

文章编号: 1674-7054(2012)03-0236-07

海南粗榧内生真菌细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的发酵条件

刘 艳, 刘四新, 李永成, 李从发

(海南大学 食品学院 海南 海口 570228)

摘 要: 以海南粗榧内生真菌细极链格孢 CH1307 发酵产高三尖杉酯碱的产量为指标, 采用响应曲面法分析葡萄糖质量浓度、硫酸镁质量浓度、复合维生素 B 质量浓度及摇床转速对该菌株液态发酵的影响。结果表明, 细极链格孢 CH1307 液态发酵产高三尖杉酯碱的关键因子值分别为葡萄糖 $32.0226 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $0.0966 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 复合维生素 B $0.1239 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 转速 $146.4742 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时 CH1307 发酵最好, 代入方程的 HHRT 产量为 $190.6370 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 细极链格孢; 发酵条件; 高三尖杉酯碱; 海南粗榧

中图分类号: Q 93; R 9

文献标志码: A

高三尖杉酯碱(Homoharringtonine, HHRT)是以四骈环为母体的含氮生物碱类化合物, HHRT 是我国独创的抗肿瘤药物, 对治疗骨髓性^[1]、粒细胞性白血病^[2-3]、乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、肝癌^[6]、淋巴细胞^[7]、疟疾^[8]等疾病具有较好的疗效, 目前在临床上已被广泛应用。HHRT 生物碱在海南粗榧的树皮中有相对较高的含量^[9-10], 但海南粗榧生长缓慢, 且因人们的肆意砍伐濒临灭绝, 因此药源不足成为高三尖杉酯碱在临床应用的瓶颈。有研究发现, 海南粗榧内生真菌具有组织专一性^[11-13], 且生物活性显著^[14], 药用价值极高。从药用植物中分离内生真菌, 并利用内生真菌生产药用价值高的次级代谢产物是解决药源不足的一种有效、可行的途径。本实验室已从海南粗榧中分离得到 1 株产高三尖杉酯碱的菌株, 经鉴定为链格孢属细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)。为提高细极链格孢的产碱能力, 笔者以实验室前期自主选育的细极链格孢 CH1307 为研究对象, 考察环境因子对其表达产碱的影响, 并优化其发酵工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 海南粗榧内生真菌细极链格孢 CH1307(*Alternaria tenuissima*) 由本实验室分离获得; 高三尖杉酯碱标准品 购自中国药品生物制品检定所; 色谱级甲醇 购自美国 Tedia 公司; 其他试剂为国产 AR 级或 BR 级商品试剂。

1.2 仪器与设备 德国 Agilent 公司生产的 Agilent1200 高效液相色谱系统 配有可变波长紫外检测器和 Agilent1200 色谱工作站; 梅特勒-托利多集团生产的 PB303-N 电子精密天平; 广东省医疗器械厂生产的 LRH-250S 恒温恒湿培养箱; 梅特勒-托利多仪有限公司生产的 Delta 320-S pH 测定仪。

1.3 培养基及培养方法

1.3.1 种子培养基^[15] 蔗糖 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硝酸钠 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸氢二钾 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钾 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸亚铁 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 水 1000 mL , pH5.0, 121°C 灭菌 20 min。

1.3.2 发酵培养基 蔗糖 $30.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硝酸钠 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 磷酸氢二钾 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钾 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸亚铁 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 水 1000 mL , 自然 pH, 121°C 灭菌 20 min。

收稿日期: 2012-05-07

基金项目: 科技部中泰长期合作研究开发项目资助(18-514J)

作者简介: 刘艳(1987-), 女, 湖南岳阳人, 海南大学食品学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 李从发, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: congfa@vip.163.com

1.3.3 摇瓶培养方法 将保存于 4 ℃ 下斜面菌种的菌丝 ,接种于预装有种子培养基 100 mL 的 250 mL 三角瓶中 ,在 28 ℃ ,160 r · min⁻¹ 条件下 ,恒温振荡培养 48 ~ 60 h ,制成发酵用的种子液。按照 2% 的接种量转接入预装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中 ,在 25 ℃ ,160 r · min⁻¹ 条件下 ,恒温振荡培养 8 d。提取 HHRT ,并用 HPLC 法测定 HHRT 的含量。

1.4 高三尖杉酯碱(HHRT)的提取方法

1.4.1 胞外 HHRT 的提取 完成发酵的培养基 ,经减压抽滤后分离出菌体和发酵液 ,发酵液在 50 ℃ 下减压浓缩至 20 mL ,用酒石酸调节 pH 值至 3^[16] ,静置后过滤 ,滤液用浓氨水调节 pH 值至 10 ,再经氯仿萃取 4 次 ,40 ℃ 减压浓缩蒸干 ,得到高三尖杉酯碱类提取物。将获得的生物碱用 1 mL 色谱级甲醇定容 ,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后 ,进行 HPLC 检测。

1.4.2 胞内 HHRT 的提取 完成发酵的培养基 ,经减压抽滤后分离出菌体和发酵液。将菌丝体充分剪碎 ,在碱性条件下 ,经甲醇浸泡 12 h 后 ,用超声波细胞破碎仪提取 3 min ,破坏菌丝体的细胞壁 ,静置提取 24 h 后过滤 ,滤液减压浓缩蒸干 ,得到高三尖杉酯碱类提取物。将获得的生物碱用 1 mL 色谱级甲醇定容 ,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后 ,进行 HPLC 检测。

1.5 HPLC 色谱检测条件^[17-18] ZERBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm ,10 μm) ;流动相为 V_{0.02 mol · L⁻¹乙酸铵} : V_{甲醇} = 11 : 9;柱温为 25 ℃ ;检测波长为 288 nm;进样量为 10 μL;流速为 1.0 mL · min⁻¹。

1.6 各因素对细极链格孢 CH1307 发酵产 HHRT 的影响

1.6.1 最适碳源浓度的筛选 选用 10 ,15 ,20 ,25 ,30 ,35 g · L⁻¹ 的葡萄糖替代发酵培养基中的蔗糖 ,分别配制成不同碳源浓度的发酵培养基^[19] ,按摇瓶培养方法进行 CH1307 发酵。提取 HHRT 生物碱 ,并通过 HPLC 测定 HHRT 的含量 ,确定最适碳源浓度。

1.6.2 最适无机盐浓度的筛选 分别添加 0.5 ,1.0 ,1.5 g · L⁻¹ 的 K₂HPO₄; 0.1 ,0.5 ,1.0 g · L⁻¹ 的 MgSO₄; 0.1 ,0.5 ,1.0 g · L⁻¹ 的 KCl; 0.1 ,0.5 ,1.0 g · L⁻¹ 的 CaSO₄; 0.5 ,1.0 ,1.5 g · L⁻¹ 的 NaNO₃ 于仅含碳氮源的发酵培养基中;待发酵完成后 ,提取 HHRT 生物碱 ,并通过 HPLC 测定 HHRT 的含量 ,确定最佳无机盐种类及浓度。

1.6.3 最适生长因子的筛选 在发酵培养基中 ,分别添加 10 mg · L⁻¹ 维生素 B₁ ,维生素 B₂ ,维生素 B₆ ,维生素 C ,维生素 PP ,100 mg · L⁻¹ 复合维生素 B^[20] ;待发酵结束后 ,提取 HHRT 生物碱 ,并通过 HPLC 测定 HHRT 的含量 ,确定最佳维生素种类及浓度。

1.6.4 最适摇床转速的筛选 摇床转速设定 6 个梯度: 80 ,100 ,120 ,140 ,160 ,180 r · min⁻¹^[21] 。发酵 8 d 后 ,提取 HHRT 生物碱 ,并通过 HPLC 测定 HHRT 的含量 ,确定最适摇床转速。

1.6.5 利用响应曲面法优化液态发酵条件 为了得到细极链格孢 CH1307 发酵产高三尖杉酯碱的最佳条件 ,参考以上单因素的实验结果 ,设定碳源浓度(葡萄糖 X₁)、无机盐(硫酸镁 X₂)、生长因子(复合维生素 B X₃)及摇床转速(X₄) 4 个因素为关键因素 ,运用响应曲面法对上述 4 个因素做进一步优化(见表 1) 。

表 1 因素和水平

水平	因 素			
	X ₁ /(g · L ⁻¹)	X ₂ /(g · L ⁻¹)	X ₃ /(g · L ⁻¹)	X ₄ /(r · min ⁻¹)
-1	28	0.05	0.05	130
0	34	0.10	0.125	145
1	40	0.15	0.20	160

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 碳源浓度对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响 由图 1 可知 ,高三尖杉酯碱的含量先是随着葡萄糖质量浓度的增加而递增 ,当葡萄糖的质量浓度为 30 g · L⁻¹ 时 ,无论是细胞的菌丝生长量还是总高三尖杉酯碱的产量均为最高值 ,故 30 g · L⁻¹ 的葡萄糖是细极链格孢 CH1307 生长及发酵产高三尖杉酯碱的最佳碳源浓度。

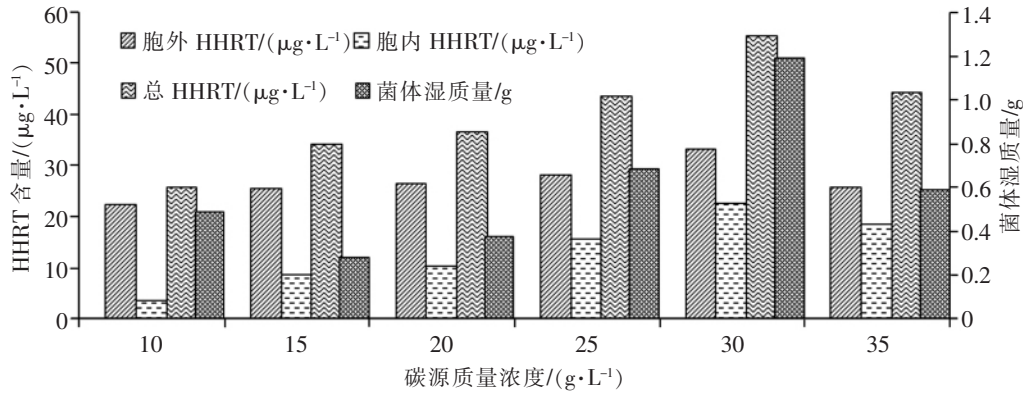


图1 碳源质量浓度对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响

2.1.2 无机盐离子对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响 图2表明5种无机盐对细极链格孢 CH1307 菌丝体生长的影响差别不大,但对菌体产 HHRT 能力的影响却各不相同,其中 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K_2HPO_4 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 能显著地提高细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的水平。这几种无机盐的离子作为关键酶的重要组成部分或关键酶的激活剂而参与到合成高三尖杉酯碱的代谢途径中,其中 Mg^{2+} 的作用较明显。

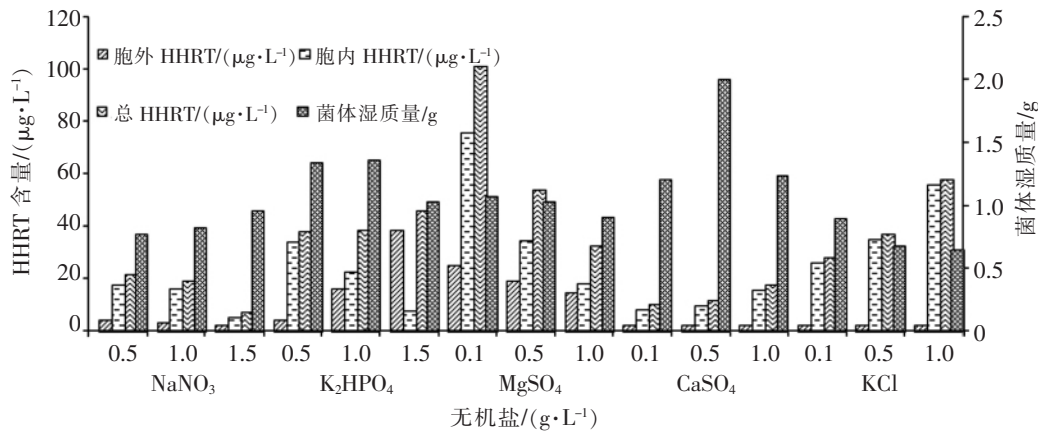


图2 无机盐离子对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响

2.1.3 生长因子对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响 维生素可加快细极链格孢的生长速率,使细胞提前进入快速生长期。由图3可知,在各处理中,胞内 HHRT 的产量均明显高于胞外的,虽然维生素在一定程度上能加快菌丝体的增长及促使高三尖杉酯碱的形成,但却增加了分离纯化的难度。

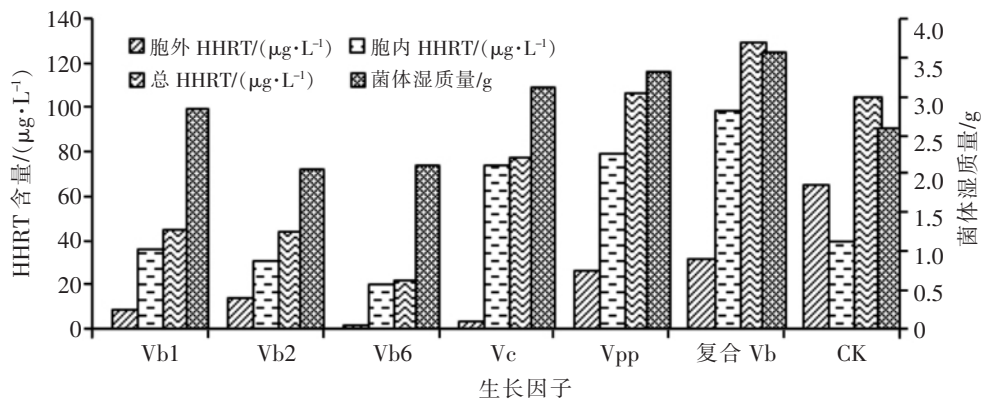


图3 生长因子对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响

2.1.4 转速对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响 从图 4 可看出 转速对细极链格孢的生长及产碱影响比较大 转速在 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 以下时 生长量及产碱量都很低; 转速在 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时 产碱量也不高; 转速在 $140,160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时 较适宜细极链格孢 CH1307 的细胞生长及产碱 其中转速 $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 为最佳条件。由此可知 过高或过低的溶氧量都不利于微生物的生长及代谢。

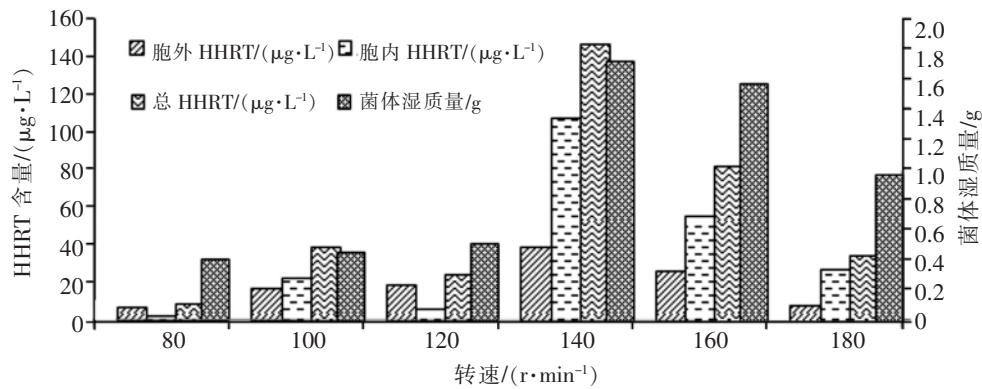


图 4 转速对细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱的影响

2.2 响应曲面法优化细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱发酵条件

2.2.1 响应面实验结果及模型的建立 对葡萄糖、硫酸镁、复合 Vb 及转速进行 4 因素 3 水平的中心组合实验 以高三尖杉酯碱的总产量为响应值 经回归拟合后 确定函数的表达式。实验结果见表 2 ,方差分析见表 3。

表 2 响应曲面实验设计与结果

试验号	葡萄糖/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	硫酸镁/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	复合 Vb/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	转速/($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	总产量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	-1	-1	0	0	167.7
2	-1	1	0	0	165.4
3	1	-1	0	0	146.1
4	1	1	0	0	138.2
5	0	0	-1	-1	89.3
6	0	0	-1	1	115.6
7	0	0	1	-1	98.8
8	0	0	1	1	120.1
9	-1	0	0	-1	127.2
10	-1	0	0	1	139.4
11	1	0	0	-1	105
12	1	0	0	1	123.6
13	0	-1	-1	0	110.6
14	0	-1	1	0	100.5
15	0	1	-1	0	94.2
16	0	1	1	0	105.7
17	-1	0	-1	0	132.3
18	-1	0	1	0	118.6
19	1	0	-1	0	104.7
20	1	0	1	0	96.2
21	0	-1	0	-1	112.4
22	0	-1	0	1	124.3
23	0	1	0	-1	94.7
24	0	1	0	1	111.2
25	0	0	0	0	193.6
26	0	0	0	0	188.4
27	0	0	0	0	182.5

表 3 回归方程的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	<i>F</i>	<i>Pr</i> > <i>F</i>
X_1	1	1559.52	1559.52	9.184197	0.010456
X_2	1	227.07	227.07	1.337242	0.270024
X_3	1	3.853333	3.853333	0.022693	0.882761
X_4	1	950.52	950.52	5.597724	0.035663
$X_1 \times X_1$	1	1530.774	1530.774	9.014907	0.011016
$X_1 \times X_2$	1	7.84	7.84	0.046171	0.833474
$X_1 \times X_3$	1	6.76	6.76	0.03981	0.845193
$X_1 \times X_4$	1	10.24	10.24	0.060305	0.810165
$X_2 \times X_2$	1	4367.539	4367.539	25.72095	0.000274
$X_2 \times X_3$	1	116.64	116.64	0.686907	0.423398
$X_2 \times X_4$	1	5.29	5.29	0.031153	0.862842
$X_3 \times X_3$	1	14237.04	14237.04	83.84359	0.0001
$X_3 \times X_4$	1	6.25	6.25	0.036807	0.851067
$X_4 \times X_4$	1	9539.12	9539.12	56.177	0.0001
模型	14	21452.49	1532.321	9.024016	0.000248
线性回归	4	2740.963	685.2408	4.035464	0.0267
平方项	4	18558.51	4639.626	27.32331	0.0001
交互项	6	153.02	25.50333	0.150192	0.985387
误差	12	2037.657	169.8047		
失拟项	10	1975.97	197.597	6.406474	0.142475
纯误差	2	61.68667	30.84333		
合计	26	23490.15			

运用 Design Expert 软件,对表 2 中的数据进行多元回归拟合,得到葡萄糖、硫酸镁、复合 Vb、转速与高三尖杉酯碱的多项回归方程,其回归方程为

$$Y_1 = 188.1667 - 11.4X_1 - 4.35X_2 - 0.566667X_3 + 8.9X_4 - 16.94167X_1^2 - 1.4X_1X_2 + 1.3X_1X_3 + 1.6X_1X_4 - 28.61667X_2^2 + 5.4X_2X_3 + 1.15X_2X_4 - 51.66667X_3^2 - 1.25X_3X_4 - 42.29167X_4^2$$

由表 3 可知,模型的一次项 X_1 、 X_4 显著, X_2 、 X_3 不显著,二次项 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 极显著, X_1^2 显著,这表明各影响因素与响应值之间不是简单的线性关系。方程的 *F* 值为 9.02, *Pr* > *F* 值为 0.000248 < 0.001,说明此回归模型极显著,这种实验方法是可靠的。失拟项 *P* = 0.142475 > 0.05,不显著,复相关系数 R^2 = 0.9133,说明拟合程度良好,实验误差较小,故可利用该回归方程代替真实点对实验结果进行有效的分析和预测。

2.2.2 细极链格孢 CH1307 发酵条件响应面分析及优化 根据回归模型作出相应的响应曲面(见图 5)。由图 5 可见,响应曲面各因素的变化趋势较明显,葡萄糖的最佳质量浓度为 $34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,硫酸镁的最佳质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,复合维生素 B 的最适质量浓度为 $0.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,最佳转速为 $145 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。为进一步确证最佳点的值,对拟合方程求偏导,得出葡萄糖为 $32.0226 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,硫酸镁为 $0.0966 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,复合维生素 B 为 $0.1239 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,转速为 $146.4742 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,CH1307 发酵最好,代入方程的 HHRT 产量为 $190.6370 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 结 论

在单因素试验的基础上,通过二次回归设计,得到了细极链格孢 CH1307 产高三尖杉酯碱与葡萄糖、硫酸镁、复合维生素 B、转速关系的回归模型,经检验证明该模型是合理可靠的。对影响 HHRT 产量的关键因素及其相互作用进行探讨后,得到的最佳工艺参数为:葡萄糖 $32.0226 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,硫酸镁 $0.0966 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,复合维生素 B $0.1239 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,转速 $146.4742 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$;在此条件下,HHRT 的理论产量为 $190.6370 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,利用响应曲面分析方法对细极链格孢 CH1307 产 HHRT 液态发酵工艺进行优化,可获得最佳的工艺参数,从而为进一步的实验研究奠定基础。

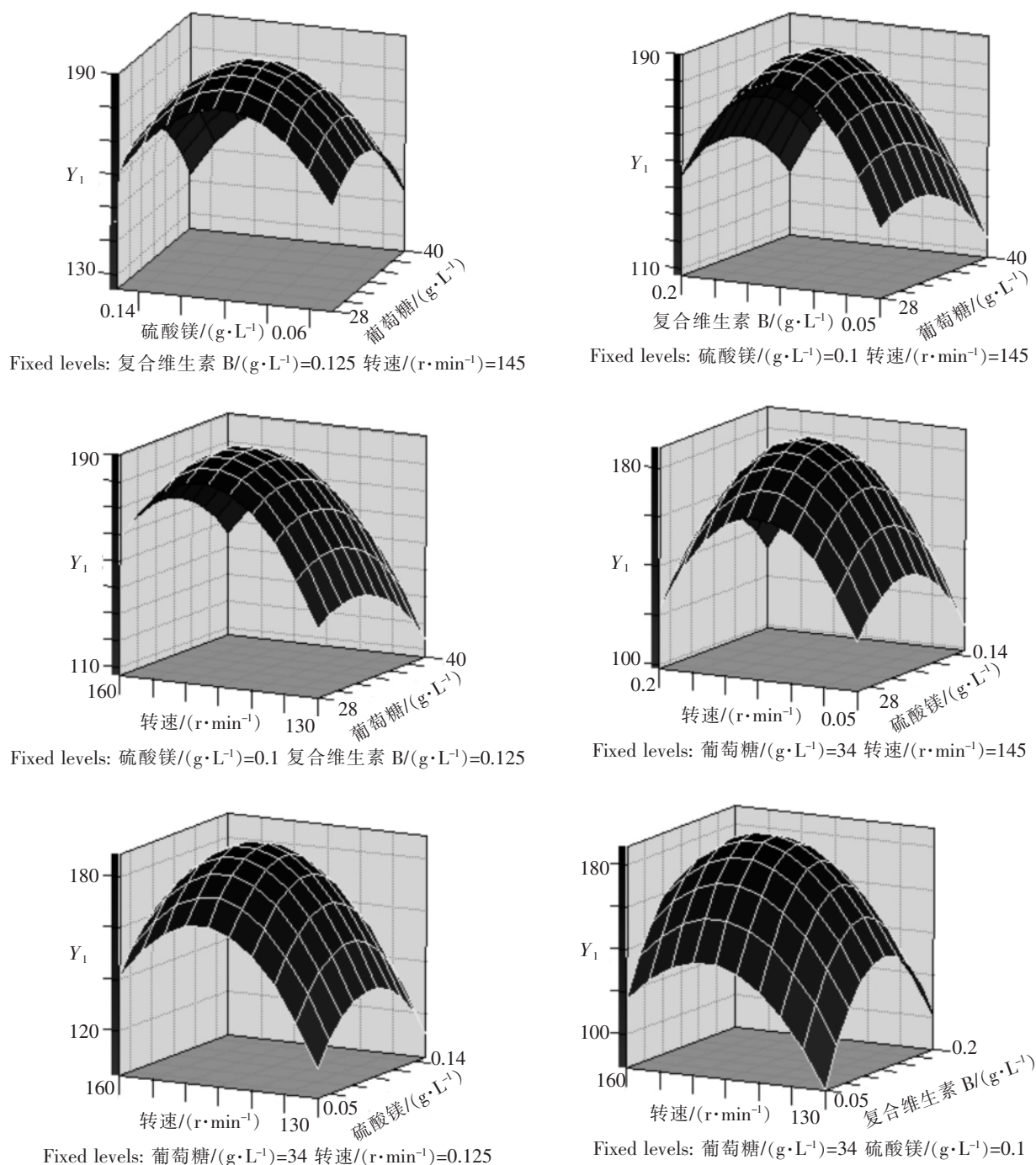


图5 响应面立体分析图

参考文献:

- [1] WANG J M, LYU S Q, YANG J M, et al. A homoharringtonine-based induction regimen for the treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia: a single center experience from China[J]. Journal of Hematology & Oncology 2009 32(2): 1-5.
- [2] Cephalotaxus Research Coordinating Group, Cephalotaxine esters in the treatment of acute leukemia. A preliminary clinical assessment[J]. Chin Med J (New Series), 1976 2: 265.
- [3] LI Y H, GUO S F, ZHOU F Y et al. Combined harringtonine or homoharringtonine chemotherapy for acute myeloid leukemia in 25 children[J]. Chin Med J, 1983 96: 303.
- [4] 赵体平, 丁根兄, 高浩荣, 等. 高三尖杉酯碱治疗乳腺癌的再探讨[J]. 肿瘤, 1986 6(8): 117-118.
- [5] 卢大用, 胥彬, 曹静懿, 等. 高三尖杉酯碱对白血病细胞分化和肿瘤转移的影响[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 1999 (2): 175.

- [6] 金伟,黄青山,侯俊梅,等.高三尖杉酯碱对 HL-60 细胞和 Q GY7703 细胞的作用研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(3): 44-45.
- [7] 王肖萱,刘秦,郝荣梁,等.异高三尖杉酯碱和天然高三尖杉酯碱对人体淋巴细胞染色体诱变作用的研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1987, 23(2): 86-89.
- [8] EKONG R M. Comparison of their *in vitro* activities of quassinoids with activities against *plasmodium falciparum*, anisomycin and some other inhibitors of eukaryotic protein synthesis[J]. *Biochem Pharmacology*, 1990, 40: 297.
- [9] 薛智,徐丽珍,陈迪华,等.海南粗榧中的微量生物碱[J]. 药学学报, 1981, 10(16): 752-756.
- [10] 傅立国. 三尖杉属化合物的研究[J]. 植物分类学报, 1984, 22(4): 277-288.
- [11] PETRINI O. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues [M] // Fokkema N J. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge U K: Cambridge University Press, 1986: 175-187.
- [12] CARROLL F E, MULLER E, SUTTON B C. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes on some European conifers[J]. *Sydowia*, 1997, 29: 87-103.
- [13] SAITHONG P, PANTHAVEE W, STONSAOVAPAK S, et al. Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees[J]. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2010, 4(3): 446-453.
- [14] ZHANG H W, SONG Y C, TAN R X. Biology and chemistry of endophytes[J]. *Natural Product Reports*, 2006, 23: 753-771.
- [15] 王伯崧,李鸣光,彭少麟,等.植物种群学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 294-296.
- [16] 林筱华. 抗癌物质高三尖杉酯碱的提取和研究[J]. 龙岩师专学报, 1992, 10(3): 34-36.
- [17] 李辉,胡文彬,李亚男,等.超声提取高效液相色谱法测定粗榧中高三尖杉酯碱[J]. 理化检验: 化学分册, 2009, 45(4): 466-467.
- [18] 朱云霞,侯卫,李明,等.福建三尖杉中生物碱的高效液相分离与鉴定[J]. 复旦学报, 2004, 43(6): 1124-1127.
- [19] 王仕玉,萧凤回. 齿瓣石斛病原链格孢菌生物学特性研究[J]. 华北农学报, 2009, 24: 243-246.
- [20] 袁蒲英,朱天辉. 桂花叶枯病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 四川林业科技, 2008, 29(4): 21-28.
- [21] 刘芳,李平,刘博. 乳牛肝菌液态发酵生长条件的优化[J]. 生物学杂志, 2010, 27(1): 5-8.

Optimization of Homoharringtonine Fermentation Conditions for *Alternaria tenuissima* CH1307, an Endophytical Fungus of *Cephalotaxus mannii* Hook. f.

LIU Yan, LIU Si-xin, LI Yong-cheng, LI Cong-fa

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Homoharringtonine (HHRT) was produced from *Alternaria tenuissima* CH1307, an endophytical fungus of *Cephalotaxus mannii* Hook. f through fermentation. Four factors such as the concentrations of glucose, magnesium sulfate and vitamin B compound and the rotating speed were analyzed by using response surface methodology to determine their effect on fermentation of the fungus CH1307. The best operating conditions resulted to be $32.0226 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for glucose, $0.0966 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for magnesium sulfate and $0.1239 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for vitamin B compound as well as $146.4742 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ for the rotating speed, and $190.6370 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of HHRT were produced from this fungus when the values of the four factors were entered into a formula established.

Key words: xendophytical fungus; *Alternaria tenuissima*; fermentation condition; homoharringtonine