

高产黑色素放线菌 G-HD-4 的分离及鉴定

郑晨娜, 金春英, 方柏山*

(泉州医学高等专科学校基础医学部, 福建 泉州 362021)

摘要: 从福建泉州华侨大学林园采集的土样中分离出一株高产胞外黑色素的放线菌(*Actinomycetes*)G-HD-4。将黑色素从该菌株发酵液中提取纯化后经红外光谱、紫外光谱以及扫描电镜的分析, 与标准黑色素基本一致。通过形态特征、培养特征以及理化性质比较发现该放线菌属于链霉菌属, 根据多项分类原则和系统进化树的构建分析, 分离的菌 G-HD-4 与卡胞链霉菌(*Streptomyces capoamus*)处于同一分支上, 序列相似性达到 99% 以上, 因此将该菌株暂归入卡胞链霉菌。

关键词: 链霉菌; 黑色素; 16SrDNA 序列; 系统发育分析

Isolation and Identification of High-yield Melanin-producing *Actinomycetes* G-HD-4

ZHENG Chen-na, JING Chun-ying, FANG Bai-shan*

(Department of Basic Medical Science, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362021, China)

Abstract: *Actinomycetes* strain G-HD-4 was isolated from soil sample collected from Huaqiao flower garden in Quanzhou of Fujian Province, which produced the most melanin compared to other isolated 18 strains. The melanin separated from the fermentation broth of strain G-HD-4 was characterized by ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy, and scanning electron microscope (SEM). The results revealed that the melanin derived from strain G-HD-4 was similar to standard melanin on the structural basis. Based on the studies of physiological and biochemical characteristics and 16S ribosomal RNA sequence homology, the G-HD-4 strain was confirmed to belong to *Streptomyces* genus and be similar to *Streptomyces capoamus* (gene sequence similarity 99%). Finally, it was identified as a species of *Streptomyces capoamus* by taxonomic and phylogenetic analysis.

Key words: *Streptomyces* G-HD-4; melanin; 16S rDNA sequence; phylogenetic analysis

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0180-05

黑色素(melanin)是一种广泛存在于动植物和微生物中的非均质的类多酚聚合体。微生物所产黑色素主要分为胞内、壁结合和胞外黑色素^[1]。黑色素能作为紫外线吸收剂、抗氧化剂、自由基清除剂、阳离子螯合剂和新型天然的药物载体, 也可用来治疗某些与黑色素缺乏有关的神经系统疾病^[2]。另外, 黑色素在化妆品、染发剂的装饰作用以及生物杀虫剂的光保护剂等方面有着广阔的应用前景^[3]。因为黑色素的应用价值十分广泛, 目前, 研究微生物产黑色素及其应用日益增多^[4]。近年来, 国内外在利用微生物发酵生产黑色素的研究也不断增加。而微生物发酵生产黑色素的菌大多数都是细菌, 利用放线菌生产黑色素的研究国内还很少见于报道^[5]。放线菌属于革兰氏阳性菌, 在土壤中广泛存在, 而大

部分的链霉菌属具有降解和合成复杂的高分子聚合物能力, 如降解纤维素, 合成黑色素等。另外, 链霉菌又是一种重要次生代谢以及抗生素资源产生菌^[6]。据文献报道^[7], 大约有 40% 的链霉菌在含有酪氨酸的培养基上产生似黑色素的胞外色素, 但是大部分不表现出胞外酪氨酸酶的活性。本实验从土壤中筛选出一株高产黑色素的放线菌, 编号为 G-HD-4。通过发酵黑色素的产量高达 10.67mg/ml, 故采取 16SrDNA 序列分析和传统菌种鉴定相结合的方法对其进行了分类鉴定, 为今后的研究开发工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2008-09-01

作者简介: 郑晨娜(1978-), 女, 硕士, 主要从事应用酶学研究。E-mail: nanaz_0@126.com

* 通讯作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 博士, 主要从事应用酶学研究。E-mail: fangbs@hqu.edu.cn

1.1.1 样品来源

用高压蒸汽灭菌的器皿从福建泉州某荔枝园、华侨大学林园以及泉州安溪茶园采集土样, 采样时选择土表下 5~20cm 深度的土壤, 用无菌的纸袋带回实验室备用。

1.1.2 培养基

初筛培养基(g/L): 马铃薯 200(市售马铃薯去皮后, 切成小块状, 于沸水中煮沸 30min 后, 用四层纱布过滤)、葡萄糖 20、L- 酪氨酸 20、琼脂粉 20、pH 值自然。

酪素培养基(g/L)^[3]: 蛋白胨 10、葡萄糖 1.0、NaCl 5、CaCl₂ 0.1、干酪素 5.0、L- 酪氨酸 1.0、琼脂粉 20、pH 7.0。

综合马铃薯固体培养基(g/L): 马铃薯 200、葡萄糖 20、KH₂PO₄ 3、MgSO₄ 1.5、胰蛋白胨 5、L- 酪氨酸 1、琼脂粉 20、pH 6.0。

Fd 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 1.2、(NH₄)₂SO₄ 1.3、K₂HPO₄ 1、CaCO₃ 3、MgSO₄ 0.56、pH7.0。

Fw 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 2、(NH₄)₂SO₄ 5、K₂HPO₄ 7、KH₂PO₄ 3、NaCl 5、MgSO₄ 1、pH7.0。

Tyr 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 1.0、蛋白胨 5.0、NaCl 5.0、CaCl₂ 0.1、L- 酪氨酸 1.0。

PDA-TYR 培养基(g/L): 葡萄糖 10、土豆 200、(NH₄)₂SO₄ 10、KH₂PO₄ 3、MgSO₄ 1.5、L- 酪氨酸 1.0, 定容 1L, pH5.9。

1.1.3 试剂与仪器

PCR 常规操作试剂、酶 TaKaRa 公司; PCR 引物、DNA Ladder 上海生物工程公司; PE29600 型 PCR 仪 Thermo 公司; GIS-2008 型凝胶成像系统 上海天能公司; 红外光谱仪 美国 Perkin-Elmer 公司; TU-1810PC 型紫外可见分光光度计; HITACHI S2520 扫描电镜; SW-CJ-2F 净化工作台。

1.2 方法

1.2.1 黑色素产生菌的筛选

将采集的 1g 土壤倒入 10ml 的无菌蒸馏水中, 用力摇匀, 取出 1ml 加入到另外一只 9ml 的无菌蒸馏水中, 依次作 10 倍系列稀释, 取 10⁻⁴~10⁻⁷ 的稀释液 100μl 涂布初筛培养基平板, 每个稀释度涂布的平板数不少于 5 个, 倒置 30℃ 培养, 24h 后开始观察, 每日一次, 第 5 天结束, 观察并记录菌体生长现象。

复筛: 将初筛得到的单菌落, 挑取产棕色、褐色和黑色色素菌落用 3 次划线法分离纯化, 获得的纯化菌株在复筛培养基中培养, 比较产色素情况。

1.2.2 黑色素的提取与纯化

黑色素的提取和初步纯化方法参考文献[8]。将发酵液过滤离心后, 用 6mol/L 的盐酸调节上清液 pH 值为 2~3, 静置过夜, 离心, 将沉淀物置于 60℃ 烘干, 即

得到黑色素粗品。

1.2.3 不同菌株产黑色素能力的比较

将筛选到的产黑色素菌株接种于综合马铃薯液体培养基, 30℃、150r/min 培养 5d, 发酵后过滤离心, 测上清液 OD₄₀₀ 以及黑色素干重。

1.2.4 黑色素的紫外可见光谱

将 G-HD-4 菌所产的黑色素和 Sigma 公司的标准黑色素分别配成 NaOH 稀释液(简称实验液), 在室温下以蒸馏水作为基线校正, 用紫外可见分光光度计于 200~800nm 波长范围内进行光谱扫描, 测定其最大吸光度。

1.2.5 黑色素红外光谱表征

将 G-HD-4 菌所产的黑色素和标准黑色素用 KBr 压片, 用红外光谱仪进行红外分析。

1.2.6 黑色素的扫描电镜观察

将提纯的 G-HD-4 菌所产的黑色素与标准黑色素镀金后观察其形态特征。

1.2.7 菌种鉴定

1.2.7.1 形态观察

采用插片法, 将菌株接种到高氏一号培养基(固体培养基)中盖玻片与培养基的接触面上, 置于 28℃ 培养 7、14、28d。用镊子小心拔出盖玻片, 擦去背面培养物, 然后将有菌的一面朝上放在载玻片上直接镜检并测量菌丝体直径。

1.2.7.2 培养特征观察

将菌株接种到察氏琼脂、葡萄糖-天门冬素琼脂、克氏合成一号琼脂、马铃薯浸汁琼脂、无机盐淀粉琼脂、高氏一号琼脂培养基、淀粉铵盐培养基、伊莫松培养基上, 28℃ 培养, 分别在 7、14、28d 后观察其孢子链、气生菌丝体颜色(即孢子链未形成前的颜色)、基质菌丝体的颜色、可溶性色素。取成熟期的颜色特征为其培养特征, 作为定种的依据。

1.2.7.3 细胞壁化学组分分析

按照快速薄层层析法(TLC)^[9]对菌株进行全细胞水解液 DAP(二氨基庚二酸)、氨基酸及糖型分析。

1.2.7.4 生理生化测定

参照《链霉菌鉴定手册》^[10]有关内容对 G-HD-4 菌株进行各项生理生化实验。

1.2.7.5 16S rDNA 测序及序列分析

将平板培养基的链霉菌 G-HD-4 新鲜菌种接种于 PDB 培养基中, 30℃、150r/min 培养 2~4d, 将发酵液离心得新鲜菌丝体, 将菌丝体分别用无菌双蒸水、20mmol/L EDTA 各洗涤一次, 得干净的菌丝体。总 DNA 的提取参考吴志红等方法^[11]进行并有所改进, 用于 16S rDNA 扩增的引物采用通用引物(引物 1: 5'-ACG GGC GGT GTG

TAC-3')和(引物2: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'),由上海生物工程公司合成。PCR 扩增条件: 94℃预变性 5min; 94℃变性 50s, 55℃退火 1min, 72℃延伸 1.5min, 30 个循环; 72℃延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 得到 1.1kb 左右的 16S rDNA 片段, 切胶回收。将回收纯化后的 PCR 产物送交上海生物工程有限公司测序。

1.2.8 系统发育树的构建

首先, 所测序列用 BLAST 软件与 GenBank 和 RDP 数据库进行相似性分析, 然后从 GenBank 中获得和实验菌株序列相近种属的 16S rDNA 序列 26 株, 构建系统发育树。序列在 Clustal X(1.8) 程序包中进行多重序列匹配排列(Multiple alignments)分析, 最后形成一个多重序列匹配排列阵, 其中形成的缺口用横杠“-”填补, 进化树的构建用 PHYLIP 软件包中的 Neighbor-joining 进行, 分支模式的重复性用 PHYLIP 中的 SEQBOOT 和 CONSENSE 分析, 重复次数选用 1500, 生成的树用 Treeview 重建。

2 结果与分析

2.1 土样筛选结果

从土壤中筛选出产黑色素的菌株 19 株, 其中荔枝园 7 株, 安溪 5 株, 华侨大学林园 7 株。结果见表 1。

表 1 土壤中产黑色素菌株的分离结果

Table 1 *Actinomycter* stains producing melanin from soil samples collected from lithohi, tea and flower gardens

采样地点	菌株编号
荔枝园	LZY-1~4, LZY-6, LZY-8, LZY-13
安溪茶园	AX-1~5
华侨大学林园	G-HD-1~7

2.2 产黑色素能力测定

将筛选到的 19 株菌株接种到马铃薯综合培养中, 30℃ 下培养 5d 后, 提取黑色素并称重, 结果发现, G-HD-2 和 G-HD-4 黑色素的产量较高, 选取这两株菌株比较二者在不同培养基上产黑色素的能力, 结果见表 2。

表 2 G-HD-2 和 G-HD-4 菌种在 6 种培养基中黑色素产量(mg/50ml 培养液)

Table 2 Melanin production by strains G-HD-2 and G-HD-4 in six kinds of cultures (mg/50 ml)

培养基	G-HD-2	G-HD-4
酪素培养基	86.1	134.8
综合铃薯固体培养基	77.8	289.3
Fd 发酵培养基	0	0
Fw 发酵培养基	0	0.8
Tyr 发酵培养基	77.7	64.5
PDA-TYR 培养基	46	244.1

从表 2 看出, 该两株菌在 Fd 发酵培养基、Fw 发酵培养基中没有得以生长, 发酵液的颜色没有任何变化, 不产生黑色素。这两株菌在综合铃薯固体培养基中产黑色素的量相对较多, 说明土豆有利于菌株的生长, 黑色素的产生, 而 G-HD-4 菌株产量最多, 50ml 的发酵液所产生的黑色素为 289.3mg。

2.3 黑色素的紫外可见光谱鉴定

将 G-HD-4 菌株所产黑色素溶液与 Sigma 公司的黑色素溶液在紫外可见分光光度计上进行 200~800nm 区间吸收峰的连续扫描。扫描结果见图 1。

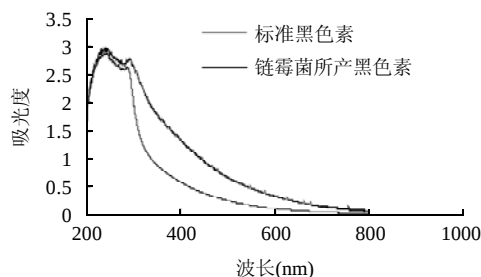
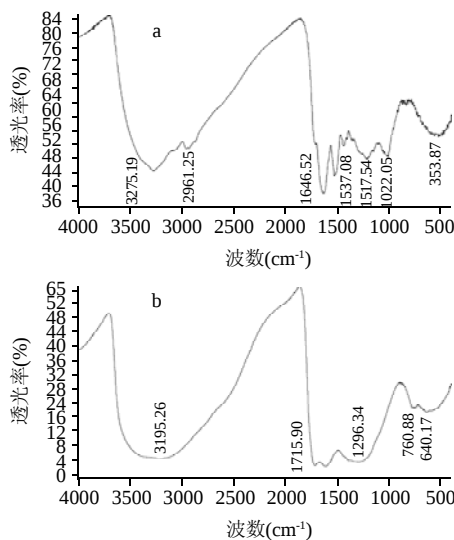


图 1 黑色素紫外可见光吸收光谱

Fig.1 UV-Vis spectra of standard melanin and that produced by strain G-HD-4

由图 1 可知, 链霉菌所产黑色素与 Sigma 公司合成的标准黑色素在 246nm 处都有一个强吸收峰, 在可见光区内没有特征吸收峰, 吸光度随波长的增大而减少, 结果与万霞等^[12]用 5 株细菌所产的 L-多巴黑色素具有类似的紫外吸收光谱。

2.4 黑色素的红外光谱表征



a.G-HD-4菌株在综合马铃薯培养基所产黑色素; b.Sigma 公司合成的标准黑色素样品。

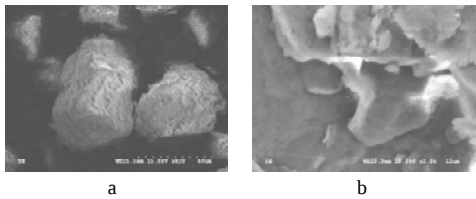
图 2 黑色素红外可见光谱表征图

Fig.2 IR spectra of standard melanin and that produced by strain G-HD-4

由图2可知,在3292.27、1646.9cm⁻¹处有强烈吸收峰,据文献[13]、[14]报道在3291.27cm⁻¹处的吸收峰是因为-OH、-NH₂的伸展振动引起;1646.91cm⁻¹峰主要是C=C、-COO-、C=O伸展振动引起,与Sigma合成的标准黑色素相比,上述两个图谱基本一致,主要功能团是一致的。造成差别的原因可能是不同来源的黑色素在某些功能基团上稍有差异或黑色素提纯的纯度不同。

2.5 黑色素的扫描电镜观察

黑色素在动物、植物以及微生物体内均能产生,属于高分子量的化合物,为非均质的类多酚聚合物,扫描电镜下观察其形态为不定型小颗粒。



a.Sigma公司合成标准黑色素;b.G-HD-4菌株所产黑色素。

图3 黑色素的电镜观察

Fig.3 Scanning electron micrographs of standard melanin and that produced by strain G-DH-4

由图3可知,该菌所得黑色素具有与报道结构相类似的结构^[3,15-16],是一些几微米到几百微米大小不一的不规则颗粒。该黑色素与标准黑色素在形态上存在细微差别,标准黑色素为圆形单一颗粒,而G-HD-4菌株所产的黑色素似乎为片状,这可能是由于该黑色素提纯的纯度不够,黏连在一起,颗粒没有完全分散单一颗粒。

2.6 菌株的鉴定

2.6.1 形态观察

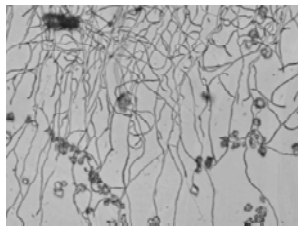


图4 G-HD-4菌种在高氏培养基的培养菌丝

Fig.4 Hyphae of strain G-HD-4 cultured in Gorodkowa's medium

菌株G-HD-4在PDA-Tyr培养基上生长良好,菌落直径2~4mm,高高隆起,周边粗糙不光滑,菌体分

裂成四半,干燥,难以挑取(图4)。在高氏一号上28℃插片培养7d后,取插片分别在光学显微镜观察,发现G-HD-4菌株气丝直,略有弯曲,分支少,生长旺盛;孢子扁球形,表明光滑;基丝直,分支少,无横隔无断裂,紧密聚集成团且不规则(图5)。

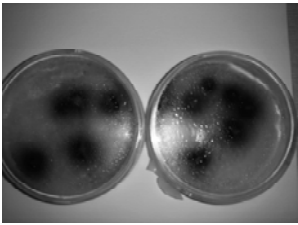


图5 菌株G-HD-4在PDA-Tyr培养基上产黑色素情况

Fig.5 Melanin production by strain G-HD-4 in PDA-Tyr medium

2.6.2 菌株细胞壁化学组分

经快速薄层层析法(TLC)测定,菌株G-HD-4细胞皆含有LL-DAP(左旋二氨基庚二酸)及甘氨酸无特征性糖(糖型C),细胞壁化学组分属于I型,符合链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.6.3 培养特征

G-HD-4菌株在不同的培养基中的特征,如表3所示。

表3 G-HD-4菌株的培养特征
Table 3 Cultural characteristics of strain G-HD-4

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
葡萄糖天门冬素琼脂	黄白色,生长中度	黄白色	淡黄色
高氏合成一号琼脂	淡黄色,生长良好	黄色	淡黄色
淀粉铵盐琼脂	白色,生长良好	白色	无
马铃薯浸汁琼脂	黄棕色,生长良好	无	浅褐棕色
伊莫松培养基	黄褐色,生长良好	浅桂皮淡棕	褐色
无机盐淀粉琼脂	淡黄色,生长良好	黄色	淡黄色
察氏琼脂	白色,生长良好	白色	无
克氏合成一号琼脂	黄色,生长良好	乳黄色	淡黄色

2.6.4 G-HD-4菌株的生理生化特征

G-HD-4菌株的生理生化特征如表4所示。

2.6.5 16S rDNA序列分析以及系统进化树构建

G-HD-4菌株16S rDNA扩增产物大小在1100bp左右,1%琼脂糖凝胶电泳结果见图6。

由图6可知,G-HD-4菌株16S rDNA序列测定结果已提交GenBank,有1048个碱基,序列号为EF661645.1,G-HD-4菌株的16S rDNA序列与GenBank中相关序

表4 G-HD-4菌株的生理生化特征
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain G-HD-4

特征	明胶液化	纤维素上生长	牛奶凝固	牛奶胨化	H ₂ S产生	类黑色素产生	尿素水解	硝酸盐还原	淀粉水解	麦芽糖	D-果糖	D-木糖	D-半乳糖	肌醇	L-鼠李糖	葡萄糖	蔗糖	山梨醇	D-纤维二糖	乳糖
结果	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

注:+.阳性;- .阴性。

列的 BLAST 比较, 结果表明, 与 G-HD-4 菌株相似性较高(99%)有 26 个序列, 均属链霉菌属(*Streptomyces*), 基于 16S rDNA 得到的系统进化树如图 7 所示, 菌株 G-HD-4 与未培养菌(*Uncultured bacterium*)和卡胞链霉菌(*Streptomyces capoamus*)关系较近, 聚成小群, 序列相似性达到 99% 以上。结合形态、细胞化学及 16S rDNA 全序列分析的系统发育研究结果, 可将菌株 G-HD-4 的分类地位确定至属的水平, 即: 菌株 G-HD-4 属于链霉菌属(*Streptomyces*), 并且与卡胞链霉菌(*Streptomyces capoamus*)具有高于 99% 的 16S rDNA 序列相似性。据文献[17]报道, 卡胞链霉菌的形态特征以及生理生化特征的描述如下: 孢子链略弯曲和呈现轮辐状, 孢子表面光滑, 呈现椭圆形, 能够利用多种物质为唯一碳源生长, 如葡萄糖、肌醇、木糖、鼠李糖、棉籽糖、蔗糖。卡胞链霉菌不能够水解淀粉以及牛奶凝固, 但是能够产生黑色素, 牛奶酪化, 明胶液化以及硝酸还原, 生长范围 20~37℃, 最适温度是 27℃, 以上特征与本实验室筛选到的 G-HD-4 菌株的生理生化特征有很多相似之处, 但在碳源利用方面存在不同, 如肌醇和鼠李糖利用可疑, 根据以上结果, 实验将 G-HD-4 菌株暂定卡胞链霉菌(*Streptomyces capoamus*)。

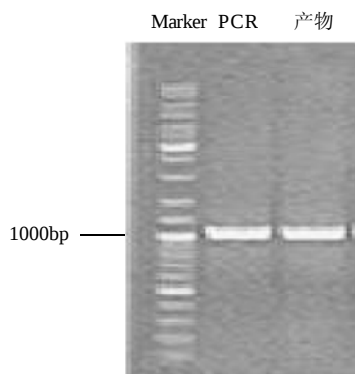


图6 G-HD-4菌株 16S rDNA PCR产物电泳图像

Fig.6 Agarose gel electrophoresis pattern of 16S rDNA PCR amplification products of strain G-HD-4

3 讨论

由于黑色素应用广泛, 利用微生物生产黑色素, 越来越受到重视。国内外微生物生产黑色素的多为细菌类, 而放线菌生产黑色素的报道比较少见, 柯冠群^[8]等筛选到产黑色素的链霉菌, 该菌产黑色素的产量约为 0.7g/L。顾敏舟等^[5]筛选到产黑色素的抗生链霉菌, 产量为 3.45g/L。本实验室采集福建不同地点的土壤, 从产黑色素的 19 株菌株中筛选出来一株高产黑色素的放线菌 G-HD-4。提取纯化该菌株发酵液中的黑色素并进行鉴定, 结果发现, 该菌所产的黑色素与标准黑色素基本一致。通过对放线菌 G-HD-4 的形态特征观察以及生理生化实验, 结果表明, 该菌属于链霉菌属(*Streptomyces*), 将其序列提交 Genbank 后进行 Blast 比较, 发现与该菌相似较高的都是链霉菌

属, 选取相似性较高的序列构建发育树, 该菌与卡胞链霉菌处于同一分支上, 参考相关文献与卡胞链霉菌进行生理生化特征比较, 其结果基本一致, 所以将该菌暂定为卡胞链霉菌(*Streptomyces capoamus*)。

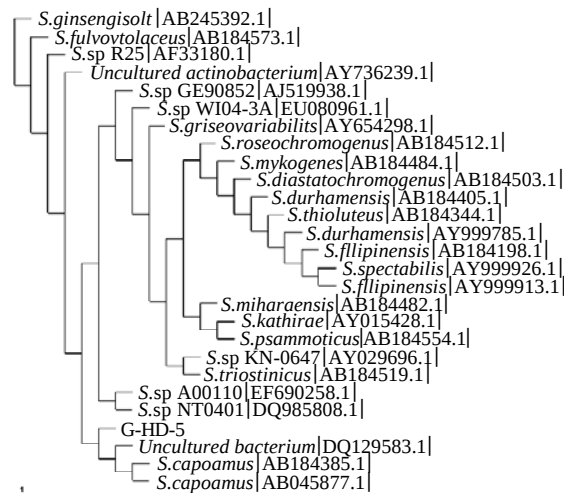


图7 依据 16S rDNA 序列构建的链霉菌属的系统发育树

Fig.7 Neighbour-joining tree based on nearly completed 16S rDNA sequences showing relationship between strain G-HD-4 and representative strains of *Streptomyces*

参考文献:

- [1] BELL A A, WHEELER M H. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. Ann Rev Phytopathol, 1986, 24: 411-451.
- [2] LIU Y T, SUI M J, JI D D, et al. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis[J]. J Invertebr Pathol, 1993, 62: 131-136.
- [3] 李建波, 宋欣, 曲音波. 产胞外黑色素菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2004, 30(1): 50-54.
- [4] MONTEFIORI D C, ZHOU J. Selection antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopamelanins against human immunodeficiency virus *in vitro*[J]. Antiviral Res, 1991, 15(1): 11-20.
- [5] 顾敏舟, 汤建才, 黄敏. 一株高产黑色素菌株的筛选及发酵条件优化[J]. 四川师范大学学报, 2006, 29(6): 735-738.
- [6] CLAUS H, DECKER H. Bacterial tyrosinases[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 3-14.
- [7] CLAUS H, KUTZNER H J. Untersuchungen uber die tyrosinase von streptomyceten[J]. Landwirt Forsch, 1985, 38: 48-54.
- [8] 柯冠群, 淳泽, 万波. 高产黑色素菌株的分离与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11 (6): 760-762.
- [9] 阮继生, 刘志恒, 宋丽糯, 等. 放线菌研究及应用[J]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [10] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [11] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法[J]. 菌物系统, 2001, 20(4): 575-577.
- [12] 万霞, 耿晶, 陈白东, 等. 5 株细菌产 L-多巴黑色素的比较研究[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005(4): 472-476.
- [13] 王岩, 刘学惠, 尹佩玉, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. 分析实验室, 1996, 15(6): 63-65.
- [14] PROTA G, THOMSON R H. Melanin pigmentation in mammals[J]. Endeavour, 1976, 35: 32-38.
- [15] WANG Y L, AISEN P, CASADEVALL A. Melanin, melanin "ghosts", and melanin composition in cryptococcus neoformans[J]. Infection and Immunity, 1996(3): 2420-2424.
- [16] ZEISE L, MURR B L, CHEDEKEL M R. Melanin standard method: Particle description[J]. Pigment Cell Research, 1992(2): 132-142.
- [17] HAYAKAWA Y, ADACHI K, IWAKIRI T, et al. Capoamycin: A new isotetracenone antibiotic[J]. Agri Biol Chem, 1987, 51(8): 2237-2243.