

南方红豆杉产紫杉醇内生真菌的分离

刘明志*

(惠州学院生命科学系,广东 惠州 516007)

摘要:对从广东乳源县的南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)内生真菌中分离和筛选产紫杉醇的内生真菌进行了研究。从南方红豆杉的树皮、茎部、叶片及叶片研磨物中分离纯化了 145 株内生真菌,对其中的 53 株内生真菌采用摇瓶发酵培养的方法筛选产紫杉醇的内生真菌。发酵物和菌丝体经研磨、离心、乙酸乙酯萃取和浓缩,经硅胶薄层层析(TLC),高效液相色谱(HPLC)以及液相色谱-质谱(HPLC-MS)分析和检测,结果表明,从茎部分离的 1 株内生真菌能够产紫杉醇或其异构体,产量达 $180 \mu\text{g L}^{-1}$ 。通过对产紫杉醇内生真菌进行诱变、筛选以及优化培养条件等措施,大规模培养生产紫杉醇是具有可行性的。

关键词: 南方红豆杉; 内生菌; 紫杉醇

中图分类号: Q949.3206

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)04-0360-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.04.014

Isolation of Paclitaxel-producing Endofungus from *Taxus chinensis* var. *mairei*

LIU Ming-zhi*

(Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: The isolation and screening paclitaxel-producing endofungus from *Taxus chinensis* var. *mairei* were studied, which derived from Ruyuan Xian, Guangdong Province. The 145 endophytic fungi were obtained from the bark, stem, leaf and leaf grinding juice of *T. chinensis* var. *mairei*, respectively, in which 53 strains were fermented by shake flask for screening paclitaxel-producing endophytic fungi. The fermented solutions and thalli were grinded, centrifugated, extracted by ethyl acetate and concentrated, and one strain of endophytic fungal from the stem of *T. chinensis* var. *mairei* was identified by using thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and HPLC-mass spectrometry (MS). The strain of endofungus could produce paclitaxel or its isomer with yield of $180 \mu\text{g L}^{-1}$. Thus, It should be possible for increasing the yield of paclitaxel on a large scale by mutagenesis, screening and optimizing the culture condition.

Key words: *Taxus chinensis* var. *mairei*; Endofungus; Paclitaxel

紫杉醇(Paclitaxel, 商品名 Taxol)是一种复杂的含氮的二萜类衍生物,1971年,由美国科学家从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离出来^[1]。由于其能抑制微管蛋白解聚而受到重视,且抑制肿瘤生长的机理已被阐明。作为植物中抗癌的首选药物,美国FDA于1992年批准成为治疗卵巢癌的药物上市^[2]。红豆杉树皮中的紫杉醇含量极低

(0.01%), 1株千年红豆杉的树皮所提取出的紫杉醇仅仅可用于治疗1位癌症病人。全球对紫杉醇的需求量十分巨大,据估计去年全球紫杉醇原料药及制剂的销售超过45亿美元^[3]。大规模种植红豆杉或通过细胞培养生产的紫杉醇仅能满足部分需求。

因此,各国科学家都在寻求紫杉醇的药物来

源。1993年,Stierle等首次报道了从短叶红豆杉中分离出可产紫杉醇的内生真菌(*Taxomyces andreanae*)^[4]。由于内生真菌易于进行大规模培养,能产紫杉醇的发酵产物也较易于分离和纯化,易于产业化。毫无疑问,能产生紫杉醇的红豆杉内生真菌将成为人们关注的热点。在产紫杉醇内生真菌研究和开发方面,目前开展了两方面的工作:一是分离出更多的产紫杉醇的高产菌株;二是对已有产紫杉醇内生真菌进行改良,使其适合产业化需求。国内学者在这方面也进行了大量研究^[5-10]。本研究报道从南方红豆杉中分离出1株产紫杉醇类化合物的内生真菌,为解决紫杉醇的供应危机以及开发利用产紫杉醇内生真菌提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)经允许于2008年7月初采自广东省乳源县红豆杉森林公园。南方红豆杉叶片、幼茎和树皮均取自1~1.5 m以上的小苗。取材后迅速置于塑料袋中带回实验室,备用。

1.2 内生真菌的分离和纯化及保藏

剥取红豆杉的老树皮,截成2~3 cm长的小段,去除树皮层,先用75%酒精中浸泡30 s,无菌水冲洗3次,再用0.1%升汞溶液浸泡8 min,无菌水冲洗3~5次。用无菌滤纸吸干表面水分,用无菌解剖刀将小段切成0.5 cm左右长的小块,接种于加有100 mg L⁻¹青霉素和链霉素的PDA固体培养基表面。每皿放置10块,依次编号,置于25℃恒温培养箱中培养。

幼茎内生菌的分离方法同上,将幼茎切成1 cm长的小段,以伤口断面垂直接种于PDA固体培养基上培养。红豆杉叶片内生菌的分离采用两种方法,第一种方法与树皮内生菌的分离方法类似,分离时将叶片切成2至3段,接种于PDA固体培养基上;第二种方法是将叶片消毒后用无菌研钵研磨成匀浆液,然后将研磨液倾倒入PDA固体培养基上,置于25℃恒温培养箱中培养。

实验中,为了排除内生菌分离过程中的非内生的真菌或细菌的干扰,采用了两种方法。第一种方法是将经升汞消毒后的树皮、幼茎和叶片,在用无菌水冲洗时,将最后一次冲洗液取少量置于PDA固体培养基上,观察是否有真菌或细菌生长,保证

所分离得到的菌株为内生真菌。第二种方法是在PDA培养基中加入抗生素排除细菌的干扰。

分离的样品每天观察1次,一般3~7 d可见菌丝长出。待菌丝长出后,根据菌落形态、颜色差异以及长出时间的先后,分别及时用接种环小心的将菌丝连同少量培养基一起挑出转移至新的PDA平板,记录编号,置于25℃恒温培养箱中培养。培养数日后,观察并记录菌落的形态及边缘的整齐情况,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化,即转接2~3次来纯化菌株。纯化后的菌株进行编号后,转至PDA试管斜面培养基上,于25℃培养箱中培养5~7 d,然后放入冰箱保存。

内生真菌长期生活在植物组织中,离开了宿主环境,它们很容易退化或死亡,必须把分离得到的内生真菌尽快保藏起来。本实验采用沙氏培养基试管斜面保藏法,方法是将要保藏的内生真菌接种于斜面上,并在其上编号,置25℃恒温培养箱培养,待其菌丝覆盖整个斜面后,室温放置2 h,放入4℃冰箱中保藏。

1.3 产紫杉醇内生真菌的筛选

菌种活化 从分离得到的145个内生真菌中选取53个菌株,用平板划线法接种在PDA培养基上进行菌种活化。

菌体摇床发酵培养 将活化的菌体用接种环接入装有1 L液体培养基的三角瓶中,置于HZQ-QX全温振荡器中进行摇瓶培养,培养5~7 d(依菌株不同培养时间略有差异,以摇瓶培养的菌丝球不再明显增加为度)。

产物提取 培养5~7 d后,将培养物倒入50 mL的EP管中,随后将培养液连同菌丝一起置于-18℃冰箱中冰冻,然后,放入50℃水浴锅中,通过“冷”和“热”快速转换,以利于菌丝体破裂,再用玻璃匀浆器充分破碎,在4000 × g下离心,取上清液。用RE-52D旋转蒸发器将上清液浓缩到1/10体积后,用等体积乙酸乙酯液萃取3次,将有机相于45℃下用旋转蒸发器浓缩、蒸干,浸膏用少量甲醇溶解后转入EP管中,用于紫杉醇分析。

硅胶薄层层析(TLC) 首先将硅胶GF254板在105℃下活化30 min,然后用点样毛细管点样于10 cm × 20 cm规格的层析硅胶板(青岛海洋化工厂)中,点样量适中(依样品浓度不同而不同,浓的不少于20 μL,淡的不少于40 μL),点样点距前端约1.5~2.0 cm,间距1.0~2.0 cm,直径约2~4 mm。

紫杉醇(paclitaxel)购自 Sigma 公司,含量 99%,用甲醇配制成 0.1 mg mL^{-1} 。展开距离 8~14 cm,展层液行至距前沿 1~1.5 cm 时停止层析。展层在密闭层析缸中进行,展层剂为二氯甲烷:甲醇(20:1)。展层完毕后,迅速风干,紫外灯下观察斑点状况,然后立即用显色剂(5% 香草醛浓硫酸)喷雾显色,在 $90^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ 下加热干燥显色。观察紫杉醇标准样品的 Rf 值($R_f = \text{原点至斑点中心的距离/原点至溶剂前沿的距离}$),通过对比分析,初步判断红豆杉内生真菌体及发酵液中是否含有紫杉醇类化合物。

HPLC 分析及 HPLC-MS 检测 经 TLC 检测后,将与紫杉醇标样 Rf 相对应的样品硅胶刮下,溶于色谱纯的甲醇中,调整至适当体积。待溶解一段时间后,在 $12000 \times g$ 下离心 10 min,转移上清,用作 HPLC 检测。HPLC 条件如下:检测波长为 228 nm;反相 C18 柱,流动相速度为 1 mL min^{-1} ;柱温为室温;进样量为 $10 \mu\text{L}$;流动相为甲醇(色谱纯):水 = 65:35。进样前再将样品 $12000 \times g$ 离心 10 min,吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入色谱仪,时间为 15 min。质谱采用 Burker Esguire HCT PLU 液相色谱-质谱联用仪检测。

2 结果

2.1 内生真菌的分离和纯化

根据内生真菌的菌落特征,经仔细鉴别,剔除可能重复的菌株,分别从南方红豆杉的树皮接种物中分离得到 33 株内生真菌,从幼茎中分离得到 37 株,从叶片切段中分离得到 41 株,从叶片研磨物中分离得到 34 株,合计 145 株内生真菌。

2.2 产紫杉醇内生真菌的筛选

将菌丝体接种于 1000 mL 的液体 PDA 培养基中进行摇瓶发酵培养。由于工作量较大,仅对其中的 53 株内生菌株,包括树皮中的 14 株、茎中的 15 株、叶片中的 15 株以及叶片研磨物中的 9 株内生真菌。菌体研磨液和发酵液经浓缩和提取后,经硅胶 GF254 薄层层析检测,以紫杉醇标准样品作为对照,结果表明,有 9 株内生真菌的 Rf 值在 0.65~0.67 之间,与紫杉醇标准样品的 Rf 值 0.66 相近,因而可能含有紫杉醇或紫杉烷类似物。

通过与紫杉醇标准样品的 HPLC 进行比较,9 株内生真菌中仅有 1 株的 HPLC 图谱峰与标准紫杉醇的出峰时间,即保留时间是一致的(图 1)。因而,该菌株可能为产紫杉醇内生真菌。此外,其它 8

株内生菌的 HPLC 图谱中虽然其它峰在保留时间上与标准紫杉醇相近或在附近,由于未能重叠或一致,不能判定为紫杉醇,可能为紫杉烷类物质或为紫杉醇的类似物(结果未示)

通过对紫杉醇标样和样品进行质谱(MS)比较分析,在 7.5 min 处,分别出现 853.6 和 853.0 的离子峰。对该离子峰进行二级质谱分析(图 2),结果表明,样品中含有与标样相同的离子峰碎片,表明从该内生菌所分离的物质是紫杉醇或其异构体。

对该菌的形态观察表明,菌落呈灰褐色,呈辐射状扩展,培养基的基质靠近子实体处为黑色,菌落呈棉絮状,孢子长椭圆形,棒状椭圆不规则,无隔膜孢子囊呈菜花状,孢子梗较短且分支多。根据这些特征,初步判断为线壳囊孢属的真菌。

3 讨论

从红豆杉中筛选具有产生紫杉醇的内生真菌被认为是解决全球紫杉醇供需矛盾的主要途径之一,目前,国内外在这方面做了大量工作。据研究报告,具有产紫杉醇的内生真菌,通过发酵培养的紫杉醇产量需要达到 1 mg L^{-1} 以上才具有产业化价值^[11-12]。

具有紫杉醇合成能力的内生真菌的筛选需要证明内生真菌发酵液或菌体中存在紫杉醇。利用硅胶薄层层析是筛选产紫杉醇内生真菌的最主要方法之一,但最终并不能确定这种内生真菌是否具有产生紫杉醇的能力,这是由于某些内生真菌虽然不具有合成紫杉醇的能力,但是却可以产生紫杉烷类化合物,而且其 Rf 值与标样的 Rf 值相近,因而造成判断上的误差^[13]。本研究的结果表明,通过薄层层析,有 9 株内生真菌可能产生紫杉醇,但经过 HPLC 分析后只有 1 株内生真菌能产生紫杉醇。因而硅胶薄层层析不能作为判断产紫杉醇真菌的标准。在早期的研究中,由于研究方法的限制,薄层层析法也许可以作为产紫杉醇内生真菌的判断方法,但随着研究手段和方法越来越先进,以及内生真菌产物的复杂性和紫杉醇类似物的因素,薄层层析法的局限性也越来越明显,不能作为鉴别产紫杉醇内生真菌的依据。我们认为,对于 1 个新菌株,要证明其能够产生紫杉醇,除了薄层层析和 HPLC 分析外,只有质谱分析才能最终证明其是否能产生紫杉醇。本研究中通过质谱分析,表明该菌为产紫杉醇的内生真菌。关于菌株的鉴定,包括形态和菌

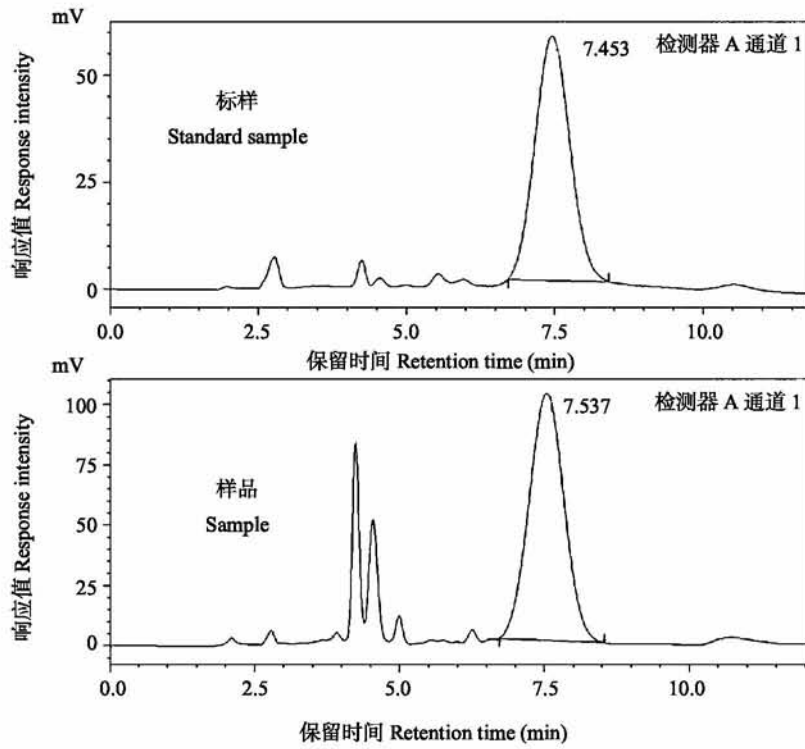


图1 紫杉醇的 HPLC 色谱图
 Fig.1 HPLC chromatography of paclitaxel

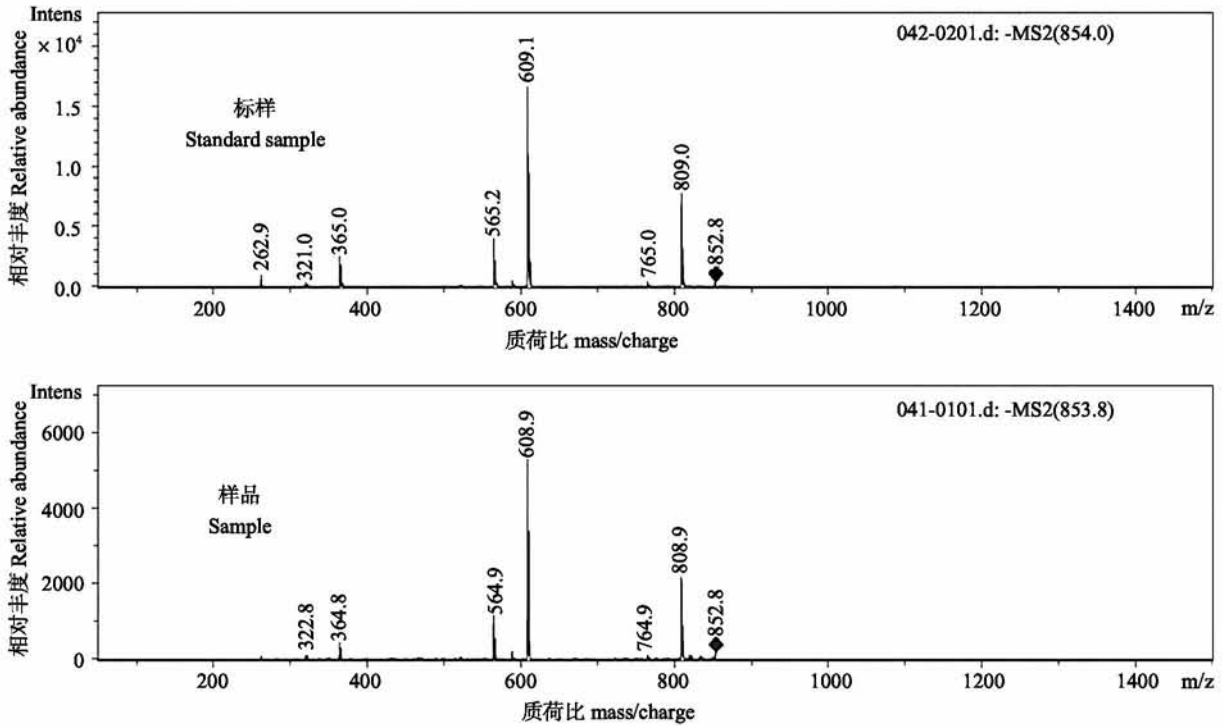


图2 紫杉醇的二级质谱(MS)图
 Fig.2 The secondary mass spectrum of paclitaxel

落特征,以及生理生化和分子生物学特征需要以后作深入研究,最后通过对菌种改良使其产量达到产

业化需求。

根据紫杉醇标准样品的浓度、发酵液的体积、

浓缩液体积,以及 HPLC 峰面积,经初步估算,本研究中产紫杉醇内生真菌经摇瓶培养所产紫杉醇的含量约为 $180 \mu\text{g L}^{-1}$,还远未达到工业化生产所需要的浓度。目前,国内外对产紫杉醇内生真菌进行了大量的筛选工作,它们的紫杉醇产量差异较大,从 $0.014 \mu\text{g L}^{-1}$ 到 $468 \mu\text{g L}^{-1}$ 不等^[14]。据报道,产紫杉醇内生真菌的紫杉醇产量可达 $622 \mu\text{g L}^{-1}$,但未见质谱分析鉴定^[15]。此外,通过改变营养条件、前体饲喂,以及通过诱变育种等措施,可大幅度提高真菌的紫杉醇产量。据报道,通过诱导处理后,内生真菌中紫杉醇产量可达 1 mg L^{-1} ,初步达到工业化生产的赢利止亏平衡点^[16]。有关产紫杉醇的菌株种类已有较详细报道^[5-15],本文不再赘述。经初步鉴定,本研究所发现的产紫杉醇内生真菌为线壳囊孢属,目前尚未见有该菌产紫杉醇的报道。

参考文献

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol: A novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Amer Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [2] Trimble E L, Adams J D, Vena D, et al. Paclitaxel for platinum-refractory ovarian cancer: Results from the first 1000 patients registered to National Cancer Institute Treatment Referral Center 9103 [J]. J Clin Oncol, 1993, 11: 2405-2410.
- [3] 徐铮奎. 紫杉醇国内外市场前景看好,我国将成为紫杉醇产销大国 [J]. 中国制药信息, 2010, 26(1): 37-39.
- [4] Stierle A, Storb G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae*: An endophytic fungus of Pacific yew [J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [5] 金涛, 王伟, 刘军, 等. 东北红豆杉内生真菌的分离及产紫杉醇菌的鉴定 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 770-772.
- [6] Tian R P(田仁鹏), Yang Q(杨桥), Zhou G L(周国玲), et al. Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2006, 24(6): 541-545.(in Chinese)
- [7] Cheng L(程龙), Ma Q M(马奇明), Tao G J(陶冠军), et al. Systemic identification of a paclitaxel-producing endofungus [J]. Indus Microbiol(工业微生物), 2007, 37(4): 23-30.(in Chinese)
- [8] Zhao K(赵凯), Zhao L F(赵立斐), Jing Y Y(金媛媛), et al. Isolation of a taxol-producing endophytic fungus and inhibiting effect of the fungus metabolites on HeLa cell [J]. Mycosystema(菌物学报), 2008, 27(5): 735-744.(in Chinese)
- [9] Lu L Y(卢陆洋), Qing Z(秦竹), Xu J K(徐金库), et al. Production of taxol by an endophytic fungus isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. Chin Med Biotechn(中国医药生物技术), 2010, 5(3): 202-207.(in Chinese)
- [10] 万波, 李安明, 王晓力. 一株产紫杉醇真菌的分离 [J]. 中国科学(C 辑), 2001, 31(3): 271-275.
- [11] Ma Y C(马玉超), Zhao K(赵凯), Wang S W(王世伟), et al. Biological diversity of taxol-producing endophytic fungi [J]. J Fung Res(菌物研究), 2003, 1(1): 28-32.(in Chinese)
- [12] Duan L L(段丽丽), Chen H R(陈鸿锐), Chen J P(陈杰鹏), et al. Screening the high-yield paclitaxel producing strain *A. litemaria* var. *monosporus* [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2008, 33(11): 650-652.(in Chinese)
- [13] Cheng L(程龙), Ma Q M(马奇明), Tao G J(陶冠军), et al. Study on a method for rapid screening of paclitaxel-producing endofungus [J]. Chin J Pharmac(中国医药工业杂志), 2006, 37(12): 817-819.(in Chinese)
- [14] Zhao K(赵凯), Ping W X(平文祥), Zhou D P(周东坡). Recent advance and prospect on taxol production by endophytic fungus fermentation: A review [J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2008, 48(3): 403-407.(in Chinese)
- [15] Li Y C(李勇超), Zhou X R(周修任), Cheng Y G(成元刚), et al. The pre-screening for taxol-producing endophytic fungi from *Taxus* [J]. Biotechnology(生物技术), 2009, 19(5): 22-25.(in Chinese)
- [16] Chen J H(陈建华), Liu J J(刘佳佳), Zang G G(臧巩固), et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi and regulation of fermentation conditions [J]. J CS Univ Techn (Nat Sci)(中南大学学报: 自然科学版), 2004, 35(1): 65-69.(in Chinese)