

内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望

赵凯, 平文祥, 周东坡*

(黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要: 抗癌药物紫杉醇已在临床上广泛应用, 但受原料红豆杉树木短缺的制约, 存在巨大的供需差距, 而内生真菌发酵生产紫杉醇是解决紫杉醇药源问题的很有前景的途径之一。结合课题组多年来开展的科学试验研究工作, 概述了内生真菌发酵生产紫杉醇的优势、产紫杉醇内生真菌的分离研究现状和生物多样性及提高内生真菌生物合成紫杉醇量的途径。

关键词: 紫杉醇; 生物合成; 内生真菌

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0403-05

紫杉醇(taxol)是一种复杂的具有抗癌活性的三环二萜类生物碱。最初是从太平洋短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中提取出来的^[1]。由于其独特的作用机理及对各种癌症和其它疾病的特殊疗效, 自问世以来一直受到相关领域研究者的重视。目前, 人们主要进行的是从红豆杉树中提取、分离和纯化紫杉醇的研究。然而研究证实红豆杉树各个部位的紫杉醇含量均甚微(0.00003%~0.039%), 且红豆杉树又是生长缓慢、散生、濒危的珍稀保护植物, 因此, 单纯依靠从红豆杉属植物中提取来解决紫杉醇的药源问题, 几乎不可能, 必须另寻蹊径^[2]。在人工栽培红豆杉树远水不解近渴; 化学全合成路线复杂, 反应条件难以控制, 试剂繁多, 制备成本昂贵, 只能停留在实验室阶段, 不能进行工业化生产; 半合成方法中的前体物质浆果赤霉素Ⅲ(Baccatin Ⅲ)和 10-脱乙酰基浆果赤霉素Ⅲ(10-Deacetyl baccatin Ⅲ)仍然是从红豆杉中提取的; 采用植物细胞培养及植物愈伤组织诱导培养制备紫杉醇, 其产量低, 费用高; 能合成紫杉醇的红豆杉内生真菌的发现, 是紫杉醇资源研究的重要进展, 开辟微生物发酵法生产紫杉醇的新途径是时代的必然, 也是未来发展的大趋势。

1 内生真菌发酵生产紫杉醇的优势

无论是从生态还是经济、社会效益的角度来看, 利用植物内生真菌作为药源是一项不会枯竭的资源, 是解决紫杉醇药源问题的有效途径。与其它方法相比, 内生真菌发酵生产紫杉醇具有如下优点^[2]。

(1) 生产的可重复性, 在工业上可用发酵罐大规模进行生产, 内生真菌生长迅速, 易于培养, 易于缩短生产周期, 可望满足市场的需求, 降低紫杉醇的价格;

(2) 微生物的发酵生产不需要特别的技术, 微生物能在简单的培养基上生长, 应用的培养基相对比较便宜, 在收集紫杉醇之前, 可以通过改善培养环境、改进技术来提高产量;

(3) 微生物育种和选育速度会明显高于植物细胞株, 比如 1943 年青霉菌生产青霉素的效价仅为 20U 左右, 经过几年的常规诱变其产量就提高了几个数量级;

(4) 增加微生物的生产能力比较容易, 微生物易于通过基因工程等方法筛选高产菌株, 提高紫杉醇的产量。而利用植物细胞培养法则很难做到这一点,

基金项目: 国家自然科学基金(30570025); 黑龙江省“十五”重大攻关项目(GA02C101); 哈尔滨市青年科学基金(2005AFQXJ063); 黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目(1152HZ06); 黑龙江大学杰出青年科学基金

*通讯作者。Tex/Fax: +86-451-86609016; E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

作者简介: 赵凯(1973-), 男, 黑龙江阿城市人, 副教授, 现主要从事于生物制药与微生物遗传方面的研究。E-mail: zk395@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-12; 修回日期: 2007-11-01

选育一株高产细胞株需很长的时间;

(5) 在药厂利用微生物规模化发酵生产的技术比较成熟, 其培养与发酵条件相对易于控制和掌握, 即微生物发酵法生产紫杉醇的转产风险明显小于细胞培养法与化学合成法。

微生物发酵法生产紫杉醇的优势是显而易见的。因此, 在 Stierle 等(1993)^[3]的工作一经发表, 美国细胞克隆公司就出价 100 万美元支持蒙塔那州立大学的这项研究。在这美妙前景的鼓舞下, 国内外的学者纷纷展开了这方面的研究, 分离新的产紫杉醇内生真菌和进行菌种选育。

2 产紫杉醇的内生真菌的分离研究现状

1993 年, 美国蒙塔那(Montana)州立大学化学家 Stierle 和植物病理学家 Strobel 在蒙塔那西北部国家冰川公园的短叶红豆杉中分离到一株内生真菌 *Taxomyces andreanae*, 利用质谱、免疫化学、色谱和放射性化学标记等方法证实此种内生真菌能产生紫杉醇。尽管此菌产紫杉醇的量很低, 3 周培养物中紫杉醇的含量只有 24~50ng/L, 但这一发现开创了利用微生物生产紫杉醇的新途径^[3]。此后, 国内外学者陆续从多种红豆杉属植物中分离到可产紫杉醇的内生真菌。1996 年, Strobel 等从西藏红豆杉(*T. wallachiana*)的小枝中分离出可产紫杉醇的内生真菌, 该菌被鉴定为小孢盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*), 其真菌的培养液可以产生紫杉醇的量达到 50 μ g/L^[4]; 此后, 又分离到尼泊尔盘端鹿角菌(*Seimatoantlerium nepalense*), 其真菌培养液产生紫杉醇的量为 62~80 ng/L^[5]。目前, 这方面的研究工作取得了相当进展, 除了短叶红豆杉、西藏红豆杉外, 云南红豆杉、南方红豆杉、中国红豆杉、东北红豆杉等红豆杉属植物内生真菌产紫杉醇的研究均有报道。另外, 在一些非红豆杉属植物中也分离到了产紫杉醇的内生真菌。Strobel 等(1997)从一种松树(*Wollemia nobilis*)分离到产紫杉醇内生真菌 *Pestalotiopsis guepinii*^[6]。Li 等(1996)从秃柏(*Taxodium distichum*)的树皮、韧皮部和木质部都分离到产紫杉醇的内生真菌 *Pestalotiopsis microspora*, 其中有些菌株能够产生紫杉醇, 产量为 14~1487ng/L^[7]。

我国学者在分离产紫杉醇内生真菌的研究中也取得了可喜的进展。1994 年, 邱德有等从云南红豆杉(*T. yunnanensis*)的树皮中分离出 80 多株真菌, 其中一

株可产紫杉醇^[8]; 张理珉等(1998)从云南红豆杉树皮分离出可产紫杉醇的内生真菌^[9]; 马天有等(1999)从中国红豆杉(*T. chinensis*)树皮中分离得到一株内生真菌, 能产紫杉醇, 产量为 14.20 μ g/L^[10]; 王伟等(1999)从南方红豆杉的主干和侧枝树皮及皮下部分分离得到 91 株菌, 其中 6 株能分泌紫杉烷类化合物^[11]; 王建锋等(1999)也从南方红豆杉(*T. mairei*)皮层中分离到一株瘤座孢菌, 发酵产物分析表明可产紫杉醇, 产量为 185.4 μ g/L^[12]。

本课题组从 1993 年至今, 先后从东北红豆杉树中分离出 5 株可产紫杉醇的内生真菌。其中 HQD33 与 HQD48 两菌株均属于多节孢属的树状多节孢(*Nodulisporium sylviform*), 系中国的新记录种和新记录属^[13]; 菌株 HQD54 为一新种——红豆杉侧孢座腔菌(*Pleurocytostora taxi*)^[14]; 菌株 HU1353 为链格孢属的一新种——红豆杉链格孢(*Alternaria taxi*)^[15]; 菌株 HD104 为葡萄孢属的一新种——红豆杉葡萄孢(*Botrytis taxi*)^[16]。我们以紫杉醇产生菌——树状多节孢 HQD₃₃ 作为原始出发菌株, 经多种理化因素复合诱变与 ⁶⁰Co 辐照以及生物工程选育相结合的手段获得了一株细胞工程菌株 TPF-1, 其摇瓶发酵产量提高了 3 倍, 最高可含紫杉醇 448.52 μ g/L, 这标志着向通过微生物发酵工业化生产抗癌药物紫杉醇迈进了一大步。该菌株已被中国专利局受理为发明专利。已通过原生质体复合诱变得到的高产紫杉醇突变株 UV₄₀₋₁₉ 和 UL₅₀₋₆(其紫杉醇产量分别为 376.38 μ g/L 和 392.63 μ g/L)^[17]为出发菌株, 采用双亲灭活原生质体融合技术得到了一株稳定的高产融合子 HDF-68, 其摇瓶培养紫杉醇的产量达到了 468.62 μ g/L, 是目前报道紫杉醇产量最高的菌株(马玺等, 该论文已被 J Industrial Microbiology & Biotechnology 录用)。

3 紫杉醇产生菌的生物多样性

自从 Stierle(1993)等^[3]人的工作发表后, 在世界范围内, 关于内生于红豆杉属植物的紫杉醇产生菌的研究已成为热点, 国内外的研究学者纷纷开展了产紫杉醇内生真菌的分离研究工作。到目前为止, 人们已发现了 20 多个属内生真菌可以产生紫杉醇, 其寄主也不仅限于红豆杉属植物, 从秃柏、*Wollemi* 松及 *Torreya grandifolia* 等非红豆杉属植物中也分离到了可产紫杉醇的内生真菌, 这充分证明了紫杉醇产生菌具有生物多样性, 同时也显示了紫杉醇产生菌宿主的生物多样性(表 1)。

表 1 目前发现的可以产生紫杉醇的植物内生真菌
Table 1 A list of taxol-producing endophytic fungi

Strain	Host	Latin name	The content of taxol in fermentation liquid/($\mu\text{g/L}$)	Reference
	<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanae</i>	0.024-0.05	[3]
Tbp-2	<i>Taxus baccata</i>	<i>Monochaetia</i> sp.	0.102	[18]
Tbp-9	<i>Taxus baccata</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	0.13	[18]
Ja-69	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Alternaria</i> sp.	0.157	[18]
Ja-73	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.268	[18]
Ne-32	<i>Taxus wallachiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	50	[4]
P-96	<i>Taxus sumatrana</i>	<i>Pithomyces</i> sp.	0.095	[18]
Tbx-2	<i>Taxus baccata</i>	<i>Pestalotia bicilia</i>	1.081	[18]
Cp-4	<i>Taxodium distichum</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.014-1.487	[7]
W-lf-2	<i>Wollemia nobilis</i>	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0.485	[6]
YF ₁	<i>Taxus yunnanensis</i>			[8]
QT ₁₂	<i>Taxus chinensis</i>		14.2	[10]
	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Cephalosporium</i> spp. <i>Martensiomycetes</i> spp. <i>Mycelia sterilia</i>		[11]
TF ₅	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Tubercularia</i> sp.	185.4	[12]
	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Taxomyces</i> sp.	2.3	[19]
HQD ₃₃	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Nodulisporium sylviforme</i>	51.06-125.7	[13]
HQD ₄₈	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Nodulisporium sylviforme</i>		
TPF-1		<i>Nodulisporium sylviforme</i>	448.52	Zhou et al, 2001
HDF-68		<i>Nodulisporium sylviforme</i>	468.62	Zhou et al, 2007
HQD ₅₄	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Pleurocytospora taxi</i>		[14]
Tax-1	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	1.43	[20]
Tax-X	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Phoma</i>	32.93(mean value)	[20]
Tax-X	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Botrytis</i>	4.092 (mean value)	[20]
Tax-26	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Penicillium</i>	8.24	[20]
Tax-23	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Trichoderma</i>	19.586	[20]
Tax-56	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Mucor</i>	1.08	[20]
Tax-60	<i>Taxus yunnanensis</i>	<i>Chaetomium</i>	21.1	[20]
HD1353	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Alternaria taxi</i>		[15]
Y1117	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Fusarium</i>	2.7	Cheng, 2005 [#]
XT5	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Ectostroma</i> sp.1	276.75	[21]
XT2	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Botrytis</i> sp.1	161.24	[21]
XT17	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Papulaspora</i> sp.1	10.25	[21]
TPF6	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	<i>Alternaria alternate</i>	84.5	[22]
HD104	<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Botrytis taxi</i>		[16]

comes from Cheng L. Screening, Identification of endofugus from *Taxus Mairei* and preliminary study on coupling cultivation. Doctor thesis of Jiangnan Universtiy, 2006

4 提高内生真菌生物合成紫杉醇量的途径

微生物发酵生产紫杉醇的研究的尽管取得了很大的进展,但大多仍停留在实验室研究阶段,至今市场上的紫杉醇仍几乎全部来自于从红豆杉树中提取。其中一个重要原因就是分离到的产紫杉醇内生真菌发酵液中紫杉醇的产量仍然很低,还难以实现工业化生产,要进行工业化生产,分离到的菌株紫杉醇的产量至少要达到毫克级水平。因此,提高紫杉醇产生菌发酵液中紫杉醇产量是今后研究工作的重心。有几个研究方向被认为是可行的。

一是将从红豆杉树中分离到的紫杉醇生物合成过程中的限速酶的基因转入到紫杉醇产生菌体内,提高关键酶的表达量,进而提高紫杉醇的合成能力。

目前,国内外关于红豆杉细胞合成紫杉醇相关基因的克隆已有报道^[23-27]。

二是从产紫杉醇的内生真菌细胞中分离出产紫杉醇的关键酶基因并将其导入微生物体内,利用其它真菌甚至细菌、酵母菌构建新的紫杉醇高产工程菌株来生产紫杉醇。然而,目前关于微生物生物合成紫杉醇相关基因在国际上尚未见有报道。本文作者采用 RT-PCR 技术已从东北红豆杉细胞中克隆到紫杉二烯合酶的基因片段,片段长度为 909bp,编码 303 个氨基酸。这个序列与 GenBank 中收录的序列进行了同源性比较,同源性达到 98%,这个序列已经在 GenBank 上注册(AY546093)。同时,通过 Southern blot 已证实该酶也存在于微生物发酵法生产抗癌药物紫杉醇的生物合成途径中,至于该酶是否也为该生

物合成途径中的关键酶的试验研究正在进行中。另外,本课题组利用抑制性消减杂交(SSH)技术构建了菌株 HDF-68 在紫杉醇合成期消减非合成期的 cDNA 消减文库,得到了近 2000 条 EST 片段,文库滴度达 8.3×10^7 cfu/mL。在鉴定质粒载体 pMD18-T Vector 转化重组子时,随机挑取 32 个克隆,PCR 检测其中阳性克隆 25 个,PCR 扩增片段大小分布于 250bp ~ 1.7kb,主要集中于 400bp ~ 1kb,阳性率为 78%。筛选出了一批与紫杉醇生物合成相关的候选基因 EST,经测序其中有 2 条与紫杉醇合成有直接或密切关系。对筛选到的差异片段进行了反向斑点杂交,杂交结果显示,在回收并得到二次扩增的两千多个片段中,有一半以上为假阳性片段,出现假阳性的主要原因有 3 种:一是回收的片段为假阳性带;二是由于插入片段较短,杂交信号弱;三是回收片段在纯化、连接、克隆和挑取单菌落时,发生了错误或丢失。此外,对于这株遗传背景不是很清楚的、难以转化的菌株,课题组已构建了 ATMT 的高效遗传转化体系。下一步将利用 ATMT 的同源整合的特点,对已经通过 SSH 方法获得的与产紫杉醇相关的候选基因进行基因打靶,实现基因敲除,进而根据转化子产紫杉醇量的变化,包括增加,减少或不产紫杉醇,来确定该候选基因是否为 HDF-68 紫杉醇生物合成的相关基因。本项研究为进一步分离紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇相关基因,阐明紫杉醇产生菌产紫杉醇的生物合成途径提供了理论依据,为构建高产紫杉醇的基因工程菌株奠定了坚实的理论基础。同时,通过与红豆杉细胞紫杉醇合成途径的比较,为对内生真菌与其宿主相互关系的研究提供新的证据与思路。

再一个有效的方法是优化发酵培养条件,通过添加碳源、氮源和前体物、特殊的诱导子、抑制剂等物质借助代谢途径工程的研究来提高真菌紫杉醇的合成量。这方面研究在红豆杉细胞培养生物合成紫杉醇研究方向已有多数报道^[28-35],而在产紫杉醇内生真菌发酵生产紫杉醇研究方面还尚未见有相关报道。本课题组已采用单因子试验设计方法,对影响紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇的培养温度、发酵液初始 pH、摇床转数进行了探讨,确定了最佳发酵培养条件;另外,也通过单因子和正交试验设计研究了向发酵培养基中添加不同终浓度的碳源、氮源及前体物、诱导子和代谢旁路抑制剂及其协同对紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇的代谢调控作用,已获得了最佳的培养基组成^[36-38]。

综上所述,我们认为,随着研究工作的不断深入,利用产紫杉醇内生真菌进行大规模发酵生产重要抗癌药物紫杉醇,具有广阔的前景,该法必将是未来发展的主导方向,将成为抗癌药物紫杉醇来源的重要途径。

参 考 文 献

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents VI: the isolation and structure of taxol, A Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325-2327.
- [2] 王世伟, 马玺, 平文祥, 等. 微生物发酵生产紫杉醇研究进展. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(3): 561-565.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific Yew*. *Science*, 1993, 260(9): 214-216.
- [4] Strobel G Stierle A. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 1996, 142: 435-440.
- [5] Bashyal B, Li JY, Strobel GA, et al. *Seimatoantlerium nepalense*, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew(*Taxus wallachiana*). *Mycotaxon*, 1999, LXXII : 33-42.
- [6] Strobel GA, Hess WM, Li JY. *Pestalotiopsis guelpinii*, a taxol-producing endophyte of the *Wollemi pine*, *Wollemia nobilis*. *Aust J Bot*, 1997, 45: 1073-1082.
- [7] Li JY, Strobel GA, Sidhu R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from Bald Cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*, 1996, 142: 2223-2226.
- [8] 邱德有, 黄美娟, 方晓华, 等. 一种云南红豆杉内生真菌的分离. *真菌学报(Acta Mycologica Sinica)*, 1994, 13(4): 314-316.
- [9] 张理珉, 陆和生, 游洪云, 等. 一株产紫杉醇的内生真菌的分离及产物鉴定. *云南大学学报(自然科学版)(Journal of Yunnan University(Natural Science Edition))*, 1998, 20(5): 385-387.
- [10] 马天有, 董兆麟. 从植物分离产紫杉醇的内生真菌的研究. *西北大学学报(自然科学版)(Journal of Northwest University(Natural Science Edition))*, 1999, 29(1): 47-49.
- [11] 王伟, 贺雄雷, 钟英长. 南方红豆杉内生真菌及紫杉烷类产物的初步鉴定. *中山大学学报(自然科学版)(Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni(Natural Science Edition))*, 1999, 38(3): 116-118.
- [12] 王建锋, 吕华鹰, 苏文金, 等. 一株新的紫杉醇产生菌及其抗肿瘤活性. *厦门大学学报(Journal of Xiamen University)*, 1999, 38(4): 485-487.
- [13] 周东坡, 孙剑秋, 于寒颖, 等. 中国一新记录属-多节孢属. *菌物系统(Mycosystema)*, 2001, 20(2): 148-149.
- [14] 孙剑秋, 周东坡, 平文祥, 等. 侧孢座腔菌属一新种. *菌物系统(Mycosystema)*, 2003, 22(1): 12-13.
- [15] 葛菁萍, 平文祥, 马玺, 等. 紫杉醇产生菌 HU1353 的分离与鉴定. *微生物学杂志(Journal of Microbiology)*, 2004, 24(3): 19-21.
- [16] 王颖, 马玺, 平文祥, 等. 葡萄孢属一新种. *菌物研究(Journal of Fungal Research)*, 2006, 4(4): 62-64.
- [17] 赵凯, 周东坡, 平文祥, 等. 紫杉醇高产菌株的原生质体诱

- 变选育及其遗传变异初探. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(3): 355–358.
- [18] Strobel GA, Hess WM, Ford E, *et al.* Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. *J Industrial Microb*, 1996, 17: 417–423.
- [19] 万波, 李安明, 王晓力. 一株产紫杉醇真菌的分离. 中国科学(C辑)[*Science in China(Series C)*], 2001, 31(3): 271–274.
- [20] 陈毅坚, 张灼, 王艳, 等. 云南红豆杉内生真菌中产紫杉醇真菌的筛选. 生物技术(*Biotechnology*), 2003, 13(2): 10–11.
- [21] 胡凯, 谈锋, 唐克轩, 等. 南方红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离和筛选. 西南师范大学学报(自然科学版)[*Journal of Southwest China Normal University(Natural Science Edition)*], 2006, 31(1): 134–137.
- [22] 田仁鹏, 杨桥, 周国玲, 等. 一株产紫杉醇的南方红豆杉内生真菌的分离及分类研究. 武汉植物学研究(*Journal of Wuhan Botanical Research*), 2006, 24(6): 541–545.
- [23] JingHong M, DeJong, Liu YL, Arthur P, Bollon, *et al.* Genetic Engineering of Taxol Biosynthetic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 2005, 93: 212–224.
- [24] Guo YK, Miao ZQ, Qiu CX, *et al.* Molecular cloning and characterization of a taxadienol acetyltransferase cDNA from *Taxus media*. *Plant Science*, 2004, 167: 759–764.
- [25] Chau M, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2a-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 427: 48–57.
- [26] Chau M, Jennewein S, Walker K, *et al.* Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7-hydroxylase. *Chemistry & Biology*, 2004, 11: 663–672.
- [27] 肖颖, 赵冬, 王刚. 紫杉醇合成途径中紫杉烯合成酶 cDNA 的克隆. 中国农业科学(*Scientia Agricultra Sinica*). 2006, 39(10): 2138–2146.
- [28] Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, *et al.* Improve taxol yield by aromatic carboxylic and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 967–971.
- [29] Fett-Neto AG, Melanson SJ, Sakata K, *et al.* Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Biotech*, 1993, 11: 731–734.
- [30] Yu LJ, Lan WZ, Qin WM, *et al.* Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, 2001, 37: 477–482.
- [31] Yari KA, Valizadeh M, Ghasempou A, *et al.* Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 2006, 30: 262–269.
- [32] Qian ZG, Zhao ZJ, Xu Y, *et al.* Highly efficient strategy for enhancing taxoid production by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate in fed-batch cultivation of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: 516–521.
- [33] Huang YF, Lan WZ, Chen C, *et al.* The role of lipoxygenase in elicitor-induced taxol production in *Taxus chinensis* cell cultures. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 2793–2797.
- [34] Li JY, Sidhu RS, Bollon A, *et al.* Stimulation of taxol production in liquid culture of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycology Research*, 1998, 102(4): 461–464.
- [35] 汪爱顺. 前体、诱导子及抑制剂对紫杉烷生物合成的促进作用研究. 生命科学研究(*Life Science Research*), 2003, 7(1): 48–52.
- [36] 赵凯, 周东坡, 王伟. 培养基组成对树状多节孢紫杉醇产量的影响. 菌物研究(*Journal of Fungal Research*), 2003, 1(1): 24–27.
- [37] 刘晓兰, 周东坡, 孙剑秋, 等. 树状多节孢发酵生产紫杉醇工艺条件的初步研究. 菌物系统(*Mycosystema*), 2002, 21(2): 246–251.
- [38] 张亚妮, 董兆麟. 一株产紫杉醇真菌发酵条件的研究. 西北大学学报(自然科学版)[*Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*], 2002, 32(3): 310–312.

Recent advance and prospect on taxol production by endophytic fungus fermentation – A Review

Kai Zhao, Wenxiang Ping, Dongpo Zhou *

(Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Taxol has become a widely used clinical anti-cancer drug. Due to the scarcity of *Taxus* trees, current taxol output cannot meet the requirement of the market. Taxol produced by endophytic fungus fermentation has high prospective. We reviewed advantages of taxol production by fungus fermentation, research advances of isolation, biodiversity of taxol-producing fungi and methods of improved taxol output by endophytic fungus fermentation.

Keywords: taxol; biosynthesis; endophytic fungi

Supported by the National Science Foundation of China (30570025), the Fifteen Important Items of Heilongjiang(GA02C101), the Research Program for Scholars Overseas by Heilongjiang Education Bureau (1152HZ06), the Harbin Youth Science Foundation(2005AFQXJ063) and the Outstanding Youth Scientist Foundation of Heilongjiang University

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-86609016; E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

Received: 12 July 2007/Revised: 1 November 2007