



短梗霉产 liamocins 研究进展

武利勤^{1,2}, 杨素玲^{1,2*}, 亓丽梅³, 刘桂君^{1,2}, 顾海科^{1,2}

¹北京市辐射中心射线束技术教育部重点实验室, 北京 100875

²北京师范大学核科学与技术学院, 北京 100875

³北京邮电大学电子工程学院, 北京 100876

摘要: 短梗霉真菌(*Aureobasidium* spp.)是一种世界性的酵母样真菌, 因其产生黑色素而被称为黑酵母。短梗霉的许多菌株都能分泌细胞外脂质 liamocins。Liamocins 具有表面活性、良好的抗癌和抗菌活性。本文综述了分泌 liamocins 的短梗霉的多样性及影响其产生 liamocins 的因素, 总结了 liamocins 生物合成途径的研究进展, 并对短梗霉真菌合成 liamocins 的进一步研究提出了建议。

关键词: 短梗霉真菌, liamocins, 抗癌活性, 抗菌活性, 生物表面活性剂

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是子囊菌中可以分泌黑色素的酵母样真菌, 因此也被称为黑酵母, 包括 *A. pullulans* var. *pullulans*、*A. pullulans* var. *melanogenum*、*A. pullulans* var. *subglaciale*、*A. pullulans* var. *namibiae* 和 *A. pullulans* var. *aubasiandi* 5 个变种^[1]。Gostinčar 等^[2]通过基因组测序证实其中 4 个变种应归属于 4 个不同的种: *A. pullulans*, *A. melanogenum*, *A. subglaciale* 和 *A. namibiae*。短梗霉是一种多形态真菌, 具有复杂的生活史, 有类酵母细胞(yeast-like cells)、芽生孢子(blastospores)、厚垣孢子(chlamydospores)和菌丝体(mycelia)等几种形态^[3]。

如发酵时由于氧气的限制和营养的缺乏, 短梗霉能够在类酵母和丝状真菌状态之间转换^[4-5]。短梗霉作为生防菌可以有效地拮抗植物病原真菌和细菌^[6-7]。短梗霉也是一种重要的工业菌株, 以能够生产普鲁兰多糖而闻名, 同时不同菌株还可以合成聚苹果酸、黑色素、多种生物酶和 liamocins (重油)等代谢产物^[8-14]。

Liamocins 是一种多元醇酯类物质, 主要由亲水性的单个多元醇头基, 连接一个亲脂性的部分 O-乙酰化的 3,5-二羟基癸酸三联体或四联体组成。作为一类新型的胞外真菌糖脂, liamocins 与其他胞外真菌糖脂如槐糖脂(SL)、甘露糖赤藓糖醇脂

基金项目: 北京市自然科学基金(6162007); 北京市科学技术研究院改革发展培育项目(PY2020JK40)

*通信作者。Tel: +86-10-57910998; E-mail: yangcicely@126.com

收稿日期: 2020-08-19; 修回日期: 2020-12-23; 网络出版日期: 2021-06-03

(MEL)和纤维二糖脂(CL)不同, liamocins 结构中没有糖基团, 它的极性基团是多元醇; 并且短梗霉真菌能以葡萄糖等廉价碳源为原料合成 liamocins, 其他糖脂如槐糖脂则必须添加疏水碳源如植物油才可以大量合成^[11,15]。Liamocins 可以特异性地抑制动物和人类的病原菌链球菌, 具有抗癌活性和表面活性剂活性, 在食品、制药和化妆品工业具有良好的应用前景^[11,16]。本文对短梗霉真菌合成 liamocins 的研究展开综述。

1 Liamocins 的发现和提取方法

1.1 Liamocins 的发现

Nagata 等^[17]发现多株短梗霉真菌(*Aureobasidium* spp.)发酵葡萄糖不仅能产生聚苹果酸(PMA), 而且还可以产生细胞外脂类; 并且发现若发酵液中不添加 CaCO_3 , 菌株则以产生细胞外脂类为主, 这些脂类比水重, 所以被称为重油。Kurosawa 等^[18]分析了重油的化学结构, 认为其亲水部分主要是阿拉伯糖醇或甘露糖醇, 亲脂性物质为 5-羟基脂肪酸, 主要为 3,5-二羟基癸酸和 5-羟基-2-癸烯酸。Price 等^[19]利用基质辅助激光解吸/电离飞行

时间质谱(MALDI-TOF MS)、质谱(GC/MS)和核磁共振(NMR)等方法解析了重油的结构并命名为 liamocins。Liamocins 是一种多元醇酯类物质, 主要由单个甘露醇头基连接了一个部分 O-乙酰化的 3,5-二羟基癸酸三联体(liamocin A1、A2)或四联体(liamocin B1、B2)。Liamocin A1、B1 不乙酰化, 而 liamocin A2、B2 包含单个的 3'-O-乙酰化(图 1)。Liamocins 的头基部分因菌株和培养基^[20-23]的不同而发生变化, 如出芽短梗霉菌株 RSU 6 (NRRL 50383)生长在 PM 培养基中合成甘露醇头基的 liamocins, 而同一个菌株生长在含有高浓度海盐培养基上则产生甘露醇、阿拉伯糖醇和甘油头基的多种 liamocins^[20-21]。

1.2 Liamocins 的提取方法

Liamocins 常用的一种提取方法是发酵液整体提取, 发酵液和提取试剂的比例为 1:1 到 1:2, 然后用分液漏斗分离有机相、水相和细胞层。有机相提取溶剂蒸发后获得 liamocins^[13,22]。发酵液整体提取的方法简单有效并且获得的 liamocins 产量最高, 但缺点是需要较多的提取试剂, 并且提取试剂的挥发也需要较多的时间。另一种获得

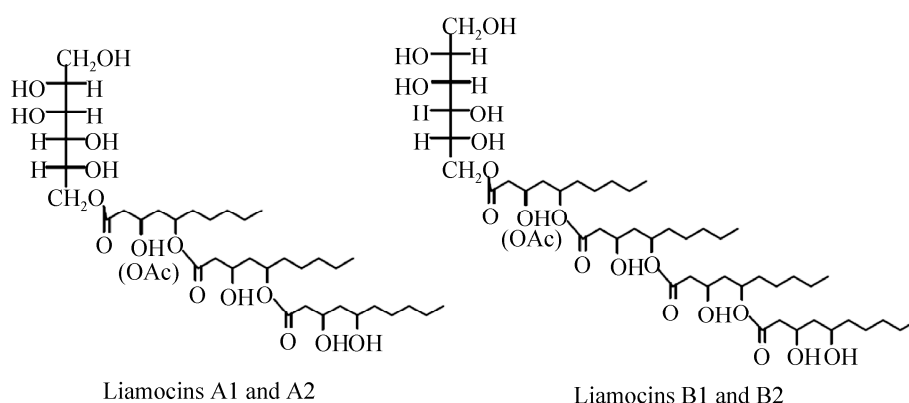


图 1. 出芽短梗霉产生的 4 种甘露醇头基 liamocins A1、A2、B1 和 B2 的结构^[19]

Figure 1. Structures for mannitol liamocins A1, A2, B1 and B2 produced by *Aureobasidium pullulans*^[19].

liamocins 的方法是发酵液首先经过离心弃去上清液, 将获得细胞和胞外的 liamocins 一起用提取试剂提取, 混合物剧烈混匀后在室温下过夜静置分层, 有机相提取试剂蒸发后获得 liamocins^[13,24]。

最常用的 liamocins 提取试剂是 2-丁酮(methyl ethyl ketone)^[13,21]。其他试剂尤其是乙酸乙酯(ethyl acetate)也用来提取 liamocins^[25]。Saur 等^[26]为了在提取 liamocins 的同时保持细胞的完整性以获取准确的细胞干重(CDW), 他们尝试利用 50%乙醇(V/V)和 50% NaCl (0.9% W/V)的溶液提取 liamocins, 发现这种方法在保持细胞的完整性以及 liamocins 的高效提取方面表现出了最佳性能。

2 liamocins 的应用

2.1 Liamocins 的表面活性剂活性

Liamocins 具有表面活性剂活性。目前使用的合成表面活性剂大都是来源于石油, 并且生产过程中会有有毒的副产品被合成^[27]。因此表面活性剂工业一直在寻找绿色可持续生产表面活性剂的方法, 利用生物表面活性剂替代石油基表面活性剂是一个有希望的方法。Manitchotpisit 等^[13]发现出芽短梗霉菌株 CU43 合成的 liamocins 虽然仅仅部分溶解于水, 其饱和水溶液的表面张力为 27 mN/m, 而水的表面张力为 67 mN/m, 表明 liamocins 具有生物表面活性剂的功能, 可以被用作增溶剂或乳化剂。Kim 等^[28-29]和 Meneses 等^[30]也证实 liamocins 具有生物表面活性剂的作用, 具有替代石油基表面活性剂的可能。

2.2 Liamocins 的抗癌活性

研究表明 liamocins 对特定的癌细胞系具有抗增殖效果^[13,31-33]。Isoda 等^[32]发现 liamocins 能够抑制人早幼粒细胞白血病细胞 HL60 细胞生长, 诱

导其分化成粒细胞。Liamocins 抑制人肺癌细胞 A549 的生长, 显著降低细胞内依赖磷脂和 Ca^{2+} 的蛋白激酶 C 的活性; 并且 liamocins 对人正常二倍体细胞 T1G1 没有毒性^[33]。

Manitchotpisit 等^[13]发现来源于菌株 NRRL Y-12974 的 liamocins 对非洲绿猴非癌性的肾脏细胞具有细胞毒性, 但菌株 CU 43 合成的 liamocins 没有细胞毒性。两个菌株产生的 liamocins 对肺小细胞癌的抑制作用所需的剂量相似, 但菌株 NRRL Y-12974 合成的 liamocins 对口腔癌细胞的抑制作用所需的剂量仅是菌株 CU 43 的一半。证明不同菌株合成的 liamocins 对特定的哺乳动物细胞的作用不同。MALDI-TOF-MS 分析 2 个菌株产生的 liamocins 表明 2 个菌株 liamocins 的主要成分都是 A2 (m/z 805.5)和 B1 (m/z 949.6), 因此不同菌株 liamocins 细胞毒性的不同与 liamocins 的主要成分没有直接关系。

同一个研究组在 2014 年发表的研究结果中进一步证实了不同的出芽短梗霉菌株合成的 liamocins 具有不同的抗癌活性, 不同的是所有测试菌株的 liamocins 对非癌性非洲绿色猴的肾细胞都没有抑制作用, 即没有细胞毒性^[31]。Liamocins 具有新颖的化学结构, 可能拥有特殊的抗癌机制, 作为有潜力的抗癌药物具有进一步深入研究的价值^[31]。

2.3 Liamocins 的抗菌活性

Liamocins 的另一个特性是具有抗菌活性。广谱抗菌素的过度使用导致耐药性病原菌持续产生, 因此迫切需要新型抗生素特别是对特定病原菌具有抗性的抗生素。liamocins 对粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus*

fermentum)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)仅有微弱或没有拮抗活性^[20,31,34]。但 *liamocins* 可以抑制所有测试过的链球菌如无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、乳房链球菌(*S. uberis*)、变形链球菌(*S. mutans*)、轻型链球菌(*S. mitis*)、婴儿链球菌(*S. infantarius*)、唾液链球菌(*S. salivarius*)^[20,34]以及猪链球菌(*S. suis*)^[35]。这些链球菌包括动物和人类病原菌^[36]。无乳链球菌、乳房链球菌是两种常见的引起奶牛乳腺炎的细菌^[37-38]。变形链球菌与龋齿有关^[39]。猪链球菌是一种新出现的人畜共患病原体引起猪败血症、肺炎和心内膜炎等疾病^[40]。在人类临床医学中,由链球菌可引起多种疾病,包括咽炎、脓疱病、败血症、中毒性休克和坏死性筋膜炎^[36]。

链球菌感染通常使用多种抗生素进行治疗,包括红霉素、克林霉素、头孢菌素、万古霉素以及青霉素。链球菌耐药性在临床分离株中屡见不鲜。如美国疾病预防控制中心公布的引起坏死性筋膜炎的 A 群链球菌具有威胁等级的红霉素抗性^[41]。高达 85%的猪链球菌具有抗生素抗性^[42]。*Liamocins* 与其他广谱抗菌素相比具有结构上的独特性,与临床使用的重要抗生素产生交叉抗药性的可能性不大;并且使用 *liamocins* 拮抗病原菌能够避免干扰有益的正常菌群,和广谱抗生素相比, *liamocins* 在链球菌引起的疾病的预防性应用方面具有无可比拟的优势。

Liamocins 的抗菌活性具有热稳定性,经过高温甚至灭菌处理仍保持抗菌活性^[20]。荧光分析表明浓度低至 250 $\mu\text{g/mL}$ *liamocins* 作用下无乳链球菌质膜完整性迅速降低^[34]。*Liamocins* 还可以抑制链球菌形成生物膜。龋齿的形成与口腔中的细菌,

特别是变形链球菌和远缘链球菌形成生物膜密切相关。*Liamocins* 有希望发展成为不干扰口腔中正常菌群而降低牙菌斑生物膜和龋齿形成的药物^[43]。

3 产 *liamocins* 的短梗霉真菌

作为一种普遍存在的腐生菌,短梗霉真菌通常存在于植物的叶际、淡水和海水中,甚至在城市环境条件下的水泥表面^[28,44]。短梗霉能适应极端环境如盐沼和北极的土壤,有极高的耐盐和温度胁迫能力^[1,45],短梗霉也能忍受酸性、碱性和寡营养的条件^[21]。但大多数产 *liamocins* 的菌株来源于热带和亚热带地区^[44]。Manitchotpisit 等^[44]选取多个基因对 53 株出芽短梗霉进行分子系统发育分析,将这些菌株分为 12 个类群。可以产生 *liamocins* 的 21 个菌株分布在 7 个类群中,而具有明亮黄色、高荧光的 *liamocins* 仅仅在热带来源的特定菌株的发酵液中产生,大部分集中在 8、9 和 11 三个类群^[13]。其中类群 8 是出芽短梗霉的“彩色变种”(color variants),不仅是分泌 *liamocins* 的关键菌株,也可以高产木聚糖酶,目前仅在热带和亚热带分离到^[13],类群 8 的出芽短梗霉次生代谢产物具有重要的生物活性,值得深入研究。Manitchotpisit 等^[24]分离了 36 株出芽短梗霉,其中 8 株分离自冰岛,其余的来自泰国各地。加上以前报道的 20 株,对 56 株出芽短梗霉利用 ITS 和 *BT2* (β -微管蛋白)基因进行分子系统发育分析,在原来 12 个类群的基础上,增加到了 14 个类群。来自冰岛等冷凉气候的出芽短梗霉都分布在新的 13 类群,来自泰国的菌株分布在其他 8 个类群,包括新认定的 14 类群。13 类群的出芽短梗霉是较好的聚苹果酸生产者,但 *liamocins* 产量较低,印证了分泌 *liamocins* 的出芽短梗霉大多是热带来源的

观点。Manitchotpisit 等^[31]从泰国新分离了 9 株出芽短梗霉, 通过分子系统发育分析证实它们分别属于 8、9 和 11 类群。9 个菌株 liamocins 和普鲁兰多糖的产量分析表明, 尽管大多数 8 和 9 类群的菌株可以分泌 liamocins, 但类群 11 liamocins 的产量显著的高, 达到 7.0–8.6 g/L, 是他们发现的 liamocins 产量最高的菌株。并且有意思的是, 类群 11 还可以产生较高产量的普鲁兰, 由于普鲁兰多糖是水溶性的多糖类物质, 可以和 liamocins 在最初的提取过程中分离, 所以类群 11 可以用来同时生产 liamocins 和普鲁兰多糖。

Liu 等^[46]采集中国海南省红树林植物样品, 筛选了 200 多个酵母样菌株, 研究发现菌株 23-2、6-1-2、6-1-1、P5、31、9-1 和 14-2 能够产生较多的 liamocins, 其中 P5 菌株经鉴定为产黑色素短梗霉 (*A. melanogenum*), 可以分泌 22.5 g/L 的 liamocins 到发酵液中, 这是产黑色素短梗霉可以合成 liamocins 的首次报道。菌株 9-1 也属于产黑色素短梗霉, 在葡萄糖为碳源时可以产生 28.5 g/L liamocins, 而以菊粉为碳源时 liamocins 的产量增加, 说明菌株 9-1 具有代谢廉价碳源菊粉合成 liamocins 的能力^[47]。

来自温带地区的出芽短梗霉也有菌株可以产生 liamocins, 尽管产量非常低。如 Kim 等^[28]从韩国虎皮百合中分离获得 1 株产 liamocins 的出芽短梗霉 L3-GPY 菌株; Manitchotpisit 等^[24]也从冰岛获得产 liamocins 出芽短梗霉, 它们的共同点是 liamocins 产量比较低。

我们从攀枝花芒果中分离获得了 3 株产黑色素短梗霉 (*A. melanogenum*): *A. melanogenum* C1、*A. melanogenum* 142、*A. melanogenum* 171。初步研究表明, 3 个菌株都可以分泌较高产量明亮黄色

的 liamocins, 其中 C1 liamocins 的产量达到 11 g/L。

4 影响 liamocins 合成的因素

4.1 不同培养基对 liamocins 合成的影响

适合的培养基和培养条件是促进短梗霉合成 liamocins 的关键。Leathers 等^[21]比较了文献中常用的 4 种短梗霉真菌合成 liamocins 的培养基: A^[13]、B^[18]、C^[48]、D^[49](表 1)。这 4 种培养基都是限氮培养基, 短梗霉真菌具有把过多的碳转化成有用的次生代谢产物如普鲁兰多糖、聚苹果酸和 liamocins 等的潜能。他们发现不同的培养基和菌株影响短梗霉真菌的生长和 liamocins 的产量。尽管大多数短梗霉真菌在 4 种培养基中都能生长良好, 但 Manitchotpisit 等^[13]改良的用于高产普鲁兰多糖的培养基 A 更有利于短梗霉真菌的生长。有意思的是分离自陆生植物的菌株 NRRL 50381 在含有人工海水的培养基 C 中生长最好, 而分离自海洋动物海绵的菌株 NRBC 10874 在培养基 C 中生长却不好。Liamocins 的产量在 0.5–8.0 g/L, 不同菌株 liamocins 产量都是在培养基 A 中最高, 其中菌株 NRRL 50384 在培养基 A 中合成的 liamocins 最高达到 8 g/L。

不同的培养基和菌株选择也影响到 liamocins 的质量。短梗霉真菌合成的 liamocins 常被伴随产生的黑色素所污染, 需要花费代价将黑色素除去。研究发现菌株 NRRL 50382 和 NRRL 50384 黑色素的分泌在不同的培养基中差异明显, 在特定的培养基中黑色素甚至不分泌。用酶处理过的小麦秸秆进行发酵合成的 liamocins 不产生黑色素, 并且 liamocins 的产量与以蔗糖为碳源的培养基相当^[21,50]。所以合适的培养基是合成高质量的 liamocins 的必要条件。

表 1. 4 种常用的产 *liamocins* 培养基^[21]
Table 1. Four different culture media used for *liamocins* production^[21]

Components/(%, <i>W/V</i>)	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D
Sucrose	5.000			
Glucose		12.000	1.000	8.000
Peptone	0.060			
Yeast extract	0.040	0.020		0.020
L-asparagine·H ₂ O			0.050	
NaNO ₃		0.150		
KNO ₃		0.100		
(NH ₄) ₂ SO ₄				0.020
Sea salts			4.000	
NaCl	0.100			
CaCl ₂				0.015
K ₂ HPO ₄	0.500	0.005	0.050	0.700
Na ₂ PO ₄				0.250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.040	0.020		0.150
FeCl ₃ ·7H ₂ O				0.015
MnSO ₄ ·H ₂ O				0.002
ZnSO ₄ ·7H ₂ O				0.002
pH	6.500	5.500	7.000	6.000

不同的培养基和菌株还可以影响短梗霉真菌产生 *liamocins* 的类型,但是培养基组成与合成的 *liamocins* 类型之间的关系还不明确^[21]。如菌株 NRRL 50380 在培养基 A、B 和 D 中培养时合成 4 种类型的 *liamocins*: *liamocin* A1、A2、B1、B2,但在不同培养基中不同类型的 *liamocin* 相对比例有一定的变化。而在 C 培养基中则额外产生 4 种类型的 *liamocins*,这些 *liamocins* 结构中多元醇头基部分由阿拉伯糖醇取代了甘露醇。培养液 C 与其他 3 种培养液最明显的区别是其含有高浓度的盐。当培养液 A 中 NaCl 的浓度增加到 4%,则培养液 A 和 C 中合成的 *liamocins* 没有明显区别^[21]。与蔗糖为碳源的培养基不同,出芽短梗霉发酵预先处理的小麦秸秆合成的 *liamocins* 一般不乙酰化,即产生的 *liamocins* 类型主要是 A1、B1^[50],这个发现具有重要意义,因为 Bischoff 等^[34]认为

不乙酰化的 *liamocins* 尤其是 B1 比乙酰化的 B2 具有更好的抗菌活性。

4.2 C/N 比对 *liamocins* 合成的影响

一般认为 *liamocins* 的合成与短梗霉真菌合成聚苹果酸和普鲁兰多糖等次级代谢产物相似,高的初始 C/N 比有利于 *liamocins* 的合成。如 Manitchotpisit 等^[13]发现培养 4 d 后出芽短梗霉细胞生长停滞,6 d 后 *liamocins* 的产量最大,在细胞生长由于氮源的消耗而停止后,*liamocins* 才能作为次生代谢产物大量合成。

但是 Brumano 等^[51]和 Leathers 等^[21]的实验发现限氮培养基对于 *liamocins* 的产生没有促进效果。相反限氮培养基抑制了细胞生长,也阻止了 *liamocins* 的合成,反而促进了普鲁兰多糖的产生。Leathers 等^[52]增加培养液中氮和硫酸镁的浓度,则细胞生长被促进,*liamocins* 的合成是限氮培养基

的 2 倍。同样, Saur 等^[26]利用发酵罐培养出芽短梗霉, 他们也发现氮源的供给加倍可以提高细胞生长, 同时促进 liamocins 的合成: 细胞生长大约增长了 50%, 而 liamocins 的产量增加了 80%。

4.3 pH 对 liamocin 合成的影响

Kurosawa 等^[18]发现发酵液中添加 CaCO_3 不利于 liamocins 的合成, 而不添加 CaCO_3 发酵液 pH 随发酵的进程不断降低, 出芽短梗霉则以合成 liamocins 为主; Manitchotpisit 等^[24]也有相似的研究结果, 他们发现培养液添加 3% (W/V) 的 CaCO_3 聚苹果酸的产量可以增加 25%–80%, 而普鲁兰多糖和 liamocins 的合成降低; 我们的研究结果显示, 产黑色素短梗霉 C1 培养液中添加 CaCO_3 , 其合成的 liamocins 降低了 70%。但尚不清楚 CaCO_3 除了稳定了培养液 pH, 是不是还参与了聚苹果酸/liamocins 的合成代谢。Lee 等^[53]在多头绒泡菌中利用不同标记碳原子的 ^{13}C -NMR 实验追踪 ^{13}C 的去向, 发现碳酸钙在 PMLA 合成过程中提供碳酸根离子。

Saur 等^[26]详细研究了出芽短梗霉在摇瓶培养过程中由于酸性物质的产生, 发酵液 pH 在大约 12 h 开始快速下降, 24 h 后 pH 下降到 4; 然后持续缓慢下降 119 h 后 pH 下降到 3.3。Liamocins 在 pH 下降后开始合成, 产量稳定增加, 119 h 后达到 12 g/L, 然后 liamocins 合成停止黑色素开始合成。他们同时使用发酵罐人工调控发酵液 pH 考察其对 liamocins 合成的影响^[26]。利用 4 mol/L HCl 和 4 mol/L NaOH 控制发酵液 pH, 若发酵液 pH 维持在 6.5, 则一直到 140 h 无明显的 liamocins 合成。人工调节 pH 到 5, liamocins 的合成被诱导。20 h 后再将 pH 调到 3.5, 则进一步促进了 liamocins 的合成。证实了发酵液中添加 NaOH 调控 pH 起到了添加 CaCO_3 相似的调控作用; 证实了出芽短梗霉

合成 liamocins 分为 2 个阶段: 高 pH 的细胞生长阶段和 pH 降低后 liamocins 的合成阶段。

4.4 碳源对 liamocins 合成的影响

碳源是 liamocins 发酵培养基中的关键组分之一, 极大地影响 liamocins 的产量。Liu 等^[46]发现分离自海南红树林的产黑色素短梗霉 P5, 120 g/L 的葡萄糖加上 0.1% 的玉米浆是适合 liamocins 合成的碳源。而同样分离自海南红树林的产黑色素短梗霉 9-1, 以菊粉为碳源时 liamocins 的产量最高^[47]。周丹凤^[54]选择产 liamocins 较高的菌株 ZUST-GS 对其发酵培养基进行优化, 发现木糖为最佳碳源。Price 等^[22]研究了多元醇和不同糖作为碳源发酵出芽短梗霉菌株 NRRL50380, 他们发现蔗糖作为碳源时 liamocins 的产量最高。Brumano 等^[51]首次利用搅拌式生物反应器对出芽短梗霉 liamocins 的生产进行优化, 他们发现蔗糖浓度和通气量对 liamocins 的产生起到关键作用, 80 g/L 的蔗糖和 1.1 vvm 的通气量条件下发酵 96 h 后 liamocins 的产量达到最大值 1.5 g/L。

碳源还可以影响 liamocins 的结构。Price 等^[22]研究发现, 出芽短梗霉菌株 NRRL50380 生长在不同的多元醇培养基中, 合成的 liamocins 的头基结构也发生相应的改变, 包括合成具有 D-半乳糖醇、D-山梨糖醇、D 和 L-阿拉伯糖醇、D-木糖醇、L-苏糖醇和甘油头基的 liamocins。而生长在蔗糖或阿拉伯糖醇发酵培养基上的菌株只合成头基是 D-甘露醇或 D-阿拉伯糖醇的 liamocins。

5 提高 liamocins 产量的短梗霉真菌的遗传改良

Liamocins 良好的生物活性使其具有广阔的

应用前景。但是发酵生产 liamocins 的原料成本高、产量低限制了其商业应用。研究者通过基因工程方法对短梗霉野生型菌株进行了遗传改造以提高 liamocins 的合成。Guo 等^[55-56]发现出芽短梗霉拥有高效的同源重组修复机制, 基因过表达重组菌株的构建基于这种机制在设计引物时于引物末端加入同源序列, 然后将待整合片段经电转导入细胞内, 即可在细胞内完成片段连接并整合到设计好的位点。Guo 等^[57]利用基因同源重组的方法, 通过基因过表达或敲除研究编码载脂蛋白(*apo*)、尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(*UGP*)、葡萄糖基转移酶(*UGT*)和 α -磷酸葡萄糖变位酶(*PGM*)的基因对合成普鲁兰多糖、重油(liamocins)和黑色素的影响。他们发现 *UGP* 基因过表达不仅可以促进普鲁兰多糖的合成, 而且使重油产量提高 146.3%; 但是黑色素的合成则相应减少。载脂蛋白 *apo* 基因过表达也表现出类似的性质。这些结果说明普鲁兰多糖、重油和黑色素合成途径存在相互影响, 即普鲁兰多糖和重油大量合成时, 则另一代谢途径被抑制。同样的方法, 郭建等^[55]在考察载脂蛋白基因 *apo* 和 *gltP* 对普鲁兰多糖和脂类物质合成的影响时, 发现基因 *apo* 或 *gltP* 的过表达后糖产量分别增加 7.78%和 15.23%, 重油合成分别增加了 41.38%和 3.5 倍。而敲除基因 *apo* 或 *gltP* 则多糖产量和重油的合成降低。表明 *apo* 和 *gltP* 基因都能影响普鲁兰多糖和重油的合成, 而 *gltP* 基因的影响更为关键。

丙酮酸羧化酶(*Pyc*)通过固定 CO_2 催化丙酮酸转化成草酰乙酸, 是胞浆还原性 TCA 途径中的关键酶。出芽短梗霉 P6 菌株高产聚苹果酸^[58], 具有高的 *Pyc* 酶活性^[59]。Tang 等^[16]利用 P6 菌株中获得的 *Pyc1* 基因, 转化海洋来源产 liamocins 的产

黑色素短梗霉 9-1 菌株, 获得了 liamocins 产量提高 22.4%的 *Pyc1* 过表达的转化菌株。郑鹏等^[60]在出芽短梗霉 P30 中过表达 *Pyc1*, 得到了类似的结果, liamocins 产量提高了 17.12%。而过表达其他乙酰-CoA 合成相关基因, 包括乙酰-CoA 合酶编码基因(*ACS1*)、ATP-依赖性柠檬酸裂解酶编码基因(*ACL*)和苹果酸酶编码基因(*ME*), 重组菌株 liamocins 产量都有不同程度的提高, 其中过表达 *ACL* liamocins 的产量增加了 93.74%最为显著, 说明 *ACL* 为出芽短梗霉 P30 合成 liamocins 的关键基因。

Xin 等^[47]发现分离自红树林的产黑色素短梗霉 9-1 重油(liamocins)的合成能力较强, 并且以菊粉为碳源时菌株 9-1 重油的产量增加。他们利用来自克鲁维酵母的菊粉外切酶基因转化菌株 9-1, 获得的重组菌株 88 不仅菊粉酶活性大幅增加, 而且提高了重油的产量。

6 Liamocins 的核心生物合成途径、调控、运输和分泌

虽然对短梗霉的多种遗传改良以提高 liamocins 的产量的研究已经取得了一定的成果, 证明了 liamocins 合成的部分相关基因、关键酶, 但我们对于 liamocins 生物合成途径及代谢的全局性调控仍然知之甚少。解析 liamocins 的生物合成途径和调控机制以及其运输和分泌机制, 是指导高效发酵生产和利用基因工程方法构建高产菌株的关键。Xue 等^[61]研究分析了真菌与脂类核心生物合成途径、调控、运输和分泌相关的关键酶及其基因。真菌聚酮合成酶(*PKSs*)由一组酮合成酶(*KS*)、酰基转移酶(*AT*)、酰基载体蛋白(*ACP*)、酮

还原酶(KR)、脱水酶(DH)和烯醇还原酶(ER)组成^[62]。已经发现一种聚酮合酶(MAS)可以催化分枝杆菌中甲基支链脂肪酸的生物合成^[63]。有充分的文献证明,通过磷酸乙烯转移酶(PPTase)的转录后磷酸乙烯基化是PKSs发挥最大酶活性所必需的^[64-65]。真菌中的甘露醇代谢是通过甘露醇循环进行的,甘露醇-1-磷酸5-脱氢酶(MPDH)和甘露醇脱氢酶(MtDH)是真菌中甘露醇生物合成的关键酶^[66]。此外,酵母中D-阿拉伯糖醇生物合成的关键酶是阿拉伯糖醇脱氢酶(ArDH)^[67]。liamocins是一种糖脂,糖脂转移蛋白将糖脂从一个双层膜转移到另一个双层膜^[56]。短梗霉中GLTP基因编码的糖脂转移蛋白(Gltp)可能参与了liamocins的转运。此外,在*Starmerella bombicola*中发现MDR1基因编码的ABC转运蛋白(Mdr1)参与槐脂(也是一种糖脂)的分泌^[15]。

基于这些研究结果, Xue 等^[61]利用裂殖壶菌 ATCC 20888 的 *PKS* 基因(AF378327)、黑曲霉 *MPDH* 基因(AAL89587.1)、链格孢菌 *MtDH* 基因(AAN28666.1)、黑曲霉 *ArDH* 基因(RDH24071.1)、产黑色素短梗霉 P5 的 *PPTase* 基因(KY174985.1)、产黑色素短梗霉 CBS 110374 的 *GLTP1* 基因(KEQ58979.1)和 *S. bombicola* 的 *MDR1* 基因(HQ6605810)搜索产黑色素短梗霉 6-1-2 基因组序列,获得了产黑色素短梗霉 6-1-2 中与 liamocins 生物合成、调控、运输和分泌相关的基因: *PKS1* 基因、*MPDH* 基因、*MtDH* 基因、*ArDH* 基因、*PPTase* 基因、*GLTP1* 基因和 *MDR1* 基因,并且发现 *EST1* 基因(编码酯酶)和 *GAL1* 基因(编码 DNA/RNA 结合锌指蛋白,转录激活因子)与 *PKS1* 基因位于同一个基因簇中。

这些基因是否真正参与了 liamocins 的生物合

成、调控、运输和分泌?他们利用基因突变和回复突变的方法,证明 *PKS* 基因、*MPDH* 基因、*MtDH* 基因、*ArDH* 基因和 *EST1* 基因与 liamocins 核心生物合成密切相关。尤其是 *PKS* 基因的缺失、*EST1* 基因的缺失以及 *MPDH*、*MtDH*、*ArDH* 基因的缺失都能完全阻止 liamocins 的合成。*PPTase* 基因和 *GAL1* 基因缺失突变都不能合成 liamocins; 而 *PPTase* 基因和 *GAL1* 基因的回复突变体则完全恢复 liamocins 的生物合成和分泌。表明 HR-PKS 的活性受到 *PPTase* 的严格控制, *PKS1* 基因的表达受到 Ga11 的激活,去除 *GAL1* 基因也几乎阻断了 *PKS1* 基因的表达。失活 *GLTP* 基因和 *MDR1* 基因 liamocins 运输和分泌被部分阻断,并且失活 *GLTP* 基因比失活 *MDR1* 基因能更有效地阻止 liamocins 的转运和分泌,这表明其他系统可能参与了黑曲霉 6-1-2 中 liamocins 的运输和分泌,或者其中一些 liamocins 可能被动地从酵母样真菌细胞扩散到培养基中。

根据这些研究结果, Xue 等^[61]推测了 liamocins 的核心生物合成、调控、运输和分泌途径(图 2)。他们认为 HR-PKS 负责合成 3,5-二羟基癸酸,对 liamocin 的产生至关重要。首先,在乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 存在下,HR-PKS 的所有 KS、AT、DH、ER、KR 和 ACP 结构域可能被利用 2 次以形成己基-S-ACP。然后,结构域 ACP、KS、AT 和 KR 被利用两次来合成 3,5-二羟基癸酰基-S-ACP。MPDH 和 MtDH 与甘露醇生物合成有关,ArDH 与阿拉伯糖醇生物合成有关。Est1 催化 3,5-二羟基癸酸与甘露醇或阿拉伯糖醇酯键的形成(liamocins)。PPTase 激活了 HR-PKS,转录激活因子 Ga11 促进了 *PKS1* 基因和其他基因的表达。糖脂转运蛋白 Gltp 和 ABC 转运蛋白 Mdr1 分别参与

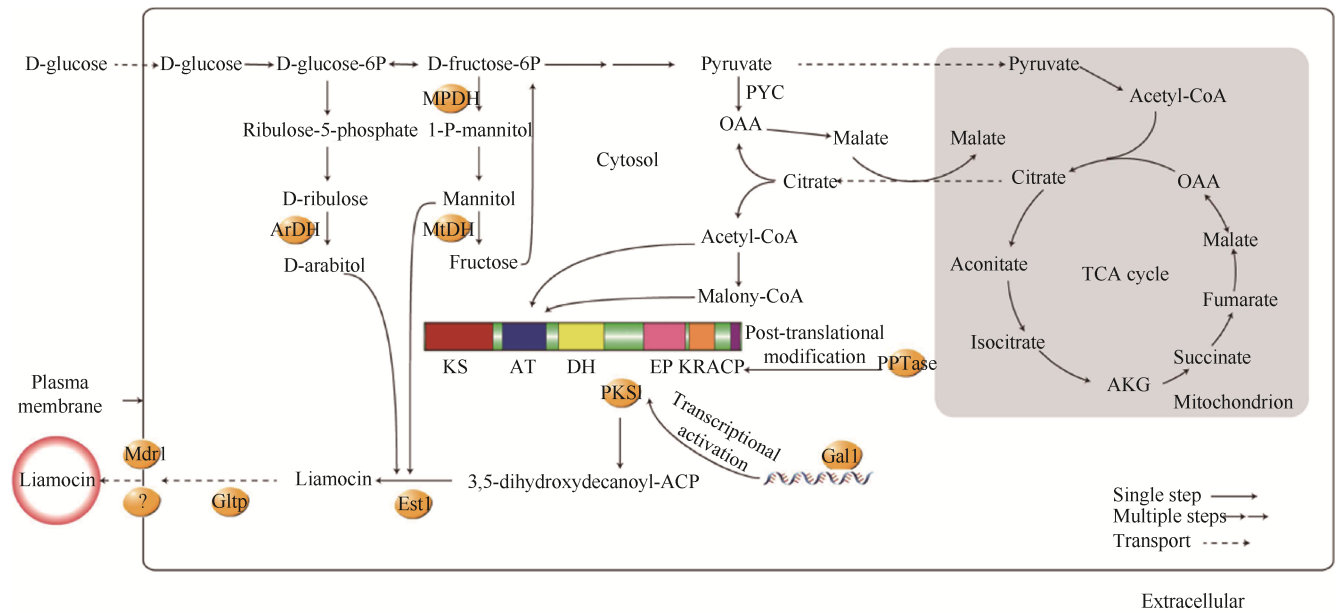


图 2. 产黑色素短梗霉 6-1-2 liamocins 核心生物合成途径、调控、转运和分泌^[61]

Figure 2. The core synthetic pathway, regulation, transport and secretion of liamocins in *A. melanogenum* 6-1-2^[61]. OAA: oxaloacetate; AKG: α -ketoglutaric acid; PYC: pyruvate carboxylase.

产生的 liamocins 从高尔基体向质膜的转运以及分泌到培养基中。

此外，基因突变和回复突变的实验结果表明一个基因的表达或缺失可以使工程菌株上调或下调与 liamocins 生物合成、调控、运输和分泌相关的其他基因的表达。这表明在短梗霉真菌细胞中存在协调调节机制，尽管具体机制仍不清楚^[61]。

7 结语

目前短梗霉真菌合成 liamocins 的研究主要集中在菌株的分离筛选和 liamocins 的结构鉴定以及表面活性、抗菌抗癌活性的研究方面，而对发酵培养基和培养条件的优化以及高产菌株的遗传改造研究较少，因此和其他糖脂相比 liamocins 的产量较低。今后的研究应重点在以下几个方面作深入的研究：优化产 liamocins 短梗霉真菌的培

养基和培养条件，获得高产 liamocins 的培养方法；全面阐明 liamocins 的生物合成途径、调控、转运和分泌机理，获得 liamocins 合成和调控相关的关键基因，为基因工程技术改造短梗霉的代谢途径提供靶标基因，以获得 liamocins 高产工程菌株，才有望取得 liamocins 产量的突破性的进展。

参考文献

- [1] Zalar P, Gostinčar C, de Hoog GS, Uršič V, Sudhadham M, Gunde-Cimerman N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 2008(61): 21–38.
- [2] Gostinčar C, Ohm RA, Kogej T, Sonjak S, Turk M, Zajc J, Zalar P, Grube M, Sun H, Han J, Sharma A, Chiniquy J, Ngan CY, Lipzen A, Barry K, Grigoriev IV, Gunde-Cimerman N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 2014(15): 549.

- [3] Ronen M, Guterman H, Shabtai Y. Monitoring and control of pullulan production using vision sensor. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2002, 51(3): 243–249.
- [4] Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW, Crous PW. A multigene phylogeny of the dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 2006, 98(6): 1041–1052.
- [5] Shabtai Y, Mukmenev I. Enhanced production of pigment-free pullulan by a morphogenetically arrested *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) in a two-stage fermentation with shift from soy bean oil to sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43(4): 595–603.
- [6] Johnson KB, Temple TN. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease*, 2013, 97(3): 402–409.
- [7] de Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 2016(47): 39–49.
- [8] Aung T, Jiang H, Chen CC, Liu GL, Hu Z, Chi ZM, Chi Z. Production, gene cloning, and overexpression of a laccase in the marine-derived yeast *Aureobasidium melanogenum* strain 11-1 and characterization of the recombinant laccase. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(1): 76–87.
- [9] Chen CC, Chi Z, Liu GL, Jiang H, Hu Z, Chi ZM. Production, purification, characterization and gene cloning of an esterase produced by *Aureobasidium melanogenum* HN6.2. *Process Biochemistry*, 2017(53): 69–79.
- [10] Chi ZM, Wang F, Chi Z, Yue LX, Liu GL, Zhang T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(5): 793–804.
- [11] Garay LA, Sitepu IR, Cajka T, Xu J, Teh HE, German JB, Pan ZL, Dungan SR, Block DE, Boundy-Mills KL. Extracellular fungal polyol lipids: a new class of potential high value lipids. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(2): 397–414.
- [12] Machaku D, Zhou DF, Lin L, Si ZJ, Liu SW, Wei PL. Fermentative production of liamocin by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Zhejiang University of Science and Technology*, 2017, 29(6): 414–418. (in Chinese)
Machaku D, 周丹凤, 林琳, 司振军, 刘士旺, 魏培莲. 出芽短梗霉发酵产 liamocin 的培养条件研究. *浙江科技学院学报*, 2017, 29(6): 414–418.
- [13] Manitchotpisit P, Price NPJ, Leathers TD, Punnapayak H. Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(6): 1151–1157.
- [14] Manitchotpisit P, Skory CD, Leathers TD, Lotrakul P, Eveleigh DE, Prasongsuk S, Punnapayak H. A-amylase activity during pullulan production and α -amylase gene analyses of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(9): 1211–1218.
- [15] van Bogaert INA, Holvoet K, Roelants SLKW, Li B, Lin YC, van de Peer Y, Soetaert W. The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. *Molecular Microbiology*, 2013, 88(3): 501–509.
- [16] Tang RR, Chi Z, Jiang H, Liu GL, Xue SJ, Hu Z, Chi ZM. Overexpression of a pyruvate carboxylase gene enhances extracellular liamocin and intracellular lipid biosynthesis by *Aureobasidium melanogenum* M39. *Process Biochemistry*, 2018(69): 64–74.
- [17] Nagata N, Nakahara T, Tabuchi T. Fermentative production of poly(β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp.. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(4): 638–642.
- [18] Kurosawa T, Sakai K, Nakahara T, Oshima Y, Tabuchi T. Extracellular accumulation of the polyol lipids, 3, 5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol by *Aureobasidium* sp.. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(11): 2057–2060.
- [19] Price NPJ, Manitchotpisit P, Vermillion KE, Bowman MJ, Leathers TD. Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *Carbohydrate Research*, 2013(370): 24–32.
- [20] Bischoff KM, Leathers TD, Price NP, Manitchotpisit P. Novel oils having antibacterial activity. US: International Patent Publication Number WO 2015/142736 A1. 2015.
- [21] Leathers TD, Price NPJ, Bischoff KM, Manitchotpisit P, Skory CD. Production of novel types of antibacterial liamocins by diverse strains of *Aureobasidium pullulans* grown on different culture media. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(10): 2075–2081.
- [22] Price NP, Bischoff KM, Leathers TD, Cossé AA, Manitchotpisit P. Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(2): 136–141.

- [23] Skory CD. Modification of the mannitol biosynthetic pathway in *Aureobasidium pullulans* to alter the structure of the polyol lipid liamocin. // 2016 Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting and Exhibition, P39.
- [24] Manitchotpisit P, Skory CD, Peterson SW, Price NPJ, Vermillion KE, Leathers TD. Poly(β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(1): 125–132.
- [25] Tabuchi T, Kayano M. New strain and glycolipid produced by the same strain. Japanese: Patent Publication Number JPH04148677 (A). 1992.
- [26] Saur KM, Brumhard O, Scholz K, Hayen H, Tiso T. A pH shift induces high-titer liamocin production in *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(12): 4741–4752.
- [27] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(5): 495–508.
- [28] Kim JS, Lee IK, Yun BS. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0122917.
- [29] Kim JS, Lee IK, Yun BS. Pullusurfactans A-E, new biosurfactants produced by *Aureobasidium pullulans* A11211-4-57 from a fleabane, *Erigeron annuus* (L.) pers. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(11): 920–926.
- [30] Meneses DP, Gudiña EJ, Fernandes F, Gonçalves LRB, Rodrigues LR, Rodrigues S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiological Research*, 2017(204): 40–47.
- [31] Manitchotpisit P, Watanapoksin R, Price NPJ, Bischoff KM, Tayeh M, Teeraworawit S, Kriwong S, Leathers TD. *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(8): 2199–2204.
- [32] Isoda H, Kitamoto D, Shinmoto H, Matsumura M, Nakahara T. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997, 61(4): 609–614.
- [33] Isoda H, Nakahara T. Antiproliferative effect of polyol lipids, 3, 5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol on lung cancer cell line A549. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 84(5): 403–406.
- [34] Bischoff KM, Leathers TD, Price NPJ, Manitchotpisit P. Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(10): 642–645.
- [35] Bischoff KM, Brockmeier SL, Skory CD, Leathers TD, Price NPJ, Manitchotpisit P, Rich JO. Susceptibility of *Streptococcus suis* to liamocins from *Aureobasidium pullulans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018(15): 291–294.
- [36] Leathers TD, Rich JO, Bischoff KM, Skory CD, Nunnally MS. Inhibition of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* biofilms by liamocins from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Reports*, 2019(21): e00300.
- [37] Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Canadian Veterinary Journal-revue Veterinaire Canadienne*, 1997, 38(7): 429–437.
- [38] Leigh JA. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *The Veterinary Journal*, 1999, 157(3): 225–238.
- [39] Hardie JM, Whiley RA. The Genus *Streptococcus*-Oral in the Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria (eds Dworkin M & Falkow S) 76–107. New York, NY, USA: Springer, 2006.
- [40] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 2007, 7(3): 201–209.
- [41] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019.
- [42] Varela NP, Gadbois P, Thibault C, Gottschalk M, Dick P, Wilson J. Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Animal Health Research Reviews*, 2013, 14(1): 68–77.
- [43] Leathers TD, Rich JO, Bischoff KM, Skory CD, Nunnally MS. Inhibition of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* biofilms by liamocins from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Reports*, 2019(21): e00300.
- [44] Manitchotpisit P, Leathers TD, Peterson SW, Kurtzman CP, Li XL, Eveleigh DE, Lotrakul P, Prasongsuk S, Dunlap CA, Vermillion KE, Punnapayak H. Multilocus phylogenetic

- analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Mycological Research*, 2009, 113(10): 1107–1120.
- [45] Oren A, Gunde-Cimerman N. Fungal life in the dead sea. *Biology of marine fungi*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011: 115–132.
- [46] Liu YY, Chi Z, Wang ZP, Liu GL, Chi ZM. Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(9): 1329–1337.
- [47] Xin FH, Zhang Y, Xue SJ, Chi Z, Liu GL, Hu Z, Chi ZM. Heavy oils (mainly alkanes) over-production from inulin by *Aureobasidium melanogenum* 9-1 and its transformant 88 carrying an inulinase gene. *Renewable Energy*, 2017(105): 561–568.
- [48] Doshida J, Hasegawa H, Onuki H, Shimidzu N, Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. *The Journal of Antibiotics*, 1996, 49(11): 1105–1109.
- [49] Wang CL, Li Y, Xin FH, Liu YY, Chi ZM. Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 2014, 49(5): 725–731.
- [50] Leathers TD, Price NPJ, Manitchotpisit P, Bischoff KM. Production of anti-streptococcal liamocins from agricultural biomass by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(199). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2158-5>
- [51] Brumano LP, Antunes FAF, Souto SG, dos Santos JC, Venus J, Schneider R, da Silva SS. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: new approach to understand the influence of important variables in the process. *Bioresource Technology*, 2017(243): 264–272.
- [52] Leathers TD, Skory CD, Price NPJ, Nunnally MS. Medium optimization for production of anti-streptococcal liamocins by *Aureobasidium pullulans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018(13): 53–57.
- [53] Lee BS, Maurer T, Kalbitzer HR, Holler E. β -Poly(l-malate) production by *Physarum polycephalum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52(3): 415–420.
- [54] 周丹凤. 出芽短梗霉发酵产 liamocin 的研究. 浙江科技学院硕士学位论文, 2019.
- [55] Guo J, Huang SY, Zheng P, Chen YF, Guo XW, Xiao DG. Effect of apolipoprotein genes *apo* and *glpP* on pullulan synthesis. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2019, 34(2): 12–18. (in Chinese)
郭建, 黄思瑶, 郑鹏, 陈叶福, 郭学武, 肖冬光. 载脂蛋白基因 *apo* 和 *glpP* 对普鲁兰多糖合成的影响. 天津科技大学学报, 2019, 34(2): 12–18.
- [56] Guo J, Wang YH, Li BZ, Huang SY, Chen YF, Guo XW, Xiao DG. Development of a one-step gene knock-out and knock-in method for metabolic engineering of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Biotechnology*, 2017(251): 145–150.
- [57] Guo J, Huang SY, Chen YF, Guo XW, Xiao DG. Discovering the role of the apolipoprotein gene and the genes in the putative pullulan biosynthesis pathway on the synthesis of pullulan, heavy oil and melanin in *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 34(1): 1–8.
- [58] Ma Y, Wang GY, Liu GL, Wang ZP, Chi ZM. Overproduction of poly(β -malic acid) (PMA) from glucose by a novel *Aureobasidium* sp. P6 strain isolated from mangrove system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 8931–8939.
- [59] Zou X, Tu GW, Zan ZQ. Cofactor and CO₂ donor regulation involved in reductive routes for polymalic acid production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(10): 2131–2136.
- [60] Zheng P, Zhang MJ, Huang SY, Kang XY, Chen YF. Overexpression of acetyl-CoA synthase and relative enzymes enhanced liamocins synthesis in *Aureobasidium pullulans*. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(9): 25–30. (in Chinese)
郑鹏, 张孟娟, 黄思瑶, 康新玥, 陈叶福. 过表达乙酰-CoA 相关基因提高出芽短梗霉 liamocins 合成能力. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 25–30.
- [61] Xue SJ, Chi Z, Liu GL, Gao ZC, Hu Z, Chi ZM. Genetic evidences for the core biosynthesis pathway, regulation, transport and secretion of liamocins in yeast-like fungal cells. *Biochemical Journal*, 2020: 477 (5): 887–903.
- [62] Schuemann J, Hertweck C. Biosynthesis of fungal polyketides. *Physiology and Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 331–351.
- [63] Jackson M, Stadthagen G, Gicquel B. Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis, transport,

- regulation and biological activities. *Tuberculosis*, 2007, 87(2): 78–86.
- [64] Venkitasubramanian P, Daniels L, Rosazza JPN. Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(1): 478–485.
- [65] Xue SJ, Chi Z, Zhang Y, Li YF, Liu GL, Jiang H, Hu Z, Chi ZM. Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(7): 1049–1060.
- [66] Véléz H, Glassbrook NJ, Daub ME. Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(4): 258–268.
- [67] Qi XH, Luo Y, Wang X, Zhu JF, Lin J, Zhang HH, Chen F, Sun WJ. Enhanced D-arabitol production by *Zygosaccharomyces rouxii* JM-C46: isolation of strains and process of repeated-batch fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(5): 807–812.

Liamocins produced by *Aureobasidium* spp.

Liqin Wu^{1,2}, Suling Yang^{1,2*}, Limei Qi³, Guijun Liu^{1,2}, Haike Gu^{1,2}

¹ Key Laboratory of Beam Technology of Ministry of Education, Beijing Radiation Center, Beijing 100875, China

² College of Nuclear Science and Technology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

³ School of Electronic Engineering BUPT, Beijing University of Posts and Telecommunications, Beijing 100876, China

Abstract: *Aureobasidium* spp. are cosmopolitan yeast-like fungi and popularly known as black yeasts due to their melanin production. Many strains of *Aureobasidium* spp. are found to secrete extracellular lipids as liamocins. Liamocins are surface active and has promising anticancer and antibacterial activities. This paper reviewed the variety of liamocin-secreting *Aureobasidium* spp. and the factors that affecting liamocins production. It also summarized the research progress of the biosynthetic pathway of liamocins. Also some further research of liamocins production by *Aureobasidium* spp. was recommended.

Keywords: *Aureobasidium* spp., liamocins, anticancer, antibacterial, biosurfactants

(本文责编: 李磊)

Supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation of China (6162007) and by the Beijing Academy of Science and Technology-Reform and Development Project (PY2020JK40)

*Corresponding author. Tel: +86-10-57910998; E-mail: yangcicely@126.com

Received: 19 August 2020; Revised: 23 December 2020; Published online: 3 June 2021