

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

黑色素之生產與應用

Production and application of melanin

計畫編號：NSC90-2626-B-041-005

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：林清宮 嘉南藥理科技大學化粧品系

一、中文摘要

本計畫擬利用微生物及其他技術開發黑色素作為防曬及染髮原料。在微生物生產黑色素方面，本計畫利用鏈黴菌進行酪胺酸酵素之表現以合成黑色素，本實驗室已完成黑色素生成之技術開發。為了有效降低成本，我們成功地由DOPA氧化成黑色素，初期由此方法而得到黑色素，顆粒較大，經過方法改進後，所得到的黑色素顆粒小於0.22 μm ，進一步將黑色素應用於防曬與染髮劑等化粧品均有相當好之效果，國內知名廠商極有興趣共同開發此類產品，因此本計畫成果相當具有產業價值。

二、緣由與目的

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。

紫外線依波長長短分為紫外線A (UVA, 400~320 nm), 紫外線B (UVB, 320~280或290 nm), 紫外線C (UVC, 280或290~230 nm), 其中 UVC可被大氣層濾掉，目前暫時無威脅性。而UVB及UVA則依波長不同而有不同傷害。紫外線波長在UVB範圍內大約300 nm左右可穿透皮膚角質層及表皮層，其能量可引起嚴重的曬傷或紅斑(Erythema)。而波長大於300 nm的紫外線可穿透皮膚的真皮層，因此可刺激黑色素細胞產生黑色素，造成皮膚色澤變化。

防曬成分依照作用機轉可分為化學性及物理性兩大類，目前市售防曬化粧品常用的化學性防曬成分為Para-aminobenzoate (PABA) 衍生物、Salicylates、Cinnamates、Benzophenone、Anthranilate等，其主要的作用是吸收紫外線；而物理性防曬常用的成分為Titanium dioxide (TiO_2), Zinc oxide (ZnO) 等，此類成分可同時反射UVA及UVB。傳統上化學性防曬主要吸收能引起曬傷或起紅斑的紫外線(波長280, 290~320nm)，例如 Salicylates、Cinnamates及 Para-aminobenzoate (PABA) 衍生物等，這些成分目前使用相當普遍。完整

的紫外線隔離亦需要UVA防曬成分，常使用的成分為 Benzophenone、Anthranilate 等，這些成分可吸收波長大於 320 nm 的有害紫外線。物理性防曬成分對皮膚較無刺激性，所以適合兒童及嬰兒使用，不過市售防曬化粧品中單純使用物理性防曬成分者仍在少數，因為需要加入的量較多且不易溶解，因此大多數是與化學性防曬成分混合使用以提高產品的SPF值及增加產品對UVA的阻隔效果。黑色素因為具有吸收UVA及UVB的效果，因此極有潛力利用於防曬產品。

染髮劑使用黑色素可使用黑色素前驅物 DHICA (5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid)，但是DHICA相當昂貴且不安定，因此其方法並不實用。本計畫擬採用酪胺酸(tyrosine)及DOPA作為黑色素產生之起始物，目前本實驗室在此方面技術已成熟，因此進一步評估以黑色素為原料之毛髮染髮劑之可行性。

二、材料及方法

(1). 材料與設備:

質體: pIJ702

菌種: *Streptomyces lividans* (ATCC 35287)

紫外線光譜儀: Spectrophotometer

色澤計: Minolta Spectrophotometer CM-508i

雷射粒徑分布儀

(2). 研究方法

1. 黑色素的製備
2. 黑色素在防曬化粧品的應用：
 - a. 含黑色素防曬化粧品的製備
 - b. SPF值測定
 - c. 皮膚色澤的測定
3. 黑色素在染髮劑的應用：

三、結果與討論

本計畫擬在 *in vitro* 中利用改變反應條

件方式(改變起始物種類、反應pH值等)，獲得黑色素，再以不同孔徑之濾紙過濾後，以分光光度計、Eliza讀值機及雷射粒徑分布儀測量濾液中之黑色素，所得到黑色素在室溫置放一年，其效果依然存在，穩定性相當高。

為了探討黑色素在防曬化粧品之應用可行性，我們將不同濃度之黑色素加入含TiO₂之防曬化粧品中，結果顯示黑色素可明顯提升產品之SPF值(圖一)。若將黑色素加熱50°C不同時間，結果顯示加熱並不會影響其SPF值(圖二)。

為了評估產品對皮膚色澤的影響程度，我們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(2mg/cm²)，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，結果顯示其L*a*b*值並無明顯差異(如圖三)，因此可見產品對皮膚色澤不會產生不良的影響。

為了探討黑色素染髮劑對毛髮色澤的作用程度，本計畫擬對自願者提供之白頭髮進行黑色素染髮試驗。首先測定未染髮前頭髮色澤L.a.b.值測定，然後分別以不同黑色素染髮劑進行染髮，經過清洗風乾後比較毛髮色澤L.a.b.值變化。色澤變化是利用色澤計進行檢測，方法是以Minolta色澤計測定。由色澤計可看出L值明顯降低顯示含黑色素染髮劑具有很好之上色效果(圖四)，另以肉眼、解剖顯微鏡等檢視均得到類似結果，此上色效果相當持久，即使經過反覆清洗，仍然不會改變其顏色(data not shown)。

本計畫已完成黑色素生產條件的建立，黑色素顆粒小於0.22μm，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。目前市面上的防曬化粧品種類

繁多，且在先前實驗結果顯示黑色素之UVA及UVB吸收能力極佳，在搭配物理性防曬成份可加強其效力。因此黑色素已具備防曬乳液添加之條件，只是其外觀略呈現灰色，不過人體塗抹後，經過皮膚色澤計測定，並不會改變膚色。

未來如能繼續獲得國科會補助則希望繼續與廠商配合儘速將染髮劑、黑色素髮膠、防曬化粧品等產品商品化(圖五)。

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 (N Y)*. **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 N Y 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 Cu²⁺ 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.

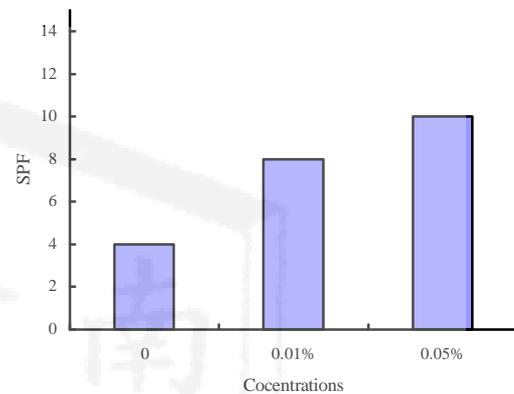
Tibbetts MW, et al. 1992. Cloning of a DNA fragment involved in pigment production in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett*. **70**, 9-13.

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.

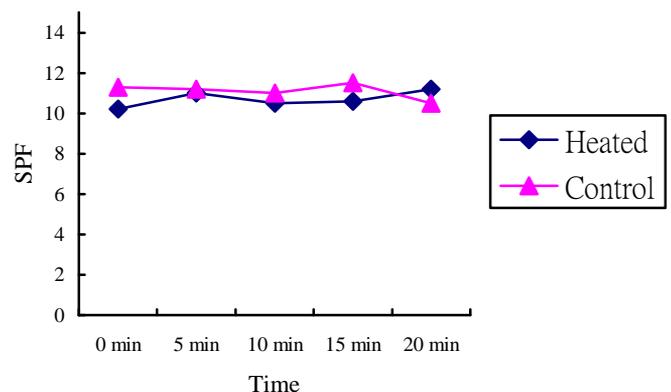
Yamamoto, H., et al. 1989. Melanin production in cultured albino

melanocytes transfected with mouse tyrosinase cDNA. *Jpn J Genet*. **64**, 121-135.

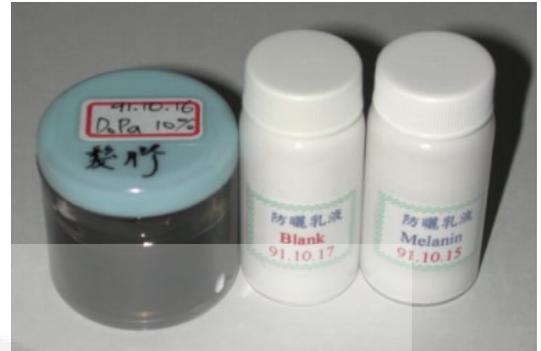
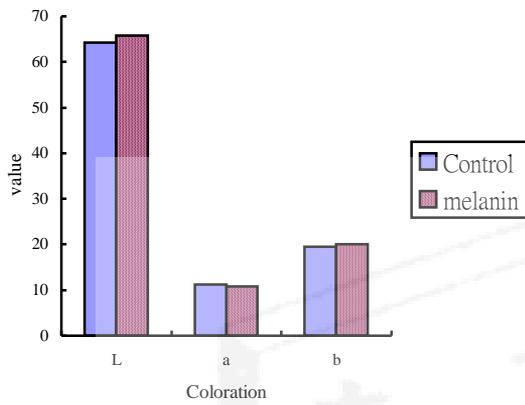
五、圖表：



圖一、黑色素之對SPF值的影響

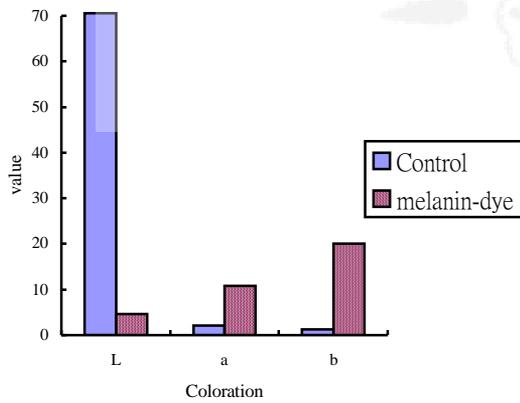


圖二、黑色素之熱安定分析



圖五、具潛力之含黑色素化粧品

圖三、黑色素對膚色的影響



圖四、黑色素染髮劑上色效果