

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

遺傳工程在化粧品之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89 - 2626 - B - 041 - 003

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：林清宮

共同主持人：陳榮秀 楊朝成 林朝賢

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 90 年 10 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

遺傳工程在化粧品之應用

Applications of genetic engineering on cosmetics

計畫編號：NSC89-2626-B-041-003

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：林清宮 嘉南藥理科技大學化粧品系

共同主持人：陳榮秀 楊朝成 林朝賢 嘉南藥理科技大學化粧品系

摘要：本計畫目的是將遺傳工程技術應用在化粧品，除了能有效降低化粧品原料之生產成本，亦能提昇我國技術層次。本計畫利用基因選殖及微生物培養技術開發(1)黑色素作為化粧品原料 (2) 玻尿酸作為保濕化粧品原料。在黑色素方面，本計畫擬利用酪胺酸酵素基因轉形之鏈黴菌進行表現，再利用酪胺酸酵素合成黑色素，目前已完成黑色素生成之技術開發，可進一步將黑色素應用於染髮劑及其他。在玻尿酸方面，本計畫挑選玻尿酸產量較高之微生物，以生化方法純化後，加入保濕化粧品的配方中。本計畫完成後可將技術移轉至國內相關業界，並協助其進行生產量之放大技術及品質管制等有關事項。

關鍵詞：遺傳工程、黑色素、玻尿酸、化粧品

一、前言

黑色素普遍存在於動植物表面，並且具有很多生物功能，包括紫外線吸收、體溫調節及膚色決定等，由於具有相當廣的紫外線吸收範圍(包含UVA及UVB波長)，因此相當具有商業價值。黑色素在生物體內是由黑色素細胞所生成，黑色素由酪胺酸氧化而產生，會聚合成不規則之聚合物，存在於melanosome胞器內，數量愈多則顏色愈黑，人體表皮、毛囊及網膜均會產生。黑色素生成過程中最關鍵的酵素為酪胺

酸酵素，已證實此基因缺陷會導致黑色素無法生成而成為白子，近年化粧品業所強調的皮膚美白，其有效成分大多具有此酵素抑制作用。

酪胺酸酵素基因的核酸序列在許多生物如人類、鼠類均已確定，而且可利用DNA轉染技術可將酪胺酸酵素基因送入白色細胞而使之成為黑色。鏈黴菌具有酪胺酸酵素operon，其中mel C為酪胺酸酵素基因所在位置，近年陽明大學生化所吳妍華博士實驗室發現MelC1蛋白可短暫地與MelC2蛋白形成二合體，並可幫助MelC2蛋白與銅離子結合及MelC2蛋白的分泌，因此MelC1蛋白可能是MelC2蛋白的chaperone (Chen等人，1993)。另外日本Ikeda等人(1996)發現鏈黴菌之酪胺酸酵素基因上游含有一個開放編譯區(open-reading frame, ORF)，此ORF包含378 base pairs (被命名為ORF378)可使得被酪胺酸酵素基因轉形(transform)鏈黴菌之酪胺酸酵素活性提高110倍。

玻尿酸屬於天然的高分子多醣類，通常使用時以鈉鹽方式存在分子式為 $(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$ ，其中 $n > 1000$ 。玻尿酸在化粧品的應用，屬於高貴的保濕原料，舉凡防曬、日霜、晚霜、保濕乳液等各類化粧品都可添加玻尿酸，以增加產品的保濕功能，雖然其應用範圍很廣，但是其缺點為價格偏高，使得這項原料的使用受到限制。目前玻尿酸有兩

種主要的來源，一是由動物抽取，以雞冠最普遍；另一種來源是由微生物之莢膜獲得，雖然後者價格較便宜，但是目前的價格仍然很高(以Sigma公司為例,每公克需221美金)。

鏈球菌之 *has operon* 包含 *has A*, *B*, *C* 三個基因，其中 *has A* 基因產物為 hyaluronan synthase, *has B* 基因產物為 UDP-glucose dehydrogenase, *has C* 基因產物為 UDP-glucose pyrophosphorylase (Carter and Rijn, 1995; Bernish and Rijn, 1999)。根據 Ashbaugh et al. 1998 報導指出 *has A* 及 *B* 已經足夠表現莢膜，也就是玻尿酸之產生並不需要 *has C* 基因。

二、材料及方法

(1). 材料與設備:

1. 菌種:

Streptomyces lividans, *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*

2. 設備: corneometer SHP88, tewameter TM210, Chromameter CM-508i (Minolta), *In vitro* SPF 測試儀 UV1000s (Labsphere)

(2). 研究方法

1. 黑色素的製備與應用:

- 黑色素的純化
- 紫外線吸收光譜測定
- 含黑色素防曬化粧品的製備
- SPF 值測定
- 皮膚色澤的測定

2. 玻尿酸的製備與應用:

- Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* 培養
- 玻尿酸純化
- 含玻尿酸保濕化粧品的製備
- 保濕能力評估

三、結果與討論

為了確認 *Streptomyces* 所含質體無誤，經 Eco RV 作用，可產生單一片段為 5.7

kb; 以 Sma I 作用，可產生 3 個片段分別為 4.2, 0.9, 0.6 kb。

將 *Streptomyces* 於 28°C 培養 72 小時，可獲得黑色素(圖一為 HPLC 之分析圖譜)，其紫外線吸收光譜涵蓋 UVB~UVA，並且可通過 0.45 μ 之過濾膜(圖二)，此結果顯示黑色素具有良好之防曬應用性。

由於化粧品乳化之溫度為 80°C，為了確定黑色素之紫外線吸引能力不會在化粧品製造過程中遭受破壞，因此進行黑色素熱安定分析: 加熱時間分別為 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 分鐘，加熱後立刻進行黑色素之紫外線吸收測定，結果顯示，經過加熱黑色素之紫外線各波長吸收並無顯著差異; 其 SPF 值亦無明顯變化(圖三)。

為了探討黑色素防曬化粧品對皮膚色澤的影響程度，於是對自願者進行黑色素防曬劑塗抹試驗。首先在手臂內外側皮膚上選定約 20 cm² 之區域分別塗抹含黑色素防曬化粧品，20 分鐘後利用皮膚色澤計 (Minolta CM 508i) 比較塗抹防曬劑及未塗抹部位皮膚色澤 L*a*b* 變化，結果如表 1 以 1976 年國際照明協會 (Commission Internationale de l'Eclairage, CIE) 所定義的色彩空間 (color space) L* a* b* 值為表示方法。

目前市面上的防曬化粧品種類繁多，本計畫收集市面上主要防曬化粧品品牌 (包括化學性及物理性防曬劑)，選擇較具代表性的產品與含黑色素防曬化粧品進行有效性比較，比較項目包括紫外線吸收波長的寬度及防曬係數等。結果顯示黑色素之 UVA 及 UVB 吸收能力極佳，但是製成乳液後，效果不甚理想，希望未來嚐試改變配方以增加其效果，或者與其它防曬成份搭配以加強其效力。黑色素防曬劑配合傳統的防曬成分可得到很好之效果。

本計畫已完成黑色素生產條件的建

立，黑色素顆粒小於 $0.45\mu\text{m}$ ，熱安定分析顯示黑色素在乳化溫度下仍然具有紫外線吸收能力。利用上述所生產之黑色素已完成含防曬乳液製備，其外觀呈現灰色，人體塗抹後，經過皮膚色澤計測定，不會改變膚色。未來希望延續目前之工作，將黑色素應用到其他產品，例如染髮劑、製成紫外線隔離效果之隔熱紙、製成具隔離紫外線之太陽眼鏡及加入塑膠製品以防止紫外線引起塑膠老化現象。

將玻尿酸加入保濕化粧品中，所製備的樣品進行人體測試，方法是在自願者手背塗抹適量的樣品，每隔固定時間比較塗抹及未塗抹部位皮膚保水能力之不同，皮膚保水能力將利用角質含水量測定儀(Corneometer)及穿皮水份流失儀(Transepidermal water loss meter, TEWL)進行檢測。

Corneometer測量條件固定在相對濕度60%且室溫為 25°C 下進行，以corneometer的probe進行皮膚角質層的測定，其結果以1~150單位表示，每個部位測量八次，求取平均值，每隔1小時測一次，共3小時。TEWL測量濕度、溫度同上，因為TEWL易受環境的影響，因此測定時必需在密閉空間，並且避免人員走動。以TEWAMETER TM210的probe進行皮膚穿皮水份流失的測定，其結果以 $\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 表示，共測定3小時。結果顯示玻尿酸保濕效果極佳(圖四)。

四、參考文獻：

Ashbaugh, C. D., Albert, S. and Wessels, M. R. 1998. Molecular analysis of the capsule gene region of group A streptococcus: the has AB genes are sufficient for capsule expression. *J. Biol. Chem.* **180**, 4955-4959.

Beermann, F., et al. 1990. Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice.

EMBO **9**, 2819-2826.

Bernan V, et al. 1985. The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene*. **37**, 101-110.

Bernish, B. and Rijn, I. 1999. Characterization of a two-component system in *Streptococcus pyogenes* which is involved in regulation of hyaluronic acid production. *J. Biol. Chem.* **274**, 4786-4793.

Crater, D. L. and Rijn, I. 1995. Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in group A streptococci. *J. Biol. Chem.* **270**, 18452-18458.

della-Cioppa G, et al. 1990. Melanin production in *Escherichia coli* from a cloned tyrosinase gene. *Biotechnology (NY)*. **8**, 634-638.

Fuqua WC, et al. 1991. Characterization of melA: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. *Gene*. **109**, 131-136.

Halaban, R., et al. 1988. Tyrosinases of murine melanocytes with mutations at the albino locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 7241-7245.

Han K, et al. 1994. Tyrosinase production in recombinant *E. coli* containing trp promoter and ubiquitin sequence. *Ann NY Acad Sci*. **721**, 30-42.

Hintermann G, et al. 1985. Cloning and expression of the genetically unstable tyrosinase structural gene from *Streptomyces glaucescens*. *Mol Gen Genet.* **200**, 422-432.

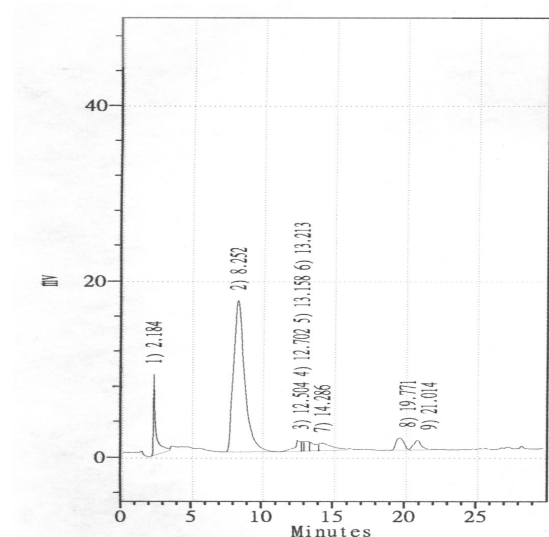
Huber M, et al. 1987. The promoter of the *Streptomyces glaucescens* mel operon. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8106.

Ikeda K, et al. 1996. Effects of methionine and Cu^{2+} on the expression of tyrosinase activity in *Streptomyces castaneoglobisporus*. *J Biochem (Tokyo)*. **120**, 1141-1145.

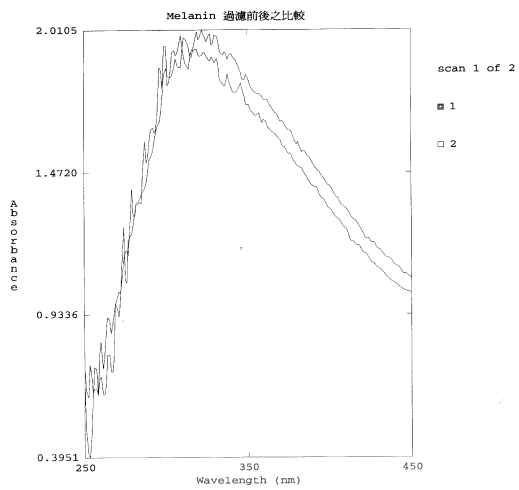
Ikeda, K., et al. 1996. Cloning and

- sequence analysis of the highly expressed melanin-synthesizing gene operon from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45**, 80-85.
- Katz, E., et al. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J Gen Microbiol.* **129**, 2703-2714.
- Kwon, B. S., et al. 1989. Isolation, chromosomal mapping, and expression of the mouse tyrosinase gene. *J Invest Dermatol.* **93**, 589-594.
- Lee, Y. H., et al. 1986. Structural stability of heterologous genes cloned in *Streptomyces* plasmid pIJ702. *Biochem Biophys Res Commun.* **140**, 372-378.
- Lee, Y. H., et al. 1988. A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase gene in *Streptomyces*. *Gene.* **65**, 71-81.
- Manome T, et al. 1987. Cloning of DNA fragments containing *Streptomyces* promoter activity. *J Antibiot (Tokyo).* **40**, 1440-1447.
- Nayak KK, et al. 1988. Cloning of tyrosinase gene from *Streptomyces lividans* in *Escherichia coli*. *Indian J Biochem Biophys.* **25**, 515-517.
- Naylor, M. F., Boyd, A., Smith, D. W., Cameron, G. S., Hubbard, D. and Neldner, K. H. 1995. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. *Archives of Dermatology.* **131**, 170-175.
- Paget MS, et al. 1994. Construction and application of streptomycete promoter probe vectors which employ the *Streptomyces glaucescens* tyrosinase-encoding gene as reporter. *Gene.* **146**, 105-110.
- Shibahara, S., et al. 1986. Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2413-2427.
- Solaiman DK, et al. 1995. Expression of *Streptomyces melC* and *choA* genes by a cloned *Streptococcus thermophilus* promoter STP2201. *J Ind Microbiol.* **15**, 39-44.
- Takeda, A., et al. 1989. Functional analysis of the cDNA encoding human tyrosinase precursor. *Biochem Biophys Res Commun.* **162**, 984-990.
- Terao, M., et al. 1989. Isolation and characterization of variant cDNAs encoding mouse tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun.* **159**, 848-853.
- Tibbetts MW, et al. 1992. Cloning of a DNA fragment involved in pigment production in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett.* **70**, 9-13.
- Tseng, H. C., et al. 1990. The melanin operon of *Streptomyces antibioticus*: expression and use as a marker in gram-negative bacteria. *Gene.* **86**, 123-128.
- Yamamoto, H., et al. 1989. Melanin production in cultured albino melanocytes transfected with mouse tyrosinase cDNA. *Jpn J Genet.* **64**, 121-135.

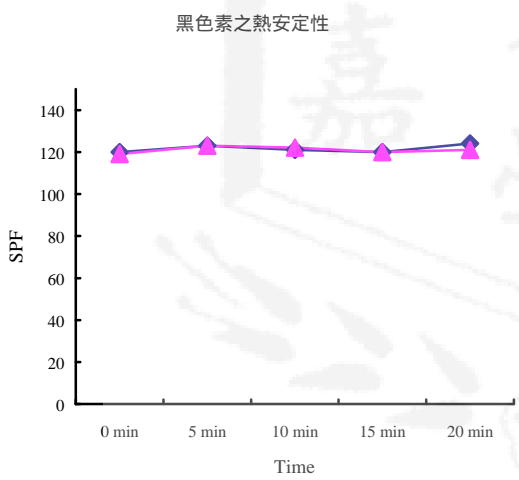
五、圖表：



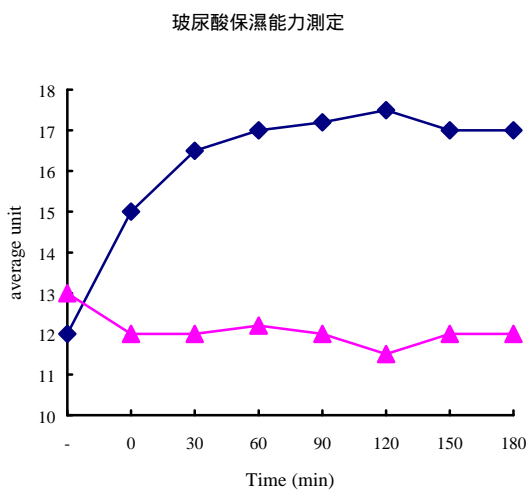
圖一、黑色素分析



圖二、過濾前後黑色素UV吸收光譜



圖三、黑色素之熱安定分析



圖四、玻尿酸保濕能力測試