

文章编号:1673-1689(2011)06-0879-05

植物生长调节剂对内生真菌生物合成紫杉醇的影响

李娟花, 陈文强, 邓百万*, 刘开辉, 解修超, 彭浩, 张晓伟, 张曼

(陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000)

摘要: 研究了植物生长调节剂对 *Metarhizium anisopliae* Tax-27 产紫杉醇的影响, 采用 HPLC 法检测。结果表明, 赤霉素(GA₃)质量浓度为 4 mg/L、茉莉酸甲酯(MeJA)质量浓度为 60 μmol/L、矮壮素(CCC)质量浓度为 25 mg/L、6-苄氨基嘌呤(6-BA)质量浓度为 4 mg/L、萘乙酸(NAA)质量浓度为 4 mg/L 时该菌产紫杉醇的质量浓度分别为: 670.49、838.11、942.57、455.72、450.48、953.35 μg/L。但 GA₃、MeJA 和 CCC 对 *M. anisopliae* Tax-27 菌丝体的生长有明显的抑制作用; 6-BA 和 NAA 对菌丝体的生长均有促进作用。

关键词: 植物生长调节剂; 内生真菌; 生物合成; 紫杉醇

中图分类号: Q 934

文献标识码: A

Effects of Plant Growth Regulators on Taxol Biosynthesis by an Endophytic Fungus

LI Juan-hua, CHE Wen-qiang, DENG Bai-wan*, LIU Kai-hui,
XIE Xiu-chao, PENG Hao, ZHANG Xiao-Wei, ZHANG Man

(School of Biological Sciences & Engineering, Shaanxi University of Technology, Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723000, China)

Abstract: In this study, the effect of plant growth regulators on the taxol biosynthesis by *Metarhizium anisopliae* Tax-27 was investigated. The results showed that the titer of taxol was 670.49 μg/L, 838.11 μg/L, 942.57 μg/L, 455.72 μg/L, 450.48 μg/L when 4 mg/L gibberellin (GA₃), 60 μmol/L methyl jasmonate (MeJA), 25 mg/L chlormequat chloride (CCC), 4 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BA), and 4 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA) was feed to the fermentation broth, respectively. However, the addition of GA₃, MeJA, CCC inhibited the mycelial growth of *M. anisopliae* Tax-27, on the other hand, the addition of 6-BA and NAA significance increased the mycelia growth.

Key words: plant growth regulators, endophyte, biosynthesis, taxol

红豆杉(*Taxus*)又名紫杉,为裸子植物,属于冰川活动期的孑遗植物^[1]。紫杉醇是从红豆杉植物

的树皮中提取分离出来的一种结构复杂的四环二萜化合物。紫杉醇(Paclitaxel,商品名 Taxol)最早

收稿日期:2010-10-14

基金项目:陕西省教育厅重点科研项目(08JZ21);陕西省教育厅项目(08JK248,08JK244)。

*通信作者: 邓百万(1963—),男,陕西眉县人,教授。主要从事微生物学方面的科研工作。Email: dengbw2008@yahoo.com.cn

是1971年,Wani等^[2]从短枝红豆杉(*Taxus brevifolia*)的树皮中分离得到而命名紫杉醇。Schiff等^[3]随后证实其具有独特的抗癌机制,可以将细胞周期阻断于 G_2/M 期,导致有丝分裂异常或停止,阻止癌细胞增殖^[4-7]。但由于原料和生产技术的限制,全球紫杉醇的产量严重不足,因此价格昂贵。

近年来,在紫杉醇研究中最重要进展应当是产生紫杉醇内生真菌的发现,目前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^[8]。提高内生菌产紫杉醇的产量是人们关注的热点^[9-11]。有人发现将植物生长调节剂加入细胞培养物中可显著提高细胞中紫杉醇的产量^[12-15],但这些研究主要集中在细胞培养方面^[16-19],将植物生长调节剂加入内生真菌细胞发酵液中研究其对紫杉醇含量变化的影响国内尚未见报道。本研究在内生真菌发酵指数期加入植物生长调节剂,研究其对紫杉醇含量变化的影响,为提高紫杉醇的产量提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 红豆杉内生真菌 *M. anisopliae* Tax-27,由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

1.1.2 培养基 斜面培养基:马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0 g, KH_2PO_4 5.0 g, V_{B1} 10.0 mg,琼脂粉 12 g,pH 值为自然。

发酵培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 40 g,蛋白胨 5 g,酵母膏 0.8 g, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 g, KH_2PO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, V_{B1} 10.0 mg,水 1 000 mL,pH 值为自然。

1.1.3 设备 高效液相色谱仪:e2698 美国 waters 公司生产;紫外检测器:2489 美国 waters 公司生产;旋转蒸发仪:RS203:上海申生科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线建立 挑取 0.5 cm^2 活化菌种接到液体培养基中,28℃静置培养 24 h,转入 28℃,160 r/min 振荡培养,从第 4 d 开始,每隔 1 天取 1 L 发酵液提取并测定菌丝体生长量和紫杉醇量,绘制其生长曲线。

1.2.2 液体发酵 挑取 0.5 cm^2 活化菌种接到液体培养基中,28℃静置培养 24 h,转入 28℃,160 r/min 振荡培养,待菌丝体生长至指数期时向发酵液中加入不同浓度的植物生长调节剂进行培养。

1.2.3 分离提取 用布什漏斗抽滤过滤发酵液,

菌丝体烘干(50℃),菌液称量体积。取菌液于 45℃旋转蒸发至 1/10 体积后,加入等体积的乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯相;菌丝体烘干后,放入研钵研磨至菌丝体完全破碎,然后加入一定量的乙酸乙酯超声波提取 3 次,每次 30 min,收集乙酸乙酯相。合并乙酸乙酯相,并于 45℃旋转蒸发至干,用少量甲醇溶解后定容至 25 mL,置 4℃冰箱保存,备用。

1.2.4 分析检测 标品用甲醇定溶,配置成 0.01~0.08 mg/mL 的梯度,绘制标准曲线。色谱条件:水-甲醇-乙腈(33:35:32)为流动相,检测波长 228 nm,流速 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$,进样量 20 μL ,柱温:室温,色谱柱:C18(4.6 mm $\times$ 150 mm)。精密称取紫杉醇标准品约 2 mg,甲醇定容至 10 mL,得母液浓度为 0.2 mg/mL,将母液依次稀释成质量浓度梯度为 0.08、0.04、0.02、0.01 mg/mL,取 20 μL 进样($N=4$),得回归方程为 $y=6.0878+3.5893913x$, $r=0.999222$ 建立标准曲线,采用外标法测定发酵产物抽提物中紫杉醇产量。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的建立

对 *M. anisopliae* Tax-27 进行液体培养,测定不同发酵时期的菌丝生长量及发酵液中紫杉醇产量,建立生长曲线,结果如图 1 所示。

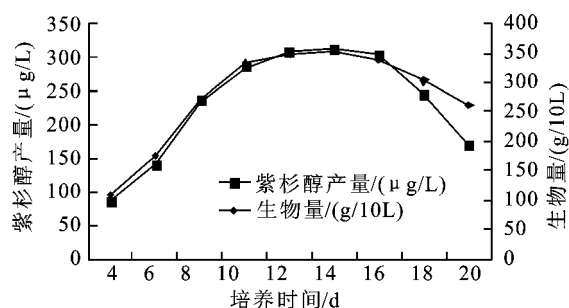


图1 *M. anisopliae* Tax-27 代谢产紫杉醇及菌丝生长规律

Fig. 1 Law of taxol production and mycelial growth of the *M. anisopliae* Tax-27

图 1 表明,内生真菌 *M. anisopliae* Tax-27 液体发酵 0~6 d 处于延滞期,菌丝生长量和发酵液中紫杉醇的产量变化不明显;发酵从第 7 d 开始进入指数期,此时菌丝生长量和发酵液中紫杉醇的产量增加明显,发酵至第 10 d,菌丝生长量和发酵液中紫杉醇的产量基本稳定在 314.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,变化不明显,发酵至第 14 d 时,*M. anisopliae* Tax-27 菌丝生长量和发酵液中紫杉醇的产量达到各自的峰值,分别为 35.2 g/L 和 314.29 $\mu\text{g}/\text{L}$;第 14 d 以后,菌丝

开始分泌色素,进而菌丝体开始自溶,菌丝生长量和发酵液中紫杉醇的产量开始下降,发酵进入衰亡期。

2.2 不同植物生长调节剂对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响

2.2.1 赤霉素(GA_3)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响

内生真菌 *M. anisopliae* Tax-27 液体发酵至第 7 d 时,加入不同浓度的赤霉素(GA_3),添加范围是 0~5 mg/L,研究其对 *M. anisopliae* tax-27 生物合成紫杉醇的影响。结果见图 2 所示。

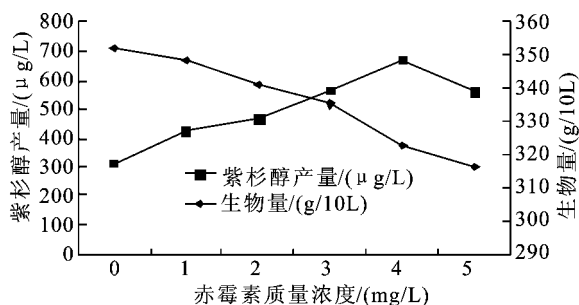


图 2 赤霉素(GA_3)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

Fig. 2 Effects of GA_3 on taxol biosynthesis of the *M. anisopliae* Tax-27

图 2 表明,在使用赤霉素(GA_3)诱导 *M. anisopliae* tax-27 生物合成紫杉醇时,赤霉素(GA_3)的浓度在 0~4.0 mg/L 范围内,紫杉醇产量随着赤霉素(GA_3)质量浓度的增大而增加,发酵液中赤霉素(GA_3)浓度到 4.0 mg/L 时,紫杉醇的产量达到峰值即 670.49 $\mu\text{g/L}$,紫杉醇的产量在不加诱导剂的基础上增加了 1.1 倍,赤霉素(GA_3)对紫杉醇的生物合成有明显促进作用。当发酵液中赤霉素(GA_3)浓度继续增大时,紫杉醇的产量反而减小。在 0~5 mg/L 浓度范围内,赤霉素(GA_3)对菌丝体生长有明显的抑制作用。

2.2.2 茉莉酸甲酯(MeJA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响

内生真菌 *M. anisopliae* Tax-27 液体发酵至第 7 d 时,加入不同浓度的茉莉酸甲酯(MeJA),添加范围是 0~100 $\mu\text{mol/L}$,研究其对 *M. anisopliae* tax-27 合成紫杉醇和菌丝体生长的影响。结果图 3 所示。

图 3 表明,在使用茉莉酸甲酯(MeJA)诱导 *M. anisopliae* tax-27 生物合成紫杉醇时,紫杉醇的产量随着茉莉酸甲酯(MeJA)加入浓度的增大而增加,茉莉酸甲酯(MeJA)质量浓度达到 60 mg/L 时,发酵液中紫杉醇的产量达到峰值即 838.11 $\mu\text{g/L}$,发酵液中紫杉醇的产量与不加任何诱导物发酵相比紫杉醇的产量增加了 1.67 倍。结果表明,在生

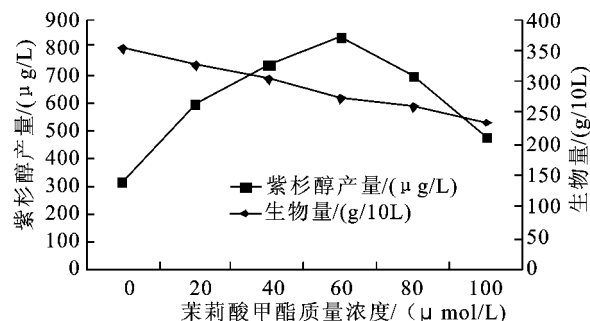


图 3 茉莉酸甲酯(MeJA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

Fig. 3 Effects of MeJA on taxol biosynthesis of the *M. anisopliae* Tax-27

物合成紫杉醇过程中,茉莉酸甲酯(MeJA)添加浓度在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 的范围时,茉莉酸甲酯(MeJA)对紫杉醇的生物合成有显著的促进作用。在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,茉莉酸甲酯(MeJA)的加入抑制菌丝体生长。

2.2.3 矮壮素(CCC)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响

内生真菌 *M. anisopliae* tax-27 液体发酵至 7 d 时,加入不同浓度的矮壮素(CCC),添加范围是 0~10 mg/L,研究对其生物合成紫杉醇的影响。结果如图 4 所示。

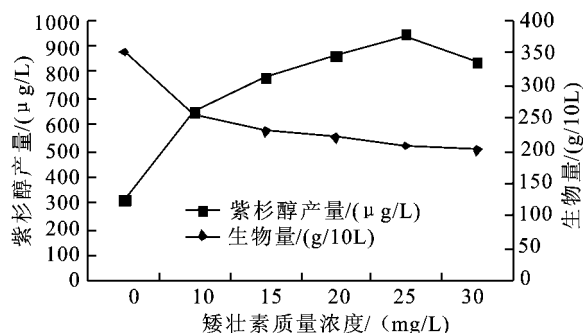


图 4 矮壮素(CCC)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

Fig. 4 Effect of CCC on taxol biosynthesis of the *M. anisopliae* Tax-27

图 4 表明,在发酵液中加入 0~10.0 mg/L 质量浓度的矮壮素(CCC)时,发酵液中紫杉醇的产量随着矮壮素质量浓度的增大而显著增加。当发酵液中矮壮素(CCC)浓度在 10.0~25.0 mg/L 范围时,发酵液中紫杉醇产量虽然随着矮壮素(CCC)的质量浓度增大而增加,但增加幅度减缓,当矮壮素(CCC)质量浓度达到 25.0 mg/L 时,发酵液中紫杉醇产量达到峰值即最大值 942.58 $\mu\text{g/L}$ 。相比本底水平发酵液中紫杉醇的产量增加了 2 倍,当矮壮素(CCC)质量浓度继续增大,紫杉醇的产量随之减小。结果表明,在生物合成紫杉醇过程中,矮壮素(CCC)

添加质量浓度在 0~30 mg/L 的范围时,矮壮素(CCC)对紫杉醇的生物合成有显著的促进作用。在 0~30 mg/L 质量浓度范围内,矮壮素(CCC)的加入抑制菌丝体生长。

2.2.4 6-苄氨基嘌呤(6-BA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响 内生真菌 *M. anisopliae* tax-27 液体发酵至 7 d 时,加入不同浓度的 6-苄氨基嘌呤(6-BA),研究其对生物合成紫杉醇影响。结果如图 5 所示。

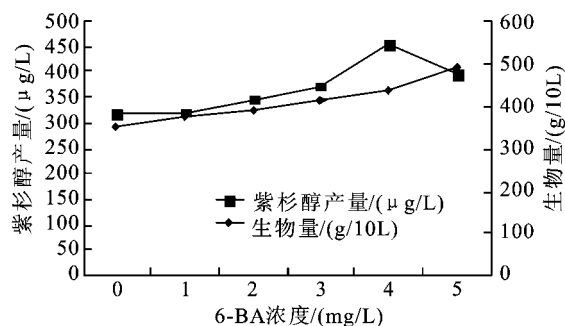


图 5 6-苄氨基嘌呤(6-BA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

Fig. 5 Effects of 6-BA on taxol biosynthesis of the *M. anisopliae* Tax-27

图 5 表明,发酵液中紫杉醇的产量随着 6-苄氨基嘌呤(6-BA)质量浓度的增大而增加。当 6-苄氨基嘌呤(6-BA)的质量浓度达到 4.0 mg/L 时,发酵液中紫杉醇产量达到峰值即 455.72 μg/L。当 6-苄氨基嘌呤(6-BA)质量浓度继续增大,紫杉醇的产量随之减小。结果表明,发酵液中 6-苄氨基嘌呤(6-BA)浓度 0~5.0 mg/L 浓度范围内,6-苄氨基嘌呤(6-BA)对紫杉醇的生物合成有促进作用,但影响不明显。在 0~5.0 mg/L 浓度范围内,6-苄氨基嘌呤(6-BA)的加入对菌丝体生长有促进。

萘乙酸(NAA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响 内生真菌 *M. anisopliae* tax-27 液体发酵至 7 d 时,加入不同质量浓度的萘乙酸(NAA),添加范围是 0~5 mg/L,研究其对生物合成紫杉醇的影响。结果如图 6 所示。

2.6 萘乙酸(NAA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

图 6 表明,发酵液中紫杉醇的产量随着萘乙酸(NAA)质量浓度的增大而增加,当萘乙酸(NAA)加入量达到 4.0 mg/L 时,发酵液中紫杉醇的产量达到峰值即 450.48 μg/L。当萘乙酸(NAA)浓度

继续增大,发酵液中紫杉醇的产量随之减小。因此,发酵液中萘乙酸(NAA)的最大加入量为 4.0 mg/L。结果表明,在萘乙酸(NAA)质量浓度 0~5.0 mg/L 范围内,萘乙酸(NAA)对紫杉醇的生物合成有促进作用,但影响不明显。在 0~5.0 mg/L 质量浓度范围内,萘乙酸(NAA)加入对菌丝体的生长有促进作用。

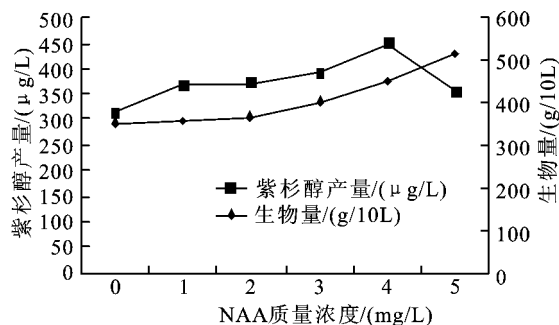


图 6 萘乙酸(NAA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇影响

Fig. 6 Effects of NAA on taxol biosynthesis of the *M. anisopliae* Tax-27

3 结 语

植物内生真菌是一类应用前景广阔的资源微生物,用微生物发酵方法生产紫杉醇,是解决药源问题的有效途径,且提高内生真菌产紫杉醇的量是目前研究的热点。

本研究通过在红豆杉内生真菌液体发酵过程中添加植物生长调节剂,研究对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成的紫杉醇影响。表明适当浓度的赤霉素(GA₃)、茉莉酸甲酯(MeJA)和矮壮素(CCC)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇起到明显促进作用,对菌丝体的生长有抑制作用;6-苄氨基嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇也有一定的促进作用,但作用没有赤霉素(GA₃)、茉莉酸甲酯(MeJA)和矮壮素(CCC)对 *M. anisopliae* Tax-27 生物合成紫杉醇的影响显著。汪爱顺^[12]等研究将诱导子、抑制剂加入红豆杉植物细胞系中对紫杉醇生物合成的影响,其结果表明,适当浓度的诱导子、抑制剂对紫杉醇的生物合成起到促进作用,与本实验的研究结果相同,但两者的作用机制和途径是否一致,有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 中国林业科学院,等. 中国植物学[M]. 第七卷. 北京:科学出版社,1978. 438.
- [2] Wain M C, Tay H L, Monroc F, et. Pant antitumor agent VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. *Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325—2327.
- [3] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol[J]. *Nature*, 1979, 277: 665—667.
- [4] Horowitz S B. Mechanism of action of taxol[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13: 134—136.
- [5] Stierle A, Stierle D, Strobel G A. The search for taxol producing microorganisms among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*, [J]. *Nat Prod*, 1995, 58: 1315.
- [6] Patel RN, tour De Paclitaxel: bioynthesis for semisynthesis[J]. *Aura Rev Microbiol*, 1998, 98: 361—395.
- [7] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces* and *Reanal*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew[J]. *Science*, 1993, 260: 214—216.
- [8] 何颖, 谈锋, 谢建平. 红豆杉内生真菌产紫杉醇研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 519—523, 513.
HE Ying, TAN Feng, XIE Jian-ping. Studies on endophytic fungus from *taxus* synthesizing taxol[J]. *Natural product research and development*, 2006, 18: 519—523, 513. (in Chinese)
- [9] 兰文智, 余龙江, 吴元喜. 水杨酸对真菌诱导子诱导红豆杉悬浮细胞膜脂过氧化和紫杉醇生物合成的影响[J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 78—83.
LAN Wen-zhi, YU Long-jiang, WU Yuan-xi. Effects of salicylic acid on membrane-lipid peroxidation induced by fungal elicitor and taxol synthesis in *Taxus chinensis* suspension cell cultures[J]. *Acta Bot Boreal*, 2002, 22(1): 78—83. (in Chinese)
- [10] 陈永勤, 吴蕴祺, 胡秋, 等. 苯丙氨酸、蔗糖和甘露醇对杂种红豆杉细胞的生长及形成紫杉醇、巴卡亭 III 和 10-去乙酰基巴卡亭 III 的影响[J]. 药学学报, 1998, 33(2): 132—137.
CHEN Yong-qin, WU Yun-qi, HU Qiu et. Effects of phenylalanine, sucrose and mannitol on the growth and production of taxol, baccatin III and 10-deacetyl baccatin III in suspension cells of *taxus media* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1998, 33(2): 132—137. (in Chinese)
- [11] 赵春芳, 余龙江, 刘智, 等. 茉莉酸甲酯诱导下红豆杉细胞产生紫杉烷类物质群代谢轮廓分析[J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 557—564.
ZHAO Chun-fang, YU Long-jiang, Liu Zhi et. Metabolic profiling analysis of taxanes in *Taxus chinensis* cell cultures elicited by methyl jasmonate[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2005, 27(5): 557—564. (in Chinese)
- [12] 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[J]. 生命科学研究, 2003, 7(1): 48—52.
WANG Ai-shun. Improvement of taxane biosynthesis in cell suspension cultures of *Taxus chinensis* by elicitors, precursors and inhibitors[J]. *Life Science Research*, 2003, 7(1): 48—52. (in Chinese)
- [13] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞芝. 生长调节物质对紫杉醇和紫杉烷类化合物合成的调控作用[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(3): 22—26.
GUO Zhi-gang, FENG Ying, LIU Rui-zhi. Control of taxol and taxanes biosynthesis by growth regulators[J]. *Natural product research and development*, 1999, 12(3): 22—26. (in Chinese)
- [14] 苏湘鄂, 梅兴国, 龚伟, 等. 茉莉酸甲酯与真菌诱导物、水杨酸组合对红豆杉细胞中紫杉醇含量的影响[J]. 生物技术, 2001, 11(1): 10—13.
SU Xiang-e, MEI Xing-guo, Gong Wei et. Effects of the combination of methyl jasmonate with salicylic acid or fungal elicitor on the cell suspension of *Taxus chinensis*[J]. *Biootechnology*, 2001, 11(1): 10—13. (in Chinese)
- [15] 陈菁, 柯铁, 常俊丽, 等. 脱氧胆酸钠体系分离紫杉烷类化合物[J]. 生物技术, 2001, 11(3): 18—20.
CHEN Jing, KE Tie, CHANG Jun-li et. Separation of paclitaxel and related taxanes by SDC system[J]. *Biootechnology*, 2001, 11(3): 18—20. (in Chinese)
- [16] 苏湘鄂, 梅兴国, 余依亭. 稀土元素对红豆杉细胞悬浮培养及紫杉醇合成的影响[J]. 生物技术, 2001, 11(4): 28—31.
SU Xiang-e, MEI Xing-guo, YU Yi-ting. Effects of rare earth elements on *Taxus* cell suspension culture and taxol synthesis[J]. *Biootechnology*, 2001, 11(4): 28—31. (in Chinese)
- [17] 梅兴国, 田朝霞, 王传贵, 等. 稀土化合物对悬浮培养红豆杉细胞紫杉醇生产和释放的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 38—41.
MEI Xing-guo, TIAN Zhao-xia, WANG Chuan-gui et. Increased accumulation of taxol by some cell lines of *taxus* in response to addition of lanthanide[J]. *Natural product research and development*, 2000, 12(5): 38—41. (in Chinese)
- [18] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞芝. 无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调控作用[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(5): 23—27.
GUO Zhi-gang, FENG Ying, LIU Rui-zhi. Regulation of taxol and taxanes biosynthesis by mineral elements [J]. *Natural product research and development*, 1999, 12(5): 23—27. (in Chinese)
- [19] 黄新, 邱德有, 黄璐琦. 茉莉酸甲酯对中国红豆杉细胞基因表达的 mRNA 差异显示研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 627—632.
HUANG Xin, QIU De-you, HUANG Lu-qi. Studies on the mRNA differential expression induced by methyl jasmonate in *Taxus chinensis* cells[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(5): 627—632. (in Chinese)