

产紫杉醇内生真菌枝状枝孢霉 MD2 的 发酵条件优化

苗莉云¹ 张鹏^{2,3*} 周蓬蓬² 余龙江^{2*}

(1. 运城学院 生命科学系 山西 运城 044099)

(2. 华中科技大学 生命科学与技术学院 资源生物与生物技术研究所 湖北 武汉 430074)

(3. 湖北省农业科学研究所 经济作物研究所 湖北 武汉 430064)

摘要: 【目的】通过优化内生真菌枝状枝孢霉 MD2 的发酵条件,提高 10-去乙酰巴卡亭 III (10-DAB)和紫杉醇(Taxol)的产量。【方法】采用单因素试验分析不同的培养基初始 pH 值、培养温度、摇床转速和培养时间对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响,优化枝状枝孢霉 MD2 的培养条件;以 YES 为基本培养基,采用单因素试验和正交试验分析添加苯甲酸钠、苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸 4 种前体物对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响,优化枝状枝孢霉 MD2 的培养基组分。【结果】优化后发酵条件为:在初始 pH 为 5.0 的 300 mL YES 培养基中,添加 15 mg/L 苯甲酸钠、25 mg/L 苯丙氨酸、5 mg/L 丝氨酸、15 mg/L 甘氨酸,接种 1 mL 枝状枝孢霉 MD2 的孢子悬液(10^7 – 10^8 个孢子/mL), 28.0 °C、220 r/min 发酵培养 12 d。在此条件下,枝状枝孢霉 MD2 的生物量、10-DAB 和紫杉醇的产量分别为 15.5 g/L、471.5 μ g/L 和 569.5 μ g/L,与初始发酵条件相比,分别提高了 1.3、3.6 和 3.4 倍。【结论】首次获得了枝状枝孢霉 MD2 生产 10-DAB 和紫杉醇的较适摇瓶发酵条件,可为进一步放大发酵培养提供参考。

关键词: 内生真菌, 枝状枝孢霉 MD2, 10-去乙酰巴卡亭 III, 紫杉醇, 发酵条件

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20776058, 20906036); 中国博士后科学基金项目(No. 20100471183); 运城学院自然科学基金项目(No. CY2012004)

*通讯作者: Tel: 86-27-87792264

✉: 张鹏: zhangpenghust@126.com; 余龙江: yulongjiang@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2012-11-09; 接受日期: 2013-01-14

Optimization of fermentation conditions of *Cladosporium cladosporioides* MD2 for 10-DAB and taxol production

MIAO Li-Yun¹ ZHANG Peng^{2,3*} ZHOU Peng-Peng² YU Long-Jiang^{2*}

(1. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044099, China)

(2. Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

(3. Institute of Industrial Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430064, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study was to increase the yield of 10-deacetylbaconin III (10-DAB) and taxol in *Cladosporium cladosporioides* MD2 through optimizing fermentation conditions. [Methods] The culture conditions of *C. cladosporioides* MD2 were optimized by single factor experiments to investigate the effect of different initial pH values of medium, culture temperatures, rotational speeds, and culture time on the yield of 10-DAB and taxol. The fermentation medium components were optimized by single factor and orthogonal experiments to investigate the effect of four precursors on the yield of 10-DAB and taxol. [Results] The optimization results were that 1 mL spore suspension of *C. cladosporioides* MD2 (10^7 – 10^8 spores) was inoculated into 300 mL YES medium with the initial pH of 5.0, which was supplemented with 15 mg/L sodium benzoate, 25 mg/L L-phenylalanine, 5 mg/L serine and 15 mg/L glycine, and then cultured at 28.0 °C and 220 r/min for 12 days. Under the optimized fermentation conditions, the biomass, 10-DAB yield and taxol yield of *C. cladosporioides* MD2 were respectively 15.5 g/L, 471.5 µg/L and 569.5 µg/L, about 1.3 times, 3.6 times and 3.4 times of that under the initial fermentation conditions. [Conclusion] A suitable fermentation condition of *C. cladosporioides* MD2 for 10-DAB and taxol production in flask culture was obtained for the first time, and these results provided a reference for its scale-up fermentation.

Keywords: Endophytic fungi, *Cladosporium cladosporioides* MD2, 10-Deactyl baconin III, Taxol, Fermentation conditions

紫杉醇(Taxol)是目前最好的抗肿瘤药物之一,但其药源植物红豆杉十分稀缺。利用产紫杉醇内生真菌发酵生产紫杉醇是解决紫杉醇药源紧缺问题的有效途径之一^[1-4]。目前,已有几十种产紫杉醇内生真菌被报道^[1-2],但大多数内生菌的紫杉醇产量都很低^[1-2],如最先报道的安德鲁紫杉菌(*Taxomyces andreanae*)的紫杉醇产量约为

24–50 ng/L^[3],随后发现的小孢盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis microspora*)的紫杉醇产量约为60–70 µg/L^[4];我国的新纪录属-树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*)的紫杉醇产量约为51.06–125.70 µg/L^[5],Zhao等发现的黑曲霉(*Aspergillus niger* var. *taxi*) HD86-9的紫杉醇产量约为273 µg/L^[6],Deng等发现的腐皮镰刀菌

(*Fusarium solani*) Tax-3 的紫杉醇产量约为 163.35 $\mu\text{g/L}$ ^[7]。

依据紫杉醇生物合成途径, 采用代谢调控策略和发酵条件优化, 是提高真菌发酵培养物中紫杉醇产量的有效方法。紫杉醇生物合成途径的研究结果^[8-12]表明, 紫杉醇的骨架结构合成与 C13 侧链合成是分别进行的: 经甲羟戊酸(Mevalonic acid, MVA)途径和 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphat, MEP)途径合成的异戊烯焦磷酸(Isopentenyl diphosphate, IPP)与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(Dimethylallyl diphosphate, DMAPP)缩合形成香叶基焦磷酸(Geranyl diphosphate, GPP), 并依次与 2 个 IPP 结合形成香叶基香叶基焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP); GGPP 在酶促作用下环化形成紫杉醇的三环二萜骨架结构: 紫杉-4(5),11(12)-二烯, 并通过羟基化、酰基化、酮基化等一系列的修饰, 以及环氧丙烷(Oxetane)的形成, 进一步合成紫杉醇的前体: 10-去乙酰巴卡亭 III (10-Deacetylbaaccatin III, 10-DAB0 和巴卡亭 III (Baaccatin III), 二者一般作为紫杉烷环母核合成量的检测指标; 而 C13 侧链则由 α -苯丙氨酸在变位酶作用下生成 β -苯丙氨酸, 通过 C2 位羟基化生成苯基异丝氨酸, 并与巴卡亭 III 的 C13 位连接生成 N-去苯甲酰紫杉醇, 之后, 通过酯化反应形成紫杉醇。紫杉醇的侧链合成对终产物的限速影响大于骨架合成^[13-14]。很多芳香羧酸和芳香氨基酸都属于紫杉醇 C13 侧链和骨架侧基合成的前体^[8], 如 Fett-Neto 等^[15]研究表明苯丙氨酸、苯甲酸、丝氨酸、甘氨酸等多种芳香羧酸与芳香氨基酸都可以明显提高紫杉醇和巴卡亭 III 的产量。其中, 苯丙氨酸是 C13 侧链合成的直接前体^[12,16-17]; 苯甲酸、苯甲酸盐既可参与 C13 侧链合成^[12], 也可参与紫杉烷环 C-2 位苯甲酰化反应^[18]; 而丝氨酸和甘氨酸则可进入莽草酸途径(Shikimic acid

pathway)参与苯丙氨酸和苯甲酸的合成, 从而影响紫杉醇 C13 侧链的合成^[15,18], 也可作为初级代谢产物进入 MVA 途径, 参与紫杉烷环骨架的合成^[18]。

枝状枝孢霉 MD2 是本研究室分离的一株产紫杉醇内生真菌^[19], 其紫杉醇产量约为 170.0 \pm 5.9 $\mu\text{g/L}$, 是一株紫杉醇产量较高的野生菌株。本研究通过分析培养基的初始 pH 值、培养温度、摇床转速和培养时间对枝状枝孢霉 MD2 的紫杉醇及其前体 10-DAB 产量的影响, 初步优化了枝状枝孢霉 MD2 的培养条件, 并选择苯甲酸钠、苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸 4 种前体物, 采用单因素试验和正交试验优化了枝状枝孢霉 MD2 的培养基组成, 以期对枝状枝孢霉 MD2 的生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

枝状枝孢霉 MD2 菌株由本研究室保存。紫杉醇 (Taxol)、10-去乙酰基巴卡亭 III (10-Deacetylbaaccatin III, 10-DAB) 标准品购自 Sigma 公司; 其它试剂和药品均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 培养基

YES 培养基为枝状枝孢霉 MD2 的初始发酵培养基, 其组成和配制方法参照文献^[20]。

1.3 孢子悬液的制备

枝状枝孢霉 MD2 孢子悬液的制备参照本研究室前期报道^[21]。

1.4 紫杉醇的提取及分析

枝状枝孢霉 MD2 发酵培养后, 离心收集菌体, 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后研磨粉碎, 过 200 目筛子收集菌粉, 并准确称取 1.0 g 用于紫杉醇的提取及分析, 提取和分析方法参照本研究室的前期报道^[19,22]。

1.5 生物量的测定

取定量发酵液,离心收集菌体,灭菌蒸馏水洗涤菌丝 3-5 次,100 °C 烘干至恒重,称取菌体量。

1.6 发酵条件的优化

将 1 mL 孢子悬液接入装有 300 mL 发酵培养基的 1 L 锥形瓶,进行以下发酵条件的优化分析。所有因素均进行 3 次平行测定,结果取平均值。

(1) 初始 pH 值: 分别将 YES 培养基调至不同的初始 pH 值,接入孢子悬液,25 °C、180 r/min 培养 10 d 后收集菌体,提取并检测紫杉醇和 10-DAB 的含量,确定培养基的最适初始 pH 值。

(2) 培养温度: 将 YES 培养基调至最适 pH 后,接入孢子悬液,并分别在不同温度条件下,180 r/min 培养 10 d 后,收集菌体,提取并检测紫杉醇和 10-DAB 的含量,确定最适培养温度。

(3) 摇床转速: 将 YES 培养基调至最适 pH 后,接入孢子悬液,于最适培养温度下,分别在不同摇床转速条件下培养 10 d,收集菌体,提取并检测紫杉醇和 10-DAB 的含量,确定最适摇床转速。

(4) 培养时间: 将 YES 培养基调至最适 pH 后,接入孢子悬液,在最适培养温度和摇床转速条件下进行发酵培养,从第 3 天开始取样,每 24 h 取样一次,离心收集菌体,并检测生物量、紫杉醇和 10-DAB 产量,确定最适培养时间。

(5) 添加前体物的单因素分析: 将 YES 培养基调至最适 pH 后,分别加入不同浓度的苯甲酸钠、L-苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸,并分别接入孢子悬液,在最适培养条件下发酵后,收集菌体并提取、检测紫杉醇的含量,分析分别添加 4 种前体物质对紫杉醇和 10-DAB 合成的影响。

(6) 添加前体物的正交分析: 采用正交设计对有效促进紫杉醇合成的前体物进行优化组合,确定优化后的培养基组成。

2 结果

枝状枝孢霉 MD2 的初始发酵条件为: 1 mL 孢子悬液接入 300 mL YES 培养基,25 °C、180 r/min 培养 10 d,生物量、10-DAB 和紫杉醇产量分别为(11.9±0.3) g/L、(130.5±5.2) µg/L 和 (170.0±5.9) µg/L。在此基础上,本研究进行了培养基初始 pH 值、培养温度、摇床转速、培养时间以及培养基成分等因素的优化。

2.1 初始 pH 值和培养温度的影响

通过分析不同的培养基初始 pH 值和培养温度对枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量的影响,结果(图 1、2)表明:当初始 pH 为 5.0 时,

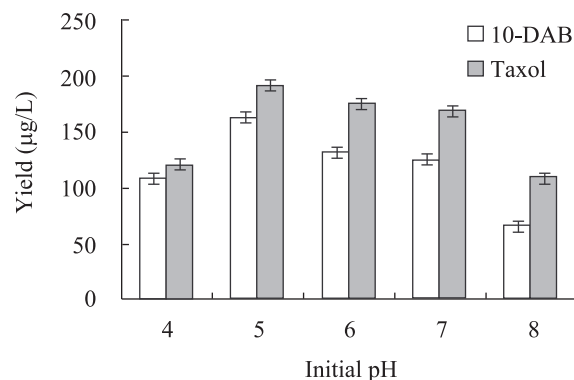


图 1 培养基初始 pH 对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响
Fig. 1 The effect of the initial pH of fermentation medium on the yield of 10-DAB and taxol

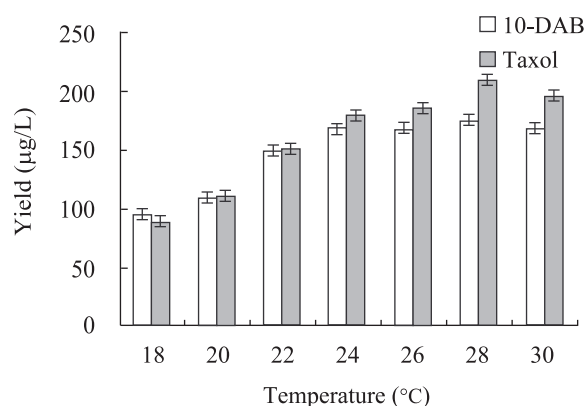


图 2 培养温度对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响
Fig. 2 The effect of the culture temperatures on the yield of 10-DAB and taxol

10-DAB 和紫杉醇的产量最高, 分别为 162.6 $\mu\text{g/L}$ 和 191.0 $\mu\text{g/L}$; 当培养温度为 28.0 $^{\circ}\text{C}$ 时, 10-DAB 和紫杉醇的产量最高, 分别为 175.1 $\mu\text{g/L}$ 和 211.5 $\mu\text{g/L}$ 。

2.2 摇床转速和培养时间的影响

通过分析摇床转速对枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量的影响, 结果(图 3)表明: 当摇床转速为 220 r/min 时, 10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别为 195.3 $\mu\text{g/L}$ 和 241.1 $\mu\text{g/L}$ 。

通过分析培养时间对枝状枝孢霉 MD2 生物量、10-DAB 和紫杉醇产量的影响, 结果(图 4、5)表明: 发酵培养 12 d 时, 生物量、10-DAB 和紫杉醇产量都是最高, 分别为 16.1 g/L、233.4 $\mu\text{g/L}$ 和 299.1 $\mu\text{g/L}$, 与初始发酵条件相比, 分别提高了约 1.35、1.79 和 1.76 倍。

2.3 添加前体物的影响

首先, 采用单因素实验分析不同浓度的苯甲酸钠、苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸, 对枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量的影响, 结果(图 6)表明: 分别添加 4 种前体物都可以提高 10-DAB 和紫杉醇的产量, 产量随底物浓度的增加表现为先升高后降低。而且, 针对所分析的 6 个浓度梯度而言, 10-DAB 和紫杉醇产量的最高值是同时出现的: 当苯甲酸钠的添加量为 15 mg/L 时, 10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别为 267.3 $\mu\text{g/L}$ 和 329.0 $\mu\text{g/L}$ (图 6A), 与对照相比, 分别提高了 1.15 和 1.10 倍; L-苯丙氨酸的添加量为 20 mg/L 时, 10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别是 291.5 $\mu\text{g/L}$ 和 345.0 $\mu\text{g/L}$ (图 6B), 与对照相比, 分别提高了 1.25 和 1.15 倍; 丝氨酸的添加量为 10 mg/L 时, 10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别为 281.6 $\mu\text{g/L}$ 和 323.5 $\mu\text{g/L}$ (图 6C), 与对照相比, 分别提高了 1.21 和 1.08 倍; 甘氨酸的添加量为 15 mg/L 时, 10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别是 253.0 $\mu\text{g/L}$ 和 314.2 $\mu\text{g/L}$ (图 6D), 与对照相比, 分

别提高了 1.08 和 1.05 倍。

之后, 采用正交实验分析组合添加 4 种前体物对枝状枝孢霉 MD2 的生物量、10-DAB 和紫杉

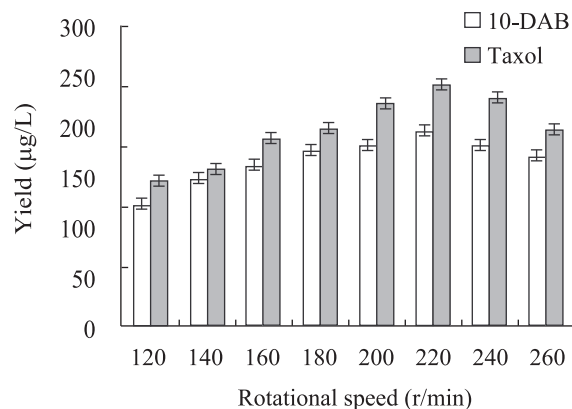


图 3 摇床转速对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响
Fig. 3 The effect of the rotational speeds on the yield of 10-DAB and taxol

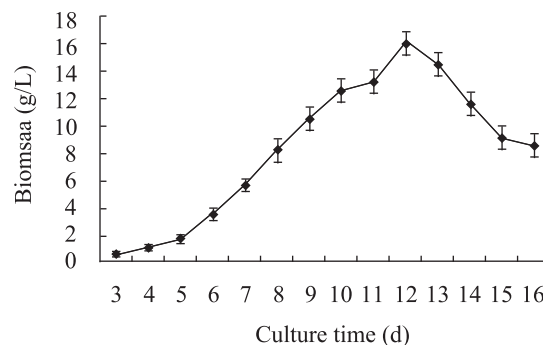


图 4 培养时间对生物量的影响
Fig. 4 The effect of the culture time on the biomass

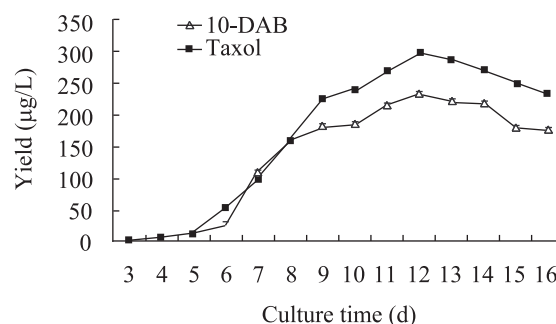


图 5 培养时间对 10-DAB 和紫杉醇产量的影响
Fig. 5 The effect of the culture time on the yield of 10-DAB and taxol

醇产量的影响, 表1结果表明, 4种前体物一起添加对其10-DAB和紫杉醇产量的影响作用均大于不添加或只添加单个前体物的影响作用; 当组合添加为15 mg/L 苯甲酸钠、25 mg/L 苯丙氨酸、5 mg/L 丝氨酸、15 mg/L 甘氨酸时, 枝状枝孢霉 MD2 的生物

量、10-DAB 和紫杉醇产量最高, 分别为 15.5 g/L、471.5 $\mu\text{g/L}$ 和 569.5 $\mu\text{g/L}$, 与初始发酵条件相比, 分别约提高了 1.3、3.6 和 3.4 倍。

综上, 本研究通过优化培养基的初始 pH 值、培养温度、摇床转速、培养时间以及发酵培

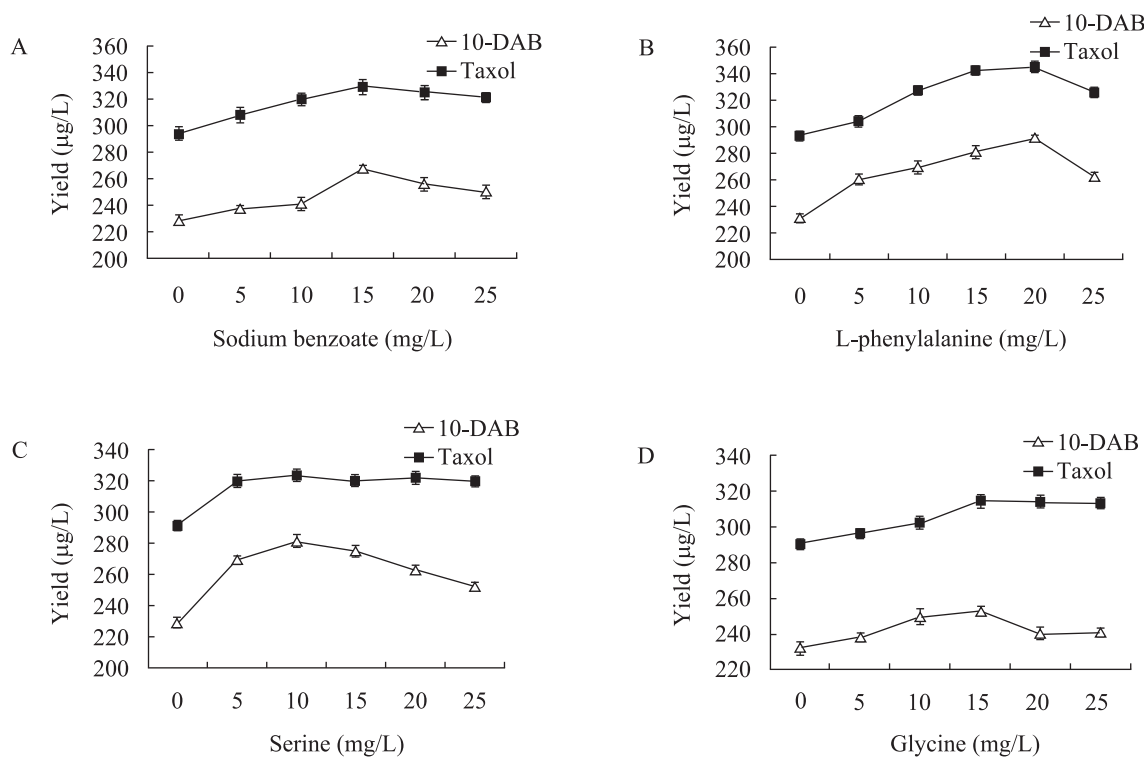


图6 单因素分析分别添加4种前体物对10-DAB和紫杉醇产量的影响

Fig. 6 Signal factor analysis of the effect of 4 precursors on the yield of 10-DAB and taxol

表1 正交分析4种前体物对生物量、10-DAB产量和紫杉醇产量的影响

Table 1 Orthogonal analysis of the effect of 4 precursors on the biomass, 10-DAB yield and taxol yield

编号 Number	苯甲酸钠 Sodium benzoate (mg/L)	苯丙氨酸 L-phenylalanine (mg/L)	丝氨酸 Serine (mg/L)	甘氨酸 Glycine (mg/L)	生物量 Biomass (g/L)	10-DAB产量 10-DAB yield ($\mu\text{g/L}$)	紫杉醇产量 Taxol yield ($\mu\text{g/L}$)
1	1(10)	1(15)	1(5)	1(10)	14.7	451.0	524.9
2	1	2(20)	2(10)	2(15)	13.9	453.9	527.1
3	1	3(25)	3(15)	3(20)	14.1	445.1	532.1
4	2(15)	1	2	3	15.7	425.1	509.6
5	2	2	3	1	15.1	450.9	525.1
6	2	3	1	2	15.5	471.5	569.5
7	3(20)	1	3	2	14.9	446.6	533.1
8	3	2	1	3	15.2	435.1	511.6
9	3	3	2	1	13.5	453.6	448.1

培养基的组分, 确定了摇瓶条件下枝状枝孢霉 MD2 的较适发酵条件为: 在 300 mL YES 培养基中添加 15 mg/L 苯甲酸钠、25 mg/L 苯丙氨酸、5 mg/L 丝氨酸和 15 mg/L 甘氨酸, 调节初始 pH 为 5.0, 接种 1 mL 枝状枝孢霉 MD2 的孢子悬液 (10^7 – 10^8 个孢子/mL), 28.0 °C、220 r/min 条件下发酵培养 12 d。

3 讨论

培养条件和培养基组分是影响真菌紫杉醇产量的重要因素^[23–25]。刘晓兰等^[23]通过优化培养时间、通气量以及添加前体物, 将树状多节孢 HQD33 融合子 TPF-1 的紫杉醇产量提高至 448.52 µg/L, 约提高了 3.56 倍。Feng 等^[24]通过优化氮源、微量元素等培养基组分, 将 *Fusarium maire* 的紫杉醇产量提高至 225.2 µg/L, 提高约 1.31 倍。杨磊等^[25]通过优化培养基的碳、氮源及添加前体物, 将曲霉 NSZJ043 的巴卡亭 III 产量提高至 34.6 µg/L, 约提高了 3 倍。张亚妮等^[26]通过优化初始糖浓度、碳源、氮源及前体物, 将真菌 T₁₄ 的紫杉醇产量提高至 146.4 µg/L, 约提高了 2.6 倍。Zhao 等^[27]通过优化初始 pH、培养温度、摇床转速、培养时间, 以及通过添加醋酸铵等前体物优化培养基组分, 将内生菌 *Nodulisporium sylviforme* UV40-19 的紫杉醇产量提高至 456.24 µg/L, 约提高了 1.15 倍。陈建华等^[28]通过添加苯丙氨酸、亮氨酸等前体物优化培养基成分, 将内生真菌 IBFC-Z3S 的紫杉醇产量提高至 1.60 mg/L, 约提高了 1.6 倍。本研究通过优化培养基的初始 pH 值、培养温度、摇床转速、培养时间及培养基组分, 将枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量分别提高至 471.5 µg/L 和 569.5 µg/L, 分别提高了 3.6 倍和 3.4 倍。

在培养基中添加前体物虽然可以较显著地提高真菌的紫杉醇产量, 但不同前体物对紫杉醇产量的影响和菌株有关, 如苯甲酸钠和乙酸钠可促进曲霉 NSZJ043 的巴卡亭 III 的合成, 而

L-苯丙氨酸和亮氨酸对其促进作用不明显^[25]; 较高浓度的乙酸铵和较低浓度的苯丙氨酸有利于提高真菌 IBFC-Z3S 的紫杉醇产量, 但不利于菌丝体的生长, 而苯甲酸钠则抑制其菌体生长和紫杉醇积累^[28]; 醋酸铵、水杨酸、亚硝酸银、丝氨酸皆可提高菌株 *N. sylviforme* UV40-19 的紫杉醇产量^[27]; 苯丙氨酸、乙酸钠、酪氨酸皆可提高树状多节孢 HQD33 融合子 TPF-1 的紫杉醇产量^[23]。本研究结果表明苯甲酸钠、苯丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸皆可不同程度的提高枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量。添加前体物对不同菌株紫杉醇产量的影响不同, 预示这些菌株的紫杉醇合成和代谢途径可能存在差异。

由于紫杉醇是具细胞毒作用的次生代谢物, 大量合成会对细胞自身产生一定的毒性作用。枝状枝孢霉 MD2 的 10-DAB 和紫杉醇产量提高的同时, 其生物量也提高了 1.3 倍, 说明提高的紫杉醇产量并不足以影响其菌丝体的生长, 预示枝状枝孢霉 MD2 的紫杉醇产量还有较大的提升空间。而本研究结果可为深入分析枝状枝孢霉 MD2 的发酵研究, 进一步提高其紫杉醇产量提供参考。

参考文献

- [1] Ji Y, Bi JN, Yan B, et al. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(1): 1–6.
- [2] Zhou X, Zhu H, Liu L, et al. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1707–1717.
- [3] Stierle A, Stroble G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214–216.
- [4] Strobel G, Yang X, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*[J]. Microbiology, 1996, 142 (2): 435–440.

- [5] Zhou DP, Ping WX. Study on isolation of taxol-producing fungus[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2001, 21(1): 18–20.
- [6] Zhao K, Ping W, Li Q, et al. *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(4): 1202–1207.
- [7] Deng BW, Liu KH, Chen WQ, et al. *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(1): 139–143.
- [8] 宣红玉, 刘家新, 王健刚, 等. 紫杉醇生物合成途径及调控研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 10(3): 96–102.
- [9] Liao ZH, Chen M, Gong YF, et al. Isoprenoid biosynthesis in plants: pathways, genes, regulation and metabolic engineering[J]. Journal of Biological Sciences, 2006, 6(1): 209–219.
- [10] 刘万宏, 姚波, 祝顺琴, 等. 紫杉醇前体生物合成途径及生物技术研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1327–1331.
- [11] Croteau R, Ketchum RE, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics[J]. Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 2006, 5(1): 75–97.
- [12] Fleming PE, Knaggs AR, He XG, et al. Biosynthesis of taxoids. Mode of attachment of the taxol side chain[J]. Journal of the American Chemical Society, 1994, 116(9): 4137–4138.
- [13] Mirjalili N, Linden JC. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models[J]. Biotechnology Progress, 1996, 12(1): 110–118.
- [14] Hezari M, Ketchum RE, Gibson DM, et al. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 337(2): 185–190.
- [15] Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, et al. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(8): 967–971.
- [16] Strobel GA, Stierle A, Van Kuijk FJGM. Factors influencing the *in vitro* production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia*[J]. Plant Science, 1992, 84(1): 65–74.
- [17] 李为, 余龙江, 朱敏, 等. 紫杉醇生物合成代谢调节方法的研究[J]. 华中理工大学学报, 2000, 28(7): 107–110.
- [18] 李家儒, 曹孟德, 刘曼西, 等. 前体物对红豆杉培养细胞中紫杉醇生物合成的影响(英文)[J]. 植物研究, 1999, 19(3): 356–360.
- [19] Zhang P, Zhou PP, Yu LJ. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2[J]. Current Microbiology, 2009, 59(3): 227–232.
- [20] 张鹏, 刘博, 周蓬蓬, 等. 一株产紫杉醇内生真菌 YN6 的分离与鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(10): 961–967.
- [21] Zhang P, Liu TT, Zhou PP, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2[J]. Current Microbiology, 2011, 62(4): 1315–1320.
- [22] Zhao CF, Yu LJ, Li LQ, et al. Simultaneous identification and determination of major taxoids from extracts of *Taxus chinensis* cell cultures[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences, 2007, 62(1/2): 1–10.
- [23] 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[J]. 菌物系统, 2002, 21(2): 246–251.
- [24] Xu F, Tao WY, Cheng L, et al. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31(1): 67–73.
- [25] 杨磊, 刘佳佳, 杨栋梁, 等. 红豆杉内生真菌中巴卡亭 III 产生菌的筛选及培养基的初步优化[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 692–695.
- [26] 张亚妮, 董兆麟. 一株产紫杉醇真菌发酵条件的研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2002, 32(3): 310–312.
- [27] Zhao K, Li ZG, Ge N, et al. Investigation of fermentation conditions and optimization of medium for taxol production from taxol-producing fungi[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(29): 6528–6535.
- [28] 陈建华, 刘佳佳, 臧巩固, 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.