

## 嗜鹽菌 *Haloferax mediterranei* 紅色色素之抗氧化與美白活性之評估

何宜倩<sup>1\*</sup> 蕭湘琳<sup>2</sup> 高家珍<sup>1</sup> 林銘澤<sup>3</sup>

<sup>1</sup>耕莘健康管理專科學校全人教育中心

<sup>2</sup>耕莘健康管理專科學校化妝品應用與管理科

<sup>3</sup>大同大學生物工程系

E-mail:yichien@ctcn.edu.tw

### 摘要

嗜鹽菌 *Haloferax mediterranei* 於醱酵培養時並不容易被污染，因此可節省醱酵程序過程中及無菌處理等費用。與其他嗜鹽菌不同的是，*H. mediterranei* 的生長速度較快，且其具有  $\alpha$ -amylase，可以澱粉為主要碳源，並不需要特殊的碳源為養分，可以生產 bacterioruberin 等類胡蘿蔔素。過去研究發現，從 *H. mediterranei* 萃取得的類胡蘿蔔素具有抗氧化、降低黑色素生成及對 HepG2 肝癌細胞具細胞毒性，可誘發癌細胞進行細胞凋亡。因此本計畫將研究利用 *H. mediterranei* 生產之 bacterioruberin (hmC3)，探討其體外抗氧化活性與美白活性。結果證實，bacterioruberin 在各種抗氧化能力的表現皆優於 BHA 與  $\beta$ -carotene，此外更可有效抑制斑馬魚之黑色素形成。

**關鍵字：**嗜鹽菌、酪胺酸酶活性、抗氧化活性、美白活性。

### 1.前言

嗜鹽菌 *Haloferax mediterranei* 於醱酵培養時並不容易被污染，因此可節省醱酵程序過程中及無菌處理等費用，與其他嗜鹽菌不同的是，*H. mediterranei* 的生長速度較快，且其具有  $\alpha$ -amylase，可以澱粉為主要碳源，並不需要特殊的碳源為養分，可以生產 bacterioruberin 等類胡蘿蔔素。過去研究發現，從 *H. mediterranei* 萃取得的類胡蘿蔔素具有抗氧化、降低黑色素生成及對 HepG2 肝癌細胞具細胞毒性，可誘發癌細胞進行細胞凋亡。

本計畫將探討由 *H. mediterranei* 產生之紅色色素所純化出之 bacterioruberin 之抗氧化與美白活性。結果證實，bacterioruberin 之 DPPH 自由基清除的能力與總抗氧化力 (ABTS, radical cation decolorization assay) 分析方面，依序為 trolox 的 0.8 與 1.7 倍； $\beta$ -carotene 的 1.7 與 4.1 倍，其總抗氧化力也優於 BHA。此外在螯合亞鐵離子能力上，bacterioruberin 為 EDTA 螯合能力的 77%。

因此，本計畫也進一步研究利用 *H. mediterranei* 生產之 bacterioruberin，探討其美白活性及其機制。結果證實，以受精 9 小時之斑馬魚胚胎進行實驗，斑馬魚在經 400 nM bacterioruberin 處理 54 小時後，可明顯抑制斑馬魚體內黑色素之形成。此外，取 400 nM bacterioruberin 處理 48 小時後的斑馬魚胚胎 100 個，在蛋白質萃取液中以超音波破碎並將萃取之蛋白質定量後，分析其 tyrosinase 活性，發現斑馬魚體內酪胺酸酶含量亦有輕微降低，可見 bacterioruberin 確實可有效抑制斑馬魚之黑色素形成。

### 2.實驗方法

#### 2.1 體外抗氧化活性分析

### 2.1.1 總抗氧化力(ABTS radical cation decolorization assay)測定

ABTS (2, 2'-Azino-bis- [ 3-ethylbenthiazoline sulfonic acid ] )與 peroxidase (metmyoglobin)及  $H_2O_2$  反應，會產生 ABTS<sup>+</sup>。此為一相當穩定藍—綠色物質，於波長 734 nm 有吸收波峰。抗氧化劑的加入會抑制此顏色的產生，因此吸光值愈低，抗氧化效果愈佳。取 0.5 ml peroxidase、0.5 ml ABTS 溶液以及 3.5 mL  $H_2O_2$  混合均勻，待產生安定藍綠色之 ABTS<sup>+</sup> 陽離子自由基後(6 分鐘)，加入不同濃度的 trolox 樣品，以分光光度計測 734nm 之吸光值，做成 trolox 之檢量線，樣品的檢測同上，測得後再由 trolox 的檢量線，換算其相當的濃度(mM)。

### 2.1.2 清除 $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基能力之測定

油脂在自氧化的過程中會產生自由基而造成油脂酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫(hydrogen doner)來清除脂質過氧化物自由基(peroxyl radical)進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行，在抗氧化的研究上通常使用 DPPH 來評估抗氧化的供氫能力。DPPH 之甲醇或乙醇溶液在 517 nm 下會有強吸光，但是被抗氧化劑(AH)還原時則吸光值降低，因此在 517 nm 的吸光值愈低即表示抗氧化劑的供氫能力愈強。取 4 ml 不同濃度的樣品，加入 1 ml 新鮮配製的 10 mM DPPH 甲醇或乙醇溶液，振盪混合均勻，於室溫下靜置 30 min 後，使用分光光度計檢測 517 nm 之吸光值。測試清除 DPPH 自由基能力，可同時與傳統抗氧化劑，如 BHA 比較，以評估其抗氧化性。清除率(scavenging effect %) = [1 - (樣品於 517 nm 的吸光值) / (未添加樣品之控制組於 517 nm 的吸光值)] × 100。

### 2.1.3 螯合鐵能力之測定

金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由 redox cycle 反應，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中， $Fe^{2+}$  經常是最具影響力的助氧化劑，其會促進脂質氧化作用的進行。利用  $Fe^{2+}$  與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，可測得樣品對  $Fe^{2+}$  離子的螯合能力。當樣品螯合  $Fe^{2+}$  離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低。



取 1 ml 不同濃度的樣品及控制組，加入 3.7 ml 的 methanol，先加入 2 mM 的  $FeCl_2$  0.1 ml，30 秒後再加入 5 mM 的 ferrozine 0.2 ml，反應 10 分鐘後，檢測 562 nm 的吸光值。吸光值越低表示樣品螯合亞鐵離子的能力越強。螯合鐵能力百分比(Chelating effects %) = [1 - (樣品於 562 nm 的吸光值) / (未添加樣品之控制組於 562 nm 的吸光值)] × 100。

## 2.2 斑馬魚胚胎美白能力之動物試驗評估

### 2.2.1 魚飼養

依照 Choi 等人(2007)之方法飼養，每缸魚約飼養 20 隻，於 28.5°C、14/10 明暗處理飼養，每天飼養 3 次。

### 2.2.2 魚胚胎處理

以微量滴管將斑馬魚胚胎約 4 個轉移至含 200  $\mu$ l 胚胎培養基之 96-well plate 中，胚胎培養基中含有溶解於 DMSO 中之不同濃度的測試用標準品與純化後的 carotenoids (DMSO 的終濃度為 0.1%)，每天觀察胚胎發育外型，以及黑色素生成之變化，同時以 0.2mM PTU 為黑色素抑制的 positive control，而添加  $\alpha$ -MSH (melogenic stimulator) 促進黑色素生成。

### 2.2.3 體外抑制酪氨酸酵素活性試驗測定

取經處理 48 小時後的斑馬魚胚胎 100 個，以超音波破碎後，依據 Kim 等人(2002)之方法，分析

tyrosinase 活性。其方法為取含不同濃度之 test sample 40 $\mu$ l，依序加入 80 $\mu$ l 磷酸緩衝溶液及 40 $\mu$ l L-DOPA 混合，置於 37 $^{\circ}$ C 之恆溫震盪槽中震盪 10 min 後，再加 40 $\mu$ l 酪氨酸酵素後使其反應 25 分鐘，以 UV-Visible spectrophotometer 檢測其 475nm 下的吸光值(A<sub>t</sub>)，當成這個實驗的給藥組。

此外，另設置一個酪氨酸酵素的空白組 A0，實驗步驟和給藥組完全一樣，但是以等體積的純水取代酪氨酸酵素，並且以等體積的磷酸緩衝溶液取代 test sample，為這個實驗的控制組 Ab。另外分別以熊果素(arbutin)、麴酸(kojic acid)代替 test sample，當成正對照組(positive control groups)。Tyrosinase activity 之測定流程如下：

|            | At         | A0            | Ab                |
|------------|------------|---------------|-------------------|
| sample     | 40 $\mu$ l | 40 $\mu$ l    | 40 $\mu$ l buffer |
| buffer     | 80 $\mu$ l | 80 $\mu$ l    | 80 $\mu$ l        |
| L-DOPA     | 40 $\mu$ l | 40 $\mu$ l    | 40 $\mu$ l        |
| tyrosinase | 40 $\mu$ l | 純水 40 $\mu$ l | 40 $\mu$ l        |

抑制率百分率計算公式：

$$\text{抑制}\% = (\text{Ab} - (\text{At} - \text{A0})) / \text{Ab} \times 100$$

### 3.結果與討論

由 *H. mediterranei* 產生之紅色色素所純化出之 bacterioruberin 之抗氧化活性方面，結果如表1所示，bacterioruberin 之 DPPH 自由基清除的能力與總抗氧化力，依序為 trolox 的 0.8 與 1.7 倍； $\beta$ -carotene 的 1.7 與 4.1 倍，此外其 DPPH 自由基清除能力雖近似於 BHA，但總抗氧化力也遠高於 BHA。此外在螯合亞鐵離子能力上，bacterioruberin 為 EDTA 螯合能力的 77%。

表1 Bacterioruberin 與 trolox、BHA、EDTA 和  $\beta$ -carotene 的抗氧化與螯合亞鐵離子能力之相關百分比

Table 1 The relative antioxidation and chelating effect on ferrous ions of bacterioruberin compare to trolox, BHA, EDTA and  $\beta$ -carotene.

|                           | Relative antioxidation (%) |       |           |
|---------------------------|----------------------------|-------|-----------|
|                           | DPPH                       | ABTS  | Chelation |
| Trolox                    | 100                        | 100   | --        |
| BHA                       | 88.9                       | 82.7  | --        |
| EDTA                      | --                         | --    | 100       |
| $\beta$ -carotene         | 46.3                       | 41.4  | 4.8       |
| hmC3<br>(bacterioruberin) | 80.2                       | 171.2 | 77        |

如圖 1 與圖 2 所示，以不同劑量 (4 - 400 nM) bacterioruberin 對受精 9 小時之斑馬魚胚胎進行黑色素形成影響試驗，結果發現，高濃度 (40 與 400 nM) bacterioruberin 會抑制斑馬魚體內黑色素之形成，以 400 nM bacterioruberin 處理 54 小時後，可明顯抑制斑馬魚體內黑色素之形成。

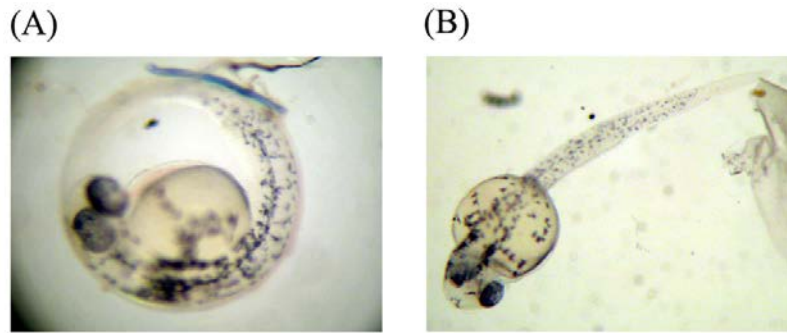


圖1 受精後9小時之斑馬魚胚胎形態

Figure 1 The embryo and zebrafish morphologies after 9 h post-fertilization (hpf). (A) Lateral views of zebrafish embryo after 9 h post-fertilization (hpf). (B) Dorsal fish view after broken the membrane of zebrafish embryo from 9 h post-fertilization (hpf).

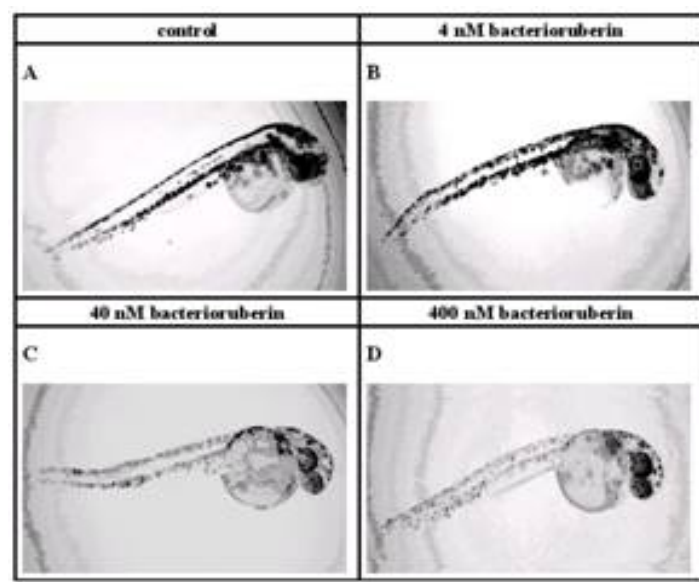


圖 2 Bacterioruberin 對斑馬魚色素形成之影響

Figure 2 Effects of bacterioruberin with various concentrations on the pigmentation of zebrafish. Synchronized embryos were treated with bacterioruberin at the indicated concentrations. Test compounds were dissolved in 0.1% DMSO, then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the phase-contrast microscopy. Lateral views of embryos were treated with bacterioruberin of 4, 40 and 400 nM for 48 hrs (B–D), untreated zebrafish embryo as a water control (A).

此外於 bacterioruberin 與熊果素(arbutin)、麴酸(kojic acid)、PTU 等黑色素生成抑制劑對斑馬魚體內酪胺酸酶含量影響之試驗上，取以 400 nM bacterioruberin 處理 48 小時後的斑馬魚胚胎 100 個，以超音波破碎並將萃取之蛋白質定量後，分析其 tyrosinase 活性。如圖 3 所示，結果發現斑馬魚體內酪胺酸酶含

量亦有輕微降低。因此，可初步判定 bacterioruberin 是經由抑制斑馬魚體內酪胺酸酶形成之機制，以達到有效抑制斑馬魚體內黑色素形成之作用，但詳細作用機制尚待進一步研究探討。

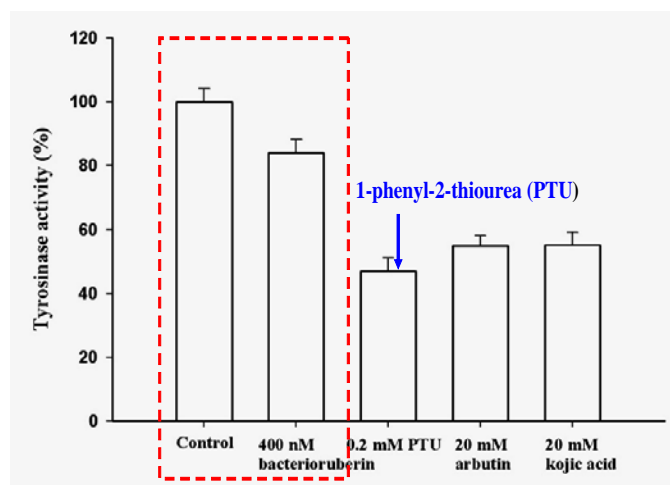


圖 3 黑色素生成抑制劑對斑馬魚體內酪胺酸酶含量之影響

**Figure 3 Effects of melanogenic inhibitors on the tyrosinase in zebrafish. For measurement of tyrosinase activity, 250  $\mu$ g of total protein was incubated with L-DOPA (final 0.5 mM), and then quantified using spectrometer. The results are shown as percentage of control. All experiment was repeated three times.**

綜合上述實驗，抗氧化分析結果顯示相同濃度的 bacterioruberin 的抗氧化能力都高於  $\beta$ -carotene 的抗氧化能力，特別是在亞鐵離子螯合能力 bacterioruberin 的表現相較於  $\beta$ -carotene 高出 16 倍；且相同濃度的 bacterioruberin 在總抗氧化力的分析數據都比 trolox、BHA 與  $\beta$ -carotene 的抗氧化能力強（表 1）。

Bacterioruberin 中含有 bacterioruberin 的成分，是一個長碳鏈的結構，擁有 13 個共軛雙鍵，兩端為開環結構且各有兩個 hydroxy group。先前的研究指出，類胡蘿蔔素對於抗氧化有良好的效果，且研究顯示  $\beta$ -carotene 在體外藉由碳鏈的斷裂可以有效的清除自由基以及移除單旋氧 (singlet oxygen;  $^1\text{O}_2$ )。而茄紅素 (lycopene) 在胡蘿蔔素對體外單旋氧 (singlet oxygen;  $^1\text{O}_2$ ) 的清除效果最為顯著 (Miller et al., 1996)。此外由於 bacterioruberin 中內含 bacterioruberin 的結構類似 lycopene 都屬於兩端非環的結構，且在結構上都擁有大量的共軛雙鍵。依據 Miller 於 1996 年的發表，類胡蘿蔔素對於 ABTS $^{\cdot+}$  自由基陽離子的清除能力之 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) value 為 lycopene (2.9 mM) >  $\beta$ -carotene (1.9 mM) > zeaxanthin (1.4 mM) > astaxanthin (0.03 mM) 與其結構上所擁有的共軛雙鍵數、兩端是否為環狀及結構上擁有 carbonyl group 以及 hydroxyl group 有關。本實驗結果顯示在抗氧化能力表現方面 bacterioruberin 優於  $\beta$ -carotene，可能是由於 bacterioruberin 在結構上比  $\beta$ -carotene 擁有更多的共軛雙鍵，且在兩端的結構上 bacterioruberin 與 lycopene 同屬於非環狀的結構，因此 bacterioruberin 與 lycopene 在抗氧化的表現上都優於  $\beta$ -carotene。

此外因作者們已發現以 *H. mediterranei* 產生之紅色色素處理 B16-F0 黑色素細胞 48 小時後，其細胞的存活率及減少黑色素細胞中黑色素量隨著處理的劑量增加而減少之現象 (Ho et al., 2006)。本實驗亦進一步以純化自 *H. mediterranei* 產生之紅色色素 bacterioruberin (hmC3) 處理黑色素細胞，可能因對細胞的

毒性太強，以致細胞大量死亡無法明顯看到單位細胞的黑色素量大量減少，因此進行體內美白能力之動物試驗評估 (Choi *et al.*, 2007)，也於斑馬魚胚胎美白能力評估中發現以 400 nM bacterioruberin 處理 54 小時後，可明顯抑制斑馬魚體內黑色素之形成，並由實驗初步判定 bacterioruberin 是經由抑制斑馬魚體內酪胺酸酶形成之機制，以達到有效抑制斑馬魚體內黑色素形成之作用，但詳細作用機制尚待進一步研究。

## 誌謝

101 年度耕莘健康管理專科學校專題研究計畫，*CTCN-101-14*。

## 參考文獻

- 何宜倩(2008)。樟芝之保肝以及啤酒花與*Haloferax mediterranei* 酒精萃取物之抗肝癌細胞活性之研究。博士論文，大同大學生物工程研究所。
- Asker D, & Ohta Y. (2002). *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 729–738.
- Bhuvanewari V, & Nagini S. (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 5, 627-635.
- Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, & Yoon TJ. (2007). Zebrafish as a new model for phenotype-based ascreening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res*, 20, 120-127.
- Ho YC, Lin MT, & Chen CW. (2006). The effect of red pigment from *Haloferax mediterranei* on the growth and pigmentation of cultured melanocytes. The 12th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, PA-26.
- Hantz HL, Young LF, & Martin KR. (2005). Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Exp. Biol. Med*, 230, 171-179.
- Higuera-Ciajara I, Felix-Valenzuela L, & Goycoolea FM. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46, 185-196.
- Hsiao G, Fong TH, Tzu NH, Lin KH, Chou DS, & Sheu JR. (2004). A potent antioxidant, lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats. *In Vivo*, 18, 351-356.
- Jung GD, Yang JY, Song ES, & Park JW. (2001). Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Experiment Mol Medic*, 33, 131-135.
- Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, & Kim Y. (2002). Oxyresveratrol and Hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem*, 277, 16340 – 16344.
- Kushwaha SC, & Kates M. (1976). Effect of nicotine on biosynthesis of C<sub>50</sub> carotenoids in *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Biochem*, 54, 824–829.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, BramLey PM, & Rice-Evans CA. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384, 240-242.
- Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, Masuda M, Osaka Y, Yogosawa S, Wada S, Mou XY, Takayasu J, Murakoshi M, Jinno K, & Yano M. (2004). Cancer prevention by antioxidants. *Biofactors*, 22, 57-61.

- Oren A, & Ventosa A. (2000). International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1405-1407.
- Park YO, Hwang ES, & Moon TW. (2005). The effect of lycopene on cell growth and oxidative DNA damage of Hep3B human hepatoma cells. *Biofactors*, 23, 129-139.
- Rao AV, Ray MR, & Rao LG. (2006). lycopene. *Adv Food Nutr Res*, 51, 99-164.
- Ronnekleiv M, Lenes M, Norgard S, & Liaaen-Jensen S. (1995). Three dodecane C<sub>50</sub>-carotenoids from halophilic bacteria. *Phytochemistry*, 39, 631-634.

## EVALUATION FOR ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES AND WHITENING ACTIVITY OF RED PIGMENT FROM HALOPHILIC *Haloferax mediterranei*

Yi-chien Ho<sup>1\*</sup> Xiang-lin Xiao<sup>2</sup> Chia-chen Kao<sup>1</sup> Ming-tse Lin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Development of Holistic Education Center, Cardinal Tien College of Healthcare and Management, Taipei, Taiwan, R.O.C.

<sup>2</sup> Development of Cosmetic Applications and Management, Cardinal Tien College of Healthcare and Management, Taipei, Taiwan, R.O.C.

<sup>3</sup> Department of Bioengineering, Tatung University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

E-mail:yichien@ctcn.edu.tw

### ABSTRACT

The extremely halophilic *Haloferax mediterranei* is not easily contaminated and can be fermented under non-sterilized condition. As a result, costs for sterility and fermentation process can be reduced. Contrast to other halobacteria, the growth rate of *H. mediterranei* with  $\alpha$ -amylase is faster and doesn't need any special carbon source which the starch can be used as the major carbon source and it can produce carotenoids, such as bacterioruberin and its derivatives. In the previous study, we demonstrate the extracted carotenoids from *H. mediterranei* had the antioxidative capacity *in vitro*, repressed the production of melanin, and were toxic for HepG2 hepatoma cell by the induction of apoptosis. Therefore, we study the antioxidant activity *in vitro* and whitening activity of bacterioruberin (hmC3) purified of the extracted red pigments from *H. mediterranei* in this project. The results demonstrate that the antioxidant abilities of bacterioruberin were similar or better than BHA and  $\beta$ -carotene. Additionally, bacterioruberin was effective to inhibit the pigmentation of zebrafish.

**Keywords:** *Haloferax mediterranei*, tyrosinase activity, antioxidative activities, whitening activity.