

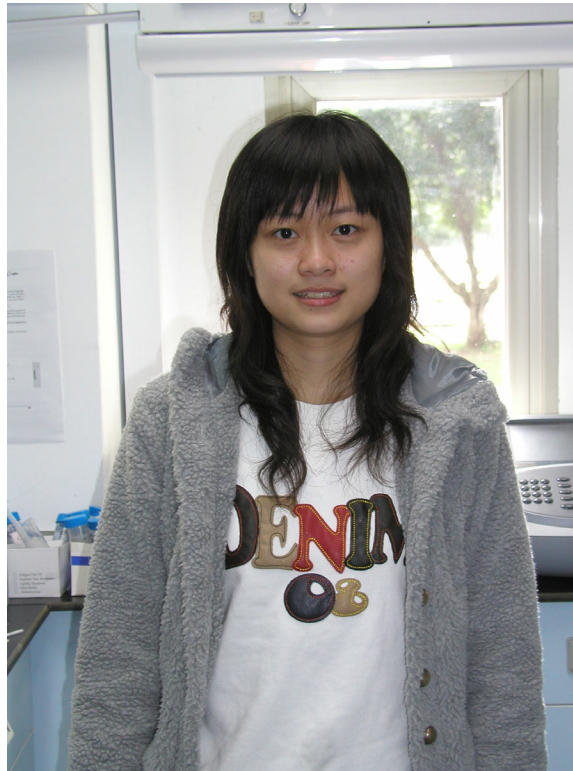
# 臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作 品 名 稱：抑制水果黑色素形成之新理論及研發美白保養  
品之新概念

學校 / 作者：國立新竹女子高級中學 李季芸

## 作者簡介：



李季芸，目前就讀國立新竹女子高中二年級。

興趣廣泛，不僅對油畫、版畫、平面設計等藝術活動多有涉略。除此之外，更對科學情有獨鍾，特別是在生命科學方面，更是積極參與相關活動以獲得更多的相關知識。

在高一時，爭取參與國科會高中生人才培育計畫，進而進入交通大學毛仁淡教授的實驗室，開始進行研究並參加這次的國際科展。

從這次經驗，我不只學習到更多科學上的知識與技術，更學習到了要成為”科學人”的精神。

在此也特別感謝毛教授給我機會進入大學實驗室做研究，也感謝幫助過我的每一個學長姐，我想如果沒有他們的大力支持，也將不能順利完成這次科展，謝謝你們！

## 英文摘要：

Polyphenol oxidase (PPO) or tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) is an important and ubiquitous enzyme responsible for browning in plants and melanization in animals. PPO is a copper-containing enzyme that catalyzes the chain-oxidation from monophenol or polyphenols to *o*-diphenols and subsequent *o*-quinones. The resulting quinones are large water-insoluble polymers with dark brown color. We proposed that volatile inhibitors are associated with the plant PPO and block the PPO activity in vivo. While post-harvesting the volatile inhibitors evaporate, the endogenous PPO is then activated and therefore instantly produces dark quinone pigment. In the present study using magnolia flowers as an example, we show the presence of a potent volatile inhibitor(s) for PPO in plant. The novel finding clarifies the mechanism involved in the browning phenomenon of post-harvesting for most fruits. Since the PPO is also known present in human as tyrosinase responsible for the formation of “darkening spots” on skin, the finding of evaporation of potent PPO inhibitor may be potentially used as a strategy in developing a novel cosmetic product.

## 中文摘要：

PPO 是一種含銅的多酚氧化酶 (E. C. 1. 14. 18. 1)，主要是將酚類 (phenol) 氧化成二酚類 (diphenol)，更進一步的變成 quinones，後者是一種不溶於水的褐色聚合物，在植物中造成褐化最主要原因，然而在人類皮膚則產生黑色素 (melanin)。

我們提出有一種揮發性的抑制劑存在動植物體內，此種抑制劑會抑制生物體內 PPO 的活性。植物在收成後，揮發性的抑制劑逐漸消失，導致內生性的 PPO 活性逐漸上升，因此植物便會產生深褐色的斑點。在本研究中，我們以玉蘭花作為例子，以生化酵素動力實驗、部分純化黑色素抑制劑來解釋揮發性抑制劑在植物體內的的存在及其作用，更進一步對水果快速褐化提出一種新的理論。研究發現 PPO 的褐化反應就像是人體內酪氨酸酶 (tyrosinase) 的催化反應，酪氨酸酶可以使人體產生黑色素而累積在皮膚上形成黑斑，利用“人工皮膚”模擬揮發性黑色素抑制物的作用，證明，防止 PPO 抑制劑之揮發可能在未來美白保養品工業裡扮演一極具潛力的角色。

## 壹、前言

蔬菜水果放置一段時間之後，有明顯褐變 (browning reaction) 的現象，這種褐變作用是由普遍存在於植物組織中的一種多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO) 所造成的 (1, 2)。PPO 普遍存在於多種物種內，依據其功能而具有多種不同的名稱。例如: 苯鄰二酚氧化酶 (catechol oxidase, CO) (3)，氧化動物蛋白質內的酪氨酸，使動物皮膚變黑的稱為酪胺酸酶 (tyrosinase) (E.C. 1.14.18.1) (4)。

本研究初步之疑問是為何荔枝在採收後立刻變成褐色，但在果樹上卻是呈現艷麗之鮮紅色，而不致於被氧化為褐色。因而大膽之提出“揮發性黑色素抑制劑”之理論及假說。本研究首先利用荔枝、蘋果及玉蘭花為例證明內生天然性之黑色素抑制劑之存在，黑色素抑制劑即為多酚氧化酶之抑制物 (PPO inhibitor)；在利用酵素的動力及生化反應證明此天生抑制劑具有揮發性，本研究再度說明一旦揮發性抑制劑用盡後就無法保護氧化酶而促進褐化反應。

而植物的褐變反應機轉與人體皮膚形成黑色素 (pigment) 使皮膚變黑的反應機轉相似，人體也會產生深色的非水溶性的黑色素沉澱。人體黑色素堆積在皮膚中，形成雀斑或是老人斑。此造成皮膚變黑的原因是 tyrosinase (4)，此酵素在植物內就是 PPO 氧化酶。當皮膚接觸到紫外線，細胞就會藉由 tyrosinase 產生麥黑色素 (melanin)。一旦皮膚接受了大量紫外線的照射，產生更多的黑色素，無法將多餘的黑色素排除而囤積在皮膚組織中，這就是曬黑的關鍵。目前保養皮膚強調保濕，但是沒有具體之理論，我們的理論是保濕除了防止氧化外亦可以阻止黑色素抑制劑之揮發。

另外本研究理論衍生出一個想法，藉由萃取水果內部的天然 PPO 小分子抑制物質，可藉由飲食及皮膚透析法 (transdermal) 透過抑制黑色素的形成，防止老人斑之形成。

本實驗發展出之抑制分子將來亦可運用在花卉、水果 PPO 的抑制上，將可防止或延長褐變的時間，增加農產品的經濟效率。

## 貳、 研究材料、方法與過程

磨菇、甜蘋果、香蕉、荔枝皆購買自超市，保持在 10 °C。購得後新鮮使用，或保存在 4 °C。玉蘭花則由新竹春記休閒農園慷慨提供。

一、 蘋果切片褐變觀察：把市售的蘋果切片，放入真空乾燥機中做不同時間之真空乾燥處理，取出不同處理條件的蘋果切片暴露在空氣中，以照相機紀錄觀察蘋果的切片在不同時間的褐變反應。

二、 蔬菜水果 PPO 粗萃取物之準備：樣品置於 0.02 M sodium phosphate buffer (PB), pH 6.0 (50%; W/V)，使用均質機將樣品均質化後，將其於 4 °C 下離心 3000 rpm/min 30 分鐘，取出上液用濾紙過濾除去固體殘渣，再將液體於 4 °C，12000 rpm/min 下離心 30 分鐘，再次過濾掉固體殘渣，所得的萃取液即可用於測定 PPO 活性。供新鮮使用或於 -20 °C 保存。

三、 酵素反應檢測方式：把 PB、酵素粗萃液、抑制劑、catechol 溶液加入 96 孔盤中，使總反應體積為 200  $\mu$ l，使用分光光度計測量 catechol 氧化後的產物 (quinone) 在波長 415 nm 吸光值。

四、 酵素活性分析方法：取出 5  $\mu$ l 的粗萃物，再加入不同濃度的 catechol 溶液，可做出 Michael-Menten equation curve 及 Lineweaver-Burk equation curve。測量其在波長 415 nm 的吸光值。

五、 抑制物抑制活性的分析方法：取 125  $\mu$ l 的 PB 加入 96 孔盤中，再把不同濃度的抑制劑取 20  $\mu$ l 加入，再取 5  $\mu$ l 的蔬果粗萃物加入各別孔中，靜置三分鐘後，加入 50  $\mu$ l 等濃度 20 mM 的 catechol 溶液。

六、 玉蘭花褐變反應觀察：把玉蘭花置於空氣、水及真空乾燥處理，以照相機紀錄觀察於不同時間點玉蘭花的褐變情形。

七、 小分子黑色素抑制劑的萃取方法：把粗萃物置於 5 kDa centricon 中離心，3000 rpm 離心 2 小時，收集 centricon 下管液體即為抑制劑的萃取液。

八、 玉蘭花揮發性黑色素抑制劑的萃取方法：將玉蘭花填充至分液漏斗中密封置於水浴槽加溫 (60 °C)，三小時後將分液漏斗置於冰中冷凝。取出冷凝液後，以少量 ddH<sub>2</sub>O 洗分液漏斗內壁、再用適量 100% 的酒精在 37 °C 微溫下清洗內壁。收集酒精清洗液，即可得到玉蘭花揮發性黑色素抑制劑的萃取液，以 parafilm 將收集離心管封口 4 °C 冰箱保存。

九、揮發後之黑色素抑制劑製備：把玉蘭花揮發性抑制劑取 1 ml 置於 15 ml 離心管中，將酒精真空乾燥揮發至乾後，取出離心管，再把殘留物用酒精回溶到體積 1 ml，此為揮發後的抑制劑。

十、人工皮膚的製備：把濾紙置於 0.8% 的 catechol 溶液中浸泡 10 分鐘後，取出放入 68 °C 烘箱中烘乾，即完成 catechol paper 的製備，將 catechol paper 避光保存在室溫。將等量的磨菇粗萃物和等體積不同濃度的抑制劑混均勻後，滴在 catechol paper 上，以照相機觀察紀錄其呈色反應。

## 參、 研究結果與討論

假說：黑色素抑制劑揮發後可造成水果褐變反應。

結果:

### 一、 利用荔枝果皮證明揮發性之黑色素抑制劑之存在

圖 1 A 首先說明荔枝在果樹上時呈鮮紅色，但收成後逐漸變為褐色。我們認為果樹具有黑色素抑制劑 (oxidase inhibitor) 在 in vivo 條件下由於植物體內不斷合成而持續保持其色彩，但採下後抑制劑可能逐漸揮發而無法抑制 PPO 氧化酶而形成黑色素 (quinones)。圖 1 B 顯示在市場採購回果皮明顯變色之時間需要 16 小時以上，但果皮於抽真空的環境靜置 5 分鐘後，果皮在空氣中曝露 2 分鐘就立刻氧化成為戲劇性之深黑色 (圖 1 C)。因而證明此抑制劑為揮發性之分子。

(A) 荔枝採收前



荔枝採收後



(B) 市場採購荔枝靜置於空氣中



Time

0 h

1 h

2 h

6 h

24 h

(C) 抽真空前



抽真空 2 分鐘後



圖 1. 荔枝果皮之褐化情形。A: 荔枝在果樹及採收後之顏色。B: 市場採購之荔枝顏色於靜置 24 小時之褐變情形。C: 果皮利用真空乾燥機抽真空後，曝露空氣 (2 分鐘) 之褐變情形。荔枝在樹上時呈現的是豔麗的鮮紅色，一旦採收後逐漸的變成黑褐色。經真空乾燥的處理，揮發性黑色素抑制劑急速蒸散，一旦接觸空氣，荔枝皮快速變黑。這說明了荔枝皮的 PPO 抑制劑是具有揮發性的分子。

## 二、 利用蘋果證明揮發性之黑色素抑制劑之存在

圖 2 說明蘋果切開後之褐變反應類似荔枝，但其褐變速度在抽真空後較慢，同時說明其褐化反應與抽真空時間及曝露在空氣中的氧化時間成正比。

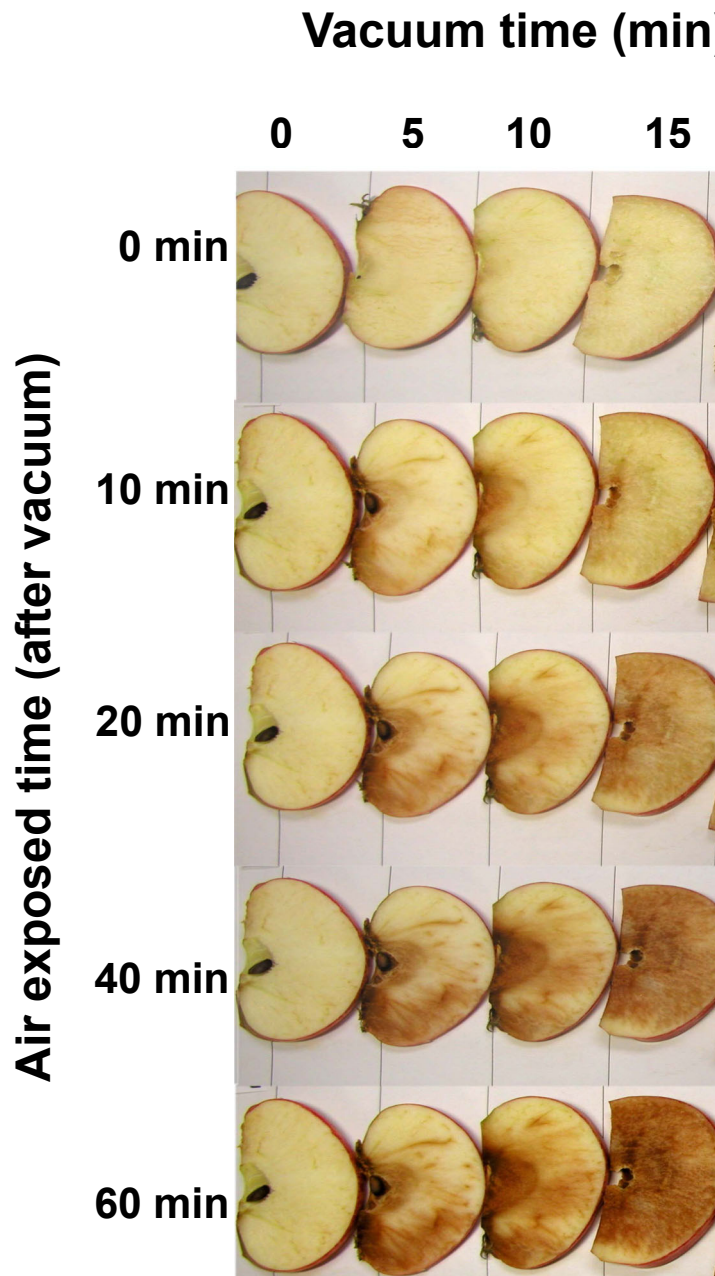


圖 2. 蘋果切開後比較未抽真空及抽真空之褐化情形。本實驗利用真空乾燥機將揮發性之黑色素抑制劑抽除 (蘋果片厚度 3 mm)。蘋果切開後未有褐變的現象，一旦經過不同時間的真空乾燥處理之後，蘋果急速褐化。抽真空的時間越久，褐化的程度越嚴重。

### 三、利用玉蘭花證明揮發性之黑色素抑制劑之存在

圖 3 再次說明玉蘭花在真空靜置 5 分鐘後，花瓣在空氣中 5 ~ 30 分鐘內立刻呈褐化，但未經真空抽取之樣品在 3 小時後仍未褐化。



圖 3. 比較玉蘭花未抽真空及抽真空情況下之褐化情形。利用真空乾燥機將玉蘭花之揮發性黑色素抑制劑抽除。玉蘭花未經真空乾燥沒有褐變的現象，一旦經過真空乾燥處理之後，玉蘭花急速褐化變黑。

#### 四、 利用生化反應證明黑色素抑制劑之存在於玉蘭花中

圖 4 首先說明抑制劑萃取可利用 centricon 先行分離，在萃取過程由於玉蘭花內 polyphenol oxidase 之活性極強，萃取液立刻形成黑色素體，其黑色素體分子量極大 (> 5 kDa) 無法穿透 5 kDa 之滲透膜 (membrane)，但抑制劑卻是小分子可透過滲透膜。

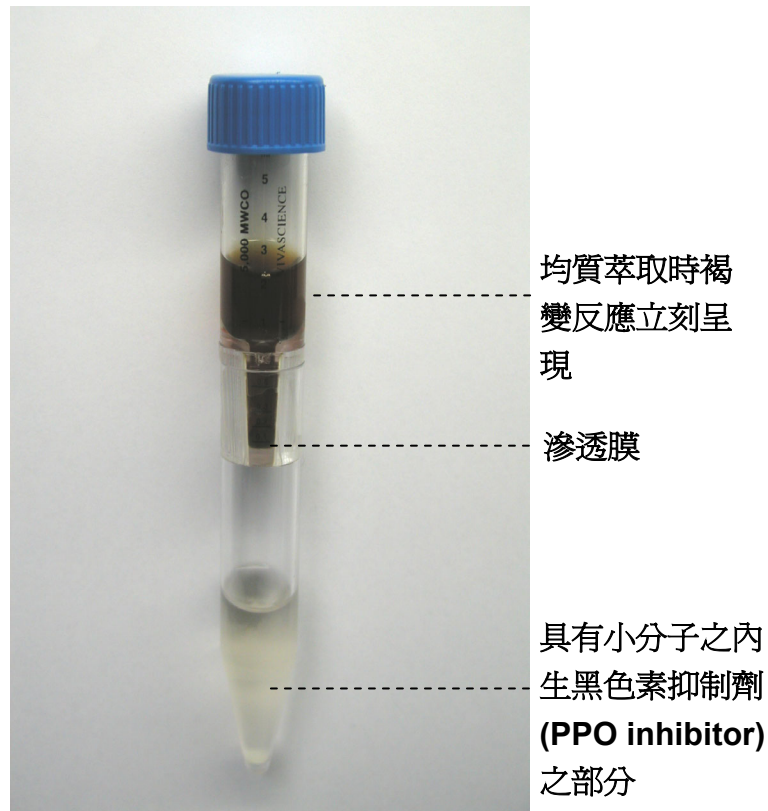


圖 4. 利用 centricon 萃取玉蘭花小分子抑制劑。利用分子篩的方法用小於 5 kDa 的 centricon 將小分子抑制劑離心下來。Centricon 上層有一滲透膜，僅容分子量小於 5 kDa 的分子通過，3000 rpm 離心 2 小時，收集 centricon 下管液體即為含有分子量小於 5 kDa 的抑制劑萃取液。

圖 5 舉例說明植物黑色素係由 polyphenol (PP) 經過 polyphenol oxidase (PPO) 催化形成黑色素體 (quinones) 而呈現褐色亦 Browning reaction。但是在 *in vivo* 的黑色素形成比此方程式更複雜，但是可利用此方式來測試 PPO 氧化酶之活性。

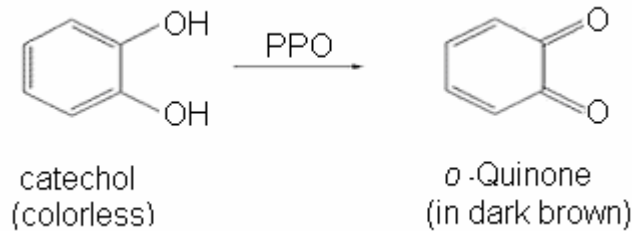


圖 5. PPO 的反應機轉。在反應，中從無色的 substrate (catechol) 轉化成深褐色產物 (quinones)。因此做 PPO 氧化反應時，可以偵測 quinones 的吸收光的增加來測得酵素活性。

圖 6 證明玉蘭花萃取之黑色素抑制劑為存在於花瓣中之小分子，並且證明其抑制氧化酶效果與其用量呈正比關係。

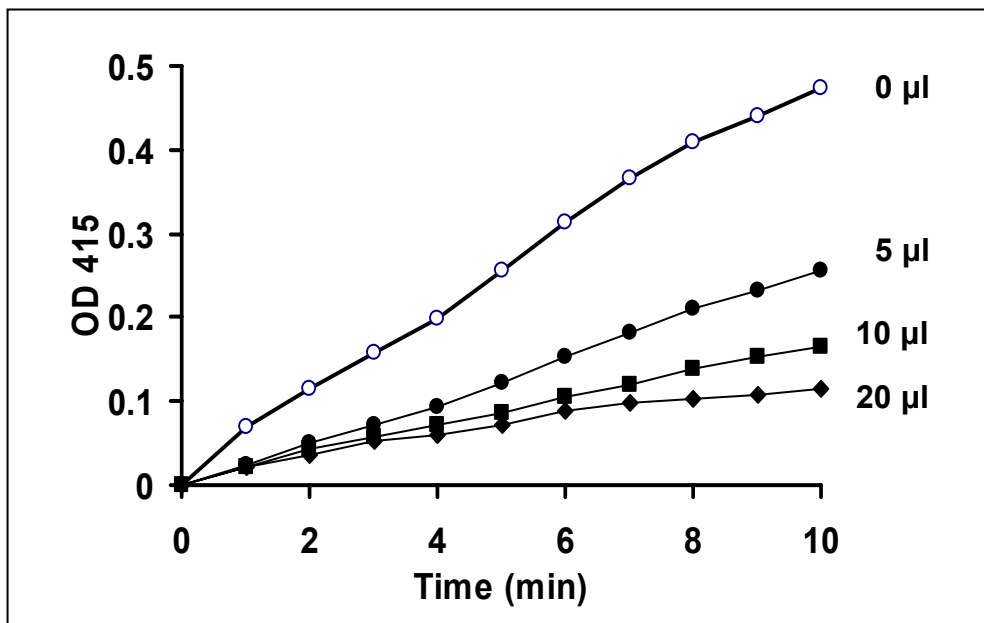


圖 6. 玉蘭花之花瓣內存在小分子的 PPO 抑制劑。將不同量以 centricon 萃取的小分子抑制劑 (0, 5, 10, 20 µl) 加入含玉蘭花之 PPO 氧化酶的萃取液 (2.5 mM catechol 溶液 250 µl 之 substrate) 中。本實驗是以 ELISA plate 測試，加入 Centricon 分離的小分子萃取液當抑制劑，發現對玉蘭花 PPO 的活性有 dosage effect 的抑制效果。

## 五、 利用酵素反應證明黑色素之抑制劑揮發性

圖 7 首先將玉蘭花置分液漏斗中，收集揮發性之黑色素抑制劑，再比較抑制劑在空氣中揮發前後之抑制效果。

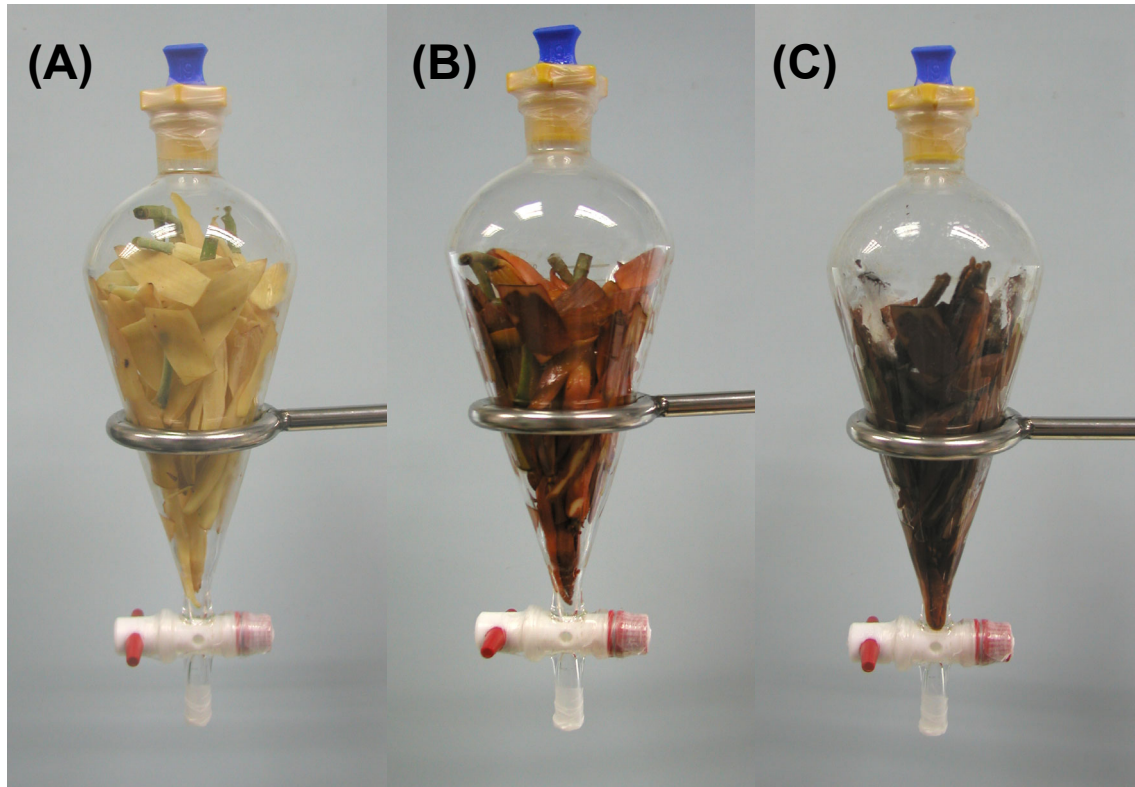


圖 7. 玉蘭花揮發性抑制分子的萃取。將玉蘭花填充至分液漏斗中密封加溫 (60 °C) 的方法，以促進 PPO 的活性，氧化耗去內生性的 substrates，同時也使揮發性抑制劑揮發出玉蘭花，更進一步完整地收集 PPO 抑制劑。A. 為一開始尚未放入 60°C 水浴槽的玉蘭花。B. 為放入水浴槽反應 1.5 小時後的玉蘭花。C. 為放入水浴槽反應 3 小時的玉蘭花。將玉蘭花填充至分液漏斗中密封置於水浴槽加溫 (60 °C)，三小時後將分液漏斗置於冰中冷凝。取出冷凝液後，以少量 ddH<sub>2</sub>O 洗分液漏斗內壁、再用適量 100% 的酒精在 37°C 微溫下清洗內壁。收集酒精清洗液，即可得到玉蘭花揮發性抑制劑的萃取液。

## 六、揮發後之黑色素抑制劑已不具有抑制效果

圖 8 測試揮發後之黑色素抑制劑做抑制效果的測試，與未經揮發之黑色素抑制劑的抑制效果相比較。

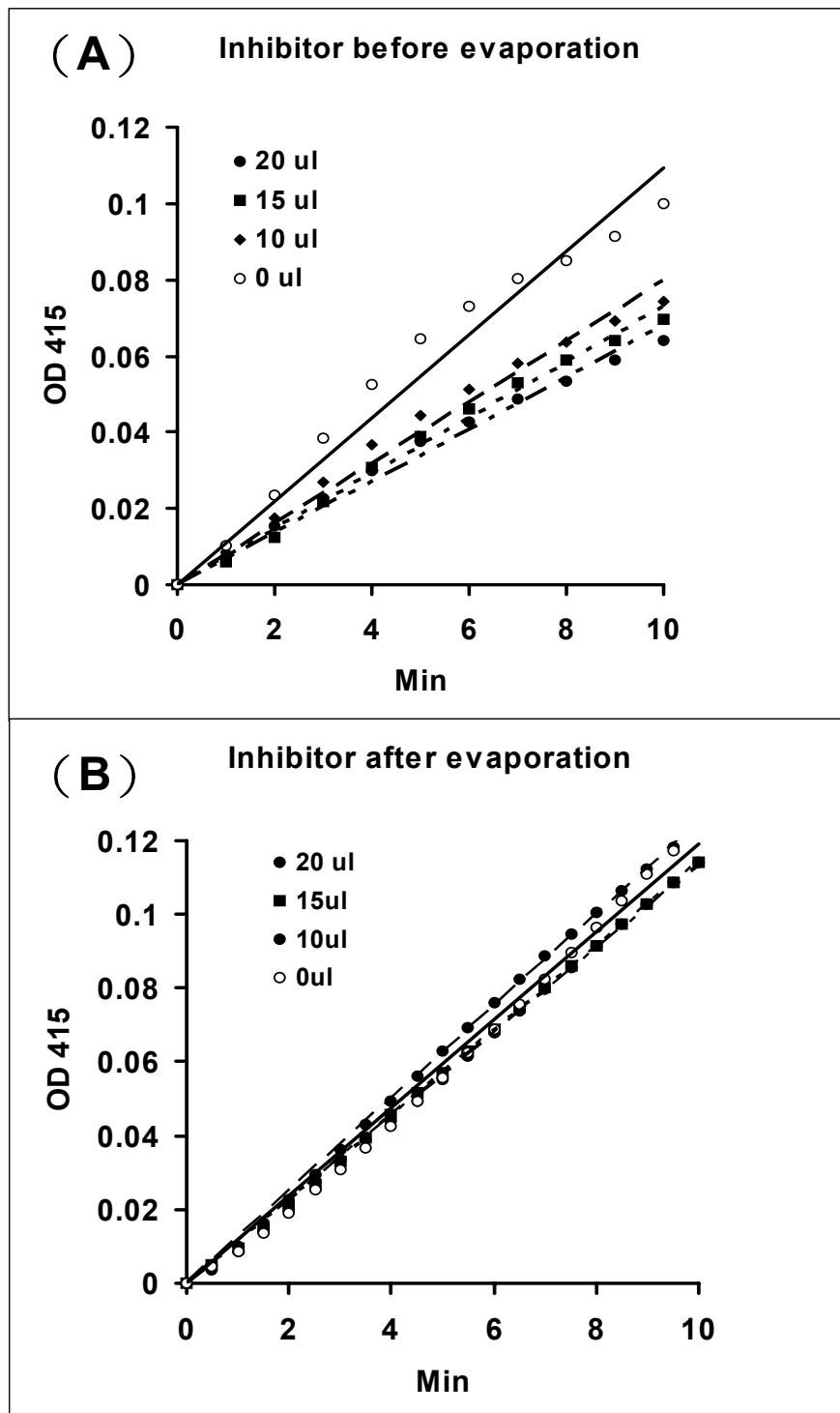


圖 8. 揮發與未經揮發之黑色素抑制劑對玉蘭花 PPO 抑制效果比較。A. 由圖 7 取得的未經揮發處理的抑制劑，依不同劑量 (0, 10, 15, 20 ul) 對玉蘭花 PPO 活性的抑制效果比較。B. 不同劑量 (0, 10, 15, 20 ul) 經過真空乾燥處理的抑制劑，對玉蘭花 PPO 活性的抑制效果比較。

## 七、非揮發性抑制劑對 PPO 活性之影響

圖 9 其因為 NaCl 可抑制 PPO 活性，500 mM 的 NaCl 即能夠對蘋果活性造成 50% 的抑制效果。

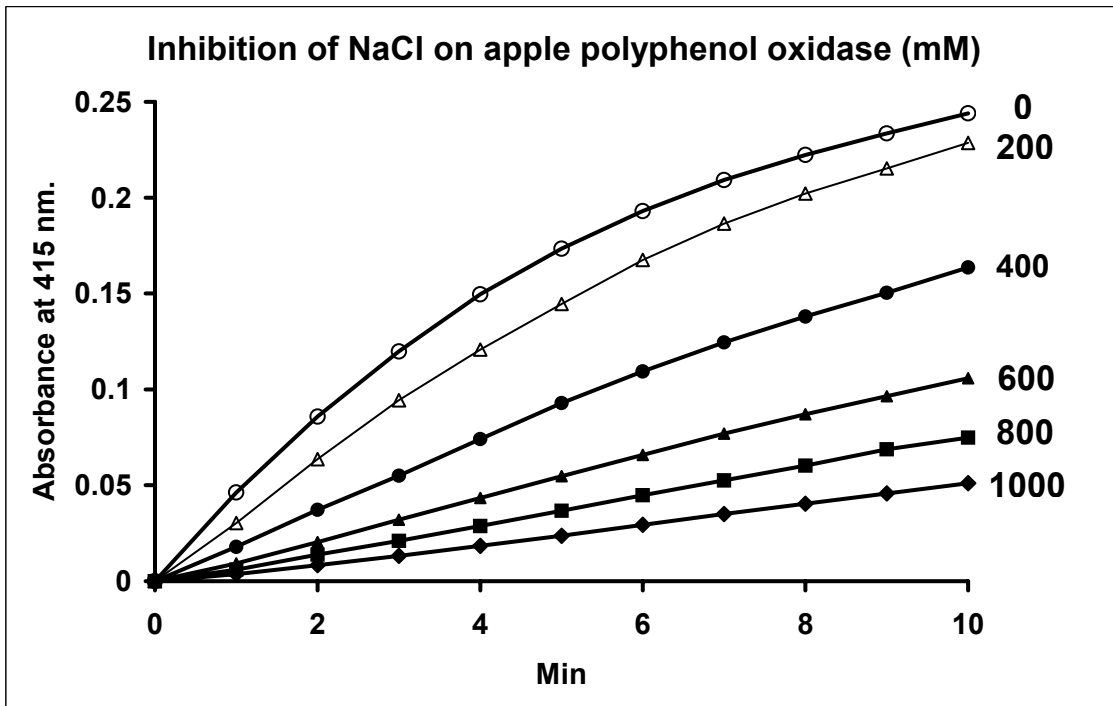


圖 9. NaCl 對 PPO 活性之影響。本實驗用蘋果 PPO 進行不同 NaCl 濃度之測試 (mM)，PPO 酵素是由 80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  所沉澱的蛋白質中萃取，利用 catechol (10 mM) 為 substrate 在 ELISA plate 上進行 NaCl 對 PPO 活性抑制的檢測。

## 八、玉蘭花 PPO 酵素與其他植物 PPO 酵素的相對比較

圖 10 測量不同植物粗萃取液中 PPO 之含量與活性，吸光值愈高表示其 PPO 的量愈多或活性愈大。玉蘭花 PPO 的含量與活性為這些植物中最高者。值得一提的是本實驗僅代表這些植物之 PPO 可用酵素動力學方式測定，無法代表真正酵素活性。

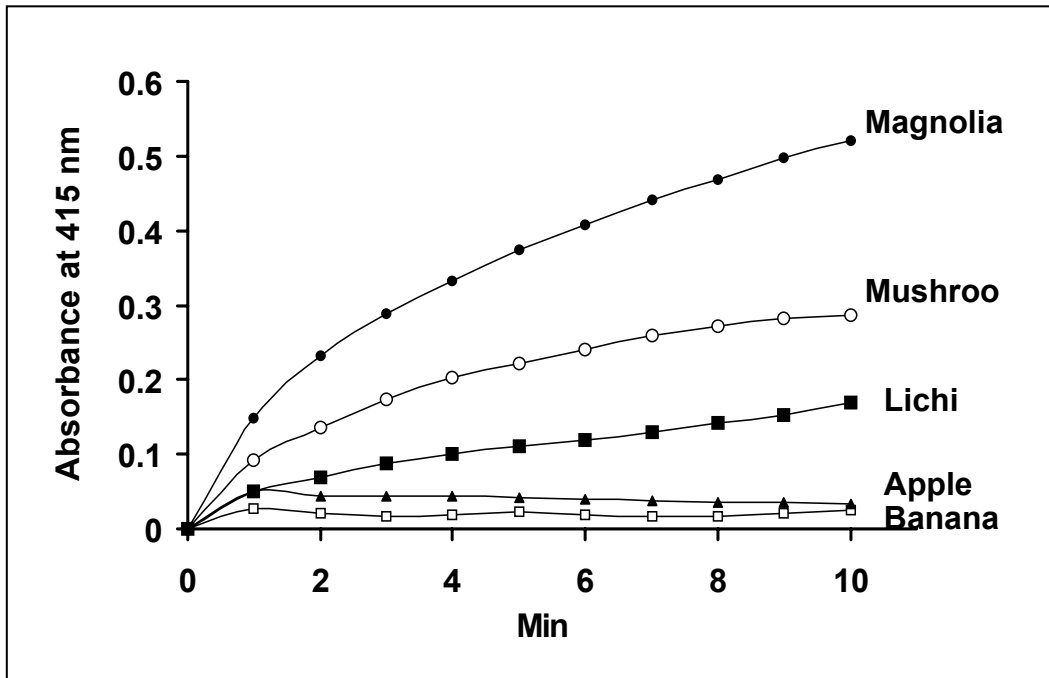


圖 10. 比較各類植物 PPO 之活性與含量。各植物以 50% (W/V) 在 phosphate buffer (0.01M)，均質後在測定期活性，所有 PPO 氧化酶未經純化，測定方法與圖 9 相同；本圖之氧化酶活性不代表各類植物每單位氧化酶之真正活性，因為在此 PPO 不代表真正  $K_m$  之值，但是一般來說其氧化酶對 catechol 之  $K_m$  約為 2-36 mM 之間。

### 九、玉蘭花 PPO 之 $K_m$ 值為 5.8 Mm

圖 11 從 Lineweaver-Burk plots 我們定義出玉蘭花 PPO 對 catechol 的  $K_m$  值為 5.8 mM， $V_{max}$  為 39.6  $\mu$  M/min。與現在已知植物的 PPO 對 catechol 的活性最強及最弱的植物相比 ( $K_m$  1.2 and 36 mM；*Nicotiana tabacum* and *Prunus persica*)，玉蘭花之 PPO 活性屬比較高者。

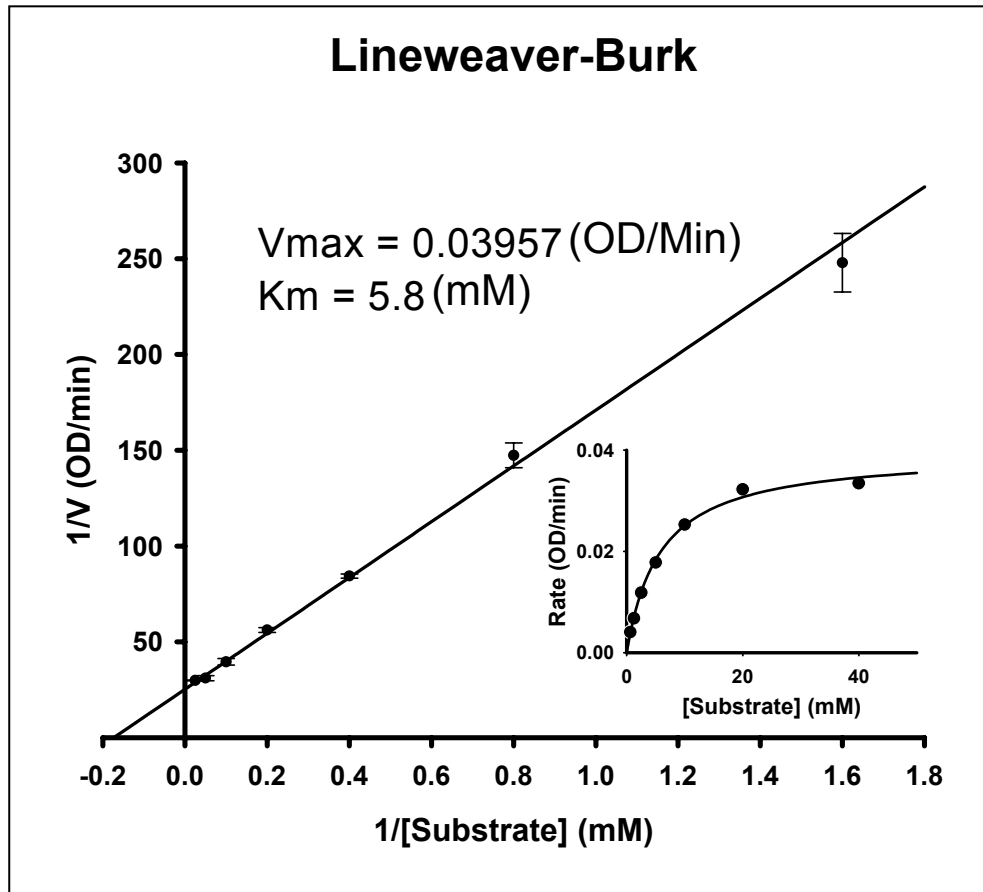


圖 11. 玉蘭花 PPO 之酵素動力學曲線。取出 5  $\mu$ l 的玉蘭花粗萃物，再加入不同濃度、相同體積的 catechol 溶液，可求得玉蘭花 PPO 之 Lineweaver-Burk plots，並且求得其  $K_m=5.8$  mM， $V_{max}=0.03957$  OD/Min。

## 十、揮發性黑色素抑制劑之重要性及臨床應用

圖 12 顯示具抑制效果之“黑色素抑制劑”即為人造皮膚上較淡的圓點，由此證明保濕減少抑制劑的揮發，對抑制 PPO 的重要性，於人體上也有同樣的效用。

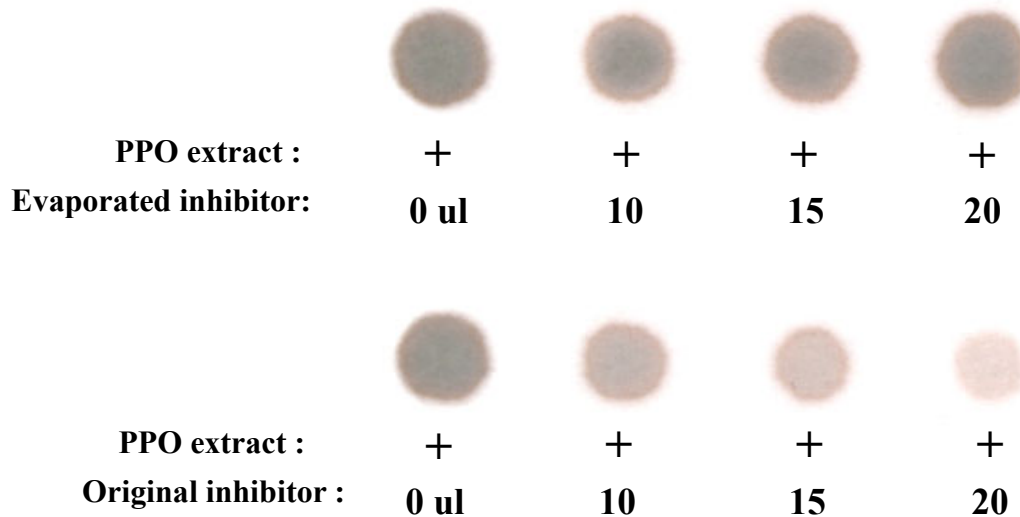


圖 12. 揮發性抑制劑的抑制效果。由 catechol paper 製成的人工皮膚測試抑制劑的抑制 PPO 的效果，發現未揮發抑制劑有明顯抑制 PPO 活性的效果，因此若是能留住水分阻隔空氣與抑制劑接觸，減少抑制劑的揮發，在化妝品美白產業上，天然 PPO 抑制劑必能成爲一個重要角色。

## 討論

### 揮發性抑制劑之一般特性

花卉、水果在採收前保有鮮艷的顏色，一旦採收之後逐漸開始褐變的反應 (圖 1)，我們認為揮發性之黑色素抑制劑雖然蒸發性強但在果樹上由於新陳代謝而不斷合成持續其色彩，但採收後便無法源源不斷的獲得抑制劑供應，PPO 酵素活力逐漸呈現，而形成黑色素累積變黑。又從這些採收後的植物經過真空乾燥的處理後，一旦曝露空氣、接觸氧氣後急遽變黑的結果 (圖 1、2、3)，我們可以推測，這些抑制劑應該是屬於揮發性的，一旦真空處理時會快速被抽掉，失去了其抑制效果，被活化的 PPO 將 substrate 耗盡，植物很快變黑 (5)。

從文獻中知道很多抑制劑是 substrate 類似物的小分子 (6, 7)，因此我們可以用分子篩的方法 (圖 4) 將小分子抑制劑離心下來。但是此方法分離出來的抑制劑有其方法上的限制，因為 PPO 的 substrate 是 mono-, polyphenol (圖 5) 其分子量也是小於 5kDa，分離抑制劑同時也將 substrate 分離下來，一旦揮發性抑制劑揮發完，不但沒有抑制效果，反而多了 substrate。因此我們更進一步發展其他純化方式來獲得揮發性的抑制劑，過程中必須能夠將 substrate 存在的量減至最少又能獲得揮發性抑制劑。

有鑑於一般的利用冷凝收集揮發性物質的方法，往往也很可能將 PPO 的 substrate 同時收集下來，因此收集到的抑制劑也往往無法達到很好的抑制效果。於是我們利用將玉蘭花填充至分液漏斗中密封加溫 (60 °C) 的方法，以促進 PPO 的活性，氧化耗去內生性的 substrates，同時也使揮發性抑制劑揮發出玉蘭花，更進一步完整地收集 PPO 抑制劑 (圖 7)。並分別測試取自分液漏斗的三道收集液 (冷凝液、ddH<sub>2</sub>O 洗液、酒精洗液) 對玉蘭花 PPO 活性抑制效果，發現有最佳抑制效果為用酒精萃取液。在水浴槽的實驗中可以看出當玉蘭花在 60°C 時使的酵素活性增加，也使的揮發速率上升，三個小時後發現其變黑的程度比在常溫中更加明顯 (圖 7)。分液漏斗內也可以看到玉蘭花本身揮發的水氣與 substrate 氧化後的深褐色的 polyquinone，放在冰上凝結後，分餾瓶內可以看到紅褐色的液體，推測是水再加上 substrate 反應後的產物。使其漏出後，再用 ddH<sub>2</sub>O 去洗瓶內壁，最後用少量酒精溶洗分餾瓶內壁的抑制劑並收集。發現酒精溶出的抑制劑有明顯的 dosage effect (圖 8 A)；當把酒精溶出的抑制劑再度以真空乾

燥揮發後補等量的酒精，發現其抑制效果明顯消失 (圖 8 B)。由上述兩點可更進一步的直接證明了玉蘭花內具有揮發性的抑制劑。

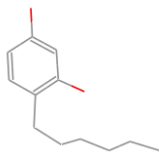
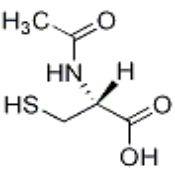
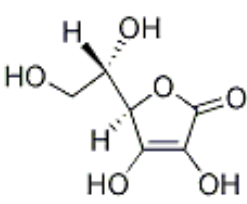
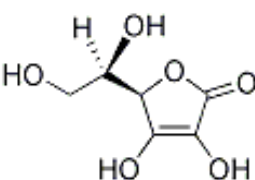
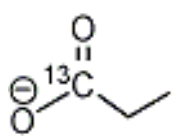
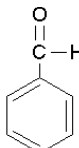
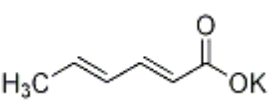
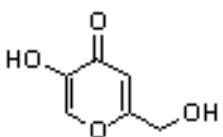
目前已知蘋果褐變的發生主要是源於 PPO 酵素的氧化 polyphenol 所致 (10)；另外剖開後的蘋果經過泡鹽水處理後，切面便不易變黑，於是推測 NaCl 能抑制蘋果褐變反應。為了印證 NaCl 是否針對 PPO 活性抑制而防止蘋果變黑。我們以不同濃度的 NaCl (0、200、400、600、800 及 1000 mM) 外加至 10  $\mu$ l 蘋果粗萃取液並加入 catechol (最終濃度 5 mM) 反應。發現 NaCl 的濃度愈高對蘋果 PPO 活性的抑制效果愈好 (圖 9)，NaCl 對 PPO 活性的抑制有 dosage effect。同時在第 10 分鐘的時候，500 mM 的 NaCl 能夠對蘋果 PPO 活性造成 50% 的抑制效果。同時印證了前人對 NaCl (8) 能抑制 PPO 的酵素活性的研究。

將等量的植物粗萃取液，用來與 catechol 反應，發現不同植物中 PPO 活性不相同，而實驗的植物粗萃取液中 PPO 活性最高者為玉蘭花的 (圖 10)。而玉蘭花在採收前是純白色，但是採收後一段時間內仍能保持潔白顏色，未有明顯褐變現象；從這現象推論，玉蘭花本身可能有內生性 PPO 抑制劑的存在，且此抑制劑活性很強或量很多。使得玉蘭花在採收後幾天內只要保濕，仍然會保有鮮豔的白色 (圖 3)。

從 Lineweaver-Burk plots 我們定義出玉蘭花 PPO 對 catechol 的  $K_m$  值為 5.8 mM， $V_{max}$  為 39.6  $\mu$  M/min。與現在已知植物的 PPO 對 catechol 的活性最強及最弱的植物相比 ( $K_m$  1.2 and 36 mM；*Nicotiana tabacum* and *Prunus persica*) (8, 9)，玉蘭花之 PPO 活性屬比較高者。與圖 10 的結果相比較，更進一步支持玉蘭花有很強或是量很多的內生性 PPO 抑制劑存在。

## 揮發性之氧化酶抑制劑究竟為何物？

此揮發性之抑制劑應該是與具有苯環之有機小分子有關，下表中列出現今常用之氧化酶抑制劑化學物：

	化學式	揮發性
4 - hexylresorcinol		No
N - acetylcysteine		No
Ascorbic acid		No
Isoascorbic acid		No
Propionate		No
Benzoaldehyde		No
Potassium sobic acid		No
Kojic acid		No

其他也有許多化合物可達抑制效果在此不多提，有趣的是在小黃瓜內發現氧化酶抑制物，其中就有是揮發性的，但是卻沒有想到揮發性抑制物卻可能造成褐化之主因而進一步提

出此概念。當然揮發性之化合物對農產品之防褐化並非理想的抑制劑。本研究最終目標應將此揮發性抑制劑純化並定出其結構，但須注意的是這種類似帶苯環的物質可能是一群，結構類似 polyphenol 的有機分子，所以在植物體內就形成一個極佳之氧化酶的競爭型抑制劑 (competitive inhibitor)；無論如何，防止這些抑制物之揮發才是本研究之新概念。

### **本研究與人類皮膚黑色素形成之關係**

將未經及經過真空乾燥揮發處理的兩種抑制劑與玉蘭花的 PPO 粗萃取液混合，點在仿造人工皮膚的 catechol-paper 上，經過真空乾燥處理後的抑制劑已不對 PPO 具有抑制效果，而以酒精萃以取的抑制劑則對 PPO 活性則具有很強的抑制效果 (圖 12 A)。此實驗更進一步證實：真空乾燥的處理說明了，當玉蘭花抽真空時同時也將其揮發性 PPO 抑制劑抽走，於是加速了 PPO 褐變反應。由以上實驗驗證了玉蘭花具有內生性的 PPO 活性抑制劑，而此抑制劑具有揮發性的特性。

水的存在能夠阻擋大部分的氧與 PPO 的接觸同時阻擋了揮發性抑制劑的揮發，此兩效果都能降低褐變反應的速率。真空乾燥急速的將揮發性抑制劑抽走，模擬了乾燥型皮膚的人或老人皮膚乾癟的狀況，皮膚容易有黑斑或老人斑的形成。其原因也等同人工皮膚抑制劑被揮發時，促使 tyrosinase 活性顯現，促使黑色素的形成。因此，若是要保持皮膚的美白，皮膚的保濕是非常重要的，預防人體內生性 tyrosinase 抑制劑不被快速揮發 (圖 12 B)；另一方面，若是能更進一步在化妝品中添加 tyrosinase 抑制劑將有助於美白的保養。

## 肆、結論與應用

### 一、 玉蘭花枯萎與揮發性抑制劑的關係:

當玉蘭花花朵還在樹上的時候，花朵能獲得樹本身的不斷提供抑制劑，持續補充揮發散去的抑制劑，因此造成褐變的酵素 PPO 活性便被抑制。故玉蘭花朵能長時間保持潔白鮮豔，一旦花朵離開了樹，失去樹體的內生性抑制劑的供給，同時存在花朵內的揮發性抑制劑逐漸逸失殆盡，PPO 的活性顯現，促使褐變反應，因此花朵便快速變褐色，再變黑。(圖 3)

從本實驗的結果，證實了玉蘭花有內生揮發性的抑制劑存在，並且我們用簡單的方式就能部分純化收集此 PPO 抑制劑，讓對花卉、蔬果褐變及皮膚變黑的防制能更進一步的研究。

### 二、 揮發性抑制劑的可能性應用:

一旦鮮花變黑即失去了其觀感導致市場經濟價值降低甚至消失;水果採收後幾天內，果皮會快速失去原本鮮豔的色彩而轉為褐色，且口感變差，同時也降低其經濟價值。因此在花卉、農產上，褐變問題一直都是降低產值的重要問題(圖 3)。若是能保持鮮豔顏色以及維持品質，並延長花卉、農產品採收後的存放時間，將對花卉水果價格穩定有所助益，增加花、果農收益。

採收後的花卉、水果會枯萎、變黑。其主要作用機轉在於 PPO 對酚化合物的氧化反應。本實驗結果證實小分子抑制劑存在，若更進一步研究此類抑制對植物的 PPO 的廣泛抑制效果。將有助加長收穫後的保存、銷售時間，突破出口時褐變以致賣相變差的限制，更能全面的增加農業的產值，疏解臺灣農業在加入世界貿易組織 (WTO) 之後的困境。

### 三、 美白化妝品產品的應用:

將來根據本研究的結果，對這類玉蘭花的小分子黑色素抑制劑的做更進一步的分析，藉由萃取玉蘭花之天然小分子 PPO 抑制劑，利用其抑制黑色素形成的功能，使得黑色素的生成被抑制，更可能達到美白、回復膚色白皙的效果。

另外，黑斑的形成也跟 tyrosinase 有直接的關係，若將 PPO 抑制分子添加入除斑的化妝品，減少黑色素形成，將有助於淡化黑斑。(圖 12) 而現有美白化妝品產品內的主要成分，如麴酸、對苯二酚，都是 PPO 抑制劑，這些成份大都是非天然的添加物，對於健康或多或少都有不良影響。若能將身邊容易取得的天然花卉萃取到的天然小分子 PPO 抑制分子，添加在用於皮膚上的化妝、保養品內，對健康的影響勢必將更微

乎其微。如此一來，不但滿足了時下保養品講究天然的需求、符合女性愛美的天性，更還具有玉蘭花的芬芳香氣。

## 五 參考文獻

1. Buta JG, Moline HE, Spaulding DW, Wang CY. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. *J Agric Food Chem.* 1999;47:1-6.
2. Spagna G, Barbagallo RN, Chisari M, Branca F. Characterization of a tomato polyphenol oxidase and its role in browning and lycopene content. *J Agric Food Chem.* 2005;53:2032-8.
3. Yang CP, Fujita S, Ashrafuzzaman M, Nakamura N, Hayashi N. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J Agric Food Chem.* 2000;48:2732-5.
4. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002 ;17:207-18. Review.
5. Gandia-Herrero F, Jimenez M, Cabanes J, Garcia-Carmona F, Escribano J. Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds: enzymes responsible for browning in cucumber. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7764-9.
6. Jimenez M. , arcy-a-Carmona F. 4-substituted resorcinols ( sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *J Agric Food Chem.* 1997;45:2061-5.
7. Jimenez M, Chazrra S, Escribano J, Cabanes F, arcy-a-Carmona F. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J Agric Food Chem.* 1991;39:1043-6.
8. Wong TC, Luh BS, Whitaker JR. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 1971;48:19-23
9. Shi C, Dai Y, Xu X, Xie Y, Liu Q. The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Expr Purif.* 2002;24:51-5.
10. Murata M, Nishimura M, Murai N, Haruta M, Homma S, Itoh Y. A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65:383-8.

## 評語

這個研究目的在於萃取具有抑制 Polyphenol oxidase 的分子，以抽真空方式，證明此抑制分子為揮發性分子，此實驗須再努力進行生化分析及化學性的鑑定。