

黑色素生物合成抑制剂产生菌株的筛选^①

徐成勇¹, 申厚风², 陈红菊², 夏欢耕¹, 黎丹辉¹, 王正祥¹, 诸葛健¹

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225001)

摘 要 采集了中国 11 个省的土样和草样共 231 份, 分离出了 1 700 株链霉菌. 筛选结果是 39-24 号菌株在比基尼链霉菌筛选模型中抑制圈的直径为 20 mm, 属于直径较大者; 其黑色素生物合成抑制剂初提物对 CV-1 细胞的急性细胞毒性(致毒质量浓度)为 10 mg/mL, 属于毒性较小者. 根据以上试验结果, 作者确定 39-24 号菌株为黑色素生物合成抑制剂研究的试验菌株.

关键词 黑色素生物合成抑制剂, 菌株, 筛选, 抑制活性, 急性细胞毒性

中图分类号: Q933

文献标识码: A

Screening of the Producing Strain of Melanin Biosynthesis Inhibitor

XU Cheng-yong¹, SHENG Hou-feng², CHEN Hong-jiu²,

XIA Huang-gen¹, LI Dang-hui¹, WANG Zheng-qiang¹, ZHUGE Jian¹

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry Wuxi 214036; 2. The Medical School, Yangzhou University, Yangzhou 225001)

Abstract : Approximately 1 700 *Streptomyces* strains isolated from 231 samples of soil and straw collected in 11 provinces in China were screened. The resulting zone of inhibition of melanin formation of *Streptomyces* sp. No. N39-24 in *Streptomyces bikiniensis* screening model is 20 mm which is one of the biggest; the acute cell toxicity index of its extraction to the CV-1 cell is 10 mg/mL which is one of the smallest. Strain N39-24 was chosen as the strain for the research on the melanin biosynthesis inhibitor based on those experimental results.

Key words : melanin biosynthesis inhibitor, strain, screening, inhibitory activity, acute cell toxicity

随着科学技术的发展, 现今世界化妆品发展的趋势正逐步走向生物化与功能化, 如何满足消费者的愿望、赋予化妆品更高的效能, 是美容科学领域中的一个重要课题. 据统计, 70% 的被调查者认为, 女性的美容障碍之一是各种类型的色素障碍, 如着色斑、痣、雀斑、炎症雀斑和妊娠黑斑. 人们已不喜欢采用粉质遮盖型膏霜, 而需要一种能抑制体内黑色素生成的还原型的膏体.

国际上关于黑色素生物合成抑制剂的研究, 除曲酸外, 其它均还处于产生菌株的筛选阶段. 1990 年, Tomita 等^[1]报道了用比基尼链霉菌(*Streptomyces bikiniensis*)筛选黑色素生物合成抑制剂的一种新方法, 利用在 ISP No. 7 培养基上能够产生黑色素的 *S. bikiniensis* NRRL B-1049 作为指示菌, 筛选放线菌来源的发酵液. 1991 年 Imae 等^[2]报道: 在利用指示菌 *S. bikiniensis* NRRL B-1049 筛选黑

① 收稿日期: 1999-05-21; 修订日期: 99-07-08

作者简介: 徐成勇(1967 年 6 月生), 男, 安徽桐城人, 发酵工程博士研究生.

色素生物合成抑制剂过程中 ,分别从 *Streptomyces calvus* No. N924-1 和 *Streptomyces clavifer* No. N924-2 的发酵液中分离出新的化合物 BMY-28565 和 BMY-28566. 1993 年 Komiyama 等^[3]从 *Streptomyces* sp OH-3984 的发酵液中分离出了新的黑色素生物合成抑制剂 OH-3984K1 和 K2. 1993 年 Takamatsu 等^[4]研究了 OH-3948K1 和 K2 的理化特性和结构. 1997 年 Lee 等^[5,6]从真菌 *Trichoderma harzianum* 的发酵液中分离出了新的黑色素合成抑制剂 MR566A 和 MR566B ,并对其分类、发酵、分离、生物学特性和理化特性、结构式鉴定进行了研究. 1997 年郑榕等^[7]从棘孢小单孢福建亚种 No. 80-A18(*Micromonospora echinospora* subsp. *fujianensis*) No. 80-A18)的发酵液中提取黑色素生物合成抑制剂 MA-18 ,经过纯化和理化性质鉴别 ,根据元素分析、EI-MS 和¹³ C-NMR 的结果 ,确定了其分子式.

微生物的不同类群可以产生种类繁多的次生代谢产物 ,它们是自然界有机物的重要来源 ,而且大多不易用现代化学方法人工合成. Tanaka 曾指出放线菌是生物活性物质最主要的来源. 作者期望从自然界放线菌资源中获得具有抑制黑色素生物合成活性的高产菌株 ,以便为研制新的高效增白化妆品打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

表 1 土样中筛选得到的黑色素生物合成抑制剂产生菌株

Tab.1 Producing strains of melanin biosynthesis inhibitors isolated from soil samples				
菌株编号	土 样 来 源	采样日期	抑制圈直径/mm	
11-4	四川省西昌市郊砂土	1997-08-01	15	
13-14	四川省乐山市扑凤洲砂土	1997-08-10	20	
13-17	四川省乐山市扑凤洲砂土	1997-08-10	19	
33-1	四川省乐山市扑凤洲泥土	1997-08-10	20	
34-11	四川省苏稽峨眉河淤泥土	1997-08-14	23	
37-19	湖南省源江市郊湖边草坡土	1997-08-20	20	
39-13	浙江省杭州市郊水田土	1997-10-05	20	
39-24	浙江省杭州市郊水田土	1997-10-05	20	
44-1	浙江省诸暨市枫桥镇新店湾桑树林土	1997-11-20	18	
47-3	浙江省诸暨市枫桥镇新店湾针叶林土	1997-11-20	21	
59-2	江西省鹰潭市龙虎山镇水田土	1997-11-22	20	
89-11	福建省漳平市芦芝乡沟边竹林土	1997-11-24	20	
110-5	广东省兴宁市郊红薯地土	1997-11-27	23	
125-6	广东省肇庆市禄步镇菜地土	1997-11-29	22	
206-2	安徽省绩溪县镇头乡灌木丛树根围土	1997-12-09	22	
207-5	安徽省绩溪县镇头乡山溪边草地土	1997-12-09	22	
211-8	河南省洛阳市面粉厂泥土	1997-10-02	21	
218-6	安徽省桐城市青草镇菜园土	1998-02-03	18	

1.1.1 菌种 指示菌 :比基尼链霉菌 NRRL B-1049(*Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049 sub-species bikiniensis) ,由美国 National Center for Agricultural Utilization Res 的 David P Labda 博士提供.

1.1.2 培养基 斜面培养基、平板培养基和发酵培养基 ,配方见参考文献 [1]和[8].

1.1.3 供试细胞 CV-1 细胞由扬州大学医学院提供.

1.2 方法

1.2.1 比基尼链霉菌模型筛选方法 见参考文献 [1].

1.2.2 急性细胞毒性的测定方法 见参考文献 [9].

2 结果和讨论

2.1 黑色素生物合成抑制剂产生菌株的筛选

将待筛选的 1 700 株链霉菌接种于发酵培养基 ,摇瓶发酵后将其发酵液用比基尼链霉菌筛选模型进行筛选. 结果共得到 200 株阳性产生菌株. 再将这 200 株阳性产生菌株重复筛选、检测 ,通过比较抑制圈直径的大小 ,从中选得 18 株抑制圈直径较大的黑色素生物合成抑制剂产生菌株 ,见表 1.

2.2 黑色素生物合成抑制剂的初提取

黑色素生物合成抑制剂阳性产生菌株接种于高氏合成 1 号琼脂斜面 ,28 ℃ 培养 7 d ,保存于 4 ℃ 的冰箱.

一铂环成熟的斜面孢子接入 100 mL 发酵培养基(500 mL 的三角瓶)中,28 ℃ 振荡(100 r/min)培养 8 d.培养基的成分(g/dL):葡萄糖 2.0 ,豆饼粉 2.0 ,CaCO₃ 0.5 ;pH 7.0.

发酵液经离心,上清液加活性炭用搅动泵搅动过夜.离心得活性炭后加蒸馏水搅动洗涤,再离心收集活性炭.活性炭加 80% 丙酮水溶液搅动混匀,过滤得丙酮洗脱液,洗脱液经旋转蒸发仪浓缩至干,即得黑色素生物合成抑制剂初提物.

2.3 黑色素生物合成抑制剂产生菌株的急性细胞毒性试验

显微镜下观察 CV-1 细胞的形态:当加入的样

品溶液对 CV-1 细胞没有毒性时, CV-1 细胞维持以前长成的正常状况,即 CV-1 细胞呈梭形,且贴壁单层致密生长,如图 1 所示;当加入的样品溶液对 CV-1 细胞有毒性时,细胞发生病变,细胞圆缩,折光性增强,并从孔壁脱落,如图 2 所示.

样品溶液的急性细胞毒性的大小与发生病变的细胞数量成正比,即发生病变的细胞数量越多,表明样品溶液的急性细胞毒性越大.

急性细胞毒性在 48 h 以后表现比较稳定,18 株产生菌的黑色素生物合成抑制剂初提物的急性细胞毒性试验结果(48 h 观察的记录)列于表 2.

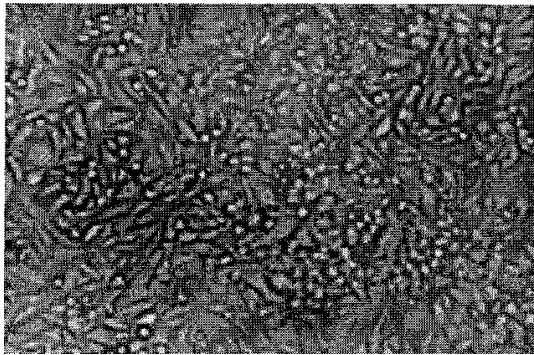


图 1 CV-1 细胞的正常细胞形态
Fig.1 Normal cell shape of CV-1

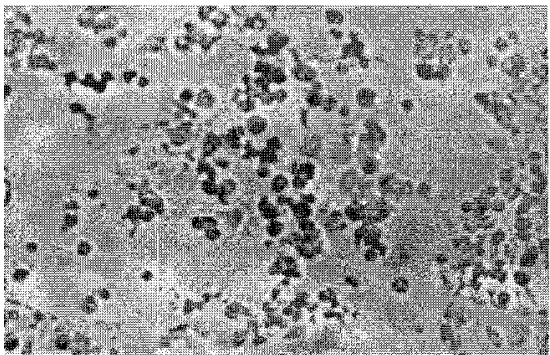


图 2 CV-1 细胞的病变细胞形态
Fig.2 Pathological cell shape of CV-1

表 2 18 株产生菌的黑色素生物合成抑制剂初提物的急性细胞毒性试验结果
Tab.2 Acute cell toxicity of crudely purified melanin biosynthesis inhibitors from 18 producing strains

	10 ⁻¹	20 ⁻¹	40 ⁻¹	80 ⁻¹	160 ⁻¹	320 ⁻¹	640 ⁻¹	1280 ⁻¹	2560 ⁻¹	5210	维持液对照
11-4	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13-14	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13-17	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
33-1	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34-1	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
37-19	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39-13	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39-24	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44-1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
59-2	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
89-11	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
110-5	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
125-6	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
206-2	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
207-5	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
211-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
218-6	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: + 25%细胞发生病变; +++ 75%细胞发生病变; - 细胞没有发生病变;
++ 50%细胞发生病变; ++++ 100%细胞发生病变

3 结 论

对 1 700 株链霉菌进行筛选的结果是 :由表 2 可见 编号为 39-24、44-1、218-6 的菌株产生的黑色素生物合成抑制剂初提物的急性细胞毒性最小 ,且

处于同一水平 ,为 10 mg/mL ;由表 1 可见 ,编号为 39-24 的菌株的抑制圈直径较大 ,为 20 mm 根据以上试验结果 ,作者确定 39-24 号菌株为黑色素生物合成抑制剂研究的试验菌株 .

参考文献

[1] TOMITA K , ODA N , OHBAYASHI M , et al. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*[J]. *J Antibiot* , 1990 43(12) :1601~1605

[2] IMAE K , KAMACHI H , YAMASHITA H , et al. Synthesis , stereochemistry , and biological properties of the depigmenting agents , melanostatin , feldamycin and analogs[J]. *J Antibiot* , 1991 44(1) :76~85

[3] KOMIYAMA K , TAKAMATSU S , TAKAHASHI Y , et al. New inhibitors of melanogenesis , OH-3948 K1 and K2(I) [J]. *J Antibiot* , 1993 46(10) :1520~1525

[4] TAKAMATSU S. New inhibitors of melanogenesis , OH-3948 K1 and K2(II) [J]. *J Antibiot* , 1993 , 46(10) :1526~1529

[5] LEE C H , KOSHINO M , CHUNG M C , et al. MR304A , a new melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*[J]. *J Antibiot* , 1997 50(6) :469~473

[6] LEE C H , CHUNG M C , LEE H J , et al. MR93A , a new oxazole from *Trichoderma harzianum*[J]. *J Antibiot* , 1997 , 50(6) :474~478

[7] 郑榕 林永珠 陈磊 等 . 黑色素生物合成抑制剂 MA-18 化学结构和生物学活性的研究[J]. 中国 抗生素杂志 , 1997 , 22(1) :8~11

[8] ISHIHARA Y , OKA M , TSUNAKAWA M , et al. Melanostatin , a new melanin synthesis inhibitor[J]. *J Antibiot* , 1991 44(1) :25~32

[9] 黄祯祥主编 . 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京 : 科学出版社 , 1990 .

(责任编辑 : 秦和平)