

产紫杉醇类云南红豆杉内生真菌筛选的研究

刘佳佳 龚汉祥 杨栋梁 陈淑娟 杨磊

(中南大学化学化工学院 湖南 长沙 410083)

摘要:采用无菌技术从云南红豆杉中分离得到 200 余株内生真菌,经过 PDA 液体培养基发酵后用 TLC、HPLC 等方法检测,发现其中有一株的胞外分泌物中含有紫杉醇,标号 12.3.2。经过形态学鉴别,其属于青霉属(*Penicillium*)。利用微生物(特别是内生真菌)产紫杉醇是新的途径,该菌株具有进一步研究的价值。

关键词:云南红豆杉;内生真菌;紫杉醇

中图分类号:Q55,S567 **文献标识码:**A

Study on Endophytic Fungi Producing Taxol Isolated from *Taxus Yunnanensis*

LIU Jia-jia, GONG Han-xiang, YANG Dong-liang, et al

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hu'nan, China)

ABSTRACT: More than 200 strains of endophytic fungi were isolated by aseptic techniques from the *Taxus Yunnanensis* in Yunnan Province. They were cultured in the liquid potato medium and indentified by means of the thin layer chromatography (TLC) and HPLC. The result showed one strain of fungus which was signed 12.3.2 could produce taxol in vitro, according to its morphology, which belonged to *penicillium*. Using microbe (especially the fungi) to produce Taxol is considered to be a new way to obtain Taxol. So this strain is worthy to be further studied.

Key words: *Taxus Yunnanensis*; Endophytic fungus; Taxol

紫杉醇(Taxol)最开始是 Wani 等^[1]从短叶红豆杉(*T. brevifolia*)的树皮中分离得到的,后经 Schiff 等^[2]研究证实紫杉醇具有独特的抗癌作用机理,它能使癌细胞内纺锤丝的形成受到抑制,有丝分裂不能正常进行,而阻止了癌细胞的扩散。以后人们开始大量地从红豆杉的树皮中提取紫杉醇以满足需求。由于红豆杉系珍稀植物,而树皮中的紫杉醇含量很低,靠树皮提取紫杉醇不能满足需求,并且严重地破坏自然资源,危及生态平衡。为了解决药源紧缺状况,目前研究生产紫杉醇的方法主要有四种:①从天然植物中提取;②半化学合成法^[3];③植物细胞培养法^[4];④红豆杉栽培法。

Stierle 与 Strobel 等^[5]首次报道了从太平洋紫杉树中分离出一种可产紫杉醇的内生真菌(*Taxomyces andreanae*),其紫杉醇含量为 24-50 ng/L,为人们展示了一个可能生产紫杉醇的诱人的新途径。从此国际国内都兴起了内生真菌产紫杉醇研究的高潮,而且紫杉醇产生菌种十分多样,例如 Strobel 等^[6]从西藏红豆杉枝条上分离到一株小孢拟盘多毛孢(*P. microspora*),周东坡等^[7]从东北红豆杉的树皮中分离筛选出一株树状多节孢(*Nodulisporium sylviiforme*)。

利用微生物发酵生产紫杉醇具有许多优点:内生真菌生长迅速,易于培养;所用的培养基成本相对较低;可以通过优化发酵条件、利用生物技术改良菌种,大幅度提高产量,满足市场的需求,降低紫杉醇的价格同时也能减小对自然界的破坏。所以筛选产紫杉醇内生真菌,用微生物发酵的方法生产紫杉醇,是解决药源问题的有效途径。

本实验室以云南红豆杉为原材料,分离内生真菌,经过 TLC 和 HPLC 检测,确定了一株产紫杉醇的内生真菌,属于青霉属,陈毅坚等^[8]也曾经从云南红豆杉中分离出青霉属内生真菌能产紫杉醇。

1 材料与方法

1.1 真菌分离材料

所有的用来分离内生真菌的红豆杉树皮都采自云南省丽江市,采集时间 2004 年 7 月初期。

1.2 培养基

固体培养基选用 PDA 培养基。马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 15g,水 1000mL,PH 自然,121℃,灭菌 20min,冷却到 60℃左右加入 25mg/L 链霉素。生长培养基用 PDA 培养基不加琼脂。

1.3 内生真菌的分离和纯化

将云南红豆杉树皮,刮去外表皮后,用无菌水冲洗干净,切成 1cm×1cm 的小块,经过紫外消毒,把剪好的材料置于 75%乙醇消毒 1min,而后用 2.5%次氯酸钠消毒 10min,再用 75%乙醇消毒 1min,无菌水冲洗 2~3 次,剪去边缘,接入已倒好的加了链霉素的固体平板培养基上。将培养皿置于 28℃培养箱中倒置培养 3~7 天。

1.4 空白实验对照

为了检查表面消毒的效果,进行对照实验:把空白平板打开,摆在超净台上 10min;将上述同样表面消毒过的材料不做任何切割,直接种植于 PDA 平皿上。在相同条件下培养。结果,两种对照处理均未有菌丝长出,多次重复都是同样结果。证明表面消毒是彻底的,从而保证了所分离到的真菌是植物的内生真菌而不是空气中的和材料表面的附生菌。取切口处新长出的

作者简介:刘佳佳,(1963-),男,教授,主要研究方向:生物化工

通讯作者:龚汉祥,E-mail:yulonggongwu2003@163.com

(收稿日期:2006-08-09 接受日期:2006-09-12)

菌丝,及时转接至新鲜 PDA 培养基上培养。

待菌落出现后,根据菌落形态、颜色的差异以及长出时间的不同,分别挑取各平板上的菌落边缘的菌丝接于新的平板上进行分离培养,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化。对菌株编号后,转至 PDA 试管斜面培养基上,于 28℃ 培养箱中培养 5~7d,然后放入冰箱保存。

1.5 菌种鉴定

从纯化培养数日的菌落上挑取菌丝并连同分生孢子制成玻片,置于光学显微镜下观察菌丝形态、孢子梗形态、孢子形态以及孢子与营养体之间的着生关系,对照有关资料确定真菌的分类学地位^[9-10]。

1.6 内生真菌的液体培养和产物的提取

液体培养基为 PDA 液体培养基,500mL 的三角瓶装液量为 200mL。用接种针挑取少许菌丝接种于培养瓶中,27℃、120r/min 培养 3 d 后制备种子液;然后将 10 mL 种子液加入 500mL 的三角瓶(装液量为 200mL),培养 6~8d 后过滤,滤液加入 1/2 左右体积的三氯甲烷和甲醇混合液(V/V=10/1)进行萃取;固体菌丝经过捣碎匀浆后加入 50 mL 三氯甲烷浸提 24h,分别收集发酵液和菌丝浸提液的有机相,再加入等体积的水进行二次萃取,收集菌丝(胞内)和发酵液(胞外)的有机相,35℃ 下减压浓缩,除去有机相后用甲醇定溶储于棕色磨口玻璃瓶中备用。

1.7 代谢产物检测

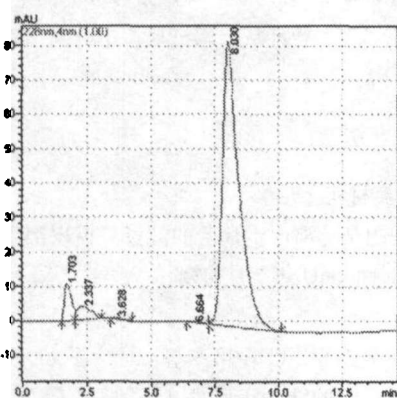


图1 紫杉醇标准品 HPLC 图
Fig1 The HPLC Chromatogram of Taxol Standard

因此,我们将 12.3.2 作为目标菌株,进一步进行生理特征以及其他代谢和发酵方面的研究。

2.2 目标菌株的生理特征和鉴定

12.3.2 菌株在 PDA 培养基上 27℃ 下培养 1d 后能产生白色菌丝,之后白色菌丝匍匐生长,第 2 天在菌落的中心产生深绿色粉末状孢子,到第 3 天菌落的最中心产生瘤状突起,且颜色由深绿色逐渐变成了褐色,边缘有白色气生菌丝;培养基的背面为无色到淡黄色。

显微镜下观察菌丝多分枝,有隔膜,菌丝平均长度为 12.6μm,直径为 2.1~2.7μm 在隔膜处会有一个类似收缩的效应,因此整个菌丝呈现出藕节状。12.3.2 分生孢子从菌丝细胞长出,有分枝,分生孢子梗直径约为 2.4~2.7μm,具横隔,顶端不膨大,有扫帚状分枝(图 3)。第 1 次分为 2 枝,不对称,一枝 2 次分枝为 2 枝,另外一枝继续分枝 2~3 次,不对称,孢子形态为

1.7.1 TLC

将内生真菌的发酵液和菌丝提取液、紫杉醇标准品(SIGMA)和巴卡亭III标准品(SIGMA)同时点样与 GF254 硅胶板(青岛海洋化工厂),在氯仿/甲醇(95.5:4.5 V/V)展层系统中展开,挥干溶剂后置于 254 nm 紫外灯下进行观察。

1.7.2 HPLC 检测

将紫杉醇和巴卡亭III标准品配制成甲醇溶解备用。

仪器与色谱条件:岛津 LC-8A 高效液相色谱仪,SPD-6AV 紫外检测器,LC-solution 工作站;色谱柱,Nova pac C18 色谱柱(150mm×4mm,4μm);流动相甲醇(色谱醇):水(65:35);柱温为室温;流速 1mL/min;检测波长为 228nm;样品经过 22μm 滤纸过滤后进样,进样量 20μL。

2 实验结果与分析

2.1 目标菌株的筛选

从云南红豆杉中分类出来 200 多株内生真菌,通过液体培养后 TLC 的初步鉴定筛选出 2 株出现与紫杉醇标样相同或相近斑点的内生真菌,标号分别为 12.3.2(胞外)、12.1.4(胞内)。

为了进一步确定 TLC 检测的结果是否准确,将 2 株菌株的发酵产物进行 HPLC 检测,结果(图 2)显示只有 12.3.2 (Rt=7.869)有与紫杉醇标准品(Rt=8.030)在相近的保留时间里吸收峰出现,因此判定 12.3.2 能产紫杉醇。

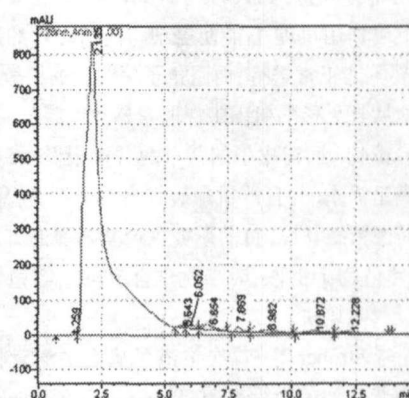


图2 12.3.2 发酵液的 HPLC 图
Fig.2 The HPLC Chromatogram of 12.3.2 zymotic fluid

圆形或椭圆形、成串、不光滑、大小为 1.4~1.6μm

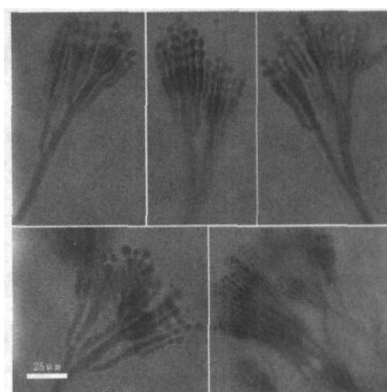


图3 12.3.2 分生孢子
Fig 3. conidiophores of 12.3.2

液体培养时候生长快速,3 d 就达到了生长的对数期,通过测定发酵液中的含糖量变化比较小得到证实,然后停止摇床,6d 后有深绿色菌苔布满表面。菌球白色,菌液澄清。

经过查阅文献^[9,10],初步可以鉴定为青霉属(*Penicillium*)。

3 结论

经过 TLC 和 HPLC 检测,可以证实 12.3.2 可以产紫杉醇类化合物,而且产物主要分泌到胞外;通过对 12.3.2 的形态学鉴别,初步鉴定 12.3.2 属于青霉属。其 HPLC 图谱可以看出,目标化合物的色谱峰非常小,其它不明物的色谱峰较多较强,这说明在 12.3.2 发酵产物中紫杉醇类化合物含量较低,其它化学成分较多。

为了提高其含量,达到分离、提取,最终得到精制品的要求,还需在培养基中添加能够刺激紫杉醇及其相关物质含量的成分,比如苯丙氨酸、酒石酸铵这类紫杉醇合成的前体物质^[11],并进行发酵培养的优化。

本研究的下一步研究重点将是对红豆杉紫杉醇合成途径中关键酶进行研究,以筛选出的能生产紫杉醇和紫杉烷化合物的内生真菌为材料,研究紫杉醇和紫杉烷化合物生物合成途径中关键酶在内生真菌中的表达情况,以及这些反应的酶的特性,为应用内生真菌生产紫杉醇和生物活性更高的紫杉烷化合物奠定基础。因为,尽管不同的科学工作者已从所有的红豆杉树种中分离到产紫杉醇的内生真菌,但对这些内生真菌合成紫杉醇的机制没有进行深入研究,对紫杉醇和紫杉烷化合物生物合成途径中的关键酶基因在内生真菌中的表达不清楚,不能在

已知条件下稳定的表达紫杉醇和紫杉烷化合物,限制了它的实际应用。

参考文献

- [1] Wani M C, Taylor H L, Monroc F, et al. Plant Antitumor Agent VI: The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus Brevifolia*[J]. J. Am Chem Soc, 1971,93: 2325-2327
- [2] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol[J]. Nature, 1979,277:665-667
- [3] Denis J N, Green E, Gerenard D, et al. A Highly efficient, practical approach to natural taxol[J]. J Am Chem Soc, 1988,110(17):5917~5919
- [4] Christen A A, Gibson D.M, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture. U.S. Patent 5019504, 1991
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew [J]. Science, 1993, 260: 154-155
- [6] Strobel G, Yang X S, Sears J. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana* [J]. Microbiology, 1996,142: 435-440
- [7] 周东坡,平文祥,孙剑秋,等.紫杉醇产生菌分离的研究[J].微生物学杂志,2001,21(1):18-19,32
- [8] 陈毅坚,张灼,王艳,等.云南红豆杉(*Taxus Yunnanensis*)皮下真菌类群初步研究[J].生物技术,2002,12(6):10-12
- [9] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1982
- [10] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等.真菌分类学[M].北京:中国林业出版社,1984
- [11] 陈建华,刘佳佳,藏巩固,等.紫杉醇产生菌的筛选与发酵条件的调控[J].中南大学学报(自然科学版),2004,35(1):65-69

杨五龙(上接第 50 页)

4.2 加强科学研究

以科研为先导、技术为基础开发利用治蛇毒药用植物资源野生植物资源的综合开发往往需要先进的技术体系来支撑。以科研为先导,从基础研究入手,积极与科研院校联合,重点研究治蛇毒药用植物资源开发利用中的所需运用技术。

4.3 坚持可持续发展的思路,制定开发利用总体规划

在清楚治蛇毒药用植物种类、资源量、分布规律和生态条件的基础上,结合市场需求情况,制定发展利用规划。规划要有科学性、先进性和可行性。应做到保护与利用并举,生态效益与经济效益统一,即有短期开发目标,又有长期发展方向。

4.4 以政府牵头,企业与院校相集合,形成“企业+基地”的开发模式

在把握民族文化旅游强劲的发展势头时,加快特色产业开发的开发及规模化建设,形成具有民族特色的地方经济,实现治蛇毒药用植物的基地化建设,产业化发展。

治蛇毒药用植物的开发利用涉及面很广。从经济的角度考虑,对其产业化的形成要有所侧重,应根据资源特点、市场需求和经济效益,将资源量大、民族特色浓厚、开发容易的治蛇毒药用植物作为蛇药开发产业化的重点。

参考文献

- [1] 谷中村,陈功锡,黄玉莲,等.湘西药用植物概览[M].西宁:青海人民

出版社,2004

- [2] 《湖南植物志》编辑委员会.湖南植物志(第二卷)[M].长沙:湖南科学技术出版社,2000
- [3] 欧志安.湘西苗药汇编[M].长沙:岳麓出版社,1990
- [4] 肖培根.新编中药志[M].化学工业出版社,2002
- [5] 陈远辉.蛇伤救治绝招[M].湖南科技出版社,2005
- [6] 杨七斤.湖南省湘西自治州民族蛇药种类整理[J].中药材,1989(4): 19
- [7] 谢宗万主编.全国中草药汇编(上、下)[M]第二版.北京:人民卫生出版社,1996
- [8] 吴修仁编著.中国药用植物简编[M].广州:广东高等教育出版社,1994
- [9] 梁剑平,卢欣石,邵献平.合理利用中药资源,促中药现代化[J].中兽医医药,2002,(6):18~21
- [10] 张卫民.植物资源开发研究与应用[M].东南大学出版社,255~258
- [11] 彭芳胜.湖南省湘西州特色民族药基地建设生态环境研究[J].中国民族民间医药,2004,67:68~70
- [12] 肖培根.中国药用植物资源开发利用的研究[J].云南植物研究,1988:1~12
- [13] 张汉瑞编著.蛇咬伤防治 170 问[M].金盾出版社,1999
- [14] 成都生物研究所,上海自然博物馆,浙江省中医研究所等编.中国的毒蛇及蛇伤防治[M].上海科学技术出版社,1979
- [15] 于志海,龚双娇,谌容等.湘西苗族聚居地野生食用植物种类调查初报[J].中国野生植物资源.2006(2),33~35(41)