

产黑色素酵母状真菌

李炳学^{1,2} 李颖^{2*}

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院 沈阳 110161)

(2. 中国农业大学生物学院 北京 100193)

摘要: 黑酵母是可产生黑色素的一类酵母菌总称。它们一般生长缓慢, 形态复杂, 抗逆性强。本文综述了黑酵母分类鉴定、生态学、抗逆性、致病性和黑色素应用等方面的研究进展。*Hortaea werneckii* 已成为研究盐胁迫响应蛋白及固醇合成的新的模式生物, *Aureobasidium pullulans* 也有望成为研究发育调控的模式种类。

关键词: 黑酵母, 分类鉴定, 抗逆性, 黑色素

Yeast Like Fungi Producing Melanin

LI Bing-Xue^{1,2} LI Ying^{2*}

(1. College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

(2. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: Black yeasts are a group of polymorphic yeast like fungi which produce melanin. They always grow slowly and have high stress resistance ability. The taxonomy, ecology, stress resistance, pathogenicity, and melanin of black yeasts are reviewed in this paper. *Hortaea werneckii* is an interesting novel model organism for studies on salt stress-responsive proteins as well as on sterol biosynthesis in eukaryotes. *Aureobasidium pullulans* is also like a model organism for studies on the regulation of polymorphic cell development.

Keywords: Black yeasts, Taxonomy, Stress resistance, Melanin

黑酵母(black yeast)是一类可在细胞内积累黑色素的酵母状真菌^[1]。自 19 世纪末发现以来, 至今对其研究有限, 它们一般生长缓慢、细胞具多形性, 其厚垣孢子积累黑色素, 可抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等多种逆境。

1 黑酵母的种类与鉴定

1.1 黑酵母的种类

目前发现的黑酵母菌株分属于 42 个属, 研究较

多的有 19 个属(表 1)。黑酵母的菌体形态有酵母状细胞(Yeast-like)、分生组织状结构(Meristematic)、假菌丝(Pseudohyphae)、真菌丝(Hyphae)、念珠状菌丝(Moniliod hyphae)等类型。分生组织状结构是黑酵母中某些种具有的一种特殊的细胞群体结构, 常在低 pH 等逆境中形成^[2]。菌丝形态、有性孢子和无性孢子类型是其形态学鉴定的主要依据。黑酵母的无性繁殖方式主要有芽殖、内分生孢子和分生孢子。分生孢子包括纵向分隔(如 *Trimmatostroma* 属)、横

表 1 黑酵母的主要种类及其特性
Table 1 Key features of the main species of black yeasts

目 Order	科 Family	属 Genus	子囊孢子 Ascomycetes	内生孢子 Endoconidia	分生组织状 Meristematic	耐盐性 Salt tolerance
Dothideales	Dothioraceae	<i>Comminutispora</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Discosphaerina</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Dothiora</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Mcosphaerella</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Pringsherimia</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Sydowia</i>	+	-	-	-
Dothideales	Dothioraceae	<i>Phaeotheca</i>	-	+	+	+
Dothideales	Dothioraceae	<i>Hyphospora</i>	-	+	+	+
Dothideales	Dothioraceae	<i>Hortaea</i>	-	-	+	+
Dothideales	Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>	-	-	+	+
Dothideales	Dothioraceae	<i>Phaeosclera</i>	-	-	+	+
Dothideales	Dothioraceae	<i>Fusicladium</i>	-	-	-	+
Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Capronia</i>	+	-	-	-
Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Sarcinomyces</i>	-	-	+	-
Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Cladophialophora</i>	-	-	+	-
Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Fonsecaea</i>	-	-	+	-
Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Phialophora</i>	-	-	+	-
Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	+	-	-	-

注：+：有；-：没有；*：在逆境中产生

Note: +: Have; -: No; *: Formed under stress conditions

切隔(如 *Coniosporium* 属)两种多细胞分生孢子类型,黑酵母的有性繁殖方式主要是子囊孢子。本室研究结果发现,黑酵母的不同形态是可以人为诱导的。例如,低浓度氧气可促进 *Aureobasidium pullulans* 形成菌丝,菌丝在发育后期收缩并厚壁化形成休眠的念珠状菌丝(Monilioid Hyphae, MH),MH 有很强的抗逆性。在渗透胁迫条件下,菌体不形成菌丝,而形成可吸附酵母状细胞 (Adsorptive Yeast, AY),这样一种细胞组织方式,有利于菌体定殖在固体表面。多形性的 *A. pullulans* 有望成为研究发育调控的新的模式生物。

1.2 黑酵母生理生化特征的常规检测依据

目前鉴定黑酵母常需要生理生化特征的测定,分析项目包括糖发酵、碳源利用、氮源利用、NaCl 耐受性、放线菌酮耐受及最高生长温度等,此外还需测定对不同浓度 $MgCl_2$ 利用、明胶利用、尿酶试验和 DNA 酶分析等项目^[3]。对耐盐菌如 *Hortaea*、*Phaeotheca* 和 *Aureobasidium* 等属的菌株,需检测 10%、20% 和 30% NaCl 利用^[4],具有分生组织状黑酵母还需检测 5% 和 10% $MgCl_2$ 生长情况^[5]。尽管目前

没有严格确定黑酵母的鉴定依据,但以上生理生化特征对于未知黑酵母菌株的鉴定具有重要参考价值。

1.3 黑酵母鉴定的分子生物学指标

与其他真菌类似,黑酵母的 5.8S rDNA 比较保守,可以应用在属以上的鉴定^[7]。在 Dothideales 目中,5.8S rDNA 基因长度大约 159 bp^[6]。核糖体小亚基 18S rDNA 能够作为鉴定到属的指标。在 5.8S rDNA 基因两侧存在高度可变的间隔序列 ITS1 和 ITS2,可用于属内种的区分。Dothideales 目黑酵母 ITS2 序列比对结果与 18S rDNA 系统发育树的结果是一致的^[5]。在 Dothideales 目中,亲缘关系较远菌种的 ITS1 长度变化较大,从 *Phaeotheca fissurella* 的 173 bp 到 *Trimmatostroma betulinum* 的 286 bp。因此,ITS1 和 ITS2 适用于属内种间的鉴定分析,不适于分析科以上分类单元之间的亲缘关系。形态学和生理学特征相近的黑酵母菌种,采用核糖体小亚基 18S rDNA 及 ITS 1/2 测序分析可以鉴定到种^[8]。

本实验室研究结果同样验证了以上事实,如黑酵母 *A. pullulans* (编号为 NG) 的 18S-ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 序列共计 2273 bp (NCBI 的 GenBank 上的注

册号为 EU009480), 其中 5.8S(156 bp) 序列保守, 在 GenBank 内检索发现, 其与 14 个属的 5.8S 序列相似性达 100%, 而 18S rDNA 为 1782 bp, 同源检索发现其与 *Aureobasidium* 属相似性达 100%, 可以作为鉴定到 *Aureobasidium* 属的主要指标。供试菌株 NG 的 ITS1 有 180 bp, 经同源分析结果表明, 其与 *A. pullulans* ATCC 11942、*A. pullulans* CBS 101160、*A. pullulans* CBS 110373、*A. pullulans* CBS 147.97 和

A. pullulans CBS 584.75 菌株相似性达到 100%。因此 NG 与上述菌株共处一个分支内, 见图 1。

NG ITS2 序列为 155 bp, 同源分析表明, 其与 *A. pullulans* CBS 110373 同源性最高。特别是存在 *Msp* I 酶切位点(第 76 bp 处), 是 *Aureobasidium* 属特有的^[9,10]。ITS2 系统发育树分析结果表明 NG 与 *A. pullulans* CBS 101160、*A. pullulans* CBS 110373 相似性达到 100%, 为一个同源群(图 2)。

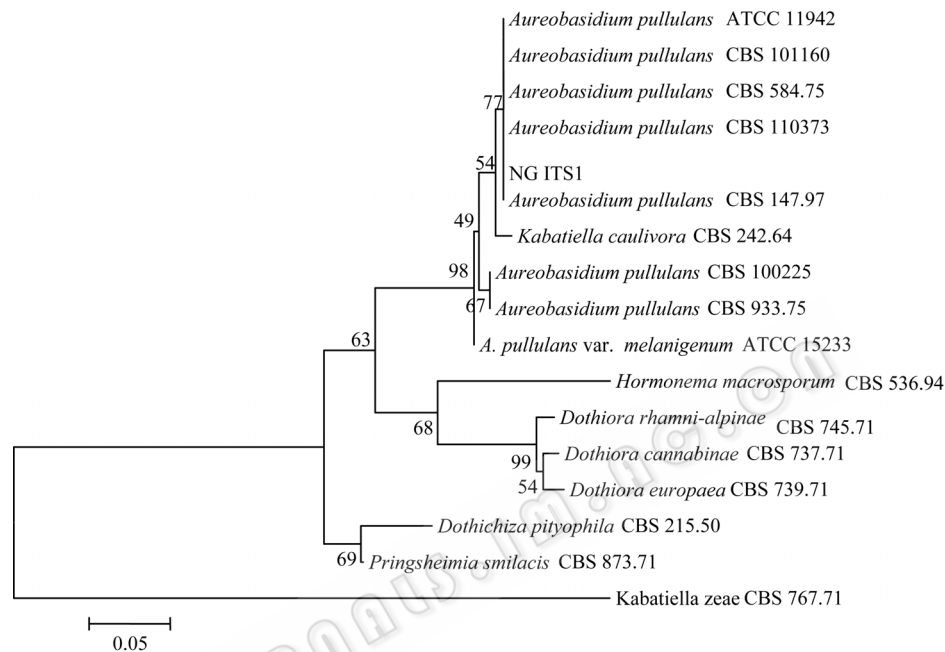


图 1 基于 ITS 1 序列构建 ITS 1 rDNA MEGA3 neighbor-joining 系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree of the ITS 1 rDNA domain constructed with the MEGA3 package on the basis of ITS 1 sequences

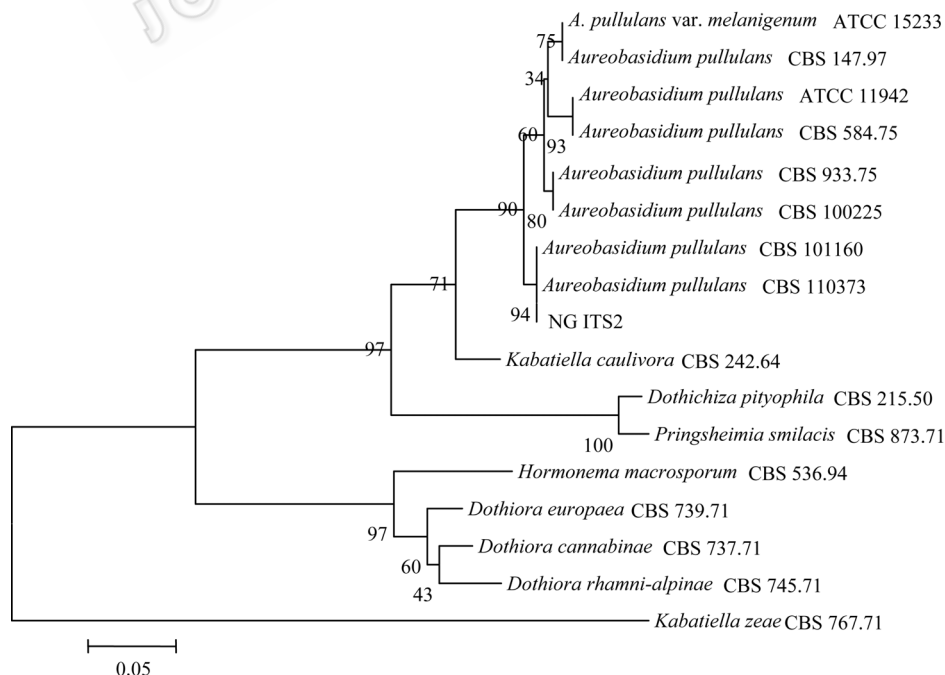


图 2 基于 ITS 2 序列构建 ITS 2 rDNA MEGA3 neighbor-joining 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree of the ITS 2 rDNA domain constructed with the MEGA3 package on the basis of ITS 2 sequences

上述结果表明ITS2比ITS1更适用于*A. pullulans*种间分群的鉴定分析,与前人结果相近^[8,11]。对于黑化变种*A. pullulans* var. *melanigenum* ATCC 15233,其ITS1和8株*A. pullulans*的差异明显(图1),相似性在98.5%~99.3%。其ITS2与*A. pullulans* CBS 147.97相似性达到100%,而ITS1相似性仅为98.5%。所以ITS1对于区分*A. pullulans*和*A. pullulans* var. *melanigenum*优于ITS2。综合分析比对ITS1与ITS2序列系统发育树对于准确鉴定*Aureo-basidium*是必须的。

2 黑酵母的特性

2.1 黑酵母的生态学特点

黑酵母主要生活在营养缺乏的生态环境(表2),

抗逆性强。来自其他生境的还有土壤中的 *H. werneckii* CBS 373.92、酸湖中的 *Bispora* sp. CBS 335.97、*Trimmatostroma* sp. CBS 303.84 及浴室窗户上 *A. pullulans* CBS 100225^[6]。许多黑酵母可以产生菌丝或假菌丝,使菌体可以吸附在植物叶片或岩石表面。可吸附酵母状细胞是黑酵母*A. pullulans* NG的一种细胞组织方式,有利于菌体定殖在草莓果实表面(本研究)。

应用rRNA目标靶向探针进行原位杂交技术可以检测生态环境中黑酵母的种类。应用 β -葡聚糖酶可使特异性探针穿透黑酵母加厚的细胞壁进入细胞质中起作用。选用黑酵母18S rDNA上第1361 bp至1380 bp间保守区域作为特异性探针,可专一性识别*Coniosporium*属^[12]。

表2 黑酵母的主要生境及其代表菌种
Table 2 Habitats of some black yeasts

生境 Habitats	人类体表 Human skin	植物体表 Surfaces of Plant	高盐环境 Hypersaline environments	岩石表面 Rock surfaces
	<i>Hortaea werneckii</i>	<i>H. werneckii</i>	<i>H. werneckii</i>	<i>H. werneckii</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Cladosporium uncinatum</i>
	<i>Sarcinomyces phaeomuriformis</i>	<i>Stenella araguata</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cladosporium apollinis</i>
代表菌种 Species	<i>Trimmatostroma abietis</i>	<i>Hyphospora agaraciensis</i>	<i>Phaeothea triangularis</i>	<i>Cladosporium perforans</i>
	<i>Botryomyces caespitosus</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i>
	<i>Cladophialophora ajelloi</i>			<i>Trimmatostroma abietis</i> <i>Phaeosclera</i> sp.

2.2 黑酵母的耐盐性

黑酵母*H. werneckii*能在0~32% (W/V) NaCl范围内生长^[13]。与啤酒酵母相比,在盐浓度增加时,其膜组分和流动性及代谢反应上均不同^[14]。MAPK(mitogen-activated protein kinase)促分裂原活化蛋白激酶Hog1p在酵母的高渗反应中起重要作用。在*H. werneckii*中分离出了Hog1p基因的同源物HwHog1p,编码359个氨基酸。HwHog1p包括1个位于蛋白激酶催化中心的TGY结构和1个C端结合域。随着盐浓度增加,其活性在翻译水平上被调控。HwHog1p在无盐胁迫条件下定位在细胞质膜上,盐浓度增加使其从膜上转移到细胞核^[15]。

H. werneckii、*Phaeothea triangularis*及*Trimmatostroma salinum*三种盐生黑酵母细胞壁中的黑色素

可被tricyclazole抑制,无NaCl或10% NaCl条件下结果相同^[16]。*A. pullulans* NG在10% NaCl条件下黑色素合成受抑制(本研究)。*H. werneckii*中的固醇合成受3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG R)调节。该酶特性与啤酒酵母中的不同。这是盐生黑酵母独特的生态生理学。*H. werneckii*可以作为研究盐胁迫响应蛋白及固醇合成的新的模式生物^[17]。在*H. werneckii*中甘油合成是提高细胞质浓度适应高盐环境的反应。在不同盐浓度下,*H. werneckii*中有8种不同基因表达。基因产物有P型-ATP酶、辅酶Q还原酶、顺乌头酸酶、RNA解旋酶、Asn-tRNA连接酶、异戊醇氧化酶和磷脂酰肌醇-3-激酶。这些酶参与了*H. werneckii*在高盐胁迫下的反应途径。甘油的合成在其它耐盐微生物中也存在^[18]。*H. werneckii*表现出了

不同的能量产生机制和通过翻译后修饰来调控基因表达, 以适应高盐环境^[14]。另外, 盐生黑酵母 *H. werneckii*、*Alternaria alternata*、*Cladosporium sphaerospermum*、*Cladosporium sp.* 和 *A. pullulans* 还可以合成麦角固醇来适应高盐环境^[19]。

2.3 黑酵母致病性

在热带水果及鸟和蝙蝠内脏存在的 *Wangiella dermatitidis*, 可以通过公共浴室中高温高湿的空气传播到人, 导致囊性纤维化脑病^[20]。人类致病菌 *Sporothrix chenckii* 可产生 DHN-melanin 型黑色素, 导致各种皮肤病以及深层次感染, 严重者发生囊性纤维化、淋巴细胞白血病、糖尿病、支气管扩张和风湿性关节炎等系统性病变^[21,22]。*Chaetothyriales* 黑酵母中的黑色素使得菌体不被人体粒性白细胞的吞噬溶酶体杀死, 成为人体潜在致病菌^[23]。黑色素是与黑酵母侵染有关的致病因子之一, 阻断黑色素合成可以防止疾病发生, 研究黑色素合成途径对人类疾病的治疗具有理论和实践意义。

2.4 黑色素及其应用

黑色素能够抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等多种逆境。黑色素还可螯合金属离子以限制其他生物的生长。黑色素结构复杂, 只溶于热碱。黑色素提取首先用乙醇浸提菌体离心后弃上清要沉淀, 然后用 5.0 mol/L NaOH 120°C 加热 20 min, 冷却后离心取棕黑色上清, 加等体积 pH 8.0 硼酸盐缓冲液, 检测 OD₅₄₀ 代表黑色素含量^[24]。

黑色素的化学结构可分为多巴型黑色素(DOPA-melanin)和 1,8-二羟萘型黑色素(DHN-melanin)。DOPA-melanin 主要存在于高等动物及人类, DHN-melanin 多存在于真菌中^[25]。黑酵母合成的黑色素大都属于 1,8-二羟萘型黑色素。*A. pullulans* NG 黑色素合成途径中还存在蓝色素支路使菌体表现为黑绿色, 不同于 1,8-二羟萘型黑色素和多巴型黑色素(DOPA-melanin)合成途径(本研究)。*Dothideales* 黑酵母在特定发育阶段或特定环境条件下形成黑色素, 使它们适于在逆境中生存^[5]。黑色素合成及调控机制研究对于控制人类和植物的产黑色素病原真菌有现实意义。

黑色素被广泛应用于皮肤病学和化妆品学, 并且表现出抗氧化物和射线的作用^[26]。溶于水-甘油混合物的纯化黑色素具有护肤效果, 而且与黑色素浓

度正相关^[27]。

3 展望

我国对产黑色素的非常规酵母研究开展的比较晚, 国际上对黑酵母研究也仅停留在菌株形态和分类研究。由于黑酵母的耐盐性、抗辐射性、抗重金属和抗酸性等独特的抗性特点, 加之其多变的细胞形态和分泌多糖的特性, 越来越引起人们的关注。它们不仅可作为选择抗逆基因, 研究抗逆机制和发育调控的模式生物, 还可作为开发化工原料的备选材料。有资料表明, *H. werneckii* 已成为研究盐胁迫响应蛋白及固醇合成的新的模式生物, 黑酵母中的 *A. pullulans* 分泌的短梗霉多糖 pullulan 在医药、化妆品、食品和生物材料等领域中显示出良好的耐酸碱性、高强韧性、水溶性和乳化性的特征^[28-30]。随着人们的需求越来越广泛, 黑酵母资源的调查和开发必将成为人们关注的热点。

参考文献

- [1] Zalar P, DE-Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Taxonomy of the endoconidial black yeast genera *Phaeothea* and *Hypophospora*. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 49-56.
- [2] Zalar P, DE-Hoog GS, Gunde-Cimerman N. *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 57-62.
- [3] Wendy A, Untereiner AH, Gerrits G, et al. Nutritional physiology of species of *Capronia*. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 98-106.
- [4] Zalar P, DE Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 38-48.
- [5] Sterflinger K, DE-Hoog GS, Haase G. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 5-22.
- [6] DE Hoog GS, Zalar P, Urzi C, et al. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 31-37.
- [7] Mitchell TG, White TJ, Taylor JW. Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. *J Med Vet Mycol*, 1992, **30**: 207-218.
- [8] Yurlova NA, DE-Hoog GS, Gerrits AHG, et al. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 63-69.
- [9] Yurlova NA, Mokrousov IV, DE-Hoog GS, et al. Intras-

- pecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1995, **68**: 57–63.
- [10] Yurlova NA, Uijthof JMJ, DE-Hoog GS, *et al.* Distinction of species in *Aureobasidium* and allied genera by PCR-ribotyping. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996, **69**: 323–329.
- [11] Yurlova NA, DE-Hoog GS. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, **72**: 141–147.
- [12] Sterflinger K, Hain M. *In situ* hybridization with rRNA targeted probes as a new tool for the detection of black yeasts and meristematic fungi. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 23–30.
- [13] Gunde-Cimerman N, Zalar P, DE-Hoog GS, *et al.* Hyper-saline waters in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEM Microbiology Ecol*, 2000, **32**: 235–240.
- [14] Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, *et al.* Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiology*, 2002, **45**: 665–672.
- [15] Turk M, Plemenitaš A. The HOG pathway in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: isolation of the *Hog1* homolog gene and activation of HwHog1p. *FEM Microbiology letters*, 2002, **216**: 193–199.
- [16] Kogej T, Wheeler MH, Rizner TL, *et al.* Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEM Microbiology*, 2004, **232**: 203–209.
- [17] Petrovič U, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, *et al.* Salt stress affects sterol biosynthesis in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEM Microbiology letters*, 1999, **180**: 325–330.
- [18] Neves L, Oliveira R, Lucas C, *et al.* Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Research*, 2004, **5**: 51–62.
- [19] Méjanelle L, López JF, Gunde-Cimerman N, *et al.* Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hyper-saline environments. *Journal of Lipid Research*, 2001, **42**: 352–359.
- [20] Horre R, Schaal KP, Siekmeier R, *et al.* Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis (A prospective study). *Respiration*, 2004, **71**: 360–366.
- [21] Matsumoto T, Matsuda T, McGinnis MR, *et al.* Clinical and mycological spectra of *Wangiella dermatitidis* infections. *Mycoses*, 1992, **36**: 145–155.
- [22] Blinova MI, Yudinseva NM, Kalmykova NV, *et al.* Effect of melanin from black yeast fungi on proliferation differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. *Cell Biology International*, 2003, **27**: 135–146.
- [23] Haase G, Sonntay L, Melzer-Krick B, *et al.* Phylogenetic inference by SSU-gene analysis of members of the *Heptorchiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Studies in Mycology*, 1999, **43**: 80–97.
- [24] Gadd GM. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, **9**: 237–240.
- [25] Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. *J Microbiol*, 1998, **44**: 1115–1136.
- [26] Kwam E, Tynnell RM. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA of melanin cells. *J Invest Dermatol*, 1999, **113**: 209–213.
- [27] Paramonov BA, Turkovskii II, Potokin IL, *et al.* Photoprotective activity of melanin preparations from black yeast-like fungi during Uv Irradiation of Human skin: dependence on the concentration. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2002, **133**(4): 377–379.
- [28] Prasongsuk S, Leathers TD, Kuhirun M. Characterization of Exopolysaccharides produced from *Aureobasidium pullulans*. Society of Industrial Microbiology Annual meeting, 2004, p.72
- [29] 李卫旗, 杨志坚. (60)Co γ 射线对不同细胞形态出芽短梗霉的辐射诱变效应. 菌物系统, 1998, **17**(3): 269–273
- [30] 王长海. 短梗霉多糖在水果保鲜方面的应用. 生物技术, 1999, **9**(1): 46–49.