

应用响应面法优化马铃薯疮痂病生防 链霉菌 PBSH9 发酵培养基

张 敏¹, 万中义², 方 伟², 张亚妮², 刘 芳²,
柯少勇², 张志成³, 董永义⁴, 张笑宇¹

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院 呼和浩特 010010; 2. 湖北省生物农药工程研究中心 武汉 430064;
3. 乌兰察布市农林科学研究所 内蒙古集宁 012000; 4. 内蒙古民族大学农学院 内蒙古通辽 028000)

摘要: 马铃薯疮痂病(potato common scab)是制约马铃薯产业发展的重要病害。笔者筛选到马铃薯疮痂病生防菌株 PBSH9, 田间防效可达 73.97%, 其代谢产物对马铃薯疮痂病菌有较好的抑制作用, 对其次级代谢产物进行分离纯化, 得到了活性物质。为提高活性物质的产量, 采用响应面法优化该菌株活性物质产生的培养基。在单因素试验、Plackett-Burman 试验基础上, 结合最陡爬坡试验、Box-Behnken 试验设计, 响应面法拟合显著因子与活性化合物产量的非线性方程求解, 得到最佳的发酵培养基配方。优化后的配方为 4.50 g·L⁻¹ 葡萄糖、50.00 g·L⁻¹ 可溶性淀粉、15.00 g·L⁻¹ 玉米粉、21.08 g·L⁻¹ 黄豆饼粉、2.00 g·L⁻¹ 蛋白胨、0.50 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、0.60 g·L⁻¹ MgSO₄、0.04 g·L⁻¹ KH₂PO₄。模型预测活性化合物产量为 199.92 μg·mL⁻¹, 实际值为 184.35 μg·mL⁻¹, 比基础培养基化合物产量提高了 5.83 倍。该试验为高效马铃薯疮痂病生物农药产品的研制提供了重要的技术支撑。

关键词: 马铃薯疮痂病; 生防链霉菌; 响应面法; 活性物质; 培养基

中图分类号: S532

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)11-065-12

Optimizing the fermentation medium of biocontrol *Streptomyces* PBSH9 against potato common scab using response surface methodology

ZHANG Min¹, WAN Zhongyi², FANG Wei², ZHANG Yani², LIU Fang², KE Shaoyong², ZHANG Zhicheng³, DONG Yongyi⁴, ZHANG Xiaoyu¹

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, Inner Mongolia, China;
2. Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Wuhan 430064, Hubei, China; 3. Wulanchabu Academy of Agricultural and Forestry Research Sciences, Jining 012000, Inner Mongolia, China; 4. College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China)

Abstract: Potato common scab is a significant disease that restricts the development of the potato industry. This study screened the biocontrol strain PBSH9, and its metabolites showed significant inhibitory effects on the pathogen, achieving a field control efficacy of 73.97%. To identify the active compounds, the secondary metabolites of strain PBSH9 were isolated and purified, successfully yielding the active substance. To enhance the yield of this active substance, response surface methodology (RSM) was employed to optimize its culture medium. Based on single-factor experiments and Plackett-Burman tests, combined with the steepest ascent method and Box-Behnken design response surface methodology to fit the nonlinear equation between significant factors and the yield of active compound, the optimal fermentation medium formula was obtained. The optimized formula was 4.50 g·L⁻¹ glucose, 50.00 g·L⁻¹ soluble starch, 15.00 g·L⁻¹ corn flour, 21.08 g·L⁻¹ soybean meal, 2.00 g·L⁻¹ peptone, 0.50 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.60 g·L⁻¹ MgSO₄, and 0.04 g·L⁻¹ KH₂PO₄. The model-predicted yield of active compounds was 199.92 μg·mL⁻¹, while the actual value was 184.35 μg·mL⁻¹, which was 5.83 times higher than the yield of compounds in the basic culture medium. This study provides crucial technical support for the development of efficient biopesticide products against potato common scab.

Key words: Potato common scab; Biocontrol *Streptomyces*; Response surface methodology; Bioactive metabolites; Medium

收稿日期: 2025-03-05; 修回日期: 2025-04-23

基金项目: 国家自然科学基金(32260700); 内蒙古自治区科技计划项目(2022YFYZ0008); 内蒙古自治区特色品种育种攻关联合项目(YZ2023006)

作者简介: 张 敏, 女, 在读硕士研究生, 主要从事马铃薯疮痂病生物防治研究。E-mail: 2835864009@qq.com

通信作者: 张笑宇, 女, 教授, 主要从事植物病害绿色防控研究。E-mail: zxy2000@126.com

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是一种历史悠久的粮食作物,在全球160个国家广泛种植,在农业生产中占据重要地位。我国作为马铃薯生产大国,2015年推出马铃薯主粮化的政策,马铃薯种植对我国粮食安全具有重要意义^[1]。在马铃薯生产过程中,土传病害日益严重,难以防治,尤其是马铃薯疮痂病,主要危害马铃薯块茎,在块茎上形成疮痂状病斑,发病马铃薯出苗迟缓,易结小薯,品质明显降低^[2-3]。该病由多种致病链霉菌(*Streptomyces* spp.)引起,据报道有20多种致病链霉菌能引起马铃薯疮痂病,如加利利链霉菌(*S. galilaeus*)^[4]、疥疮链霉菌(*S. scabies*)^[5]、酸疮痂链霉菌(*S. acidiscabies*)^[6]等。李宇晨^[7]在内蒙古地区分离得到的病原菌有*S. galilaeus*、*S. scabies*、*S. bobbili*等病原菌,其中*S. galilaeus*为内蒙古地区优势菌株。病原菌兼具种传和土传特征,防控难度大,给我国马铃薯产业造成了严重的经济损失,是制约我国马铃薯产业发展的主要病害,目前没有高效的防治方法。生物防治具有安全、低毒、环保等特点,是防控马铃薯疮痂病的有效措施。

马铃薯疮痂病的生防菌包括链霉菌(*Streptomyces*)^[8]、木霉(*Trichoderama*)^[9]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[10]、芽孢杆菌(*Bacillus*)^[11-13]等。其中链霉菌属因复杂的次级代谢被认为是天然产物的宝库^[14-15],它包含抗菌、抗病毒、抗氧化、免疫抑制、促进植物生长等多种生物活性化合物^[16-18],在马铃薯疮痂病生物防治方面具有很大潜力。目前,从链霉菌属分离到的活性次级代谢产物占放线菌的80%^[19],被广泛应用于医疗、农业、食品等多个领域。

发酵培养基组分比例直接影响代谢物的产量,培养基优化的方法主要有正交试验、人工神经网络、均匀设计和响应面法等,其中最常用的方法为响应面法。该方法是一种用于寻找响应变量与多个因素之间关系并可将该响应值进行优化的统计方法,能够弥补正交试验的缺陷,同时考虑多个因子之间的互作效应。用于微生物发酵工艺优化时,可以用较少的试验次数获得最佳的发酵培养基配方^[20]。李泰明等^[21]应用响应面法优化发酵配方,将化合物司替霉素B的产量提高了1773.08%,获得了克级纯品。张梦菲等^[22]应用响应面法优化发酵培养基,将菌株产大环内酯(MLNs)化合物产量提高了4.10倍。

菌株PBSH9(*Streptomyces hohhotensis* sp. nov.) (JAKZEO000000 000)是本课题组分离鉴定的马铃

薯疮痂病生防链霉菌新种,能高效防控马铃薯疮痂病,还能促进马铃薯种薯萌发和幼苗生长,其次级代谢产物对马铃薯疮痂病菌有抑制作用^[23-24]。前期通过硅胶柱层析、制备型高效液相色谱法对菌株次级代谢产物进行分离纯化,得到了3种活性化合物,但活性物质产量较低,因此,本试验基于Box-Behnken响应面法优化菌株PBSH9活性物质产生的培养基,提高菌株产生活性物质的能力,以期为充分利用和研究活性化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试马铃薯疮痂病生防菌株PBSH9(*Streptomyces hohhotensis* sp. nov.)^[24]、马铃薯疮痂病病原菌加利利链霉菌(*Streptomyces galilaeus*)PS1^[4]均由内蒙古农业大学植物病理学实验室保存。优化生防菌株PBSH9发酵培养基试验于2023年4—10月在湖北省农业科学院生物农药工程研究中心进行。

1.1.2 供试培养基 高氏1号培养基:参照王丽玮^[24]的方法配制;ISP-2培养基:参照王丽玮^[24]的方法配制;TCS-1培养基:甘露醇20 g、大豆蛋白胨10 g、大豆油2.5 g、K₂HPO₄0.35 g、碳酸钙0.5 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0;TCS-2培养基:参照王丽玮^[24]的方法配制;TCS-3培养基:甘露醇20 g、黄豆饼粉20 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0;TCS-4培养基:甘露醇20 g、大米粉20 g、碳酸钙0.5 g、蒸馏水1000 mL、pH 6.5;TCS-5培养基:玉米淀粉10 g、甘油10 g、葡萄糖5 g、棉籽饼粉10 g、干酵母5 g、玉米浆5 g、碳酸钙2 g、蒸馏水1000 mL、pH 7;TCS-6培养基:甘油8 g、可溶性淀粉8 g、大豆蛋白胨3 g、鱼粉8 g、碳酸钙2 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0;TCS-7培养基:葡萄糖5 g、可溶性淀粉40 g、玉米粉15 g、黄豆饼粉25 g、蛋白胨2 g、硫酸铵0.5 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0;TCS-8培养基:可溶性淀粉60 g、黄豆饼粉20 g、干酵母4 g、酵母浸粉1 g、硫酸镁5 g、棉籽饼粉7 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0;TCS-9培养基:参照李泰明等^[21]的方法配制;TCS-10培养基:乳糖20 g、葡萄糖10 g、干酵母4 g、棉籽饼粉7.5 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.0。

以上培养基均在121 °C条件下灭菌30 min,培养基材料、所用试剂来源于市售及国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养方法 PBSH9 种子液制备:将菌株 PBSH9 适量接种至高氏 1 号培养基上,28 °C 恒温培养箱内倒置培养 3~5 d;使用无菌打孔器,取 2 个直径 5 mm 的菌饼,接种到 500 mL 种子培养基中,装液量为 100 mL,置于 28 °C、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 3 d,得到分生孢子浓度为 1×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的种子液;将培养好的种子液以 9% 的接种量移接至发酵摇瓶中(100/500 mL),在摇床上 28 °C、180 r·min⁻¹ 条件下发酵培养 5 d。

马铃薯疮痂病菌菌悬液的制备:将马铃薯疮痂病病原菌菌株 PS1 稀释,均匀涂在 ISP2 培养基平板上,28 °C 恒温培养 3~5 d,取培养好的 2 个直径为 5 mm 菌饼,置于装有 100 mL 种子培养基 500 mL 三角瓶中,28 °C 恒温振荡培养 2 d,得到马铃薯疮痂病病原菌的菌悬液(1×10⁷ CFU·mL⁻¹)。

1.2.2 培养基筛选 选取 TCS-1、TCS-2、TCS-3、TCS-4、TCS-5、TCS-6、TCS-7、TCS-8、TCS-9 和 TCS-10 共 10 种培养基。向 500 mL 三角瓶中分别加入 100 mL 各液体培养基,每种培养基中按体积比 9% 的接种量接入菌株 PBSH9 的种子液,28 °C 恒温振荡培养 5 d。取 15 mL 各发酵液,高速冷冻离心机(Centrifuge 5910 R)8000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,用 Millex-GP 0.22 μm 的过滤器滤出菌体,得到菌株次级代谢产物,试验重复 3 次。

抑菌活性测定:将 200 μL 病原菌 PS1 菌悬液均匀涂在 ISP-2 培养基表面,放入牛津杯,分别向不同杯中注入 100 μL 不同培养基培养的菌株 PBSH9 的代谢产物,各液体培养基为空白对照(CK),28 °C 恒温培养 2 d,十字交叉法测量抑菌圈直径,根据抑菌圈直径大小筛选最优培养基,并将此培养基作为菌株 PBSH9 基础发酵培养基进行优化,试验重复 3 次。

1.2.3 活性化合物标准曲线绘制 活性化合物由菌株 PBSH9 经发酵、硅胶柱层析分离及高效液相色谱法制备获得,共 3 种化合物,经 UPLC-MS 超高效液相-质谱联用仪分析,3 种活性化合物含量(ω,后同)在 97% 以上^[24]。

准确称取 2 mg 各化合物纯品,加入 2 mL 甲醇充分溶解,使各活性化合物浓度(ρ,后同)均为 1 000.00 μg·mL⁻¹,采用二倍稀释法将化合物 1 用甲醇稀释至 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 和 1 000.00 μg·mL⁻¹ 系列浓度的标准溶液;将化合物 2、3 分别用甲醇稀释成 1.95、3.91、7.81、15.63、

31.25、62.50 μg·mL⁻¹ 系列浓度的标准溶液。各标准品溶液进样量 1 μL,使用 UPLC-MS 测定其在 248 nm(化合物紫外吸收峰波长)处吸收峰峰面积,绘制标准曲线,3 次生物学重复,取平均值(图 1)。

1.2.4 活性化合物含量测定 将 100 mL 乙酸乙酯加入到 100 mL 发酵液中,摇床振荡 180 r·min⁻¹ 萃取 1 h,将混合液倒入离心瓶内,高速冷冻离心机(GL21M)5000 r·min⁻¹ 离心 15 min,吸取 50 mL 上清液经 T-50 溶剂过滤器过滤后,转移至锥形瓶中,40 °C 减压浓缩得到酯相,加入 1.5 mL 色谱纯甲醇溶解转至离心管内,用离心机(5430R)12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min。然后吸取上清液至进样瓶中,利用超高效液相-质谱联用仪自动进样,色谱分析条件:

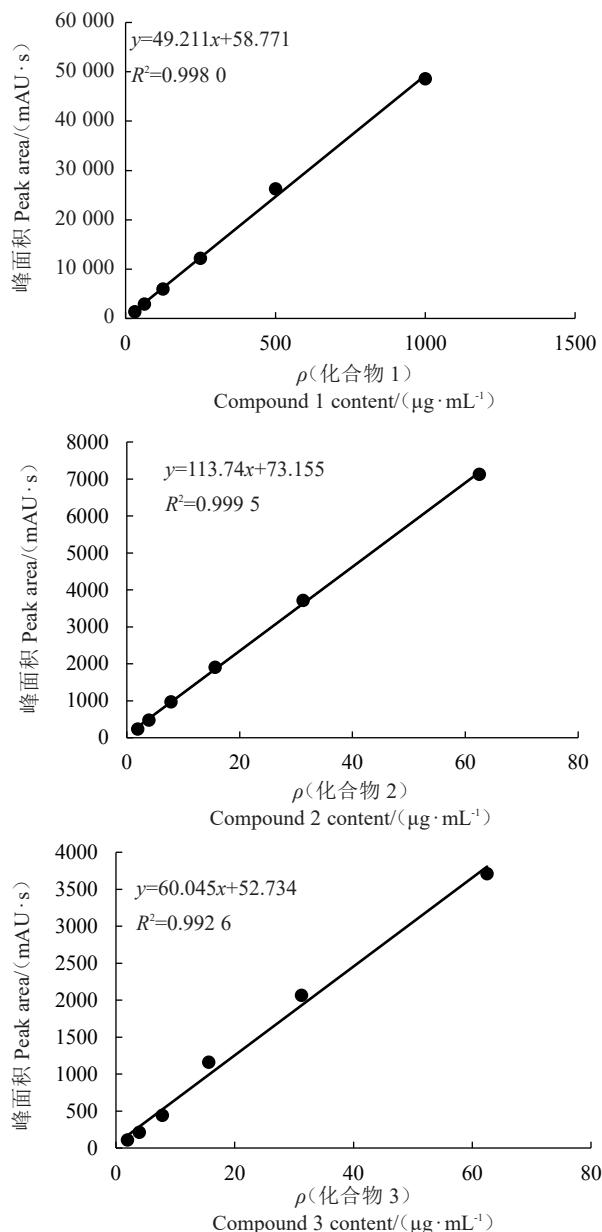


图 1 化合物的标准曲线

Fig. 1 Standard curve of compound

ACQUITY UPLC BEH C18 反相色谱柱($1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$),流动相为超纯水(A)和色谱纯乙腈(B),流速 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 40°C ,进样量 $1.0 \mu\text{L}$,样品分析时间 13 min ,溶剂洗脱梯度见表1。根据标准曲线,248 nm 波长下几种化合物的峰面积总和为活性化合物含量,3 次重复。

表1 溶剂洗脱梯度

Table 1 Solvent gradient for UPLC analysis

时间	流动相 A	流动相 B
Time/min	Mobile phases A/%	Mobile phases B/%
初始 Initial	95.0	5.0
0.20	95.0	5.0
8.20	0.0	100.0
9.70	0.0	100.0
11.30	95.0	5.0
13.00	95.0	5.0

1.2.5 单因素试验 碳氮源优化:调整 TCS-7 中各种物质的质量(表2)制备培养基,按照 1.2.4 中的处理方法,测定活性化合物的产量,确定碳氮源的含量,3 次重复。

表2 单因素试验水平设计

Table 2 Single factor experimental level design table

培养基组分	添加量				
	Additive amount/(g·L ⁻¹)				
葡萄糖 Glucose	3	4	5	6	7
可溶性淀粉 Soluble starch	25	30	35	40	45
玉米粉 Corn flour	5	10	15	20	25
黄豆饼粉 Soybean meal	10	15	20	25	30
蛋白胨 Yeast	1	1.5	2	2.5	3
硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7

无机盐优化:以 1.25 方法试验得出的配方为对照组,分别添加 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 1.2 、 $1.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 和 0.02 、 0.03 、 0.04 、 0.05 、 0.06 、 $0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 ,按照 1.2.4 中的处理方法,测定活性化合物的产量,分析无机盐对发酵水平的影响,试验 3 次重复。

氨基酸优化:以 1.25 方法试验得出的配方为对照组,分别添加半胱氨酸、苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸 6 种氨基酸,浓度分别为 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,按照 1.2.4 中的处理方法,测定活性化合物的产量,分析氨基酸对发酵水平的影响,3 次重复。

1.2.6 Plackett-Burman (PB) 试验设计 根据单因素试验的结果,选择葡萄糖(A)、可溶性淀粉(B)、玉米粉(C)、黄豆饼粉(D)、蛋白胨(E)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (F)、氨基酸(G)、 MgSO_4 (H)、 KH_2PO_4 (I)共 9 种营

养成分,使用软件 Design Expert-13.0 从 9 个变量中筛选出对活性化合物产量具有显著影响的因子,每个因子设高和低 2 个水平,分别以“+1”“-1”为代表,3 次重复。PB 试验因素和水平及试验设计见表 3。

表3 PB 试验设计因素水平

Table 3 Factors and levels of PB experimental design

水平	因素 Factor/(g·L ⁻¹)									
	Level	A	B	C	D	E	F	G	H	I
-1		3	40	15	15	1	0.5	0.0	0.4	0.02
+1		5	50	25	25	2	0.7	0.2	0.8	0.04

1.2.7 最陡爬坡试验 基于 PB 试验结果拟合方程,以显著因子葡萄糖(A)、黄豆饼粉(D)、 MgSO_4 (H)的中间水平为起点进行爬坡试验,确定试验的爬坡方向和步长范围,快速、经济地逼近最佳响应值区域,3 次重复,试验设计见表 4。

表4 最陡爬坡试验设计

Table 4 Design of steepest ascent experiment design

编号	ρ (葡萄糖)		ρ (黄豆饼粉)		ρ (硫酸镁)	
	No.	Glucose content/ (g·L ⁻¹)	Soybean meal content/(g·L ⁻¹)	MgSO ₄ content/ (g·L ⁻¹)		
1		4.0	20		0.6	
2		4.5	21		0.7	
3		5.0	22		0.8	
4		5.5	23		0.9	
5		6.0	24		1.0	

1.2.8 Box-Behnken (BBB) 试验设计 根据爬坡试验结果确定的中心点,以活性化合物产量为响应值,使用 Design Expert-13.0 软件拟合二次函数,以方差分析评估模型的拟合效果。对碳源葡萄糖(A)、氮源黄豆饼粉(B)、无机盐 MgSO_4 (C)进行 3 因素 3 水平的 BBB 试验筛选。每个因素设置高、中、低 3 个水平,并以“-1”“0”“+1”进行编号,以此确定最佳的培养基配方,3 次重复。各因素水平见表 5。利用 Origin 2018 软件绘制响应面分析曲面图和等值线图。

表5 BBB 试验因素及水平设计

Table 5 Factors and levels of BBB design

水平	因素 Factor/(g·L ⁻¹)			
	Level	ρ (葡萄糖)	ρ (黄豆饼粉)	ρ (硫酸镁)
-1		4.0	20	0.6
0		4.5	21	0.7
+1		5.0	22	0.8

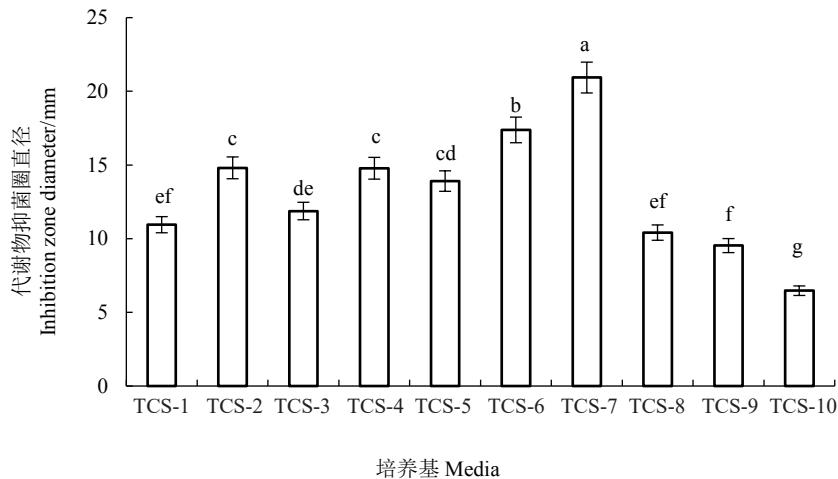
1.2.9 摆瓶发酵验证试验 按优化后的培养基配方配制培养基,进行撆瓶发酵试验,按照 1.2.4 中的处理方法测定活性化合物产量,3 次重复。

1.3 数据分析

使用 Excel 2019 软件进行数据统计,作图与分析分别用 Design Experts-13.0、Origin 2018,采用 IBM SPSS Statistics 22.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 培养基筛选



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different small letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 发酵培养基种类对菌株 PBSH9 代谢产物抑菌活性的影响

Fig. 2 Influence of medium on the antibacterial activity about the metabolites of strain PBSH9

2.2 单因素试验结果

2.2.1 碳氮源优化 由表 6 可知,葡萄糖浓度为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 PBSH9 活性化合物总产量最大,为 $44.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;可溶性淀粉的添加量为 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、玉米粉的添加量为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、黄豆饼粉的添加量为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时活性化合物总产量达到最大,分别为 55.26 、 63.81 、 $63.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当蛋白胨的添加量为 1.5 、 2.5 、 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,活性化合物总产量分别为 51.80 、 50.31 、 $51.73 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,三者之间差异不显著,综合考虑经济成本和活性化合物产量,以 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加量为最佳。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量为 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,活性化合物总产量达到最大,为 $53.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 无机盐优化 在碳氮源优化后的配方中添加 KH_2PO_4 和 MgSO_4 (图 3),2 种无机盐对 PBSH9 活性化合物产量提高有显著影响,添加量分别为 0.03 、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,活性化合物产量最高,分别为 61.27 、 $66.97 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,比 CK($38.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别提高了 57.47% 、 72.12% 。

2.2.3 氨基酸优化 由图 4 可知,PBSH9 活性化合物产量随着氨基酸浓度的增加而降低,在添加量为

在不同的培养基中,PBSH9 菌株产生的抑菌物质对疮痂病菌有不同的抑制活性。由图 2 可知,在 TCS-7 培养基中产生的抑菌物质活性最强,抑菌圈直径显著大于其他培养基,为 20.93 mm ;其次是培养基 TCS-6,抑菌圈直径为 17.38 mm ,TCS-10 培养基最差,显著小于其他培养基。选择 TCS-7 培养基为基础活性物质产生培养基进行后续优化试验。

0.1 、 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,产量分别为 60.79 、 $55.92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,比 CK($38.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别提高了 56.23% 、 43.72% ,二处理间差异不显著,考虑经济成本, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 更适宜。

2.3 Plackett-Burman(PB)试验设计

PB 试验设计及结果见表 7,应用 design expert-13.0 软件对 PB 试验数据(表 8)进行拟合,获得一次回归方程: $Y=79.01+19.37A+6.51B-2.39C+36.70D+3.49E-7.96G+8.74H+6.78I$ 。方差分析结果(表 8)表明,其相关系数 R^2 为 0.9965 ,模型线性方程可解释 99.65% 的变异性,仅有 0.35% 的变异性无法由此模型解释,校正相关系数 $\text{Adj } R^2=0.9808$,方程可解释 98.08% 的变异性,模型信噪比 $\text{Adeq precision}=22.8267 > 4$,表明该模型可用于试验预测。模型 P 值为 0.0156 ,模型显著,说明该一次回归方程的拟合效果较好,可用于分析和预测链霉菌 PBSH9 在发酵过程中活性化合物产量的变化。在 9 个变量中(表 8),对活性化合物产量影响显著的 3 个因素从大到小依次为黄豆饼粉 $>$ 葡萄糖 $>$ MgSO_4 。因此确定黄豆饼粉、葡萄糖、 MgSO_4 为显著影响因子,然后进行爬坡试验。

表 6 不同碳氮源对 PBSH9 活性化合物产量的影响

Table 6 Effects of different concentration of carbon and nitrogen-containing components on the production of active compounds

培养基组分 Medium composition	$\rho/$ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物种类 Types of compounds	单个化合物产量 Single compound production/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	化合物总产量 Total compound production/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	培养基组分 Medium composition	$\rho/$ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	化合物种类 Types of compounds	单个化合物产量 Single compound production/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	化合物总产量 Total compound production/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
葡萄糖 Glucose	3	1	26.00	30.55±0.05 c			2	6.59	
		2	1.32				3	12.90	
		3	3.24			20	1	43.42	63.20±0.24 a
	4	1	40.85	44.65±0.13 a			2	4.80	
		2	1.79				3	14.97	
		3	1.98			25	1	24.57	26.99±1.35 d
	5*	1	24.57	26.99±0.24 e			2	0.62	
		2	0.62				3	1.79	
		3	1.79			30	1	36.90	42.17±1.16 b
	6	1	36.84	42.34±0.28b			2	2.13	
可溶性淀粉 Soluble starch		2	1.27				3	3.13	
		3	4.22			蛋白胨 Yeast	1.0	38.67	45.58±0.54 b
	7	1	26.79	28.72±0.18 d			2	1.92	
		2	0.84				3	4.99	
		3	1.09			1.5	1	40.47	51.80±0.63 a
	25	1	5.92	9.28±0.18 e			2	2.47	
		2	0.96				3	8.86	
		3	2.410			2.0	1	24.57	26.99±0.24 c
	30	1	12.51	16.24±0.62 d			2	0.62	
		2	0.58				3	1.79	
玉米粉 Corn flour		3	3.16			2.5	1	48.52	50.31±1.35 a
	35	1	29.68	31.88±0.97 b			2	0.85	
		2	1.26				3	0.95	
		3	0.94			3.0	1	43.48	51.73±1.16 a
	40	1	24.57	26.99±0.23 c			2	1.69	
		2	0.62				3	6.56	
		3	1.79			0.4	1	13.17	18.11±0.37 d
	45	1	46.90	55.26±0.49 a			2	1.21	
		2	1.71				3	3.74	
		3	6.65			0.5	1	24.57	26.99±0.24 c
黄豆饼粉 Soybean meal	5	1	42.94	47.26±0.48 c			2	0.62	
		2	1.35				3	1.79	
		3	2.97			0.6	1	46.45	53.54±0.58 a
	10	1	44.77	50.51±1.08 b			2	1.44	
		2	1.68				3	5.64	
		3	4.05			0.7	1	39.21	43.14±0.43 b
	15	1	24.57	26.99±0.24 e			2	1.08	
		2	0.62				3	2.86	
		3	1.79			15	1	21.68	41.17±0.63 bc

注:同列同组分数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。*为基础培养基。

Note: Different lowercase letters after the same column indicate significant difference at 0.05 level. * indicate basic culture medium.

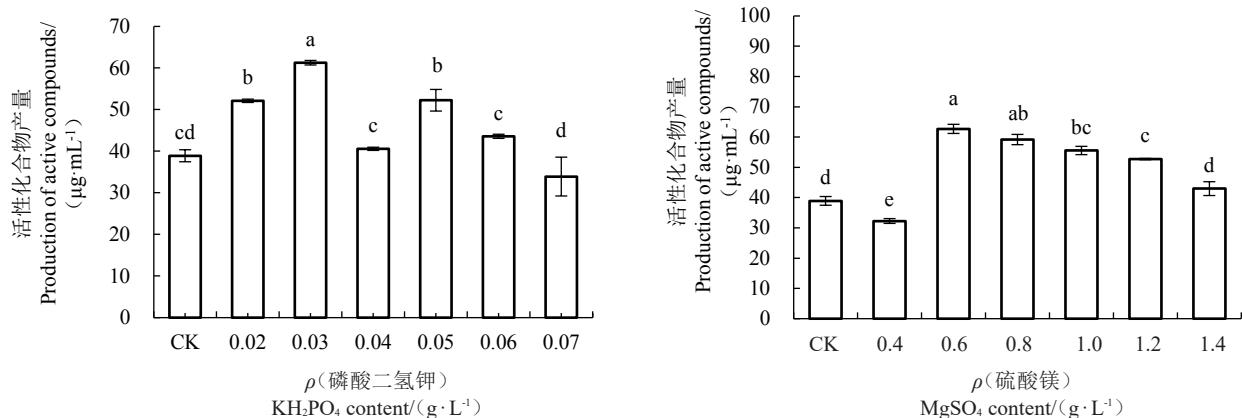


图3 不同无机盐对活性化合物产量的影响

Fig. 3 Effects of different inorganic salts on the production of active compounds

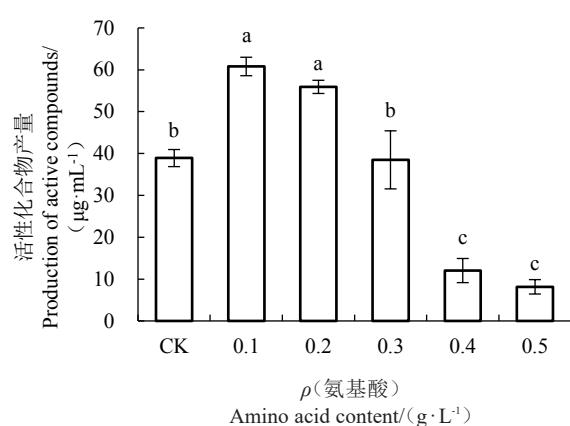
图4 不同氨基酸浓度对活性化合物产量的影响
Fig. 4 Effects of different amino acid concentrations on the production of active compounds

表7 9因素PB设计

Table 7 Plackett-Burman design with 9 independent variables

编号 No.	因素 Factor									产量 Production/ (µg·mL⁻¹)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	90.84
2	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	139.64
3	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	149.88
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	52.14
5	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	110.52
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	75.46
7	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	126.60
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	40.74
9	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	14.32
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	11.12
11	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	65.66
12	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	113.08

表8 PB试验方差分析

Table 8 Analysis of variance of results of Plackett-Burman experiment

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 Significance
模型 Model	24 197.41	9	2 688.60	63.53	0.015 6	*
A	4 503.91	1	4 503.91	106.42	0.009 3	**
B	508.56	1	508.56	12.02	0.074 1	
C	68.35	1	68.35	1.62	0.331 6	
D	16 159.74	1	16 159.74	381.83	0.002 6	**
E	583.53	1	583.53	13.79	0.065 5	
F	145.88	1	145.88	3.45	0.204 5	
G	759.70	1	759.70	17.95	0.051 4	
H	916.65	1	916.65	21.66	0.043 2	*
I	551.08	1	551.08	13.02	0.068 9	
残差 Residual	84.64	2	42.32			
总和 Cor total	24 282.06	11				
模型信噪比 Adeq precision	=22.862 7					
R^2	0.996 5		Adj R^2	=0.980 8		

注: *和**分别表示各因素对活性化合物产量的影响在0.05和0.01水平差异显著。下同。

Note: * and ** indicate that the influence of factors on the yield of active compounds are significantly different at 0.05 and 0.01 level, respectively. The same below.

2.4 最陡爬坡试验

将 PB 试验筛选到的 3 个显著影响因子葡萄糖 (A)、黄豆饼粉 (D)、 $MgSO_4$ (H) 进行爬坡试验, 葡萄糖、黄豆饼粉、 $MgSO_4$ 的系数均为正数, 与活性化合物产量呈正相关。以 3 个因子中间水平为起始点, 即葡萄糖 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄豆饼粉 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $MgSO_4 0.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验结果(表 9)表明, 处理 2 活性化合物产量最高, 因此, 选择处理 2 的条件作为下一步 BB 试验设计的各因素水平中心点, 即葡萄糖 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄豆饼粉 $21\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $MgSO_4 0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 9 最陡爬坡试验结果

Table 9 Results of steepest ascent experiment

编号 No.	产量 Production/(\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1})	因素 Factors			产量 Production/ (\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1})
		A	B	C	
1	103.90	-1	-1	0	78.18
2	130.20	1	-1	0	208.96
3	109.78	-1	1	0	130.06
4	123.44	1	1	0	207.02
5	100.34	-1	0	-1	136.12

2.5 Box-Behnken(BBD) 试验设计

BBD 试验设计及结果见表 10, 以活性化合物产量 (Y) 为因变量, 葡萄糖 (A)、黄豆饼粉 (B)、 $MgSO_4$ (C) 的添加量为自变量, 应用 design expert-13.0 软件对 BBD 试验数据(表 11)进行拟合, 得到多元二次回归方程: $Y=195.18+2.69A+5.72B-7.77C+13.595AB+4.845AC-2.765BC-54.5425A^2-50.0225B^2-3.3925C^2$ 。方差分析结果(表 11)表明, 回归模型 $P=0.0003$ ($P<0.01$), 模型极显著, 多元相关性系数 $R^2=0.9627$, 可以解释 96.27% 的变异性, 失拟项的 P 值为 0.7136 (>0.05), 表明影响不显著, 模型不存在失拟现象, 说明模型和数据吻合度较好。 $CV\% = 8.37\%$, 说明模型离散程度小, 方程修正系数 $Adj\ R^2$ 为 0.9148 , 进一步说明了模型的可靠性。该模型中, 回归方程二次项 A^2 、 B^2 对活性化合物产量影响达到极显著水平, 表明响应值的变化复杂, 各因子对响应值的影响不是简单的线性关系。

采用 Design expert-13.0 软件进行响应面分析, Origin 2018 软件绘制响应面分析曲面图和等高线图(图 5), 曲面的陡峭程度反映了因子之间的交互作用, 等高线为椭圆形时表明自变量之间的交互作用显著。由图及软件可直观分析出此模型具有最大值, 各因子之间的交互作用对活性化合物产量的影响程度从大到小的顺序为葡萄糖与黄豆饼粉、葡萄糖与 $MgSO_4$ 、黄豆饼粉与 $MgSO_4$ 。运用 Design

expert-13.0 软件进行预测, 发酵培养基为 $4.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $21.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄豆饼粉、 $0.60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $MgSO_4$ 时, 模型预测活性化合物产量最高, 可达 $199.92\text{ μg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 10 3 因素 BBD 试验设计及结果

Table 10 The design and results of Box-Behnken experiment

编号 No.	因素 Factors			产量 Production/ (\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1})
	A	B	C	
1	-1	-1	0	78.18
2	1	-1	0	208.96
3	-1	1	0	130.06
4	1	1	0	207.02
5	-1	0	-1	136.12
6	1	0	-1	176.00
7	-1	0	1	119.88
8	1	0	1	75.86
9	0	-1	-1	136.64
10	0	1	-1	187.94
11	0	-1	1	124.12
12	0	1	1	88.54
13	0	0	0	141.36
14	0	0	0	152.94
15	0	0	0	195.98
16	0	0	0	154.12
17	0	0	0	140.68

2.6 最优培养基的摇瓶发酵验证

采用最佳发酵培养基 $4.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $50.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 可溶性淀粉、 $15.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米粉、 $21.08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄豆饼粉、 $2.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、 $0.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$ 、 $0.60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $MgSO_4$ 、 $0.04\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 进行验证试验, 在最优发酵培养基配方下使用摇瓶发酵, 模型预测活性化合物产量为 $199.92\text{ μg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 实际值为 $184.35\text{ μg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 比基础培养基提高了 5.83 倍, 与曲面模型预测值基本一致, 说明模型预测结果可信度高。

3 讨论与结论

放线菌是活性次级代谢产物的主要来源, 远高于细菌和真菌, 用于植物病害生物防治的放线菌主要集中在链霉菌属, 其次级代谢产物有一系列生物活性^[25]。Sarwar 等^[26]等报道由链霉菌 A1RT (*Streptomyces A1RT*) 产生的活性化合物 isatropolone C 对马铃薯疮痂病菌 *S. scabies* 表现出较高的抑菌活性, 该团队还从紫黑链霉菌 (*Streptomyces violaceusniger*) AC12AB 中分离出抗生素 azalomycin RS22A^[8], 也同样对马铃薯疮痂病菌 *S. scabies* 有很

表 11 BBD 试验方差分析
Table 11 Analysis of variance of the results of Box-Behnken experiment

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	26 363.28	9	2 929.25	20.08	0.000 3	**
A	57.89	1	57.89	0.396 8	0.548 8	
B	261.75	1	261.75	1.79	0.222 3	
C	482.98	1	482.98	3.31	0.111 7	
AB	739.30	1	739.30	5.07	0.059 1	
AC	93.90	1	93.90	0.643 5	0.448 8	
BC	30.58	1	30.58	0.209 6	0.661 0	
A ²	12 525.83	1	12 525.83	85.85	0.000 1	**
B ²	10 535.79	1	10 535.79	72.21	0.000 1	**
C ²	48.46	1	48.46	0.332 1	0.582 5	
残差 Residual	1 021.33	7	145.90			
失拟项 Lack of fit	270.32	3	90.11	0.479 9	0.713 6	
纯误差 Pure error	751.00	4	187.75			
总和 Cor total	27 384.61	16				
模型信噪比 Adeq precision=13.081 5			CV% = 8.37			
R ² =0.962 7			Adj R ² = 0.914 8			

好的抑菌效果。在本研究中,生防链霉菌 PBSH9 所产生的活性化合物对病原菌 PS1 (*Streptomyces galilaeus*) 有较强的抑制作用,因此需提高活性化合物的产量,为研发安全高效的生物防控产品防治马铃薯疮痂病奠定基础。

微生物发酵的过程复杂,培养基成分显著影响微生物的生长、次级代谢产物合成及活性化合物的分离纯化^[27-28]。发酵培养基主要成分为碳源、氮源和无机盐。碳源是微生物生长和代谢活动中重要的能量物质来源,分为速效和迟效碳源。笔者采用葡萄糖、可溶性淀粉、玉米粉作为链霉菌 PBSH9 产活性化合物发酵培养基的复合碳源。张昊月等^[29]采用麦芽糖和糊精作为天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) K10 产达托霉素发酵培养基的复合碳源。张莉等^[30]使用葡萄糖与糊精作为复合碳源时,游动放线菌 *A. deccanensis* FD-13-194 产非达霉素的产量最高可达 $1850 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。李文科等^[31]使用麦芽糊精和葡萄糖为复合碳源时,野野村放线菌 (*Streptomyces Nomonuraea* sp.) DB-3-04 产巴万星前体 A40926 抗生素含量可达 $1 154.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

氮源的种类根据不同发酵阶段分为速效氮源和迟效氮源。在本研究中应用蛋白胨、黄豆饼粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为链霉菌 PBSH9 产活性化合物发酵培养基的复合氮源。Chen 等^[32]发现,链霉菌 (*Streptomyces alfalfa*) XN-04 产抗生素 roflamycoin 最适复合氮源为 KNO_3 和黄豆饼粉。张艳敏等^[33]使用豆

粕、酵母蛋白胨作为黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*) ZM70 产纳他霉素发酵培养基的复合氮源,经过响应面法优化,纳他霉素产量达到 $5.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,比优化前提高了 77.8%。马思彤^[34]研究表明,吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 产波拉霉素最佳复合氮源为黄豆饼粉和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,经响应面法优化后,波拉霉素产量为 $772 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,是基础发酵培养基产量的 5 倍。

此外,培养基中无机盐的种类对链霉菌次级代谢产物合成也极其重要, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子是许多生物合成酶催化反应的辅助因子^[35]。本研究结果表明, MgSO_4 、 KH_2PO_4 对链霉菌 PBSH9 活性化合物产量增加均有影响,其中 MgSO_4 是显著影响因子。Zhu 等^[36]报道,在添加 MgSO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 培养基中,绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) Tü57-1 的次级代谢产物 avilamycin 的产量可达 $(88.33 \pm 0.94) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,较优化前提高了 2.8 倍。Zhou 等^[37]研究表明,添加 Na_2SO_4 、 MnSO_4 和 MgSO_4 对链霉菌 (*Streptomyces actuosus*) Z-10 产化合物 Nosiheptide 具有显著影响,经响应面优化后产量可达 $1501 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,较优化前提高了 1.56 倍。由此可见,不同链霉菌在发酵产活性物质时所需的无机盐种类存在差异。

科学、合理优化发酵培养基是提高产量的重要手段之一,其中响应面法具有周期短、试验组数相对较少的优点^[38],可应用于微生物发酵培养基分

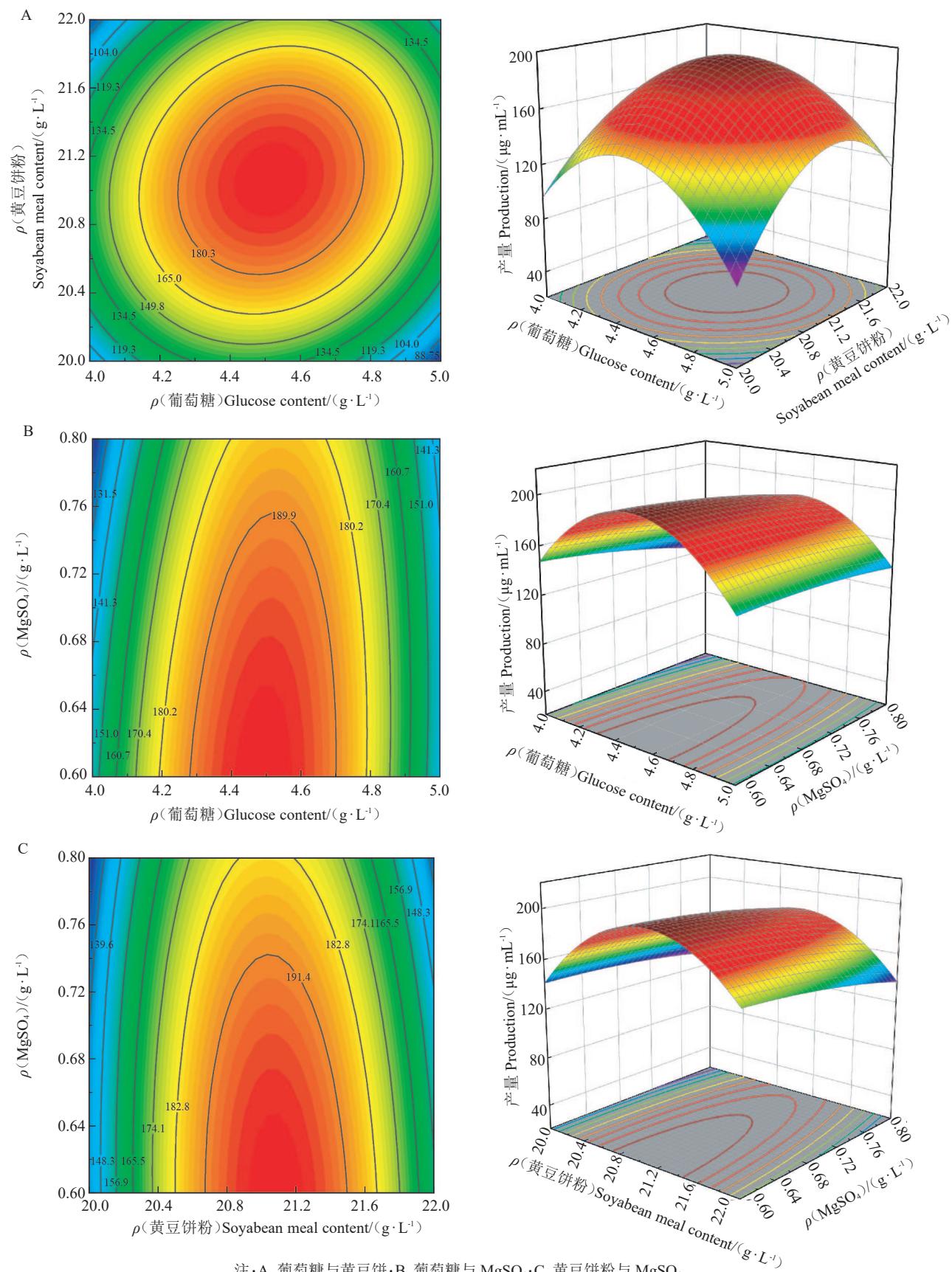


图 5 PBSH9 产生的活性化合物产量与不同营养成分的响应面优化

Fig. 5 Response surface optimization of active compounds production with different nutrients

的工艺优化,以此提高次级代谢产物产量,从而促进新型天然抗菌物质的研发。响应面法常用的试验设计方法有 Box-behnken 设计和中心组合设计 (CCD)。刘芳等^[39]应用 Box-behnken 响应面法对链霉菌 (*Streptomyces* sp.) WS-13394 产支链葸醌的发酵培养基进行优化,使产量提高了 3.59 倍。郄丽萍等^[40]应用 Box-behnken 响应面法对游动放线菌 TC19-3p-103 产替考拉宁发酵培养基进行优化,使产量提高了 31.6%。Yan 等^[41]应用 CCD 中心组合设计响应面法优化链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis*) FIM-16-06 产 tacrolimus 发酵培养基进行优化,使产量提高了 3.7 倍。

菌株 PBSH9 产生的活性化合物对马铃薯疮痂病病原菌 PS1 有较好的抑制作用,优化产生化合物的培养基,有利于产量显著提升,为活性物质的分离纯化、鉴定及利用奠定了基础。提高菌株 PBSH9 抑菌活性化合物产量的优化培养基组成为:4.50 g·L⁻¹ 葡萄糖、50.00 g·L⁻¹ 可溶性淀粉、15.00 g·L⁻¹ 玉米粉、21.08 g·L⁻¹ 黄豆饼粉、2.00 g·L⁻¹ 蛋白胨、0.50 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、0.60 g·L⁻¹ MgSO₄、0.04 g·L⁻¹ KH₂PO₄。优化后,活性化合物实际产量达到了 184.35 μg·mL⁻¹,提高了 5.83 倍。

参考文献

[1] 夏善勇,盛万民.我国马铃薯疮痂病及其防治研究进展[J].植物保护,2022,48(1):7-16.

[2] 李爽,杨美军,张云,等.马铃薯疮痂病研究进展[J].中国马铃薯,2018,32(4):240-248.

[3] 夏善勇,牛志敏,李庆全,等.马铃薯疮痂病菌及防控手段研究进展[J].中国瓜菜,2022,35(8):12-17.

[4] 李驰,刘艳,梁燕,等.马铃薯疮痂病病原菌鉴定及其生物学特性[J].农业生物技术学报,2019,27(5):897-907.

[5] LAMBERT D H, LORIA R. *Streptomyces scabies* sp. Nov. Nom. rev[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1989, 39(4):387-392.

[6] LORIA R, BUKHALID R A, FRY B A, et al. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*[J]. Plant Disease, 1997, 81 (8) : 836-846.

[7] 李宇晨.内蒙古马铃薯疮痂病菌的分离鉴定及多样性[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2021.

[8] SARWAR A, LATIF Z, ZHANG S Y, et al. A potential biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* AC12AB for managing potato common scab[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 202.

[9] WANG Z S, LI Y, ZHUANG L B, et al. A rhizosphere-derived consortium of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* suppresses common scab of potato and increases yield[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 17:645-653.

[10] ARSENEAULT T, GOYER C, FILION M. *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 increases potato yield and reduces common scab symptoms in the field[J]. Phytopathology, 2015, 105 (10) : 1311-1317.

[11] HAN J S, CHENG J H, YOON T M, et al. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. Sunhua[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 99 (1) : 213-221.

[12] MENG Q X, JIANG H H, HANSON L E, et al. Characterizing a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BAC03 for potential biological control application[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(5):1165-1175.

[13] LIN C, TSAI C H, CHEN P Y, et al. Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens* Ba01[J]. PloS One, 2018, 13(4):e0196520.

[14] NTEMAFACK A, AHMED S, KUMAR A, et al. Plant growth promoting potential of butyl isobutyl phthalate and *Streptomyces* sp. from *Rumex dentatus* on rice[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2022, 106(7):2603-2617.

[15] CHANG T L, HUANG T W, WANG Y X, et al. An actinobacterial isolate, *Streptomyces* sp. YX44, produces broad-spectrum antibiotics that strongly inhibit *Staphylococcus aureus*[J]. Microorganisms, 2021, 9(3):630.

[16] NGUYEN C T, DHAKAL D, PHAM V T, et al. Recent advances in strategies for activation and discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*[J]. Microorganisms, 2020, 8(4):616.

[17] SHARMA V, KAUR R, SALWAN R. *Streptomyces*: Host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites[J]. 3 Biotech, 2021, 11(7):340.

[18] PHAM V T, NGUYEN C T, DHAKAL D, et al. Recent advances in the heterologous biosynthesis of natural products from *Streptomyces*[J]. Applied Sciences, 2021, 11(4):1851.

[19] 薛正莲,王珊,孙俊峰,等.链霉菌形态分化与次级代谢产物合成的研究进展[J].微生物学报,2021,61(12):3870-3886.

[20] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版)2005,14(3):236-240.

[21] 李泰明,方伟,张亚妮,等.Box-Behnken 响应面法优化司替霉素 B 产生菌发酵条件[J].微生物学报,2022,62 (10) : 3844-3857.

[22] 张梦菲,余炼,李菲,等.响应面法优化暹罗芽孢杆菌产大环内酯的发酵培养条件[J].生物技术通报,2024,40(8):299-308.

[23] ZHANG X Y, LI C, HAO J J, et al. A novel *Streptomyces* sp. Strain PBSH9 for controlling potato common scab caused by *Streptomyces galilaeus*[J]. Plant Disease, 2020, 104 (7) : 1986-1993.

[24] 王丽玮.马铃薯疮痂病生防链霉菌 PBSH9 的鉴定及其抗生素作用研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2022.

[25] RAJESWARI P, JOSE P A, AMIYA R, et al. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 5:753.

[26] SARWAR A, LATIF Z, ZHANG S Y, et al. Biological control of

potato common scab with rare isatropolone c compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1126.

[27] SCHWARZ J, HUBMANN G, ROSENTHAL K, et al. Triaging of culture conditions for enhanced secondary metabolite diversity from different bacteria[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2):193.

[28] VLAJKOV V, ANDELIĆ S, PAJČIN I, et al. Medium for the production of *Bacillus*-based biocontrol agent effective against aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: Dual approach for modelling and optimization[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6): 1165.

[29] 张昊月, 郭正彦, 吕志堂, 等. 应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 113-122.

[30] 张莉, 米贵东, 王昂, 等. 响应面法优化非达霉素发酵培养基及中试应用[J]. *中国抗生素杂志*, 2025, 50(1): 41-49.

[31] 李文科, 张仁文, 万传星. 野野村放线菌 DB-3-04 产达巴万星前体 A-40926 B0 发酵培养基优化[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(12): 1353-1361.

[32] CHEN J, LAN X J, JIA R M, et al. Response surface methodology (RSM) mediated optimization of medium components for mycelial growth and metabolites production of *Streptomyces al-falfae* XN-04[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9), 1854.

[33] 张艳敏, 董学前, 张永刚, 等. 响应面法优化褐黄孢链霉菌 ZM701 产纳他霉素发酵培养基[J]. *中国酿造*, 2016, 35(4): 112-117.

[34] 马思彤. 波拉霉素发酵培养基优化及菌株改造[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.

[35] ABHINI K N, RAJAN A B, ZUHARA K F, et al. Response surface methodological optimization of L-asparaginase production from the medicinal plant endophyte *Acinetobacter baumannii* ZAS1[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2022, 20(1): 22.

[36] ZHU C H, LU F P, HE Y N, et al. Statistical optimization of medium components for avilamycin production by *Streptomyces viridochromogenes* Tü57-1 using response surface methodology[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34(4): 271-278.

[37] ZHOU W, LIU X H, ZHANG P, et al. Effect analysis of mineral salt concentrations on nosiheptide production by *Streptomyces actuosus* Z-10 using response surface methodology[J]. *Molecules*, 2014, 19, 15507-15520.

[38] VENKATESWARULU T C, PRABHAKAR K V, KUMAR R B. Optimization of nutritional components of medium by response surface methodology for enhanced production of lactase[J]. *Biotech*, 2017, 7: 202.

[39] 刘芳, 权婷婷, 张菲, 等. 响应面法优化链霉菌产支链葸醌发酵培养基[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(7): 3142-3154.

[40] 郭丽萍, 姜明星, 葛鹏鹏, 等. 响应面法优化替考拉宁发酵培养基及其扩大培养[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(10): 1051-1056.

[41] YAN L B, ZHANG Z L, ZHANG Y, et al. Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett-Burman design combined with response surface methodology[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(9): 1765-1778.