

# 响应面法优化 paraherquamide A 的发酵工艺

陈晓娜<sup>1</sup>, 彭加飞<sup>2</sup>, 王品美<sup>1</sup>, 徐金钟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江大学海洋学院, 舟山 316000; <sup>2</sup>极致生物技术(杭州)有限公司, 杭州 311121

**摘要:** Paraherquamide A (PA) 作为新型驱虫药 Startect®的重要原料, 其产量制约药物的推广和使用。本研究采用响应面法系统对野生 *Penicillium* sp. KWF31 的 PA 发酵工艺进行优化。通过 Plackett-Burman 设计对培养基的 8 个因素进行筛选, 得到显著影响效价的 3 个关键因素分别是酵母提取物、可溶性淀粉和葡萄糖。进而采用爬坡实验逼近这 3 个关键因素的最大响应区域, 通过 Box-Behnken 设计建立数学模型, 获得产 PA 的最佳条件为可溶性淀粉 31.0 g/L、葡萄糖 12.8 g/L、酵母提取物 14.5 g/L。在此条件下, PA 效价高达 243.7 mg/L, 与预测值 241.6 mg/L 相近, 是优化前的 3.4 倍。

**关键词:** 响应面法; paraherquamide A; 驱虫药; 发酵; 海洋青霉

**中图分类号:** R978.6; TQ463

**文献标识码:** A

## Optimization of fermentation process of paraherquamide A by response surface methodology

CHEN Xiao-na<sup>1</sup>, PENG Jia-fei<sup>2</sup>, WANG Pin-mei<sup>1</sup>, XU Jin-zhong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Oceanography College, Zhejiang University, Zhoushan 316000, China; <sup>2</sup>Jizhi Biotechnology (Hangzhou) Co., Ltd., Hangzhou 311121, China

**Abstract:** Paraherquamide A(PA) is an important raw material for the new anthelmintic drug Startect®, and its low yield limits the promotion and use of the drug. Response surface methodology (RSM) was used to optimize the fermentation process of wild *Penicillium* sp. KWF31 to produce PA. Eight factors of the medium were screened by Plackett-Burman test design. Among them, the dosages of soluble starch, glucose and yeast extract were found to be the key factors. The optimal concentration ranges of the three factors were examined by the steepest ascent path and the Box-Behnken design as 31.0 g/L soluble starch, 12.8 g/L glucose and 14.5 g/L yeast extract, respectively. Under the optimal condition, the maximum titer of PA approached 243.7 mg/L, which was close to the theoretical value of 241.6 mg/L, and 3.4 times of the initial.

**Key words:** response surface methodology; paraherquamide A; anthelmintic; fermentation; marine *Penicillium* fungus

寄生性线虫病是严重影响畜牧业发展的畜禽类寄生虫病<sup>[1]</sup>。目前, 阿维菌素类药物 (ivermectins) 是世界范围内兽医临床上用量最大的抗寄生虫药。但由于该药物的滥用, 许多地区<sup>[2-4]</sup>已出现了耐药虫株。我国在 80 年代末引进并广泛使用该类药物<sup>[5]</sup>, 现国内牧羊胃肠道线虫已对阿维菌素类药物产生了不同程度的耐药性<sup>[6-8]</sup>。Startect®<sup>[9]</sup>是全球最大动物保健药和疫苗公司硕腾 (Zoetis) 开发的新型绵羊口服短效驱虫药, 可有效预防和解决畜禽寄生虫病及其耐药性问题。该药的药效成分是得曲恩特 (derquantel, 10 mg/mL) 和阿维菌素 (1 mg/mL)。Startect®标准剂量为 1 mL/5 kg (药液体积/绵羊体重), 每只 50 kg 的成年绵羊用

药一次约需 0.1 g 得曲恩特。根据联合国粮农组织（FAO）的统计数据，世界绵羊存栏量达到 12 亿只<sup>[10]</sup>，因此，得曲恩特的潜在需求量为百吨级甚至更高，市场需求巨大。

得曲恩特是真菌代谢产物 paraherquamide A（PA）的化学衍生物，由 PA 经酰胺羰基还原、脱氧是目前得曲恩特主要的获取方式（见图 1）<sup>[11]</sup>。因此，得曲恩特的工业原料供应主要受 PA 产量影响。然而，paraherquamide 类天然产物化学结构复杂，虽可通过工业原料异戊二烯或异戊二烯环氧化物化学全合成，但其化学反应步骤多达 46 步<sup>[12]</sup>，成本高，收率极低（2.5%），难以工业化生产。利用微生物发酵生产 PA 是目前大规模获得该化合物的有效途径。PA 最早分离自一株青霉属真菌 *Penicillium paraherquei* 的发酵产物<sup>[13]</sup>，但野生型青霉菌产生的 PA 效价不高，这阻碍了其进一步的实验研究与工业应用。在真菌代谢产物的应用研究中，目标代谢产物的效价水平不仅取决于菌株本身的性能，更重要的是优化发酵培养条件充分发挥其生产能力。目前广泛应用于微生物发酵培养优化的是响应面法<sup>[14-17]</sup>，该方法综合试验设计和数学建模具有试验次数少、周期短、求得回归方程精度高、预测性能好、研究几种因素间交互作用等优点<sup>[18, 19]</sup>。

本课题组在前期工作中发现一株高产 PA 的海洋来源青霉属真菌 KWF31，初期探索在察氏培养基<sup>[20]</sup>下其发酵效价为 55.8±3.7 mg/L，尚未达到工业生产要求。本研究旨在通过 Plackett-Burman 设计、最陡爬坡设计和 Box-Behnken 设计等响应面方法优化菌株 KWF31 的发酵培养基，建立高产且稳定的 PA 生产工艺技术方案。

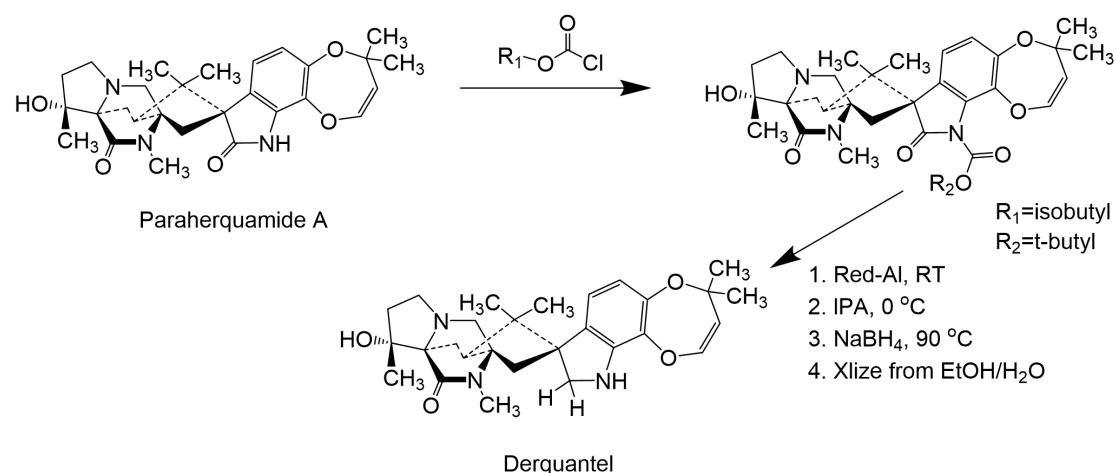


图 1 由 PA 生产得曲恩特的生产工艺流程<sup>[10]</sup>

Fig. 1 The production process of derquantel from PA<sup>[10]</sup>

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和仪器

#### 1.1.1 菌株

*Penicillium* sp. KWF31 是由本课题组从南海深海冷泉区（16°43'43.64"N，

110°28'23.84"E, 深度 1 352 m) 的沉积物中分离、纯化得到的一株海洋真菌, 现保存于浙江大学海洋生物与药物研究所。

#### 1.1.2 试剂

可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KCl}$ 、分析纯甲醇等(国药集团化学试剂有限公司);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (天津市永大化学试剂有限公司); 酵母提取物(yeast extract, YE)(Oxoid); 色谱纯甲醇(百灵威公司)。

#### 1.1.3 仪器

JB-CJ-IFXS 型超净无菌工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司); DHP-9082 型恒温培养箱(上海恒一科技有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司)。

#### 1.1.4 培养基及缓冲液

**硝酸盐母液:** 120.0 g  $\text{NaNO}_3$ , 10.4 g  $\text{KCl}$ , 10.4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 定容至 1.0 L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

**微量元素母液:** 2.2 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.1 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.5 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.16 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.11 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5.0 g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , 定容至 100.0 mL。

GMM 培养基(glucose minimal media): 50.0 mL 硝酸盐母液, 1.0 mL 微量元素母液, 10.0 g 葡萄糖, 800.0 mL ddH<sub>2</sub>O 溶解, 调节 pH 至 6.5, 定容至 1.0 L, 加入琼脂粉 16.0 g, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

GMM+YE 培养基: 在 GMM 培养基的基础上添加 0.5% (W/V) 的酵母提取物, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

察氏液体培养基(Czapek-Dox medium): 蔗糖 30.0 g,  $\text{NaNO}_3$  3.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{KCl}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g, 定容至 1.0 L, pH 自然或 7.0~7.2, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

### 1.2 发酵培养与代谢物提取

孢子悬浮液的制备: 将菌种接种于 GMM+YE 固体培养基中, 在 30 °C 静置培养 4 d, 用无菌 0.1% (V/V) Tween 80 收取孢子, 神奇滤布 Miracloth 过滤菌丝体, 得到新鲜孢子悬浮液, 转移至 4 °C 冰箱备用。

液体发酵培养: 将孢子液以  $10^5$  sp/mL 的发酵初始孢子量接入发酵培养基中, 装液量 50 mL/250 mL, 在 28 °C 静置发酵 12 d。

试样制备: 将菌液与菌体用纱布分离, 菌体加入甲醇 50 mL, 25 °C, 70 W, 超声 30 min,

取超声后上清液 500  $\mu\text{L}$  加入菌液 500  $\mu\text{L}$ ，再加入 1 mL 甲醇混匀，用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后，用高效液相色谱（HPLC）测定 PA 发酵效价。

### 1.3 PA 发酵效价的测定

HPLC 色谱方法：Agilent 1260 HPLC 系统，DAD 检测器，色谱柱：COSMOSIL C18 MS II(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )，检测波长 230 nm，流动相：MeOH/H<sub>2</sub>O 6 : 4，流速：1.0 mL/min，柱温：35  $^{\circ}\text{C}$ 。

标准曲线的绘制：准确配制 0.5、0.25、0.1、0.05、0.025、0.01、0.005 mg/mL 的 PA 标准溶液，用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后通过 HPLC 色谱法进行分析，按上述 HPLC 色谱条件分析测定 PA 的峰面积，以浓度（mg/mL）为横坐标，峰面积（mAU\*s）为纵坐标，进行线性回归拟合，得到 PA 定量标准曲线为： $y=53\ 987.623\ 24x-589\ 236$ ，相关系数  $R^2=0.999\ 96$ ，线性关系良好，可以用于测定 PA 的效价。

### 1.4 响应面设计优化产 PA 培养基

#### 1.4.1 Plackett-Burman 实验设计

前期单因素实验已得到影响 PA 效价的 8 个因素的最佳浓度，在此基础上利用 Plackett-Burman 设计对影响青霉 KWF31 产 PA 的 8 个因素进行筛选，8 个因素为可溶性淀粉、葡萄糖、酵母提取物、NaNO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 和 CoCl<sub>2</sub>，分别编号  $X_1\sim X_8$ ，各因素分别设置两个水平，其中“1”代表高水平，“-1”代表低水平（见表 1）。设计 12 组测试，每组 3 个重复，以 PA 效价为响应值，建立关系式初步确定优化发酵条件，基于显著因子进行 Box-Behnken 实验设计。拟合方程见方程式（1）

$$y = \beta_0 + \beta_i \sum x_i \quad (1)$$

其中  $y$  为响应值，即 PA 效价，mg/L； $\beta_0$  为常量； $\beta_i$  为线性系数； $x_i$  为各影响因素。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experimental design

因素 Factor	编码 Code	水平 Level	
		-1	1
可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	$X_1$	25.0	30.0
葡萄糖 Glucose (g/L)	$X_2$	10.0	12.0
酵母提取物 Yeast extract (g/L)	$X_3$	12.0	15.0
NaNO <sub>3</sub> (g/L)	$X_4$	8.0	10.0
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	$X_5$	1.0	1.5
MnCl <sub>2</sub> (g/L)	$X_6$	0.04	0.06
ZnSO <sub>4</sub> (g/L)	$X_7$	0.04	0.06

因素 Factor	编码 Code	水平 Level	
		-1	1
CoCl <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>8</sub>	0.005	0.008

#### 1.4.2 最陡爬坡实验设计

根据 Plackett-Burman 实验所拟合方程结果, 在得到各显著因素贡献程度之后, 为了确保响应面实验的准确性及可靠性, 需要通过最陡爬坡实验逼近中心点<sup>[21]</sup>。以各显著因子为中心起点, 确定最陡爬坡实验的方向与步长, 通过最陡爬坡实验进一步逼近最优区域进而确定 Box-Behnken 设计的中心点, 根据各效应的正负和大小确定取值, 将正效应值逐步增加, 负效应值逐渐减小<sup>[22]</sup>。

#### 1.4.3 Box-Behnken 实验设计

基于 Plackett-Burman 设计与最陡爬坡设计的结果, 选择影响 PA 效价的 3 个因素及其中心值, 利用 Box-Behnken 设计, 设计 3 因素 3 水平 17 个测试组。每个因素设置高、中、低 3 水平, 分别以“+1”“0”“-1”代表(见表 2), 以 PA 效价为响应值, 应用 Design Expert 8.0.2 拟合二次函数, 以方差分析评估模型拟合效果, 确定最优发酵条件方程 (2)。

$$y = \beta_0 + \beta_i \sum x_i + \beta_{ij} \sum x_i^2 + \beta_{ij} \sum x_i x_j \quad (2)$$

其中  $y$  为响应值, 即 PA 效价, mg/L;  $x_i$  和  $x_j$  均为编码变量,  $\beta_0$  为截距,  $\beta_i$ 、 $\beta_{ii}$  和  $\beta_{ij}$  分别为一次项、二次项和交互项系数。

表 2 Box-Behnken 实验设计

Table 2 Design of the Box-Behnken experiment

因素 Factor	编码 Code	水平 Level		
		-1	0	1
可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	X <sub>1</sub>	29.0	30.0	31.0
葡萄糖 Glucose (g/L)	X <sub>2</sub>	12.8	13.5	14.2
酵母提取物 Yeast extract (g/L)	X <sub>3</sub>	14.0	14.5	15.0

#### 1.5 结果验证和数据统计分析

所有实验设 3 个平行, 采用 Microsoft Excel 2 016 对实验数据进行统计与分析, 所得结果以平均值±标准差表示。采用 Design-Expert 8.0.2 软件<sup>[23]</sup>进行响应面实验设计和解析, 并绘制各显著因素间相互关系的响应面图和等高线图。\* $P < 0.05$  和 \*\* $P < 0.01$  分别表示差异显著和差异极显著。用优化后的培养基进行验证, 实验重复 3 次, 每次 3 个平行, 结果取平均值, 判断多元回归模型的可靠性与准确性, 进而获得最终优化方案。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 实验设计

Plackett-Burman 设计法是一种针对因子数较多的两水平的实验设计方法，可快速有效地从所考察的众多因素中将对实验结果影响具有显著性的几个重要因素筛选出来<sup>[24]</sup>。Plackett-Burman 实验设计中，12 个组的 PA 效价在 192.5~248.0 mg/L 的范围内波动，其中第 7 组实验的效价最低，第 3 组实验的效价最高（见表 3）。将实验所得的数据利用 Design expert 软件回归分析后得多元一次回归方程（3）如下。

$$Y=221.77+9.63X_1+5.55X_2+11.62X_3+2.31X_4+2.14X_5-4.57X_6+1.55X_7+0.12X_8 \quad (3)$$

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Design and results of Plackett-Burman design ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

试验号 No.	变量水平 Variable level								效价 Potency (mg/L)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	220.4±3.7
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	234.3±0.5
3	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	248.0±6.7
4	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	218.1±8.9
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	207.9±2.1
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	215.3±4.6
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	192.5±6.6
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	221.7±13.3
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	230.1±11.3
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	193.0±3.0
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	246.0±15.0
12	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	234.1±2.5

注： $X_1$ ~ $X_8$  所对应的因素详见表 1。

Note: The corresponding factors of  $X_1$ - $X_8$  are detailed in Table 1.

以 PA 效价为评价指标对该模型进行方差分析及模型系数进行显著性检验（见表 4）。该回归模型的  $P$  值（0.024 3） $<0.05$ ，表明该模型显著，即该模型在被研究的整个回归区域的拟合度良好，有统计学意义；决定系数  $R^2=0.975 3>0.9$ ，说明实验相关性比较好；校正决定系数  $R^2_{(adj)}=0.909 5$ ，表示此回归模型能解释 90.95% 的响应值的变化。由实验显著性分析结果可知，对 PA 效价影响显著的因素依次为酵母提取物  $X_3$ （ $P=0.005 1$ ）、可溶性淀粉  $X_1$ （ $P=0.008 7$ ）、葡萄糖  $X_2$ （ $P=0.038 4$ ），而其他 5 个因素的  $P$  值均大于 0.05，对效价没有显著的影响，因此选择这 3 个显著因素进行进一步的优化。

表 4 Plackett-Burman 实验方差分析结果

Table 4 ANOVA for Plackett-Burman design

方差来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
------	-----	-----	----	-------	-------

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
模型 Model	3 501.86	8	437.73	14.82	0.024 3*
$X_1$	1 113.04	1	1 113.04	37.68	0.008 7**
$X_2$	370.19	1	370.19	12.53	0.038 4*
$X_3$	1 619.60	1	1 619.60	54.83	0.005 1**
$X_4$	64.26	1	64.26	2.18	0.236 7
$X_5$	54.74	1	54.74	1.85	0.266 6
$X_6$	251.08	1	251.08	8.50	0.061 7
$X_7$	28.80	1	28.80	0.97	0.396 2
$X_8$	0.17	1	0.17	0.005 609	0.945 0
残差 Residual	88.61	3	29.54	-	-
总离差 Cor total	3 590.48	11	-	-	-

注: \*\* $P < 0.01$ , 差异极显著; \* $P < 0.05$ , 差异显著,  $R^2 = 0.975 3$ ,  $R^2_{(adj)} = 0.909 5$ 。

Note: \*\* $P < 0.01$ , highly significant difference; \* $P < 0.05$ , significant difference,  $R^2 = 0.975 3$ ,  $R^2_{(adj)} = 0.909 5$ .

## 2.2 最陡爬坡实验设计

通过 Plackett-Burman 实验设计筛选到影响海洋真菌 KWF31 产 PA 显著影响因素有酵母提取物、可溶性淀粉、葡萄糖, 且均为正效应, 因此适当提高浓度会增强 PA 效价。以这三个显著因素为考察对象, 按照软件 Design expert 8.0.2 所拟合的多元一次方程式 (3) 中各因素的效应系数并结合前期单因素实验结果的经验值来设计爬坡步长, 以可溶性淀粉 25.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, 酵母提取物 12.0 g/L 为初始起点设计实验, 结果显示, PA 的效价在初始值增加 5 个步长时, 达到了最高值, 发酵效价可达到 257.6 mg/mL, 相比初始实验组 0 号, 发酵效价进一步提高了 12.3%, 这与之前 Plackett-Burman 实验结果的预期相符合, 故将第 5 组的条件作为响应面实验的中心点 (见表 5)。

表 5 最陡爬坡实验设计及结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 5 Design and results of steepest ascent ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

试验号	可溶性淀粉	葡萄糖	酵母提取物	效价
No.	Soluble starch (g/L)	Glucose (g/L)	Yeast extract (g/L)	Potency (mg/L)
0	25.0	10.0	12.0	229.3±5.5
1	26.0	10.7	12.5	224.0±7.1
2	27.0	11.4	13.0	231.5±4.0
3	28.0	12.1	13.5	231.1±5.3
4	29.0	12.8	14.0	227.8±7.1
5	30.0	13.5	14.5	257.6±10.1
6	31.0	14.2	15.0	249.7±3.6

## 2.3 Box-Behnken 实验设计

根据最陡爬坡实验结果, 以 30.0 g/L 可溶性淀粉、13.5 g/L 葡萄糖, 14.5 g/L 酵母

提取物作为响应面实验设计的中心点，进一步通过 Box-Behnken 设计对这 3 个因素的浓度进行优化，每个因素各取 3 水平，实验设计与结果见表 6。

PA 效价的变化范围为 191.4~240.1 mg/L，第 11 组的效价最高为 240.1 mg/L，其添加量为可溶性淀粉 31.0 g/L，葡萄糖 14.2 g/L，酵母提取物 14.5 g/L。借助统计分析软件 Design expert 8.0.2 表 6 中的实验数据进行回归拟合，以 PA 效价 ( $Y$ ) 为因变量，可溶性淀粉 ( $X_1$ )、葡萄糖 ( $X_2$ ) 和酵母提取物 ( $X_3$ ) 的浓度为自变量，获得多元回归方程 (4)：

$$Y=215.49+11.5X_1+1.06X_2+0.85X_3-4.23X_1X_2-3.53X_1X_3+0.94X_2X_3+7.79X_1^2+3.48X_2^2-14.94X_3^2 \quad (4)$$

表 6 Box-Behnken 设计与实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Box-Behnken design and experimental results ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

试验号 No.	变量水平 Variable level			效价 Potency (mg/L)
	$X_1$ -可溶性淀粉 Soluble starch (g/L)	$X_2$ -葡萄糖 Glucose (g/L)	$X_3$ -酵母提取物 Yeast extract (g/L)	
	1	0	1	
2	0	-1	1	207.4±8.8
3	0	0	0	222.9±10.3
4	0	0	0	211.3±13.7
5	1	-1	0	235.9±4.8
6	0	0	0	224.2±10.1
7	-1	1	0	226.1±4.2
8	-1	0	1	201.7±11.3
9	0	1	1	200.8±1.2
10	0	0	0	213.4±13.8
11	1	1	0	240.1±5.5
12	0	-1	-1	209.1±9.7
13	-1	0	-1	191.4±11.7
14	1	0	1	218.2±15.4
15	0	0	0	205.7±6.2
16	-1	-1	0	204.9±4.4
17	1	0	-1	222.0±6.8

从模型系数显著性检验可以看出 (见表 7)：因素  $X_1$  ( $P<0.001$ ) 对 KWF31 产 PA 的影响线性效应极显著，二次项  $X_3^2$  ( $P<0.001$ ) 影响极显著，因素  $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$  和  $X_2X_3$  ( $P>0.05$ ) 交互影响不显著。3 个因素对 PA 效价的影响顺序： $X_1>X_2>X_3$ ，即可溶性淀粉>葡萄糖>酵母提取物。以 PA 效价为评价指标对该模型进行方差分析，回归模型在统计学上呈显著 ( $P=0.0439<0.05$ )，说明实验模型有统计学意义；失拟项  $P=0.4105>0.05$ ，



不显著，说明实验模型拟合度较好。本实验  $R^2=0.8329$ ，这表明 83.29% 的实验结果可以用该模型解释，拟合程度与实际情况基本相符。

表 7 回归模型的方差分析

Table 7 ANOVA of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
模型 Model	2 384.82	9	264.98	3.88	0.043 9*
$X_1$	1 057.54	1	1 057.54	15.47	0.005 6**
$X_2$	8.97	1	8.97	0.13	0.727 9
$X_3$	5.83	1	5.83	0.085	0.778 7
$X_1X_2$	71.49	1	71.49	1.05	0.340 5
$X_1X_3$	49.91	1	49.91	0.73	0.421 1
$X_2X_3$	3.5	1	3.5	0.051	0.827 5
$X_1^2$	255.41	1	255.41	3.74	0.094 5
$X_2^2$	51.02	1	51.02	0.75	0.416 2
$X_3^2$	940.31	1	940.31	13.76	0.007 6**
残差 Residual	478.4	7	68.34	-	-
失拟项 Lack of fit	228.75	3	76.25	1.22	0.410 5
净误差 Pure error	249.64	4	62.41	-	-
总离差 Cor total	2 863.22	16	-	-	-

注：\*\* $P<0.01$ ，差异极显著；\* $P<0.05$ ，差异显著， $R^2=0.8329$ 。

Note:\*\* $P<0.01$ , highly significant difference; \* $P<0.05$ , significant difference,  $R^2=0.8329$ .

#### 2.4 三个因素交互作用对 PA 效价影响的等高线图和响应曲面

响应面曲面图和等高线图能直观反映各因素间的交互作用，对响应值影响的显著程度。曲面图越陡表示交互作用越强，曲面图越平则表示交互作用越弱；等高线越接近椭圆形则表示因素间交互影响越显著，圆形则表示交互作用影响不显著<sup>[25]</sup>。

可溶性淀粉和葡萄糖浓度交互作用响应面曲面图坡度较为陡峭，表明可溶性淀粉和葡萄糖的浓度对 PA 效价影响较强（见图 2a）。当葡萄糖浓度不变时，随着可溶性淀粉浓度的增加，PA 效价明显增加，可溶性淀粉浓度的变化对 PA 效价的影响显著；当可溶性淀粉浓度不变时，PA 效价变化平缓，表明葡萄糖浓度的变化对 PA 效价的影响不明显。从等高线图可以看出，可溶性淀粉的浓度对 PA 效价影响比葡萄糖大，等高线有呈现椭圆的趋势但不明显，表明两个因素之间的交互作用不太显著（见图 2b）。

可溶性淀粉和酵母提取物浓度交互作用响应面曲面图坡度较陡，表明可溶性淀粉和酵母提取物的浓度对 PA 效价影响较强（见图 2c）。当可溶性淀粉浓度不变时，PA 效

价随着酵母提取物浓度的增加呈现先上升后下降的变化趋势,当酵母提取物浓度为 14.5 g/L 时, PA 效价达到最高值,之后随着其浓度增加,效价减低,但总体变化趋势相对缓慢,表明酵母提取物浓度对 PA 效价有影响但不显著。从等高线图可以看出,可溶性淀粉的浓度对 PA 效价影响比酵母提取物大,两个因素之间的交互作用不显著(见图 2d)。葡萄糖和酵母提取物添加量交互作用响应面曲面图坡度较平缓,对 PA 效价影响不显著(见图 2e、2f)。

通过对等高线图和响应面图结果的综合分析,并结合统计软件 Design-Expert 8.0.2 对数据的运算处理和响应值预测,该模型的最优解为 (31.0, 12.8, 14.5),即可溶性淀粉 31.0 g/L、葡萄糖 12.8 g/L、酵母提取物 14.5 g/L,在此条件下 PA 最大的预测效价为 241.6 mg/L。为了检验响应面优化模型及优化效果的可靠性与准确性,对预测的优化条件进行验证。采用所预测的最优培养基配方,对菌株 KWF31 进行发酵培养,做 3 次重复实验,每次设置 3 个平行,得到 PA 实际效价均值为  $243.7 \pm 6.9$  mg/L,与预测值相对误差小于 1%,表明该方程与实际情况拟合良好,相应优化模型真实可行,与优化前 ( $55.8 \pm 3.7$  mg/L) 相比,PA 的发酵效价提高了 3.4 倍,具有指导工业生产的实用价值。

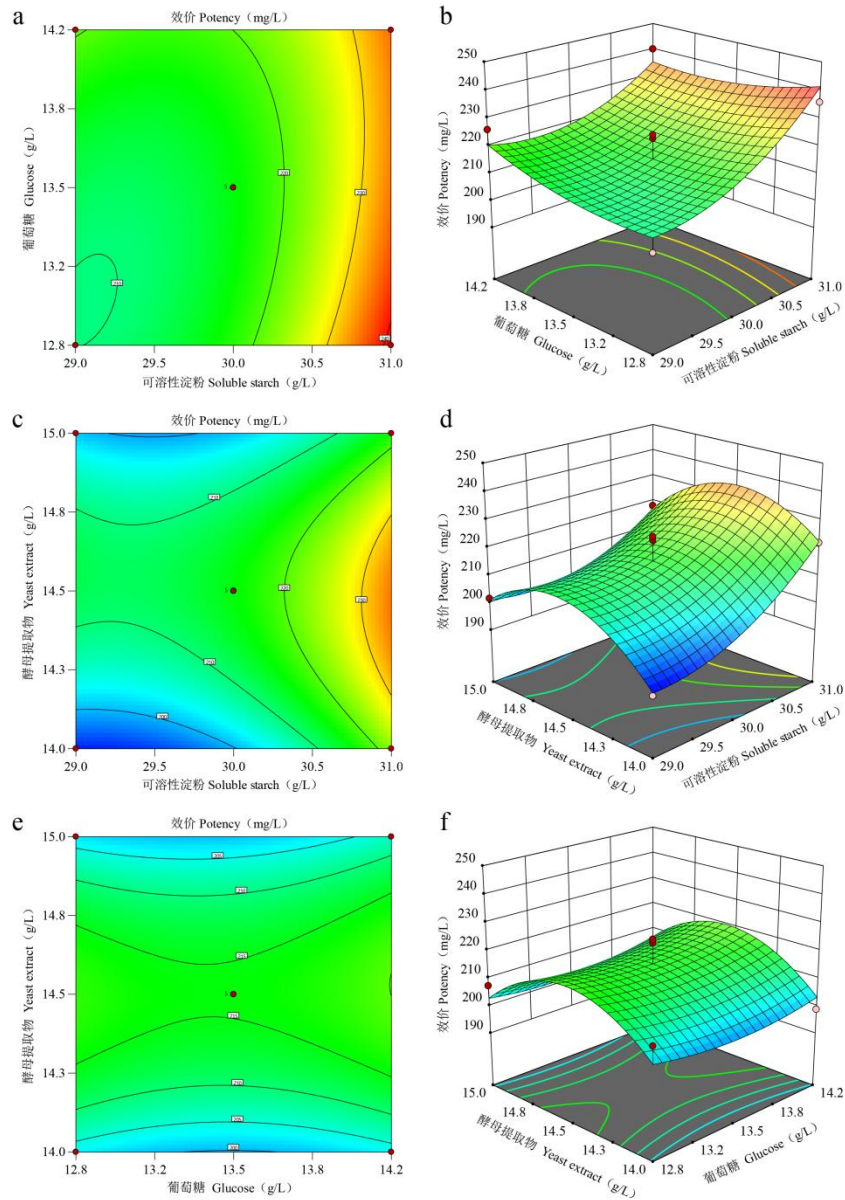


图2 可溶性淀粉、葡萄糖和酵母提取物含量交互作用对 PA 效价影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface plot and contour line of the combined effects of interaction between soluble starch , glucose and yeast extract content on PA potency

### 3 讨论与结论

PA 是一种异戊烯基吲哚类生物碱，不仅具有独特的化学结构，还具有良好抗虫活性，是合成商业化抗虫剂得曲恩特的原料，具有极高的市场价值和庞大的市场需求。但野生型青霉菌株 PA 产量低，而化学合成步骤多且收率低，难以满足市场需求。本研究采用 Plackett-Burman 设计从 8 个因素中筛选出了显著影响野生菌株 KWF31 摇瓶水平发酵生产 PA 的 3 个培养基组分：可溶性淀粉、葡萄糖和酵母提取物；采用爬坡实验和 Box-Behnken 设计逐步优化了它们的浓度。优化后的最佳浓度分别为可溶性淀粉 31.0 g/L、葡萄糖 12.8 g/L、酵母提取物 14.5 g/L。在该培养基中，野生菌株 KWF31 在摇瓶水平发酵生产 PA 的

效价高达 243.7 mg/L, 与优化前 (55.8 mg/L) 相比, 发酵效价提高了 3.4 倍。本研究建立的基于海洋青霉属真菌 KWF31 发酵生产 PA 的工艺重现性好, 稳定可控。在此基础上进一步开发工业化发酵工艺, 为我国新型抗线虫农药的开发奠定基础, 对促进我国畜牧养殖业的健康发展具有重要理论与实践意义。

#### 参考文献

- 1 Morgan ER,van Dijk J.Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe[J].Vet Parasitol,2012,189:8-14.
- 2 Suter RJ,Besier RB,Perkins NR,et al.Sheep-farm risk factors for ivermectin resistance in *Ostertagia circumcincta* in Western Australia[J].Prev Vet Med,2004,63:257-269.
- 3 McMahan C,Edgar H,Barley JP,et al.Control of *Nematodirus* spp.infection by sheep flock owners in Northern Ireland[J].Ir Vet J,2017,70:31.
- 4 Anziani OS,Suarez V,Guglielmo AA,et al.Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina[J].Vet Parasitol,2004,122:303-306.
- 5 Zhang M.A new type of highly effective and broad-spectrum insecticidal acaricide—avermectin[J].Agrochemicals(农药),1998,37:36-37.
- 6 Luo X,Ao D,Zhan S,et al.The study of anthelmintic effect on gastrointestinal nematodes of sheep by three current anthelmintics in Inner Mongolia[J].Chin J Vet Med(中国兽医杂志),2017,53:35-37.
- 7 He X,Gong Q,Qi L,et al.Comparative study on gastrointestinal nematode infection and deworming effects of commonly used anthelmintics in sheep in some area of the Inner Mongolia[J].J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报),2020,51:63-69.
- 8 E Y,Cao Z,Hai Y,et al.Studies on infections and drug resistance of gastrointestinal nematodes in sheep in Uxin Banner[J].Chin Vet Sci(中国兽医科学),2018,48(06):735-742.
- 9 Lee BH,Clothier MF,Dutton FE,et al.Marcfortine and paraherquamide class of anthelmintics:discovery of PNU-141962[J].Curr Top Med Chem,2002,2:779-793.
- 10 Kilic I,Simsek E,Yaslioglu E,et al.Air quality measurements in four sheep barns part II:pollutant gas emissions[J].Environ Sci Pollut Res Int,2021,28:19064-19078.
- 11 Michael AM,Michael FL,Michael FV.Process development and preparation of 2-deoxyparaherquamide:implementation of a selective reduction of secondary amides on a kilogram scale[J].Org Process Res Dev,2002,6:192-196.
- 12 Williams RM,Cao J,Tsujishima H,et al.Asymmetric, stereocontrolled total synthesis of paraherquamide A.[J].J Am Chem Soc,2003,125:12172-12178.
- 13 Yamazaki M,Okuyama E,Kobayashi M,et al.The structure of paraherquamide,a toxic metabolite from *Penicillium paraherquei*[J].Tetrahedron Lett,1981,22:135-136.
- 14 Box GEP,Wilson KB.On the experimental attainment of optimum conditions[J].J R Stat Soc B,1951,13:1-38.
- 15 He W,Li J,Bao K,et al.Optimization of culture medium for a high performance amylaseproducing *Bacillus koreensis* by response surface methodology[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1425-1433.
- 16 Sumaira G,Muhammad S,Rubina A,et al.Response surface optimization of prodigiosin production by mutagen-treated *Serratia marcescens* in different growth media[J].Pharmacogn Mag,2020,16:99.
- 17 Rabiya R,Sen R.Artificial intelligence driven advanced optimization strategy vis-à-vis response surface optimization of production medium:bacterial exopolysaccharide production as a case-study[J].Biochem Eng

- J,2022,178:178.
- 18 Li L,Zhang S,He Q,et al.Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J].Res Explor Lab(实验室研究与探索),2015,34:41-45.
  - 19 Guo J,Li Y,Fan Z,et al.Extraction technology optimization of dietary fiber from *Hippophae rhamnoides* pomace by response surface methodology and the evaluation of its application properties[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2022,34:1181-1188.
  - 20 Banks RM,Blanchflower SE,Reading C.Paraherquamide derivatives,precursor thereof,processes for their preparation,microorganism used and their use as antiparasiti:WO9222555[P].1992-12-23..
  - 21 Hu N,Wu X,Qiu S,et al.Optimization of Tannase Production from Waste Tea Extract from *Asp. niger* B1401[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2018,39:205-212.
  - 22 Zohra K,Baida DH,Saida H,et al.Optimization of split pea and dry figs-based media for the growth of *Lactobacillus plantarum* through Plackett-Burman and response surface methodological approaches[J].Pak J Biol Sci,2015,18:122-128.
  - 23 Alben KT.Books and software:design,analyze,and optimize with Design-Expert[J].Anal Chem,2002,74:222A-223A.
  - 24 Zhang W,Guo J.Research advances in microbial fermentation process optimization[J].Guangdong Agric Sci(广东农业科学),2013,40:114-117.
  - 25 Qi H,Wang Z,Peng Y,et al.Optimization of acetic fermentation process of buckwheat vinegar by response surface methodology[J].China Brew(中国酿造),2022,41:159-163.

收稿日期: 2022-11-04 接受日期: xxxx-xx-xx

基金项目: 舟山市校合作联合专项(2021C81004); 海南省自然科学基金(321QN273)

\*通信作者 Tel: 15858168018; E-mail: xujinzhong@zju.edu.cn