行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

克弗爾應用於新美容產品之開發研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC93-2313-B-002-099-
執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日
執行單位：國立臺灣大學動物科學技術學系

計畫主持人：林慶文

報告類型：精簡報告
報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文
處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 94 年 11 月 1 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※　　※
※　　克弗爾應用於新美容產品之開發研究　　※
※　　※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC
執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：林慶文　　台灣大學畜產學研究所
共同主持人：陳明汝　　台灣大學畜產學研究所
計畫參與人員：許佳鳳　　台灣大學畜產學研究所

中　華　民　國　94 年 10 月 31　日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

克弗爾應用於新美容產品之開發研究

Kefir

計畫編號：NSC

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳明汝　　台灣大學畜產學研究所

共同主持人：林慶文　　台灣大學畜產學研究所

計畫參與人員：許佳鳳　　台灣大學畜產學研究所

一、中文摘要

克弗爾為一種由乳酸菌及酵母菌共同發酵之酒精發酵乳，本研究旨在探討克弗爾中之不同成分，對於美白、抗氧化及痤瘡治療是否具有功效，以提升畜產品之應用價值。於美白試驗中，主要以酪胺酸酶之抑制活性來做評估。黑色素主要由酪胺酸藉由酪胺酸酶之催化，經過一連串之反應所形成，故減少黑色素的形成可藉由抑制酪胺酸酶活性達成。結果顯示，乳酸在8mg/mL的添加下，於 10 分鐘後之黑色素生成可達IC_{50}，濃度提升為 10mg/mL時，酪胺酸酶已不具活性。証據顯示自由基的形成對於皮膚老化有顯著影響，故本研究以銅離子螯合能力做為克弗爾抗氧化能力之指標，推測克弗爾是否具有抗老化之功能。結果發現乳清、肽類、醣類、菌之胞內萃取物均對銅離子產生螯合能力，顯示克弗爾具有明顯之抗氧化活性。對於痤瘡改善，乳酸於濃度為 60mg/mL及 10mg/mL分別對痤瘡桿菌及表皮葡萄球菌產生抑制能力，相較於此二株菌對酸環境及抗生素耐受性之不同，或許可供治療炎性痤瘡之參考。

關鍵詞：克弗爾、酪胺酸酶、抗氧化、痤瘡

ABSTRACT

Kefir is a cultured milk beverage produced by microbial action. The purpose of this research is to study the effects of different kefir components on skin properties including skin whitening effect, antioxidative activity and acne treatment. The final aim is enhance the value of dairy products. The skin whitening tests were performed by tyrosinase assay. The melanin synthesis is regulated by tyrosinase, which catalyzes the conversions of tyrosine to dopa and dopa to dopaquinone. Inhibition of tyrosinase activity reduced the melanin production. The results showed that lactic acid had better inhibitory ability agaist melanin synthesis. A vast amount of evidence implicates oxygen-derived free radicals as important causative agents of aging. Therefore, the antioxidative activities of kefir components were determined by cupric ion chelating analysis and results demonstrated that certain kefir components had antioxdative activities. The ability of acne treatment was performed by inhibition of *Propionibacterium acne* and *Staphylococcus epidermidis*, which commonly isolated from pustular acne lesions. The results indicated that lactic acid level higher than 60 and

10mg/mL could inhibit the growth of *Propionibacterium acne* and *Staphylococcus epidermidis*, individually, while no inhibition was found for other components.

二、緣由與目的

化妝品產業是結合科技與美學的化學工業，其低污染、高利潤之特性，一直是國內企業感興趣的主因。由於國民生活水準的提昇，對於化妝品的需求也日益成長，尤以保養美白類之產品需求最高，深具發展潛力。本實驗室研究克弗爾已有多年的歷史，對於克弗爾已有相當程度的了解。化妝品中之乳酸可促進細胞再生，並去除角質層；肽類為抗老化之新興產品；多醣體亦常用於保溼產品中，故推測克弗爾中之肽類、乳酸、醣類對於皮膚美容應有一定的功效。多年來研究克弗爾之文獻多以其食用後對人體之益處為主，鮮有專以探討其於美容方面之貢獻。為提昇畜產品之利用價值，拓展其應用領域，本研究即以克弗爾於美容上之應用做探討，評估其是否可開發為一美容產品。

三、結果與討論

(1)克弗爾之組成分析

本實驗中之克弗爾，主要以源自於新竹之克弗爾粒接種於 12.5%(w/v)脫脂還原乳中，於 20℃培養箱中培養 20 小時後，分別測定 pH 值、水分、粗蛋白質、灰分、乳酸、乳酸菌、酵母菌，結果如表一所示。

結果顯示經發酵後之克弗爾 pH 值降至 4.21±0.12，主要為乳糖被乳酸菌分解為乳酸，並於代謝過程所產生之醋酸及其它有機酸所致，其乳清中乳酸的含量為 12.16 ±0.21 mg/mL。

克弗爾中之粗蛋白質及灰分含量分別為 3.51±0.06 及 0.83±0.01%，顯著低於還原乳之 3.74±0.01 及 0.88±0.01%。總固形物的減少相對使得水分含量上升，由表中得知克弗爾之水分含量為 90.82±0.11%，顯著高於還原乳之 89.37±0.04%。克弗爾中之菌元含有蛋白分解酶，可分解牛乳中之酪蛋白及肽(Abraham *et al.*, 1993)，使肽類及游離胺基酸增加，而粗蛋白質總量的損失推測應是克弗爾粒生成時，會先利用游離的肽、胺基酸及其它的固形物來合成，使得克弗爾因而減少了部分的蛋白質及灰分。

克弗爾中之微生物主要為發酵過程中，於克弗爾粒中脫落至乳中並增生，其量與比例會因發酵的條件不同而有所差異。本實驗之克弗爾中乳酸菌及酵母菌分別為 6.95±0.07 及 6.62±0.07 log CFU/mL。

表一、克弗爾之組成及活菌數

Group	Milk	Kefir
pH	6.53±0.01[a]	4.21±0.12[b]
Moisture (%)	89.37±0.04[b]	90.82±0.11[a]
Crude protein (%)	3.74±0.01[a]	3.51±0.06[b]
Ash (%)	0.88±0.01[a]	0.83±0.01[b]
Crude fat (%)	< 0.1	< 0.1
Lactic acid (mg/mL, whey)	---	12.16±0.21
Lactic acid bacteria (log CFU/mL)	---	6.95±0.07
Yeast (log CFU/mL)	---	6.62±0.07

(2)克弗爾抑制酪胺酸酶活性能力

黑色素為酪胺酸經酪胺酶催化而生成，並經由角質細胞之吞噬作用而自黑色素細胞轉移至角質細胞使皮膚呈色。藉由抑制酪胺酸酶活性來達到減少黑色素生成之目的是美白方式之一，而利用酪胺酸酶來檢測抑制劑是否具美白功能為常見之實驗方法。市售之酪胺酸酶主要自蕈類(mushroom)所萃得，目前美白產品多以麴酸、熊果素、維生素等為主成分，但麴酸

對細胞所產生之毒性目前仍無定論，故尋找安全性高之天然美白成分為美容界目標之一。

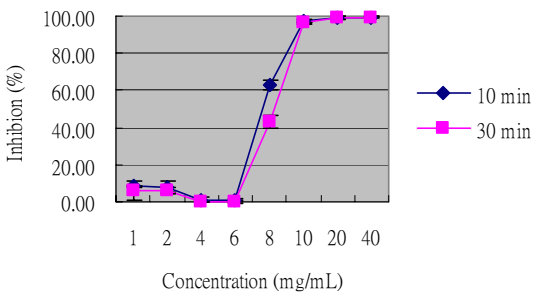
為了解克弗爾是否具有抑制黑色素生成之效果，本實驗自克弗爾中分別分離出乳清、肽、醣類、克爾弗菌元之胞內萃取物進行抑制酪胺酸酶活性能力試驗。

結果顯示，克弗爾乳清抑制酪胺酸酶活性能力顯著高於還原乳乳清(表二)，且其抑制能力會隨濃度的增加而提升，而克弗爾中之肽亦有相同結果。

表二、克弗爾對酪胺酸酶活性抑制率

	Inhibition(%)		
	whey		peptide
concentration	10%(v/v)	20%(v/v)	5mg/mL
Milk	19.9±1.1[b]	55.6±0.7[b]	49.4±4.6[b]
kefir	35.2±1.1[a]	91.4±2.0[a]	63.1±2.1[a]

由圖一結果得知，隨著乳酸濃度的增加，酪胺酸酶之抑制率明顯上升，反應時間達 10min時，濃度 8mg/mL之乳酸可達 IC_{50}，而 10mg/mL之乳酸於 10min時已達抑制率 90%，且並未隨時間之提昇而降低，推測其原因為 10mg/mL 乳酸之添加所造成 pH 下降使酪胺酸酶已無活性產生。



圖一、乳酸對酪胺酸酶活性抑制率

在其它之萃取物所測得之結果顯示，各濃度之醣類及酵母菌細胞內萃取物均無抑制酪胺酶活性之能力；而乳酸菌細胞內萃取物僅有輕微之抑制能力(數據未顯示)。

總合上述結果得知，克弗爾乳清中之乳酸及肽具有抑制酪胺酸酶活性之效果，而肽之抑制效果會隨反應時間的增加而降低，推測應是具活性肽之濃度過低，或其抑制效果為競爭型受質之原因。

(3)克弗爾對銅離子螯合能力

生物體在正常的代謝過程中會產生含氧的自由基，一旦含氧自由基的產生與生物體本身具有的抗氧化防禦系統失去平衡時，即會造成氧化壓力，進而使得皮膚受損產生老化現象。部分金屬離子在低含量(0.1ppm)時具有促進脂質氧化的能力，其中以鐵和銅離子對於脂質氧化作用的促進效果最為顯著，故鐵及銅離子之螯合能力常被用來評判試劑是否具有抗氧化之能力。目前已知具有螯合金屬能力的抗氧化劑包括檸檬酸、磷酸、EDTA 等(Gordon, 1990)。

除了抗氧化能力的判定之外，銅離子螯合能力試驗或可用來探討試劑抑制酪胺酸酶活性之原因。酪胺酸酶之中心原子為銅離子，實驗証明可利用螯合酪胺酸酶上之銅離子來達到減少黑色素生成之目的。本實驗之原理為 TMM 螯合劑於波長 530 nm 有最大之吸光值，而當 TMM 與銅離子螯合形成TMM-Cu^{2+}之複合物時，於波長 485nm 具最大吸光值，依 485nm/530nm 吸光值之比值可判定其金屬螯合能力，比值愈大，表示TMM-$Cu2^{+}$之複合物愈多，而試劑之螯合能力愈差，反之比值愈小，試劑之螯合能力愈佳。

表三為克弗爾中各成分對銅離子螯合之能力。數據顯示，乳清實驗組其 485nm /530nm 吸光值之比值為 1.73±0.04，顯著低

於控制組之 2.41；肽及醣類亦有螯合銅離子能力之產生，並隨濃度之提昇而增加其螯合能力。乳酸在濃度 1~80mg/mL 之間 485nm/530nm 吸光值比值與控制相較並無顯著差異，故此範圍濃度之乳酸無銅離子螯合現象產生。

Lin and Yen 在 1999 年測定了 19 株乳酸菌胞內萃取物抗氧化之能力，結果顯示 *Streptococcus thermophilus* 821 及 *Bifidobacterium longum* 15 708 在金屬離子螯合能力試驗中，分別對亞鐵離子及銅離子有最高之螯合能力，而其於菌種也分別於不同之抗氧化試驗展現了抗氧化之能力，故部分乳酸菌確實具有抗氧化之效果。於本試驗中，乳酸菌胞內萃取物也具有銅離子螯合之效果(表三)，且會隨濃度提升而提高其銅離子螯合之能力。

表三、克弗爾對銅離子螯合之能力

	485nm/530nm	
	Milk	Kefir
Whey	1.68±0.04[a]	1.73±0.04[a]
Peptide 2mg/mL	1.67±0.03[a]	1.64±0.15[a]
5mg/mL	1.35±0.15[a]	1.33±0.06[a]
Saccharides 0.1%	1.53±0.05[b]	1.78±0.07[a]
0.5%	1.23±0.05[a]	1.30±0.05[a]
intracellular extract1X	---	1.68±0.12
10X	---	1.09±0.03

(4)克弗爾抑制痤瘡病原菌能力

痤瘡桿菌(*Propionibacterium acne)*本身並無致病性，表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）為存在皮膚表面之正常菌群，但這兩類細菌會分泌一種脂肪酶，將中性的皮脂分解成多種游離脂肪酸，導致毛孔開口處角質化而發生阻塞，皮脂因無法排泄而使粉刺形成，進而造成痤瘡之產生。Dreno *et al.*(2001)研究發現，自痤瘡患者所分離出之病原菌以痤瘡桿菌及表皮葡萄球菌所佔例最高，故本實驗即探討克弗爾於此兩株病原菌之抑制能力。

結果顯示，克弗爾、乳清、肽、醣類、乳酸菌及酵母菌之胞內萃取物均無抑制圈的產生，顯示了這些成分並無抑制痤瘡桿菌及表皮葡萄球菌之能力。

在痤瘡桿菌抑制試驗中(表四)，乳酸濃度為 20mg/mL 始有 3.0±1.0mm 抑菌圈產生，而在濃度提高為 60mg/mL 時，抑菌圈為 15.7±2.1mm，具中度抑菌活性，而 80mg/mL 濃度之乳酸表現出高度的抑菌活性(抑菌圈 20.7±1.2 mm)。於表皮葡萄球菌抑制試驗結果顯示，8mg/mL 濃度之乳酸即產生 6.0±2.0mm 之抑菌圈，10mg/mL 具有輕度活性之抑菌圈 10.0±0.0mm，而在 40mg/mL 即達高度抑制活性 20.7±1.2mm，效果近似於 64μg/mL 紅黴素及 32μg/mL 氯四環黴素。Jin *et al.*(1996)實驗結果顯示，乳酸菌可抑制沙門氏桿菌及大腸桿菌，而其抑菌能力為有機酸的分泌而非過氧化氫或抗生物質產生所致，其結果與本實驗相似。

表四、乳酸抑制痤瘡病菌之能力

	Diameter of inhibition zone(mm)	
	Propionibacterium acne	*Staphylococcus epidermidis*
6mg/mL	0.0	0.0
8mg/mL	0.0	6.0±2.0
10mg/mL	0.0	10.0±0.0
20mg/mL	3.0±1.0	15.0±1.0
40mg/mL	8.7±2.5	20.7±1.2
60mg/mL	15.7±2.1	29.3±1.2
80mg/mL	20.7±1.2	31.3±1.2

由本實驗結果中發現，痤瘡桿菌與表

皮葡萄球菌對抗生素及酸之耐受性顯著不同。痤瘡桿菌於抑菌圈達 20mm 所需濃度為 80mg/mL，而表皮葡萄球菌則為 40 mg/mL，顯示痤瘡桿菌之耐酸程度較高；而 32μg/mL 紅黴素及氯四環黴素於痤瘡桿菌之抑菌圈可達 50mm 以上，而 512μg/mL 紅黴素及氯四環黴素於表皮葡萄球菌之抑菌圈則分別為 30.7±1.2mm 及 36.0±0.0mm，表示表皮葡萄球菌對抗生素有較高之耐受性。由於抗生素常會促使病原菌產生抗藥性而減低其治療效果，故使用其它具有抑菌功能之物質來取代抗生素，為目前研究之新方向。

四、計畫成果自評

本計畫証實了克弗爾中之部分成分對於美白、抗氧化及治療痤瘡具有部分成效，但其含量低且各成分之交互作用亦會影響產品之利用性，故其中有效成分之分離、純化亦有其必要性。

五、參考文獻

1. 陳宜嫻。2000。皮膚黑色素抑制劑與保濕劑效能之研究。靜宜大學應用化學系。
2. Abraham, A. G., G. L. De Antoni and M. C. Anon. 1993. Proteolytic active of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. J. Dairy Sci. 76: 1498-1505.
3. Amiot, J., L. Germain, S. Turgeon., M. Lemay, C. Ory-Salam and F. A. Auger. 2004. Peptides from milk protein hydrolysates to improve the growth of human keratinocytes in culture. Int. Dairy J. 14:619-626.
4. Dreno, B., A. Reynaud, H. Richet, D. Moyse and H. Habert. 2001. Erythromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne. Eur. J. Dermatol. 11:549-553.
5. Gordon, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. Chapter 1, In Food Antioxidants. B. J. F. Hudson(Ed.), p. 1-18.
6. Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, M. A. Ali, and S. Jalaludin. 1996. Antagonistic effects of intestinal Lactobacillus isolates on pathogens of chicken.Lett. Appl. Microbiol. 23:67-71.
7. Lin, M. Y. and C. L. Yen. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. J. Agric. Food Chem. 47: 1460-1466.
8. Mitusuhashi, S. and N. Murata.1991. Inhibitory activity of Bifidobacterium on the growth of Gram-negative and Gram-positive bacteria. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 44: 365-372.
9. Sanchez-Ferrer, A., J. N. Rodriuez-Lopez and Garcia-Canovas. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta. 1247:1-11.
10. Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara, andT. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 945-948.