

## 创新中药与经典名方专栏

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20250407007

## 药用真菌乌灵参黑色素生物合成研究

蔡奕泽<sup>1,2</sup>, 赵群飞<sup>2</sup>, 王海颖<sup>1</sup>

1. 上海中医药大学中药学院中药学教研室(上海 201203); 2. 上海中医药大学创新中药研究院手性药物研究中心(上海 201203)

**【摘要】** 目的 解析珍稀药食两用真菌乌灵参黑色素的生物合成机制,并推动其开发应用。方法 采用多组学整合分析筛选潜在黑色素生物合成基因簇(*mel*),利用合成生物学技术构建米曲霉异源表达系统,实现基因簇功能重构,结合高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)与单晶X射线衍射技术对代谢产物进行分离鉴定。结果 首次在乌灵参中鉴定出1,8-二羟基萘(1,8-DHN)型黑色素合成基因簇(*mel*),并通过异源表达成功重构其生物合成途径。从米曲霉转化株中分离获得关键中间体小柱孢酮[(*R*)-Scytalone],经晶体结构解析(CCDC 2440681)确证其立体构型。结论 本研究初步阐明了乌灵参中1,8-DHN型黑色素的生物合成机制。

**【关键词】** 乌灵参;乌灵胶囊;真菌黑色素;1,8-二羟基萘;米曲霉异源表达;生物合成;中药研究

## Study on biosynthesis of melanin in medicinal fungus Wulingshen

CAI Yize<sup>1,2</sup>, ZHAO Qunfei<sup>2</sup>, WANG Haiying<sup>1</sup>

1. Traditional Chinese Medicine Teaching and Research Section, School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Research Center for Chiral Drugs, Innovative Institute of Chinese Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To elucidate the biosynthesis mechanism of melanin in the rare medicinal and edible fungus Wulingshen (*Xylaria* spp.) and promote its development and application. **Methods** Potential melanin biosynthesis gene clusters (*mel*) were screened using multi-omics integrated analysis. A heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* was constructed through synthetic biology techniques to functionally reconstruct the gene cluster. Metabolites were isolated and identified via high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and single-crystal X-ray diffraction. **Results** The 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN)-type melanin biosynthesis gene cluster (*mel*) was identified for the first time in Wulingshen. The biosynthetic pathway was successfully reconstructed through heterologous expression. The key intermediate (*R*)-Scytalone was isolated from *A. oryzae* transformants, and its stereochemical configuration was confirmed by crystal structure analysis (CCDC 2440681). **Conclusion** This study preliminarily clarified the biosynthesis mechanism of 1,8-DHN-type melanin in Wulingshen.

**Keywords:** Wulingshen; Wuling capsule; fungal melanin; 1,8-DHN; *Aspergillus oryzae* heterologous expression; biosynthesis; Chinese materia medica research

乌灵参作为一种疗效显著的珍稀药用真菌,在中国已有悠久的历史,其文献记载最早见于清代《灌县志》<sup>[1-2]</sup>。乌灵参性温、味微苦,具有补气固肾、镇静安神、健脾除湿的传统功效<sup>[3]</sup>。现代药理学研究<sup>[2,4]</sup>表明,乌灵参具有镇静、抗焦虑、抗抑郁、抗氧化、抗炎等作

用,因此临床上常用于治疗心悸失眠、抑郁、焦虑等神经衰弱性疾病。乌灵参来源于炭角菌属(*Xylaria*)多种近缘真菌(*Xylaria* spp.),其特定生长于废弃的白蚁巢穴中<sup>[5-6]</sup>。基于乌灵参独特的药用价值,浙江佐力药业股份有限公司采用现代发酵工程技术成功研制出国家一类新药乌灵菌粉和乌灵胶囊,并广泛应用于治疗心肾不交所致的失眠、健忘、心悸、心烦及神经衰弱等<sup>[7-8]</sup>。

乌灵参以其通体乌黑的典型特征而著称,但其黑色素的生物来源及合成机制尚未阐明。天然黑色素是一类由多酚或吡啶前体经氧化聚合形成的高分子疏水化合物,其复杂的聚合结构赋予其独特的化学和物理

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374015);上海市中药化学生物学前沿基地项目(2022年)

[作者简介] 蔡奕泽,男,硕士研究生,主要从事中药活性分子的生物合成研究

[通信作者] 王海颖,教授;E-mail: wanghaiying\_7@hotmail.com

性质,包括对水及有机溶剂的极端不溶性,这极大限制了对其分子结构、合成机制及功能特性的深入研究<sup>[9]</sup>。天然黑色素具有多种生物活性,包括免疫调节、降血脂、抗菌、抗辐射和抗肿瘤等作用<sup>[10]</sup>。特别是黑色素能够将 99.9% 的阳光能量转化为热能,从而有效降低皮肤癌的发生风险,展现出重要的应用前景<sup>[11-13]</sup>。

近年来,真菌黑色素研究愈发受到关注,在其形成和调控机制以及开发利用方面取得了一些重要进展。研究<sup>[14-16]</sup>表明,真菌黑色素的合成受多层次调控网络支配,包括环境刺激及信号感知、关键限速酶活性和转录因子调控。Zhang 等<sup>[17]</sup>最新研究发现,一种主要协助转运蛋白超家族(MFS)的膜蛋白 PCMFS 通过调控黑色素颗粒的胞外运输决定食用蘑菇黄白侧耳菌(*Pleurotus cornucopiae*)的菌盖颜色深浅,为食用菌颜色性状的分子育种提供了新靶点。通过基因过表达、敲除抑制剂基因及导入外源基因等代谢工程改造可促进黑色素合成<sup>[18]</sup>,例如在无花果拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis fici*)中过表达转录因子 *pfmaF* 和 *pfmaH* 使黑色素积累增加<sup>[19]</sup>,为黑色素合成途径解析提供了重要参考。

目前,食用菌黑色素的研究主要集中在黑木耳(*Auricularia auricula*)和毛木耳(*Auricularia polytricha*),而其他食用菌的黑色素含量较低或几乎不含<sup>[20]</sup>。黑木耳黑色素不仅能有效清除 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和羟基自由基<sup>[21]</sup>,减轻过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的氧化损伤和酒精性肝损伤<sup>[22-23]</sup>,还可通过调控氧化应激与 Toll 样受体 4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路缓解缺铁性贫血诱导的溃疡性结肠炎<sup>[24]</sup>。乌灵参作为珍稀的药食两用真菌,其富含黑色素的特征可能与其药用价值及生物活性密切相关。因此,本研究整合多组学分析、基因组挖掘与合成生物学策略,探究乌灵参黑色素的生物合成机制,以推动其在医药和工业领域的开发应用。

## 1 材料

1.1 主要仪器 高压蒸汽灭菌器(型号:MLS-3751L-PC),上海申安医疗器械厂;隔水式恒温培养箱(型号:GSP-9080MBE),上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;大容量振荡培养箱(型号:YR101),上海西雷生物科技有限公司;离心机(型号分别为 5425、5415R、5910R),德国 Eppendorf 公司;聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(型号:GET3XG),杭州柏恒科技有限公司;恒温金属浴(型号:Tu-100C),上海一恒科学仪器有限公司;微量紫外分光光度计(型号:NanoDrop One),美国 Thermo Fisher Scientific 科技公司;DNA 电泳仪(型号:JY300C),北京君意东方电泳设备有限公司;凝胶成像

系统(型号:GenoSens 1850),上海勤翔科学仪器有限公司;显微镜(型号:SGO-PH201D),深圳市深视光谷光学仪器有限公司;分析天平(型号:SQP),赛多利斯科学仪器有限公司;氮吹仪(型号:TurboVap<sup>®</sup> LV),瑞典 Biotage 公司;快速色谱仪(型号:SepaBean machine U200),常州三泰科技有限公司;液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS,型号分别为 UFLC 和 LCMS-8040),日本 SHIMADZU 公司;色谱柱(型号:Zorbax SB-C18),美国 Agilent 公司;X-射线晶体衍射仪(型号:D8 Venture),德国 Bruker 公司;核磁共振(NMR)仪(型号:AVANCE NEO 600M),德国 Bruker 公司。

1.2 试剂和工作酶 限制性内切酶 *Kpn* I (批号:0091804)、*EcoR* I (批号:10198504)、*Nco* I (批号:10059043)、*EcoR* V (批号:10016059)、*Pst* I (批号:10013766)和 *Spe* I (批号:10178129),美国 New England Biolab 公司;DNA 凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit (批号:D2500020000I27X004)、质粒提取试剂盒 E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (批号:D694302000 L30X022),美国 BioTek 公司;高纯度耐热 DNA 聚合酶 2 × Taq Master Mix (批号:7E0611I4)、超保真 DNA 聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (批号:7E890A4)、重组酶 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit (批号:7E0770F4)、重组酶 ClonExpress<sup>®</sup> MultiS One Step Cloning Kit (批号:7E890A4),南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 裂解液 Lysis Buffer for PCR (批号:A6A3950),湖南艾科瑞生物工程有限公司;溶壁酶 Yatalase Enzyme (批号:ANZP011),日本 Takara 公司。除特殊说明,化学试剂如无机盐、分析和色谱级有机试剂等,均购自上海泰坦科技股份有限公司;除特殊说明,生化试剂如琼脂粉、山梨醇、葡萄糖、淀粉、糊精和多聚蛋白胨等,均购自上海生工生物技术有限公司;PCR 所需的核苷酸引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.3 乌灵参、菌株和质粒 乌灵参(*Xylaria* spp.,由修彦凤教授鉴定)采自云南文山(东经 103° 43' ~ 104° 27',北纬 23° 06' ~ 23° 44')和四川乐山(东经 102° 50' ~ 104° 30',北纬 28° 25' ~ 30° 20');大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )购自上海生工生物技术有限公司;米曲霉(*Aspergillus oryzae* NSAR1)及米曲霉表达载体 pAdeA、pTAex 来源于日本东京大学 Ikuro Abe 课题组,而 pAdC 载体由本课题组在 pAdeA 载体基础上改造构建而成<sup>[25]</sup>。

## 1.4 培养基及缓冲液

1.4.1 培养基 (1)溶菌肉汤(LB)培养基:1%(质量分数,下同)胰蛋白胨,0.5% 酵母提取物,1% 氯化钠(NaCl);固体培养基则添加 1.5% 琼脂粉。

(2)糊精多聚蛋白胨酵母膏(DPY)培养基:2%糊精,1%多聚蛋白胨,0.5%酵母提取物,0.05%七水合硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O),0.5%磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。

(3)察氏-淀粉(CD-starch)培养基:2%可溶性淀粉,1%多聚蛋白胨,0.3%硝酸钠(NaNO<sub>3</sub>),0.2%氯化钾(KCl),0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.002%七水合硫酸亚铁(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O),pH = 5.5。

(4)M 筛选培养基:1.2 mol/L 山梨醇,0.2% 氯化铵(NH<sub>4</sub>Cl),0.1% 硫酸铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>],0.05% KCl,0.05% NaCl,0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.002% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,2% 葡萄糖,按照米曲霉转化子营养需求添加0.15% 甲硫氨酸/0.1% 精氨酸/0.01% 腺嘌呤,pH=5.5。

①上层 M 筛选培养基添加 0.8% 琼脂粉;②下层 M 筛选培养基添加 1.5% 琼脂粉;③传代 M 筛选培养基去除 1.2 mol/L 山梨醇,并添加 1.5% 琼脂粉。

(5)土豆葡萄糖琼脂(PDA)培养基:20% 土豆的煮沸液,2% 葡萄糖,1.5% 琼脂粉,按照米曲霉转化子营养需求添加0.15% 甲硫氨酸/0.1% 精氨酸/0.01% 腺嘌呤。

在 M 筛选培养基和 PDA 培养基中,培养已导入 pAdeA 或 pAdC 质粒的米曲霉菌株,在培养基中添加

0.15% 甲硫氨酸和 0.1% 精氨酸;培养同时导入 pTAex3 和 pAdeA 质粒的米曲霉菌株,在培养基中添加 0.15% 甲硫氨酸。

1.4.2 缓冲液 转化缓冲液(TFS)0:50 mmol/L 马来酸,pH = 5.5。

TFS 1:0.6 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1% 真菌细胞裂解酶(yatalase),溶剂为 TFS 0。

TFS 2:1.2 mol/L 山梨醇,50 mmol/L 二水合氯化钙(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O),35 mmol/L NaCl,10 mmol/L 三羟甲基甲烷(Tris),pH = 7.5。

TFS 3:60% 聚乙二醇 4000(PEG4000),50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,10 mmol/L Tris,pH = 7.5。

50× Tris 乙酸 EDTA (TAE)电泳缓冲液储备液:242 g/L Tris,57.1 mL/L 冰乙酸,5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),pH=8。工作液浓度 1×TAE。

除特殊说明外,上述所有成分百分比(%)均表示溶质质量(g)与溶液体积(mL)的比值,溶剂默认使用去离子水,并使用盐酸(HCl)或氢氧化钠(NaOH)调 pH。

1.5 引物 PCR 引物序列详见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	长度/bp	GC 含量/%	用途
pTAex3-melA-F	CCACAGCAAGCTCCGAATTCATGTTCAAAG CACCCCTTGTTC	43	49	从乌灵参基因组 DNA 中克隆 melA 基因插入 pTAex3 载体
pTAex3-melA-R	CTACAGATCCCCGGGTACCTTAATCTAGC CAGTGGCCAATTTTC	45	51	
pTAex3-melB-F	CCACAGCAAGCTCCGAATTCATGTCCCTT CAGACGTGACACC	43	56	从乌灵参基因组 DNA 中克隆 melB 基因插入 pTAex3 载体
pTAex3-melB-R	CTACAGATCCCCGGGTACCTAGACACCGC CTCCGGAGCATC	42	64	
pAdC-melC-F	AGCAAAGCTCCGAATTCATGATGGCGGAC CAGATGTCGTTTCTCC	45	53	从乌灵参基因组 DNA 中克隆 melC 基因插入 pAdC 载体
pAdC-melC-R	CTACTACAGATCCCGATCTACCTCATATCC ATCCCCTCCTCATG	45	51	
pAdeA-amy-F1	GTCCCCAATCCATATGACTAGGAAACATCA TGTTGGGGTAACCAAG	46	48	从 pAdC-melC 质粒中克隆连有淀粉酶启动子(Pamy)和终止子(Tamy)的 melC 基因片段,并插入 pAdeA 载体中,构建共表达质粒
pAdeA-amy-R1	GAAGATTGGGTAAGATACATGAGCTTCGG TG	31	45	
pAdeA-amy-F2	GTATCTTACCAATCTTCAAGAGCAGAATG TG	32	41	从 pTAex3-melA 和 pTAex3-melB 质粒中克隆连有 Pamy 和 Tamy 的 melA 和 melB 基因片段,并插入 pAdeA 载体中,构建共表达质粒
pAdeA-amy-R2	GTCCCCAATCCATATGACTAGGAAACATCA TGTTGGGGTAACCAAG	46	48	

注:F 为上游引物,R 为下游引物,GC 含量为鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)占总碱基数的含量,pTAex3、pAdC 和 pAdeA 为米曲霉表达载体,melA、melB、melC 为目标基因。

## 2 方法

2.1 生物信息学分析 乌灵参子实体的宏基因组测序和转录组测序由北京诺禾致源生物信息科技股份有限公司完成。利用抗生素及次级代谢物分析平台(antiSMASH v7.1.0)真菌版本分析工具(<https://fungismash.secondarymetabolites.org/#!/start>),对乌灵参子实体的宏基因组进行次级代谢物生物合成基因簇

(BGC)预测分析(检测严格度:宽松),并筛选聚酮合酶(PKS)核心基因所在的基因簇。采用生物信息学工具集软件(TBtools- II v2.210)的基本局部比对搜索工具区(Blast Zone)功能(E 值阈值设为 1e<sup>-5</sup>)<sup>[26]</sup>,对乌灵参子实体宏基因组进行目标基因的本地化基本局部比对搜索工具(Local Blast)同源分析。通过奥古斯都(Augustus)在线工具(<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>),对基因簇内编码基因的开放阅读框(ORFs)进行预测。通

过美国国家生物技术信息中心(NCBI)平台的核苷酸-蛋白质基本局部比对搜索工具(Blastx, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),对 ORFs 进行进一步的功能注释和预测优化。

## 2.2 米曲霉异源表达质粒的构建

### 2.2.1 单基因表达质粒的构建

以乌灵参基因组 DNA 为模板,采用 Phanta<sup>®</sup>Max Super-Fidelity DNA 聚合酶,通过表 1 所示特异性引物分别扩增 *melA*、*melB* 和 *melC* 基因片段。用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *EcoR* I 消化载体 pTAex3,用限制性内切酶 *Nco* I 和 *EcoR* V 消化载体 pAdC,并通过 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物和线性化载体片段。将纯化的 PCR 产物和线性化载体片段使用 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit 试剂盒进行重组连接,构建 pTAex3-*melA*、pTAex3-*melB* 和 pAdC-*melC* 质粒。将重组产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,经培养扩增后使用质粒提取试剂盒提取重组质粒。由苏州金唯智生物科技有限公司进行双脱氧链终止法(Sanger)测序,通过序列比对验证插入基因片段的完整性和序列正确性。

### 2.2.2 双基因共表达质粒的构建

以 pTAex3-*melA*、pTAex3-*melB* 和 pAdC-*melC* 质粒为模板,采用 Phanta<sup>®</sup>Max Super-Fidelity DNA 聚合酶,通过表 1 所示特异性引物分别扩增连有 *Pamy* 和 *Tamy* 的 *melA*、*melB* 和 *melC* 基因片段。用限制性内切酶 *Pst* I 和 *Spe* I 消化载体 pAdeA,同上法回收及纯化 PCR 产物和线性化载体片段,进一步使用 ClonExpress<sup>®</sup> II MultiS One Step Cloning Kit 试剂盒进行重组连接,构建 pAdeA-*melCA* 和 pAdeA-*melCB* 质粒。同上法进行 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞转化、质粒提取及 Sanger 测序。

## 2.3 原生质体转化法构建米曲霉转化株

为表征 *mel* 基因簇,选择在米曲霉(*A. oryzae* NSAR1)中进行异源重构,该宿主具备卓越的真菌 BGCs 表达能力,是次级代谢研究的理想平台<sup>[25]</sup>。通过系统地将构建的质粒导入米曲霉中,可构建一系列米曲霉转化株,以探究各基因功能。

### 2.3.1 制备原生质体

取 20  $\mu$ L 米曲霉孢子混悬液,接种于含 10 mL DPY 培养基的 50 mL 无菌离心管中,30  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下振荡培养 48 h。将预培养菌液转接至含 100 mL DPY 培养基的 250 mL 无菌锥形瓶中,在相同条件下继续培养 24 h。培养结束后,取 15 mL 菌液过滤收集菌丝体置于 15 mL 无菌离心管中。加入 10 mL TFS 1,30  $^{\circ}$ C 水浴下处理 2 h,使细胞壁裂解。处理完毕后,过滤收集含有原生质体的滤液至 50 mL 无菌离心管中。加入 10 mL TFS 2,轻柔混匀,4  $^{\circ}$ C、1 500 r/min 离心 10 min,弃去上清。原生质体沉淀用 5 mL TFS 2 轻柔重悬,相同条件下再次离心洗涤。加入适量 TFS 2,

轻柔重悬原生质体沉淀,使原生质体浓度大致调整为  $2 \times 10^7$  个细胞/mL。

### 2.3.2 原生质体转化

取 200  $\mu$ L 原生质体悬浮液置于 15 mL 无菌离心管中,加入待转化的 10  $\mu$ L 质粒(0.5 ~ 1 g/L),轻柔混匀,冰上静置 30 min。随后依次加入 250  $\mu$ L、250  $\mu$ L 和 850  $\mu$ L TFS 3,每次添加后轻柔搅动混匀,室温静置 20 min 促进原生质体融合。加入 5 mL TFS 2,轻柔混匀,4  $^{\circ}$ C、1 500 r/min 离心 10 min,小心弃去上清。添加 200  $\mu$ L TFS 2 轻柔重悬原生质体,加入到下层 M 筛选培养基平板的中央。随后迅速覆盖 5 mL 相应的上层 M 筛选培养基(50  $^{\circ}$ C 保温),快速混匀使原生质体均匀分布于平板表面。待培养基凝固后,于 30  $^{\circ}$ C 倒置培养 3 ~ 7 d。

### 2.3.3 米曲霉转化子的鉴定与保存

从转化平板上挑取 6 ~ 10 个生长状态良好的单克隆菌落,将其菌丝接种于不含山梨醇的传代 M 筛选培养基平板上,30  $^{\circ}$ C 倒置培养 4 ~ 6 d,重复传代 2 ~ 3 次以获得稳定的转化子。提取米曲霉转化子总 DNA,并通过特异性引物 PCR 进行基因型鉴定。对于经 PCR 验证目的基因成功整合至基因组的阳性转化子,将其接种于相应的营养筛选 PDA 平板,30  $^{\circ}$ C 倒置培养 14 ~ 21 d,至菌丝表面形成大量深棕色的孢子。使用 10 mL 无菌 0.1% 吐温 80 溶液收集孢子,2 500 r/min 离心 10 min 后弃去上清,加入 1 mL 20% 甘油溶液重悬孢子。将孢子混悬液分装至 1.5 mL 离心管中,保存于 -80  $^{\circ}$ C。

## 2.4 米曲霉菌株发酵及检测

### 2.4.1 米曲霉菌株发酵

经 PCR 验证目的基因成功整合至基因组的阳性转化子,从其传代板上挑取适量菌丝或取 20  $\mu$ L 孢子混悬液,接种于装有 10 mL DPY 培养基的 50 mL 无菌离心管中,30  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 48 h。随后转接至含 100 mL CD-starch 培养基的 500 mL 无菌锥形瓶中,通过淀粉激活淀粉酶 *amyB* 启动子<sup>[27]</sup>,诱导外源基因表达。在相同培养条件下,继续振荡培养 7 d 进行发酵。

### 2.4.2 米曲霉发酵液处理及检测

发酵结束后,取 800  $\mu$ L 含有菌丝的发酵液放至 2 mL 离心管中,加入等体积的乙酸乙酯(EA),涡旋振荡混匀,在 40 kHz 频率下超声提取 20 min。12 000 r/min 离心 7 min,取上层 EA 层至 1.5 mL 离心管。使用氮吹仪将有机溶剂蒸干,加入甲醇复溶样品,进样 HPLC-MS 进行检测分析。

仪器分析条件为:Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱(5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm);流动相为 A 相(H<sub>2</sub>O + 0.1% 甲酸)和 B 相(ACN + 0.1% 甲酸);柱温为 25  $^{\circ}$ C;流速为 1 mL/min,梯度洗脱 33 min(时间 T = 0 ~ 3 min, 10% B; T = 3 ~ 23 min, 10% ~ 100% B; T = 23 ~ 28 min, 100% B; T = 28 ~ 30 min, 100% ~ 10% B; T = 30 ~ 33 min, 10%

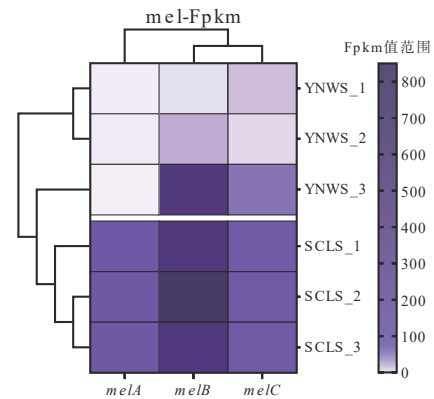
B);检测器为PDA(检测波长λ为190~600 nm);质谱扫描在正离子和负离子模式下进行,质荷比(m/z)范围为100~1 000。

2.5 米曲霉菌株的大量发酵及化合物的分离鉴定 参考“2.4.1”发酵方法,将米曲霉转化株孢子混悬液接种于DPY培养基中培养2 d,随后按10%的接种量转接到10 L的CD-starch培养基中继续培养5 d。发酵结束后,使用等体积EA对发酵液进行2次萃取,合并萃取液,并通过旋转蒸发器浓缩去除溶剂,得到粗提物。使用快速色谱仪对粗提物进行硅胶柱色谱初步分离,以石油醚-乙酸乙酯(PE-EA)体系(EA 0~100%,流速30 mL/min)进行线性梯度洗脱,同时通过紫外检测器监测洗脱过程,收集在λ254 nm和λ330 nm处具有显著吸收的馏分。通过HPLC-MS分析鉴定含有目标代谢物的馏分并评估其纯度。对分离得到的化合物进行NMR分析,包括<sup>1</sup>H-NMR和COSY(在600 MHz下测定),以及<sup>13</sup>C-NMR、HSQC和HMBC(在151 MHz下测定)。对于能够形成结晶的化合物,进一步通过X-射线晶体衍射确证其结构。

### 3 结果

3.1 生物信息学分析挖掘乌灵参黑色素 本研究对云南文山来源的乌灵参子实体进行了宏基因组测序(GenBank 登录号:JBJGAF000000000),并对云南文山和四川乐山来源的乌灵参子实体各3个生物学重复样本开展了转录组测序分析。通过对基因组开展antiSMASH分析,发现了一个潜在的黑色素BGCs(命名为mel基因簇)。*mel*基因簇在不同地理来源的乌灵参

样本中均表现出高表达特性,表明其在乌灵参生物学功能中的潜在重要性(图1)。*mel*基因簇包含3个可能的编码基因,分别为漆酶(LAC,*melA*)、1,3,6,8-四羟基萘还原酶(T4HR,*melB*)以及非还原型聚酮合酶(nrPKS,*melC*)(表2)。通过基因簇同源性分析,发现*mel*基因簇的PKS骨架基因*melC*与多个真菌物种(包括*Glarea lozoyensis*、*Magnaporthe oryzae*、*Nodulisporium* sp. ATCC74245和*Pestalotiopsis fici*)中负责1,3,6,8-四羟基萘(T4HN)合成的PKS基因具有较高的序列一致性(图2)<sup>[28-31]</sup>。值得注意的是,T4HN是1,8-二羟基萘(1,8-DHN)黑色素生物合成途径中的关键前体化合物,提示*mel*基因簇可能与真菌1,8-DHN黑色素的生物合成相关。



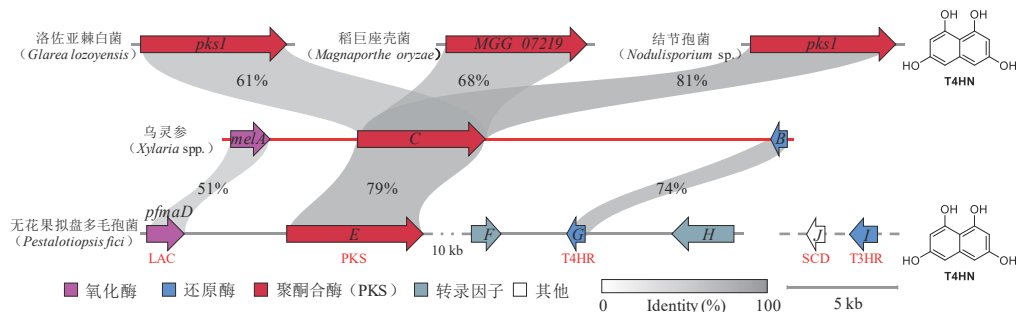
注:YNWS和SCLS分别为云南文山和四川乐山来源的乌灵参子实体,Fpkms为每千碱基外显子长度每百万映射片段数(基因表达定量标准),*melA*、*melB*、*melC*为目标基因。

图1 *mel*基因簇在不同产地乌灵参子实体中的转录组热图分析

表2 *mel*基因簇功能注释

基因	长度/bp	同源匹配	登录号	一致性/相似性	预测功能
<i>melA</i>	2 063	多铜氧化酶(黑柄炭角菌 <i>Xylaria nigripes</i> 来源)	KAI2640017.1	88%/94%	LAC
<i>melB</i>	882	T4HN还原酶(焦炭菌 <i>Ustilina deusta</i> 来源)	KAI0912266.1	84%/92%	T4HR
<i>melC</i>	6 592	聚酮合酶(黄心炭角菌 <i>Xylaria intraflava</i> 来源)	KAI1824593.1	87%/93%	nrPKS

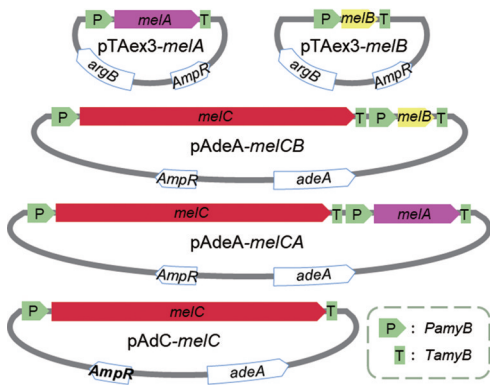
注:LAC为漆酶,T4HN为1,3,6,8-四羟基萘,T4HR为T4HN还原酶,nrPKS为非还原型聚酮合酶。



注:PKS为聚酮合酶,T4HN为1,3,6,8-四羟基萘,T4HR为T4HN还原酶,SCD为小柱孢菌脱水酶,T3HR为1,3,8-三羟基萘还原酶(T3HN),LAC为漆酶,*melA*~*C*为目标基因,*pksI*、*MGG\_07219*、*pksI*和*pfmaD*~*J*为*mel*基因簇的同源基因。

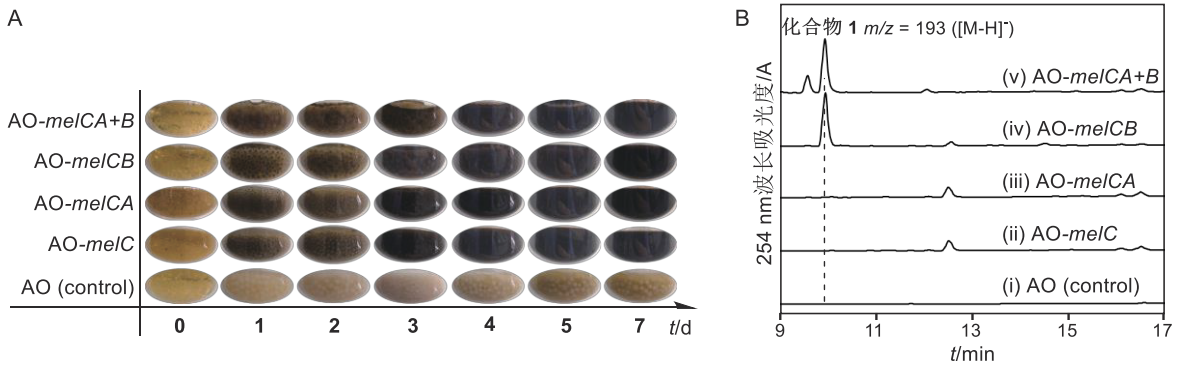
图2 *mel*基因簇的同源基因簇比对

3.2 米曲霉异源表达质粒的构建 在真菌底盘细胞中进行异源表达时,每个外源基因需配备独立的启动子和终止子元件。本研究采用诱导型淀粉酶启动子 *P<sub>amy</sub>* 和终止子 *T<sub>amy</sub>* 调控目标基因表达,分别构建了单基因表达载体 pTAex3-*melA*、pTAex3-*melB* 和 pAdC-*melC*,以及双基因共表达载体 pAdeA-*melCA* 和 pAdeA-*melCB*(图3)。



注:P为 *amyB* 启动子,T为 *amyB* 终止子,*melA*、*melB*、*melC* 为目标基因, *AmpR* 为氨苄青霉素抗性基因标签,*adeA* 为腺嘌呤营养缺陷型标记基因标签,*argB* 为鸟氨酸氨甲酰转移酶基因标签。

图3 米曲霉异源表达质粒图谱



注:A为米曲霉转化株发酵液随时间变化的表现特征,B为米曲霉转化株发酵物液相色谱-质谱联用检测图谱。米曲霉转化株为 AO-*melCA+B* (*melA/melB/melC* 三基因共表达株)、AO-*melCB* (*melB/melC* 两基因共表达株)、AO-*melCA* (*melA/melC* 两基因共表达株)、AO-*melC* (*melC* 基因表达株)和 AO (control, pAdeA 空载体对照菌株)。

图4 米曲霉转化株发酵分析

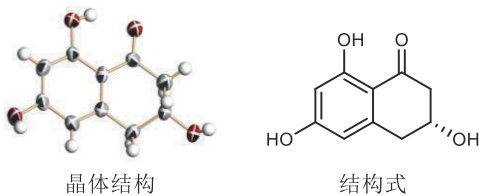


图5 化合物(R)-Scytalone的晶体结构及结构式

3.4 乌灵参黑色素的生物合成 根据组成和生物合成途径的不同,真菌黑色素可分为:1,8-DHN黑色素、儿茶酚黑色素、二羟基苯丙氨酸(DOPA)黑色素以及γ-谷氨酰胺-4-羟基苯(GHB)黑色素<sup>[32]</sup>。真菌PKS途径合成的1,8-DHN黑色素中,T4HN是主要中间体,其通过一系列连续的还原和脱水反应转化为1,8-DHN,后者是

3.3 *mel* 基因簇在米曲霉中异源重构 米曲霉转化株发酵结果表明,仅导入 *melC* 基因(nrPKS)的 AO-*melC* 菌株发酵液随时间推移逐渐黑化,这一现象证实了 *mel* 基因簇参与黑色素的生物合成(图4A)。进一步分析表明,共表达 *melC* 和 *melA*(LAC)基因的 AO-*melCA* 菌株与 AO-*melC* 菌株的发酵谱高度相似(图4B, ii 和 iii);共表达 *melC* 和 *melB*(T4HR)基因的 AO-*melCB* 菌株以及三基因的 AO-*melCA+B* 菌株发酵谱中均检测到新产生的高丰度化合物1(*m/z* 193-)(图4B, iv 和 v)。

通过对 AO-*melCB* 菌株的大规模发酵和产物分离纯化,我们成功获得了化合物1,并经X-射线晶体衍射和NMR鉴定为小柱孢酮[(*R*)-Scytalone, CCDC 2440681](图5~图7和表3)。化合物(*R*)-Scytalone的核磁数据如下:<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 6.22 (dt, *J* = 2.3, 1.1 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.25 (tt, *J* = 7.7, 3.8 Hz, 1H), 3.08 (ddd, *J* = 15.9, 3.8, 1.3 Hz, 1H), 2.81 ~ 2.88 (m, 2H), 2.62 (ddd, *J* = 17.0, 7.8, 1.0 Hz, 1H);<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 201.09, 165.19, 165.11, 144.62, 110.34, 108.00, 100.28, 65.53, 46.04, 37.78。

聚合形成黑色素的直接前体<sup>[28]</sup>(图8)。本研究鉴定的 Scytalone 属于 1,8-DHN 黑色素生物合成中间产物,这提示 *melB* 基因可能编码 T4HR,其在过表达条件下可促进 Scytalone 的高效合成,证明了 *mel* 基因簇在乌灵参中参与 1,8-DHN 黑色素的生物合成。

与典型的 1,8-DHN 生物合成途径相比,*mel* 基因簇缺乏编码 SCD 和 T3HR 的关键基因(图8)。然而,已有研究表明真菌 1,8-DHN 黑色素合成基因可能存在分散分布的特征,例如 *pfma* 基因簇中编码 T3HR 和 SCD 的关键基因 *pfmaI* 和 *pfmaJ* 就分散在基因组的不同位置(图2)<sup>[31]</sup>。采用 P<sub>fmaI</sub> 和 P<sub>fmaJ</sub> 蛋白作为探针,我们通过 Local blast 在乌灵参宏基因组中成功鉴定出与 P<sub>fmaI</sub>

表 3 化合物(R)-Scytalone的X-射线晶体结构数据 (CCDC 2440681)

晶体数据	参数
化学式	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
分子量	194.18
温度/K	293(2)
波长/Å	1.541 84
晶体尺寸/mm	0.150×0.120×0.120
晶体形态	透明无色
晶系	斜方晶
空间群	P1
维度	a = 6.692(4) Å    α = 67.52(2)° b = 7.850(3) Å    β = 84.719(19)° c = 10.205(4) Å    γ = 88.72(3)°
体积/Å <sup>3</sup>	493.2(4)
Z	1
晶体密度计算值/(g/cm <sup>3</sup> )	1.308
吸收系数/mm <sup>-1</sup>	0.860
F(000)	204
衍射仪	d8 venture
数据收集的θ角范围/°	4.709 to 65.520
米勒指数	-7<h<=7, -8<k<=9, -11<l<=11
衍射点收集	11 991
独立衍射点	3 203 [R(int) = 0.096 5]
独立衍射点覆盖/%	98.8
吸收校正	多重扫描
数据数/约束数/参数数	3 203 / 4 / 259
F <sup>2</sup> 拟合优度	1.111
绝对结构参数	-0.01(12)

和 P<sub>fmaJ</sub> 同源的 *melD* (位于 Contig46: 224897-226013) 和 *melE* (位于 Contig14: 154234-154841) 基因。序列分析显示, 这两个基因与 *pfmaI* 和 *pfmaJ* 的序列一致性分别

达到 85% 和 77%, 并且它们与核心基因簇 *melA~C* (位于 Contig24: 109734-137829) 在基因组上也呈现出分散状态 (图 2)。

基于真菌黑色素生物合成途径的多样性特征, 通过比对儿茶酚、DOPA 和 GHB 黑色素生物合成关键酶: 漆酶 (LAC, GenBank: AAA33590.1)、酪氨酸酶 (TYR, PIR: T52526) 和酪氨酸氨基转移酶 (TyrB, GenBank: CAA00594.1)<sup>[32, 34-35]</sup>, 在乌灵参宏基因组中鉴定出 3 个功能候选基因: A07301 (LAC 序列一致性 47%, FPKM=7.4)、A02652 (TYR 序列一致性 28%, FPKM=111.0) 和 A02098 (TyrB 序列一致性 38%, FPKM=253.5)。这些基因均具有一定的转录表达水平, 提示儿茶酚、DOPA 及 GHB 黑色素代谢途径可能也协同参与乌灵参黑色素合成过程。

#### 4 讨论

黑色素作为生物体和细胞的重要组成部分, 在保护宿主细胞和生物体方面发挥着关键作用。其主要功能包括抵御紫外线辐射、吸收能量、防止外部物理损伤, 以及通过其生理活性维持细胞内稳态, 从而增强生物体的抗逆性<sup>[36-37]</sup>。真菌黑色素可以清除自由基, 发挥抗氧化和抗炎作用, 这意味着它可以用于药物和保健品的开发, 并为增强抗氧化疗法提供一种新方法<sup>[33]</sup>。本研究以具有典型黑色表型的珍稀药食两用真菌乌灵参为研究对象, 系统开展其黑色素生物合成机制的研究。

本研究通过多组学整合的生物信息学分析, 成功从乌灵参宏基因组中鉴定出一个黑色素相关 BGC (*mel* 基因簇)。进一步的异源表达实验表明, 在米曲霉转化株 AO-*melCB* 和 AO-*melCA+B* 中均能检测到关键中间产

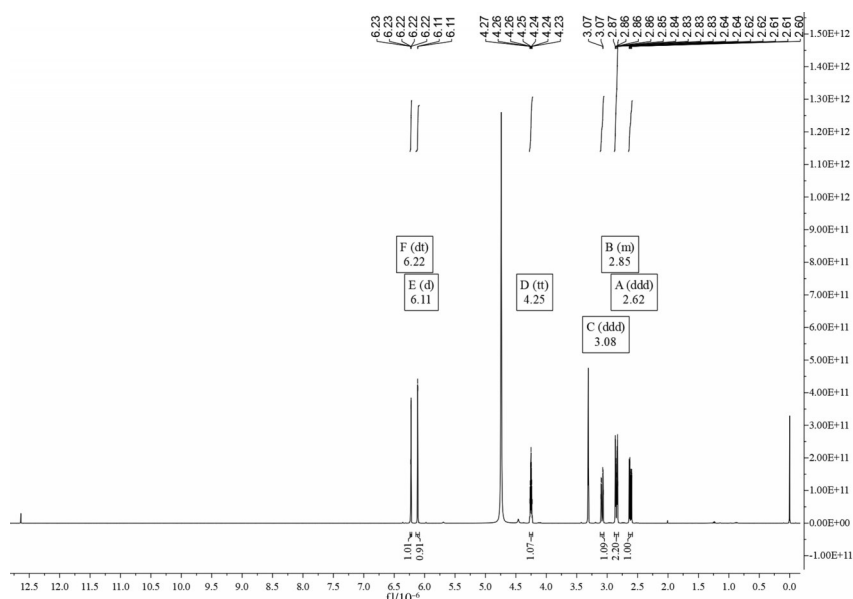


图 6 化合物(R)-Scytalone的<sup>1</sup>H-NMR谱图

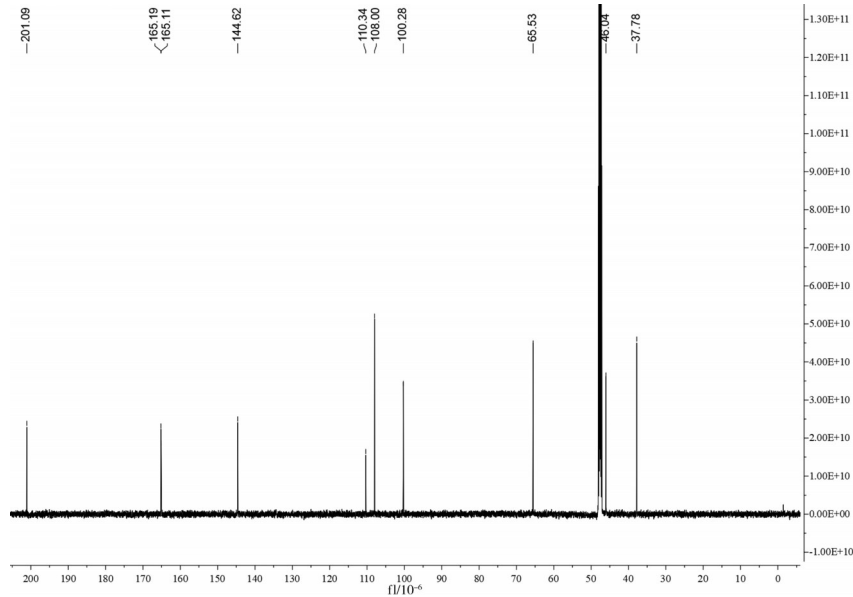
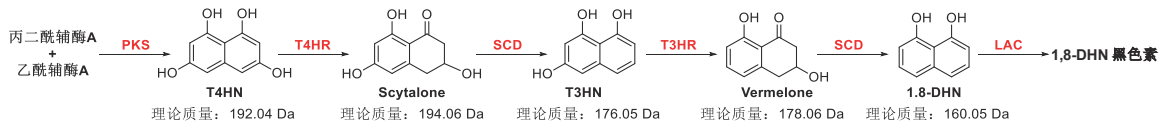


图7 化合物(R)-Scytalone的<sup>13</sup>C-NMR谱图



注:该途径包含5种关键酶,即聚酮合酶(PKS)、1,3,6,8-四羟基萘(T4HN)还原酶(T4HR)、小柱孢酮(Scytalone)脱水酶(SCD)、1,3,8-三羟基萘(T3HN)还原酶(T3HR)和漆酶(LAC)。Vermelone为柱孢酮,1,8-DHN为1,8-二羟基萘。

图8 1,8-DHN黑色素生物合成途径<sup>[19, 31, 33]</sup>

物(R)-Scytalone的积累,充分证实了mel基因簇在乌灵参中负责1,8-DHN黑色素的生物合成。在合成途径解析方面,我们推测melC(nrPKS)负责催化合成前体化合物T4HN,由于T4HN化学性质极不稳定,在实验中未能直接检测到该中间产物。当引入melB(T4HR)时,则将T4HN还原为相对稳定的中间体Scytalone。此外,尽管melA(LAC)理论上负责催化1,8-DHN聚合形成黑色素,但由于黑色素产物的不溶性及结构复杂性,其直接检测存在技术挑战,因此melA的功能验证仍需进一步研究。

值得注意的是,即使在mel基因簇部分功能基因缺失的情况下,其米曲霉转化株仍能产生黑色素(图4A)。这提示米曲霉可能具备完整的1,8-DHN黑色素生物合成后修饰酶系统,能够在异源重构mel基因簇时通过内源酶系补偿外源基因的缺失功能。通过同源比对分析,我们发现米曲霉基因组(GeneBank: GCA\_002007945.1)中存在1,8-DHN黑色素生物合成后修饰酶的同源蛋白: OOO05720.1(与PfmA序列一致性40%)、OOO15209.1(与PfmA/PfmA序列一致性48%/67%)和OOO11110.1(与PfmJ序列一致性33%),初步表明了米曲霉内源补偿酶系的存在。

本研究初步揭示了药食两用真菌乌灵参黑色素的生物合成途径,鉴定出mel基因簇介导的1,8-DHN合成途径,成功解析其生物合成关键中间体(R)-Scytalone

的晶体结构,并发现多条代谢途径可能协同参与乌灵参黑色素合成,为乌灵参源天然黑色素的开发与利用奠定了基础。同时,研究观察到米曲霉内源酶系统可能参与异源表达途径的功能补偿,为天然产物异源合成平台的优化研究提供了重要参考。

参考文献:

[1] 黄年来. 中国最有开发前景的主要药用真菌[J]. 食用菌, 2005, 27(1): 3-4.

[2] 朱志熊. 珍稀药食两用菌乌灵参菌种的DNA鉴定、研究和应用[C]//中国菌物学会. 首届药用真菌产业发展暨学术研讨会论文集. 南通:中国食用菌协会, 2005: 81-84.

[3] 宋寒冰, 徐凌川. 炭角菌属主要药用真菌化学成分研究现状[J]. 中药材, 2021, 44(11): 2716-2721.

[4] HUANG Q L, SIU K C, WANG W Q, et al. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a Cordyceps sinensis fungus [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(2): 380-386.

[5] 马橙, 翁榕安, 张平. 黑柄炭角菌的研究进展[J]. 菌物研究, 2009, 7(1): 59-62.

[6] JU Y M, HSIEH H M, HE X S. Wulingshen, the massive Xylaria sclerotia used as traditional Chinese medicine, is produced by multiple species[J]. Mycologia, 2022, 114(1): 175-189.

[7] LI D, ZHENG J, WANG M, et al. Wuling powder prevents the depression-like behavior in learned helplessness mice model through improving the TSPO mediated-mitophagy [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 186: 181-188.

- [ 8 ] LIN Y, WANG X Y, YE R, et al. Efficacy and safety of Wuling capsule, a single herbal formula, in Chinese subjects with insomnia: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 320-327.
- [ 9 ] KOLIPAKALA R S, BASU S, SARKAR S, et al. Fungal peptidomelanin: A novel biopolymer for the chelation of heavy metals [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(34): 36353-36370.
- [ 10 ] 侯若琳, 王丹亭, 刘鑫, 等. 基于国际专利数据的真菌黑色素创新发展趋势分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1470-1484.
- [ 11 ] INDRIANINGSIH A W, TACHIBANA S, DEWI R T, et al. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitor activities of natural compounds isolated from *Quercus gilva* Blume leaves[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2015, 5(9): 748-755.
- [ 12 ] KUNWAR A, ADHIKARY B, JAYAKUMAR S, et al. Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(2): 202-211.
- [ 13 ] YE Y, WANG C, ZHANG X, et al. A melanin-mediated cancer immunotherapy patch[J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(17): eaan5692.
- [ 14 ] YAMAMOTO K, TATEBAYASHI K, SAITO H. Binding of the extracellular eight-cysteine motif of Opy2 to the putative osmosensor Msb2 is essential for activation of the yeast high-osmolarity glycerol pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(3): 475-487.
- [ 15 ] QIN Y, XIA Y. Melanin in fungi: advances in structure, biosynthesis, regulation, and metabolic engineering[J]. *Microb Cell Fact*, 2024, 23(1): 334.
- [ 16 ] LEE D, JANG E H, LEE M, et al. Unraveling melanin biosynthesis and signaling networks in *Cryptococcus neoformans*[J]. *mBio*, 2019, 10(5): e02267-19.
- [ 17 ] ZHANG Y, XU S, LI Y, et al. Identification and functional characterization of major gene *pcmf5*, controlling cap color formation in *Pleurotus cornucopiae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2025, 91(3): e0189424.
- [ 18 ] MARTINEZ L M, MARTINEZ A, GOSSET G. Production of melanins with recombinant microorganisms [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 285.
- [ 19 ] ZHANG P, ZHOU S, WANG G, et al. Two transcription factors cooperatively regulate DHN melanin biosynthesis and development in *Pestalotiopsis fici*[J]. *Mol Microbiol*, 2019, 112(2): 649-666.
- [ 20 ] ZHANG F, XUE F, XU H, et al. Optimization of solid-state fermentation extraction of *Inonotus hispidus* fruiting body melanin[J]. *Foods*, 2021, 10(12): 2893.
- [ 21 ] LIU X, HOU R, WANG D, et al. Comprehensive utilization of edible mushroom *Auricularia auricula* waste residue-Extraction, physicochemical properties of melanin and its antioxidant activity[J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(11): 3774-3783.
- [ 22 ] HOU R, LIU X, YAN J, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 1017-1027.
- [ 23 ] LIN Y, CHEN H, CAO Y, et al. *Auricularia auricula* melanin protects against alcoholic liver injury and modulates intestinal microbiota composition in mice exposed to alcohol intake[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2436.
- [ 24 ] 王雨亭, 王森, 李元敬, 等. 黑木耳黑色素对缺血性脑卒中诱导溃疡性结肠炎小鼠的保护作用[J]. *食品科学*, 2023, 44(17): 110-117.
- [ 25 ] JIN F J, MARUYAMA J, JUVVADI P R, et al. Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 239(1): 79-85.
- [ 26 ] CHEN C, WU Y, LI J, et al. TBtools- II : A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [ 27 ] KANEMORI Y, GOMI K, KITAMOTO K, et al. Insertion analysis of putative functional elements in the promoter region of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A gene (*amyB*) using a heterologous *Aspergillus nidulans amdS-lacZ* fusion gene system [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(1): 180-183.
- [ 28 ] FULTON T R, IBRAHIM N, LOSADA M C, et al. A melanin polyketide synthase (PKS) gene from *Nodulisporium* sp. that shows homology to the *pksI* gene of *Colletotrichum lagenarium*[J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262(4-5): 714-720.
- [ 29 ] OH Y, DONOFRIO N, PAN H, et al. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Genome Biol*, 2008, 9(5): R85.
- [ 30 ] ZHANG A, LU P, DAHL-ROSHAK A M, et al. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pksI*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 268(5): 645-655.
- [ 31 ] ZHANG P, WANG X, FAN A, et al. A cryptic pigment biosynthetic pathway uncovered by heterologous expression is essential for conidial development in *Pestalotiopsis fici*[J]. *Mol Microbiol*, 2017, 105(3): 469-483.
- [ 32 ] ZHANG S, YANG W, CHEN J, et al. Whole genome sequencing and annotation of *Scleroderma yunnanense*, the only edible *Scleroderma* species[J]. *Genomics*, 2023, 115(6): 110727.
- [ 33 ] LIU R, MENG X, MO C, et al. Melanin of fungi: from classification to application[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2022, 38(12): 228.
- [ 34 ] GERMANN U A, LERCH K. Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(23): 8854-8858.
- [ 35 ] JOHN A P, DORA M R. A comparison of native and synthetic mushroom melanins by fourier-transform infrared spectroscopy [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(1): 49-55.
- [ 36 ] CAMACHO E, VIJ R, CHRISSIAN C, et al. The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(27): 10471-10489.
- [ 37 ] SEO D, CHOI K Y. Heterologous production of pyromelanin biopolymer using 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase isolated from *Ralstonia pickettii* in *Escherichia coli*[J]. *Biochem Eng J*, 2020, 157: 107548.

编辑:季春来

收稿日期:2025-04-07