Study on the natural antioxidants secreted by the soil-born isolate of *Streptomyces* sp. AMS-1110

土壤分離菌 *Streptomyces* sp. AMS-1110 所生產

天然抗氧化物成分之性狀分析研究

計畫編號	: NSC 88-2113-M038-003
執行期限	: 87/08/01 至 88/07/31
主持人	: 許元勳
執行機構及單位名稱	: 台北醫學院醫學研究所
E-mail	: microbes@tmc.edu.tw

一、中文摘要

自由基以及油脂過氧化物是造成細胞損害、組織老化甚至生物體發生各種病變的主因之一。這樣的過氧化傷害非常廣泛，在生物體內有時需藉由外在抗氧化劑的適時補充以維持生理機能之正常運轉。在從微生物資源篩選天然抗氧化物的過程中，我們篩得一抗氧化物生產性之土壤分離株 AMS-1110，並從菌種發酵培養液中分離得一抗氧化物 AMS-1110-TS-A (sample No. SY815-A)。該物質經質譜分析(MS)和核磁共振(^{1}H 及 ^{13}C-NMR)等有機光譜的分析，以及 IR 直接比對的結果證實，其構造是屬於酪胺酸代謝中間體之 2,5－二羥苯乙酸(homogentisic acid)。抗氧化活性測試的結果發現，AMS-1110-TS-A 無論在紅血球空細胞膜(RBC ghost membrane)以及在老鼠肝微粒體 (rat liver microsome) 的抗氧化評估系統中，均可顯示有效抑制脂質過氧化反應的進行，其效果雖不如合成抗氧化物 BHT 但與天然抗氧化物維生素 E (α-tocopherol) 具有幾乎對等的活性。
關鍵詞：自由基、油脂過氧化物、抗氧化劑、紅血球空細胞膜、老鼠肝微粒體

Abstract

Free radicals and lipid peroxides have been implicated as the causative factors in cell injury, aging and the pathogenesis of numerous diseases. Since such kinds of oxidative damage are widely existing in biological systems, it is necessary to compensate sufficient antioxidants in time through diet to keep our physiological function in progress normally. As a part of our screening program on natural antioxidants from microbial sources, we have isolated an antioxidants, designed AMS-1110-TS-A (sample No. SY815-A). The chemical structure of this metabolite was elucidated to be identical with homogentisic acid, a tyrosine-derived metabolic intermediate, on the basis of its MS, ^{1}H and ^{13}C-NMR spectral data followed by the direct IR comparison. The antioxidant activity of AMS-1110-TS-A was investigated *in vitro*. As a results, AMS-1110-TS-A showed equal inhibitory activity to vitamin E but weaker effect than butylated hydroxytoluene (BHT) against lipid peroxidation in erythrocyte ghost membrane and rat liver microsome systems.

二、計畫緣由與目的

酸敗油脂的攝取以及生物體內因氧化反應、紫外線或放射線照射等現象所產生的氧化自由基(Oxidized free radicals)或過氧化脂質(Lipid peroxides)，是造成細胞損傷、組織老化甚至生物體內各種病變的主因之一；這樣的過氧化傷害機制，在生物體內雖可藉由外來或內在的各種抗氧化防禦機制予以減輕或防止，但有時並不能完全有效的對抗多種氧化自由基及過氧化脂質所造成的傷害，因此抗氧化物(antioxidants)的適時補充或添加是有其必要性的。然而目前泛用的抗氧化物多屬人工合成，對人體的安全性堪慮，因此如何從天然資源中找尋更有效的安全性抗氧化物，以進一步評估其抗氧化活性及作用機制即更顯重要且深具開發潛

力。在過去植物起源的天然抗氧化物被報導頗多，然深究其抗氧化活性並不顯著，且大部份有效成份的分子結構較為特定，因此發展範圍有限。微生物是天然物重要的資源，從現代生物技術的角度觀之，從微生物代謝產物中篩選具抗氧化活性的天然物，應是生物醫學範疇中值得探討的重要課題。因此針對上述目的，我們首先利用選擇性菌種分離方法(selective isolation method)從所採集的56個土壤試樣中分離出包括絲狀真菌(filamentous fungi) 和放線菌(actinomycetes)等近500 株特定高好氣性微生物，並分別予以分類整理及保存。在菌種發酵培養方面，我們採用批式液態發酵方式進行往復式振盪培養以刺激二次代謝物的生產，所得的發酵培養上清菌液再藉由吸附性樹脂 Amberlite XAD-2 吸附、乙酸乙酯(EtOAC)及正丁醇(*n*-BuOH)等不同極性的有機溶劑萃取轉溶，並以甲醇(MeOH)振盪溶離及脫水減壓濃縮方式，以取得抗氧化活性篩選的檢測試樣。經篩選結果，我們從近300株放線菌中，篩得一具有抗氧化物質高生產能力的菌株，命名為AMS-1110。從其生理生化特徵及形態觀測等菌種鑑定的結果，確認該菌株為鏈黴菌屬（*Streptomyces* sp.)。本研究擬進一步進行菌株 AMS-1110 之大量發酵培養，以針對此菌株代謝產物中之主要抗氧化成分進行分離抽取獲得足量之純化物，以進行活性物質後續之化學結構鑑定與抗氧化活性評估。

三、結果與討論

1. 菌種發酵培養物質分離純化

針對菌株 AMS-1110 在回轉數 105rpm、28℃下，進行6 天 2 L modified Bennett medium / 5 L Erlenmeyer flask 往復振盪發酵培養，以量化生產抗氧化活性代謝物，如此共累積了20 L 發酵菌液。

2. 物質分離純化

針對其中的主要抗氧化活性成份之一 AMS-1110-TS-A (sample No. SY815-A)，利用順相矽膠及逆相 C-18 層析，以及 Sephadex LH-20 膠體過濾層析等方法可取得約 60 mg 之無色結晶純化物。

3. 物質物化特性及化學結構分析

將 AMS-1110-TS-A 物質更進一步利用質譜分析(MS)和核磁共振(^{1}H 及 ^{13}C-NMR)等有機光譜分析可知，此物質的分子量為 168，其分子式為 $C_8H_8O_4$。從 UV 最大吸光值在波長 294nm，以及 IR 在波數 3500cm^{-1} 有羥基(hydroxyl group)，在波數 1695cm^{-1} 處有羧基 (carboxylic group)，以及 ^{1}H-NMR 在 δ6.67 ppm (3H，s) 處有芳香環 (aromatic ring) 和 δ7.55 ppm (3H，6r) 有三個羥基(Hydroxyl group) 存在等事實，可說明本物質為含三個置換基，並擁有羧基的苯環化合物。由 IR 光譜比對的結果證實，AMS-1110-TS-A 的化學結構確定為 2,5－二羥苯乙酸(homogentisic acid)。

4. 抗氧化活性評估

針對幾種不同的抗氧化機制進行了探討，即：1.對超氧自由基(superoxide

anion radical, $\cdot O_2^-$)的清除作用：以 I.N.T. System；以及 2.對抑制過氧化脂質生成的影響：包括(1)β-胡蘿蔔素系統(β-carotene system)；(2)紅血球細胞膜系統(RBC ghost membrane system)；(3)老鼠肝微粒系統(rat liver microsome system)；(4)固態硫丙二醯尿系統(solid TBA system)等。測試結果證實，AMS-1110-TS-A 物質可有效抑制脂質過氧化反應的進行，進而減少脂質過氧化所造成的傷害，尤其在紅血球細胞膜系統與固態硫丙二醯尿系統中，其效果較現在常用的天然抗氧化物維生素 E (α-tocopherol)更為顯著；同時此物質亦具有似超氧化物歧化酶(SOD－Like)的功能，可清除由黃嘌呤(xanthine)與黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)反應後所產生的超氧自由基，當檢測濃度為 0.005mg/ml 時，可發揮相當於 SOD 1.731U/ml 的活性。

5. 綜合討論

在過去有報導指出，過多的 homogentisic acid 可能促進氧化反應的產生，但其所使用的劑量比本實驗中所使用者高了近 100 倍。在實驗進行的過程中，我們曾針對此物質的細胞毒性進行評估，結果發現此物質濃度達 20 μg /ml 對大鼠的肝初代培養細胞〈rat hepatocytes〉生長仍無影響，反觀 BHA 及 BHT 當濃度小於 1 μg/ml 時，對細胞生長即抑制了將近 30% ，而當濃度為 20 μg/ml 時，則對細胞生長更抑制了將近 70% 。而當我們對細胞給予氫氧自由基造成氧化傷害時，在 homogentisic acid 濃度為 0.01 μg/ml 時，對細胞的保護效力即高達 60% ，此一效果較α-tocopherol 高了 30% ；因此可知此物質對細胞的毒性遠小於 BHA 及 BHT，而其清除氫氧自由基使細胞免於受傷害的能力則較-tocopherol 更顯著。

四、計畫結果自評

本研究確立了抗氧化物生產性菌株的實驗室規模篩選模式，並從菌種培養液中成功地進行了抗氧化代謝產物的分離純化、構造鑑定、以及 *in vitro* 抗氧化活性評估；研究結果更首次證實了 homogentisic acid 抗氧化及清除自由基的能力，為後續類似研究提供了一個可行的研究模式；由於受限於時間和經費，針對微生物所代謝其他類型物質的後續分離純化、結構解析、抗氧化活性和作用機轉，以及在生物產業的應用價值等系列問題均有待做進一步評估。

五、參考文獻

1. 梁錦釧，台北醫學院醫學研究所碩士論文，民國八十六年六月。
2. 古豐瑞，台北醫學院醫學研究所碩士論文，民國八十七年六月。
3. 許元勳，生物產業，Bioindustry，Vol. 10，No. 1，pp. 12 - 18，1999。
4. 許元勳，生物產業，Bioindustry，Vol. 10，No. 2，pp. 33 - 40，1999。