

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

## 蕃茄酪氨酸酶抑制劑之探討

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

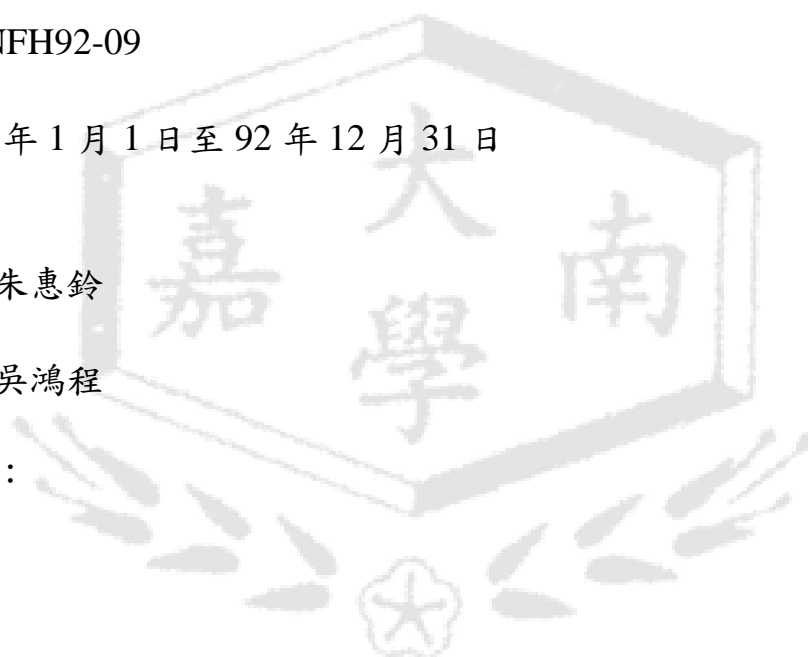
計畫編號：CNFH92-09

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 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：



執行單位：食品科技系

中華民國 93 年 2 月 26 日

# 專題研究計畫成果報告

## 蕃茄酪氨酸酶抑制劑之探討

### 一、中文摘要

本實驗所利用之酪氨酸酶抑制劑是由蕃茄（學名 *Lycopersicon esculentum* Mill）直接以水萃取出，所萃取出蕃茄酪氨酸酶粗抽液在  $-18^{\circ}\text{C}$  及  $4^{\circ}\text{C}$  儲存六個月後，其相對殘留抑制活性分別為 80%、70%，該蕃茄酪氨酸酶抑制劑粗抽液再經由 Sephadex G-25 管柱層析進行純化步驟，收集抑制劑活性部分以進行冷凍乾燥濃縮，而半抑制濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 為 2.46mg/ml。

以 Superdex peptide HR 管柱層析測量此酪氨酸酶抑制劑的分子量約為 0.2KDa；此抑制劑和酪氨酸酶作用 0 分鐘時的抑制活性為 0%，而抑制效果最佳達 100% 時是在作用了 5 小時後，為緩慢結外型。蕃茄酪氨酸酶抑制劑之最適作用溫度為  $50^{\circ}\text{C}$ 、最適作用酸鹼值為 pH4 到 pH5 之間，而在 pH4 到 pH9 之間都很穩定。在動力學方面，以 L-DOPA 當基質時，蕃茄酪氨酸酶抑制劑屬於 mix type 抑制作用。根據 Molish, Barford's, Seliwanoff's, Schiff's 和 Ninhydrin 試驗皆為正反應，於 TLC 試驗中蕃茄酪氨酸酶抑制劑與醣苷類呈色劑結合，推測出蕃茄酪氨酸酶抑制劑中可能為醣苷化合物。

### Abstract

The tyrosinase inhibitor from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) was extracted by water. The inhibitor was then stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$ , the relative inhibition activity of tyrosinase were 80% and 70% after 6 month storage, respectively. The tyrosinase inhibitor was partially purified with Sephadex G-25 column chromatography. The  $\text{IC}_{50}$  of partially purified tyrosinase inhibitor from tomato was 2.46 mg/ml.

The molecular mass of tyrosinase inhibitor was 0.2 KDa examined by Superdex Peptide HR column. The inhibition activity of tyrosinase was 0 % when preincubated with the inhibitor for 0 minute, while 100% for 5 hour,

indicating a slow binding behavior. The optimal temperature of the inhibition activity of tyrosinase treated with the inhibitor was  $50^{\circ}\text{C}$ ; optimal pH was 4-5. The inhibitor was stable at pH4-9. A kinetic analysis show that the inhibitor is a mixed type inhibitor using L-DOPA as substrate. The tyrosinase inhibitor from tomato was probably a glycosidyl compound, according to the positive reaction with Molish, Barford's, Seliwanoff's, Schiff's and Ninhydrin, TLC test.

**Keywords:** tyrosinase inhibitor, tomato, partially purify,

### 二、緣由與目的

由於酪氨酸酶 (monophenol, *o*-diphenol-oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1) 為黑色素生成之關鍵酵素，酪氨酸酶又稱多酚氧化酶，為一種含銅酵素 (Sanchez-Ferrer, 1995)，不僅對蔬果、穀類外觀有顯著影響，且降低了食品品質及價值 (Friedman M., 1996)，於人類若生理失調或過量紫外線作用會造成黑色素生產過多，使皮膚暗沉或生成雀斑、黑斑 (Jae Kyung No, 1999)，更嚴重的話形成黑變病或惡性黑色素腫瘤皮膚癌 (C. Murray et al., 1999)，而酪氨酸酶抑制劑可調控黑色素之生成，進而解決此問題，所以近年常使用人工合成之二氧化硫，其安全性受質疑，故由天然物中萃取出酪氨酸酶抑制劑乃蔚為風潮 (靈芝酪氨酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)、檸檬皮 ppo 抑制劑 (Chu, 2001))。本實驗採用蕃茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) --- 台灣大宗農產品，其近五年來產量均在九千萬公斤 (行政院農業委員會, <http://www.coa.gov.tw/>) 不僅市場上容易取得，價格合理且市場供需量大，也是一般家庭所不可或缺之食材。蕃茄又名西紅柿，本省俗稱柑仔蜜，屬茄科，蕃茄屬 (丘應模, 1988)，本實

驗由蕃茄中萃取酪胺酸酶抑制劑研究探討其最適純化分離條件、及其抑制劑生化特性。期望日後能將其運用在食品、化妝品、控制黑色素腫瘤及植物組織培養褐變之防止等功效上。

### 三、結果與討論

蕃茄粗抽液經冷凍濃縮回溶後，取 3ml 注入 Sephadex G-25 以膠過濾管柱層析分離，測 A220 及 A475 收集具有抑制活性部份 (45~60 管；如圖一)，再進行冷凍濃縮，經回溶後，進行下列生化特性之探討。

#### 1. 最適時間 Preincubation time :

依方法 (5-a) 所提進行最適時間探討，結果如圖二，最適時間會隨著時間延長，抑制作用越好，0 分鐘時無抑制作用，60 分鐘抑制活性為 86.87%，5 小時後抑制活性可達 100%，屬於緩慢結合型。也屬於緩慢結合型的還有文獻上已知的麴酸 (Cabanes.J, 1994)、4-substituted resorcinols (Jimenez.J, 1997)、tropolone (Espin.J.C., 1999; Edelmira Valero, 1991)、dimethyl sulfide (Perez-gilabert.M., 2001)、靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)、蘆筍酪胺酸酶抑制劑 (廖珮瑩, 2003)。蜂蜜達到 30 分鐘後抑制活性即達到最高 (Jan Oszmianski, 1990)；4-HR (4-hexylresorcinols) 對蝦的酪胺酸酶不同的異構酶形式：F1、F2、F3，而 F1 並不會時間的作用而受到影響，而 F2、F3 則會隨著作用時間增加，抑制活性越強。Cabanes. 等人使用麴酸抑制老鼠上皮的酪胺酸酶做研究，而麴酸屬於慢速結合作用，Cabanes. 等人認為麴酸本身結構有氧基和羥基，介於基質 (雙酚) 和產物 (*o*-quinone) 之間，需要有一段時間才能結合酵素。麴酸、4-substituted resorcinols、tropolone Edelmira Valero、dimethyl sulfide 慢速結合的機制於報告中推測它們並不是跟酪胺酸酶的 met 形式作用，而是作用在酪胺酸酶的 oxy 形式。

#### 2. 最適溫度 Preincubation temperature :

依方法 (5-b) 所提進行最適溫度探討，結果如圖三，最適溫度在 4°C 時抑制活性為 80%，50°C 時抑制活性為 95%，實驗反應在此兩個

溫度下都有極好的作用反應，但以 50°C 反應較佳。而麴酸與洋菇、馬鈴薯、蘋果和龍蝦的酪胺酸酶於 4°C、25°C 和 37°C 下反應並不受溫度影響 (Chen.et al., 1991)；而 4-HR 對蝦的酪胺酸酶於 4°C、25°C 和 37°C 下反應也不受溫度影響 (葉美嬌, 1994)；而檸檬皮 ppo 抑制劑 (Chu., 2001) 對洋菇的酪胺酸酶於 4°C、10°C、20°C 和 37°C 下反應，以 37°C 抑制活性最高，靈芝酪胺酸酶抑制劑在 45-50°C 下反應最高 (陳彥瑾, 2003)；蕃茄酪胺酸酶抑制劑和靈芝酪胺酸酶抑制劑同樣都是在溫度較高環境下抑制活性較佳。

3. 最適酸鹼值 Preincubation pH: 依方法 (所提進行最適酸鹼值探討，結果如圖四，蕃茄酪胺酸酶抑制劑最適酸鹼值為 4~5。在 pH4~5 反應最佳，隨後逐次遞減，在 pH9 時活性最低。靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)；和檸檬皮 ppo 抑制劑 (Chu., 2001)、4-HR 對蝦的酪胺酸酶 (葉美嬌, 1994)，與蕃茄酪胺酸酶抑制劑相同在 pH5 抑制效果較佳。

#### 4. 酸鹼值穩定性 pH stability :

依方法 (5-d) 所提進行酸鹼值穩定性探討，結果如圖五，蕃茄酪胺酸酶抑制劑在 pH4~9 間，都很穩定。可推測蕃茄酪胺酸酶抑制劑在任何不同 pH 值下，都可不受影響。文獻上靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003) 與蕃茄酪胺酸酶抑制劑均可不受到影響。

#### 5. 對銅的還原作用 :

依方法 (5-e) 所提進行對銅的還原作用探討，結果如圖六，酪胺酸酶的活性中心為銅離子，此實驗是在探討蕃茄酪胺酸酶抑制劑對銅離子是否有還原力。因 bathocuprinedisulfonic acid 會與  $\text{Cu}^+$  形成紅色複合物 ( $\text{Cu}^+$  - bathocuprinedisulfonate)，而此紅色複合物最大吸光值 483nm。如圖所示，抑制劑加入濃度愈高，其吸光值愈高，因此可證明蕃茄酪胺酸酶抑制劑具有將  $\text{Cu}^{2+}$  還原成  $\text{Cu}^+$  的能力。文獻靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)、檸檬皮 ppo 抑制劑 (Chu., 1991)、4-HR 對蝦的酪胺酸酶 (葉美嬌, 1994)、麴酸

(Cabanes.J, 1994)和蘆筍酪胺酸酶抑制劑(廖珮瑩, 2003),也都具有將  $\text{Cu}^{2+}$  還原成  $\text{Cu}^+$  的能力。

#### 6. *o*-dopaquinone product 之測定:

依方法 (5-f) 所提進行 *o*-dopaquinone product 之測定探討,結果如圖七,利用分光光度計掃描 200~700nm 之波長,因酪胺酸酶與 L-DOPA 作用形成中間產物 *o*-dopachrome,此物質最大波長為 475nm,添加抑制劑後,中間產物 *o*-dopachrome 會減少,隨著抑制劑濃度愈高,中間產物 *o*-dopachrome 也會隨著減少。

*o*-dopachrome 和蕃茄酪胺酸酶抑制劑形成不具顏色之複合物,而抑制黑色素生成。例如: captopril 抑制洋菇酪胺酸酶 (Espin, 2001)、4-HR 對蝦的酪胺酸酶 (葉美嬌, 1994) 和蘆筍酪胺酸酶抑制劑 (廖珮瑩, 2003)、靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003),它們抑制酵素的機制也是會與 *o*-dopaquinone 結合的抑制劑。

#### 7. 動力學:

依方法 (5-g) 所提進行動力學探討,結果如圖八,以 L-DOPA 為基質,不同濃度抑制劑和不同濃度的 L-DOPA 作用,所得的反應常數之倒數,抑制劑型態依據 Lineweaver-Burk Plot,將基質和抑制劑濃度倒數後求得其抑制劑作用形式為 mix-type 抑制作用形式。例如:靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)、蘆筍酪胺酸酶抑制劑 (廖珮瑩, 2003),也是 mix-type 抑制作用形式。

#### 8. 分子量測定:

依方法 (5-h) 所提進行分子量測定探討,利用 Superdex Peptide HR 管柱進行分子量測試,流速 0.5 ml/min,每一管收 0.5ml。標準品為 Insulin (MW5800)、VitB12 (MW1355)、L-DOPA (MW197)、Kojic acid (142)。以分液收集器收集後使用分光光度計測 A220 或 A280。以  $K_{av}$  為橫軸,log 分子量為縱軸做線性回歸圖。酪胺酸酶抑制劑經純化後進行 Superdex Peptide HR 管柱分離,收集後使用分光光度計測 A475、A220,取相對抑制活性最高部份代入線性回歸公式,公式為

$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ ;  $K_{av}$ : 樣品溶離程度指標,  $V_e$ : 樣品分子,  $V_o$ : 其中流動相的體積,  $V_t$ : 膠體總體積, 蕃茄酪胺酸酶抑制劑

$K_{av} = 0.6569$ , 求的蕃茄酪胺酸酶抑制劑分子量約為 0.2kDa。

(a) 蕃茄酪胺酸酶抑制劑之成份鑑定:

(I) Ninhydrin Reaction:

依方法 (6-A-i) 所提進行 Ninhydrin Reaction 探討,結果如圖九,本試驗針對具有  $\alpha$ -胺基及羧基之胺基酸或蛋白質進行反應,  $\alpha$ -胺基與氧化態 Ninhydrin

(2,2-dihydroxy-1,3-indanedione) 在微酸性或中性條件下,經由氧化、水解、脫羧等反應生成還原態 Ninhydrin; aldehyrin、 $\text{NH}_3$  及  $\text{CO}_2$ , 接著還原態 Ninhydrin 及  $\text{NH}_3$  會與試劑中過量的氧化態 Ninhydrin 形成一種帶有紫紅色 (或藍色) 的衍生物,對於 proline 與 hydroxy-proline 之呈色較不同 (黃色), 氫及一級胺類亦可呈色,但無  $\text{CO}_2$  形成。蕃茄酪胺酸酶抑制劑與 Ninhydrin 試劑形成帶有紫紅色衍生物,並隨著濃度的增加,吸光值越高,推測抑制劑結構可能含有胺基結構。文獻上相同的還有靈芝酪胺酸酶抑制劑 (陳彥瑾, 2003)、蘆筍酪胺酸酶抑制劑 (廖珮瑩, 2003)。

(ii) Xanthoproteic Test:

依方法 (6-A-ii) 所提進行 Xanthoproteic Test 探討,結果如表一,本試驗針對含有苯基

( $-\text{C}_6\text{H}_5$ ) 之芳香族胺基酸進行硝化反應,主要是利用  $\text{HNO}_3$  會與苯基發生作用,結果在芳香環的 ortho-或 para-位置發生硝化反應進而形成黃色硝基苯衍生物 (於酸性下呈黃色;鹼性下呈橘紅色)。Tyrosinase 反應後呈現黃色 (正反應), 蕃茄酪胺酸酶抑制劑與  $\text{Conc.HNO}_3$  並無黃色衍生物,推測抑制劑結構可能無環狀結構。

(b) 醣質測試:

(a) Molish's Test:

依方法 (6-B-a) 所提進行 Molish's Test 探討,鑑定是否含有醣基反應,結果如表二。加無機酸 (mineral acid : 例如  $\text{Conc.H}_2\text{SO}_4$ ) 於醣類

溶液中可使醣脫水產生 furfural 或其他衍生物，此等脫水產物再與  $\alpha$ -naphthol 或 thymol 等酚族化合物作用可產生紅紫色物質。蕃茄酪胺酸酶抑制劑反應呈色為紅紫色，所以推測可能含有醣基。文獻上相同的還有蘆筍酪胺酸酶抑制劑（廖珮瑩，2003）。

#### (b) Barfoed's Test :

依方法 (6-B-b) 所提進行 Barfoed's Test 探討鑑定單、雙醣反應，結果如表三，一般單醣在 5~7 分鐘內有顯著紅色沉澱反應，雙醣在 7~12 分鐘內會有顯著沉澱，這是因為在酸性溶液下，雙醣者反應速率很慢，所以可以用來鑑定單、雙醣。蕃茄酪胺酸酶抑制劑在 5~7 分鐘內有紅色沉澱反應，推測其為單醣結構。而文獻蘆筍酪胺酸酶抑制劑（廖珮瑩，2003）7 分鐘後有明顯藍色沉澱，推測其為雙醣反應。

#### (c) Seliwanoff's Test :

依方法 (6-B-c) 所提進行 Seliwanoff's Test 探討鑑定，結果如表四，酮醣 (Ketose) 在加入 Seliwanoff's 試劑後，煮沸 0.5~1 分鐘即有鮮明的紅色出現，而醛醣 (Aldose) 則在煮沸 15~30 分鐘後，才慢慢地有紅色呈現，鑑定是否為酮醣試驗。蕃茄酪胺酸酶抑制劑與 Seliwanoff's 試劑反應 15 分鐘內產生紅色反應，推測抑制劑結構可能為酮醣。而文獻靈芝酪胺酸酶抑制劑（陳彥瑾，2003）並無此反應。

#### (d) Schiff's Test :

依方法 (6-B-d) 所提進行 Schiff's Test 探討鑑定，結果如表五，此法為鑑定五碳醣、六碳醣，利用五碳醣 (pentose) 與鹽酸共熱，會脫水形成 Furfural，此化合物具有揮發性，揮發同時會與上方乙酸苯胺試紙作用，產生紅色化合物；而六碳醣 (hexose) 與鹽酸共熱脫水形成 Hydroxymethyl furfural，此化合物不具揮發性，會進一步分解成類糊精糖酸 (levulinic acid)、CO、CO<sub>2</sub> 及甲酸等，具有黑色聚合物產生。蕃茄酪胺酸酶抑制劑反應呈色為紅色，推測抑制劑結構可能為五碳醣。

#### (e) EDTA 金屬測定 :

依方法 (6-B-e) 所提進行 EDTA 金屬測定，鑑定蕃茄酪胺酸酶抑制劑與 5mM EDTA 試劑

反應，測分光光度計 A475，實驗組與對照組比較下，酪胺酸酶抑制活性不受顯影響，推測抑制劑內不含金屬離子。

#### (f) 薄層色層層析法 (Thin-Layer Chromatography, TLC) :

依方法 (6-B-f) 所提進行薄層色層層析法探討鑑定，結果如圖十。TLC 屬於分配層析方式，即是試樣在移動相和固定相間的分配率不同而分離，再計算其 Rf 值： $a/b = \text{溶質移動距離} / \text{溶媒 (劑) 移動距離}$ 。蕃茄酪胺酸酶抑制劑經 TLC 有分離出，且計算其 Rf 值為  $=6.5/7.7=0.844$

#### 四、謝辭

感謝本校校長王昭雄博士於研究經費及實驗環境之支持使得實驗得以順利進行。

#### 五、參考文獻

1. 朱惠鈴、蝦頭酪胺酸酶之分子特性、碩士論文、國立海洋大學水產食品科學研究所、1988
2. 葉美嬌、蝦酪胺酸酶抑制劑之研究、碩士論文、國立海洋大學水產食品科學研究所、1994
3. 陳彥瑾、靈芝酪胺酸酶抑制劑之特性、碩士論文、嘉南藥理科技大學生物科技研究所、2003
4. 朱惠鈴、檸檬多酚氧化酶抑制劑、嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告、2001
5. No.J.K、Soung D.Y、and Kim.Y.J、Inhibition of tyrosinase by green tea components、Life Sciences Including Pharmacology Letters、65、241-2461、1999
6. S.O.Farrell、M.K.Campbell、Biochemistry、Fourth Edition
7. Sanchez-Ferrer、A、Tyrosinase : A comprehensive review of its mechanism、Biochim.Biophys.Acta、1247、1-11、1995
8. 楊濟華、部分中草藥美白與防曬成分研究、碩士論文、靜宜大學應用化學研究所、1996

9.葉東柏、生物化學精要、藝軒圖書出版社、1996

10.N.H.Shin.、S.Y.Ryu.、E.J.Chol.、S.H.Kang.、Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase、Biochemical and Biophysical Research Communications 243, 801-803、1998

11.H.C.Wu.、H.L.Chu.、J.M.Kuo.、J.F.Shaw.、The immobilization of tyrosinase on chitosan by multiple point attachment、Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society (August、1998) 36 (4) : 425-432

12.J.C.Espin.、H.J.Wichers、Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro、Biochimica et Biophysica Acta 1544 (2001) 289-300

13.H.L.Chu.、J.M.Kuo.、J.F.Shaw.、The biochemical properties of polyphenol oxidase from banana leaf、Bot. Bull.Acad.Sin (1993) 34 : 169-174

14.Heuy-Ling Chu、Production of L-Dopa by banana leaf polyphenol oxidase、Bot. Bull.Acad.Sin (1993) 34 : 57-60

15.M.Perez-Gilbert、F.Garcia Carmona、Characterization of Catecholase and Cresolase Actiuties of Eggplant Polyphenol Oxidase、J. Agric.Food.Chem. (2000) 48.695-700

16.李建武、余瑞元、陳麗蓉、陳雅蕙、陳來同、袁明秀、生物化學實驗原理和方法、第一版、藝軒出版社、(2000)

G-25

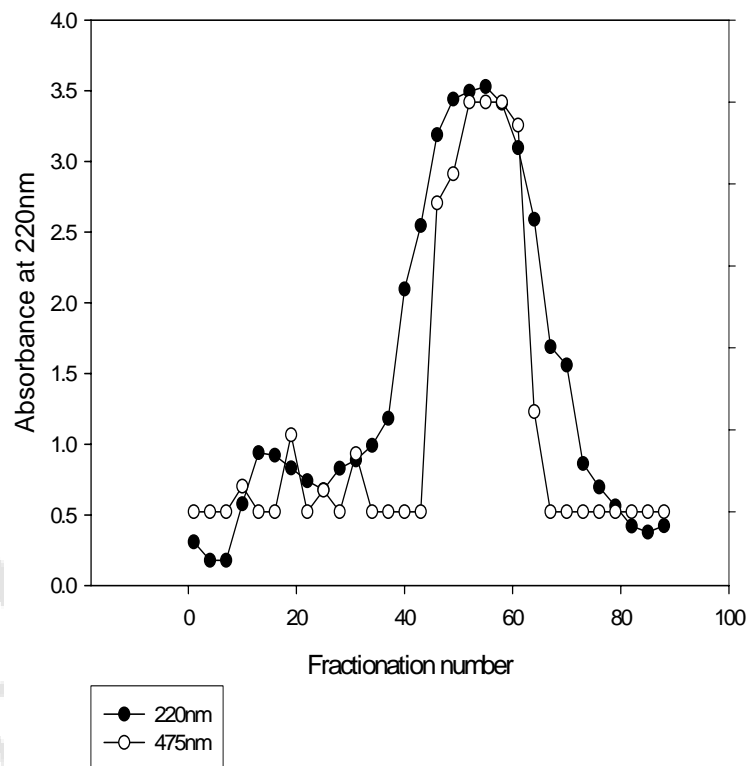
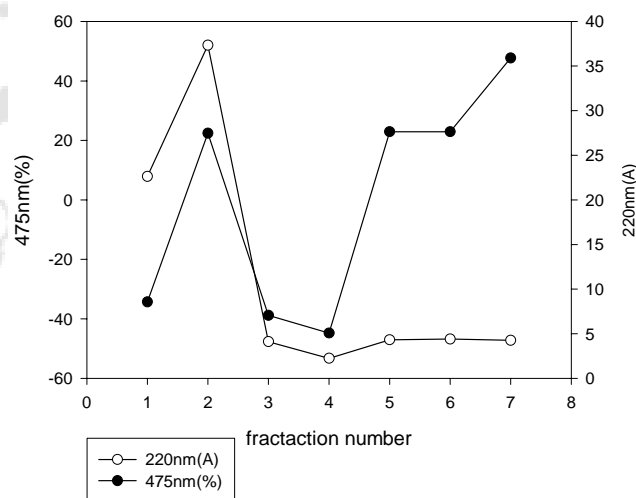


Fig. Elution profile of tyrosinase inhibitor from tomato on Sephadex gel column.

2D Graph 1



0822BLANK

