

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检测模式，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之酪胺酸酶活性之影響，初步評估其美白功效。首先加入 250 μ l 的蘑菇酪胺酸酶水溶液 (135 U/ml)、250 μ l 的測試樣品及 250 μ 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。

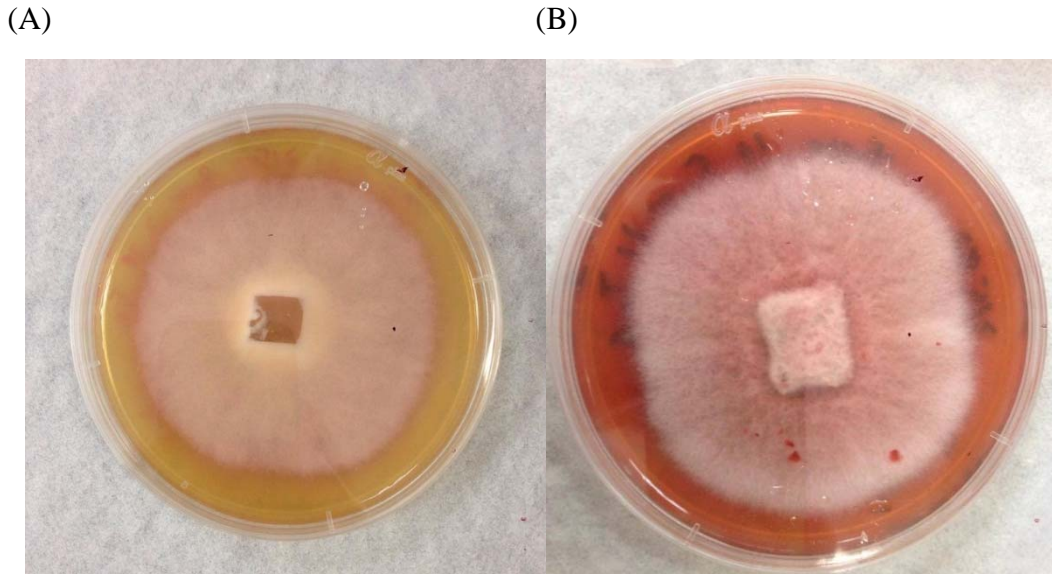


圖 1. Mp1 (A) 及 Mp2 (B) 菌絲體型態。

2. 紅麴菌固態培養之菌絲體形態一

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。

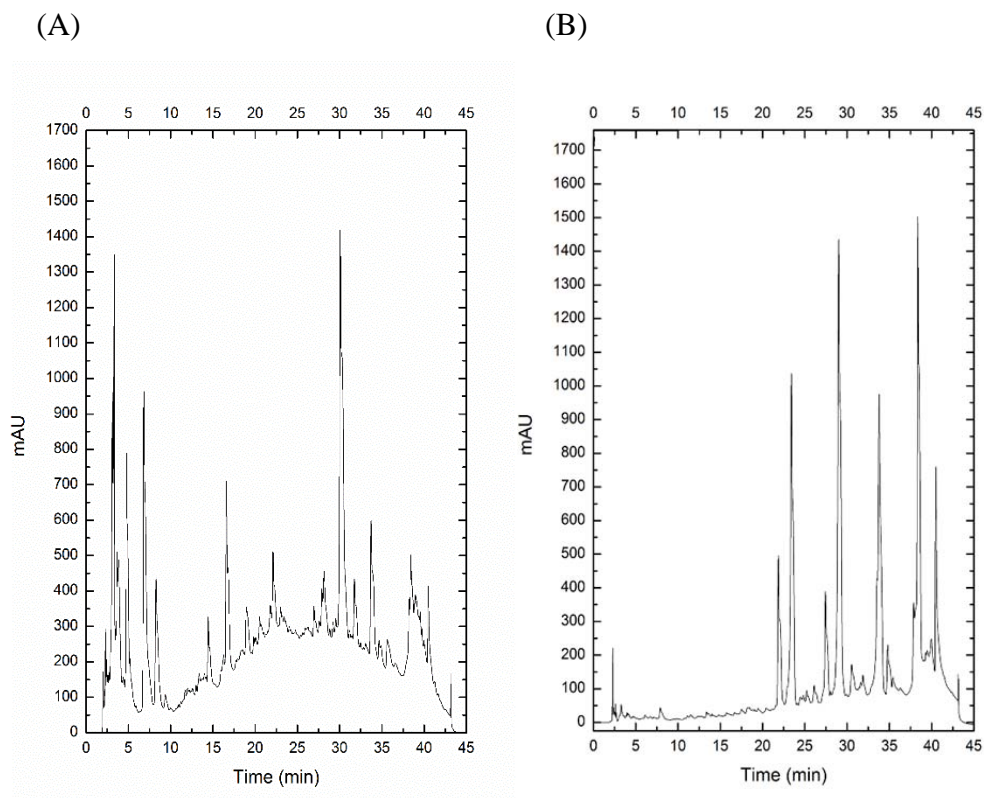


圖 2. Mp1 (A) 及 Mp2 (B) 二次代謝物之 HPLC 分析結果。

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。

