



國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝暨景觀學系

碩士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

冷凍處理香蕉皮萃取物中

影響酪胺酸酶活性之成分分析與分離

Analysis and identification of compounds affect to
tyrosinase activity from frozen banana peel extracts

柯昱安

Yu-An Ko

指導教授：徐源泰 博士

Advisor: Yuan-Tay Shyu, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July 2014



謝誌

首先感謝指導教授 徐源泰博士兩年來悉心的指導及驅策；實驗室豐厚的研究資源，讓我能安心研究、順利完成論文，成為老師的學生，真是萬分幸運。由衷感謝口試委員曾文聖老師、陳增蔚經理、劉育姍老師、吳思節老師於百忙中撥冗審閱論文並給予寶貴建議及指正。

實驗研究期間，尤其感謝曾文聖老師指點實驗的正確方向並於論文校正期間不厭其煩的檢查與修正。感謝王自存老師、許輔老師、吳俊達老師於專題討論時給予實驗、論文撰寫上的建議與鼓勵。感謝食品科技研究所羅翊禎老師於分析純化實驗上的教導，如邦學長、英傑的協助與建議。感謝臺灣大學生物資源暨農學院共同儀器中心林佩吟博士於液相層析質譜儀的技術協助及數據分析的教學。感謝展才學長於實驗及論文上的提點。感謝四研每位夥伴的相伴，謝謝學長姐們思節、彥惠、宜庭、王薰、瑾霏、思佩、俞文、淳皓、騰弘，在你們身上我學到很多，不只是實驗技巧，還有待人處事的道理，可謂我的心靈導師。感謝同窗好友馥鴻、家賢於研究生涯的支持與陪伴，讓深夜的實驗室並不孤單。謝謝學弟妹冠妤、明謙、英維、逸婷為實驗室帶來滿滿的歡笑與快樂。感謝一研的可鈞學姊、瑜珊、季霖、柏羽、學弟偉齊總是即時的幫助。也謝謝園藝系各位夥伴於實驗及生活上的分享、協助。感謝在我研究生涯中幫助、支持我的每位好友們。

最感謝的仍是我的家人，爸爸、媽媽、哥哥，永遠支持我，在求學的路途上讓我無後顧之憂的學習。謹以此論獻給我摯愛的家人及所有關心、愛護我的人，謝謝。

柯昱安 謹誌於國立台灣大學園藝暨景觀學研究所

中華民國一零三年七月

中文摘要



香蕉為 (*Musa sapientum* L.) 芭蕉科 (Musaceae) 芭蕉屬 (*Musa*) 多年生草本植物，是台灣重要經濟作物。香蕉皮佔香蕉總重量約 40%，為加工、農業廢棄物，常被蕉農作為飼料及肥料，然因香蕉皮富含水分及氮磷易造成微生物滋生等環境問題，先前研究顯示香蕉皮含多種機能性物質，尤其是抗氧化物質。本研究以比色法檢測多巴色素生成量，探討香蕉皮經 -20°C 冷凍處理及萃取物製備過程使用 40°C 、 70°C 減壓濃縮甲醇及水萃取物對酪胺酸酶活性之影響。結果顯示香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物在濃度為 8 mg/mL 增進 69.75% 之多巴色素生成； 70°C 減壓濃縮組在相同濃度下，增進 9.15% 多巴色素生成。 -20°C 冷凍處理 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物在濃度為 8 mg/mL 時，減少 24.36% 多巴色素生成；同濃度下， -20°C 冷凍處理經 70°C 減壓濃縮組減少 48.41% 多巴色素生成。冷凍處理香蕉皮甲醇萃取物均能減少多巴色素之生成，能抑制酪胺酸酶之活性，且為不競爭型 (uncompetitive) 之抑制。經有機溶劑依極性分層，香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇-正丁醇區分層萃取物增進 79.15% 多巴色素之生成，而 -20°C 冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇-正丁醇區分層萃取物降低 53.74% 多巴色素生成。 -20°C 冷凍處理香蕉皮甲醇-正丁醇區分層萃取物內之化合物可能是造成酪胺酸酶催化生成多巴色素量變化的原因，而化合物成分需進一步鑑定分析。

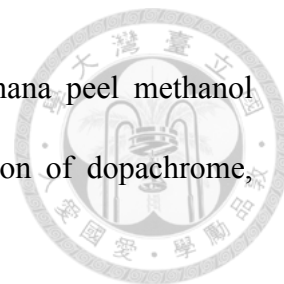
關鍵字：香蕉皮、酪胺酸酶、多巴色素、不競爭型抑制動力學、液液萃取區分

Abstract



Banana (*Musa sapientum* L.) is a perennial herbaceous plant of the family Musaceae and genus *Musa*, and it is an important cash crop in Taiwan. Banana peel, which accounts for about 40% of the total weight of banana fruit, is the by-product of the banana processing and agricultural industry. The peels are often used as feed and fertilizer. Previous studies have shown that banana peel is rich in functional compounds. However, due to its high nitrogen and phosphorus content, and high water content, this by-product is becoming a burden to environment. In this study, banana peel and frozen banana peel were used as materials for water and methanol extraction, which include concentration at 40° C or 70° C, to obtain six different extracts. The colorimetric detection of Dopachrome producing capacity is use to evaluate the effect of tyrosinase activity of six samples. The results showed that banana peel methanol extract with concentration 8 mg/mL which concentrated at 40°C displayed 69.75% higher in the dopachrome production. Banana peel methanol extract with concentration 8 mg/mL which concentrated at 70°C displayed 9.15% higher in the dopachrome production. Frozen banana peel methanol extract with concentration 8 mg/mL which concentrated at 40°C reduced 24.36% of dopachrome production, and with the same concentration which concentrate at 70°C reduced 48.41% dopachrome production of the same concentration. Therefore, frozen banana peel is found the inhibitory activity to tyrosinase, and it is uncompetitive inhibitor to tyrosinase. After liquid-liquid partition by organic solvents, butanol fraction of banana peel methanol extract concentrated at 40°C has 79.15% higher in dopachrome production, and butanol fraction of frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C reduced 53.74% dopachrome

production. The compounds in the butanol fraction of frozen banana peel methanol extracts concentrated at 40°C may cause changes in the production of dopachrome, which need to be further identified.



Keywords: Banana peel, tyrosinase, dopachrome, uncompetitive inhibition kinetics, liquid-liquid partition

目錄



中文摘要	I
Abstract.....	II
目錄	IV
圖目錄	VI
表目錄	VIII
第一章、前言	1
第二章、文獻回顧	2
第一節、 香蕉	2
一、簡介	2
二、香蕉皮中機能性成分	3
三、香蕉功效	9
四、 香蕉皮其他應用	9
五、 香蕉之凍害	11
第二節、 酪胺酸酶 Tyrosinase.....	13
一、 簡介	13
二、 酪胺酸酶抑制劑.....	18
第三章、材料與方法	28
第一節、 實驗目的	28
第二節、 實驗架構	28
第三節、 香蕉皮以不同溶劑萃取及區分層之製備	29



一、 材料萃取前製備	29
二、 材料萃取	29
三、 製備香蕉皮萃取物區分層	30
第四節、 樣品測試	32
一、 體外酪胺酸 酶 活性試驗	32
二、 酵素抑制動力學	33
第五節、 香蕉皮萃取物成分分析	34
一、 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析香蕉皮萃取物	34
二、 串聯式質譜儀 (ESI-MS/MS) 分析香蕉皮萃取物	36
第六節、統計分析	37
第四章、結果與討論	38
第一節、 萃取物之萃取率	38
第二節、 體外酪胺酸 酶 活性試驗	41
第三節、 酵素抑制動力學試驗	44
第四節、 香蕉皮甲醇萃取物之液液萃取區分	47
第五節、 香蕉皮甲醇萃取物有機溶劑分層萃取物之體外酪胺酸 酶 活性試	50
第六節、 香蕉皮萃取物成分分析	57
第五章、總結	66
第六章、參考文獻	68

圖目錄



圖一、香蕉近十年栽種面積	2
圖二、香蕉中分離出之植物化學成分結構	7
圖三、酪胺酸酶活性中心的雙核銅中心結構	16
圖四、酪胺酸酶催化單酚羥化及鄰苯二酚之氧化的循環	16
圖五、黑色素之生合成途徑	17
圖六、天然來源之酪胺酸酶抑制劑結構	20
圖七、人工合成及天然化合物衍生物之酪胺酸酶抑制劑結構	21
圖八、半胱胺酸及抗壞血酸還原多巴醌以抑制酪胺酸酶之酵素性褐變	21
圖九、可逆性抑制劑作用機制	22
圖十、實驗架構	28
圖十一、香蕉皮萃取物製備方式	32
圖十二、不同處理條件之香蕉皮萃取物對酪胺酸酶活性之影響	43
圖十三、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M).....	45
圖十四、冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M).....	46
圖十五、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP40M) 有機溶劑分層萃取物.....	53
圖十六、香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP70M) 有機溶劑分層萃取物.....	54
圖十七、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M) 有機溶劑分層萃取物	55
圖十八、冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M) 有機溶劑分層萃取物	56

圖十九、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物之高效能液相層析在波長 254、280、330 nm 之圖譜	58
圖二十、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物之高效能液相層析在波長 254、280、330 nm 之圖譜	59
圖二十一、自冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物 HPLC 收集之流洗液質譜分析圖	62
圖二十二、(A)香蕉皮、(B)冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物之 HPLC-PDA-MS 之正電質譜訊號圖	63
圖二十三、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物於 HPLC-PDA-MS 滯留第十四分鐘之質譜掃描訊號圖	64
圖二十四、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物於 HPLC-PDA-MS 滯留第十一分鐘之質譜掃描訊號圖	65

表目錄



表一、香蕉皮與果肉中不同成熟階段之抗氧化植物化學成分含量	6
表二、香蕉皮不同成熟時期之脂肪酸組成	8
表三、新鮮水果蔬菜對凍害之敏感度	12
表四、各種酪胺酸酶之特性	15
表五、天然來源化合物酪胺酸酶抑制活性之簡介	25
表六、植物萃取之美白成分活性	26
表七、衛生署公佈之美白成分及規定濃度	27
表八、香蕉皮及冷凍香蕉皮之萃取率	40
表九、香蕉皮及冷凍處理組甲醇萃取物有機溶劑之區分層萃取率	49

第一章、前言



酵素性褐變造成農、漁產品之品質劣變及營養價值降低；在人體中則造成黑色素之生成，不正常之黑色素累積會造成美觀上的問題。催化酵素性褐變的主要酵素為酪胺酸酶，又稱為多酚氧化酶，具有單酚酶活性及二酚酶活性，催化兩種反應，分別為酪胺酸及 Dopa 為基質之氧化反應。若能抑制酪胺酸酶之反應，則能抑制農產品中之酵素性褐變或作可為皮膚美白之商品，各種來源之酪胺酸酶抑制劑已漸漸被開發。

香蕉，*Musa sapientum* L. 又稱甘蕉、芭蕉及芎蕉，英文名為 Banana、Common Banana、Sweet Banana。為台灣重要之經濟作物，是截至目前為止外銷數量最多的生鮮農產品。近年外銷量雖已逐漸減少，每年香蕉之栽種面積仍維持在一萬至一萬五千公頃，為台灣大宗栽培果品。產生之相應廢棄物，包括香蕉之假莖、蕉葉及香蕉皮，常被蕉農作為家禽、家畜之飼料。香蕉皮具多種抗氧化物質如維生素 C、酚類物質、類胡蘿蔔素、多巴胺，然而其中富含水分及氮、磷容易造成微生物滋生。本研究以冷凍保存香蕉皮並藉由其中之抗氧化物質，測試其對酪胺酸酶活性之影響，是否為一潛在之酪胺酸酶抑制劑。此外香蕉常因供需失衡而導致蕉價驟跌，亦為挑選香蕉作為試驗材料之原因，希望提升香蕉之經濟價值和廢棄物利用性及附加價值。

第二章、文獻回顧

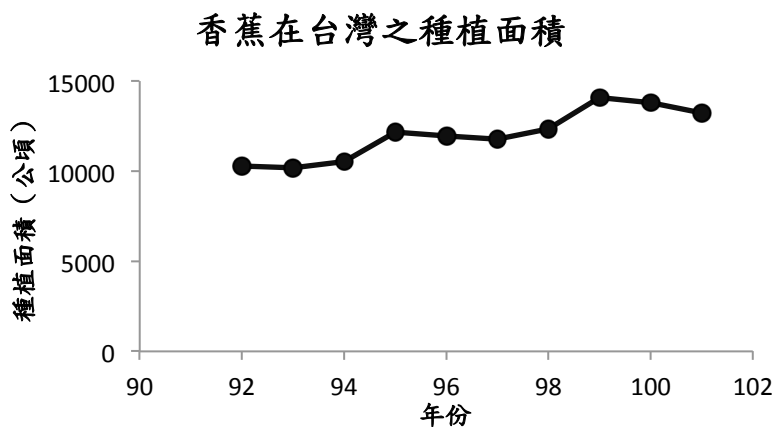


第一節、香蕉

一、簡介


香蕉學名為 *Musa sapientum* L.，英文名為 banana，屬於芭蕉科 (Musaceae) 芭蕉屬 (*Eumusa*) 草本植物，盛產於中南美洲、非洲及亞洲之赤道兩旁熱帶、亞熱帶地區。

香蕉在國際市場上被歸類為最受歡迎的水果之一；在國際貿易市場上，為僅次於柑橘類的第二大宗重要果品。台灣在民國五十年代，因大量外銷香蕉，外銷量曾高居世界第四名，且台灣的香蕉具有獨特的風味，因此得到了「香蕉王國」的美稱。香蕉栽種於中南部各縣市，南投縣、屏東縣及嘉義縣尤其為主要產區，此外花東一帶也有少量種植。經濟栽培品種有北蕉、仙人蕉、台蕉 1 號、台蕉 2 號及寶島蕉，又以北蕉及寶島蕉占國內香蕉種植品種之大宗。各品種間的蕉果形態差異不大，然植株高度及蕉果產量則有顯著性差異。近十年來，每年香蕉之種植面積約為 10000 公頃（圖一），仍是台灣大宗栽種之果品（康，1992；農業統計年報，101 年；台灣農家要覽，2005）。



圖一、香蕉近十年栽種面積

Fig. 1. The planting area of banana in recent ten years. (台灣農糧署公務統計, 2013)



香蕉皮佔香蕉的總重量約 30-40% (Anhwange *et al.*, 2008 ; González-Montelongo *et al.*, 2010)，在香蕉加工產業中是最主要的廢棄物，由於富含氮磷及水分，易造成微生物滋生，成為一嚴重之環境問題 (González-Montelongo *et al.*, 2010)。

二、香蕉皮中機能性成分

1. 抗氧化物質

香蕉生長在陽光強烈的炎熱熱帶、亞熱帶地區，此環境下將造成脂質的過氧化，因此香蕉富含抗氧化物以對抗過氧化因子、保護自身(表一)(圖二)(Kanazawa and Sakakibara, 2000)。

1.1 維生素 C

維生素C為一不飽和之五元環內酯，除了包含在環酯鍵內的羧基碳外每一個碳都與一個羥基鍵結。在細胞內為最重要之水溶性抗氧化物，能有效清除活性氧族，如 O_2^- 、 $OH\cdot$ 、超氧化物及單態氧 (Halliwell, 1996)。

每100 g香蕉皮中約含有10 mg之抗壞血酸 (Kanazawa and Sakakibara, 2000)。

1.2 酚類化合物

酚類化合物為植物中之次級代謝物，其基本結構為一羥基化芳香環，又據其羥基位置可分為酚酸類 (phenolic acid)、類黃酮 (flavonoid)、二苯乙烯 (stilbene) 和木質素 (lignin) (Karakaya, 2004)。酚類化合物具有還原劑特性，能作為氫原子、電子提供者，有自由基清除活性；並具有螯合金屬的能力，可抑制金屬催化之自由基形成 (Rice-Evans *et al.*, 1997)。

香蕉皮中的酚類化合物含量為 0.9 -3.0 g/DW (Nguyen *et al.*, 2003 ; Someya *et al.*, 2002)，包括兒茶素 (catechin)、木質素、鞣質 (tannins) 及花青素中的翠雀花素 (delphinidin) 和矢車菊素 (cyaniding) (Someya *et al.*, 2002; Wall, 2006; Lim *et al.*,



2007 ; González-Montelongo *et al.*, 2010) 。其中兒茶素類的沒食子兒茶精 (gallicocatechin) 含量為 160 mg/100 g (Someya *et al.*, 2002) 。

1.3 類胡蘿蔔素

類胡蘿蔔素是世界上最廣泛的色素，由四十個碳組成的含共軛雙鍵多烯結構。在植物組織中主要扮演光合作用和光保護作用，為一脂溶性抗氧化物，可捕捉受激之單態氧 (Krinsky, 1989)，清除超氧化物。此外能有效的去活化自由基和單態氧產生過程中的受激發之感光分子 (Truscott, 1990, Young and Lowe, 2001) 。

每 1 g 香蕉皮中類胡蘿蔔素含量為 3-4 μg ，已被鑑定出其中含有 β -胡蘿蔔素、 α -胡蘿蔔素、堇菜黃質 (violaxanthin)、異堇黃質 (auroxanthin)、新黃質 (neoxanthin)、葉黃素 (leutein)、異葉黃素 (isoleutein)、 β -隱黃素 (β -cryptoxanthin) 及 α -隱黃素 (α -cryptoxanthin)(Subagio *et al.*, 1996) 。

1.4 植物固醇

植物固醇又名甾醇 (sterol)，為類固醇之含羥基衍生物，屬非極性之脂質，有三個六碳環和一個五碳環鍵結在脂肪鍊上，能與脂質自由基迅速作用，使其相對穩定，中斷三酸甘油酯的自身氧化連鎖反應，為一有效的抗氧化物質。而最有效之抗氧化作用起因於烯丙基上未受立體阻礙之氫原子的存在，使甾醇相對快速產生自由基，當自由基因此產生可以異構化為相對穩定之三級自由基 (Gordon and Magos, 1982) 。

香蕉皮中含有固醇及三萜，包括 β -穀甾醇 (β -sitosterol)、豆固醇 (stigmasterol)、菜油甾醇 (campesterol)、環桉烯醇 (cycloeucaleanol)、環木鳳梨烯醇 (cycloartenol) 及 24-亞甲基環木菠蘿醇 (24-methylene cycloartanol)(Knapp and Micholas, 1969) 。



1.5 多巴胺

多巴胺在人體為一神經傳導物質，為兒茶酚胺類 (catecholamines)，具有鄰苯二酚之結構。由於其結構上在酚環的 1,2 位置上有羥基，且支鍊為一提供電子之胺基，因此具有還原能力並能清除活性氧族，如：超氧陰離子及氫氧自由基 (Yen and Hsieh, 1997)，抗氧化力優於類黃酮及防止油脂氧化酸敗之食品添加物—丁基羥基甲氧苯 (butylated hydroxyl-anisole, BHA)、二丁基羥基甲苯 (butylated hydroxytoluene, BHT)，其抗氧化力類似於強抗氧化物質—抗壞血酸。每 100 g 香蕉皮中含有 80-560 mg 多巴胺 (Kanazawa and Sakakibara, 2000)。

2. 膳食纖維

香蕉皮富含膳食纖維，占香蕉皮乾重約 50% (Hpaai Emaga *et al.*, 2007)。膳食纖維在通過人體消化系統時無法被消化，不會提供顯著的養分或熱量，主要由水溶性纖維 (soluble fiber) 及非水溶性纖維 (insoluble fiber) 組成。水溶性膳食纖維包括果膠 (pectins) 及膠類 (gums) 等，非水溶性纖維包含纖維素、木質素、和一些半纖維素 (Thebaudin and Lefebvre, 1997)。水溶性纖維能降低血清中總膽固醇濃度；非水溶性纖維可增加糞便體積，降低罹患大腸癌的風險 (Burkitt *et al.*, 1974；Kelsey, 1978)。

3. 多元不飽和脂肪酸

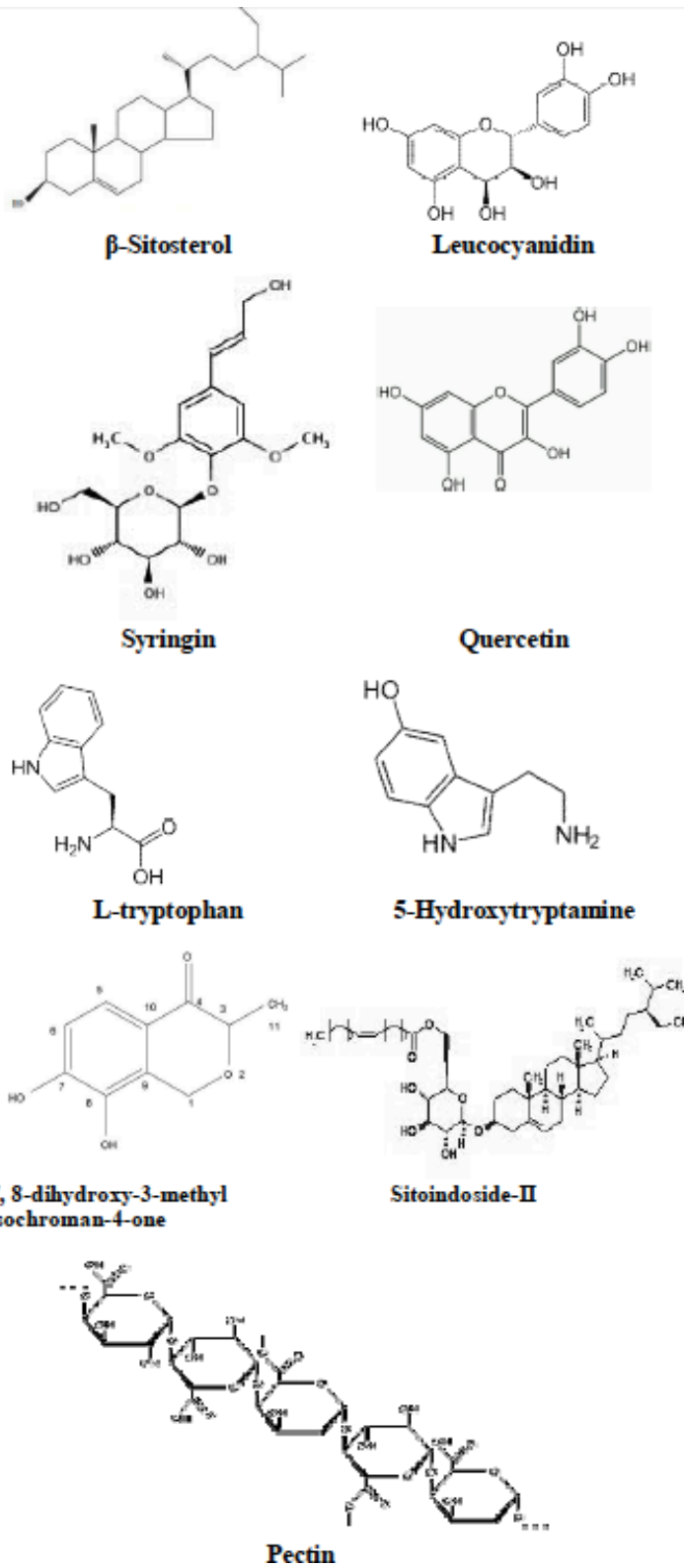
香蕉皮中之脂肪酸主要是亞麻油酸 (linoleic acid) 和 α -次亞麻油酸 (α -linolenic acid)，即使在不同香蕉的成熟階段，兩者合計量超過香蕉皮中脂肪酸含量之 40% (42.1-52.2%) (表二) (Hpaai Emaga *et al.*, 2007)。亞麻油酸對血脂及降低血壓、血清中膽固醇都具有利的作用 (Ramadan and Mörseel, 2002)；而 α -次亞麻油酸可降低動脈受損和降低心臟疾病 (Simopoulos, 1999)。

表一、香蕉皮與果肉中不同成熟階段之抗氧化植物化學成分含量

Table 1. Levels of Antioxidative Phytochemicals in Banana at Various Ripening Stages.

	ripening stage ^a			
	1-3	4-6	6-7	7-8
In Peel (mg/100 g) ^b				
dopamine	865-1940 (1290 ± 420)	185-705 (430 ± 210)	80-560 (380 ± 160)	235-930 (500 ± 270)
dopa	14-30	3.5-10	1.1-8.0	2.5-15
norepinephrine	55-118	8.2-14	ND ^c -24	38-43
naringin	120-260	17-120	28-95	42-72
rutin	16-23	11-14	11-16	15-17
ascorbic acid ^d	6.8-8.2	6.6-8.7	5.8-8.0	3.2-7.9
carotenes ^d	0.43-1.2	0.55-0.87	0.28-0.78	0.11-0.66
tocopherols ^d	2.4-2.6	3.2-5.3	1.5-5.8	5.5-7.8
In Pulp (mg/100 g) ^b				
dopamine	4.7-10 (7.0 ± 2.0)	6.1-15 (9.1 ± 3.1)	2.5-10 (7.3 ± 2.4)	0.72-6.1 (3.4 ± 2.2)
dopa	1.3-1.9	1.3-1.9	1.0-1.5	0.95-1.4
norepinephrine	0.80-1.7	0.84-2.1	0.82-1.6	0.62-1.5
naringin	ND ^c -65	ND ^c	ND ^c -3.3	ND ^c
rutin	ND ^c -4.8	ND ^c	ND ^c	ND ^c
ascorbic acid ^d	12-13	11-13	6.9-11	5.4-10
carotenes ^d	0.09-0.12	0.06-0.12	0.03-0.12	0.02-0.05
tocopherols ^d	ND ^c	ND ^c -0.29	ND ^c	ND ^c -0.45

(Kanazawa and Sakakibara, 2000)



圖二、香蕉中分離出之植物化學成分結構

Fig. 2. Structures of some phytochemicals isolated from *Musa sapientum*.

(Imam and Akter, 2011)

表二、香蕉皮不同成熟時期之脂肪酸組成

Table 2. Fatty acid (% of total FA content) composition in the fruit peels of different varieties and maturation stages.

Varieties	FC			BE			GN			YKm5			PPT			039		
	1	5	7	1	5	7	1	5	7	1	5	7	1	5	7	1	5	7
Lauric (12:0)	0.8±0.1	0.5±0.1	ND	0.7±0.0	0.5±0.0	ND	1±0.2	0.7±0.0	0.7±0.0	0.4±0.0	0.5±0.0	ND	0.8±0.0	0.9±0.0	ND	0.8±0.0	0.4±0.0	0.7±0.0
Myristic (14:0)	5.2±0.3	0.8±0.1	0.9±0.2	3.2±0.1	4.2±0.1	4.1±0.1	4.3±0.4	4.7±0.3	4.6±0.3	2.8±0.3	3.1±0.3	2.2±0.1	1.2±0.4	2.6±0.8	2.8±0.4	1.8±0.4	2.1±0.4	2.3±0.3
Pentadecanoic (15:0)	1.8±0.5	0.5±0.3	ND	0.8±0.1	1.1±0.1	ND	3.1±0.8	1.2±0.4	ND	1.1±0.3	0.9±0.01	ND	0.9±0.1	1.0±0.1	ND	0.5±0.1	0.6±0.1	0.1±0.0
Palmitic (16:0)	38.1±1.4	38.7±0.9	37.2±3.4	39.1±0.1	39.3±1.2	41.9±0.4	38.2±2.2	40.8±2.4	41.5±3.8	34.3±0.9	35.4±1.1	35.2±1.0	35.4±1.3	35.3±0.8	36.6±0.3	38.2±0.4	36.3±0.8	38.2±0.5
Stearic (C18:0)	3.7±0.0	3.5±0.8	4.5±0.9	2.8±0.4	2.6±0.3	2.3±0.0	5.3±1.2	3.9±0.6	3.4±0.8	2.3±0.5	3.2±0.8	3.009	2.8±0.3	3.8±0.5	2.5±0.2	2.2±0.8	2.5±0.6	5.2±1.0
Arachidic (C20:0)	2.1±1.0	1.4±0.6	ND	ND	ND	ND	ND	0.7±0.8	1.4±0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
% Saturated fatty acids	51.8	43.4	42.6	46.6	47.7	48.3	51.9	51.9	51.8	40.9	43.1	40.4	41.1	43.6	45.5	43.0	41.9	46.2
Oleic (C18:1)	4.1±0.0	4.2±0.7	6.1±2.2	4.4±0.3	3.5±0.4	4.2±0.2	4.2±1.1	3.2±0.8	3.2±1.1	4.3±0.8	3.7±1.1	3.5±1.2	4.6±0.3	4.0±0.4	9.6±0.0	2.0±0.2	3.3±0.1	4.0±0.1
% Mono-unsaturated fatty acids	4.1±0.0	4.2±0.7	6.1±2.2	4.4±0.3	3.5±0.4	4.2±0.2	4.2±1.1	3.2±0.8	3.2±1.1	4.3±0.8	3.7±1.1	3.5±1.2	4.6±0.3	4.0±0.4	9.6±0.0	2.0±0.2	3.3±0.1	4.0±0.1
Linoleic (C18:2)	23.9±0.6	23.2±1.1	22.2±3.2	21.3±1.1	21.8±1.2	21.2±1.0	22.7±4.9	22.4±1.5	23.9±4.0	22.3±1.2	24.8±0.7	25.3±0.3	22.5±0.5	24.8±0.2	22.3±1.1	23.0±0.0	26.9±0.2	26.3±0.6
α-linolenic (C18:3)	20.2±1.1	29.3±1.6	29±1.7	27.1±1.3	28.3±1.4	27.5±1.2	21.1±1.9	22.5±3.7	21.2±1.9	20.8±1.3	19.7±0.5	20.8±0.2	22.9±0.1	24.3±0.3	22.6±0.4	27.6±0.3	25.3±0.4	25.5±0.1
% Poly-unsaturated fatty acids	44.1	52.4	51.2	48.4	50.1	48.7	43.8	44.9	45.1	42.1	44.5	46.1	45.4	49.1	49.9	50.6	52.2	51.8

ND, not detected.



(Happi Emaga *et al.*, 2007)



三、香蕉功效

香蕉果肉在傳統上應用於腹瀉、下痢、腸道病變、潰瘍性結腸炎、糖尿病、口炎性腹瀉、尿毒症、腎炎、痛風、高血壓及心血管疾病 (Imam and Akter, 2011)，在非洲也與美人蕉 (*Canna indica* L. var. *speciosa*) 搭配使用作為經血過多的治療 (Okoli *et al.*, 2007)。在動物試驗中，香蕉因富含果膠而具有止瀉、抗胃潰瘍等功效 (Goel and Sairam, 2000)，此外香蕉也有抗高血壓 (Perfumi *et al.*, 2004)、降低血糖 (Alarcon-Aguilara *et al.*, 1998)、膽固醇、三酸甘油酯 (Gomathy *et al.*, 1989)，防止粥狀動脈硬化 (Saraswathi and Gnanam, 1997)，促進傷口癒合 (Agarwal *et al.*, 2009) 等功效，細胞試驗則顯示具有抗過敏活性 (Tewtrakul *et al.*, 2008)。而研究顯示香蕉皮對葡萄球菌屬 (*Staphylococcus*)、假單孢菌屬 (*Pseudomonas*) 具有抗菌活性 (Alisi *et al.*, 2008)，而富含皂素、類黃酮、類萜，故可作為利尿劑 (Jain *et al.*, 2007；Chodera *et al.*, 1991)。

四、香蕉皮其他應用

香蕉皮可用來生產生物質 (Essien *et al.*, 2002)、蛋白質 (Chung and Meyers, 1979)、酒精 (Tewari *et al.*, 1986；Hammond *et al.*, 1996)、甲烷 (Gunaseelan *et al.*, 2004；Bardiya *et al.*, 1996)、果膠 (Emaga *et al.*, 2008) 和酵素，如 α -澱粉酶 (α -amylase)(Krishna and Chandrasekaran, 1996)、半纖維水解酶 (hemicellulase) (Medeiros *et al.*, 2000)、纖維水解酶 (cellulase)(Krishna, 1999)。此外亦可用來作為家畜飼料 (Onwuka *et al.*, 1997) 或是水質的淨化，不僅能吸附微量之金屬離子如銅離子 (Cu^{2+})、鋅離子 (Zn^{2+})、鈷離子 (Co^{2+})、鎳離子 (Ni^{2+})、鉛離子 (Pb^{2+})，也能吸附染劑如甲基橙 (methyl orange)、甲基藍 (methylene blue)、羅丹明 B

(Rhodamine B)、剛果紅 (Congo red)、甲基紫 (methyl violet) 及胺基黑10B (amido black 10B)(Annadurai *et al.*, 2002)。





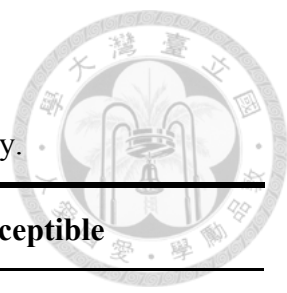
五、香蕉之凍害

香蕉屬於熱帶性水果，為對低溫非常敏感類之作物，發生寒害 (chilling injury) 的臨界溫度在 11.5-13°C，相較其他亞熱帶、溫帶性園產品來得高，只要短時間接觸低溫就會產生寒害徵狀。香蕉在綠熟時接觸低溫，其徵狀包括果皮呈現灰色、暗黃色，若持續接觸更低之溫度，果皮顏色則會轉為深褐色或黑色，且在移入室溫後仍無法正常後熟 (Wardlaw, 1961)。成熟果實較綠熟果對低溫更加敏感。造成寒害之生理機制主要為細胞膜脂質組成分因為低溫的影響發生物理性變化使細胞膜通透性改變；或低溫造成細胞生理代謝中之關鍵酵素活性降低等原因，影響細胞正常代謝，造成細胞的傷害 (Lyons, 1973)。

凍害 (freezing injury) 是由於園產品接觸到結冰點 (freezing point) 以下之溫度，冰晶在組織中形成所造成，影響園產品結冰點的因素包含品種 (表三)、地區和生長條件等 (McColloch, 1953; Whiteman, 1957)。凍害病徵一般為使園產品呈現水浸狀 (water-soaked) 之外表。當遇到低於凍結點的溫度時，由於細胞間隙的水分率先凍結，造成細胞內水勢相對較高而向細胞外流，使得細胞間隙之冰晶漸大，破壞細胞膜，令細胞崩解。而在解凍之後，細胞內隔室遭到破壞，各種水解酵素及氧化酵素釋出，如多酚氧化酶與酚類反應聚合成多酚類，造成組織變色壞死，表皮不再堅硬呈現糊狀 (Mazur, 1969; Mayer, 2006)。

表三、新鮮水果蔬菜對凍害之敏感度

Table 3. Susceptibility of fresh fruits and vegetables to freezing injury.



Most susceptible	Moderately susceptible	Least susceptible
Apricots	Apples	Beets
Asparagus	Broccoli	Brussels sprouts
Avocados	Carrots	Cabbage, mature and savory
Bananas	Cauliflower	Dates
Beans, snap	Celery	Kale
Berries (except cranberries)	Cranberries	Kohlrabi
Cucumbers	Grapefruit	Parsnips
Eggplant	Grapes	Salsify
Lemons	Onion (dry)	Turnips
Lettuce	Oranges	
Limes	Parsley	
Okra	Pears	
Peaches	Peas	
Peppers, sweet	Radishes	
Plums	Spinach	
Potatoes	Squash, Winter	
Squash, Summer		
Sweetpotatoes		
Tomatoes		

(Wang, 2004)




第二節、酪胺酸酶 Tyrosinase

一、簡介

酪胺酸酶 (EC 1.14.18.1) 又稱多酚氧化酶 (polyphenol oxidase)，參與黑色素 (melanin pigment) 之生合成，廣泛存在於動植物體、細菌、真菌中，不同生物體之酪胺酸酶具不同特性 (表四) (Pawelek and Körner, 1982; Mayer, 1987)。酪胺酸酶由三個蛋白結構區域 (domain) 組成，中心結構區域有兩個銅離子結合位，兩個銅離子各與活性位中的三個組胺酸 (Histidine) 結合 (圖三)，並能與氧分子和酚類基質反應 (Jackman *et al.*, 1991)。

依酪胺酸酶之雙核銅離子活性中心之不同結構又分為氧化態 (Oxy tyrosinase, E_{oxy})、還原態 (Met tyrosinase, E_{met}) 和脫氧態 (Deoxy tyrosinase, E_{deoxy})。氧化態活性中心有外源氧分子結合作為過氧化物並橋接兩個二價銅離子 (Solomon and Lowery, 1993)，由於氧分子之間的氧氧鍵容易斷裂因此對於生物功能極為重要，能與單酚 (monophenol) 和鄰苯二酚 (*o*-diphenol) 等基質作用 (Eickman *et al.*, 1979)；還原態活性中心類似於氧化態，同樣具有兩個銅離子，然而與銅離子結合的是氫氧化物而非過氧化物，為酪胺酸酶之靜止期 (resting form)，可經由加入過氧化物轉化為氧化態，而當過氧化物損失後則衰變回還原態，純化後的酪胺酸酶由 85% 的還原態及 15% 的氧化態所組成 (Himmelwright *et al.*, 1980)；脫氧態活性中心則由兩個一價銅離子組成 (圖四) (Kubowitz, 1938)。

黑色素 (melanin) 為最廣泛分佈於細菌、真菌、植物及動物中的色素之一。黑色素為一群多酚類生物聚合物 (heterogeneous polyphenol-like)，其顏色分佈由黃色至黑色 (Prota, 1988)。黑色素生合成可自暴露於空氣中的蘋果、馬鈴薯或香蕉之



切面觀察得 (Körner and Pawelek, 1982)。而哺乳類動物中由位在表皮基底層之黑色素細胞 (melanocyte) 分泌的黑色素，能減少紫外光對皮膚所造成之傷害 (Hill *et al.*, 1991)，而其分佈與含量則是決定皮膚、毛髮及眼球顏色的重要因素 (Quevedo *et al.*, 1987)。酪胺酸酶催化黑色素合成過程中單酚氧化步驟之酪胺酸 (tyrosine) 羥基化 (hydroxylation) 及二酚氧化步驟之 3,4-二羥苯丙胺酸 (3,5-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) 氧化為多巴醌 (*o*-dopaquinone)，此二反應皆需氧分子參與 (Lerch, 1982)。多巴醌在水溶液為不穩定之反應中間產物，會快速經由非酵素性環化形成無色多巴色素 (leukodopachrome)，再由另一多巴醌分子的非酵素性氧化產生多巴色素 (dopachrome)，而該多巴醌分子則還原成 L-DOPA (圖五)。接著經由一系列自發性化學反應形成黑色素，黑色素分為兩種形態，分別為呈現黑褐色之真黑色素 (eumelanin) 及黃色及紅棕色之褐黑色素 (pheomelanin) (Lerner and Fitzpatrick, 1950)。



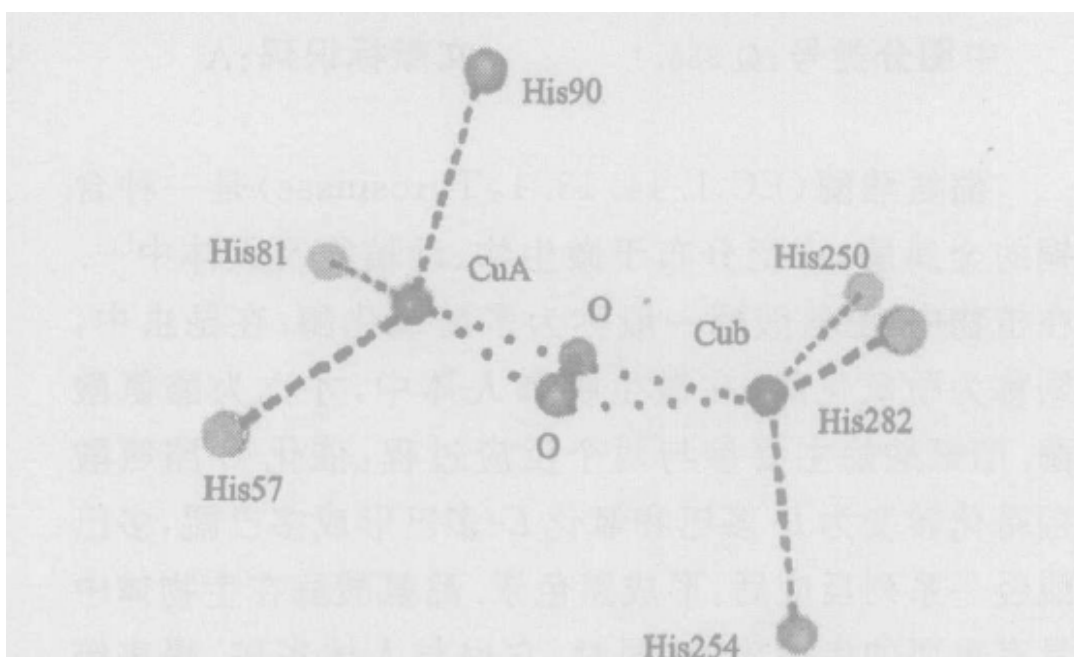
表四、各種酪胺酸酶之特性

Table 4. Properties of various tyrosinases.

Source	Number of subunits	Molecular weight of subunit (kDa)	Spectroscopy of oxy form	
			Absorption (nm)	CD (nm)
<i>Streptomyces glaucescens</i> (Eubacteria)	1	30.9	345 640	345 470 575 740
<i>Neurospora crassa</i> (Fungi)	1	46	345 425 600	345 520 600 750
<i>Agaricus bisporus</i> (Fungi; mushroom)	2	13.4 43	345 600	353
<i>Beta vulgaris</i> (Plant; spinach-beet)	1	40	345	— ^a
Human melanocyte (Animal)	1	66.7	— ^a	— ^a

^a No data available.

(Kim and Uyama, 2005)

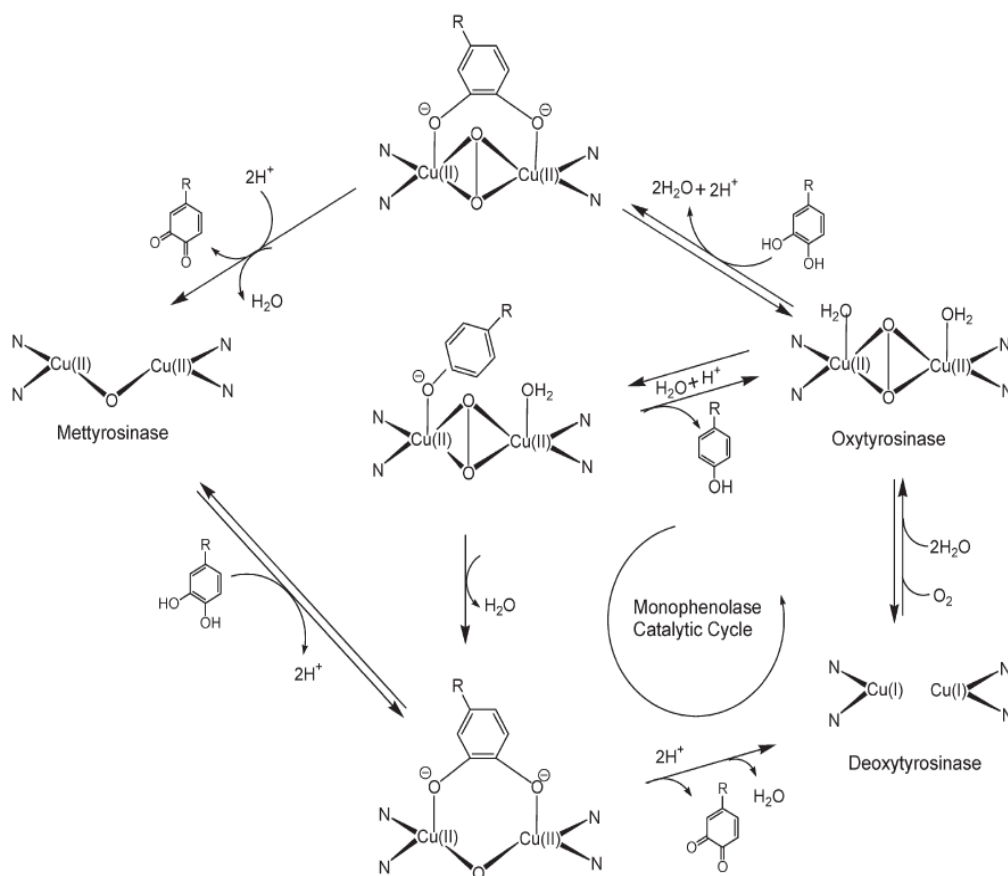




圖三、酪胺酸酶活性中心的雙核銅中心結構

Fig. 3. The structure of the active center containing Cu of tyrosinase.

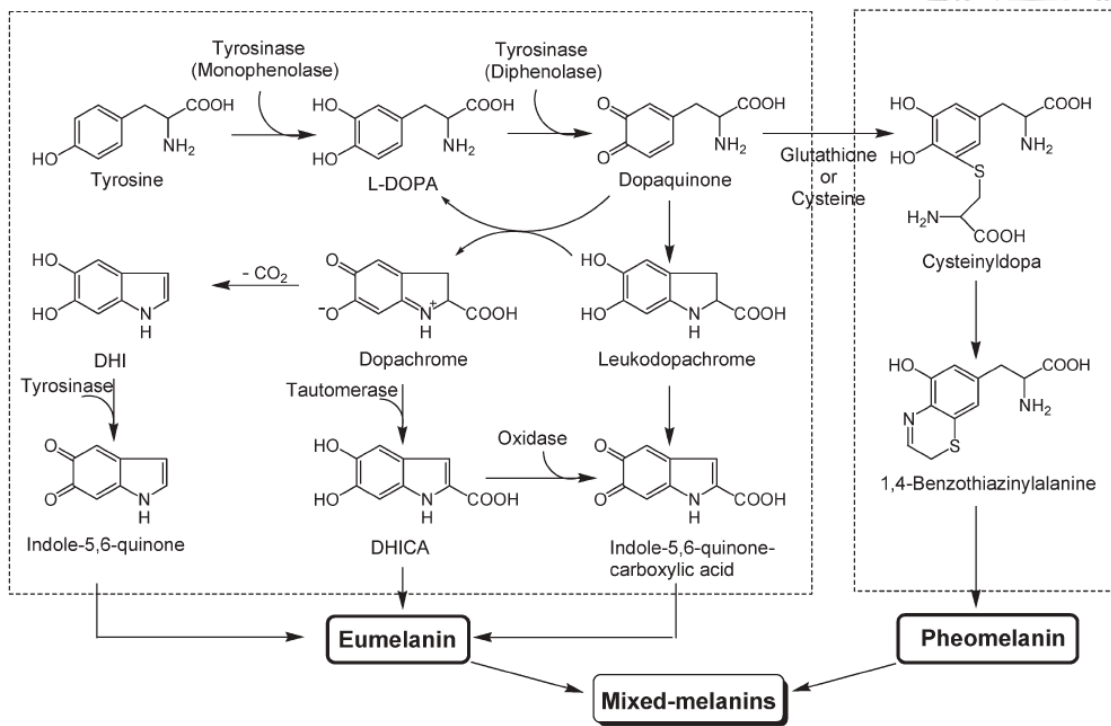
(陳和宋，2006)



圖四、酪胺酸酶催化單酚羥化及鄰苯二酚之氧化的循環

Fig. 4. Catalytic cycles of the hydroxylation of monophenol and oxidation of *o*-diphenol to *o*-quinone by tyrosinase.

(Kim and Uyama, 2005)



圖五、黑色素之生成途徑

Fig. 5. Biosynthetic pathway of melanin.

(Kim and Uyama, 2005)



二、酪胺酸酶抑制劑

截至目前為止，已發現許多不論是天然來源，如植物多酚類、醛類抑或是真菌代謝物（圖六），或人工合成之酪胺酸酶抑制劑（圖七），能抑制單酚酶、二酚酶或同時抑制兩者之活性。

1. 機制

酪胺酸酶抑制劑的作用機制可以歸納為：

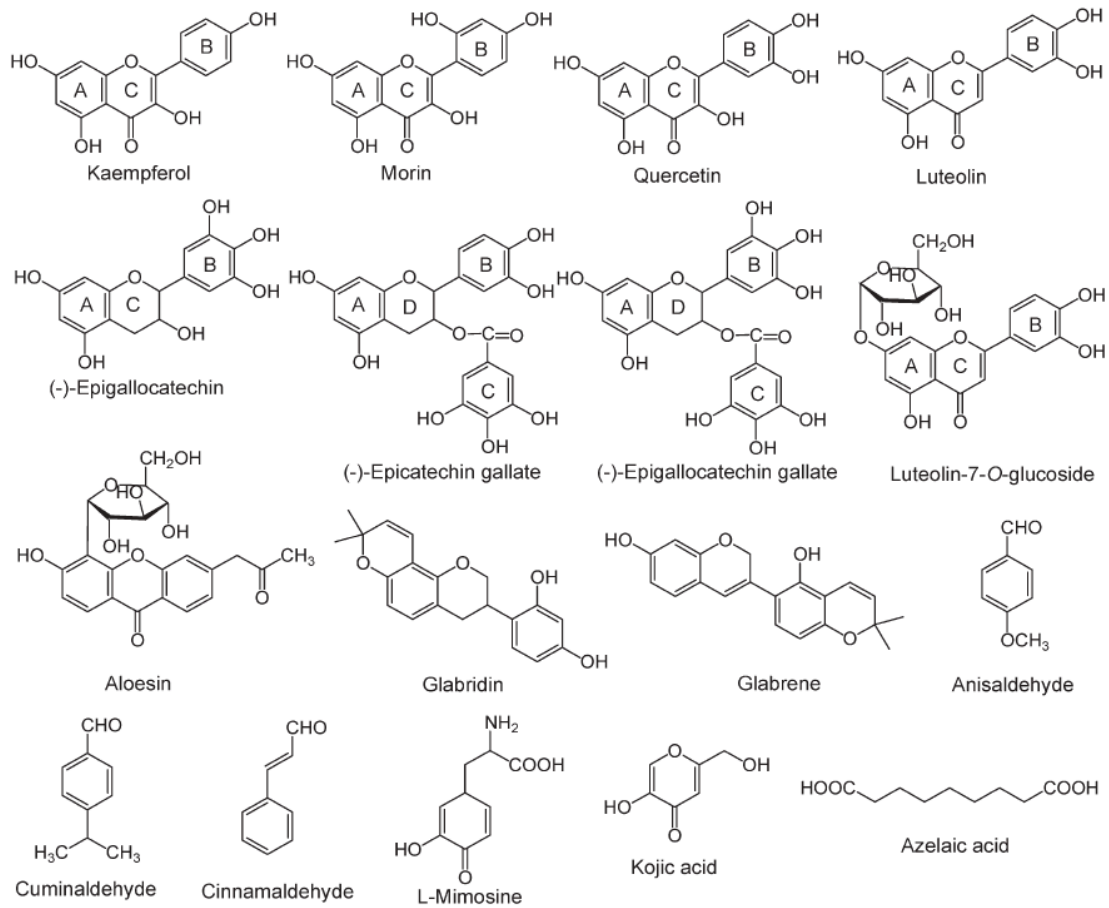
- A. 減少多巴醌的生成：利用其強還原劑之特性，將多巴醌還原成多巴，進而降低多巴色素及黑色素的生成，如抗壞血酸及半胱胺酸（圖八）(Friedman, 1996)。
- B. 清除多巴醌：藉由與多巴醌反應生成無色產物，在多巴醌清除劑耗盡前可減緩黑色素之生成，如含硫化合物、亞硫酸鹽。
- C. 與基質競爭酪胺酸酶：此類抑制劑利用結構與酪胺酸酶之基質酪胺酸、多巴相似，而與之競爭酪胺酸酶，若其親和性較強則阻礙多巴色素的生成，減少黑色素之生成，如苯酚或兒茶酚衍生物 (Notsu *et al.*, 2002)。
- D. 非專一性之酪胺酸酶失活劑：利用酸或鹼使酵素變性、失活，如檸檬酸 (citric acid)、蘋果酸 (malic acid)。
- E. 專一性之酪胺酸酶失活劑：此類抑制劑類似於酪胺酸酶之基質，可與酪胺酸酶形成共價鍵，而使酵素在催化反應時發生不可逆的鈍化情形。
- F. 專一性之酪胺酸酶抑制劑：此類抑制劑透過與酪胺酸酶可逆性結合，以降低



酪胺酸酶之催化功能 (李, 2013)。

雖然上述六種機制均能抑制酪胺酸酶活性，然而只有專一性之酪胺酸酶失活劑及專一性之酪胺酸酶抑制劑可以直接作用於酪胺酸酶，抑制效果較其他種間接作用於酪胺酸酶之抑制機制強。而酪胺酸酶抑制劑又根據抑制類型可分為競爭型 (competitive)、非競爭型 (noncompetitive)、不競爭型 (uncompetitive) 及混合型 (mixed-type) 抑制劑。

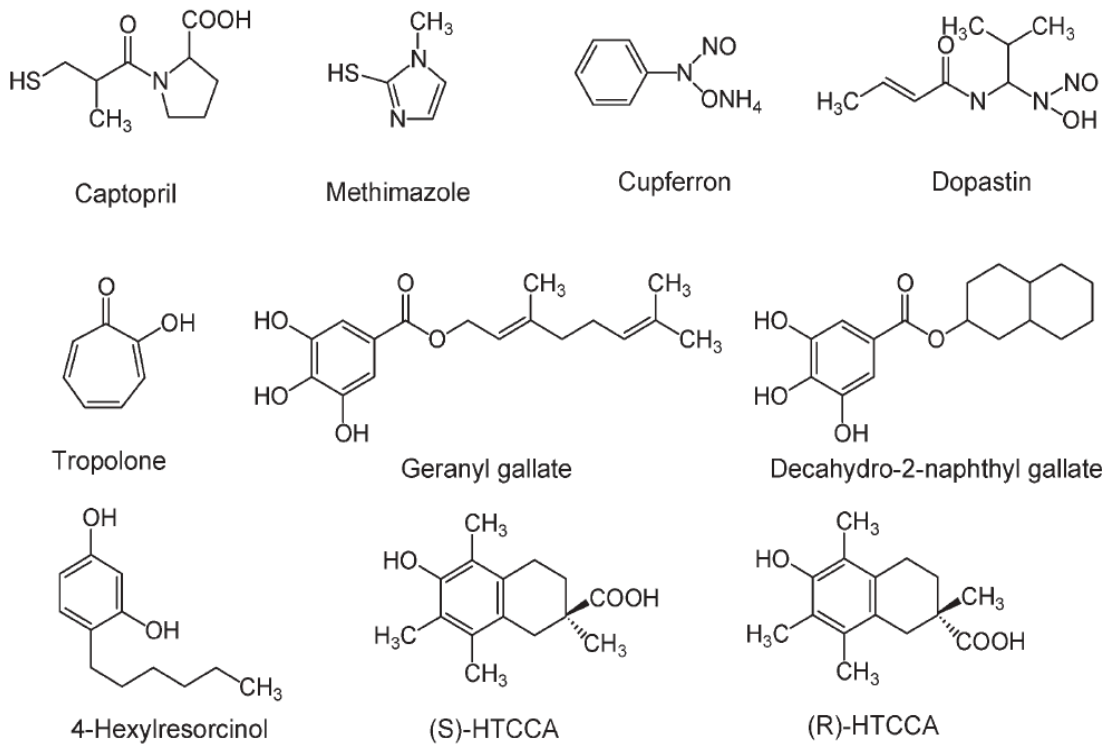
競爭型抑制劑通常為一會與基質競爭相同的酵素結合位之物質，並與自由的酵素結合使基質無法與酵素結合。競爭型抑制劑有銅離子螯合劑、非代謝性取代物或是基質之衍生物，如槲皮素 (quercetin)、表沒食子兒茶素 (epigallocatechin, EGC)、表兒茶素沒食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG) 等 (Kim and Uyama, 2005)。不競爭型抑制劑只能與已和基質結合的酵素複合體結合，如蘑菇胺酸 ((β -N-(γ -l(+)-glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine, agaritine) 在以 L-Dopa 為基質時為不競爭型之抑制 (Espín *et al.*, 1998)。混合型(競爭型與不競爭型之混合) 抑制劑不僅可與自由的酵素結合亦可與酵素-基質複合體結合，然而對於自由酵素和酵素-基質複合體結合之平衡常數是不相同的，如光甘草素 (glabrene) 及異甘草素 (isoliquiritigenin)。此外非競爭型抑制劑可稱為是混合型抑制劑的特例，可與自由酵素和酵素-基質複合體結合，且對於兩者結合之平衡常數是相同的 (圖九)，如茴香醛 (anisaldehyde)、肉桂醛 (cinnamaldehyde)、枯茗醛 (cuminaldehyde) 及阿魏酸 (ferulic acid) 等 (表五) (Lin *et al.*, 2008 ; Chang, 2009)。



圖六、天然來源之酪胺酸酶抑制劑結構

Fig. 6. Structures of tyrosinase inhibitors from natural sources.

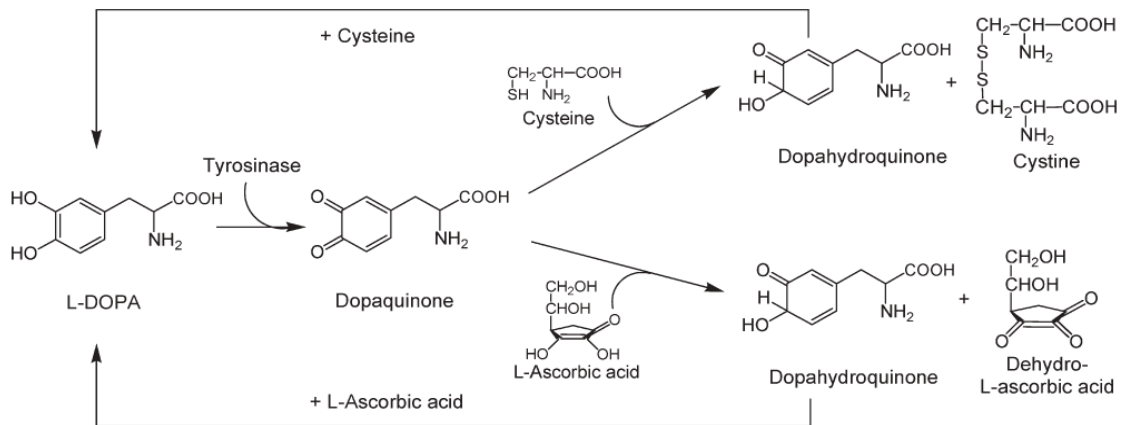
(Kim and Uyama, 2005)



圖七、人工合成及天然化合物衍生物之酪胺酸酶抑制劑結構

Fig. 7. Structures of tyrosinase inhibitors from synthetic sources and derivatives of natural compounds.

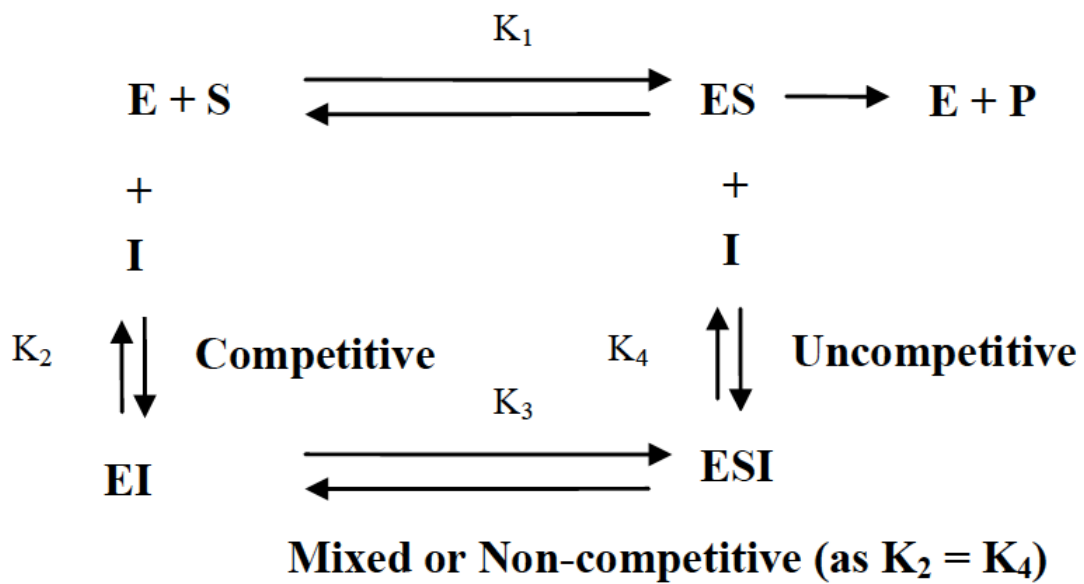
(Kim and Uyama, 2005)



圖八、半胱胺酸及抗壞血酸還原多巴醌以抑制酪胺酸酶之酵素性褐變

Fig. 8. Inhibition of tyrosinase-catalyzed enzymatic browning by trapping the dopaquinone intermediate with cysteine or ascorbic acid.

(Friedman, 1996)



圖九、可逆性抑制劑作用機制

Fig. 9. Action mechanism of reversible inhibitors. E, S, I, and P are the enzyme, substrate, inhibitor, and product, respectively; ES is the enzyme-substrate complex, and EI and ESI are the enzyme-inhibitor and enzyme-substrate-inhibitor complexes, respectively.

(Chang, 2009)




2. 酪胺酸酶抑制劑之應用

2.1. 農業及食品

食品成分中的胺、胺基酸、胜肽與醃類的胺羰反應 (Amino-carbonyl) 容易造成酵素性褐變 (enzymic browning)。酵素性褐變在食品中占有重要的角色，產生茶葉、咖啡、蘋果汁、無花果與葡萄乾的味道及顏色等。然而在一般蔬果、海鮮中，酵素性褐變為造成品質劣變的主要原因 (Martinez and Whitaker, 1995; Nirmal and Benjakul, 2009)，不僅造成顏色的改變也因為破壞必需胺基酸，降低消化性，並抑制蛋白水解、糖解酵素而造成營養價值的降低，有毒物質可能相應產生，造成食品安全性的降低 (Carpenter, 1981)。因此抑制造成酵素性褐變的酪胺酸酶為一重要議題，常見方法為殺菁 (blanching)，藉由短時間加熱破壞酵素活性；另外亞硫酸鹽類為強還原劑，也常用於防止農產品及甲殼類海鮮的酵素性褐變，然而亞硫酸鹽類有健康上之疑慮，近期已有使用抗壞血酸取代 (Hsu *et al.*, 1988)；亦有脫水使酵素不活化、添加檸檬酸、蘋果酸、磷酸 (phosphoric acid) 作為酸化劑，或金屬螯合劑以螯合銅離子等方法使酪胺酸酶失去活性 (Santerre *et al.*, 1988)。

2.2 美妝及醫療

酪胺酸酶抑制劑由於對色素異常沉澱有預防的功效，因此在美妝及醫療界的應用愈趨重要。酪胺酸酶抑制劑能降低黑色素生合成，並能用在與美白相關，如雀斑形成之美妝產品上。在醫藥上，酪胺酸酶和其抑制劑為白斑症 (piebaldism) 及白化症 (albinism) 的製藥目標。至今已有多種天然或合成之酪胺酸酶抑制劑被報導，



然而因為安全問題，只有少數被作為皮膚美白劑。近來熊果素 (arbutin) 和蘆薈苦素 (aloesin) 由於可以抑制酪胺酸酶，而被用來作為美妝工業的皮膚白化劑，熊果素為競爭型抑制，而蘆薈苦素為非競爭型抑制，兩者同時作用可達到協同作用，並能降低對相同抑制效果的劑量而減少副作用 (Jin *et al.*, 1999)。此外常見之美白成分尚有對苯二酚 (hydroquinone)、維生素C、麴酸 (kojic acid) 等。然而現今已有研究指出，有些成分如麴酸或對苯二酚會對人體造成皮膚性過敏或皮膚炎、紅斑、灼傷甚至白斑症等副作用，因此目前研究偏好自植物中萃取出替代性之淡化黑色素化合物 (表六) (Zhu *et al.*, 2008)，衛生福利部食品藥物管理署也公佈部分美白成分及其濃度限制，如表七。

2.3. 殺蟲劑

多酚氧化酶普遍存在於昆蟲中，參與昆蟲脫皮時鞣化過程之重要反應。阻斷昆蟲體內生物合成途徑為新式殺蟲劑之目標，因此酪胺酸酶抑制劑具有發展成新式生物殺蟲劑的潛力 (張，1993)。

表五、天然來源化合物酪胺酸酶抑制活性之簡介



Table 5. Summary of tyrosinase inhibitory activity of compounds from natural sources.

Compounds	Type of inhibition	IC ₅₀ (mM)	Reference
Flavanols			
(-)-Epigallocatechin	competitive ^a	0.035	90
(-)-Epicatechin gallate	competitive ^a	0.017	90
(-)-Epigallocatechin gallate	competitive ^a	0.034	90
Flavonols			
Quercetin	competitive ^b	0.070	91
Kaempferol	competitive ^b	0.230	91
Morin	competitive ^b	2.320	91
Flavones			
Luteolin	noncompetitive ^b	0.190	91
Luteoilin 7- <i>O</i> -glucoside	noncompetitive ^b	0.500	91
Isoflavans			
Glabridin	noncompetitive ^b	0.004	98
Glabrene	mixed-type ^b	7.600	98
Isoliquiritigenin	mixed-type ^b	0.047	98
Other compounds			
Kojic acid	mixed-type ^b	0.014	119
Anisaldehyde	noncompetitive ^b	0.320	104
Cuminaldehyde	noncompetitive ^b	0.050	104
Cinnamaldehyde	noncompetitive ^b	0.980	106

^a Inhibition of monophenolase activity.

^b Inhibition of diphenolase activity.

IC₅₀, inhibitory concentration 50%.

(Kim and Uyama, 2005)

表六、植物萃取之美白成分活性

Table 6. Overview of botanical extracts with depigmenting activity.

Component	Plant source	Depigmenting mechanism	<i>In vitro</i> research	<i>In vivo</i> research	Potency
<i>Arbutins</i>					
Arbutin	Pear, cranberry, blueberry, bearberry shrub	↓ Tyr. ↓ DHICA polymerase	MT B16 NHM		Arbutin < HQ < dA (Boissy <i>et al.</i> , 2005)
α-Arbutin	Pear, cranberry, blueberry, bearberry shrub	↓ Tyr. ↓ DHICA polymerase	MT [†] human melanoma cell	100 mgg ⁻¹ 15 days 15 Koreans	Arbutin < α-arbutin (Funayama <i>et al.</i> , 1995); reduced pigmentation by 43.5% (Choi <i>et al.</i> , 2002)
Deoxyarbutin	Pear, cranberry, blueberry, bearberry shrub	↓ Tyr. ↓ DHICA polymerase	MT NHM	3% 12 weeks 34 Caucasian 16 ethnic	Improved skin tone, significant in Caucasians (Boissy <i>et al.</i> , 2005)
Aloesin	Aloe	↓ Tyr. Competitively ↓ DOPA oxidase	MT B16 NHM	100 mgg ⁻¹ 15 days 15 Koreans	Arbutin < aloesin < kojic acid (Jones <i>et al.</i> , 2002); reduced pigmentation by 34% (Choi <i>et al.</i> , 2002)
<i>Flavonoids</i>					
Flavones	Most plants	↓ Tyr. Uncompetitively	MT		Chrysin < apigenin < luteolin (Kubo <i>et al.</i> , 2000)
Flavonols	Most plants	Copper chelation	MT		Morin < galangin < quercetin (Xie <i>et al.</i> , 2003)
Hesperidin	Citrus fruits	↓ Tyr. Antioxidant of collagen	MT B16 NHM	1%, 3% 30 females UV-induced pigmentation	Hesperidin (200 μgml ⁻¹) ≈ kojic acid; significantly reduced pigmentation in 1 week (Zhang <i>et al.</i> , 2008)
p-Coumaric acid	Panax ginseng	↓ L-tyrosine oxidation	MT B16		Significant suppress melanogenesis (Im <i>et al.</i> , 2003)
Niacinamide	Root vegetables, yeast	↓ Melanin transfer, antioxidant of collagen	MC-KC coculture PREP	8 weeks 5%, 18 facial stain 2%, 40 facial tone	↓ 35-68% melanin transfer; significant improvement in 4 weeks (Bissett <i>et al.</i> , 2004)
<i>Licorice extracts</i>					
Glabridin	Licorice	↓ Tyr. ROS scavenger	B16		Significant ↓ Tyr. at low concentrations (Yokota <i>et al.</i> , 1998)
Liquiritin	Licorice	Melanin dispersibility Epidermal remove	MT	20% 4 weeks 20 melasma	80% excellent (Amer and Metwalli, 2000)
Mulberry	<i>Morus alba</i>	↓ Tyr. ROS scavenger	Melan-a		< kojic acid (Lee <i>et al.</i> , 2002)
<i>Polyphenols</i>					
Procyanidins	Grape seeds, cranberry	↓ Tyr. ROS scavenger	MT B16		Kojic acid, arbutin < EA (Shoji <i>et al.</i> , 2005)
Ellagic acid	Strawberry, geranium	Copper chelation ↓ MC proliferation	MT B16		Kojic acid, arbutin < EA ≈ HQ (Shimogaki <i>et al.</i> , 2000)
<i>Traditional Chinese medicine</i>					
18α-GL	Licorice	↓ Tyr.	MT S91	3% 30 female UV-induced pigmentation	Significantly reduced pigmentation in 1 week (Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Sophorcarpidine	Kuhseng	↓ Tyr.	MT Melan-a		< HQ (Lu <i>et al.</i> , 2006)

↓, inhibit; 18α-GL, ammonium glycyrrhizinate; B16, murine B16 melanoma cell; DHICA, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine; HQ, hydroquinone; KC, keratinocyte; MC, melanocyte; MT, mushroom tyrosinase; NHM, normal human melanocytes; PREP, pigmented reconstructed epidermis model; S91, Cloudman S91 melanoma cells; Tyr., tyrosinase.



(Zhu *et al.*, 2008)

表七、衛生署公佈之美白成分及規定濃度

Table 7. The skin-whitening agents and prescribed concentration published by TFDA.

成分	常見俗名	濃度
Magnesium Ascorbyl Phosphate	維生素 C 磷酸鎂鹽	3%
Kojic acid	麴酸	2%
Ascorbyl Glucoside	維生素 C 糖苷	2%
Arbutin	熊果素	7%
Sodium Ascorbyl Phosphate	維生素 C 磷酸鈉鹽	3%
Ellagic Acid	鞣花酸	0.5%
Chamomile ET	洋甘菊精	0.5%
5,5' – Dipropyl-Biphenyl-2, 2' –diol	二丙基聯苯二醇	0.5%
CetylTranexamate HCl	傳明酸十六烷基酯	3%
Tranexamic acid	傳明酸	2-3%
Potassium Methoxysalicylate (Potassium 4-Methoxysalicylate)	甲氧基水楊酸鉀	1-3%
(Benzoic acid, 2-Hydroxy-4- Methoxy-, Monopotassium Salt)		
3-O-Ethyl Ascorbic Acid (L-Ascorbic Acid, 3-O-Ethyl Ether)	3-o-乙基抗壞血酸	1-2%
Ascorbyl Tetraisopalmitate	脂溶性維生素 C	3%

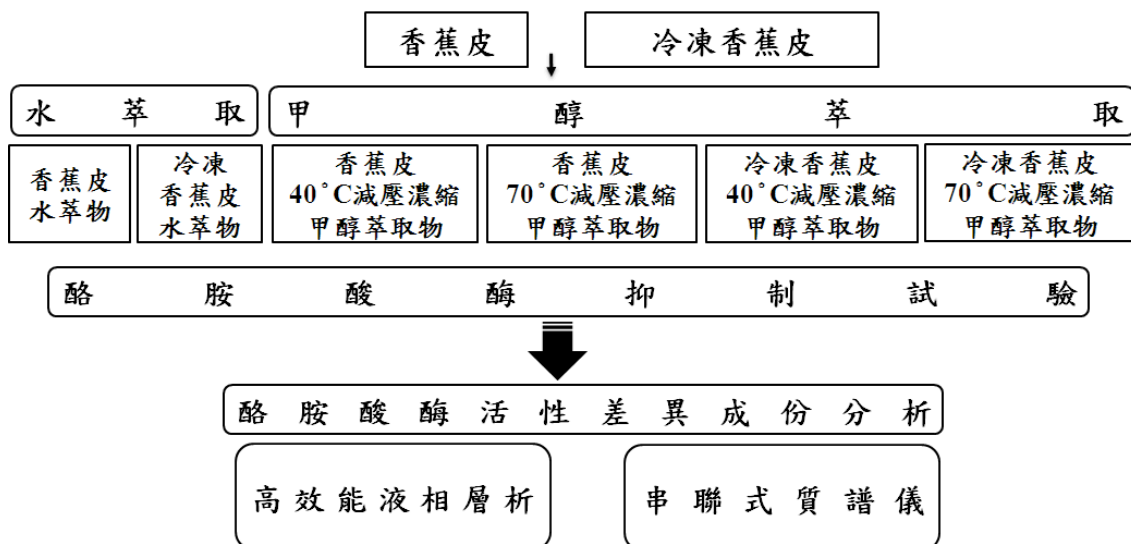
第三章、材料與方法



第一節、實驗目的

基於香蕉皮中富含多種抗氧化物質，本研究探討冷凍處理香蕉皮水萃取物及甲醇萃取物，是否具有酪胺酸酶抑制能力，期望能增加廢棄物的利用性。然發現香蕉皮及冷凍處理組甲醇粗萃取物兩者對酪胺酸酶活性有相反之影響，希望藉由分離純化及成分分析，探討香蕉皮萃取物中造成酪胺酸酶活性差異之成分。

第二節、實驗架構



圖十、實驗架構

Fig. 10. The scheme of this study.



第三節、香蕉皮以不同溶劑萃取及區分層之製備

一、材料萃取前製備

[材料]

1. 實驗材料

實驗所使用之香蕉皮為購自好事多商場都樂 (Dole) 食品公司之台灣產香蕉，採用全黃果色 (fully yellow) 成熟度之香蕉，去除果肉後使用。

2. 設備與材料

真空冷凍乾燥機 (MARTIN CHRIST GmbH, Germany)

真空幫浦 (Edwards Co., USA.)

均質機 (Osterizer, Sunbeam Products, Inc., US)

純水製造裝置 (Merck, Germany)

[方法]

材料分為兩組，一組為香蕉皮於-20°C 冰箱放置一星期後進行冷凍乾燥後以均質機粉碎。另一組為香蕉皮直接置於冷凍乾燥機中冷凍乾燥後，以均質機粉碎。

二、材料萃取

[材料]

1. 藥品與試劑

Methanol (Avantor performance Materials, Inc.)

2. 設備與器材

真空冷凍乾燥機 (Martin Christ GmbH, Germany)

真空幫浦 (Edwards Co., USA.)



恆溫培養箱 (Firstek Scientific Co., Ltd, Taiwan)

Whatman No. 1、5 filter paper (Whatman Ltd, GE Healthcare, UK)

減壓濃縮機 (Büchi, Switzerland)

真空幫浦 (Vacuubrand GmbH, Germany)

恆溫水浴槽 (Heidolph Instruments GmbH, Germany)

[方法]

冷凍乾燥後之香蕉皮粉末加入 20 倍體積 (w:v) 之不同溶劑：(1) 甲醇 (2) 去離子水，於 25°C 震盪萃取 24 小時，萃取液經抽氣過濾去除不溶物。得到水萃取之濾液則經冷凍乾燥去除水分；甲醇萃取之濾液再經減壓濃縮去除溶劑，分別使用 40°C 及 70°C 兩種減壓濃縮之溫度，並經冷凍乾燥完全去除溶劑。得到之香蕉皮、冷凍香蕉皮甲醇及水粗萃物放置於 -80°C 冰箱保存備用。

三、製備香蕉皮萃取物區分層

[材料]

1. 藥品與試劑試劑

Hexane (島久藥品株式會社)

Ethyl acetate (ALPS CHEM)

Butanol (Scharlau Chemie S.A.)

2. 設備與器材

真空冷凍乾燥機 (Martin Christ GmbH, Germany)

真空幫浦 (Edwards Co., USA.)

恆溫培養箱 (Firstek Scientific Co., Ltd, Taiwan)

Whatman No. 1、5 filter paper (Whatman Ltd, GE Healthcare, UK)

減壓濃縮機 (Büchi, Switzerland)

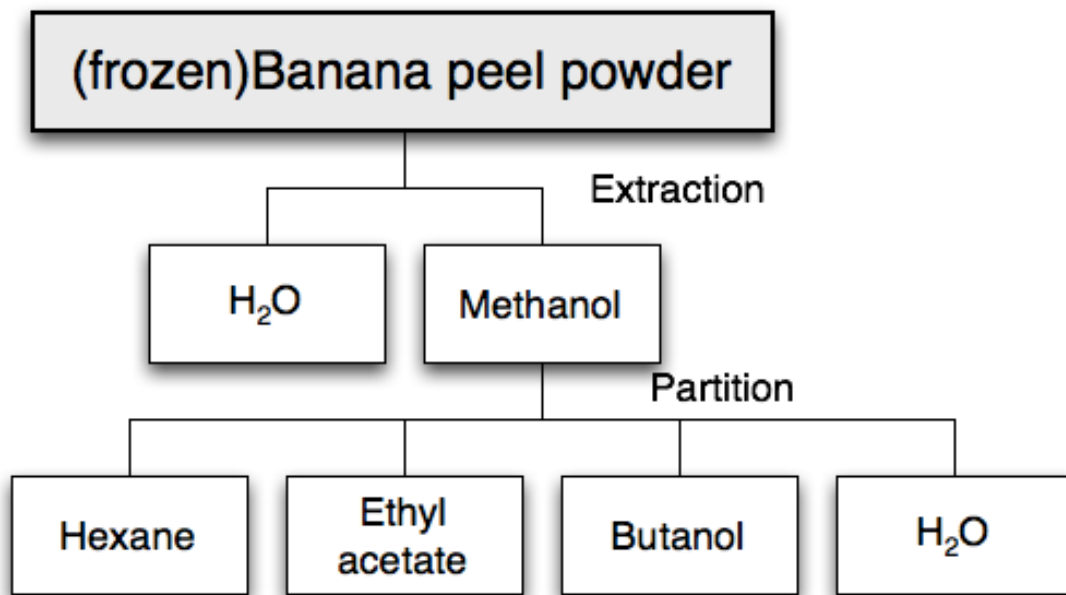
真空幫浦 (Vacuubrand GmbH, Germany)

恆溫水浴槽 (Heidolph Instruments GmbH, Germany)



[方法]

甲醇萃取物乾燥後使用液液萃取的方式分為不同之區分層，將粗萃取物以 1:10 (w: v) 回溶於去離子水中，於其中加入一半體積的己烷，搖一搖使均勻混合，靜置待己烷層澄清後，取出己烷層，剩餘之水層再照上述方法重複以己烷萃取兩次，合併己烷層，進行減壓濃縮去除溶劑。再將乙酸乙酯加入水層（乙酸乙酯與水的體積比為 1:2）混合搖晃，靜置待乙酸乙酯層澄清後，取出乙酸乙酯層，又加入乙酸乙酯重複區分兩次，合併乙酸乙酯層後減壓濃縮去除溶劑。正丁醇與水層（體積比為 1:2）混合後搖晃，靜置待正丁醇層澄清後取出正丁醇層，進行三次液液區分後，合併正丁醇層，得到正丁醇層及水層減壓濃縮去除溶劑。並將減壓濃縮後的香蕉皮甲醇萃取物-己烷、甲醇萃取物-乙酸乙酯、甲醇萃取物-正丁醇、甲醇萃取物-水層再經過冷凍乾燥完全去除水分後，放置於-80°C 冰箱保存備用。



圖十一、香蕉皮萃取物製備方式

Fig. 11. The preparation methods of banana peel extract.

第四節、樣品測試

一、體外酪胺酸酶活性試驗

[材料]

1. 藥品與試劑

Mushroom tyrosinase (Sigma, U.S.A.)

3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-Dopa)(Sigma, U.S.A.)

Kojic acid (Sigma, U.S.A.)

Potassium phosphate (KH_2PO_4)(J.T. Baker, U.S.A.)

Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)(J.T. Baker, U.S.A.)

2. 設備與器材

電動多爪可調式微量分注器 (Eppendorf explorer, Hamburg, Germany)

光譜分析儀 (VersaMax Molecular Device Co., USA)



[方法]

參考 Masuda 等人 (Masuda *et al.*,2005) 與 Likhitwitayawuid 和 Sritularak (Likhitwitayawuid and Sritularak, 2001) 之試驗方法並作修改。首先將商品化之 mushroom tyrosinase 溶解於 50 mM potassium phosphate buffer，配製成 100 U/mL 之酵素溶液。將 40 μ L 待測樣品加入 40 μ L mushroom tyrosinase (100 U/ml)，室溫下反應十分鐘，再加入 40 μ L 0.85 mM 之 L-Dopa (potassium phosphate buffer)，避光反應二十分鐘後，利用光譜分析儀測定在 475 nm 下之吸光值。

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{[(C-D)-(A-B)]}{(A-B)} \times 100\%$$

A: 未加入樣品之 475 nm 下吸光值

B: 未加入樣品及酵素之 475 nm 下吸光值

C: 加入樣品之 475 nm 下吸光值

D: 加入樣品然未加入酵素之 475 nm 下吸光值

二、 酵素抑制動力學

1. 藥品與試劑

Mushroom tyrosinase (Sigma, U.S.A.)

3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-Dopa)(Sigma, U.S.A.)

Kojic acid (Sigma, U.S.A.)

Potassium phosphate (KH_2PO_4)(J.T. Baker, U.S.A.)

Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)(J.T. Baker, U.S.A.)



2. 設備與器材

電動多爪可調式微量分注器 (Eppendorf xplorer, Hamburg, Germany)

光譜分析儀 (VersaMax Molecular Device Co., USA)

[方法]

根據體外酪胺酸酶實驗找出樣品中抑制 50% 酵素活性之濃度，作為最適抑制劑濃度。將 L-dopa 以 potassium phosphate buffer 序列稀釋，取 40 μ L mushroom tyrosinase (100 U/mL)，加入最適抑制濃度之樣品 10 μ L 中混合均勻後在室溫待其反應 10 分鐘，而空白組以 potassium phosphate buffer 取代樣品。最後加入 L-Dopa 不同稀釋液濃度各 200 μ L，避光反應 20 分鐘後，利用光譜分析儀測定在 475 nm 下之吸光值。將所得的數據以基質倒數為 x 軸，而以吸光值的倒數為 y 軸，得到雙倒數作圖。比較酵素動力學作圖和抑制劑的抑制動力學作圖推得抑制劑對酵素之抑制機制。

第五節、香蕉皮萃取物成分分析

一、 高效能液相層析儀 (HPLC) 分析香蕉皮萃取物

[材料]

1. 藥品與試劑

分析級甲醇 (Aencore chemical Co., Ltd)

2. 設備與器材

純水製造裝置 (Merck, Germany)

0.2 μ m 濾膜 (Pall Corp., USA)



高效能液相層析儀

- (a) 脫氣設備 (ERC Inc., Japan)
- (b) 幫浦 (Jasco Co., Tokyo, Japan)
- (c) 自動進樣器 (Jasco Co., Tokyo, Japan)
- (d) 烘箱 (Hipoint, Taiwan)
- (e) 偵測器 (Shimadzu, Japan)
- (f) 儀器控制與資源分析軟體 (SISC 訊華, 台灣)
- (g) 分析管柱：管柱型號：Reversed phase Agela Innoval C18 column (250 mm x 4 mm, i.d. and particle size 5 μm)(Bonna-Agela Technologies Inc., USA)

[方法]

參考 Wen 等人實驗所使用的條件 (Wen *et al.*, 2005) 來做調整，本實驗使用逆向 C-18 管 (reversed phase Macherey-Nagel C-18 column (250 mm x 4 mm, i.d. and particle size 5 μm))，移動相分別為甲醇 (A)；水 (B)。所有萃取物在分析前以 25% 甲醇回溶至 500 ppm，再經 0.2 μm filter 過濾。

高效液相層析儀 (HPLC) 參數設定

管柱型號：Reversed phase Agela Innoval C18 column (250 mm x 4 mm, i.d. and particle size 5 μm)

流速：0.5 mL/min

移動相：

Solvent A：甲醇

Solvent B：水



注入體積：100 μ L

Photodiode array (PDA): 200-400 nm。發現樣品於波長 254 nm、280 nm、330 nm 下

有最大吸光值。

梯度設定：

Time (min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
0	25	75
5	25	75
10	30	70
16	45	55
26	100	0
40	100	0
50	25	75
55	25	75

二、串聯式質譜儀 (ESI-MS/MS) 分析香蕉皮萃取物

1. 串聯式質譜儀 (ESI-MS/MS) 參數設定

scan range: 50 – 500 m/z

sheath gas flow rate: 25 arb

aux gas flow rate: 12 arb

spray voltage: 3.5 kv

capillary temperature: 325 °C

capillary voltage: -35 V

第六節、統計分析

實驗數據以 SAS v 9.2 版 (SAS Institute Inc., Cary, NY, USA) 軟體執行統計分析，以 one way ANOVA 判定有無差異性，並以鄧氏新多變預測法 (Duncan's New Multiple Range Test) 檢定兩兩之間是否有顯著差異，以 $p < 0.05$ 作為具顯著性差異之標準。



第四章、結果與討論



第一節、萃取物之萃取率

蕉果重 135.13 ± 6.75 g，香蕉皮重 46.82 ± 2.94 g 佔蕉果重量 $34.63 \pm 0.60\%$ ，與文獻中香蕉皮佔蕉果重量 30-40% 相符。經冷凍乾燥後，乾燥香蕉皮粉末為香蕉皮重量之 $10.62 \pm 0.25\%$ ， -20°C 冷凍處理香蕉皮粉末為香蕉皮重量之 $10.49 \pm 0.44\%$ ，香蕉皮約含有九成的水分。香蕉皮粉末及 -20°C 冷凍處理香蕉皮粉末進行水萃取和甲醇萃取，而甲醇萃取組又使用兩種減壓濃縮之溫度，一為 40°C ，另一為 70°C 。水與甲醇均為常用之高極性萃取溶劑。水之極性高於甲醇，可萃取樣品中水溶性物質，甲醇除了萃取出水溶性物質尚可萃出其他極性稍低之物質，如脂質。已有研究顯示香蕉皮經甲醇萃取後可得極高之抗氧化活性 (González-Montelongo *et al.*, 2010)。

萃取率 (yield of extraction) 是指樣品經由萃取後，所得萃取物重量除以原本樣品乾重。而植物材料的萃取效率 (extraction efficiency) 則是與液-固萃取 (liquid-solid extraction) 進行過程之條件有關，如樣品品種 (González-Paramás *et al.*, 2004)、樣品前製備、溶劑種類、固液相比 (liquid to solid ratio)、萃取過程之時間及溫度等 (Spingno *et al.*, 2007)。不同植物材料具有不同結構及組成上的差異，因此當他們與溶劑結合時所造成的材料-溶劑系統 (material-solvent system) 之特性是難以預測的 (Pinelo *et al.*, 2005)。一般對於抗氧化物之萃取流程均在 $20-50^{\circ}\text{C}$ 環境下進行 (Li *et al.*, 2006)，萃取時間為三十分鐘至二十四小時 (Lafka *et al.*, 2007；Xu *et al.*, 2008；Shui and Leong, 2006)。若在高溫下進行萃取，雖然會因為增進析物之擴散率及其於溶劑中之溶解率而促進萃取效率，然而高溫卻造成植物化學成分 (phytochemicals) 的降解並因揮發而喪失；此外具有生物活性之物質將會與植物材料中的其他物質發生反應，而影響萃取的進行 (Larrauri *et al.*, 1997)。長時

間萃取雖然可以促進萃取效率，不過植物樣品中之抗氧化物質也隨時間跟溫度增長而降解。

本實驗各萃取物採用之萃取流程均在 25°C 下萃取二十四小時，符合文獻中提及之抗氧化物最適萃取條件。即使過程中沒使用高溫萃取，然而其中有兩種萃取物之製備是在萃取後使用 70°C 的減壓濃縮溫度，因此有可能造成上述植物化學成分降解、揮發或促進活性物質反應的發生。

萃取結果如表八所示，香蕉皮水萃取物 (BPW) 之萃取率為 19.00%，甲醇以 40°C 減壓濃縮 (BP40M) 萃取率為 41.79%，70°C 減壓濃縮組 (BP70M) 萃取率為 42.95%；冷凍處理香蕉皮水萃取物 (FBPW) 之萃取率為 25.30%，甲醇以 40°C 減壓濃縮 (FBP40M) 萃取率為 36.02%，70°C 減壓濃縮組 (FBP70M) 萃取率為 35.71%。結果顯示萃取率依溶劑不同而有所不同，且具有顯著性差異。香蕉皮和冷凍處理香蕉皮萃取不論使用水或甲醇萃取，萃取率皆不相同，水萃取組冷凍處理之香蕉皮萃取率較高，甲醇萃取組冷凍處理香蕉皮之萃取率較低。而甲醇萃取組，不論是 40°C 或 70°C 減壓濃縮組，其萃取率均無顯著性差異，顯示無論是否經過冷凍處理香蕉皮甲醇萃取率不受減壓濃縮溫度之影響。

表八、香蕉皮及冷凍香蕉皮之萃取率

Table 8. Extraction yield of banana and frozen banana.

Sample	Weight (g)	Percentage (%)
Banana peel	46.82±2.94	
Banana peel powder	4.98±0.26	10.62±0.25
Frozen banana peel ¹ powder	4.89±0.06	10.49±0.44

Extract	Yield of extraction (%)	
	Banana peel	Frozen banana peel
water	19.00±3.12 ^d (BPW)	25.30±1.44 ^c (FBPW)
methanol concentration	40°C	41.79±1.32 ^a (BP40M)
	70°C	42.95±0.70 ^a (BP70M)
methanol concentration	40°C	36.02±2.11 ^b (FBP40M)
	70°C	35.71±1.96 ^b (FBP70M)

Yield of extraction was expressed as g extract /g (dried wt.) banana peel and frozen banana peel * 100%.

Mean± SD (n=3)

¹Banana peel was frozen at -20 °C for 7 days.

Symbols followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

BPW: Banana peel water extract

FBPW: Frozen banana peel water extract

BP40M: Banana peel methanol extract concentrated at 40°C

FBP40M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C

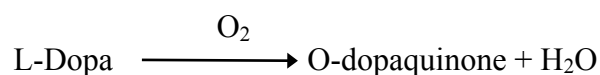
BP70M: Banana peel methanol extract concentrated at 70°C

FBP70M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 70°C



第二節、體外酪胺酸酶活性試驗


酵素抑制模式與基質和抑制劑的結構有關 (Chen and Kubo, 2002)。本實驗中採用 L-Dopa 作為酵素實驗中之基質，因此本實驗之酪胺酸酶抑制率是表示對二酚酶之活性抑制 (Ritaro *et al.*, 2006)。利用 L-Dopa 被二酚酶氧化後生成多巴醌，酵素催化之主要反應如下：



多巴醌再經過自發性化學反應形成多巴色素後，測量在 475 nm 之吸光值，得知多巴色素產生的量 (Behbahani *et al.*, 1993)，加入待測樣品組與空白組相比，若吸光值降低則表示多巴色素的形成被抑制，代表該樣品具有抑制酪胺酸酶催化反應之能力。天然萃取物之酪胺酸酶抑制試驗已有多篇文獻，然各實驗間採用之基質濃度各不相同而難以比較，因此通常酪胺酸酶抑制實驗中會加入一廣為人知的酪胺酸酶抑制劑—麴酸作為正對照組。

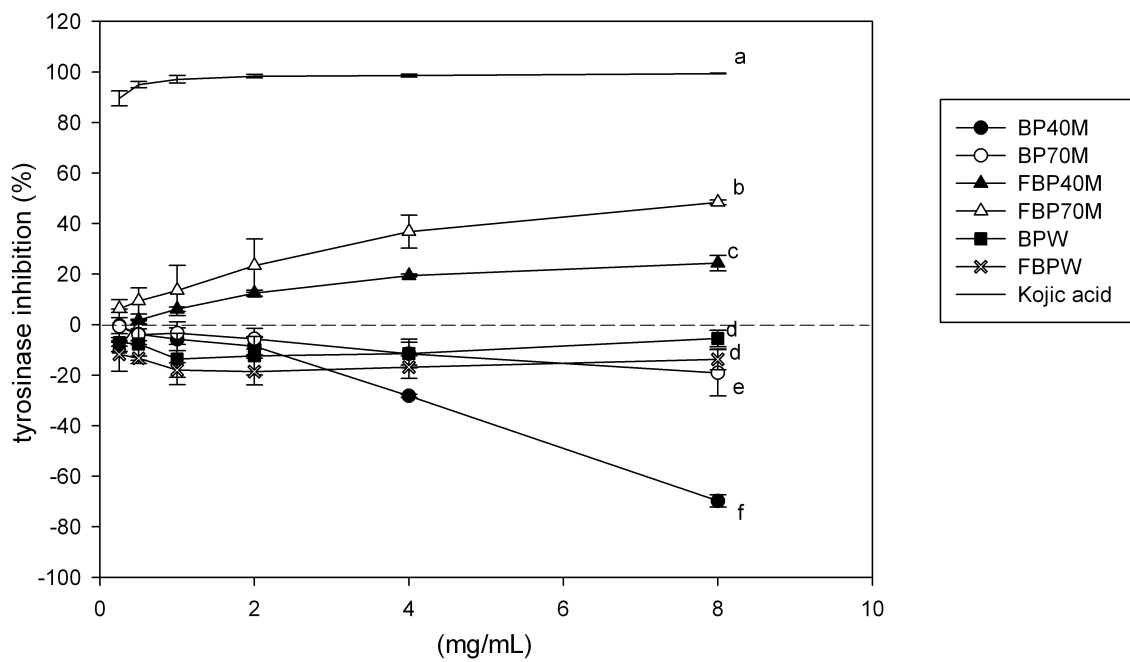
香蕉皮水萃及 40°C、70°C 減壓濃縮之甲醇萃取物與冷凍香蕉皮水萃及 40、70°C 減壓濃縮之甲醇萃取物以 potassium phosphate buffer 回溶後，配製成 0.25、0.5、1、2、4、8 mg/mL 之濃度，與商品化之酪胺酸酶作用後，加入基質 L-Dopa 測試酪胺酸酶活性抑制百分比。

實驗結果顯示香蕉皮甲醇萃取物不論是 40°C (BP40M) 或 70°C (BP70M) 減壓濃縮組均增進多巴色素之生成，並隨樣品處理濃度增加而增加，且 40°C 減壓濃縮組較 70°C 減壓濃縮組更能促進多巴色素之生成，前者於 8 mg/mL 時較空白



組增加 69.75% 之多巴色素生成量，而後者於 8 mg/mL 時則增加 19.04% 之多巴色素生成量。冷凍處理香蕉皮甲醇萃取物不論是 40°C (FBP40M) 或 70°C (FBP70M) 減壓濃縮組，均減少多巴色素生成的量，且隨樣品處理濃度增加而減少多巴色素生成的量，推測此二樣品均可抑制酪胺酸酶之活性，70°C 減壓濃縮組較 40°C 減壓濃縮組減少較多之多巴色素生成，前者於 8 mg/mL 時較空白組減少 48.41% 多巴色素之生成，後者於 8 mg/mL 時則減少 24.36% 之多巴色素生成量。水萃取物組不論是否經過冷凍處理幾乎是不減少也不增加多巴色素之生成，且兩者不具有顯著性差異（圖十二）。

雖然抑制酪胺酸酶活性之樣品—FBP40M、FBP70M，對酪胺酸酶的抑制百分比與正對照組—麴酸仍有一段差距。然而香蕉皮甲醇萃取物經過冷凍處理過後，由增進多巴色素之生成轉變為減少多巴色素之生成，為一值得探討之議題，後續實驗採用香蕉皮及冷凍處理香蕉皮甲醇萃取物包括 BP40M、BP70M、FBP40M 及 FBP70M 作進一步之成分分離實驗，並以測試酪胺酸酶活性作為實驗標的，以期找出造成香蕉皮甲醇萃取物經過冷凍處理而改變多巴色素生成量之影響因子。



圖十二、不同處理條件之香蕉皮萃取出物對酪胺酸酶活性之影響

Fig. 12. Tyrosinase inhibitory activity of banana peel extracts by different treatment.

The mean \pm SE of three observations has been plotted.

Symbols followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

BPW: Banana peel water extract

FBPW: Frozen banana peel water extract

BP40M: Banana peel methanol extract concentrated at 40°C

FBP40M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C

BP70M: Banana peel methanol extract concentrated at 70°C

FBP70M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 70°C



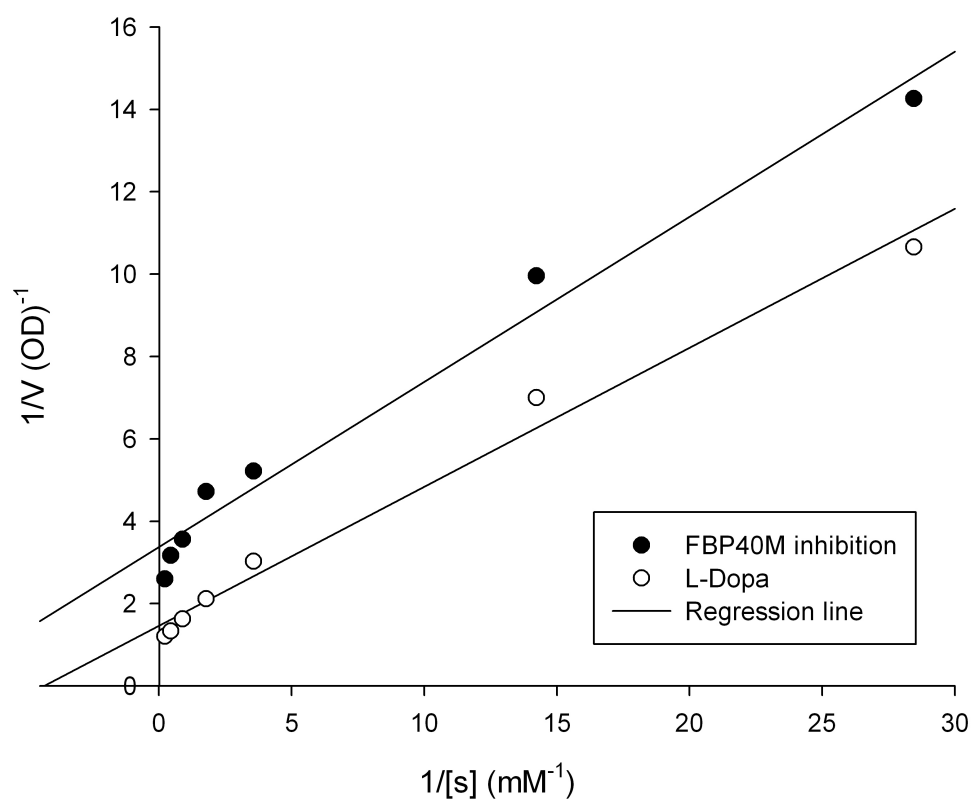
第三節、酵素抑制動力學試驗

取冷凍香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M)約能抑制酪胺酸酶50%活性之濃度，於不同濃度之L-Dopa下測定酪胺酸酶活性，並利用繪製Lineweaver-Burk雙倒數作圖分別得到酪胺酸酶的雙倒數動力學作圖和抑制劑—冷凍香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇萃取物之雙倒數抑制動力學作圖。求得酪胺酸酶之 K_m 和 V_{max} 值分別為 0.23 mM與0.67 OD/min，在加入抑制劑後 K_m 和 V_{max} 值分別為 0.10 mM 和0.29 OD/min， K_m 、 V_{max} 均較未加入抑制劑前變小，可推得冷凍香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇萃取物對酪胺酸酶之抑制為不競爭型 (uncompetitive) 之抑制 (圖十三)。

另取冷凍香蕉皮70°C減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M) 約能抑制酪胺酸酶50%活性之濃度，於含有不同濃度之 L-Dopa 下測定酪胺酸酶活性，並利用繪製Lineweaver-Burk 雙倒數作圖分別得到酪胺酸酶的酵素雙倒數動力學作圖和抑制劑—冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物之雙倒數抑制動力學作圖。求得酪胺酸酶之 K_m 和 V_{max} 值分別為 0.40 mM 與0.77 OD/min，在加入抑制劑後 K_m 和 V_{max} 值分別為0.33 mM 和0.61 OD/min， K_m 與 V_{max} 在加入抑制劑後均變小，得知冷凍香蕉皮70°C減壓濃縮甲醇萃取物對酪胺酸酶之抑制為不競爭型之抑制 (圖十四)。



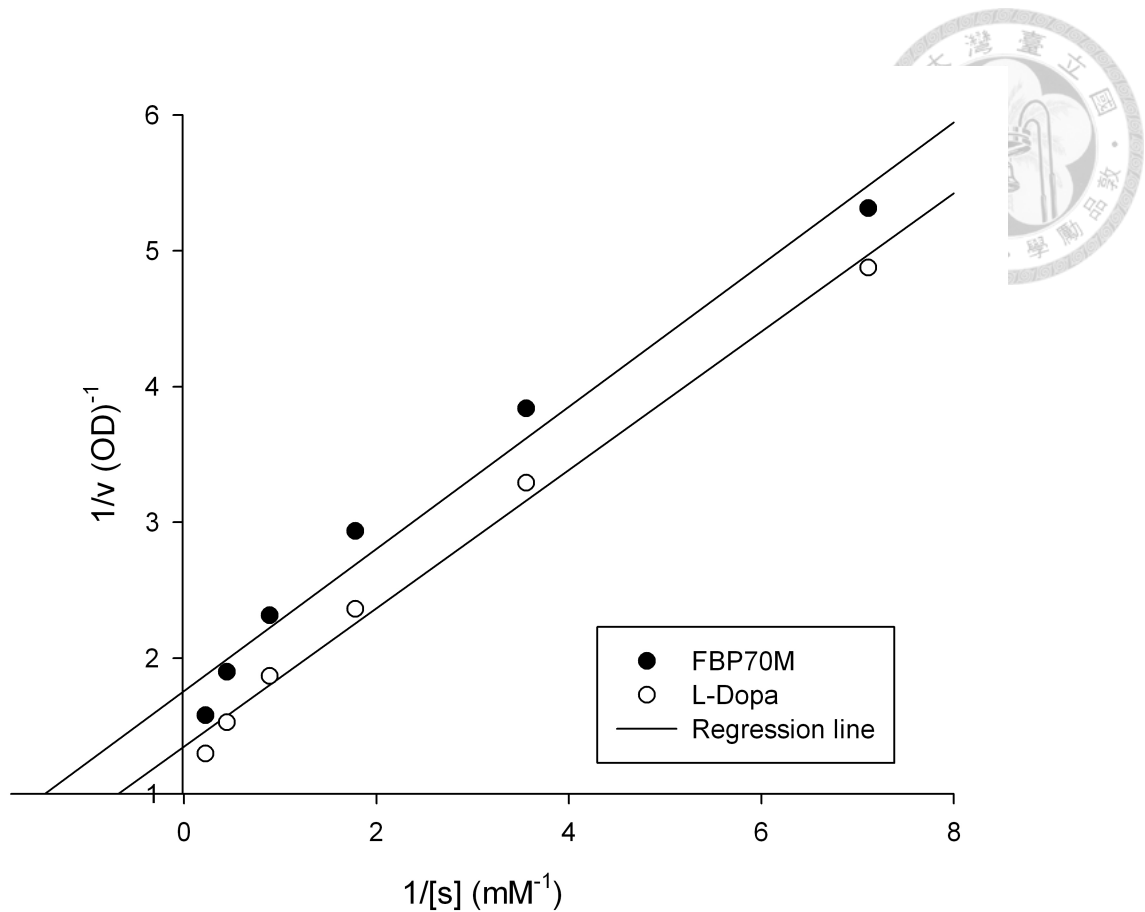
FBP40M 和 FBP70M 對酪胺酸酶催化以 L-Dopa 為基質的反應均為不競爭型抑制，結果也顯示香蕉皮甲醇萃取物，經過高溫減壓濃縮，對酵素之抑制機制不會產生影響。



圖十三、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M)

對酪胺酸酶之抑制動力學試驗

Fig. 13. Lineweaver- Burk plots for inhibition of FBP40M on tyrosinase.
Triple reciprocal plot for determining the V_{max} and K_m values of FBP40M
FBP40M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C



圖十四、冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M)

對酪胺酸酶之抑制動力學試驗

Fig. 14. Lineweaver- Burk plots for inhibition of FBP70M on tyrosinase.
Triple reciprocal plot for determining the V_{\max} and K_m values of FBP40M
FBP70M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 70°C




第四節、香蕉皮甲醇萃取物之液液萃取區分

天然粗萃取物一般是由多種具有不同物理、化學性質之物質所組成極為複雜的混合物，因此可利用不同的物化特性，將他們初步分離成不同的化學基團，並根據相關文獻，預測在特定的萃取物中可能出現的化合物形式而找出適合的萃取及分離方式。

一般植物樣品之醇類萃取物包含許多極性和中極性之物質。藉著共溶 (cosolubility) 的特性，許多物質無法單獨溶解於甲醇或乙醇中，可以容易的被這些溶劑萃取出來。

分離方式包括層析法、溶劑分層法及結晶技術等。在層析方法出現前，溶劑分離和結晶分離早已被廣泛使用。溶劑分層法可以成功的應用在不同類別之天然產物分離。液液萃取區分 (liquid-liquid partition) 之方法主要是利用兩不互溶之溶劑 (immiscible solvent)，由於物質的分佈與不同的分配系數 (partition coefficient) 有關，也就是受溶質在兩不互溶之溶劑間於界面處達到平衡時的濃度比例所影響，因此能有效的使物質分離。而植物天然產物最常用之方式為以有機溶劑照極性漸增的方式依序分層萃取 (Craig, 1994)。

為了得知造成香蕉皮甲醇萃取物經過冷凍處理而使酪胺酸酶催化 L-Dopa 生成多巴色素量的改變因素，因此進一步使用有機溶劑對 BP40M、BP70M、FBP40M 及 FBP70M 樣品進行區分，以正己烷 (hexane)、乙酸乙酯 (ethyl acetate)、正丁醇 (butanol) 及水依極性不同進行液液萃取區分。使用之有機溶劑極性高至低分別為：水 > 正丁醇 > 乙酸乙酯 > 正己烷 (He *et al.*, 2002)。首先將甲醇粗萃取樣品溶於去離子水中，使用正己烷與水進行香蕉皮萃取物液液萃取區分，得到之區分層包含非極性或低極性物質，可能有油脂類、類固醇及葉綠素等。因此此過程又稱為去脂 (defatting)。剩下之水層再與乙酸乙酯進行液液萃取區分，得到之區分層含中



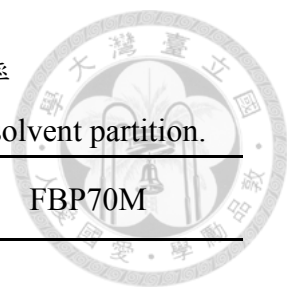
低極性之物質，如酚類、類黃酮、三萜類及可能帶有醣基之類固醇。最後將剩下之水層與正丁醇進行液液萃取區分，得到之區分層含中高極性物質，如帶醣基酚類、帶醣基類黃酮、帶醣基三萜類、帶醣基之固醇。而剩下的水層，經減壓濃縮冷凍乾燥後，呈現粘性之膠狀，其中含高極性物質，如醣苷類、多醣類。然而應用液液萃取區分的方式並非總是準確的方法，時常能發現物質在不同區分層重複出現 (Takeda and Fatope, 1988)。

香蕉皮甲醇萃取物不論是 BP40M、BP70M、FBP40M 或 FBP70M 得到各區分層之萃取率由高至低分別為：水層 > 正己烷層 > 正丁醇層 > 乙酸乙酯層(表九)，可能與香蕉皮甲醇萃取物中不同極性物質之含量不同相關。

得到 BP40M、BP70M、FBP40M 及 FBP70M 各分層萃取物後，接著進行酪胺酸酶抑制試驗，測試各分層萃取物之多巴色素生成量。

表九、香蕉皮及冷凍處理組甲醇萃取物有機溶劑之區分層萃取率

Table. 9. Extraction yield of banana peel and frozen banana peel by solvent partition.



	BP40M	BP70M	FBP40M	FBP70M
Fraction				
Hexane	8.2±1.63	7.66±1.08	8.44±2.17	7.91±3.67
Ethyl acetate	2.64±0.23	1.66±0.41	1.86±0.20	0.55±0.01
Butanol	6.07±0.79	5.67±0.22	5.91±0.47	5.47±0.45
Water	86.59±0.35	86.2±1.02	84.71±6.81	85.26±2.06

Yield of extraction was expressed as g extract /g (dried wt.) banana peel and frozen banana peel * 100%.

Mean± SD (n = 3)

BPW: Banana peel water extract

FBPW: Frozen banana peel water extract

BP40M: Banana peel methanol extract concentrated at 40°C

FBP40M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C

BP70M: Banana peel methanol extract concentrated at 70°C


FBP70M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 70°C



第五節、香蕉皮甲醇萃取物有機溶劑分層萃取物之體外酪胺酸酶活性試

將香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP40M)，經正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層分層後，以各層萃取物進行酪胺酸酶酵素抑制試驗。正己烷跟乙酸乙酯層萃取物均較空白組減少多巴色素生成，且隨萃取物濃度增加而減少多巴色素之生成，推測兩者均能抑制酪胺酸酶之活性。正己烷層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時，較空白組減少 56.23%多巴色素之生成；乙酸乙酯層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時則減少了 68.75%，兩者無顯著性差異。而正丁醇層跟水層萃取物皆較空白組增進多巴色素之生成，且隨萃取物濃度增加而增進多巴色素之生成。正丁醇層較水層更加增進多巴色素之生成，正丁醇層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時，較空白組增加 79.15%之多巴色素生成；水層萃取物在相同濃度下，則增加 43.47%之多巴色素生成（圖十四）。

香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP70M)經有機溶劑分層，各層萃取物進行酪胺酸酶活性抑制試驗。正己烷及乙酸乙酯層萃取物均較空白組減少多巴色素之生成，且隨萃取物濃度增加而減少多巴色素之生成，顯示兩者均抑制酪胺酸酶之活性，正己烷層萃取物較乙酸乙酯層萃取物更能減少多巴色素之生成，正己烷層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時，較空白組減少 50.32%多巴色素之生成；乙酸乙酯層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時則減少 42.85%。正丁醇層萃取物則較空白組增進多巴色素之生成，在濃度為 8 mg/mL 時，能增進 47.94%多巴色素之生成。水層與空白組相比則不增進或減少多巴色素之生成（圖十五）。BP70M 與 BP40M 相比，顯示在萃取物製備過程中提高減壓濃縮溫度至 70°C，使水層萃取物由較空白組增進多巴色素生成而變成不增進也不減少多巴色素之生成，可能是由於高溫減壓濃縮



造成植物化學成分降解揮發或促進活性物質發生反應。水層中可能含高極性之物質如醣類、多醣體等，文獻指出香蕉皮中含有葡萄糖、果糖、蔗糖及麥芽糖等 (Chandrabu *et al.*, 2011)，醣類經過高溫加熱會發生非酵素型褐變，產生焦糖化之產物 (caramelisation product)，焦糖化產物具有抗氧化活性 (Benjakul *et al.*, 2005；Manzocco *et al.*, 2001)，因此影響酪胺酸酶催化生成多巴色素之反應。

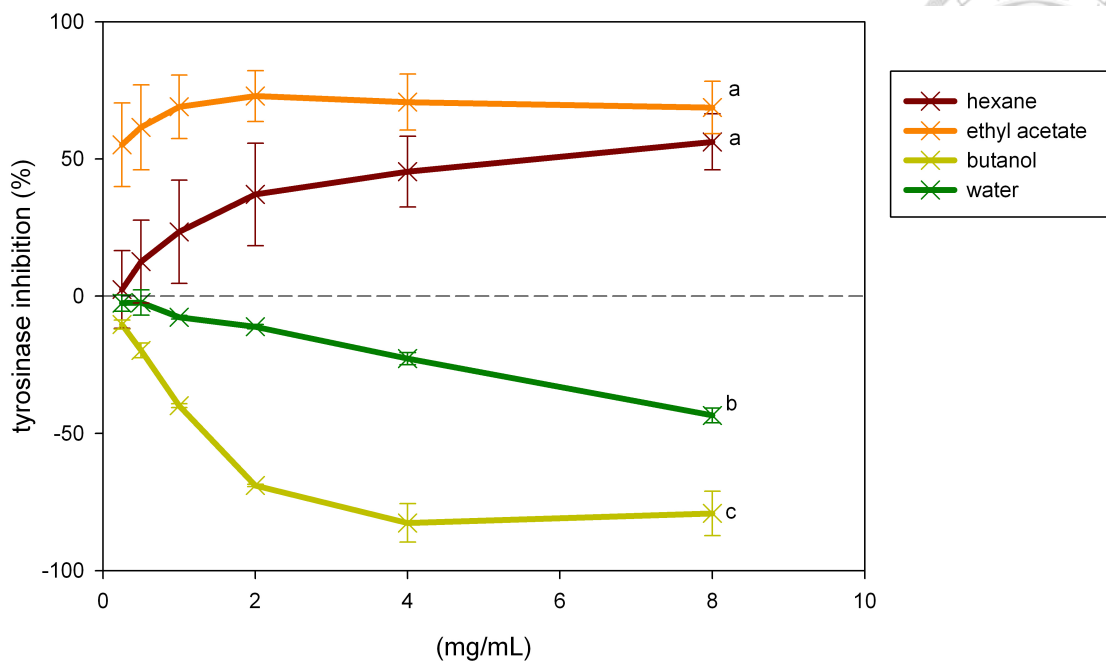
冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M) 經有機溶劑分層，各分層萃取物進行酪胺酸酶活性抑制試驗。正己烷、乙酸乙酯與正丁醇層之萃取物皆較空白組減少多巴色素之生成，且隨萃取物濃度增加而減少多巴色素之生成，推測此三分層萃取物能抑制酪胺酸酶之活性，正己烷層萃取物在濃度為 8 mg/mL 時較空白組減少 60.64% 多巴色素之生成，乙酸乙酯層萃取物在同濃度下則減少 42.23% 多巴色素之生成，正丁醇層萃取物在同濃度下亦減少 53.74% 多巴色素之生成。而水層則不增進也不減少多巴色素之生成 (圖十六)。FBP40M 與 BP40M 相比可發現經冷凍處理造成正丁醇層萃取物由較空白組增進成轉變為減少多巴色素之生成，並造成水層萃取物由增進轉變為不增進也不減少多巴色素之生成。由於正丁醇層中可能含有帶醣基之固醇、三萜、類黃酮、酚類，推測造成此現象之原因，可能由於酪胺酸酶 (多酚氧化酶) 為一具廣泛專一性的酵素，香蕉皮內原有之酚類亦為其基質，因此在酪胺酸酶酵素試驗時，被氧化成醌類形成黑色素而造成吸光值的增加。而冷凍過程造成細胞間隙的冰晶生成，在處理樣品過程中，發生解凍，造成細胞內隔室遭到破壞，各種水解酵素及氧化酵素釋出，如多酚氧化酶與酚類反應使之聚合成多酚類，不再受酪胺酸酶氧化，因此不會較未加入樣品組增加 475



nm 下之吸光值。此外經過多酚氧化酶催化反應之產物—黑色素 (Palmer, 1963; 袁等氏, 2013; 朱與陳, 2011), 也具有抗氧化之功能 (Jacobson and Tinnell, 1993; Jacobson *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2007), 因此可能具有抑制酪胺酸酶之活性。

冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M) 經有機溶劑分層, 各層萃取物進行酪胺酸酶活性抑制試驗。不論是正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層各層萃取物均較空白組減少多巴色素之生成, 得知冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物之不同分層萃取物皆抑制酪胺酸酶活性, 正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水層各層萃取物在濃度於 8 mg/mL 時分別較空白組降低 31.56%、58.06%、57.64% 及 41.06% 之多巴生成 (圖十七)。FBP70M 與 FBP40M 相比, 顯示經過高溫減壓濃縮, 正己烷層之減少多巴生合成、抑制酪胺酸酶之能力有下降的現象, 可能是活性物質受到高溫的破壞, 水層由不減少也不促進轉變減少多巴色素之生成, 造成這個改變有可能是因為前述香蕉皮甲醇萃取物之水分層萃取物中富含醣類, 經由高溫減壓濃縮之後產生焦糖化產物, 為一抗氧化物質, 且能競爭型抑制以 L-Dopa 作為基質的多酚氧化酶 (酪胺酸酶) 催化反應 (Lee and Lee, 1996)。

不同處理之香蕉皮甲醇萃取物, 經由冷凍處理會造成正丁醇分層萃取物由增進轉變為減少多巴色素之生成, 並使水層萃取物由增進轉變為不增進也不減少多巴色素之生成。而在萃取物製備過程中, 若使用 70°C 減壓濃縮, 會造成正己烷分層萃取物的抑制酪胺酸酶活性降低, 也會造成水層對多巴色素生成之影響。選定冷凍處理造成多巴色素產量變化最大之正丁醇分層萃取物做進一步的成分分析。



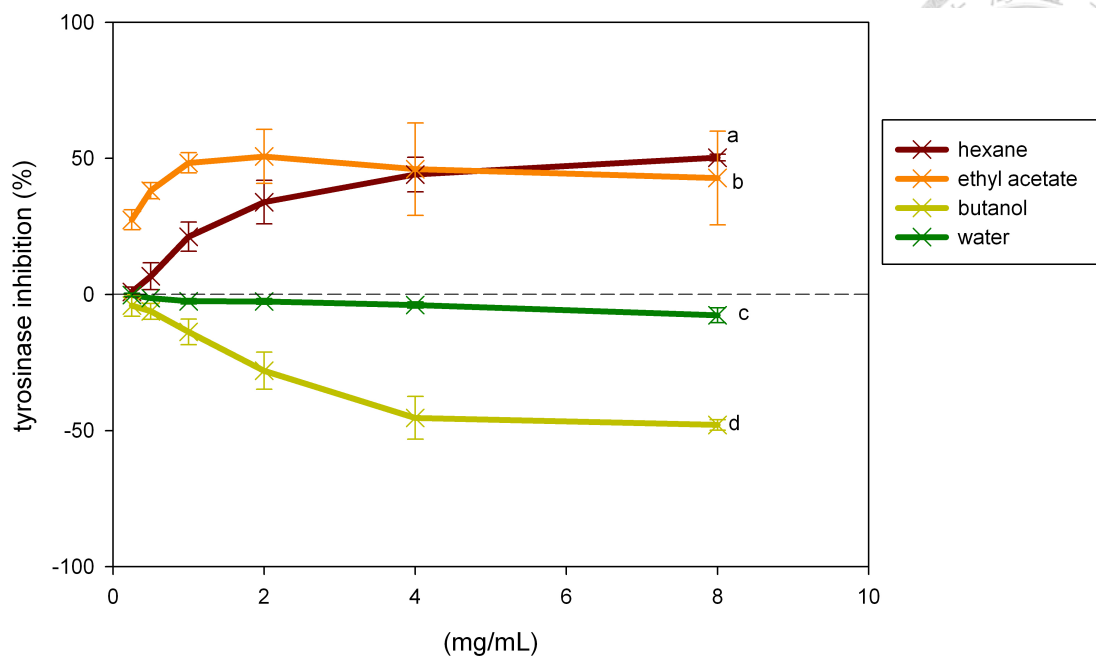
圖十五、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP40M) 有機溶劑分層萃取物
對酪胺酸酶活性之影響

Fig. 15. Tyrosinase inhibitory activity of different solvent fraction of BP40M.

The mean \pm SE of three observations has been plotted.

Symbols followed by the same letter are not significantly different.

BP40M: Banana peel methanol extract concentrated at 40°C



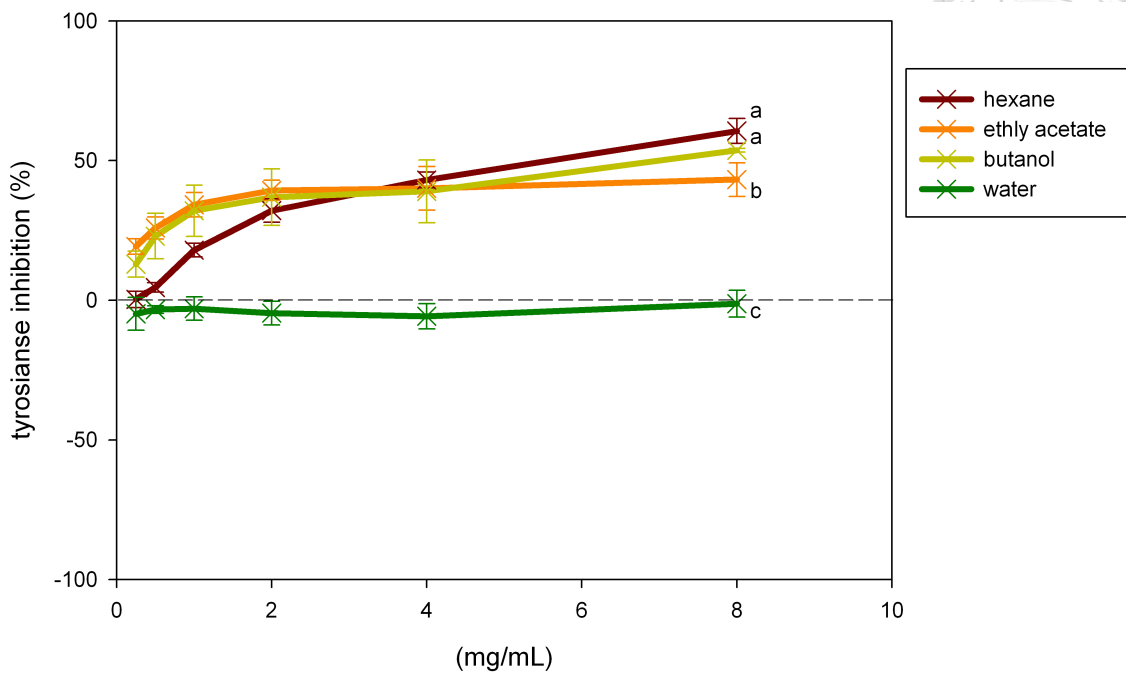
圖十六、香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (BP70M) 有機溶劑分層萃取物
對酪胺酸酶活性之影響

Fig. 16. Tyrosinase inhibitory activity of different solvent fraction of BP70M.

The mean \pm SE of three observations has been plotted.

Symbols followed by the same letter are not significantly different.

BP70M: Banana peel methanol extract concentrated at 70°C

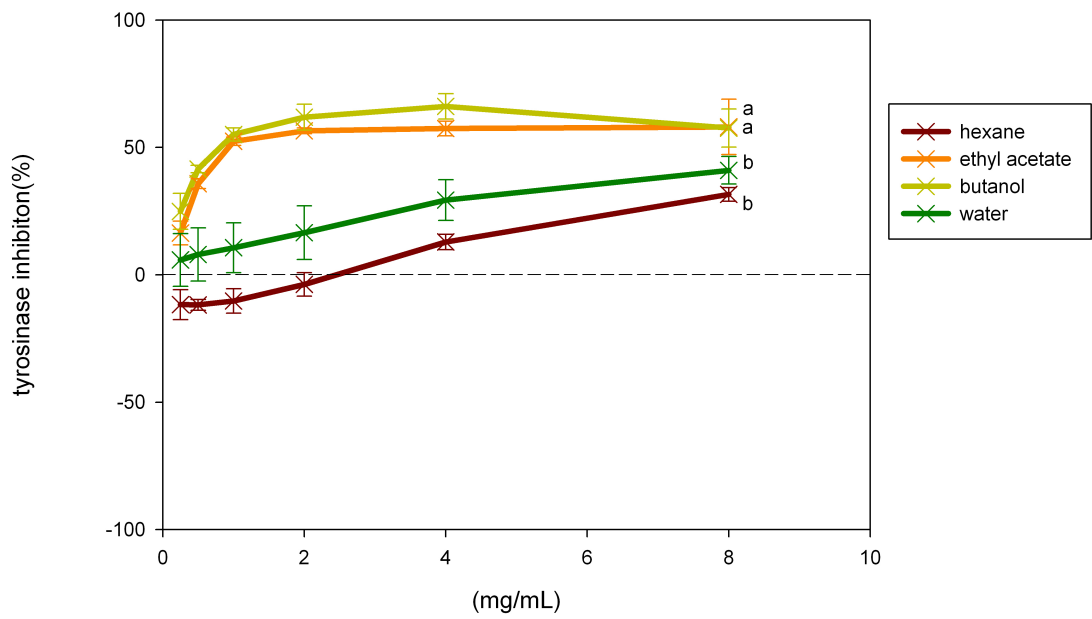


圖十七、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP40M) 有機溶劑分層萃取物對酪胺酸酶活性之影響

Fig. 17. Tyrosinase inhibitory activity of different solvent fraction of FBP40M.

The mean \pm SE of three observations has been plotted.

FBP40M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 40°C



圖十八、冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物 (FBP70M) 有機溶劑分層萃取物對酪胺酸酶活性之影響

Fig. 18. Tyrosinase inhibitory activity of different solvent fraction of FBP70M.

The mean \pm SE of three observations has been plotted.

Symbols followed by the same letter are not significantly different.

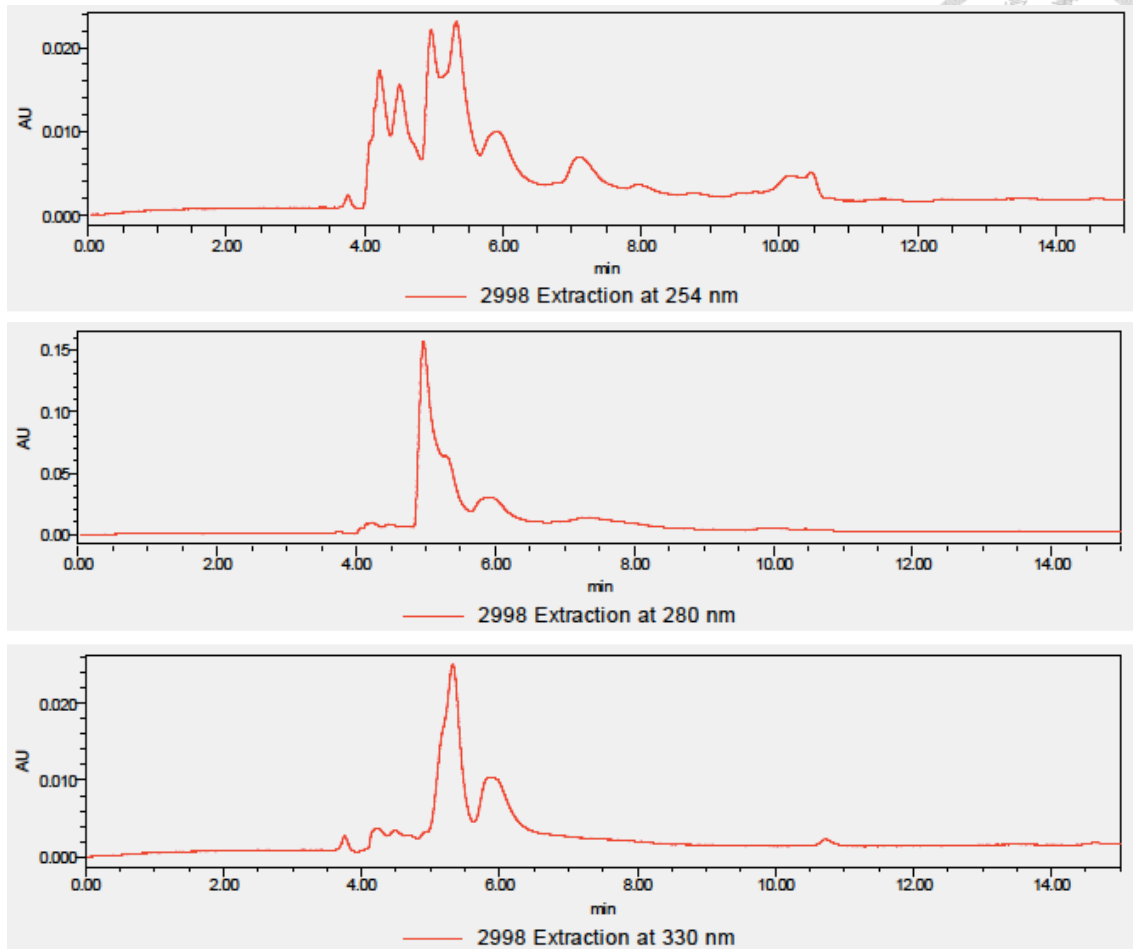
FBP70M: Frozen banana peel methanol extract concentrated at 70°C



第六節、香蕉皮萃取物成分分析

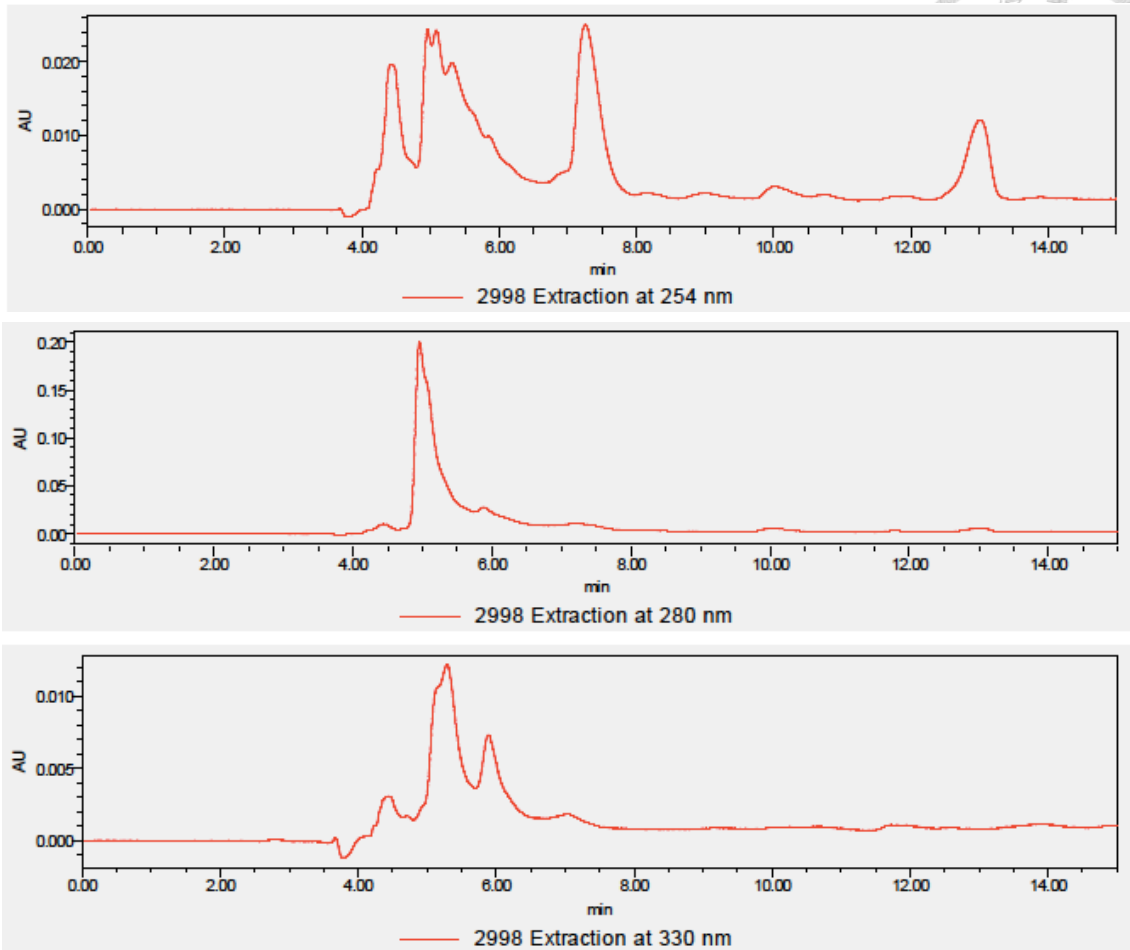
1. 香蕉皮萃取物高效能液相層析圖譜

利用 HPLC-PDA 偵測 200-400 nm 下之吸收波峰，發現香蕉皮及冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物於 254、280 與 330 nm 下有最大吸光值，於這三個波長下觀察香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物與冷凍處理組經層析後之差異。發現在波長 254 nm 下兩組樣品有波峰之差異，冷凍香蕉皮甲醇—正丁醇分層萃取物於 13 分鐘處有一吸收高峰，而香蕉皮甲醇—正丁醇分層萃取物則無。將此波峰收集後經減壓濃縮使用串聯式質譜儀分析，期望找出冷凍處理造成香蕉皮甲醇萃取物正丁醇分層萃取物對酪胺酸酶活性影響之物質。



圖十九、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物之高效能液相層析在波長 254、280、330 nm 之圖譜

Fig. 19. HPLC chromatogram of butanol fraction of BP40M at 254, 280, and 330 nm.



圖二十、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物之高效能液相層析在波長 254、280、330 nm 之圖譜

Fig. 20. HPLC chromatogram of butanol fraction of FBP40M at 254, 280, and 330 nm.

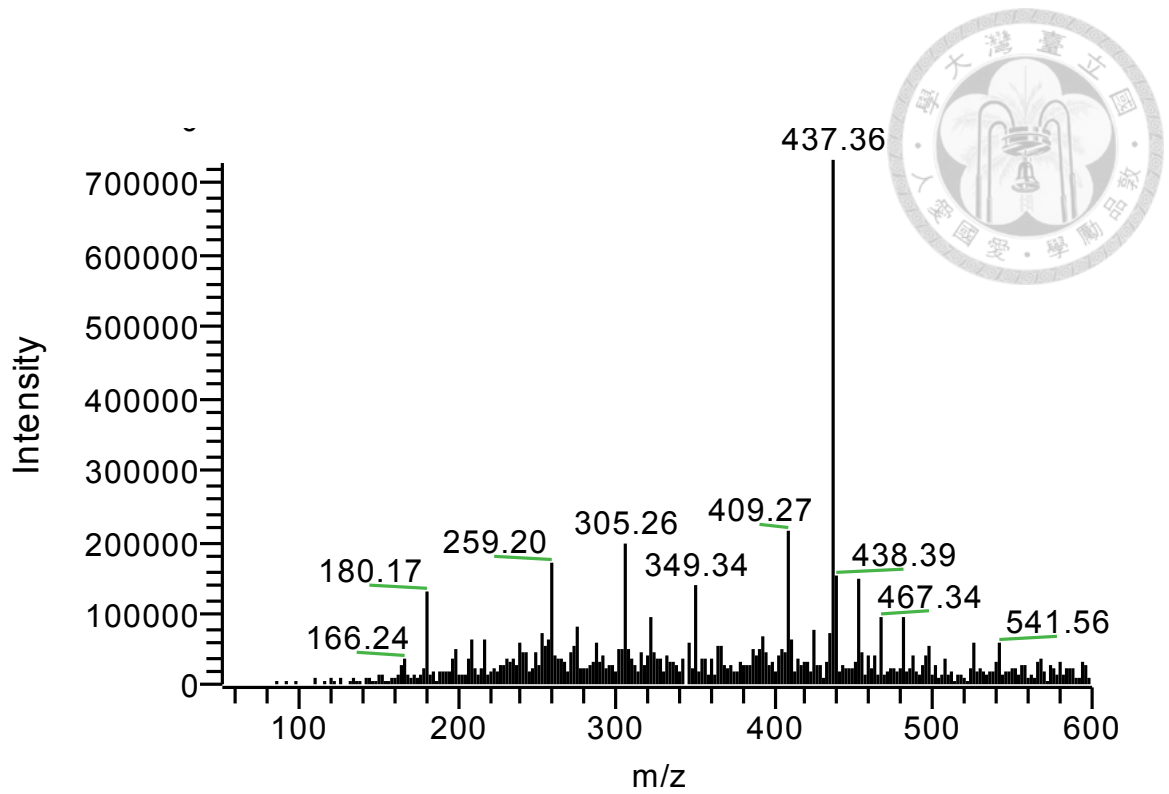


2. 香蕉皮甲醇萃取物 ESI-MS/MS 之結果

收集冷凍香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物於 HPLC 層析圖譜中 254 nm 波長下與香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物相異波峰之流洗液，經減壓濃縮、冷凍乾燥後，使用串聯式質譜儀分析其成分，得到正電質量訊號，化合物經電噴灑游離後可能為 $[M-H]^+$ 或 $[M-Na]^+$ m/z 437 (圖二十一)，與文獻中香蕉皮內已知化合物相比均不吻合，化合物結構仍需進一步鑑定。嘗試直接將香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物及冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物復溶於 25% 甲醇水溶液中，以較靈敏之 HPLC-PDA-MS 分析，254 nm 波長下之層析圖譜結果顯示，冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物樣品於滯留時間約 14.7 分鐘處出現明顯波峰(圖二十二)，因此檢視冷凍香蕉皮40°C減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物樣品層析圖譜中，滯留時間 14.7 分鐘之質譜偵測器訊號，負電模式下未測得明顯之質荷比訊號；正電模式下則有明顯的訊號。化合物經電噴灑游離後可能為 $[M-H]^+$ 或 $[M-Na]^+$ m/z 268 (圖二十三)，與文獻中香蕉皮內已知化合物相比均不吻合，化合物結構仍需進一步鑑定。而未經過冷凍處理香蕉皮甲醇萃取物正丁醇分層萃取物樣品於滯留時間約11分鐘處出現明顯波峰 (圖二十二)，檢視層析圖譜中，滯留時間11分鐘之質譜偵測器訊號，負電模式下未測得明顯之質荷比訊號；正電模式下則有明顯的訊號。經電噴灑游離後有可能為 $[M-H]^+$ 或 $[M-Na]^+$ m/z 323 (圖二十四)，與文獻中香蕉皮內已知化合物相比可能為無色翠雀花素 (leucodelphinidin) $[M-H]^+$ m/z 323 (Agusta *et al.*, 2005)，能被植物體內生酵素催化為翠雀花素 (delphinidin) (Forkmann and Martens, 2001)，為香蕉中主要之多酚氧化酶基質之一 (Marshall *et al.*, 2000)，因此可能造成酪胺酸酶活性測試結果在 475 nm

下吸光讀值增加。不過仍需進一步比較二次質譜之斷片或進行 NMR 結構分析始能確定。



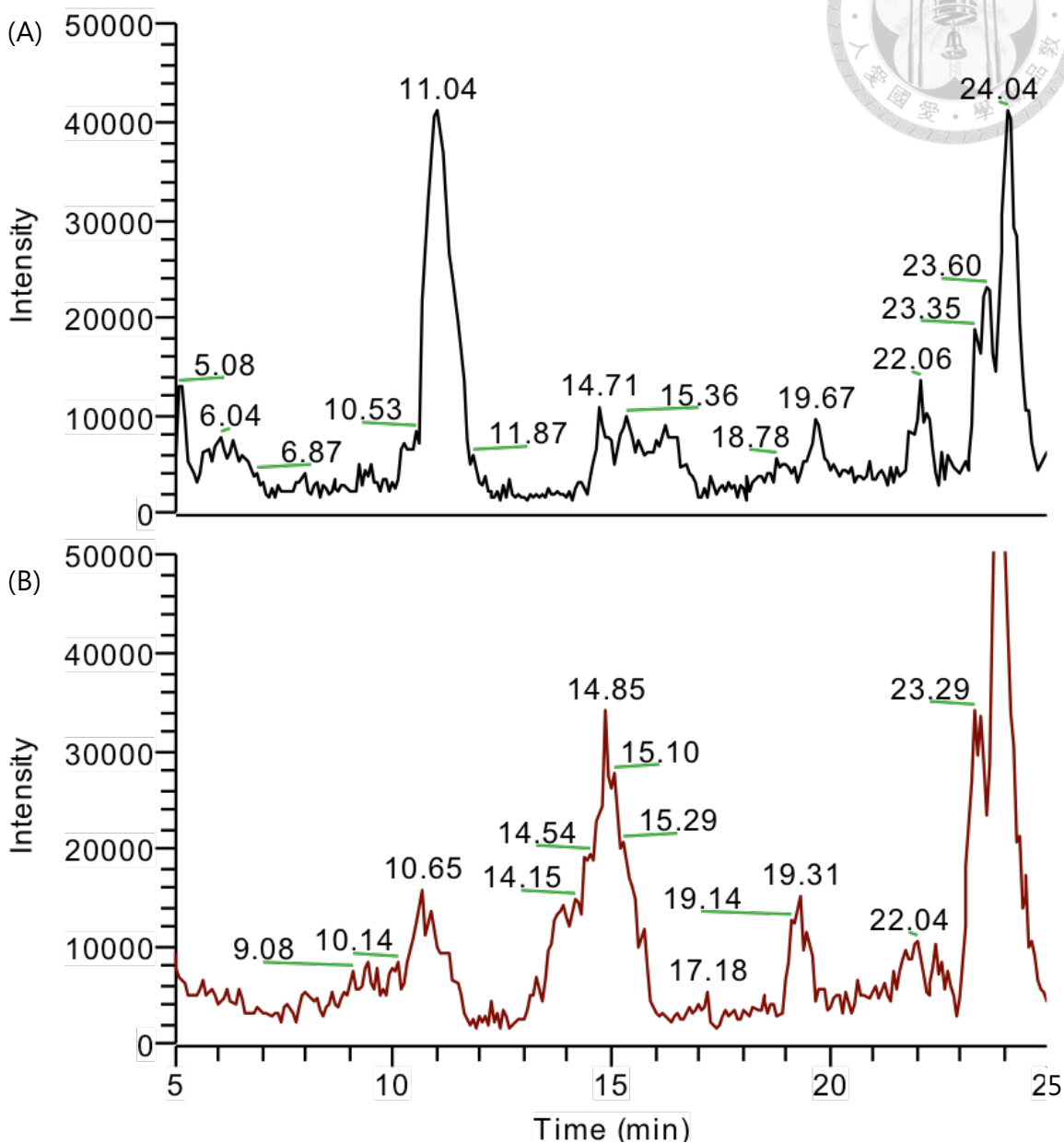


圖二十一、自冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物 HPLC 收集之流洗液質譜分析圖

Fig. 21. Mass spectrum of collected fraction of HPLC elution from FBP40M butanol fraction.

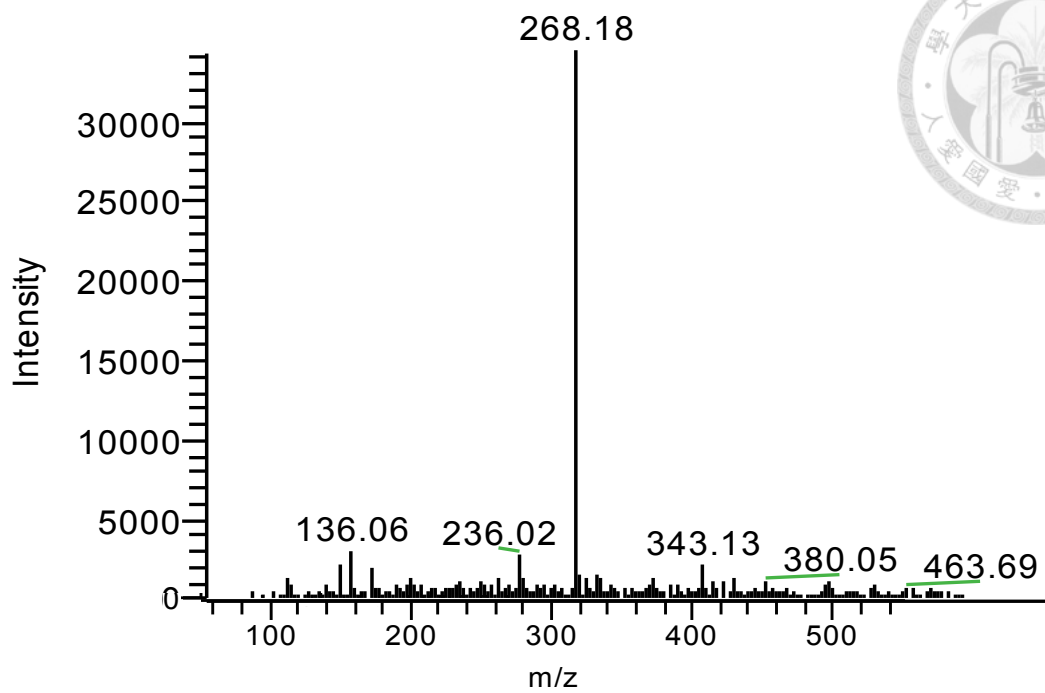


RT: 5.00 - 25.00



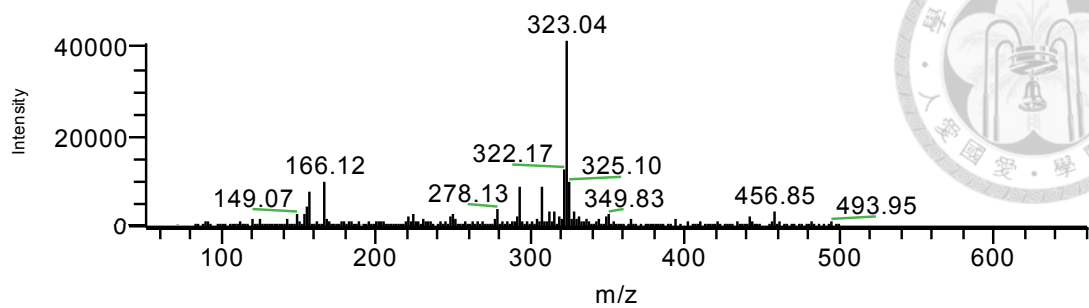
圖二十二、(A)香蕉皮、(B)冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇分層萃取物之 HPLC-PDA-MS 之正電質譜訊號圖

Fig. 22. HPLC-PDA-MS spectrum of HPLC-PDA-MS of (A) BP40M and (B) FBP40M butanol fraction.



圖二十三、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物於 HPLC-PDA-MS 滯留第十四分鐘之質譜掃描訊號圖

Fig. 23. The Mass spectrum of HPLC-PDA-MS mass signal at elution time-14th min from FBP40M butanol fraction.



圖二十四、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇—正丁醇區分層萃取物於 HPLC-PDA-MS 滯留第十一分鐘之質譜掃描訊號圖

Fig. 24. The Mass spectrum of HPLC-PDA-MS mass signal from BP40M butanol fraction at elution time- 11th min.

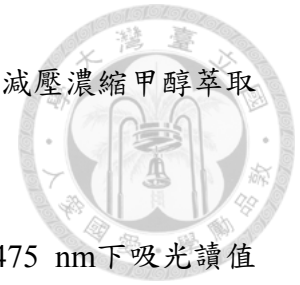
第五章、總結



1. 研究材料—香蕉皮，使用水及甲醇萃取。甲醇萃取物之萃取率大於水萃取物之萃取率。經過 -20°C 冷凍處理香蕉皮，水萃取物之萃取率較未經冷凍處理組高；甲醇萃取物之萃取率較未冷凍組低。此外甲醇萃取物之萃取率不受減壓濃縮溫度之影響。
2. 六種萃取物—香蕉皮水萃取物、冷凍香蕉皮水萃取物、香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物、香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物、冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物、冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物，經測試酪胺酸酶活性試驗，以冷凍香蕉皮 70°C 減壓濃縮甲醇萃取物有最佳之減少多巴色素生成能力，在濃度為 8 mg/mL 時可減少 48.41% 多巴色素生成，能抑制酪胺酸酶之活性；反之香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物在濃度為 8 mg/mL 時，增進 69.75% 多巴色素生成。而水萃取物則呈現不增進亦不減少多巴色素生成。
3. 冷凍香蕉皮甲醇萃取物經酵素抑制動力學之 K_m 及 V_{max} 均較酪胺酸酶之酵素動力學之 K_m 及 V_{max} 小，得知冷凍香蕉皮甲醇萃取物對酪胺酸酶為不競爭型之抑制。
4. 香蕉皮甲醇萃取物經過有機溶劑：正己烷、乙酸乙酯、正丁醇及水，依極性分層，萃取率由高至低分別為：水層 $>$ 正己烷層 $>$ 正丁醇層 $>$ 乙酸乙酯層，經酪胺酸酶活性試驗，冷凍處理之正丁醇層造成多巴色素產量之變化最大，香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物正丁醇分層萃取物在 8 mg/mL 時，增加了

79.15% 之多巴色素生成，而相同濃度下冷凍香蕉皮 40°C 減壓濃縮甲醇萃取物減少 53.74% 多巴色素生成。

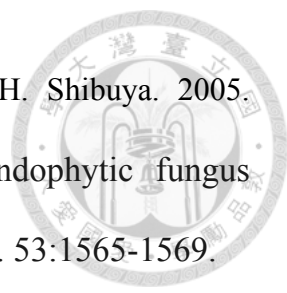
5. 經成分分析造成香蕉皮甲醇萃取物於酪胺酸酶活性試驗，475 nm下吸光讀值增加之物質有可能為無色翠雀花素 (leucodelphinidin); 冷凍處理香蕉皮甲醇萃取物中抑制酪胺酸酶活性之成分仍需後續成分分析。

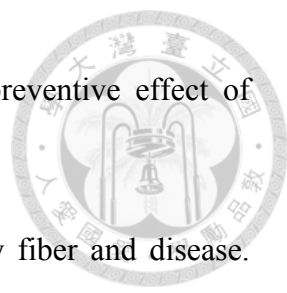


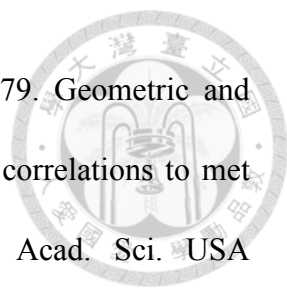
第六章、參考文獻

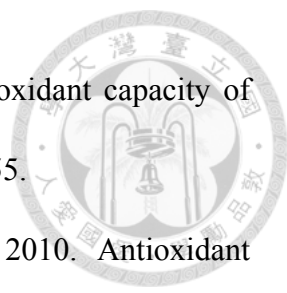



1. 朱慶英、陳桂明. 2009. 香蕉皮黑色素的提取工藝. 添加劑食品研究與發展. 30:171-173.
2. 行政院農業委員會，台灣農家要覽增修訂三版策劃委員會. 2005. 台灣農家要覽. 行政院農業委員會. 臺北. 台灣
3. 行政院農業委員會. 2012. 農業統計年報. 行政院農業委員會. 臺北. 台灣.
4. 李溯、丁勁松. 2013. 黑色素生物合成與酪胺酸酶抑制劑的研究法展. 中南藥學. 11:278-282.
5. 袁德保、楊昭、李芬芳、譚琳、李奕星、陳嬌、鄭曉燕、鄭麗麗. 2013. 香蕉多酚氧化酶的純化、酶學性質及活性抑制的研究進展. 食品科學. p. 1-9.
6. 梁佑慎. 2004. 市售新鮮蔬果抗氧化力之研究. 國立屏東科技大學熱帶農業暨國際合作研究所碩士論文. 屏東.
7. 張宗炳、冷欣夫. 1993. 殺蟲劑毒理及應用. 化學工業出版社. 北京. 中國
8. 陳奕安. 2012. 利用細胞平台的評估進行中國橄欖萃取物中具抗發炎或抗腫瘤功效成分的分析與分離. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文. 臺北
9. 陳清西、宋康康. 2006. 酪胺酸酶的研究進展. 廈門大學學報. 45:731-733.
10. 康有德. 1992. 水果與果樹. 黎明文化事業公司. 臺北. 台灣.
11. Agarwal, P.K., A. Singh, K. Gaurav, S. Goel, H.D. Khanna, and R.K. Goel. 2009. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 47:322-340.

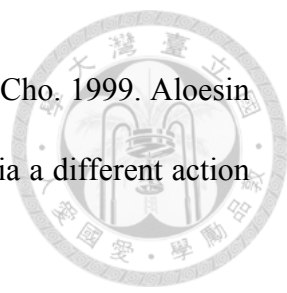
- 
12. Agusta, A., S. Maehara, K. Ohashi, P. Simanjuntak, and H. Shibuya. 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chem. Pharm. Bull.* 53:1565-1569.
 13. Alarcon-Aguilar, F.J., R. Roman-Ramos, S. Perez-Gutierrez, A. Aguilar-Contreras, C.C. Contreras-Weber, and J.L. Flores-Saenz. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.* 61:101-110.
 14. Alisi, C.S., C.E. Nwanyanwu, C.O. Akujobi, and C.O. Ibegbulem. 2008. Inhibition of dehydrogenase activity in pathogenic bacteria isolates by aqueous extracts of *Musa paradisiaca* (var. *sapientum*). *Afr. J. Biotechnol.* 7:1821-1825.
 15. Anhwange, B.A. 2008. Chemical composition of *Musa sapientum* (Banana) peels. *J. Food Tech.* 6:263-266.
 16. Annadurai, G., R.S. Juang, and D.J. Lee. 2002. Adsorption of heavy metals from water using banana and orange peels. *Water Sci. Technol.* 47:185-190.
 17. Annadurai, G., R.S. Juang, and D.J. Lee. 2002. Use of cellulose-based wastes for adsorption of dyes from aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* B98:263-274.
 18. Bardiya, N, D., Somayaji, and S. Khanna. 1996. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresource Technol.* 58:73-76.
 19. Behbahani, I., S.A. Miller, and D.H. O'Keeffe. 1993. A comparison of mushroom tyrosinase dopaquinone and dopachrome assays using diode-array spectrophotometry: dopachrome formation vs ascorbate-linked dopaquinone reduction. *Microchem. J.* 47:251-260.
 20. Benjakul, S., W. Visessanguan, V. Phongkanpai, and M. Tanaka. 2005.

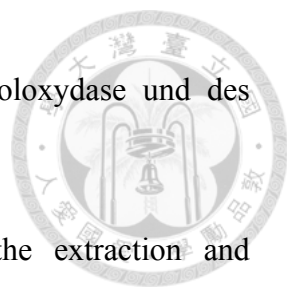
- 
- Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect of lipid oxidation in fish mince. *Food Chem.* 90:231-239.
21. Burkitt, D.P., A.R.P. Walker, and N.S. Painter. 1974. Dietary fiber and disease. *JAMA.* 229:1068-1074.
 22. Carpenter, K.J. 1981. Individual amino acid levels and bioavailability. In: *Protein Quality in Humans: Assessment and In Vitro Estimation*, pp.239-160, Bodwell C. E., Adkins J. S. and Hopkins D. T. (eds), AVI, Westport, CT.
 23. Chandraju, S., R. Mythily, and C.S. Chidan Kumar. 2011. Extraction, isolation and identification of sugars from banana peels (*Musa sapientum*) by HPLC coupled LC/Ms instrument and TLC analysis. *J. Chem. Pharm. Res.* 3:312-321.
 24. Chang, T. S. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10:2440-2475.
 25. Chodera A., K. Dabrowska, A. Sloderbach, L. Skrzypczak, and J. Budzianowski. 1991. Effect of flavanoid fractions of *Solidago virgaurea* L. on diuresis and levels of electrolytes. *Acta. Pol. Pharm.* 48:35-37.
 26. Chung, S.L. and S.P. Meyers. 1979. Bioprotein from banana wastes. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:723-732.
 27. Clarke, W.P., P. Radnidge, T.E. Lai, P.D. Jensen, and M.T. Hardin. 2008. Digestion of waste bananas to generate energy in Australia. *Waste Manage.* 28:527-533.
 28. Craig, L.C. 1944 Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution. *J. Biol. Chem.* 155, 519-534.

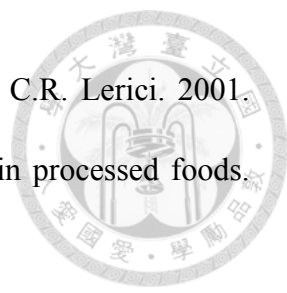
- 
29. Eickman, N.C., Himmelwright, R. S. and Solomon, E. I. 1979. Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: spectral and chemical correlations to met apo, half met, met, and dimer active sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2094-2098.
30. Espín J.C., S. Jolivet, and H.J. Wichers. 1998 Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by agaritine. J. Agric. Food Chem. 46: 2976-2980.
31. Essien, J.P., E.J. Akpan, and E.P. Essien. 2005. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. Bioresource Technol. 96:1451-1456.
32. Finkel, T. and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408:239-247.
33. Forkmann, G. and S. Martens. 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr. Opin. Biotechnol. 12:155-160.
34. Friedman, M. 1996. Food browning and its prevention: an overview. J. Agric. Food Chem. 44: 631-653.
35. Gardner, P.T., T.A.C. White, D.B. McPhail, and G.G. Duthie. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. Food Chem. 68:471-474.
36. Goel, R.K., Sairam K. 2002. Anti-ulcer Drugs from Indigenous Sources with Emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. Indian J. Pharmacol. 34:100-110.
37. Gomathy, R., N.R. Vijayalekshmi, and P.A. Kurup. 1989. Hypolipidemic principle of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*). J. Biosci. 14:301-309.
38. González-Montelongo R., M.G. Lobo, and M. Gonzále. 2010. The effect of

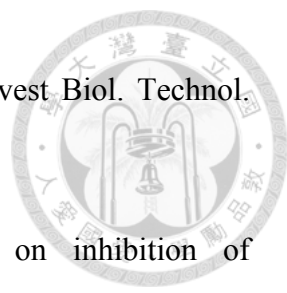
- 
- extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. *Sep. Purif. Technol.* 71:347-355.
39. Gonzalez-Montelongo, R., M.G. Lobo, and M. Gonzalez. 2010. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem.* 119:1030-1039.
40. González-Paramás A. M., S. Esteban-Ruano, C. Santos-Buelga, S. de Pascual-Teresa, and J.C. Ricas-Gonzalo. 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery by-product. *J. Agri. Food Chem.* 52:234-238.
41. Gordon, M.H and P. Magos.1983. The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chem.* 10:141-147.
42. Gunaseelan, V.N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenerg.* 26:389-399.
43. Halliwell, B. 1996. Vitamin C: antioxidant or prooxidant in vivo? *Free Radical Res.* 25:439-454
44. Hammond, J.B, R. Egg, D. Diggins, and C.G. Coble.1996. Alcohol from bananas. *Bioresource Technol.* 56:125-130.
45. Handelman, G.J. 2001. The evolving Role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition.* 17:818-822.
46. Happi Emaga, T., R.H. Andrianaivo, B. Wathelet, J.T. Tchango, and M. Paquot. 2007. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chem.* 103:590-600.
47. He, D.-H., H. Otsuka, E. Hirata, T. Shinzato, M. Bando, and Y. Takeda. 2002. Tricalysiosides A–G: rearranged ent-kauranoid glycosides from the leaves of

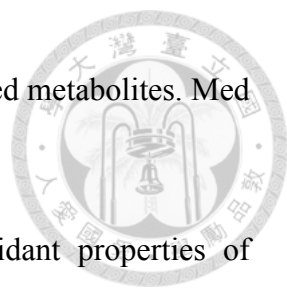
- 
- Tricalysia dubia. J. Nat. Prod. 65:685-688.
48. Hill, H.Z., K.N. Cathcart, J. Bargellini., Z. Trizana., G.J. Hill., K.U. Schallreuter, and J.M. Wood. 1991 Does melanin affect the low LET radiation response of Cloudman S91 mouse melanoma cell lines? Pigment Cell Res 4:80-86.
49. Himmelwright, R.S., N.C. Eickman, C.D. LuBien,K. Lerch, and E.I. Solomon.1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of neurospora tyrosinase: comparison to hemocyanins. J. Am. Chem. Soc, 102:7339-7344.
50. Hsu, A.F., J.J. Sheih, D.D. Bill, and K. White. 1988. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. J. Food Sci. 53:765-767.
51. Jackman, M. P., A. Hajnal, and K, Lerch. 1991. Albino mutants of Streptomyces glaucescens tyrosinase. Biochem. J. 274: 707-713.
52. Jacobson, E.S, E. Hove, and H.S. Emery. 1995. Antioxidant function of melanin in black fungi. Infect. Immun. 63:4944-4945.
53. Jacobson, E.S. and S.B.Tinnell. 1993. Antioxidant funtion of fungal melanin. J. Bacteriol. 175:7102-7104.
54. Jain, D.L., A.M. Baheti, S.R. Parakh, S.P. Ingale, P,L. and Ingale. 2007. Study of antacid and diuretic activity of ash and extracts of Musa sapientum L. fruit peel. Phcog. Mag. 3:116-119.
55. Jimbow, K., W.C. Jr. Quevedo, T.B. Fitzpatrick, and G. Szabo 1976. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. J Invest Dermatol. Review.67:72-89.

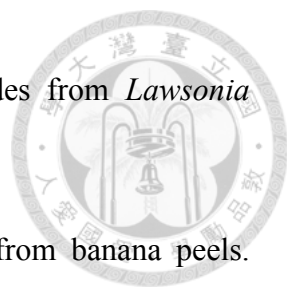
- 
56. Jin, Y.H., S.J. Lee, M.H. Chung, J.H. Park, Y.I. Park, and T.H. Cho. 1999. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharmacol. Res* 22:232-236.
57. Kanazawa, K. and H. Sakakibara. 2000. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J. Agric. Food Chem.* 48:844-848.
58. Karakaya, S. 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci.* 44:453-464.
59. Kelsay, J.L. 1978. A review of research on effects of fiber intake on man. *Am. J. Clin. Nutr.* 31:142-159.
60. Kim Y. J. and H. Uyama. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1707-1723.
61. Knapp, F.F. and H.J. Nicholas. 1969. The sterols and triterpenes of banana peel. *Phytochemistry* 8:207-214.
62. Körner, A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science.* 217: 1163-1165.
63. Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Bio. Med.* 7:617-635.
64. Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technol.* 69:231-239.
65. Krishna, C., M. Chandraskearan. 1996. Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:106-111.

- 
66. Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämozanins. *Biochem. Z.* 299:32-57.
67. Lafka, T.I., V. Sinanoglou, and E.S. Lazos. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* 104:1206-1214.
- Larrauri, J.A., P. Ruperez, B. Borroto, and F. Saura-Calixto. 1997. Seasonal changes in the composition and properties of a high dietary fibre powder from grapefruit peel. *J. Sci. Food Agric.* 74:308-312.
68. Lee, G. C. and C.Y. Lee. 1997. Inhibitory effect of caramelisation products on enzymic browning. *Food Chem.* 60:231-235.
69. Lerch, K. and L. Ettlinger. 1972. Purification and properties of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Pathol Microbiol* 38:23-25.
70. Li, B.B., B. Smith, Md. M. Hossain. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* 48:182-188.
71. Likhitwitayawuid, K. and sritularak B. 2001. A new dimeric stibene with tyrosinases inhibitory activity from *artocarpus gomezianus* J. *Natural Product.* 64:1456-1459.
72. Lim, Y.Y., T.T. Lim, and J.J. Tee. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem.* 103:1003-1008.
73. Lin, J.W., H.M. Chiang, Y.C. Lin, and K.C. Wen. 2008. Natural products with skin whitening effects. *J. Food Drug Anal.* 16:1-10.
74. Lyons, J.M. 1973 Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:445-466.

- 
75. Manzocco, L., S. Calligaris, D. Mastrocola, M.C. Cicoli, and C.R. Lerici. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends Food Sci. Tech. 11:340-346.
76. Martinez, M.V. and J.R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci. Tech. 6:195-200.
77. Marshall, M.R., J. Kim, and C.I. Wei. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafood. FAO.
78. 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*. Biosce. Biotechnol. Biochem. 69:197-201.
79. Mayer, A.M. 1987. Polyphenol oxidases in plants: recent progress. Phytochemistry 26:11-20.
80. Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry. 67:2318-2331.
81. Mazur, P. 1969. Freezing injury in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20: 419-448.
82. McColloch, L.P. 1953. Injuries from chilling and freezing. In: USDA Yearbook Agric.p.826-830.
83. Medeiros, R.G., M.L.A.P. Soffner, J.A.Thome, A.O.G. Cacaís, R.S. Estelles,B.C. Salles, H.M. Ferreira, S.A.Lucena Neto, F. G.Silva Jr, and E.X.F. Filho. 2000. The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate. Biotechnol. Prog. 16:522-524.
84. Nguyen, T.B.T., S. Ketsa, and W.G. van Doorn. 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia

- 
- lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 30:187-193.
85. Nirmal, N.P., S.Benjakul. 2009. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chem.* 116: 323-31.
86. Notsu, H., T. Tatsuma, A. and Fujishima. 2002. Tyrosinase-modified boronadoped diamond electrodes for the determination of phenol derivatives. *J. Electroanal. Chem.* 523:86-92.
87. Onwuka, C.F.I, P.O. Adetiloye, and C.A. Afolami. 1997. Use of household wastes and crop residues in small ruminant feeding in Nigeria. *Small Ruminant. Res.* 24:233-237.
88. Palmer, J.K. 1963. Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties. *Plant Physiol.* 38: 508-513.
89. Pawelek, J.M. and Körner A. M. 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *AMSCA* 70: 136-145.
90. Perfumi, M., M. Massi ,and G. de Caro. 1994. Effects of Banana Feeding on Deoxycorticosterone-Induced Hypertension and Salt Consumption in Rats. *Pharm. Biol.* 32:115-125.
91. Pinelo, M., M. Rubilar, M. Jerez, J. Sineiro, M.J. Nunez. 2005. Effect of solvent, temperature and solvent to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* 53:2111-2117.

- 
92. Prota, G. 1988. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Med Res Rev.* 8:525-556.
93. Rice-Evans, C.A, N.J. Miller and G. Paganga. 1997 Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159.
94. Santerre, C.R., Cash J.N. and van Norman D.J. 1988. Ascorbic acid and citric acid combinations in the processing of frozen apple slices. *J. Food Sci.* 53:1713-1716.
95. Saraswathi, N.T. and F.D. Gnanam. 1997. Effect of medicinal plants on the crystallization of cholesterol. *J. Cryst. Growth.* 179:611-617.
96. Shanmugavelu K.G. and G. Rangaswami. 1962. Tryptophan and Indole Compounds in Banana Ovaries. *Nature* 194: 775-776.
97. Shui, G. and L.P. Leong. 2006 Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chem.* 97:277-284.
98. Simopoulos, A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70:560S-9S.
99. Solomon, E.I. and M.D. Lowery. 1993. Electronic structure contribution to function in bioinorganic chemistry. *Science* 259:1575–1581.
100. Someya, S., Y. Yoshiki, and K. Okubo. 2002 Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chem.* 79:351-354.
101. Stahl, W. and H. Sies. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 24:345-351.
102. Subagio, A., N. Morita, and S. Sawada. 1996. Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42:553-566.

- 
103. Takeda, Y. and M.O. Fatope. 1988. New phenolic glucosides from *Lawsonia inermis*. J. Nat. Prod. 51:725-729.
104. Tewari, H.K., S.S. Marwaha, and K. Rupal. 1986. Ethanol from banana peels. Agricultural wastes. 16:135-146.
105. Tewtraku, S., A. Itharat, P. Thammaratwasik, and B. Ooraikul. 2008. Antiallergic and anti-microbial activities of some Thai crops. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30:467-473.
106. Truscott, T.F. 1990. The photophysics and photochemistry of the carotenoids, J. photochem, Photobiol. B: Biol. 6:359-371.
107. Vijayakumar S., G. Presannakumar, N. R. Vijayalakshmi. 2008. Antioxidant activity of banana flavonoids. Fitoterapia 79: 279-282.
108. Wall, M.M. 2006. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. J. Food Compos. Anal 19:434-445.
109. Wang, Z., J. Dillon, and E.R. Gaillard. 2006. Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cell. Photochem. Photobiol. 82:474-479.
110. Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases, including plantains and Abaca. London: Longmans. P648.
111. Whiteman, T.M. 1957. Freezing point of fruits, vegetables and florist stocks. USDA Mkt. Res. Rpt. 196:32.
112. Xu, G.H, J.C. Chen, D.H. Liu, Y.H. Zhang, P. Jiang, and X.Q. Ye. 2008. Minerals, phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. J. Food Sci. 73:C11-C18.

113. Young, A.J. and G.M. Lowe. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27.

114. Zhu, W. and J. Gao. 2008. The use of botanical extracts as topical skin-lightening Agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J. Invest. Derm. Symp.*

P. 13:20-24.

