lysozyme、Papain及Bromelain。期望可以得到抑制黑色素生成之有效成分。實驗包括：(一)萃取或分解後之上清液抑制DOPA生成效果之比較。(二)不同分解酵素之最佳pH、溫度及作用時間。(三)有效成分之分析等三部分。結果顯示：發酵液經均質後添加Neutrased、Celluclast、Papain作用，其上清液抑制DOPA生成效果最好，分別為79.8%、82.7%、88.1%。改變pH、溫度及分解時間，Neutrased以pH 5.5、30°C、120分鐘作用後，抑制效果提高為93.4%；Celluclast以pH 5、45°C、240分鐘作用後，抑制效果為95.9%；結果也顯示：使用Neutrased與Celluclast分解時，作用時間越長其抑制效果趨近於100%，而Papain分解時，作用120分鐘之後，其抑制效果逐漸下降。由福林-酚試劑結果顯示，此有效成分可能為含有酚基胺基酸的胜肽類。

關鍵字：靈芝、酪胺酸酶、美白

Abstract

Tyrosinase is the key enzyme for the synthesis of melanin. The purpose of this study is to try to produce tyrosinase inhibitor obtained from the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. Different parts from the fermented product were tested and compared for the effect of inhibitor, which included supernatant, mycelium, and fermentation broth. Inhibiting melanogenesis. In addition, extraction or enzyme hydrolysis were also used to improve inhibition effect. The types of enzymes chosen were Neutrase, Celluclast, Lysozyme, Papain, and Bromelain. The experiment could be categorized mainly into three parts. (1) the comparison of various fermented product for bleaching effect (2) the comparison of various enzyme and hydrolysis conditions (pH, temperature and time) for inhibiting melanogenesis and bleaching effect. (3) the analysis of effective components. The results show that the polytron treatment of fermented broth and the addition of Neutrase, Celluclast, and Papain could improve the bleaching effect to 79.8%, 82.7%, and 88.1%. The optimum conditions of enzyme hydrolysis were determined as follows. The treatment of Neutrase at pH 5.5, 30°C, and 120 minutes could cause the inhibiting effect to rise to 93.4%. The treatment of Celluclast at pH 5, 30°C, and 240 minutes could lead to an increase of the inhibiting effect to 95.9%. The results reveal that prolonged hydrolysis of Neutrase and Celluclast could enhance the bleaching effect. However, the prolonged treatment of Papain after 120 min would cause the reverse effect. After the chemical analysis in Folin & Ciocalteu's Phenol reagent, the effective component for bleaching was considered to be some types of peptide containing phenolic group.

Keyword : *Ganoderma lucidum*, Tyrosinase, bleaching effect

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
第一章 緒論	
1-1 前言與目的.....	1
第二章 文獻回顧	
2-1 靈芝簡介.....	3
2-1-1 靈芝生活史	3
2-1-2 靈芝的栽培方式.....	4
2-1-3 靈芝的生理作用與藥理效果.....	6
2-2 皮膚的構造.....	10
2-2-1 表皮 (Epidermis)	10
2-2-2 真皮 (Dermis)	12
2-2-3 皮下組織 (Hypodermis)	13
2-3 黑色素細胞 (Melanocytes)	14
2-4 酪胺酸酶 (Tyrosinase)	15

2-5 黑色素形成過程.....	17
2-6 黑色素種類.....	18
2-7 美白成分.....	20
2-8 美白之有效性評估檢驗法.....	25
2-8-1 酵素實驗	25
2-8-2 動物實驗	25
2-8-3 細胞培養實驗 (Cell Culture)及 Eytex 試驗法.....	26
2-9 酵素簡介	28
第三章 實驗材料與分析方法	
3-1 實驗菌株	32
3-2 實驗藥品	33
3-3 實驗儀器與設備.....	34
3-4 分析方法	35
3-4-1 pH 值測定	35
3-4-2 菌體 Biomass	35
3-4-3 葡萄糖濃度測定	35
3-4-4 多醣含量測定法	35
3-4-5 含酚基的胺基酸測定(Folin & Ciocalteus Phenol reagent)	37
3-4-6 離體抑制酪氨酸酶活性試驗試藥配製	37

3-4-7 離體抑制酪氨酸酶活性試驗測定方法	38
------------------------------	----

第四章 實驗方法

4-1 論文整體實驗架構.....	40
4-2 液態培養基組成.....	41
4-3 種菌製備.....	41
4-4 酪胺酸與酪胺酸酶反應時間與吸收度關係之測定.....	42
4-5 三角瓶液態培養試驗.....	43
4-6 靈芝發酵液、Vit-C 與美白修護液抑制 DOPA 生成之效果...	44
4-7 培養基與添加酵素對抑制 DOPA 生成之影響.....	45
4-8 菌絲體添加酸、鹼、酵素作用試驗.....	46
4-9 發酵液添加酸、鹼、酵素作用試驗.....	48
4-10 不同 pH 對酵素作用之影響	50
4-11 不同溫度對酵素作用之影響.....	51
4-12 不同時間對酵素作用之影響.....	52
4-13 有效成分鑑定試驗	53

第五章 結果與討論

5-1 酪胺酸與酪胺酸酶反應時間與吸收度關係之測定.....	54
5-2 三角瓶液態培養試驗.....	57
5-2-1 培養時間之影響.....	57

5-2-2 比較靈芝發酵液、Vit-C 與美白修護液抑制 DOPA 生成之效果.....	60
5-2-3 設定條件.....	62
5-2-4 培養基與添加酵素是否會抑制 DOPA 生成之試驗...	63
5-2-5 菌絲體添加酸、鹼、酵素作用試驗.....	64
5-2-6 發酵液添加酸、鹼、酵素作用試驗.....	66
5-2-7 不同 pH 對酵素作用之影響.....	69
5-2-8 不同溫度對酵素作用之影響.....	76
5-2-9 不同時間對酵素作用之影響.....	75
5-3 改變變因(pH、溫度及作用時間)之綜合歸納.....	79
5-4 有效成分鑑定試驗.....	81
第六章 結論與未來展望	
6-1 結論	86
6-2 未來展望	88
參考文獻	89

圖目錄

圖 2-1 靈芝生活史.....	3
圖 2-2 皮膚組成.....	10
圖 2-3 表皮組成.....	11
圖 2-4 表皮中的黑色素細胞.....	14
圖 2-5 酪胺酸酶活性中心的結構.....	16
圖 2-6 總氧化反應.....	16
圖 2-7 黑色素形成示意圖.....	17
圖 2-8 黑色素細胞中 Eumelanin 與 Pheomelanin 合成之示意圖.....	19
圖 5-1 黑色素隨反應時間之生成變化圖.....	55
圖 5-2 黑色素的生成時間與吸收值之關係.....	56
圖 5-3 靈芝菌絲體之生長曲線圖.....	59
圖 5-4 比較市售 Vit-C 與美白修護液對 DOPA 抑制之影響 ...	61
圖 5-5 不同 enzyme 對黑色素生成之影響.....	63
圖 5-6 菌絲體經不同萃取方法其抑制效果之比較.....	65
圖 5-7 發酵液與均質處理發酵液經不同作用方法對抑制效果之影 響.....	68
圖 5-8 不同 pH 對 Neutrased 作用之影響.....	70
圖 5-9 不同 pH 對 Celluclast 作用之影響.....	70

圖 5-10 不同 pH 對 Papain 作用之影響.....	70
圖 5-11 比較不同 pH 對三種酵素作用之影響.....	71
圖 5-12 不同溫度對 Neutrase 作用之影響.....	73
圖 5-13 不同溫度對 Celluclast 作用之影響.....	74
圖 5-14 不同溫度對 Papain 作用之影響.....	75
圖 5-15 不同時間對 Neutrase 作用之影響.....	77
圖 5-16 不同時間對 Celluclast 作用之影響.....	78
圖 5-17 不同時間對 Papain 作用之影響.....	79
圖 5-18 多醣生成與上清液 DOPA 抑制之關係.....	84
圖 5-19 多醣對黑色素抑制之影響.....	84
圖 5-20 不同酵素、時間作用酚基的氨基酸增加百分比與抑制率比較.....	85
圖 5-21 酚基生成與上清液 DOPA 抑制之關係.....	85

表目錄

表 2-1 靈芝的生理作用與藥理效果.....	6
表 2-2 行政院衛生署核准之美白成分與限量.....	24
表 2-3 黑色素生成抑制評估法.....	27
表 3-1 實驗藥品.....	33
表 3-2 實驗儀器與設備.....	34

第一章 緒論

1-1 前言與目的

根據產業報告指出，2001 年全球化妝品的銷售額為 1,239 億美元，預期 2008 年全球化妝品的銷售額可達 1,800 億美元，我國已將化妝保養品產業列入行政院「挑戰 2008 國家發展重點計畫」的產業高值化發展項目內，故政府自 2003 年起投入新台幣一億元以上協助廠商研發高品質的化妝保養品，期望於 2008 年國內的產值規模能超過 400 億元。因此，市場快速成長是可預期的(楊等人，2005)。

俗話說：「一白遮三醜」，在這樣的傳統觀念下，白皙的皮膚是大家所想要的，所以美白產品可說是東方地區國家的熱門產品。一般而言，肌膚美白可分為外用、口服、注射及雷射等方式。其中外用美白最為普遍，主要透過皮膚吸收；口服與注射美白則是藉由體內血液循環將藥物送往表皮；雷射美白是在極短時間內給予大量吸收能量，瞬間造成黑色素細胞破壞，再經由表皮代謝剝落或體內血管淋巴系統帶走。所以美白肌膚可透過干擾黑色素的形成和轉移的過程來達到美白目的。造成黑色素生成的關鍵酵素是酪胺酸酶，所以通過抑制酪胺酸酶活性來抑制黑色素的生成。

靈芝(*Ganoderma lucidum*)自古以來就是國人認為的仙丹妙藥，因為野生靈芝量少且難尋，所以就更顯得珍貴。靈芝已知的成分有：

多醣體、超氧歧化酶、三帖類、免疫調節蛋白、蛋白多醣、有機鍍、腺苷、類固醇、SACCHACHITIN 等物質。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)。2006 年臺北醫學大學 張湘寧研究生研究指出 SACCHACHITIN 可減少 B16 細胞產生黑色素與降低 B16 細胞之酪胺酸酶活性(張，2006)。

由於靈芝子實體的培養一般需要 2-3 個月，從開始到採收相當費時，且野生靈芝不易取得，所以發展出類似以液態發酵培養生產抗生素的形式，即靈芝液態培養。

本實驗主要目的為：希望藉由靈芝液態培養生成具有抑制黑色素生成的抑制劑，再藉由不同的萃取方式萃出更多有效成分。

第二章 文獻回顧

2-1 靈芝簡介

2-1-1 靈芝生活史(詹，2003)

靈芝的擔子孢子自菌褶散出後，在適當的生長環境下萌發後直接發育成菌絲，此菌絲每一節中具有一個核，一般稱為初級菌絲或單相菌絲。初級菌絲在靈芝生活史中存在時間很短，它萌發和生長主要是依靠孢子中儲存的營養。由不同性別的擔子孢子所生長的初級菌絲融合後可生成具有二個核之菌絲，稱為次級菌絲或複相菌絲。由次級菌絲繼續生長最後形成有組織分化的子實體，凡是組成子實體的菌絲都稱為三級菌絲。詳細靈芝生活史如圖 2-1 所示。

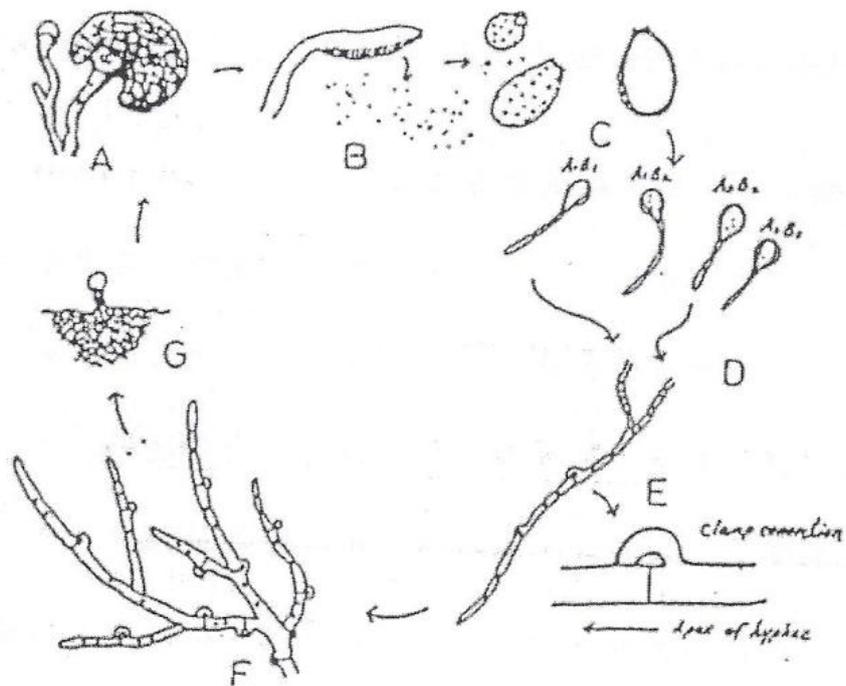


圖 2-1 靈芝生活史(蘇，1991)

(B)從菌摺中散出擔子孢子，(C)孢子再發芽成為不同交配型態的單核體(monok)，此時的菌絲每一節只有一個細胞核，(D)二條具有不同性核的單核體交配發生細胞質融合生成雙核體，(E)雙核體繼續共軛分裂，分裂行為發生時，將出現扣子體結構(clamp connection)，(F)菌絲繼續生長，(G)在適當環境條件下會長成子實體的原基(primodium)，(A)成熟的靈芝子實體。

2-1-2 靈芝的栽培方式(詹，2003)

(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

(1) 子實體栽培

段木栽培：將靈芝の生長菌絲種植在櫟木或枹木の枯木段上。

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℃栽培 70-90 天即可採收子實體。

(2) 菌絲體液態培養(楊，2006)

目前已有大規模靈芝子實體培養，所使用の方法與菇類培養相似，即段木或太空包培養，經過是當環境控制，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。

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(Peng et al.,2005)。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。

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

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。

2-1-3 靈芝的生理作用與藥理效果

靈芝是珍貴的藥用植物，其主要原因是靈芝含有多種具有生理活性與療效物質，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(詹，2003)

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	(王等人，1996) (Sone et al., 1985)
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)
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	(王，2001)
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)
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)

(一)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)子實體的殘渣中萃取出一種特殊成分 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)，已取得中華民國專利(張，2006)，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)。之後，臺北醫學大學 張湘寧研究生之研究指出 SACCHACHITIN 可減少 B16 細胞產生黑色素與降低 B16 細胞之酪胺酸酶活性(張，2006)。

(二)抗癌作用

靈芝具抗癌的主要成分為多醣體；具抗癌及免疫增加作用之靈芝多醣為 β 型之高分子多醣體，即必須有 C-6 側枝，(1-3)- β -D-gluco-pyr-anosyl-(1-3)-A-D-gluco-pyranosyl 之結構。

由醫學臨床研究指出：靈芝多醣體之抗癌機轉可能是由靈芝之 β 型多醣體 (β -1,3)-glucan) 刺激巨噬細胞(macrophage)，活化巨噬細胞使其分泌 Cytokines 及 Lymphokines ，例如：IL-I ， TNF ， INF ， IL-II ，刺激靜態 T 細胞活化，並分化成輔助性 T 細胞(helper T cell)，繼而更進一步誘導產生自然殺戮細胞(NK cell)、毒殺性細胞 (Cytotoxic)與 LAK (lymphokin active killer cell)細胞等等一連串免

益增強反應，使動物體內增進免疫功能，發揮抗癌作用。

(三)降血壓作用

主要為 lanostane 類之衍生物及某些三帖類化合物可以抑制 Angiotensin Angiotensin converting enzyme 而達到降壓之目的。

(四)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。靈芝多醣體 β -glucan 結構則具有降血脂作用，能不同程度的降低血清膽固醇、甘油三酯和 β -脂蛋白。

(五)免疫作用

靈芝中多醣體類為無毒或低毒性的免疫促進劑，能增加免疫力，強化身體健康。根據醫學研究靈芝多醣體可提高宿主免疫能力，如：NK 細胞之增加等，以對抗移植之肉瘤細胞。所以多醣體是一種生物學反應調節劑(Biological Response Modifier, BRM)長期服用可提高免疫系統。

(六)對內分泌與代謝的影響

大陸方面研究指出：復方靈芝(靈芝菌絲+銀耳孢子)可能有腎上腺皮質激素樣作用。而靈芝多醣 D6 能明顯影響核酸、蛋白質代謝過程，促進蛋白質的合成，這一作用不但是靈芝多種藥理作用的物質基礎，而且還可能是靈芝扶正固本作用的重要環節。

(七)保肝與治療肝炎

對肝受損之動物，靈芝能降低 SGPT，具有解毒作用，可促進肝細胞的再生。靈芝製劑可用於各種病毒性肝炎的治療，總有效率為 73.1-97.0 %，顯效(包括臨床治癒)率為 44.0-76.5 %。

2-2 皮膚的構造

皮膚是人體最大的器官，大約佔總體重的百分之十六。其主要扮演三種功能，分別是保護身體、排汗、感覺冷熱和壓力等。皮膚從外至內大致可分為表皮(Epidermis)、真皮(Dermis)、皮下組織(Hypodermis) 三大部分(圖 2-2)(洪，2004)。

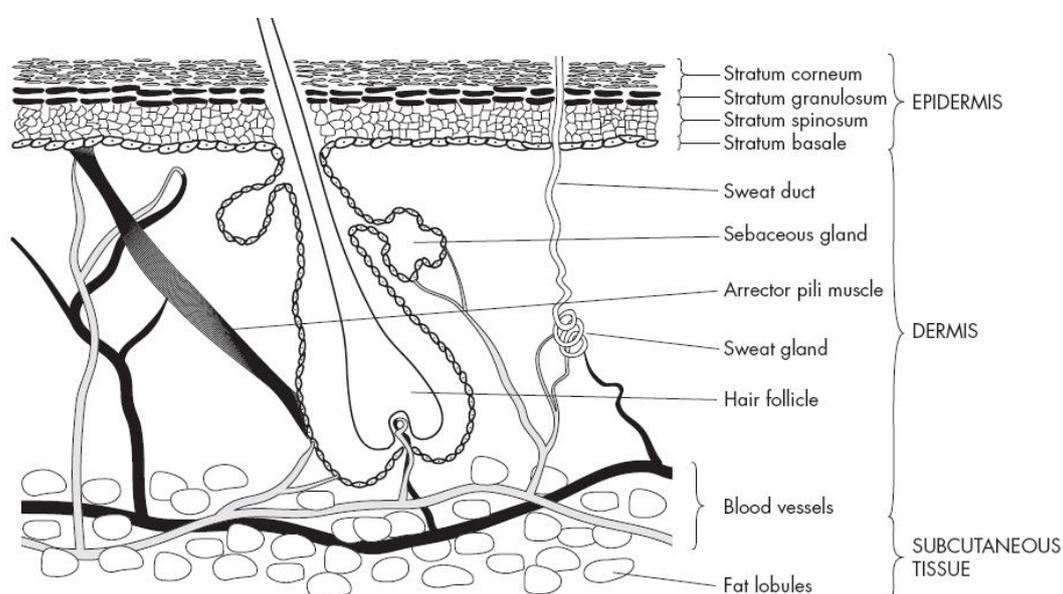


圖 2-2 皮膚組成 (Williams, 2003)

2-2-1 表皮 (Epidermis) (中村，1992)(Williams, 2003)

皮膚最外面薄薄一層即為表皮，大約只有 0.5mm。表皮是由表皮細胞與色素重覆重疊所構成的，最上層至最底層分別為角質層(Stratum corneum)、透明層(Stratum lucidum)、顆粒層(Stratum granulosum)、有棘層(Stratum spinosum)、基底層(Stratum germinativum)等(圖 2-3)。每隔一段時間會分裂出新細胞，接著這些

細胞會由最內層的基底層被推著往外走，角化越完全，最終成為角質層，約要花上 4-6 週的時間，才能完成表皮細胞正常的新陳代謝。

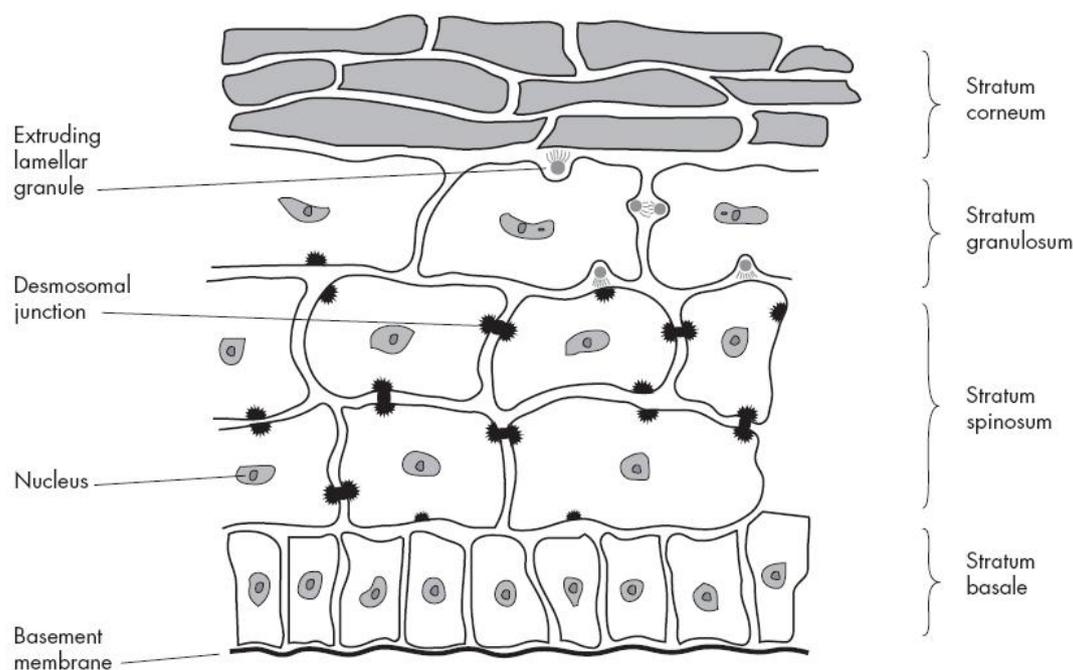


圖 2-3 表皮組成(Williams, 2003)

角質層(Stratum corneum)可以從體外保護肌膚，其主要成分是一種稱「角蛋白」的蛋白質角化而成的。雖然本身不具水分，藉著吸收濕氣因子的機能，使表皮表面的吸水性提升，維持肌膚一定的濕度與水分。

透明層(Stratum lucidum)只在手掌與腳掌處可見，位於角質層與顆粒層之間，在光學顯微鏡下呈現透明的薄層。

顆粒層(Stratum granulosum)別名又稱「角蛋白層」，細胞呈平坦或一端鼓起呈絲網狀，這種細胞中含有很多的「角質透明蛋白」，並

具有強烈折射外來光線的功能。

有棘層(Stratum spinosum) 細胞成方形、多角形或略為扁平，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。

基底層(Stratum germinativum) 是由一排圓柱形細胞所組成，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。

2-2-2 真皮 (Dermis)(中村，1992)(吳，2002)

真皮層緊連在基底層之下，其構造與表皮層不同，並無一層一層的細胞組織。真皮層其厚度約 3-5mm，在人體皮膚中真皮層佔較大的比例。真皮包含了膠原纖維、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。

2-2-3 皮下組織 (Hypodermis) (中村，1992)(吳，2002)

皮下組織位於皮膚最底層，構成皮下組織主要是脂肪，又稱皮下脂肪，其厚度依性別、體型、身體部位不同而有所差異。例如在眼皮的部分，皮下組織是不存在的。當血液在血管中運送或神經傳導的過程中，皮下組織可以有效的提供高能量的分子。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 (Melanocytes)

黑色素細胞為樹突狀的單細胞分泌器官(圖 2-4)，佔表皮細胞的 5-10%，位於表皮中的基底層與棘層之間，在細胞的細胞質中和周邊會形成黑色素小體，黑色素小體會產生黑色素，所以黑色素細胞是黑色素的製造者。當皮膚受到紫外線傷害、內部荷爾蒙、作息不正常、角質代謝不良、不當保養品使用、藥物影響、空氣汙染物或氧化自由基等刺激時，會產生一連串的發炎反應，此時會誘發黑色素細胞製造酪胺酸酶，酪胺酸酶會進入黑色素細胞中的黑色素小體中，在銅離子的輔助下，促使其催化黑色素小體內的酪胺酸經過氧化作用而形成黑色素。(許等人，1992)(徐與柯，1991)

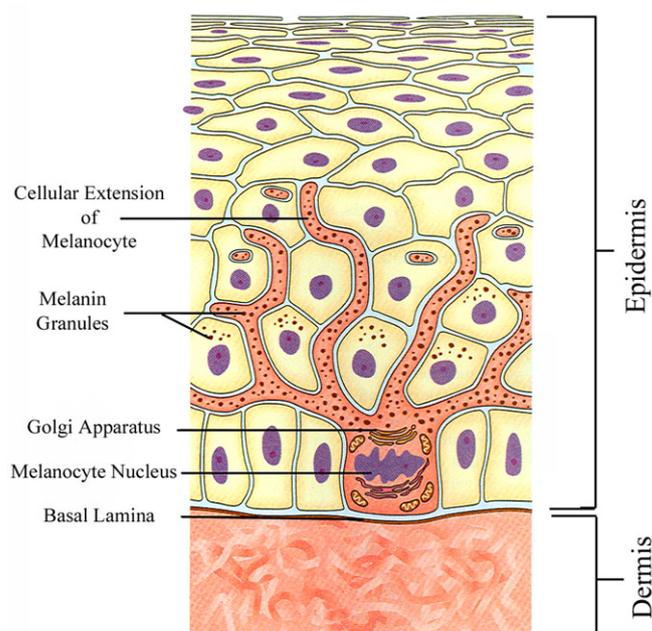


圖 2-4 表皮中的黑色素細胞(Solomon, 2007)

2-4 酪胺酸酶 (Tyrosinase)

酪胺酸酶(polyphenol oxidase , EC 1.14.18.1)為含銅的酵素(圖 2-5)(Seo et al., 2003)。在黑色素合成的過程中，酪胺酸酶扮演著關鍵的角色，此過程分為兩部分(圖 2-6)，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(Espin, 2001)。

因為酪胺酸酶之分子結構上帶有銅離子，銅離子起到輔酶的作用，若有抑制物能利用類似銅螯合劑(copper-chelating agents)螯合銅離子的方式來競爭銅離子，而降低酪胺酸酶的活性，則可減少黑色素之生成。

酪胺酸酶的分布很廣泛，在微生物、植物、動物至人體中皆有酪胺酸酶的存在(Prota, 1988)。不同的酪胺酸酶具有相似的結構和功能。在微生物方面，有 *Bacillus subtilis var niger*、*Psalliota campestris* 和 *Neurospora crassa*；在植物方面，可能分布在葉綠體和色素體中；在動物方面，哺乳類皮膚上的黑色素細胞(melanocyte)、黑色素腫瘤細胞(melanoma)、蝦類的頭部和昆蟲外殼(Sugumaran and Nellaiappan, 2000)。

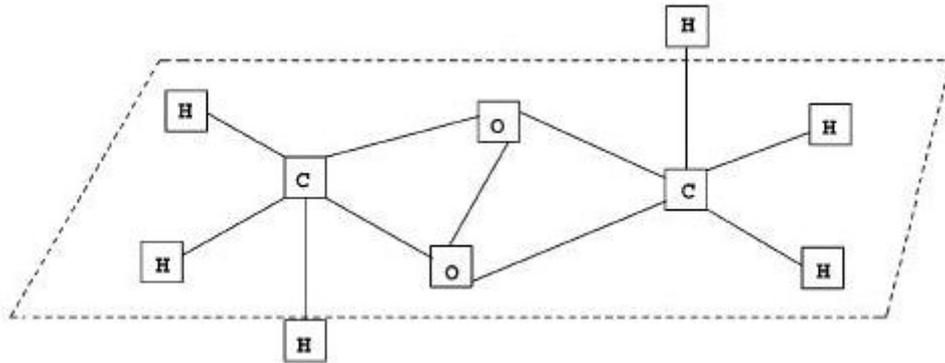


圖 2-5 酪胺酸酶活性中心的結構 C = Cu ion, O = oxygen, and H = His-N (Seo et al., 2003)

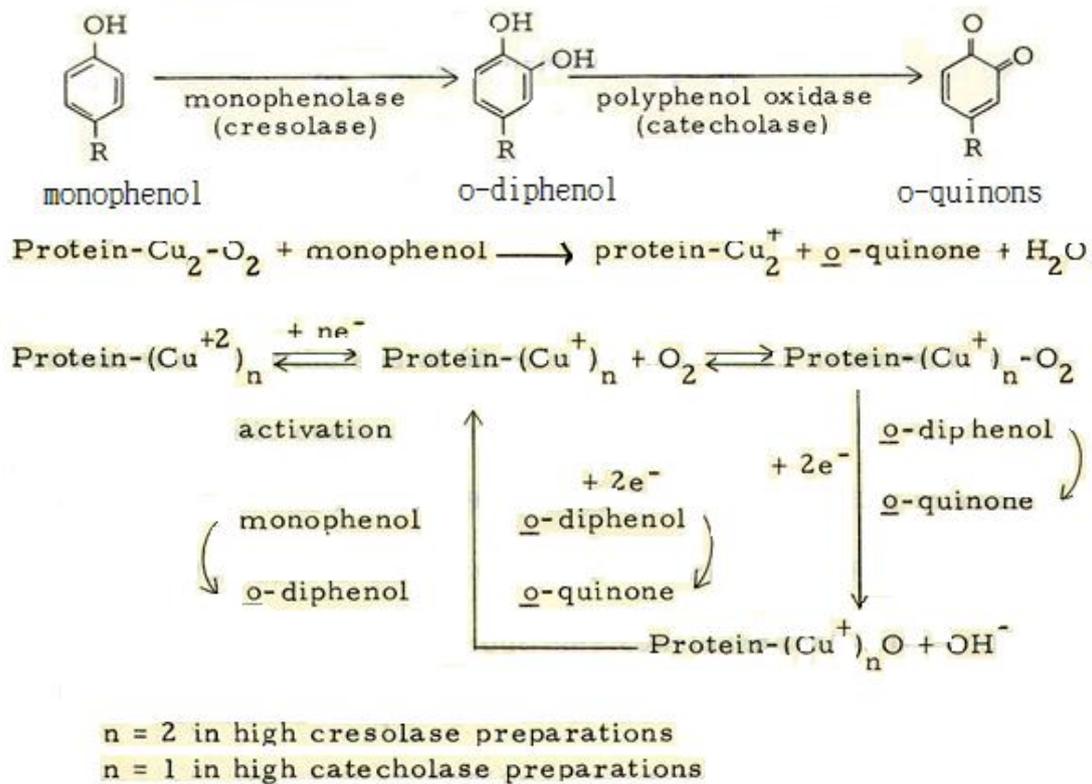


圖 2-6 總氧化反應 (Connie, 1974)

2-5 黑色素形成過程(曾，2002)

黑色素是由黑色素細胞所製造(圖 2-7)，在表皮的深層內形成，並且向皮膚表面移動，扮演其保護的角色。黑色素細胞中的黑色小體會藉由細胞質的流動或受到細胞骨架的推擠，而慢慢往樹突狀方向移動，最後進入周邊的角質細胞。角質細胞負責轉移的工作，角質細胞將這些黑色素運至皮膚表面，最後黑色素會隨表層角質細胞脫落而被代謝。

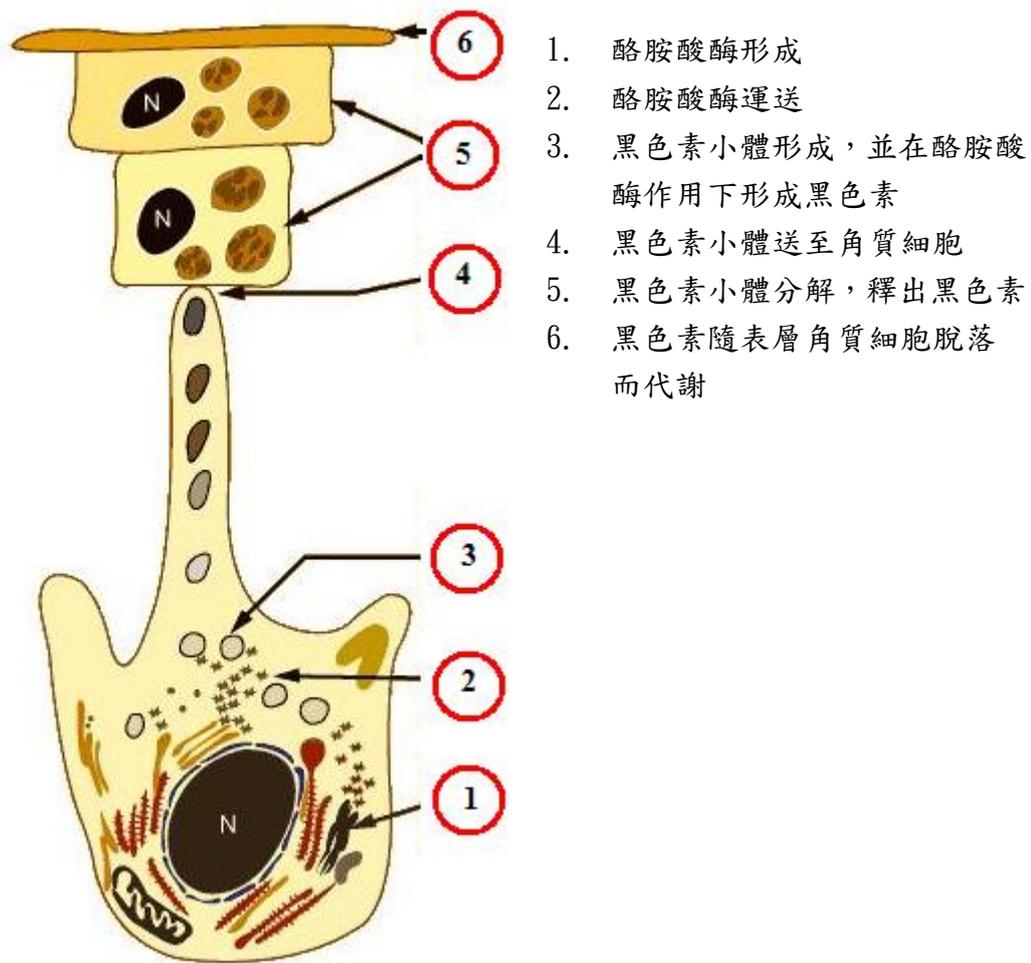


圖 2-7 黑色素形成示意圖(曾，2002)

2-6 黑色素種類(張, 2001)(Chad et al., 2000)

人體皮膚產生的黑色素依構造分為兩種：真黑色素(Eumelanin)和類黑色素(Pheomelanin)(圖 2-8)。

真黑色素(Eumelanin)，含氮元素，呈黑色或褐色，衍生自 DHI (5,6-dihydroxyindole)，少部分來自 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)，經氧化與聚合作用產生真黑色素(Eumelanin)(Ortonne and Prota, 1993)。真黑色素(Eumelanin)在人體中主要表現於深色的頭髮、眼睛、內耳、黏膜和黑色素瘤細胞等。

類黑色素(Pheomelanin)，含 8-11% 氮元素，9-12% 硫元素，呈黃色或紅色，可溶於鹼，其中黃色色素蛋白是由 1,4-benzothiazine 組成，在哺乳類的毛髮(ex:牛、山羊、馬、鹿、天竺鼠和人類的紅頭髮等)和鳥類的羽毛(雞、雉和鷓鴣等)含量較高。

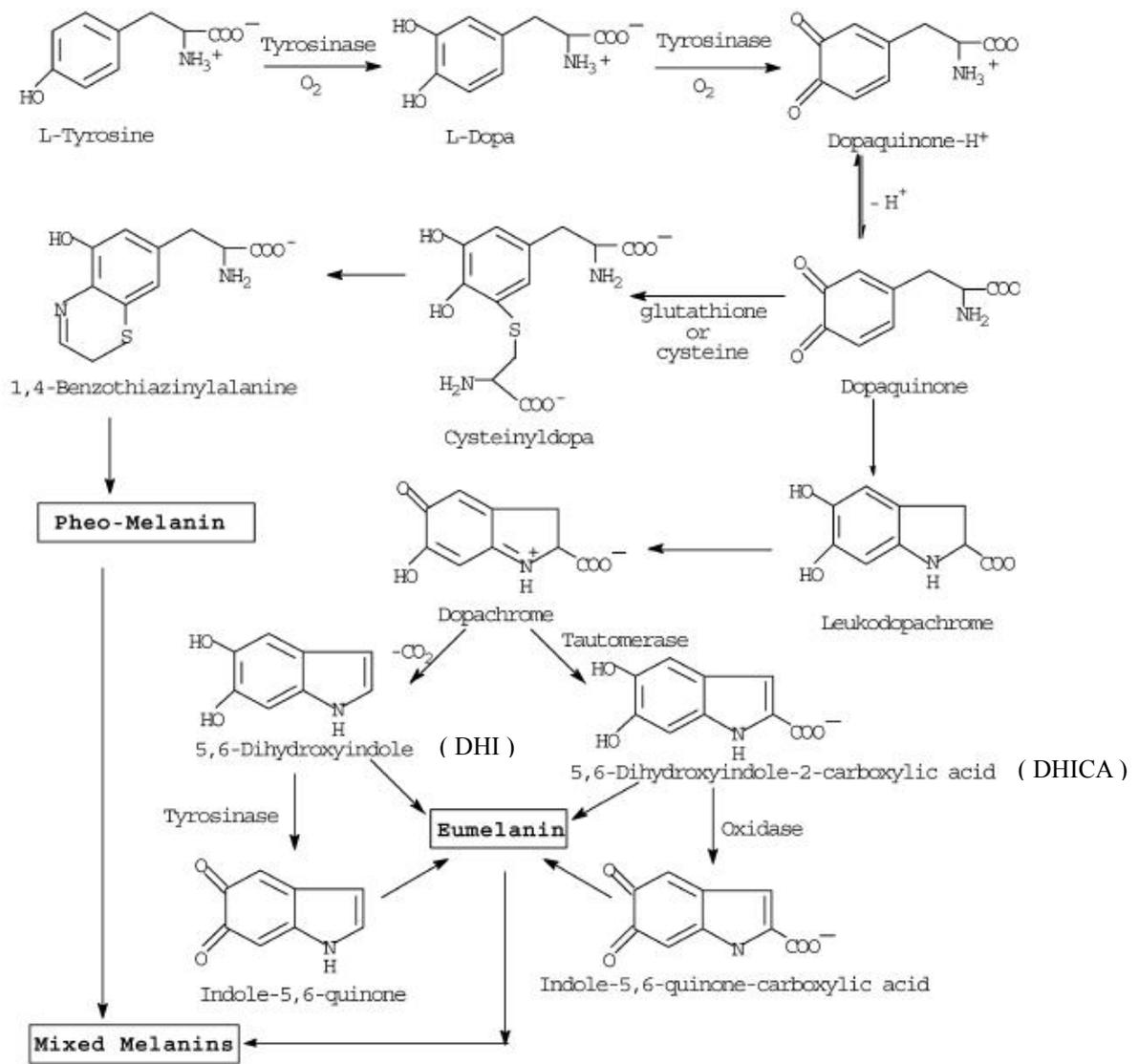


圖 2-8 黑色素細胞中 Eumelanin 與 Pheomelanin 合成之示意圖

(Seo et al. , 2003)

2-7 美白成分(王，2004)(楊等人，2005)

愛美是人的天性，隨著社會風氣的多元開放與生活水準日益提高，化妝品的消費族群越來越年輕，使用人口不分男女也越來越多，已慢慢地從過去被視為奢侈品轉為民生必需品。針對東方國家，美白產品可說是最熱門的產品，其作用機轉可分為下列幾類：

(1) 酪胺酸酶直接或間接抑制

抑制酪胺酸酶活性的機制是螯合酪胺酸酶之活性中心銅離子，此可使酪胺酸酶失去活性，進而防止黑色素的形成。

(2) 抗氧化及抗自由基作用

正常狀態下，生物體所產生的自由基與抗氧化防禦系統為恒定狀態。在生物體細胞中，抗氧化物的存在可對體內的氧化還原反應做適度的調節，防止 DOPA 的自動氧化。

自由基的作用機制會氧化細胞內外多種成分，造成細胞衰老或發炎反應等。

(3) 加速角質細胞的代謝，促進黑色素脫落剝離

正常表皮細胞從基底層到角質層死亡、脫落，約要花上 4-6 週的時間，才能完成表皮細胞正常的新陳代謝。凡能幫助角質層快速代謝的物質，皆能促進黑色素脫落剝離。

(4) 還原已氧化的酪胺酸 (還原黑色素)

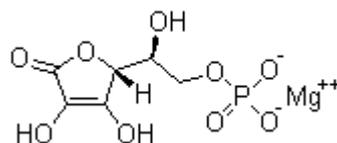
維他命 C (L-ascrobic acid) 為還原劑，可將 Dopauinone 還原成 DOPA 或將深色氧化型黑色素還原成淺色的黑色素。

(5) 黑色素細胞的毒殺作用

使用具有細胞毒性(cyto-toxic) 的物質會阻止黑色素生成且不再生成黑色素，在人體中，其生理保護作用也會受到抑制，如對苯二酚。

依行政院衛生署核准，可使用於化妝品且可訴求美白之成份(表 2-2) 包括：維生素 C 磷酸鎂(Magnesium ascorbyl phosphate)、維生素 C 磷酸鈉(Sodium ascorbyl phosphate)、維生素 C 糖苷(Ascorbyl glucoside)、麴酸(Kojic acid)、熊果苷(Arbutin)、鞣花酸(Ellagic acid) 等。以下針對這些美白成分做介紹：

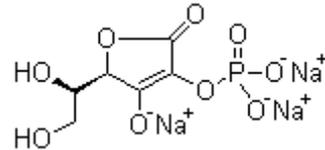
1. 維生素 C 磷酸鎂



維生素 C 磷酸鎂(Magnesium L-Ascorbyl-2-phosphate, MAP) 為維生素 C 衍生物，是以維生素 C 為原料，用現代科學技術加工而成，維生素 C 是最早被醫界肯定為安全有效的口服美白製劑，為最具代表性的黑色素抑制劑。維生素 C 磷酸鎂是一種水溶性美白劑，具有維生素 C 所有功效又克服了維生素 C 怕光、熱及金屬離子等、易被

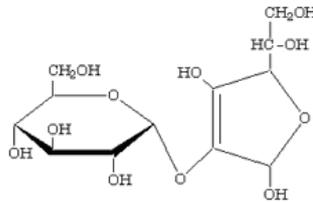
氧化的缺點，其穩定性高且無刺激。我國目前衛生署規定產品添加維生素 C 磷酸鎂濃度在 3% 以下者可標美白產品。

2. 維生素 C 磷酸鈉



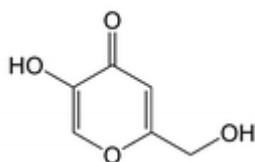
維生素 C 磷酸鈉(Sodium L-ascorbyl-2-phosphate)亦為維生素 C 衍生物。我國目前衛生署規定產品添加維生素 C 磷酸鈉濃度在 3% 以下者可標美白產品。

3. 維生素 C 糖苷



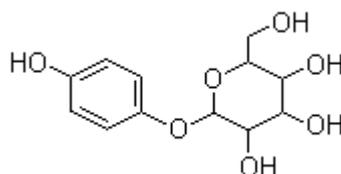
維生素 C 糖苷(Ascorbic acid 2-glucoside, AA2G)是維他命 C 的衍生物，因為純維他命 C 的氧化特性不易保存，所以此類衍生物因此被開發出來，將維他命 C 結合金屬鹽，維持較佳的穩定性、穩定性高、較無副作用。我國目前衛生署規定產品添加維生素 C 糖苷濃度在 2% 以下者可標美白產品。

4. 麴酸



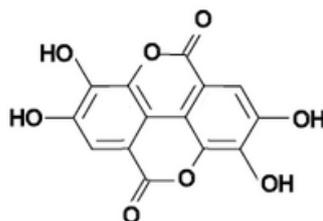
麴酸(Hydroxyl-methyl-5-hydroxy- σ -pyrone) 是麴菌(*Aspergillus oryzae*)發酵所產生之副產物，一般可做為殺蟲劑及抗菌劑使用。經研究發現，麴酸能螯合與酪胺酸酶活性關係密切的銅離子，而抑制酪胺酸酶活性，減少黑色素生成，所以具有美白之功效。我國目前衛生署規定產品添加麴酸濃度在 2% 以下者可標美白產品。

5. 熊果苷



熊果苷(Hydroquinone- β -D-glucopyranoside)最早是由熊果樹(*Arctostaphylos uva-ursi*)之葉中萃取而得。由於其可抑制人體皮膚細胞黑色素的生成，且無明顯副作用，所以被廣用在化妝品中。我國目前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。我國目前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。

表 2-2 行政院衛生署核准之美白成分與限量

成分名稱	限量	用途
維生素 C 磷酸鎂(Magnesiun ascorbyl phosphate)	3%	美白
維生素 C 磷酸鈉(Sodium ascorbyl phosphate)	3%	美白
維生素 C 醣苷(Ascorbyl glucoside)	2%	美白
麴酸(Kojic acid)	2%	美白
熊果苷(Arbutin)	7%	美白
鞣花酸(Ellagic acid)	0.5%	美白

2-8 美白之有效性評估檢驗法(陳, 2003)(Sheu et al. , 2003)(莊等人, 2005)

黑色素生成抑制有效性的評估方式(表 2-3)可以應用在離體與活體兩種方式進行。離體方式即以酵素實驗與細胞培養為主。活體方式即以動物實驗的有效評估方式與人體相同。

2-8-1 酵素實驗

皮膚的各種生理反應常有酵素參與，所以可以直接觀察酵素與成份之間的反應效果，進一步了解成份的毒害或有效性，因為酵素實驗屬於離體實驗且方法簡易，所以常是篩選有效成份的第一步。例如篩選美白成份時，常測定對菇類萃取的酪胺酸酶之抑制效果。

2-8-2 動物實驗

市售的化妝品在研發過程中需先通過毒性試驗與刺激性試驗，確保不會對人體造成傷害。毒性試驗中，廣為人知的試驗如半致死劑量試驗(LD₅₀ 試驗)，即求得半數實驗動物死亡所需劑量的實驗。需配合其他毒性試驗才能確定試劑的真正毒性。刺激性試驗如德瑞茲試驗(Draize's test)，即測試試劑能否引起動物皮膚及眼睛刺激反應的評估方法，常以天竺鼠與兔子做為實驗對象(Takahashi et al. , 2008)。

在動物實驗中，最直接的美白測試方法是化妝品使用前後之皮膚顏色來比較，目前膚色測定是以分光儀器測定三原色的反射比率，再以標準色度法求得顏色的定量。

2-8-3 細胞培養實驗 (Cell Culture)及 Eytex 試驗法

細胞培養實驗是最接近活體的效果的離體實驗，常取用人體或鼠體的癌症細胞或正常細胞，如Mouse B16 細胞之抑制效果，其做法是將Mouse B16 細胞培養在 10 % FBS之DMEM 培養基中，控制條件為 5 % CO₂及 37°C，再加入待測成分，觀察細胞活存情形可做為待測成份對細胞毒性的依據；觀察細胞顏色可探討待測成分是否具有抑制黑色素生成之依據。

Eytex 試驗法是用來取代德瑞茲試驗的眼睛刺激實驗，由於豆類蛋白與人類眼角膜蛋白類似，所以當試劑會刺激眼睛時，蛋白會變性而導致混濁，其混濁程度可由分光光度計判讀。

表 2-3 黑色素生成抑制評估法(魏等人，2005)

評估 level、材料	評估對象	方法
<p>酵素活性抑制</p> <p>Mushroom tyrosinase 抽出液</p>	<p>1. Tyrosinase 活性抑制</p> <p>1) Tyrosinase hydroxylase 活性抑制</p> <p>2) DOPA oxidase 活性抑制</p> <p>2. Tyrosinase 以外酵素活性抑制</p> <p>1) DOPAchrome tautomerase 活性抑制</p> <p>2) DHICA oxidase 活性抑制</p> <p>3) DHI oxidase 活性抑制</p> <p>4) Melanin 合成抑制</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ H^3-Tyrosine 轉換成DOPA 時，放出H^3O的放射活性測試 ■ DOPA 當基質，於 475nm 測生成 DOPA-chrome 的吸光值 ■ DOPAchrome 當基質，以 HPLC 測生成 5,6-DHICA ■ Modified MBTH 法 ■ Modified MBTH 法 ■ C^{14}-Tyrosine 或 C^{14}-thiouracil生成 C^{14}-melanin測定
<p>用培養色素細胞測 Melanin 合成抑制</p> <p>B16 Melanoma 細胞 人正常 melanosite</p>	<p>1. Tyrosinase 活性抑制</p> <p>2. Tyrosinase 生成抑制</p> <p>3. Tyrosinase 糖鏈修飾抑制</p> <p>4. Melanin 合成抑制</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 細胞抽出液 Tyrosinase 活性抑制試驗 ■ Northern blotting 法，以 RT-PCR 法定量 mRNA ■ Western blotting 法定量蛋白質 ■ Tyrosinase isozyme SDS 電泳·DOPA 染色解析 ■ 顯微鏡視覺判定 ■ 細胞 level 的顏色目視判定 ■ NaOH 溶解後 400nm 吸光測定 ■ HPLC eumelanin、pheoelanin 定量 ■ C^{14}-Tyrosine 或 C^{14}-thiouracil當基質時生成 C^{14}-melanin測定 ■ 電子顯微鏡觀察(TEM、SEM)
<p>實驗動物(褐色 marmot) <i>in vivo</i> 試驗</p>	<p>因紫外線色素沉澱預防、改善 (Pissavini and Ferrero, 2004)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 目視判定 ■ 皮膚癌色測定 ■ 組織學的觀察
<p>人皮膚 <i>in vivo</i> 試驗</p>	<p>因紫外線色素沉澱預防、改善 各角質層的 melanin 顆粒評估</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 目視判定 ■ 皮膚癌色測定 ■ Tape stripping
<p>臨床試驗(肝斑、老人性色素斑改善實驗)</p>	<p>臨床試驗(肝斑、老人性色素斑改善實驗)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 目視判定 ■ 皮膚癌色測定 ■ 影像解析

2-9 酵素簡介

目前，國內外學者提出的萃取法主要有化學萃取法、物理萃取法和酵素水解法。化學萃取法主要是酸(鹽酸、硝酸、硫酸等強酸)、鹼(氫氧化鈉)萃取；物理萃取法主要有微波萃取法；酵素水解法通常優於化學萃取過程，這是由於酵素水解法是在較溫和的條件下直接進行的，且不需加入大量的反應試劑，對環境污染較少。以下將針對五種酵素做介紹：

(一) 木瓜蛋白酶 (Papain)

木瓜蛋白酶 (Papain) 簡稱木瓜酶，又稱為木瓜酵素。它是一種含巯基(-SH)肽鏈內切酶，具有蛋白酶和酯酶的活性，有較廣泛的特異性，對動植物蛋白、多肽、酯、醯胺等有較強的水解能力，同時，還具有合成功能，能把蛋白水解物合成為類蛋白質。溶於水和甘油，水溶液呈無色或淡黃色，有時呈乳白色；幾乎不溶於乙醇、氯仿和乙醚等有機溶劑。

(二) 纖維分解酵素 Celluclast (Cellulase)(尤，2003)

纖維素纖維分解酵素是一群水解酵素，這些酵素包括：

(1) 內切型纖維素纖維分解酵素(endo- β -1,4-glucanase) E.C.3.2.1.4

此酵素又稱 β -1,4-D-glucanhydrolase 或 carboxymethylcellulase (CMCase)，是 glycoprotein 的一種，分子量約為 53,000-145,000D。

作用在纖維素的非結晶區(amorphous domain)，可將纖維素的 β -1,4 鍵，以非特異性(random)的方式予以水解，將纖維素分解成 glucose、cellobiose 和 cellodextrin。此酵素也會分解 carboxymethylcellulose (CMC)、cellodextrin 及一些水溶性的纖維分解衍生物，缺乏獨立分解結晶型纖維素的能力，但在 exoglucanase 的共同作用下，可以很有效率的分解結晶型纖維素。此酵素是一種可被纖維素誘導(induced)產生的酵素。

(2) 外切型纖維素纖維分解酵素($\text{exo-}\beta$ -1,4-glucanase) E.C.3.2.1.91

此酵素又稱 β -1,4-glucan cellobiohydrolase 或 cellulose- β -1,4-glucan cellobiosidase。為 glycoprotein 的一種，分子量約為 42,000~65,000D。此酵素可分解結晶型纖維素，如微結晶型(microcrystal)的棉花。它可自纖維素末端起，以纖維雙糖(cellobiose)為單位將之水解。在在 endoglucanase 的共同作用下，是具有良好的分解結晶型纖維素的能力。

(3) β -葡萄糖苷酵素(β -1,4-glucosidase) E.C.3.2.1.21

β -葡萄糖苷酵素(β -1,4-glucosidase)又稱 β -1,4-glucohydrolase 或 cellobiase。是 glycoprotein 的一種，分子量約為 50,000~410,000D。可將纖維雙糖(cellobiose)或纖維寡糖(cellooligosaccharide，DP=3~4)自非還原端起，以葡萄糖一個單位予以水解。由於能將纖維雙糖分解成

葡萄糖，可以減少纖維雙糖對於 endo- β -1,4-glucanase 及 exo- β -1,4-glucosidase 活性的抑制作用，但是 β -1,4-glucosidase 本身的活性則會受到葡萄糖累積的抑制。

(三) 鳳梨酵素(Bromelain)

鳳梨酵素(Bromelain)，可因來源的不同分成兩種，從果肉取得的稱 fruit bromelain；從莖幹部取得的稱 stem bromelain，其中又以由鳳梨莖幹部所取得的鳳梨酵素具有較多的生理效能。1876 年，鳳梨酵素的化學性質正是被人類所發現，而在 1957 年，Heinicke 在 Ananas comosus 鳳梨的莖幹部發現高濃度的鳳梨酵素是 Sulfhydryl 蛋白水解酶中之一員。鳳梨酵素中除了 Cysteine 蛋白水解酶外，也含有過氧化酶(peroxidase)、酸性磷酸(acid phosphatase)和數種蛋白質水解酶抑制劑(Rowan et al., 1990)。

(四) 溶菌酶(Lysozyme)

溶菌酶(Lysozyme)是一種可溶解細菌細胞壁的酵素，廣泛存在於生物中，包括動物的淚水、口水及人乳、雞蛋蛋白等。其中以雞蛋蛋白中的溶菌酶與人體內的溶菌酶具有相似的性質，也是自然界溶菌酶含量最多的。

(五) 中性蛋白酶(Neutrase)

中性蛋白酶是由枯草芽孢桿菌經發酵提取而得的，屬於一種內切

酶，可用於各種蛋白質水解處理。在一定溫度、pH 下，可將大分子蛋白質水解為氨基酸等產物。

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 實驗菌株

本研究所採取的菌株購自新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，編號 BCRC36123 靈芝屬之赤靈芝 *Ganoderma lucidum* 【原美國菌種保存中心 ATCC (American Type Culture Collection) 編號 ATCC32471 菌株，來源地：Acrocarpus fraxinifolius roots , India】。

菌種在 30°C 下活化後，以 PDA (Potato Dextrose Agar) 為斜面培養基，接菌完畢後於 30°C 下培養 7 天，之後置於 4°C 冰箱中保存備用，每 2 個月更新一次。

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		
D-(+)- glucose	SIGMA	
Yeast extract	DIFCO	
KH ₂ PO ₄	SHOWA	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	聯工化學試藥	EP 級
Potato dextrose ager (PDA)	DIFCO	
NaOH	SHOWA	
HCl	林 純藥工業株式會社	試藥 1 級
H ₂ SO ₄	SHOWA	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	聯工化學試藥	EP 級
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	SHOWA	
L-tyrosine	SIGMA	
Tyrosinase mushroom (5370 units/mg)	SIGMA	
Phenol	林 純藥工業株式會社	試藥 1 級
CH ₃ COOH	林 純藥工業株式會社	試藥 1 級
CH ₃ COONa	SHOWA	
Na ₂ CO ₃	SHOWA	
Bromelain	雙安	
Papain	雙安	
Lysozyme	SIGMA	10,000units/mg
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	
美白修護液	杏輝	
維他命 C	紐崔萊	

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	MS1 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-TURR AX T25
高速中型離心機	德國 HETTICH 公司	Universal-32R
紫外光-可見光譜儀	美國 Thermo 公司	
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

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

取發酵液以抽氣過濾裝置利用濾紙過濾之後，將過濾後的菌體和已知重量的濾紙，在烘箱 60°C 下烘乾後，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 glucose 測定。

3-4-4 多醣含量測定法

(一) 總糖測定—酚硫酸比色法

1. 測定之原理

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

2. 標準曲線製作步驟

(1) 秤取 D-(+)- glucose 20 mg 溶於 100 ml 蒸餾水中 (0.2 mg/ml)

(2) 利用(1)配置濃度分別為：

0.01 mg/ml、0.015 mg/ml、0.025 mg/ml、0.03 mg/ml、0.05 mg/ml、0.06 mg/ml、0.1 mg/ml、0.12 mg/ml 各 2 ml，以及蒸餾水 2 ml 做為空白對照組。

(3) 各加入 1 ml 濃度為 5% 酚溶液，並於 10-20 分鐘內各加入 5 ml 濃度為 95.5% 濃硫酸溶液，均勻混和後靜置 10 分鐘。

(4) 放入 25°C 水浴中 15 分鐘，最後取出以紫外光-可見光譜儀 490 nm 波長下測其吸光值，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 2 ml 置於試管中，加入 1 ml 濃度為 5% 酚溶液，並於 10-20 分鐘內各加入 5ml 濃度為 95.5% 濃硫酸溶液，均勻混和後靜置 10 分鐘。

(3) 放入 25°C 水浴中 15 分鐘，最後取出以紫外光-可見光譜儀 490 nm 波長下測其吸光值，對照標準曲線即可訂出樣品所含糖量。

(二) 葡萄糖量測定

(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) 取適量上述經稀釋的多醣溶液於試管中，以 YSI-2300 STAT

葡萄糖分析儀進行分析。

(三) 多醣含量

將(一)總糖量扣除(二)葡萄糖量級為多醣量。

3-4-5 含酚基的胺基酸測定(Folin & Ciocalteus Phenol reagent)

(李，2002)

1.測定之原理：

福林-酚試劑在鹼性條件下可被酚類化合物還原呈藍色反應。由於蛋白質分子中含有酚基的胺基酸(酪胺酸和色胺酸同磷鉬酸-磷鎢酸)，它使蛋白質及其水解產物呈上述反應，測OD 660nm。

2.測定之方法：

取發酵液的上清液或經萃取的上清液 1 ml，再加0.4 M 碳酸鈉溶液5 ml 和已稀釋的福林-酚試劑 1 ml，於40°C水浴中呈色反應20分鐘後測其OD 660 nm。將此與培養基做比較即可得含酚基的胺基酸增加之百分比。

3-4-6 離體抑制酪氨酸酶活性試驗試藥配製

(1) Sorensen 氏磷酸緩衝溶液 (pH6.8):

取(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 (0.03 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) 430 units/ml Tyrosinase:

取2mg (5370units/mg)加磷酸緩衝溶液定量至25 ml，攪拌至溶解，置於4°C 冷藏。由於 Tyrosinase 不易保存，容易失去活性，且其價格昂貴 \$ 3080/4.7mg，建議當藥品從-20°C 取出時，先將其降回室溫，再開瓶取藥品，避免溫差大而造成藥品內積水氣與造成藥品不易取量，配置完的 Tyrosinase 溶液盡量在3-4天全部用完，其活性降的非常快，約一周就完全失活了。

(4)樣品萃取物溶液

將各萃取物溶液pH調至6.8。

3-4-7 離體抑制酪氨酸酶活性試驗測定方法 (Kobayashi et al.,1995 ; Khanom et al., 2000 ; Takagi and Mitsunaga, 2003)

此方法是參考日本丸善製藥株式會社技術報告的方法。取不同之待測物上清液1ml，各加入0.9ml pH6.8磷酸緩衝溶液及1ml L-tryosine 溶液混合，置於37°C 往復式震盪恆溫水槽中震盪10min 後，再加0.1ml Tyrosinase 後使其反應20min，以紫外光-可見光譜儀檢測其475nm 下的吸光值(A_i) 當成此實驗的實驗組。另外設置一個 Tyrosinase 的空白組(A₀)，步驟與實驗組相同，但是以等體積的純水取代

Tyrosinase，並以等體積的pH6.8磷酸緩衝溶液取代待測物溶液，做為此實驗的對照組(A_b)，將此設為100。另外以 Vit-C 、美白修護液做為實驗組。

	A _t	A ₀	A _b
待測物溶液	1 ml	1 ml	0 ml
Buffer	0.9 ml	0.9 ml	1.9 ml
L-tyrosine	1 ml	1 ml	1 ml
Tyrosinase	0.1 ml	0.1 ml 純水	0.1 ml

DOPA 抑制率百分率計算公式：

$$\text{DOPA 抑制}\% = (A_b - (A_t - A_0)) / A_b \times 100\%$$

第四章 實驗方法

4-1 論文整體實驗架構

本實驗利用靈芝 *Ganoderma lucidum* 液態培養，做三角瓶試驗。

三角瓶試驗分為上清液、菌絲體、含菌絲體的發酵液和均質過的發酵液。上清液部分是做培養時間的探討，在菌絲體、含菌絲體的發酵液和均質過的發酵液則是添加酸、鹼和酵素作用，其中以均質過的發酵液添加酵素作用有顯著的抑制 DOPA 生成之效果，所以進一步探討不同 pH、溫度和作用時間對酵素作用之影響。

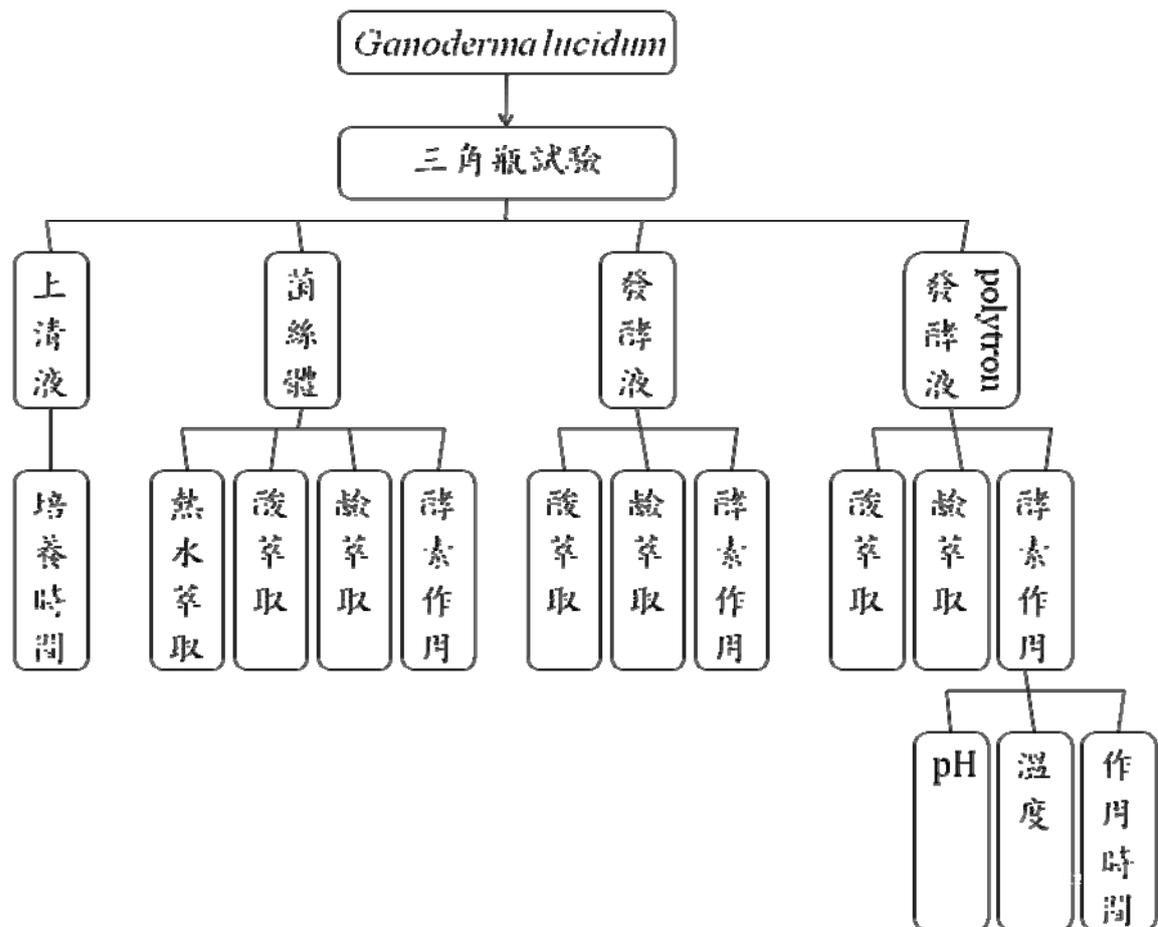


圖 4-1 論文整體實驗架構

4-2 液態培養基組成

本實驗研究所採用的液態培養基成分如下：

Yeast extract	3.0 g/l
Glucose	20.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g/l

並利用 0.1 N HCl，將液態培養基之 pH 值調整為 4。

4-3 種菌製備

種菌之前培養：

1. 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(0.5 cm × 0.5 cm)，放入 250 ml 三角瓶內含培養液 100ml 的液態種菌培養基中。
2. 將上述之三角瓶於 30°C、pH 4.0、100 rpm 培養七天。

4-4 酪胺酸與酪胺酸酶反應時間與吸收度關係之測定

此試驗之主要目的為，找出最佳酪胺酸與酪胺酸酶的反應時間。

試驗方法為，取 0.9 ml Buffer，加 1 ml 純水，再加 1 ml Tyrosine 於 37°C 恆溫震盪器中，震盪 10 分鐘後，加入 0.1 ml Tyrosinase，使溶液於恆溫震盪器中反應，每隔 5 分鐘測定 OD 475 nm 的吸光值。

於酪胺酸與酪胺酸酶反應時間與吸收度關係之測定試驗中，需 20 支試管，一支為空白組(0.9 ml pH6.8 Buffer + 1.1 ml 純水 + 1 ml Tyrosine)，其餘 19 支試管皆以上述方法試驗(0.9 ml pH6.8 Buffer + 1 ml 純水 + 1 ml Tyrosine + 0.1 ml Tyrosinase)，於各試管上標示 0 分鐘、5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘、、、85 分鐘共 19 支，每當到達其反應時間時，利用紫外光- 可見光譜儀測定 OD 475 nm。

4-5 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，使用的三角瓶總容量為 250 ml，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，放置無菌操作台，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攪碎 10 秒後，取 5 ml 的接菌量接種於 250 ml 三角瓶中，於 100 rpm、30°C 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。

4-6 靈芝發酵液、 Vit-C 與美白修護液抑制 DOPA 生成之效果

此試驗之主要目的為，比較靈芝發酵液、 Vit-C 與美白修護液抑制 DOPA 生成之效果。試驗方法，取 0.9 ml pH6.8 Buffer，加 1 ml 待測液(靈芝發酵液、 Vit-C 與美白修護液)，再加 1 ml Tyrosine 於 37°C 恆溫震盪器中，震盪 10 分鐘後，加入 0.1 ml Tyrosinase，使溶液於恆溫震盪器中反應，20 分鐘後測定 OD 475 nm。

4-7 培養基與添加酵素對抑制 DOPA 生成之影響

此試驗之主要目的為，探討培養基與添加之酵素是否會抑制

DOPA 生成之影響。添加的酵素之設定條件如下所示：

添加酵素	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	5	0.2 ml/100 ml
Lysozyme	60°C	4	1 mg/100 ml
Papain	45°C	4.8	0.3 g/100 ml
Bromelain	37°C	3.5	0.5 g/100 ml

試驗方法，於培養基中分別加入 Neutrase、Celluclast、Lysozyme、Papain 與 Bromelain 將 pH、溫度調至各設定值，2 小時後，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。培養基部分，則直接將 pH 調至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。若所測之吸收值與對照組相近表示培養基與添加之酵素不會抑制 DOPA 生成。

4-8 菌絲體添加酸、鹼、酵素作用試驗

此試驗之主要目的為，探討是否能直接於菌絲體中萃取或分解出更多有效成分。添加的酸、鹼、酵素之設定條件如下所示：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	5	0.2 ml/100 ml
Lysozyme	60°C	4	1 mg/100 ml
Papain	45°C	4.8	0.3 g/100 ml
Bromelain	37°C	3.5	0.5 g/100 ml
H ₂ SO ₄	100°C	-	0.1 N
NaOH	100°C	-	0.1 M

試驗方法，此實驗將分為三部分，(一)直接將菌絲體過濾後用大量清水清洗，加水 100 ml 後，調 pH 與溫度進行萃取或分解，作用時間 2 小時，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果；(二) 直接將菌絲體過濾後用大量清水清洗，加水 100 ml 後，調 pH 與溫度進行萃取或分解，作用時間 2 小時，再經均質，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果；(三) 將菌絲體過濾後用大量清水清洗，加水 100 ml 後，先經均質，調 pH 與溫度

進行萃取或分解，作用時間 2 小時，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。

4-9 發酵液添加酸、鹼、酵素作用試驗

此試驗之主要目的為，探討不同方法萃取或分解出有效成分，並找出最佳方法與條件使抑制 DOPA 生成效果最顯著。添加的酸、鹼、酵素之設定條件如下所示：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	5	0.2 ml/100 ml
Lysozyme	60°C	4	1 mg/100 ml
Papain	45°C	4.8	0.3 g/100 ml
Bromelain	37°C	3.5	0.5 g/100 ml
H ₂ SO ₄	100°C	-	0.1 N
NaOH	100°C	-	0.1 M

試驗方法，此試驗將分為兩大部分，分別為化學法與酵素法。在化學法中，本研究將採用 0.1 N H₂SO₄與 0.1 M NaOH 萃取，將培養七天後之三角瓶用均質機攪碎 10 秒，直接在發酵液中各別添加 H₂SO₄與 NaOH，其濃度分別為 0.1 N 與 0.1 M，於電磁石加熱攪拌器上，溫度為 100°C，萃取 2 小時，萃取完使其溫度降至室溫，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。在酵素法中，本研究

將添加Papain、Neutrase、Celluclast、Lysozyme與Bromelain作用，將培養七天後之三角瓶用均質機攪碎 10 秒，先將發酵液調至各酵素適用之pH與溫度，再直接於發酵液中各別添加不同酵素，進行分解，作用時間 2 小時，過濾離心後取上清液，再調pH至 6.8 測量抑制DOPA生成效果。找出三種抑制效果最顯著的酵素，再進行更進一步的探討。

4-10 不同 pH 對酵素作用之影響

此試驗之主要目的為，探討不同酵素分解，改變其 pH，找出抑制 DOPA 生成效果最顯著之 pH。添加酵素之設定條件如下所示：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	3, 4, 5, 5.5, 6	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	3, 4, 5, 6	0.2 ml/100 ml
Papain	45°C	3, 3.5, 4, 5, 6	0.3 g/100 ml

試驗方法：

培養七天後之三角瓶用均質機攪碎 10 秒，先將發酵液調至各設定條件，再直接於發酵液中各別添加不同酵素，進行分解，作用時間 2 小時，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。找出抑制效果最顯著的萃取 pH。

4-11 不同溫度對酵素作用之影響

前一試驗已找出抑制效果最好的 pH，將其設為此試驗之 pH。此試驗主要目的為，探討不同酵素分解，改變其溫度，找出抑制 DOPA 生成效果最顯著之溫度。添加酵素設定條件如下所示：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	25°C,30°C,40°C,45°C,50°C,60°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	40°C,45°C,50°C,55°C,60°C	5	0.2 ml/100 ml
Papain	40°C,45°C,50°C,60°C	5	0.3 g/100 ml

試驗方法：

培養七天後之三角瓶用均質機攪碎 10 秒，上一實驗已找出抑制效果最顯著的 pH，再將發酵液調至各設定條件，直接於發酵液中各別添加不同酵素，進行分解，作用時間 2 小時，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。找出抑制效果最顯著的萃取溫度。

4-12 不同時間對酵素作用之影響

前二試驗已找出抑制效果最好的 pH 與溫度，將其設為此試驗之 pH 與溫度。此試驗主要目的為，探討不同酵素分解，為了經濟考量，所以改變其作用時間，找出抑制 DOPA 生成效果最顯著之作用時間。

添加酵素設定條件如下所示：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	30°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	45°C	5	0.2 ml/100 ml
Papain	50°C	5	0.3 g/100 ml

試驗方法，培養七天後之三角瓶用均質機攪碎 10 秒，前兩個實驗已找出抑制效果最顯著的 pH 與溫度，再直接於發酵液中各別添加不同酵素，進行分解，作用時間分別為 30 分鐘、60 分鐘、90 分鐘、120 分鐘、240 分鐘、480 分鐘、600 分鐘，過濾離心後取上清液，再調 pH 至 6.8 測量抑制 DOPA 生成效果。找出抑制效果最顯著且最具經濟效益的萃取時間。

4-13 有效成分鑑定試驗

此試驗之主要目的為，由於發酵培養過程中，會產生許多物質，可能是一些已知具有藥理活性物質，亦可能是其他未知物，為先做初步猜測，此實驗將針對官能基，測其是否與 DOPA 抑制效果成正比。

試驗方法如下所示：

(1) Fehling 試劑：1 ml Fehling 試劑配置的 A 液(34.66 g 硫酸銅加水定量至 500 ml)加入 1 ml Fehling 試劑配置的 B 液(17.3 g 酒石酸鉀鈉 + 5 g 氫氧化鈉，加水定量至 50 ml)混合震盪後，加入 1 ml 萃取上清液，於 50°C 下 2-3 分鐘，觀察其顏色變化。

(2) 福林-酚試劑：在鹼性條件下可被酚類化合物還原成藍色反應。

由於蛋白質分子中含有酚基的氨基酸，他使蛋白質及其水解物呈上述反應，利用此原理可以測定含有酚基的氨基酸。1 ml 待測上清液加入 5 ml 0.4 M 碳酸鈉溶液和 1 ml 已稀釋的 FCPR (取 Folin & Ciocalteus phenol reagent 原液稀釋三倍備用)，於 40°C 水浴中呈色反應 20 分鐘後測其 OD 660 nm。

第五章 結果與討論

5-1 酪胺酸與酪胺酸酶反應時間與吸收度關係之測定

一般人體的體溫為 37°C ，因此，將酪胺酸與酪胺酸酶反應之溫度設定在 37°C ，並測定 OD 475 nm，找出最佳酪胺酸與酪胺酸酶的反應時間。於圖 5-1 中，藉由黑色素隨不同反應時間，其生成量亦會不同，可簡易從其外觀顏色，觀察黑色素生成之變化情形。10 分鐘前，顏色呈淺橘色；15 分鐘呈褐色；20-25 分鐘呈深褐色；30 分鐘以後，顏色幾乎呈黑色。所以，隨 DOPA 的生成量漸漸變多，其顏色會由淺橘色慢慢變成褐色、深褐色，隨著時間越久，顏色也越深，最後趨近於黑色。

由上述觀察，從紫外光-可見光譜儀測定(圖 5-2)顯示，10 分鐘前，吸收值相近；隨著顏色變深，所得吸光值也越高。於圖 5-2 可知吸光值上升最快的時間是在 5 分鐘以內($\text{ABS}=0.286$)，而在 85 分鐘時吸光值達平衡($\text{ABS}=0.762$)。表示於 5 分鐘前，酵素活性高，所以酪胺酸與酪胺酸酶易作用生成黑色素，將時間拉長能減少誤差值；但反應時間越久，酵素活性降低漸漸失去活性，所以當反應時間拉長至 85 分鐘以後，其黑色素生成量將達最高，所以吸光值將不會有太大的改變。因此選用 20 分鐘($\text{ABS}=0.387$)為本實驗黑色素生成的反應時間。

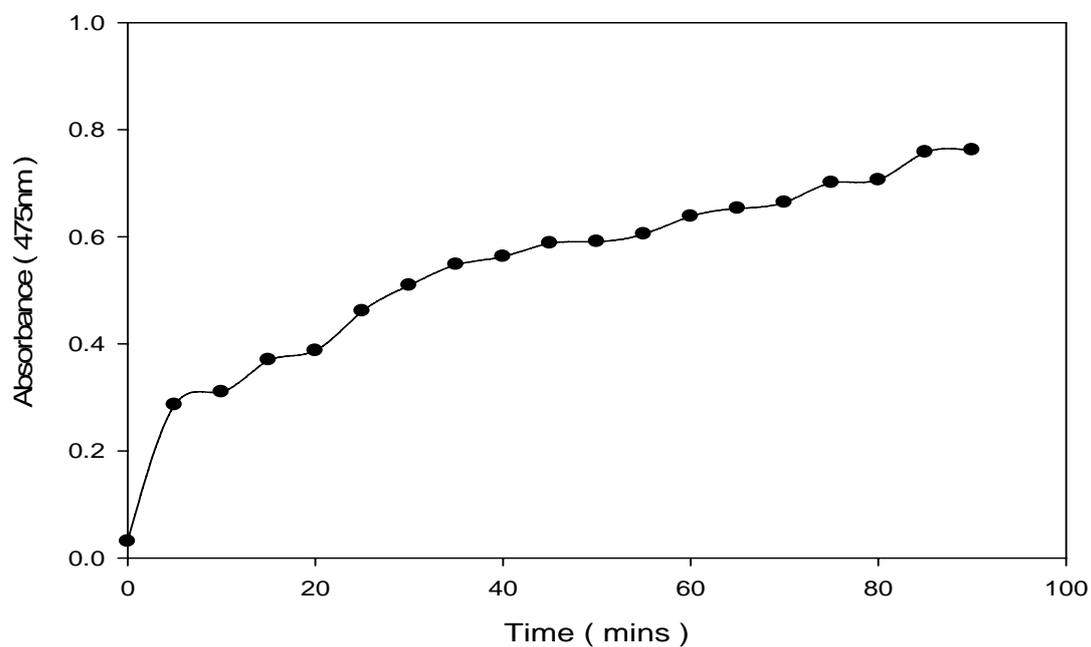


圖 5-2 黑色素的生成時間與吸收值之關係

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

	A_0	A_b
Buffer	1.9 ml	1.9 ml
L-tyrosine	1 ml	1 ml
Tyrosinase	0.1 ml	0.1 ml

其吸收值為($A_b - A_0$)

5-2 三角瓶液態培養試驗

5-2-1 培養時間之影響

為了探討菌體培養過程中，能在有效時間產生最多有效成分並達到最好的抑制效果，所以進行三角瓶液態培養。在不同的培養天數，比較其對 DOPA 抑制之影響。

從圖 5-3 顯示，培養時間於 3-5 天 DOPA 的抑制率很快的提升，表示在這期間為有效成分的生成期，培養 5 天之後，抑制效果只有些微提升，7 天後開始持平，故本實驗之菌體液態培養設定為 7 天。

於培養過程中，葡萄糖之消耗是很緩慢的，培養 8 天後，葡萄糖濃度呈線性遞減，從 20 g/L 降至 12.2 g/L，所以葡萄糖的量是充足的，表示有效成分不再增加，不是碳源不足，因為從菌體濃度觀察，菌體濃度是呈線性遞增。

從圖 5-3 中菌體濃度與 DOPA 抑制效果觀察，可發現產物(DOPA 抑制物)與菌體是生長聯動(growth-associated products)關係，也就是產物隨菌體生長而產生。但菌體濃度隨培養時間不斷往上生長後，在培養 5 天後，DOPA 之抑制效果卻漸漸持平，而菌體濃度並未跟著持平或下降，而是繼續生長，推論其可能原因為，菌體在生長過程中，可能會持續釋放出有效成分(DOPA 抑制物)至胞外，當胞外有效成分(DOPA 抑制物)夠多時，會產生回饋抑制(feedback inhibition)，所以

菌體就不再釋放(DOPA 抑制物)至胞外，因此培養 5 天後，即使菌絲體有繼續生長的趨勢，但是其胞外之有效成分(DOPA 抑制物)生成並不隨著菌絲濃度增加而增加，故 DOPA 之抑制效果漸漸持平。

針對 pH 而言，初始隨培養時間增加而增加(0-3 天)，從 4 增至 4.67，當有效成分進入生長期時(3-5 天)，其 pH 會下降，從 4.67 降至 4.11，推測此時可能有酸性物質被釋放出來。

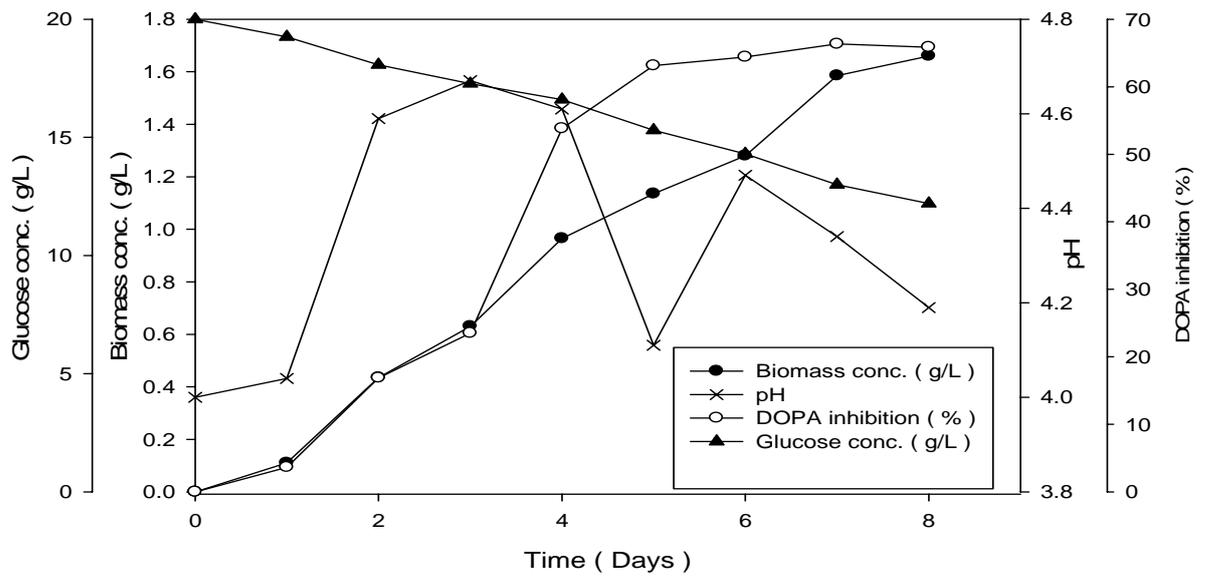


圖 5-3 靈芝菌絲體之生長曲線圖

培養條件：基礎培養基

初始 pH 4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

5-2-2 比較靈芝發酵液、Vit-C 與美白修護液抑制 DOPA 生成之效果

市面上有許多具有美白效果之美白產品，此試驗將以 Vit-C、美白修護液與靈芝液態培養之上清液相做比較(圖 5-4)，實驗結果顯示：靈芝上清液之抑制效果與美白修護液相近，各別為 60.4%與 60.6%，而維他命 C 之效果較為顯著 82.2%。一般而言，肌膚美白可分為口服、外用、注射和雷射等方式。口服與注射美白是藉由體內之血液循環將藥物送至皮膚表層，藉此達到抑制酪胺酸酶活性，或阻斷酪胺酸氧化成黑色素的路徑，轉成另一路徑，使其外觀不呈黑色。外用美白主要是透過皮膚吸收，藉此達到抑制酪胺酸酶活性，所以外用的美白成分能否被皮膚吸收是非常重要的，但，外用美白可能造成皮膚的刺激或過敏現象。無論是口服、注射或外用美白，皆需要一段時間才能達到美白效果。

從此試驗結果顯示靈芝上清液之抑制效果與美白修護液相近，若假設靈芝上清液能被皮膚有效的吸收，且靈芝為優良食品，故不具刺激性，如果直接將其塗抹於肌膚是最具經濟效益的。因為若要將其製成錠狀或添加於飲料食品中食用，所花費的成本是比較高的，且食物經過吸收、輸送、作用以及代謝後，真正能顯現出的功效，是我們比較難掌握的。所以，若要將本實驗所得之有效成分有效利用，可能會選擇直接外用塗抹。

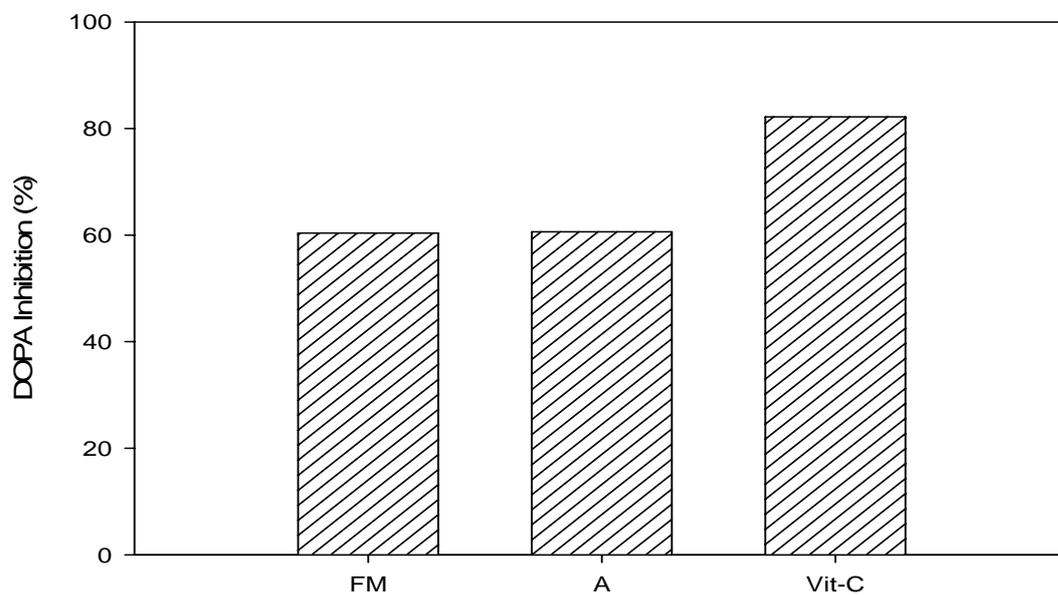


圖 5-4 比較市售 Vit-C 與美白修護液對 DOPA 抑制之影響

FM: fermentation broth A: 美白修護液 vit-C: 維他命 C

註：美白修護液購自杏輝取 1 ml 做測試

維他命 C 購自安麗 取 1 mg 溶於 1 ml 純水中做測試

5-2-3 設定條件

本研究希望採取不同的作用方式，探討過程中，能否有更多有效成分產生，分別有酸(H_2SO_4)、鹼($NaOH$)和酵素進行萃取或分解，其初步的溫度、pH、濃度和作用時間，皆參考過去期刊各酵素作用所做的初步設定，其設定條件如下：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	5.5	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	5	0.2 ml/100 ml
Lysozyme	60°C	4	1 mg/100 ml
Papain	45°C	4.8	0.3 g/100 ml
Bromelain	37°C	3.5	0.5 g/100 ml
H_2SO_4	100°C	-	0.1 N
$NaOH$	100°C	-	0.1 M

作用時間為 2 小時，再將各瓶 pH 調為 6.8。

5-2-4 培養基與添加酵素是否會抑制 DOPA 生成之試驗

由於本實驗的主要目的是：排除培養基或添加的酵素會造成 DOPA 生成之抑制。所以使用培養基和酵素，來確認在培養過程中有無抑制 DOPA 生成的有效成分產生。

由圖 5-5 可發現，培養基或添加的酵素對於 DOPA 生成並不會造成太大的影響，故可排除這兩個因素並更進一步做接下來的萃取有效成分實驗。

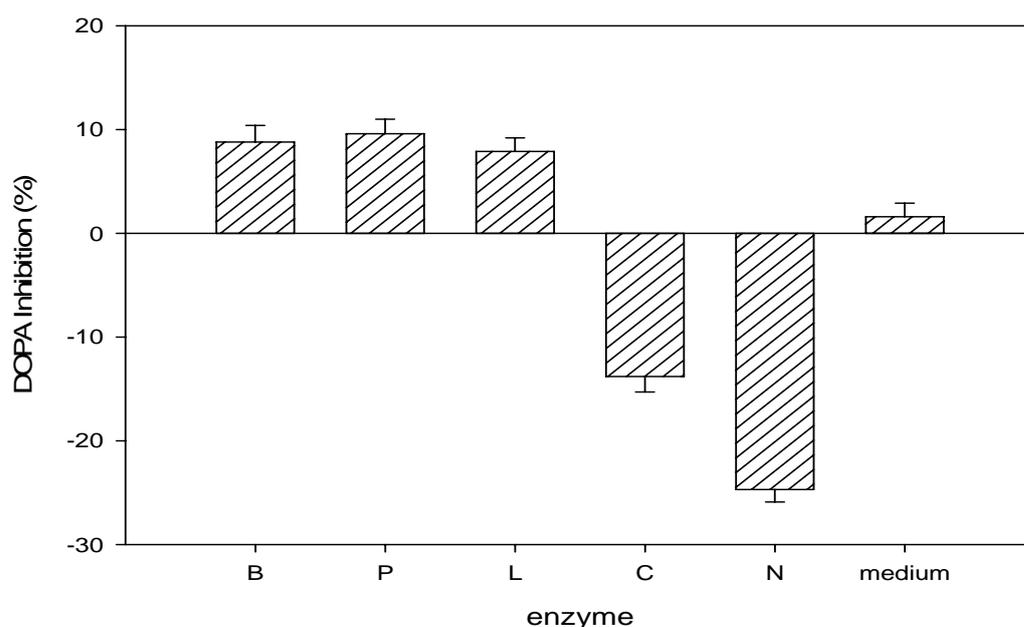


圖 5-5 不同 enzyme 對抑制效果之影響

B: Bromelain **P:** Papain **L:** Lysozyme **C:** Celluclast **N:** Neutrase

黑色素生成之反應條件：培養基中添加各種 enzyme，將 pH 調至 6.8

溫度 37°C

$\lambda = 475 \text{ nm}$

註：以上為三重複

5-2-5 菌絲體添加酸、鹼、酵素作用試驗

於菌絲體萃取與分解實驗中，由圖 5-6 顯示，單獨菌絲體作用，其抑制效果皆不及直接用含菌絲體之發酵液進行作用，但是，從實驗發現，將菌絲體分解亦可萃取出不可忽視的有效成分。首先，針對酵素分解菌絲體來說，先經均質再分解，此效果較為顯著。因為先將菌絲體均質時，原本為菌絲球被破壞成許多菌絲片段，在破壞的過程中，菌絲球裡可能原本也有包覆一些有效成分，破壞後有效成分被釋放出來，剩下的菌絲片段可能因均質後已有受傷，再經酵素之萃取可能破壞細胞壁生成更多有效成分。若是直接將菌絲體加水調 pH，再加入酵素作用，若是藉由破壞細胞壁，而釋放出有效成分，此方法之效果會最不好。選用之五種酵素中，唯有纖維酵素不符上述之推論，此酵素對菌絲體有無均質並無太大之影響。

利用 NaOH 萃取，並不會提升其有效成分，所以用此方法無任何有效的幫助。利用 0.1 N 的濃硫酸萃取，其抑制效果幾乎可被忽略，推測濃硫酸萃取可能會破壞發酵液中之有效成分。

就酵素分解菌絲體而言，會選用先均質菌絲體後再進行分解，若能合併發酵液中的上清液一起作用，就能產生更多的有效成分，所以直接將發酵液先均質再進行分解的效果會最好。

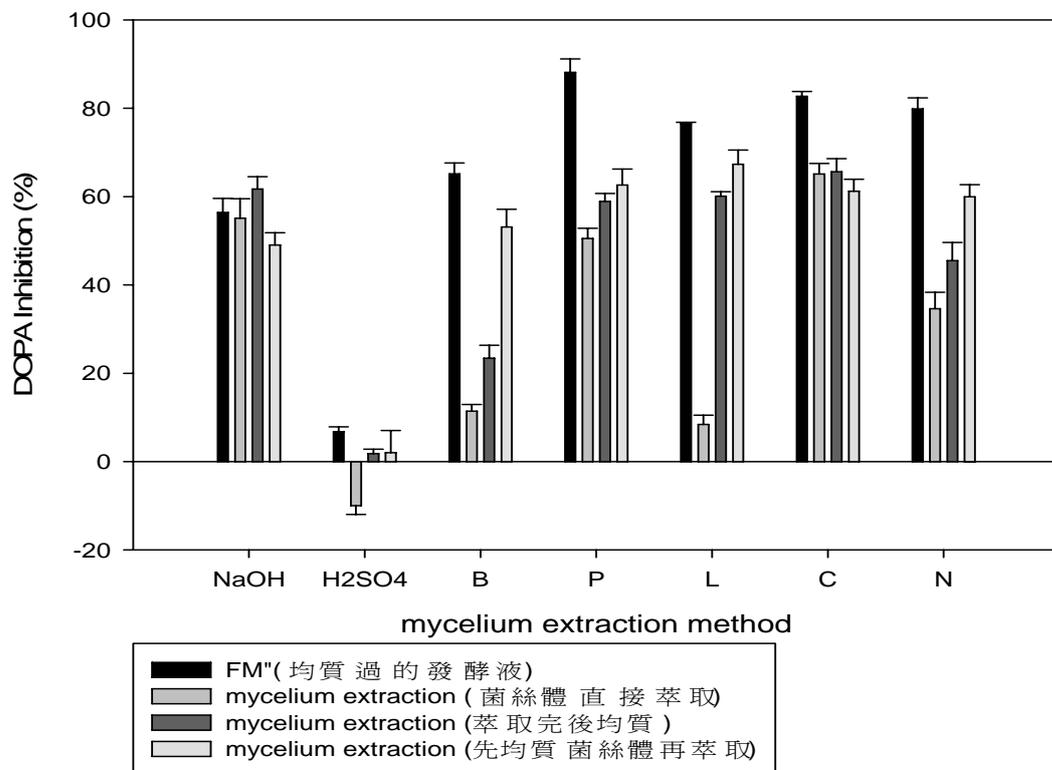


圖 5-6 菌絲體經不同萃取方法比較其抑制效果

B: Bromelain 37°C pH 3.5 **P:** Papain 45°C pH 4.8

L: Lysozyme 60°C pH 4 **C:** Celluclast 50°C pH 5

N: Neutrase 50°C pH 5.5

黑色素生成之反應條件：溫度 37°C pH 6.8

$\lambda = 475 \text{ nm}$

註：以上為三重複

5-2-6 發酵液添加酸、鹼、酵素作用試驗

試驗分為兩部分，一種為直接在含菌絲體之發酵液中添加酸、鹼、酵素作用；另一種為先將含菌絲體之發酵液均質後再添加酸、鹼、酵素作用。結果顯示(圖 5-7)，酵素作用部分，先將發酵液均質後再添加酵素作用之效果幾乎都比直接在發酵液中添加酵素進行作用之效果好，也比之前只有發酵液的上清液或單獨菌絲萃取的效果好，所以之後的實驗均直接先將含菌絲體之發酵液均質後再作用，並做其他更進一步的探討。在三種方法中，以酵素分解較明顯，有經均質的抑制率均高於 10 %。

於圖 5-7 可推測利用 H_2SO_4 萃取可能會破壞發酵液中的有效成分。在此實驗中，其抑制效果比原本發酵液的上清液(62.0% ~65%)的抑制效果還差很多，表示連原本發酵液中的上清液效果也都消失了，抑制效果卻只剩 6.8% ~ 16.8%，更證實利用 H_2SO_4 萃取會破壞發酵液中的有效成分或將酵素之活性中心切斷了。較特別的地方在於，通常有均質再萃取之效果會比較好，可是 H_2SO_4 卻相反，因為 H_2SO_4 會破壞發酵液中的有效成分或能將酵素之活性中心切斷，由於上清液中的有效成份均被破壞後，所剩的有效成分就是包覆在菌體中，所以反而有均質過的發酵液效果會較差。

在此實驗中，篩選三種酵素(Neutralase、Celluclast、Papain)，先將發酵液均質後再添加此三種酵素進行其他改變變應條件的探討。

5-2-7 不同 pH 對酵素作用之影響

由於 Neutrase、Celluclast、Papain 三種酵素皆能分解出更多的有效成分，即使未在最佳作用條件(pH、溫度、作用時間)其抑制效果皆比未添加任何酵素的發酵液好。所以此實驗將找出在哪些條件下能有最好的抑制效果。

Neutrase 分解(圖 5-8)，溫度設為 50°C、作用時間設為 2 小時並改變 pH 之試驗中，實驗顯示 pH5.5 有最好抑制效果，抑制率為 79.7%。而 Celluclast 分解(圖 5-9)，溫度設為 50°C、作用時間設為 2 小時並改變 pH 之試驗中，實驗顯示 pH5 有最好抑制效果，抑制率為 82.2%。在 Papain 分解(圖 5-10)，溫度設為 45°C、作用時間設為 2 小時並改變 pH 之試驗中，實驗顯示 pH5 有最好抑制效果，抑制率為 88.5%。

將上述之三張圖合併(圖 5-11)，由此圖可以推論：利用 Papain 作用時，受 pH 影響最大；利用 Neutrase 作用，只有些微影響；利用 Celluclast 作用，對 pH 的改變是非常不敏感的。

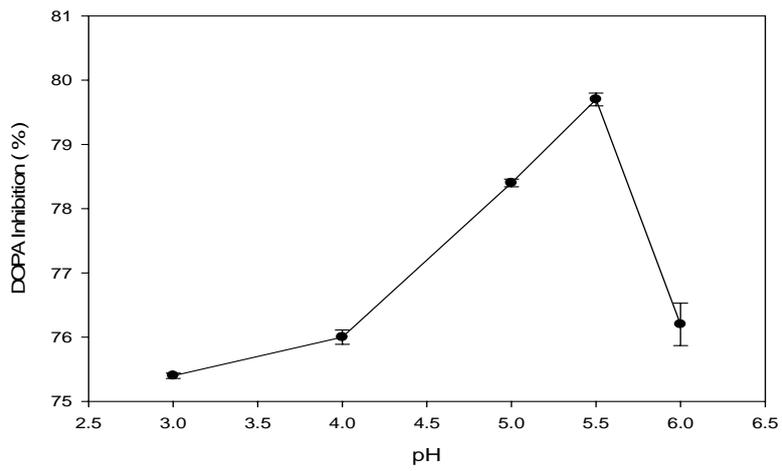


圖 5-8 不同 pH 對 Neutrase 作用之影響

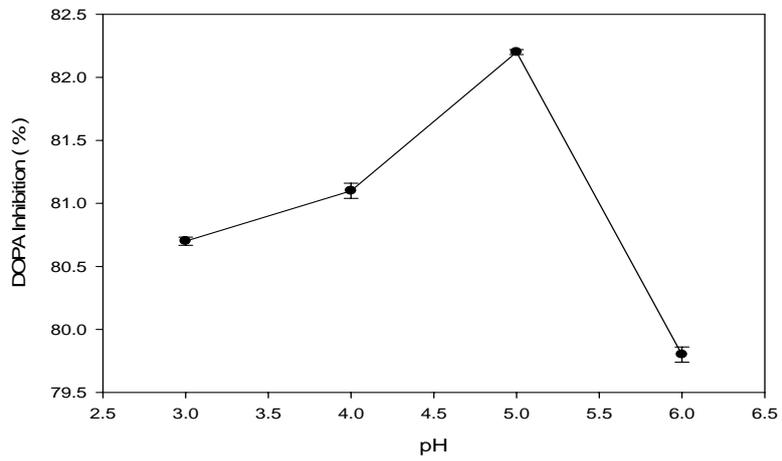


圖 5-9 不同 pH 對 Celluclast 作用之影響

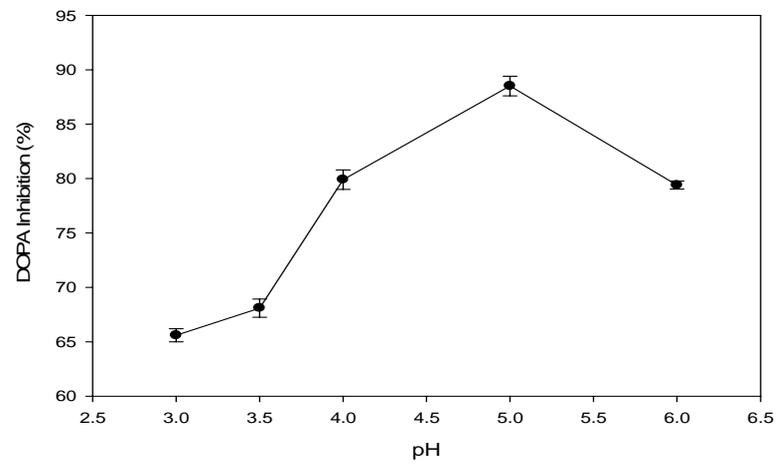


圖 5-10 不同 pH 對 Papain 作用之影響

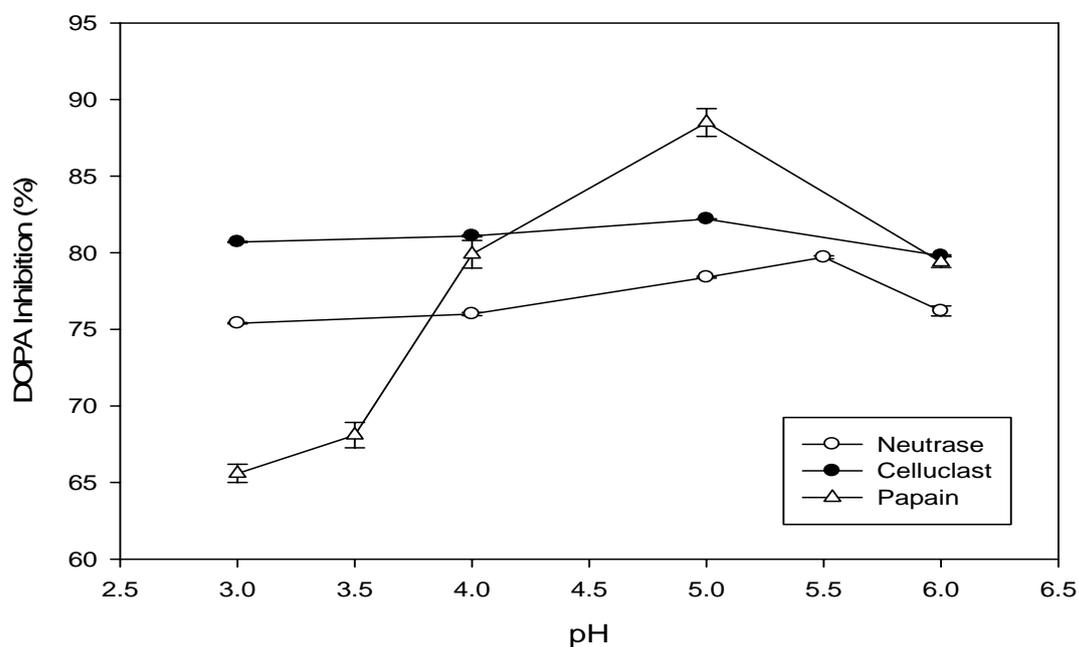


圖 5-11 比較不同 pH 對三種酵素作用之影響

設定條件：

方法	溫度	pH	濃度
Neutrase	50°C	3, 4, 5, 5.5, 6	0.2 ml/100 ml
Celluclast	50°C	3, 4, 5, 6	0.2 ml/100 ml
Papain	45°C	3, 3.5, 4, 5, 6	0.3 g/100 ml

註：作用時間 2 小時。

以上為三重複

5-2-8 不同溫度對酵素作用之影響

上一試驗中已找出 Neutrase、Celluclast、Papain 三種酵素能分解出抑制效果最好之 pH，進一步探討改變溫度找出最好的抑制效果。

Neutrase 分解(圖 5-12)，pH 設為 5.5、作用時間設為 2 小時並改變溫度之試驗中，實驗顯示 30°C 有最好抑制效果，抑制率為 93.4 %。當溫度逐漸上升，其抑制效果會逐漸下降，當溫度為 60°C 其抑制效果明顯降為 64.5 %，表示當溫度升高時可能不利於有效成分之生成。

而 Celluclast 分解(圖 5-13)，pH 設為 5、作用時間設為 2 小時並改變溫度之試驗中，實驗顯示 45°C 有最好抑制效果，抑制率為 83.6 %。隨溫度上升，升至 55°C 抑制效果緩慢下降，抑制率為 78.8 %，當溫度為 60°C 其抑制效果迅速降為 60.6 %，表示當溫度高於 55°C，可能不利於有效成分之生成。

在 Papain 分解(圖 5-14)，pH 設為 5、作用時間設為 2 小時並改變溫度之試驗中，實驗顯示 50°C 有最好抑制效果，抑制率為 89.8 %。在改變溫度之試驗中，其抑制效果並沒有降非常多，抑制效果最不佳為 40°C，抑制率為 81.2 %，與最佳效果只差 8.6 %，雖然如此，本試驗中還是選擇 50°C 進行分解。

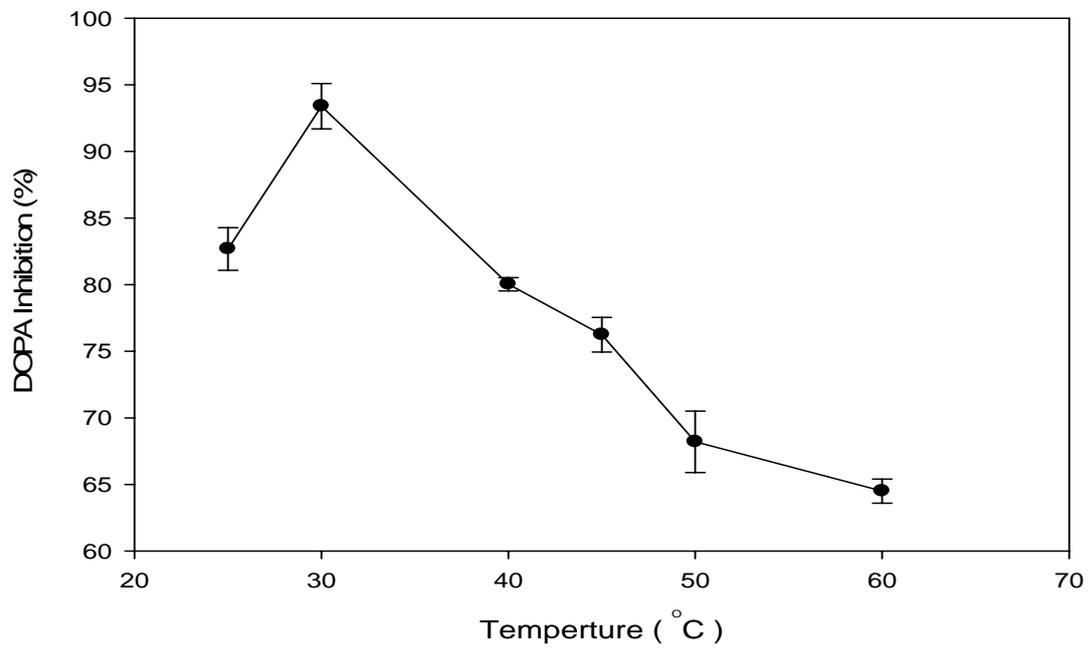


圖 5-12 不同溫度對 Neutrased 作用之影響

設定條件：Neutrased 濃度 0.2 ml/100 ml pH 5.5

作用時間 2 小時

註：以上為三重複

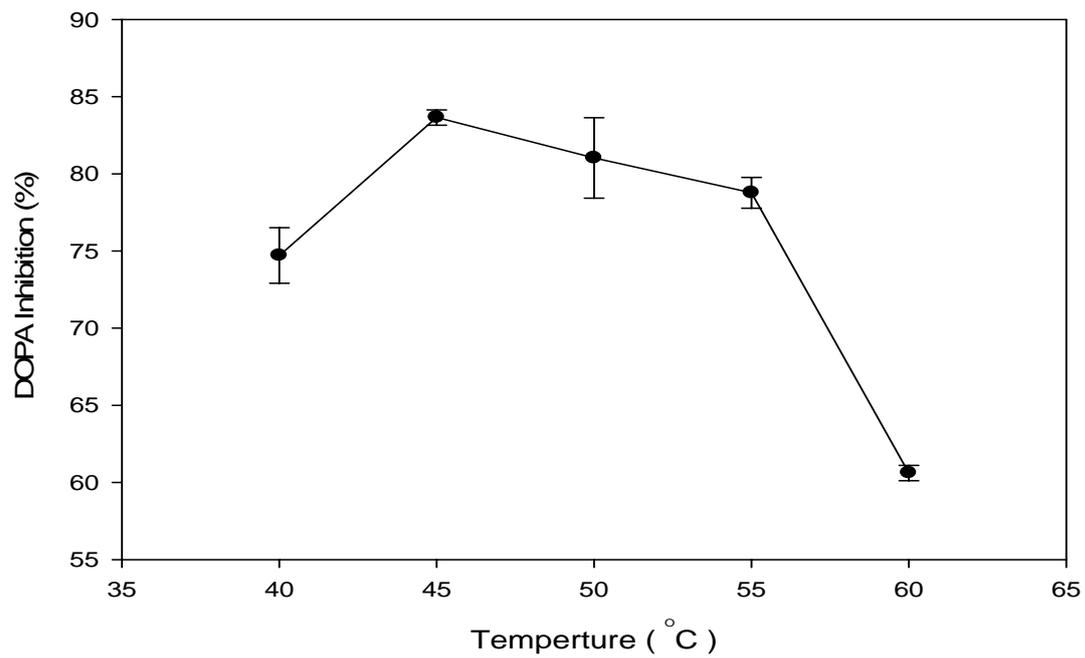


圖 5-13 不同溫度對 Celluclast 作用之影響

設定條件：Celluclast 濃度 0.2 ml/100 ml pH 5

作用時間 2 小時

註：以上為三重複

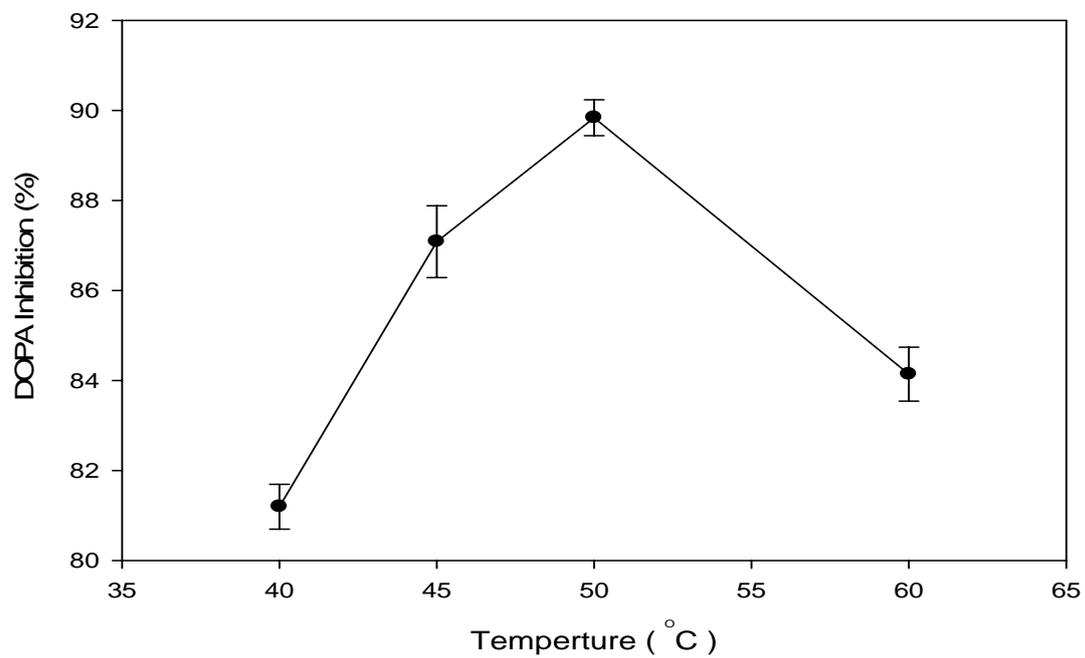


圖 5-14 不同溫度對 Papain 作用之影響

設定條件：Papain 濃度 0.3 g/100 ml

pH 5

作用時間 2 小時

註：以上為三重複

5-2-9 不同時間對酵素作用之影響

前二個試驗中已找出 Neutrase、Celluclast、Papain 三種酵素能分解出抑制效果最好之 pH 與溫度，進一步探討改變作用時間找出最好的抑制效果。

Neutrase 分解(圖 5-15)，pH 設為 5.5、溫度設為 30°C 並改變作用時間之試驗中，實驗顯示作用時間從 30 分鐘至 120 分鐘抑制效果從 70.2 % 增至 93.4 %，作用時間拉長至 480 分鐘，發現抑制效果趨近於 100 %，表示作用時間拉越長能分解出更多的有效成分。但 120 分鐘與 480 分鐘之抑制效果只差 6.6 %，所以建議選取 120 分鐘。

Celluclast 分解(圖 5-16)，pH 設為 5、溫度設為 45°C 並改變作用時間之試驗中，實驗顯示作用時間從 30 分鐘至 240 分鐘抑制效果從 74.5 % 增至 95.9 %，作用時間拉長至 480 分鐘，發現抑制效果趨近於 100 %，但只差 4 %，所以建議選取 240 分鐘。

Papain 分解(圖 5-17)，pH 設為 5、溫度設為 50°C 並改變作用時間之試驗中，實驗顯示作用時間從 30 分鐘至 120 分鐘抑制效果從 69.6 % 增至 89.8 %，較特別的是，120 分鐘之後，抑制效果逐漸下降，推測可能有效成分被切成更小的分子，此小分子不具抑制 DOPA 之生成，故抑制效果會下降，所以建議選取 120 分鐘。

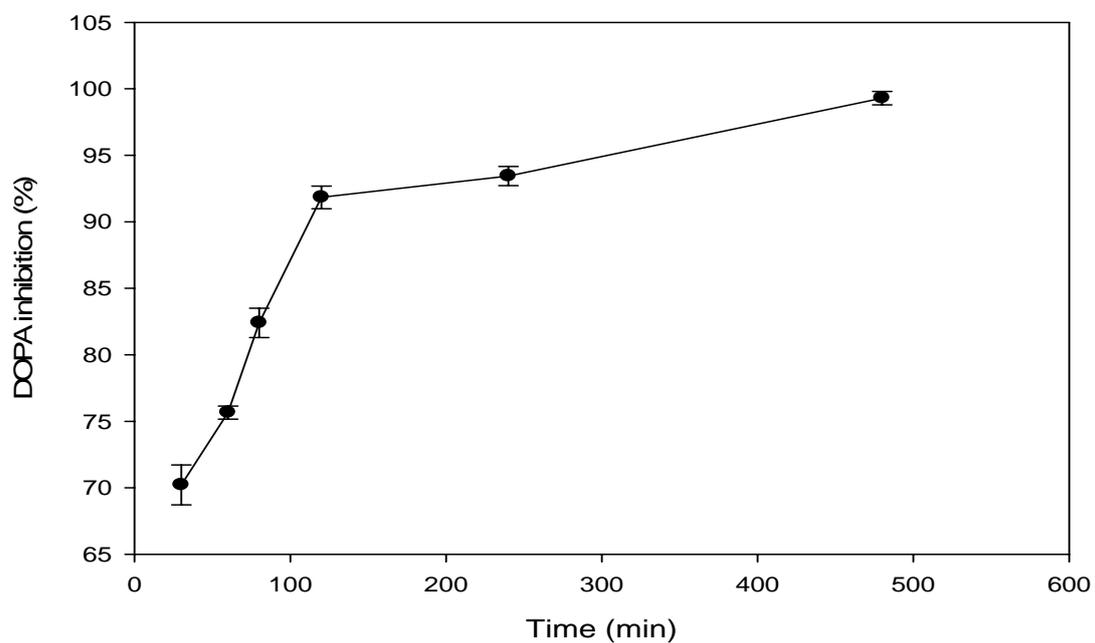


圖 5-15 不同時間對 Neutrased 作用之影響

設定條件：Neutrased 濃度 0.2 ml/100 ml

溫度 30°C pH 5.5

註：以上為三重複

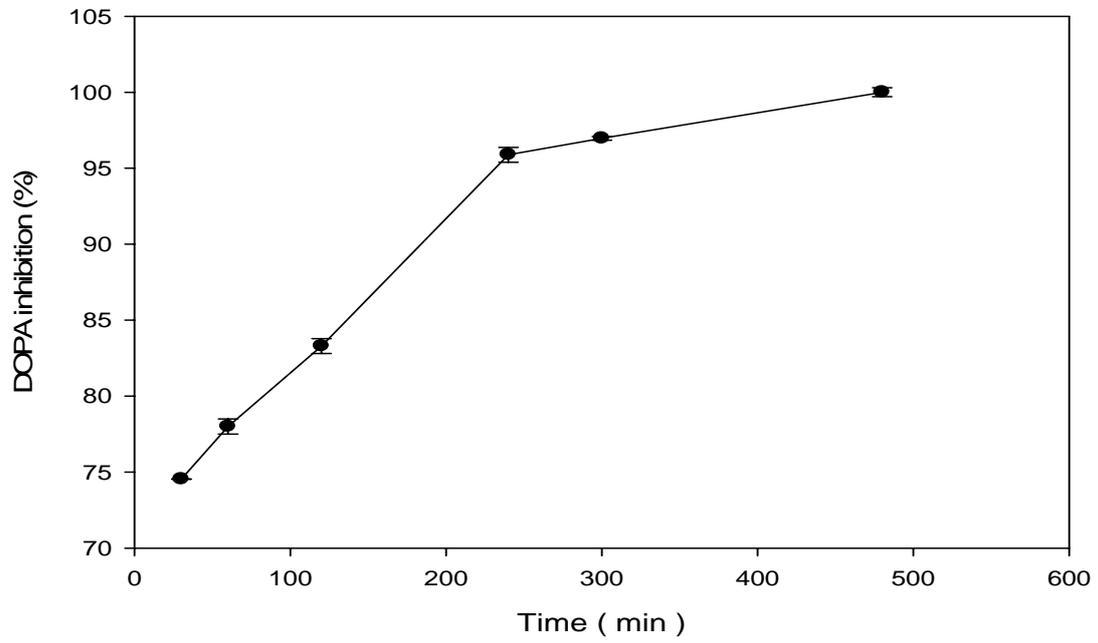


圖 5-16 不同時間對 Celluclast 作用之影響

設定條件：Celluclast 濃度 0.2 ml/100 ml

溫度 45°C pH 5

註：以上為三重複

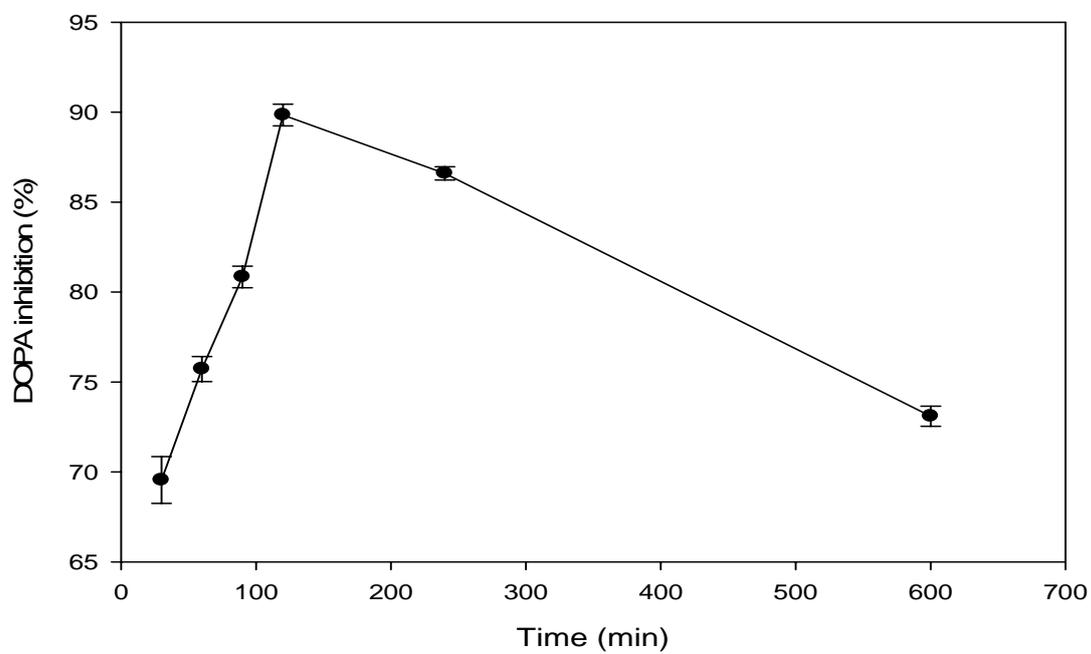


圖 5-17 不同時間對 Papain 作用之影響

設定條件：Papain 濃度 0.3 g/100 ml

溫度 50°C pH 5

註：以上為三重複

5-3 改變變因(pH、溫度及作用時間)之綜合歸納

由於添加酵素於發酵液中，可分解出有效成分，於以上三種試驗中，改變各酵素之 pH、溫度及作用時間。

每種酵素對 pH 之敏感度不一，在選用之三種酵素中，以 Papain 受 pH 影響最大；在溫度方面，雖然提高溫度會使活化能降低，加速反應進行，相對地，酵素活性也會快速降低、失活，其中以 Neutrase 和 Celluclast 於溫度升高時，對 DOPA 生成之抑制效果也隨之降低，表示酵素於高溫時，酵素很快失活，所以分解出的有效成分相對較少；作用時間方面，不一定作用時間越久，就可以分解出越多有效成分。綜合以上試驗之歸納，建議如下：

方法	溫度	pH	作用時間	DOPA Inhibition(%)
Neutrase	30°C	5.5	120 分鐘	93.4 %
Celluclast	45°C	5	240 分鐘	95.9 %
Papain	50°C	5	120 分鐘	89.8 %

在上述建議中，若考慮能量供應與作用時間因素，於此三種酵素中，利用 Neutrase 作用應是最具經濟效益的。

5-4 有效成分鑑定試驗

Fehling 試劑是含有硫酸銅與酒石酸鉀鈉的氫氧化鈉溶液。硫酸銅與鹼溶液混合加熱會生成黑色的氧化銅溶液，若同時有還原糖存在，則會產生黃色或磚紅色的氧化亞銅沉澱。由於靈芝培養過程中，會產生很多的多醣，過去很多報導均認為靈芝多醣有很多功效，所以在有效成分未知之情況下，首先進行多醣測試，直接取發酵液的上清液或萃取液的上清液與培養基相比較，從氧化亞銅沉澱的顏色只能判定出發酵液的上清液或萃取液的上清液(磚紅色)比培養基(黃色)含有更多的醣基。

於靈芝培養過程中，多醣體隨培養時間增加而增加(圖 5-18)，因此，一開始猜測有效成分可能為多醣體。將每天培養靈芝發酵液中的上清液，用酒精將多醣析出，再將多醣回溶於水中，測其抑制 DOPA 之效果，結果顯示，反應 20 分鐘後，所生成之黑色素與對照組相比，並無差異(圖 5-19)。由於未能確定實際析出的有效多醣量及回溶的有效多醣量，所以多醣亦可能為抑制黑色素生成之有效成分。

在分解過程中發現，當抑制效果越好時，所含酚基的氨基酸亦隨之增加，與培養基中酚基的氨基酸含量相比，其酚基的氨基酸增加百分比皆與抑制率相差 35 % 左右(圖 5-20)，且於培養過程中，酚基的

氨基酸亦隨培養時間增加而增加(圖 5-21)。所選用之酵素(Neutrase、Celluclast、Papain)作用皆可切割蛋白質，所以推測在分解過程中可能切割成具有酚基氨基酸的胜肽類，且這些成分具有抑制 DOPA 生成。

於美國專利編號wo/2008/045766，此專利發明是藉由多肽化合物一個適合的氨基酸進行皮膚的治療，認為多肽的組成可以用於保護皮膚變色與避免皮膚受到有害陽光之傷害。黑色素是一種色素，會使皮膚變黑。而黑色素是由黑素細胞所產生，並分別位於皮膚的基底層。Melanotropin (或 α -MSH)是一種激素，可刺激黑色素細胞產生黑色素。多肽也可能用來針對皮膚的治療，暴露於太陽下，皮膚不可避免地產生黑斑。多肽nonapeptide -1 的使用是一種拮抗劑，可阻斷 α -MSH (促黑激素)的傳導，降低黑色素生成機會。

也就是說，當肌膚受到外界刺激或經紫外線照射時，位於基底層細胞內的 α -MSH 會與黑色素細胞上的接受器結合，直接刺激黑色素細胞、活化酪胺酸酶，開始分泌黑色素。而 nonapeptide -1 可在黑色素形成的源頭進行阻斷，並中止 α -MSH 訊息的傳導，避免與黑色素細胞上的接受器結合，以降低黑色素生成機會。

於文獻回顧 2-3 小節酪胺酸酶介紹中，酪胺酸酶會將單酚(monophenol)羥化成雙酚(o-diphenol)再去氫氧化成o-quinones，之

後會以自發性作用再經環化反應形成黑色素(圖 2-5)。因此推論有效成分可能為短鏈的胜肽類，且此胜肽上具有酚基的氨基酸(如：酪胺酸)，於動力參數分析中(Espin et al. , 1998)，利用Michaelis equation 估算 K_m 與 V_{max} ，針對同分異構之底物，在相同的酵素濃度下，所得之 V_{max} 相同，而 K_m 不同(附錄B)。如：monophenols與o-diphenols中 K_m 值大小為：D-isomers > D,L- isomers > L- isomers。當monophenols或o-diphenols的側鏈取代基分子量增加時，則 V_{max} 會減少、 K_m 會增加(附錄 B)， 表示形成黑色素的機會降低。故所推測之有效成分與此相符。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots(\text{Michaelis equation})$$

V_{max} ：可生成產物最大的速率(mol/dm³ · s)

K_m ：表示 enzyme 和 substrate 的親和能力

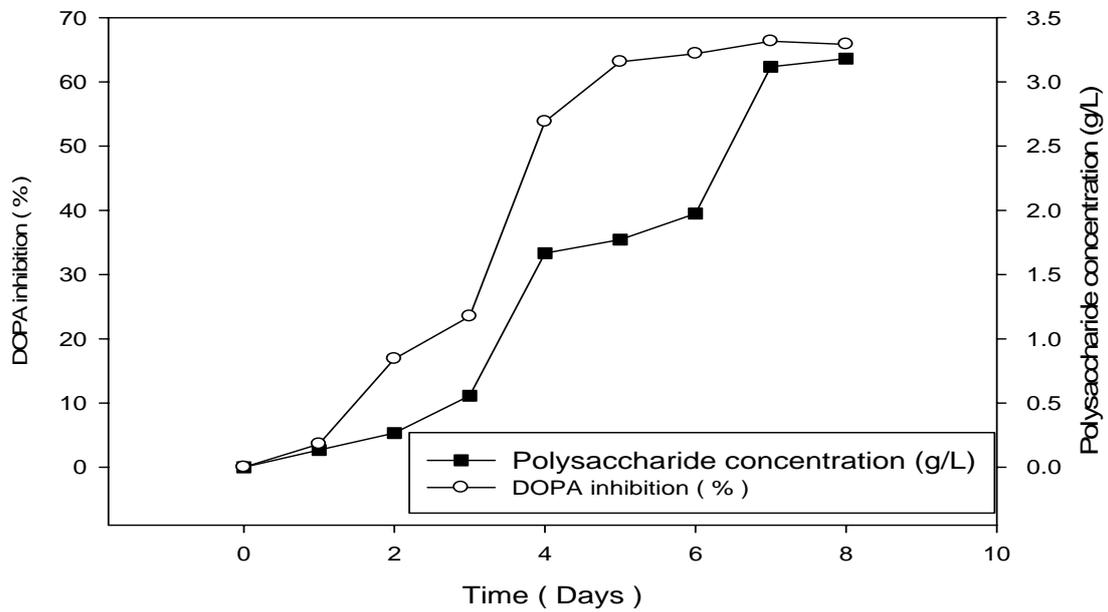


圖 5-18 多醣生成與上清液 DOPA 抑制之關係

培養條件：基礎培養基

初始 pH=4

接種量 5% (v/v)

溫度 30°C

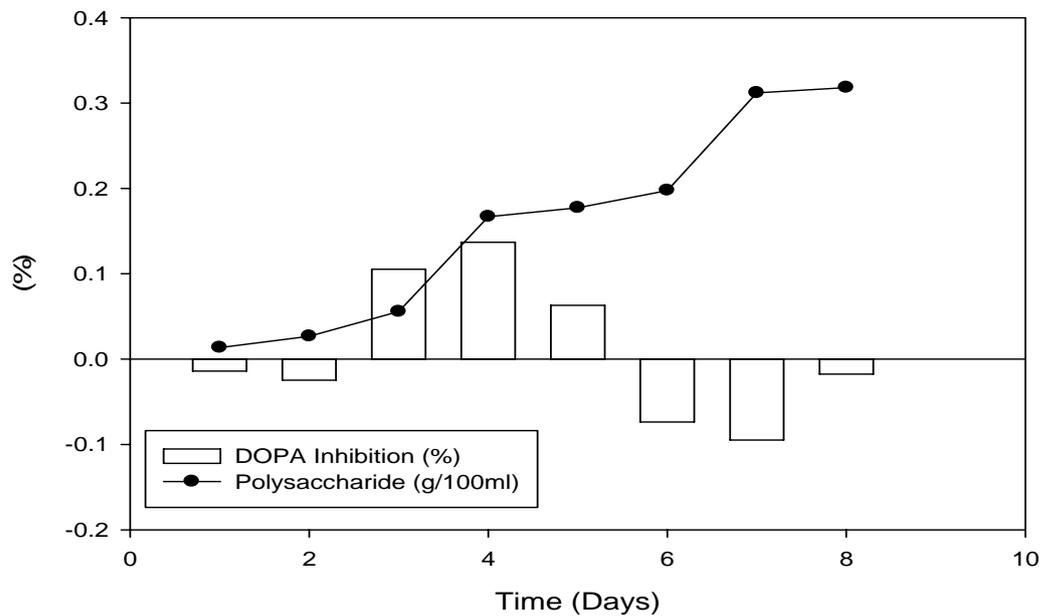


圖 5-19 多醣對黑色素抑制之影響

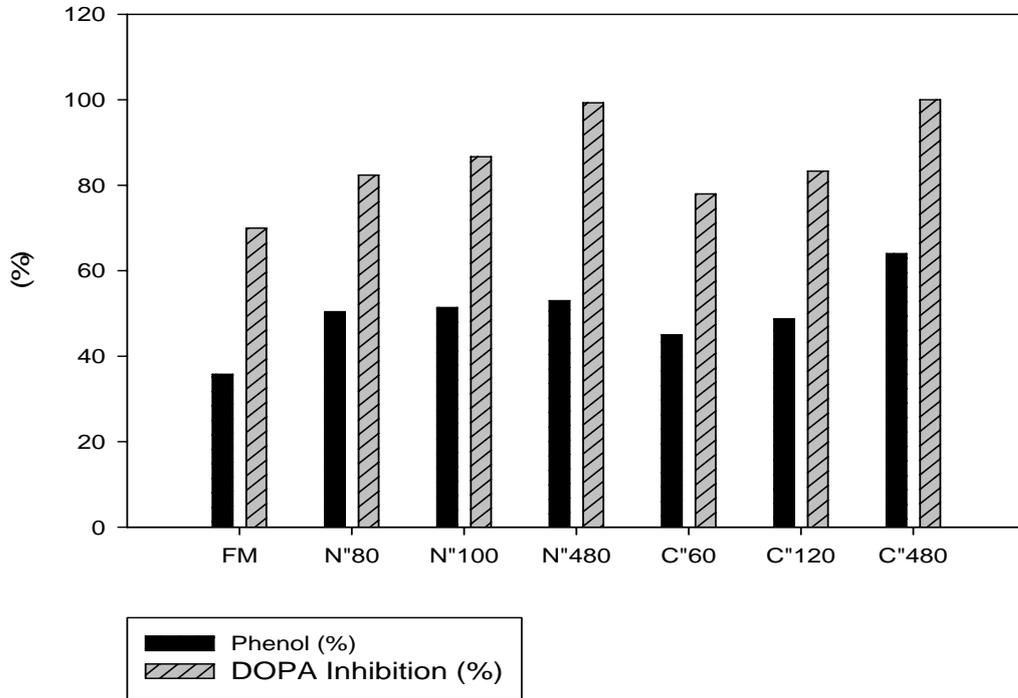


圖 5-20 不同酵素、時間作用酚基的氨基酸增加百分比與抑制率比較

M: medium FM: fermentation broth N": Neutrase + polytron
 C": Celluclase + polytron 數字為萃取時間(mins)

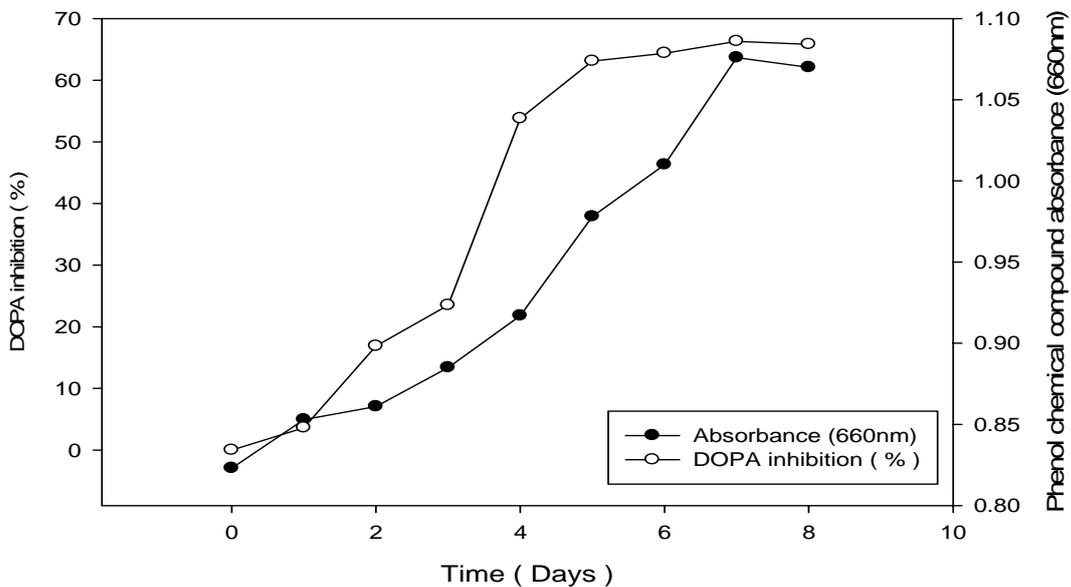


圖 5-21 酚基生成與上清液 DOPA 抑制之關係

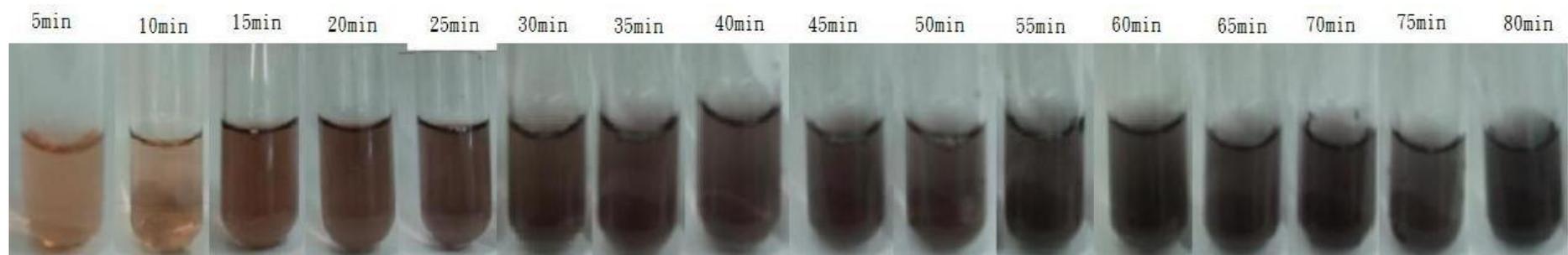


圖 5-1 黑色素隨反應時間之生成變化圖

第六章 結論與未來展望

6-1 結論

在本研究中，由於發酵液中的上清液有抑制 DOPA 生成之成分，將其經高溫高壓滅菌後，其中之有效成分並無受到太大之破壞，所以在作用過程中，若需經高溫作用時，則不需擔心會破壞其有效成分。

在含菌絲體之發酵液進行酵素分解的過程中，發現有先經均質後再行分解，其 DOPA 之抑制效果更為顯著，其效果約差 10% 左右。無論是上清液與菌絲體分開作用(菌絲體有經均質或無)其效果皆不及於整瓶發酵液經均質後分解之效果。所以本研究於後半部添加酵素分解出有效成分變因之探討，皆將整瓶發酵液經均質後進行分解。

利用 H_2SO_4 進行萃取時，發現其抑制效果特別不好，猜測於 H_2SO_4 進行萃取過程中可能會將有效成分切成更小分子或破壞發酵液中的有效成分，以至於 DOPA 之生成量幾乎不受影響。

在培養過程中，其多醣量與含酚基的氨基酸皆與 DOPA 抑制率成正比，但所析出來的多醣再經回溶，卻無抑制 DOPA 生成，雖然如此，並不能排除多醣的可能性，因為實際析出和回溶的有效多醣量未知。而抑制 DOPA 生成效果越好，其含酚基的氨基酸越多且呈一定比例。所選用之酵素(Neutrase、Celluclast、Papain)作用皆可切割蛋白質，推論有效成分可能為短鏈的胜肽類，且此胜肽上具有酚基的氨基酸

(如：酪胺酸)，於動力參數分析中，當monophenols或o-diphenols的側鏈取代基分子量增加時，則 V_{\max} 會減少、 K_m 會增加(附錄B)，表示形成黑色素的機會降低。故所推測之有效成分與此相符。

6-2 未來展望

本研究利用酵素分解出有效成分，此有效成分推測可能具有酚基氨基酸的胜肽類，此有效成分之分子量有待後續利用電泳加以探討鑑定。

本研究僅將分解出的有效成分對 DOPA 生成抑制之探討，針對有效成分對動物黑色素細胞之影響及對實驗動物皮膚之美白功效有待後續探討與研究。

參考文獻

中村敏郎著、黃玉儒譯(1992)。醫學美容指南。青春出版社。台北市。

尤智立(2003)。嗜高溫纖維分解菌纖維分解酵素之探討。中山大學生物科學系碩士論文。

王伯轍(2001)。保健用菇的生理活性物質。農業世界雜誌，210，56-59。

王阿靜(2004)。化妝品美白成份之 HPLC 分析方法開發。朝陽科技大學應用化學系碩士論文。

王聲遠、許敏玲、李旭生、蕭明熙(1996)。靈芝與雲芝免疫增強作用之研究。行政院衛生署中醫藥年報，12(3)，257-275。

李建武、余瑞元、陳麗蓉、陳雅慧、陳來同、袁明秀(2002)。生物化學實驗原理和方法。藝軒出版社。台北市。

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。

洪勛峰(2004)。槐花萃取物的美白研究。中國醫藥大學中西醫結合研究所碩士論文。

徐莉萍、柯哲明(1991)。ROOS 組織學。合計圖書出版社。台北市。

許元昱、李旺祚、郭文歷(1992)。組織學。合計圖書出版社。台北市。

張惠淇(2001)。中藥美白化妝品其安全、品質與療效之評估。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文。

張湘寧(2006)。靈芝子實體細胞壁組成 SACCHACHITIN 對 B16 細胞黑色素形成抑制之探討。台北醫學大學醫學研究所碩士論文。

莊麗貞、陳政蓉、楊昭順(2005)。化妝保養品的管理於檢測。化工技術，148，173-179。

- 曾文楷(2002)。中草藥對痤瘡病原菌與黑色素生成的影響。靜宜大學應用化學研究所碩士論文。
- 詹宏偉(2003)。不同培養方式對靈芝菌絲體生理活性成份生成之影響。東海大學化工所碩士論文。
- 楊明哲(2006)。控制菌絲體形態對於靈芝液態培養之影響。東海大學化工所博士論文。
- 楊昭順、陳玫蓉、陳俊瑜(2005)。生物技術在化妝保養品工業上之應用。化工技術，148，133-138。
- 劉國柱(1990)。現代科學看靈芝。雙利實業公司。台北市。
- 魏育群、李志忠、李文靜(2005)。化妝保養品的有效性評估檢測。生物產業 (Bioindustry)，16(3)：213-220。
- 蘇慶華(1991)。靈芝之分類學及生理活性物質。北醫學報，20，1-16。
- 蘇慶華(2006)。靈芝子實體之完全利用—三帖類、多醣及幾丁質。全球華人Ganoderma研討會。
- Alexotolus C. J., Mims C. W. (1979) “Introductory mycology.” John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Chad R. B., Jeanette C. R., Diana G. W., and Douglas E. R. (2001) “Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair.” Analytical Biochemistry, 290, 116-125.
- Connie M. (1974) “Mechanism of enzymatic oxidation of phenolic compounds.” Food resource[<http://food.oregonstate.edu/>].
- Espin J. C. (2001) “Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro.” Biochimica et Biophysica Acta(BBA) / Protein Structure and Molecular Enzymology, 1544,289-300.
- Espin J. C., Garciaruiz P. A., Tudela J. and Garciacanos F. (1998) “Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase.” Journal of Biochemistry, 331, 547-551.
- Hikino H., Lomnno C., Mirin Y.(1985) “Isolation and hypoglycemic activity of *Ganoderans A and B*, glycans of *Ganoderan lucidum* fruit

bodies.” *Planta Med*, 4, 339-340.

Katz M., Poulsen B. J. (1971) “Absorption of drugs through the skin.” In: Brodies B B, Gillette J R, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology, Concepts in Biochemical Pharmacology*, vol. 28. New York: Springer-Verlag, chapter 7.

Khanom F., Kayahara H., and Tadasa K. (2000) “Tyrosinase inhibitory activity of bangladeshi indigenous medicinal plants.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 1967-1969.

Kobayashi Y., Kayahara H., Tadasa K., Nakamura T., and Tanaka H. (1995) “Synthesis of amino acid derivatives of Kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 1745-1746.

Liliane S., (2008) U.S. Patent NO. WO/2008/045766.

Misiki A., Kututa M. (1981) “Studies in interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides.” *Carbohydrate Research*, 92, 115-129.

Ortonne J. P. and Prota G. (1993) “Hair melanins and hair color: ultrastructural and biochemical aspects.” *Journal of Investigative Dermatology*, 101 (1 Suppl):82S-89S.

Peng Y. F., Zhang L. Z., Zeng F. B. and Kennedy J. F. (2005) “Structure and Antitumor Activity of the Water-soluble Polysaccharides from *Ganoderma tsugae* Mycelium.” *Carbohy. Polym.*, 59,385-392.

Pissavini D. M., Ferrero L. (2004) “In vitro determination of sun protection factor.” *Business briefing: global cosmetics manufacturing*, 1-5. New York.

Prota G. (1988) “Progress in the chemistry of melanins and related metabolites.” *Medical Research*, 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.

Sheu M. T., Lin C. W., Huang M. C., Shen C. H. and Ho H. O. (2003)
“Correlation of In Vivo and In Vitro Measurements of Sun Protection
Factor.” *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 128–132.

Solomon E. P., (2007) “The Integumentary System.” *An Introductory to
Human Anatomy and Physiology*, 2-8. London.

Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A. (1985) “Structure
and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruiting body
and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*.” *Agriculture
and Biology Chemistry*, 49(9), 2641-2653.

Sugumaran M., Nellaiappan K. (2000) “Characterization of a new
phenoloxidase inhibitor from the cuticle of *Manduca sexta*.” *Biochemical
And Biophysical Research Communications*, 268, 379-383.

Takagi K., Mitsunaga T. (2003) “Tyrosinase inhibitory activity of
proanthocyanidin from woody plants.” *The Japan Wood Research Society*,
49, 461-465.

Takahashi Y., Koike M., Honda H., Ito Y., Sakaguchi H., Suzuki H.,
Nishiyama N. (2008) “Development of the short time exposure (STE)
test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells.” *Toxicology*, 22,
760–770.

Wilkes G. L., Brown I. A., Wildnauer R. H. (1973) “The biomechanical
properties of skin.” *CRC Critical Review in Bioengineering*, 453–495.

Williams (2003) “Structure and function of human skin.” *Transdermal and
topical drug delivery : from theory to clinical practice*. Pharmaceutical
Press, 1-25. London.