

# 嘉南藥理大學 105 年度教師研究補助 計畫成果報告

## 重點研究總計畫名稱：

以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討  
紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用

子計畫一：不同光波長與紅麴誘導因子對金線連組織培養苗及  
懸浮培養二次代謝物形成之影響

子計畫二：以 3D QSAR 與半合成方法由紅麴色素開發新穎性  
之黑色素生成抑制劑

子計畫三：以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法之紅  
麴二次代謝物的化粧品功能性分析

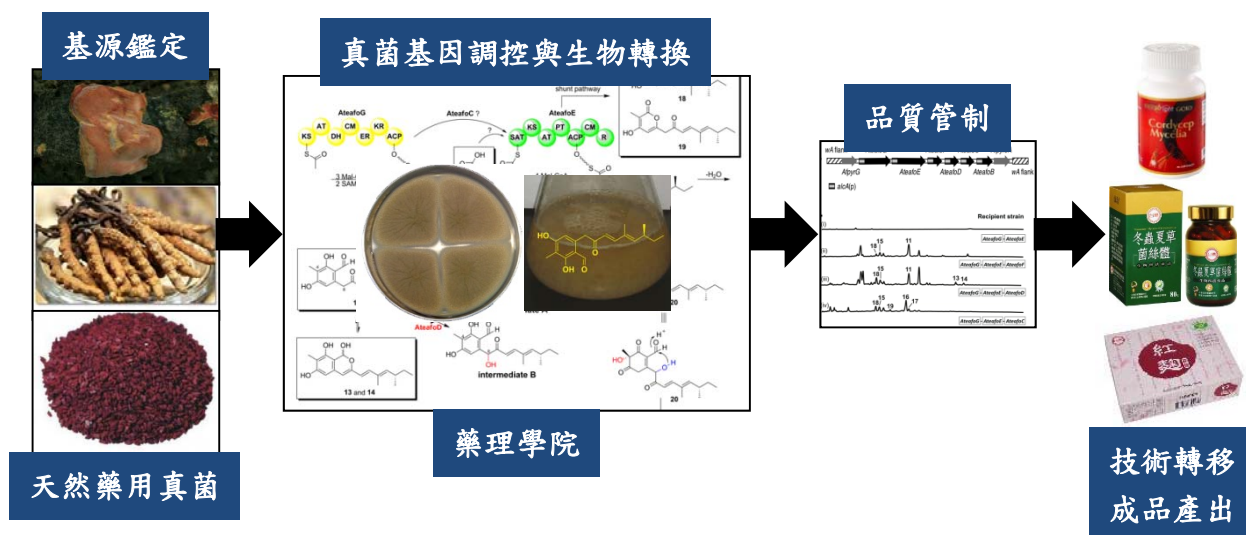
執行單位：藥理學院

中華民國一〇六年三月二十四日



## 一、前言

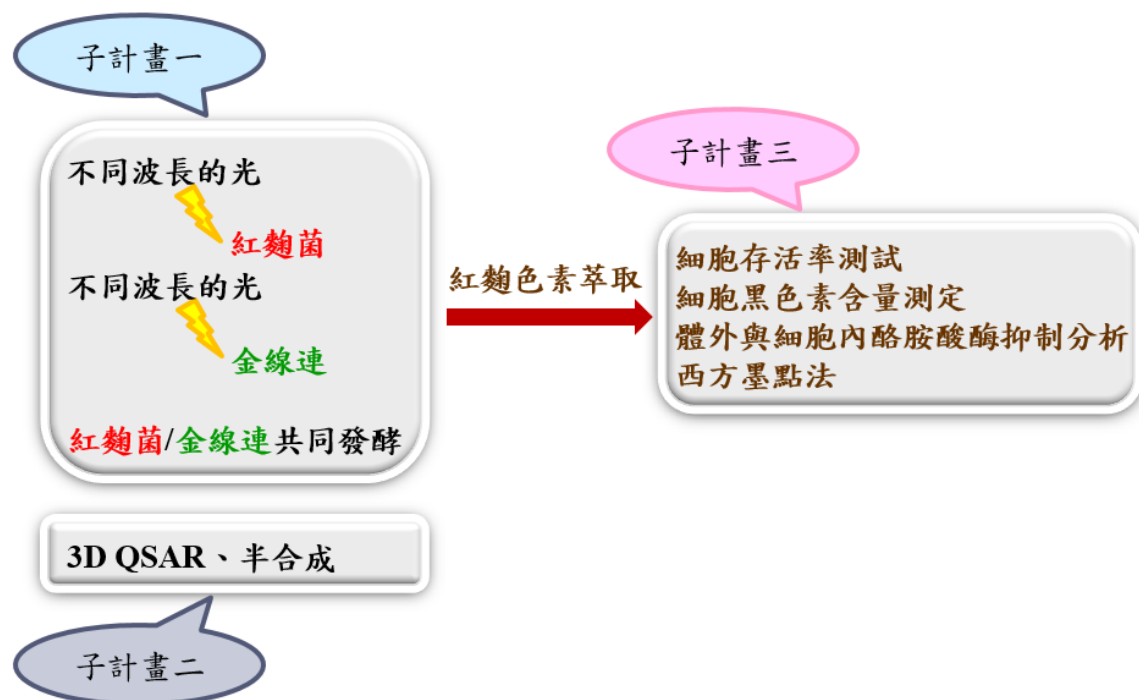
本院近年與美國南加大藥學院藥學系主任王嘉駿博士 (2009 年禮聘為客座教授，現擔任副校長) 進行跨國研究，研究主題著重『真菌基因探勘與其二次代謝物之生合成研究』，以最尖端之基因調控與生物轉換技術，研究真菌類生合成之微量物質成為新藥的可能性，研究團隊在國際學術領域嶄露頭角，除獲得美國國家衛生院之多年期研究計畫補助外，已有十餘篇研究論文發表於國際頂尖期刊，如：Nature Chemical Biology 與美國化學會誌 (J. Am. Chem. Soc.) 更將本校的研究推向另一個高峰，研究成果除學術貢獻外，以此為藥理學院之核心技術與重點研究方向，未來的實務應用與商業價值更具潛力。



## 二、計畫架構

本年度提出「以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用」整合型研究計畫，針對我國、日本等亞洲國家使用歷史悠久的真菌--紅麴菌 (*Monascus* spp.)，其所產生之二次代謝物 azaphilones 類色素，子計畫一進行不同光波長與紅麴誘導因子對金線連組織培養苗及懸浮培養二次代謝物形成之影響，期望產生新穎二次代謝物，子計畫二進行以 3D QSAR 與半合成方法由紅麴色素開發新穎性之黑色素生成抑制劑，

子計畫三則由子計畫一、二所提供之二次代謝物分析其抗黑色素生成效果，以評估開發為化粧品之可能性，進行後續之研發。計畫大綱如下圖所示：



### 三、預期成果與效益

本研究將呈現紅麴菌、植物組織培養等生物技術，以及電腦模擬與化學半合成技術應用於真菌二次代謝物於化粧品開發之應用實例，研究成果將產出 SCI 論文、研討會論文；提出至少一件之專利申請案；參與研究之研究生人數至少有一人，所得之研究經驗與成果均將融入計畫主持人之教學，並於未來作為實際產品開發之參考。



## 嘉南藥理大學 105 年度教師研究補助計畫成果報告

計畫類型	<input type="checkbox"/> 與業界廠商合作研究 <input checked="" type="checkbox"/> 重點研究 <input type="checkbox"/> 一般個人型研究				
本（子）計畫主持人	高毓瑩	單位	生科系	職級	助理教授
聯絡電話	分機：2523		E-mail	viviakao7175@gmail.com	
本（子）計畫名稱	不同光波長與紅麴誘導因子對金線連組織培養苗及懸浮培養二次代謝物形成之影響				
重點研究總計畫名稱	以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用				
重點研究總計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
「與業界廠商合作研究計畫」填寫	廠商名稱				
	廠商出資金額				
執行期限 (核定公告日由研發處填寫)	自核定公告日起至民國 105 年 12 月 31 日止				



## 研究計畫內容

### (一) 摘要

植物在不同的環境刺激之下，可產生各式的次級代謝物，並協助植物度過生物性與非生物性的逆境。台灣重要藥用植物金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata)，具有「藥王」的美名，許多研究指出其具有改善高血脂、活化巨噬細胞、肝損傷保戶與免疫調節的功能，90 年代從組織培養轉型到農民產業開發，近來已具有相當大的市場規模。近年來，開始有研究人員利用 LED 光處理，預期可加速金線連組培苗生長。本計畫期望在單一波長刺激下，觀察金線連生長型態變化，並探討金線連次級代謝物圖譜，比較基因圖譜與代謝圖譜之相關性，篩選出促進此類次級代謝物的產量的光質條件與品系。

### (二) 研究動機與研究問題

近年來，台灣蘭花產業興盛，除供給觀賞花卉市場外，各大研究單位與生技公司陸續開發蘭花系列化妝品，蘭科植物也成為台灣重要化粧品原料來源。金線連為蘭科重要的藥草植物，已經被證實具有改善高血脂、活化巨噬細胞、肝損傷保護與免疫調節等功能，而其細胞萃取物已成為歐洲化粧品原料之一，而相關的功能性成份尚未有相關報告發表。因此，子計畫一擬定利用物理性(光波長)因子提高金線連二次代謝物生產；與生物性因子(紅麴)共培養，提高功能性二次代謝物生產，並加以探討與化粧品相關功能性成分的品系。

### (三) 研究方法與步驟

1. 金線連無菌苗材料：購自南投不同農場之金線連瓶苗，將無菌苗進行繼代培養。
2. 不同光質處理：每瓶 12 株苗，每組處理重複 6 瓶。將含節間約 1.5 公分切除後，在植物生長箱生長兩周，之後置於不同光波長處理，以黑暗處理與全螢光燈處理當作對照組，八種光波長(純藍光，純紅光，藍紅光不同比例)包含藍光、紅光、藍光與紅光、藍光紅光與遠紅外光等，觀察並紀錄生長型態。
3. 金線連癒合組織誘導：將無菌苗切約一公分含節間，培養於不同強度之 MS 與 WPM 培養基中，另外添加活性碳與植物生長調節劑 (BA, kinetin 濃度 0.5~1ppm; 2,4-D, IAA, NAA 濃度 0.5~3ppm)，於光照與黑暗中培養兩個月。
4. 將金線連組培苗出栽、馴化並與紅麴共培養。





5. 金線連 DNA/RNA 萃取：取金線連葉子 0.2 公克，加入液態氮研磨後以 2% CTAB 萃取，經酒精沉澱並回溶於 100ul TE 供 ISSR 與 RT-PCR 試驗。
6. 金線連品系鑑定：以 ISSR 引子進行 PCR 反應，確認可鑑定不同品系金線連之引子與 DNA 圖譜。

#### (四) 實驗結果及討論

1. 金線連無菌苗材料：購自南投不同農場之金線連瓶苗，將無菌苗進行繼代培養。金線連節間抽長需經過兩次繼代培養，約兩個月生長時期可達光質測試高度。
2. 不同光質處理：於不同光波長處理，八種光波長發現全藍光與全紅光對於金線連生長抑制，全紅光處理組，植物呈現白化 (圖 1A)，推測此光源不利於葉綠素生成，也可能抑制光合作用之進行。當金線連生長於不同比例紅藍光的組合，有利於健康的植株生長 (圖 1B, C)。不同光源對於植物生長之影響如圖 2 所示。

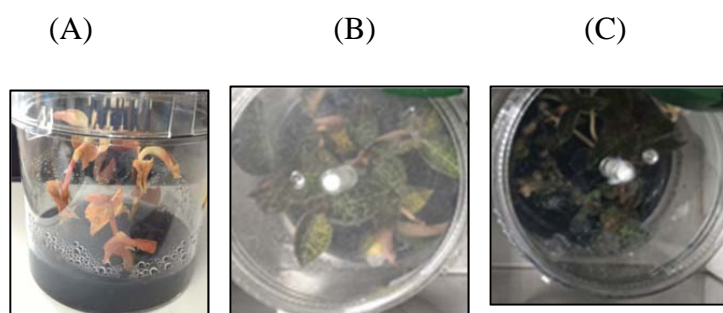


圖 1. 金線連於全紅光 (A) 及紅藍光組合 (B 與 C) 培養下植物生長狀態。



圖 2. 金線連於不同光源下之植物生長狀態。

3. 金線連癒合組織誘導於不同強度之 MS 與 WPM 培養基與植物生長調節劑之處理下，不論是光照與黑暗中培養兩個月皆無癒合組織形成，目前文獻也尚未有癒合組織形成之相關報告，推測蘭科在受傷部位不易以大量細胞團增生的方式修復，尚有未知因素控制癒合組織的形

成。

4. 金線連瓶苗於瓶中生長兩個月，超過兩個節間時，將根部培養基洗淨移至不同配方的土壤(珍珠石、矽藻土、泥炭土) 馴化。在密閉的生長盒中生長約一到兩個月新根生成，植物可於 25°C 室外環境正常生長。出栽苗與真菌共培養仍在試驗中。
5. 由不同農場取得之金線連瓶苗葉子進行 DNA 萃取，以 2% CTAB 萃取之 DNA 進行 16 組 UBC 引子進行 PCR，以 ISSR 方式探討不同品系的 DNA 圖譜。其中有 11 組引子可產生多型性條帶，目前以 UBC827 可擴增出多條帶，並可做為區分品種的候選引子 (圖 3)。

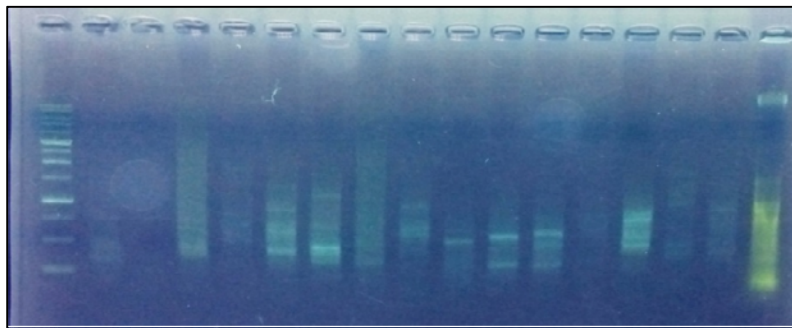


圖 3. 金線連葉片 DNA 以 16 組引子進行 ISSR 試驗

6. 金線連品系鑑定：以 ISSR 引子進行 PCR 反應，利用引子 UBC827 擴增數個樣品，兩家農場瓶苗呈現類似條帶，推測計畫中的瓶苗可能來自同一母瓶 (圖 4)。



圖 4. 不同瓶苗之金線連葉片 DNA 進行 ISSR 試驗



## (五) 結論

1. 金線連在不同光質下呈現不同的生長型態，全紅光對金線連瓶苗的生長具抑制作用，而藍紅光的組合有利於金線連的生長，經透氣度高的土壤配方，可成功馴化出栽之金線連瓶苗，並正常生長於室外的自然光源。
2. 本試驗取得之金線連瓶苗經由DNA圖譜，初步鑑定為同一親代，其二次代謝物質成分應相近；然而不同光質下生長型態差異極大，與粧品原料生產相關基因之表達量將在未來試驗中完成。





# 嘉南藥理大學 105 年度教師研究補助計畫成果報告

計畫類型	<input type="checkbox"/> 與業界廠商合作研究 <input checked="" type="checkbox"/> 重點研究 <input type="checkbox"/> 一般個人型研究				
本（子）計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
聯絡電話	分機：2000		E-mail	kuanhanlee@mail.cnu.edu.tw	
本（子）計畫名稱	以 3D QSAR 與半合成方法由紅麴色素開發新穎性之黑色素生成抑制劑				
重點研究總計畫名稱	以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用				
重點研究總計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
「與業界廠商合作研究計畫」填寫	廠商名稱				
	廠商出資金額				
執行期限 (核定公告日由研發處填寫)	自核定公告日起至民國 105 年 12 月 31 日止				



## 研究計畫內容

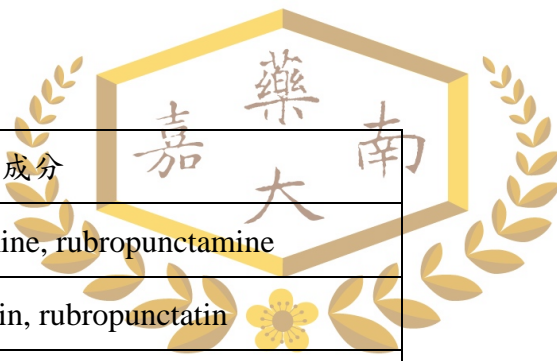
### (一) 摘要

Filamentous fungi are known to be prolific producers of secondary metabolites, such as penicillin, lovastatin, and cyclosporine, and are an important resource for discovering small molecules of pharmaceutical and industrial value. *Monascus* spp. produced several well-known polyketides such as monacolin K, citrinin, and azaphilone pigments. Azaphilone pigments are a class of fungal metabolites characterized by a highly oxygenated pyrano-quinone bicyclic core and exhibiting a broad range of bioactivities. In this study, the orange pigments will be transformed into red pigments by replacing the oxygen moiety of orange pigments with various nitrogen-containing derivatives. The optimal side chain will be selected by using 3D QSAR approaches, such as pharmacophore development and molecular simulation. The amino acid and amino alcohol derivatives will be tested as the inhibitors of melanogenesis for novel cosmeceuticals.

### (二) 研究動機與研究問題

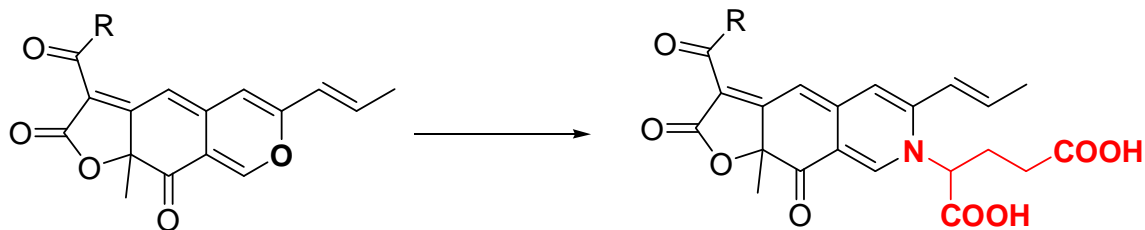
紅麴在發酵過程中，會產生醇、酸、酯與其他酵素水解物質，這些發酵產物，能造成發酵產品的芳香味與甘甜口感，因而成為常用的食品材料。紅麴發酵過程所產生的二次代謝物具有許多有益於人體的活性成分，更成為近年來生技藥粧產業研發重點項目，如：紅麴色素與 monacolin，可分別用為食用色素與膽固抑制劑。目前的研究與產品開發多集中在食品加工、降膽固醇、降血壓等代謝症候群的應用。

紅麴色素是經衛福部認可的天然色素，由紅麴菌 *Monascus* sp 生產，經萃取純化而得。主成分依色澤分為紅麴紅色素、紅麴黃色素、紅麴紫色素等 3 類，隨著各類色素所佔之比例不同，因而產生由橙色到暗紅色等多樣化之紅麴色素產品系列，是安全性極高的食用色素或食品著色劑。



色素	成分
紅色素	Monascorubramine, rubropunctamine
橙色素	Monascorubin, rubropunctatin
黃色素	Ankaflavin, monascin, xanthomonascin A

2014 年 Jo DJ 等人發表了有關於紅麴橙色素的含氮衍生物可抑制黑色素生成的文章，其中提到 glutamic acid 的衍生物對於 melanin-synthesis pathway 中的 tyrosinase 有 dose-dependent 的抑制效果。上述的研究成果，引起我們對紅麴色素與美白活性成份的開發的興趣，累積多年對藥用真菌的研究，擬定了針對紅麴二次代謝物作為粧品活性成分研發的系列計畫，尤其對於美白功能性的探討，聚焦為近期的研發重點。



由 Jo DJ 的報導，上圖紅麴色素的 glutamic acid (紅色部分) 衍生物，具有美白潛力。因此，本研究將聚焦於具有 azaphilone 核心結構的紅麴色素的含 N 衍生物與美白功能的探討。

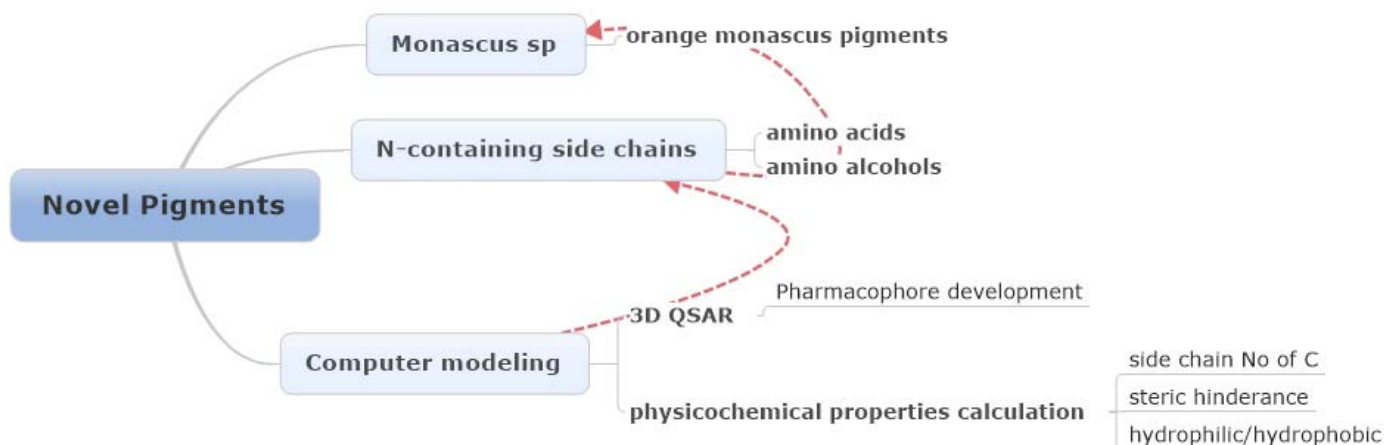
研究問題歸納為以下 3 個重點：

1. 利用理論計算(藥效團建立)推導最適當的含 N 側鏈
2. 由理論計算而得的含 N 側鏈，建立半合成方法，將紅麴色素轉換成為含氮衍生物
3. 提供紅麴色素含氮衍生物給子計畫三，進行生物活性評估與後續產品開發。

### (三) 研究方法與步驟

計畫中利用電腦理論計算與模擬對接方法，找出在理論中最適當的含 N 側鏈，半生合成出含 N 的紅麴橙色素衍生物，亦即新穎性的色素，作為美白化粧品之功能性成分，研究方法流程，如下圖所示。



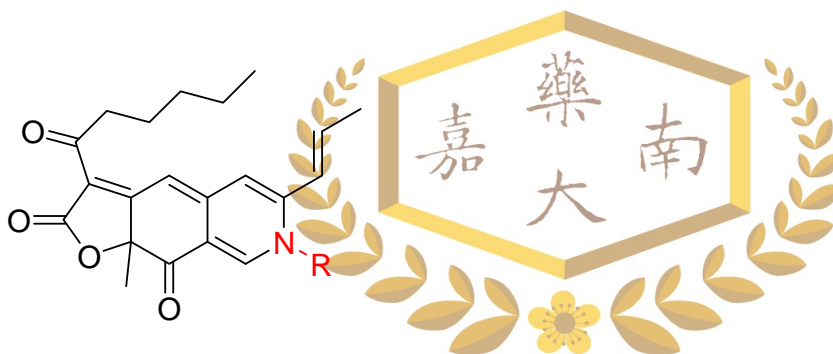


#### (四) 實驗結果及討論

1. **最適側鏈的理論計算與選擇**：本研究在市售的化學物中先選取適當的 amino acid，如 glutamic acid 等 17 種與 amino alcohol，如 2-amino-1-propanol 等 3 種，對這 20 種化合物進行理論探討，得到初步數據如下：

- (1) 圖型工作站：Intel® Xeon® CPU W3565@3.20GHz；RAM 20.0GB；windows 64 位元作業系統
- (2) 軟體：以 BIOVIA (Accelrys) Dicvovery Studio 2.5
- (3) 計算模組
  - a. Molecular Properties Calculation
  - b. Conformation--- Generate Conformation
  - c. Pharmacophore--- Common Feature Pharmacophore Generation
  - d. Pharmacophore--- Ligand Pharmacophore Mapping

選取 glutamic acid, leucine, tryptophan 等 3 種 amino acid 與 2-amino-4-picoline, theanine, 2-amino-1-propanol 等 3 種 amino alcohol，進行計算，結果如下：

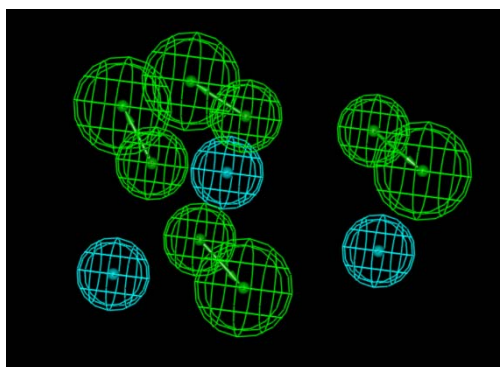


a. Molecular Properties

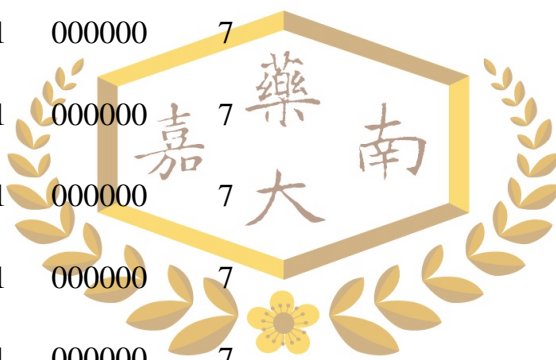
含 N 側鏈 R=	ALogP	MW	H acceptors	H donors	Rotatable bonds	Rings	Ar Rings	Molecular Fractional Polar Surface Area
glutamic acid	2.875	483.51	9	2	11	3	0	0.293
leucine	4.404	467.554	7	1	10	3	0	0.215
tryptophan	5.022	540.606	7	2	10	5	2	0.226
2-amino-4-picoline	4.134	444.522	6	0	7	4	1	0.175
theanine	2.802	510.579	8	2	12	3	0	0.256
2-amino-1-propanol	3.045	411.491	6	1	8	3	0	0.203

- b. Generate conformations: Conformation generation for 6 molecules yielded 1490 conformations. Average is 248.33 conformations per molecule.

c. Pharmacophore



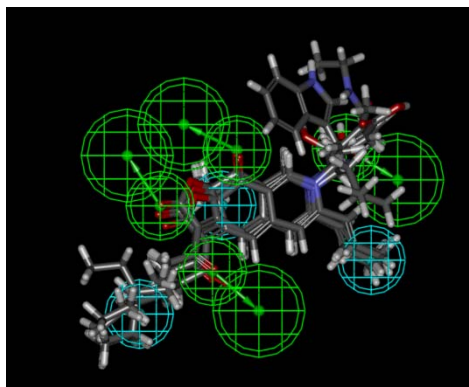
Features	Rank	Direct Hit	Partial Hit	Max Fit
01 HHHAAAA	107.417	111111	000000	7
02 HHHAAAA	106.211	111111	000000	7
03 HHHAAAA	105.539	111111	000000	7
04 HHHAAAA	105.539	111111	000000	7
05 HHHAAAA	105.292	111111	000000	7
06 HHHAAAA	104.943	111111	000000	7
07 HHHAAAA	103.112	111111	000000	7





08	HHHHAAA	102.994	111111	000000	7
09	HHHHAAA	99.995	111111	000000	7
10	HHAAAA	99.268	111111	000000	6

#### d. Ligand Pharmacophore Mapping

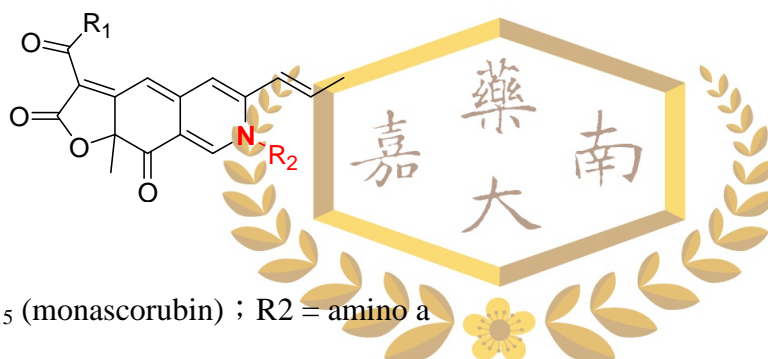


由化合物與藥效團模型對接後 fit value 與 relative energy 的理論值，挑選出最有潛力的側鏈，作為半合成的指引。

2. **具含 N 側鏈新穎性色素的半合成：**將理論計算中建議的 amino acid 或 amino alcohol 與紅麴橙色素 (molar ratio=1：1) 溶於乙醇，60 °C 加熱，可以得到預期的新穎性色素。

#### (五) 結論

1. 研究中以 commom feature pharmacophore generation 計算後得到 10 種 pharmacophoric hypothesis，其中 scoring 最高的是 HHHAAAA，具有 3 個 hydrophobic pharmacophore 以及 4 個 aromatic pharmacophore，以此藥效團模型，進行篩選，得到最佳的候選側鏈分子。
2. 經由本藥效團模型建議，以候選側鏈分子，進一步合成出具有含 N 衍生物的紅麴色素，結構式如下圖，進行化粧品功能性分析與提供化粧品開發。



R<sub>1</sub>= C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (rubropunctatin), C<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (monascorubin) ; R<sub>2</sub> = amino a

## 嘉南藥理大學 105 年度教師研究補助計畫成果報告

計畫類型	<input type="checkbox"/> 與業界廠商合作研究 <input checked="" type="checkbox"/> 重點研究 <input type="checkbox"/> 一般個人型研究				
本（子）計畫主持人	劉坤湘	單位	粧品系	職級	助理教授
聯絡電話	分機：2108		E-mail	sandraliu@mail.cnu.edu.tw	
本（子）計畫名稱	以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法之紅麴二次代謝物的化粧品功能性分析				
重點研究總計畫名稱	以物理性、生物性因子誘導及化學半合成方法探討紅麴二次代謝物於功能性化粧品之應用				
重點研究總計畫主持人	李冠漢	單位	藥學系	職級	教授
「與業界廠商合作研究計畫」填寫	廠商名稱				
	廠商出資金額				
執行期限 (核定公告日由研發處填寫)	自核定公告日起至民國 105 年 12 月 31 日止				



## 研究計畫內容

### (一) 摘要

紅麴菌 (*Monascus spp.*) 為我國、日本等亞洲國家使用歷史悠久的真菌，不僅具有特殊的風味，其所產生的紅麴色素，以往常被用於食品添加物。近年來科學分析發現紅麴色素另有更大的應用價值，應用於食品著色劑、紡織工業外，於醫學上貢獻卓著，例如抗菌、降膽固醇、抗氧化、抗發炎、抗癌等，可做為保健食品以及臨床用藥，因此利用培養方式的改變或是進行基因工程，使篩選出具有較高色素產量的菌株，成為紅麴菌研究的主流之一。紅麴色素多為 azaphilones 類化合物，基本上可分為黃色、橘色、紅色與無色四大類色素，除目前已知之生物活性外，尚無應用於化粧品之深入報導，開發紅麴色素應用於化粧品，成為可供努力的目標。本研究為整合型計畫之子計畫三，利用不同紅麴菌所產出之二次代謝物，分析其酪胺酸酶抑制分析，以評估開發為化粧品，例如具有美白功能的保養品的可行性。此計畫不僅可以增添紅麴菌的應用價值，同時呼應目前市場潮流之化粧品崇尚天然、環保等訴求，開發出新穎又有效的保養化粧品。

### (二) 研究動機與研究問題

近年來由於消費者對於化粧保養品知識的增長以及健康、環保的考量、生活品質的追求，化粧品市場的潮流崇尚自然，人們逐漸捨棄以化學合成物為主成分的化粧品，以天然物質中的有效成分取而代之；當中以植物來源取得最容易，對於環境的影響也較有利而少傷害。而以動物為來源的有效成分，如膠原蛋白、胎盤素等，則會有動物性傳染病的考量，以及飼養時對環境造成的負面影響。近年研究發現真菌中的二次代謝物，如麴酸，由於美白效果甚佳，已應用於化粧保養品，因此真菌代謝物亦躍升為化粧保養品的來源成為新興主流之一。但基於對大環境是否造成傷害的嚴肅話題，以及對小環境如使用者的安全性與有效性，這些想要應用於美白化粧保養品的成分，在可以藉由電腦模擬化合物結構、利用半合成的方式由真菌工廠執行修飾原有的代謝物結構而獲得新穎物質，或是藉由培養條件的改變、與植物進行生物轉化而增加有效成分、甚至獲得新穎物質，對於化粧保養品的開發應用，均是嶄新的概念與做法。紅麴為我國、日本等亞洲國家使用歷史悠久的真菌，不僅具有特殊的風味，其所產生的紅麴色素，以往用於食品添加物、抗菌、降膽固醇、抗氧化、抗發炎、抗癌等，做為保健食品以及臨床用藥，對於化粧品的應用與開發，至今仍是未被探討的研究領域。

本計畫的主要目的，是以物理性因子（經電腦模擬後可添加特定化合物於紅麴菌中）、生物性因子誘導（與植物共培養進行生物轉化）所產生的紅麴菌二次代謝產物，進行各項抗黑色素生成的分析檢測，以評估開發為美白化粧品原料的應用性。藉由酪胺酸酶抑制分析的檢測模式，建立一個可信度高的分析方法，並可將此一真菌增加經濟上的價值與開發新的化粧品保養品。未來可進一步進行調劑與有效性、安全性測試，開發為實際產品。

### (三) 研究方法與步驟

#### 1. 紅麴菌固態菌絲體之培養

本實驗所採用的紅麴菌株購自食品工業研究發展所生物資源中心 (Bioresources Collection and Research Center, BCRC)。將紅麴菌絲體培養於 M25 固態平面培養盤中 (M25 培養基組成為 malt extract 2%、glucose 2%、bacto-peptone 0.1%、bacto-agar 2%)，放置於 25°C，避光靜置培養。

#### 2. 紅麴菌固態培養之二次代謝物萃取

將甲醇加入紅麴菌固態培養皿，連同培養基切碎放入燒杯，再加入甲醇蓋過培養基，以超音波震盪培養箱震盪一小時後用抽氣過濾將菌絲過濾，再加入甲醇震盪一小時並過濾，合併兩次甲醇萃取液以濃縮機濃縮，減少體積，再加入去離子水以及等量的乙酸乙酯進行萃取，搖晃後靜置，以等量乙酸乙酯萃取兩次，合併有機層。將濃縮乾燥後的萃取物以乙酸乙酯回溶至試管中，以快速濃縮系統濃縮至乾，稱重後扣除空試管重，即為萃取物之重量。

#### 3. 活體外酪胺酸酶活性抑制分析

用以測定樣品對由蘑菇萃取出的酪胺酸酶活性之影響，初步評估其美白功效。首先加入 250  $\mu$ l 的蘑菇酪胺酸酶水溶液 (135 U/ml)、250  $\mu$ l 的測試樣品及 250  $\mu$ l 的 0.03% L-DOPA 溶液 (溶於 50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 6.5)，混合均勻，於 25°C 黑暗中反應 90 分鐘後，利用分光光度計於 415 nm 波長下測定吸光值，並計算 dopachrome 的產量。以麴酸 (kojic acid) 做為正向對照組。

### (四) 實驗結果及討論

#### 1. 紅麴菌固態培養之菌絲體形態—

在 25°C 避光環境進行固態培養，Mp1 的型態呈現蓬鬆的白色，且於 30 天後生長接近滿盤；





而 Mp2 的型態則呈現蓬鬆的酒紅色，約需 60 天才可成長接近滿盤，但詳細原因並不清楚。  
實驗結果如圖 1A 及 B。

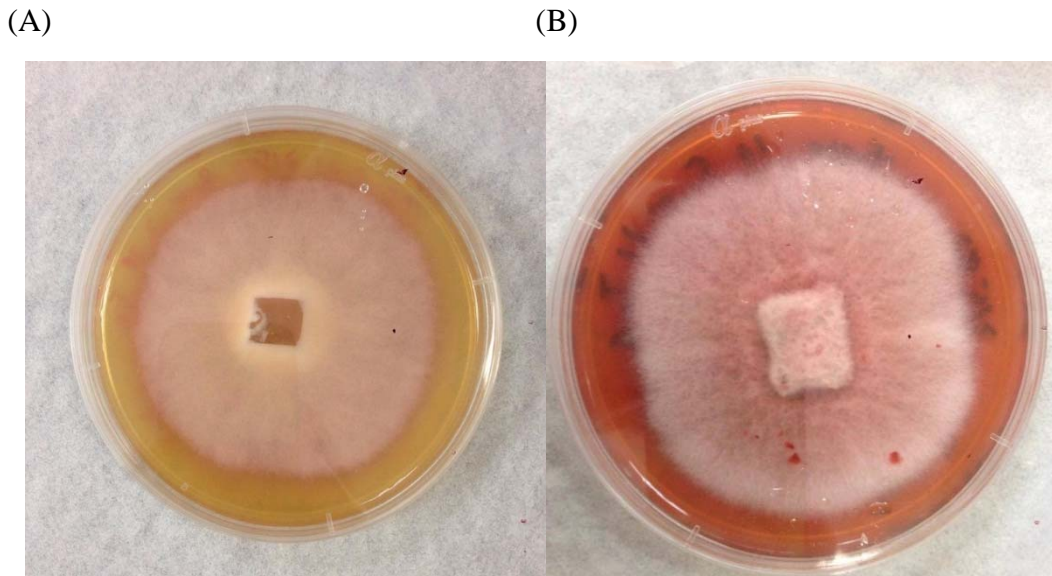


圖 1. Mp1 (A) 及 Mp2 (B) 菌絲體型態。

## 2. 紅麴菌固態培養之菌絲體形態—

兩種紅麴菌分別用甲醇和乙酸乙酯進行萃取後，最後使用 DMSO 回溶成原始濃度為 20 mg/ml，進行高效能液相層析 (high performance liquid chromatography) 分析，分析結果見圖 2A 及 B。  
自該結果觀察可知，Mp1 及 Mp2 除固態培養之菌絲體外觀相當不同之外，所產生之二次代謝物之種類與產量亦有極大差異。

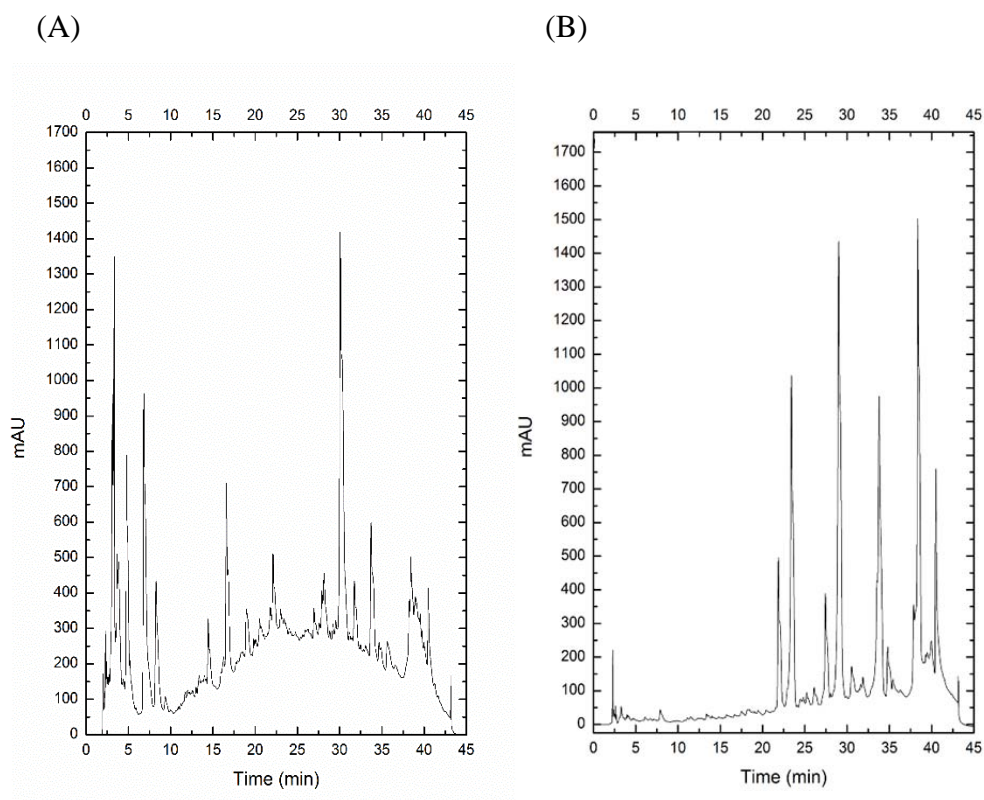


圖 2. Mp1 (A) 及 Mp2 (B) 二次代謝物之 HPLC 分析結果。



### 3. 酪胺酸酶抑制率－

以麴酸當做對照組，Mp1 與 Mp2 二次代謝物為實驗組。分別加入含 tyrosinase 緩衝溶液，再加入 L-DOPA 反應之後，以酵素免疫分析儀測定波長 475 nm 下之吸光值並予以量化後，計算其抑制率。實驗結果發現 Mp2 二次代謝物於最終濃度 2.5 mg/mL 時對於酪胺酸酶抑制率約可達 40%，最終濃度 5.0 mg/mL 時對於酪胺酸酶抑制率約可達 70%。Mp1 二次代謝物於上述濃度下可能由於濃度過高，無法測得抑制率，未來將再行稀釋之後進行較精確之檢測。

## (五) 結論

1. Mp1與Mp2不僅菌絲外觀不同，其所產生之二次代謝物種類與產量亦有極大差異。
2. Mp2二次代謝物初推測具有酪胺酸酶抑制效果，抑制之機制以及對於細胞內酪胺酸酶抑制效果則需進一步分析；或可做為未來將紅麴菌二次代謝物應用於美白化粧品的參考。

