

研究报告

高产紫杉烷内生菌的分离筛选及曼地亚红豆杉发酵炮制

郭幸¹, 王胜超¹, 张振凌^{*1,2,3,4,5}, 李雅静¹, 吴亚宁¹, 张帅¹, 院军¹

1 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

3 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

4 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室, 河南 郑州 450046

5 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

郭幸, 王胜超, 张振凌, 李雅静, 吴亚宁, 张帅, 院军. 高产紫杉烷内生菌的分离筛选及曼地亚红豆杉发酵炮制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2647-2662.

GUO Xing, WANG Shengchao, ZHANG Zhenling, LI Yajing, WU Yaning, ZHANG Shuai, YUAN Jun. Endophytic bacteria and fungi for high production of taxanes: screening and application in the fermentation of *Taxus media*[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2647-2662.

摘要: 【背景】曼地亚红豆杉内生菌种类丰富, 能产生多种抗肿瘤活性成分; 经过中药发酵炮制, 部分有效成分的含量得以提高。【目的】选用曼地亚红豆杉产紫杉烷的内生菌作为发酵菌种, 优化曼地亚红豆杉固体发酵的优势菌株及发酵时间, 创新红豆杉炮制方法。【方法】采用平板划线法对曼地亚红豆杉内生菌进行分离纯化, 通过 HPLC 及 UPLC-MS 测定紫杉烷类化合物, 以筛选高产紫杉烷成分的内生菌。筛选出的菌株用于发酵炮制曼地亚红豆杉, 采用 HPLC 法测定 7 种成分含量, 结合权重计算得分, 优选曼地亚红豆杉固体发酵炮制的优势菌株及时间, 并通过 16S rRNA 基因及全基因组测序对优势菌株进行分类鉴定。【结果】从曼地亚红豆杉中分离出 30 株真菌、35 株细菌, 筛选出 7 株内生菌产紫杉烷; 其中 6 株产巴卡亭III、4 株产三尖杉宁碱、2 株产紫杉醇, 6 株产巴卡亭III的内生菌产量分别为 LY2 (2.99 mg/L)、LY9 (4.90 mg/L)、LP22 (0.34 mg/L)、PJ20 (1.43 mg/L)、PJ25 (0.18 mg/L)、PJ30 (0.36 mg/L), 4 株产三尖杉宁碱的内生菌产量分别为: LY2 (4.92 mg/L)、LY9 (1.31 mg/L)、PP4 (0.66 mg/L)、PJ25 (1.31 mg/L), 2 株产紫杉醇的内生菌产量分别为: PP4 (0.70 mg/L)、PJ25 (0.34 mg/L)。HPLC 含量测定及权重计算得分显示, 菌株 LP22 为曼地亚红豆杉固体发酵炮制的优势菌株, 最佳发酵时间为 48 h, 优势菌株 LP22 经 16S rRNA 基因及全基因组学测序鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 基因组测序数据提交至

资助项目: 2023 年郑州市协同创新专项(2023XTCX041); 河南中医药大学 2022 年度研究生科研创新项目(2022KYCX032)
This work was supported by the Zhengzhou Collaborative Innovation Project in 2023 (2023XTCX041) and the Graduate Research Innovation Project of Henan University of Traditional Chinese Medicine (2022KYCX032).

*Corresponding author. E-mail: zhangz16758@163.com

Received: 2023-10-09; Accepted: 2023-12-07; Published online: 2024-01-30

NCBI 数据库获得登录号为 PRJNA1039587。【结论】曼地亚红豆杉部分内生菌能够产紫杉烷，将菌株 LP22 加入药粉固体发酵 48 h，有利于提高曼地亚红豆杉中的紫杉烷及黄酮含量，为后续曼地亚红豆杉发酵炮制研究奠定了基础。

关键词：曼地亚红豆杉；内生菌；紫杉醇；发酵

Endophytic bacteria and fungi for high production of taxanes: screening and application in the fermentation of *Taxus media*

GUO Xing¹, WANG Shengchao¹, ZHANG Zhenling^{*1,2,3,4,5}, LI Yajing¹, WU Yaning¹, ZHANG Shuai¹, YUAN Jun¹

1 School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China

2 Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan province & Education Ministry of China, Zhengzhou 450046, Henan, China

3 Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology of Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China

4 Key Laboratory of Chinese Medicine for Preparation of TCM Decoction Pieces of Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China

5 Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao of Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China

Abstract: [Background] *Taxus media* are abundant in endophytic bacteria and fungi, which can produce a range of anti-tumor active compounds. Fermentation and processing can increase the concentrations of active components in Chinese herbal medicines. [Objective] To select the optimal strain from the taxane-producing endophytic strains of *T. media* for solid fermentation and optimize the fermentation duration, so as to innovate the solid fermentation method of *T. media*. [Methods] The plate streaking method was used to isolate the endophytic strains of *T. media*. HPLC and UPLC-MS were employed to measure taxanes, and the strains with high yields of taxanes were selected. The selected strains were used for solid fermentation of *T. media*, and the concentrations of seven components were determined by HPLC. Weighted scores were computed to determine the optimal strain for fermentation, and the optimal duration of the solid fermentation process was determined. The optimal strain was identified by 16S rRNA gene and whole-genome sequencing. [Results] A total of 30 fungal strains and 35 bacterial strains were isolated from *T. media*, and 7 strains had the ability to produce taxanes. Among them, 6, 4, and 2 strains produced baccatin III, cephalomannine, and taxol, respectively. The 6 strains producing baccatin III were LY2 (2.99 mg/L), LY9 (4.90 mg/L), LP22 (0.34 mg/L), PJ20 (1.43 mg/L), PJ25 (0.18 mg/L), and PJ30 (0.36 mg/L). The 4 strains yielding cephalomannine were LY2 (4.92 mg/L), LY9 (1.31 mg/L), PP4 (0.66 mg/L), and PJ25 (1.31 mg/L). The 2 strains capable of producing taxol were PP4 (0.70 mg/L) and PJ25 (0.34 mg/L). The HPLC results and weighted scores confirmed that LP22 was the predominant strain for solid fermentation and 48 h was the optimum fermentation period. The strain LP22 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by

16S rRNA gene and whole genome sequencing. The full-length genome sequencing data was submitted to NCBI and received the accession number PRJNA1039587. **[Conclusion]** Certain endophytic strains of *T. media* have the ability to produce taxanes. The solid fermentation with strain LP22 for 48 h increased the content of taxanes and flavonoids in *T. media*. The findings provide a basis for further research on the fermentation and processing of *T. media*.

Keywords: *Taxus media*; endophytic fungi and bacteria; taxol; fermentation

曼地亚红豆杉(*Taxus media*)为红豆杉属灌木, 物质丰富, 含多种萜类、黄酮、酚酸、木脂素、挥发油等成分, 具有抗肿瘤、解热镇痛、调节免疫、抗炎等作用^[1-2]。发挥抗肿瘤作用的主要成分是其所含的四环二萜化合物紫杉醇, 对于卵巢癌、子宫癌、乳腺癌^[3]等多种癌症具有极佳的治疗效果。紫杉醇在曼地亚红豆杉中的含量极低, 目前的来源主要为从植物中直接提取^[1]。此外, 紫杉醇也可通过微生物转化、细胞培养、化学合成、植物细胞离体培养、基因工程^[4]等手段获得。微生物转化法因不受环境季节等限制且容易工业化生产而被各国学者青睐。

微生物转化的研究主要包括两大类: 一是从植物中筛选可产紫杉烷化合物的内生菌; 二是对菌种的液体发酵条件进行优化进而提高紫杉醇的产量。目前, 国内外学者已从 9 种红豆杉中筛选出 40 多个属的菌可产紫杉醇^[5-7]。例如, 赵赟鑫^[8]从野生红豆杉中筛选出一株绿僵菌可以产紫杉醇, 并对其液体发酵条件进行优化, 紫杉醇产量最终达到 987.3 $\mu\text{g/L}$ 。除紫杉醇外, 各学者也从红豆杉中筛选了产 10-脱乙酰基巴卡亭 III (10-deacetylbaaccatin III, 10-DAB)、巴卡亭 III 和三尖杉宁碱的菌株^[9-14]。此外, 也有学者通过对现有菌株进行遗传改造来提高产量^[15]。然而, 发酵时间长、环境要求无菌、产量低仍是目前紫杉醇商业化生产面临的最大问题^[16]。因此, 新的高产紫杉烷菌株的筛选对于缓解红豆杉资源短缺和促进紫杉醇商业化生产具有重要意义。

研究表明, 中药经过发酵炮制后可以提高有

效成分的含量。灵芝菌发酵灵芝后灵芝多糖含量升高^[17], 蛹虫草 B1528 发酵天麻后天麻素含量增加^[18], *Fusarium tricinctum* 发酵重楼后重楼皂苷含量升高^[19], *Bacillus cereus*、*Bacillus megaterium*、*Burton Pichia pastoris* 及 *Kluyveromyces* 这 4 种菌混合发酵百药煎后没食子酸的含量增加^[20]。因此, 本实验从曼地亚红豆杉中分离筛选产紫杉烷的内生菌, 采用筛选的菌株对曼地亚红豆杉进行发酵炮制处理, 使用高效液相色谱仪测定其中 7 种成分的含量, 利用 CRITIC 结合层次分析法计算不同样品得分, 优选曼地亚红豆杉固体发酵炮制的优势菌株及时间, 创新红豆杉炮制方法, 为高效节约使用红豆杉资源及开发新型红豆杉饮片提供参考。

1 材料与方法

1.1. 样品

曼地亚红豆杉枝条采自平顶山市致远生物科技有限公司种植基地; 红豆杉固体发酵原材料为基地 6-10 年生曼地亚红豆杉的枝叶; 面粉, 河北金沙河面业集团有限责任公司; 麦麸, 实验室留存。

1.2 主要试剂和仪器

紫杉醇 (taxol)、10-脱乙酰基巴卡亭 III (10-deacetylbaaccatin III, 10-DAB)、巴卡亭 III (baaccatin III, DAB)、三尖杉宁碱 (cephalomannine)、7-表紫杉醇 (7-epitaxol)、银杏双黄酮 (ginkgetin)、金松双黄酮 (sciadopitysin) 标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 分析级甲醇,

天津市富宇精细化工有限公司；色谱级甲醇，天津市四友精细化学品有限公司；色谱级 TEDIA 甲醇、乙腈，安徽天地高纯溶剂有限公司；质谱级甲醇，赛默飞世尔科技公司；磷酸，天津市科密欧化学试剂有限公司。

立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；霉菌培养箱、生化培养箱、立式恒温振荡培养箱、恒温恒湿培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；十万分之一天平、万分之一天平，北京赛多利斯天平有限公司；数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；超纯水机，成都超纯科技有限公司；双列六孔仪表恒温水浴锅，上海树立仪器仪表有限公司；高效液相色谱仪，Agilent 公司；液质联用仪，赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 培养基和染色液

PDA、PDB 培养基参照文献[10]配制。

LB 培养基(g/L)^[12]：蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，氯化钠 10.0，琼脂 20.0。LB 液体培养基不加琼脂，其余相同。

草酸铵结晶紫染液：A 液：结晶紫 2.5 g，95%乙醇 25 mL；B 液：草酸铵 1.0 g，蒸馏水 100 mL；混合静置 48 h 过滤后使用。

革兰氏碘液：碘 1.0 g，碘化钾 2.0 g，蒸馏水 300 mL。

2.5%沙黄(番红)染色液母液：沙黄(番红) 2.5 g，95%乙醇 100 mL，使用时取 20 mL 母液加 80 mL 蒸馏水混匀。

吕氏美蓝染液：A 液：美蓝(亚甲基蓝) 0.6 g，95%乙醇 30 mL；B 液：氢氧化钾 0.01 g，蒸馏水 100 mL，混匀即得。

乳酸-石炭酸棉兰染色液：苯酚 15.0 g，乳酸 15.0 g，甘油 30.0 mL，棉兰 0.075 g，蒸馏水 15 mL，将苯酚进行水浴加热至结晶溶解，然后依次加入乳酸、甘油和棉兰混匀即可，避光保存。

1.4 产紫杉烷化合物内生菌的筛选

1.4.1 内生菌的分离纯化

用流水冲洗曼地亚红豆杉三年生新鲜枝条及叶片 5 h，随后依次用 75%乙醇消毒 30 s、5%次氯酸钠溶液浸泡 10 min、无菌水清洗 5 次，将茎、叶、树皮切块，分别接种于 PDA 及 LB 培养基，用最后一次清洗的无菌水涂板作为对照，28 °C 恒温培养。每天观察，当材料表面有菌丝长出时，用无菌的竹签挑取，采用平板划线法接种至新的培养基中，28 °C 恒温培养，重复上述步骤直至获得纯菌落^[8]。

1.4.2 内生菌的形态学鉴定

无菌操作条件下使用竹签挑取少许纯化后的菌落于载玻片上，分别进行革兰氏染色、吕氏美蓝染色、乳酸-石炭酸棉兰染色，而后置于生物显微镜下观察结构，进行形态学鉴定。

1.4.3 内生菌发酵产物的培养

配制真菌(PDA)及细菌(LB)固体培养基，将菌种接种至培养基，放入生化培养箱中 28 °C 活化，真菌活化 3 d、细菌活化 2 d，使用无菌的打孔器取一定量的菌块，接种至装量为 100 mL/250 mL 三角瓶的液体培养基中振荡培养 10 d，温度设置 28 °C，0–2 d 时转速 100 r/min，3–10 d 时转速 160 r/min，全程暗培养^[9]。

1.4.4 内生菌发酵产物供试品溶液的制备

使用布氏漏斗减压过滤，将菌液与固体菌丝分离，菌丝使用乙酸乙酯超声(功率 500 W，频率 40 kHz，30 °C)提取 0.5 h 后萃取，重复 3 次；菌液用等体积乙酸乙酯以 200 r/min 转速振荡 1.5 h 后萃取，重复 3 次，再加等体积乙酸乙酯于 500 W 超声 1 h，合并上述有机相，双层滤纸滤过，65 °C 减压蒸干，用色谱级甲醇溶解，并定容至 5 mL，过 0.22 μm 有机滤膜即得液相色谱供试品溶液^[9]。

取液相供试品溶液分装至 1 mL/2 mL 离心管中，置 4 °C 真空浓缩 5 h，取 1 mL 质谱甲醇复溶，过 0.22 μm 有机滤膜，取 700 μL 样品至 1 mL/1.5 mL

离心管中, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 过 0.22 μm 有机滤膜, 即得质谱供试品溶液。

1.4.5 HPLC 法初步检测内生菌发酵液中紫杉烷成分

采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 色谱柱为 Waters Symmetry Shield RP18 Column 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0–15 min, 65%–45% A; 15.0–22.5 min, 45%–30% A; 22.5–32.5 min, 30%–10% A; 32.5–35.0 min, 10%–65% A), 进样量 10 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 232 nm。

1.4.6 UHPLC-Q-OrbitrapHRMS 法鉴定内生菌发酵液中紫杉烷成分

采用 Ultimate 3000-Orbitrap Exploris 240 液质联用仪, 色谱柱为 Hypersil GOLD 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0–0.5 min, 95% A; 0.5–8 min, 95%–75% A; 8–24 min, 75%–50% A; 24–38 min, 50%–5% A; 38–40 min, 5% A; 40–40.1 min, 5%–95% A; 40.1–43 min, 95% A); 流速 0.2 mL/min; 进样量 4 μL 。

质谱离子源: H-ESI 扫描; 模式: 正; 毛细管温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气气压: 25 psi; 辅助气压: 10 arb; 扫描范围: 0–1 200 m/z 。

1.5 固体发酵曼地亚红豆杉优势菌株的筛选及时间的优化

1.5.1 发酵样品的制备

将曼地亚红豆杉粉碎成细粉后与麦麸混匀, 熬煮稀面糊, 放置室温后加进混匀的药粉和麦麸中揉和均匀, 再加入一定量的菌悬液, 制成握之成团、触之即散的软材, 再制成大小厚薄均匀的方块, 取部分放入干燥箱 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 作为未发酵生品(0 h 样品, 下同), 其余置于 32 $^{\circ}\text{C}$ 、75%湿度的恒温恒湿培养箱中发酵, 间隔 12 h 取样, 至 96 h 发酵结束。所有样品烘干后打粉, 过 5 号筛, 备用^[21]。

1.5.2 供试品溶液的制备

精密称取“1.5.1”样品粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 500 W 超声 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液滤过, 再加入甲醇 50 mL 重复提取, 将超声后的甲醇连同药粉过滤, 合并 2 次滤液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干, 色谱级甲醇溶解后定容至 10 mL, 使用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 备用。

1.5.3 对照品溶液的制备

精密称定 10-脱乙酰基巴卡亭III、巴卡亭III、三尖杉宁碱、紫杉醇、7-表紫杉醇、银杏双黄酮、金松双黄酮适量, 分别加色谱级甲醇溶解, 制成单一对照品母液, 精密吸取各对照品母液适量, 加甲醇配成质量浓度分别为 606.70、280.00、250.00、163.30、66.70、380.00 和 440.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

1.5.4 方法学考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1.00、0.75、0.50、0.25、0.05 和 0.01 mL 定容至 1 mL, 进样量 10 μL , 按 1.4.4 的色谱条件测定, 以对照品浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线(表 1)。

按照 1.4.5 的方法测定发酵样品中 10-DAB、DAB、三尖杉宁碱、紫杉醇、7-表紫杉醇、银杏双黄酮、金松双黄酮的含量, 依照方法学考察的要求进行精密度实验、重复性实验、稳定性实验, 数据分析显示各成分的 relative standard deviation (RSD)值均小于 3.0%, 表明使用的高效液相色谱仪精密度良好、测定方法的重复性良好、制备的供试品溶液在 24 h 内稳定。加样回收实验数据表明, 7 种成分的平均加样回收率在 97.85%–104.96%, RSD 值为 0.14%–0.96%。以上方法学考察表明, 本研究建立的含量测定方法效果好、稳定性强、方法可靠。

表 1 七种成分的线性回归方程与线性范围

Table 1 Regression equations and linearity of seven components

Compound	Regression equation	<i>r</i>	Linear range (μg/mL)
10-脱乙酰基巴卡亭III 10-deacetylbaaccatin III (10-DAB)	$Y=16\ 704.82X+12.37$	0.999 9	6.07–606.70
巴卡亭III Baccatin III (DAB)	$Y=15\ 635.49X+3.69$	0.999 9	2.80–280.00
三尖杉宁碱 Cephalomannine	$Y=14\ 113.40X+0.49$	0.999 9	2.50–250.00
紫杉醇 Taxol	$Y=14\ 957.48X+1.60$	0.999 9	1.63–163.30
7-表紫杉醇 7-epitaxol	$Y=15\ 766.64X+1.31$	0.999 9	0.67–66.70
银杏双黄酮 Ginkgetin	$Y=29\ 788.22X+15.23$	0.999 9	3.80–380.00
金松双黄酮 Sciadopitysin	$Y=36\ 537.77X+40.12$	0.999 9	4.40–440.00

1.6 综合评分方法的选择

将 7 种不同菌株发酵红豆杉的液相数据导入 SPSS PRO, 使用 AHP (A)法、CRITIC (C)法及 AHP-CRITIC (B)法这 3 种权重分别计算 63 个时间点的综合得分, 对得分及权重进行相关系数分析, 综合评判, 选择合适的权重。

$$D=\sum Q_i \times W_i \text{ 发酵品} / W_i \text{ 生品}$$

式中: D 为综合得分; Q_i 为第 i 个成分的权重; W_i 为第 i 个成分的含量, 发酵品为 12–96 h 样品, 生品为 0 h 样品。

1.7 优势菌株的测序鉴定

将 1.6 评分最高的优势菌株送至中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC) 进行菌种鉴定。委托武汉天一华煜基因科技有限公司采用 16S rRNA 基因测序技术对优势菌株的种类进行初步鉴定, 委托武汉贝纳科技有限公司采用二代 Illumina 结合三代 NanoPore 进行全基因组测序, 将测序获得的全基因组序列提交至 NCBI 的 SRA 数据库。

1.8 数据分析

液相数据使用 SPSS PRO、SPSS 26.0 分析, 质谱数据使用 Xcalibur 3.0 软件分析, 数据表现为方差齐性使用 LSD 多重比较法, 数据方差不齐使用 Dunnett's T3 法, 使用 Origin 2018 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 产紫杉烷类化合物内生菌筛选结果

从样品中分离得到 65 株内生菌, 通过革兰氏染色、吕氏美蓝染色、乳酸-石炭酸棉兰染色, 在显微下观察其结构, 有 35 株内生细菌、30 株内生真菌。经 HPLC 检测, 其中 7 株菌产紫杉烷类成分, 具体液相数据见表 2。使用 Xcalibur 3.0 软件对质谱数据进行分析, 在正离子模式下, 化合物 B 的准分子离子峰为 m/z 587.248 8, 二级

表 2 曼地亚红豆杉内生菌发酵产物的 HPLC 分析
Table 2 HPLC results of endophytic bacterial and fungi fermentation products of *Taxus media*

Compound	Strain	Content (mg/L)
巴卡亭III Baccatin III (DAB)	LY2	2.99±0.17a
	LY9	4.90±0.61a
	LP22	0.34±0.04cd
	PJ20	1.43±0.02b
	PJ25	0.18±0.02d
三尖杉宁碱 Cephalomannine	PJ30	0.36±0.00c
	LY2	4.92±0.15a
	LY9	1.31±0.16b
	PP4	0.66±0.03c
紫杉醇 Taxol	PJ25	1.31±0.01b
	PP4	0.70±0.04a
	PJ25	0.34±0.00b

数值是平均值±标准差。不同小写字母表示存在显著性差异 ($P<0.05$)

Its content is the arithmetic mean±standard deviation. Different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$).

质谱分别为 m/z 345.170 2、 m/z 327.159 1、 m/z 133.064 7 和 m/z 105.033 4, 与文献[22]一致, 鉴定该化合物为巴卡亭III; 化合物 S 的准分子离子峰为 m/z 832.353 9, 碎片离子分别为 m/z 509.217 6、 m/z 264.122 9, 结合文献[23]鉴定其为三尖杉宁碱; 化合物 Z 的准分子离子峰为 m/z 854.338 3, 碎片离子分别为 m/z 509.214 1、 m/z 327.159 6 和 m/z 286.107 3, 与文献[24]对比鉴定为紫杉醇, 具体菌种发酵产物结果见表 3。

2.2 内生菌发酵红豆杉成分变化结果

因不同采收季节、不同年限及枝叶成分含量有差异, 且 5 种紫杉烷与 2 种黄酮含量相差较大, 所以使用 SPSS PRO 在线软件对数据初值化处理, 再分析比较不同菌种发酵红豆杉后 7 种成分含量的增减变化, 结果见表 4。

2.2.1 内生菌发酵红豆杉对五种紫杉烷成分的影响

10-DAB 具有抗肿瘤活性, 也是合成紫杉醇

和多烯紫杉醇的主要前体物。除菌株 PP4 发酵后含量下降外, 其余 6 种菌株发酵 12–72 h 均能提高 10-DAB 含量, 表现最佳的是菌株 LY9 的 48 h 发酵品, 与生品相比显著升高 54.63% (表 4, 图 1A)。DAB 作为一种与紫杉醇结构类似的紫杉烷化合物, 是半化学合成紫杉醇的重要原料, 7 种内生菌发酵后均能使 DAB 含量升高, 菌株 PP4 的 96 h 发酵品含量最高, 与生品相比显著升高 34.54% (表 4, 图 1B)。三尖杉宁碱同样具有抗肿瘤活性, 且与紫杉醇结构相似, 菌株 PJ30 的 84 h 发酵品含量升高最显著, 与生品相比升高 102.70% (表 4, 图 1C)。紫杉醇具有抗癌、抗肿瘤作用, 可以抑制肿瘤细胞增殖, 菌株 LP22 与菌株 PP4 发酵后, 紫杉醇含量均比生品含量高, 其余菌株发酵后, 不同发酵时间含量变化不同, 变化最大的为菌株 PJ25 的 48 h 发酵品, 与生品相比显著升高 29.30% (表 4, 图 1D)。7-表

表 3 曼地亚红豆杉内生菌发酵产物的 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析

Table 3 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS results of endophytic bacterial and fungi fermentation products of *Taxus media*

Strain	Compound abbreviation	tR/min	Molecular formula	Ion mode	m/z calculated value	m/z measured value	Error value/ 10^{-6}	Fragment ion
LY2	B ^[22]	17.05	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.248 8	0.34	345.170 2, 327.159 1, 133.064 7, 105.033 4
	S ^[23]	25.07	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	[M+H] ⁺	832.353 9	832.353 9	0.00	509.217 6, 264.122 9
LY9	B ^[22]	17.05	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.248 9	0.51	345.170 5, 327.159 1, 133.064 8, 105.033 4
	S ^[23]	24.94	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	[M+H] ⁺	832.353 9	832.353 9	0.00	509.219 1, 264.123 0
LP22	B ^[22]	16.98	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.249 0	0.68	345.170 4, 327.159 0, 133.064 7, 105.033 4
PP4	S ^[23]	24.98	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	[M+H] ⁺	832.353 9	832.353 7	−0.24	509.215 3, 264.123 0
	Z ^[24]	25.82	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	[M+H] ⁺	854.338 2	854.338 3	0.12	509.217 7, 327.159 3, 286.107 2
PJ20	B ^[22]	16.94	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.248 9	0.51	345.171 0, 327.159 4, 133.064 7, 105.033 4
PJ25	B ^[22]	16.93	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.249 0	0.68	327.160 1, 133.064 8, 105.033 3
	S ^[23]	24.97	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₄	[M+H] ⁺	832.353 9	832.353 9	0.00	509.217 8, 264.123 4
	Z ^[24]	25.85	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	[M+H] ⁺	854.338 2	854.338 3	0.12	509.214 1, 327.159 6, 286.107 3
PJ30	B ^[22]	17.02	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	587.248 6	587.248 8	0.34	345.170 2, 327.159 7, 133.064 7, 105.033 4

第 2 列名称下 B 为化合物巴卡亭III (baccatin III); S 为三尖杉宁碱(cephalomannine); Z 为紫杉醇(taxol)

In column 2, compound B is the baccatin III; S is cephalomannine and Z is taxol.

表 4 七种内生菌发酵曼地亚红豆杉后 7 种成分含量变化分析

Table 4 Content changes of seven constituents of *Taxus media* after fermentation by seven endophytic bacteria and fungi

Compound	Fermentation time (h)	LY2	LY9	LP22	PP4	P120	P125	P130
10-DAB (10-deacetyl/baccatin III)	0	100.00±0.53c	100.00±3.82d	100.00±0.38e	100.00±3.60a	100.00±0.53c	100.00±4.06bc	100.00±3.28b
	12	118.93±2.22b	136.46±3.05c	108.18±1.79d	85.15±0.41a	119.00±2.22b	104.81±2.23ab	106.29±0.31b
	24	123.49±0.61ab	147.37±1.80b	112.75±2.30bc	92.25±0.53a	123.61±0.61b	113.15±0.95a	118.22±0.78ab
	36	122.99±4.28ab	143.47±1.26c	114.86±2.07ab	96.22±0.21a	123.11±4.28b	115.06±0.57a	110.29±1.87b
	48	131.61±2.38a	154.63±1.07a	115.93±2.19ab	88.62±0.50a	131.44±2.27ab	103.18±0.75b	119.78±1.16a
	60	117.72±2.68b	153.10±1.52ab	117.43±0.81a	92.04±1.10a	117.85±2.68b	114.73±0.94a	115.67±1.50ab
	72	118.26±3.41b	149.09±0.53b	110.97±1.65cd	89.29±1.07a	118.36±3.42b	114.96±1.36a	118.34±1.34ab
DAB (Baccatin III)	84	120.45±1.16ab	144.65±0.81c	114.83±1.91ab	91.60±0.63a	132.86±1.14a	93.68±1.66c	122.29±2.06a
	96	115.47±1.74b	149.67±1.85ab	95.36±0.67f	85.09±0.54a	131.47±1.03a	101.48±0.93b	104.07±3.16b
	0	100.00±3.40c	100.00±1.69a	100.00±0.41f	100.00±0.26d	100.00±3.40c	100.00±2.74ef	100.00±1.69cd
	12	120.75±1.40ab	117.75±1.05a	107.17±0.88d	110.54±1.12c	120.82±1.40b	114.43±0.68b	97.37±1.94d
	24	118.74±2.24ab	119.17±4.44a	109.81±1.76d	106.90±0.38cd	118.85±2.24b	109.21±0.57c	108.06±1.06b
	36	118.74±0.98b	107.32±1.38a	121.27±2.02ab	109.81±1.11cd	118.86±0.98b	104.12±0.11d	114.84±1.79a
	48	117.33±0.27bc	113.73±1.77a	120.01±2.08b	104.86±1.06d	117.43±0.27b	133.06±1.07a	107.36±2.04b
三尖杉宁碱 Cephalomannine	60	116.44±1.12bc	108.79±1.63a	118.47±3.14b	120.82±2.26bc	116.57±1.12b	97.29±0.33f	102.70±1.59c
	72	125.24±1.19a	108.74±1.80a	112.97±1.27c	122.30±0.73b	125.34±1.19a	102.77±0.68de	108.21±1.11b
	84	94.45±0.41c	82.55±0.62b	123.84±0.67a	123.93±0.52b	116.87±1.11b	105.28±3.62d	117.21±1.18a
	96	93.06±0.63c	78.15±1.75b	103.79±0.98e	134.54±0.54a	118.44±1.96b	100.51±0.86ef	91.62±1.53e
	0	100.00±0.38d	100.00±0.53b	100.00±1.17d	100.00±3.35cd	100.00±0.38c	100.00±2.26c	100.00±5.32d
	12	97.09±0.58e	100.10±1.24b	111.00±0.13c	100.50±3.04cd	97.15±0.58d	102.62±0.45c	97.51±0.17d
	24	105.31±2.31bc	98.85±0.93bc	114.18±1.48c	104.20±0.43c	105.40±2.31c	104.20±0.66c	109.70±6.20cd
紫杉醇 Taxol	36	103.03±1.52cd	92.20±0.80e	119.04±3.22bc	103.15±1.86cd	103.13±1.52c	102.32±2.28c	123.19±0.38c
	48	103.39±0.64c	97.78±1.36c	125.16±1.34b	97.14±0.79d	103.48±0.64c	142.49±0.14a	103.39±1.24d
	60	114.46±0.31b	98.17±0.57bc	110.77±0.49c	111.75±0.68b	114.58±0.31b	116.80±0.33b	106.21±1.65d
	72	162.98±1.45a	96.18±0.59d	112.19±0.03c	117.52±1.99ab	163.11±1.45a	121.37±2.61b	146.93±1.22b
	84	88.97±0.83f	86.15±0.64f	168.35±1.65a	125.77±1.75a	96.72±1.86d	116.27±0.46b	202.70±0.88a
	96	89.43±0.96f	106.38±0.72a	101.56±3.35c	121.30±0.49a	106.08±1.40c	109.28±0.27b	166.39±4.04b
	0	100.00±0.26d	100.00±0.46d	100.00±1.11g	100.00±0.91e	100.00±0.26d	100.00±0.83d	100.00±0.62e
	12	113.97±0.90b	109.35±0.83b	100.25±0.32g	100.67±1.20de	114.04±0.90b	98.31±0.43e	99.22±0.89e

(待续)

(续表 4)

Compound	Fermentation time (h)	LY2	LY9	LP22	PP4	PJ20	PJ25	PJ30
7-表紫杉醇 7-epitaxol	24	111.08±1.24bc	114.23±0.96a	101.58±0.97g	106.49±1.08cd	111.18±1.24bc	101.43±0.03d	107.59±1.19d
	36	104.44±0.21c	99.62±0.73d	108.36±1.37e	105.47±0.30d	104.55±0.21c	101.53±0.21d	117.55±1.41b
	48	98.34±0.16c	103.81±0.85c	122.40±0.62b	107.46±0.15c	98.43±0.16c	129.30±0.59a	110.17±1.16c
	60	112.65±0.32b	98.86±0.65d	111.96±0.76d	122.89±0.52b	112.78±0.32b	111.43±0.60b	108.26±1.26d
	72	119.36±0.93a	95.26±0.66f	115.29±1.24c	126.10±2.16ab	119.45±0.93a	105.58±1.26c	111.91±1.49c
	84	110.95±1.59bc	97.36±0.45e	126.16±0.43a	125.99±1.18ab	102.41±1.57cd	104.50±0.77c	120.73±0.64a
	96	107.89±1.77bc	92.98±0.33g	104.25±1.35f	128.64±0.40a	106.07±1.08c	98.52±1.34e	96.97±1.03f
	0	100.00±4.07a	100.00±0.25a	100.00±0.09g	100.00±0.70h	100.00±4.07a	100.00±0.80e	100.00±0.59cd
	12	94.24±0.94a	100.63±0.59a	102.97±0.27f	125.76±0.78e	94.29±0.94a	89.12±0.19h	92.69±1.58d
	24	93.53±1.20a	97.57±0.44b	102.85±1.00f	102.28±0.49g	93.62±1.21a	104.28±0.32c	101.03±0.51c
银杏双黄酮 Ginkgetin	36	94.09±0.24a	91.35±0.59c	113.97±0.84b	100.93±0.07h	94.19±0.24a	102.34±0.38d	108.76±0.64ab
	48	83.07±1.13a	95.06±4.12bc	111.81±1.02c	111.43±0.49f	83.15±1.13a	117.13±0.79a	100.11±0.69cd
	60	92.03±0.23a	88.19±0.39d	111.41±0.85c	129.70±0.68d	92.13±0.23a	102.29±0.31d	102.89±0.20c
	72	97.08±1.02a	87.65±0.58d	107.31±1.02d	131.07±0.76c	97.16±1.02a	106.36±1.01b	106.4±0.61b
	84	77.23±0.6ab	77.14±0.75e	118.25±1.29a	142.27±0.36b	85.53±1.35a	97.67±0.86f	112.04±0.04a
	96	75.25±0.64b	73.64±0.24c	104.91±0.76e	144.17±0.27a	87.68±0.58a	96.07±0.21g	88.23±0.63d
	0	100.00±1.12a	100.00±2.1bc	100.00±0.67d	100.00±0.67d	100.00±1.12a	100.00±1.09bc	100.00±0.23c
	12	93.98±1.28b	92.50±0.54d	103.28±0.43c	98.32±0.25e	94.04±1.29c	97.21±0.31c	80.29±0.88e
	24	92.82±1.63bc	100.53±0.60b	117.24±1.96ab	90.27±0.08g	92.91±1.63c	97.53±0.10c	108.63±0.61b
	36	89.50±0.72bc	98.67±0.65bc	109.73±2.07bc	86.03±0.45h	89.59±0.72d	86.88±0.06d	99.24±0.46c
金松双黄酮 Sciadopitysin	48	96.98±0.47ab	95.31±0.62cd	124.66±1.24a	93.24±0.06f	97.06±0.47b	112.66±1.02a	101.11±0.45c
	60	84.40±0.23c	96.79±0.48c	111.27±0.01b	112.36±0.36b	84.49±0.23e	108.54±0.33a	102.64±1.06c
	72	86.26±1.09c	108.47±0.59a	109.74±1.46bc	121.47±0.63a	86.33±1.09e	103.95±0.64b	100.22±1.74c
	84	52.92±0.10d	59.08±0.10e	112.33±0.58b	102.87±0.42c	78.29±1.10f	98.63±0.85c	115.71±0.42a
	96	49.89±0.10e	51.80±0.10f	100.34±0.11d	92.93±0.18f	85.58±0.32e	78.43±0.18e	86.27±1.20d
	0	100.00±0.45b	100.00±2.00c	100.00±0.95e	100.00±3.78c	100.00±0.45b	100.00±2.32a	100.00±2.07c
	12	80.24±0.45c	65.07±0.2g	119.63±0.65c	85.28±2.25d	80.29±0.45c	74.75±0.61b	52.68±0.56f
	24	75.51±0.41d	94.30±0.96c	183.08±0.45a	55.04±1.07f	75.58±0.41d	70.8±0.14c	123.47±0.07a
	36	72.26±0.56e	114.53±0.32b	120.99±0.67c	45.22±0.99g	72.33±0.56e	44.07±0.07d	74.56±0.73e
	48	106.80±0.32a	73.14±0.67e	181.35±2.76a	69.68±0.11e	106.9±0.32a	117.17±4.08a	93.86±0.37c
数值是平均值±标准差。相同成分同列数据后不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)	60	48.06±0.87h	86.64±0.82d	130.2±2.54b	109.71±0.32b	48.11±0.87g	113.92±0.12a	99.68±0.17c
	72	36.88±1.00i	160.81±1.07a	130.8±0.40b	137.09±1.90a	36.91±1.00h	76.83±0.23b	79.10±0.49d
	84	67.72±0.20f	96.13±0.15c	117.87±2.81c	71.17±1.14e	37.47±1.98h	109.90±2.20a	111.30±0.74b
	96	53.77±0.14g	68.08±0.12f	108.96±2.12d	55.31±0.70f	58.35±0.02f	37.61±0.56e	72.57±0.23e

数值是平均值±标准差。相同成分同列数据后不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)

Its content is the arithmetic mean ± standard deviation. Different letters after the same component and the same column of data indicated significant differences (P<0.05).

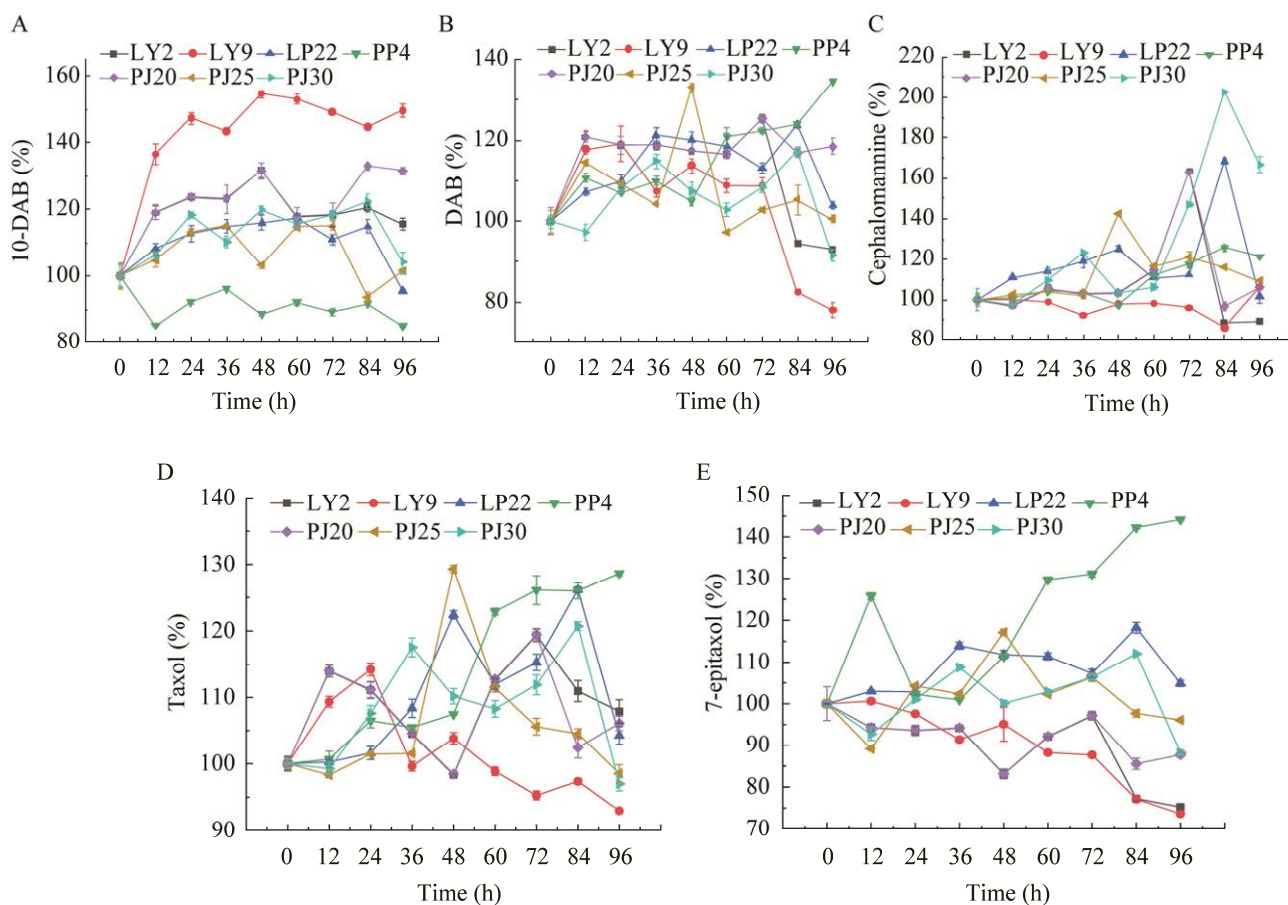


图 1 七种内生菌固体发酵曼地亚红豆杉后紫杉烷成分变化结果

Figure 1 Changes of taxanes in *Taxus media* after solid fermentation by seven endophytic bacteria and fungi.

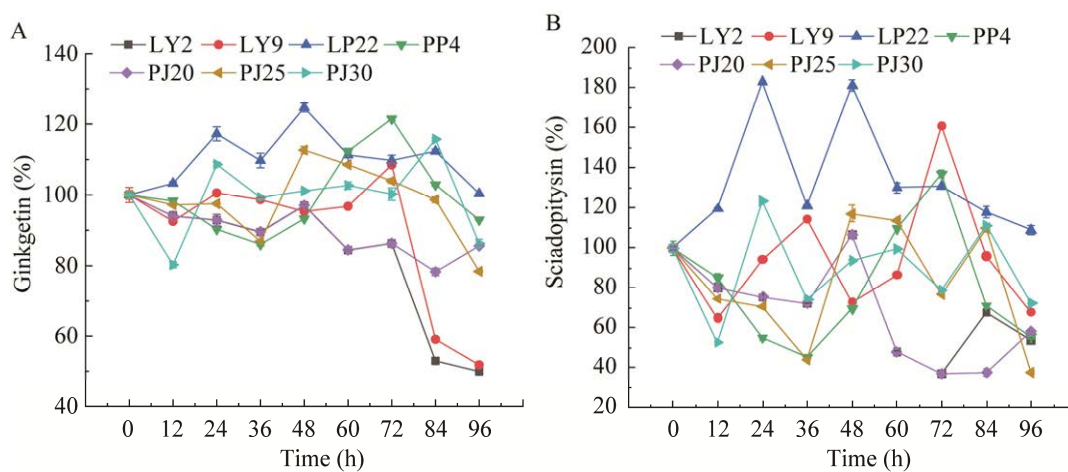


图 2 七种内生菌固体发酵曼地亚红豆杉后黄酮类成分变化结果

Figure 2 Changes of flavonoids in *Taxus media* after solid fermentation by seven endophytic bacteria and fungi.

紫杉醇可以通过差向异构化转化为紫杉醇,菌株 LP22 和菌株 PP4 发酵后含量均高于生品,其余 5 种菌株发酵后含量有增有减,含量明显升高的是菌株 PP4 的 96 h 发酵品,比生品显著增加 44.17% (表 4, 图 1E)。

2.2.2 内生菌发酵红豆杉对两种黄酮类成分的影响

黄酮类化合物同样具有抗肿瘤功效。此外,还具有抗菌、抗病毒、抗氧化、提高免疫力等药理作用。7 种菌株固体发酵曼地亚红豆杉后,不同发酵时间银杏双黄酮含量变化不同,菌株 LP22 发酵后银杏双黄酮含量均比生品高,最高为 48 h 发酵品,比生品显著升高 24.66% (表 4, 图 2A); 对金松双黄酮含量影响最大的同样为菌株 LP22, 所有发酵品含量均显著高于生品, 0–96 h 发酵过程中, 含量变化类似“M”, 24 h 为金松双黄酮含量最高点, 与 48 h 发酵品含量无显著差异, 与其余 7 个时间样品均存在显著差异(表 4, 图 2B)。

2.3 7 种成分的权重结果

3 种评分方法的权重见表 5, A 与 C 的得分、权重相关系数分别为 0.39 ($P<0.01$)、 -0.07 ($P=0.89>0.05$), A 与 B 的得分、权重相关系数分别为 0.99 ($P<0.01$)、0.98 ($P<0.01$), C 与 B 的得分、权重相关系数分别为 0.32 ($P<0.05$)、0.10 ($P=0.83>0.05$)。三种方法计算得分均具有相关性, A 与 C、B 与 C 的权重不相关, A 与 B 权重相关。A 评价方法较为主观, 综合评判, B 所体现的信息更全

面, 最终选择权重计算方法为 B。

2.4 固体发酵曼地亚红豆杉最佳菌株的筛选结果

为优选红豆杉发酵的最佳菌株, 以“2.3”的权重按“1.6”中公式计算 63 种不同样品得分, 图 3 为不同样品得分热图。第 1 列浅蓝色为曼地亚红豆杉生品得分(1.000 0), 后 8 列为 12–96 h 发酵品得分(0.941 5–1.245 7)。颜色越接近红色, 得分越高, 表明发酵后曼地亚红豆杉抗肿瘤成分含量总体高于生品; 颜色越接近深蓝色, 得分越低, 表示发酵后含量整体低于生品。由热图可知, 56 种发酵品中得分低于生品的有 11 种, 分别为菌株 LY2 和菌株 LY9 的 96 h 发酵品, 菌株 PP4 的 12、24、36 和 48 h 发酵品, 菌株 PJ25 的 12、36 和 96 h 发酵品, 以及 PJ30 菌株 12 h 和 96 h 发酵品, 其余 45 种发酵品得分均高于生品, 并且菌株 LP22 及菌株 PJ20 发酵后所有发酵时间样品得分均高于生品。得分最高的是菌株 LP22 的 48 h 发酵品, 综合评分为 1.245 7。综合以上数据, 曼地亚红豆杉发酵的优势菌株为菌株 LP22, 最佳发酵时间为 48 h。

2.5 优势菌株 LP22 的鉴定结果

将筛选的优势菌株 LP22 在 LB 培养基中培养 36 h, 为白色、不透明的大菌落, 边缘波浪形, 湿润, 易挑起(图 4A); 革兰氏染色后镜检结果为蓝紫色, 菌株形态为杆状、有芽孢, 不膨大, 中生(图 4B), 初步鉴定 LP22 为革兰氏阳性杆菌。

表 5 三种不同赋权方法中 7 种成分的权重

Table 5 Weights of seven components in three different weighting methods

Compound	A	B	C
10-脱乙酰基巴卡亭III 10-deacetylbaaccatin III (10-DAB) (%)	15.66	20.75	18.70
巴卡亭III Baccatin III (DAB) (%)	11.74	9.88	11.88
三尖杉宁碱 Cephalomannine (%)	5.87	5.97	14.36
紫杉醇 Taxol (%)	46.97	43.80	13.16
7-表紫杉醇 7-Epitaxol (%)	5.22	4.44	11.99
银杏双黄酮 Ginkgetin (%)	6.71	8.61	18.10
金松双黄酮 Sciadopitysin (%)	7.83	6.55	11.81

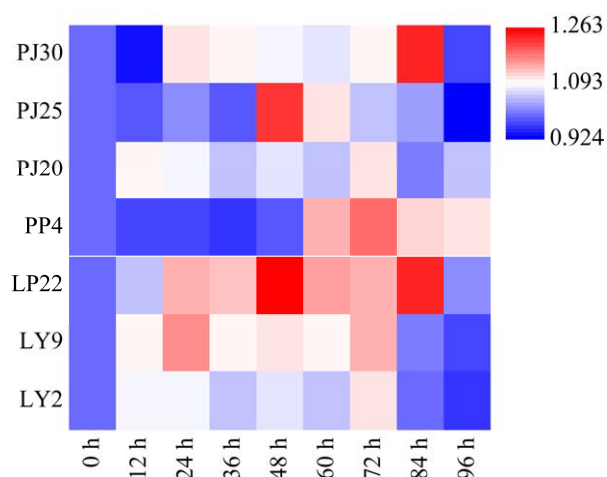


图 3 七种菌株发酵曼地亚红豆杉 63 种样品得分热图

Figure 3 Heat map of 63 samples of seven strains of fermented *Taxus media*.

16S rRNA 基因测序鉴定结果显示菌株 LP22 的基因序列与 *Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus siamensis*、*Bacillus velezensis* 的一致性最高, 达到 99.86% (表 6)。此外, 菌株 LP22 与 *Bacillus subtilis*、*Bacillus nakamurai* 的基因一致性也达到 99.58% (表 6)。16S rRNA 基因的测序结果不能鉴定优势菌株 LP22 的具体种类, 需要进行全基因组测序才能确定其准确种属。

将全基因组序列提交至 NCBI 的 SRA 数据库, 获得登录号为 PRJNA1039587。全基因组测序结果表明, 菌株 LP22 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)为 98.39%, 与其余菌株的 ANI 结果均小于 96% (表 7), 鉴定细菌为同一

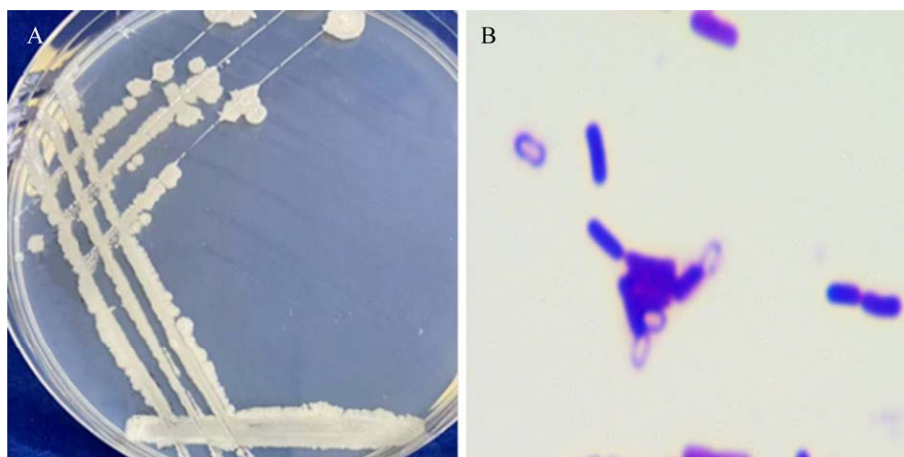


图 4 菌株 LP22 在 LB 培养基上菌落形态(A)及革兰氏染色结果(B) (1 000×)

Figure 4 Colony morphology of strain LP22 on LB medium (A) and Gram staining results (B) (1 000×).

表 6 菌株 LP22 的 16S rRNA 基因序列与芽孢杆菌属代表菌株的相似性结果

Table 6 Similarity results of the 16S rRNA gene sequence of strain LP22 with representative strains of the genus *Bacillus*

Bacterial species	Strain No.	Accession	Pairwise similarity (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	FN597644	99.86
<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	AJVF01000043	99.86
<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	AY603658	99.86
<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610	ABQL01000001	99.58
<i>Bacillus nakamurai</i>	NRRL B-41091	LSAZ01000028	99.58

表 7 菌株 LP22 的全基因组测序与芽孢杆菌属代表菌株的 ANI 对比结果

Table 7 Results of whole genome sequencing of strain LP22 in comparison with ANI of representative strains of the genus *Bacillus*

Bacterial species	Strain No.	Average nucleotide identity (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7	98.39
<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	93.94
<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	94.41
<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610	86.46
<i>Bacillus nakamurai</i>	NRRL B-41091	77.33

种类的标准是 ANI 值达到 95%以上^[25], 因此将菌株 LP22 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 将其命名为 M-SHDS-22。

3 讨论与结论

自 1993 年美国科学家 Stierle 等^[26]从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)中分离出一株产紫杉醇的内生真菌后, 国内外学者围绕产紫杉烷的内生菌展开大量研究。本研究从曼地亚红豆杉中筛选出 6 株内生菌产巴卡亭Ⅲ, 菌株 LY9 产量最高, 为 4.90 mg/L; 杨磊等^[10]从云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)中筛选出一株产巴卡亭Ⅲ的曲霉属内生真菌, 初始产量为 11.5 $\mu\text{g/L}$, 对液体发酵条件进行优化后, 巴卡亭Ⅲ产量达 34.6 $\mu\text{g/L}$; 席晓圆等^[27]从南方红豆杉(*Taxus chinensis var. mairei*)中筛选出一株产巴卡亭Ⅲ的黑孢霉^[27]属内生真菌, 其产量为 0.5 $\mu\text{g/g}$ 。对比分析, 菌株 LY9 产巴卡亭Ⅲ能力优于其他报道的菌株。同时, 本研究还筛选出 4 株内生菌产三尖杉宁碱, 产量最高的是菌株 LY2, 三尖杉宁碱产量为 4.92 mg/L; Li 等^[28]从东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)中筛选出一株黑曲霉属内生真菌产三尖杉宁碱, 产量为 259.26 $\mu\text{g/L}$ 。比较发现, 本研究筛选出的内生菌优于报道的菌株。此外, 本研究还从曼地亚红豆杉中筛选出 2 株产紫杉醇的内生菌, 产量最高为 0.70 mg/L。国内外产紫杉醇内生菌的研究较多, 已报道有曲霉属、芽孢杆菌属等 40 多个

属^[5]的内生菌产紫杉醇, 产量较高的有 El-Sayed 等^[29]研究的烟曲霉, 紫杉醇产量为 0.90 mg/L, 通过对培养条件进行优化, 紫杉醇的产量升高 4 倍, 高达 4.54 mg/L。本研究筛选的内生菌虽然产量低于报道的菌株, 但是菌株 PP4 是来自曼地亚红豆杉的内生真菌, 丰富了产紫杉醇内生菌的种群资源。由以上分析可知, 红豆杉内生菌有着巨大的发展潜力, 具有极大的开发利用价值。本研究采用平板划线法, 从曼地亚红豆杉中分离出 65 株内生菌, 并使用 HPLC 及 UPLC-MS 对内生菌的发酵液进行检测分析, 筛选出 7 株产紫杉烷的内生菌, 丰富了紫杉烷成分新的来源, 有助于节约使用红豆杉资源。

细胞实验证明, 本研究测定的 5 种紫杉烷成分均具有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[30-31]。黄酮类成分也具有抗肿瘤作用, 主要是通过抑制癌细胞生长来诱导凋亡, 逆转肿瘤多药耐药性, 抑制血管生成达到抗肿瘤效果。本研究发现, 7 株内生菌固体发酵曼地亚红豆杉, 对 5 种紫杉烷及 2 种黄酮类成分均能产生影响, 不同菌株不同发酵时间含量变化不同。本研究将筛选的 7 株产紫杉烷的内生菌加入曼地亚红豆杉中进行固体发酵炮制, 以菌株和时间自变量, 控制发酵温度、湿度等其他因素不变, 测定 5 种紫杉烷成分及 2 种含量较高的黄酮类成分, 对其赋予不同权重进行计算, 优选发酵的最佳菌株, 结果表明 LP22 为最佳发酵菌株, 最佳发酵时间为 48 h, 此时

10-DAB 含量升高 15.93%、DAB 含量升高 20.01%、三尖杉宁碱含量升高 25.16%、紫杉醇含量升高 22.40%、7-表紫杉醇含量升高 11.81%、银杏双黄酮含量升高 24.66%、金松双黄酮含量升高 81.35%。姚晓^[32]将灵芝菌加入南方红豆杉进行双向固体发酵,发酵 35 d 后 10-DAB 含量升高 206.70%、紫杉醇含量升高 62%, DAB 含量降低,这与本研究结果略有不同,本研究筛选的菌株 LP22 发酵曼地亚红豆杉 2 d 后 7 种成分含量均升高。中药发酵是一种传统的特色炮制技术,中药经发酵炮制后,可以提高有效成分的含量,增强药物的疗效。临床使用的红豆杉饮片多为净制、切制^[33]处理,本研究首次将内生菌加入曼地亚红豆杉中进行发酵炮制,菌株 LP22 固体发酵曼地亚红豆杉可以提高 5 种紫杉烷及 2 种黄酮类成分的含量,该结果为后期固体发酵条件的优化提供了数据支撑。对优势菌株 LP22 进行种属鉴定,16S rRNA 基因及全基因组测序结果显示其为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*),除董蒙蒙等^[12]从南方红豆杉中筛选出芽孢杆菌属细菌可产吲哚乙酸 (indol-yl-3-acetic acid, IAA) 及脂肽化合物,其他同属细菌鲜有报道。本研究筛选的解淀粉芽孢杆菌 LP22 丰富了红豆杉内生菌的种群资源,它既能产紫杉烷化合物,又能提高发酵后红豆杉中的有效成分含量,因此,下一步计划通过单因素试验对菌株 LP22 的固体发酵辅料、温度、湿度、时间等发酵条件进行优化,对曼地亚红豆杉发酵工艺进行研究,期望能应用于工业化大规模生产,对提高紫杉醇产量及节约曼地亚红豆杉资源提供参考。

REFERENCES

- [1] 吕旭辉. 曼地亚红豆杉和亮叶杨桐化学成分研究[D]. 南京: 南京中医药大学硕士学位论文, 2018.
LÜ XH. Study on chemical constituents of *Taxus media* and *Adinandra nitida*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Chinese Medicine, 2018 (in Chinese).
- [2] 王楠楠, 黄飞华. 红豆杉有效成分及其药理作用研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(8): 621-623.
WANG NN, HUANG FH. Research progress on effective components and pharmacological effects of *Taxus chinensis*[J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 53(8): 621-623 (in Chinese).
- [3] YANG YH, MAO JW, TAN XL. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(12): 890-897.
- [4] 王世伟, 马玺, 平文祥, 周东坡. 微生物发酵生产紫杉醇研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 561-565.
WANG SW, MA X, PING WX, ZHOU DP. Research advances on taxol production by microbe fermentation[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 561-565 (in Chinese).
- [5] 郑寒琪, 沈诗媚, 赵玉知, 陈营. 红豆杉中产紫杉醇及其类似物内生菌的分离与筛选[J]. 安徽农学通报, 2023, 29(5): 27-30, 53.
ZHENG HQ, SHEN SM, ZHAO YZ, CHEN Y. Isolation and screening of endophytes producing taxol and its analogues from *Taxus chinensis*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2023, 29(5): 27-30, 53 (in Chinese).
- [6] 赵凯, 宇璐, 金昱言, 马学玲, 刘丹, 王晓华, 王歆. 内生真菌紫杉醇生物合成的研究现状与展望[J]. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1038-1051.
ZHAO K, YU L, JIN YY, MA XL, LIU D, WANG XH, WANG X. Advances and prospects of taxol biosynthesis by endophytic fungi[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(8): 1038-1051 (in Chinese).
- [7] 赵凯, 平文祥, 周东坡. 内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望[J]. 微生物学报, 2008, 48(3): 403-407.
ZHAO K, PING WX, ZHOU DP. Recent advances and prospects on taxol production by endophytic fungus fermentation—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(3): 403-407 (in Chinese).
- [8] 赵赞鑫. 红豆杉内生真菌代谢产紫杉醇发酵工艺条件研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2010.
ZHAO YX. Optimization of the fermentation condition of taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2010 (in Chinese).
- [9] 陈毅坚, 张灼, 王艳, 苏源, 张睿. 云南红豆杉(*Taxus Yunnanensis*)内生真菌中产紫杉醇真菌的筛选[J]. 生物技术, 2003, 13(2): 10-11.
CHEN YJ, ZHANG Z, WANG Y, SU Y, ZHANG R. Screening endophytic fungus to produce taxol from

- Taxus Yunnanensis*[J]. Biotechnology, 2003, 13(2): 10-11 (in Chinese).
- [10] 杨磊, 刘佳佳, 杨栋梁, 朱婉华. 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.
- YANG L, LIU JJ, YANG DL, ZHU WH. Screening of endophytic fungi producing baccatin III from *Taxus Yunnanensis* and preliminary optimization of the culture media[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(5): 692-695 (in Chinese).
- [11] 张智慧, 郑文艺, 崔海超, 罗朝辉, 袁肖寒, 顾成波. 东北红豆杉一株产三尖杉宁碱内生真菌 *Xylaria primorskensis* Y32 的分离与鉴定[J]. 黑龙江医药, 2021, 34(3): 499-503.
- ZHANG ZH, ZHENG WY, CUI HC, LUO CH, YUAN XH, GU CB. Isolation and identification of cephalomannine-producing endophytic fungus *Xylaria primorskensis* Y32 isolated from *Taxus cuspidata*[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2021, 34(3): 499-503 (in Chinese).
- [12] 张永杰, 王建锋, 黄耀坚, 郑忠辉, 苏文金. 4 种裸子植物内生真菌抗肿瘤菌株的筛选[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(6): 804-809.
- ZHANG YJ, WANG JF, HUANG YJ, ZHENG ZH, SU WJ. Screening for antitumor activities of endophytic fungi isolated from four species of gymnomerm[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2002, 41(6): 804-809 (in Chinese).
- [13] 董蒙蒙, 袁博, 徐玲霞, 曹小迎, 蒋继宏. 南方红豆杉产 IAA 内生芽胞杆菌的分离、鉴定及产脂肽类化合物研究[J]. 亚热带植物科学, 2020, 49(6): 420-426.
- DONG MM, YUAN B, XU LX, CAO XY, JIANG JH. Isolation and identification of endophytic *Bacillus* sp. producing IAA from *Taxus wallichiana* var. *mairei* and its lipopeptide production[J]. Subtropical Plant Science, 2020, 49(6): 420-426 (in Chinese).
- [14] 彭小伟, 陈洪章. 南方红豆杉内生真菌产油及降解纤维素的研究[J]. 菌物学报, 2005, 24(3): 457-461.
- PENG XW, CHEN HZ. Lipid accumulation and cellulose decomposition of endophytic fungi isolated from *Taxus mairei*[J]. Mycosystema, 2005, 24(3): 457-461 (in Chinese).
- [15] 朱泽燕, 李军超, 王启明, 杨淑慎. 农杆菌介导 *Txpm* 基因转化烟曲霉 TMS-26 及其产紫杉醇效果评价[J]. 菌物学报, 2021, 40(8): 2087-2101.
- ZHU ZY, LI JC, WANG QM, YANG SS. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus* TMS-26 with a phenylalanine aminomutase gene and evaluation of the transformant potential for paclitaxel production[J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 2087-2101 (in Chinese).
- [16] 纪元, 毕建男, 严冰, 朱旭东. 产紫杉醇真菌的研究概况与紫杉醇工业生产的一个新思路[J]. 生物工程学报, 2006, 22(1): 1-6.
- JI Y, BI JN, YAN B, ZHU XD. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(1): 1-6 (in Chinese).
- [17] 何伟, 于淼, 彭超, 袁恺, 朱威宇, 丁子元, 江俊杰, 周卫强. 灵芝深层发酵工艺优化及中药双向发酵[J]. 生物化工, 2022, 8(3): 45-49, 62.
- HE W, YU M, PENG C, YUAN K, ZHU WY, DING ZY, JIANG JJ, ZHOU WQ. Optimization of deep fermentation technology of *Ganoderma lucidum* and bidirectional fermentation of traditional Chinese medicine[J]. Biological Chemical Engineering, 2022, 8(3): 45-49, 62 (in Chinese).
- [18] 向丽, 孟凡雄, 李松节, 梁建东, 田维毅. 蛹虫草固液发酵天麻的单因素研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(12): 2919-2922.
- XIANG L, MENG FX, LI SJ, LIANG JD, TIAN WY. Single factor study on solid-liquid fermentation of *Gastrodia elata* by *Cordyceps militaris*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(12): 2919-2922 (in Chinese).
- [19] 刘德柱, 陈艺扬, 张蒙, 田雨, 李早慧, 于丹, 都晓伟. 内生真菌生物转化提高滇重楼皂苷含量及抗肿瘤作用研究[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4486-4492.
- LIU DZ, CHEN YY, ZHANG M, TIAN Y, LI ZH, YU D, DU XW. Study on biotransformation of endophytic fungus to enhance saponins content and antitumor activity of *Paridis rhizoma*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(14): 4486-4492 (in Chinese).
- [20] 胡梦. 百药煎传统炮制过程中微生物的分离、鉴定及降解鞣质最佳菌种组合的筛选[D]. 上海: 中国医药工业研究总院硕士学位论文, 2019.
- HU M. Isolation, identification of microorganisms and screening of optimal strains combination for degradating tannins from Chinese gall leaven samples during its processing[D]. Shanghai: Master's Thesis of China State Institute of Pharmaceutical Industry, 2019 (in Chinese).
- [21] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范[S]. 成都: 四川科技出版社, 2015.
- Sichuan Food and Drug Administration. Sichuan traditional Chinese medicine slices processing standards[S]. Chengdu: Sichuan Publishing House of

- Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [22] 张才煜, 李婕, 高家敏, 张启明, 施亚琴. UPLC-MS/MS 法研究紫杉醇及其注射液的杂质谱[J]. 药学学报, 2016, 51(6): 965-971.
- ZHANG CY, LI J, GAO JM, ZHANG QM, SHI YQ. The impurity profiling of paclitaxel and its injection by UPLC-MS/MS[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2016, 51(6): 965-971 (in Chinese).
- [23] 陈冉, 黎星, 江丰, 王会霞, 范小龙, 吴婉琴. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定配制酒中 5 种紫杉烷[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 254-258.
- CHEN R, LI X, JIANG F, WANG HX, FAN XL, WU WQ. Simultaneous determination of 5 kinds of taxanes in blending liquor by using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 254-258 (in Chinese).
- [24] 张洁, 段继诚, 梁振, 张维冰, 张丽华, 霍玉书, 张玉奎. 东北红豆杉及其伤愈组织粗提物中紫杉醇的 HPLC-ESI-MS/MS 分析研究[J]. 药学学报, 2006, 41(9): 863-866.
- ZHANG J, DUAN JC, LIANG Z, ZHANG WB, ZHANG LH, HUO YS, ZHANG YK. Separation and identification of Taxol in the crude extracts of *Taxus cuspidata* and its callus culture with HPLC-ESI-MS/MS[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41(9): 863-866 (in Chinese).
- [25] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [26] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [27] 席晓圆, 赵盛英, 张鹏, 宋发军, 雷世康, 宁伟. 产紫杉醇内生真菌 N-15 的分离及鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1219-1222, 1283.
- XI XY, ZHAO SY, ZHANG P, SONG FJ, LEI SK, NING Y. Isolation and identification of taxol-producing endophytic fungus N-15[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(8): 1219-1222, 1283 (in Chinese).
- [28] LI D, FU DW, ZHANG Y, MA XL, GAO LG, WANG X, ZHOU DP, ZHAO K. Isolation, purification, and identification of taxol and related taxanes from taxol-producing fungus *Aspergillus niger* subsp. *taxi*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(8): 1379-1385.
- [29] EL-SAYED ESR, AHMED AS, HASSAN IA, ISMAIEL AA, KARAM EL-DIN AZA. Semi-continuous production of the anticancer drug taxol by *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima* immobilized in calcium alginate beads[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(6): 997-1008.
- [30] 苟晓莉, 金晶, 毕惠嫦, 钟国平, 李志良, 黄民. 红豆杉枝叶提取物及紫杉烷类成分对 4 种肿瘤细胞的毒性作用研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 591-592.
- GOU XL, JIN J, BI HC, ZHONG GP, LI ZL, HUANG M. Study on antitumor activity of extracts of branches and leaves of *Taxus Chinensis* and taxoids on four cell lines[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(4): 591-592 (in Chinese).
- [31] 卢轩, 孙业青, 程子芪, 冯宝民. 矮紫杉中紫杉烷类成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5210-5217.
- LU X, SUN YQ, CHENG ZQ, FENG BM. Taxanes in *Taxus cuspidata* cv. Nana and its anti-tumor activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(17): 5210-5217 (in Chinese).
- [32] 姚晓. 南方红豆杉枝叶紫杉烷类成分的生物转化研究[D]. 南京: 南京中医药大学硕士学位论文, 2020.
- YAO X. Biotransformation of taxoids from twigs and needles of *Taxus chinensis* var. *mairei*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Chinese Medicine, 2020 (in Chinese).
- [33] 刘佳佳. 肺癌患者服用含红豆杉汤剂不良反应的临床观察[D]. 广州: 广州中医药大学硕士学位论文, 2015.
- LIU JJ. Clinical observation on adverse reactions of lung cancer patients taking decoction containing *Taxus chinensis*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015 (in Chinese).