

细菌黑色素的合成途径及生物功能研究进展

柴保中 王禾 彭珍荣 沈萍 陈向东*

(武汉大学 生命科学学院 武汉 湖北 430072)

摘要:黑色素的合成是生物界从细菌到人类都普遍存在的现象。黑色素在生物体中具有抗紫外辐射、清除自由基等功能,对于生物的生长发育虽非必需,却能极大提高生物体的生存竞争能力。此外,黑色素合成途径中的关键酶类如酪氨酸酶能代谢不少酚类物质,在化工等领域具有实际应用价值。本文重点从细菌黑色素的种类、生物合成途径、黑色素的生物学功能方面进行阐述。

关键词:黑色素, 细菌酪氨酸酶, HGA 途径, 生理功能

Advance in study on pathway of melanin biosynthesis and their physiological function in bacteria

CHAI Bao-Zhong WANG He PENG Zhen-Rong SHENG Ping
CHEN Xiang-Dong*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: Production of melanin has been described in a variety of life forms ranging from bacteria to human. Though melanin is not essential to the growth of organisms, it can help to improve their competitive abilities through conferring organisms diverse functions such as resistance to UV radiation and toxic free radicals elimination. Nowadays, research on enzymes essential for the formation of melanin has attracted more attentions because they can metabolize dozens of phenol compounds. It made these enzymes, like tyrosinase, a significant value in biotechnology application. This review summarizes the present knowledge of melanin categories, biosynthetic pathways and physiological functions.

Keywords: Melanin, Bacterial tyrosinase, HGA pathway, Physiological function

黑色素(Melanin)是广泛存在于自然界中的一类天然色素家族^[1],根据其来源可分为植物源黑色素、动物源黑色素以及微生物源黑色素。虽然对于黑色素的研究已经开展了一个多世纪,但由于其结

构上为非均质的多聚物,它们的组成可因组成单元与聚合过程的不同而出现极大差异,因此这类色素只是一类结构复杂的多酚类或吲哚类异源多聚芳香族化合物的总和^[2]。目前的研究证明,黑色素在

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31070077)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-27-68754533; ✉: xdchen@whu.edu.cn

收稿日期: 2013-08-15; 接受日期: 2013-09-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

生物体中具有抗紫外辐射、清除自由基等功能,虽然对于生物的生长发育并非必不可少,但是却能提高生物体生存与竞争的能力^[3]。为了更深入地理解这种自然界中普遍存在的生物色素及其功能,红外光谱分析、电子自旋共振分析、核磁共振谱、分析级质谱分析等技术被广泛应用于对黑色素结构的研究。与此同时,围绕酪氨酸酶这一黑色素合成途径中关键酶的研究也相继展开。近些年来,基因组测序及蛋白质分析技术的快速发展,为黑色素合成代谢及功能的研究提供了更多的思路与数据基础。

1 细菌黑色素的类型与生物学功能

1.1 细菌黑色素的分类

根据合成途径和中间代谢产物的不同,细菌来源的黑色素一般可分为以下几类:第一类是真黑色素(Eumelanin),含氮,颜色为深棕色或黑色,通常通过酪氨酸酶催化酪氨酸经由多巴途径得到,是5,6-二羟吲哚(Indole-5,6-quinone)和5,6-二羟吲哚-2-羧酸(Indole-5,6-quinone carboxylic acid)为基本单元构成的异聚体^[4]。第二类是棕黑色素(Pheomelanin),又称为脱黑色素,颜色为红色或黄色,含氮、硫。与真黑色素的差别仅在酪氨酸氧化为多巴醌后,在色素形成的后续阶段有半胱氨酸参与反应^[5]。这两类黑色素普遍存在于自然界中,均通过经典的 Raper-Mason 途径合成,又被称为 L-多巴黑色素(L-DOPA melanin)。第三类是脓黑色素(Pyomelanin),其关键性中间产物是尿黑酸(Homogentisis acid, HGA),因此也被称为尿黑酸黑色素(HGA melanin),是2-乙酰基对苯醌为基本单元构成的多聚体,经由对羟苯丙酮酸羟化酶(4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, EC 1.13.11.27)催化底物酪氨酸经过尿黑酸途径所形成^[6],该类色素在动物与微生物中均有报道。第四类是1,8-二羟基萘(DHN)黑色素,主要存在于植物与微生物中,由丙二酸单酰辅酶A(Malonyl-CoA)经聚酮体合成酶(Polyketide synthase, PKS)催化合成1,8-二羟基萘(1,8-DHN),再通过聚合化得到的多聚

色素^[7-8]。脓黑色素与 DHN 黑色素这两类色素由于在化学组成上均不含氮或硫,有别于 L-多巴色素,又被称为异黑色素(Allomelanin)。

1.2 细菌黑色素的生物学功能

黑色素在生物界中普遍存在,虽然不是生物体生长发育必需的因子,但却能极大地提高生物体的生存适应能力。黑色素形成在动植物中的生物学功能已经比较明确,而对于微生物特别是细菌而言却了解不多。目前普遍认为细菌黑色素主要通过其抗辐射、吸收电子、清除氧自由基的能力从多方面有利于黑色素产生菌的生存竞争。

(1) 提升细菌的生存能力:在细菌的生存竞争中,黑色素有时也起到重要作用。一方面,黑色素能够吸收紫外辐射、清除自由基等,能极大提高细菌的生存能力。研究者发现苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的产黑色素突变株比野生株具有更强的紫外线抵抗能力和马铃薯茎蛾的杀虫活力^[9]。另外,一些细菌合成的黑色素具有抗生素活性。比如最新的研究表明,海洋链霉菌形成的黑色素对具有致病性的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳杆菌(*Lactobacillus vulgaris*)、霍乱弧菌等具有抑制效果,起到明显的抗菌作用^[10]。黑色素表现的这种抗菌活性既可提高细菌自身的生存竞争力,也是未来制药业潜在的新型抗生素来源^[11]。

(2) 促进固氮:在固氮细菌中,黑色素可以促进固氮作用。园褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)在有氧环境中可以将儿茶酚类物质代谢合成黑色素,而形成黑色素的能力会在缺少氮源的时候急剧增强。虽然黑色素的产生与固氮酶并没有直接的关联,但黑色素合成过程中酚类物质的氧化被认为可消耗大量的氧气从而为固氮菌在固氮过程中提供了结合大气氮所必需的还原态环境。与此同时,黑色素在该过程中可以清除羟基自由基与额外的活性氧原子,对固氮菌本身也起到一定的保护作用^[12-13]。

(3) 厌氧呼吸系统中的重要电子传递载体:在

厌氧环境中,厌氧呼吸中的电子传递载体对某些厌氧菌或者兼性厌氧菌的生命活动至关重要。由于黑色素不仅能吸收光谱的电磁辐射与电离辐射,同时对金属离子、声音和自由基等都有较强的吸收能力,因此一直被认为是细菌中一种重要的电子传递载体。比如在兼性厌氧的海洋细菌海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)中,黑色素通过吸收的电子可以帮助将最终电子受体 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} ,促进厌氧呼吸作用。有人认为,产生黑色素是海洋细菌 *S. algae* 进化适应性的必然结果^[14]。

(4) 某些致病菌的毒力因子:对于不少致病菌而言,黑色素被认为是重要的毒力因子。比如对霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)致病性的研究发现,产黑色素的霍乱弧菌突变株比不产色素的野生株具有更显著的霍乱毒性,并在对寄主的侵染能力方面提高了5倍^[15]。黑色素在致病菌侵染过程中被认为能清除免疫反应中的超氧阴离子自由基,从而保护致病菌不被宿主吞噬细胞清除。

微生物来源的黑色素合成方式相对简单,又具有操作方便、易于大规模生产的优点,是重要的黑色素研究与开发资源。利用黑色素抗辐射的功能,研究者发现苏云金芽孢杆菌黑色素高产突变株在作为生物杀虫制剂时,在工业应用上具有更好的光稳定性^[16]。本实验室自20世纪80年代就一直进行微生物产黑色素的研究,筛选鉴定了一系列黑色素高产菌株并构建了相应的基因工程菌株。通过对黑色素高产菌株的研究,进一步证实黑色素作为生物杀虫剂紫外保护剂及防晒型化妆品方面具有应用潜力^[17-18]。

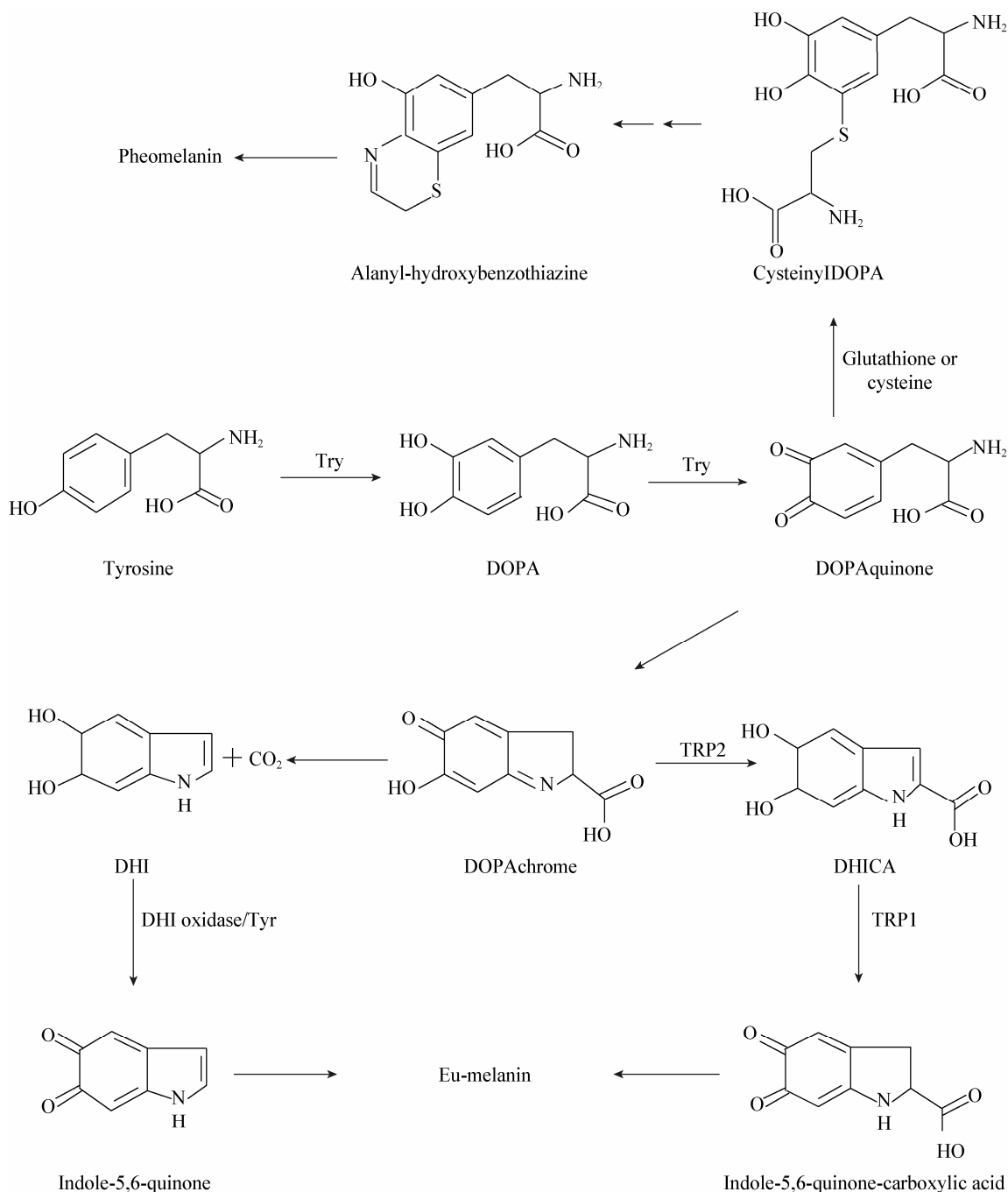
2 L-多巴黑色素的 Raper-Mason 合成途径

Raper-Mason 途径也就是黑色素合成的酪氨酸酶途径,最早由 Raper 在 20 世纪 20 年代提出,之后被 Mason 证实并得到了完善^[19-20],其核心理论是认为黑色素的形成是酶催化与化学反应共同作用的结果。如图 1 所示,Raper-Mason 途径第一个阶段是酪氨酸酶(Tyrosinase, EC 1.14.18.1)介导的单酚物质(L-酪氨酸)和双酚物质(L-多巴)的酶促反

应,导致 L-多巴醌的合成;第二个阶段是 L-多巴醌经由一系列的化学氧化反应与酶反应,最终形成一类化学结构极其复杂的非均质类多酚聚合物,即 L-多巴黑色素。

酪氨酸酶是黑色素 Raper-Mason 合成途径中的关键酶,广泛存在于动物、植物及微生物中。它可以同时催化单酚类物质的羟化反应和双酚类物质的氧化反应。大量的化学实验和波谱研究,包括圆二色谱、顺磁共振谱、电子吸收光谱及拉曼光谱都表明,不同来源的酪氨酸酶均与血蓝蛋白图谱特征类似且具有非常相似的活性中心位点。该活性中心具有一对分别由 3 个组氨酸残基组成的铜离子结合位点,即 CuA 和 CuB 域。其中 CuB 域在所有的分类系统中具有高度的保守性,因而被普遍认为是一种古老的结构域,在进化的早期就已经形成^[21]。Claus 等对酪氨酸酶的氨基酸组成进行比对分析时进一步发现,许多真核及原核的酪氨酸酶的铜离子结合位点都高度保守。已知酪氨酸酶活性中心的组氨酸在分布上的序列特征标志分别是 H-x(n)-H-x(8)-H 和 H-x(3)-H-x(n)-H,其他位点的组氨酸对底物结合的方向性起作用,对铜离子的结合并无贡献^[22]。之后, Fairhead 等通过对酪氨酸酶序列进一步比对发现, CuA 与 CuB 之间含有一段氧分子结合区域,特征序列为 PYWDW^[23]。

酪氨酸酶虽然在不同的生物体内具有相似的生理功能,但他们的理化性质却有不同程度的差异性。同真核生物来源的酪氨酸酶不同,细菌酪氨酸酶不仅等电点范围较广^[24],而且在一级结构上的同源性也很低。通过比对 NCBI 数据库可以发现,细菌来源的酪氨酸酶的保守区域很少且氨基酸的组成与数目差异很大。黑色素合成的 Raper-Mason 途径虽然是由酪氨酸酶催化的一个过程,但细菌酪氨酸酶结构上的差异性决定了其作用机理也存在差异。这些差异能否进一步揭示酪氨酸酶与黑色素合成现象的生物学意义,仍是该研究领域值得思考的问题。

图1 黑色素合成的 Raper-Mason 途径^[5]Figure 1 Raper-Mason pathway, the major pathway to melanin formation^[5]

注：Tyr：酪氨酸酶；TRP1：酪氨酸酶相关蛋白；TRP2：酪氨酸酶相关蛋白。

Note: Tyr: Tyrosinase; TRP1: Tyrosinase related protein; TRP2: Tyrosinase related protein.

目前已知的不少细菌酪氨酸酶基因在染色体上是单独存在和行使功能的^[22]，其编码的酪氨酸酶具备典型结构的2个活性中心(CuA和CuB)与氧

原子结合区域，如来自巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的酪氨酸酶^[25]。2011年，Sendovski等^[26]分离鉴定了巨大芽孢杆菌酪氨酸酶 TyrBm 的

三维结构,分辨率为 2.0–2.3 Å。通过晶体结构解析发现,α螺旋式是 TyrBm 二级结构的主要元件,而铜离子活性中心则处于三型铜离子蛋白保守的四螺旋结构束核心区域,每个铜离子均结合在 3 个由四螺旋结构凸出的组氨酸上。之前报道巨大芽孢杆菌的酪氨酸酶以单体形式存在^[25],不过结晶出来的 TyrBm 却以二聚体形式存在。对结晶 TyrBm 的研究发现,6 个组氨酸残基构成的活性中心依旧依赖铜离子激活,但不同的检测条件下铜离子的结合状态却不同。这种铜离子结合状态随环境变化的模式暗示着某种机制在调控其与酶分子的结合或分离。与此同时,研究发现 TyrBm 中酶活中心附近的 R209 和 V218 残基可通过弹性实现位置调节,在底物结合的方向性方面扮演着重要角色^[26]。

对链霉菌属(*Streptomyces*)与地中海海单胞菌(*Marinomonas mediterranea*)的酪氨酸酶研究却发现,这些细菌是通过操纵子结构利用分子伴侣蛋白(Auxiliary chaperon)来调节酪氨酸酶的活性。在链霉菌属的 *melC* 操纵子和地中海海单胞菌的 *ppoB* 操纵子中,分子伴侣蛋白(MelC1 和 PpoB2)扮演着将铜离子传递到酪氨酸酶(MelC2 和 PpoB1)活性中心及辅助酪氨酸酶分泌的角色^[22]。通常情况下,二者缺其一则细菌就会失去合成黑色素的能力,但向地中海海单胞菌的 *ppoB2* 基因敲除株培养物或细胞抽提液中添加铜离子被证实可部分恢复 PpoB1 的活性^[27]。2006 年,Matoba 等^[28]首次从抗生链霉菌(*Streptomyces castaneoglobisporus*)中得到了酪氨酸酶 TyrSc 的晶体结构,分辨率达到 1.4 Å。他们的研究发现与酪氨酸酶活性紧密相关的一个“球童”蛋白 ORF378 与铜离子运输到酪氨酸酶的活性中心过程相关,而且通过改变酪氨酸酶的形态还可影响底物与酶活性中心的接触。2011 年,Matoba 研究小组进一步鉴定了该“球童”蛋白与酪氨酸酶的相互作用,证实了其在铜离子运输与酪氨酸酶活性激活中的作用^[29]。对链霉菌中酪氨酸酶三维结构的解析,不仅从结构上为分子伴侣调节的酪氨酸酶作用机理提供了证据,同时对研究其它来

源的酪氨酸酶也具有指导意义,如小鼠酪氨酸酶三维结构模式的预测等^[30]。

上述两类细菌酪氨酸酶虽然在作用机理上有所不同,但均具备酪氨酸酶的典型结构特征,并在晶体结构上证明了 CuA 与 CuB 域以及氧原子结合区域在酪氨酸酶活性激活中的关键作用。此外,茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和菜豆根瘤菌(*Rhizobium etli*)等细菌的酪氨酸酶除了上述保守结构域外还含有一段类似于真菌酪氨酸酶的 C 端,该 C 端的切除可以使酶活性增加 100 倍左右^[31-32]。另一方面,虽然一些酪氨酸酶的结构特征可以作为鉴定酪氨酸酶的一个依据,但仍有不少酪氨酸酶并不含有上述的结构特征,如从固氮菌(*Azospirillum* sp.)、玫瑰红嗜热菌(*Thermomicrobium roseum*)及恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中鉴定的酪氨酸酶^[23]。与真核生物相比,细菌来源的酪氨酸酶显然具有更加丰富的多样性。

除酪氨酸酶外,在地中海海单胞菌、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、恶臭假单胞菌及一些链霉菌中发现漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)也可催化多巴黑色素的合成^[22]。漆酶也是含有金属离子的酶,在它们的活性位点包含 1–4 个铜离子,与血浆铜蓝蛋白及抗坏血酸氧化酶同属于蓝色铜离子结合氧化酶。由于漆酶和酪氨酸酶在原核和真核生物中都有报道,并且在一些菌中酪氨酸酶与漆酶会同时出现并执行相似的生物学功能,引得人们开始重新思考二者的进化起源关系^[33]。

本实验室前期从武汉东湖中分离到一株高产黑色素的中间气单胞菌(*Aeromonas media*) WS 菌株,经过 HPLC 中间产物鉴定证实该菌所产黑色素属于多巴黑色素。由于产黑气单胞菌的全基因组注释及结构域扫描时并未找到酪氨酸酶与漆酶相关基因,我们通过纯化酶蛋白后进行 N 端序列测定的方法克隆到了一个酪氨酸酶基因 *tryA*^[34],但结构分析发现该酶并不具备典型的酪氨酸酶结构特征。之后的基因缺失等实验进一步证实该酶并不是 WS 菌株中黑色素合成的关键因子^[35],可见缺少典

型保守域特征的一些酪氨酸酶在黑色素合成中的作用与作用机理仍具有一定的争议,多巴黑色素形成有可能还存在尚未阐明的机制。

3 HGA 黑色素的合成

随着对细菌黑色素认识的不断深入,研究者发现细菌中并非只通过酪氨酸酶的途径来合成黑色素。对霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、谢瓦纳拉菌(*Shewanella colwelliana*)、恶臭假单胞菌

(*Pseudomonas putida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)以及 *Hypomonas* sp.等致病菌或海洋细菌的研究发现^[36-37],它们是由对羟苯丙酮酸羟化酶催化底物由尿黑酸途径形成终产物脓黑色素。

随着研究的深入与基因组测序技术的发展,尿黑酸途径的调控基因与调控蛋白被陆续鉴定。在细菌中,以恶臭假单胞菌与铜绿假单胞菌为例,目前的研究发现该通路中有 3 个基因对于脓黑色素的形成起到至关重要的作用(图 2)。其中 *hpd* 编码

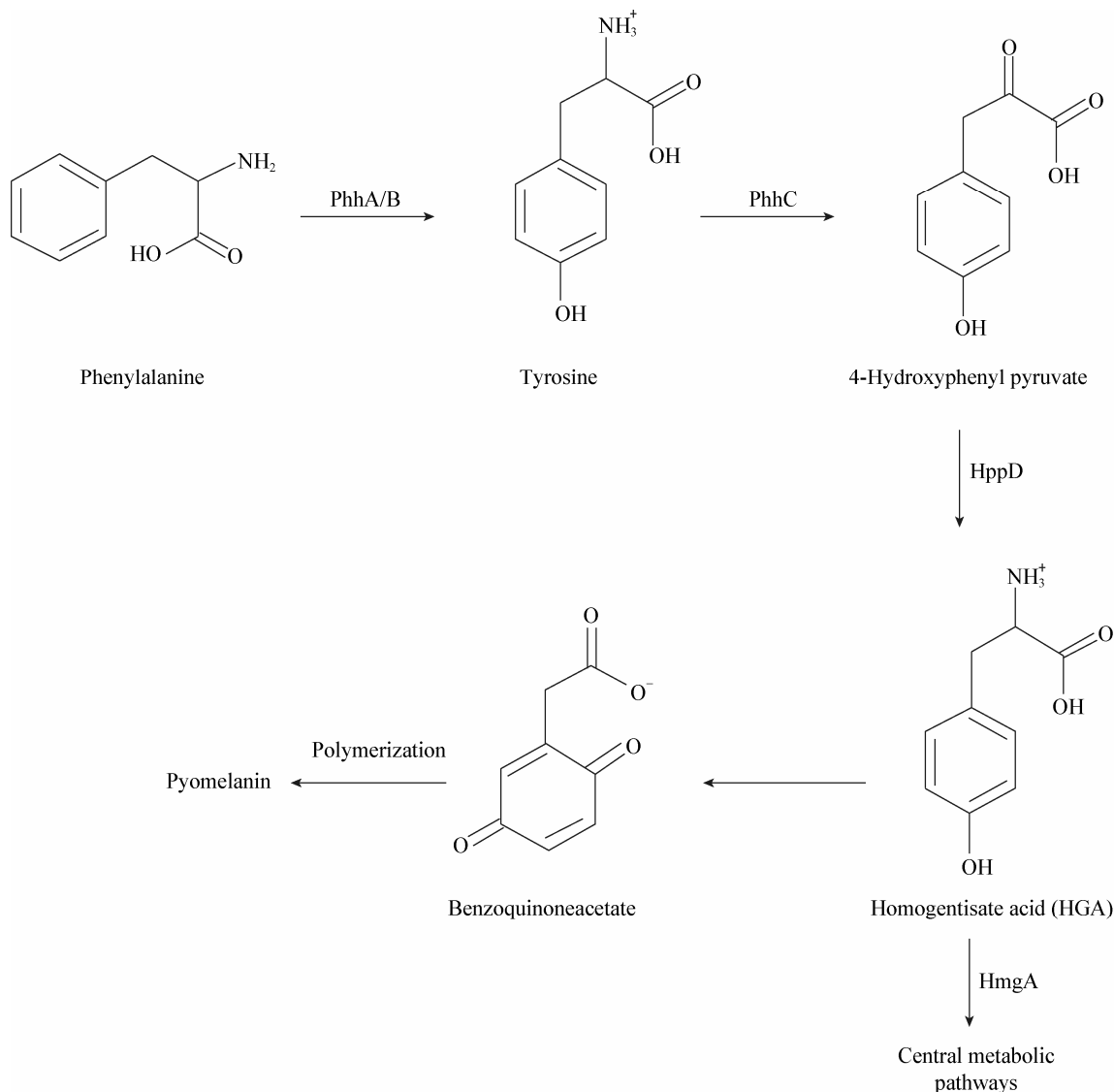


图 2 脓黑色素的 HGA 合成途径^[38]
Figure 2 Synthesis of pyomelanin^[38]

合成的对羟苯丙酮酸羟化酶(HPPD)负责将芳香族氨基酸代谢合成为中间产物尿黑酸,该过程在苯丙氨酸单加氧酶(PhhA, EC 1.14.16.1)、蝶呤-4- α -甲酰胺脱水酶(PhhB, EC 4.2.1.96)与芳香族氨基酸转氨酶(PhhC, EC 2.6.1.57)的协助下完成^[39]。由于尿黑酸是细菌中间代谢通路中的重要前体物质,尿黑酸 1,2-二氧化酶(HmgA, EC 1.1.1.88)的缺陷可以切断尿黑酸进入中间代谢的通路,从而促使脓黑色素的大量形成^[40]。最近的研究发现,尿黑酸从胞内运输到胞外进而再通过自氧化与多聚化作用形成脓黑色素的过程受到 ABC 转运系统的调控。该转运系统的编码基因在铜绿假单胞菌 PA14 菌株中以操纵子形式存在,负责尿黑酸的运输。该系统的缺陷直接导致脓黑色素合成通路的中断。此外,通过转座子插入失活的方法,在 PA14 菌株中同时发现了与脓黑色素合成代谢相关的其他一些基因,包括核酸合成相关基因 *pyrC*、*pyrD*、*pyrE*、*pyrF* 与 *carB*; 转录调控因子 *phhR*、*cbrB*、*ntnC* 与 *rpoN*; 膜蛋白编码基因 *kup* 和 *blc*; 以及其他未知功能的蛋白 *isgH*、*gnyA* 等^[38]。这些基因的中断缺失都会直接导致黑色素合成缺陷或产量下降,但这些基因或者其产物在 HGA 黑色素形成中的作用尚不清楚。

通过对一些具有酪氨酸酶合成途径细菌的基因组分析发现,脓黑色素合成途径的调控基因在这些菌的基因组中也有存在。此外,研究也表明一些致病菌会同时存在脓黑色素与多巴黑色素两种黑色素代谢途径。比如在霍乱弧菌中,非寄生的菌株合成的黑色素通常是脓黑色素,但在饥饿、高温等压力环境中它们会诱导合成真黑色素,在一个致病性突变株 HTX-3 中甚至还发现有脱黑色素的合成^[41]。最近,我们构建了中间气单胞菌 WS 菌株的转座子随机插入突变体库获取了一系列的黑色素合成缺陷菌株,部分基因鉴定发现属于尿黑酸途径,比如 *phhA* 等。另外,通过全基因组测序分析,我们同时发现 *hpd* 等也存在于该菌基因组上,暗示着尿黑酸合成通路在该菌株中可能也存在^[35]。对

于前期鉴定存在 L-多巴色素代谢的 WS 菌株而言^[42],尿黑酸途径的存在在该菌株色素代谢中扮演着什么样的角色,是一个我们期待解答的问题。

4 DHN 黑色素的合成

DHN 黑色素在微生物致病性方面扮演着重要角色,是不少致病性真菌的重要毒力因子^[3]。在细菌中,DHN 黑色素并不常见,主要在一些链霉菌的孢子中有该类色素的合成。目前的研究发现,在 DHN 黑色素的合成过程中,聚酮体合成酶起着关键作用。如图 3 所示,该酶催化丙二酸单酰辅酶 A 合成 1,3,6,8-四羟基萘(1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene, 1,3,6,8-THN),进而经过一系列脱水等化学作用合成 1,8-二羟基萘(1,8-DHN),再进一步聚合形成 DHN 黑色素^[41]。

聚酮体合成酶属于古老的多结构域蛋白家族,在不少微生物的中间代谢过程中扮演着重要角色,包括色素合成、毒素与抗生素合成等。在微生物中,聚酮体合成酶通常有 I 型与 II 型之分,其中 I 型合成芳香聚酮体,II 型主要合成还原型聚酮体。真菌通常利用 I 型聚酮体合成酶代谢合成 DHN 黑色素^[43-44],而在细菌中情况却不同。虽然 I 型聚酮体合成酶在细菌中普遍存在,如对阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的全基因组分析就分别发现了 8 个和 3 个 I 型聚酮体合成酶编码基因^[43],但研究却发现一些链霉菌,如 *S. coelicolor* A3(2),变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)和郝氏链霉菌(*Streptomyces halstedii*)却利用 II 型聚酮体合成酶合成其孢子中的聚酮体黑色素^[45-46]。1999 年,Funa 等通过 DNA 重组技术首次从灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中克隆了负责编码合成聚酮体合成酶的基因 *rppA*,并通过基因的缺失回补等技术直接证实了聚酮体合成酶在 DHN 黑色素合成中的关键作用^[7]。随着基因组测序技术的发展,聚酮体合成酶编码基因的标注也在不断增加。

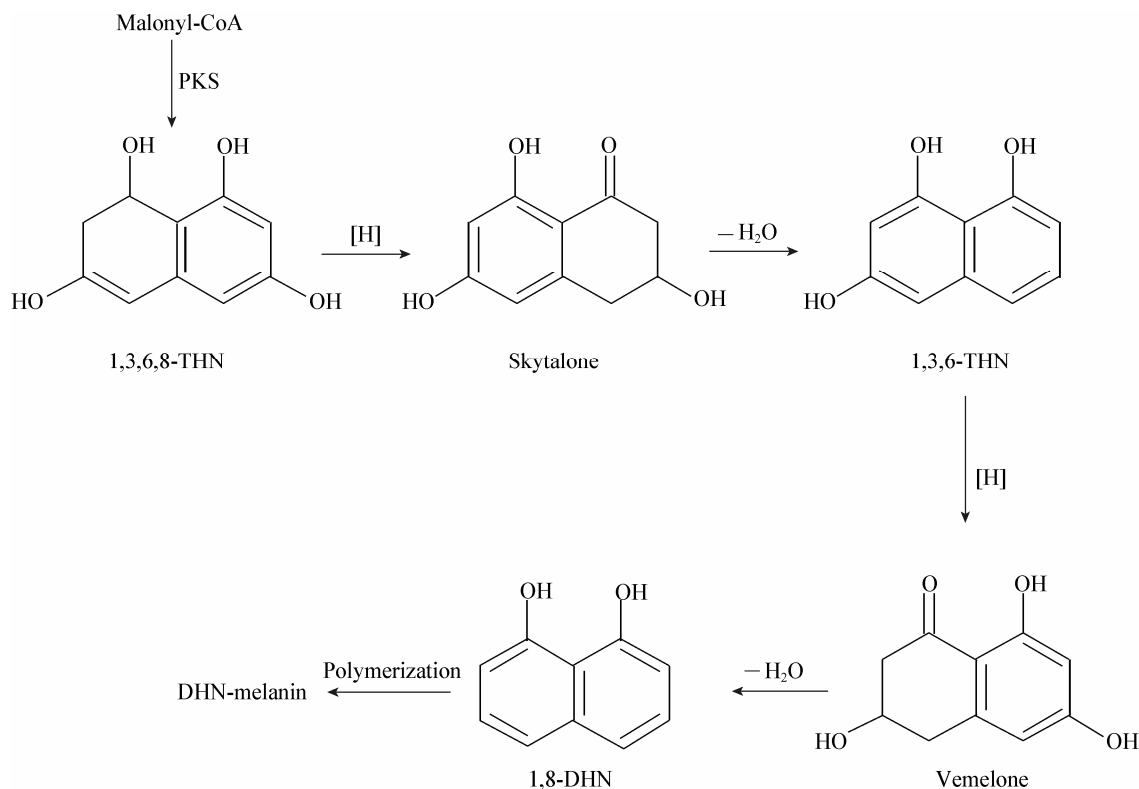


图3 1,8-二羟基萘(DHN)黑色素的PKS合成途径^[41]
Figure 3 Synthesis of DHN melanin^[41]

5 展望

随着基因组测序技术的发展,越来越多的细菌在其基因组序列中发现有黑色素合成相关基因的存在。本实验室长期以来一直在研究细菌黑色素的机理与应用,近几年来对一株高产黑色素的中间气单胞菌 WS 菌株的研究工作证明,细菌黑色素形成可能还存在尚不清楚的调控机理。在后基因组时代,随着新基因功能的不断挖掘,在代谢网络层次研究细菌合成黑色素的现象将成为进一步探究黑色素生物学功能的一种趋势。

参考文献

- [1] Riley PA. Melanin[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1997, 29(11): 1235-1239.
- [2] Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: A review[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1115-1136.
- [3] Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(3): 931-940.
- [4] Langfelder K, Streibel M, Jahn B, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 38(2): 143-158.
- [5] Nappi AJ, Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates[J]. Bioessays, 2000, 22(5): 469-480.
- [6] Schmalzer-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, et al. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(2): 493-503.
- [7] Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, et al. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms[J]. Nature, 1999, 400(6747): 897-899.
- [8] Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus species*[J]. Medical Mycology, 2013: 1-9.
- [9] Mohamed HALA, Sabbour MM, Ragaie M, et al. Characterisation of *Bacillus thuringiensis* mutant highly producing melanin pigment and active against potato tuber moth[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2012, 45(5): 547-560.
- [10] Vasanthabharathi V, Lakshminarayanan R, Jayalakshmi S. Melanin production from marine *Streptomyces*[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(54): 11224-11234.
- [11] Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes;

- biological activity, purification and chemical screening[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 71(5): 499-504.
- [12] Shivprasad S, Page WJ. Catechol formation and melanization by Na⁺-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation?[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(7): 1811-1817.
- [13] Herter S, Schmidt M, Thompson ML, et al. A new phenol oxidase produced during melanogenesis and encystment stage in the nitrogen-fixing soil bacterium *Azotobacter chroococcum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 1037-1049.
- [14] Turick CE, Tisa LS, Caccavo JrF. Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe (III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by *Schewanella algae* BrY[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2436-2444.
- [15] Valeru SP, Rompikuntal PK, Ishikawa T, et al. Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(3): 935-942.
- [16] Liu F, Yang W, Ruan L, et al. A *Bacillus thuringiensis* host strain with high melanin production for preparation of light-stable biopesticides[J]. Annals of Microbiology, 2012(63): 1-5.
- [17] Wan X, Liu HM, Liao Y, et al. Isolation of a novel strain of *Aeromonas media* producing high levels of DOPA-melanin and assessment of the photoprotective role of the melanin in bioinsecticide applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2533-2541.
- [18] Geng J, Tang W, Wan X, et al. Photoprotection of bacterial-derived melanin against ultraviolet A-induced cell death and its potential application as an active sunscreen[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2008, 22(7): 852-858.
- [19] Raper HS. The tyrosinase-tyrosine reaction: production from tyrosine of 5: 6-dihydroxyindole and 5: 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid—the precursors of melanin[J]. Biochemical Journal, 1927, 21(1): 89.
- [20] Mason HS. The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 172(1): 83-99.
- [21] Decker H, Schweikardt T, Nillius D, et al. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases[J]. Gene, 2007, 398(1): 183-191.
- [22] Claus H, Decker H. Bacterial tyrosinases[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(1): 3-14.
- [23] Fairhead M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology[J]. New Biotechnology, 2012, 29(2): 183-191.
- [24] Halaoui S, Asther M, Sigoillot JC, et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(2): 219-232.
- [25] Shuster V, Fishman A. Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2009, 17(4): 188-200.
- [26] Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, et al. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 405(1): 227-237.
- [27] López-serrano D, Solano F, Sanchez-Amat A. Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*[J]. Microbiology, 2007, 153(7): 2241-2249.
- [28] Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, et al. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(13): 8981-8990.
- [29] Matoba Y, Bando N, Oda K, et al. A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(34): 30219-30231.
- [30] Schweikardt T, Olivares C, Solano F, et al. A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations[J]. Pigment Cell Research, 2007, 20(5): 394-401.
- [31] Hernández-Romero D, Sanchez-Amat A, Solano F. A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio[J]. FEBS Journal, 2006, 273(2): 257-270.
- [32] Piñero S, Rivera J, Romero D, et al. Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, 13(1/3): 35-44.
- [33] Castro-Sowinski S, Martinez-Drets G, Okon Y. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 119-125.
- [34] Wan X, Chai B, Liao Y, et al. Molecular and biochemical characterization of a distinct tyrosinase involved in melanin production from *Aeromonas media*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(2): 261-269.
- [35] Chai B, Wang H, Chen X. Draft genome sequence of high-melanin-yielding *Aeromonas media* strain WS[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(23): 6693-6694.
- [36] Kotob SI, Coon SL, Quintero EJ, et al. Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1620-1622.
- [37] Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, et al. The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(15): 5062-5077.
- [38] Hunter RC, Newman DK. A putative ABC transporter, hatABCDE, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 5962-5971.
- [39] Herrera MC, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, et al. Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(6): 1427-1438.
- [40] Rodríguez-Rojas A, Mena A, Martín S, et al. Inactivation

- of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection[J]. *Microbiology*, 2009, 155(4): 1050-1057.
- [41] Plonka PM, Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms — biotechnological and medical aspects[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 53(3): 429-443.
- [42] Wan X, Liu HM, Liao Y, et al. Isolation of a novel strain of *Aeromonas media* producing high levels of DOPA-melanin and assessment of the photoprotective role of the melanin in bioinsecticide applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2533-2541.
- [43] Hutchinson CR. Polyketide and non-ribosomal peptide synthase: falling together by coming apart[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(6): 3010-3012.
- [44] Snyder RV, Gibbs PDL, Palacios A, et al. Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates[J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(1): 1-12.
- [45] Blanco G, Brianb P, Pereda A, et al. Hybridization and DNA sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp.[J]. *Gene*, 1993, 130(1): 107-116.
- [46] Yu TW, Shen Y, McDaniel R, et al. Engineered biosynthesis of novel polyketides from *Streptomyces* spore pigment polyketide synthases[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(31): 7749-7759.

书 讯

欢迎订阅 《英语科技论文撰写与投稿(第二版)》

本书是科技论文写作与投稿的指南读物，书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择等方面阐述了科技论文写作前的准备工作，通过大量的实例分析阐述了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则，分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写，举例说明了致谢及图表制作的注意事项，总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

书中还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题，从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达，全面总结了英文标点符号的使用，从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系，综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外，还从PPT制作、会议讲演等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材；也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

作者简介

任胜利：理学博士，国家自然科学基金委杂志社编审，《中国科学》杂志社副总编辑。社会兼职有中国科技期刊编辑学会理事，《编辑学报》编委、《中国科技术语》编委、《中国科技期刊研究》副主编等。

自1997年博士后出站后从事科技编辑工作以来，先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学和科技编辑与写作方面的论文或杂文60余篇。有丰富的科技编辑与写作方面的培训经验，2007年和2009年先后主持翻译了《科技英文写作与演讲》和《科技英语写作进阶》。曾获中国科学院期刊出版领域引进优秀人才择优支持、第二届中国出版政府奖优秀出版人物奖等资助和奖项。

个人博客：www.sciencenet.cn/blog/rensl.htm

订阅方式：各地图书卖场及网上书店。

邮购：定价：35元 ISBN: 978-7-03-031305-8

北京学士书店：地址：北京东黄城根北街16号(100717)；电话：010-64000246，64034558，64034205；

科学出版社科学书店：地址：北京朝阳门内大街135号(100010)；电话：010-64017892。