



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Endofyyttisten sienten käyttö paklitakselin tuotannossa**

Emma Hyytiäinen

Kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

13.5.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Emma Hyytiäinen

**Otsikko:** Endofyyttisten sienten käyttö paklitakselin

**Ohjaajat:** Juha-Pekka Salminen, Maarit Karonen

**Sivumäärä:** 18 sivua

**Päivämäärä:** 13.5.2026

---

Paklitakseli on yksi merkittävimmistä lääketieteessä käytettävistä luonnonyhdisteistä, ja sitä hyödynnetään muun muassa rinta-, keuhko- ja haimasyöpien hoidossa. Sen tuottaminen on kuitenkin edelleen ongelmallista. Perinteisesti paklitakselia on eristetty *Taxus*-sukuisten marjakuusten kaarnasta, jossa yhdisteen pitoisuus on vain 0,01–0,05 % sen kuivapainosta. Lisäksi kaarnan kuoriminen vahingoittaa puita. Tämän takia tarvitaan kasvukunnasta riippumaton menetelmä paklitakselin tuotannolle.

On kehitetty synteettisiä vaihtoehtoja paklitakselin tuotannolle, mutta totaalisynteesi ei sovi teolliseen tuotantoon monivaiheisen synteesisireitin ja kalliiden reagenssien takia. Semisynteesiä puolestaan käytetään paljon teollisessa tuotannossa, mutta se on edelleen riippuvainen kasvimateriaalista, kuten marjakuusten neulasista.

Vuonna 1993 löydettiin ensimmäinen endofyyttinen sieni, *Taxomyces andreanae*, jonka havaittiin tuottavan paklitakselia biosynteettisesti. Myöhemmin yli 200 endofyyttisen sienilajin on havaittu pystyvän samaan. Biosynteesisireitti on kuitenkin osin tuntematon, ja sen selvittäminen vaatii lisätutkimusta. Endofyyttisistä sienistä on kuitenkin löydetty kasvien biosynteesisireitille keskeisiä geenejä, kuten taksadieenisyntaasi (TS)-, 10-deasetyylibakkatiini(III)-10-*O*-asetyyylitransferaasi (DBAT)- ja bakkatiini(III): 3-amino-3-fenyylipropanoyylitransferaasi (BAPT)-entsyymejä koodaavat geenit.

Endofyyttisten sienten tuottaman paklitakselin määrä on edelleen pieni, eikä se siten sovellu teolliseen tuotantoon. Paklitakselin tuotantoa endofyyttisissä sienissä on kuitenkin pystytty tehostamaan fermentointiparametrejä optimoimalla sekä sopivilla kemiallisilla, biologisilla ja fysikaalisilla elisiittoreilla. Paklitakselin eristäminen endofyyttisistä sienistä vaatii hieman erilaisia lähestymistapoja riippuen käytetystä fermentointimenetelmästä. Paklitakselin tunnistamiseen ja määrittämiseen endofyyttisistä sieninäytteistä, voidaan käyttää useita analyyttisiä menetelmiä, kuten korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC), nestekromatografia-tandemmassaspektrometriaa (LC-MS/MS), ohutkerroskromatografiaa (TLC), ultraviolettispektroskopiaa (UV) ja <sup>1</sup>H-ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (<sup>1</sup>H-NMR).

Kaiken kaikkiaan endofyyttiset sienet tarjoavat uuden ja lupaavan kasvukunnasta riippumattoman menetelmän paklitakselin tuotantoon. Menetelmän kehittämistä rajoittavat kuitenkin edelleen biosynteesisireitin puutteellinen tuntemus, menetelmän skaalautuvuus bioreaktoreihin ja pienet saannot. Näihin haasteisiin voidaan kuitenkin löytää ratkaisut lisätutkimusten avulla.

---

**Avainsanat:** Biosynteesi, elisiittorit, endofyyttiset sienet, fermentaatio, HPLC, LC-MS/MS, NMR, paklitakseli, semisynteesi, *Taxus*, TLC, totaalisynteesi, UV

Bachelor's thesis

**Subject:** Chemistry

**Author:** Emma Hyytiäinen

**Title:** Paclitaxel production using endophytic fungi

**Supervisors:** Juha-Pekka Salminen, Maarit Karonen

**Number of pages:** 18 pages

**Date:** 13.5.2026

---

Paclitaxel is one of the most remarkable natural compounds used in the medical field with applications in the treatment of breast, lung and pancreatic cancers. Unfortunately, the production of paclitaxel is still challenging. Traditionally, paclitaxel has been extracted from the bark of yew trees of the *Taxus* species. The yield of paclitaxel from yew trees is only 0.01-0.05 % of its dry weight. Additionally, peeling the bark of the yew trees is harmful to the trees. For this reason, a method to produce paclitaxel outside of the plant domain is needed.

Synthetic methods of producing paclitaxel have been developed, but total synthesis isn't suitable for industrial production due to the complexity of the synthetic pathway and the cost of the reagents. Semisynthesis, however, is used in industrial production, but it's still dependent on plant-material like the leaves of yew trees.

In 1993, the first paclitaxel producing endophytic fungus, *Taxomyces andreanae*, was found. Since then, over 200 species of paclitaxel producing endophytic fungi have been reported. The paclitaxel biosynthetic pathway in endophytic fungi is still partly unknown and needs additional research. Some plant biosynthetic genes required for paclitaxel production, like taxadiene synthase (TS), 10-deacetylbaccatin(III)-10-*O*-acetyltransferase (DBAT) and baccatin(III): 3-amino-3-phenylpropanoyltransferase (BAPT) genes, have been found in endophytic fungi.

The yield of paclitaxel produced by endophytic fungi is still quite low, making endophytic fungi not usable in the industrial scale production of paclitaxel. There are ways to enhance paclitaxel production, such as optimization of fermentation parameters and using different chemical, biological and physical elicitors. The extraction of paclitaxel varies according to the fermentation method used. Identifying and quantifying paclitaxel in samples of endophytic fungi can be done with methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet spectroscopy (UV) and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-NMR).

Overall, endophytic fungi offer a new and promising method of producing paclitaxel outside of the plant domain. The development of this method is still limited by the incomplete understanding of the biosynthetic pathway, challenges in scaling the process to bioreactors and low yields. These challenges can, however, be overcome through additional research.

---

**Key words:** biosynthesis, elicitors, endophytic fungi, fermentation, HPLC, LC-MS/MS, NMR, paclitaxel, semisynthesis, *Taxus*, TLC, total synthesis, UV

# Sisällys

<b>Lyhenteet</b> .....	
<b>1. Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Paklitaksin synteettinen ja biosynteettinen valmistaminen</b> .....	<b>2</b>
2.1. Totaalisynteesi .....	2
2.2. Semisynteesi .....	3
2.3. Biosynteesi.....	6
<b>3. Paklitaksin tuottaminen endofyytisissä sienissä</b> .....	<b>11</b>
3.1. Fermentointi .....	11
3.2. Elisiittorit .....	13
3.3. Eristäminen ja analysointi .....	15
<b>4. Johtopäätökset</b> .....	<b>17</b>
<b>Viitteet</b> .....	<b>18</b>

## Lyhenteet

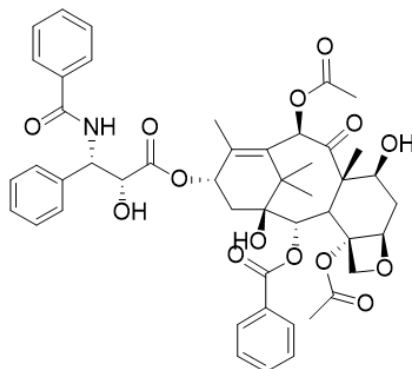
Ac <sub>2</sub> O	Etikkahappoanhydridi
BAPT	Bakkatiini(III): 3-amino-3-fenyylipropanoyylitransferaasi (engl. baccatin(III): 3-amino-3-phenylpropanoyltransferase)
BnONH <sub>2</sub> HCl	<i>O</i> -bentsyylihydroksyyliamiinihydrokloridi
BzCl	Bentsoyylikloridi
CoA	Koentsyymi-A
10-DAB	10-deaseetylibakkatiini (engl. 10-deacetyl baccatin)
DBAT	10-deaseetylibakkatiini(III)-10- <i>O</i> -aseetyylitransferaasi (engl. 10-deacetyl baccatin(III)-10- <i>O</i> -acetyltransferase)
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
DEAD	Dietyyliatodikarboksylaatti
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini
DMAPP	Dimetyyliallylidifosfaatti (engl. dimethylallyl diphosphate)
Et <sub>3</sub> N	Trietyyliamiini
EtOH	Etanoli
GGPP	Geranyyligeranylidifosfaatti (engl. geranylgeranyl diphosphate)
GGPPS	Geranyyligeranylidifosfaattisyntaasi (engl. geranylgeranyl diphosphate synthase)
HCl	Suolahappo
HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	Ammoniumformiaatti
HGT	Horisontaalinen geenisiirto (engl. horizontal gene transfer)
<sup>1</sup> H-NMR	<sup>1</sup> H-ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (engl. <sup>1</sup> H nuclear magnetic resonance spectroscopy)
HOAc	Etikkahappo
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (engl. high-performance liquid chromatography)
IDI	Isopentenyylidifosfaatti-isomeraasi (engl. isopentenyl diphosphate isomerase)
IPP	Isopentenyylidifosfaatti, (engl. isopentenyl diphosphate)

LC-MS/MS	Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (engl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
MeCN	Asetonitriili
MeOH	Metanoli
MEP	2-C-metyyli-D-erytrioli 4-fosfaattipolku (engl. methylerythrol phosphate pathway)
MOM	Metoksimetyyli
MVP	Mevalonaattipolku (engl. mevalonate pathway)
PAM	Fenyyialaniiniaminomutaasin (engl. phenylalanine aminomutase)
PCL	$\beta$ -fenyyialaniini-CoA-ligaasi (engl. $\beta$ -phenylalanine-CoA ligase)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain-reaction)
PDA	Peruna-dekstroosi-agar (engl. potato dextrose agar)
PDB	Peruna-dekstroosi-kasvatusliuos (engl. potato dextrose broth)
PPh <sub>3</sub>	Trifenyylifosfiini
Py	Pyridiini
TAT	Taksadienoli- <i>O</i> -asetyyli transferaasi (engl. taxadienol- <i>O</i> -acetyl transferase)
TBT	Taksaani-2 $\alpha$ - <i>O</i> -bentsoyylit transferaasi (engl. taxane-2 $\alpha$ - <i>O</i> -benzoyl transferase)
TES	Trietyylisilyyli
TLC	Ohutkerroskromatografia (engl. thin-layer chromatography)
TsN <sub>3</sub>	<i>p</i> -tolueenisulfonyyliatsidi
T2' $\alpha$ OH	Taksaani-2' $\alpha$ -hydroksylaasi (engl. taxane-2' $\alpha$ -hydroxylase)
T5 $\alpha$ OH	Taksadieeni-5 $\alpha$ -hydroksylaasi (engl. taxadiene-5 $\alpha$ -hydroxylase)
T10 $\beta$ OH	Taksaani-10 $\beta$ -hydroksylaasi (engl. taxane-10 $\beta$ -hydroxylase)
TS	Taksadieenisyntaasi (engl. taxadiene synthase)
UV	Ultraviolettispektroskopia (engl. ultraviolet spectroscopy)

Tutkielmassa on käytetty Microsoft Copilot-tekoälyohjelmaa englanninkielisten lähteiden suomentamisessa ja tulkitsemisessä.

# 1. Johdanto

Paklitakseli (Kuva 1), kaupalliselta nimeltään taksoli, on *Taxus*-suvun kasveista, eli marjakuusista, löytyvä diterpeeni. Sitä käytetään laaja-alaisesti erilaisten syöpien, kuten rinta-, keuhko- ja haimasyöpien kemoterapiahoitoissa, koska sillä on tehokas syövän vastainen aktiivisuus (Wani et al., 1971; Yu et al., 2025). Paklitakselin kysyntä on jatkuvassa kasvussa, joten tehokkaan, toimivan ja halvan tuotantomenetelmän löytäminen sille on tärkeää.



**Kuva 1.** Paklitakselin kemiallinen rakenne

Perinteisesti paklitakselia on eristetty *Taxus*-suvun puiden, kuten *Taxus brevifolia* kaarnasta. *T. brevifolia* on eniten paklitakselia tuottava *Taxus*-sukuinen kasvi, mutta se tuottaa silti paklitakselia vain noin 0,01–0,05 % painostaan, eli kaarnassa on paklitakselia erittäin vähän (Wheeler et al., 1992). *Taxus*-puiden kaarnan kerääminen on lisäksi johtanut joidenkin suvun lajien, kuten *Taxus wallichianan* populaation vähenemiseen (Uniyal, 2013). Paklitakselin eristämistä puiden kaarnasta ei siten voida jatkaa kestävästi. Tämän perinteisen menetelmän tilalle onkin kehitetty erilaisia bio- ja (semi)synteettisiä menetelmiä.

Vaikka paklitakselin totaalisynteesissä on onnistuttu, se ei ole vielä kaupallisesti kannattavaa, sillä monet totaalisynteesissä onnistuneet tutkimukset ovat akateemisia tutkimuksia, joiden saannot ovat olleet vain milligrammojen luokkaa (Min et al., 2023). Lisäksi totaalisynteesi on liian kallista kaupalliseen mittakaavaan sovellettavaksi (Nikolic et al., 2011).

Sen sijaan semisynteettisten prekursorien lähteiden lisääntyminen ja yleisesti semisynteettisen teknologian kehityksen myötä on kehitetty semisynteettisiä valmistusmenetelmiä myös paklitakselille (Baloglu & Kingston, 1999; Yang et al., 2020). Semisynteesiä käytetäänkin paljon paklitakselin teollisessa tuotannossa (Yang et al., 2020). Paklitakselin rakenne on kuitenkin monimutkainen, joten myös semisynteettiset valmistusmenetelmät vaativat useita välivaiheita.

Myös mikrobien, kuten endofyyttisten sienten, tuottama paklitakseli on lupaava menetelmä paklitakselin kaupallisen tuotannon edistämiseksi. Endofyyttiset sienet ovat kasvin kudoksen pinnalla tai sisällä eläviä sieniä, joista ei ole isäntäkasville haittaa. Ensimmäisen paklitakselia tuottavan

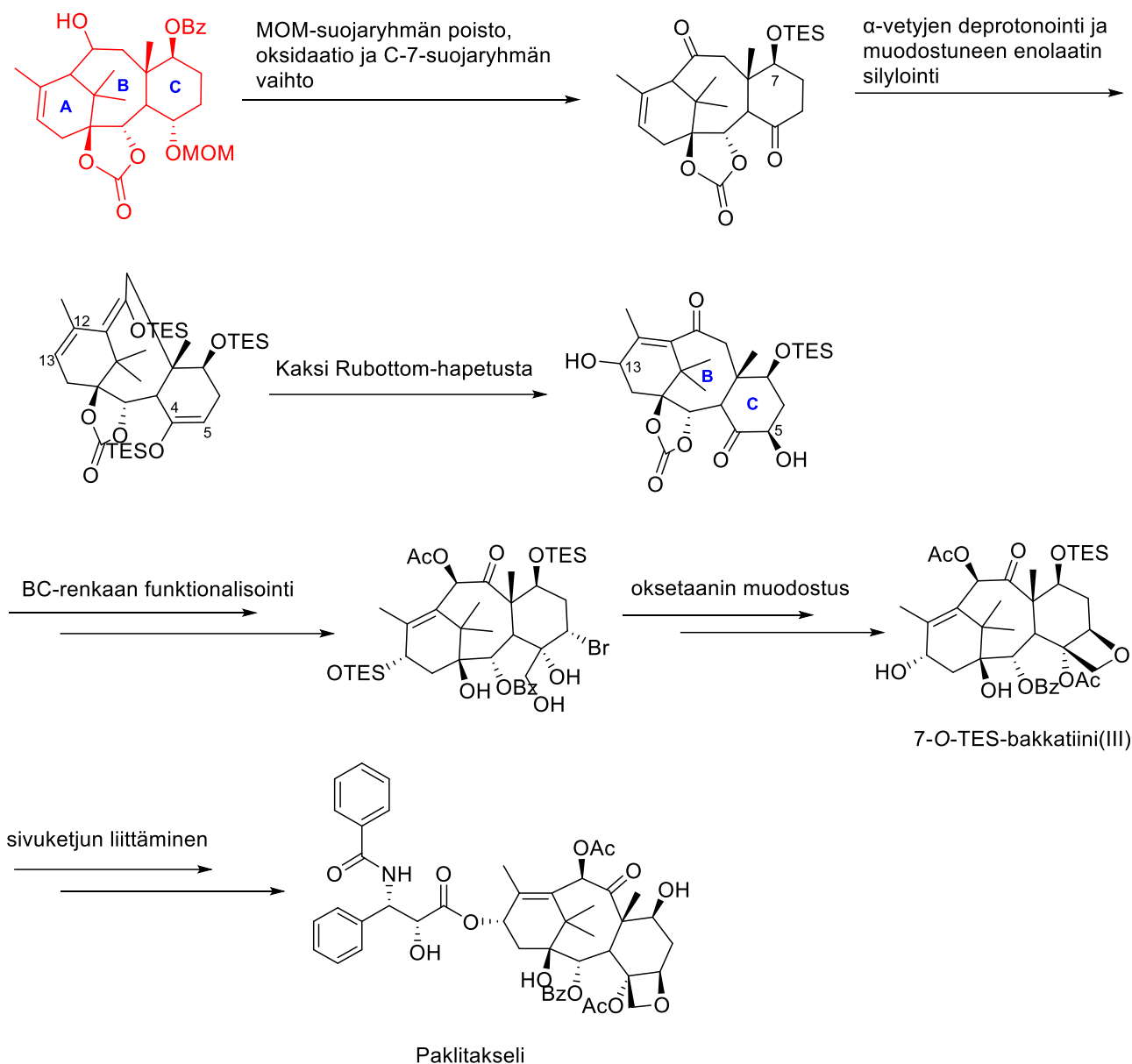
endofyyttisen sienilajin *Taxomyces andreanae* raportoitiin löytyneen vuonna 1993 (Stierle et al., 1993). Vuoteen 2001 mennessä noin 200 endofyyttisten sienten lajin oli raportoitu pystyvän tuottamaan paklitakselia (Jennewein & Croteau, 2001). Paklitakselin biosynteesi endofyyttisissä sienissä on eräs kiinnostavimmista ja lupaavimmista tulevaisuuden näkymistä paklitakselin tuotantoon. Tässä tutkielmassa selvitetään, miten paklitakselin biosynteesi tapahtuu kasveissa ja endofyyttisissä sienissä. Lisäksi selvitetään, miten niiden biosynteesireitit ja biosynteesiin osallistuvat entsyymit eroavat toisistaan. Lisäksi pohditaan, millaisia menetelmiä on kehitetty paklitakselin tuotantoon endofyyttisissä sienissä, ja miten menetelmiä voitaisiin hyödyntää lääketieteellisyydessä. Lisäksi tarkastellaan näiden menetelmien skaalautuvuutta teollisuuteen.

## 2. Paklitakselin synteettinen ja biosynteettinen valmistaminen

Paklitakselin valmistukseen on useita eri tapoja, joista seuraavissa alaluvuissa käsitellään totaalisynteesiä, semisynteesiä sekä biosynteesiä. Synteettiset menetelmät ovat mahdollistaneet paklitakselin rakenteen muodostamisen yksinkertaisista lähtöaineista tai luonnosta saatavista prekursoreista (Iiyama et al., 2022; Mandai et al., 2000). Biosynteesi puolestaan mahdollistaa paklitakselin tuottamisen hyödyntämällä kasvien ja sienten omia aineenvaihduntareittejä (Yang et al., 2014; Wang et al., 2021). Menetelmien tarkastelu rinnakkain tarjoaa hyvän kokonaiskuvan paklitakselin tuotannon mahdollisuuksista ja rajoitteista sekä menetelmien soveltuvuudesta teolliseen tuotantoon.

### 2.1. Totaalisynteesi

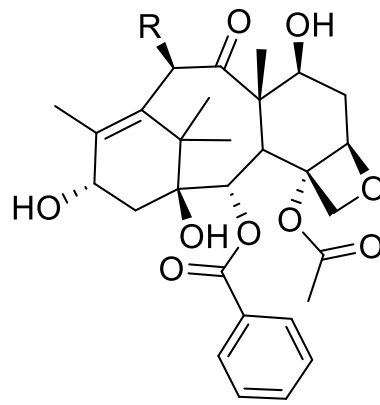
Totaalisynteesi on houkutteleva menetelmä paklitakselin tuotannolle, koska silloin paklitakseli saataisiin valmistettua synteettisesti alusta loppuun ilman marjakuusten tai niiden osien hyödyntämistä (Holton et al., 1994; Iiyama et al., 2022). Paklitakselin totaalisynteesi saavutettiin ensimmäisen kerran vuonna 1994 kahden eri tutkimusryhmän toimesta, ja eri synteesireittejä käyttäen (Holton et al., 1994; Nicolaou et al., 1994). Myös uudempia synteesireittejä on löytynyt, mutta niiden saannot ovat aikaisempien reittien tapaan olleet erittäin pieniä (Iiyama et al., 2022). Lisäksi reaktiot vaativat monia välivaiheita, sekä monenlaisia reagensseja, mikä lisää menetelmän kustannuksia (Iiyama et al., 2022). Iiyaman (2022) tutkimusryhmä muodosti paklitakselin ABC-rengasrakenteen (Kuva 2) allyylibentsoaatista, jossa on aldehydyryhmä, SmI<sub>2</sub>-välitteisellä pelkistävällä syklistaatiolla. He lähtivät seuraavaksi muokkaamaan muodostunutta rengasrakennetta suojaryhmiä poistolla ja muokkauksella, hapettamalla, BC-rengasta funktionalisoimalla, muodostamalla oksetaanirenkaan, sekä lisäämällä sivuketjun muodostaen lopulta paklitakselia (Kuva 2).



**Kuva 2.** Iiyaman (2022) käyttämä paklitakselin synteesireitti. Paklitakselin ABC-rengasrakenne esitetty punaisella. Kaksi reaktionuolta kuvaa useita synteesivälivaiheita vaativia rakenteen muokkauksia. MOM = metoksimetyyli, TES = trietyylisilyyli.

## 2.2. Semisynteesi

Totaalisynteestistä eroten, semisynteesi on yksi tämän hetken käytetyimmistä menetelmistä paklitakselin kaupalliseen valmistamiseen (Yang et al., 2020; Zhang et al., 2023). Paklitakselin semisynteesi perustuu luonnosta löytyvien paklitakselin prekursorien, kuten 10-deasetyylibakkatiinin (10-DAB) ja bakkatiini(III):n, hyödyntämiseen (Kuva 3; Mandai et al., 2000). Esimerkiksi euroopanmarjakuusen (*Taxus baccata*) neulasista pystytään eristämään 10-DAB:tä hyvällä saantoprosentilla, minkä lisäksi marjakuusten neulasit ovat nopeasti uusiutuvia (Denis et al., 1988).



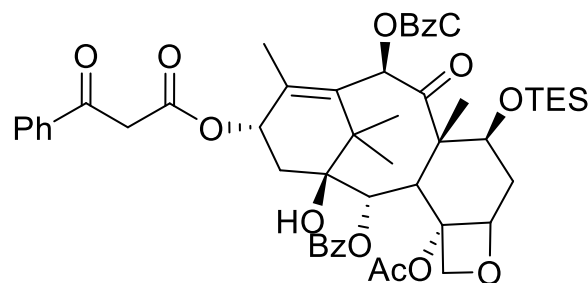
**R**

Bakkatiini III: OAc

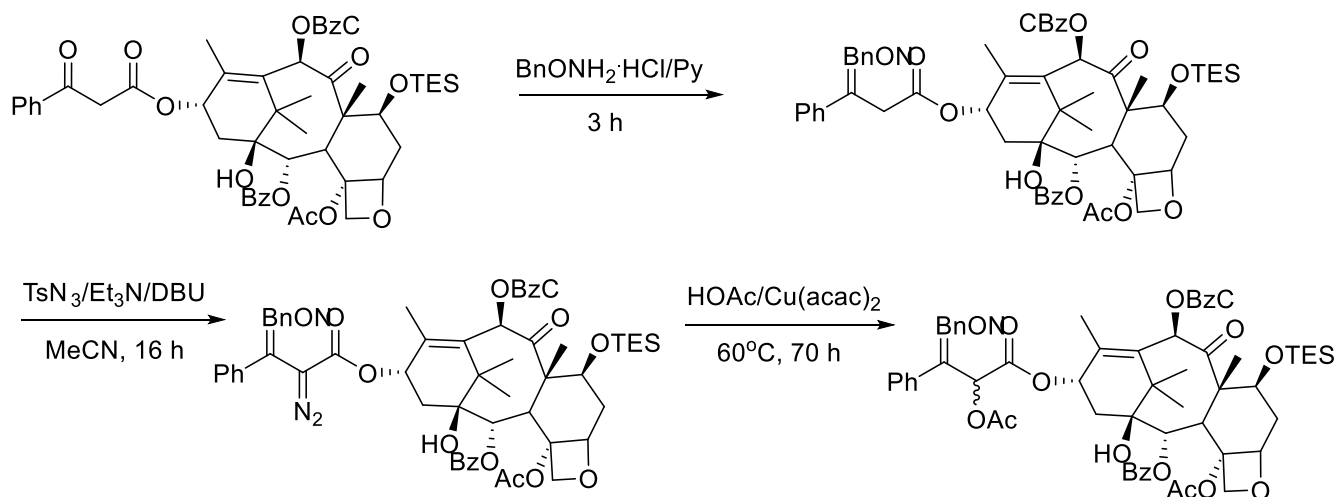
10-DAB: OH

**Kuva 3.** Bakkatiini III:n ja 10-DAB:n rakennekaavat.

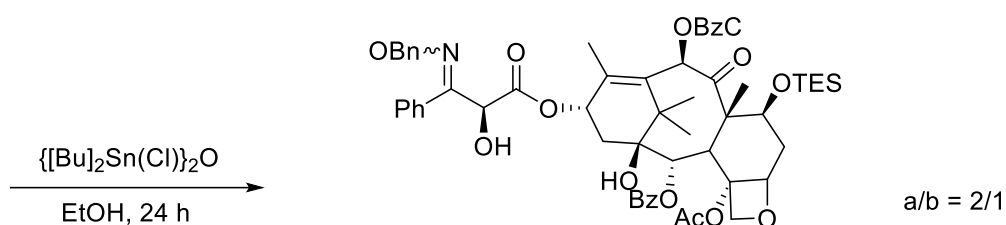
Koska 10-DAB:n saanto marjakuusista on lähes kymmenenkertainen paklitakselin saantoon verrattuna, sen käyttäminen semisynteetissä on houkutteleva vaihtoehto paklitakselin suoraan eristämiseen verrattuna (Baloglu & Kingston, 1999). Tämän lähestymistavan pohjalta Baloglu ja Kingston (1999) kehittivät uudenlaisen semisynteettisen lähestymistavan paklitakselin tuotannolle, missä suojattu C-13-sivuketju voidaan liittää 10-DAB:stä muokattuun ja suojattuun bakkatiini(III):een. Mandai tutkimusryhmineen (2000) puolestaan kehittivät erilaisen semisynteetisireitin paklitakselille. Synteetisireitti alkaa etyylibentsoyyliaasettiin ja suojatun 10-DAB:n transesteröinnillä, minkä tuloksena muodostuu synteesin lähtöaineena käytetty 10-DAB-johdannainen (Kuva 4; Mandai et al., 2000). Tämä semisynteetisireitti on kuvattu kaavioissa 1 ja 2.



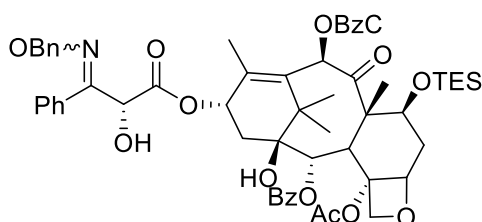
**Kuva 4.** 10-DAB-johdannainen (Mandai et al., 2000).



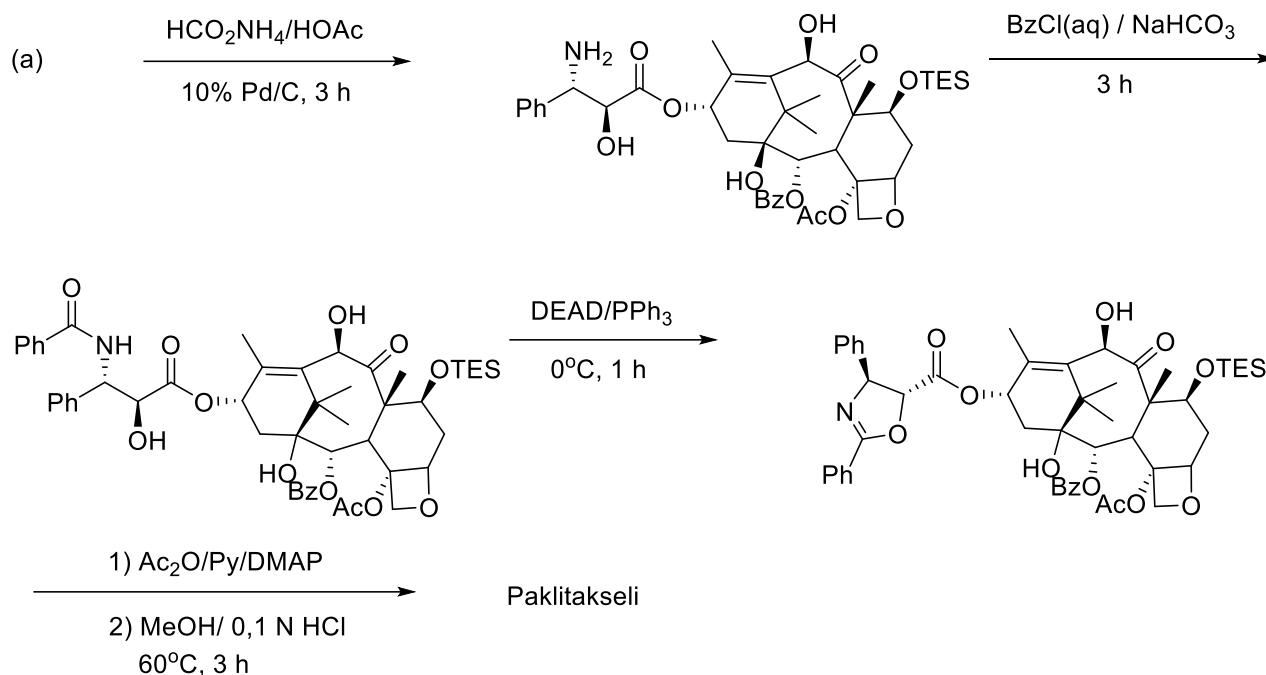
a)



b)



**Kaavio 1.** Mandain (2000) semisynteesi 10-DAB-johdannaisesta. Reagenssit ja katalyytit:  $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$  = *O*-bentsyylihydroksyyliamiinihydrokloridi;  $\text{Py}$  = pyridiini;  $\text{TsN}_3$  = *p*-tolueenisulfonyyliatsidi;  $\text{Et}_3\text{N}$  = trietyyliamiini;  $\text{DBU}$  = 1,8-diatsabisykloundek-7-eeni;  $\text{MeCN}$  = asetonitriili;  $\text{HOAc}$  = etaanihappo,  $\text{Cu}(\text{acac})_2$  = kupari(II)asetyyliasetonaatti,  $\{[\text{Bu}]_2\text{Sn}(\text{Cl})\}_2\text{O}$  = 1,3-dikloori-1,1,3,3-tetrabutyylidistannoksaani,  $\text{EtOH}$  = etanoli. Tuotteita a ja b muodostui suhteessa 2:1. Uudelleenjulkaistu teoksesta: *Tetrahedron Letters*, vol. 41, Mandai et al., *A semisynthesis of paclitaxel via a 10-deacetylbaccatin III derivative bearing a  $\beta$ -keto ester appendage*, sivut 243–246, © 2000, Elsevierin luvalla.



**Kaavio 2.** Mandain (2000) semisynteesi. Lähtöaine (a) on sama yhdiste kuin kaavion 1 lopputuote (a). Reagenssit ja katalyytit:  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$  = ammoniumformiaatti;  $\text{HOAc}$  = etaanihappo;  $\text{BzCl}$  = bentsoyylikloridi;  $\text{NaHCO}_3$  = natriumvetykarbonaatti;  $\text{DEAD}$  = dietyyliatodikarboksylaatti;  $\text{PPh}_3$  = trifenyylifosfiini;  $\text{Ac}_2\text{O}$  = etikkahappoanhydridi;  $\text{Py}$  = pyridiini;  $\text{DMAP}$  = 4-dimetyyliaminopyridiinille;  $\text{MeOH}$  = metanoli;  $\text{HCl}$  = suolahappo. Uudelleenjulkaistu teoksesta: *Tetrahedron Letters*, vol. 41, Mandai et al., *A semisynthesis of paclitaxel via a 10 deacetylbaaccatin III derivative bearing a  $\beta$  keto ester appendage*, sivut 243–246, © 2000, Elsevierin luvalla.

Paklitaxelin prekursoreita, kuten bakkatiini(III):a on löydetty myös endofyyttisistä sienistä, kuten *BT2*:sta (0,012–0,018 mg/L) ja *Diaporthe phaseolorumista* (0,219 mg/L), mutta saannot ovat toistaiseksi erittäin pieniä (Guo et al., 2006; Zaiyou et al., 2013). Sen lisäksi, että paklitaxelia voidaan valmistaa semisynteettisesti marjakuusten tuottamista paklitaxelin prekursoreista, sitä voitaisiin siis valmistaa myös endofyyttisten sienten tuottamista paklitaxelin prekursoreista, kuten bakkatiini III:sta (Guo et al., 2006). Se vaatii kuitenkin saantojen parantamista.

### 2.3. Biosynteesi

Semisynteettisten valmistusmenetelmien taustalla on marjakuusisten luontainen ominaisuus tuottaa paklitaxelia biosynteettisesti (Baloglu & Kingston, 1999). Paklitaxelin biosynteeseireitti kasveissa (Kuva 5) tunnetaan pääasiassa hyvin. Joidenkin vaiheiden tarkkaa järjestystä ei täysin tunneta, mutta biosynteesin kokonaiskuva on hyvin selvillä (Heinig et al., 2013). Terpeenien, kuten paklitaxelin, biosynteeseireitin alussa isopentenyylidifosfaattia (IPP, engl. isopentenyl diphosphate) ja dimetyyliallyylidifosfaattia (DMAPP, engl. dimethylallyl diphosphate) tuotetaan joko mevalonaattipolun (MVP, engl. mevalonate pathway) kautta tai 2C-metyyli-D-erytrioli 4-fosfaattipolun (MEP, engl. methylerythrol phosphate pathway) kautta (Jarchow-Choy et al., 2014). IPP muodostaa

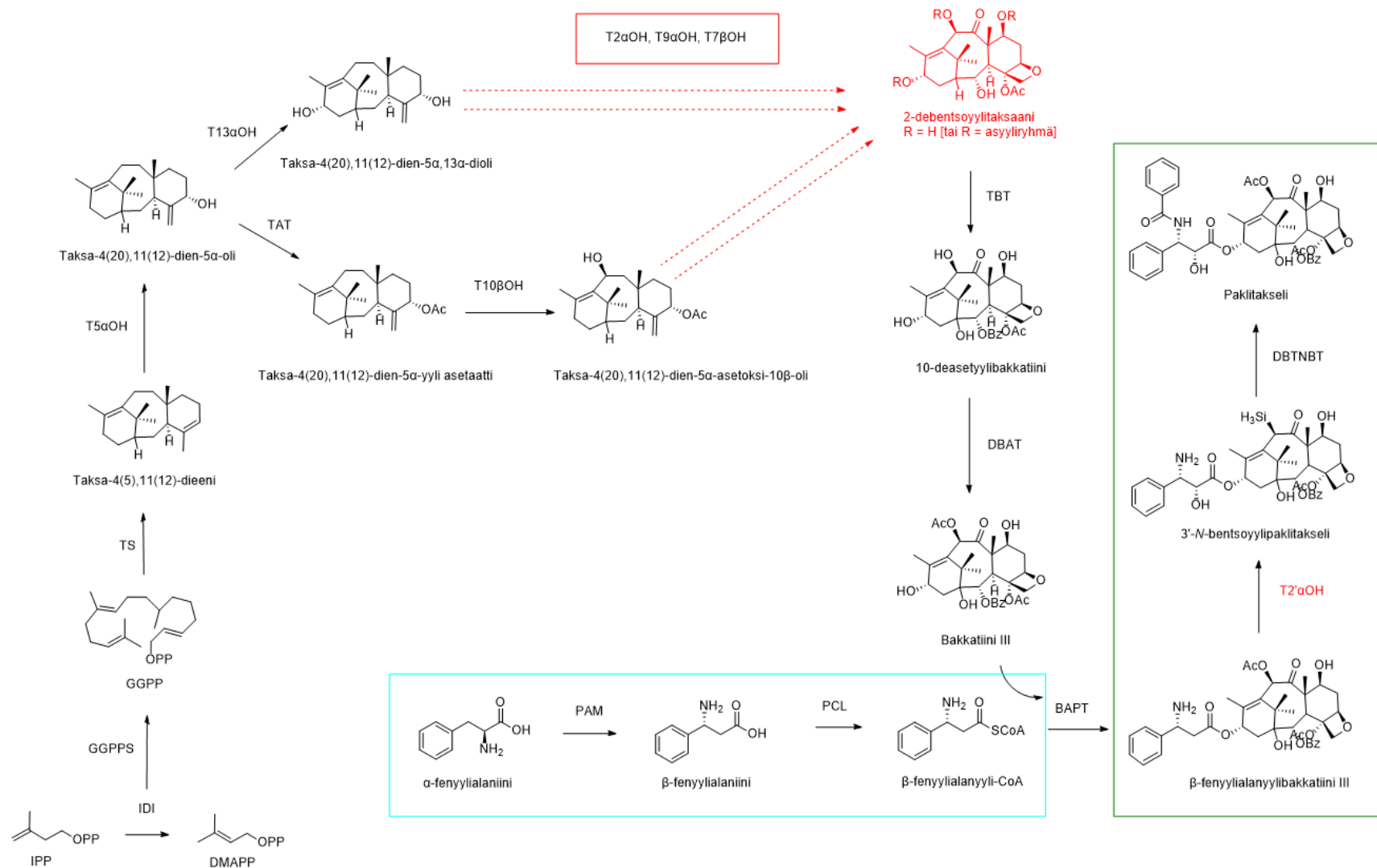
isopentenyylidifosfaatti-isomeraasin (IDI, engl. isopentenyl diphosphate isomerase) avulla isomeeriään, DMAPP:tä. Geranyyligeranylidifosfaattisyntaasi (GGPPS, engl. geranylgeranyl diphosphate synthase) katalysoi kolmen IPP- ja yhden DMAPP-molekyylin reaktiota, missä muodostuu geranyyligeranylidifosfaattia (GGPP, engl. geranylgeranyl diphosphate; Hefner et al., 1998).

Paklitakselin biosynteesi alkaa GGPP:n syklistaatiolla taksa-4(5),11(12)-dieniksi taksadienisyntaasin (TS, engl. taxadiene synthase) katalysoimalla reaktiolla (Hezari et al., 1995; Wildung & Croteau, 1996). Kun taksa-4(5),11(12)-dienirunko on muodostunut, useat entsyymit osallistuvat sen muokkaukseen. Ensin luokan II sytokromi P450-hydroksylaasi, taksadieni-5 $\alpha$ -hydroksylaasi (T5 $\alpha$ OH, engl. taxadiene-5 $\alpha$ -hydroxylase), muokkaa taksa-4(5),11(12)-dienin taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -oliksi (Hefner et al., 1996). Tämän jälkeen synteesireitti haarautuu, ja synteesi voi jatkua kahta eri reittiä pitkin. Toisessa reitissä taksadienoli-*O*-asetyylitransferaasi (TAT, engl. taxadienol-*O*-acetyl transferase) asetyloi taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -olin C-5-aseman, jolloin muodostuu taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -yyliasetaatti (Walker et al., 1999). Asetylaation jälkeen taksaani-10 $\beta$ -hydroksylaasi (T10 $\beta$ OH, engl. taxane-10 $\beta$ -hydroxylase) hydroksyloi C-10-aseman, jolloin muodostuu taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -asetoksi-10 $\beta$ -oli (Schoendorf et al., 2001; Wheeler et al., 2001)

Toinen mahdollinen synteesireitti on, että taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -oli hydroksyloidaan C-13-asemassa taksaani-13 $\alpha$ -hydroksylaasin toimesta, jolloin muodostuu taksa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -dioli (Jennewein et al., 2001). Näiden kahden reitin on esitetty useiden tuntemattomien muokkausten jälkeen muodostavan samaa hypoteettista paklitakselin esiasetta, 2-debentsoyylitaksaania (Walker & Croteau, 2000b). Tämä ehdotettu välituote, jossa C-13-asema on asyloitu, ei kuitenkaan ole looginen esiaste 10-DAB:lle, koska 10-DAB:llä ei ole C-13- tai C-7-asyyliryhmiä (Al-Hilfi et al., 2024). Myöskään 2-debentsoyylitaksaani, jolla on C-13-hydroksyyliryhmä ei luultavasti ole oikeanlainen esiaste paklitakselille (Al-Hilfi et al., 2024), joten tarkkaa biosynteesireittiä ei vielä täysin tunneta. Jos tätä 2-debentsoyylitaksaania muokattaisiin taksaani-2 $\alpha$ -*O*-bentsoyylitransferaasilla (TBT, engl. taxane-2 $\alpha$ -*O*-benzoyl transferase), saataisiin 10-DAB:tä. Viimeinen taksaanirungon muokkausvaihe on 10-DAB:n muuttaminen bakkatiini(III):ksi 10-deasetyylibakkatiini(III)-10-*O*-asetyylitransferaasilla (DBAT, engl. 10-deacetyl baccatin(III)-10-*O*-acetyltransferase) (Walker & Croteau, 2000a).

Seuraavaksi biosynteesissä tapahtuu paklitakselin C-13-sivuketjun muodostus, ja sen liittäminen bakkatiini(III)-runkoon. Sivuketjun muodostumisen ensimmäinen vaihe on  $\alpha$ -fenyylialaniinin muuttaminen  $\beta$ -fenyylialaniiniksi fenyylialaniiniaminomutaasin (PAM, engl. phenylalanine aminomutase) avulla (Walker et al., 2004). Seuraavaksi  $\beta$ -fenyylialaniini-CoA-ligaasi (PCL, engl.  $\beta$ -phenylalanine-CoA ligase) katalysoi  $\beta$ -fenyylialaniinin muuttumista  $\beta$ -fenyylialaniini-CoA:ksi (Ramírez-Estrada et al., 2016).  $\beta$ -fenyylialaniini-CoA liitetään bakkatiini(III)-rungon C-13-hydroksyyliryhmään bakkatiini(III): 3-amino-3-fenyylipropanoyylitransferaasin (BAPT, engl. baccatin(III): 3-amino-3-phenylpropanoyltransferase) katalysoimana, jolloin muodostuu  $\beta$ -fenyylialanylibakkatiini(III) (Walker et al., 2002). Toiseksi viimeinen vaihe paklitakselin biosynteesissä on sivuketjun C-2'-aseman hydroksylaatio, mutta sitä katalysoivaa entsyymiä ei vielä

tunneta (Ramírez-Estrada et al., 2016; Wang et al., 2021). On kuitenkin esitetty, että entsyymi kuuluisi sytokromi P450-hydroksylaaseihin, ja voisi siten olla taksaani-2' $\alpha$ -hydroksylaasi (T2' $\alpha$ OH, engl. taxane-2' $\alpha$ -hydroxylase; Wang et al., 2021). Viimeinen vaihe on sivuketjun C-3'-aseman bensamidointi *N*-debentsoyyli-2'-deoksitaksoli-*N*-bentsoyylitransferaasin katalysoimana (Walker et al., 2002).



**Kuva 5.** Paklitakselin biosynteesireitti, mukailtu Wang et al. (2021). Punaisella kuvataan tuntemattomia biosynteesivaiheita, karakterisoimattomia entsyymireaktioita ja hypoteettista välituotetta 2-debentsoyylitaksaania. Punainen kehys kuvaa tuntematonta reaktiojärjestystä, sekä karakterisoimattomia entsyymireaktioita. Sininen kehys kuvaa paklitakselin sivuketjun muodostusta ja vihreä β-fenyylialanyyli-CoA-sivuketjun liittämistä bakkatiini(III)-runkoon.

Endofyyttisten sienten kykyä tuottaa paklitakselia biosynteettisesti voidaan tutkia muun muassa polymeraasiketjureaktiolla (PCR, engl. polymerase chain-reaction) (Garyali et al., 2013). Garyali et al. (2013) tutkivat *T. baccata* sp. *wallichianan* kaarnassa kasvaneiden endofyyttisten sienten kykyä tuottaa paklitakselia. He analysoivat DBAT-geenin läsnäoloa 25 sienilajissa. Viidessä näistä lajeista havaittiin kyseisen geenin fragmentteja. DBAT on välttämätön katalyytti paklitakselin tuotannolle, mutta koska se katalysoi bakkatiini(III):n tuotantoa, ei voida olla varmoja siitä, että analysoitu laji tuottaisi myös paklitakselia. Tämän takia he analysoivat myös BAPT-geenin läsnäoloa niissä näytteissä, joista DBAT-geeniä löytyi. Kaikilta DBAT-geeniä sisältäviltä endofyyttisiltä sieniltä löytyi myös BAPT-geeni. Geenien havaitseminen kertoo siitä, että kyseisillä endofyyttisillä sienilajeilla on paklitakselin biosynteesiin tarvittavia geenejä (Garyali et al., 2013). Myös Zhang et al. (2009) löysivät DBAT-geeniä *Taxus median* kaarnasta eristetystä endofyyttisestä sienilajista, *Cladosporium cladosporioides* MD2:sta.

DBAT:n ja BAPT:n lisäksi myös TS on paklitakselin biosynteesille välttämätön katalyytti (Hezari et al., 1995; Wildung & Croteau, 1996). Xiong et al. (2013) tutkivat *T. maireista* eristettyjen endofyyttisten sienilajien kykyä tuottaa paklitakselia analysoimalla paitsi DBAT-geenin ja BAPT-geenin, myös TS-geenin läsnäoloa näytteissä. He löysivät kolmesta endofyyttisestä sienilajista, *Fusarium proliferatum* HBA29:stä, *Guignardia mangiferae* HAA11:sta ja *Colletotrichum gloeosporioides* TA67:stä, jokaista entsyymiä koodaavat geenit, ja siten kolme paklitakselin biosynteesiin kykenevää sienilajia. He eivät havainneet suurta yhteneväisyyttä endofyyttisten sienten ja *T. mairein* tuottamien paklitakselin biosynteesigeenien sekvenssien välillä (Xiong et al., 2013).

On lisäksi esitetty erilaisia teorioita sille, miten endofyyttiset sienet olisivat voineet saada paklitakselin biosynteesiä koodaavia geenejä. Eräs näistä teorioista on horisontaalinen geenisiirto (HGT, engl. horizontal gene transfer) kasveilta sienille. Yang et al. (2014) eristivät euroopanpähkinäpensaassa (*Corylus avellana*) kasvavaa endofyyttistä sientä, *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431:tä ja sekvensoivat sen genomien. He tunnistivat geenit, joiden he olettivat osallistuvan paklitakselin biosynteesiin vertaamalla niitä marjakuusten 13 tunnettuun biosynteesigeeniin. He löysivät seitsemän toisiaan vastaavaa geeniä, jotka koodaavat PAMin, GGPPS:n, T5 $\alpha$ OH:n, T13 $\alpha$ OH:n, T10 $\beta$ OH:n, T7 $\beta$ OH:n ja T2 $\alpha$ OH:n tuotantoa. Nämä seitsemän geeniehdokasta olivat kuitenkin huomattavan erilaisia verrattuna euroopanpähkinäpensaaseen ja *T. baccatan* geeniehdokkaisiin, koska geenien tuottamien proteiinien aminohapposekvenssit erosivat toisistaan. Siksi *P. aurantiogriseumin* uskotaan kehittäneen itsenäisen biosynteesireitin paklitakselin tuotannolle HGT:n sijaan (Yang et al., 2014).

### 3. Paklitakselin tuottaminen endofyyttisissä sienissä

Endofyyttiset sienet tarjoavat vaihtoehtoisen ja lupaavan valmistustavan paklitakselin tuotantoon verrattuna synteettisiin tuotantomenetelmiin. Lisäksi monien endofyyttisten sienilajien on havaittu pystyvän valmistamaan paklitakselia biosynteettisesti (Jennewein & Croteau, 2001). Endofyyttisten sienten hyödyntäminen perustuu niiden nopeaan kasvuun (Flores-Bustamante et al., 2010), sekä mahdollisuuteen tehostaa niiden paklitakselin tuotantoa esimerkiksi fermentoimalla tai käyttämällä elisiittoreita (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Endofyyttisiin sieniin perustuva tuotanto on bioteknologisesti kiinnostava ja potentiaalisesti teollisuuteen skaalautuva vaihtoehto (Singhania et al., 2009). Seuraavissa alaluvuissa käsitellään paklitakselin tuotantoa endofyyttisissä sienissä fermentoinnin, elisiittorien käytön sekä eristämisen ja analytiikan näkökulmasta.

#### 3.1. Fermentointi

Endofyyttiset sienet tarjoavat edellä kuvattujen synteettisten ja semisynteettisten menetelmien rinnalle uudenlaisen lähestymistavan paklitakselin tuotannolle. Paklitakselin tuottaminen endofyyttisissä sienissä fermentoimalla on eräs huomionarvoinen tuotantotapa (Flores-Bustamante et al., 2010). Fermentoinnissa aine muuttuu mikrobien vaikutuksesta. Biokemiassa fermentaatio tarkoittaa anaerobista prosessia, missä elektronin vastaanottaja on hapen sijaan jokin orgaaninen yhdiste, kuten pyruvaatti tai sen johdannainen, joka muodostaa pelkistyessään hyödyllisiä tuotteita, kuten etanolia tai maitohappoa. Teollisen fermentoinnin määritelmä eroaa tyypillisestä biokemian määritelmästä (Barrios-González & Tarragó-Castellanos, 2017). Teollisuudessa fermentointi tarkoittaa kaikkia mikrobiviljelmiä riippumatta siitä ovatko ne aerobisia vai anaerobisia (Barrios-González & Tarragó-Castellanos, 2017).

Tässä teollisen fermentoinnin näkökulmassa mikro-organismit, kuten endofyyttiset sienet, nousevat erityisen kiinnostaviksi paklitakselin tuotannon suhteen. Ne ovat ympäristöystävällisiä, suhteellisen yksinkertaisia ja halpoja paklitakselin lähteitä (Flores-Bustamante et al., 2010) verrattuna esimerkiksi totaalisynteesiin, joka vaatii paljon vaarallisia ja kalliita kemikaaleja (Iiyama et al., 2022). Mikro-organismien hyötyjä ovat, että ne kasvavat nopeasti hyvin yksinkertaisissa kasvuliukuksissa, niitä voidaan kasvattaa suurissa fermentoreissa, niiden geneettinen manipulointi on suhteellisen yksinkertaista, ja niiden paklitakselin tuotanto on käytännössä rajoittamatonta (Flores-Bustamante et al., 2010).

Endofyyttisten sienten fermentaatioon voidaan käyttää kiinteäalustaista fermentaatiota ja upotusfermentaatiota (El-Sayed et al., 2020; Ismaiel et al., 2017). Kiinteäalustaisessa fermentaatiossa mikrobiviljelelmä kehittyy kiinteän materiaalin pinnalle tai sisäosiin ilman vapaata vettä (Lonsane et al., 1985). Vapaalla vedellä tarkoitetaan vettä, joka ei ole imeytynyt kiinteään substraattiin. Kun kiinteän

substraatin pinnalle muodostuu liian paksu vesikerros, veden pintajännitys alkaa rajoittaa rihmaston kasvua ja heikentää mikrobien hapensaantia (Chen 2013). Mikrobien käytössä olevaa veden määrää kuvataan veden aktiivisuudella, joka ilmoitetaan  $a_w$ -arvona. Veden aktiivisuus määritellään substraatin vesihöyrynpaineen suhteena puhtaan veden vesihöyrynpaineeseen. Eri mikrobeilla on eri suuruiset optimaaliset veden aktiivisuudet, ja sienille tyypillinen  $a_w$ -arvo on kiinteälustaisessa fermentoinnissa noin 0,60–0,70 (Chen 2013). Uputusfermentaatioissa sienille optimaalinen  $a_w$ -arvo on tyypillisesti noin 0,99 (Somjai peng 2016).

Toisin kuin kiinteälustainen fermentaatio, upotusfermentaatio tapahtuu nesteessä. Kiinteälustaisella fermentaatiolla on useita etuja verrattuna upotusfermentaatioon, kuten erikoistuneiden metaboliittien korkeammat saannot, veden säästäminen ja energiatehokkuus (Barrios-González ja Tarragó-Castellanos, 2017; Chen, 2013). Lisäksi kiinteä kasvualusta muistuttaa sienten luonnollista kasvu ympäristöä, ja on siten suotuisa kasvu ympäristö fermentoinnissa (Hölker et al., 2004). Kiinteälustaiseen fermentaatioon liittyy kuitenkin myös ongelmia kuten se, että menetelmän skaalaaminen suuriin bioprosessoreihin on hankalaa (Hölker et al., 2004; Singhania et al., 2009). Uputusfermentaatioon liittyviä ongelmia ovat korkea energian tarve, suuri veden tarve sekä lisäksi menetelmästä aiheutuvat ympäristösaasteet (Chen, 2013). Toisaalta upotusfermentaatiota on kehitetty pidemmälle ja se on helpompaa toteuttaa teollisessa skaalassa suurissa bioprosessoreissa (Singhania et al., 2009).

Ennen varsinaista fermentaatiota, endofyyttiset sienet tulee eristää kasvimateriaalista (El-Sayed et al., 2020; Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Endofyyttistä sientä sisältävää kasvimateriaalia, kuten kuorta, vartta, silmuja tai lehtiä kerätään, minkä jälkeen ne pintasteriloidaan (El-Sayed et al., 2020; Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Pintasterilointi on tärkeää, jotta viljelmissä kasvaa vain kasvin sisäosissa eläviä endofyyttisiä sieniä eikä kasvin pinnalla esiintyviä mikrobeja (Ismaiel et al., 2017). Pintasterilointiin voidaan käyttää muun muassa etanolia, elohopea(II)kloridia ja natriumhypokloriittia (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Lopuksi kasvimateriaalit huuhdellaan käyttäen steriloitua vettä (Salehi et al., 2018). Pintasteriloiduista sisäkuoren, silmujen tai lehtien pienistä paloista leikataan seuraavaksi segmenttejä. Segmenttejä inkuboidaan muokattujen peruna-dekstroosi-agar-maljojen (PDA, engl. potato dextrose agar) pinnalla, jolloin sienirihmasto kasvaa (Salehi et al., 2018). Sen jälkeen endofyyttisistä sienikannoista voidaan tehdä puhtaat sieniviljelmät siirtämällä rihmastosta yksittäinen rihmankärki uudelle kasvualustalle (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018).

Puhdistusvaiheiden jälkeen päästään itse fermentaatiovaiheeseen. Uputusfermentaatioissa inokulaatti voi olla joko agarpaloista peräisin oleva rihmasto (Salehi et al., 2018) tai itiösuspensio (Ismaiel et al., 2017), joka siirretään nestemäiseen kasvatusliuokseen, kuten perunadekstroosiliuokseen (PDB, engl. potato dextrose broth) tai muuhun vastaavaan, jossa viljelmää inkuboidaan (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018).

Fermentointiparametrien optimointi vaikuttaa suoraan endofyyttisten sienten erikoistuneiden metaboliittien tuotantoon, eli myös paklitakselin muodostumiseen. Tällaisia parametrejä ovat esimerkiksi, pH, kasvatusliuoksen tai kiinteän substraatin tyyppi, itiöpitoisuus ja veden aktiivisuus. Ismaiel tutkimusryhmineen (2017) optimoivat upotusfermentaation avulla floridansuosypressistä (*Taxodium distichum*) eristämänsä endofyyttisen sienien paklitakselin tuotantoa. He tunnistivat sienien *A. fumigatus* TXD105 -lajiksi polymeerasiketjureaktion avulla. Tehokkaimman paklitakselin tuotannon he saavuttivat käyttämällä M1D-kasvatuslientä, joka sisälsi glukoosia, fruktoosia, sukroosia, hiivauutetta, mineraaleja, hivenaineita, fenyylialaniinia, natriumbentsoaattia sekä natriumasetaattia. Inokulaation itiösuspension pitoisuus oli  $10^6$  itiötä/mL ja pH oli 6,0. Paklitakselin tuotanto kasvoi M1D-lientä käyttämällä 3,6 kertaiseksi (307,03  $\mu\text{g/L}$ ) verrattuna PDB-liuokseen (84,41  $\mu\text{g/L}$ ) (Ismaiel et al., 2017).

El-Sayed et al. (2020) puolestaan tutkivat, pystytäänkö maatalousjätteitä hyödyntämään *A. fumigatus* TXD105:n kiinteäalustaisessa fermentaatiossa. He tutkivat sokeriruokokuidun, vehnäleseiden, maissintähkän runkojen, vehnän olkien, riisin olkien ja riisileseiden toimintaa kiinteänä kasvualustana endofyyttisille sienille. Parhaiten paklitakselin kasvua edistävä kiinteä alusta oli sokeriruokokuitu, ja seuraavaksi parhaimmat vehnäleseet ja riisileseet. Huonoja alustoja olivat puolestaan maissintähkän runko, vehnän olki ja riisin olki (El-Sayed et al., 2020).

Lisäksi El-Sayed et al. (2020) tutkivat mikä kasvatusliuos toimii parhaana kosteusaineena substraatille, sekä kosteustason ja inokulaatin itiöpitoisuuden vaikutusta paklitakselin tuotannon kasvattamiseksi. Tutkimuksessa havaittiin, että paras kosteusaine oli kaksinkertainen määrä MM1D-liemen ravinteita (glukoosi, sakkaroosi, fruktoosi, mineraalit, fenyylialaniini, natriumasetaatti, natriumbentsoaatti), 80 % kosteustaso ja inokulaatin itiöpitoisuus  $10^7$  itiötä/mL lisäsivät paklitakselin tuotantoa 10-kertaiseksi (145,61  $\text{mg kg}^{-1}$ ) alkuperäisestä.

Myös veden aktiivisuutta muokkaamalla pystytään kasvattamaan paklitakselin tuotantoa (Somjaipeng et al. 2016). Somjaipeng et al. (2016) onnistuivat kasvattamaan endofyyttisen sienien (*Epicoccum nigrum*) paklitakselin tuotantoa jopa 8,5 kertaa suuremmaksi alentamalla veden aktiivisuutta KCl:n avulla arvoon 0,98. Veden aktiivisuuden alentaminen vähentää solujen käytössä olevan vapaan veden määrää suhteessa liuenneeseen KCl:ään, mikä lisää osmoottista stressiä (Chen, 2013), ja parantaa siten erikoistuneiden metaboliittien, kuten paklitakselin, tuotantoa (Zhao et al., 2005). Fermentointiolosuhteiden lisäksi paklitakselin tuotantoa voidaan tehostaa elisiittoreilla, joita käsitellään seuraavassa alaluvussa.

### 3.2. Elisiittorit

Elisiittorit ovat kemiallisia yhdisteitä tai biologisia tekijöitä, jotka voivat indusoida kasveissa fysiologisia tai morfologisia vasteita (Zhao et al., 2005). Ne voivat siten vaikuttaa muun muassa

signalointireittien aktivoitumiseen tai tehostaa erikoistuneiden metaboliittien, kuten paklitakselin, tuotantoa (Zhao et al., 2005). Elisiittorit voidaan jakaa bioottisiin ja abioottisiin elisiittoreihin (Zhao et al., 2005). Bioottiset elisiittorit ovat peräisin biologisista lähteistä, ja niihin kuuluvat mikrobien tuottamat yhdisteet, mikro-organismien soluseinän polysakkaridit (mm. kitiini ja glukaanit) ja kasvien signaalimolekyylit (Ramirez-Estrada et al., 2016). Abioottisia elisiittoreita ovat muun muassa metalli-ionit ja epäorgaaniset yhdisteet (Zhao et al., 2005).

Toinen jaottelutapa on jakaa elisiittorit biologisiin, kemiallisiin ja fysikaalisiin elisiittoreihin (Meena et al., 2022). Tässä jaottelussa solu-uutteen tai kasvatusliuoksen suodokset ovat esimerkkejä biologisista elisiittoreista (Ramirez-Estrada et al., 2016). Kemiallisia elisiittoreita ovat puolestaan puhtaat kemikaalit, kuten salisyylihappo ja bentsoehappo sekä metalli-ionit ja suolat (Meena et al., 2022; Ramirez-Estrada et al., 2016). Fysikaalisiin elisiittoreihin lukeutuu muun muassa sähkömagneettinen säteily (Godínez-Mendoza et al., 2024).

Muun muassa fysikaalisilla elisiittoreilla on suuri vaikutus paklitakselin tuotannon kasvattamiseen endofyyttisissä sienissä (El-Sayed et al., 2020). Kun *A. fumigatus* altistettiin tietylle annokselle UV- ja gammasäteilyä, paklitakselin saanto nousi arvoihin 209,91 mg kg<sup>-1</sup> (UV) ja 351,82 mg kg<sup>-1</sup> (gamma) (El-Sayed et al., 2020). Saanto kasvoi siis yli kaksinkertaiseksi säteilyttämättömään kontrolliin (noin 150 mg kg<sup>-1</sup>) verrattuna.

Salehi et al. (2018) puolestaan tutkivat biologisten ja kemiallisten elisiittorien vaikutusta endofyyttisen sienen, *E. nigrum*, paklitakselin tuotantoon. He eristivät *T. baccata*-kasvin silmuista *E. nigrumia*, jonka he tunnistivat molekyylibiologisten sekvensointiin perustuvien menetelmien avulla. Seuraavaksi he kasvattivat suspensioviljelmissä *C. avellanan* kasvisoluja, joista he valmistivat kasvisolu-uutetta. Seuraavassa vaiheessa he käyttivät valmistamaansa kasvisolu-uutetta elisitoimaan paklitakselin tuotantoa *E. nigrumissa*. He havaitsivat, että gibberellihapon ja *C. avellanan* solu-uutteen yhteisvaikutuksesta *E. nigrum*in kasvu synteettisellä Murashigen ja Skoogin kasvualustalla tehostui. He saavuttivat korkeimman paklitakselin tuotannon (314,7 µg/L) käyttämällä 28 % (v/v) 0,22 µm selluloosa-asetatiruiskusuodattimella suodatettua *C. avellanan* solu-uutetta sekä 2 µg/mL gibberellihappoa. Paklitakselin tuotto oli 11,5-kertainen aikaisempiin tuottoihin verrattuna. He kuitenkin katsoivat paklitakselin kasvaneen tuotannon johtuneen ennemmin biomassan määrän kasvusta, eikä niinkään itse paklitakselin tuotannon tehostumisesta (Salehi et al., 2018).

Salehi et al. (2018) tutkivat myös *C. avellanan* solususpensioviljelmästä valmistetun kasvatusliuoksen suodoksen vaikutusta *E. nigrum*in paklitakselin tuotantoon. Tutkimuksessa käytettiin kahdella eri tavalla steriloitua kasvatusliuoksen suodosta: autoklaavattua sekä suodattamalla steriloitua. Molempien kasvatusliuoksen suodosten havaittiin lisäävän *E. nigrum*in kasvua, mutta autoklaavattu suodos lisäsi kasvua enemmän. Autoklaavattua suodoksen *E. nigrum*in kuivapaino oli 6,28 ± 0,59 g/L, kun taas suodattamalla steriloidun suodoksen *E. nigrum*in kuivapaino oli 4,05 ± 0,03 g/L. Suodattamalla steriloitu kasvatusliuoksen suodos lisäsi kuitenkin itse paklitakselin tuotantoa enemmän (240,8 ± 11,3 µg/L) kuin autoklaavattu suodos (116,5 ± 7,5 µg/L). Siten Salehi et al. (2018) katsoivat myös

autoklaavatus suodoksen tapauksessa, että paklitakselin tuotanto kasvoi lisääntyneen biomassan tuotannon takia, eikä itse paklitakselin tuotannon tehostumisen takia.

Somjaipeng et al. (2016) puolestaan tutkivat kemiallisten elisiittorien, kuten seriinin ja salisyylihapon, vaikutuksia *T. baccata* eristetyn endofyyttisen sienen (*E. nigrum*) tuottaman paklitakselin määrään. Väitöskirjassaan Somjaipeng (2013) ilmoitti *E. nigrum* tuottaman paklitakselin määräksi määritellyssä kasvatusliuoksessa 1,32 µg/L. Kun paklitakselin tuotantoa elisitoitiin 85 mg/L seriinillä, paklitakselin tuotanto kasvoi huomattavasti saavuttaen 39,8 ± 18,6 µg/L (Somjaipeng et al., 2016). Tuotanto kasvoi siis lähes 30-kertaiseksi verrattuna alkuperäiseen (Somjaipeng 2013; Somjaipeng et al. 2016). Kun fermentointiolosuhteiden pH ja veden aktiivisuus optimoitiin sekä käytettiin elisitoinnissa pienempää seriinin pitoisuutta (30 mg/L), paklitakselin tuotanto saavutti jopa 57,1 ± 11,8 µg/L (Somjaipeng et al., 2016). Somjaipeng et al. (2016) havaitsivat myös ammoniumasetaatilla ja hopeanitraatilla elisitoiduissa näytteissä kasvua paklitakselin tuotannossa, mutta se ei ollut yhtä mittavaa kuin seriinillä elisitoidussa näytteessä.

Somjaipeng et al. (2016) tutkivat myös elisiittorien vaikutusta toisen *T. baccata* eristetyn endofyyttisen sienen, *Paraconiothyrium variabilem*, paklitakselin tuotantoon. Tehokkaimmaksi elisiittoriksi tutkimuksessa osoittautui salisyylihappo, kun sen konsentraatio oli 50 mg/L. Tällöin paklitakselin tuotanto *P. variabilessa* oli 14,7 ± 4,8 µg/L. Määrä oli siis noin kahdeksankertainen alkuperäiseen (1,75 µg/L) verrattuna. Kun fermentointiolosuhteita (pH ja veden aktiivisuus) muokattiin ja käytettiin pienempää salisyylihapon pitoisuutta (20 mg/L), paklitakselin tuotanto saavutti jopa 68,9 ± 11,9 µg/L. Myös natriumasetaatti ja seriini lisäsivät paklitakselin tuotantoa, mutta niiden vaikutus oli salisyylihappoon verrattuna pienempi (Somjaipeng et al., 2016). Kemiallisilla elisiittoreilla on siis huomattava vaikutus paklitakselin tuotannon tehostamisessa.

### 3.3. Eristäminen ja analysointi

Paklitakselin eristämässä ja analytiikassa on tutkimusryhmien välillä menetelmällisiä eroja. Lisäksi paklitakselin eristäminen endofyyttisistä sienistä on haastavaa etenkin upotusfermentoinnissa, sillä paklitakselia löytyy niin kasvatusliuoksesta kuin rihmastosta solunsisäisesti (Salehi et al., 2018). Ennen paklitakselin eristämistä endofyyttisistä sienistä, kasvinäytteet on lisäksi pintasteriloitava, kuten luvussa 3.1. käytiin läpi. Näistä pintasteriloituista kasvin osista valmistetaan seuraavaksi puhtaita viljelmiä, joita fermentoidaan joko upotus- tai kiinteäalustaisella fermentoinnilla (El-Sayed et al., 2020; Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018).

Fermentoinnin jälkeen päästään eristämään tuotettu paklitakseli viljelmistä. Sienirihmastot erotetaan kasvatusliuoksesta suodattamalla, jolloin kasvatusliuoksen suodos ja rihmasto saadaan erotettua toisistaan uuttovaiheita varten (Salehi et al., 2018). Upotusfermentoinnissa kasvatusliuoksen suodos uutetaan yleensä dikloorimetaanin avulla, ja orgaaninen faasi haihdutetaan sen jälkeen

pyöröhaihduttimella kuivaksi (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Kuivattu kasvatusliuoksen suodos liuotetaan uudelleen orgaaniseen liuottimeen, kuten metanoliin, myöhempiä analyysejä varten (Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018).

Solunsisäinen paklitakseli vaatii erillisen käsittelyn, koska yhdiste on sitoutuneena rihmaston solurakenteisiin eikä vapaana kasvatusliuoksessa (Zhao et al., 2024). Solunsisäinen paklitakseli eristetään siksi erillisellä uuttomenetelmällä, jota ennen rihmasto kylmäkuivataan (Salehi et al., 2018). Kylmäkuivattu rihmasto käsitellään metanolilla, joka hajottaa solurakenteita ja vapauttaa solunsisäisen paklitakselin uuttoa varten (Salehi et al., 2018; Sapcaru et al., 2014). Sen jälkeen metanolikäsitelty rihmasto sonikoidaan ja sentrifugoidaan (Salehi et al., 2018). Lopuksi se uutetaan dikloorimetaanin ja veden seoksella. Orgaaninen faasi kerätään talteen ja kuivataan pyöröhaihduttimella, minkä jälkeen kuiva näyte liuotetaan metanoliin analyysejä varten (Salehi et al., 2018).

Kiinteälustaisessa fermentaatiossa uutto eroaa hieman upotusfermentaatiosta. Koska paklitakseli on sitoutuneena kiinteään substraattiin, sen vapauttamiseen tarvitaan vahvempaa liuotinta ja mekaanista ravistelua (El-Sayed et al., 2020). El-Sayed et al. (2020) käyttivät uuttamiseen kloroformin ja metanolin 10:1 (v/v) seosta, jota ravisteltiin koko uuton ajan tasoravistelijalla paklitakselin erottamiseksi substraatista.

Kun valmiit näytteet on liuotettu sopiviin liuottimiin, voidaan siirtyä analyysivaiheeseen. Tarkoituksena on selvittää kvalitatiivisilla menetelmillä, sisältävätkö näytteet paklitakselia. Kvalitatiiviseen analyysiin voidaan käyttää esimerkiksi ohutkerroskromatografiaa (TLC, engl. Thin-layer Chromatography), ultravioletispektroskopiaa (UV), nestekromatografia-tandemmassaspektrometriaa (LC-MS/MS, engl. Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry) ja  $^1\text{H}$ -ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa ( $^1\text{H}$ -NMR, engl.  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance) (El-Sayed et al., 2020; Fu et al., 2024; Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018). Kvantitatiiviseen analyysiin puolestaan voidaan käyttää korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC, engl. High-performance Liquid Chromatography) ja LC-MS/MS:ää (Salehi et al., 2018).

Ismaiel et al. (2017) käyttivät paklitakselin kvalitatiiviseen analyysiin TLC:tä. Ajoliuoksena he käyttivät kloroformin ja metanolin 7:1 (v/v) seosta. He vertasivat näytteen muodostamaa TLC-vyöhykettä paklitakselin standardiin, ja tekivät johtopäätökset paklitakselin löytymisestä. Kun näytteen täplä vastaa standardia, se tarkoittaa, että paklitakselia on näytteessä. Näytteiden puhtaat paklitakselia sisältävät TLC-vyöhykkeet voidaan raaputtaa varovasti levyn pinnalta, ja eluoida metanolilla tai asetonitriilillä myöhempiä analyysejä varten (Fu et al., 2024; Ismaiel et al., 2017). Ismaiel et al. (2017) varmistivat TLC:n jälkeen paklitakselin löytymisen näytteestä vertaamalla näytteen ja standardin UV-spektrien absorptiomaksimeita. Kun absorptiomaksimit vastaavat toisiaan, on näytteessä silloin paklitakselia (Ismaiel et al., 2017).

Salehi et al. (2018) puolestaan käyttivät LC-MS/MS-menetelmää näytteen sisältämän paklitakselin kvalitatiiviseen analyysiin. LC-MS/MS-menetelmä on TLC:tä ja UV:tä tarkempi tapa selvittää sisältääkö näyte paklitakselia, koska paklitakselin ioneille ominaisten massavaraussuhteiden

( $m/z$ ) perusteella voidaan varmistua, että kyseessä on oikea rakenne (Salehi et al., 2018). Salehi et al. (2018) vertasivat näytteiden retentioaikoja ja  $m/z$ -arvoja paklitakselin standardeihin, kuten  $[M+H]^+$  -ioniin ( $m/z$  854) ja  $[M+Na]^+$  -ioniin ( $m/z$  876) (Salehi et al., 2018). Kun näytteiden retentioajat ja  $m/z$ -arvot vastaavat paklitakselistandardia, voidaan varmistua siitä, että näyte sisältää paklitakselia (Salehi et al., 2018).

Myös  $^1\text{H-NMR}$ -menetelmää voidaan hyödyntää tarkemmassa kvalitatiivisessa analyysissä (Fu et al., 2024).  $^1\text{H-NMR}$  tarjoaa rakenteellisen varmistuksen paklitakselin löytymiselle, koska se paljastaa molekyylin protonien kemialliset ympäristöt ja siten sen rakenteen erityispiirteet, kuten metyyli- ja asetyyliryhmät, sekä aromaattiset ryhmät (Fu et al., 2024). Fu et al. (2024) eristivät *Taxus cuspidatan* marjoista endofyyttistä sientä, *Alternaria alternata* F3:a. He analysoivat ensin *A. alternatan* tuottaman paklitakselin TLC:llä. Sen jälkeen he käyttivät TLC-levyltä raaputettua paklitakselia sisältävää vyöhykettä ja analysoivat sen  $^1\text{H-NMR}$ :llä varmistaakseen oikean rakenteen löytymisen (Fu et al., 2024).

Fu et al. (2024), Ismaiel et al. (2017) ja Salehi et al. (2018) käyttivät paklitakselin kvantitatiiviseen analyysiin HPLC-menetelmää. He määrittivät menetelmällä endofyyttisten sienten tuottaman paklitakselin pitoisuuden. Menetelmä perustuu standardien piikkien pinta-aloista muodostettuun kalibraatiokäyrään, jonka avulla näytteiden sisältämän paklitakselin pitoisuus pystytään määrittämään (Fu et al., 2024; Ismaiel et al., 2017; Salehi et al., 2018).

## 4. Johtopäätökset

Tutkielman tavoitteena oli selvittää, miten paklitakselin biosynteesi tapahtuu kasveissa ja endofyyttisissä sienissä, miten biosynteesireitit eroavat toisistaan ja millaisia tuotantomenetelmiä on kehitetty paklitakselin tuotantoon. Lisäksi tarkasteltiin menetelmien soveltuvuutta teolliseen mittakaavaan. Tutkimuskysymyksiin vastattiin kattavasti: paklitakselin biosynteesireitti kasveissa tunnetaan hyvin, kun taas endofyyttisten sienten biosynteesireittiin liittyy useita karakterisoimattomia entsyymejä ja epävarmuuksia.

Keskeinen havainto on, että endofyyttiset sienet muodostavat lupaavan, mutta vielä kehitysvaiheessa olevan vaihtoehdon paklitakselin tuotannolle. Niiden hyödyntäminen ei kuormita kasvikuntaa samalla tavalla kuin kaarnan kerääminen *Taxus*-suvun puista, ja ne soveltuvat hyvin fermentointiin. Endofyyttiset sienet tuottavat paklitakselia kuitenkin hyvin pieniä määriä, vaikka tuotantoa on pystytty tehostamaan fermentointiparametrejä optimoimalla, kasvuolosuhteita säätelemällä, sekä käyttämällä erilaisia kemiallisia, biologisia tai fysikaalisia elisiittoreita. Tällöin on pystytty saavuttamaan jopa 30-kertaisia saantoja paklitakselille verrattuna lähtötasoon, mutta saannot jäävät edelleen liian pieniksi teollisen tuotannon vaatimuksista.

Koska paklitakseli on eräs käytetyimmistä syöpälääkkeistä markkinoilla, endofyyttisten sienten potentiaalia lääketeollisuudessa tulee tutkia lisää. Tulevaisuuden tutkimuksen keskiössä on erityisesti biosynteesireitin tarkempi selvittäminen ja biosynteesiin osallistuvien entsyymien tarkka karakterisointi. Geenitekniikan ja synteettisen biologian menetelmät tarjoavat mahdollisuuksia saantojen parantamiseen esimerkiksi yliekspressoimalla biosynteesigenejä. Tarvitaan myös lisätutkimusta prosessien skaalautuvuuteen, kustannusten vähentämiseen sekä ympäristövaikutuksiin liittyen. Lisäksi klinisen ja teollisen tuotannon näkökulmasta on tärkeää varmistua paklitakselin puhtaudesta ja laadusta, sekä menetelmien toistettavuudesta. Yhteenvetona voidaan todeta, että endofyyttiset sienet tarjoavat lupaavan, ekologisesti kestävämmän ja potentiaalisesti skaalautuvan vaihtoehdon paklitakselin tuotannolle. Menetelmä vaatii vielä merkittävää tutkimusta ennen kuin voidaan harkita sen korvaavan nykyiset teollisuudessa käytetyt semisynteettiset tuotantotavat.

## Viitteet

- Al-Hilfi, A., Li, Z., Merz Jr., K. M., Nawarathne, I. N., & Walker, K. D. (2024). Biocatalytic and regioselective exchange of 2-*O*-benzoyl for 2-*O*-(*m*-substituted)benzoyl groups to make precursors of next-generation paclitaxel drugs. *ChemCatChem*, 16(9), e202400186. <https://doi.org/10.1002/cctc.202400186>
- Baloglu, E., & Kingston, D. G. I. (1999). A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III. *Journal of Natural Products*, 62(7), 1068–1071. <https://doi.org/10.1021/np990040k>
- Barrios-González, J., & Tarragó-Castellanos, M. R. (2017). Solid-state fermentation: special physiology of fungi. Kirjassa *Fungal Metabolites* (319–347). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_6)
- Chen, H. (2013). Introduction. The difference between solid-state fermentation and liquid fermentation. Water activity. *Modern solid-state fermentation: Theory and practice*. 1–3. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Denis, J. Noel., Greene, A. E., Guenard, Daniel., Gueritte-Voegelein, Françoise., Mangatal, Lydie., & Potier, Pierre. (1988). Highly efficient, practical approach to natural taxol. *Journal of the American Chemical Society*, 110(17), 5917–5919. <https://doi.org/10.1021/ja00225a063>
- El-Sayed, E. r., Ahmed, A. s., & Al-Hagar, O. e. a. (2020). Agro-industrial wastes for production of paclitaxel by irradiated *Aspergillus fumigatus* under solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1427–1439. <https://doi.org/10.1111/jam.14574>
- Flores-Bustamante, Z. R., Rivera-Orduña, F. N., Martínez-Cárdenas, A., & Flores-Cotera, L. B. (2010). Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *The Journal of Antibiotics*, 63(8), 460–467. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.83>
- Fu, Y., Li, X., Yuan, X., Zhang, Z., Wei, W., Xu, C., Song, J., & Gu, C. (2024). *Alternaria alternata* F3, a novel taxol-producing endophytic fungus isolated from the fruits of *Taxus cuspidata*: isolation, characterization, taxol yield improvement, and antitumor activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(4), 2246–2269. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04661-0>

- Garyali, S., Kumar, A., & Reddy, M. S. (2013). Taxol Production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(10), 1372–1380. <https://doi.org/10.4014/jmb.1305.05070>
- Godínez-Mendoza, P. L., Hurtado-Zuñiga, A., Siboney-Montante, V., Guzman-Cruz, R., & Guevara-González, R. G. (2024). Eustressors to improve plant secondary metabolites production: insect frass and physical factors as examples applied in agriculture and horticulture. Shahid, M. & Gaur, R. (toim.). *Molecular Dynamics of Plant Stress and its Management*. 25–49. Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-97-1699-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-97-1699-9_2)
- Guo, B., Wang, Y., Zhou, X., Hu, K., Tan, F., Miao, Z., & Tang, K. (2006). An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *Mairei*. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 875–877.
- Hefner, J., Ketchum, R. E. B., & Croteau, R. (1998). Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 360(1), 62–74. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0926>
- Hefner, J., Rubenstein, S. M., Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M., Williams, R. M., & Croteau, R. (1996). Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-diene to taxa-4(20),11(12)-dien-5a-ol: The first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 3(6), 479–489. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90096-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90096-4)
- Heinig, U., Scholz, S., & Jennewein, S. (2013). Getting to the bottom of taxol biosynthesis by fungi. *Fungal Diversity*, 60(1), 161–170. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0228-7>
- Hezari, M., Lewis, N. G., & Croteau, R. (1995). Purification and characterization of taxa-4(5),11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 437–444. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1486>
- Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Liang, F., Biediger, R. J., Boatman, P. D., Shindo, M., Smith, C. C., & Kim, S. (1994). First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *Journal of the American Chemical Society*, 116(4), 1597–1598. <https://doi.org/10.1021/ja00083a066>
- Iiyama, S., Fukaya, K., Yamaguchi, Y., Watanabe, A., Yamamoto, H., Mochizuki, S., Saio, R., Noguchi, T., Oishi, T., Sato, T., & Chida, N. (2022). Total synthesis of paclitaxel. *Organic Letters*, 24(1), 202–206. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c03851>
- Jarchow-Choy, S. K., Koppisch, A. T., & Fox, D. T. (2014). Synthetic routes to methylerythritol phosphate pathway intermediates and downstream isoprenoids. *Current Organic Chemistry*, 18(8), 1050–1072. <https://doi.org/10.2174/1385272819666140501001101>
- Jennewein, S., & Croteau, R. (2001). Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s002530100757>
- Jennewein, S., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. B. (2001). Taxol biosynthesis: taxane 13 $\alpha$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13595–13600. <https://doi.org/10.1073/pnas.251539398>

- Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiartman, S., & Ramakrishna, S. V. (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), 258–265. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3)
- Mandai, T., Kuroda, A., Okumoto, H., Nakanishi, K., Mikuni, K., Hara, K., & Hara, K. (2000). A semisynthesis of paclitaxel via a 10-deacetylbaccatin III derivative bearing a  $\beta$ -keto ester appendage. *Tetrahedron Letters*, 41(2), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)02056-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02056-0)
- Meena, M., Yadav, G., Sonigra, P., Nagda, A., Mehta, T., Swapnil, P., Harish, & Marwal, A. (2022). Role of elicitors to initiate the induction of systemic resistance in plants to biotic stress. *Plant Stress*, 5, 100103. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100103>
- Min, L., Han, J.-C., Zhang, W., Gu, C.-C., Zou, Y.-P., & Li, C.-C. (2023). Strategies and lessons learned from total synthesis of taxol. *Chemical Reviews*, 123(8), 4934–4971. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00763>
- Nicolaou, K.C., Yang, Z., Liu, J.J. (1994). Total synthesis of taxol. *Nature* 367, 630–634.
- Nikolic, V., Savic, I., Savic, I., Nikolic, L., Stankovic, M., & Marinkovic, V. (2011). Paclitaxel as an anticancer agent: isolation, activity, synthesis and stability. *Open Medicine*, 6(5), 527–536. <https://doi.org/10.2478/s11536-011-0074-5>
- Ramírez-Estrada, K., Altabella, T., Onrubia, M., Moyano, E., Notredame, C., Osuna, L., Vanden Bossche, R., Goossens, A., Cusido, R. M., & Palazon, J. (2016). Transcript profiling of jasmonate-elicited taxus cells reveals a  $\beta$ -phenylalanine-CoA ligase. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 85–96. <https://doi.org/10.1111/pbi.12359>
- Ramírez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Salehi, M., Moieni, A., & Safaie, N. (2018). Elicitors derived from hazel (*Corylus avellana* L.) cell suspension culture enhance growth and paclitaxel production of *Epicoccum nigrum*. *Scientific Reports*, 8(1), 12053. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29762-3>
- Sapcariu, S. C., Kanashova, T., Weindl, D., Ghelfi, J., Dittmar, G., & Hiller, K. (2014). Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX*, 1, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.07.002>
- Schoendorf, A., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. B. (2001). Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1501–1506. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1501>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal, Invited Review Issue 2009*, 44(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Somjai peng, S., Medina, A., & Magan, N. (2016). Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 90, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.05.002>

- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 260(5105), 214–216. <https://doi.org/10.1126/science.8097061>
- Uniyal, S. Kr. (2013). Bark removal and population structure of *Taxus wallichiana* Zucc. In a temperate mixed conifer forest of western Himalaya. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 2921–2928. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2760-4>
- Walker, K., & Croteau, R. (2000a). Molecular cloning of a 10-deacetylbaconin III-10-*O*-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 583–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.583>
- Walker, K., & Croteau, R. (2000b). Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl- CoA: taxane 2 $\alpha$ -*O*-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13591–13596. <https://doi.org/10.1073/pnas.250491997>
- Walker, K. D., Klettke, K., Akiyama, T., & Croteau, R. (2004). Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 53947–53954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411215200>
- Walker, K., Fujisaki, S., Long, R., & Croteau, R. (2002). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12715–12720. <https://doi.org/10.1073/pnas.192463699>
- Walker, K., Ketchum, R. E. B., Hezari, M., Gatfield, D., Goleniowski, M., Barthol, A., & Croteau, R. (1999). Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-*O*-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 364(2), 273–279. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1125>
- Walker, K., Long, R., & Croteau, R. (2002). The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain *N*-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9166–9171. <https://doi.org/10.1073/pnas.082115799>
- Wang, T., Li, L., Zhuang, W., Zhang, F., Shu, X., Wang, N., & Wang, Z. (2021). Recent research progress in taxol biosynthetic pathway and acylation reactions mediated by taxus acyltransferases. *Molecules*, 26(10), 2855. <https://doi.org/10.3390/molecules26102855>
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Wheeler, A. L., Long, R. M., Ketchum, R. E. B., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. (2001). Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 $\alpha$ -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390(2), 265–278. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2377>
- Wheeler, N. C., Jech, K., Masters, S., Brobst, S. W., Alvarado, A. B., Hoover, A. J., & Snader, K. M. (1992). Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *Journal of Natural Products*, 55(4), 432–440. <https://doi.org/10.1021/np50082a005>

- Wildung, M. R., & Croteau, R. (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9201–9204. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9201>
- Xiong, Z.-Q., Yang, Y.-Y., Zhao, N., & Wang, Y. (2013). Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. *BMC Microbiology*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-71>
- Yang, Y., Zhao, H., Barrero, R. A., Zhang, B., Sun, G., Wilson, I. W., Xie, F., Walker, K. D., Parks, J. W., Bruce, R., Guo, G., Chen, L., Zhang, Y., Huang, X., Tang, Q., Liu, H., Bellgard, M. I., Qiu, D., Lai, J., & Hoffman, A. (2014). Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. *BMC Genomics*, 15(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-69>
- Yang, Y.-H., Mao, J.-W., & Tan, X.-L. (2020). Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(12), 890–897. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)60032-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)60032-2)
- Yu, H., Lan, F., Zhuang, Y., Li, Q., Zhang, L., Tian, H., Bu, X., Chen, R., Gao, Y., Wang, Z., & Zhang, L. (2025). Paclitaxel anti-cancer therapeutics: from discovery to clinical use. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 23(7), 769–789. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(25\)60833-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(25)60833-8)
- Zaiyou, J., Li, M., Guifang, X., & Xiuren, Z. (2013). Isolation of an endophytic fungus producing baccatin III from *Taxus wallichiana* var. *Mairei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(11), 1297–1302. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1320-4>
- Zhang, P., Zhou, P.-P., & Yu, L.-J. (2009). An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology*, 59(3), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9270-1>
- Zhang, S., Ye, T., Liu, Y., Hou, G., Wang, Q., Zhao, F., Li, F., & Meng, Q. (2023). Research Advances in Clinical Applications, Anticancer Mechanism, Total Chemical Synthesis, Semi-Synthesis and Biosynthesis of Paclitaxel. *Molecules*, 28(22), 7517. <https://doi.org/10.3390/molecules28227517>
- Zhao, F., Wang, Z., & Huang, H. (2024). Physical cell disruption technologies for intracellular compound extraction from microorganisms. *Processes*, 12(10), 2059. <https://doi.org/10.3390/pr12102059>
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>