宜蘭大學生物資源學刊（2020）16: 49-62
DOI: 10.6175/job.202012_16.0004

淨白成分抑制酪胺酸酶活性和斑馬魚胚胎黑色素生成之研究

劉祖寧 洪浚祥 陳詠善 陳淑德*

國立宜蘭大學 食品科學系

摘要

麴酸和熊果素是衛福部核准的美白成分，而白藜蘆醇亦有淨白效果，故本研究選用麴酸、熊果素及白藜蘆醇作為酪胺酸酶的抑制劑，探討其酵素抑制動力學機制，由於台灣已禁止化妝品進行動物實驗，故本研究改以利用斑馬魚胚胎作為淨白研究的平台。結果顯示在體外試驗中，100 μg/mL 的麴酸、熊果素及白藜蘆醇對酪胺酸酶的抑制率分別為 77.82%、8.72%及 59.85%。在酵素抑制動力學的部分，麴酸及熊果素均為競爭型抑制劑，而白藜蘆醇則為無競爭型抑制。進一步做動物試驗，將三種抑制劑添加於斑馬魚胚胎水溶液中，並於 72 小時後分析斑馬魚胚胎黑色素生成量，可以發現在 100 μg/mL 的濃度下，與控制組相比，浸泡於麴酸、熊果素與白藜蘆醇相對黑色素含量分別降為 65.24、53.42 與 67.38%，尤其以熊果素淨白效果最佳，和體外抑制酪胺酸酶的效果有很大的差異，故未來可使用斑馬魚胚胎作為淨白成分之篩選平台。

關鍵詞：麴酸、熊果素、白藜蘆醇、酪胺酸酶、酵素抑制動力學、斑馬魚、黑色素

*通訊作者。E-mail: sdchen@niu.edu.tw

Study on the Whitening Components on Inhibition of Tyrosinase Activity and Melanin Production in Zebrafish Embryos

Tsu-Ning Liou, Jun-Xiang Hong, Yung-Shan Chen, Su-Der Chen*

Department of Food Science, National Ilan University, Taiwan

Abstract

Kojic acid and arbutin are whitening ingredients approved by the Ministry of Health and Welfare, and resveratrol has a whitening effect. Here, koji acid, arbutin, and resveratrol were selected as model tyrosinase inhibitors to study their enzyme inhibition kinetic mechanism in this study. Since Taiwan has banned animal experiments on cosmetics, this study changed to use zebrafish embryos as an in vivo platform for whitening study. The results showed that 100 μg/mL kojic acid, arbutin, and resveratrol inhibited tyrosinase by 77.82%, 8.72%, and 59.85% in the in vitro test, respectively. Regarding enzyme inhibition kinetics, both kojic acid and arbutin were competitive inhibitors, while resveratrol seemed to be a non-competitive inhibitor. Follow-up animal experiments, inhibitors at 100 μg/mL were immersed in zebrafish embryos, and the amounts of melanin production in zebrafish embryos were analyzed 72 hours later. Compared to the control, relative contents of melanin in kojic acid, arbutin, and resveratrol decreased to 65.24, 53.42, and 67.38%, respectively. Arbutin showed the most promising whitening effect, and the effect of inhibiting tyrosinase in vitro was different. Therefore, using zebrafish embryos can be a feasible screening platform for detailed testing of whitening ingredients.

Keywords: kojic acid, arbutin, resveratrol, tyrosinase, enzyme inhibition kinetics, zebrafish, melanin

*Corresponding author. E-mail: sdchen@niu.edu.tw

壹、前言

根據世界衛生組織（WHO）的調查，在中國、菲律賓、馬來西亞、南韓等亞洲國家有超過 40%的女性有使用美白產品（Draelos, 2008）。根據經濟部統計，國內化妝品製造工廠家數逐年增加，從民國 96 年的 582 家，逐年成長至 106 年達 1038 家，且我國化妝品產業也從早期的代工，轉變至今開始結合生物技術開發自有品牌。107 年藥妝零售業銷售商品以化妝保養品占 51.5%居首位（劉，2016）。

黑色素（melanin）過度產生和累積是皮膚色素沉澱的原因，在哺乳動物中，黑色素生成是由酪胺酸酶（tyrosinase）催化，以酪胺酸（tyrosine）或 L-多巴（L-DOPA）作為基質，受酪胺酸酶氧化形成多巴醌，接著分成兩個途徑（圖 1），第一個途徑會與半胱胺酸（cysteine）或穀胱甘肽（glutathione）結合形成擬黑色素（pheomelanin），另一個則會形成真黑色素（eumelanin），此兩種黑色素一般皆統稱為黑色素。在黑色素形成過程中關鍵的主要酵素為酪胺酸酶及酪胺酸酶相關蛋白（tyrosinase-related protein 1, TRP-1）、（tyrosinase-related protein 2, TRP-2），故透過抑制黑色素生成相關的酵素及蛋白質或是藉由還原作用將多巴醌還原成多巴就能夠抑制黑色素的生成（Chang, 2009） 。

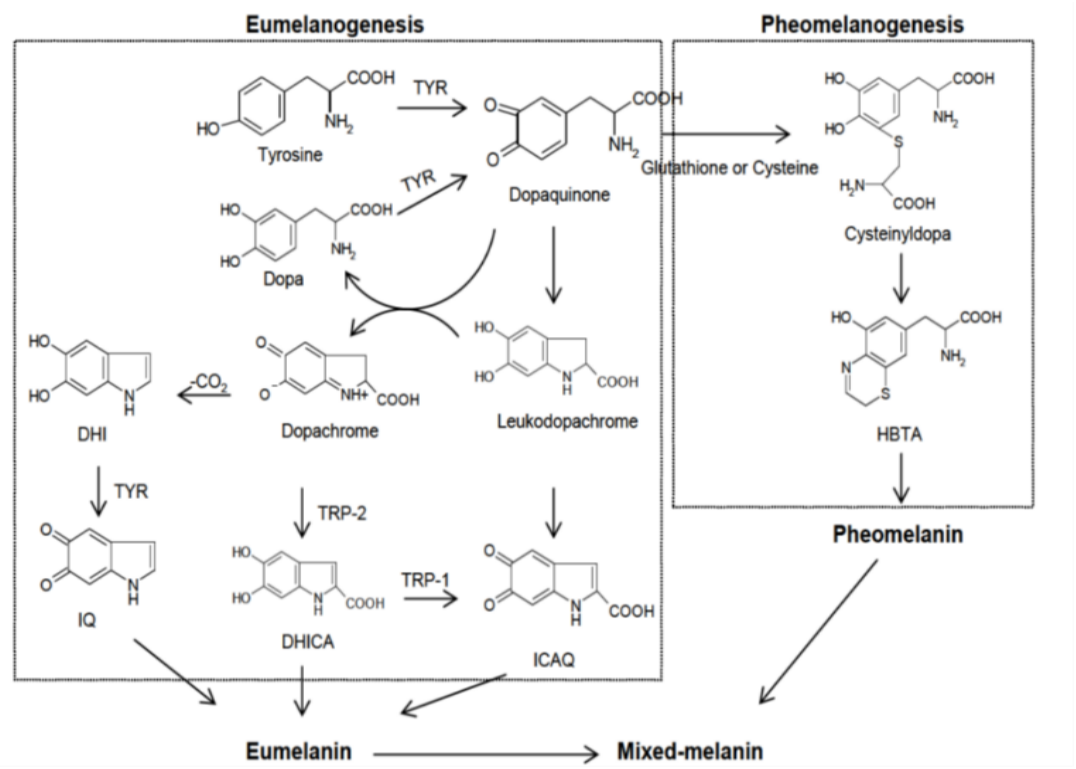


圖 1. 黑色素生物合成途徑。
Fig. 1. Biosynthetic pathway of melanin. (Chang, 2009)

酵素與基質的結合具有專一性，藉由形成酵素-基質複合物來降低反應的活化能，而酵素動力學則是在不同濃度的基質條件下，添加定量的酵素進行反應，並測定生成物的量即可得知，當抑制劑存在時，會抑制酵素的活性與反應，亦可以同樣的方法測得其酵素抑制動力學模型（莊，2000）。將基質濃度和初速度的雙倒數 1/S 和 $1/V_o$ 作 Lineweaver-Burk 圖，所得的酵素動力學線性方程式為$\frac{1}{V_o} = \frac{1}{V_{maz}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S}$，其中 y 軸的截距為最大反應速率的倒數（$1/V_{max}$），而 x 軸的截距為（$-1/K_m$），$K_m$ 為 Michaelis-Menten 常數，其的定義是達到反應初速為一半的 Vmax 時，所需的基質的濃度，此為酵素與基質間親和力指標，當兩者親和力越大時，僅需較少量的基質，即較小的 K_m 值即達到 1/2 V_{max} 的速率（邱和徐，2008）。

事實上，酵素的抑制作用在機制上可分為可逆性及不可逆性，不可逆抑制劑像是重金屬（汞、鉛等）透過與酵素結合形成穩定的複合物而降低酵素活性，然而可逆性的抑制劑與酵素結合後較容易解離，解離後酵素會回復至原本狀態，此種抑制作用主要有三種，競爭型抑制（competitive）、非競爭型抑制（noncompetitive）、無競爭型抑制（uncompetitive），以基質濃度和初速度的雙倒數 1/S 和 $1/V_o$ 作 Lineweaver-Burk 圖（圖 2），競爭型抑制劑因其構型與基質相似，並且會與基質競爭酵素的活性位置，y 軸的截距，最大反應速率（V_{max}）不改變，當抑制劑的存在下，會破壞酵素與基質的親和力，使 K_m 值增大，故由 K_m 增大程度可以反應出抑制劑的效果。非競爭型抑制劑則與基質構型不相似，而是藉由抑制劑與酵素在非活性位置的部分結合，降低酵素對基質的親和性，其 K_m 不改變。無競爭型抑制劑僅能會酵素-基質複合物結合，但對酵素本身無親和力（（Delaune and Alsayour，2020；邱和徐，2008）。

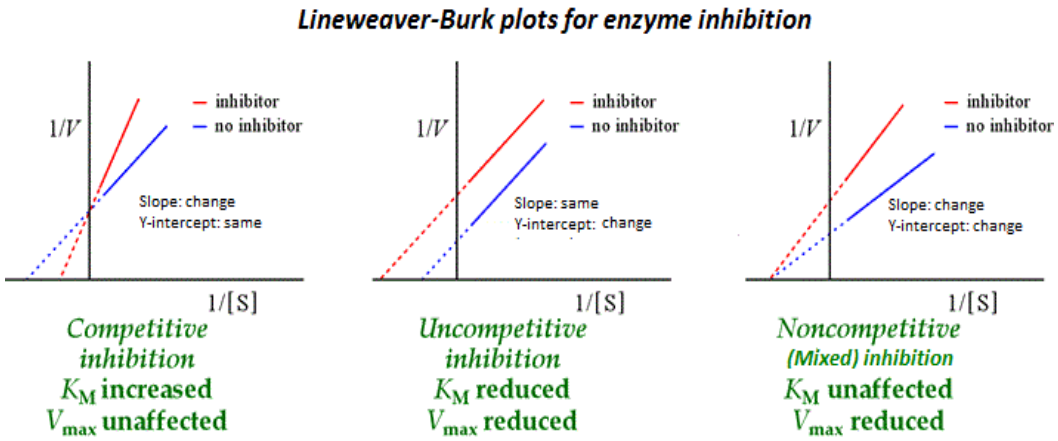


圖 2. 酵素抑制動力學模式。
Fig. 2. Models of enzyme inhibition. (Delaune and Alsayour, 2020)

目前衛福部公告核准的美白成分共有十三種（表 1），包括麴酸、熊果素、維生素 C 衍生物以及洋甘菊精等。主要功能分為兩大類，分別為抑制黑色素形成及兼具抑制黑色素形成與促進已產生的黑色素淡化，其中麴酸、熊果素最常被用於研究中作為正對照組使用，此兩種美白成分皆能有效抑制酪胺酸酶活性，但是有些美白成分臨床效果差、具皮膚刺激性，可能引起紅斑、過敏等副作用，所以目前正積極尋找高效果、低副作用的天然酪胺酶抑制劑。白藜蘆醇可抑制细胞增殖，對细胞內酪胺酸酶活性有明顯抑制作用，能明顯減少细胞內黑色素的含量，而達成美白的作用 （史等，2011）。

表 1. 衛生福利部目前核准使用之 13 種美白成分（衛生福利部，2008）
Table 1. 13 kinds of whitening ingredients currently approved by the Ministry of Health and Welfare

成　分	常見俗名	限　量	用　途
kojic acid	麴酸	2%	美白
arbutin	熊果素	7%	美白（製品中所含之不純物 hydroquinone 應在 20 ppm 以下）
ascorbyl glucoside	維生素 C 糖苷	2%	美白
ascorbyl tetraisopalmitate	抗壞血酸四異棕櫚酸酯（脂溶性維生素 C）	3.0 %	抑制黑色素形成（含藥化粧品）
3-o-ethyl ascorbic acid	3-o-乙基抗壞血酸	1.0~2.0%	抑制黑色素形成及防止色素斑的形成，美白肌膚
sodium ascorbyl phosphate	維生素 C 磷酸鈉鹽	3%	美白
magnesium ascorbyl phosphate	維生素 C 磷酸鎂鹽	3%	美白
chamomile ET	洋甘菊精	0.50%	防止黑斑、雀斑
5,5’-dipropyl-biphenyl-2,2’-diol	二丙基聯苯二醇	0.50%	抑制黑色素形成、防止黑斑雀斑（美白肌膚）
cetyl tranexamate HCl	傳明酸十六烷基酯	3 %	抑制黑色素形成及防止黑斑雀斑，美白肌膚
tranexamic acid	傳明酸	2.0~3.0%	抑制黑色素形成及防止色素斑的形成
potassium methoxysalicylate	甲氧基水楊酸鉀	1.0~3.0%	抑制黑色素形成及防止色素斑的形成，美白肌膚
ellagic acid	鞣花酸	0.50%	美白

針對淨白活性物質之測試平台，過去是利用小鼠的黑色素瘤細胞或小鼠的皮膚，此測試的成本高、耗時長和操作複雜，且已有多個國家立法禁止將實驗動物用於化妝品試驗，且台灣衛福部化粧品衛生安全管理法亦於 2018 年 5 月 2 日，已於第六條明文禁止國內化妝品原料或產品進行動物實驗。因此科學家將注意開始以斑馬魚動物模式為取代評估平台上面，基於斑馬魚胚胎於 120 小時內無法自主獨立進食的原因，此符合歐洲聯盟指令（EU Directive 2010/63/EU）保護用於科學目的之動物規定:「最早的生命階段並不在此動物規範內」（Strähle et al., 2012）。斑馬魚（Danio rerio）為鯉科硬骨魚，是一種常見的淡水魚，斑馬魚胚胎作為研究模型的優點是胚胎透明、易觀察到發展中的器官，且胚胎發育快速，大約兩天過後，所有跟脊椎動物相關的身體特性都可以被觀察到，且斑馬魚的基因已組定序完成（Ferreira et al., 2011），研究發現其基因組與人類相似，斑馬魚基因組中約有 70%可於人類基因找到對應的序列，而與人類疾病相關的潛在基因則達到 82%（De Souza Anselmo et al., 2018）。利用斑馬魚胚胎作為動物淨白測試的平台，具有胚胎透明、發育快速、成本便宜、遺傳易處理性，且較能顧及動物福祉，也讓此種動物模式逐漸受到歡迎（Lajis，2018；陸等 2015）。事實上，此平台應用上，Hsu 等（2016）亦曾利用斑馬魚胚胎測試靈芝菌絲萃取物對酪胺酶之抑制效果。

本研究之目的為研究麴酸、熊果素和白藜蘆醇淨白成分對體外的抑制酪胺酸酶之動力學和其對於體內的斑馬魚胚胎的之淨白效果，更試圖為未來美白商品提出有效評估分析之模式案例範本。

貳、材料和方法

一、材料

麴酸（kojic acid）、熊果素（arbutin）、白藜蘆醇（resveratrol）、酪胺酸（L-tyrosine）、酪胺酸酶（tyrosinase）、二氯螢光黃乙酸乙酯染色劑（2’7’-dichlorofluorescin diacetate，DCF-DA）、氫氧化鈉（NaOH）購自 Sigma Chemical Co.（St. Louis，MO，USA）。野生種斑馬魚(Wild type AB)購自台灣斑馬魚中心中央研究院分支(TZCAS，Taipei，Taiwan)。ELISA 平底 96 微孔盤（90015-2NB）購自龍冶股份有限公司（桃園，台灣）。Tissue PE LB™ 購自 G-Biosciences （Maryland Heights，MO，USA）。過氧化氫（H2O2）購自日本和光純藥工業株式會社(大阪，日本)。Protease inhibitor cocktail tablets 購自 Roche(BL，CH)、0.22 μm 針頭過濾器購自 Advangene Consumables（Lake Bluff，IL，USA）。

二、設備

烘箱（Channel DCM-45，台灣）、減壓濃縮機（Eyela Oil Bath Osb-2000，Japan）、離心機（Hsiangtai Centrifuge，頤樺公司，台灣）、高速離心機（Hsiangtai Centrifuge，頤樺公司，台灣）、震盪機（Vortex Genie 2，USA）、電子精秤（Sartorius，頤樺公司，台灣）、分光光度計（Model U-2001，Hitachi Co.，Japan）、洗淨式超音波機（DC-600H，Delta，台灣）、盤式分光光度計（ChroMate4300，岑祥股份有限公司，台灣）、立體顯微鏡（SMZ745T，聖川實業有限公司，台灣）、螢光分光光度計（VictorTM X2 Multicable Plate Reader，Perkin-Elmer Co. Ltd.，Shelon, USA）、真空微波濃縮萃取機（康倍得機械股份有限公司，台灣）、2L 產卵配對缸（20.5*10.5*10 cm）購自邰港科技全球實驗魚公司（新北，台灣）。

三、酪胺酸酶活性及抑制動力學

（一）酪胺酸酶活性分析（Masuda et al., 2005）

依藥品上標示之活性單位（unit/mg）取適量酪胺酸酶以 0.1M（pH 6.8）磷酸緩衝溶液（PBS）配置成 250 unit/mL 之酪胺酸酶溶液，儲放於 4℃冰箱備用;精秤 30 mg 酪胺酸（L-tyrosine）溶於 100 mL 磷酸緩衝溶液，為 300 mg/L 酪胺酸基質溶液。於 ELISA 平底 96 微孔盤中依序添加：（A）120 μL 0.1M PBS+40 μL tyrosinase（250 unit/mL）、（B）160 μL PBS、（C）80 μL PBS + 40 μL tyrosinase+40 μL sample、（D）120 μL PBS+40 μL sample，於室溫（25℃）下反應 10 min 後，再添加 40 μL 300 mg/L tyrosine，混合均勻反應 10 min，以波長 475 nm 測定其吸光值，藉由公式計算酪胺酸酶的抑制率。

計算公式：Tyrosinase inhibition（%）=（（A-B）–（C-D））/（A-B）× 100%

（二） 抑制酪胺酸酶活性之動力學

將酪胺酸配製成不同濃度（150、200、250、300 和 400 μg/mL）取 200 μL，加入 400 μL 0.1 M 磷酸緩衝溶液，再加入 400 μL 250 unit/mL 酪胺酸酶，使總體積為 1 mL 並放入塑膠比色槽中混合均勻，在波長 475 nm 下，每分鐘記錄一次吸光值，直到 5 min 停止，並以時間對吸光值作圖，以斜率決定初速度。

將酪胺酸配製成不同濃度（150、200、250、300 和 400 μg/mL）取 200 μL，加入 200 μL 0.1 M pH6.8 磷酸緩衝溶液及 200 μL 抑制劑，再加入 400 μL 250 unit/mL 酪胺酸酶，使總體積為 1 mL 並放入塑膠比色槽中混合均勻，在波長 475 nm 下，每分鐘記錄一次吸光值，直到 5 min 停止，再以時間對吸光值作圖。

四、斑馬魚胚胎之動物試驗

（一） 斑馬魚飼養與受精卵之收集（Westerfield, 2000）

野生種之斑馬魚飼養於外掛式循環水系統之魚缸中，公母魚分缸飼養，每缸 12 隻，水溫維持於 28±2℃，並調節光週期為 14 小時光照，10 小時黑暗，每天餵食兩次，換水一次，每次換水 1/3。欲產卵的前一天晚上，將一母魚兩公魚置於中間有隔板之產卵缸中，並保持黑暗，於隔天光照時拉開中間隔板，使公魚追逐母魚產卵，約 30 min 收集底部之魚卵。

（二） 斑馬魚胚胎的淨白測試

每組選用 50 顆 6 hpf 的斑馬魚胚胎浸泡於 100 μg/mL 待測試樣品液中，浸泡 72 h 後（78 hpf），以 RO 水清洗三次，進行拍照及黑色素含量試驗，以浸泡 RO 水處理為空白對照組。

（三） 斑馬魚胚胎黑色素含量試驗 （Hsu et al., 2016）

清洗後的斑馬魚胚胎需吸乾 RO 水以 1 mL 含有蛋白酶抑制劑的 PE LB Tissue Buffer 裝入微量離心管中，經超音波震盪 30 min，以 10000 g 離心 15 min，將上層液體倒出，再添加 1 mL 1 N NaOH 於 100℃下回溶 1 小時，並將溶解後的黑色素以 0.22 μm 針頭過濾器過濾，於 96 孔盤中每孔添加 200 μL，以盤式分光光度計在波長 405 nm 測吸光，並將測得之吸光值帶入合成黑色素標準曲線，求得相對黑色素含量。

五、統計分析

檢驗結果三重複，並以平均值±標準偏差表示，所得之數據使用 Statistical Package for Social Science（SPSS, SPSS INC.宏德國際軟體諮詢顧問有限公司）20.0 版統計套裝軟體進行統計分析，以多元全距檢定分析（Duncan’s Multiple Range Test），以顯著水準為 $P<0.05$，以較其差異之顯著性。

參、結果與討論

一、酪胺酸酶之抑制作用

由圖 3 所示，三種淨白成分針對酪胺酸酶活性抑制率，濃度在 100 μg/mL，以麴酸抑制效果最佳達 77.8%，白藜蘆醇次之達 59.9%，熊果素最差只有 8.7%，而濃度在 50 μg/mL 下，麴酸、熊果素和白藜蘆醇的酪胺酸酶活性抑制率分別為 51.6%, 6%和 56.4%，顯著較濃度 100 μg/mL 為低，當濃度增至 250 μg/mL 其中麴酸和熊果素對酪胺酸酶活性抑制率可提升至 87.6%和 22.5%，但白藜蘆醇並無顯著差異。進一步分析這三種麴酸、

熊果素和白藜蘆醇淨白成分抑制酪胺酸酶之動力學，首先取得在不同濃度酪胺酸下的初速度，再依 Lineweaver-Burk 取 1/S 和 $1/V_o$ 雙倒數作圖，如圖 2 所示，當添加抑制劑時，不會影響酵素最大反應速率者，即為競爭性抑制劑，故由圖 4 和圖 5 分別添加麴酸和熊果素抑制劑，其線性迴歸直線的 y 軸截距和無抑制時的截距相近，即呈現相近的最大反應速率，故為競爭性抑制作用，當增加抑制劑濃度增加時，則酪胺酸和酪胺酸酶的親和性將下降低，而 K_m 值會隨之變大，表示需要更多的酪胺酸才能克服抑制劑的添加，而達到相同最大反應速率（V_{max}）。進一步比較添加麴酸和熊果素抑制劑的濃度，添加的濃度上麴酸明顯低於熊果素，顯示相較於熊果素，麴酸有較好的抑制效果，此與體外酪胺酶活性抑制實驗中，相同濃度下，麴酸的抑制力較熊果素佳有相同的趨勢。

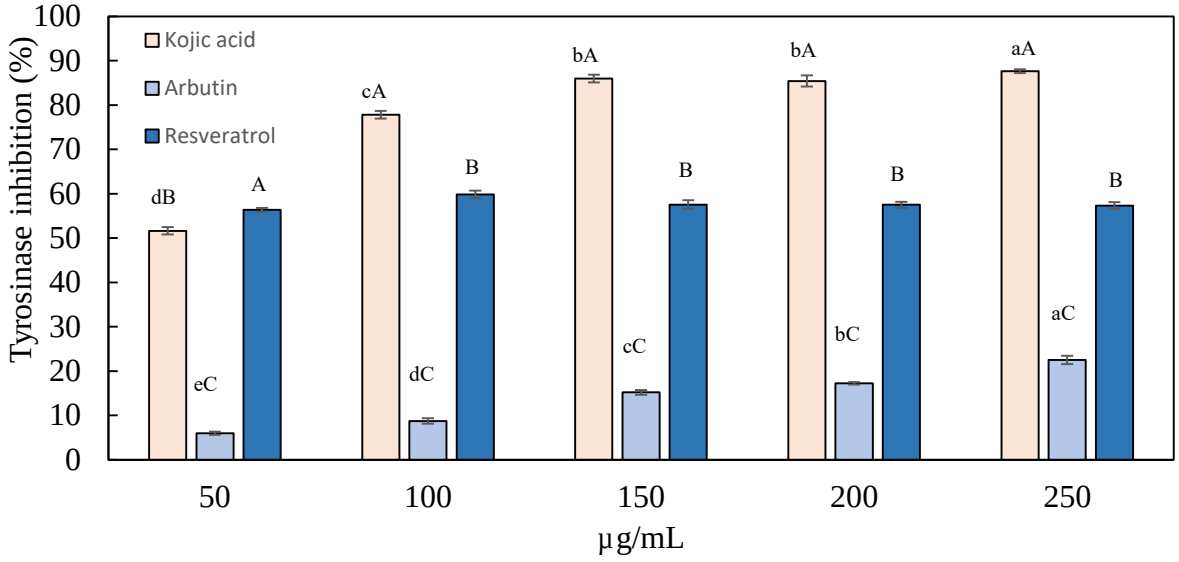
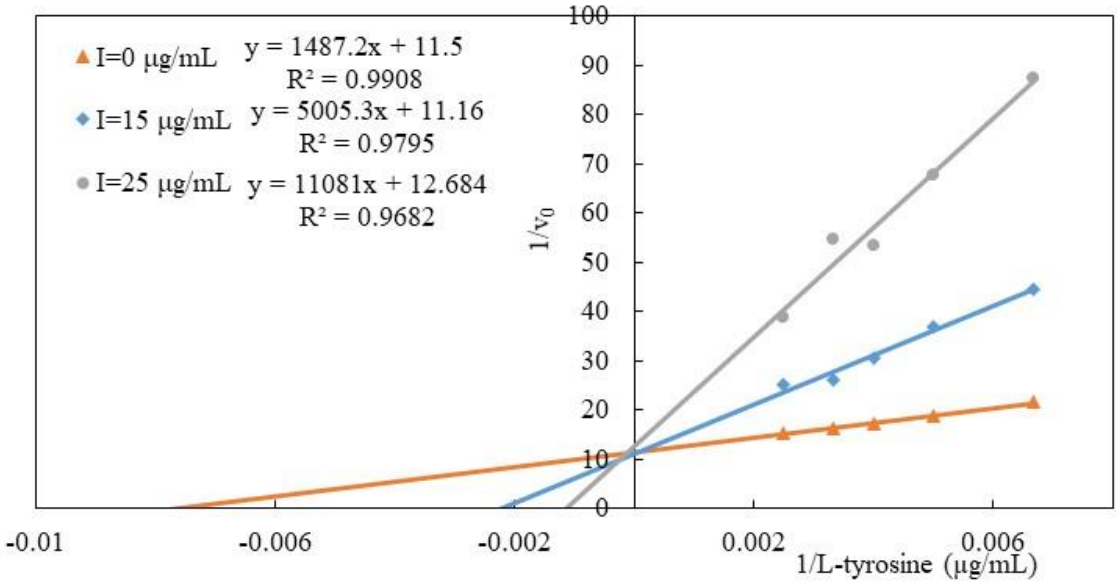


圖 3. 不同濃度的麴酸、熊果素和白藜蘆醇對酪胺酸酶活性抑制率。

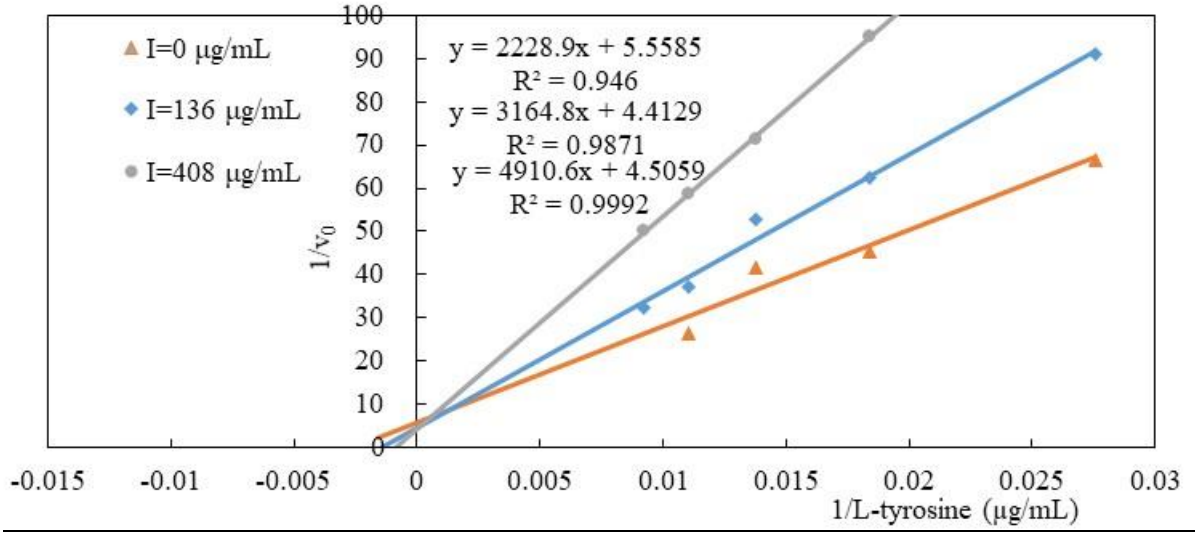
Fig. 3. Effect different concentration of kojic acid, arbutin and resveratrol on tyrosinase inhibition. Data are expressed as mean ± S. D. (n=3). [a-e] Means with different superscript were significantly different ($p<0.05$). [A-C] Means with different superscript among the same concentration were significantly different ($p<0.05$).

麴酸是由麴菌或青黴菌中得到，可藉由螯合酪胺酸酶上的銅離子，達到降低其活性之效果，進而減少黑色素產生，而據文獻指出，麴酸的酵素抑制動力學機制為混和型或競爭型抑制（Deri, 2016; Chen et al., 1991）。另外熊果素為對苯二酚類配醣體，目前所知的熊果素有三種，分別為 α、β 及去氧化態型熊果素（deoxyarbutin），一般大家所熟知的熊果素為 β-arbutin，其結構為葡萄糖基的 β 位接一個酚基，因結構與酪胺酸類似，其酵素抑制動力學機制為競爭型抑制，藉由與基質競爭酪胺酸酶的活性位置，使酵素無法與基質進行反應，進而抑制酪胺酸酶產生黑色素（邱和徐，2008; Maeda and Fukuda, 1996）。



Inhibitor (μg/mL)	Without Inhibitor	15 μg/mL Kojic aicd	25μg/mL Kojic aicd
K_m (μg/mL)	129.3	448.5	873.6
V_{max}	0.087	0.090	0.079
Inhibition type		Competitive inhibition	

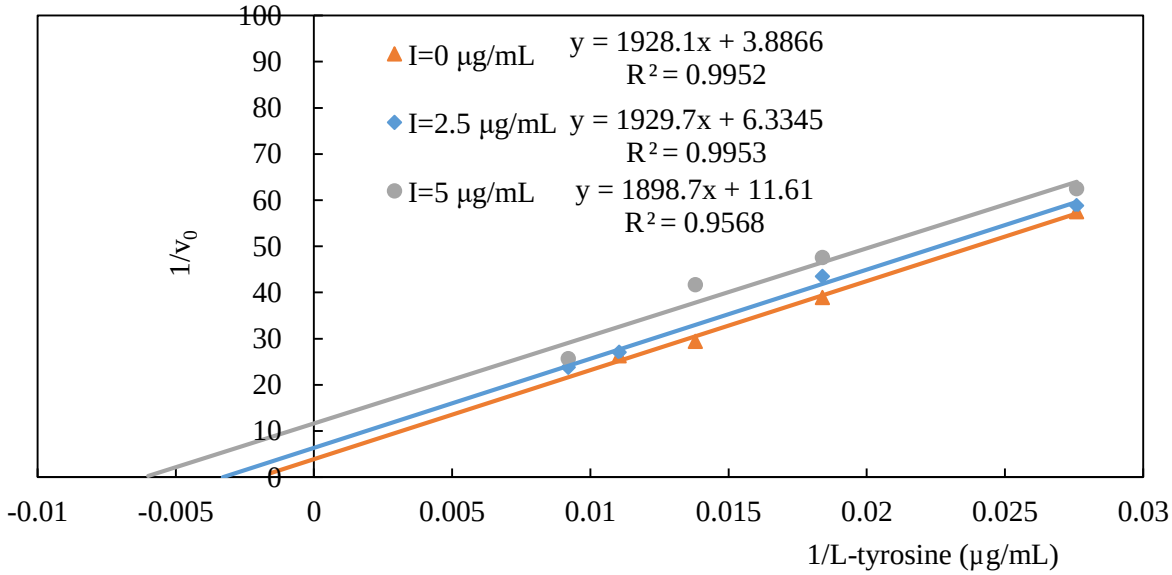
圖 4. 麴酸對酪胺酸酶活性的 Lineweaver-Burk 雙倒數圖。
Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of tyrosinase activity in the presence or absence of kojic acid.



Inhibitor (μg/mL)	Without Inhibitor	Arbutin 136 μg/mL	Arbutin 408 μg/mL
K_m (μg/mL)	401.0	717.2	1089.8
V_{max}	0.180	0.222	0.227
Inhibition type		Competitive inhibition	

圖 5. 熊果素對酪胺酸酶活性的 Lineweaver-Burk 雙倒數圖。
Fig. 5. Lineweaver-Burk plots of tyrosinase activity in the presence or absence of arbutin.

反式白藜蘆醇近年來以其抗氧化、抗心血管疾病、抗癌、調整脂質代謝等功效聞名（Frémont, 2000），添加白藜蘆醇的（圖 6），以 Lineweaver-Burk 作圖，以 1/S 和 $1/V_o$ 作圖，和未添加白藜蘆醇時，呈現平行的情形，顯示當提高白藜蘆醇的濃度時，最大反應速率（V_{max}）和 K_m 值皆變小，故此為無競爭性抑制反應，表示此抑制劑只會與酵素-基質複合物結合，在高濃度的基質，甚至有利於抑制劑的結合。除此之外，白藜蘆醇並具有顯著的美白效果，可用於化妝品中使用，達到減少黑色素產生的效果（Yoon et al., 2019）。



Inhibitor（μg/mL）	Without Inhibitor	Resveratrol 2.5 μg/mL	Resveratrol 5 μg/mL
K_m （μg/mL）	496.0	304.6	163.5
V_{max}	0.257	0.157	0.086
Inhibition type		Uncompetitive inhibition	

圖 6. 白藜蘆醇對酪胺酸酶活性的 Lineweaver-Burk 雙倒數圖。
Fig. 6. Lineweaver-Burk plots of tyrosinase activity in the presence or absence of resveratrol.

二、斑馬魚胚胎黑色素的形成

由圖 7 為浸泡 72 小時後斑馬魚外表的結果顯示，相較於控制組，是以浸泡 100 μg/mL 熊果素的斑馬魚所呈現的黑色素較少，顏色較淡，熊果素在斑馬魚體內試驗和圖 3 體外抑制酪胺酸酶的結果有非常大的差異，此由於熊果素會有效抑制黑色素合成相關基因表達，而減少酪胺酸酶的生成，進而抑制黑色素的合成，而非只是抑制酪胺酸的活性（陸等，2015）。然而浸泡 100 μg/mL 白藜蘆醇和麴酸的斑馬魚胚胎皆較控制組的顏色為淡，且觀察其外表的黑色度較相近，此和圖 3 體外抑制酪胺酸酶活性之效果相近。

表 2 是進一步針對 50 和 100 μg/mL 的麴酸、熊果素和白藜蘆醇浸泡 72 小時後的斑馬魚作黑色素含量分析，以控制組作 100%，則當濃度僅為 50 μg/mL 時，麴酸、熊果素

和白藜蘆醇的相對黑色素含量分別降為 78.09%、83.38%和 75.76%，然而斑馬魚浸泡淨白成分的濃度增為 100 μg/mL 時，麴酸、熊果素和白藜蘆醇的相對黑色素含量都較 50 μg/mL 更降低，分別顯著降為 65.24%、53.42%和 67.38%，且以熊果素的淨白效果較佳，而麴酸和白藜蘆醇二者的淨白效果無顯著差異，此和圖 7 觀察斑馬魚外表的結果相近，比較斑馬魚的體內試驗以熊果素淨白效果最佳，和體外抑制酪胺酸酶的效果有很大的差異。隨著熊果苷濃度增加，可透過抑制黑色素合成相關基因，如:酪胺酸酶，進而降低黑色素含量（陸等，2015），故建議未來可使用斑馬魚胚胎作為淨白成分之篩選平台。

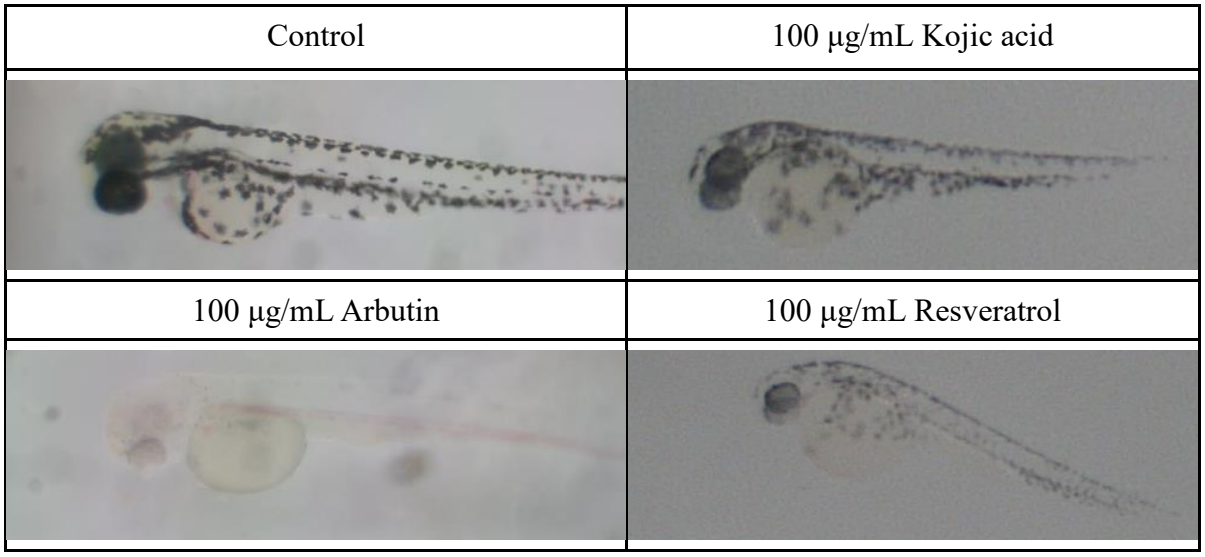


圖 7. 控制組及100 μg/mL麴酸、熊果素、白藜蘆醇的78 hpf斑馬魚胚胎相片。
Fig. 7. Depigmenting effect of control, 100 μg/mL kojic acid, arbutin and resveratrol of zebrafish embryos treated at 78 hpf (72 h treatment).

表 2. 50 和 100 μg/mL 淨白成分對斑馬魚體內黑色素的淨白效果
Table 2. The whitening effect of 50 and 100 μg/mL whitening components on the melanin in zebrafish

Treatment	Concentration （μg/mL）	Relative melanin （%）
Control	-	100±0.23[a]
Kojic acid	50	78.09±0.44[b]
	100	65.24±0.51[d]
Arbutin	50	83.38±0.11[b]
	100	53.42±0.84[e]
Resveratrol	50	75.76±0.35[c]
	100	67.38±3.49[d]

Data were expressed as mean ± S. D. （N=4）.
[a-e] Means with different superscript were significantly different （$p<0.05$）.

肆、結 論

抑制酪胺酸酶活性的效果，依次為麴酸、白藜蘆醇和熊果素，其酵素動力學分別為競爭型、無競爭型和競爭型的抑制作用。然而以斑馬魚胚胎的黑色素生成之動物試驗平台，以 100 μg/mL 較 50 μg/mL 顯著較黑色素生成量為低，且比較 100 μg/mL 三種淨白成分，則以熊果素抑制效果最佳，和體外的抑制酪胺酸酶之活性的效果不相同，以斑馬魚胚胎實驗動物模型作為淨白測試平台，於後續美白可能樣品提出可行有效之評估指標參數。

誌　謝

感謝農委會 107 農科-13.4.1-科-a3 計畫經費支持得以完成建立斑馬魚胚胎淨白測試平台。

參考文獻

史先敏、嚴澤民、謝靜紅、周華鋒、何宏軒、段明星。2011。白藜蘆醇美白功效的初步研究。香料香精化妝品 5：37-39。

邱嘉玲、徐照程。2008。三種美白劑的抑制酪胺酸酶動力學研究。弘光學報 54：115-126。

陸彬、樓鴛鴦、陳楚楚、章超男、徐超、方兆華。2015。熊果苷與斑馬魚胚胎黑色素合成的研究。湖南科技大學學報（自然科學版）30：116-120。

劉依蓁。2016。皮膚保養機能性產品產業趨勢分析。財團法人台灣經濟研究院。

莊榮輝。2000。生化實驗，S3-1；台灣大學農業化學系；中華民國，台北市。

Chen, J. S., C. Wei, R. S. Rolle, W. S. Otwell, M. O. Balaban, and M. R. Marshall. 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. J. Agric. Food Chem. 39: 1396-1401.

Chang, T. S. 2009. An updated review of tyrosinase inhivitors. Int. J. Mol. Sci. 10: 2440-2475.

Deri, B., M. Kanteev, M. Goldfeder., D. Lecina, V. Guallar, N. Adir, and A. Fishman. 2016. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. Sci. Rep. 6: 1-10.

De Souza Anselmo, C., Sardela V. F., De Sousa V. P., and H. M. G. Pereira. 2018. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in human? Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol & Pharmacol. 212: 34-46.

Delaune K. P., and Alsayouri K. 2020. Physiology, Noncompetitive Inhibitor. *StatPearls*, from: https://goo.gl/images/fkvJ8G.

Draelos, Z. D. 2008. The cosmeceutical realm. Clin Dermatol. 26: 627-632.

Ferreira, C. V., M. A. Sartori-da-Silva, and G. Z. Justo. 2011. Zebrafish as a suitable model for evaluating nanocosmetics and nanomedicines. In 'Nanocosmetics and Nanomedicines' (pp. 239-251). Springer, Berlin, Heidelberg.

Frémont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. Life Sci. 66: 663-673.

Hsu, K. D., H. J. Chen, C. S. Wang, C. C. Lum, S. P. Wu, S. P. Lin, and K. C. Cheng. 2016. Extract of *Ganoderma formosanum* mycelium as a highly potent tyrosinase inhibitor. Sci. Rep. 6: 32854.

Lajis, A. F. 2018. A zebrafish embryo as an animal model for the treatment of hyperpigmentation in cosmetic dermatology medicine. Medicina 54: 1-31.

Maeda, K. and M. Fukuda. 1996. Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in numan melanocyte culture. J. Pharmacol. Exp. Ther. 276: 765-769.

Masuda, T., D. Yamashita, Y. Takeda, and S. Yonemori. 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69: 197-201.

Strähle, U., S. Scholz, R. Geisler, P. Greiner, H. Hollert, S. Rastegar, A. Schumacher, I. Selderslaghs, C. Weiss, H. Witters, and T. Braunbeck. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments - A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod. Toxicol. 33: 128-132.

Westerfield, M. 2000. The xebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., University of Oregon Press. Eugene.

Yoon, M, Y., J. S. Moon, and S. H. You. 2019. A study on resveratrol on the antioxidative and whitening cosmeceutical ingredients. Indian J. 19: 609-615.

109年 11月 17日 投稿
110年 12月 31日 接受