

南華大學科技學院自然生物科技學系自然療癒碩士班

碩士論文

Master's Program in Natural Healing Sciences

Department of Natural Biotechnology

College of Science and Technology

Nanhua University

Master Thesis

野生常見植物萃取方式及醱酵條件對抗氧化與抑制酪胺
酸酶活性之影響

Effects of Antioxidant and Inhibition of Tyrosinase Active
from The Extracts of Weeds and Its Fermented Condition

王雅玲

Ya-Ling Wang

指導教授：林俊宏 博士

Advisor: Jun-Hong Lin, Ph.D.

中華民國 107 年 6 月

June 2018

南 華 大 學

自然生物科技學系自然療癒碩士班 碩 士 學 位 論 文

野生常見植物萃取方式及發酵條件
對抗氧化與抑制酪胺酸酶活性之影響

Effects of antioxidant and inhibition of tyrosinase active from the extracts of
weeds and its fermented condition.

研究生：王雅玲

經考試合格特此證明

口試委員：張耿峻
林富強
林偉忠
葉月嬌

指導教授：林偉忠

系主任(所長)：陳秋嬌

口試日期：中華民國 107 年 6 月 19 日

致謝

兩年來，感謝恩師林俊宏教授在這段期間的諄諄教誨，不厭其煩地教導許多研究上之專業知識，包括實驗系統的建立、論文撰寫以及會議報告的表達技巧，讓學生我如沐春風，獲益良多。

在此特別感謝口試委員葉月嬌教授、張耿峻教授以及林家驊教授，在論文上的不吝指正與建議，使得本論文內容盡善盡美，特此至上無限謝意。

感謝筱晴、健倫、俞廷、尚俞、俊翥等實驗室學弟妹們以及通識教育中心所有同仁於生活中之協助，為嚴肅的研究生涯增添了歡樂的氣氛。也再次感謝恩師林俊宏教授提供良好的研究環境以及充裕的研究經費，讓我在歡樂中度過多采多姿的研究生生活，留下了深刻且美好的回憶。

感謝父親王聰明先生與母親王春蓮女士的養育之恩，為我提供了一個美滿且完善的家庭，並且讓我在經濟上無需操心，能夠讓我得以無後顧之憂地專心完成學業。感謝妹妹與小妹在我低潮時與我聊天講心事，謝謝您們在背後默默的支持與付出。

本文的完成，融合了許多人的幫助與支持，無法一一列舉致謝，謹以本文獻給所有關心以及照顧我的人。

王雅玲

2018年7月

中文摘要

野生植物常為田間管理常面對的課題，其生長速度常較目標作物快，農民常用除草劑或機械除草後堆肥。若將野草視為可利用的自然資源，開發作為生物技術之原料，替代高單價之原料，亦是一種妥善利用自然資源的方式。

本研究從常見的野生植物著手，透過三種不同溫度的水萃方式，進行一系列的研究。結果顯示，野生常見植物透過三種不同溫度萃取之測定體外抗氧化試驗中，以 25°C 萃取之兔兒草 DPPH 清除率最高，DPPH 清除率為 $92.7 \pm 6.7\%$ ；100°C 萃取之魚腥草的總多酚含量最高，總多酚含量為 $102.6 \pm 3.5 \text{ mg-GAE/g-dw}$ 。在體外酪胺酸酶試驗中，適合用 25°C 萃取的物種為魚腥草，酪胺酸酶抑制率為 $76.6 \pm 2.2\%$ ；適合用 60°C 萃取的物種為大花咸豐草，酪胺酸酶抑制率為 $74.7 \pm 1.1\%$ ；適合用 100°C 萃取的物種為牛筋草，酪胺酸酶抑制率為 $73.5 \pm 1.5\%$ 。

野生常見植物透過抗氧化試驗與酪胺酸酶抑制率實驗後，得知魚腥草與含羞草為表現較佳的物種。因魚腥草相關研究多，故本研究挑選含羞草做進一步分析，透過田口氏實驗找尋抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶實驗之最適參數。結果顯示影響抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗最明顯的因子為培養天數、培養基 pH 值，經確認實驗可得知，DPPH 清除率與總多酚含量最適培養天數為 3.5 天、培養基 pH 值維持在 3.5。酪胺酸酶抑制率最適培養天數維持在 3 天、培養基 pH 值維持在 3.5。

綜整田口氏實驗與野生植物水萃液抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗，本研究得知發酵後 DPPH 清除率為 $82.8 \pm 6.9\%$ ，發酵前 DPPH 清除率為 $69.1 \pm 8.0\%$ ，DPPH 清除率約提升了 1.2 倍。推測醋酸菌代謝出的有機酸類有助於提高含羞草清除 DPPH 自由基的能力。總多酚含量與酪胺酸酶抑制率加入醋酸菌種後並無明顯提升，推測醋酸菌可能無法轉化含羞草內物質，造成總多酚與酪胺酸酶抑制率成效不彰。

因植物成分複雜，無法分辨哪些成分會影響抗氧化活性與抑制酪胺酸酶。建議可深入研究分離出含羞草有效成分，期望得到更佳的效果。

關鍵字：野生植物、醋酸菌、抗氧化、酪胺酸酶、田口氏實驗

Abstract

Weeds always be the common problem in field management, its growth rate is faster than, so famer usually use grass killer or grass remover after compost. Looking at other viewpoint, if take weeds for available natural resource, develop into biotechnology raw material instead of high price raw material, is a good way to use natural resource. The weeds grow faster than the crops and always treated by herbicides in the field. For using the natural bioresouce, the weeds can be adopted by its high productivity.

In this study, a series of studies were carried out from common wild plants through three different temperature water extraction methods. Six weeds were discovered from the natural farm of Nanhua University for the study on the antioxidant (DPPH free radical scavenging rate, total polyphenols) and inhibition rate of tyrosinase. The results indicated the *Prenanthes chinensis* Thunb. had the highest antioxidant activity ($92.7 \pm 6.7\%$); the *Houttuynia cordata* Thunb. had the highest total polyphenols contents (102.6 ± 3.5 mg-GAE/g-dw); The species suitable for extracting at 25°C was *Houttuynia cordata* Thunb. had the highest tyrosinase inhibition rate ($76.6 \pm 2.2\%$), The species suitable for extracting at 60°C was *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. had the highest tyrosinase inhibition rate ($74.7 \pm 1.1\%$), The species suitable for extracting at 100°C was *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. had the highest tyrosinase inhibition rate ($73.5 \pm 1.5\%$).

After the experiment of antioxidant and the inhibition rate of tyrosinase, it was found that *Houttuynia cordata* and *Mimosa pudica* Linn. were the better species. Because of the related research of *Houttuynia cordata*, so this study chooses *Mimosa pudica* Linn. to do further analysis, through the Taguchi experiment design to find the antioxidant test and inhibit the tyrosinase experiment the most suitable parameters. The results showed that the most obvious factors affecting the antioxidant experiment and the inhibition of the tyrosinase experiment were culture days and medium pH value, and it was

confirmed that the DPPH free radical scavenging rate and total polyphenols content were 3.5 days, and medium pH value was maintained at 3.5. The most suitable incubation days for the tyrosinase inhibition rate were 3 days and the pH value of the medium remained at 3.5.

The results of this study suggested that the DPPH free radical scavenging rate after fermentation was $82.8 \pm 6.9\%$, and the scavenging rate was improved 12.8% higher than that before fermentation ($69.1 \pm 8.0\%$), and it was speculated that these organic acids could improve the ability of *Mimosa pudica* Linn. to DPPH free radical scavenging rate. There was no significant increase in total polyphenol content and tyrosinase inhibition rate after adding *Acetobacter*, and it was speculated that *Acetobacter* could absorb or interfere with the total polyphenol and tyrosinase inhibition rate. Because of the complex composition of plants, it is impossible to tell which ingredients will affect antioxidant activity and tyrosinase inhibition. It is suggested that the effective components of *Mimosa pudica* Linn. can be studied in depth and the results will be better.

Key word: weeds, *Acetobacter*, anti-oxidant, tyrosinase, Taguchi methods

目錄

致謝.....	I
中文摘要.....	II
ABSTRACT.....	III
目錄.....	V
圖次.....	VII
表次.....	IX
第一章 研究動機與目的.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 野生常見植物的介紹及用途.....	2
2.1.1 野生常見植物之介紹.....	2
2.1.2 野生植物之用途.....	2
2.2 自由基與抗氧化.....	6
2.2.1 氧化壓力及活性氧介紹.....	6
2.2.2 自由基對皮膚的傷害.....	7
2.2.3 抗氧化劑.....	9
2.2.4 常見抗氧化活性的評估方法.....	12
2.3 皮膚與黑色素之關係.....	14
2.3.1 黑色素在皮膚上的位置.....	14
2.3.2 黑色素的生合成機轉.....	15
2.3.3 酪胺酸酶與黑色素生成的關聯性.....	17
2.3.4 黑色素的保護作用與有害作用.....	18
2.3.5 常見的美白評估方法.....	19
2.4 醋酸菌之應用.....	20
第三章 材料與方法.....	23

3.1 研究架構.....	23
3.2 研究材料.....	24
3.2.1 實驗樣品.....	24
3.2.2 實驗耗材、器材及藥品試劑.....	24
3.2.3 儀器設備.....	25
3.2.4 實驗菌株.....	26
3.3 實驗方法.....	26
3.3.1 實驗樣品製備.....	26
3.3.2 清除 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力測定.....	27
3.3.3 總多酚含量分析.....	28
3.3.4 體外酪胺酸酶活性抑制試驗.....	29
3.3.5 菌株培養.....	30
3.3.6 田口氏實驗.....	31
3.3.7 實驗數據分析.....	33
第四章 結果與討論.....	34
4.1 野生植物抗氧化試驗評估.....	34
4.1.1 DPPH 清除率試驗.....	34
4.1.2 總多酚試驗.....	44
4.2 野生植物酪胺酸酶試驗評估.....	54
4.3 田口氏實驗對野生植物發酵後抗氧化活性與抑制酪胺酸酶之影響.....	64
4.3.1 野生植物發酵後田口氏實驗之準備.....	64
4.3.2 野生植物發酵後田口氏實驗之實驗結果分析.....	65
4.3.3 野生植物發酵後田口氏實驗之確認實驗.....	75
4.3.4 綜整田口氏實驗與野生植物水萃液抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶之比較.....	80
第五章 結論與建議.....	81
5.1 結論.....	81
5.2 研究限制與建議.....	82
第六章 參考文獻.....	83

圖次

圖 1、Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) (Molyneux, 2004)	13
圖 2、Diphenylpicrylhydrazine (nonradical) (Molyneux, 2004).....	13
圖 3、不同種族膚色的黑色素含量(Brenner & Hearing, 2008).....	14
圖 4、黑色素生成機制(Gillbro & Olsson, 2011)	16
圖 5、天然來源的酪胺酸酶抑制劑結構(Kim & Uyama, 2005)	17
圖 6、研究架構.....	23
圖 7、DPPH 之標準曲線.....	27
圖 8、沒食子酸之標準曲線.....	28
圖 9、含羞草在不同溫度下 DPPH 清除率	36
圖 10、大花咸豐草在不同溫度下 DPPH 清除率	36
圖 11、魚腥草在不同溫度下 DPPH 清除率.....	37
圖 12、牛筋草在不同溫度下 DPPH 清除率	37
圖 13、兔兒草在不同溫度下 DPPH 清除率	38
圖 14、紫花霍香薊在不同溫度下 DPPH 清除率	38
圖 15、25°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率	42
圖 16、60°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率	42
圖 17、100°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率	43
圖 18、不同的野生植物在不同溫度中最佳的 DPPH 清除率	43
圖 19、含羞草在不同溫度下總多酚之含量.....	46
圖 20、大花咸豐草在不同溫度下總多酚之含量.....	46
圖 21、魚腥草在不同溫度下總多酚之含量.....	47
圖 22、牛筋草在不同溫度下總多酚之含量.....	47
圖 23、兔兒草在不同溫度下總多酚之含量.....	48
圖 24、紫花霍香薊在不同溫度下總多酚之含量.....	48
圖 25、25°C 下不同種野生植物平均總多酚含量.....	52
圖 26、60°C 下不同種野生植物平均總多酚含量.....	52
圖 27、100°C 下不同種野生植物平均總多酚含量.....	53
圖 28、不同的野生植物在不同溫度中平均總多酚含量.....	53

圖 29、含羞草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	56
圖 30、大花咸豐草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	56
圖 31、魚腥草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	57
圖 32、牛筋草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	57
圖 33、兔兒草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	58
圖 34、紫花霍香薊在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率.....	58
圖 35、25°C 下不同種野生植物的最佳酪胺酸酶抑制率.....	62
圖 36、60°C 下不同種野生植物最佳酪胺酸酶抑制率.....	62
圖 37、100°C 下不同種野生植物的最佳酪胺酸酶抑制率.....	63
圖 38、不同溫度中最佳的酪胺酸酶抑制率比較.....	63
圖 39、菌種標準曲線.....	64
圖 40、DPPH 清除率試驗回應圖.....	67
圖 41、總多酚含量試驗回應圖.....	70
圖 42、抑制酪胺酸酶試驗回應圖.....	73

表次

表 1、會產生活性氧或活性氮的酵素(López-Alarcón & Denicola, 2013).....	7
表 2、能作為生物抗氧化劑的試劑(Black, 1987).....	11
表 3、常見的抗氧化酶(López-Alarcón & Denicola, 2013).....	11
表 4、醋酸菌不同階段的重要記事(Dourado et al., 2017).....	22
表 5、可控因子表.....	32
表 6、L ₁₈ 直交表配置.....	32
表 7、不同溫度下各物種 DPPH 清除率與半數抑制濃度(IC ₅₀).....	39
表 8、同濃度不同溫度下各物種的 DPPH 清除率.....	40
表 9、不同溫度下各物種的最佳 DPPH 清除率.....	40
表 10、不同溫度下各物種平均總多酚含量.....	49
表 11、同濃度不同溫度下各物種平均總多酚含量.....	50
表 12、不同溫度下各物種平均總多酚含量.....	51
表 13、不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率與半數抑制濃度(IC ₅₀).....	59
表 14、同濃度不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率.....	60
表 15、不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率.....	60
表 16、DPPH 清除率試驗結果與 S/N 比.....	66
表 17、DPPH 清除率試驗因子水準 S/N 比.....	67
表 18、DPPH 清除率試驗最佳參數組合.....	68
表 19、總多酚含量試驗結果與 S/N 比.....	69
表 20、總多酚含量試驗因子水準 S/N 比.....	70
表 21、總多酚含量試驗最佳參數組合.....	71
表 22、抑制酪胺酸酶試驗結果與 S/N 比.....	72
表 23、抑制酪胺酸酶試驗因子水準 S/N 比.....	73
表 24、抑制酪胺酸酶試驗最佳參數組合.....	74
表 25、DPPH 清除率最佳化確認實驗.....	76
表 26、DPPH 清除率試驗最佳發酵條件.....	76
表 27、總多酚含量試驗最佳化確認實驗.....	77
表 28、總多酚含量試驗最佳發酵條件.....	78

表 29、抑制酪胺酸酶試驗最佳化確認實驗.....	79
表 30、抑制酪胺酸酶試驗最佳發酵條件.....	79
表 31、含羞草水萃液經菌種發酵前後抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗比較.....	80



第一章 研究動機與目的

在全球氣候劇烈變遷下，作物之土地、用水及資源等面臨衝擊逐漸嚴峻，造成田間管理及栽培的成本增加。自然資源之使用，更應思考如何因應全球氣候劇烈變遷而做調適。

野生植物常為田間管理常面對的課題，其生長速度常比目標作物快，所以農民常用除草劑或機械除草後堆肥。但換個角度看，若將野生植物視為可利用的自然資源原料，開發作為生物技術之原料，替代高單價、難管理之原料，亦是一種妥善利用自然資源的方式。

本研究從常見的野生植物著手，進行一系列抗氧化活性試驗與抑制酪胺酸酶試驗，透過不同溫度的水萃法，測定野生植物適合的萃取方式。再透過田口氏實驗設定實驗因子與水準，挑選出野生植物經醋酸菌發酵後，機能性最佳化的發酵條件。

實驗目的分為下列五項：

1. 評估野生常見植物之抗氧化特性，篩選適合野生常見植物。
2. 研究野生常見植物在不同的萃取條件下，萃取物總多酚化合物的含量。
3. 研究野生常見植物在不同的萃取條件下，萃取物清除 DPPH 能力。
4. 研究野生常見植物在不同的萃取條件下，萃取物對酪胺酸酶之抑制效果。
5. 利用田口氏實驗測定含羞草經醋酸菌發酵後，萃取物抗氧化活性與抑制酪胺酸酶之最佳實驗參數。

第二章 文獻回顧

2.1 野生常見植物的介紹及用途

2.1.1 野生常見植物之介紹

植物作為自營生物必須接受許多環境上的挑戰，包括授粉與種子傳播。故植物進化了次級生化途徑，使它們能夠合成大量的化學物質。通常受到特定的環境刺激才會有此途徑，如草食性動物引起的損傷、病原體攻擊或營養匱乏。次級代謝物能夠作為抗氧化劑、自由基清除劑、紫外線吸收劑和抗增殖劑，能夠使植物抵抗細菌、真菌和病毒的攻擊(Kennedy & Wightman, 2011)。

一般未經馴化的非栽培植物通常以野生植物或野草稱之，雜草則是以人為利用做出發點所定義的名詞，凡是影響到人們當時所栽種作物之收量的其他植物，均以雜草視之。因此田區內所謂的雜草並非指特定種類的植物，或許只是在當時環境狀況下尚未被人們發現其利用價值。雜草憑藉著種子產量高及休眠期長之特性，而具有很強的繁殖能力，且容易隨著灌溉水、栽培作物種苗之介質、動物攜帶等因素而快速擴散到其他地區，營養繁殖莖甚至還會因為整地時的農機具切割而蔓延至全區（蔣永正，2002）。

2.1.2 野生植物之用途

Wojdył 等人採取了 32 種的草藥做抗氧化能力的測定，發現菊科、唇形科、繖形科類黃酮含量比較高，平均 957 mg-GAE/100g-dw、710 mg-GAE/100g-dw、620 mg-GAE/100g-dw(Wojdyło et al., 2007)。而 Liu 等人發現豆科植物—槐花具有豐富的類黃酮，總酚含量為 86.93±1.51 mg-GAE/g-dw(Liu et al., 2008)。

大花咸豐草在總抗氧化試驗(trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)中，以 60%乙醇萃取的花粗萃物為最佳，數值為 0.74 mM Trolox（洪昆源等，2011）。含羞草具有抗氧化活性，包括自由基清除能力、還原力、

亞鐵離子螯合能力及氧自由基吸收能力，其中亞鐵離子螯合能力與槲皮素相當，氧自由基吸收能力則顯著高於槲皮素及維他命 C（蔡佳芳，2012）。

參考以上研究，此研究從中篩選為菊科、脣形科、繖形科、豆科的植物，進而評估實驗樣品。

(1)大花咸豐草

- ◆ 學名：*Bidens pilosa* Linn. var. *radiata* Schultz.
- ◆ 分類地位：菊科(Compositae)，鬼針屬。
- ◆ 性能：味甘，性微寒。有消炎、利尿、解熱、解毒等功能（胡敏夫等，2006）。
- ◆ 別稱及性狀：白花婆婆針，為高三尺的直立性一年生草本植物。多分枝，全株無毛。莖為方莖且呈現綠色，節處多帶淡紫色，具有逆針刺狀的宿存萼有二至三條，附著於人畜身上散佈。四季開花，廣佈自生於台灣平地至阿里山高地，嫩葉可食用，全草可入藥（台灣植物同好會，2009）。

(2)含羞草

- ◆ 學名：*Mimosa pudica* Linn.
- ◆ 分類地位：豆科(Leguminosae)，含羞草屬。
- ◆ 成分：全草含含羞草鹼(mimosine)、酚類、胺基酸、含羞草鹼，根包含生物鹼。
- ◆ 性能：味甘、性寒。（胡敏夫等，2006）。
- ◆ 別稱及性狀：別名怕羞草、知羞草，為多年生灌木狀草本植物，株高約 20-60 公分。全株可利用，具毛茸與銳刺，若不注意容易被刺傷。含羞草生長在向陽的荒廢地、河床、路邊，最大特點為葉柄基部有膨大的葉枕，輕輕碰觸就會閉合下垂。在中藥藥性上面具有清熱解毒、安神消積的功效（李幸祥，2009）。

含羞草未經處理前會釋放出含羞草鹼(mimosine)，含羞草鹼為一種有毒的生物鹼，直接食用會造成微量中毒(Joseph et al., 2013)。Matsumoto 等人研究表示當含羞草鹼於 80°C 至 100°C 的高溫下，可降低含羞草鹼的含量，進而降低含羞草的毒性(Matsumoto et al., 1951)。

(3)兔兒草

- ◆ 學名：*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai
- ◆ 分類地位：菊科(Compositae)，剪刀草屬。
- ◆ 入藥部位：全草或根。
- ◆ 性能：味苦，性寒。有止瀉、消腫等作用（胡敏夫等，2006）。
- ◆ 別稱及性狀：台灣俗稱兔仔菜、鵝仔菜、苦菜，因兔子喜好食之而得名。生長於稻田、原野的普通多年生植物。全株無毛，如有折傷會流出白色乳汁。莖高八寸至十五寸，花為黃色，冠毛呈白色，花期在春夏季。分佈在台灣平地至玉山高地。全株可食，為苦茶的製作原料。台灣民間常用來治療消化不良，具有麻醉成分（台灣植物同好會，2009）。

(4)魚腥草

- ◆ 學名：*Houttuynia cordata* Thunb.
- ◆ 分類地位：三白草科(Saururaceae)，蕺菜屬。
- ◆ 別稱及性狀：俗稱臭腥草或蕺菜，因用手沾之會有魚的腥味而得名，是低海拔地區到處可見的上等野菜。自生於近山路旁的多年生草本植物，因有地下莖，每年夏季會自地面長出直立莖。全株可食用，無毛有臭味。高五寸至二尺、長一寸至二寸五分、寬一寸至二寸。葉子互生成心型。花為淡黃色，開花期在六月到八月。乾燥的全草成為十藥（十藥，意指具有十種藥效），用來作為利尿劑，有效成分為黃酮、配糖體及鉀鹽（台灣植物同好會，2009）。

(5) 牛筋草

- ◆ 學名：*Eleusine indica* (L.) Gaertn.
- ◆ 分類地位：禾本科(Gramineae)，稩屬。
- ◆ 分布：台灣全境原野、果園及田埂。
- ◆ 成分：含蛋白質、澱粉、脂肪、硝酸鹽及少量亞硝酸鹽
- ◆ 性能：味甘，性平。有清熱解毒、散瘀止血等功能（胡敏夫等，2006）。
- ◆ 別稱及性狀：別名蟋蟀草，牛頓草，牛信棕。為一年生禾草，稩叢生，葉鞘兩側扁平。葉線形，平滑無毛，葉舌短。穗狀花序由一至數枚，呈指狀排列於稩頂，全年為開花期。牛筋草的特徵是它韌如牛筋的莖及其根系發達，且為深根系因此拔除不易，因此危害潛力高，難防治（徐玲明、蔣慕琰，2000）。

(6) 紫花藿香薷

- ◆ 學名：*Ageratum houstonianum* Mill.
- ◆ 分類地位：菊科(Compositae)，藿香薷屬。
- ◆ 分布：全省原野、山地及田埂。
- ◆ 入藥部位：全草
- ◆ 性能：味辛苦，性涼。有清熱、解毒、消腫等功能（胡敏夫等，2006）。
- ◆ 別名紫花毛麝香，墨西哥藍薷。為一年生草本，莖直立，密生細毛。葉對生，有柄，葉基部為心臟形，邊緣有圓鋸齒狀。花紫色，頭狀花序，全年開花期頂生。瘦果黑色，長圓柱形，具冠毛。植株及頭狀花皆比白花藿香薷稍大些（徐玲明等，2000）。

2.2 自由基與抗氧化

2.2.1 氧化壓力及活性氧介紹

氧化壓力的定義為活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和活性氮(Reactive nitrogen species, RNS)之間不平衡，進而產生抗氧化防禦，能夠產生活性氧或活性氮的酵素如表 1。研究指出攝入富含抗氧化劑的飲食與患心血管疾病等疾病的風險呈負相關。因此，人們開始關注天然產物的抗氧化能力(López-Alarcón & Denicola, 2013)

在生物學與醫藥領域中，最廣泛人知的自由基為 ROS 及 RNS。其中最重要的 ROS 為氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧化自由基陰離子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、一氧化氮($\text{NO}\cdot$)、過氧自由基($\text{ROO}\cdot$)。ROS 及 RNS 在生命系統中扮演著一體兩面的角色，它們有可能是有害或有益的。當 ROS 或 RNS 過度生產時，一方面在生物系統中會產生有害的影響，另一方面也會缺乏抗氧化酶或低分子量抗氧化劑。ROS 或 RNS 一體兩面的走向為一種微妙的平衡，這種平衡機制稱之為氧化還原調控。氧化或硝化壓力會造成 ROS 或 RNS 之間不平衡，損害生物體的解毒能力或修復能力(Poprac et al., 2017)。

氧化壓力的潛在作用對紫外線在人體皮膚有害影響，已經有相當多的討論，如皮膚細胞照射 UVA 後會產生自由基與活性氧，而照射 UVB 後人類的皮膚纖維細胞會被刺激而釋放出超氧化物(Jackson, 1999)。對於預防 ROS 損傷的重要機制為抗氧化酶、非酶的化合物與修復過程，但這些機制會隨著年紀的增長，效果會跟著降低(López-Alarcón & Denicola, 2013)。

表 1、會產生活性氧或活性氮的酵素(López-Alarcón & Denicola, 2013)

英文名稱	中文名稱
nitric oxide synthase(NOS)	一氧化氮合成酶
NADPH oxidase(NOx)	NADPH 氧化酶
cyclooxygenase(COX)	環氧化酶
myeloperoxidase(MPO)	骨髓過氧化酶

2.2.2 自由基對皮膚的傷害

自由基為一種分子或分子片段，包含一個或多個未配對電子，它們的存在通常使它們具有高度的反應性。自由基可以從內源性或外源性來源產生，其中最主要的內源性來源有粒線體呼吸鏈、NADPH 氧化酶、黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)。有害的自由基可以透過抗氧化劑去抑制，如活性細胞內包含大量的低分子量抗氧化劑(如維他命 E、維他命 C、類胡蘿蔔素、類黃酮等)與高分子量的抗氧化酶(如 SOD、CAT、GPX、TRX 等)，兩者都可以去防止或修復自由基的傷害(Poprac et al., 2017)。

自由基與其他活性物種跟許多由發炎引起的疾病有關，且伴隨著氧化傷害。例如癌症、動脈硬化、神經退化性疾病、糖尿病。自由基也會造成許多皮膚疾病，包含皮膚惡性腫瘤與皮膚老化跟皺紋(Haag et al., 2010)。

年紀與自由基的產量成正比，年紀越大自由基的數量也會增多。細胞修復 DNA 損傷的能力與抗氧化能力也會隨著年紀增長能力降低。含酶抗氧化劑如穀胱甘肽過氧化物酶、超氧化物歧化酶、過氧化氫酶，以及不含酶的抗氧化劑，如維生素 E 異構物、維生素 C、穀胱甘肽、尿酸、輔酶(Zastrow et al., 2009)。

皮膚是人類最大的器官，為人體形成一層保護膜，隔絕外面大量的化學與物理環境污染物，對於體內平衡是至關重要的(Jackson, 1999)。皮膚的防禦系統由酵素、維生素與其他抗氧化物種組成(Haag et al., 2010)。

當皮膚過度暴露在紫外線時，會造成急性或慢性的傷害。短期的過度暴露會形成急性傷害，通常被稱為紅斑或曬斑。長期過度暴露則會促進皮膚癌與不成熟的光老化。由於大氣中臭氧的損耗，人類正接觸到高劑量的UV光。紫外線由UVA(320–400 nm)、UVB(280–320 nm)、UVC(200–280 nm)，但只有UVA與UVB能夠到達地球表面。皮膚組織暴露紫外線中，在體內和體外試驗已知可以產生自由基與ROS，造成細胞氧化壓力，加速老化過程(Jackson, 1999)。

此外，人體暴露在大量的助氧化劑的環境，包含藥物、太陽輻射、污染性的化學物質、食品添加物、化妝品等，都能使皮膚產生活性氧。而皮膚大量的接觸到汙染物與藥品會顯示對皮膚的毒性，這些環境毒物或代謝物為固有的氧化劑，透過直接或非直接的方式，驅動各式各樣的活性氧化劑的產生，即我們熟知的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)。許多環境汙染物無論自身是抗氧化劑或催化酶，都會直接或間接產生ROS。而ROS被認為可以刺激增殖與細胞存活信號、改變細胞凋零途徑、參與一些皮膚疾病的發病機制。包含光敏性疾病和皮膚惡性腫瘤。皮膚具有一系列與毒物相互作用的防禦機制，防止它們的有害影響。不幸地，這些自我平衡的防禦雖然有效，但能力有限，一旦皮膚的活性氧不平衡就會造成皮膚病的發展(Bickers & Athar, 2006)。

自由基在人類的皮膚是重要的壓力因子，也是皮膚老化的重要因素。透過激活NADPH氧化酶、呼吸鏈反應、與porphyrins的光敏化反應，人類皮膚會生成氧化自由基。外部環境因子如太陽輻射與環境危害，內部因子如新陳代謝、疲累、發炎或疾病。以及自我強加的因素，例如吸食尼古丁與大量的酒精，能在人體皮膚上產生不同的自由基。自由基對於病毒與細菌扮演著很重要的角色，能夠提供細胞內部與細胞的信號功能。然而，高濃度的自由基會引起氧化壓力，在這個情況下，自由基會破壞膠原蛋白以及彈性纖維(Lademann et al., 2011)。

2.2.3 抗氧化劑

抗氧化劑的定義為延緩任何物質、防止或消除目標分子的氧化損傷，通常會理解成化合物有抵抗自由基的能力，能作為生物抗氧化劑的試劑如表 2 所示。好的抗氧化劑應有以下幾個條件：消耗穩定的自由基、降低銅或鐵離子的能力、保護暴露在自由基來源的目標分子、抑制低密度脂蛋白的氧化、清除自由基與還原化合物、激活轉錄因子促使抗氧化酶的產生，改善氧化壓力(López-Alarcón & Denicola, 2013)。

有些黃酮類被發現可以作為溫和的抗氧化劑，可以適當地提高細胞的抗氧化能力。尤其類黃酮包含多種氫基，如黃芩素與表沒食子兒茶素沒食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)，在 Fenton 反應條件下能促進形成羥基自由基(Poprac et al., 2017)。適量的補充含有抗氧化劑的食物，能有效降低由紫外線誘導的鱗狀細胞癌的數量及嚴重程度(Black, 1987)。抗氧化劑的防禦系統和有氧代謝有密切相關，能夠消除因活性氧造成的破壞，使組織損傷降到最低(Bickers & Athar, 2006)。

酚類普遍存在於植物界，迄今為止已鑑定出約 10,000 種結構，透過苯丙烷途徑前體合成而成。在結構上，1 個芳香烴環能夠連接 1 個或多個羥基。具有這種結構模體(motif)之最簡單的化合物為苯酚分子，其本身不在植物中發生。酚類化合物的範圍從簡單的低分子量化合物，如苯丙烷類(phenylpropanoids)、香豆素(coumarins)和苯甲酸衍生物，至更複雜的結構如類黃酮(flavonoids)，二苯乙烯(stilbenes)和鞣質(tannins)。流行病學研究表示食用富含酚類物質的食物或飲料，跟中風、癌症、神經系統疾病如阿茲海默症之間存在相關性(Kennedy & Wightman, 2011)。

多酚類化合物是植物二次代謝產物，為天然植物中萃取的多羥基酚類衍生物，廣泛的存在蔬菜水果裡，具有許多生物效應包括：抗誘變、抗腫瘤、抗菌、保護心血管等特性。多酚類化合物主要有羥基酸、羥基肉桂酸、類黃酮、異黃酮等(Shui & Leong, 2002)、(Song et al., 2010)。

皮膚保護人體內部的方法可以分成內源性與外源性。內源性如合成黑色素與含酶的抗氧化劑；外源性如抗氧化劑。抗氧化劑可以從食物中攝取，比如維生素 A、C、E 等。紫外線會誘導皮膚光老化，且隨著年紀增長，臨床表現症狀更明顯。當內源性的抗氧化機制與修復過程不再有效時，光損傷在皮膚上就會特別明顯。皮膚在暴露在太陽光前先使用抗氧化劑保護是非常重要的事。人類已經實際證明出當皮膚暴露在 UV 光前先使用天然或合成的抗氧化劑能達到光保護作用。各式各樣的抗氧化劑或其他植化素，例如茄紅素、輔酶 Q、穀胱甘肽、肌肽、硒、鋅、生物類黃酮、綠茶多酚、葡萄籽原花青素、白藜蘆醇、水飛薊素、金雀異黃酮，對於紫外線所誘導的皮膚炎症、氧化壓力和 DNA 損傷具有重要的保護作用(López-Alarcón & Denicola, 2013)。

常見的抗氧化酶如表 3 所示，超氧化物歧化酶為一種金屬蛋白，可以將超氧化物分解為過氧化氫。穀胱甘肽過氧化物酶和過氧化物酶被認為有清除自由基的能力(Black, 1987)

表 2、能作為生物抗氧化劑的試劑(Black, 1987)

英文名稱	中文名稱
Ascorbate	抗壞血酸鹽
Tocopherol	生育醇 (維生素 E)
Uric Acid	尿酸
Sulfhydryl compounds	硫氫基化合物
Phenols	酚類
Reduced glutathione	還原型穀胱甘肽
Selenium	硒
Carotenoids	類胡蘿蔔素
Mannitol	甘露醇

表 3、常見的抗氧化酶(López-Alarcón & Denicola, 2013)

英文名稱	中文名稱
Catalase(CAT)	過氧化氫酶
Superoxide dismutase(SOD)	超氧化物歧化酶
Peroxiredoxin(Prx)	過氧化物還原酶
Glutathione peroxidase(GPx)	穀胱甘肽過氧化酶
Thioredoxin(Trx)	硫氧還蛋白
Thioredoxin reductase(TR)	硫氧還蛋白還原酶
Glutathione reductase(GR)	穀胱甘肽還原酶

。

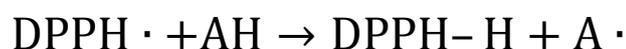
2.2.4 常見抗氧化活性的評估方法

考慮到體內試驗所涉及的複雜性較高，在抗氧化劑方面，已經開發出不同的體外方法。常見測定體外的抗氧化能力方法有氧化自由基吸收能力 (oxygen radical absorption capacity, ORAC)、DPPH 清除能力、總多酚的含量、氧化自由基吸收能力測定、抑制低密度脂蛋白的過氧化反應、抑制酪胺酸硝化(López-Alarcón & Denicola, 2013)。

■ DPPH 測定方法

DPPH(diphenylpicryl-hydrazyl)是一個穩定的自由基，如圖 1。原理如公式 1 所示，其中 AH 為抗氧化劑，A·為自由基，DPPH 與抗氧化劑反應，產生 DPPH-H 與自由基(Molyneux, 2004)。

它的穩定性來自於氮中心周圍有三個苯環形成共振，使氮原子無法產生二聚作用(二聚作用指兩個單體的聚合作用，其適用原子與分子)。DPPH 溶於醇類溶液時，在波長 517 至 520 nm 中會呈現深紫色。而當 DPPH 溶液接觸到可捐贈氫原子之物質時，DPPH 會轉變型態如圖 2，氮原子與氫原子結合後，溶液顏色會從深紫色轉變成淡黃色。此反應最常在抗氧化系統，例如脂質的抗氧化或其他不飽和物質。當抗氧化劑的抗氧化能力越強，其吸光值越低，代表 DPPH 的自由基抗氧化清除能力越好 (磨耀霖, 2011)。



公式 1、DPPH 反應式

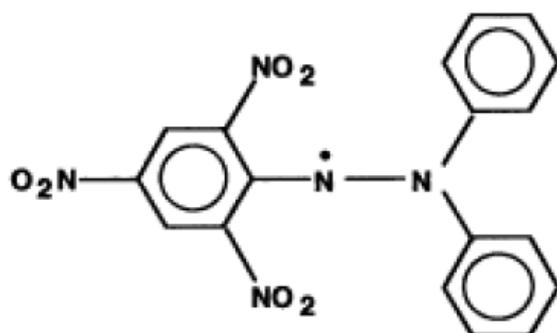


圖 1、Diphenylpicrylhydrazyl (free radical) (Molyneux, 2004)

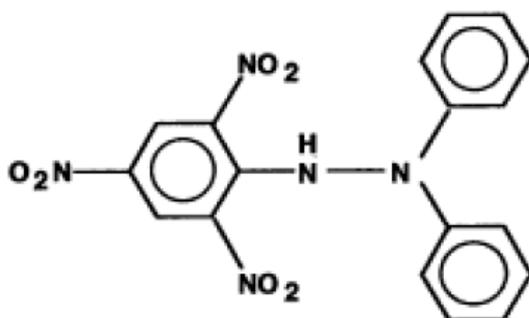


圖 2、Diphenylpicrylhydrazine (nonradical) (Molyneux, 2004)

■ 總多酚測定方法

總多酚含量的測定方法為 Folin-Ciocalteu。Folin-Ciocalteu 比色法是普遍應用於檢測抗氧化總多酚含量的方法，定量上常以沒食子酸(Gallic acid)當量作為總多酚相對含量的表示（陳良宇等人，2012）。

因 Folin-Ciocalteu 試劑與酚類化合物在酸性穩定，在鹼性環境下才有顯色效果。故 Folin 試劑與樣品做反應後需加入碳酸鈉，使 pH 值為鹼性，再測定在波長 760 nm 的吸光度。當吸光度越高，代表總酚的還原能力越強，酚類含量越高（林煜書，2012）。

2.3 皮膚與黑色素之關係

2.3.1 黑色素在皮膚上的位置

皮膚由外而內大致可分為三層：表皮層(epidermis)、真皮層(Dermis)、皮下組織(Subcutaneous)。表皮層又能細分成五層：角質層、透明層、顆粒層、棘狀層、基底層。其中麥拉寧色素細胞(Melanocyte)即在基底層，主要為合成黑色素(Melanin)，平均一個麥拉寧色素細胞可以產生 36 個黑色素(嚴嘉蕙，2009)。

影響人體膚色的主要色素為黑色素(melanin)，它是黑色素細胞(melanocyte)所合成的一種聚合物，由酪胺酸酶(tyrosinase)輔助酪胺酸(tyrosine)合成，能夠保護皮膚對抗紫外線傷害，而陽光的曝曬會加速黑色素的合成。根據圖 3 我們得知，黑色素的含量及分布主要與遺傳有關，但是不論何種膚色的種族，皮膚黑色素細胞的數量和構造都是一樣的，不同的是黑色素體(Melanosomes)的比例有別(Brenner & Hearing, 2008)。

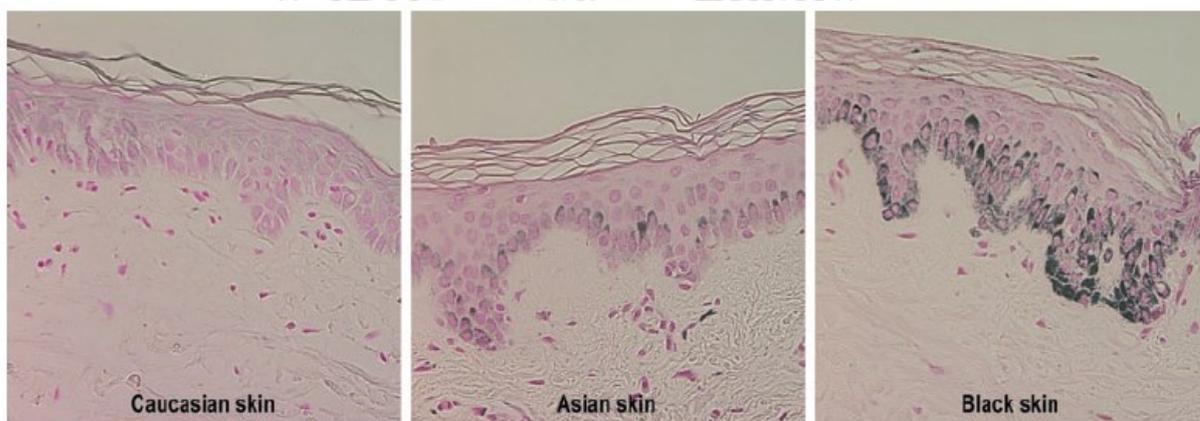


圖 3、不同種族膚色的黑色素含量(Brenner & Hearing, 2008)

2.3.2 黑色素的生合成機轉

黑色素體有兩種類型的黑色素：真黑色素(eumelanin)、褐黑色素(pheomelanin)。真黑色素為暗褐黑色的不溶性聚合物，而褐黑色素為亮紅黃色的可溶性硫聚合物。真黑色素的途徑包含兩個酪胺酸酶相關蛋白質—Tyrosinase related protein 1 (TRP-1)、Tyrosinase related protein 2 (TRP-2)，它們可以增加酪胺酸酶的穩定性(Gillbro & Olsson, 2011)。

黑色素生成機制如圖 4。L-酪胺酸(L-tyrosine)只能透過促進擴散的方式進入黑色素體，在這個情況下值得注意的是，黑色素合成中 L-酪胺酸的濃度多寡，取決於細胞內的苯丙胺酸羥化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)。L-苯丙胺酸(L-phenylalanine)透過 PAH 轉換成 L-酪胺酸。和 L-酪胺酸相反，L-苯丙胺酸透過膜運輸的方式，確保有高濃度的 L-酪胺酸在胞器內。形成 L-dopaquinone 後，黑色素生成途徑會被分成兩種：黑褐色的真黑色素、紅黃色的褐黑色素。而氧化還原在黑色素體中扮演一個至關重要的角色，它是平衡真黑色素與褐黑色素生成的重要條件。其中會形成真黑色素或是褐黑色素的條件，取決於穀胱甘肽(glutathione, GSH)。

高濃度的穀胱甘肽會使途徑形成真黑色素，低濃度的穀胱甘肽會使途徑形成褐黑色素。因此，具有抗氧化活性的酶可能能夠修改黑色素生成的途徑，如過氧化氫酶、穀胱甘肽過氧化物酶、穀胱甘肽還原酶等。此時可分成兩種途徑：在褐黑色素的途徑中，半胱胺酸與 L-dopaquinone 反應形成 cysteinyl-dopa，再轉變成醌亞胺(quinoleimine)，最後形成褐黑色素；而在真黑色素的途徑中，多巴色素(dopachrome)會自發性的轉變成 5,6-二羥基吲哚(5,6-dihydroxyindole)或透過多巴色素互變異構酶(dopachrome tautomerase, DCT)轉變成 5,6-二羥基吲哚-2-羧(5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid)，兩者途徑擇一。其中 DCT 的過程又稱之 tyrosine-related protein-2(TRP-2)。最後，聚合的 Indole-5,6-quinone 形成真黑色素(Gillbro & Olsson, 2011)。

黑色素合成後，會沿著黑色素細胞的樹狀突，傳送給棘狀細胞層的角質細胞。在表皮角質細胞中的黑色素有吸收紫外線和清除自由基的作用，為細胞核 DNA、真皮蛋白、膠原蛋白、彈性蛋白提供保護。最後，黑色素會在角質形成細胞溶酶體內降解，隨表皮細胞的脫落而排出（王隆碩等，2013）。

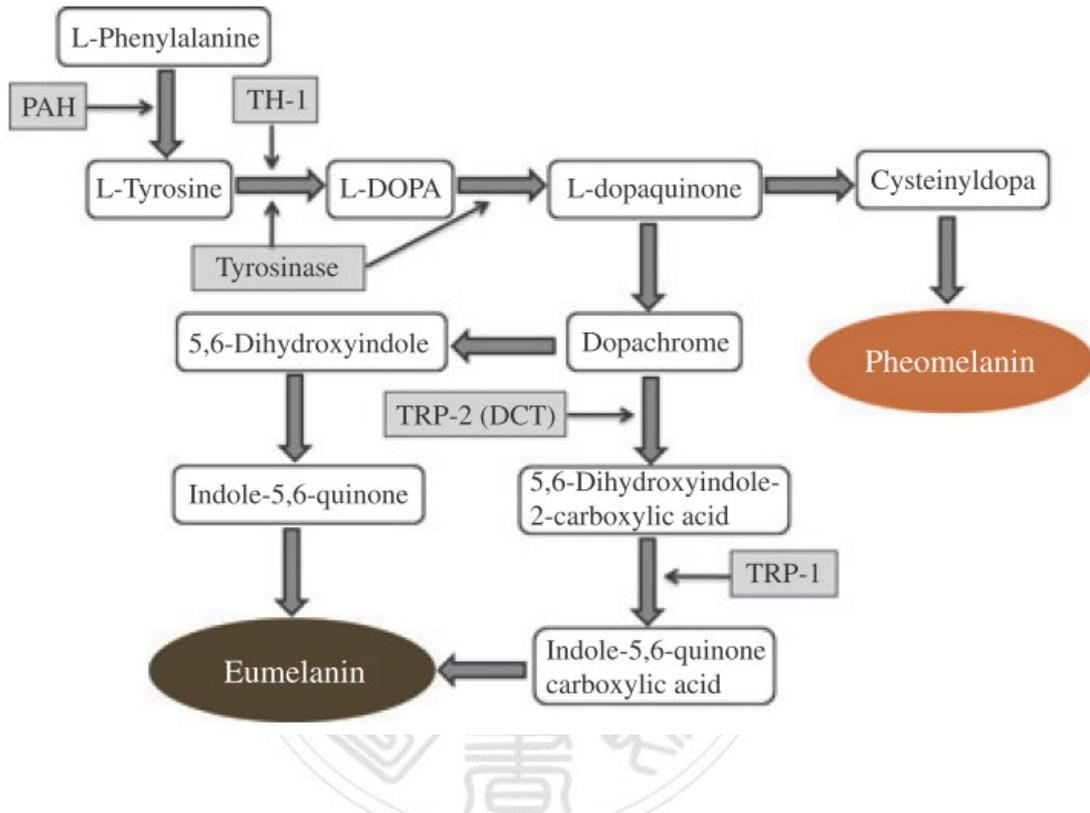


圖 4、黑色素生成機制(Gillbro & Olsson, 2011)

2.3.3 酪胺酸酶與黑色素生成的關聯性

當人類暴露過多的 UV 光，黑色素細胞容易合成過多的黑色素，造成色素過度沉澱，使皮膚變成褐色(Chan et al., 2014)。

黑色素是由表皮黑色素細胞產生的，負責調控皮膚的顏色與保護皮膚不受到 UV 光線的傷害。黑色素的產生需要發生一連串的生物合成途徑。酪胺酸酶在此生物合成中扮演催化的角色，當 L-酪胺酸與酪胺酸酶反應時，L-酪胺酸會羥基化變成 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)，L-DOPA 進一步氧化成相對應的鄰醌(*o*-quinone)。因此，酪胺酸酶在黑色素的合成中，被認為是篩選抑制因子的主要目標(Huang et al., 2014)。

酪胺酸酶通常專一表現在黑色素細胞中，是黑色素形成過程中的一個速率決定酵素，其屬於第三型含銅蛋白質(Type 3 copper protein)，此類型的酵素在進行催化反應時，銅離子為重要的輔助因子。在催化過程中酪胺酸酶扮演著重要的角色，若能有效抑制酪胺酸酶的活性，使黑色素無法順利合成，則有助於達到美白的功效(陳旺全等，2015)。

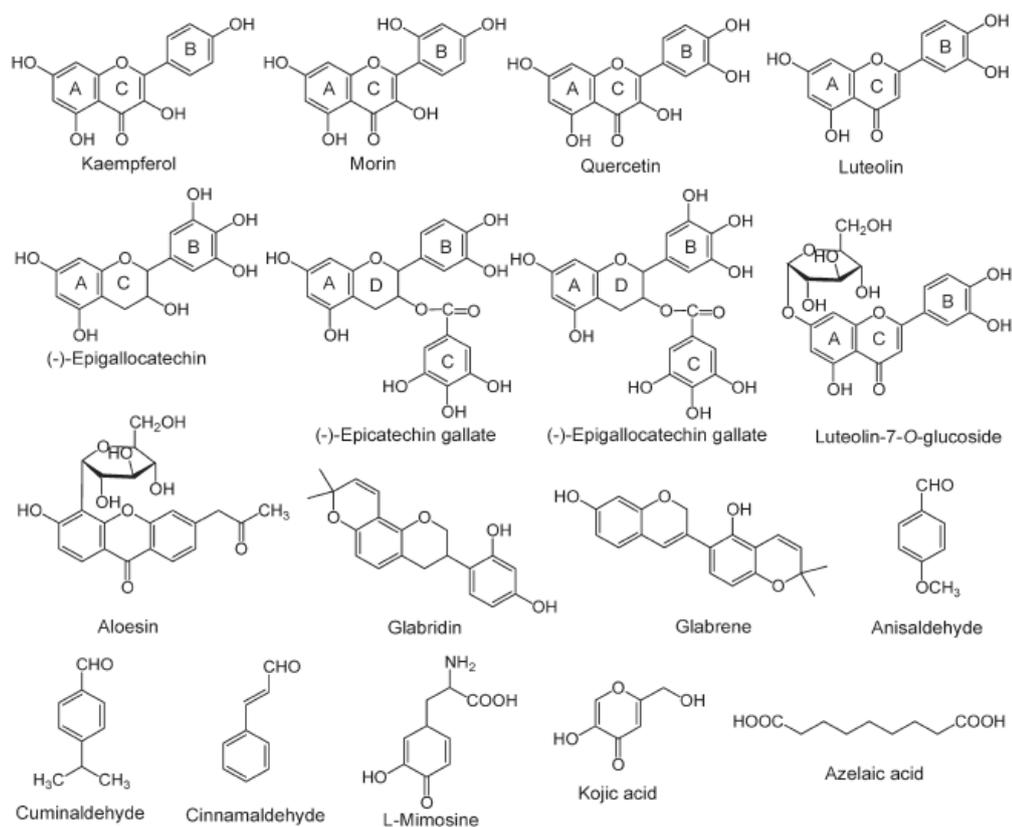


圖 5、天然來源的酪胺酸酶抑制劑結構(Kim & Uyama, 2005)

2.3.4 黑色素的保護作用與有害作用

根據以下三點應證了黑色素的光保護作用(Brenner & Hearing, 2008)：

1. 皮膚色素沉著與日曬引起的皮膚癌率存在負相關，暗沉的皮膚包含更多的真黑色素，比起白皙的皮膚更能抵擋紫外線的損傷。
2. 白皮膚的受試者比起黑皮膚的受試者，罹患皮膚癌的機率比黑皮膚多了約 70 倍的機率。
3. 黑皮膚的表皮只允許 7.4%的 UVB 與 17.5%的 UVA 穿透，而白皮膚能允許 24%的 UVB 與 55%的 UVA 穿透。

Brenner 等人表示，真黑色素透過物理屏障的能力散射 UVR，能夠減少紫外線對於皮膚深入的傷害。假設黑色素作為防曬劑的有效性約 1.5-2.0 防護指數(sun protective factors, SPF)，等於黑色素能夠吸收 50-75%的 UVR。而防曬指數 2 代表能夠雙倍的保護皮膚免受曬傷。黑色皮膚中的黑色素小體對微粒分解酶的降解具有抗性，能保持完整的表皮層與在角質形成細胞與黑色素細胞形成帽上核。這對因紫外線誘導光損傷的光保護有相當大的貢獻。相反地，在淺色皮膚中，黑色素小體會降解且使基底層的黑色素成粉塵狀。上表皮層的黑色素小體減少被認為是致癌作用的重要因素，因為黑色素小體會損害皮膚的光保護作用。

真黑色素的其他重要特性為清除自由基與清除超氧化物歧化酶，減少活性氧的產生。針對因 UV 光誘導的光損傷，黑色素通常被認為是保護皮膚的最大功臣。但黑色素暴露在 UVB 中可能會帶有毒性，在照射 UVA 之後，黑色素已被證明與 DNA 反應能當光敏劑產生活性氧。在體外的皮膚產生單鏈 DNA 斷裂。與真黑色素相比，褐黑色素特別容易發現光降解且被認為有助於UVR的破壞性作用，因為它可以產生過氧化氫和超氧化物陰離子，並可能引起黑素細胞或其他細胞的突變。此外，褐黑色素與照射 UVR 後的凋亡細胞有高度的相關性。褐黑色素還會促進組織胺的釋放，白皙人群照射陽光後容易引起日曬紅斑與水腫(Brenner & Hearing, 2008)。

2.3.5 常見的美白評估方法

皮膚美白的的方法除了增加表皮轉換的速度（表皮換膚）與使用抗氧化劑之外，抑制酪胺酸酶的活性亦可。酪胺酸酶(EC 1.14.18.1)為一含銅的氧化酵素，由黑色素細胞內的核糖體所合成，再運送到粗內質網之內腔，並儲存在高基氏體之小泡中。於蔬果之褐變或皮膚黑色素的形成中，皆扮演著重要的角色（許純真，2007）。

酪胺酸酶抑制劑可分為三種型態：競爭型、非競爭型、反競爭型。常見的酪胺酸酶抑制劑有 L-ascorbic acid（L-抗壞血酸）、kojic acid（麴酸）、ellagic acid（鞣花酸）、tranexamic acid（傳明酸）、hydroquinone（對苯二酚）、Arbutin（熊果苷）。其中麴酸、熊果苷可以抑制酪胺酸酶，能治療或預防異常的色素沉澱(Huang et al., 2014)。

雖然市面上常用以上抑制劑，但在臨床上尚有一些副作用。例如 L-ascorbic acid 容易對熱敏感造成降解作用，刺激性強、kojic acid 容易觸發過敏反應（如接觸性皮膚炎）、hydroquinone 容易導致外源性老化(Chan et al., 2014)。

2.4 醋酸菌之應用

醋酸菌普遍分布在變質的蔬果上。基質在好氧的環境下能使基質裡的乙醇氧化成乙酸，這種過程稱之為醋化。醋化過程會形成相關的氣味和風味。另外醋酸菌的生長會形成多醣類，在發酵後的澄清和穩定性造成額外的問題。*Acetobacteraceae* family(醋酸菌科)主要為 *Acetobacter*(醋酸桿菌屬)與 *Gluconobacter*(葡萄糖桿菌屬)，為革蘭氏陰性有氧菌，型態為近似為橢圓或桿狀，大小為 0.9-4.2 flm×0.5-0.9 flm。兩屬之間的區別在於利用乙醇做為碳源的相對能力(Fugelsang, 1997)。

Leifson 表示醋酸菌具有絕對好氧、氧化葡萄糖的能力，生長在 pH 5 至 6 培養基中。此外，醋桿菌屬目前構成兩種截然不同的形態類型，一種具有周邊形成鞭毛的型態，平均波長為 2.9 μ，能夠氧化醋酸與乳酸使分解成二氧化碳與水；另一種為極生的單鞭毛，平均長度為 1.4 μ(Leifson, 1954)。

醋酸菌能夠將各種碳水化合物、醇類與糖醇類氧化成乙酸和其他有機酸，例如葡萄糖酸、延胡索酸、檸檬酸、酮類(ketones)等。*Acetobacter* 已有 24 種物種被鑑定出來，*Gluconacetobacter* 則是 23 種，廣泛的應用在工業上。其中 *Acetobacter* 與 *Komagataeibacter* 這兩屬對於含有酸性或酒精性條件下的環境耐受度很高，產生醋酸的能力比其他屬高很多。Dourado 等人整理出醋酸菌不同階段的重要記事，如表 4 (Dourado et al., 2017)。

在 1898 年，醋酸菌科只有 *Acetobacter* 一屬而已。1925 年，Visser't Hooft 為第一個提出用生化與生理條件分類醋酸菌。約 1935 年，Asai 進一步提出能夠將葡萄糖氧化成葡萄糖酸的細菌及不能氧化醋酸的菌種皆隸屬於 *Gluconobacter*。1954 年，Leifson 將具有鞭毛的醋酸菌分離出來，隸屬於 *Gluconobacter*，具有鞭毛的醋酸菌有氧化部分乙醇的能力。De Ley 等人研究了 28 株醋酸菌的 DNA 鹼基組成，提出了 *Acetobacter* 與 *Gluconobacter* 的共同起源。在 1983 至 1984 間，Yamada 等人基於細菌的泛醌系統，將 *Acetobacter* 細分成兩個亞屬。*Acetobacter* 主要的 respiratory quinone 為 Q-9，*Gluconacetobacter* 則為 Q-10。幾種常見的含 *Acetobacter* 的 Q-10 被轉移隸屬至 *Gluconacetobacter* 亞屬，即 *Acetobacter diazotrophicus* (*A. diazotrophicus*)、*Acetobacter europaeus* (*A. europaeus*)、*Acetobacter hansenii*

(*A. hansenii*)、*Acetobacter liquefaciens* (*A. liquefaciens*)、*Acetobacter xylinus* (*A. xylinus*)。在 1998 年，基於部分 16S rDNA 序列，Yamada 等人提出將 *Gluconacetobacter* 亞屬提高一階，*Gluconacetobacter* 進一步分裂成 *Ga. liquefaciens* 與 *Ga. xylinus*。主要表型差異為 *Ga. liquefaciens* 全面具有鞭毛且有運動性，*Ga. xylinus* 無鞭毛，不具運動性。而 Cleenwerck 等人透過序列分析三個管家基因 (housekeeping genes)—*dnaK*、*groEL*、*rpoB*，支持 *Gluconacetobacter* 系統分裂。因此 Yamada 等人提出將 *Ga. Xylinus* 分類成一個單獨的新屬—*Komagataeibacter*。

纖維素為自然界中分布最廣，含量最多的多醣體。大多的纖維素來自於植物，且多應用於造紙工業，由於來自植物的纖維素組成複雜且含蠟質，因此近年來科學家及工業界開始重視細菌纖維素應用於不同領域之可行性，其中，又以木質醋酸菌 *Acetobacter xylinum* 為主。*Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) 產生的纖維素具有純度高、彈性強度大、生體適合性高以及生物分解性佳等優點，具有較高的應用價值，已廣泛被應用於生醫材料、造紙及食品等產業 (楊祐俊等，2009)。

張瑞珠等人將 *Acetobacter* sp.(BCRC 14156)、*Acetobacter pasteurianus*(BCRC 11569) 與鳳梨發酵，測定其發酵率、揮發性成分、感官品質。研究顯示透過這兩種菌發酵的鳳梨具有較高酯類、醇類和較低酸性成分，而感官品評分析顯示經由這兩種菌發酵過的具較強水果氣味與豐富口感 (張瑞珠等，2006)。

Kongkiattikajorn 也研究出洛神花(*Hibiscus sabdariffa*)透過 *Acetobacter aceti* 與 *Acetobacter cervisiae* 菌種混合培養後跟 25°C 水萃總多酚含量與 DPPH 清除率的差別。研究指出洛神花於 25°C 水萃時，總多酚含量為 3.42 ± 0.05 g/L，DPPH EC₅₀ 為 14.95 ± 0.03 g/L；菌種與洛神花混合培養的總多酚含量為 34.19 ± 0.14 g/L，DPPH EC₅₀ 為 0.72 ± 0.04 g/L。洛神花透過醋酸菌種培養後總多酚含量比未培養時高出 10 倍(Kongkiattikajorn, 2014)。

表 4、醋酸菌不同階段的重要記事(Dourado et al., 2017)

年份	摘要
1872	早期系統研究發現，醋放置一段時間後，會產生所謂的“醋母”，為醋酸發酵後的產物，含有醋酸菌與纖維素。
1900	首先對細菌生理與生態學進行進一步的探索，利用無機銨鹽與醋酸作為氮、碳源進行分類。 根據鞭毛與生理特徵，大致將醋酸菌科分成兩屬— <i>Acetobacter</i> 、 <i>Gluconobacter gen. nov.</i> 。
1955	此時的分子生物學日漸成熟，發現三羧酸循環(tricarboxylic acid,TCA)是存在於醋酸桿菌屬(<i>Acetobacter</i>)而非在 <i>Gluconobacter</i> 。透過核酸雜交試驗辨別之前誤植的菌株。
1980-迄今	這個時期發現九種新的菌屬： <i>Frateuria, Acidomonas, Gluconacetobacter, Asaia Neoasai, Saccharibacter, Swaminathania, Kozakia, Granulibacter, Bethesdensis</i> 兩個完整的基因組序列： <i>Glucono bacteroxydans</i> (strain621H) <i>Granuli bacterbethesdensis</i> (strainCGDNIH)

第三章 材料與方法

3.1 研究架構

本研究如圖 6 所示。研究樣品以常見的野生植物為實驗材料。實驗設計分為兩大部分，第一部分為建立野生植物萃取方法；第二部分為評估野生植物在抗氧化能力與美白有效成分進行討論後，選出結果呈現最佳的野生植物。利用田口實驗評估野生植物加入醋酸菌後，抗氧化能力與美白有效成分的最佳參數。

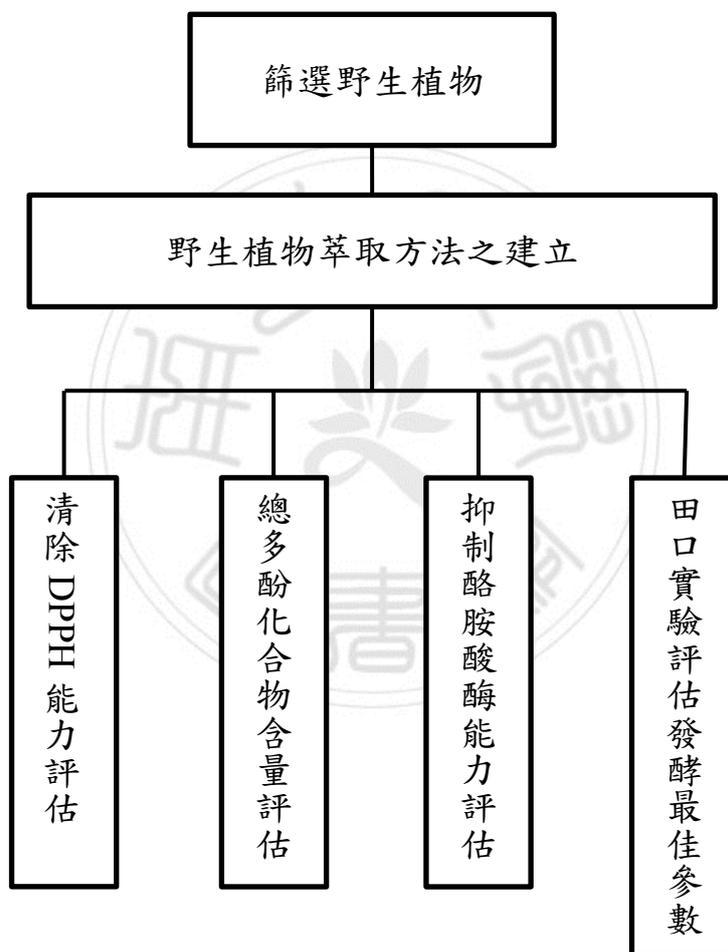


圖 6、研究架構

3.2 研究材料

3.2.1 實驗樣品

大花咸豐草、牛筋草、含羞草、兔仔草、魚腥草、紫花霍香薊皆摘採自南華大學校園周邊及實習自然農場。

3.2.2 實驗耗材、器材及藥品試劑

■ 耗材

秤量紙、50 mL 離心管、塑膠滴管、125 mm 濾紙、塑膠針筒、96-well、1,000 μ L tip、200 μ L tip、0.45 μ m 針筒過濾器、1.5 mL eppendorf、Parafilm

■ 器材

刮勺、燒杯、磁石、吸量管、安全吸球、紅棕瓶、試管架、血清瓶、定量瓶、螺旋試管、L 型玻棒、pipetman

■ 總酚含量測定

Folin-Ciocalteu 試劑，購自 SIGMA，美國
碳酸鈉(Na_2CO_3)，購自島久製藥，GR 級，日本
沒食子酸(Gallic acid)，購自 SIGMA，ACS 級，美國

■ 清除自由基(DPPH)能力測定

DPPH，購自 SIGMA，美國
甲醇(Methanol)，購自 J.T.Baker，HPLC 級，美國

■ 抑制酪胺酸酶能力測定

酪胺酸(Tyrosine)，購自 SIGMA，RG 級，美國

酪胺酸酶(Tyrosinase)，購自 SIGMA，美國

磷酸二氫鉀(KH₂PO₄)，購自島久製藥，ACS 級，日本

磷酸氫鈉(Na₂HPO₄)，購自島久製藥，日本

■ 微生物培養基

Yeast extract powder，購自 HIMEDIA，印度

Agar，購自 HIMEDIA，印度

Peptone，購自 HIMEDIA，印度

Mannitol，購自 Panreac，歐洲

3.2.3 儀器設備

設備名稱	廠牌
熱風循環烘箱	DENG YNG DO60
微量天平	SHIMADZU AUX220
定溫加熱攪拌器	IKARCT Basic
離心機	HSIANGTAI CN-2060
水流抽氣機	NEW LABASPIRATOR AS-3
多用途試管振盪器	Vortex Genie II SI-G560
ELISA reader	BMG LabtechFLUOstar Omega
精密型恆溫培養箱	DENG YNG DB45
滅菌釜	B28N-1-0691-003
pH meter	Sartorius
超音波震盪水浴槽	Delta DC400H

3.2.4 實驗菌株

菌名	BCRC 編號
<i>Acetobacter</i> sp.	BCRC 14156
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	BCRC 11569
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	BCRC 14148

3.3 實驗方法

3.3.1 實驗樣品製備

■ 野生植物採樣方法及前處理

於校園周邊摘採整株的野生植物，透過植物圖鑑（李幸祥，2009）辨識特徵後，挑選翠綠之植株。將摘採來的植株以清水將表面附著之泥沙清洗乾淨，於室內風乾。確定植株表面乾燥後，將其放置於 60°C 烘箱烘 24 小時，乾燥後之植株以粉碎機打粉後於乾燥箱保存。

■ 樣品熱水萃取液之製備方法

參考林威宏等人之測定方法並稍作修改（林威宏，2010）。

水煮萃取分為 100°C、60°C、25°C，將樣品秤重 10 g 後加入 200 mL 的水，以恆溫加熱器進行萃取。100°C 及 60°C 煮 1 小時，25°C 以磁石攪拌 17 小時。萃取時間完成後，將萃取液放至 25°C，以離心方式（60 rpm, 15 分鐘）將沉澱物與溶液分離後，用抽氣過濾機過濾後取得濾液，再將過濾後的濾液裝進 10 mL 之塑膠針筒中，並以 0.45 μm 針筒過濾器將其過濾，最後得樣品之水萃取物。

3.3.2 清除 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力測定

■ DPPH 標準曲線

參考 Sharma 等人之測定方法並稍作修改(Sharma & Bhat, 2009)。

秤取 0.0079 g 的 DPPH 加入至 100 mL 的甲醇，置於棕色瓶裡備用。將 0.1 M DPPH 稀釋成濃度 0-100%，各取 1 mL 的稀釋溶液，震盪 20 秒後，避光靜置 30 分鐘。將完成反應之樣品以 0.45 μm 針筒過濾器過濾，取 200 μL 於 96-well，以 ELISA Reader 測其波長 517 nm 之吸光值，標準曲線如圖 7。

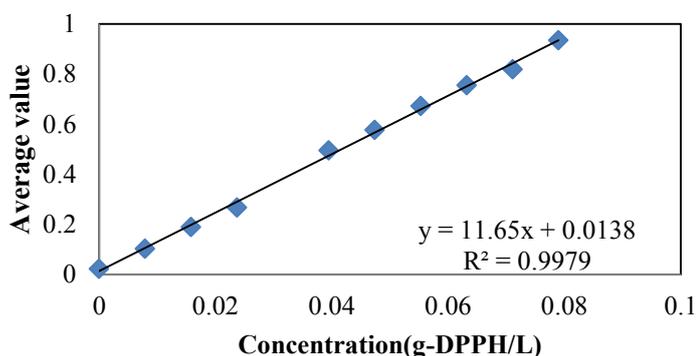


圖 7、DPPH 之標準曲線

■ 實驗步驟

稀釋野生植物萃取物，各取 1 mL 的稀釋溶液，並加入 2 mL 之 0.2 M DPPH 溶液，震盪 20 秒後，避光靜置 30 分鐘。以 0.45 μm 針筒過濾器過濾反應物，取 200 μL 於 96-well，以 ELISA Reader 測其波長 517 nm 之吸光值。此試驗每個樣品做三重覆。

■ 半數抑制濃度(IC_{50})算法

參考 Yang 等人之算式，如公式 2 所示。其中 X_m 為 lg 最大劑量、 I 為 lg(最大劑量/相臨劑量)、 P 為陽性反應率之和、 P_m 為最大陽性反應率、 P_n 為最小陽性反應率(Yang et al., 2015)。

$$\text{IC}_{50} = X_m - I (P - (3 - P_m - P_n) / 4)$$

公式 2、半數抑制濃度(IC_{50})算法

3.3.3 總多酚含量分析

■ 沒食子酸標準曲線

參考 Kujala 等人之測定方法並稍作修改(Kujala et al., 2000)。

取 500 μL Folin-Ciocalteu 試劑 (1 N) 加入等量不同濃度的沒食子酸於微量離心管中，混合均勻並靜置 5 分鐘後，添加 1 mL 20% Na_2CO_3 靜置 10 分鐘，以離心方式 (150 g, 8 分鐘) 將沉澱物與溶液分離。將離心好的萃取液取上層之澄清液，裝入塑膠針筒，再以 0.45 μm 針筒過濾器進行過濾。以 ELISA Reader 測其波長 730 nm 之吸光值，根據此吸光值與沒食子酸濃度之關係求出標準曲線之迴歸式，如圖 8。

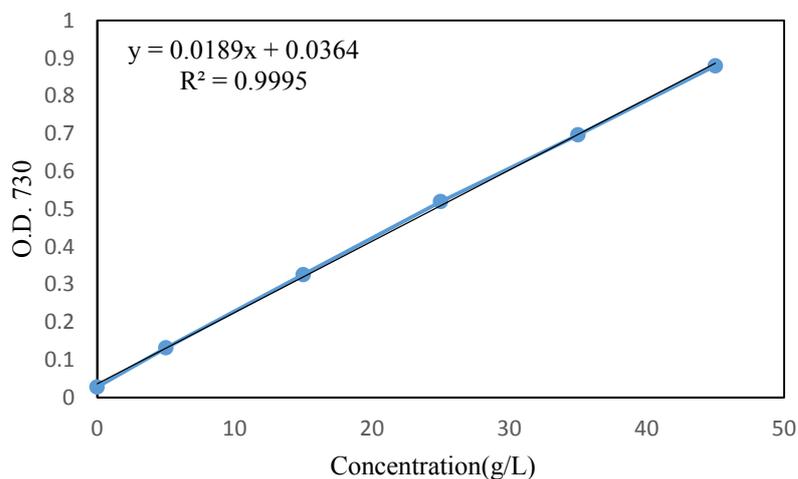


圖 8、沒食子酸之標準曲線

■ 實驗步驟

野生植物萃取物取代標準品 (沒食子酸)，並依照相同方式進行反應與吸光值測量。將樣品吸光值代入上述迴歸式即可算出每克萃取物中所含沒食子酸相對量 (Gallic acid equivalent, GAE)，並以此表示野生植物萃取物中酚類化合物的總量。

3.3.4 體外酪胺酸酶活性抑制試驗

參考 Baurin 等人與黃亦昕之測定方法並稍作修改(Baurin et al., 2002)、(黃亦昕, 2014)。

■ 磷酸緩衝溶液(PBS)配法

取 2.266 g KH_2PO_4 與 2.366 g Na_2HPO_4 加水定量到 100 mL，pH 值調至 6.8，放入 4 °C 環境下保存備用

■ 0.03% 酪胺酸配法

0.03 g 酪胺酸，加 PBS 定量至 100 mL，離心後取上清液備用

■ 酪胺酸酶配法

依照藥品罐上的 Unit，使用 PBS 做調配，算出實驗所需的 Unit。

實驗步驟：

- A. 待測樣品 500 μL 加上 PBS 500 μL 混合後備用
- B. 分成樣品組與空白組
- C. 樣品組(Sample 475 nm)為 900 μL 的酪胺酸加混合過的樣品取 100 μL 加酪胺酸酶 350 U
- D. 空白組為(Control 475 nm)為 1,000 μL 的酪胺酸加酪胺酸酶 350 U
- E. 配置好後放置 37°C 的超音波震盪水浴槽反應 30 分鐘
- F. 30 分鐘後放置於 25°C 的恆溫水浴槽放置 5 分鐘
- G. 放至 ELISA reader 在 OD 475 nm 測定吸光值

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = \frac{\text{Control 475 nm} - \text{Sample 475 nm}}{\text{Control 475 nm}} \times 100\%$$

公式 3、酪胺酸酶抑制率

3.3.5 菌株培養

■ 培養基配法

參考財團法人食品工業發展研究所的 medium NO.1 配法
(<https://goo.gl/5ox6fB>)

Mannitol Agar

yeast extract 5.0 g/L

distilled water 1.0 L

mannitol 25.0 g/L

peptone 3.0 g/L

agar 15.0 g/L

SH 培養基配法(Lin et al., 2012)

sodium hydrogen phosphate 5.1 g/L

yeast extract 5.0 g/L

peptone 5.0 g/L

glucose 20.0 g/L

citric acid 5.0 g/L

YPD 培養基配法(Lin et al., 2012)

yeast extract 5.0 g/L

peptone 5.0 g/L

glucose 20.0 g/L

KL 培養基配法(Lin et al., 2012)

sodium acetate trihydrate 6.8 g/L

yeast extract 5.0 g/L

peptone 5.0 g/L

glucose 20.0 g/L

acetic acid 3.0 g/L

■ 醋酸菌活化

將從財團法人食品工業發展研究所購買的醋酸菌菌粉—*Acetobacter* sp. (BCRC 14156)、*Acetobacter pasteurianus* (BCRC 11569)、*Gluconacetobacter europaeus* (BCRC 14148)凍乾管用酒精燈加熱後，迅速用無菌水澆滴在高溫的凍乾管頂部，再用鑷子敲破凍乾管頂部龜裂處。夾出內管後取出內管的棉花塞，內管底部即為菌粉。

滴入 1 mL 的 Mannitol 液態培養基，使用 pipetman 使菌粉均勻混合並溶解。取出含有 Mannitol 液態培養基的螺旋試管與固態培養皿，滴入 0.4 mL 已混合均勻的菌液，在精密型恆溫培養箱中以 26°C 培養 48 小時，完成菌種活化。

3.3.6 田口氏實驗

田口氏實驗利用直交表設計實驗與分析數據，可以同時研究多個可控因子，同時簡化及刪除許多統計設計的工作，快速地找出最適參數。使用直交表的目的是減少實驗次數，將各個影響因素與水準以直交排列方式組合，由於任兩因素組合出現次數相同，故受到其他因素的影響會被抵銷掉（黃華邦，2004）。

本研究列出有可能影響菌種生長的條件，考慮了一個兩水準的可控因子與七個三水準的可控因子($2^1 \times 3^7$)，如表 5。假設因子間無交互作用，即可使用 L_{18} 直交表，配置如表 6。

表 5、可控因子表

水準	因子名稱							
	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
1	粉狀	0	1	27	165	14156	3.5	SH
2	液狀	50	3	30	331	11569	4.5	YPD
3		100	5	33	497	14148	5.5	KL

表 6、L₁₈ 直交表配置

	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
1	粉狀	0	1	27	165	14156	3.5	SH
2	粉狀	0	3	30	331	11569	4.5	YPD
3	粉狀	0	5	33	497	14148	5.5	KL
4	粉狀	50	1	27	331	11569	5.5	KL
5	粉狀	50	3	30	497	14148	3.5	SH
6	粉狀	50	5	33	165	14156	4.5	YPD
7	粉狀	100	1	30	165	14148	4.5	KL
8	粉狀	100	3	33	331	14156	5.5	SH
9	粉狀	100	5	27	497	11569	3.5	YPD
10	液狀	0	1	33	497	11569	4.5	SH
11	液狀	0	3	27	165	14148	5.5	YPD
12	液狀	0	5	30	331	14156	3.5	KL
13	液狀	50	1	30	497	14156	5.5	YPD
14	液狀	50	3	33	165	11569	3.5	KL
15	液狀	50	5	27	331	14148	4.5	SH

16	液狀	100	1	33	331	14148	3.5	YPD
17	液狀	100	3	27	497	14156	4.5	KL
18	液狀	100	5	30	165	11569	5.5	SH

待田口氏實驗完成後，計算 S/N 得最佳參數後，微調單一影響最大因子，再次確認其為影響抗氧化與美白有效成分的效果。

S/N (Signal to Noise Ratio；訊號雜音比) 是用來衡量品質特性的一種指標，望大特性指的是 S/N 值越大代表此品質特性受外界干擾因素越小，及品質佳且穩定(Lin et al., 2012)。

$$S/N = -10 \cdot \log_{10} \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y^2} \right)$$

公式 4、訊號雜音比之望大特性算法

3.3.7 實驗數據分析

實驗數據以平均值±標準偏差(mean ± standard deviation)表示。實驗數據計算軟體使用 Microsoft Excel 2016，田口氏訊號雜音比使用 Minitab 16 統計軟體。

第四章 結果與討論

4.1 野生植物抗氧化試驗評估

於校園周邊摘採整株的野生植物，透過植物圖鑑（李幸祥，2009）辨識特徵後，挑選翠綠之植株。將摘採來的植株以清水將表面附著之泥沙清洗乾淨於室內風乾，確定植株表面乾燥後，將其放置於 50°C 烘箱中 1 小時後，乾燥後之植株以粉碎機打粉後於乾燥箱保存。

4.1.1 DPPH 清除率試驗

■ 不同萃取溫度下同一種野生植物的 DPPH 清除率

實驗條件將萃取水溫分成 25°C、60°C、100°C，實驗樣品為以下六種野生植物：含羞草、大花咸豐草、魚腥草、牛筋草、兔兒草、紫花霍香薊。利用 DPPH 清除率試驗，評估野生植物的抗氧化能力。

六種不同的野生植物對於 DPPH 的抑制率如圖 9 至圖 14 所示，以下分成不同萃取水溫與樣品濃度做討論：

(1) 不同萃取水溫：

不同溫度下，六種野生植物的最佳 DPPH 清除率與半數抑制濃度(IC₅₀)整理如表 7 所示。

含羞草最高 DPPH 清除率為 74.8 ± 4.9%，IC₅₀ 為 0.41 mg/mL，顯示含羞草於 25°C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。大花咸豐草最高 DPPH 清除率為 74.0 ± 3.0%，IC₅₀ 為 0.47 mg/mL，顯示大花咸豐草於 100 °C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。魚腥草最高 DPPH 清除率為 81.6 ± 4.0%，IC₅₀ 為 0.87 mg/mL，顯示魚腥草於 60 °C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。牛筋草最高 DPPH 清除率為 67.9 ± 6.8%，IC₅₀ 為 2.46 mg/mL，顯示牛筋草於 100 °C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。兔兒草最高 DPPH 清除率為 92.7 ± 6.7%，IC₅₀ 為 0.58 mg/mL，顯示兔兒草於 25°C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。紫花霍香薊最高 DPPH 清除率為 79.4 ± 6.6%，IC₅₀ 為 1.65 mg/mL，顯示紫花霍香薊於 100 °C 水溫中能達到最佳的 DPPH 清除率。

(2)樣品濃度：

同濃度不同溫度下，六種野生植物的最佳 DPPH 清除率整理如表 8 所示。以野生植物水萃液濃度 0.1 mg/mL 做比較，在野生植物水萃液濃度 0.1 mg/mL 時，含羞草可清除 $69.1 \pm 8.3\%$ 的 DPPH 自由基、大花咸豐草可清除 $37.5 \pm 5.6\%$ 的 DPPH 自由基、魚腥草可清除 $75.4 \pm 6.1\%$ 的 DPPH 自由基、牛筋草可清除 $14.1 \pm 8.1\%$ 的 DPPH 自由基、兔兒草可清除 $92.7 \pm 6.7\%$ 的 DPPH 自由基、紫花霍香薊可清除 $15.7 \pm 8.2\%$ 的 DPPH 自由基。

與前人研究相比，Tian 等人利用 80°C 水萃取魚腥草，DPPH 清除率為 59.1%，而本研究魚腥草以 60°C 水萃取，DPPH 清除率為 $81.6 \pm 4.0\%$ ，兩者清除率相差約 1.4 倍，推測魚腥草在水溫 60°C 時能釋放較多清除 DPPH 自由基的物質(Tian et al., 2011)。

含羞草透過 95%乙醇萃取時，DPPH 清除率為 40%，本研究將含羞草經 25°C 水萃後，DPPH 清除率為 $74.8 \pm 4.9\%$ ，比 95%乙醇萃取時約提升 1.8 倍，推測含羞草於萃取溶劑為水時較能釋放清除 DPPH 自由基的物質(Zhang et al., 2011)。

紫花霍香薊透過甲醇萃取之 DPPH 清除率為 $82.6 \pm 8.9\%$ ，而本研究透過 100°C 水溫萃取，DPPH 清除率為 $79.9 \pm 6.6\%$ ，比甲醇萃取時約降低 2.7%，推測紫花霍香薊以有機溶劑萃取時較能釋放清除 DPPH 自由基的物質(Tennyson et al., 2012)。

綜整以上，不同溫度下六種野生植物最佳的 DPPH 清除率整理如表 9 所示。適合用 25°C 萃取的物種為兔兒草，最高可達 $92.7 \pm 6.7\%$ 抑制率；適合用 60°C 萃取的物種為魚腥草，最高可達 $81.6 \pm 4.0\%$ 抑制率；適合用 100°C 萃取的物種為紫花霍香薊，最高可達 $79.4 \pm 6.6\%$ 抑制率。

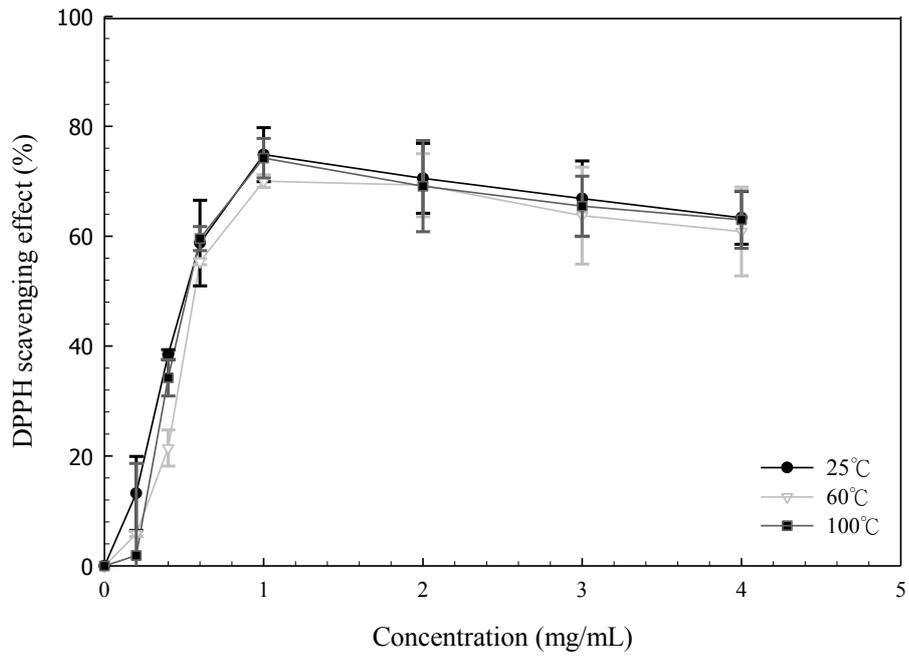


圖 9、含羞草在不同溫度下 DPPH 清除率

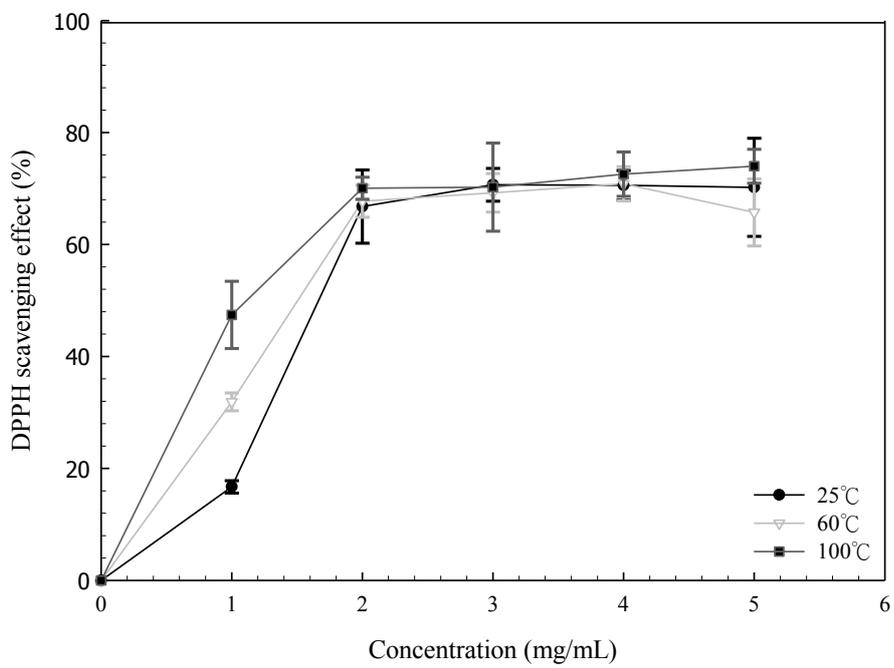


圖 10、大花咸豐草在不同溫度下 DPPH 清除率

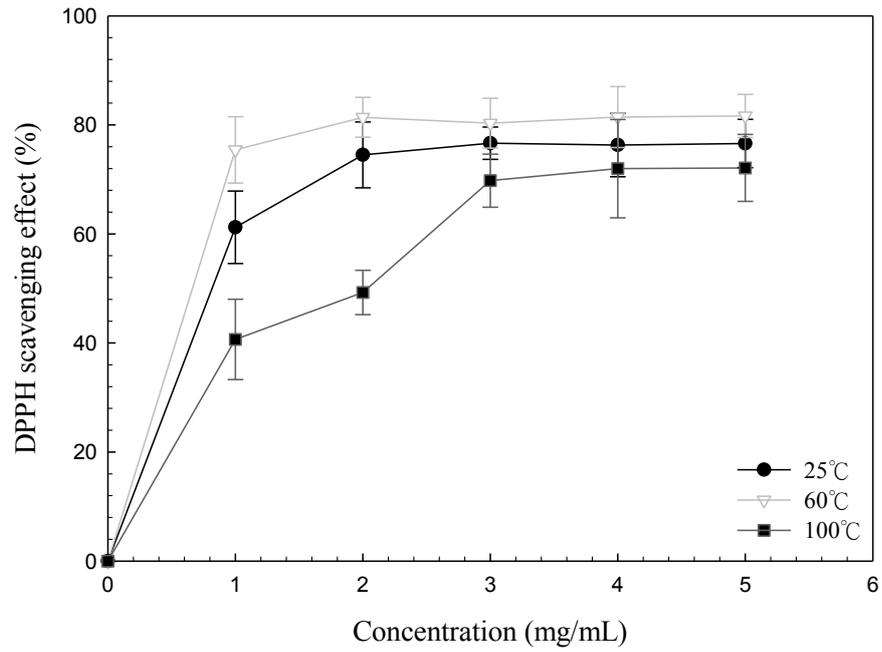


圖 11、魚腥草在不同溫度下 DPPH 清除率

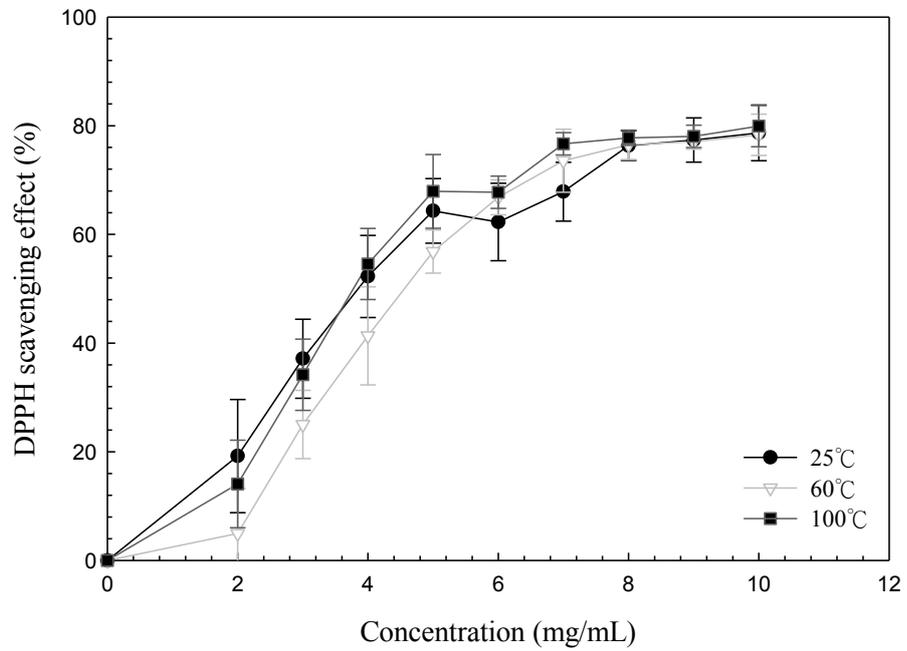


圖 12、牛筋草在不同溫度下 DPPH 清除率

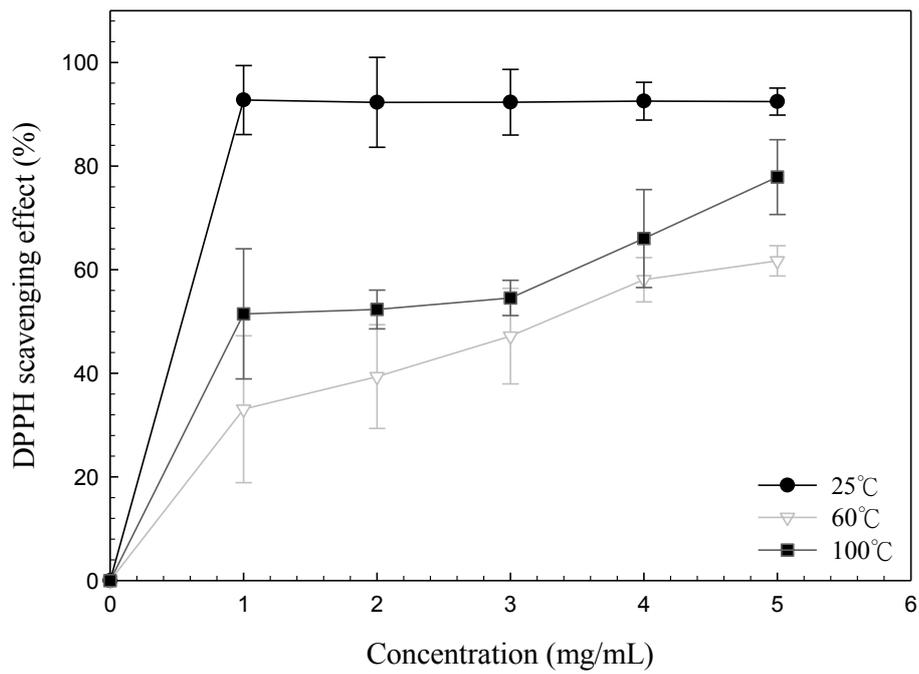


圖 13、兔兒草在不同溫度下 DPPH 清除率

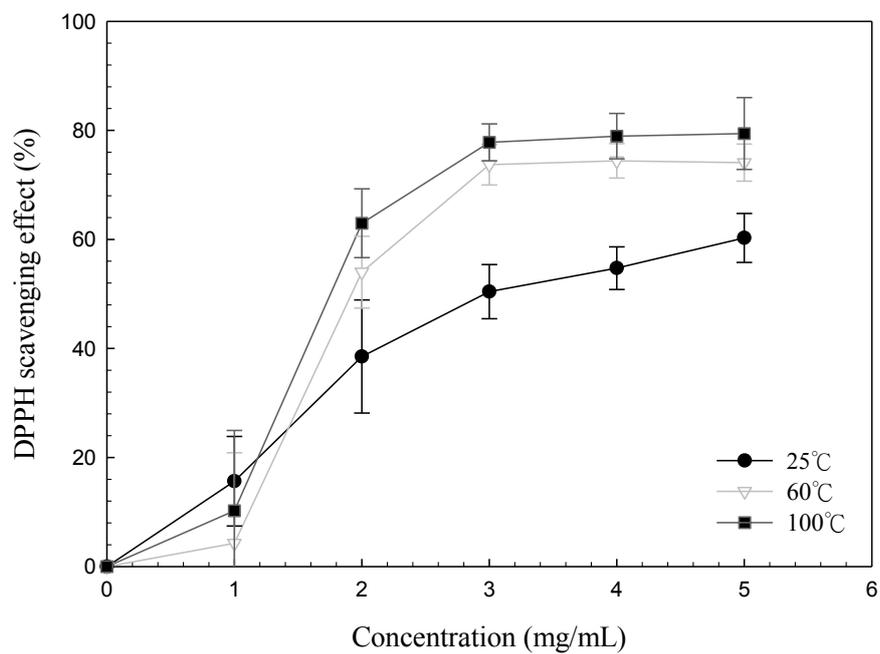


圖 14、紫花霍香薷在不同溫度下 DPPH 清除率

表 7、不同溫度下各物種 DPPH 清除率與半數抑制濃度(IC₅₀)

野生常見植物名	代號	溫度	DPPH 清除率(%)	IC ₅₀ (mg/mL)
含羞草 (<i>Mimosa pudica</i> Linn.)	MI	25°C	74.8 ± 4.9%	0.41
		60°C	69.3 ± 5.7%	0.46
		100°C	69.1 ± 8.3%	0.40
大花咸豐草 (<i>Bidens pilosa</i> Linn.)	BI	25°C	70.6 ± 2.6%	1.71
		60°C	70.9 ± 3.0%	1.55
		100°C	74.0 ± 3.0%	0.47
魚腥草 (<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.)	HO	25°C	76.6 ± 3.0%	1.79
		60°C	81.6 ± 4.0%	0.87
		100°C	72.0 ± 9.0%	2.24
牛筋草 (<i>Eleusineindica</i> (L.) Gaertn)	EI	25°C	64.3 ± 5.9%	2.09
		60°C	66.8 ± 3.2%	2.94
		100°C	67.9 ± 6.8%	2.46
兔兒草 (<i>Ixeris chinensis</i> Thunb.)	IX	25°C	92.7 ± 6.7%	0.58
		60°C	61.7 ± 2.9%	3.29
		100°C	77.9 ± 7.2%	4.15
紫花霍香薷 (<i>Ageratum houstonianum</i> Mill.)	AG	25°C	60.3 ± 4.5%	1.06
		60°C	74.4 ± 3.2%	1.82
		100°C	79.4 ± 6.6%	1.65

表 8、同濃度不同溫度下各物種的 DPPH 清除率

濃度(mg/mL)	溫度	野生常見植物名	DPPH 清除率(%)
0.1	25°C	兔兒草	92.7 ± 6.7%
	60°C	魚腥草	75.4 ± 6.1%
	100°C	含羞草	69.1 ± 8.3%
0.2	25°C	兔兒草	92.3 ± 0.8%
	60°C	魚腥草	81.4 ± 3.7%
	100°C	大花咸豐草	70.0 ± 2.0%
0.3	25°C	兔兒草	92.3 ± 6.3%
	60°C	魚腥草	80.3 ± 4.6%
	100°C	紫花霍香薊	77.8 ± 3.4%
0.4	25°C	兔兒草	92.5 ± 3.6%
	60°C	魚腥草	81.5 ± 5.6%
	100°C	紫花霍香薊	78.9 ± 4.2%
0.5	25°C	兔兒草	92.4 ± 2.6%
	60°C	魚腥草	81.6 ± 4.0%
	100°C	紫花霍香薊	79.4 ± 6.6%

表 9、不同溫度下各物種的最佳 DPPH 清除率

溫度	野生常見植物名	DPPH 清除率
25°C	兔兒草	92.7 ± 6.7%
60°C	魚腥草	81.6 ± 4.0%
100°C	紫花霍香薊	79.4 ± 6.6%

■ 不同種野生植物在同一溫度中最佳的 DPPH 清除率

六種野生植物在不同萃取溫度中，最佳的 DPPH 清除率於圖 15 至圖 17 所示，sample 1-6 分別為含羞草(MI)、牛筋草(EI)、大花咸豐草(BI)、魚腥草(HO)、兔兒草(IX)、紫花霍香薊(AG)。

在 25°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的 DPPH 之物種為兔兒草，可抑制 $92.7 \pm 6.7\%$ 的 DPPH，其次為魚腥草，可抑制 $76.6 \pm 3.0\%$ 的 DPPH。在 60°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的 DPPH 之物種為魚腥草，可抑制 $81.6 \pm 4.0\%$ 的 DPPH，其次為紫花霍香薊，可抑制 $74.4 \pm 3.2\%$ 的 DPPH。在 100°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的 DPPH 之物種為紫花霍香薊，可抑制 $79.4 \pm 6.6\%$ 的 DPPH，其次為兔兒草，可抑制 $77.9 \pm 7.2\%$ 的 DPPH。

綜整以上，六種野生植物於不同萃取溫度下最佳的 DPPH 清除率整理如圖 18 所示。適合 25°C 萃取的物種為含羞草、兔兒草，適合 60°C 水溫萃取為魚腥草，適合 100°C 水溫萃取為大花咸豐草、牛筋草、紫花霍香薊。推測含羞草與兔兒草在高溫萃取時，高溫可能會破壞含羞草與兔兒草能清除 DPPH 的物質，導致 DPPH 清除率降低。而魚腥草、大花咸豐草、牛筋草、紫花霍香薊在高溫時反而能使清除 DPPH 的成分提升，提高 DPPH 的清除率。

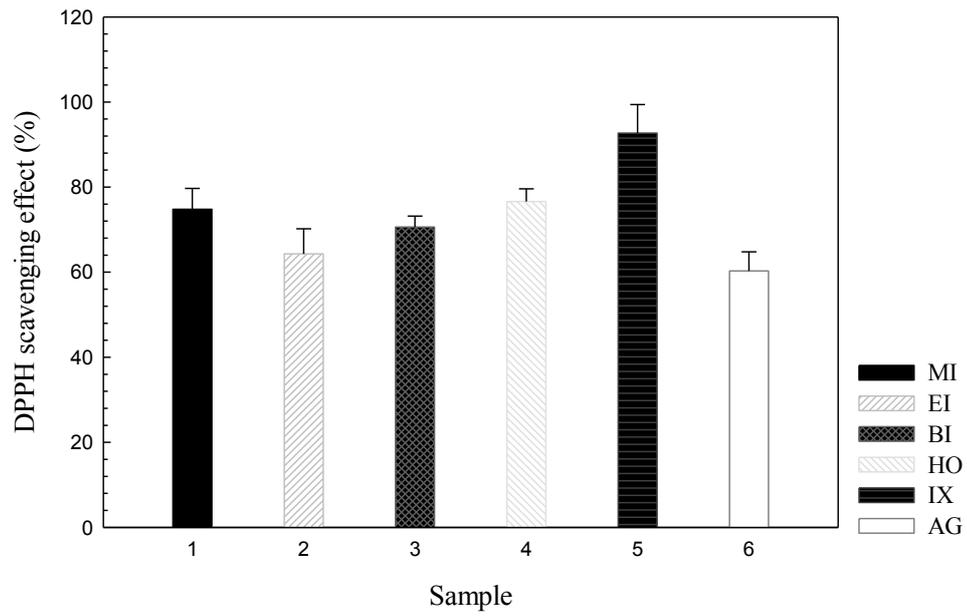


圖 15、25°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率

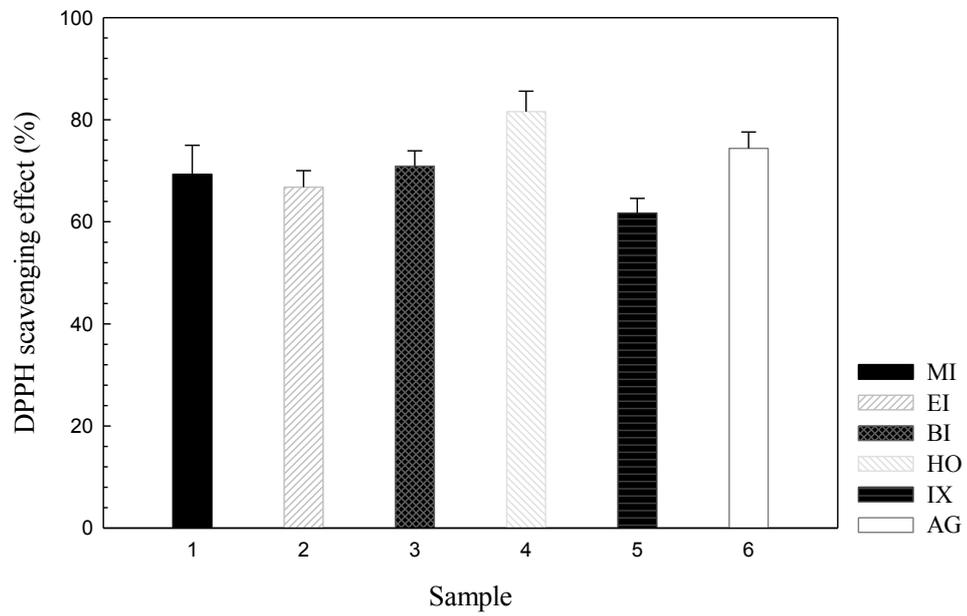


圖 16、60°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率

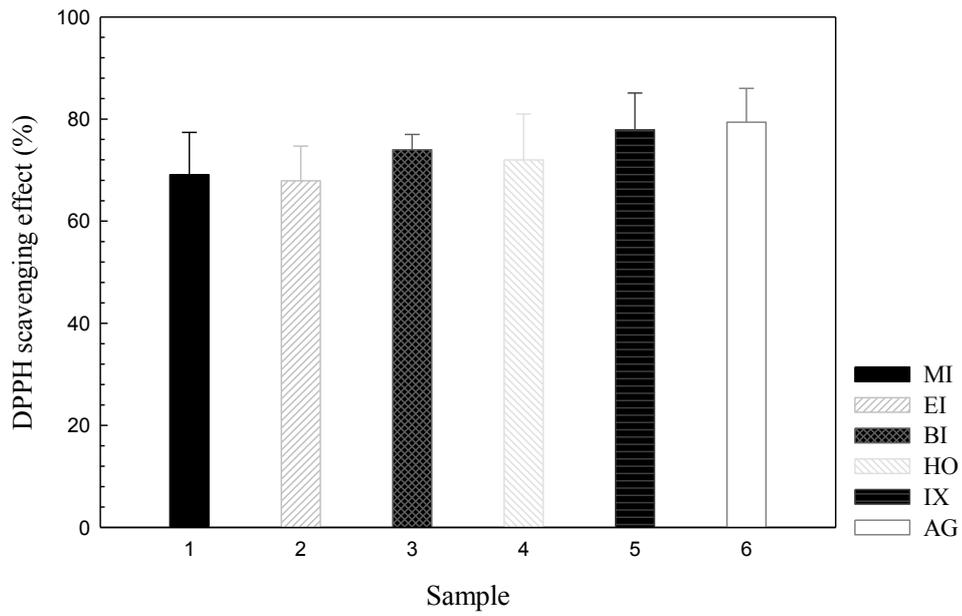


圖 17、100°C 下不同種野生植物的最佳 DPPH 清除率

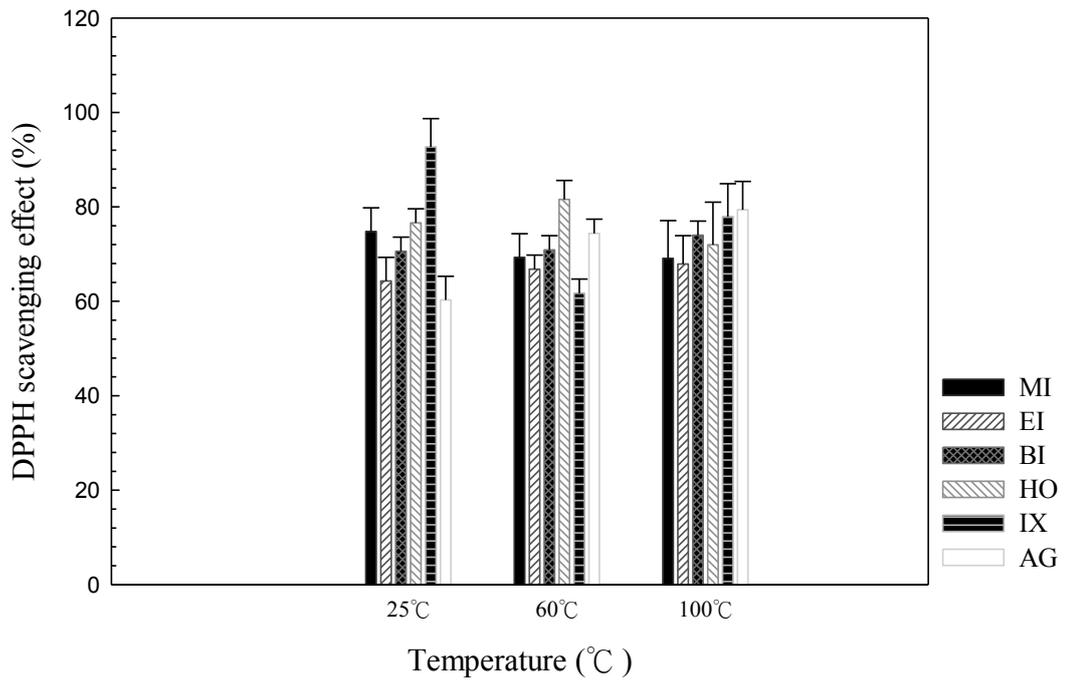


圖 18、不同的野生植物在不同溫度中最佳的 DPPH 清除率

4.1.2 總多酚試驗

■ 不同萃取溫度下同一種野生植物的總多酚含量

實驗條件將萃取水溫分成 25°C、60°C、100°C，實驗樣品為以下六種野生植物：含羞草、大花咸豐草、魚腥草、牛筋草、兔兒草、紫花霍香薊。利用總多酚試驗，評估野生植物的抗氧化能力。

六種不同的野生植物總多酚的含量如圖 19 至圖 24 所示，以下分成不同萃取水溫與樣品濃度做討論：

(1)不同萃取水溫：

不同溫度下，六種野生植物的平均總多酚含量整理如表 10 所示。含羞草平均總多酚含量為 83.9 ± 0.9 mg-GAE/g-dw，顯示含羞草於 100°C 水溫中總多酚含量能達到最高。大花咸豐草平均總多酚含量為 56.8 ± 0.6 mg-GAE/g-dw，顯示大花咸豐草於 100°C 水溫中總多酚含量能達到最高。魚腥草平均總多酚含量為 102.6 ± 3.5 mg-GAE/g-dw，顯示魚腥草於 100°C 水溫中總多酚含量能達到最高。牛筋草平均總多酚含量為 18.9 ± 0.1 mg-GAE/g-dw，顯示牛筋草於 100°C 水溫中總多酚含量能達到最高。兔兒草平均總多酚含量為 73.2 ± 1.8 mg-GAE/g-dw，顯示兔兒草於 60°C 水溫中總多酚含量能達到最高。紫花霍香薊平均總多酚含量為 66.7 ± 0.7 mg-GAE/g-dw，顯示紫花霍香薊於 100°C 總多酚含量能達到最高。

(2)樣品濃度：

同濃度不同溫度下，六種野生植物的平均總多酚含量整理如表 11 所示。以野生植物水萃液濃度 0.0125 mg/mL 做比較，在野生植物水萃液濃度 0.0125 mg/mL 時，含羞草含有 90.0 ± 5.6 mg-GAE/g-dw 的總多酚、大花咸豐草含有 14.3 ± 5.2 mg-GAE/g-dw 的總多酚、魚腥草含有 60.4 ± 6.1 mg-GAE/g-dw 的總多酚、兔兒草含有 34.1 ± 3.8 mg-GAE/g-dw 的總多酚、紫花霍香薊含有 $36.9\% \pm 0.01$ mg-GAE/g-dw 的總多酚。

與前人研究相比，Tian 等人利用 80°C 水溫萃取魚腥草，總多酚含量為 0.037 mg-GAE/g-dw，而本研究魚腥草以 60°C 水萃取，總多酚含量為 84.9 ± 0.6 mg-GAE/g-dw，比 80°C 水溫萃取時約提升了 84.8 mg-GAE/g-dw，推測魚腥草以水溫 60°C 萃取時能釋放較多總多酚化合物(Tian et al., 2011)。

含羞草透過 95% 乙醇萃取時，總多酚含量為 2.55 ± 0.33 mg-GAE/g-dw，本研究將含羞草經 25°C 水萃後，總多酚含量為 81.9 ± 3.3 mg-GAE/g-dw，比 95% 乙醇萃取時約提升 32 倍，推測含羞草於萃取溶劑為水時較能釋放總多酚化合物(Zhang et al., 2011)。

綜整以上，不同溫度下六種野生植物平均總多酚含量整理如表 12 所示。適合用 25°C 萃取的物種為含羞草，總多酚含量最高可達 81.9 ± 3.3 mg-GAE/g-dw；適合用 60°C 萃取的物種為魚腥草，總多酚含量最高可達 84.9 ± 0.6 mg-GAE/g-dw；適合用 100°C 萃取的物種為魚腥草，總多酚含量最高可達 102.6 ± 3.5 mg-GAE/g-dw。

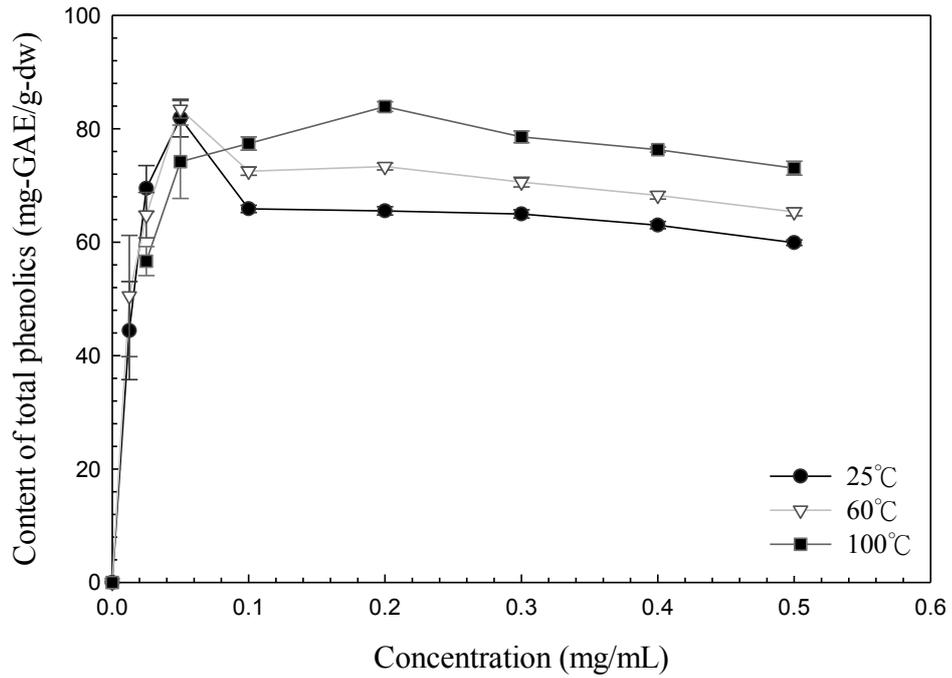


圖 19、含羞草在不同溫度下總多酚之含量

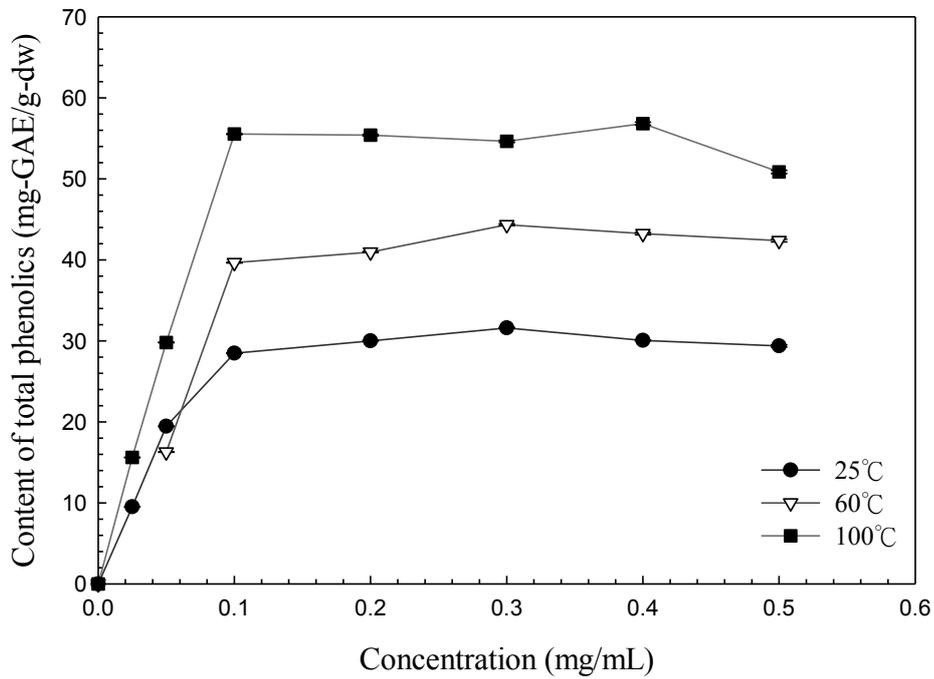


圖 20、大花咸豐草在不同溫度下總多酚之含量

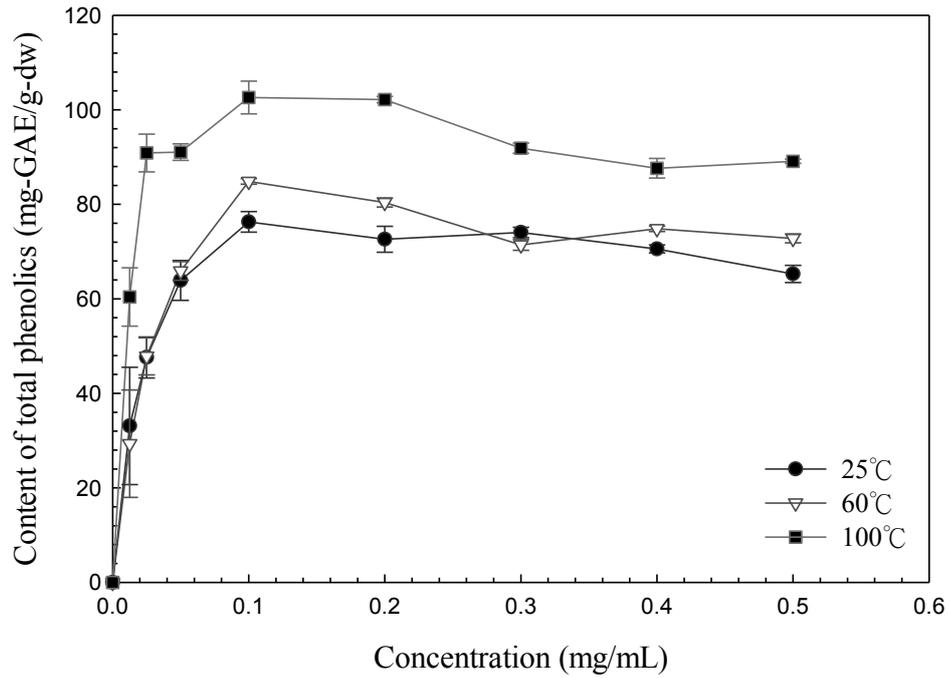


圖 21、魚腥草在不同溫度下總多酚之含量

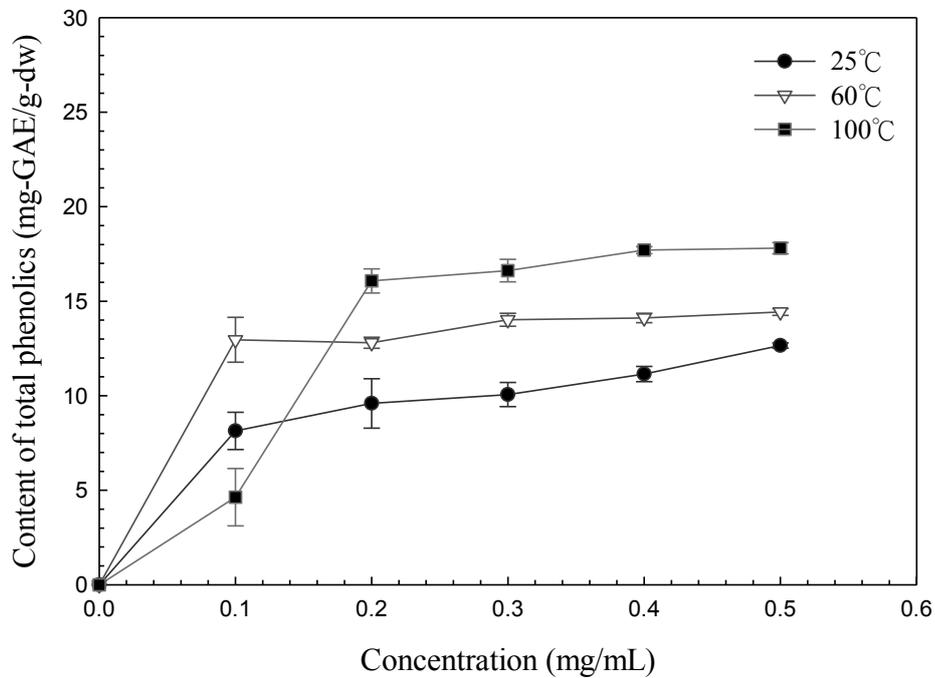


圖 22、牛筋草在不同溫度下總多酚之含量

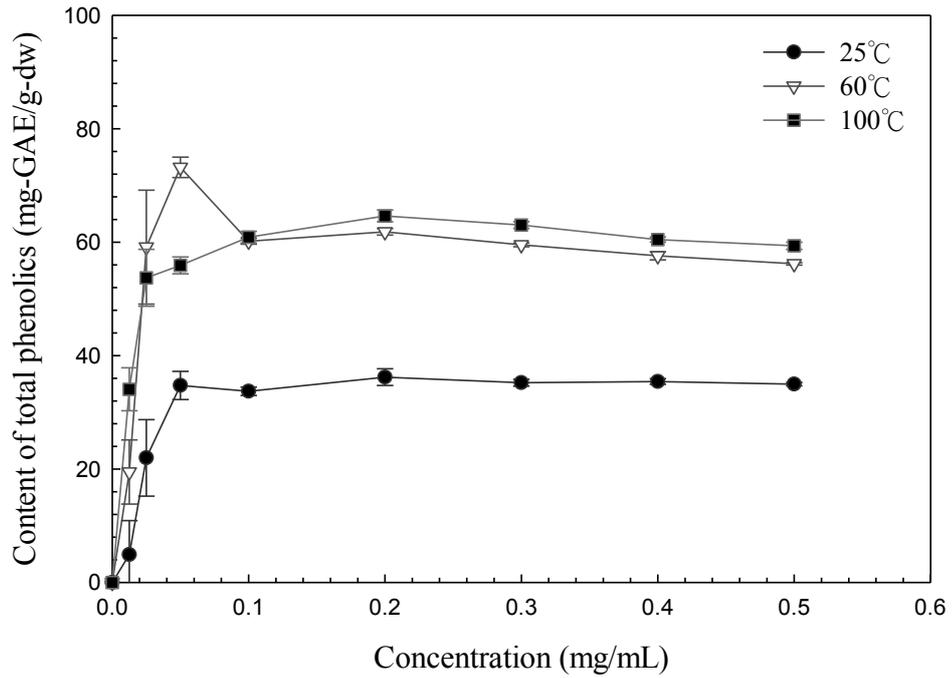


圖 23、兔兒草在不同溫度下總多酚之含量

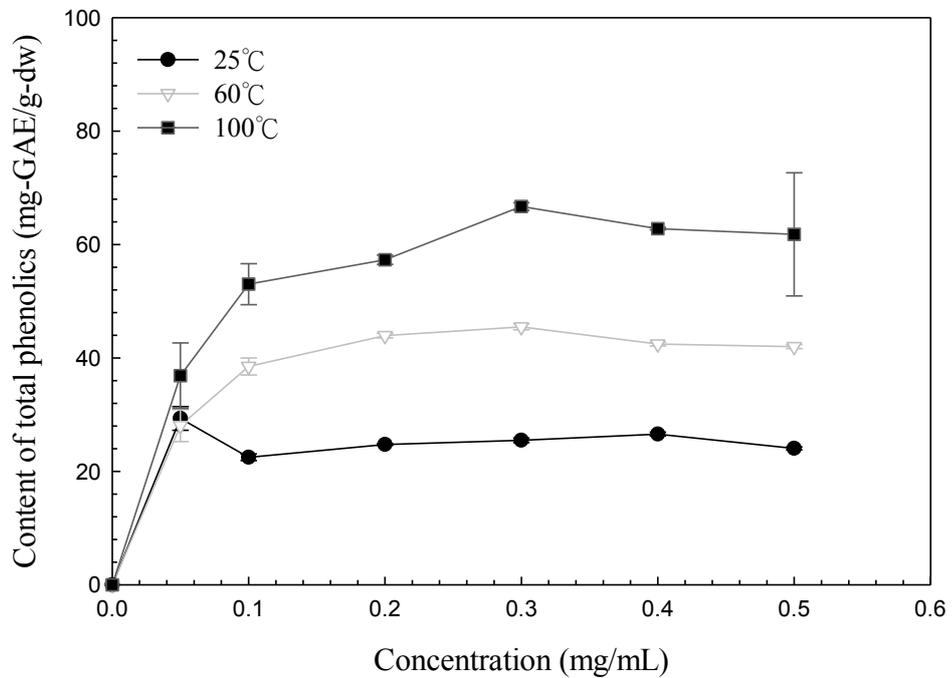


圖 24、紫花霍香薊在不同溫度下總多酚之含量

表 10、不同溫度下各物種平均總多酚含量

野生常見植物名	代號	溫度	平均總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)
含羞草 (<i>Mimosa pudica</i> Linn.)	MI	25°C	81.9 ± 3.3
		60°C	83.4 ± 1.5
		100°C	83.9 ± 0.9
大花咸豐草 (<i>Bidens pilosa</i> Linn.)	BI	25°C	31.6 ± 2.5
		60°C	44.3 ± 2.5
		100°C	56.8 ± 0.6
魚腥草 (<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.)	HO	25°C	76.3 ± 2.2
		60°C	84.9 ± 0.6
		100°C	102.6 ± 3.5
牛筋草 (<i>Eleusineindica</i> (L.) Gaertn)	EI	25°C	12.7 ± 0.1
		60°C	14.4 ± 0.2
		100°C	18.9 ± 0.1
兔兒草 (<i>Ixeris chinensis</i> Thunb.)	IX	25°C	36.2 ± 1.5
		60°C	73.2 ± 1.8
		100°C	64.6 ± 1.0
紫花霍香薊 (<i>Ageratum houstonianum</i> Mill.)	AG	25°C	29.3 ± 2.1
		60°C	45.5 ± 0.5
		100°C	66.7 ± 0.7

表 11、同濃度不同溫度下各物種平均總多酚含量

濃度(mg/mL)	溫度	野生常見植物名	平均總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)
0.0125	25°C	含羞草	44.4 ± 8.6
	60°C	含羞草	50.5 ± 10.7
	100°C	魚腥草	60.4 ± 6.2
0.025	25°C	含羞草	69.5 ± 4.0
	60°C	含羞草	64.8 ± 4.0
	100°C	魚腥草	90.9 ± 4.0
0.05	25°C	含羞草	81.9 ± 3.3
	60°C	含羞草	83.4 ± 1.5
	100°C	魚腥草	91.1 ± 1.7
0.1	25°C	魚腥草	76.3 ± 2.2
	60°C	魚腥草	84.9 ± 0.6
	100°C	魚腥草	102.5 ± 3.5
0.2	25°C	魚腥草	72.6 ± 2.7
	60°C	魚腥草	80.4 ± 0.8
	100°C	魚腥草	102.2 ± 0.7
0.3	25°C	魚腥草	74.0 ± 1.1
	60°C	魚腥草	71.4 ± 1.1
	100°C	魚腥草	91.9 ± 1.1
0.4	25°C	魚腥草	70.6 ± 0.8
	60°C	魚腥草	74.8 ± 0.6
	100°C	魚腥草	87.6 ± 2.1
0.5	25°C	魚腥草	65.3 ± 1.8
	60°C	魚腥草	72.8 ± 0.9
	100°C	魚腥草	89.0 ± 0.4

表 12、不同溫度下各物種平均總多酚含量

溫度	野生常見植物名	平均總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)
25°C	含羞草	81.9 ± 3.3
60°C	魚腥草	84.9 ± 0.6
100°C	魚腥草	102.6 ± 3.5

■ 不同種野生植物在同一溫度的總多酚含量

六種野生植物在不同萃取溫度中，平均總多酚最高含量如圖 25 至圖 27 所示，sample 1-6 分別為含羞草(MI)、牛筋草(EI)、大花咸豐草(BI)、魚腥草(HO)、兔兒草(IX)、紫花霍香薊(AG)。

在 25°C 下萃取的野生植物中，具有最多總多酚之物種為含羞草，含有 81.9 ± 3.3 mg-GAE/g-dw 的總多酚，其次為魚腥草，含有 76.3 ± 2.2 mg-GAE/g-dw 的總多酚。在 60°C 下萃取的野生植物中，具有最多總多酚之物種為魚腥草，含有 84.9 ± 0.6 mg-GAE/g-dw 的總多酚，其次為含羞草，含有 83.4 ± 1.5 mg-GAE/g-dw 的總多酚。在 100°C 下萃取的野生植物中，具有最多總多酚之物種為魚腥草，含有 102.6 ± 3.5 mg-GAE/g-dw 的總多酚，其次為含羞草，含有 83.9 ± 0.9 mg-GAE/g-dw 的總多酚。

綜整以上，六種野生植物於不同萃取溫度下平均總多酚含量整理如圖 28 所示。適合 60°C 水溫萃植物種為兔兒草，適合 100°C 水溫萃植物種為含羞草、魚腥草、大花咸豐草、紫花霍香薊，推測高溫萃取會使野生植物釋放較多總多酚化合物。而牛筋草無論是透過 25°C、60°C、100°C 萃取，總多酚含量皆不高，估計牛筋草需另求其他水溫萃取或利用不同溶劑萃取，進而提升牛筋草內總多酚含量。

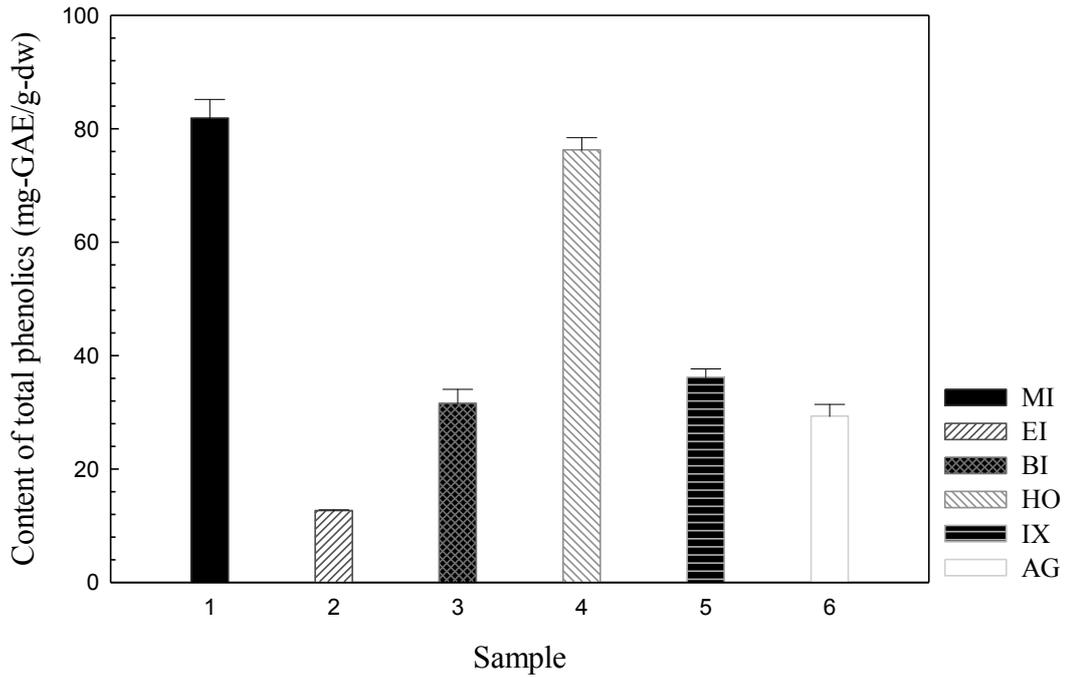


圖 25、25°C 下不同種野生植物平均總多酚含量

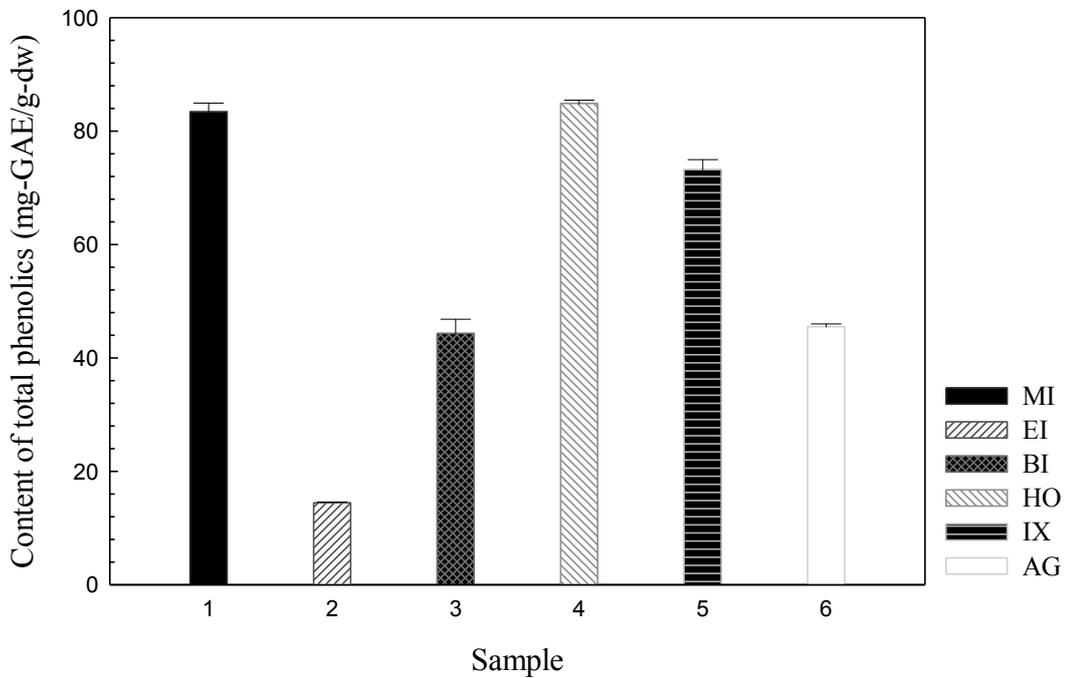


圖 26、60°C 下不同種野生植物平均總多酚含量

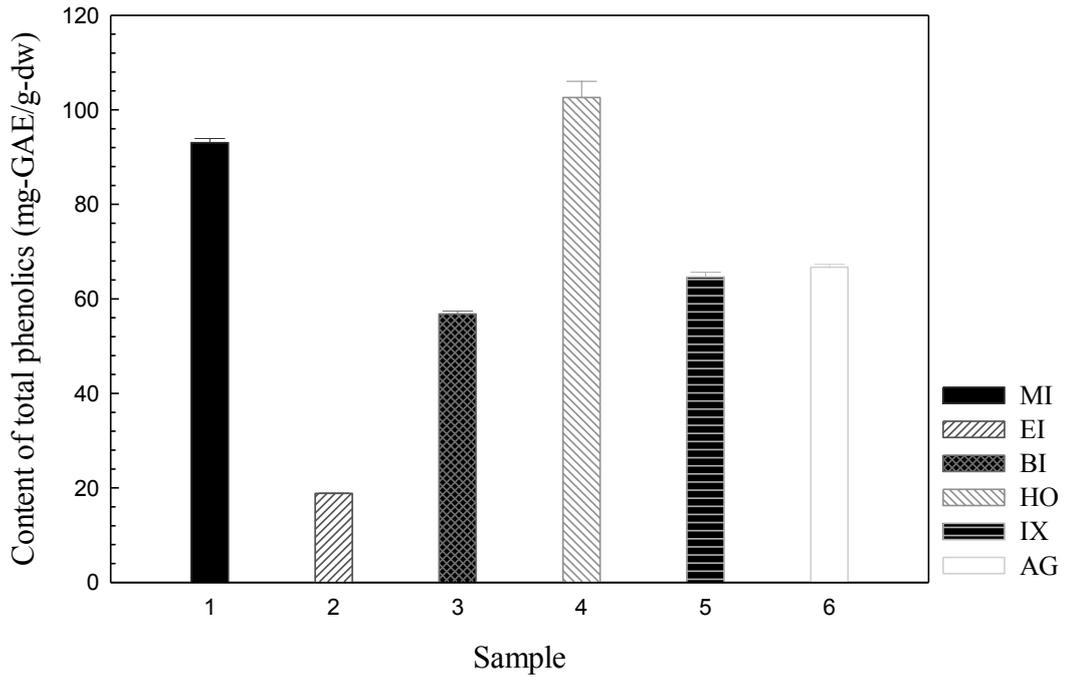


圖 27、100°C 下不同種野生植物平均總多酚含量

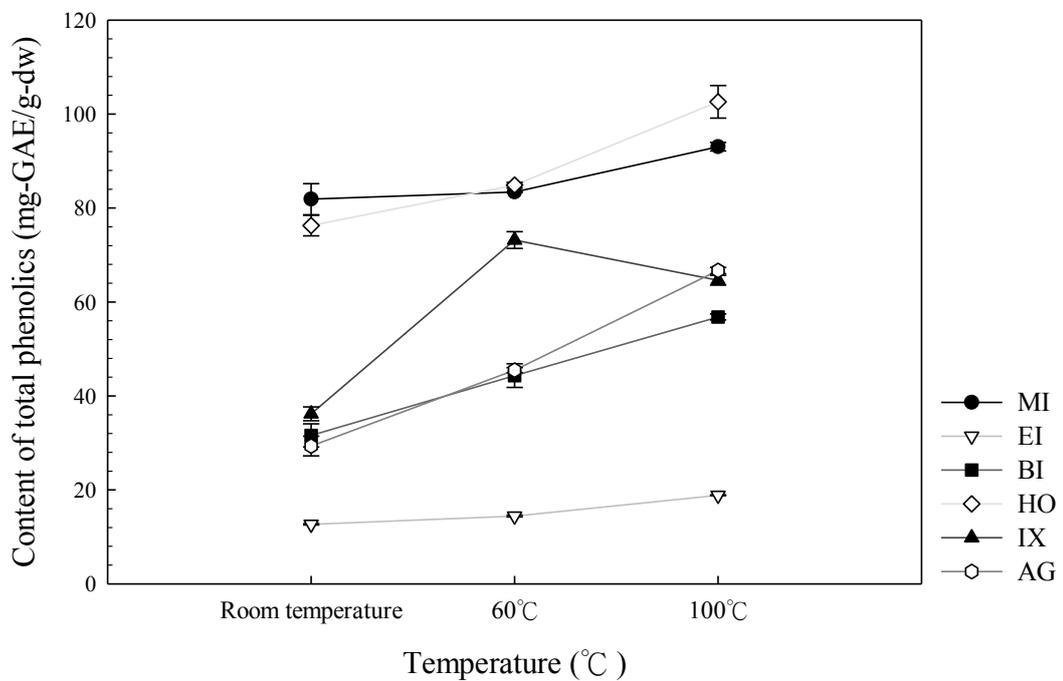


圖 28、不同的野生植物在不同溫度中平均總多酚含量

4.2 野生植物酪胺酸酶試驗評估

本研究實驗條件將萃取水溫分成 25°C、60°C、100°C，實驗樣品為以下六種野生植物：含羞草、大花咸豐草、魚腥草、牛筋草、兔兒草、紫花霍香薊。利用抑制酪胺酸酶試驗，評估野生植物的美白能力。

■ 不同萃取溫度下同一種野生植物的酪胺酸酶抑制率

六種不同的野生植物對於酪胺酸酶的抑制率如圖 29 至圖 34 所示，以下分成不同萃取水溫與樣品濃度做討論：

(1) 不同萃取水溫：

不同溫度下，六種野生植物酪胺酸酶的抑制率與半數抑制濃度(IC₅₀)整理如表 13 所示。

含羞草酪胺酸酶抑制率為 $74.5 \pm 0.6\%$ ，IC₅₀ 為 0.05 mg/mL，顯示含羞草於 25°C 水溫中能達到最佳的抑制率。大花咸豐草酪胺酸酶抑制率為 $74.7 \pm 1.1\%$ ，IC₅₀ 為 0.05 mg/mL，顯示大花咸豐草於 60 °C 水溫中能達到最佳的抑制率。魚腥草酪胺酸酶抑制率為 $76.6 \pm 2.2\%$ ，IC₅₀ 為 0.26 mg/mL，顯示魚腥草於 25°C 水溫中能達到最佳的抑制率。牛筋草酪胺酸酶抑制率為 $73.8 \pm 0.6\%$ ，IC₅₀ 為 0.33 mg/mL，顯示牛筋草於 25°C 水溫中能達到最佳的抑制率。兔兒草酪胺酸酶抑制率為 $72.6 \pm 0.6\%$ ，IC₅₀ 為 0.03 mg/mL，顯示兔兒草於 100°C 水溫中能達到最佳的抑制率。紫花霍香薊酪胺酸酶抑制率為 $72.3 \pm 0.4\%$ ，IC₅₀ 為 0.04 mg/mL，顯示紫花霍香薊於 60 °C 水溫中能達到最佳的抑制率。

(2) 樣品濃度：

同濃度不同溫度下，六種野生植物酪胺酸酶的抑制率整理如表 14 所示。以野生植物水萃液濃度 0.00625 mg/mL 做比較，在野生植物水萃液濃度 0.00625 mg/mL 時，含羞草可抑制 $74.5 \pm 0.6\%$ 的酪胺酸酶、大花咸豐草可抑制 $74.7 \pm 1.1\%$ 的酪胺酸酶、魚腥草可抑制 $72.7 \pm 0.1\%$ 的酪胺酸酶、牛筋草可抑制 $72.9 \pm 0.9\%$ 的酪胺酸酶、兔兒草可抑制 $71.9 \pm 0.3\%$ 的酪胺酸酶、紫花霍香薊可抑制 $72.6 \pm 0.1\%$ 的酪胺酸酶。

與前人研究相比，紫花霍香薊透過 95% 乙醇萃取之酪胺酸酶抑制率為 $6.5 \pm 8.2\%$ 。而本研究透過 25°C 水溫萃取，酪胺酸酶抑制率為 $71.3 \pm 0.5\%$ ，比 95% 乙醇萃取時約提升 64.8%，推測紫花霍香薊以 25°C 水溫萃取時較能釋放抑制酪胺酸酶的物質(Asad et al., 2011)。

Lee 研究指出，魚腥草透過 80% 乙醇萃取之酪胺酸酶抑制率為 $18.4 \pm 0.4\%$ ，而本研究透過 25°C 水溫萃取，酪胺酸酶抑制率為 $76.3 \pm 2.2\%$ ，比 80% 乙醇萃取時約提升 57.9%，推測魚腥草以 25°C 水溫萃取時較能釋放抑制酪胺酸酶的物質(Lee & Kim, 2007)。

綜整以上，不同溫度下六種野生植物最佳的酪胺酸酶抑制率整理如表 15 所示。適合用 25°C 萃取的物種為魚腥草，平均可達 $76.6 \pm 2.2\%$ 抑制率；適合用 60°C 萃取的物種為大花咸豐草，平均可達 $74.7 \pm 1.1\%$ 抑制率；適合用 100°C 萃取的物種為牛筋草，平均可達 $73.5 \pm 1.5\%$ 抑制率。

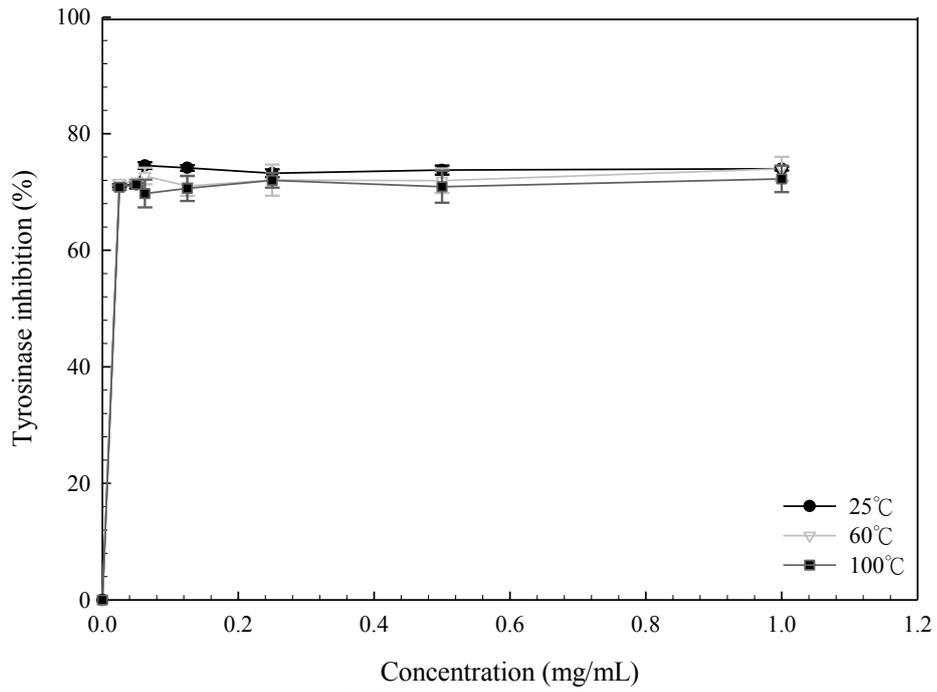


圖 29、含羞草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

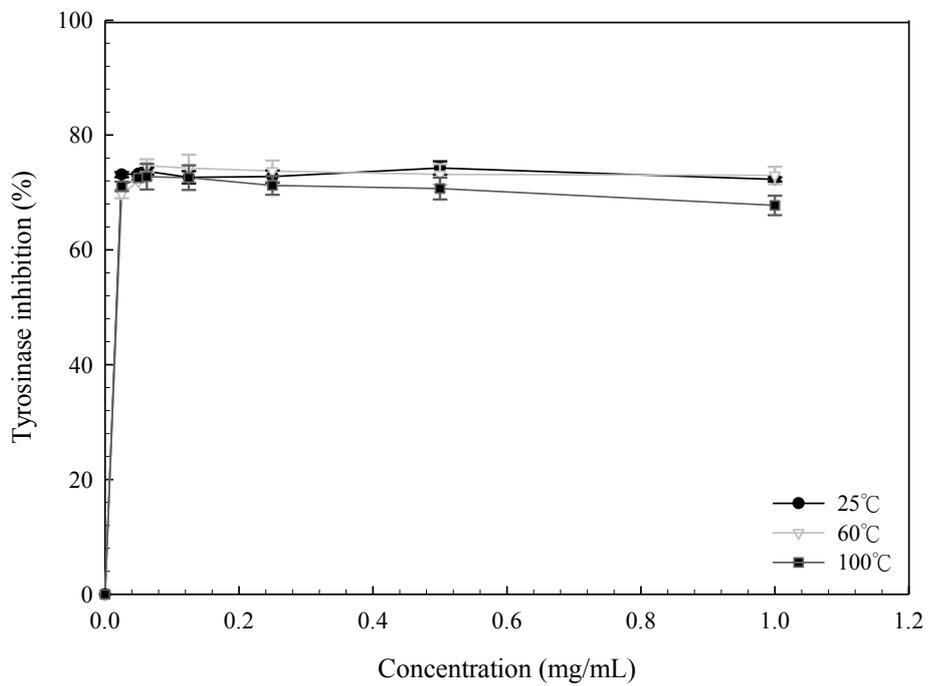


圖 30、大花咸豐草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

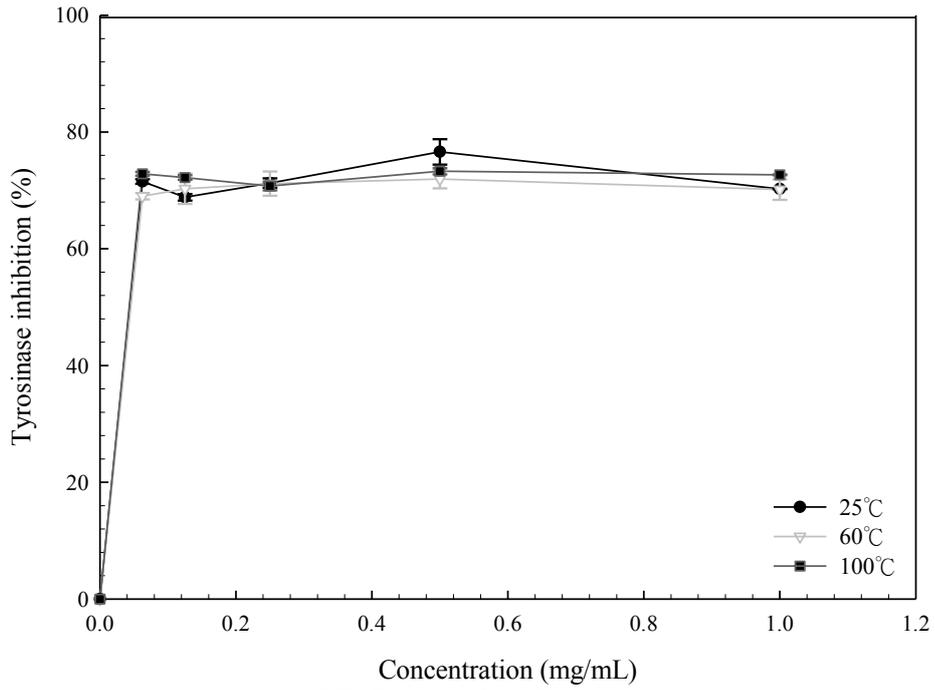


圖 31、魚腥草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

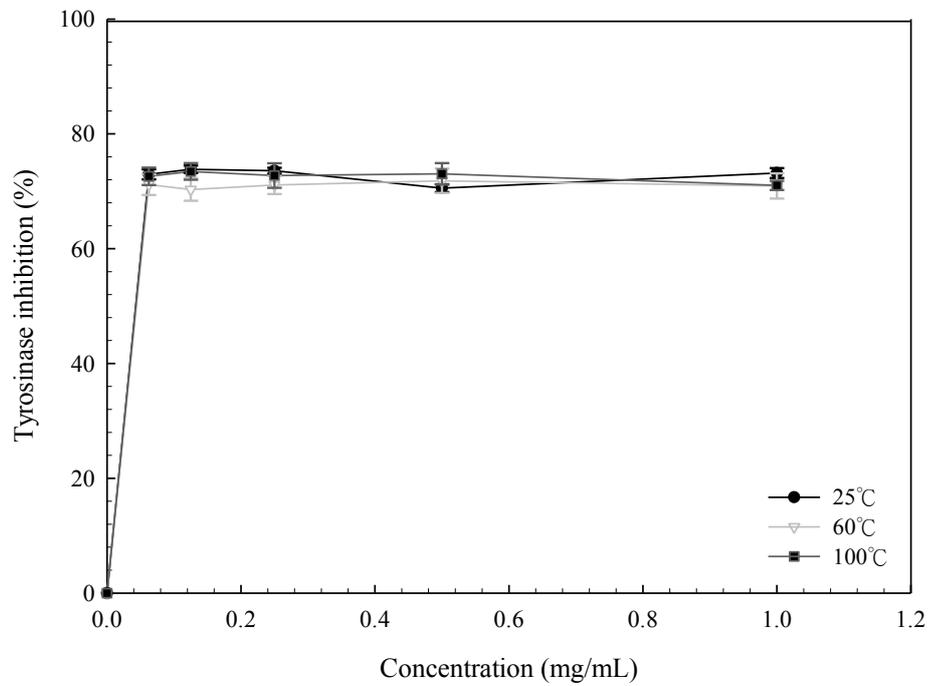


圖 32、牛筋草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

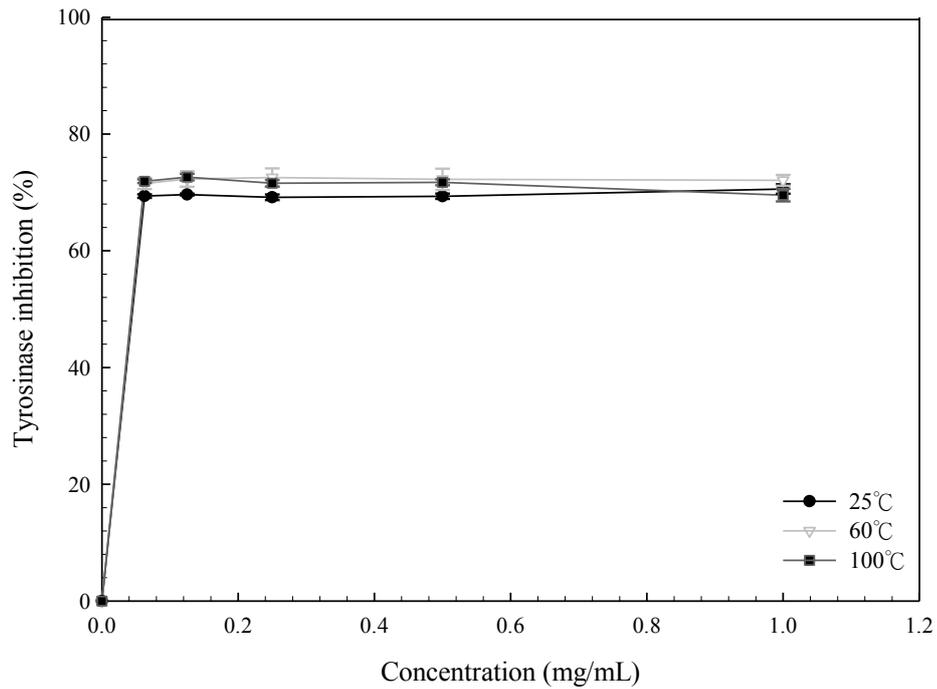


圖 33、兔兒草在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

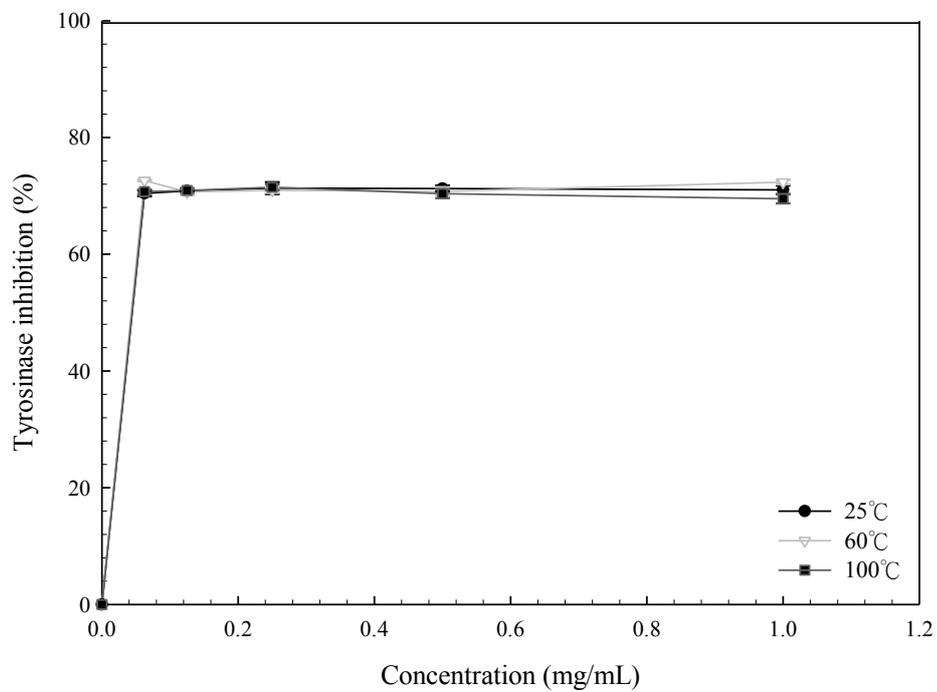


圖 34、紫花霍香薊在不同溫度下酪胺酸酶的抑制率

表 13、不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率與半數抑制濃度(IC₅₀)

野生常見植物名	代號	溫度(°C)	酪胺酸酶抑制率(%)	IC ₅₀ (mg/mL)
含羞草 (<i>Mimosa pudica</i> Linn.)	MI	25°C	74.5 ± 0.6%	0.05
		60°C	74.0 ± 2.0%	0.90
		100°C	72.2 ± 2.3%	0.16
大花咸豐草 (<i>Bidens pilosa</i> Linn.)	BI	25°C	74.3 ± 1.2%	0.10
		60°C	74.7 ± 1.1%	0.05
		100°C	72.7 ± 2.2%	1.20
魚腥草 (<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.)	HO	25°C	76.6 ± 2.2%	0.26
		60°C	71.9 ± 1.6%	0.12
		100°C	73.3 ± 0.5%	0.20
牛筋草 (<i>Eleusineindica</i> (L.)Gaertn)	EI	25°C	73.8 ± 0.6%	0.33
		60°C	71.8 ± 2.1%	0.24
		100°C	73.5 ± 1.5%	1.20
兔兒草 (<i>IXeris chinensis</i> Thunb.)	IX	25°C	70.6 ± 0.8%	1.40
		60°C	72.5 ± 1.6%	0.03
		100°C	72.6 ± 0.6%	1.08
紫花霍香薊 (<i>Ageratum houstonianum</i> Mill.)	AG	25°C	71.3 ± 0.5%	0.12
		60°C	72.3 ± 0.4%	0.04
		100°C	71.5 ± 0.5%	0.52

表 14、同濃度不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率

濃度(mg/mL)	溫度	野生常見植物名	酪胺酸酶抑制率(%)
0.0625	25°C	含羞草	74.5 ± 0.6%
	60°C	大花咸豐草	74.7 ± 1.1%
	100°C	魚腥草	72.7 ± 0.1%
0.0125	25°C	含羞草	74.1 ± 0.5%
	60°C	大花咸豐草	74.2 ± 2.4%
	100°C	牛筋草	73.5 ± 1.5%
0.25	25°C	牛筋草	73.6 ± 0.5%
	60°C	大花咸豐草	73.8 ± 1.8%
	100°C	牛筋草	72.7 ± 2.1%
0.5	25°C	魚腥草	76.6 ± 2.2%
	60°C	大花咸豐草	73.2 ± 1.8%
	100°C	魚腥草	73.3 ± 0.5%
1	25°C	含羞草	74.0 ± 0.3%
	60°C	含羞草	74.0 ± 2.0%
	100°C	魚腥草	72.7 ± 0.1%

表 15、不同溫度下各物種的酪胺酸酶抑制率

溫度	野生常見植物名	酪胺酸酶抑制率
25°C	魚腥草	76.6 ± 2.2%
60°C	大花咸豐草	74.7 ± 1.1%
100°C	牛筋草	73.5 ± 1.5%

■ 同一溫度下不同種野生植物最佳酪胺酸酶抑制率

六種野生植物在不同萃取溫度中，最佳的酪胺酸酶抑制率如圖 35 至圖 37 所示，sample 1-6 分別為含羞草(MI)、牛筋草(EI)、大花咸豐草(BI)、魚腥草(HO)、兔兒草(IX)、紫花霍香薊(AG)。

在 25°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的酪胺酸酶之物種為魚腥草，可抑制 $76.6 \pm 2.2\%$ 的酪胺酸酶，其次為含羞草，可抑制 $74.5 \pm 0.6\%$ 的酪胺酸酶。在 60°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的酪胺酸酶之物種為大花咸豐草，可抑制 $74.7 \pm 1.1\%$ 的酪胺酸酶，其次為含羞草，可抑制 $74.0 \pm 2.0\%$ 的酪胺酸酶。在 100°C 下萃取的野生植物中，能抑制較多的酪胺酸酶之物種為牛筋草，可抑制 $73.5 \pm 1.5\%$ 的酪胺酸酶，其次為魚腥草，可抑制 $73.3 \pm 0.5\%$ 的酪胺酸酶。

綜整以上，六種野生植物於不同萃取溫度下最佳的酪胺酸酶抑制率整理如圖 38 所示。適合 25°C 萃植物種為含羞草、兔兒草，適合 60°C 萃植物種為魚腥草，適合 100°C 萃植物種為大花咸豐草、牛筋草、紫花霍香薊。推測含羞草與兔兒草在高溫萃取時，高溫可能會破壞含羞草與兔兒草能抑制酪胺酸酶的物質，導致酪胺酸酶抑制率降低。而魚腥草、大花咸豐草、牛筋草、紫花霍香薊在高溫時反而能使抑制酪胺酸酶的成分提升，提高酪胺酸酶的抑制率。

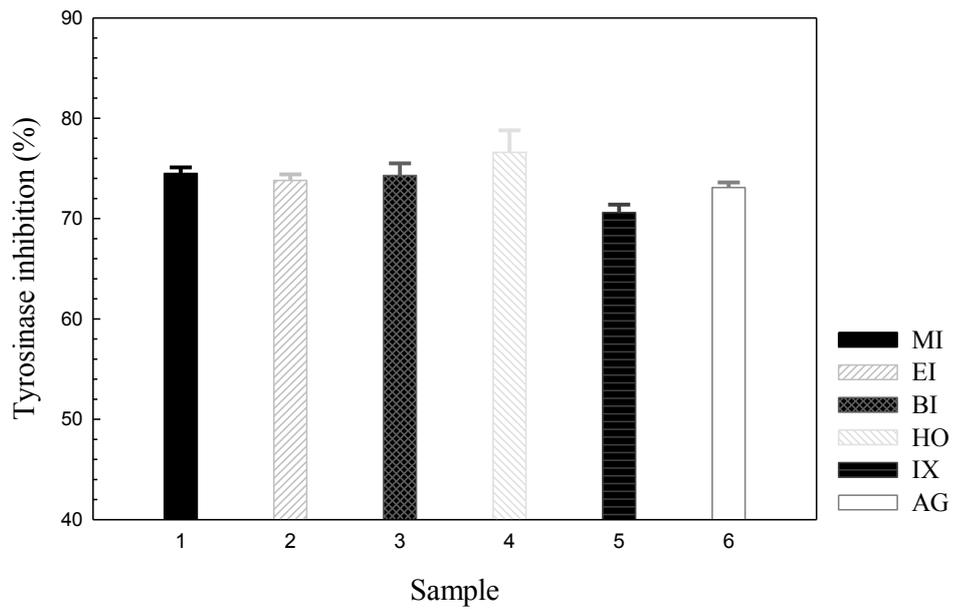


圖 35、25°C 下不同種野生植物的最佳酪胺酸酶抑制率

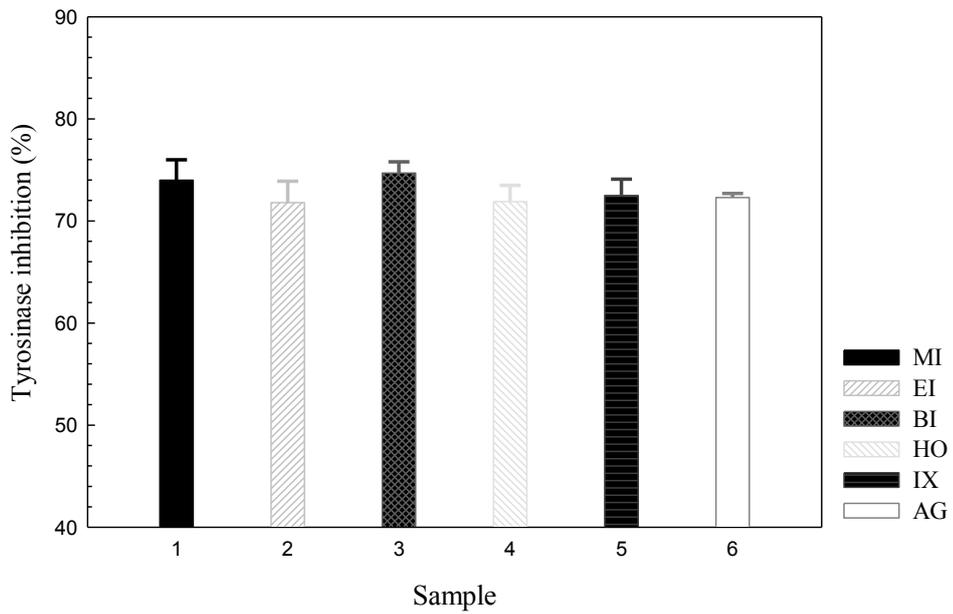


圖 36、60°C 下不同種野生植物最佳酪胺酸酶抑制率

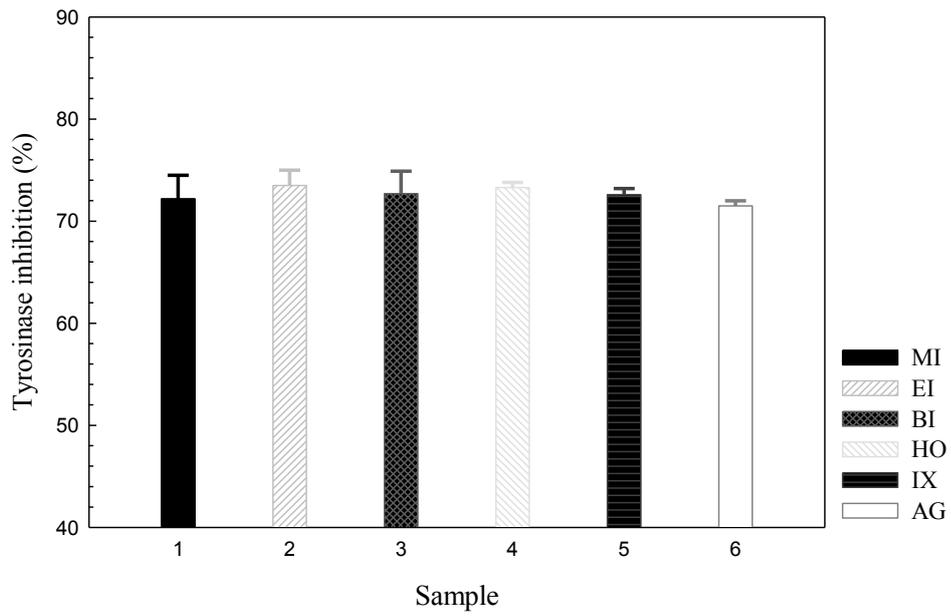


圖 37、100°C 下不同種野生植物的最佳酪胺酸酶抑制率

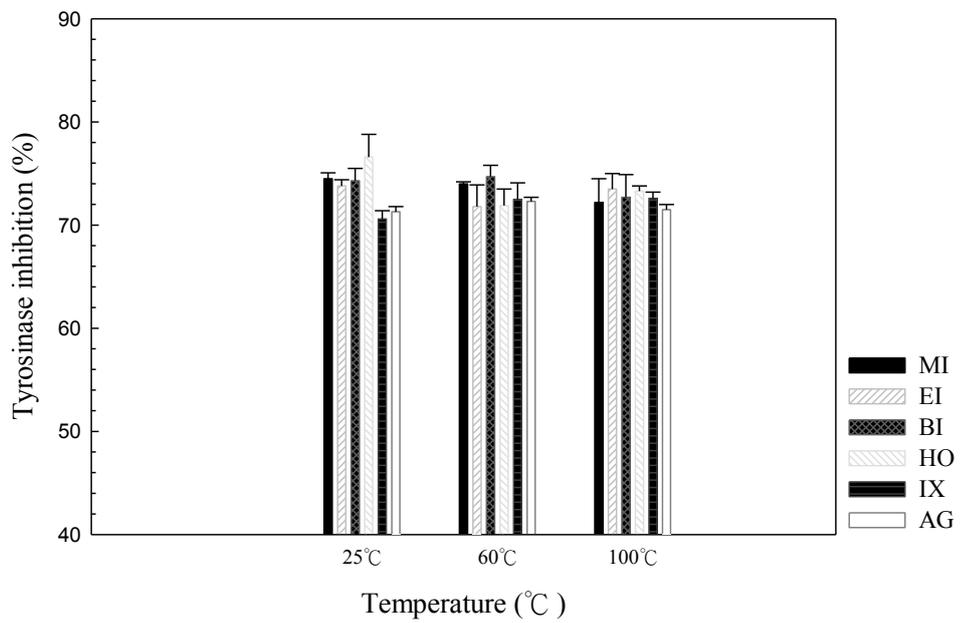


圖 38、不同溫度中最佳的酪胺酸酶抑制率比較

4.3 田口氏實驗對野生植物發酵後抗氧化活性與抑制酪胺酸酶之影響

根據 DPPH 清除率試驗、總多酚含量試驗、抑制酪胺酸酶試驗，如表 9、表 12、表 15，本研究得知魚腥草與含羞草在抗氧化活性與抑制酪胺酸酶的能力比起其他野生植物佳。但魚腥草前人已有許多相關研究，故本實驗採取含羞草作為田口實驗的樣品。

已知醋酸菌能夠將各種碳水化合物、醇類與糖醇類氧化成乙酸和其他有機酸，例如葡萄糖酸、延胡索酸、檸檬酸、酮類等(Dourado et al., 2017)。(Gil et al., 2000)期許含羞草透過醋酸菌種能夠轉化自身抗氧化與抑制酪胺酸酶之物質，提升 DPPH 清除率、總多酚含量、酪胺酸酶抑制率。

4.3.1 野生植物發酵後田口氏實驗之準備

1. 樣品濃度固定為 0.005 g/ mL
2. 先測定菌種標準曲線，利用檢量線得知菌種最佳濃度，標準曲線如圖 39。

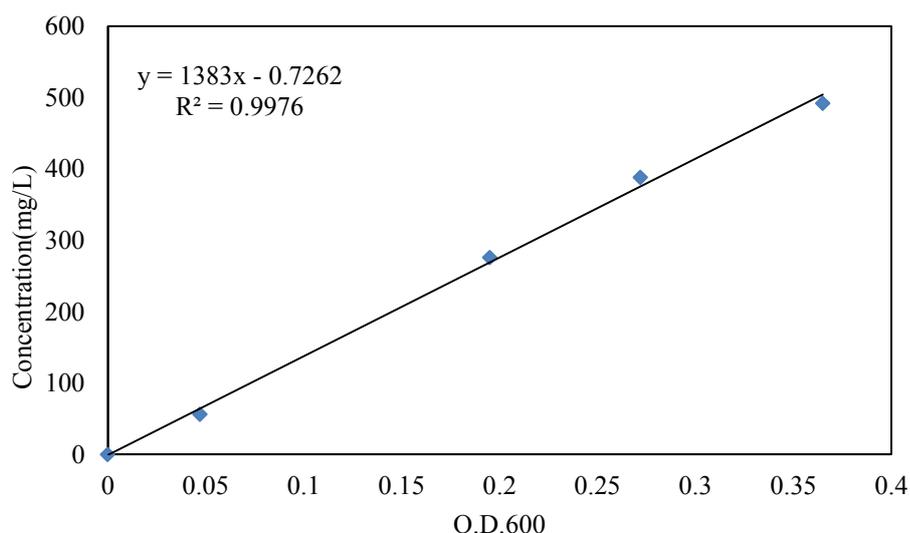


圖 39、菌種標準曲線

4.3.2 野生植物發酵後田口氏實驗之實驗結果分析

參考黃華邦等人之測定方法並稍作修改（黃華邦，2004）。

本實驗根據可控因子表(如表 5)、L₁₈ 直交表配置(如表 6)進行抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗，實驗結果可分為四個項目探討：抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗綜合分析、DPPH 清除率試驗分析、總多酚含量試驗分析、抑制酪胺酸酶試驗分析。利用 Minitab 16 繪製各因子的回應圖。

(1) 清除 DPPH 試驗分析

含羞草透過 L₁₈ 直交表交叉實驗後，DPPH 清除率試驗結果如表 16 所示。以 DPPH 清除率試驗可知含羞草最佳參數為液狀狀態、搖瓶速度 100 rpm、培養 1 天、培養溫度 33°C、菌液濃度 331 mg/L、醋酸菌菌種 *Gluconacetobacter europaeus*(BCRC 14148)、發酵培養基 pH 值 3.5、發酵培養基 YPD。根據以上參數，實驗得出 DPPH 清除率為 82.8 ± 6.9%，與發酵前(69.1 ± 8.0%)DPPH 清除率約提升了 1.2 倍。因醋酸菌發酵後會產生有機酸類，推測這些有機酸類有助於提高含羞草清除 DPPH 自由基的能力。

由 DPPH 清除率試驗回應圖(如圖 40)得知，含羞草於 DPPH 清除率試驗中，最佳因子水準為液狀樣品、搖瓶速度 0 rpm、培養天數 3 天、培養溫度 33°C、菌液濃度 165 mg/L、醋酸菌菌種 *Acetobacter sp.* (BCRC 14156)、發酵培養基 pH 值 4.5、發酵培養基 YPD。影響 DPPH 清除率最明顯的因子為醋酸菌菌種、培養基 pH 值、溫度、菌液濃度，如表 17 所示。

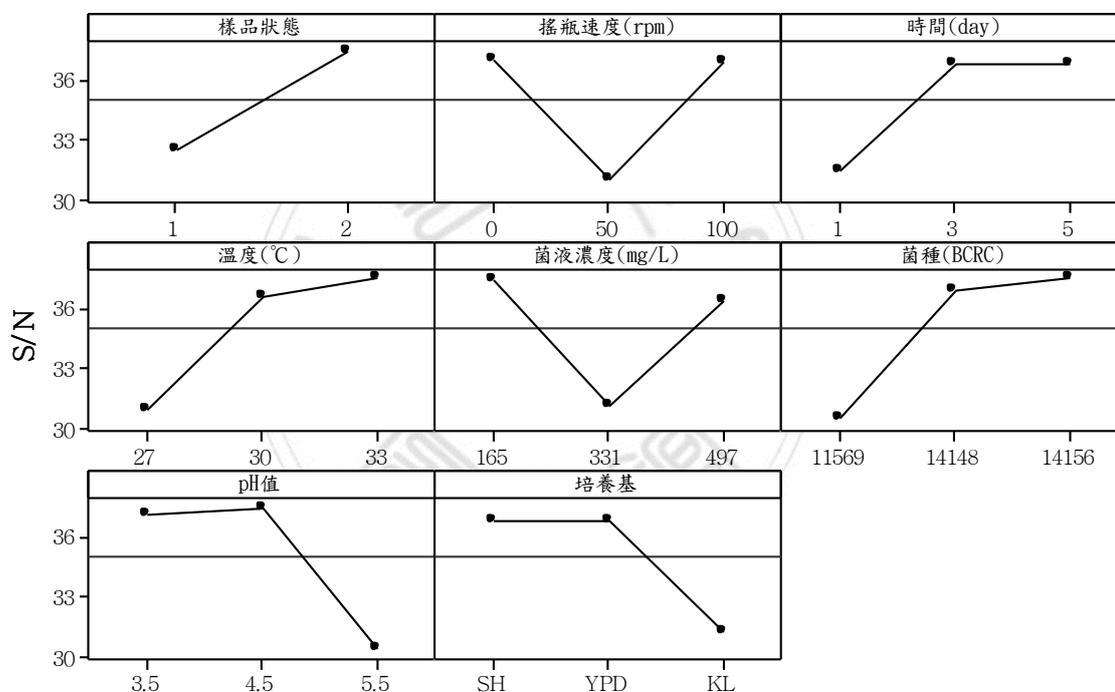
統整以上，最佳參數組合如表 18，影響 DPPH 清除率試驗最明顯因子為菌種、培養基 pH 值。

表 16、DPPH 清除率試驗結果與 S/N 比

編號	樣品 狀態	搖瓶 速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液 濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養 基	DPPH 抑制率 (%)	S/N 比
1	1	0	1	27	165	14156	3.5	SH	77.3	37.76359
2	1	0	3	30	331	11569	4.5	YPD	63	35.98681
3	1	0	5	33	497	14148	5.5	KL	62.2	35.87581
4	1	50	1	27	331	11569	5.5	KL	1	0
5	1	50	3	30	497	14148	3.5	SH	58	35.26856
6	1	50	5	33	165	14156	4.5	YPD	80.3	38.09431
7	1	100	1	30	165	14148	4.5	KL	77	37.72981
8	1	100	3	33	331	14156	5.5	SH	70.4	36.95145
9	1	100	5	27	497	11569	3.5	YPD	56.8	35.08697
10	2	0	1	33	497	11569	4.5	SH	76.7	37.69591
11	2	0	3	27	165	14148	5.5	YPD	70.4	36.95145
12	2	0	5	30	331	14156	3.5	KL	80	38.0618
13	2	50	1	30	497	14156	5.5	YPD	69.2	36.80212
14	2	50	3	33	165	11569	3.5	KL	81.5	38.22315
15	2	50	5	27	331	14148	4.5	SH	76.6	37.68458
16	2	100	1	33	331	14148	3.5	YPD	82.8	38.36061
17	2	100	3	27	497	14156	4.5	KL	76.6	37.68458
18	2	100	5	30	165	11569	5.5	SH	62.2	35.87581

表 17、DPPH 清除率試驗因子水準 S/N 比

水準	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
1	32.53	37.06	31.39	30.86	37.44	30.48	37.13	31.26
2	37.48	31.01	36.84	36.62	31.17	36.98	37.48	36.87
3		36.95	36.78	37.53	36.40	37.56	30.41	36.88
Effect	4.95	6.04	5.45	6.67	6.27	7.08	7.07	5.62
次序	8	5	7	3	4	1	2	6



信噪：望大

圖 40、DPPH 清除率試驗回應圖

表 18、DPPH 清除率試驗最佳參數組合

因子	水準	說明
樣品狀態	1	液體
搖瓶速度(rpm)	1	0
時間(day)	2	3
溫度(°C)	3	33
菌液濃度(mg/L)	1	165
菌種(BCRC)	1	14156
pH 值	2	4.5
培養基	2	YPD

(2)總多酚含量試驗分析

含羞草透過 L_{18} 直交表交叉實驗後，總多酚含量試驗結果如表 19 所示。以總多酚含量試驗可知含羞草最佳參數為以粉狀狀態、搖瓶速度 100 rpm、培養三天、培養溫度 33°C、菌液濃度 331 mg/L、醋酸菌菌種 *Acetobacter* sp.(BCRC 14156)、發酵培養基 pH 值 5.5、發酵培養基 SH。根據以上參數，實驗得出總多酚含量最高為 17.0 ± 0.3 mg-GAE/g-dw，與發酵前(83.9 ± 0.9 mg-GAE/g-dw)總多酚含量約降低了 4.9 倍，推測含羞草經菌種發酵後，菌種可能會吸收含羞草內的總多酚，導致發酵後總多酚含量比發酵前低。

由總多酚含量試驗回應圖(如圖 41)得知，含羞草於總多酚含量試驗中最佳因子水準為粉狀樣品、搖瓶速度 0 rpm、培養天數 3 天、培養溫度 27°C、菌液濃度 331 mg/L、醋酸菌菌種 *Acetobacter pasteurianus*(BCRC 11569)、發酵培養基 pH 值 3.5、發酵培養基 SH。影響總多酚含量最明顯的因子為培養天數、培養溫度、菌液濃度、培養基 pH 值，如表 20 所示。

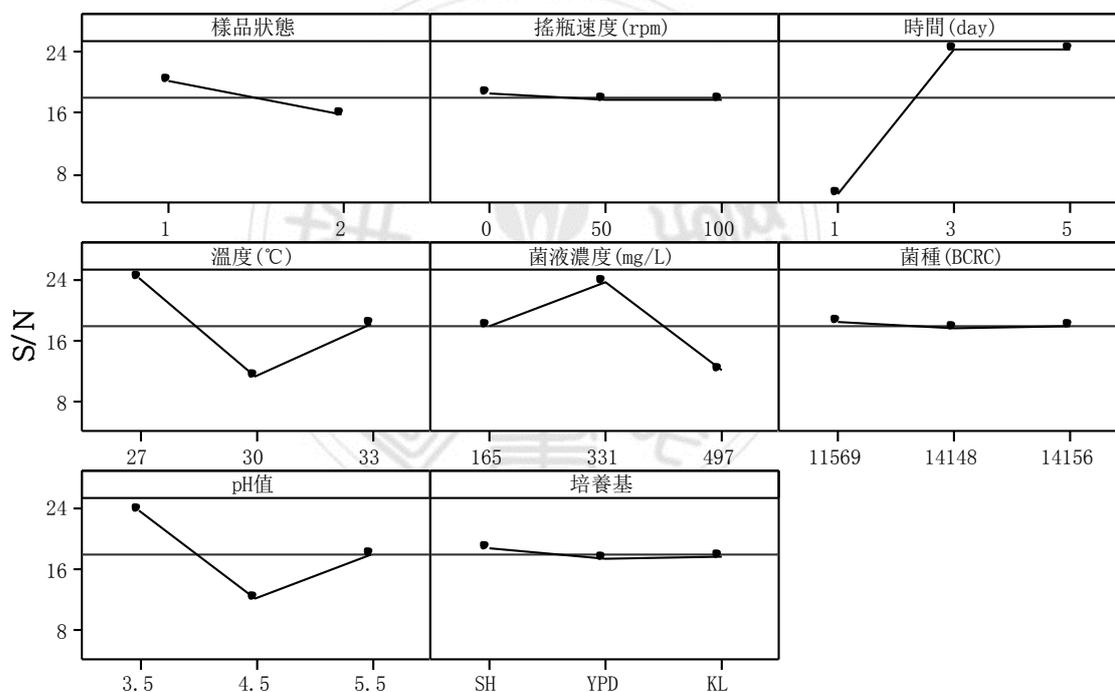
統整以上，最佳參數組合如表 21，能夠影響總多酚含量試驗因子為天數、培養溫度。

表 19、總多酚含量試驗結果與 S/N 比

編號	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基	總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)	S/N 比
1	1	0	1	27	165	14156	3.5	SH	16.9	24.55773
2	1	0	3	30	331	11569	4.5	YPD	16.5	24.34968
3	1	0	5	33	497	14148	5.5	KL	16.8	24.50619
4	1	50	1	27	331	11569	5.5	KL	15.6	23.86249
5	1	50	3	30	497	14148	3.5	SH	16.6	24.40216
6	1	50	5	33	165	14156	4.5	YPD	16.5	24.34968
7	1	100	1	30	165	14148	4.5	KL	0.2	-13.9794
8	1	100	3	33	331	14156	5.5	SH	17.0	24.60898
9	1	100	5	27	497	11569	3.5	YPD	16.2	24.1903
10	2	0	1	33	497	11569	4.5	SH	0.3	-10.4576
11	2	0	3	27	165	14148	5.5	YPD	15.9	24.02794
12	2	0	5	30	331	14156	3.5	KL	14.7	23.34635
13	2	50	1	30	497	14156	5.5	YPD	0.2	-13.9794
14	2	50	3	33	165	11569	3.5	KL	15.5	23.80663
15	2	50	5	27	331	14148	4.5	SH	16.4	24.29688
16	2	100	1	33	331	14148	3.5	YPD	12.5	21.9382
17	2	100	3	27	497	14156	4.5	KL	16.4	24.29688
18	2	100	5	30	165	11569	5.5	SH	16.9	24.55773

表 20、總多酚含量試驗因子水準 S/N 比

水準	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
1	20.094	18.388	5.324	24.205	17.887	18.385	23.707	17.640
2	15.759	17.790	24.249	11.450	23.734	17.532	12.143	18.661
3		17.602	24.208	18.125	12.160	17.863	17.931	17.479
Effect	4.335	0.786	18.925	12.756	11.574	0.853	11.564	1.182
次序	5	8	1	2	3	7	4	6



信噪：望大

圖 41、總多酚含量試驗回應圖

表 21、總多酚含量試驗最佳參數組合

因子	水準	說明
樣品狀態	1	粉狀
搖瓶速度(rpm)	1	0
時間(day)	2	3
溫度(°C)	1	27
菌液濃度(mg/L)	2	331
菌種(BCRC)	2	11569
pH 值	1	3.5
培養基	1	SH

(3)抑制酪胺酸酶試驗分析

含羞草透過 L_{18} 直交表交叉實驗後，抑制酪胺酸酶試驗結果如表 22 所示。以抑制酪胺酸酶試驗可知含羞草最佳參數以液狀狀態、搖瓶速度 50 rpm、培養五天、培養溫度 27°C 、菌液濃度 331 mg/L、醋酸菌菌種 *Gluconacetobacter europaeus*(BCRC 14148)、發酵培養基 pH 值 4.5、發酵培養基 SH。根據以上參數，實驗得出酪胺酸酶抑制率最高為 $68.6 \pm 0.3\%$ ，與發酵前($72.2 \pm 2.3\%$)酪胺酸酶抑制率約降低了 1.1 倍，推測含羞草經菌種發酵後，菌種可能會干擾含羞草內能抑制酪胺酸酶的物質，導致發酵後酪胺酸酶抑制率比發酵前低。

由抑制酪胺酸酶試驗回應圖(如圖 42)得知，含羞草於抑制酪胺酸酶試驗中，最佳參數為液狀樣品、搖瓶速度 100 rpm、培養天數 5 天、培養溫度 30°C 、菌液濃度 497 mg/L、醋酸菌菌種 *Gluconacetobacter europaeus*(BCRC 14148)、發酵培養基 pH 值 4.5、發酵培養基 YPD。影響酪胺酸酶抑制率最明顯的因子為培養溫度、培養天數、含羞草狀態、培養基 pH 值，如表 23 所示。

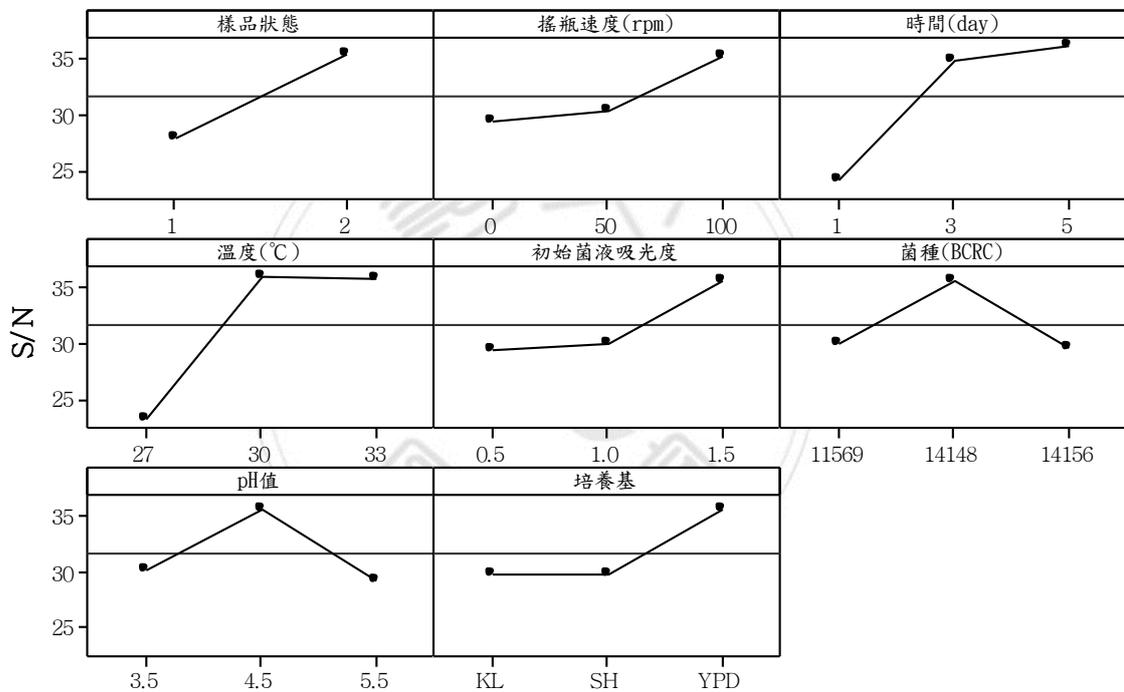
統整以上，最佳參數組合如表 24，能夠影響總多酚含量試驗因子為天數、培養溫度。

表 22、抑制酪胺酸酶試驗結果與 S/N 比

編號	樣品 狀態	搖瓶 速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液 濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基	酪胺酸酶 抑制率(%)	S/N 比
1	1	0	1	27	165	14156	3.5	SH	1.0	0.0000
2	1	0	3	30	331	11569	4.5	YPD	63.8	36.0964
3	1	0	5	33	497	14148	5.5	KL	63.0	35.9868
4	1	50	1	27	331	11569	5.5	KL	1.0	0.0000
5	1	50	3	30	497	14148	3.5	SH	63.8	36.0964
6	1	50	5	33	165	14156	4.5	YPD	66.1	36.4040
7	1	100	1	30	165	14148	4.5	KL	63.4	36.0418
8	1	100	3	33	331	14156	5.5	SH	55.4	34.8702
9	1	100	5	27	497	11569	3.5	YPD	64.8	36.2315
10	2	0	1	33	497	11569	4.5	SH	61.2	35.7350
11	2	0	3	27	165	14148	5.5	YPD	42.6	32.5882
12	2	0	5	30	331	14156	3.5	KL	66.5	36.4564
13	2	50	1	30	497	14156	5.5	YPD	66.3	36.4303
14	2	50	3	33	165	11569	3.5	KL	66.4	36.4434
15	2	50	5	27	331	14148	4.5	SH	68.6	36.7265
16	2	100	1	33	331	14148	3.5	YPD	62.5	35.9176
17	2	100	3	27	497	14156	4.5	KL	47.2	33.4788
18	2	100	5	30	165	11569	5.5	SH	59.1	35.4317

表 23、抑制酪胺酸酶試驗因子水準 S/N 比

水準	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
1	27.97	29.48	24.02	23.17	29.48	29.99	30.19	29.73
2	35.47	30.35	34.93	36.09	30.01	35.56	35.75	29.81
3		35.33	36.21	35.89	35.66	29.61	29.22	35.61
Effect	7.5	5.85	12.19	12.92	6.17	5.95	6.53	5.88
次序	3	8	2	1	5	6	4	7



信噪：望大

圖 42、抑制酪胺酸酶試驗回應圖

表 24、抑制酪胺酸酶試驗最佳參數組合

因子	水準	說明
樣品狀態	1	液體
搖瓶速度(rpm)	3	100
時間(day)	3	5
溫度(°C)	2	30
菌液濃度(mg/L)	3	497
菌種(BCRC)	3	14148
pH 值	2	4.5
培養基	2	YPD



4.3.3 野生植物發酵後田口氏實驗之確認實驗

統整 DPPH 清除率試驗(表 17)、總多酚含量試驗(表 20)、酪胺酸酶抑制率(表 23)，得知各試驗影響最大的因子。為確認在最佳水準下，實驗的改善結果能再次發生的可能性(黃華邦，2004)，每次只變動一個參數，其他參數維持前次實驗的水準，以探討參數變動之效應。

(1)清除 DPPH 確認試驗

透過 DPPH 清除率試驗回應圖(圖 40)得知影響 DPPH 清除率試驗最明顯的因子為菌種與培養基 pH 值，因此於確認實驗中將菌種調整為 *Acetobacter pasteurianus*(BCRC11569)與 *Gluconacetobacter europaeus*(BCRC 14148)；培養基 pH 值調整為 4 與 5，再進行一次 DPPH 清除率最佳化確認實驗。

經 DPPH 清除率最佳化確認實驗(表 25)，本實驗得知：以菌種不同來說，當菌種調整為 *Acetobacter pasteurianus*(BCRC11569)時，DPPH 清除率比菌種為 *Acetobacter* sp.(BCRC14156)來得高，DPPH 清除率約提升 0.2%。以培養基 pH 值不同來說，無論是調整成 4 或 5，DPPH 清除率皆不會比調整前來得佳。

綜整以上，DPPH 清除率最適培養菌種為 *Acetobacter pasteurianus*(BCRC11569)、培養基 pH 值維持在 4.5，DPPH 清除率試驗最佳發酵條件如表 26 所示。

表 25、DPPH 清除率最佳化確認實驗

田口氏實驗最大 S/N 之參數								
樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基	DPPH 抑制率 (%)
液狀	0	3	33	165	14156	4.5	YPD	82.1%
田口氏實驗最佳化確認實驗之參數								
液狀	0	3	33	165	14148	4.5	YPD	81.9%
液狀	0	3	33	165	11569	4.5	YPD	82.3%
液狀	0	3	33	165	14156	4	YPD	81.6%
液狀	0	3	33	165	14156	5	YPD	81.9%

表 26、DPPH 清除率試驗最佳發酵條件

因子	樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
說明	液體	0	3	33	165	11569	4.5	YPD

(2)總多酚含量確認試驗

透過總多酚含量試驗回應圖(圖 41)得知影響總多酚含量試驗最明顯的因子為培養天數與培養溫度，因此於確認實驗中將培養天數調整為 2.5 天及 3.5 天；培養溫度調整為 25°C 與 29°C，再進行一次總多酚含量最佳化確認實驗。

經總多酚含量試驗最佳化確認實驗(表 26)。本實驗得知：以培養天數不同來說，當天數調整時，無論是調整成 2.5 天或 3.5 天，總多酚含量皆不會比調整前來得佳。以培養溫度來說，將培養溫度調整成 25 度或 29 度皆會比調整前來得佳，總多酚含量約提升 0.6 mg-GAE/g-dw。

綜整以上，總多酚含量的培養天數維持在 3 天、培養溫度以 25°C 或 29°C 皆可，總多酚含量最佳發酵條件如表 28。

表 27、總多酚含量試驗最佳化確認實驗

田口氏實驗最大 S/N 之參數								
樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基	總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)
粉狀	0	3	27	331	11569	3.5	SH	15.2
田口氏實驗最佳化確認實驗之參數								
粉狀	0	2.5	27	331	11569	3.5	SH	15.0
粉狀	0	3.5	27	331	11569	3.5	SH	14.9
粉狀	0	3	25	331	11569	3.5	SH	15.8
粉狀	0	3	29	331	11569	3.5	SH	15.8

表 28、總多酚含量試驗最佳發酵條件

因子	樣品 狀態	搖瓶 速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
說明	粉狀	0	3	25/29	331	11569	3.5	SH

(3)抑制酪胺酸酶確認試驗

透過抑制酪胺酸酶試驗回應圖(圖 42)得知影響抑制酪胺酸酶試驗最明顯的因子為培養天數與培養溫度，因此於確認實驗中將培養天數調整為 4.5 天及 5.5 天；培養溫度調整為 28°C 與 32°C，再進行一次抑制酪胺酸酶最佳化確認實驗。

經抑制酪胺酸酶試驗最佳化確認實驗(表 29)本實驗得知：以培養天數不同來說，當培養天數調整成 5.5 天時，酪胺酸酶抑制率比培養 5 天時來得高，酪胺酸酶抑制率約提升約 0.4%。以培養溫度不同來說，無論是調整成 28°C 或 32°C，酪胺酸酶率皆不會比調整前來得佳。

綜整以上，酪胺酸酶最適培養天數為 5.5 天、培養溫度值維持在 30°C，抑制酪胺酸酶試驗最佳發酵條件如表 30。

表 29、抑制酪胺酸酶試驗最佳化確認實驗

田口氏實驗最大 S/N 之參數								
樣品狀態	搖瓶速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基	酪胺酸酶 抑制率(%)
液狀	100	5	30	497	14148	4.5	YPD	66.0 %
田口氏實驗最佳化確認實驗之參數								
液狀	100	4.5	30	497	14148	4.5	YPD	63.3 %
液狀	100	5.5	30	497	14148	4.5	YPD	66.4 %
液狀	100	5	28	497	14148	4.5	YPD	63.6 %
液狀	100	5	32	497	14148	4.5	YPD	64.9 %

表 30、抑制酪胺酸酶試驗最佳發酵條件

因子	樣品 狀態	搖瓶 速度 (rpm)	時間 (day)	溫度 (°C)	菌液濃度 (mg/L)	菌種 (BCRC)	pH 值	培養基
說明	液體	100	5.5	30	497	14148	4.5	YPD

4.3.4 綜整田口氏實驗與野生植物水萃液抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶之比較

以含羞草水萃液抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗之發酵前後比較，如表 31，本研究得知含羞草經菌種發酵後，DPPH 清除率比未發酵前提升了約 13%，透過優化田口氏實驗參數後能再往上提升 0.2%。推測含羞草經加入菌種後，菌種可以轉化含羞草內物質，提升 DPPH 的清除率。

而總多酚與酪胺酸酶抑制率經菌種發酵後，總多酚含量與酪胺酸酶抑制率並沒有比發酵前好，推測菌種可能不會轉化含羞草內總多酚含量與能抑制酪胺酸酶的物質，導致總多酚含量與酪胺酸酶抑制率沒有比發酵前佳。

綜整以上，醋酸菌只對含羞草水萃液中 DPPH 清除率有影響，總多酚含量與酪胺酸酶抑制率則無影響。

表 31、含羞草水萃液經菌種發酵前後抗氧化試驗與抑制酪胺酸酶試驗比較

	含羞草 水萃液	田口實驗參數 (含羞草水萃液+菌種)	田口氏實驗確認實驗參數 (含羞草水萃液+菌種)
DPPH 清除率(%)	69.1 ± 8.0	82.1 ± 2.7	82.3 ± 4.9
總多酚含量 (mg-GAE/g-dw)	83.9 ± 0.9	15.2 ± 0.1	15.8 ± 0.4
酪胺酸酶抑制率(%)	72.2 ± 2.3	66.0 ± 0.3	66.4 ± 0.3

第五章 結論與建議

5.1 結論

經本研究一系列的抗氧化活性與美白有效成分實驗後，結論得出：DPPH 在 25°C 中有最佳的抑制率，最佳抑制率的野外植物為兔兒草、總多酚在 100°C 中有最高的總多酚，總多酚含量最高的野外植物為魚腥草、酪胺酸酶在 25°C 中有最佳的抑制率，能抑制酪胺酸酶最多的野外植物為魚腥草。推測野外植物比起 25°C 萃取，高溫萃取時能夠釋放出更多酚類物質。反之，野外植物透過 25°C 萃取能夠清除較多的 DPPH 自由基與抑制較多的酪胺酸酶，推測高溫萃取會破壞野生植物中能清除 DPPH 與抑制酪胺酸酶的成分。

透過田口氏實驗得知，能影響含羞草 DPPH 清除率關鍵因子為醋酸菌種與培養基 pH 值，發酵後 DPPH 清除率為 $82.8 \pm 6.9\%$ 。而發酵前 DPPH 清除率為 $69.1 \pm 8.0\%$ ，兩者相較起來 DPPH 清除率約提升了 1.2 倍。總多酚含量的關鍵因子為培養天數與培養溫度，發酵後總多酚含量為 17.0 ± 0.3 mg-GAE/g-dw，發酵前總多酚含量為 83.9 ± 0.9 mg-GAE/g-dw，兩者相較起來總多酚含量約降低了 4.9 倍。酪胺酸酶抑制率的關鍵因子為培養天數與培養溫度，發酵後酪胺酸酶抑制率為 $68.6 \pm 0.3\%$ ，而發酵前酪胺酸酶抑制率為 $72.2 \pm 2.3\%$ ，兩者相較起來酪胺酸酶抑制率約降低了 1.1 倍。

經由田口氏實驗最佳化確認實驗後，結論得出 DPPH 清除率最適發酵條件為液狀樣品、搖瓶速度 0 rpm、培養天數 3 天、培養溫度 33°C、菌液濃度 165 mg/L、醋酸菌菌種 *Acetobacter pasteurianus* (BCRC 11569)、發酵培養基 pH 值 4.5、發酵培養基 YPD。總多酚含量最適發酵條件為粉狀樣品、搖瓶速度 0 rpm、培養天數 3 天、培養溫度 27°C、菌液濃度 331 mg/L、醋酸菌菌種 *Acetobacter pasteurianus* (BCRC 11569)、發酵培養基 pH 值 3.5、發酵培養基 SH。酪胺酸酶抑制率最適發酵條件為液狀樣品、搖瓶速度 100 rpm、培養天數 5.5 天、培養溫度 30°C、菌液濃度 497 mg/L、醋酸菌菌種 *Gluconacetobacter europaeus* (BCRC14148)、發酵培養基 pH 值 4.5、發酵培養基 YPD。

5.2 研究限制與建議

根據實驗結果發現，魚腥草與含羞草於體外抗氧化能力與抑制酪胺酸酶方面皆高於其他野生植物，因植物成分複雜，本實驗樣本抑制效果有限，無法分辨哪些成分為影響抗氧化活性與抑制酪胺酸酶。建議可再進一步研究這兩種物種的有效成分或透過黑色素細胞測試酪胺酸酶抑制黑色素細胞生成的量。

其他抗氧化能力與抑制酪胺酸酶不明顯的物種，可以透過不同的萃取水溫、萃取方式、不同的萃取植物部位做更深入的研究，找到適合的條件。



第六章 參考文獻

- 王隆碩、林立涵、陳豪君、王淑綺 (2013)。臨床常見美白中草藥之文獻探析。中醫內科醫學雜誌，11 (2)，頁 1-8。
- 台灣植物同好會 (2009)。台灣野生食用植物圖錄。：玉山社出版事業股份有限公司。
- 李幸祥 (2009)。台灣青草茶植物圖鑑。：貓頭鷹出版。
- 林威宏 (2010)。魚腥草與芭樂葉萃取物之抗氧化活性探討。未出版之碩士論文，國立臺灣海洋大學食品科學系，基隆市。
- 林煜書 (2012)。毛茄葉部之抗氧化成分研究。未出版碩士論文。嘉南藥理科技大學藥物科技研究所，台南市。
- 洪昆源、吳芯慧、黃士元、林文智 (2011)。大花咸豐草不同萃取方式之抗發炎及抗氧化活性。中華林學季刊，44 (4)，頁 589-598。
- 胡敏夫、余志儒、林俊義、謝廷芳、吳明哲、劉光隆 (2006)。保健藥用野草。：行政院農業委員會農業試驗所。
- 張瑞珠、戴昭瑛、鄧德豐、區少梅 (2006)。發酵鳳梨醋之醋酸菌的選擇。臺灣農業化學與食品科學，44 (6)，頁 351-359。
- 許純真 (2007)。紅麴萃取物對酪胺酸酶及黑色素腫瘤細胞活性之影響。未出版之碩士論文。大仁科技大學製藥科技研究所，屏東縣。
- 陳良宇、鄭建璋、王志玄、林志璋、張云力、李瑞玲等人 (2012)。鹼催化對 Folin-Ciocalteu 試劑檢測總多酚含量的影響。MC-Transaction on Biotechnology，4 (1)，頁 10-19。
- 陳旺全、蔡耿彰、林立偉、林輝雄、施純全 (2015)。中草藥活性分子抑制酪胺酸酶之美白成份探討。臺灣中醫醫學雜誌，13 (1)，頁 29-41。
- 黃亦昕 (2014)。探討以乳酸菌發酵中草藥對於抑制酪胺酸酶活性之美白效能評估。未出版之碩士論文，中華科技大學健康科技研究所，台北市。
- 黃華邦、黃永宏、鄭博文 (2004)。由水火箭實驗了解整合六標準差手法之田口實驗設計。中國民國品質學會第 40 屆年會-高雄市分會第 30 屆年會暨第 10 屆全國品質管理研討會(論文集)，頁 94-105。

- 楊祐俊、洪爭坊、趙雲鵬 (2009)。醋酸菌 *Gluconacetobacter xylinus* 轉殖類血紅素蛋白基因 (*vhb*) 對細菌纖維素產量之影響。臺中區農業改良場研究彙報 (102), 頁 1-14。
- 蔡佳芳 (2012)。含羞草之生物活性探討。未出版之碩士論文, 大同大學生物工程學系(所), 台北市。
- 蔣永正 (2002)。有機栽培之雜草防治技術。農業試驗所特刊第 102 號, 頁 97-104。
- 磨耀霖 (2011)。台灣懸鈎子地上部的抗氧化成分之研究。未出版碩士論文。嘉南藥理科技大學藥物科技研究所, 台南市。
- 嚴嘉蕙 (2009)。化妝品概論(第四版)。: 新文京開發出版股份有限公司。
- Asad, M. H. H. B., Murtaza, G., Siraj, S., Khan, S. A., Azhar, S., Sik, M., Hussain, I. (2011). Enlisting the scientifically unnoticed medicinal plants of Pakistan as a source of novel therapeutic agents showing anti-venom activity. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(20), 2292-2305.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. T., & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol*, 82(2-3), 155-158.
- Bickers, D. R., & Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2565-2575.
- Black, H. S. (1987). Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochemistry and Photobiology*, 46(2), 213-221.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 539-549.
- Chan, C.-F., Huang, C.-C., Lee, M.-Y., & Lin, Y.-S. (2014). Fermented broth in tyrosinase-and melanogenesis inhibition. *Molecules*, 19(9), 13122-13135.
- Dourado, F., Rynhajllo, M., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., & Gama, M. (2017). Taxonomic review and microbial ecology in bacterial

- nanocellulose fermentation. In *Bacterial Nanocellulose* (pp. 1-17): Elsevier.
- Fugelsang, K. C. (1997). Acetic Acid Bacteria. In *Wine Microbiology* (pp. 48-67): Springer.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.
- Gillbro, J., & Olsson, M. (2011). The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(3), 210-221.
- Haag, S., Bechtel, A., Darvin, M., Klein, F., Groth, N., Schäfer-Korting, M., Meinke, M. (2010). Comparative study of carotenoids, catalase and radical formation in human and animal skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(6), 306-312.
- Huang, H.-C., Hsieh, W.-Y., Niu, Y.-L., & Chang, T.-M. (2014). Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 16665-16679.
- Jackson, M. J. (1999). Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(3), 673-676.
- Joseph, B., George, J., & Mohan, J. (2013). Pharmacology and traditional uses of *Mimosa pudica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 5(2), 41-44.
- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32-50.

- Kim, Y.-J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723.
- Kongkiattikajorn, J. (2014). Antioxidant Properties of Roselle Vinegar Production by Mixed Culture of *Acetobacter aceti* and *Acetobacter cerevisiae*. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)*, 48, 980-988.
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agric Food Chem*, 48(11), 5338-5342.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Lademann, J., Schanzer, S., Meinke, M., Sterry, W., & Darvin, M. (2011). Interaction between carotenoids and free radicals in human skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(5), 238-244.
- Lee, M.-G., & Kim, K.-J. (2007). Experimental studies on the Whitening and Anti-allergic effect of various Herbal medicines that clear heat. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*, 20(3), 71-81.
- Leifson, E. (1954). The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 20(1), 102-110.
- Lin, J.-H., Sung, W.-P., Chen, T.-Y., Lin, Y.-J., & Kuo, J.-C. (2012). Applying the Taguchi method in improving the production of bacterial cellulose. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 6(6), 610-616.
- Liu, H., Qiu, N., Ding, H., & Yao, R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41(4), 363-370.

- Matsumoto, H., Smith, E. G., & Sherman, G. D. (1951). The effect of elevated temperatures on the mimosine content and toxicity of Koa Haole (*Leucaena glauca*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33(2), 201-211.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shui, G., & Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 89-96.
- Song, F.-L., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., & Li, H.-B. (2010). Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362-2372.
- Tennyson, S., Balaraju, K., Park, K., Ravindran, K. J., Eapen, A., & William, S. J. (2012). In vitro antioxidant activity of *Ageratum houstonianum* Mill.(Asteraceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S712-S714.
- Tian, L., Zhao, Y., Guo, C., & Yang, X. (2011). A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata*. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 537-544.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.

- Yang, R., Tang, Q., Miao, F., An, Y., Li, M., Han, Y., Chen, R. (2015). Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7345.
- Zastrow, L., Groth, N., Klein, F., Kockott, D., Lademann, J., Renneberg, R., & Ferrero, L. (2009). The missing link—light-induced (280–1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22(1), 31-44.
- Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W.-l., Zhou, J., & Yang, P. (2011). Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 35.

