

## 微生物发酵生产紫杉醇研究进展\*

王世伟<sup>1,2</sup> 马 玺<sup>2</sup> 平文祥<sup>2</sup> 周东坡<sup>2,\*</sup>

(齐齐哈尔大学生命与工程学院 齐齐哈尔 161005) (黑龙江大学 哈尔滨 150080)

**摘要** 概述了微生物发酵法生产紫杉醇的研究进展,包括产紫杉醇内生真菌的多样性和真菌产紫杉醇的优势,内生真菌分离、紫杉醇纯化和含量测定方法,同时对如何提高内生真菌紫杉醇产量进行了比较全面的综述。

**关键词** 紫杉醇,微生物发酵,内生真菌,产量

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:10253-2654(2007)03-0561-05

## Research Advances on Taxol Production by Microbe Fermentation\*

WANG Shi-Wei<sup>1,2</sup> MA Xi<sup>2</sup> PING Wen-Xiang<sup>2</sup> ZHOU Dong-Po<sup>2,\*</sup>

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

(College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080)

**Abstract** The biodiversity of the taxol-producing endophytic fungi, advantage of taxol production by microbe fermentation, isolation of endophytic fungi, and the separation, purification and determination of taxol in fermentation liquid were reviewed. The pathways to improve the production of taxol by endophytic fungi were also comprehensively discussed.

**Key words** Taxol, Microbe fermentation, Endophytic fungi, Production

紫杉醇(Paclitaxel,商品名Taxol)是一种二萜类衍生物,是当前公认的广谱、活性强的抗癌药物之一<sup>[1]</sup>。紫杉醇最早是Wani等<sup>[2]</sup>于1971年从短枝红豆杉(*Taxusbrevifolia*)树皮中分离得到的。随后,Schiff等<sup>[3]</sup>证实紫杉醇具有独特的抗癌机制。随着紫杉醇的临床应用,对其研究也逐渐深入,其主要抗癌机制为抑制肿瘤细胞的微管(Microtubules)合成,以阻断细胞分裂,致使肿瘤体积逐渐缩小,紫杉醇还可诱导细胞凋亡,另外还有类似脂多糖(LPS)的作用,可调节机体的免疫功能<sup>[4]</sup>。目前国际市场上的紫杉醇仍依靠从红豆杉树皮提取及半合成,迄今为止尚未见有第三种形式形成大规模工业化生产的报道。紫杉醇的工业生产受到了原料和技术两方面的制约,短期内难以突破<sup>[5]</sup>。为了解决红豆杉资源短缺与紫杉醇需求量的日益增加的矛盾,人们对生产紫杉醇进行了多方面的研究,包括化学全合成、红豆杉细胞培养及微生物发酵。微生物发酵法生产紫杉醇因具有明显优势,其研究和开发越来越受到国内外研究学者的广泛关注。

## 1 紫杉醇产生菌研究进展

## 1.1 产紫杉醇内生真菌的多样性和真菌产紫杉醇的优势

最早 Stierle 和 Strobel 等<sup>[6]</sup>在短叶红豆杉(*T. brevifolia*)的枝条上分离到一种内生真菌,能够产生紫杉醇,定名为安德列亚霉(*Taxomyces andreanae*)。当时这一发现对紫杉醇药

源开发是一个重大的突破,为开发紫杉醇来源提供了一条新的途径。此后,各国学者纷纷开展产紫杉醇内生真菌的分离工作,陆续从西藏红豆杉、云南红豆杉、东北红豆杉、欧洲红豆杉、中国红豆杉中分离到产紫杉醇的内生真菌,其宿主植物几乎涉及红豆杉属的各个种。在红豆杉以外的树种中,研究人员也分离到了可产紫杉醇的内生真菌。Li等<sup>[7]</sup>从秃柏(*Taxodium distichum*)的树皮、韧皮部和木质部中都分离到产紫杉醇的内生真菌 *Pestalotiopsis microspora*。Strobel GA等<sup>[8]</sup>从一种松树(*Wollemia nobilis*)分离到产紫杉醇内生真菌 *Pestalotiopsis guepini*。这说明产紫杉醇的内生真菌不仅存在于红豆杉属植物中,在一些非红豆杉属植物中也存在,他们的研究进一步扩大了产紫杉醇内生真菌的范围。

我国的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年邱德友等<sup>[9]</sup>从云南红豆杉(*T. yunnanensis*)的树皮中分离到80多株真菌,其中一株可产紫杉醇。1993年周东坡<sup>[10,11]</sup>领导的课题组从百年以上的东北红豆杉(*T. cuspidata*)的枝条与树皮中分离到3株可产紫杉醇的内生真菌,发酵液中紫杉醇的产量可达51.06 $\mu$ g/L~125.70 $\mu$ g/L。其中2株菌被鉴定为树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*),为我国的新记录属、新记录种。张理珉等<sup>[12]</sup>从云南红豆杉树皮分离出可产紫杉醇的内生真菌。马天有等<sup>[13]</sup>从中国红豆杉(*T. chinensis*)树皮中分离到一株内生真菌,能

\* 国家自然科学基金项目(No.30570025)和黑龙江十五重大攻关课题资助项目(No.GA02C101)

\*\* 通讯作者 Tel:0451-88194798 E-mail:zhoudp2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-07,修回日期:2007-03-18

产紫杉醇,产量为 $14.20\mu\text{g/L}$ 。王伟等<sup>[14]</sup>从南方红豆杉(*T. chinensis* var. *mairei*)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,经鉴定分别属于头孢霉属(*Cephalosporium* spp.)、轮柄梳霉属(*Martensiomycetes* spp.)和无孢菌群(*Mycelia sterilia*)。王建锋等<sup>[15]</sup>也从南方红豆杉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 $185.4\mu\text{g/L}$ 。陈毅坚等<sup>[16]</sup>报道从云南红豆杉(*T. yunnanensis*)分离出的52株内生真菌中,有19株菌的发酵产物中有紫杉醇或紫杉烷类物质,分属于12个属。胡凯<sup>[17]</sup>等从南方红豆杉的树皮中分离得到的21个内生真菌,发现有3个菌株能够产生紫杉醇。到目前为止,人们已发现20多种内生真菌可以产紫杉醇,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,充分证明了紫杉醇产生菌及其宿主的生物多样性。

与过去从红豆杉植物的树皮中提取紫杉醇相比,内生真菌生产紫杉醇具有更大的优势,真菌不仅能在简单的培养基上良好生长,产生大量的发酵产物,发酵周期短,还可以在生物反应器中人为控制各种参数,并可通过诱变育种等手段来提高菌种性能以提高紫杉醇产量,所以大规模工业生产容易实现,其应用前景十分广阔,而且对于植物来源的天然药物的新生产途径的开发及濒危药用植物的保护具有十分重要的经济及生态效益,这样就为无限而有效地产生紫杉醇药物开辟了新的途径。

## 1.2 内生真菌分离以及紫杉醇含量测定和纯化

**1.2.1 内生真菌分离:**从植物体内分离内生真菌的关键一步是对植物组织表面进行消毒,以控制表生真菌的生长,使内生真菌得以分离。目前常用次氯酸钠作为消毒剂<sup>[18]</sup>,其分离方法是先用水冲洗植物材料,然后在75%乙醇中浸泡60s后,在4%次氯酸钠水溶液浸泡0.5h,然后在75%酒精中再浸泡30s,最后用无菌水冲洗。一般分离所用的培养基为1%~2% 麦芽浸膏琼脂 MEA 培养基。为了防止细菌污染可在培养基中加抗菌素,如链霉素、四环素等。一般 $20^{\circ}\text{C}$ ~ $25^{\circ}\text{C}$ 培养一个月左右,即可形成内生真菌菌落。

### 1.2.2 紫杉醇的分离、纯化和结构鉴定:

(1)紫杉醇的提取分离:真菌培养物首先要进行预处理,然后进行紫杉醇的提取。主要提取方法是用有机溶剂萃取。马天有等<sup>[13]</sup>的方法是,将培养物冷冻后用转速为10000r/min 组织捣碎机匀浆3min,用4层纱布过滤,滤液中加入等体积的氯仿和甲醇混合液(10:1, V/V),充分振荡后静置8h~12h,收集有机溶液相,并在 $45^{\circ}\text{C}$ 条件下减压蒸发,残留物溶于1mL 甲醇中作为样品溶液备用。周东坡等人<sup>[10]</sup>对发酵产物萃取的方法是:收集培养物先经3000r/min 离心15min,并将沉淀物捣碎后重新与上清液混合,再经3500r/min 离心12min,保留上清液,用等体积的氯仿与甲醇混合液(10:1, V/V)萃取,收集有机相后置 $30^{\circ}\text{C}$ 下鼓风干燥,将蒸发后

的萃取物溶于少量的氯仿中保存。后来又进行了改进,即发酵液过滤后,滤渣烘干(低于 $50^{\circ}\text{C}$ ),滤液称量体积。滤渣用适量乙酸乙酯萃取,滤液用1/2 滤液体积的乙酸乙酯萃取(30min),下层水层再用乙酸乙酯萃取一次,合并乙酸乙酯,减压蒸馏。用适量甲醇洗涤减压蒸馏得到的固体,再用正己烷洗涤15min,收集下层甲醇,加入乙酸乙酯和水(1:1, V/V)进行萃取(30min),将收集的乙酸乙酯进行减压蒸馏,用一定量的乙腈洗下固体, $0^{\circ}\text{C}$ 密封保存,优点是能够充分萃取出发酵液和菌丝中的紫杉醇。陈建华等人<sup>[19]</sup>的萃取方法比较简单,直接用菌丝进行,取菌丝1g 均质5min 后用甲醇抽提,将抽提液通过离心,收集上层,用旋转蒸发器蒸干,加入等体积水和二氯甲烷抽提,弃水相收集有机相,再次蒸干,所得粉末溶于少量甲醇中,用粒径为 $0.15\mu\text{m}$ ~ $0.18\mu\text{m}$ 的硅胶粒子作填料的硅胶柱进一步纯化。综上所述,在分离真菌发酵液中的紫杉醇首先要考虑预处理,然后用相应的萃取方法进行分离,要考虑萃取液的种类和减压蒸馏的温度。

(2)紫杉醇的纯化:得到较高纯度的紫杉醇十分重要。紫杉醇的纯化多采用色谱法。已报道的用于紫杉醇分离的方法除薄层色谱法、柱层析法外还有胶束电动毛细管色谱法、高速逆流色谱法、树脂吸附分离法、膜分离法、沉淀法、化学反应法和药理作用靶点法<sup>[20]</sup>。粗分离的紫杉醇一般采用柱层析纯化。周东坡<sup>[21]</sup>(1995)报道,用高20cm 层析柱,以硅胶(60目~100目)为吸附剂纯化紫杉醇。将一定量的氯仿加入萃取物中,然后加样入柱,先用氯仿洗脱再用乙腈洗脱。庞欣<sup>[22]</sup>采用苯基柱固相萃取(SPE)与高效液相色谱(HPLC)联用来纯化紫杉醇。经SPE处理的样品最大吸收峰的峰高明显降低,杂质峰大大减少。真菌发酵产物的提取物中杂质较多,常规精制方法使用大量溶剂,而且处理过程中乳状液的生成也会造成样品的损失,导致样品的回收率不够理想,该法克服了上述缺点,是目前解决微生物发酵产物杂质多、产量低的较好方案。金涛等<sup>[23]</sup>探索了对紫杉醇产生菌发酵液有效脱色作用同时制备高纯度紫杉醇的树脂及层析条件。他采用了7种树脂对紫杉醇产生菌发酵液进行脱色和提取,结果表明201×4型树脂处理样品的效果最好,利用80%的乙腈水溶液洗脱,紫杉醇的回收率达到了98.8%。从而为提取紫杉醇提供了一种操作简单、回收率高、污染较低的树脂层析方法。

(3)紫杉醇结构鉴定:1991年,Kingston等<sup>[24]</sup>报道了紫杉醇的一维 $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 谱,并描述了其立体结构。1993年Stierle等<sup>[6]</sup>采用质谱(MS)、免疫化学、色谱(TLC、HPLC)和放射性同位素标记等方法,证明了安德鲁紫杉菌的3周培养物中存在紫杉醇。1998年黄鹤等<sup>[25]</sup>通过高分辨NMR研究,对紫杉醇的整体结构进行了归属,结合NMR与分子模型方法计算出了紫杉醇的一组溶液构象,其结构偏差RMSD值在0.025左右,NOESY谱峰强度偏差R因子小于0.022,表现出很好的一致性,并与NMR实验结果相吻合,由此获得了紫

杉醇分子的三维溶液构象。2001 年吴红菱等<sup>[26]</sup>研究了红豆杉叶中的化学成分,采用 HPLC、NMR、IR、MS 等方法,对从红豆杉叶醇浸膏中分离精制所得的部分化合物进行结构鉴定。经分析对照,确定了三个化合物的结构,它们分别是:紫杉醇、紫杉醇前体物紫杉素 III 和紫杉素 IV。2003 年李志良等<sup>[27]</sup>从中国红豆杉的细胞培养物中分离纯化了紫杉醇,并用多种核磁共振波谱方法( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMQC, HMBC)结合质谱(FAB/MS)红外光谱、紫外光谱等方法鉴定了它的化学结构,证明与源于天然红豆杉植物材料提取的紫杉醇为同一物质。对紫杉醇空间结构的研究将有助于探讨其构象与药效关系,为进一步开发和研制紫杉醇类药物,扩大其临床应用提供了依据。

**1.2.3 紫杉醇含量测定** 真菌发酵液中紫杉醇的定量可采用薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、UV 免疫分析、生物学方法和放射性前体标记等。另外还有竞争抑制酶免疫分析法(competitive inhibition enzyme immunoassay, CIEIA),它是利用对紫杉醇有专一特性的单抗进行测定,此方法简单易行且灵敏度高。HPLC 是最常用的、较为有效的分析检测方法。HPLC 不仅可以测定紫杉醇含量,而且还能追踪分离紫杉醇。

我们课题组采用薄层层析法对纯化的紫杉醇进行初步定性定量的测定,基本步骤是,将内生真菌的培养物反复萃取或经柱层析获得的产物进行干燥后,用乙腈溶解,点于  $10\mu\text{m} \sim 40\mu\text{m}$  粒度的硅胶薄层层析板上进行层析,展开剂采用氯仿:甲醇(7:1, V/V)。层析后立即用含有 1% 香草醛的浓硫酸喷雾显色,观察其特异斑点是否出现,并根据斑点的大小、位置和颜色初步估计紫杉醇含量。陈建华<sup>[28]</sup>采用核蛋白分析仪进行分析,以 228nm 处的吸光度  $\lambda_{228}$  为纵坐标,紫杉醇浓度  $\rho$  为横坐标,用紫杉醇标准样制作标准曲线。测定经过稀释的培养物提取液的  $\lambda_{228}$  值,从标准曲线上查出相应紫杉醇浓度。

高效液相色谱的主要特点为高速、高压、高效及高灵敏度。紫杉醇的高效液相色谱分析始于 20 世纪 80 年代末,随后得到广泛应用。正相、反相色谱均有应用,分离用到的固定相也有 10 余种。广泛应用的普通填料主要有 ODS(C18)、氰基柱和苯基柱。在分离过程中,采用的流动相通常为乙腈-水或甲醇-水二元溶剂系统,或采用乙腈-甲醇-水三元溶剂系统。另外,梯度洗脱方式也得到广泛采用,且收到良好效果。HPLC 也可与 MS 联用,用氰基柱,流动相为甲醇-乙腈-醋酸铵。用 HPLC-MS 联用来分析检测紫杉烷类化合物,检测范围可提高到 ng 级。2003 年赵凯等<sup>[29]</sup>用高效液相色谱定量测定紫杉醇含量,其色谱条件:Waters 高效液相色谱系统,二极管阵列检测器, C18 色谱柱,  $200\text{mm} \times 4.6\text{mm}$  柱温为室温,流动相为甲醇与水混合物( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 60:40$ );波长 228nm,流速  $110\text{mL}/\text{min}$ ,注射体积  $10\mu\text{L}$ 。目前具有极高柱效的微型柱(microcolumn)及毛细管电泳也有应用。

## 2 利用微生物发酵法提高紫杉醇产量的探索与策略

近 10 年来,国内外利用内生真菌产生紫杉醇的研究报道迅速增多,但利用内生真菌发酵培养生产紫杉醇仍未能达到中型或大型工业化生产规模(要达到工业化生产表达率至少为毫克级,而现在普遍产量仅仅为几百微克)<sup>[30]</sup>。其中主要存在下列问题:1)缺乏良好的适合于发酵的工业菌株。根据国内外报道,目前的产紫杉醇真菌大多是红豆杉内生菌,一般菌丝体不发达,影响紫杉醇产量。因此要从两方面入手解决这一问题,一是继续从自然界中筛选更好的适合发酵的原始出发菌株;二是对现有高产紫杉醇产生菌进行遗传改造,使其能够产生大量菌丝体来提高紫杉醇的产量。2)由于发酵条件的限制,单位培养液中紫杉醇的含量低。

### 2.1 菌种改良

**2.1.1 利用常规诱变改良菌种** 1993 年,周东坡等<sup>[10]</sup>从东北红豆杉中分离到 3 株紫杉醇产生菌,其中 HQD33 经过紫外线、EMS、 $^{60}\text{Co}$ 、NTG 等诱变剂顺序诱变得到高产突变株 NCEU-1,其紫杉醇产量到达  $314.07\mu\text{g}/\text{L}$ ,远远高于原始出发菌株紫杉醇的产量( $51.06\mu\text{g}/\text{L} \sim 125.70\mu\text{g}/\text{L}$ )。

**2.1.2 利用原生质体诱变改良菌种** 赵凯等人<sup>[31]</sup>对紫杉醇产生菌-树状多节孢原生质体制备的酶系组成、pH、酶解温度和酶解时间等影响原生质体制备和再生的因素和原生质体诱变进行了研究,找到了比较合适的酶解和再生条件。同时对得到的树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*)原生质体进行了诱变,发现最佳的诱变条件为 30W 紫外灯、30cm 距离、照射 50s;UV + LiCl 复合诱变、照射时间 40s。之后又报道<sup>[32]</sup>了对紫杉醇产生菌 NCEU-1 的原生质体进行了紫外线和氯化锂复合诱变,筛选制霉菌素抗性突变株,共筛选出 4 株正突变株。经发酵筛选实验,获得一株遗传性稳定、高产菌株 UL04.5,其紫杉醇产量提高到  $418.24\mu\text{g}/\text{L}$ 。

**2.1.3 利用双亲灭活原生质体融合改良菌种** 最近周东坡领导的实验课题组成员马玺等人采用双亲灭活原生质体融合的实验进一步提高了紫杉醇的产量,使紫杉醇的产量已经达到  $468.62\mu\text{g}/\text{L}$ (未发表)。可见除常规诱变外,采用原生质体诱变以及原生质体融合技术能够大幅度提高内生真菌紫杉醇产量。采用产紫杉醇内生真菌与产紫杉醇前体物的菌株互补培养对紫杉醇的产量也有一定的提高作用。

**2.1.4 利用基因工程技术构建工程菌株改良菌种** 利用 DNA 重组技术,通过基因操作,局部设计、改造和更新固有的代谢途径,以紫杉醇微生物合成途径的基因转移与表达为切入点,提高紫杉醇最终产量是今后研究的重要方向。但由于紫杉醇合成途径复杂,例如,利用双槐牛基焦磷酸 geranylgeranyl diphosphate(GGPP)为前体物合成紫杉醇就约 20 个酶促反应,所以分离或合成关键酶的基因,寻找合适的载

体、研究外源基因的表达已成为利用基因工程技术提高内生真菌紫杉醇产量的关键环节。2001年Huang Q等<sup>[34]</sup>将异戊二烯焦磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase)双糖牛基焦磷酸合成酶(geranylgeranyl diphosphate(GGPP) synthase)与紫杉二烯合成酶(Taxadiene synthase, TS)的基因转化大肠杆菌进行表达,通过融合5-磷酸-1-脱氧木酮糖DXP(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate)合成酶基因提高异戊二烯焦磷酸异构酶的表达量,获得紫杉醇生物合成的重要中间产物紫杉二烯(Taxadiene,产量达1.3mg/L),成为基因工程菌合成紫杉醇中间体的先例。目前,对微生物途径工程产紫杉醇的研究相对进展较慢,原因是目前还存在生物合成途径的多样性、代谢网络的复杂性、基因表达调控的未知性等问题<sup>[35]</sup>,但随着产紫杉醇内生真菌和相关基因进一步的深入研究,必能提高紫杉醇产量。

## 2.2 优化培养基及发酵条件

真菌自生和共生条件的代谢途径有差异,内生真菌脱离植物体后,次级代谢产物的生产量多停止或延缓,如果发酵液中加入红豆杉针叶萃取物则可以激活紫杉醇的合成,进而提高紫杉醇产量。发酵液添加合成紫杉醇的前体物,如Baccatin III、醋酸盐(Acetate)、苯丙氨酸(Phenylalanine)、苯甲酸(Benzoic acid)、亮氨酸(Leucine)等,或不同发酵时期加入不同的糖类,或使用不同培养基及改变生长条件,亦有助于提高紫杉醇的产量。赵凯等人<sup>[29]</sup>用正交试验法研究了醋酸钠、苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸对紫杉醇产生菌HQD<sub>33</sub>产生紫杉醇的影响,结果发现它们之间的协同作用对提高紫杉醇产量有显著影响,在改良的S-7培养基基础上加入适当浓度的上述物质可以使HQD<sub>33</sub>紫杉醇产量达到203.656 $\mu$ g/L。2006年冯旭等人<sup>[36]</sup>通过紫外线和硫酸二乙酯复合诱变得到了一株镰刀菌属(*Fusarium mairi*)K178的高产紫杉醇的诱变菌株。通过PB设计和反应曲面法对培养基的成分中NaOAc、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>和MgSO<sub>4</sub>进行了优化,使紫杉醇的产量从20 $\mu$ g/L提高到225.2 $\mu$ g/L,效果确实很显著。同年周选围等<sup>[37]</sup>报道,在红豆杉内生真菌(*Ozonium* sp.)适生碳源、氮源和生长情况研究的基础上,通过正交试验筛选了其发酵培养基,即用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行了4因素3水平的正交试验,结果表明1%的蔗糖、1%的果糖、0.2%的蛋白胨、0.5%的酵母粉、0.5%的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3%的MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和0.001%的V<sub>BI</sub>为优化后的最佳培养基。

## 3 结语

从目前研究水平来看,真菌发酵液中紫杉醇的产量仍然很低,要进行工业化生产,至少要达到mg级水平。因此,提高真菌发酵液中紫杉醇的产量是今后研究工作的重心。高产菌种选育、优化培养条件将是提高紫杉醇产量的有效途径。随着紫杉醇生物合成途径的逐渐明了,充分应用现

代生物学技术,对能够产紫杉醇的内生真菌进行遗传改造,构建高产工程菌株,提高紫杉醇的产量,是提高紫杉醇产量最有效、也是必然的途径,到时将实现紫杉醇的微生物发酵法生产,从而既解决了紫杉醇的药源问题,改善目前市场上紫杉醇价格昂贵、供不应求的现状,又可保护濒临灭绝的珍稀红豆杉树种。

## 参考文献

- [1] 江泽飞,宋三泰,冯奉仪.中国肿瘤临床与康复,2000,7(2):66~67.
- [2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, Coggon P, McPhail A T. J Am Chem Soc, 1971, **19**: 2325~2327.
- [3] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature, 1979, **277**: 665.
- [4] 袁金辉,郭立霞,王兴旺,等.紫杉醇的最新研究进展.中国药理学通报,2001,17(2):135~139.
- [5] 纪元,毕建男,严冰,等.生物工程学报,2006,22(1):1~6.
- [6] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Science, 1993, **260**(9): 214~216.
- [7] Li J Y, Strobel G, Sidhu R, et al. Microbiology, 1996, **142**: 2223~2226.
- [8] Strobel G, Hess W M, Li J Y. Aust J Bot, 1997, **45**: 1073~1082.
- [9] 邱德有,黄美娟,方晓华,等.真菌学报,1994,13(4):314~316.
- [10] 周东坡,平文祥,孙剑秋,等.微生物学杂志,2001,21(1):18~19,32.
- [11] 周东坡,平文祥,孙剑秋,等.菌物系统,2001,20(2):277~278.
- [12] 张理琨,陆和生,游洪云,等.云南大学学报(自然科学版),1998,20(5):385~387.
- [13] 马天有,董兆麟.西北大学学报(自然科学版),1999,29(1):47~49.
- [14] 王伟,贺雄雷,钟英长.中山大学学报(自然科学版),1999,38(3):116~118.
- [15] 王建峰,吕华鹰,黄耀坚,等.厦门大学学报(自然科学版),1999,38(4):485~487.
- [16] 陈毅坚,张灼,王艳,等.生物技术,2003,13(2):10~11.
- [17] 胡凯,谈锋,唐克轩,等.西南师范大学学报(自然科学版),2006,31(1):134~137.
- [18] Petrini O. Taxonomy of endophytic fungi Of aerial plant tissues. In Fokkema N. J. and vanden Heuvel J. ed. Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge Cambridge University Press 1986, pp. 175~187.
- [19] 陈建华,刘佳佳,臧巩固,等.中南大学学报(自然科学版),2004,35(1):65~69.
- [20] 赵凯,周东坡.生物技术通讯,2004,15(3):309~312.
- [21] 周东坡,平文祥.微生物发酵法生产抗癌药物紫杉醇.北京:中国科技出版社,2002,pp.81.
- [22] 庞欣,章光明,张瑞萍,等.色谱,2003,22(2):185.
- [23] 金涛,刘利群,王伟,等.黑龙江医药,2006,19(5):375~377.

- 1.
- [25] 黄 鹤,毛黎明,张晓东,等.中国药物化学杂志,1998,8(2): 106.
- [26] 吴红菱,梅兴国.郧阳医学院学报,2001,20(4):209~211.
- [27] 李志良,骆雪兰,谢维权.天然产物研究与开发,2003,15(5):433~435,440.
- [28] 陈建华,藏巩固,李育君等.中国麻林,2002,24(5):42~45.
- [29] 赵 凯,周东坡,王 伟.菌物研究,2003,1(1):24~27.
- [30] 林福呈,刘小红,王洪凯,等.微生物学报,2003,43(4):534~538.
- [31] 赵 凯,平文祥,马 玺.微生物学报,2005,45(3):355~358.
- [32] 赵 凯,周东坡,平文祥.生物工程学报,2005,21(5):847~850.
- [33] Strobel G A. Can J Plant Patol, 2002, 24:13~20.
- [34] Qiulong Huang, Charles A. Roessner, Rodney Croteau A. Ian Scott. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001, 9(9):2237~2242.
- [35] 黄 瑛,曾庆平.中国生物工程杂志,2006,26(1):60~64.
- [36] Feng Xu, Wenyi Tao, Long Cheng, et al. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31:67~73.
- [37] 周选围,王子楠,魏雅敏,等.应用与环境微生物学报,2006,12(2):176~181.