



## 研究报告

## 盐水球菌 *Salinicoccus ventosaetal* B2-3-5 的代谢产物分析及其抑制酪氨酸酶活性的机制

徐彤<sup>△</sup> 姚雪丹<sup>△</sup> 王玉苗 王俊 付建红\* 孙浩然 沙柳圆

新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830054

**摘要:** 【背景】酪氨酸酶是黑色素合成过程中的关键酶,也是引起人体色素障碍性疾病和产生果蔬酶促褐变的主要原因。目前,酪氨酸酶抑制剂的开发已引起广泛关注,但一些酪氨酸酶抑制剂如熊果苷、曲酸等均存在一定的安全隐患。微生物资源丰富且具有许多优点,从微生物中寻找特异性强、高效的酪氨酸酶抑制剂已成为该领域研究的热点。【目的】通过测定分离自新疆乌鲁木齐达坂城盐湖的盐水球菌 *Salinicoccus ventosaetal* B2-3-5 和 B6-1-4 代谢物提取物对酪氨酸酶活性的影响,比较 2 株菌发酵过程中代谢物的差异,了解所筛选菌株 B2-3-5 抑制酪氨酸酶活性的机制。【方法】以曲酸为阳性对照分别测定 B2-3-5 和 B6-1-4 这 2 个菌株发酵产生的代谢物提取物对蘑菇酪氨酸酶的抑制活性;应用 LC-MS 代谢组学方法检测 2 株菌在相同条件下产生的所有代谢物质;采用单变量、多元变量、正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination Analysis, OPLS-DA)法识别差异代谢物;利用层次聚类分析(Hierarchical Cluster Analysis, HCA)法对识别的差异物进行聚类分析;通过 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)代谢通路对比法分析这些差异代谢物主要参与的代谢途径。【结果】菌株 B2-3-5 代谢物提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率为 67%,其  $IC_{50}$  为 0.277 mg/mL,同属菌株 B6-1-4 代谢物提取物则对酪氨酸酶无抑制活性。采用代谢组学的检测方法从 2 株菌的代谢物中筛选出 63 个差异代谢物,其中氨基酸类化合物、维生素类化合物和羧酸类化合物的种类及相对含量均是 B2-3-5 菌株明显高于 B6-1-4 菌株。通过代谢途径分析发现这些差异代谢物主要参与 15 个代谢通路,其中维生素 B6 生物合成通路的影响较为显著。【结论】推测 B2-3-5 菌株可能是通过增加一些氨基酸类、维生素类及羧酸类等小分子化合物的含量来抑制酪氨酸酶活性。维生素 B6 代谢途径的上调也表明菌体细胞可通过产生维生素 B6 与酪氨酸酶中的必需氨基作用或清除酶催化循环过程中产生的活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)来抑制酪氨酸酶活性。

**关键词:** 盐水球菌属, 代谢产物, 酪氨酸酶抑制剂, 维生素 B6

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31660249); Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang Key Laboratory Project (XJTSWZ-2018-01)

<sup>△</sup>These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: Tel: 86-991-3693666; E-mail: fjh\_719@163.com

Received: 25-12-2020; Accepted: 04-03-2021; Published online: 06-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31660249); 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室项目(XJTSWZ-2018-01)

<sup>△</sup>对本文贡献相同

\*通信作者: Tel: 0991-3693666; E-mail: fjh\_719@163.com

收稿日期: 2020-12-25; 接受日期: 2021-03-04; 网络首发日期: 2021-04-06

## Analysis of metabolites from *Salinicoccus ventosaetal* B2-3-5 and their inhibitory mechanism of tyrosinase activity

XU Tong<sup>Δ</sup> YAO Xuedan<sup>Δ</sup> WANG Yumiao WANG Jun FU Jianhong\* SUN Haoran  
SHA Liuyuan

Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China

**Abstract:** [Background] Tyrosinase is the key enzyme of melanin biosynthesis, which easily causes the pigment disorders and enzymatic browning of fruits and vegetables. At present, the development on tyrosinase inhibitor has obtained more and more attention. However some tyrosinase inhibitors have certain potential safety hazards, such as arbutin and kojic acid. Microorganisms are rich in resources and have many advantages. It has become a spot to search for tyrosinase inhibitors with strong specificity and high efficiency from microorganisms. [Objective] We investigated the effects of metabolite extracts of *Salinicoccus ventosaetal* strains B2-3-5 and B6-1-4 isolated from dabancheng Salt Lake of Urumqi in Xinjiang on tyrosinase activity. And also compared metabolic differences between the two strains during the fermentation. The aim of this study was to understand the inhibitory mechanism of tyrosinase activity of the strain B2-3-5. [Methods] Taken kojic acid as positive control, we determined the inhibitory effects of metabolite extracts produced by the two strains B2-3-5 and B6-1-4 on mushroom tyrosinase, respectively. We detected all the metabolites of the two strains under the same fermentation conditions by liquid chromatograph-mass spectrometer. We identified metabolic differences with univariate and multivariate analysis, Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination Analysis (OPLS-DA) method. We carried out cluster analysis on the identified differential metabolites by Hierarchical Cluster Analysis (HCA) method and searched the differential metabolic pathways through the databases kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). [Results] These findings indicated that the inhibitory effects of metabolite extracts of the strain B2-3-5 on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase was 67% and its  $IC_{50}$  was estimated as 0.277 mg/mL, while the metabolite extracts of the strain B6-1-4 among the same genus had no inhibitory activity. We obtained 63 differential metabolites from the two strains by metabolomics methods. The types and relative contents of amino acids, vitamins and carboxylic acids were significantly higher in B2-3-5 than those in B6-1-4. The results of metabolic pathway analysis showed that these differential metabolites were mainly participated in 15 metabolic pathways, among which vitamin B6 biosynthesis pathway had the highest correlation with differential metabolites and fermentation process. [Conclusion] We speculated that the strain B2-3-5 might increase the contents of some small molecular compounds such as amino acids, vitamins and carboxylic acids, etc. to inhibit the tyrosinase activity. The upregulation of vitamin B6 biosynthesis pathway also suggested that the strain had the inhibitory activity of tyrosinase through producing vitamin B6 to interact with the essential amino group in tyrosinase or scavenging the reactive oxygen species (ROS) during the enzymatic catalytic process.

**Keywords:** *Salinicoccus*, metabolites, tyrosinase inhibitor, vitamin B6

酪氨酸酶(Tyrosinase)又称多酚氧化酶,是一种含铜氧化还原酶,广泛存在于微生物和动植物中<sup>[1]</sup>。酪氨酸酶是黑色素合成过程的限速酶,在黑色素的生物合成过程中起着极其重要的作用,当酪氨酸酶过量表达时可能会引起人体的黑色素瘤和果蔬褐变等<sup>[2-3]</sup>。酪氨酸酶抑制剂可以抑制酪氨酸

酶的表达,应用于美容保健、色素型皮肤病治疗、病虫害防治及食品保鲜等多个领域,但目前发现的一些酪氨酸酶抑制剂如曲酸等均存在一定的安全隐患,因此寻找安全、高效的酪氨酸酶抑制剂受到越来越多人的关注<sup>[4]</sup>。微生物资源具有数量多、分布广、易于培养等优点,从微生物中寻找特异、高

效的酪氨酸酶抑制剂已成为目前研究的热点。刘肖肖<sup>[5]</sup>发现古尼拟青霉(*Paecilomyces gunnii*)菌丝提取物对酪氨酸酶活性具有较高的抑制作用,半抑制浓度( $IC_{50}$ )为 0.048 mg/mL。田敏等<sup>[6]</sup>研究发现一株链霉菌产生的代谢产物 H7264A 和 H7263B 对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制作用较高,  $IC_{50}$  分别为 120  $\mu$ g/mL 和 200  $\mu$ g/mL。

基于高通量、多变量数据的代谢组学可对生物体内的小分子代谢物进行分析,其中,非靶标代谢组学是无偏向性地分析样品中尽可能多的代谢物,而且已在临床医学、生物学、食品等领域广泛应用<sup>[7-8]</sup>。目前,微生物代谢组学已应用于微生物代谢工程、微生物突变体筛选、微生物发酵工艺的优化以及微生物降解环境污染物等方面。Dalluge 等<sup>[9]</sup>利用 LC-MS 技术分析发酵过程中的微生物细胞代谢物,发现微生物产生的氨基酸变化与发酵过程的动力学变化之间具有密切关系。Li 等<sup>[10]</sup>采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(Ultra High Performance Liquid Tandem Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry, UPLC-QTOF-MS)的代谢组学技术对氨基酸、胆汁、脂肪酸、葡萄糖等代谢途径进行研究,证实了乳杆菌可改善高脂饲料喂养的高脂血症大鼠模型的症状,并对其代谢产物产生影响。可见,微生物代谢组学的快速发展加快了微生物次级代谢物和代谢途径的挖掘,为更好地利用微生物造福人类奠定了基础<sup>[11]</sup>。

本研究基于 UPLC-QTOF-MS 非靶向代谢组学技术分析 2 株分离自盐水的盐水球菌属菌株的代谢产物,利用化学计量学方法如主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discrimination Analysis, OPLS-DA)对所得数据进行建模分析,进而筛选 2 株菌的差异代谢物。将识别的差异代谢物进行可视化的聚类分析,通过 KEGG 代谢通路对比,分析差异代谢物主要参与的代谢途径,以期为进一步了解酪氨酸酶抑制剂产生菌 B2-3-5 的抑制

机理和探讨主要代谢物的调控途径奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

盐水球菌属(*S. ventosaetal*)菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 由本课题组自行分离并保藏。

#### 1.1.2 培养基

参照文献[12]的方法配制改良 CM 培养基。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

乙酸乙酯(分析纯)、丙酮(分析纯),天津北联精细化学品开发公司;二甲基亚砜(DMSO)、蘑菇酪氨酸酶(比活力为 5 340 U/mg)、L-多巴(L-DOPA)、曲酸, Sigma 公司。恒温培养箱,上海博讯仪器公司;恒温培养振荡器,上海智域分析仪器制造有限公司;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;高速冷冻离心机,郑州长城科工贸有限公司;液-质联用仪, Waters 公司;分光光度计,贝克曼库尔特有限公司;超高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司。

### 1.2 细菌代谢产物粗提物的制备

将菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 接种于 100 mL 改良 CM 液体培养基中,37 °C、150 r/min 振荡培养 48 h, 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。菌体先用 60%丙酮浸提,然后用超声波破碎仪破碎细胞(200 W, 工作 30 s、间歇 30 s 至菌液透明), 4 °C、6 000 r/min 离心 30 min 后的上清液用乙酸乙酯萃取,分别收集乙酸乙酯相和丙酮水相,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。

### 1.3 细菌代谢产物的提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的影响

#### 1.3.1 细菌提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶抑制率的测定

参考文献[12]的方法测定 2 株细菌代谢产物的提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性的抑制率。

### 1.3.2 细菌提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶 $IC_{50}$ 的测定

将细菌丙酮水相样品冻干后得到的提取物溶于含 5% DMSO 的磷酸盐缓冲液中,制成浓度分别为 0、0.125、0.250、0.375 和 0.500 mg/mL 的细菌代谢产物的提取物溶液。细菌提取物对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性  $IC_{50}$  的测定方法参照文献[1]。

### 1.4 2 株细菌淬灭及其代谢物提取

将菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 分别接种于 10 mL 改良 CM 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养 48 h。采用乙腈:甲醇:水体积比为 2:2:1 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 °C 孵育 1 h, 4 °C、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  $\mu$ L 50%乙腈复溶, 涡旋 30 s, 冰水浴超声 10 min; 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min, 取 75  $\mu$ L 上清液于进样瓶中进行 LC-MS 分析。

### 1.5 LC-MS 检测

使用超高效液相色谱仪, 通过液相色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (1.7  $\mu$ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm)对目标化合物进行分离。液相色谱 A 相是水相, 含 25 mmol/L 氨水和 25 mmol/L 乙酸铵; B 相是乙腈。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 °C, 样品盘温度为 4 °C, 进样体积正离子和负离子均为 2  $\mu$ L。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。

### 1.6 数据处理和分析

对实验检测的数据进行去噪和标准化处理之后, 使用 SIMCA 软件(V15.0.2)进行一系列的多元变量模式识别分析, 包括 PCA 和 OPLS-DA。本研究使用的卡值标准为学生  $t$  检验的  $P < 0.05$ , 同时 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (Variable Importance in the Projection, VIP) > 1。用 2 个菌株差异代谢物的定量值先计算出欧式距离

矩阵, 然后采用完全连锁方法对差异代谢物进行聚类, 并借助热力图来呈现<sup>[13]</sup>。基于最新版 KEGG 数据库找到所有差异代谢物参与的通路, 通过富集分析和拓扑分析对通路进一步筛选, 找到对代谢物差异性影响最显著的关键通路。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌代谢产物的提取物对蘑菇酪氨酸酶活性的影响

分别制备盐水球菌属菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 代谢产物的丙酮提取物, 用乙酸乙酯萃取, 获得的 6 个不同部位样品参照文献[12]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, 菌株 B2-3-5 的菌体丙酮水相部位的酶活性抑制率最高为 67%, 其上清液的酶活抑制率为 43%, 菌体乙酸乙酯相部位的酶活抑制率最低, 仅为 13%; 而 B6-1-4 菌株的 3 个不同部位的样品对蘑菇酪氨酸酶二酚酶活性均无抑制作用。

在以 L-DOPA 为底物的测酶活体系中, 加入不同质量浓度的细菌代谢产物提取物溶液, 以不加提取物为对照, 测定相对酶活力, 结果见图 1。由图 1 可知, 细菌代谢产物的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 0.277 mg/mL, 随着提取物质量浓度的增大, 相对酶活力呈指数下降。

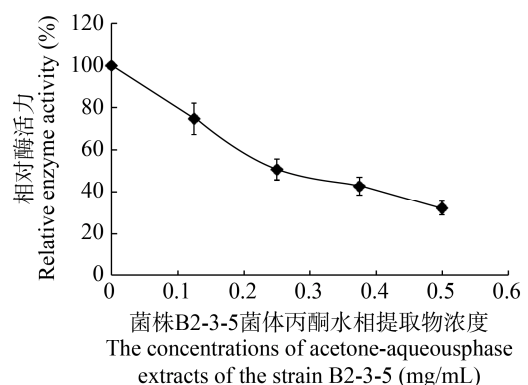


图1 菌株 B2-3-5 代谢产物的提取物对酪氨酸酶二酚酶活力的影响

Figure 1 Effect of metabolite extracts of the strain B2-3-5 on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase

## 2.2 细菌代谢物的 UPLC-QTOF-MS 检测分析

预实验选取 2 个细菌的 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 B2-3-5 和 B6-1-4 这 2 组菌体细胞内代谢产物经提取、衍生化, 上机检测共得到 2 444 个峰(图 2)。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 1 084 个, 主要包括维生素类、脂质及类脂质类、氨基酸类、羧酸类等化合物。

## 2.3 多变量数据分析

PCA 是一种通过正交变换将一组观测的可能相关变量转换为线性不相关变量即主成分, 并提供一幅比较低维度的图像(二维或三维)的统计方法。使用 SIMCA 15.0 软件对数据进行对数转换和中心

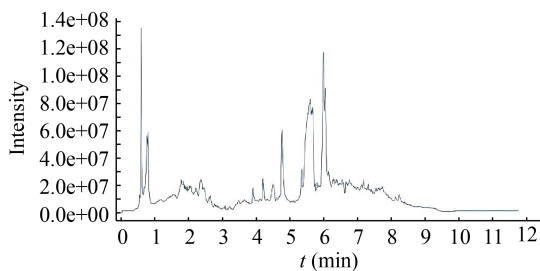


图 2 实验样本 UPLC-QTOF-MS 总离子流图  
Figure 2 Total ion chromatogram of experimental samples under the condition of UPLC-QTOF-MS

化格式化处理, 然后进行自动建模分析, 获得的  $R^2X(\text{cum})$  为 0.804。从 PCA 得分图(图 3A)可以看到, 横坐标表示第一主成分 PC1, 纵坐标表示第二主成分 PC2, 图中每个点代表一个样品, 不同颜色和形状代表不同组别, 样品全部处于 95%置信区间内。结果显示, 盐水球菌属 2 个菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 的 2 组样本不同组别相对集中、区分明显, 组内各样本之间分离趋势也很明显, 表明 B2-3-5 组和 B6-1-4 组的代谢物在主成分上存在显著性差异。

OPLS-DA 相比 PCA 分析具有更好的表现分组间差异的能力。通过 SIMCA 软件分析获得 OPLS-DA 模型参数  $R^2Y=0.99$  和  $Q^2=0.961$ , 表明该模型具有较高的准确性和预测能力。从 OPLS-DA 得分图(图 3B)可以看出, 2 组样本之间的区分非常显著, 样本全部处于 95%置信区间内, 该结果与 PCA 的结果大体一致, 数据值得进一步研究。采用置换检验评估模型的可靠性, 置换检验循环的次数为 200 次。从图 4 可以看出不同菌株样本的原模型  $R^2Y$  和  $Q^2$  的结果均接近 1, 说明建立的模型能够表现出样本的真实情况, 并且从原模型可以发现 2 组样本差异性明显。置换检验随机模型的  $Q^2$  值均小于原模型的  $Q^2$  值;  $Q^2$  的回归线与纵轴的截距为 -1.03; 当置换保留度逐渐降低时, 置换的  $Y$  变量比例增大, 随机模型的  $Q^2$  逐渐下降。表明原模型稳健性良好, 不存在过拟合的现象。

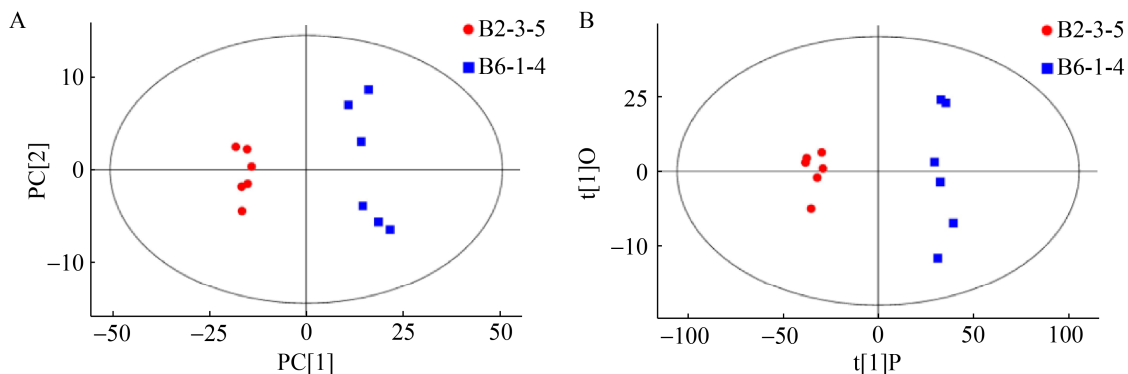


图 3 B2-3-5 组与 B6-1-4 组的化合物差异模型得分散点图  
Figure 3 Score scatter plot of the models for group B2-3-5 vs B6-1-4

注: A: PCA 模型得分散点图; B: OPLS-DA 模型得分散点图

Note: A: Score scatter plot of PCA model; B: Score scatter plot of OPLS-DA model



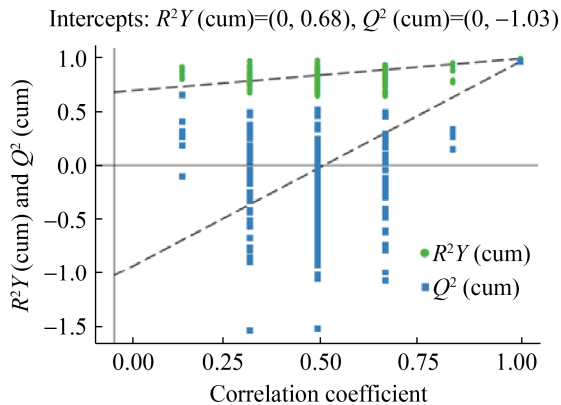


图4 B2-3-5组对B6-1-4组OPLS-DA模型的置换检验结果

Figure 4 Permutation test of OPLS-DA model for group B2-3-5 vs B6-1-4

## 2.4 差异代谢物的筛选与分析

对2株盐水球菌属菌株B2-3-5和B6-1-4培养48 h的代谢物进行UPLC-QTOF-MS检测分析,共检测到1 084个代谢物。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2株菌的差异代

谢物63个,B2-3-5菌株中上调差异代谢物有53个,下调差异代谢物有10个,B6-1-4菌株则相反。对这些差异代谢物的类别进行归类分析发现,它们大多为氨基酸及其衍生物、羧酸类化合物、维生素类化合物等,其中羧酸类差异代谢物有23个,氨基酸类差异代谢物有10个,维生素类差异代谢物有9个,表1显示菌株B2-3-5和B6-1-4发酵产生的部分差异代谢物。

将筛选出来的差异代谢物进行可视化的聚类分析,并用热图(图5)呈现。图5中的每一行代表一个差异代谢物,每一列代表一个样本,不同颜色表示不同的强度,颜色从蓝色到红色,表示强度从低到高。从图5可以看出,检测的12个样本中,B2-3-5和B6-1-4的差异代谢物在组内和组间都具有一定的离散程度,2株菌具有明显的代谢物分组差异。

进一步分析筛选出的差异代谢物在所有样品中的含量,发现在B2-3-5体系中有19种相对含量较高的羧酸类化合物,以苯甲酸、水杨酸、柠檬

表1 菌株B2-3-5和B6-1-4部分差异代谢物

Table 1 Part of different metabolites of strains B2-3-5 and B6-1-4

序号 Number	差异代谢物 Different metabolites	化学式 Chemical formula	VIP value	<i>P</i> value	类别 Category
1	DL-homocysteine	$C_4H_9NO_2S$	1.286 254 176	1.387 25E-06	Amino acids
2	Gamma-glutamylcysteine	$C_8H_{14}N_2O_5S$	1.139 509 251	0.027 923 051	Amino acids
3	L-homocysteic acid	$C_4H_9NO_3S$	1.240 859 750	1.755 46E-06	Amino acids
4	Formylanthranilic acid	$C_8H_7NO_3$	1.023 991 626	0.002 039 927	Carboxylic acids
5	Benzoic acid	$C_7H_6O_2$	1.118 927 702	0.011 893 934	Carboxylic acids
6	Salicylic acid	$C_7H_6O_3$	1.208 064 003	0.003 581 473	Carboxylic acids
7	4-methoxycinnamic acid	$C_{10}H_{10}O_3$	1.297 538 809	1.577 81E-07	Carboxylic acids
8	Trans-cinnamate	$C_9H_8O_2$	1.053 954 135	0.007 065 881	Carboxylic acids
9	Citraconic acid	$C_5H_6O_4$	1.238 093 971	8.367 72E-07	Carboxylic acids
10	3-aminobenzoic acid	$H_2NC_6H_4CO_2H$	1.112 274 438	2.832 08E-05	Carboxylic acids
11	Phe-Phe	$C_8H_7N$	1.214 213 177	7.503 55E-06	Carboxylic acids
12	Trans-2-hydroxycinnamic acid	$C_9H_8O_3$	1.310 055 220	0.000 309 778	Carboxylic acids
13	Pyridoxal (Vitamin B6)	$C_8H_9NO_3$	1.292 819 267	0.000 135 305	Vitamins
14	Pyridoxamine (PM)	$C_8H_{12}N_2O_2$	1.312 418 126	8.094 09E-05	Vitamins
15	Pyridoxine	$C_8H_{11}NO_3$	1.292 891 844	4.008 76E-09	Vitamins
16	Thiamine	$C_{12}H_{17}N_4OS$	1.252 052 473	0.006 695 427	Vitamins

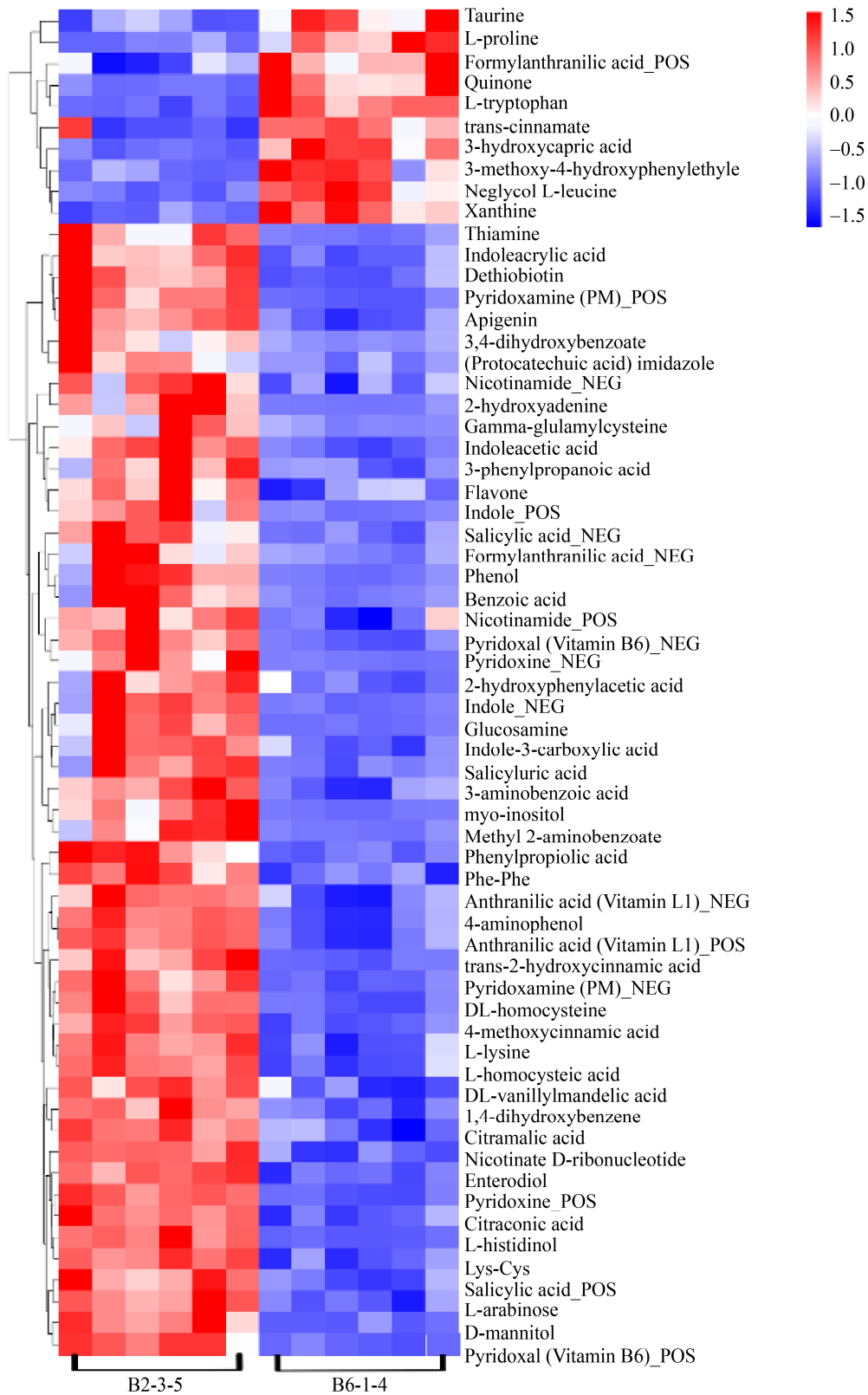


图 5 B2-3-5 组对 B6-1-4 组的层次聚类分析热图

Figure 5 Heatmap of hierarchical clustering analysis for group B2-3-5 vs B6-1-4

酸等衍生物为主。这有可能因为它们所包含的羧基是强吸电子基,可抑制酪氨酸酶氧化态(Eoxy)中氧原子与芳环的取代反应,使 Eoxy 与之形成的化合物成了终端化合物,导致酪氨酸酶的浓度降低,进而抑制黑色素的合成<sup>[14]</sup>。B6-1-4 体系中仅有 4 种相对含量较高的羧酸类物质如 3-羟基癸酸等。

B2-3-5 中相对含量较高的氨基酸及其衍生物有 7 种,包括 DL-同型半胱氨酸、L-组氨酸、赖氨酸-半胱氨酸、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸、L-同型半胱氨酸、L-赖氨酸、D-半胱氨酸,其中以半胱氨酸类衍生物为主,半胱氨酸可以通过抑制酪氨酸酶单酚酶和二酚酶的活性,导致细菌细胞内酪氨酸酶活性下降,进而使细菌内的氨基酸类代谢物量发生变化而产生差异<sup>[15]</sup>。在 B6-1-4 体系中相对含量较高的氨基酸及其衍生物有 3 种如 L-亮氨酸、L-脯氨酸和 L-色氨酸。

在 B2-3-5 中检测到 9 种相对含量较高的维生素类化合物,如吡哆醛(PL)、吡哆醇(PN)、吡哆胺(PM)、硫胺素(维生素 B1)、邻氨基苯甲酸(维生素 L1)、烟酰胺(维生素 B3)、对氨基苯甲酸(维生素 Bx)、脱硫生物素(维生素 BH)、磷酸腺嘌呤(维生素 B4),而在 B6-1-4 中这些维生素类化合物的相对含量较低。PL、PN 和 PM 是维生素 B6 的 3 种转化形式,因此维生素 B6 和维生素 B1 这 2 种维生素的相对含量在 2 个菌株的发酵体系中差异很大。据文献报道,维生素 B6 和维生素 B1 均对酪氨酸酶具有抑制效应<sup>[16-17]</sup>。维生素 B6 具有强氧化作用,可通过与酪氨酸酶中的必需氨基相互作用或清除酶催化循环过程中产生的活性氧来抑制酪氨酸酶活性<sup>[16]</sup>;维生素 B1 可以和游离酶的底物进行可逆性的竞争,通过与游离酶结合对酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活力均有抑制作用,抑制类型为竞争型抑制<sup>[17]</sup>。

此外,在 B2-3-5 样品中还检出了相对含量较高的 2-羟基腺嘌呤、咪唑、N-乙酰-5-羟色胺、吡啶等杂环类化合物,说明 2 菌株在发酵过程中的代谢产物丰富多样,而且 2 菌株的代谢物之间存

在明显差异。

## 2.5 差异代谢物的代谢途径分析

基于 KEGG 注释分析找到所有差异代谢物参与的通路,通过对差异代谢物的代谢通路进行富集分析和拓扑分析,进一步筛选找到与代谢物差异相关性最高的关键通路 15 个,结果如表 2 所示。由表 2 可知,有 8 个差异代谢物参与了氨基酸生物合成途径,这与 B2-3-5 菌株中半胱氨酸及其衍生物的合成占优势有直接关系;参与苯丙氨酸代谢的差异代谢物有 6 个,参与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径的差异代谢物有 6 个,参与芳香族化合物降解的差异代谢物有 6 个,参与氨基苯甲酸酯降解的差异代谢物有 7 个,参与安息香酸盐降解的差异代谢物有 3 个。这些代谢途径产生较大的差异很可能是 B2-3-5 和 B6-1-4 这 2 个菌株在芳香族氨基酸合成与苯甲酸盐降解代谢途径上有明显的不同,这也表明 B2-3-5 菌株在发酵过程中产生一些与芳香族氨基酸合成、氨基苯甲酸酯降解共有的含苯环中间产物,这些含苯环的抑制剂可与酪氨酸酶结合而抑制酶的活性。此外,在这些差异代谢物中参与 ABC 运输的有 7 个,参与抗生素生物合成的有 8 个,参与色氨酸代谢途径的有 8 个,这主要是因为 B2-3-5 和 B6-1-4 为同属而不同种的菌株,使得菌株的代谢物具有一定的差异性。

气泡图(图 6)显示了代谢途径分析的结果。气泡图中每一个代谢通路用一个气泡表示,富集分析的  $P$  值 $[-\ln P \text{ value}]$ 用图中纵坐标和气泡颜色表示,气泡颜色越深  $P$  值越小,富集程度越显著;该通路在拓扑分析中的影响因子大小用横坐标和气泡大小表示,气泡越大表示影响因子越大。从图 6 可以看出,菌株 B2-3-5 相对于菌株 B6-1-4 的代谢通路中,维生素 B6 的代谢通路影响最为显著。

维生素 B6 (吡哆醇)和维生素 B1 均是良好的抗氧化剂,参与机体重要的生理代谢,能维持和提高机体的代谢率,并且保证良好的皮肤代谢<sup>[18]</sup>。维生素 B6 的辅酶形式 5'-磷酸吡哆醛(Pyridoxal-5-Phosphate,



表 2 差异代谢物涉及的代谢通路

Table 2 The main pathways of the differential metabolites participated in

序号 Number	代谢通路名称 Metabolic pathway	差异代谢物数量 The amounts of different metabolites	总代谢物数量 The amounts of total metabolites
1	ABC transporters	7	43
2	Biosynthesis of antibiotics	8	38
3	Biosynthesis of amino acids	8	31
4	Phenylalanine metabolism	6	9
5	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	6	11
6	Degradation of aromatic compounds	6	10
7	Tryptophan metabolism	8	12
8	Aminobenzoate degradation	7	9
9	Benzoate degradation	3	3
10	Tyrosine metabolism	2	14
11	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1	5
12	Glutathione metabolism	1	5
13	2-oxocarboxylic acid metabolism	3	9
14	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	3	8
15	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2	4

PLP)和天然维生素 B6 化合物的其他 5 种相互转换的形式: PN、PL、PM、5'-磷酸吡哆醇(Pyridoxine-5-Phosphate, PNP)、5'-磷酸吡哆胺(Pyridoxamine-5-Phosphate, PMP)均存在于自然界中, 其生物合成途径如图 7 所示。维生素 B6 主要在烟酸生物合成、核酸合成、硫胺素生物合成、氨基酸代谢、强氧化剂和葡萄糖代谢等方面发挥重要作用。研究表明, 酪氨酸酶需要氧或活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)才能将 L-酪氨酸氧化为 3-羟基-L-酪氨酸, 然后再氧化为 L-多巴醌, 最后

聚合形成黑色素, 而维生素 B6 可以通过与酪氨酸酶中的必需氨基相互作用或清除酶催化循环过程中产生的 ROS, 进而抑制酪氨酸酶活性。王鲁梅等<sup>[18]</sup>报道了维生素 B1、维生素 B6 和维生素 B12 对人 A375 黑素瘤细胞的生长、酪氨酸酶活性及黑色素生成的影响具有双向的调节作用。我们根据差异代谢物的筛选与分析结果, 推测维生素 B6 的合成和代谢途径很可能在菌株 B2-3-5 抑制酪氨酸酶活性中发挥重要作用。

### 3 讨论

酪氨酸酶是生物体内黑色素合成的关键酶, 通过抑制酪氨酸酶活性或阻断酪氨酸生成黑色素过程中的氧化反应, 可减少黑色素的产生。目前获得的酪氨酸酶抑制剂大多数来源于动植物, 而微生物源酪氨酸酶抑制剂的研究报道较少。微生物生长迅速、易于培养, 应利用其合成人们所需的代谢物产品。本研究通过测定菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 的代谢产物提取物对酪氨酸酶活性的影响, 发现菌株 B2-3-5 丙酮水相部位的酶活性抑制率达 67%,  $IC_{50}$  为 0.277 mg/mL, 菌株 B6-1-4 的代谢产物提取

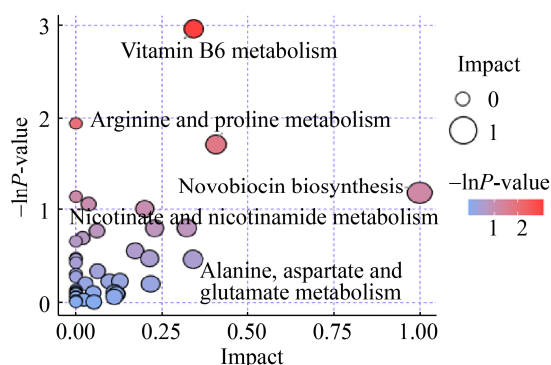


图 6 B2-3-5 对 B6-1-4 的通路分析图

Figure 6 Pathway analysis for group B2-3-5 vs B6-1-4

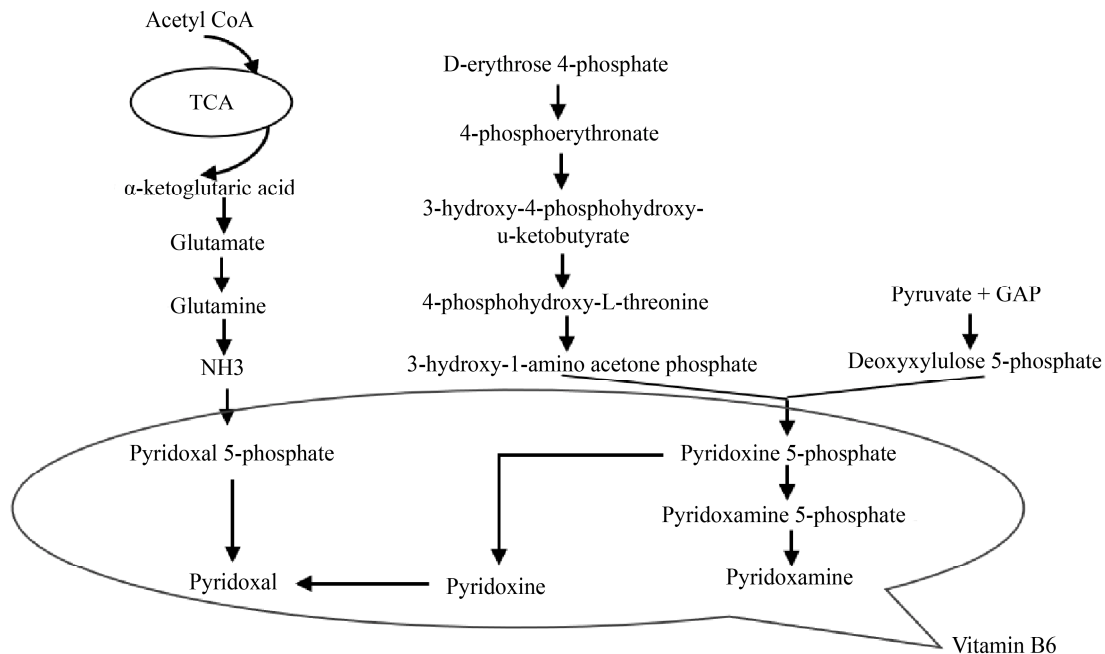


图7 维生素 B6 的生物合成途径

Figure 7 Biosynthetic pathways of vitamin B6

物则对酪氨酸酶无抑制作用，表明菌株 B2-3-5 的代谢物中存在具有抑制酪氨酸酶活性能力的物质。

采用 UPLC-QTOF-MS 方法检测 2 个菌株的代谢物，发现羧酸类化合物如苯甲酸、水杨酸、柠檬酸等在菌株 B2-3-5 中相对含量较高，已有报道证明这些物质具有抑制酪氨酸酶活性的能力。刘晓丹等<sup>[19]</sup>发现苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性均有抑制作用，其效应为可逆抑制效应，同时测定导致单酚酶活力和二酚酶活力下降 50% 的苯甲酸的浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 1.20 mmol/L 和 1.00 mmol/L。周虹<sup>[20]</sup>研究发现 10.0 g/L 柠檬酸对苹果中的多酚氧化酶活性的抑制作用可达到 17.6%。菌株 B2-3-5 中相对含量较高的氨基酸以半胱氨酸为主，半胱氨酸是常见的酪氨酸酶抑制剂。方庆秋<sup>[21]</sup>发现随着 L-半胱氨酸浓度的增加，其对单酚酶活性的抑制作用也不断增强。Maillard 等<sup>[22]</sup>研究发现半胱氨酸不论加热与否都不会对酶促褐变过程中的氧气消耗情况产生影响，但是对表观发生的褐变会产生明显的抑制作用。另外，在菌株

B2-3-5 中检测到维生素 B6 和维生素 B1 的相对含量较高。Yokochi 等<sup>[16]</sup>实验证明维生素 B6 可通过与酪氨酸酶中的必需氨基相互作用或者清除单线态氧而抑制酪氨酸酶活性。陈桂霞等<sup>[17]</sup>测定了维生素 B6 对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶活力的  $IC_{50}$  分别为 15 mmol/L 和 11.7 mmol/L。

本研究利用代谢组学的检测方法对比了菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 的所有差异的代谢物质，菌株 B2-3-5 中苯甲酸、柠檬酸、半胱氨酸、维生素 B6 和维生素 B1 等代谢物的含量上调，在一定程度上解释了菌株 B2-3-5 代谢产物的提取物具有抑制酪氨酸酶活性的原因。对所有代谢物的代谢通路进行分析发现，维生素 B6 代谢通路在所有通路中相关性最高，结合差异代谢物的分析结果认为维生素 B6 是菌株 B2-3-5 的重要差异代谢物，因此推测维生素 B6 的合成和代谢途径与菌株 B2-3-5 具有抑制酪氨酸酶活性的能力密切相关。通过对维生素 B6 代谢通路的进一步分析表明，其与糖酵解、三羧酸循环 (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA) 等代谢

途径相连,在实际应用过程中可通过微生物育种和培养条件优化等方法影响其代谢过程,使菌株 B2-3-5 最大限度地合成酪氨酸酶抑制剂。目前, *S. ventosaetal* 及其代谢产物具有酪氨酸酶活性抑制作用的研究尚未见报道,本研究结果对于产酪氨酸酶抑制剂菌株的研发及其抑酶机理的探讨具有深远的影响。

#### 4 结论

(1) 本研究采用 UPLC-QTOF-MS 技术检测盐水球菌属 2 个菌株 B2-3-5 和 B6-1-4 的所有代谢物,共鉴定到 1 084 个化合物。通过多元变量分析筛选出 63 个差异代谢物,归类分析发现这些代谢物大多为维生素类化合物、氨基酸及其衍生物和羧酸类化合物。

(2) 2 株菌的差异代谢物分析结果表明,菌株 B2-3-5 中上调差异代谢物包括苯甲酸、柠檬酸、水杨酸、半胱氨酸、维生素 B6 和维生素 B1 等,推测这些物质的高表达可能是菌株 B2-3-5 具有抑制酪氨酸酶活性的原因之一。

(3) 通过 KEGG 代谢路径对比,差异代谢物主要参与的代谢通路集中在芳香族氨基酸合成与苯甲酸盐降解等 15 个相关代谢通路,说明 B2-3-5 菌株在发酵过程中产生一些含苯环的中间产物,这些物质可与酪氨酸酶结合从而抑制酶的活性。

(4) 在菌株 B2-3-5 的所有代谢通路中影响最为显著的是维生素 B6 代谢通路,其连接糖酵解、TCA 循环等代谢途径,这对于该功能菌株的代谢调控研究具有重要的指导意义。

致谢: 本文在研究中得到新疆师范大学校级重点学科生物学学科、中亚区域有害生物联合控制国际研究中心的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

#### REFERENCES

[1] Fu JH, Qi R, Zheng J, Zhou CJ, Chen QX. Inhibition of mushroom tyrosinase by flavonoid from *Sorbus tianschanica* Rupr in Xinjiang[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(4): 63-67 (in Chinese)  
付建红, 祁瑞, 郑静, 周晨婕, 陈清西. 新疆天山花楸黄酮类物质对酪氨酸酶的抑制机制[J]. 生物加工过程, 2015,

13(4): 63-67

[2] Zhu L, Zhang SQ, Wen N, Yu M, Li ZG. Study on metabolism enzyme kinetics of a natural novel tyrosinase inhibitor UP302 in rat liver microsome by LC-MS/MS[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(21): 1665-1669 (in Chinese)  
朱凌, 张双庆, 闻隰, 于敏, 李佐刚. LC-MS/MS 研究新型酪氨酸酶抑制剂 UP302 在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(21): 1665-1669

[3] Fu JH, Guo LY. Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol extracts from Xinjiang pomegranate peel[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(3): 59-63,69 (in Chinese)  
付建红, 郭丽艳. 新疆石榴皮多酚的提取及其对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 生物加工过程, 2015, 13(3): 59-63,69

[4] Hu YH, Jia YL, Chen QX. Research progress in the application of tyrosinase inhibitor[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2016, 55(5): 760-768 (in Chinese)  
胡泳华, 贾玉龙, 陈清西. 酪氨酸酶抑制剂的应用研究进展[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2016, 55(5): 760-768

[5] Liu XX. Screening, isolation and identification for tyrosinase inhibitors from extracts of entomogenous fungi[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2013 (in Chinese)  
刘肖肖. 虫生菌提取物中酪氨酸酶抑制剂的筛选及分离鉴定[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2013

[6] Tian M, Liu Y, Yu D, Lu Q. Studies on H7264A and B, melanin biosynthesis inhibitors from microorganism[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2002, 27(2): 84-86,120 (in Chinese)  
田敏, 刘瑜, 俞朵, 陆群. 微生物来源的黑色素生物合成抑制剂 H7264 的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(2): 84-86,120

[7] Sumner LW, Lei ZT, Nikolau BJ, Saito K. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects[J]. Natural Product Reports, 2015, 32(2): 212-229

[8] Zhang ZJ, Liu HF, Sun JL, Zhao BL, Pan LZ, He W, Liu JJ. Analysis of differential metabolites in cabernet sauvignon skins from different rootstock-scion combinations by non-targeted metabolomics[J]. Food Science, 2020, 41(24): 22-30 (in Chinese)  
章智钧, 刘怀锋, 孙军利, 赵宝龙, 潘立忠, 何旺, 刘晶晶. 非靶向代谢组学对赤霞珠果皮不同砧穗组合差异代谢物的分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 22-30

[9] Dalluge JJ, Hashizume T, McCloskey JA. Quantitative measurement of dihydrouridine in RNA using psotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry

- (LC/MS)[J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(16): 3242-3245
- [10] Li C, Cao J, Nie SP, Zhu KX, Xiong T, Xie MY. Serum metabolomics analysis for biomarker of *Lactobacillus plantarum* NCU116 on hyperlipidaemic rat model feed by high fat diet[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 42: 171-176
- [11] Yu W, Gao JQ, Zhou YJ. Application of proteomics and metabolomics in microbial metabolic engineering[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(8): 798-805 (in Chinese)  
禹伟, 高教琪, 周雍进. 蛋白质组学和代谢组学在微生物代谢工程中的应用[J]. *色谱*, 2019, 37(8): 798-805
- [12] Fu JH, Yang XP, Xie Q, Zhong XY, Zhang WX, Gan T. Isolation of culturable bacteria from saline-alkali soil in Qitai and screening of strains of inhibiting melanin biosynthesis[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2017, 15(6): 74-79 (in Chinese)  
付建红, 杨新平, 谢芹, 仲晓燕, 张婉昕, 甘甜. 奇台黑碱土可培养细菌的分离及抑制黑色素合成活性菌株的筛选[J]. *生物加工过程*, 2017, 15(6): 74-79
- [13] Feng YC. Metabolomics analysis of rice (*Oryza sativa* L.) in main production area of Heilongjiang province based on GC-MS technology[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019 (in Chinese)  
冯玉超. 基于 GC-MS 技术的黑龙江省主产区水稻(*Oryza sativa* L.)代谢组学分析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2019
- [14] Chen QX, Lin JF, Song KK. Development of tyrosinase inhibitors[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2007, 46(2): 274-282 (in Chinese)  
陈清西, 林建峰, 宋康康. 酪氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(2): 274-282
- [15] Xu HN. Study of the inhibition capacity of Maillard reaction products derived from cysteine on tyrosinase-catalyzed enzymatic browning[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2017 (in Chinese)  
徐海宁. 半胱氨酸美拉德反应产物抑制酪氨酸酶促褐变的研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2017
- [16] Yokochi N, Morita T, Yagi T. Inhibition of diphenolase activity of tyrosinase by vitamin B6 compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(9): 2733-2736
- [17] Chen GX, Hu YH, Wang W, Qiu L, Song KK, Chen QX. Inhibitory kinetics and mechanism of vitamin B1 on the activities of mushroom tyrosinase[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2010, 49(4): 558-560 (in Chinese)  
陈桂霞, 胡泳华, 王伟, 邱凌, 宋康康, 陈清西. 维生素 B1 对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2010, 49(4): 558-560
- [18] Wang LM, Li JJ, Yuan JT. Therapeutic effect of compound VB combined with halometasone ointment on vitiligo in minors[J]. *Chinese Journal of Misdiagnostics*, 2011, 11(16): 3888-3889 (in Chinese)  
王鲁梅, 李俊杰, 袁景桃. 复合维生素 B 联合卤米松乳膏治疗未成年人白癜风疗效观察[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 11(16): 3888-3889
- [19] Liu XD, Huang H, Chen QX. Studies on inhibitory effects of benzoic acid on mushroom tyrosinase[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2003, 42(1): 102-106 (in Chinese)  
刘晓丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(1): 102-106
- [20] Zhou H. Inhibition of polyphenol oxidase in apple by ascorbic acid citric acid and sodium chloride[J]. *Modern Commodity Inspection Science and Technique*, 1994, 4(6): 56-59 (in Chinese)  
周虹. 抗坏血酸、柠檬酸和氯化钠对苹果中多酚氧化酶的抑制作用[J]. *现代商检科技*, 1994, 4(6): 56-59
- [21] Fang QQ. Kinetics of inhibition of tyrosinase by L-cysteine[J]. *Science and Technology Information*, 2015, 13(18): 116-117 (in Chinese)  
方庆秋. L-半胱氨酸对酪氨酸酶的抑制酪氨酸酶催化动力学[J]. *科技资讯*, 2015, 13(18): 116-117
- [22] Maillard MN, Billaud C, Chow YN, Ordonaud C, Nicolas J. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40(8): 1434-1444