

# 一株罗布泊盐湖链霉菌的鉴定及其代谢产物对酪氨酸酶活性、黑色素生成的抑制效应

王 俊<sup>1,2,3</sup>, 付建红<sup>1,2,3\*</sup>,  
王玉苗<sup>1,2,3</sup>, 阮文伟<sup>1,2,3</sup>, 聂慧林<sup>1,2,3</sup>, 崔凤真<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室;

<sup>2</sup>新疆师范大学干旱区植物逆境生物学实验室; <sup>3</sup>新疆师范大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830054

**摘要:**本研究采用多相分类法对一株分离自新疆罗布泊盐湖链霉菌 89-2-2 进行鉴定, 通过 CCK-8 法、L-多巴氧化法和 NaOH 溶解法检测该菌株乙酸乙酯提取物对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖、细胞内酪氨酸酶活性及黑色素含量的影响。以抑制酪氨酸酶活性为指标, 应用 LC-MS 代谢组学方法检测链霉菌 89-2-2 发酵条件优化前后所产生的差异代谢物, 分析可能具有抑制活性的代谢产物类型。结果初步鉴定该菌株为西唐氏链霉菌 (*Streptomyces setonii*) 89-2-2。S. *setonii* 89-2-2 乙酸乙酯提取物在 100 ~ 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内几乎无细胞毒性, 但能有效抑制 B16 细胞内酪氨酸酶活性和黑色素生成, 与空白组相比均具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。代谢组学实验的结果显示 S. *setonii* 89-2-2 产生的差异代谢物主要为维生素类化合物、芳香类化合物和羧酸类化合物。本研究为从新疆罗布泊链霉菌中开发酪氨酸酶抑制剂和黑色素合成抑制剂提供重要的科学依据。

**关键词:**罗布泊链霉菌; 代谢产物; 酪氨酸酶抑制活性; 小鼠黑色素瘤 B16 细胞; 黑色素合成抑制活性

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2022) 9-1548-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.9.012

## Identification of a *Streptomyces setonii* from Lop Nur and inhibition effects of its metabolites on tyrosinase activity and melanin synthesis

WANG Jun<sup>1,2,3</sup>, FU Jian-hong<sup>1,2,3\*</sup>,  
WANG Yu-miao<sup>1,2,3</sup>, RUAN Wen-wei<sup>1,2,3</sup>, NIE Hui-lin<sup>1,2,3</sup>, CUI Feng-zhen<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulation Biology;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, Xinjiang Normal University;

<sup>3</sup>College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

**Abstract:** In this study, a *Streptomyces* sp. 89-2-2 isolated from Lop Nur Salt Lake in Xinjiang was identified by multiphase classification. Effects of the strain ethyl acetate extract on mouse melanoma B16 cell proliferation, tyrosinase activity and melanin content were determined by CCK-8 assay, L-Dopa oxidation method and NaOH dissolution method. Taken the inhibitory activity on tyrosinase as evaluation index, we detected the differential metabolites produced by *Streptomyces* sp. 89-2-2 under the two fermentation conditions of before and after optimization by liquid chromatograph-mass spectrometer. The aim of this study was to analyze the types of metabolites that may have inhibitory activity. The strain was preliminary identified as *Streptomyces setonii* 89-2-2. The ethyl acetate extract of S. *setonii* 89-2-2 had little cytotoxic, but could effectively inhibit the tyrosinase activity and melanogenesis in the B16 cells under the concentration of 100-1 000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The above results were significantly different from those of the blank groups ( $P < 0.05$ ). Metabolomics test results showed that the differential metabolites produced by S. *setonii* 89-2-2 were mainly vitamins, aromatic compounds and carboxylic acids. This study provides an important scientific basis for the development of tyrosinase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Streptomyces* of Lop Nur

收稿日期: 2022-03-07 接受日期: 2022-06-06

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2021D01A122)

\* 通信作者 Tel: 86-015739580179; E-mail: fjh\_719@163.com

in Xinjiang.

**Key words:** *Streptomyces setonii* from Lop Nur; metabolites; inhibitory activity on tyrosinase; mice melanoma B16 cell; inhibitory activity on melanin synthesis

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, tyrosinase)又称为多酚氧化酶,是动物、植物和微生物黑色素生物合成过程中的关键酶,其表达活性决定着黑色素生成的速度和数量<sup>[1,2]</sup>。酪氨酸酶抑制剂在化妆品、果蔬保鲜、生物农药及黑色素代谢疾病的治疗等方面,有着巨大的应用前景<sup>[3]</sup>。目前,酪氨酸酶抑制剂主要通过天然产物提取或化学合成得到。极端环境微生物在适应强酸、强碱、强辐射等其他生物无法生存的环境中形成了特殊的基因类型及生理机制,能够产生结构新颖、生物活性显著的次级代谢产物,这为酪氨酸酶抑制剂的筛选提供了新的思路<sup>[4]</sup>。本文的研究对象是一株分离自中国第二大咸水湖—新疆罗布泊的链霉菌 89-2-2,经鉴定为西唐氏链霉菌(*Streptomyces setonii*)属菌株。西唐氏链霉菌 Z-L-22 发酵可产生抑菌活性物质<sup>[5]</sup>。有人发现西唐氏链霉菌菌体及其产生的磷酸三酯酶可降解有机磷杀虫剂<sup>[6]</sup>。目前,尚未见有关西唐氏链霉菌产生酪氨酸酶抑制剂和黑色素合成抑制剂的报道。本实验对 *Streptomyces setonii* 89-2-2 代谢产物抑制酪氨酸酶活性和抑制黑色素合成的活性进行研究,以深入挖掘极端环境微生物独特的生物活性潜能,为开发在医药、化妆品等领域迫切需要的天然黑色素合成抑制剂及其先导化合物奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

菌株 89-2-2 分离自新疆罗布泊盐湖土壤。

#### 1.1.2 培养基

R<sub>2</sub>A 固体培养基:酵母浸出粉 0.5 g,可溶性淀粉 0.5 g,酸水解干酪素 0.5 g,蛋白胨 0.5 g,葡萄糖 0.5 g,丙酮酸钠 0.3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L。菌株种子液培养基和液体发酵培养基与固体培养基相同,均不加琼脂。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

小鼠黑色素瘤 B16 细胞购自中科院上海细胞生物研究所,由本实验室液氮冻存、培养和传代; CCK-8(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BA03175388); RPMI-1640 培养基(美国 GIBCO 公司,批号:8122013)、胎牛血清(美国 GIBCO 公司,批

号:2176377); L-多巴(美国 Sigma 公司,批号:#SL-BR0479V)、蘑菇酪氨酸酶(比活力为 5 340 U/mg,美国 Sigma 公司,批号:#SLCG8506); 胰蛋白酶(上海道鹏生物科技有限公司,批号:J130056); 其他试剂均为分析纯。恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司,中国); SHELLAB 全自动二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司,中国); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂,中国); 超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司,中国); 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司,中国); COIC 倒置显微镜(北京汗盟紫星仪器仪表有限公司,中国); SpectraMax 多功能酶标仪(美国加州分子仪器公司,美国); 高速离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司,中国); Hewlett-Packard 紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司,中国)。

### 1.2 耐盐性实验

菌株 89-2-2 接种于盐浓度分别为 5%、10%、15%、20% (W/V) 的 R<sub>2</sub>A 固体培养基中,30 ℃ 恒温培养 14 天,每隔 1~2 天观察菌体形态及生长状况。

### 1.3 菌种鉴定

#### 1.3.1 培养特征、细胞形态观察及生理生化特性测定

参照《放线菌系统学》观察菌株 89-2-2 的菌落和细胞形态,检测该菌株的相关生理生化特性。使用 API50CH 试剂盒测定该菌株产酸酶学特性指标, GEN III 鉴定板测定碳源利用指标<sup>[7,8]</sup>。

#### 1.3.2 全细胞壁氨基酸的提取及分析

全细胞壁氨基酸的提取及分析均参照文献<sup>[9]</sup>的标准操作进行,用薄层层析扫描法分析氨基酸组成。

#### 1.3.3 16S rRNA 基因型分析及其系统发育分析

采用 Chelex-100 法提取菌株 89-2-2 的基因组 DNA,扩增 16S rDNA 并测定序列,将得到的序列利用 Blast 软件在 GenBank、EMBL 及 DDBJ 等数据库中进行相似性搜索,并与基因库中已知菌株比较,确定菌株的初步分类地位。

### 1.4 菌株 89-2-2 代谢产物提取物的制备

将活化后的菌株 89-2-2 接种于 R<sub>2</sub>A 液体培养基中,30℃、180 r/min 振荡培养 3~5 天。按 5% 接

种量将种子培养液接种到液体发酵培养基中,30 ℃、180 r/min 振荡培养 3~5 天。6 000 r/min 离心 20 min,分别收集发酵上清液和菌体沉淀。上清液用乙酸乙酯萃取、蒸馏,最后用含 5% DMSO 的磷酸盐缓冲液溶解,获得上清液样品。菌体用 60% 冷丙酮浸提过夜,再用超声波破碎仪破碎细胞(功率 200 W,破碎 30 s,间歇 30 s,破碎至菌液透明),破碎液于 4 ℃、6 000 r/min 离心 30 min,上清液用乙酸乙酯萃取后,分别收集乙酸乙酯相和丙酮水相,蒸馏后用含 5% DMSO 的磷酸盐缓冲液溶解,获得菌体乙酸乙酯相样品和菌体丙酮水相样品。

## 1.5 菌株 89-2-2 代谢产物的提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的影响

### 1.5.1 菌株代谢产物提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制率的测定

参考文献<sup>[10]</sup>的方法测定菌株 89-2-2 代谢产物提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率。

### 1.5.2 菌株代谢产物提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶 IC<sub>50</sub> 的测定

将菌株 89-2-2 上清液样品冻干后得到的提取物溶于含 5% DMSO 的磷酸盐缓冲液中,配制成浓度分别为 0、0.125、0.250、0.375 和 0.500 mg/mL 代谢产物的提取物溶液。菌株提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性 IC<sub>50</sub> 的测定方法参照文献<sup>[11]</sup>。

## 1.6 菌株 89-2-2 代谢产物提取物对黑色素瘤细胞的生物学效应

### 1.6.1 菌株 89-2-2 代谢产物提取物对黑色素瘤 B16 细胞增殖率的影响

取指数生长期的 B16 黑色素瘤细胞,调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板,培养 24 h 左右待细胞完全贴壁后更换新培养基,每孔加入 100 μL 不同浓度提取物溶液(终质量浓度为 100、250、500、750、1 000 μg/mL),阳性对照熊果苷溶液(终质量浓度为 31.25、62.25、125、250、500 μg/mL,DM-SO 体积分数为 0.5%),每个浓度设置 3 个复孔,空白组为新鲜培养液,对照组为加入新鲜培养液的单细胞悬液,培养 24、48、72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,培养箱中孵育 4 h,用酶标仪测定各孔在 450 nm 下的吸光度。细胞(相对)增殖率按以下公式计算:

$$\text{细胞增殖率} =$$

$$(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$$

### 1.6.2 菌株 89-2-2 代谢产物提取物对 B16 细胞酪氨酸酶活性的影响

细胞培养和药物处理方法同“1.6.1”。药物处理一定时间后,弃去上清,用 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 1% Triton 50 μL,迅速放入 -80 ℃超低温冰箱冻存 30 min,随后室温融化使细胞完全破裂,酪氨酸酶释放出细胞外,37 ℃预温 5 min 后加入 1% 的 L-DOPA 溶液 10 μL/孔,37 ℃反应 1 h,在酶标仪 490 nm 处测其吸光度。酪氨酸酶(相对)活性按以下公式计算:

$$\text{酪氨酸酶活性} = OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}} \times 100\%$$

### 1.6.3 菌株 89-2-2 代谢产物提取物对 B16 细胞黑色素合成量的影响

细胞培养和药物处理同“1.6.1”。药物处理一定时间后,弃去上清,用 PBS 清洗 2 次,消化并收集细胞,1 500 r/min 离心 10 min,弃去上清。加入 2 mL 的 PBS 重新悬浮,然后加入 500 μL 体积比为 1:1 的乙醇/乙醚混合液,室温下放置 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 1 mL 含 10% DMSO 的 1.0 mol/L NaOH 溶液完全溶解裂解细胞,80 ℃水浴 2 h,测定其 405 nm 处吸光度。黑色素合成总量按以下公式计算:

$$\text{黑色素合成总量} = OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}} \times 100\%$$

## 1.7 菌株 89-2-2 代谢物的 LC-MS 检测分析

采用甲醇:乙腈 = 1:1 对菌株培养物进行淬灭,其中含有同位素标记的内标混合物。涡旋混匀 30 s 后,35 Hz 均质 4 min,冰水浴超声 5 min。均质及超声循环重复 3 次。然后 -40 ℃孵育 1 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。将上清液转移至新的 EP 管中,真空干燥。加入 200 μL 50% 乙腈复溶,涡旋 30 s,冰水浴超声 10 min;4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,取 75 μL 上清液于进样瓶中进行 LC-MS 检测分析<sup>[12]</sup>。

使用 Vanquish 超高效液相色谱仪,通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 液相色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)对目标化合物进行分离。液相色谱 A 相为水相,含 25 mmol/L 氨水和 25 mmol/L 乙酸铵;B 相为乙腈。采用乙腈水梯度洗脱体系,流动相流速为 0.5 mL/min,柱温为 25 ℃,样品盘温度为 4 ℃,进样体积正离子和负离子均为 3 μL。使用高分辨质谱(Triple TOF 6600),通过 IDA(Information-Dependent Acquisition)模式进行质谱数据采集。本部分检测委托上海阿趣生物科技有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐盐性实验

通过将菌株 89-2-2 接种于不同盐 (NaCl) 浓度的 R<sub>2</sub>A 固体培养基中, 观察菌株的生长情况, 菌株生长情况由强到弱分别用“+++”“++”“+”表示、不生长用“-”表示。经过各盐浓度下菌株生长情况的观察, 确定菌株 89-2-2 的最适盐浓度为 5%, 属于中度嗜盐链霉菌。

### 2.2 菌株 89-2-2 的鉴定

#### 2.2.1 形态学、生理生化鉴定及全细胞壁氨基酸的分析

将菌株 89-2-2 接种到 8 种培养基中 (ISP<sub>2</sub>/ISP<sub>3</sub>/ISP<sub>4</sub>/ISP<sub>5</sub>/PDA/TSA/察氏琼脂/营养琼脂), 分别培养 4、7、10、14 天后, 记录菌株的培养特征。菌株 89-2-2 在 ISP<sub>4</sub> 培养基上生长良好; 在 ISP<sub>4</sub> 培养基

上气生菌丝较发达呈灰黄色, 基内菌丝棕黄色, 无可溶性色素产生。在 ISP<sub>4</sub> 固体培养基上, 28 °C 下培养 4 天, 菌落背面呈棕黄色, 正面呈白色, 圆形, 表面有褶皱, 最大菌落直径约为 2.5 mm (见图 1)。光学显微镜下观察基内菌丝生长都比较丰富, 分支不断裂, 气生菌丝生长丰富, 有分支, 成熟的气生菌丝分化形成孢子丝, 孢子丝为直或波曲形, 培养 4 天左右, 孢子丝断裂生成柱状孢子 (见图 2)。

采用 API 50CH 试剂条对菌株 89-2-2 进行生理生化检测, 结果显示该菌株七叶灵为阳性; 采用 GEN III 鉴定板检测唯一碳源利用特性, 结果显示该菌株可将  $\alpha$ -D-葡萄糖、D-果糖、D-麦芽糖等作为唯一碳源, 不能利用 L-海藻糖、蔗糖等; 89-2-2 菌株能够使淀粉水解, 牛奶凝固和胨化, 硝酸盐还原反应为弱阳性, 明胶液化为阳性, 结果见表 1。

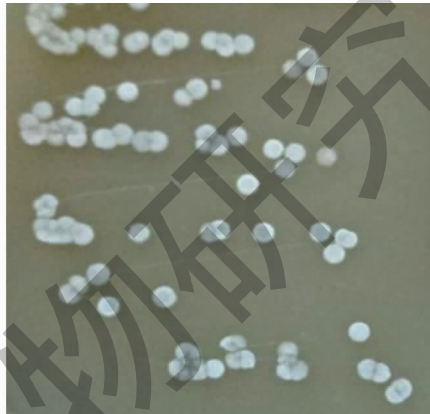


图 1 *S. setonii* 89-2-2 在 ISP<sub>4</sub> 固体培养基中培养 4 天的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of *S. setonii* 89-2-2 was cultured in ISP<sub>4</sub> solid medium for 4 days

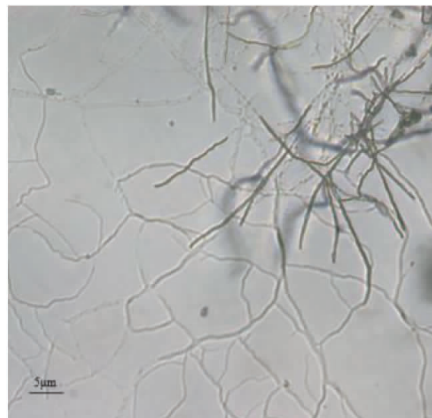


图 2 光镜下 *S. setonii* 89-2-2 的菌丝形态

Fig. 2 Mycelial morphology of *S. setonii* 89-2-2 under light microscope

菌株 89-2-2 的细胞壁含有丙氨酸 (alanine, Ala)、甘氨酸 (glycine, Gly)、谷氨酸 (glutamic acid,

Glu)、天冬氨酸 (aspartic acid, Asp)、左旋-2,6-二氨基庚二酸 (LL-2,6-diaminopimelic acid, LL-DAP)、内

消旋-2,6-二氨基庚二酸 (meso-2,6-diaminopimelic acid, Meso-DAP)、右旋-2,6-二氨基庚二酸 (DD-2,6-

表1 *S. setonii* 89-2-2 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of *S. setonii* 89-2-2

测试项 Test item	测试结果 Test result	测试项 Test item	测试结果 Test result
七叶灵 Esculin ferric citrate	+	D-麦芽糖 D-Maltose	+
$\alpha$ -D-葡萄糖 $\alpha$ -D-Glucose	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
L-海藻糖 L-Fucose	-	牛奶凝固酶 Milk coagulates	+
D-果糖 D-Fructose	+	puffs	+
蔗糖 Sucrose	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	±
		明胶液化 Gelatin liquefaction	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“±”表示弱阳性。

Note：“+” indicates positivity；“-” indicates negativeness；“±” indicates weak positivity.

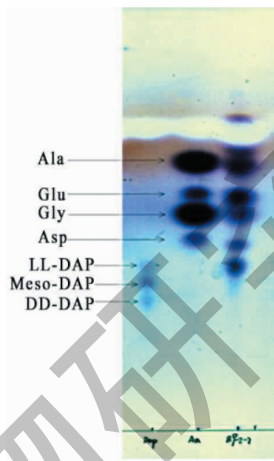


图3 全细胞水解液氨基酸层析图谱

Fig.3 Amino acid chromatogram of whole cell hydrolyzate

2.2.2 菌株 89-2-2 的 16S rRNA 基因序列分析

菌株 89-2-2 的 16SrRNA 基因特异序列为 1411bp (GenBank 登录号为 OK255534), 利用 MEGA

5.0 软件, 以 NeighborJoining 法构建菌株的系统发育树 (见图 4)。结果表明, 菌株 89-2-2 和 *Streptomyces setonii* NBRC<sup>T</sup>13085<sup>T</sup> 以及 *Streptomyces anulatus* NRRL

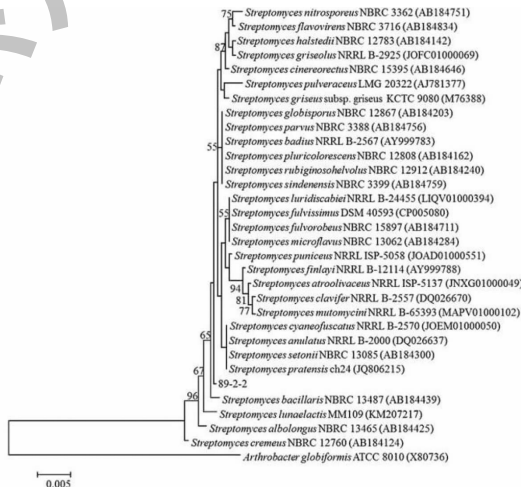


图4 *S. setonii* 89-2-2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *S. setonii* 89-2-2 based on 16S rRNA gene sequence

B-2000<sup>T</sup> 的序列相似性最高,均为 99.9%。结合菌株的形态特征和生理生化特性测定结果,可初步确定菌株 89-2-2 为西唐氏链霉菌 (*Streptomyces setonii*),并命名为 *Streptomyces setonii* 89-2-2。

### 2.3 菌株 89-2-2 代谢产物的提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的影响

制备 *Streptomyces setonii* 89-2-2 代谢产物的丙酮提取物,用乙酸乙酯萃取后获得的 3 个样品参照文献<sup>[10]</sup>的方法测定它们对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率。结果表明,*S. setonii* 89-2-2 的上清液乙酸乙酯萃取相酶活性抑制率最高为 72.2%,其次是菌体乙酸乙酯相和菌体丙酮水相的酶活性抑制率分别为 44.9% 和 31.4% (见图 5)。

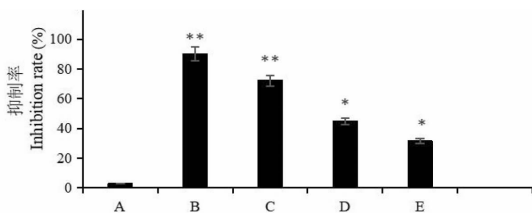


图 5 *S. setonii* 89-2-2 代谢产物提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制活性

Fig. 5 *S. setonii* 89-2-2 inhibitory activity of metabolite extracts on mushroom tyrosinase

注:A.空白;B.曲酸;C.上清液乙酸乙酯萃取相;D.菌体乙酸乙酯相;E.菌体丙酮水相。与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

Note: A. Blank; B. Kojic acid; C. The ethyl acetate extract of *S. setonii* 89-2-2 supernatant; D. The ethyl acetate extract of *S. setonii* 89-2-2 precipitation; E. The acetone aqueous fraction of *S. setonii* 89-2-2 precipitation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs blank.

在以 L-DOPA 为底物的酶活性测定体系中,加入不同浓度的菌株 89-2-2 上清液提取物溶液,以不加提取物为对照,测定相对酶活力,结果见图 6。由图 6 可知,*S. setonii* 89-2-2 上清液提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活力有较强的抑制作用, $IC_{50}$  为 0.478

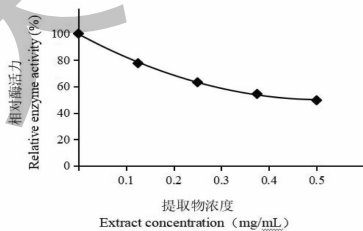


图 6 *S. setonii* 89-2-2 提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Fig. 6 Effect of *S. setonii* 89-2-2 extract on tyrosinase diphenolase activity

mg/mL,随着提取物浓度增大,相对酶活力呈指数下降。

### 2.4 菌株 89-2-2 代谢产物的提取物对黑色素瘤细胞的生物学效应

#### 2.4.1 菌株 89-2-2 提取物对小鼠黑色素瘤 B16 细胞增殖的影响

*Streptomyces setonii* 89-2-2 上清液提取物在 100 ~ 1 000  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内作用细胞 48 ~ 72 h,对黑色素瘤 B16 细胞生长几乎没有抑制作用,如图 7 所示。浓度为 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的 *S. setonii* 89-2-2 提取物作用细胞后,细胞培养 72 h 活力仍能达到 (120.1  $\pm$  0.26)%,阳性对照熊果苷在 31.25 ~ 500  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内作用黑色素瘤 B16 细胞,细胞培养 72 h 后存活率也比较高,与 *S. setonii* 89-2-2 提取物相比差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

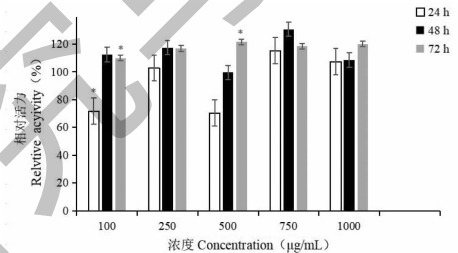


图 7 *S. setonii* 89-2-2

提取物对 B16 细胞增殖率的影响

Fig. 7 Effect of *S. setonii* 89-2-2 extract on the proliferation rate of B16 cells

#### 2.4.2 菌株 89-2-2 提取物对黑色素瘤 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响

与空白组相比,*S. setonii* 89-2-2 提取物在作用 24、48、72 h 后对黑色素瘤 B16 细胞内酪氨酸酶的总活性均具有抑制作用 (见图 8)。用 750  $\mu\text{g/mL}$  和 1 000  $\mu\text{g/mL}$  *S. setonii* 89-2-2 提取物处理细胞,培养 48 h 后细胞内酪氨酸酶活性分别下降至 (53.98  $\pm$  3.05)% 和 (51.92  $\pm$  0.38)%,抑制效果强于 500  $\mu\text{g/mL}$  熊果苷 (实验数据未给出)。随着细胞培养时间的延长,750  $\mu\text{g/mL}$  *S. setonii* 89-2-2 提取物持续地使细胞内酪氨酸酶相对活性降低,细胞培养 72 h 后酪氨酸酶活性与 24 h 相比具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。阳性对照熊果苷作用细胞 72 h 后,随着其浓度的增大和时间的延长细胞内酪氨酸活性反而逐渐增强,其原因可能是熊果苷易降解、抑酶活性不稳定,或者高浓度熊果苷在体外可提高小鼠黑色素瘤细胞的增殖率,促进细胞大量分泌酪氨酸酶,

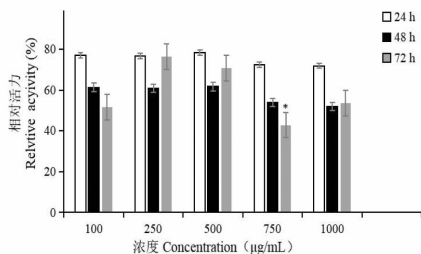


图8 *S. setonii* 89-2-2 提取物对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响

Fig. 8 Effect of *S. setonii* 89-2-2 extract on tyrosinase activity in B16 cells

从而增强酪氨酸酶的活性<sup>[13]</sup>。

### 2.4.3 菌株 89-2-2 提取物对小鼠 B16 细胞内黑色素合成的影响

如表 2 所示,用浓度分别为 100、500 和 1 000 µg/mL 的 *S. setonii* 89-2-2 提取物处理 B16 细胞,培养 48 h 后细胞内黑色素含量分别下降至  $(57.01 \pm 0.8)\%$ 、 $(76.28 \pm 2.90)\%$  和  $(69.59 \pm 0.47)\%$ ,且

表 2 *S. setonii* 89-2-2 提取物对黑色素瘤 B16 细胞内黑色素含量的影响

Table 2 Effect of *S. setonii* 89-2-2 extract on melanin content in melanoma B16 cells

样品 Sample	浓度 Concentration (µg/mL)	黑色素相对含量 Relative content of melanin (%)
<i>S. setonii</i> 89-2-2 提取物 Extract of <i>S. setonii</i> 89-2-2	0	100 <sup>a</sup>
	100	57.01 ± 0.8 <sup>e</sup>
	250	112.95 ± 1.23 <sup>b</sup>
	500	76.28 ± 2.90 <sup>c</sup>
	750	117.23 ± 2.13 <sup>a</sup>
	1 000	69.59 ± 0.47 <sup>d</sup>
熊果苷 Arbutin	31.25	108.00 ± 1.21 <sup>c</sup>
	62.5	116.95 ± 2.63 <sup>a</sup>
	125	116.95 ± 2.63 <sup>a</sup>
	250	50.05 ± 0.62 <sup>e</sup>
	500	60.49 ± 0.84 <sup>d</sup>

注:不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

### 2.6 菌株 89-2-2 发酵条件优化前后差异代谢物的筛选与分析

采用 OPLS-DA 模型第一主成分的 VIP 值(阈值  $> 1$ ),并结合 Student's *t* 检验的 *P* 值(阈值  $< 0.05$ )共筛选出 28 个差异代谢物,发酵条件优化后 *S. setonii* 89-2-2 中上调差异代谢物有 21 个,下调差异代谢物有 7 个,优化前则相反。对上调差异代谢物的

不同浓度处理组之间的差异达到显著性水平( $P < 0.05$ )。表明 100、500 和 1 000 µg/mL *S. setonii* 89-2-2 提取物对 B16 细胞内黑色素合成具有显著的抑制作用。

### 2.5 菌株 89-2-2 代谢物的 UPLC-QTOF-MS 检测分析

前期我们优化了 *S. setonii* 89-2-2 产生酪氨酸酶抑制剂的发酵条件,预实验选取菌株 89-2-2 优化前和优化后的 2 个发酵条件的 12 个实验样本和 3 个质控(quality control, QC)样本。实验样本和 QC 样本的预实验结果表明,样本品质良好,实验方法和仪器平台良好。正式检测实验中菌株 89-2-2 发酵条件优化前后的两组菌体细胞内代谢产物经提取、衍生化,上机检测共得到 5 338 个峰(见图 9)。根据化合物的质荷比、保留时间和保留指数等对化合物进行鉴定,最终推测鉴定化合物 626 个,主要包括维生素类化合物、芳香类化合物、羧酸类化合物及氨基酸类化合物等。

类别进行归类分析发现,它们大多为维生素类化合物、芳香类化合物、羧酸类化合物等,其中维生素类差异代谢物有 10 个,芳香类差异代谢物有 4 个,羧酸类差异代谢物有 9 个,表 3 显示 *S. setonii* 89-2-2 发酵条件优化前后产生的部分差异代谢物。据文献报道维生素类<sup>[14,15]</sup>、芳香类<sup>[16]</sup>和羧酸类<sup>[17]</sup>等小分子化合物对酪氨酸酶活性具有抑制作用。



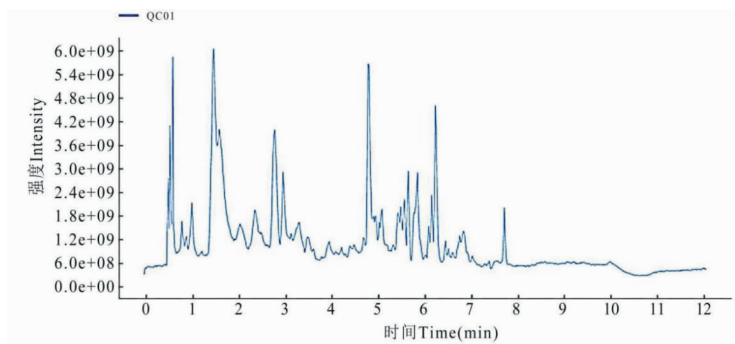


图9 实验样本 UPLC-QTOF-MS 总离子流图

Fig. 9 Total ion chromatogram of UPLC-QTOF-MS of experimental samples

表3 *S. setonii* 89-2-2 发酵条件优化前后产生的部分差异代谢物Table 3 Part of different metabolites produced by *S. setonii* 89-2-2 before and after optimization of fermentation conditions

序号 Number	差异代谢物 Different metabolite	化学式 Chemical formula	VIP value	P value	类别 Category
1	烟酰胺 Niacinamide	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	1.595 082 043	7.81284E-07	维生素
2	吡哆醇 Pyridoxine	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N	1.240 859 75	1.75546E-06	维生素
3	脱硫生物素 Dethiobiotin	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.460 973 081	0.01159271	维生素
4	吡哆醛 Pyridoxal	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	1.139 603 533	0.041958478	维生素
5	生物素 Biotin	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>5</sub> P	1.142 804 082	0.001936226	维生素
6	硫胺素 Thiamine	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS	1.042 988 358	0.011418733	维生素
7	吡哆胺 Pyridoxamine	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.267 368 14	3.56238E-05	维生素
8	没食子酸 Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1.212 676 406	0.00132582	芳香族化合物
9	苯甲醛 Benzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	1.203 591 57	0.025565405	芳香族化合物
10	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.119 260 175	0.000541354	芳香族化合物
11	苯丙氨酸 Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	1.089 599 452	0.006361272	氨基酸
12	4-氨基苯酚 4-Aminophenol	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO	1.560 146 74	3.98146E-06	有机化合物
13	2-羟基苯甲醛 2-Hydroxybenzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1.105 798 936	0.000387054	羰基化合物
14	正壬酸 Pelargonic acid	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1.020 833 825	0.001872484	脂肪酸

### 3 结论

菌株 89-2-2 的最适盐浓度为 5%, 属于中度嗜盐链霉菌。经形态特征、培养特征、生理生化特性、细胞壁化学组分及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定菌株 89-2-2 为西唐氏链霉菌 (*Streptomyces setonii*)。 *Streptomyces setonii* 89-2-2 代谢产物的提取物对体外蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的 IC<sub>50</sub> 为 0.478 mg/mL。在 100 ~ 1 000 μg/mL 浓度范围内, 菌株 89-2-2 提取物对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的增殖没有明显的影响, 但是可显著抑制细胞内酪氨酸酶活性, 有效地降低细胞内黑色素含量; 1 000 μg/mL 提取物作用 B16 细胞 48 h 可使细胞内酪氨酸酶活性下

降 48%, 使黑色素含量降低 31%。代谢组学的检测结果显示 *S. setonii* 89-2-2 发酵条件优化前后产生的差异代谢物主要为维生素类化合物、芳香类化合物和羧酸类化合物, 已有报道证明以上三类物质均具有抑制酪氨酸酶活性的能力。可见, *S. setonii* 89-2-2 是一种具有开发潜力的, 可产生酪氨酸酶抑制剂和黑色素合成抑制剂的良好材料。

### 参考文献

- 1 Wang YF, Li SW, He RJ, et al. Study on the chemical composition of was an cone and its inhibitory activity of tyrosinase[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021,



- 33:1499-1505.
- 2 Zhang CJ, Yu XT, Pan LJ, et al. Inhibitory effect of disrupted supernatant of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 on melanin production[J]. J Tianjin Univ Sci Technol(天津科技大学学报), 2019, 34:15-21.
  - 3 Hu YH, Jia YL, Cheng QX. Research advances in the application of tyrosinase inhibitors[J]. J Xiamen Univ Nat Sci(厦门大学学报:自科版), 2016, 55:760-768.
  - 4 Zhuang YT, Liu RC, Cheng YL, et al. Research progress on extremophiles and their applications[J]. Sci Sin:Vitae(中国科学:生命科学), 2022, 52:204-222.
  - 5 Wang SH. Isolation, purification and physicochemical properties of active substances from *Streptomyces westtangii* Z-L-22[D]. Baoding: Hebei Agricultural University(河北农业大学), 2007.
  - 6 Santillan JY, Muzlera A, Molina M, et al. Microbial degradation of organophosphorus pesticides using whole cells and enzyme extracts[J]. Biodegradation, 2020, 31:423-433.
  - 7 Tamura KC, Peterson DN, Kumar SD, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol, 2011, 28:2731-2739.
  - 8 Xu LH, Li WJ, Liu ZH, et al. Actinomycete Systematics: Principles, Methods and Practice(放线菌系统学:原理、方法及实践)[M]. Beijing: Science Press, 2007.
  - 9 Jiang LY, Li MG, Li WJ, et al. Application of quantitative analysis of cell wall amino acids in the classification of actinomycetes[J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2001, 41:270-277.
  - 10 Fu JH, Guo LY. Extraction of polyphenols from Xinjiang pomegranate peel and its inhibitory effect on tyrosinase[J]. Chin J Bioprocess Eng(生物加工过程), 2015, 13:59-69.
  - 11 Fu JH, Qi R, Zheng J, et al. Inhibition of mushroom tyrosinase by flavonoid from *Sorbus tianschanica* Rupel in Xinjiang[J]. Chin J Bioprocess Eng(生物加工过程), 2015, 13:63-67.
  - 12 Xu T, Yao XD, Wang YM, et al. Analysis of metabolites of *Salinicoccus ventosaetal* B2-3-5 and its mechanism of inhibiting tyrosinase activity[J]. Microbiol China(微生物学通报), 2021, 48:3753-3764.
  - 13 Yan XF, Zhang X, Fan QW. Study on the stability of  $\beta$ -arbutin in cosmetic whitening materials[J]. China Surfactant Deterg Cosmet(日用化学工业), 2019, 49:178-182.
  - 14 Cheng GX, Hu YH, Wang W, et al. Study on the inhibitory mechanism of vitamin B<sub>1</sub> on mushroom tyrosinase[J]. J Xiamen Univ Nat Sci(厦门大学学报:自科版), 2010, 49:558-560.
  - 15 Zhang F, Zhang X, Yang MS, et al. Inhibitory mechanism and types of tetrahydropyrimidine on tyrosinase[J]. J Chin High Alt Med Biol(中国高原医学与生物学杂志), 2021, 42:42-46.
  - 16 Qiao W, Wu XQ, Li F, et al. Study on inhibitory effect of benzaldehyde and its analogs on tyrosinase[J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报:自科版), 2007, 46:41-44.
  - 17 Qiu AD, Gou L, Guo SY. Inhibitory effect of *L*-malic acid on tyrosinase[J]. Food Sci Technol(食品科技), 2010, 11:261-263.