行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※靈芝及冬蟲夏草菌絲體機能性研 II 酪胺酸酶抑制劑的探討※

※　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　※

※　※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：☒個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2626-B-041-004

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：朱惠鈴

共同主持人：吳鴻程

計畫參與人員：陳彥謹

本成果報告包括以下應繳交之附件：

□赴國外出差或研習心得報告一份

□赴大陸地區出差或研習心得報告一份

□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學食品衛生系

中　華　民　國　九十一 年　十　月　三十　日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

靈芝及冬蟲夏草菌絲體機能性研 II 酪胺酸酶抑制劑的探討

The functional properties of *Ganoderma Lucidum* and *cordyceps sinesis* II –The study of tyrosinase inhibitor

計畫編號：NSC 90-2626-B-041-004
執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日
主持人：朱惠鈴　　執行機構：嘉南藥理科技大學食品衛生系

一、中文摘要

本研究之目的在探討以台糖提供靈芝（*Ganoderma Lucidum*）之菌絲體酪胺酸? 抑制劑之特性。於實驗中以水、甲醇、正丁醇、正己烷和乙酸乙酯進行靈芝酪胺酸? 抑制劑之萃取，結果顯示酪胺酸? 抑制活性之順序為水>甲醇>正丁醇>正己烷及乙酸乙酯；以水萃取 1g 的靈芝，可淨得 0.63g 之酪胺酸? 抑制劑。靈芝酪胺酸? 抑制劑粗抽出液以 L-DOPA 當基質，進行後續生化性質之探討，半抑制濃度（IC_{50}）為 22.2 mg/ml；靈芝酪胺酸? 抑制劑和酪胺酸? 預先作用時間 10 分鐘其抑制活性可達 93%，而 30 分鐘其抑制活性可達 94%。利用雙倒數作圖發現該抑制劑作用形式為競爭性抑制作用；以 Diox plot 做圖得抑制常數（Ki）為 2 mg/ml。以 Sephadex G-25 管柱層析測量此抑制劑分子量大約為 1KDa；酪胺酸? 抑制劑在-18°C儲存 180 天其相對抑制活性為 98%，而酪胺酸? 抑制劑在 4°C儲存 180 天其相對抑制活性為 88%。目前正利用 AMBERLITE XAD-7、Sephadex G-25 和 Sephadex LH-20 等膠體來進行後續純化工作。

關鍵詞：*靈芝、酪胺酸? 抑制劑、作用機制、美白、生化特性*

Abstract

The *Ganoderma lucidum* extract was found having the activity to inhibit the mushroom tyrosinase-catalyzed oxidation of L-DOPA. The yield of extract by using different solvent was in the following order: water〉methanol〉*n*-butanol〉*n*-hexane=acetyl ester. The crude extract of tyrosinase inhibitor was then used to study its inhibition on tyrosinase inhibitor activity. The inhibitory concentration causing 50% inhibition (IC_{50}) was 22.2 mg/ml . The molecular mass was estimated to be 1.0 KDa according to the Sephadex G-25 chromatography. The crude extract retained 98% and 88% inhibitory activity for 180 days at -18°C and 4°C, respectively. Further studies on the purification with the tyrosinase inhibitor from *Ganoderma Lucidum*. with Further studies on the immobilization with Amberliter XAD-7, Sephadex G25, and Sephadex LH-20 are proceediing.

Keywords: ***Ganoderma Lucidum*, *tyrosinase inhibitor ,biochemical properties***

二、緣由與目的

酪胺酸? （單酚? ，雙酚? ；多酚氧化? ；EC 1.14.18.1）是一個含有銅的酵素，廣泛的存在自然界中，不同的酪胺酸? 從不同的生物得到，它們具有類似的結構和功能（1）。黑色素生合成為形成黑色色素的生理過程，主要為保護皮膚免受到光致癌物的傷害（2）。酪胺酸? 為在黑色素合成中為關鍵酵素它參與了2個步驟，首先先將單酚羥化成雙酚（單酚? 作用）；再將雙酚氧化成quinones（雙酚? 作用），而quinones在經聚合反應成褐色、紅色或黑色的色素（3.4）。

酪胺酸? 若產生過多，在皮膚上則引起斑點或黑斑，而食品中因酵素性褐變產生的變化，降低商品的價值。酪胺酸? 抑制劑可調整酪胺酸? 的活性，因而可避免皮膚或食品引起

上述情形。目前皮膚常用來美白淡斑之酪胺酸？抑制劑有對苯二酸、麴酸及維他命A酸及衍生物。但對苯二酸及麴酸易引起刺激，維他命A酸及衍生物具致畸性。尋找有效的酪胺酸？抑制劑且可長期使用於人類皮膚不會產生不安定，對皮膚的灼傷或皮膚過敏等副作用是很重要的。故由天然物去尋找有效、天然、不具毒性之酪胺酸？抑制劑乃蔚為風潮，不但可運用於美白保養品，在醫療上可治療黑色素腫瘤，在食品上也具有防止褐變之作用。

靈芝，在中國又稱"仙草"、"瑞草"，在日本則又稱之為"吉祥茸"。兩千多年來，靈芝在中國醫學一直佔有崇高地位且是最吉祥珍貴的調理滋補藥材，特別重要。本實驗則是希望從靈芝中找出低刺激性、低副作用的酪胺酸？抑制劑。

三、結果與討論

（一）靈芝酪胺酸？抑制劑粗抽出液萃取條件

1.靈芝抑制劑粗抽出液在不同的溶劑（水、甲醇、正丁醇、正己烷和乙酸乙酯）經超音波加熱萃取後的溶解情形（表一），結果顯示靈芝粉末在水和甲醇的溶解力極佳，經濃縮後用分光光度計測是否有抑制活性，結果顯示靈芝抑制劑粗抽出液的溶解情形與溶劑的極性成正比。已知水和甲醇溶解情形較好，以不同比例的水和甲醇萃取靈芝（表二），結果顯示 50% 甲醇和水萃取是相同的。以水萃取 1g 的靈芝，可淨得 0.63g 之酪胺酸？抑制劑。

表一、利用不同溶劑萃取靈芝酪胺酸？抑制劑之情形 5

溶劑	**溶解情形**	**抑制百分比**
水	互溶	80%
甲醇	互溶	69%
正丁醇	微溶	35%
乙酸乙酯	不互溶	0%
正己烷	不互溶	0%

表二、不同比例的水和甲醇萃取靈芝

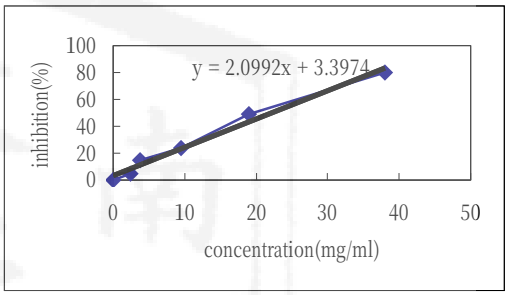
甲醇濃度（%）	**抑制百分比（%）**
100%	56
50%	88
0%	88

2.靈芝酪胺酸？抑制劑粗抽出液粗萃取液以 L-Dopa 當基質，做以下之性質

(A) 半抑制濃度（IC_{50}）：

而以不同濃度之抑制劑測吸光以求 IC50，圖一為不同濃度的靈芝抑制劑抑制情形，得到的圖為線性關係，經公式帶入計算得到的結果為 22.2 mg/ml。

圖一、不同濃度的靈芝抑制劑抑制情形



(B) 最適作用時間：如表三觀察靈芝酪胺酸？抑制劑粗抽出液和酪胺酸？作用時間，結果發現在 10 分鐘以後作用時間就不會改變。

表三、靈芝酪胺酸？抑制劑粗抽出液和酪胺酸？作用時間

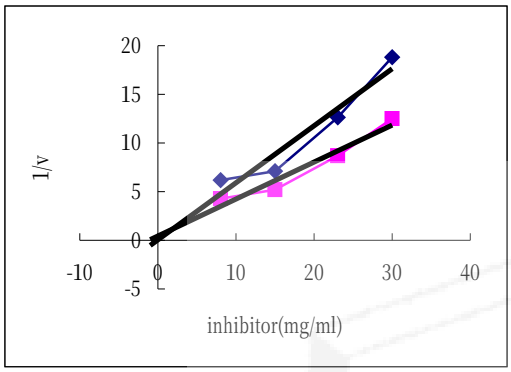
Preincubation Time(min)	**抑制百分比（%）**
0	5%
5	81%
10	93%
30	94%
60	90%
120	87%
180	88%

(C) 抑制劑作用型式與 Dixon plot

以有添加抑制劑和無添加抑制劑，在不同濃度

的 L-Dopa (3.8 mM、1.9 mM 和 0.95 mM) 反應，得來的反應常數和 L-Dopa 成雙倒數作圖，求出靈芝抑制劑粗抽出液的抑制型態，2 條交於 y 軸，故為競爭性抑制作用。而 Dixon plot 為求 Ki，由不同的抑制劑濃度的 L-Dopa (3.8 mM 和 1.9 mM) 反應，得來的反應常數成倒數，交叉的點即為 Ki (圖二)，結果顯示 Ki 為 2 mg/ml。

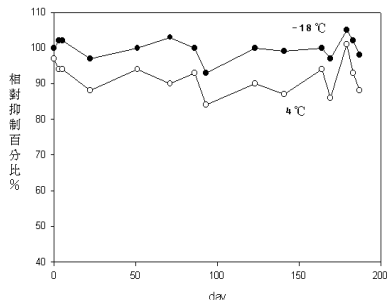
圖二、Dixon plot



(D)分子量測定

以 Sephadex G-25 管柱層析分析靈芝酪胺酸?抑制劑，insulin 和 vitB12 經管柱跑完後，計算 Kav 和 log MW 做線性圖後，將靈芝粗抽出液放入管柱跑，跑完後用 ELISA reader 測吸光，找出抑制活性最高的地方，計算其 Kav，結果顯示靈芝酪胺酸? 抑制劑 Kav 為 0.677，插入其方程式後，算出此抑制劑分子量大約為 1KDa。

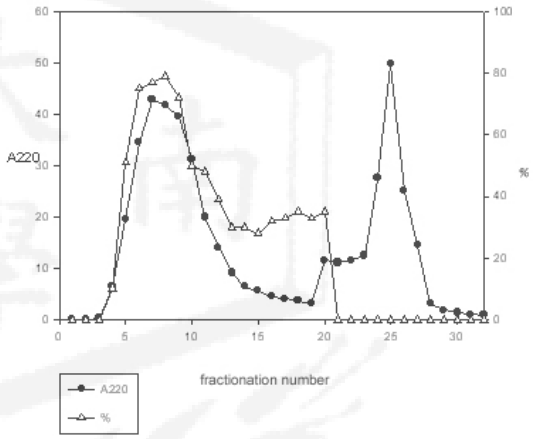
(E)儲存安定性：觀察靈芝抑制劑是否會隨著儲存的時間而有所變化 (圖三)。結果顯示，酪胺酸? 抑制劑在-18°C儲存 180 天其相對抑制活性為 98%，而酪胺酸? 抑制劑在 4°C儲存 180 天其相對抑制活性為 88%。因此靈芝抑制劑粗抽出液在-18°C和 4°C下之儲存極為穩定



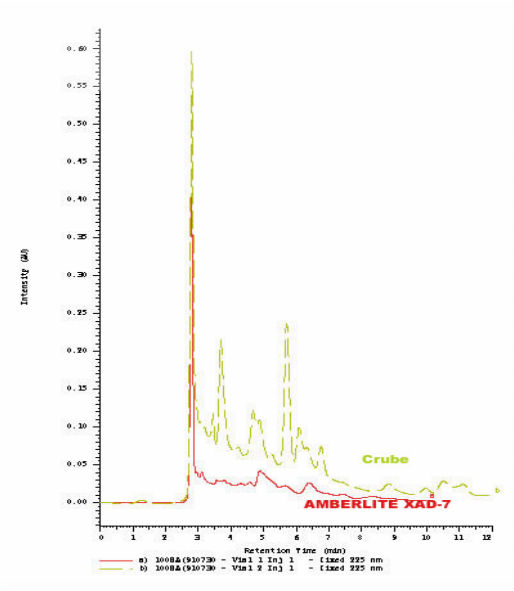
圖三、靈芝酪胺酸? 抑制劑粗抽出液經 -18°C和 4°C的儲存安定性

(二) 靈芝酪胺酸? 抑制劑純化最佳步驟

利用 AMBERLITE XAD-7 非離子交換樹脂，發現會產生 2 個波峰，如圖所示用小的管柱跑的結果。在 A220 中出現 2 個波峰，而具有抑制活性出現在前面的波峰，而後面的波峰由 AMBERLITE XAD-7 所吸附的卻沒抑制活性，因此可發現靈芝抑制劑為 AMBERLITE XAD-7 所不能吸附的 (圖四)。使用 HPLC 確認純化程度 (圖五)，結果顯示經 AMBERLITE XAD-7 可部分純化。表四為粗萃取和 AMBERLITE XAD-7 處理後的回收率，結果顯示經 AMBERLITE XAD-7 處理後的回收率為 72.5%



圖四、利用 AMBERLITE XAD-7 純化之情形



圖五、使用 HPLC 分析其純度

五、參考文獻

1.Sanchez-Ferrer, A.,Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism , Biochim. Biophys. Acta ,1995 ,Volume 1247 ,pp. 1-11

2. Espin, Juan Carlos, "Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro" Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology 2001 pp. 289-300

3.Kyung No, Jaea; Yu Soung, Doa; Jung Kim, Youa, Inhibition of Tyrosinase by Green Tea Components , Life Sciences Including Pharmacology Letters Vol: 65, Issue: 21, 1999 ,pp. PL241-PL246

4.Espin, J. C.; Jolivet, S.; Wichers, H. J., Inhibition of Mushroom Polyphenol Oxidase by Agaritine ,J. Agric. Food Chem.; 1998; 46(8); 2976-2980.

5.K Kino, A Yamashita, K Yamaoka, J Watanabe, Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from Ganoderma lucidium J. Biol. Chem. 1989 264: 472-478.

6..葉美嬌，1994，蝦酪胺酸?抑制劑之研究，碩士論文，國立海洋大學，水產食品科學研究所

六、自評

本研究已順利完成計畫之目標，不但將靈芝酪胺酸?抑制劑萃取條件找出，並且探討其特性。發現靈芝酪胺酸?抑制劑粗抽出液-18℃下放置 180 天，抑制活性仍可保持在98%左右。若於4℃下放置180天，抑制活性仍可保持在 88%。而且前正朝著靈芝酪胺酸?抑制劑純化及成分鑑定著手後續將有相當大之發展空間。