

具抑菌活性的橙黄黑孢霉卷线孢菌素高产发酵工艺优化

李慧^{1,2}, 马召迪^{1,2}, 雷帮星², 陈其荣^{1,2}, 何张江², 刘正慧^{2*}, 康冀川^{2*}

1 贵州大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学 西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心, 贵州 贵阳 550025

摘要: 本研究以银杏内生真菌橙黄黑孢霉 *Nigrospora aurantiaca* GDYX-311 为试验菌株, 为提高卷线孢菌素(bostrycin)产量, 结合单因素实验与响应面法, 对发酵培养基组分及培养条件进行优化, 并探究卷线孢菌素的体外抑菌活性。结果表明, 发酵时间、温度和接种量对卷线孢菌素产量影响显著, 优化后最佳培养基为葡萄糖 50 g/L、牛肉浸粉 10 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L; 最佳培养条件为: 发酵时间 129.12 h、温度 27.38 °C、接种量 0.81%、自然 pH (5.74)。在此条件下, 橙黄黑孢霉发酵液中卷线孢菌素产量可达(414.89±11.10) μg/mL, 是未优化条件下产量[(201.55±18.90) μg/mL]的 2.06 倍。抑菌实验还发现卷线孢菌素抑菌效果显著, 对宋内志贺菌 *Shigella castellani*、白色念珠菌 *Candida albicans*、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 以及无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae* 均表现出良好的抑制活性。本研究为卷线孢菌素规模化液体发酵生产及其抑菌开发利用提供了理论依据, 具有重要的参考价值。

关键词: 橙黄黑孢霉; 卷线孢菌素; 液体发酵; 抑菌活性

[引用本文]

李慧, 马召迪, 雷帮星, 陈其荣, 何张江, 刘正慧, 康冀川, 2025. 具抑菌活性的橙黄黑孢霉卷线孢菌素高产发酵工艺优化. 菌物学报, 44(8): 250003

Li H, Ma ZD, Lei BX, Chen QR, He ZJ, Liu ZH, Kang JC, 2025. Optimization of fermentation process of *Nigrospora aurantiaca* for high production of bostrycin with antibiotic activities. Mycosystema, 44(8): 250003

资助项目: 国家自然科学基金(32170019, 32460007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170019, 32460007).

*Corresponding authors. E-mail: KANG Jichuan, jckang@gzu.edu.cn; LIU Zhenghui, zhenghuiliu1212@126.com

ORCID: LI Hui (0009-0009-2307-679X), KANG Jichuan (0000-0001-5471-7435)

Received: 2025-01-04; Accepted: 2025-02-27

Optimization of fermentation process of *Nigrospora aurantiaca* for high production of bostrycin with antibiotic activities

LI Hui^{1,2}, MA Zhaodi^{1,2}, LEI Bangxing², CHEN Qirong^{1,2}, HE Zhangjiang², LIU Zhenghui^{2*}, KANG Jichuan^{2*}

1 School of Pharmaceutical sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Engineering and Research Center for Southwest Bio-Pharmaceutical Resources of National Education Ministry of China, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: To increase the yield of bostrycin from *Nigrospora aurantiaca* GDYX-311, an endophytic fungus of *Ginkgo biloba*, a study based on combining single factor experiment and response surface method is carried out for optimization of fermentation medium formulation and culture conditions of the fungus. The antibacterial and antifungal activities of bostrycin *in vitro* are also carried out. The results showed that fermentation time, temperature and inoculum size had significant effects on bostrycin yield. The optimal media were glucose 50 g/L, beef extract powder 10 g/L, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L. Under the optimal fermentation time of 129.12 h, temperature of 27.38 °C, inoculum size of 0.81%, and natural pH of 5.74, the yield of bostrycin was $(414.89 \pm 11.10) \mu\text{g/mL}$, 2.06 times of the yield under unoptimized condition $[(201.55 \pm 18.90) \mu\text{g/mL}]$. The antibacterial and antifungal experiment found that bostrycin has significant antibiotic effects on *Shigella castellani*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus agalactiae*. This study provides reference for large-scale liquid fermentation of bostrycin and its antibacterial and antifungal application.

Keywords: *Nigrospora aurantiaca*; bostrycin; liquid fermentation; antibiotic activities

黑孢霉属 *Nigrospora* Zimm.物种是一类极具开发潜力的天然产物来源,可代谢产生聚酮、萜类、类固醇、含氮化合物、脂肪酸等多类化合物,其中多数具有显著的抗菌、抗氧化和抗病毒等活性(Chen *et al.* 2016; Xu *et al.* 2022)。研究发现该属中可外泌色素的菌株稀少,但这些产色素菌株往往具备代谢产生多种活性物质的能力。吴斌教授团队对海洋源产色素真菌 *Nigrospora* sp. MG36-1 进行代谢产物分离,发现了多种具有抗菌活性的化合物(Lan *et al.* 2023); Mani *et al.* (2024)从稻黑孢霉 *N. oryzae* 中分离出的化合物,对 4 种人体致病微生物和 HeLa、A549 两种癌细胞均具有抑制作用; Suwannarach *et al.* (2019)从药用植物肉桂中分离得到产红色素的橙黄黑孢霉 *N. aurantiaca* CMU-ZY2045,并证实卷线孢菌素为红色素的主成分。本实验室首次从药用植物

银杏中分离得橙黄黑孢霉 *N. aurantiaca* Mei Wang & L. Cai GDYX-311,研究发现其可代谢产生卷线孢菌素,值得进一步研究。

卷线孢菌素是一种具有四氢蒽醌骨架结构的天然红色产物,广泛存在于微生物中,自 Noda *et al.* (1968)从 *Bostryconema alpestre* 中首次分离并报道后,又相继在多属真菌中被发现,如节菱孢属、黑孢霉属、链格孢属和曲霉属等(Xu *et al.* 2008; 黎瑞宏 2010; Li *et al.* 2021)。研究发现卷线孢菌素药理活性显著,它能够抑制包括舌鳞癌、前列腺癌、乳腺癌、鼻咽癌、结肠癌、宫颈癌、肝癌、肺癌等在内的多种癌细胞增殖并促进凋亡(Chen *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013; Jie *et al.* 2020; 王沫等 2022); 在抗菌方面,卷线孢菌素对金黄色葡萄球菌、耐甲氧金黄色葡萄球菌(MRSA)和结核杆菌等人体致病微生物也展现出

较强抑制活性(黄宇虹等 2011; Yang *et al.* 2012; 叶玉珍等 2022); 卷线孢菌素还可用于植物生物防治, 抑制青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*、辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum nigrum*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 等病原菌生长(杨倩 2018; 叶玉珍等 2022)。此外, 卷线孢菌素也被证实可用来制备酪氨酸磷酸酶结合剂或抑制剂, 治疗与人酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 相关的糖尿病和肥胖症等(陆勇军等 2017)。

目前, 采用液体发酵提高发酵液中卷线孢菌素产量的工艺报道较少。本研究为提高卷线孢菌素产量, 采用单因素试验和响应面法优化橙黄黑孢霉 GDYX-311 的液体发酵培养基组分及培养条件, 建立了高产、稳定的卷线孢菌素发酵工艺, 并对其抑菌谱进行拓展, 为卷线孢菌素的研究应用提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

实验菌株橙黄黑孢霉 GDYX-311 为银杏树枝皮上所分离的内生真菌, 现保藏于贵州大学西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心, 其 ITS 序列已上传至 NCBI, 登录号为 PV112703。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)与马铃薯葡萄糖肉汤(PDB) (上海博微生物科技有限公司); 沙氏培养基(SDB): 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 40 g, 1 000 mL ddH₂O; 萨氏培养基(SDY): 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 10 g, 葡萄糖 40 g, 1 000 mL ddH₂O; GY 培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母浸粉 2 g, 1 000 mL ddH₂O; 马铃薯蔗糖培养基(PSB): 马铃薯块 200 g 沸水煮 20 min, 取滤液加蔗糖 20 g, ddH₂O 补足 1 000 mL; 胡萝卜蔗糖培养基(CSB): 胡萝卜块 20 g 沸水煮 20 min, 取滤液加葡萄糖 20 g, ddH₂O 补足 1 000 mL; LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, 氯化钠 10 g, 1 000 mL ddH₂O (固体加 15 g 琼脂粉); 脑心浸液肉汤(BHI)和脑心浸液琼脂培养基(BHI) (青岛海

博生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器和设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪配有二极管阵列检测器(安捷伦公司), 制备型液相色谱仪 Prominence LC-20AR (岛津公司), GR-85SA 型立式高压灭菌器(致微仪器有限公司), SW-CJ 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), RXZ 型人工气候箱(宁波江南仪器厂), SHWY 型叠加式摇床(菲斯福仪器有限公司), N-1300-W 型旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社)。

1.1.4 标准品及试剂

卷线孢菌素标准品由华中农业大学王沫教授惠赠, 纯度大于 96%。乙酸乙酯、甲醇、脲、NaNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、KCl、FeSO₄·7H₂O、NaCl、(NH₄)₂SO₄, 均为分析纯; 蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉、牛肉浸粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘油、可溶性淀粉、乳糖均为生化试剂; 甲醇(HPLC 级)。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养及发酵粗提物制备

发酵种子液: GDYX-311 菌株在 PDA 上培养 120 h 后取 5 个菌饼接种至含有 400 mL 的 PDB 中, 于 28 °C、180 r/min 恒温培养振荡器中培养 96 h, 即得种子液。

发酵培养: 在无菌环境下, 以 1% (体积比) 的接种量将种子液接种到含有 250 mL 液体发酵培养基的 1 L 锥形瓶中, 在 28 °C、180 r/min 条件下培养 138 h。

发酵粗提物制备: 收集培养完成后的发酵液, 使用抽滤设备分离菌丝与菌液, 滤液用乙酸乙酯等量萃取 3 次, 合并有机相, 经减压浓缩旋干得发酵粗提物。

1.2.2 GDYX-311 菌株产卷线孢菌素能力评估及含量测定

试验菌株在 PDA 上培养 120 h 后取 3 个菌饼接种至 PDB 中, 按 1.2.1 所示方法培养并制备发酵粗提物。采用 LC-MS (Thermo Scientific Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap™ 质谱仪与 UltiMate™ 3000 HPLC, 赛默飞公司) 联用技术检测粗提物。LC-MS 检测条件: 色谱柱为 Accucore™

aQ C18 极性封端 HPLC 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm), 柱温 25 °C, 流动相为甲醇-水(0.1%甲酸), 梯度洗脱, 在 190–400 nm 波长范围内全扫描。选择电喷雾电离(ESI)模式, 离子源温度: 300 °C; 取样针加热温度: 300 °C; 喷雾电压: 3 200 V; 最大喷雾电流: 100 μA; 鞘气: 40 Arb。

卷线孢菌素含量测定: 粗提物用甲醇溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用高效液相色谱(HPLC)测定, 采用外标法计算样品中卷线孢菌素含量(卢雪欢 2019)。HPLC 色谱条件: 色谱柱为 Eicocoe WT-C18 柱(4.6 mm × 150 mm), 流动相为甲醇-水(0.3%甲酸) (35:65), 检测波长 302 nm, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

1.2.3 液体发酵的初始培养基筛选

将种子液分别接种到 6 种不同液体发酵培养基中(SDY、GY、PDB、PSB、CSB 和 SDB), 按 1.2.1 所述方法培养, 筛选生产卷线孢菌素的初始培养基。

1.2.4 单因素试验

(1) 碳源筛选: 在 1.2.1 发酵条件和 SDB 的基础上, 分别以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘油、可溶性淀粉、乳糖为碳源, 考察不同碳源对卷线孢菌素产量的影响。

(2) 氮源筛选: 在 1.2.1 发酵条件和 SDB 的基础上, 分别以胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉浸粉、酵母浸粉、NaNO₃、(NH₄)₂SO₄ 为氮源, 考察不同氮源对卷线孢菌素产量的影响。

(3) 无机盐筛选: 在 1.2.1 发酵条件和 SDB 的基础上, 分别外加 0.5 g/L 的 NaCl、KCl、FeSO₄·7H₂O 和 MgSO₄·7H₂O 这 4 种无机盐, 考察不同无机盐对卷线孢菌素产量的影响。

(4) 葡萄糖浓度的筛选: 在 1.2.1 发酵条件基础上, 采用均匀递增法考察葡萄糖的最适添加量。共设计 5 种不同浓度, 分别为 20、30、40、

50 和 60 g/L, 比较各浓度下发酵液中卷线孢菌素产量的高低。

(5) 牛肉浸粉浓度筛选: 在 1.2.1 发酵条件基础上, 采用均匀递增法考察牛肉浸粉的最适添加量。分别添加 5、10、15、20 和 25 g/L 的牛肉浸粉, 比较各浓度下发酵液中卷线孢菌素产量的高低。

(6) MgSO₄·7H₂O 浓度筛选: 在 1.2.1 发酵条件基础上, 采用均匀递增法筛选 MgSO₄·7H₂O 的最适添加量。分别添加 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 g/L 的 MgSO₄·7H₂O, 比较各浓度下发酵液中卷线孢菌素产量的高低。

(7) 发酵时间筛选: 在上述试验结果基础上, 控制其他培养条件不变, 从第 2–10 天, 每隔 24 h 取样, 考察不同发酵时间对卷线孢菌素产量的影响。

(8) 接种量筛选: 在上述试验结果基础上, 控制其他培养条件不变, 将接种量设置为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%, 筛选目标菌株产卷线孢菌素的最适接种量。

(9) 培养温度的筛选: 在上述试验结果基础上, 控制其他培养条件不变, 将发酵温度分别设置为 22、25、28、31 和 34 °C, 考察目标菌株产卷线孢菌素的最佳温度。

(10) pH 筛选: 在上述试验结果基础上, 控制其他培养条件不变, 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节培养基的 pH, 分别调至 4、5、自然 pH (5.74)、6、7 和 8, 以确定目标菌株产卷线孢菌素的最适初始 pH。

1.2.5 响应面法优化

(1) Plackett-Burman 试验: 在单因素试验基础上, 采用 Design-Expert 13 设计 N=7 的 Plackett-Burman 试验, 筛选显著影响卷线孢菌素产量的因素, 各因素水平设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 因素水平表

Table 1 Table of Plackett-Burman factor levels

因素	A 葡萄糖	B 牛肉浸粉	C	D 发酵时间	E	F 温度	G 接种量
Factor	Glucose	Beef extract powder	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Time of fermentation	pH	Temperature	Inoculum size
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(h)		(°C)	(%)
–1	40	5	0.1	120	5	25	0.5
+1	60	15	0.5	168	6	31	1.5

(2) Box-Behnken 试验: Plackett-Burman 试验确定发酵时间、温度和接种量是影响卷线孢菌素产量的显著因素。本试验在单因素试验及 Plackett-Burman 试验结果的基础上,以卷线孢菌素产量为响应值,采用 Design-expert 13 设计三因素三水平的试验以确定最佳发酵条件,试验因素与水平设计见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验中的变量及水平
Table 2 Variables and levels in the Box-Behnken test

因素 Factor	A 发酵时间 Time of fermentation (h)	B 温度 Temperature (°C)	C 接种量 Inoculum size (%)
-1	120	26	0.8
0	144	28	1
+1	168	30	1.2

1.2.6 橙黄黑孢霉中卷线孢菌素单体的分离纯化

发酵粗提物用甲醇溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,采用制备型液相色谱仪 Prominence LC-20AR 进行分离。制备分离色谱条件:色谱柱为 Eclipse XDB-C18-5 μm 柱(9.4 mm × 250 mm),流动相为甲醇-水(35:65),检测波长 302 nm,流速 2 mL/min,进样量 100 μL。

1.2.7 卷线孢菌素的抑菌活性

(1) 菌悬液制备:采用平板划线法活化致病微生物。宋内志贺菌、无乳链球菌和鼠伤寒沙门氏菌在 LB 固体培养基上活化,白色念珠菌于 PDA 上活化,化脓链球菌于 BHI 固体培养基上活化。活化后分别挑取单菌落于对应液体培养基,37 °C 振荡培养 14–20 h,并用生理盐水将各指示菌悬浮液调至 10⁸ cfu/mL、10⁶ cfu/mL 备用(李萍等 2017)。

(2) 抑菌圈测定:采用琼脂孔洞扩散法测定卷线孢菌素对各指示菌的抑制效果。吸取 200 μL 浓度为 10⁸ cfu/mL 指示菌菌悬液涂布于对应固体培养基,静置 2 min 后用打孔器均匀打 6 个孔,孔中分别加入 20 μL 浓度为 62.5、125、250 和 500 μg/mL 的卷线孢菌素溶液,20 μL 阳性对照药物头孢呋辛钠(1 mg/mL),20 μL 纯度 99%的二甲基亚砜(DMSO)作阴性对照。37 °C 培

养 24 h 后,观察有无明显的抑制区,测量并记录区域直径(Han *et al.* 2023)。

(3) 最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MAC)测定:采用二倍稀释法测定 MIC (Lagashetti *et al.* 2022; Han *et al.* 2023)。先在 96 孔板 1–10 孔加入 50 μL 含有 2% DMSO 的 LB/PDB 肉汤培养基,而后在孔 1 中加入 50 μL 含有 2% DMSO 的卷线孢菌素溶液(1 mg/mL),依次二倍稀释至第 10 孔,并弃去 50 μL 混合液,使得 1–10 孔中卷线孢菌素终浓度依次为 500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.81、3.91、1.95、0.98 μg/mL。孔 11 加入 50 μL 含有 2% DMSO 的 LB/PDB 肉汤培养基作阴性对照;孔 12 中加入 50 μL 头孢呋辛钠作阳性对照(500 μg/mL);分别在 A、B、C、E、F、G 行加入 10⁶ cfu/mL 的菌悬液 50 μL;D 行和 H 行不加菌悬液,加入 50 μL 生理盐水作卷线孢菌素本色阴性对照。37 °C 孵育 20 h 后在各孔中加入 30 μL 指示剂(0.01%刃天青),继续孵育 2 h 观察颜色变化。与 D、H 行相比,以卷线孢菌素浓度最低且无颜色变化的孔,确定为卷线孢菌素对某菌株的 MIC 值;而后从 MIC 值前的孔中分别取 10 μL 涂布于对应琼脂板,37 °C 培养 24 h 后观察,琼脂板上菌落数 ≤ 5 且浓度最低的确定为卷线孢菌素对某菌株的 MAC 值(Lagashetti *et al.* 2022)。

1.3 数据处理

实验中的每个实验组重复 3 次取平均值,以“平均数±标准差”的形式表示,采用 SPSS 24 软件进行差异显著性分析,使用 Origin 2022 软件处理实验数据并作图。

2 结果与分析

2.1 GDYX-311 菌株产卷线孢菌素能力评估

采用 LC-MS 分析粗提物,结果显示质谱峰 [M+H]⁺ 分子量为 337.09,与卷线孢菌素分子量吻合(图 1A)。但具有此分子量的红色化合物有可能是 altersolanol A、altersolanol D 或 bostrycin (Suwannarach *et al.* 2019),为确定试验菌株所产物质是否为卷线孢菌素,进一步采用 HPLC 检测。结果显示,在相同条件下,卷线孢菌素标准

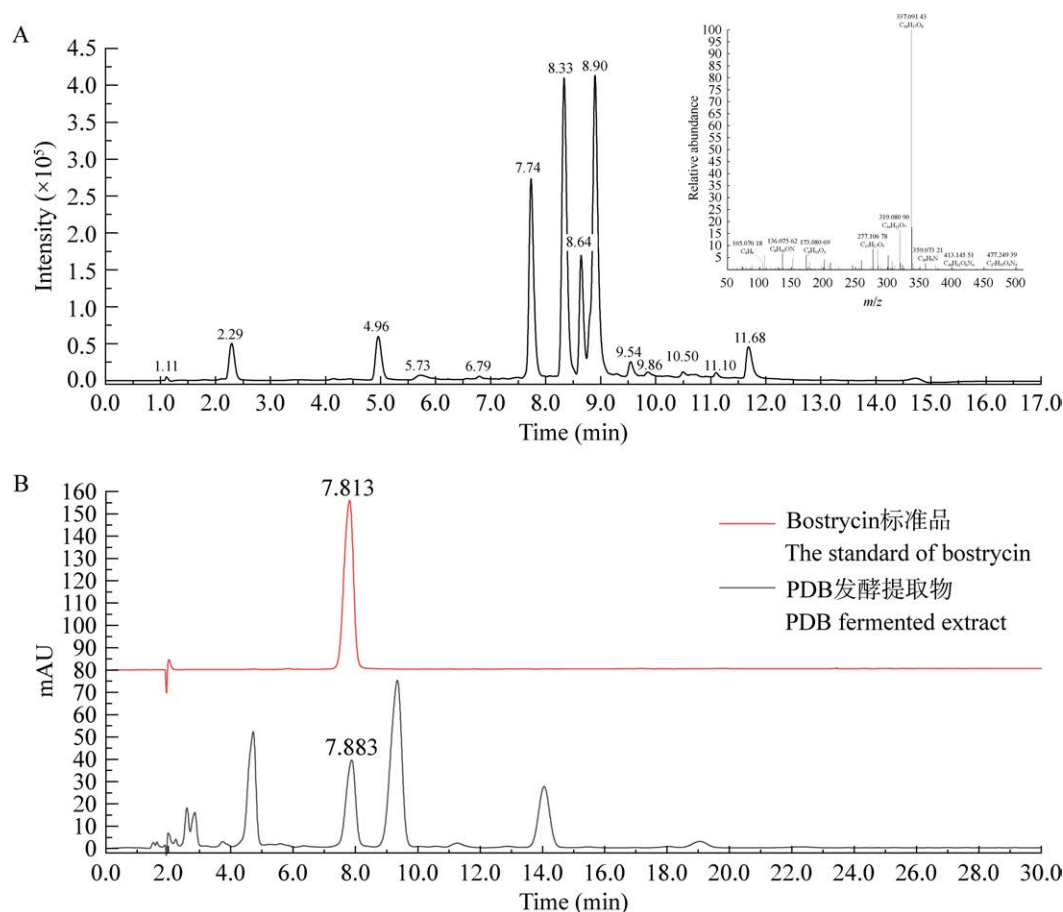


图1 *Nigrospora aurantiaca* 产卷线孢菌素能力评估 A: LC-MS 检测; B: HPLC 检测

Fig. 1 Evaluation of the ability of *Nigrospora aurantiaca* to produce bostrycin. A: LC-MS detection; B: HPLC detection.

品的保留时间为 7.813 min, 粗提物在对应保留时间 7.883 min 也有明显单峰(图 1B), 表明菌株 GDYX-311 可产卷线孢菌素。

2.2 发酵初始培养基筛选

相同培养条件下, 沙氏培养基(SDB)发酵液中卷线孢菌素产量远高于其他 5 种培养基, 可达 202 $\mu\text{g/mL}$ (图 2)。因此, 选用 SDB 作为基础培养基进行培养基组分单因素实验。

2.3 单因素实验

2.3.1 碳源及其浓度对卷线孢菌素产量的影响

各碳源添加时卷线孢菌素产量由大到小依次为葡萄糖>蔗糖>麦芽糖>淀粉>乳糖>甘油, 使用葡萄糖时产量可达 220 $\mu\text{g/mL}$ (图 3A), 因此选择葡萄糖为最适碳源。对葡萄糖用量进行考察发现, 随着葡萄糖浓度的增加, 卷线孢菌素产量先增后降, 葡萄糖浓度为 50 g/L 时产量最高,

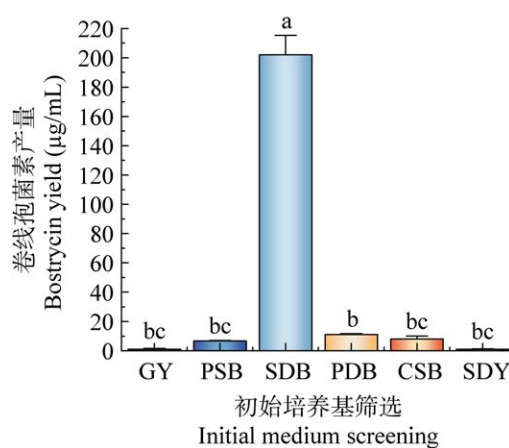


图2 不同发酵培养基对卷线孢菌素产量的影响 不同的小写字母表示各均值存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 2 Effects of different fermentation media on bostrycin production. Different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$). The same below.

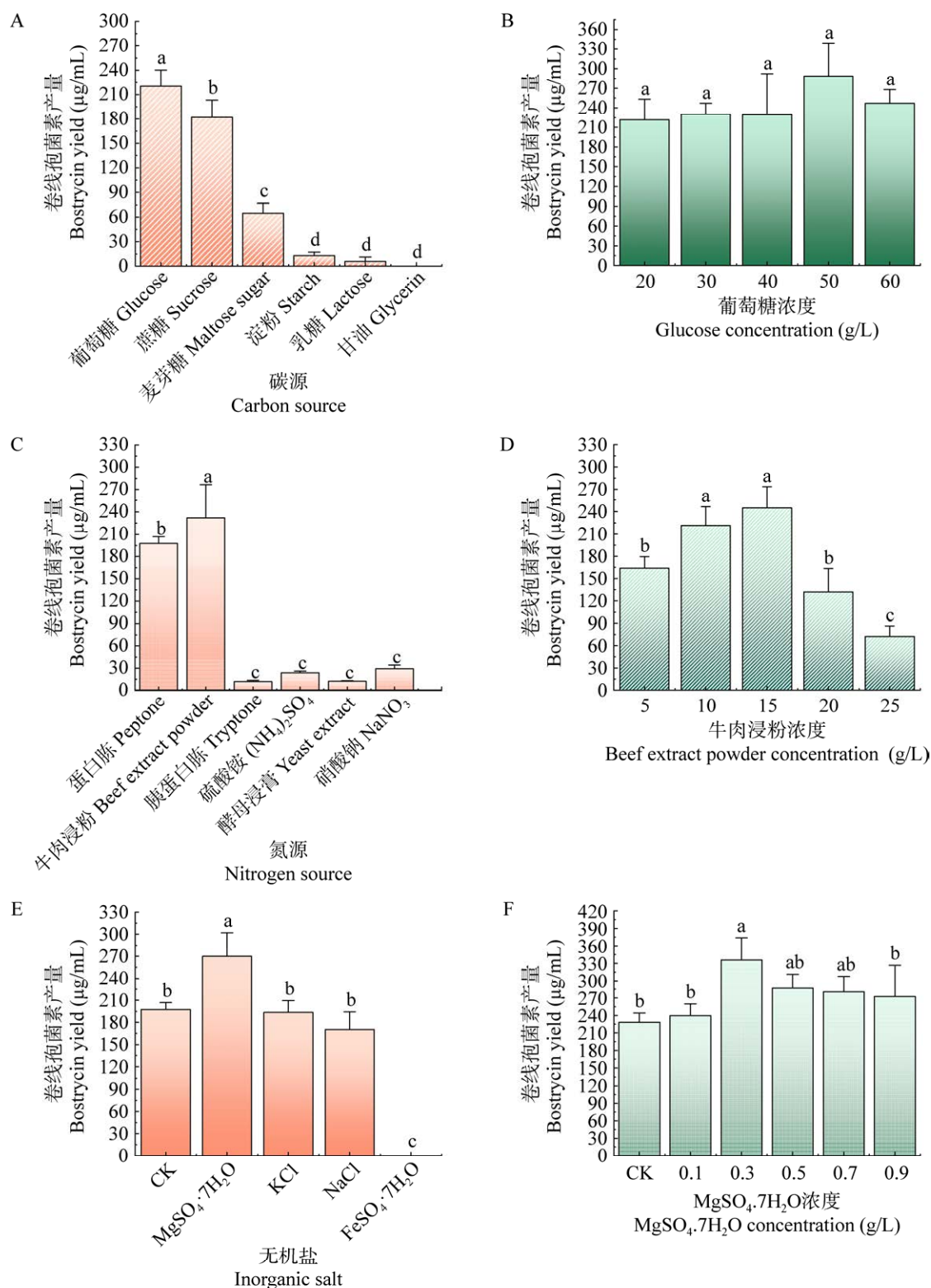


图3 培养基中不同组分及浓度对卷线孢菌素产量的影响 A, B: 不同碳源与不同葡萄糖浓度; C, D: 不同氮源与不同牛肉浸粉浓度; E, F: 不同无机盐与不同 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度

Fig. 3 Effects of different components and concentrations of the component on bostrycin production. A, B: Different carbon sources and different glucose concentrations; C, D: Different nitrogen sources and different beef extract powder concentrations; E, F: Different inorganic salts and different $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentrations.

达到 288 $\mu\text{g/mL}$ (图 3B)。因此将葡萄糖的最适添加量确定为 50 g/L。

2.3.2 氮源及其浓度对卷线孢菌素产量的影响

试验菌株对牛肉浸粉的利用能力显著大于其他氮源, 因此将牛肉浸粉确定为最适氮源(图 3C)。对其浓度进行考察发现, 当浓度为 15 g/L 时, 卷线孢菌素产量达到峰值 244 $\mu\text{g/mL}$; 当浓度为 10 g/L 时, 卷线孢菌素产量为 221 $\mu\text{g/mL}$, 与添加 15 g/L 的牛肉浸粉相比无显著性差异(图 3D)。综合成本因素考虑, 将牛肉浸粉的添加量确定为 10 g/L。

2.3.3 无机盐及其浓度对卷线孢菌素产量的影响

GDYX-311 菌株在添加 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的培养基中培养, 卷线孢菌素产量可达 270 $\mu\text{g/mL}$, 与对照组相比有明显差异, 且产量显著高于添加其他无机盐时的产量(图 3E), 表明 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

是卷线孢菌素生产的最适无机盐。进一步考察 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加量发现, 当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 0.3 g/L 时, 卷线孢菌素产量达到峰值 335 $\mu\text{g/mL}$, 是对照组产量的 1.24 倍(图 3F)。综合考虑, 将 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 最适浓度确定为 0.3 g/L。

2.3.4 发酵时间对卷线孢菌素产量的影响

发酵时长对物质代谢生产影响显著。发酵培养 144 h 后, 卷线孢菌素产量可达 396 $\mu\text{g/mL}$, 而发酵时间 <144 h 或 >144 h 时, 卷线孢菌素产量次优(图 4A)。因此确定最佳发酵时间为 144 h。

2.3.5 接种量对卷线孢菌素产量的影响

接种量在 0.5%–2.5% 的范围内, 随着接种量加大, 卷线孢菌素产量呈先增后降的趋势(图 4B)。当接种量为 1% 时, 卷线孢菌素的产量达到最大值, 为 364 $\mu\text{g/mL}$ 。因此, 将 1% 的接种量确定为菌株发酵生产卷线孢菌素的最适接种量。

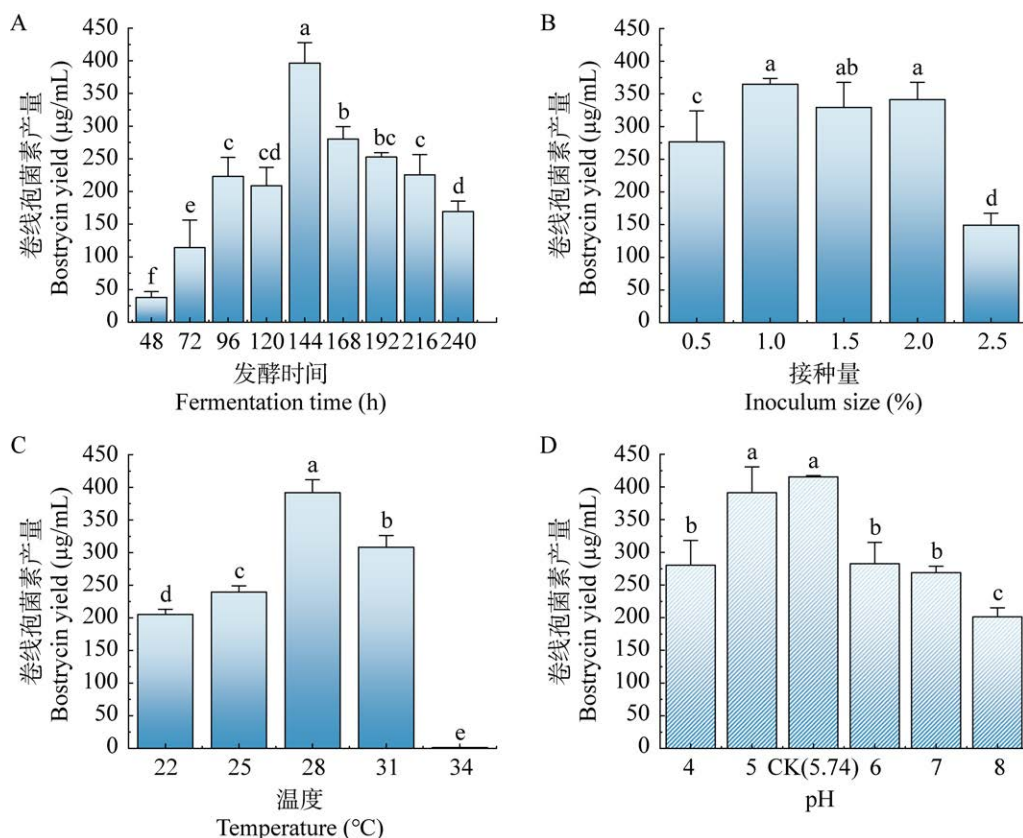


图 4 培养条件对卷线孢菌素产量的影响 A: 不同发酵时间; B: 不同接种量; C: 不同温度; D: 不同 pH

Fig. 4 Effects of culture conditions on bostrycin production. A: Different fermentation times; B: Different inoculum size; C: Different temperatures; D: Different pH.

2.3.6 发酵温度对卷线孢菌素产量的影响

不同温度下卷线孢菌素产量存在显著差异(图 4C)。培养温度在 22–28 °C 时, 卷线孢菌素产量随温度提高而增加, 在 28 °C 达到峰值 391 µg/mL, 而当温度超过 28 °C 时, 卷线孢菌素产量逐渐下降。这可能是温度上升导致相关酶活下降, 从而影响了卷线孢菌素的合成速率。因此确定最佳培养温度为 28 °C。

2.3.7 初始 pH 对卷线孢菌素产量的影响

培养基的酸碱度对卷线孢菌素的产量有明显影响, 培养基初始 pH 在自然 pH (5.74) 时, 卷线孢菌素产量达到 415 µg/mL, 当 pH 值>5.74

或<5.74 时, 产量次优(图 4D)。因此选取自然 pH 为试验菌株发酵生产的最适初始 pH。

2.4 响应面试验

2.4.1 Plackett-Burman 试验

Plackett-Burman 试验方案及结果见表 3。采用方差分析法对其进行评价, 并分析显著性(表 4)。该模型显著($P<0.05$), 在被研究的回归区域内拟合良好; 复相关系数 $R^2=0.960\ 1$, 相关性较好; 校正决定系数 $R^2\ adj=0.890\ 1$, 表明有 89.01% 试验数据的变异性可用此回归模型来解释。经分析将发酵时间、温度和接种量确定为影响卷线孢菌素产量的显著因素。

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Design and results of the Plackett-Burman trial

试验号 Test No.	A	B	C	D	E	F	G	卷线孢菌素产量 Bostrycin yield (µg/mL)
1	1	1	−1	1	1	1	−1	243.318
2	−1	1	−1	1	1	−1	1	313.049
3	1	−1	1	1	1	−1	−1	392.775
4	−1	−1	−1	1	−1	1	1	202.264
5	−1	−1	1	−1	1	1	−1	124.522
6	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	240.082
7	−1	1	1	1	−1	−1	−1	255.549
8	1	−1	−1	−1	1	−1	1	198.931
9	1	1	1	−1	−1	−1	1	134.418
10	1	1	−1	−1	−1	1	−1	140.929
11	−1	1	1	−1	1	1	1	15.447
12	1	−1	1	1	−1	1	1	218.181

表 4 Plackett-Burman 试验回归分析结果

Table 4 Results of regression analysis of Plackett-Burman test

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F-值 F-value	P-值 P-value	显著性 Significance
Model	99 720.29	7	14 245.76	13.73	0.011 7	*
A	2 629.96	1	2 629.96	2.54	0.186 5	
B	6 257.70	1	6 257.70	6.03	0.070 0	
C	3 256.12	1	3 256.12	3.14	0.151 1	
D	49 512.34	1	49 512.34	47.73	0.002 3	**
E	778.11	1	778.11	0.7501	0.435 3	
F	29 023.09	1	29 023.09	27.98	0.006 1	**
G	8 262.98	1	8 262.98	7.97	0.047 7	*
残差 Residual	4 149.38	4	1 037.34			
总和 Sum up	1.039E+05	11				
R^2	0.960 1			Pred R^2	0.640 5	
$R^2\ adj$	0.890 1			Adeq Precisor	13.483 7	

注: ** $P<0.01$, 表示差异极显著; * $P<0.05$, 表示差异显著. 下同
Note: ** $P<0.01$ indicates extremely significant difference; * $P<0.05$ indicates significant difference. The same below.

通过对数据进行多元回归拟合得到回归方程为卷线孢菌素产量($\mu\text{g/mL}$)= $+206.62+14.80\text{A}-22.84\text{B}-16.47\text{C}+64.23\text{D}+8.05\text{E}-49.18\text{F}-26.24\text{G}$ 。

2.4.2 Box-Behnken 试验

根据 2.4.1 试验结果,我们以卷线孢菌素产量为响应值进行 Box-Behnken 试验,试验设计及结果见表 5。对得到的数据进行二次多元回归拟合,确定回归方程为:卷线孢菌素产量($\mu\text{g/mL}$)= $401.257\ 94+1.285\text{A}-11.255\text{B}-14.777\ 5\text{C}-2.272\ 5\text{AB}+20.022\ 5\text{AC}+10.297\ 5\text{BC}-0.212\ 7\text{A}^2-24.612\ 7\text{B}^2-23.152\ 7\text{C}^2$

方差分析结果(表 6)表明,模型的 $F=20.53$ 且 $P<0.01$,表明回归模型极显著;失拟项 $P>0.05$,差异不显著,说明该模型拟合效果良好;复相关系数 $R^2=0.963\ 5$,表明有 96.35%的数据可用此优化后二次式模型来解释;精密度 $\text{Adeq precision}=13.099\ 4(>4)$,说明模型不易受外部因素干扰; $\text{C.V\%}=1.94\%$,说明该验证模型分散程度低,误差小,精确度高。综合表明,模型可信度高,可用于橙黄黑孢霉 GDYX-311 发酵液中卷线孢菌素产量测定。因素 B、C,交互项 AC、BC,二次项 B^2 、 C^2 对卷线孢菌素产量影响显著,其他项不显著,说明各因素与响应值之间不是简单的线性关系,各因素的影响程度依次为

$\text{C}>\text{B}>\text{A}$,即接种量>温度>发酵时间。

发酵时间与温度交互作用时,响应面坡度平缓,对卷线孢菌素产量无显著影响(图 5A, 5B);当发酵时间与接种量交互作用时,响应面坡度陡且等高线图曲线斜率较大,对卷线孢菌素产量

表 5 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 5 Box-Behnken test design and results				
试验号	A	B	C	卷线孢菌素产量
Test No.				Bostrycin yield ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	0	-1	371.75
2	-1	-1	0	381.67
3	-1	0	1	343.99
4	0	1	-1	346.44
5	0	0	0	399.45
6	1	0	1	390.34
7	-1	1	0	372.36
8	0	1	-1	329.38
9	0	0	0	398.61
10	0	0	0	408.21
11	-1	0	-1	405.49
12	0	-1	1	339.95
13	0	0	0	398.35
14	1	-1	0	385.05
15	1	1	0	366.65
16	0	0	0	401.67
17	0	-1	-1	398.20

表 6 Box-Behnken 试验回归分析结果

Table 6 Results of regression analysis of Box-Behnken test

方差来源	平方和	自由度	均方	F-值	P-值	显著性
Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	Significance
Model	9 931.16	9	1 103.46	20.53	0.000 3	**
A	13.21	1	13.21	0.245 8	0.635 2	
B	1 013.40	1	1 013.40	18.86	0.003 4	**
C	1 747.00	1	1 747.00	32.51	0.000 7	**
AB	20.66	1	20.66	0.384 4	0.554 9	
AC	1 603.60	1	1 603.60	29.84	0.000 9	**
BC	424.15	1	424.15	7.89	0.026 2	*
A ²	0.190 5	1	0.190 5	0.003 5	0.954 2	
B ²	2 550.68	1	2 550.68	47.46	0.000 2	**
C ²	2 257.05	1	2 257.05	42.00	0.000 3	**
残差 Residual	376.18	7	53.74			
失拟项 Lack of fit	308.94	3	102.98	6.13	0.056 2	
纯误差 Pure error	67.24	4	16.81			
总差 Cor total	10 307.34	16				
$R^2=0.963\ 5$				Pred R^2	0.510 2	
$R^2\ \text{adj}=0.916\ 6$				Adeq precisor	13.099 4	

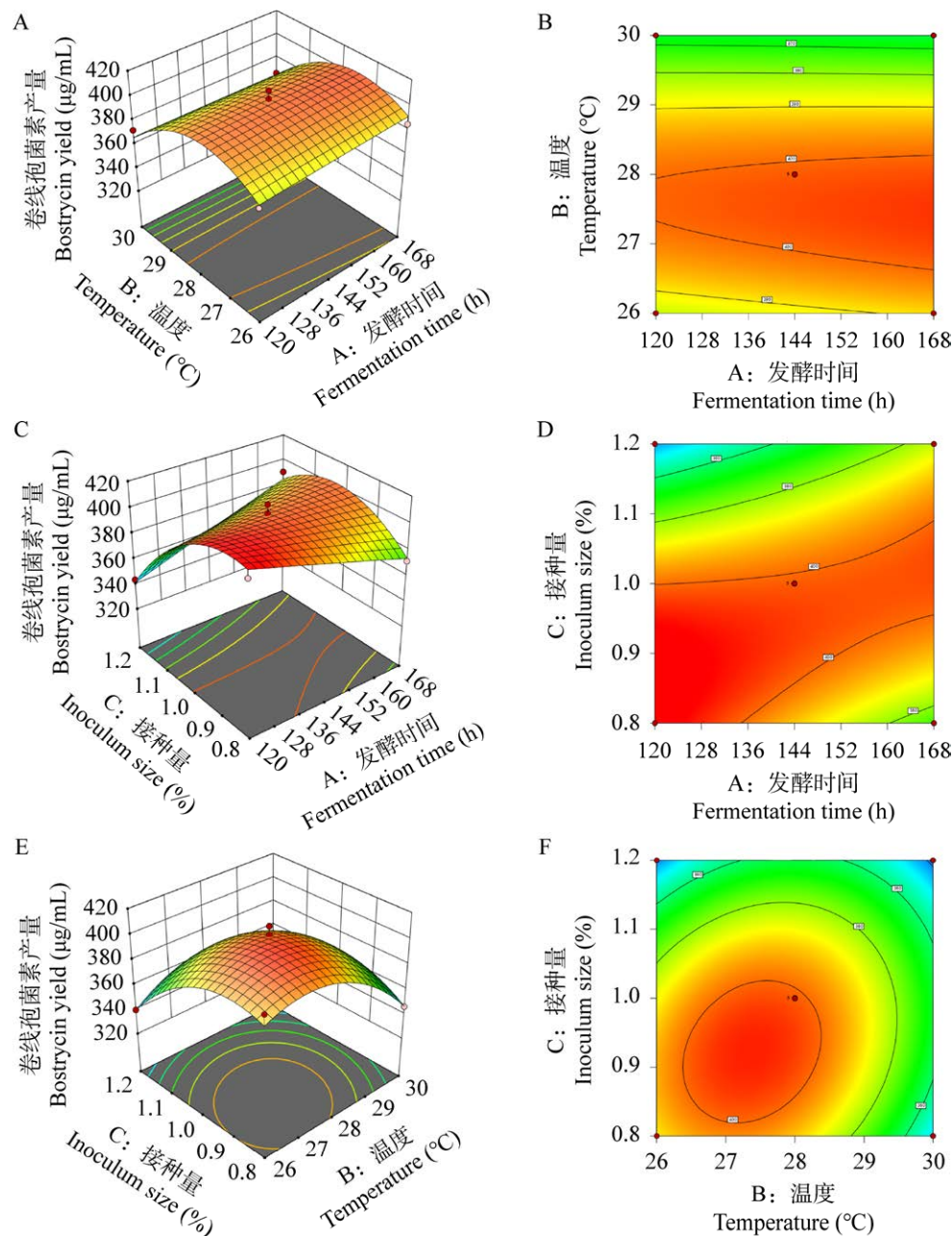


图5 发酵时间、温度和接种量对发酵液卷线孢菌素产量影响的3D响应面曲线(A、C、E)与等高线(B、D、F)

Fig. 5 3D response surface (A, C and E) and contour plots (B, D and F) of effects of fermentation time, temperature and inoculum size on bostrycin yield in fermentation broth.

影响极显著(图 5C, 5D); 当温度与接种量交互作用时, 响应面图坡度较陡且二维等高线图呈椭圆形, 对卷线孢菌素产量的影响显著(图 5E, 5F)。这与回归模拟试验结果一致(表 6)。进一步通过软件预测分析发现, 在发酵时间 129.12 h、温度 27.38 °C和接种量 0.81%的条件下, 试验菌

株发酵生产卷线孢菌素的能力可达到峰值 409.02 μg/mL。我们另观察到, 在发酵时间 120–160 h, 温度 26.5–28.5 °C范围内卷线孢菌素产量可达到最大值, 为稳定发酵工艺, 我们在验证试验中进一步考察发酵时间和温度的阈值。

2.5 验证实验

在最佳发酵工艺参数下摇瓶发酵进行验证,验证得卷线孢菌素实际产量可达 (414.89 ± 11.10) $\mu\text{g/mL}$,是优化前 $[(201.55 \pm 18.90)$ $\mu\text{g/mL}]$ 的 2.06 倍,与预测值无显著差异,表明模型真实可靠。进一步阈值分析也表明,时间在 125–135 h,温度在 27–28 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,卷线孢菌素产量可保持在 400 $\mu\text{g/mL}$ 以上(图 6)。

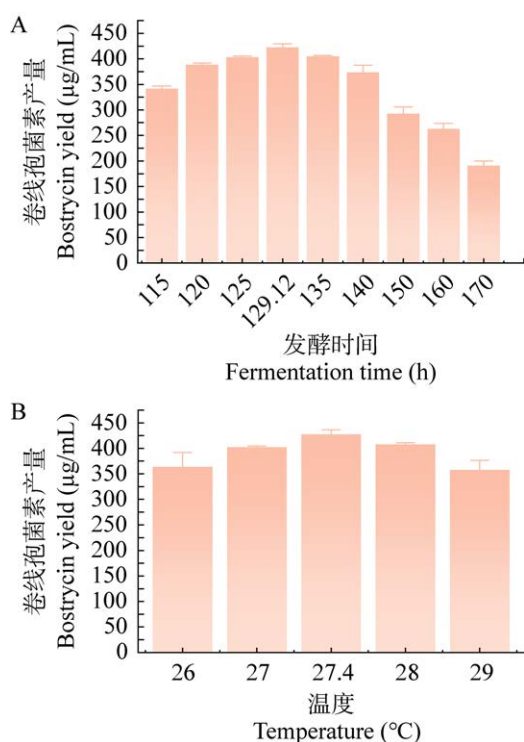


图 6 发酵时间与温度的阈值分析 A: 发酵时间; B: 温度

Fig. 6 Threshold analysis of fermentation time and temperature. A: Fermentation times; B: Temperatures.

2.6 卷线孢菌素单体的分离纯化

分离得红棕色粉末状化合物 **1** 共 33 mg, 纯度为 98.8%。化合物 **1** 与卷线孢菌素标准品保留时间一致, 化合物 **1** 与标准品混合后的结果也为单峰(图 7), 初步证明了卷线孢菌素的成功分离。核磁氢谱结果也与文献报道一致(叶玉珍等 2022), ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ_{H} 6.42 (s, 1H, H-6), 4.73 (d, $J=4.8$ Hz, 1H, H-4), 3.89 (s, 3H, H-12), 3.50 (m, 1H, H-3), 2.69 (s, 1H, H-1 α), 2.66 (s, 1H, H-1 β), 1.22 (s, 3H, H-11)。综上所述, 将化合物 **1** 鉴定为卷线孢菌素。

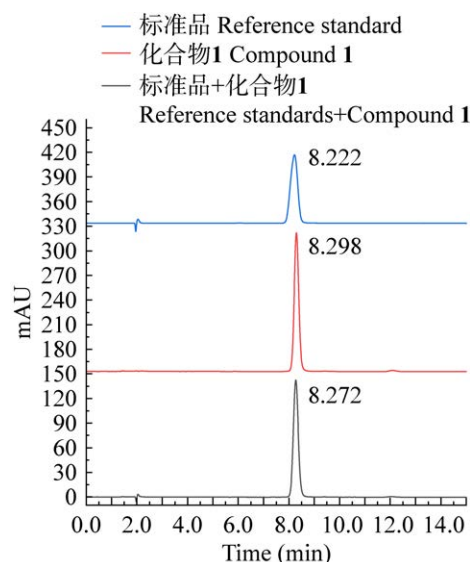


图 7 分离化合物 **1** 及标准品的 HPLC 检测图

Fig. 7 HPLC charts of isolated compounds **1** and standards.

2.7 卷线孢菌素的抑菌圈测定

抑菌圈结果显示, 除化脓链球菌外, 卷线孢菌素对宋内志贺菌、白色念珠菌、鼠伤寒沙门氏菌以及无乳链球菌均有抑制作用, 且抑菌圈随卷线孢菌素浓度增大而增大, 具有浓度依赖性(图 8, 表 7)。

2.8 卷线孢菌素的最低抑制浓度(MIC)及最低杀菌浓度(MAC)测定

MIC 及 MAC 结果(表 8)表明, 卷线孢菌素对多种致病微生物都具有抑制活性($\text{MIC}=1.95\text{--}7.81$ $\mu\text{g/mL}$; $\text{MAC}=3.91\text{--}15.63$ $\mu\text{g/mL}$)。其中, 卷线孢菌素对鼠伤寒沙门氏菌作用尤为显著, MIC 值仅为 1.953 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

自卷线孢菌素被发现对人类疾病治疗有效以来, 人们就对卷线孢菌素展开了深入的研究。涂松源和龙玉华(2016)首次合成了卷线孢菌素的不对称结构, 但合成原料药茶茜价格昂贵, 生产投入成本大, 难以用于工业生产。目前已有多种微生物也被证实可产生卷线孢菌素, 但产量低仍是一个亟需解决的问题。因此, 基于微生物资源去提升卷线孢菌素产量具有较大现实意义。想要提高微生物中卷线孢菌素的产量主要有两种

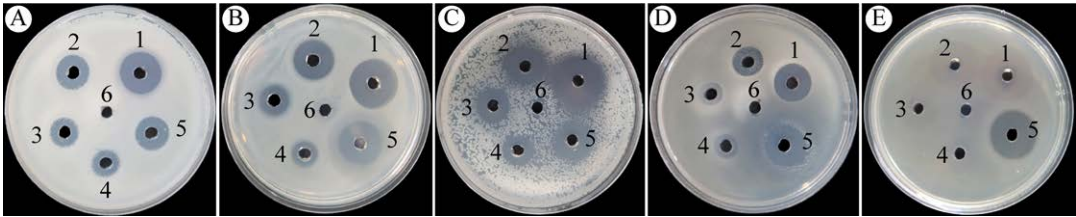


图 8 卷线孢菌素对不同致病菌株的抑菌圈测定 A: 宋内志贺菌; B: 白色念珠菌; C: 鼠伤寒沙门氏菌; D: 无乳链球菌; E: 化脓链球菌

Fig. 8 Inhibition zone assay of bostrycin against different pathogenic strains. A: *Shigella castellani*; B: *Candida albicans*; C: *Salmonella typhimurium*; D: *Streptococcus agalactiae*; E: *Streptococcus pyogenes*. 1: 500 $\mu\text{g/mL}$ bostrycin, 2: 250 $\mu\text{g/mL}$ bostrycin, 3: 125 $\mu\text{g/mL}$ bostrycin, 4: 62.5 $\mu\text{g/mL}$ bostrycin, 5: 1 mg/mL cefuroxime sodium, 6: DMSO.

表 7 抑菌圈直径的测量(Mean $\pm$ SD, mm) (n=3)

Table 7 Measurement of inhibition zone diameter (Mean±SD, mm) (n=3)					
致病菌株 Pathogenic strains	卷线孢菌素 Bostrycin (μg/mL)				头孢呋辛钠 Cefuroxime sodium (1 mg/mL)
	62.5	125	250	500	
宋内志贺菌 <i>Shigella castellani</i>	9.5±0.50 ^c	11.00±1.04 ^c	14.67±1.04 ^b	19.83±1.76 ^a	13.5±0.29 ^b
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	10.33±0.29 ^c	11.67±0.58 ^d	16.83±0.29 ^c	21.83±1.15 ^a	20.17±0.58 ^b
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	13.00±1.32 ^c	15.50±0.50 ^{bc}	17.67±0.76 ^b	23.17±2.75 ^a	20.83±0.58 ^a
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	11.50±0.50 ^c	11.07±0.58 ^c	13.67±0.29 ^b	16.17±0.58 ^a	17.17±1.26 ^a
化脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	/	/	/	/	17.17±1.26 ^a

表 8 卷线孢菌素对不同测试微生物的最低抑制浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MAC)

Table 8 Minimum microbe inhibitory concentration (MIC) and minimum antibiotic concentration (MAC) of bostrycin against different tested microorganisms

测试菌株 Strains tested	MIC value ($\mu\text{g/mL}$)	MAC value ($\mu\text{g/mL}$)
宋内志贺菌 <i>Shigella castellani</i>	3.906 25	7.812 5
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	3.906 25	7.812 5
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i>	1.953 1	3.906 2
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	7.812 5	15.625

方法:一是通过分子生物学手段对化合物合成的关键基因进行调控,并使其在菌株中稳定表达;二是通过发酵优化,确定最佳培养基组分与最适发酵条件,达到提高生产效率、降低生产成本的目的(梁一晨 2021)。且液体发酵与固体发酵相比,具有操作简单、发酵时间短、成本低、产量高、可持续等优点,可用于快速积累大量代谢物(Gao *et al.* 2024)。本研究首次从银杏中分离的橙

黄黑孢菌 GDYX-311 被证实具有生产红色化合物卷线孢菌素的能力,这为卷线孢菌素液体发酵优化研究提供了基础材料。

响应面中的三维响应面图说明因素两两交互作用时对响应值的影响,有助于理解 2 个因素交互作用下与响应值的关系(Dwibedi *et al.* 2021; 苏林贺等 2023; 许娟等 2024)。本研究采用单因素实验与响应面优化相结合的方式,考察不同培养基组分和发酵条件对卷线孢菌素产量的影响,以获得卷线孢菌素最佳发酵工艺。优化后培养基为葡萄糖 50 g/L、牛肉浸粉 10 g/L、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L;优化后培养条件为:发酵时间 129.12 h;温度 27.38 $^{\circ}\text{C}$;接种量 0.81%;自然 pH (5.74)。优化后卷线孢菌素产量从(201.55 $\pm$ 18.90) $\mu\text{g/mL}$ 提高至(414.89 $\pm$ 11.10) $\mu\text{g/mL}$,表明了响应预测模型的真实性与可行性。Zhang *et al.* (2013)对斑茅内生真菌黑孢霉 BM-2 进行液体发酵优化,优化后卷线孢菌素的产量为(86.25 $\pm$ 7.23) $\mu\text{g/mL}$,橙黄黑孢霉 GDYX-311 液体发酵的优化结果是其 4.8 倍,具有一定生产优势。且发酵时间与温度阈值分析的结果也显示,发酵时

间在 125–135 h, 温度在 27–28 °C 范围内, 卷线孢菌素产量可保持在 400 µg/mL 以上, 确保了发酵工艺稳定性。本研究通过发酵工艺优化显著提高了发酵液中卷线孢菌素产量, 结果重复性良好, 可为工业化生产卷线孢菌素提供支持, 并促进其在医药、食品等领域的开发应用。

此外, 本研究还通过制备型液相色谱仪成功获得卷线孢菌素单体(图 7), 为卷线孢菌素抑菌活性研究积累了试验材料。并通过抑菌实验发现, 卷线孢菌素对多种人类致病微生物都具有显著抑制作用, MIC 值介于 1.95–7.81 µg/mL 之间; MAC 值介于 3.91–15.63 µg/mL 之间。值得注意的是, 卷线孢菌素对化脓链球菌未显示出抑制作用, 这可为卷线孢菌素抑菌机理的研究提供思路。

在未来的研究中, 还可通过育种及基因工程等方法对菌株进行选育与改造, 并与发酵培养基组分和发酵工艺过程控制等相结合, 进一步提高卷线孢菌素的发酵产量。此外, 探究卷线孢菌素的纯化工艺, 对于节约生产时间, 降低生产成本也极具意义。

致谢

感谢华中农业大学植物科学技术学院王沫教授馈赠卷线孢菌素标准品。

作者贡献

李慧: 研究资源采集、试验方法设计、试验操作、试验数据整理分析与论文初稿撰写; 马召迪: 试验操作、论文初稿撰写; 雷帮星: 试验整体设计、试验数据分析; 陈其荣: 试验材料制备、发酵种子液制备; 何张江: 优化试验整体方案设计与分析; 刘正慧: 研究思路指导、实验设计验证与核实、研究监管与指导、论文审阅与修订; 康冀川: 研究思路指导、实验设计验证与核实、研究监管与指导、论文审阅与修订。

利益冲突

作者声明, 该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Chen WS, Hou JN, Guo YB, Yang HL, Xie CM, Lin YC, She ZG, 2011. Bostrycin inhibits proliferation of human lung carcinoma A549 cells via downregulation of the PI3K/Akt pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1): 17
- Chen ZM, Dong ZJ, Wen J, Feng T, Liu JK, 2016. A new sesquiterpene from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* #003. *Records of Natural Products*, 10(3): 307-310
- Dwivedi V, Rath SK, Prakash R, Saxena S, 2021. Response surface statistical optimization of fermentation parameters for resveratrol production by the endophytic fungus *Arcopilus aureus* and its tyrosinase inhibitory activity. *Biotechnology Letters*, 43(3): 627-644
- Gao YH, Li XM, Xu H, Sun HJ, Zhang JL, Wu XP, Fu JS, 2024. The liquid-fermentation formulation of *Sanghuangporus sanghuang* optimized by response surface methodology and evaluation of biological activity of extracellular polysaccharides. *Foods*, 13(8): 1190
- Han L, Zheng W, He ZJ, Qian SY, Ma XL, Kang JC, 2023. Endophytic fungus *Biscogniauxia petrensis* produces antibacterial substances. *PeerJ*, 11: e15461
- Huang HY, Wang J, Chen H, Xu GR, Li J, Li Y, Peng Y, Lin YC, She ZG, Lai XM, 2011. Antituberculous activity of bostrycin and its influence on bacterial gene expressions. *Chinese Journal of New Drugs*, 20(6): 535-539 (in Chinese)
- Jie J, Shi L, Yue S, Wang M, Zhang J, 2020. Bostrycin inhibits growth of tongue squamous cell carcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis. *Translational Cancer Research*, 9(6): 3926-3936
- Lagashetti AC, Singh SK, Dufossé L, Srivastava P, Singh PN, 2022. Antioxidant, antibacterial and dyeing potential of crude pigment extract of *Gonatophragmium triuniae* and its chemical characterization. *Molecules*, 27(2): 393
- Lan D, Ge Y, Zhou C, Li S, Wang J, Wu X, Zhang X, Lei H, Wu B, 2023. Antifungal polyketides from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MG36-1. *Fitoterapia*, 165: 105406
- Li JH, Shi L, Xu SY, Gu SY, Wen X, Xu DY, Luo JY, Huang YY, Wang M, 2021. Optimal fermentation time for *Nigrospora*-fermented tea rich in bostrycin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(6): 2483-2490
- Li P, Zhang L, Shu Z, Hu CY, Yan JK, Wang QQ, 2017. Study on the related factors of antimicrobial activity by agar-hole diffusion method. *Chinese Condiments*, 42(8): 47-52 (in Chinese)
- Li RH, 2010. Synthesis of bostrycin with anti-tumor activity. MS Thesis, Sun Yat-sen University, Guangzhou. 1-62 (in Chinese)

- Liang YC, 2021. Recombinant *Escherichia coli* for tyrosolfermentation optimization and metabol. MS Thesis, Jiangnan University, Wuxi. 1-52 (in Chinese)
- Lu XH, 2019. Preliminary study on the fermentation technology of pingyangmycin. MS Thesis, Zhejiang University of Technology, Hangzhou. 1-66 (in Chinese)
- Lu YJ, Chen DN, He L, She ZG, Lin YC, 2017. Application of bostrycin in the preparation of tyrosine phosphatase binders or inhibitors: CN201310259038.6. 2017-02-08 (in Chinese)
- Mani I, Thangavel M, Surendrababu A, Sneha MJX, Rajagopal R, Alfarhan A, Ponnuraj N, Pandi M, 2024. Unveiling the bioprospecting efficacy and textile dyeing of a novel endophytic mycobial red pigment. Indian Journal of Microbiology, 64(2): 618-634
- Noda T, Take T, Otani M, Miyauchi K, Watanabe T, Abe J, 1968. Structure of bostrycin. Tetrahedron Letters, 58: 6087-6090
- Su LH, Zeng WM, Zhang YL, 2023. Optimization of extraction and determination conditions of cellulases from *Auricularia heimuer* cultivated substrate by response surface methodology. Mycosystema, 42(3): 731-744 (in Chinese)
- Suwannarach N, Kumla J, Nishizaki Y, Sugimoto N, Meerak J, Matsui K, Lumyong S, 2019. Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(17): 6973-6987
- Tu SY, Long YH, 2016. Complete synthesis of the natural product bostrycin. Proceedings of the 11th National Conference on Natural and Organic Chemistry, Chinese Chemical Society (part 5), Shanghai. 435 (in Chinese)
- Wang M, Jie J, Wang ZQ, Shi L, Han T, 2022. A method for the extraction and isolation of bostrycin from the solid product obtained by HCH285 fermentation: CN201910982800.0. 2022-11-04 (in Chinese)
- Xu J, Xu YJ, Jiang SY, Li W, Zha XX, 2024. Optimization of liquid fermentation medium for *Auricularia sinodelicata* strain based on response surface methodology. Mycosystema, 43(4): 230259 (in Chinese)
- Xu JZ, Nakazawa T, Ukai K, Kobayashi H, Mangindaan RE, Wewengkang DS, Rotinsulu H, Namikoshi M, 2008. Tetrahydrobostrycin and 1-deoxytetrahydrobostrycin, two new hexahydroanthrone derivatives, from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. Journal of Antibiotics, 61(7): 415-419
- Xu TC, Song ZQ, Hou YG, Liu SS, Li XP, Yang QR, Wu SH, 2022. Secondary metabolites of the genus *Nigrospora* from terrestrial and marine habitats: chemical diversity and biological activity. Fitoterapia, 161: 105254
- Yang KL, Wei MY, Shao CL, Fu XM, Guo ZY, Xu RF, Zheng CJ, She ZG, Lin YC, Wang CY, 2012. Antibacterial anthraquinone derivatives from a sea anemone-derived fungus *Nigrospora* sp. Journal of Natural Products, 75(5): 935-941
- Yang Q, 2018. Bio-activity and toxicity analyses of bostrycin derived from endophytic fungi HCH285. MS Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. 1-67 (in Chinese)
- Ye YZ, Zhang ZJ, Li X, Zhong FD, Huang YH, Mao LT, Xu LX, 2022. Antibacterial metabolites of endophytic *Nigrospora* sp. HU0460 from *Heritiera littoralis*. Journal of Huizhou University, 42(6): 39-43 (in Chinese)
- Zhang HQ, Deng ZS, Guo ZY, Chen JF, Wang JZ, Zou K, 2013. Anthraquinone metabolites from endophytic *Nigrospora* sp. BM-2 and optimization of fermentation medium for high bostrycin production. Journal of Pure and Applied Microbiology, 7(4): 2489-2494
- [附中文参考文献]
- 黄宇虹, 王娟, 陈洪, 许国蓉, 李嘉, 李研, 彭毅, 林永成, 余志刚, 赖小敏, 2011. Bostrycin 的抗结核菌活性及对细菌基因表达的影响. 中国新药杂志, 20(6): 535-539
- 李萍, 张兰, 舒展, 胡鑫垚, 闫静坤, 汪青青, 2017. 琼脂-孔洞扩散法测定物质抑菌活性中相关影响因素的探讨. 中国调味品, 42(8): 47-52
- 黎瑞宏, 2010. 抗肿瘤活性天然产物 bostrycin 的合成. 中山大学硕士论文, 广州. 1-62
- 梁一晨, 2021. 重组大肠杆菌产酪醇发酵优化及代谢改造. 江南大学硕士论文, 无锡. 1-52
- 卢雪欢, 2019. 平阳霉素发酵工艺的初步研究. 浙江工业大学硕士论文, 杭州. 1-66
- 陆勇军, 陈冬妮, 何磊, 余志刚, 林永成, 2017. Bostrycin 在制备酪氨酸磷酸酶结合剂或抑制剂上的应用: CN201310259038.6. 2017-02-08
- 苏林贺, 曾伟民, 张彦龙, 2023. 基于响应面法对黑木耳栽培料中纤维素酶提取及测定条件的优化. 菌物学报, 42(3): 731-744
- 涂松源, 龙玉华, 2016. 天然产物 bostrycin 的全合成. 中国化学会第十一届全国天然有机化学学术会议论文集(第五册), 上海. 435
- 王沫, 揭晶, 王璋倩, 石乐, 韩婷, 2022. 一种以 HCH285 发酵所得的固体产物中提取分离 bostrycin 的方法: CN201910982800.0. 2022-11-04
- 许娟, 徐彦军, 江苏燕, 李伟, 查兴雪, 2024. 基于响应面法对中国皱木耳菌种液体发酵培养基优化. 菌物学报, 43(4): 230259
- 杨倩, 2018. 蕈艾内生菌 HCH285 的卷线孢菌素活性及安全研究. 华中农业大学硕士论文, 武汉. 1-67
- 叶玉珍, 钟志娟, 李馨, 钟富丹, 黄钰涵, 毛露甜, 徐良雄, 2022. 银叶树内生黑孢菌 HU0460 抗细菌活性成分研究. 惠州学院学报, 42(6): 39-43