

研究报告

响应面法优化提高萎缩芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病病原菌活性的研究

乔佳慧子^{1,2,3,4,5}, 沈硕^{*1,2,3,4,5}, 呼荣^{1,2,3,4,5}

1 青海大学, 青海 西宁 810016

2 青海省农林科学院, 青海 西宁 810016

3 青海省马铃薯育种重点实验室, 青海 西宁 810016

4 青藏高原生物技术教育部重点实验室, 青海 西宁 810016

5 西北马铃薯教育部工程研究中心, 青海 西宁 810016

乔佳慧子, 沈硕, 呼荣. 响应面法优化提高萎缩芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病病原菌活性的研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2411-2427

Qiao Jiahuzi, Shen Shuo, Hu Rong. Improving the activity of *Bacillus atrophaeus* E20303 against the dry rot pathogen of potato: based on response surface methodology[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2411-2427

摘要:【背景】萎缩芽孢杆菌 E20303 可以有效地抑制马铃薯干腐病病原菌的活性, 而响应面法可在较少的试验次数下优化生防菌发酵培养基配方与发酵条件, 获得的最优组合将为马铃薯干腐病生防菌剂的制备与应用提供参考。【目的】以分离自青海察尔汗盐湖湖泥中且对马铃薯干腐病病原菌具有较高抑菌活性的萎缩芽孢杆菌 E20303 为研究对象, 利用响应面法对其培养基配方和发酵条件进行优化, 以期提高其对马铃薯干腐病病原菌的抑菌活性。【方法】采用单因素试验、中心组合设计试验及响应面法设计优化萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基配方及发酵条件。【结果】培养基最优发酵配方(g/L): 淀粉 10.72、酵母粉 23.60、七水合硫酸镁 16.00、碳酸钙 1.14、磷酸二氢钾 8.00 和磷酸氢二钾 16.00, 优化后抑菌率由 46.51% 提高至 62.00%; 最优发酵条件为装液量 102.89 mL、pH 8.64、温度 28.73 °C、转速 200 r/min、培养时间 3 d、接种量 2%, 优化后抑菌率由 51.15% 提高至 72.51%。【结论】实验获得了对马铃薯干腐病病原菌的抑菌活性明显提高的萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵配方及发酵条件, 为马铃薯干腐病生防制剂的后续研究提供支撑。

关键词: 响应面法; 发酵配方; 发酵条件; 萎缩芽孢杆菌; 马铃薯干腐病; 抑菌活性

基金项目: 青海省自然科学基金(2019-ZJ-914); 青海省科技厅重大科技专项(2019-NK-A1); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-09)

Supported by: Natural Science Foundation of Qinghai Province (2019-ZJ-914); Major Science and Technology Projects of Qinghai Science and Technology Department (2019-NK-A1); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-09)

*Corresponding author: E-mail: fjzss@126.com

Received: 2021-09-29; Accepted: 2022-04-05; Published online: 2022-04-20

Improving the activity of *Bacillus atrophaeus* E20303 against the dry rot pathogen of potato: based on response surface methodology

QIAO Jiahuizi^{1,2,3,4,5}, SHEN Shuo^{*1,2,3,4,5}, HU Rong^{1,2,3,4,5}

1 Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, Qinghai, China

3 Key Laboratory of Potato Breeding of Qinghai Province, Xining 810016, Qinghai, China

4 The Tibet Plateau Biotechnology Key Laboratory of Ministry of Education, Xining 810016, Qinghai, China

5 Northwest Potato Engineering Research Center, Ministry of Education, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] *Bacillus atrophaeus* E20303 can inhibit the activity of the dry rot pathogen of potato and the response surface methodology can optimize the components of medium for fermentation and fermentation conditions of biocontrol bacteria. The optimal medium components and fermentation conditions for E20303 can serve as a reference for the preparation and application of biocontrol agents against potato dry rot. [Objective] To optimize the medium components and fermentation conditions of E20303, a strain isolated from the mud of Chaerhan Salt Lake in Qinghai with high activity against the dry rot pathogen of potato, by response surface methodology in order to improve its antifungal activity. [Methods] Single factor experiment, central composite design, and response surface methodology were used to design and optimize the medium components and fermentation conditions of E20303. [Results] The optimal components of the medium were starch 10.72 g/L, yeast powder 23.60 g/L, MgSO₄·7H₂O 16.00 g/L, CaCO₃ 1.14 g/L, KH₂PO₄ 8.00 g/L, and K₂HPO₄ 16.00 g/L. After optimization, the antifungal rate increased from 46.51% to 62.00%. The optimal fermentation conditions were liquid medium volume of 102.89 mL, pH 8.64, 28.73 °C, rotation speed 200 r/min, culture for 3 days, and inoculum 2%. Under the conditions, the bacteriostatic rate rose from 51.15% to 72.51%. [Conclusion] The fermentation formula and fermentation conditions of E20303 with significantly improved activity against the dry rot pathogen of potato were clarified, which laid a foundation for research on the biocontrol agents against potato dry rot.

Keywords: response surface methodology; fermentation medium formula; fermentation conditions; *Bacillus atrophaeus*; potato dry rot; antifungal activity

马铃薯干腐病是由多种镰刀菌(*Fusarium* sp.)引起的真菌性病害,一般发生于窖藏期的马铃薯块茎^[1]。目前应用于马铃薯干腐病微生物防治的菌株主要为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)和放线菌(*Actinomycetes* sp.)^[2-3]。嗜盐菌是一类生长于盐湖、盐矿等富盐极端环境下的特殊微生物,部分嗜盐菌的次级代谢产物对植物具有促生防病等功效^[4-6]。青藏高原

地区察尔汗盐湖中度嗜盐菌具有丰富的微生物种群和遗传多样性,前人研究表明,部分中度嗜盐菌具有抑制多种植物病原菌的生防活性^[7-10]。

由于生防菌产生次级代谢产物的过程具有不稳定性等特点,为了使生防菌能够更好地应用于农业生产,设计一个最优的发酵配方及发酵条件是提高生防菌对病原菌抑制活性的首要条件^[11-12]。响应面法是通过试验设计,采用多

元二次回归方程拟合自变量与响应值之间的函数关系, 对优化发酵配方与发酵条件的多个变量的最优水平进行计算预测的优化技术^[12-13]。

本课题组在进行马铃薯干腐病拮抗菌筛选过程中, 自青海察尔汗盐湖湖泥中分离得到一株对马铃薯干腐病原菌具有较高抑制活性的菌株 E20303。本文通过对菌株 E20303 进行单因素试验、中心组合设计及响应面法优化发酵培养基及发酵条件, 以进一步提高其发酵效价, 为后期生防制剂的开发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

萎缩芽孢杆菌 E20303 由本课题组成员分离自察尔汗盐湖湖泥中, 经鉴定为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*, 登录号为 MF184034); 马铃薯干腐病原菌青 9A-4-13 为锐顶镰刀菌(*Fusarium acuminatum*), 菌株均由本实验室分离保存。

1.1.2 培 养 基

ATCC 213 改良培养基(g/L)^[13]: MgSO₄·7H₂O 10.0, CaCl₂·2H₂O 0.2, KCl 5.0, 蛋白胨 2.5, 酵母粉 10.0, NaCl 30.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.2-7.4。PDA 培养基(g/L)^[8]: 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0。以上培养基不加琼脂粉即为 ATCC 213 改良液体培养基和 PDB 液体培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器

牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、MgSO₄·7H₂O 等试剂, 国药集团化学试剂有限公司。恒温摇瓶柜, 常州金坛精达仪器制造有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 超净工作台, 益世科(上海)企业发展有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 种子液制备

取 EP 管中保存的菌株 E20303, 用接种针划线接种于 ATCC 213 改良培养基平板上, 28 °C 培养 24-48 h。用 8 mm 的无菌打孔器打取 3 个菌饼, 将其接种于装有 400 mL ATCC 213 改良液体培养基的 1 000 mL 锥形瓶中, 放置于 28 °C、180 r/min 转速的恒温摇瓶柜中培养 24 h, 备用。

1.2.2 萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵液及无菌滤液的制备

以 2%接种量的种子液, 接种于不同配方(碳源、氮源、无机盐)或不同发酵条件(接种量、初始 pH 值、培养时间、温度、转速及装液量)的 ATCC 213 改良液体培养基中, 装液量为 400 mL/1 000 mL, 于 28 °C 的恒温摇瓶柜中以 180 r/min 的转速培养 7 d, 收获发酵液。将发酵液在 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 得发酵液无菌滤液。

1.2.3 发酵液无菌滤液抑菌活性

采用牛津杯法测定菌株 E20303 发酵液无菌滤液的抑菌活性。在平板中心位置接种直径为 5 mm 的病原真菌, 在平板上距离中心位置 2.5 cm 处等距离放置 3 个牛津杯, 每个牛津杯内加入 200 μL 菌株 E20303 的发酵液无菌滤液, 以只接种病原真菌的培养基平板为对照, 在 28 °C 的培养箱中培养 24 h, 测量抑菌带宽度, 计算抑菌率。计算公式:

抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100。

1.2.4 发酵培养基配方的优化

在 ATCC 213 改良培养基基础上, 分别选用葡萄糖、蔗糖、淀粉、甘油、玉米粉作为碳源; 分别选用胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏、酵

母粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 作为氮源；分别选用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 和 NaCl 作为无机盐，其他成分及含量不变，按照 1.2.2 和 1.2.3 的方法制备无菌发酵液并计算抑菌率。

1.2.5 发酵培养基培养条件的优化

利用紫外分光光度计测定不同发酵条件下培养的发酵液的吸光度，以发酵液吸光度 OD_{600} 为指标优化菌株 E20303 培养条件，对菌株的接种量、初始 pH 值、培养时间、温度、转速及装液量等发酵条件进行优化。条件设置如下：接种量：1%、2%、5%、8%和 10%；按 2%的初始接种量设置初始 pH 值，分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0；培养时间分别为 24、48、72、96 和 120 h；培养温度分别为 24、26、28、30、32 和 34 °C；转速分别为 150、170、180、200 和 220 r/min；装液量分别为 50、75、100、125 和 150 mL 于 250 mL 的锥形瓶中，放置于 28 °C 的恒温摇瓶柜中以 180 r/min 的转速培养 5 d。按照 1.2.2 和 1.2.3 的方法制备无菌发酵液并计算抑菌率。

1.2.6 中心组合设计-响应面法优化技术试验设计

(1) 发酵培养基成分

通过中心组合设计(central composite design, CCD)和响应面法(response surface methodology, RSM)优化技术对萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基进行优化。以其对病原菌的抑制率为响应值(Y)，碳源(X_1)、氮源(X_2)和无机盐(X_3)分别为自变量，其中碳源、氮源及无机盐均由 1.2.4 筛选获得。根据中心组合设计，总的实验处理组合数 $N=2^k+2k+n_0$ ，式中， k 表示独立变量的个数； n_0 表示中心点在实验中的重复次数。各因素质量浓度与其对应自变量的编码转化公式： $x_i=(X_i-X_j)/\Delta X_i$ ， $i=1, 2, 3, \dots, k$ 。式中： x_i 为自

变量的编码值， X_i 为自变量的实际实验水平， X_j 为实验水平在中心点的实际水平， ΔX_i 为增量。响应面优化模型采用二次方程：

$$Y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_i \sum_j b_{ij} x_{ij} + \sum_i b_{ii} x_i^2$$

式中： Y 为病原菌抑制率， b_0 为常数项， b_i 、 b_{ij} 和 b_{ii} 分别为一次项 x_i 、交互项 x_{ij} 和二次项 x_i^2 的系数。发酵培养基优化试验的因素、水平设计见表 1，采用 Minitab 17.0 软件对响应面实验处理组合进行设计(表 2)。

(2) 发酵培养条件

以对马铃薯干腐病病原菌的抑制率为响应值，同时分析单因素实验结果，以单因素筛选得到发酵条件中 3 个显著因素 pH、装液量及温度为响应面试验的 3 个因素，进行三因素三水平的 Box-Behnken design，试验因素及水平如表 3 所示。用软件 Design Expert 11 对实验设计进行回归分析并且进行误差分析。

根据 Design Expert 11 结果得到萎缩芽孢杆菌 E20303 最佳培养条件后，按最佳培养条件进行抑菌试验，将实验得到的最优抑菌率与预测值进行比较，并与未优化的原培养条件下抑菌率进行比较验证。

表 1 实验变量的取值及范围

Table 1 Experimental range and level of the independent variables

变量 Variables	参数 Parameter	取值范围及水平 Range and level				
		-1.682	-1	0	1	1.682
x_1	淀粉 Starch (g/L)	1.6	5.0	10.0	15.0	18.4
x_2	酵母粉 Yeast powder (g/L)	1.8	5.0	15.0	25.0	31.8
x_3	无机盐 Inorganic salt (g/L)	4.8	15.0	30.0	45.0	55.2

表 2 菌株 E20303 发酵培养基优化试验的因素和水平

Table 2 Experimental range and levels of the independent variables

标准序 Standard order	运行序 Run order	点类型 Point type	区组 Block	淀粉 Starch (g/L)	酵母粉 Yeast powder (g/L)	无机盐 Inorganic salt (g/L)
15	1	0	1	10.0	15.0	30.0
1	2	1	1	5.0	5.0	15.0
16	3	0	1	10.0	15.0	30.0
9	4	-1	1	1.6.0	15.0	30.0
4	5	1	1	15.0	25.0	15.0
14	6	-1	1	10.0	15.0	55.2
12	7	-1	1	10.0	31.8	30.0
10	8	-1	1	18.4	15.0	30.0
17	9	0	1	10.0	15.0	30.0
19	10	0	1	10.0	15.0	30.0
3	11	1	1	5.0	25.0	15.0
5	12	1	1	5.0	5.0	45.0
7	13	1	1	5.0	25.0	45.0
2	14	1	1	15.0	5.0	15.0
13	15	-1	1	10.0	15.0	4.8
8	16	1	1	15.0	25.0	45.0
6	17	1	1	15.0	5.0	45.0
18	18	0	1	10.0	15.0	30.0
11	19	-1	1	10.0	1.8	30.0
20	20	0	1	10.0	15.0	30.0

2 结果与分析

2.1 发酵配方优化的试验及分析

2.1.1 不同碳源、氮源及无机盐对菌株 E20303 抑制马铃薯干腐病原真菌活性的影响

在不同条件下,萎缩芽孢杆菌 E20303 无菌发酵液对马铃薯干腐病原真菌具有抑制活性。并且,随着对峙培养时间的延长,抑制率

逐渐增大。在 ATCC 213 改良培养基中分别加入 2.5 g 不同的碳源,经培养后,菌株 E20303 对病原真菌的抑制活性由高到低依次为:淀粉、玉米粉、葡萄糖、蔗糖和甘油,抑制率最高为 39.42% (图 1)。在 ATCC 213 改良培养基中分别加入 12.5 g 不同的氮源,经培养后,菌株 E20303 对病原真菌的抑制活性由高到低依次为:酵母粉、蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、硝酸铵和硫酸铵,抑制率最高为 46.44% (图 2)。在 ATCC 213 改良培养基中加入 30 g 不同的无机盐,其他成分及含量不变,经培养后,菌株 E20303 对病原真菌的抑制活性由高到低依次为: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 、 $CaCO_3$ 、 $NaCl$ 和 KH_2PO_4 , 抑制率最高为 36.47% (图 3)。

表 3 响应面法因素水平设计

Table 3 Response surface method factors level design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
pH	7	8	9
装液量 Volume (mL)	75	100	125
温度 Temperature (°C)	26	30	34

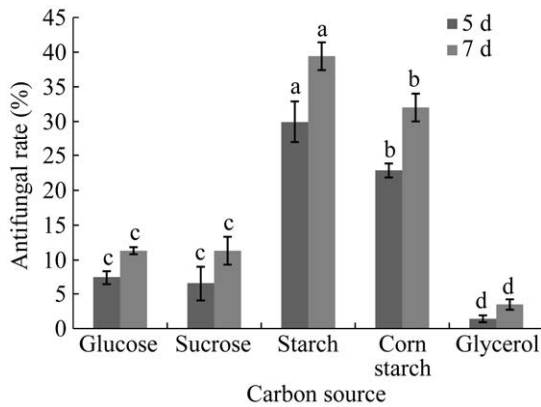


图1 不同碳源对菌株 E20303 抑制病原真菌活性的影响 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 下同

Figure 1 The effect of different carbon source on the inhibitory activity of strain E20303 against pathogen. Different lowercase letters represent significant differences at $P < 0.05$ level, the same below.

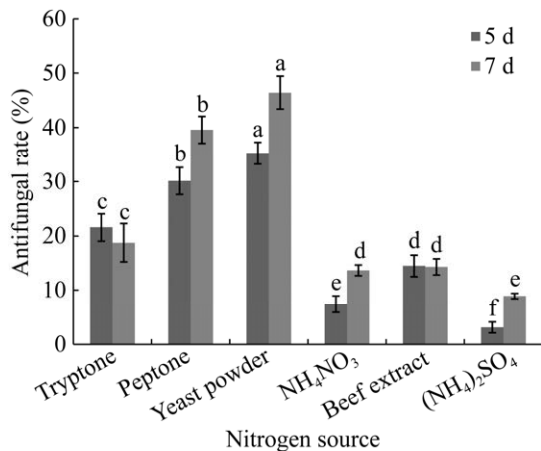


图2 不同氮源对菌株 E20303 抑制病原真菌活性的影响

Figure 2 The effect of different nitrogen source on the inhibitory activity of strain E20303 against pathogen.

2.1.2 萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵配方的优化

以淀粉为碳源、酵母粉为氮源、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为无机盐, 就培养基各组分浓度配比对萎缩芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病原真菌活

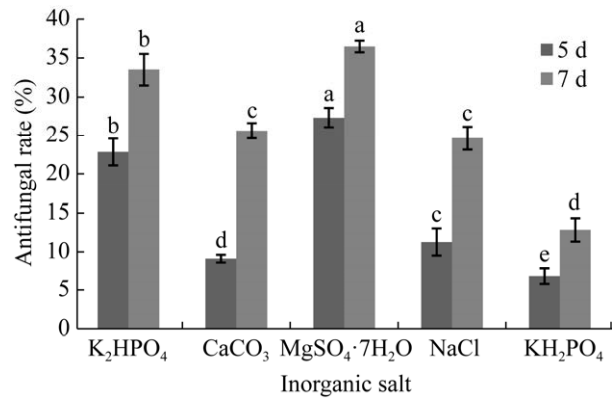


图3 不同无机盐对菌株 E20303 抑制病原真菌活性的影响

Figure 3 The effect of different inorganic salt on the inhibitory activity of strain E20303 against pathogen.

性的影响进行研究, 所研究变量及水平如表 2 所示。结果表明(表 4): 培养基中 3 个独立变量抑制病原菌的活性变化较大。其中, 处理 5、7、和 20 对病原真菌的抑制率大于 60%; 处理 5 的抑制作用最大, 达到 62.09%; 处理 4 的抑制率最小, 达到 48.37%。其中, 处理 15–20 是实验设计的中心点, 重复 6 次以估算实验误差, 结果表明 6 次试验重复之间存在实验误差。

2.1.3 二阶回归模型的拟合及方差分析

通过 Minitab 17.0 软件中的响应曲面设计分析发现, 二阶多项式中每个系数都解释了每个变量的作用以及它们对抑制活性的交互作用。

对表 4 数据进行回归分析, 得到各因子响应二阶多项式方程:

$$Y = 48.19 + 0.68x_1 - 0.13x_2 + 0.48x_3 - 0.06x_1^2 - 0.01x_2^2 - 0.01x_3^2 + 0.03x_1x_2 - 0.01x_1x_3 + 0.01x_2x_3$$

式中, Y 是响应值, 即抑制率。 x_1 、 x_2 和 x_3 分别表示淀粉、酵母粉和无机盐。该二阶方程式模型包含 3 个线性变量、3 个二次变量和 3 个两因素交互作用, 显著差异性分析如表 5 所示。

表 4 中心组合设计编码值、观测值和预测值

Table 4 CCD plan of coded value, the observed value and predicted value

处理 Treatment	x_1	x_2	x_3	抑制率 Inhibitory rate (%)	预测值 Predicted value	残差 Residual
1	1	1	1	56.28	58.21	-1.93
2	1	1	-1	52.09	53.45	-1.36
3	1	-1	1	54.19	52.16	2.03
4	1	-1	-1	48.37	51.23	-2.86
5	-1	1	1	62.09	59.67	2.42
6	-1	1	-1	49.53	52.00	-2.47
7	-1	-1	1	60.47	59.55	0.92
8	-1	-1	-1	57.21	55.72	1.49
9	1.682	0	0	54.65	52.41	2.24
10	-1.682	0	0	55.81	57.42	-1.61
11	0	1.682	0	58.84	57.06	1.78
12	0	-1.682	0	53.95	55.10	-1.15
13	0	0	1.682	56.74	59.00	-2.26
14	0	0	-1.682	54.65	51.77	2.88
15	0	0	0	58.60	58.93	-0.33
16	0	0	0	59.07	58.93	0.14
17	0	0	0	59.07	58.93	0.14
18	0	0	0	57.21	58.93	-1.72
19	0	0	0	59.07	58.93	0.14
20	0	0	0	60.47	58.93	1.54

表 5 回归系数及显著性检验

Table 5 Model coefficients estimated by multiples linear regression (significance of regression coefficients)

来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
线性 Linear	97.95	3	32.65	5.11	0.021*
x_1	30.24	1	30.24	4.73	0.055
x_2	4.66	1	4.66	0.73	0.413
x_3	63.05	1	63.05	9.87	0.010**
平方 Second power	55.74	3	18.58	2.91	0.087
x_1^2	29.05	1	29.05	4.55	0.059
x_2^2	14.64	1	14.64	2.29	0.161
x_3^2	22.71	1	22.71	3.56	0.089
双因子交互作用 Two-factor interaction	29.19	3	9.73	1.52	0.268
x_1x_2	17.61	1	17.61	2.76	0.128
x_1x_3	4.22	1	4.22	0.66	0.435
x_2x_3	7.35	1	7.35	1.15	0.308

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

回归模型的显著性检验结果表明(表 6): 回归模型的 $P=0.043 < 0.05$, 差异达到显著; 失拟检验表明非实验因素对实验结果的影响不显著, 说明抑制率(Y)与实际情况拟合充分。同时,

该模型的决定系数 $R^2=0.74$, 说明该模型能解释 72% 的抑制率变化, 调整后的决定系数 $R^2=0.51$, 说明该模型显著。由此可见, 该回归模型适合对萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基的优化筛选。

表 6 回归模型的显著性检验

Table 6 Significance test of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	SS	DF	MS	F value	P value
模型 Model	182.87	9	20.32	3.18	0.043*
误差 Error	63.86	10	6.39		
失拟 Lack of fit	58.37	5	11.67	10.62	0.051
纯误差	5.50	5	1.10		
Pure error					
合计 Total	246.74	19			

注：决定系数 $R^2=0.74$ ；调整后的决定系数 $R^2=0.51$

Note: Coefficient of determination $R^2=0.74$; Adjusted $R^2=0.51$.

2.1.4 发酵配方优化的响应面分析

回归模型所描述的 3D 响应面图和 2D 等高线图揭示了自变量的作用效果及每个自变量对响应因变量的交互作用。等高线图的形状可表明自变量间的交互作用是否显著，椭圆形的等高线表明自变量之间的交互作用显著。通过 3D 响应面图及其相对应的等高线图可对最佳自变量的取值及与之相对应的响应值进行预测。响应面所展现的最大值在等高线图中处于最小椭圆中。

将培养基中的无机盐浓度控制在 30 g/L 条件下，淀粉和酵母粉对萎缩芽孢杆菌 E20303

抑制马铃薯干腐病原真菌活性的 3D 响应面图及相对应的 2D 等高线图如图 4 所示。从图 4 的 3D 响应面图中可以看出萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基对病原真菌的抑制率可随着淀粉和酵母粉浓度的变化而发生明显的变化。当酵母粉浓度不变时，随着淀粉浓度的增大抑制率逐渐减小；当淀粉浓度不变时，随着酵母粉浓度的增大抑制率增大。2D 等高线图中呈现一定的椭圆形状，可见淀粉与酵母粉对抑制率的影响存在交互作用。

将培养基中的酵母粉浓度控制在 15 g/L 条件下，淀粉和无机盐对萎缩芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病原真菌活性的 3D 响应面图及相对应的 2D 等高线图如图 5 所示。从图 5 的 3D 响应面图中可以看出萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基对病原真菌的抑制率可随着淀粉和无机盐浓度的变化而发生明显的变化。当无机盐浓度不变时，随着淀粉浓度的增大抑制率先增大后减小；当淀粉浓度不变时，无机盐对抑制率的影响亦然。2D 等高线图呈现一定的椭圆形状，可见淀粉与无机盐对抑制率的影响存在一定的交互作用。

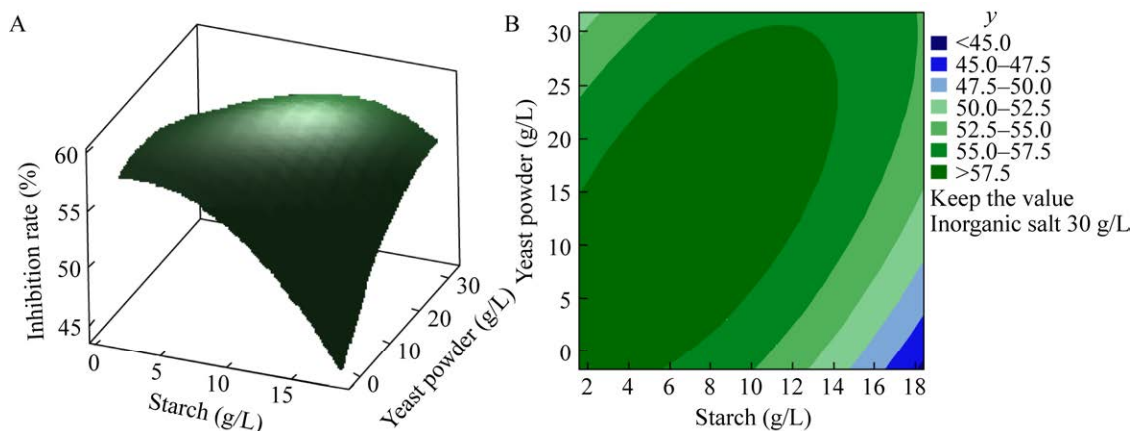


图 4 淀粉和酵母粉的响应面图(A)和等高线图(B)

Figure 4 Response surface plot (A) and contour plot (B) of starch and yeast powder.

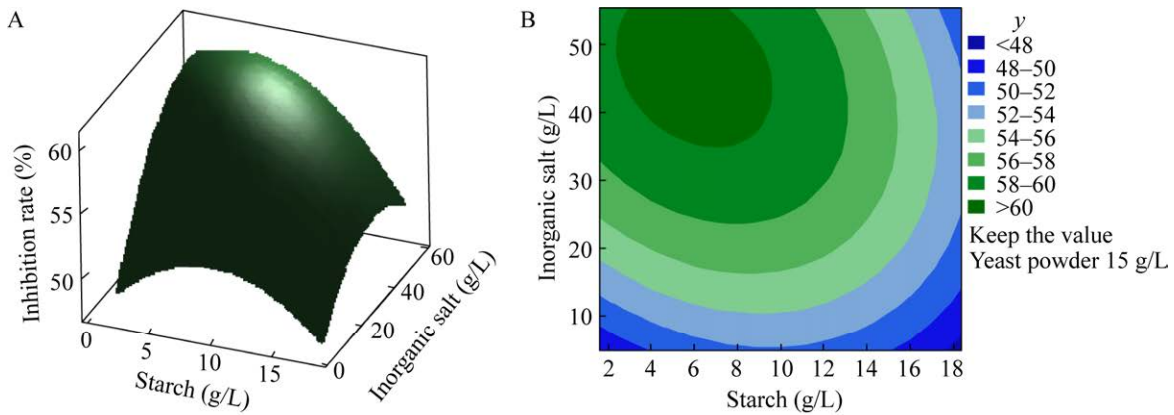


图 5 淀粉和无机盐的响应面图(A)和等高线图(B)
Figure 5 Response surface plot (A) and contour plot (B) of starch and inorganic salt.

将培养基中的淀粉浓度控制在 10 g/L 条件下, 酵母粉和无机盐对萎缩芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病原真菌活性的 3D 响应面图及相对应的 2D 等高线图如图 6 所示。从图 6 的 3D 响应面图中可以看出萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基对病原真菌的抑制率可随着酵母粉和无机盐浓度的变化而发生明显的变化。当无机盐浓度不变时, 随着酵母粉浓度的增大抑制率逐渐减小; 当酵母粉浓度不变时, 随着无机盐浓度的增大抑制率逐渐增大。2D 等高线图呈现一定的椭圆形状, 可见酵母粉与无机盐对抑制率的影响存在显著的交互

作用。

观察所拟合 3D 响应曲面的形状可知, 响应面的开口向下, 存在极大值点, 说明回归模型存在稳定点。对回归模型进行一阶偏导求导, 并令其为零, 从而求得曲面的最大点。

$$0.068 - 0.012x_1 + 0.003x_2 - 0.001x_3 = 0;$$

$$0.013 + 0.003x_1 - 0.002x_2 + 0.001x_3 = 0;$$

$$0.048 - 0.001x_1 + 0.001x_2 - 0.002x_3 = 0.$$

对 3 个三元一次方程求解得: $x_1=1.44$; $x_2=4.86$; $x_3=4.11$ 。

根据所求得的 3 个变量最大值, 通过响应面回归方程, 求得 $Y=62.00\%$ 。

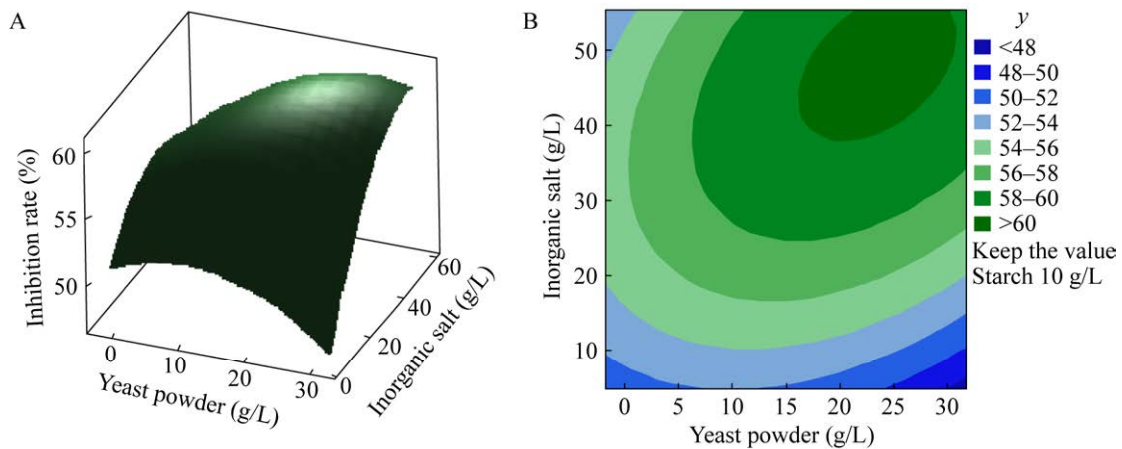


图 6 酵母粉和无机盐的响应面图(A)和等高线图(B)
Figure 6 Response surface diagram (A) and contour diagram (B) of yeast powder and inorganic salt.

再根据上述3个变量的最大值,通过自变量的编码转化公式,可计算得出各因子及其水平值分别为淀粉(x_1) 10.72 g/L,酵母粉(x_2) 23.60 g/L,无机盐(x_3) 41.14 g/L。特别需要注意的是,无机盐为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 、 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 的总和,其中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.00 g/L、 CaCO_3 1.14 g/L、 KH_2PO_4 8.00 g/L 和 K_2HPO_4 16.00 g/L。综上所述:萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵培养基配方为:淀粉 10.72 g/L、酵母粉 23.60 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.00 g/L、 CaCO_3 1.14 g/L、 KH_2PO_4 8.00 g/L 和 K_2HPO_4 16.00 g/L。优化后菌株 E20303 对病原菌的抑制率由优化前的 46.51% 增加到 62.00%。

2.2 发酵条件优化试验及分析

2.2.1 不同发酵条件对菌株 E20303 抑制马铃薯干腐病原真菌活性的影响

如图 7A 所示,接种量为 2% 时,菌株 E20303 发酵液的抑菌活性最高。如图 7B 所示,装液量在 50–75 mL 时抑菌率和 OD_{600} 值都呈显著增高,并在装液量为 75 mL 时抑菌活性达到最大值。如图 7C 所示,pH 值在 8.0 之前抑菌率和 OD_{600} 值呈缓慢增高,pH 8.0 时到达最大抑菌率,抑菌活性在 pH 8.0 之后呈现出快速下降趋势。如图 7D 所示,E20303 菌株发酵液的抑菌活性受到培养天数的影响较小,培养天数在 3 d 之前抑菌率和 OD_{600} 值都呈不断增高趋势,培养至第 3 天抑菌率达到最高为 63.45%。如图 7E 所示,转速 200 r/min 时抑菌率达到最大值,200 r/min 之后抑菌率呈现出下降趋势。如图 7F 所示,温度在 30 °C 前抑菌率和 OD_{600} 值都呈增高趋势,在 30 °C 时抑菌率达到最大值,但随着温度持续上升,菌株由于温度变高失去活性, OD_{600} 值急剧降低。

2.2.2 发酵条件优化的响应面分析

根据对单因素试验结果进行分析,选取 pH、装液量、温度 3 个因素,以对马铃薯干腐

病病原菌抑制率为响应值,用软件 Design Expert 11 设计三因素三水平的响应面试验,实验设计及结果如表 7 所示。通过软件对分析结果进行多元回归拟合,获得以 Y (抑菌率)为响应值,以 A (pH)、 B (装液量)、 C (温度)为变量的二阶回归方程: $Y=83.48-0.2675A-4.23B+1.37C+8.5AB+4.55AC+1.02BC-17.58A^2-14.40B^2-14.42C^2$ 。

根据 F 检验分析所得模型,对回归模型进行方差分析和显著性检验,如表 8 所示,本试验响应面优化模型得 $P=0.0094 < 0.01$,表示以马铃薯干腐病原菌抑制率为响应值所建立的回归方程式是显著的且失拟项 $P=0.1394$ (不显著),代表该实验数据与模型拟合度较好,对培养条件优化具有显著意义,能够得到比较好的拟合后实验数据,该模型的拟合度 $R^2=0.8982$,表示不能由此模型解释的变异只有 0.1018,并且信噪比为 7.254 $1 > 4$,这表示模型拟合度及可信度较高,可以用于分析和预测菌株 E20303 在发酵期间的 pH、装液量及温度对马铃薯干腐病原菌抑制率间的关系。二次项(A^2 、 B^2 、 C^2)均表现出显著差异($P < 0.01$),对显著性和 F 值分析可知,各因子对马铃薯干腐病原菌抑制率影响大小为:装液量 $>$ pH $>$ 温度。

为了反映各实验因素及其之间的交互作用对抑菌率的影响,根据上述拟合方程绘制出 3D 响应面图及 2D 等高线图,结果如图 8 所示。

如图 8 所示,当固定温度为 28.73 °C 时,装液量从 75 mL 增大至 125 mL,pH 值从 7.0 增大至 9.0 的过程中,发酵液对马铃薯干腐病原菌抑制率均呈现先逐渐增大后减小的趋势,曲面的最高点即为抑制率最大值点,响应面所得到的最大值落在等高线图的最小椭圆中,且等高线较为椭圆,说明装液量与 pH 之间的交互作用显著。

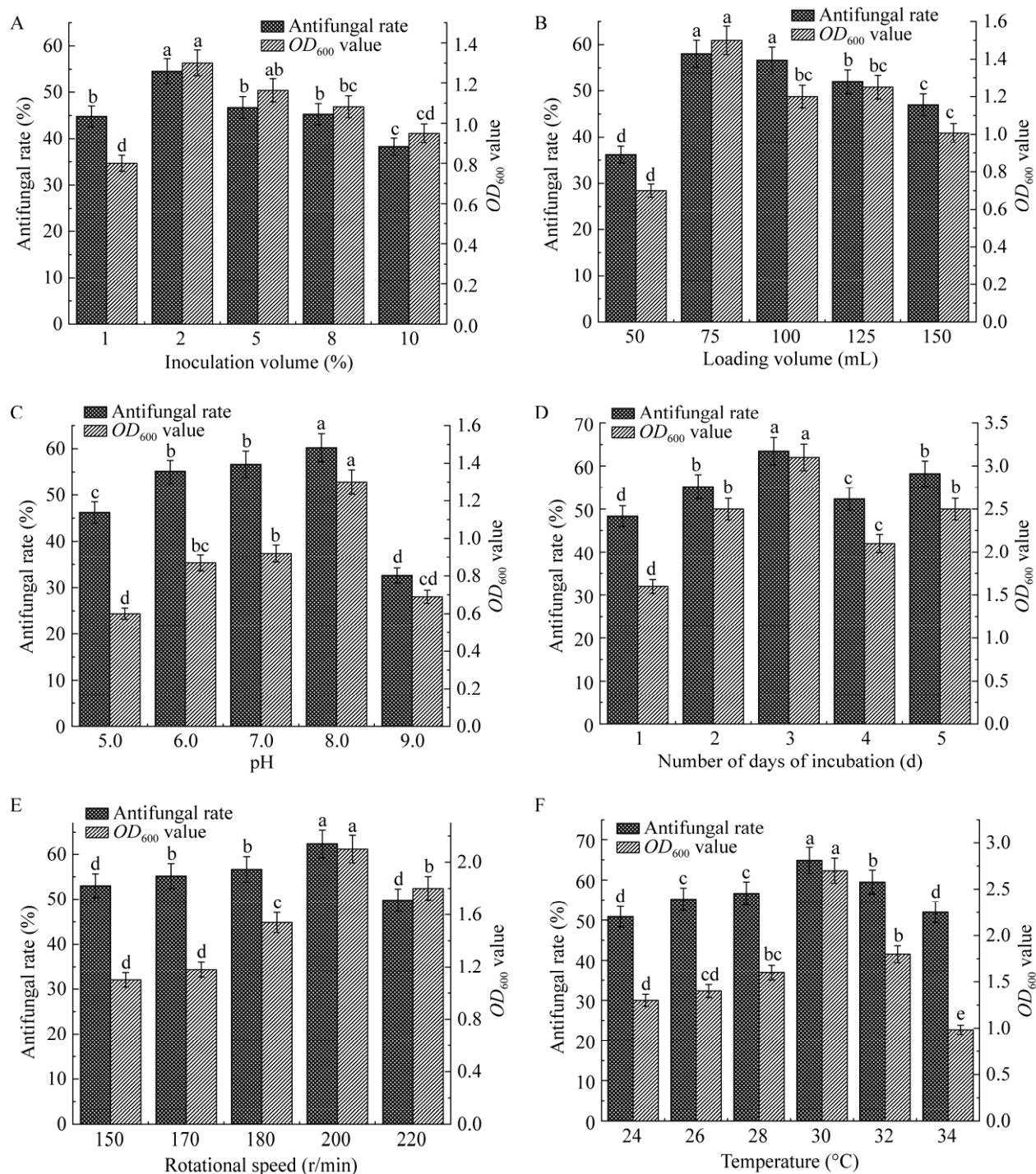


图 7 不同发酵条件培养的发酵液的抑菌率和 OD_{600} 值 A: 初始接种量; B: 装液量; C: 不同 pH; D: 培养天数; E: 转速; F: 温度

Figure 7 Antifungal rate and OD_{600} value of fermentation broth cultured under different fermentation conditions. A: Inoculation volume; B: Loading volume; C: pH; D: Culturing days; E: Rotational speed; F: Temperature.

表 7 响应面试验设计及结果

Table 7 Response surface experimental design and results

Test No.	A pH	B 装液量 B Fluid volume (mL)	C 温度 C Temperature (°C)	抑菌率 Antifungal rate (%)
1	0	-1	-1	62.75
2	0	0	0	65.45
3	-1	0	-1	54.89
4	-1	-1	0	57.28
5	0	1	1	65.54
6	1	-1	0	64.68
7	-1	1	0	65.58
8	1	1	0	56.57
9	0	0	0	66.59
10	0	1	-1	66.85
11	1	0	-1	67.57
12	-1	0	1	59.97
13	0	0	0	65.34
14	1	0	1	63.35
15	0	-1	1	65.78
16	0	0	0	64.42
17	0	0	0	62.87

如图 9 所示, 当固定装液量为 102.89 mL 时, 发酵温度从 26 °C 增大至 34 °C, pH 值从 7.0 增大至 9.0 的过程中, 发酵液对马铃薯干腐病原菌抑菌率均呈现先增大后又减小的趋势, 曲面的最高点即为抑制率最大值点, 响应面所得到的最大值落在等高线图的最小椭圆中, 并且等高线图呈椭圆形, 说明发酵温度与 pH 之间的交互作用较为显著。

如图 10 所示, 当固定 pH 为 8.64 时, 发酵温度从 26 °C 增大至 34 °C, 装液量从 75 mL 增大至 125 mL 的过程中, 发酵液对马铃薯干腐病原菌抑菌率均呈现先增大后减小的趋势, 曲面的最高点即为抑制率最大值点, 等高线图呈圆形, 说明发酵温度与装液量之间的交互作用不显著。

3 组三维曲线的弯曲度都比较大, 均倒扣在坐标轴上, 说明随着温度、装液量和 pH 的变化, 抑菌率也呈现显著的先升高后降低的变化。响应面所得到的最大值均落在等高线图

表 8 回归方程的方差分析

Table 8 Variance analysis table of regression equation

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	
模型 Model	3 938.64	9	437.63	6.86	0.009 4	Significant
A pH	0.572 5	1	0.572 5	0.009 0	0.927 2	
B 装液量 B Fluid volume	143.14	1	143.14	2.24	0.177 8	
C 温度 C Temperature	15.07	1	15.07	0.236 2	0.641 8	
AB	288.83	1	288.83	4.53	0.070 9	
AC	82.90	1	82.90	1.30	0.291 8	
BC	4.18	1	4.18	0.065 6	0.805 3	
A ²	1 300.81	1	1 300.81	20.39	0.002 7	
B ²	873.31	1	873.31	13.69	0.007 7	
C ²	875.73	1	875.73	13.73	0.007 6	
剩余 Residual	446.58	7	63.80			
失拟项 Lack of fit	318.08	3	106.03	3.30	0.139 4	Not significant
纯误差 Pure error	128.50	4	32.12			
总离差 Cor total	4 385.22	16				

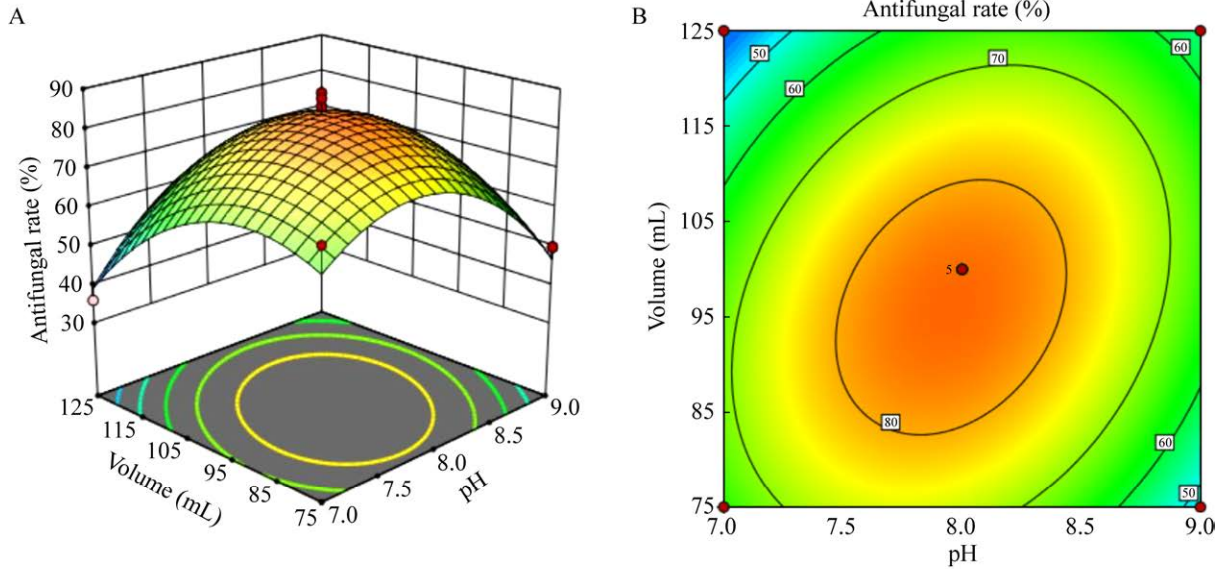


图 8 pH 和装液量的响应面图(A)和等高线图(B)

Figure 8 pH and fluid volume response surface (A) and contour plots (B).

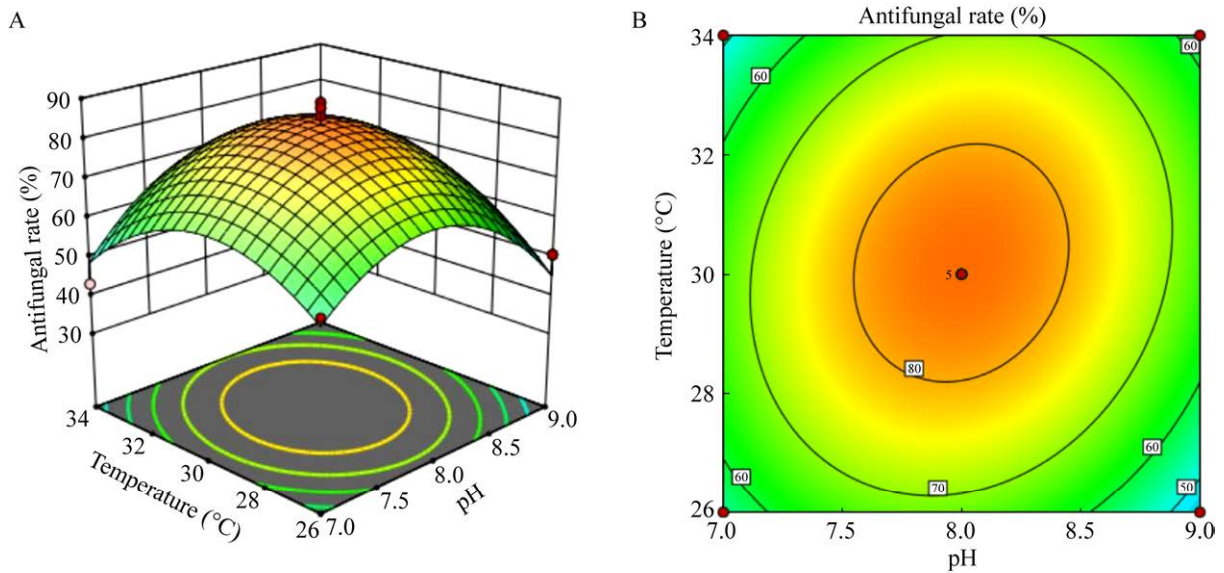


图 9 pH 和温度的响应面图(A)和等高线图(B)

Figure 9 pH and temperature response surface (A) and contour plots (B).

中的最小椭圆中, 表明模型可以准确预测发酵液 pH、装液量及发酵温度对马铃薯干腐病原菌抑制率之间的关系。

由 Design Expert 11 软件预测得到菌株 E20303 对马铃薯干腐病原菌抑制效果最优

的培养条件如图 11 所示, 此时预测的最优抑菌率达到 73.267 6%。

最佳培养条件验证: 为证实此模型的准确性, 将发酵条件稍作调整为, 装液量 102.88 mL, pH 8.64, 温度 28.73 °C。按照此条件进行重复

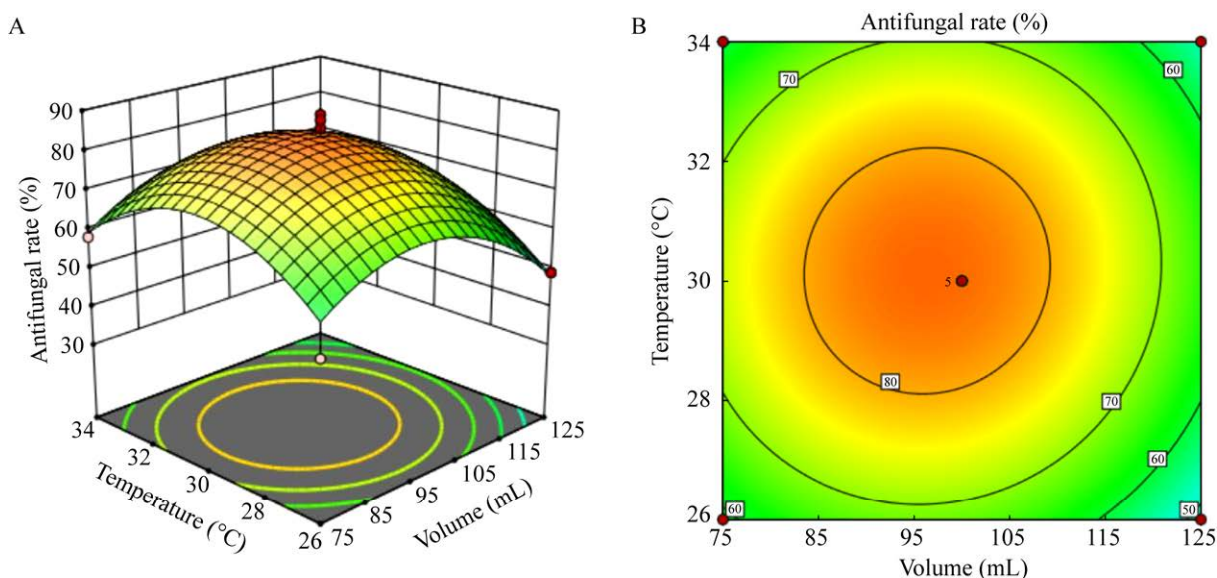


图 10 装液量和温度的响应面图(A)和等高线图(B)

Figure 10 Fluid volume and temperature response surface (A) and contour plots (B).

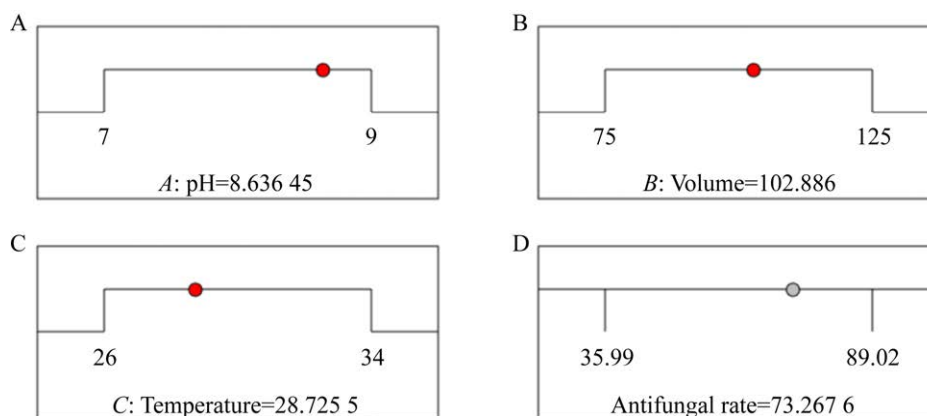


图 11 E20303 菌株发酵液最优培养条件 A: 最优 pH 值; B: 最优装液量; C: 最优温度; D: 最优条件下预测的抑菌率

Figure 11 Optimal culture conditions for fermentation broth of strain E20303. A: Optimum pH value; B: Optimum liquid loading; C: Optimum temperature; D: Predicted antifungal rate under optimal conditions.

试验, 测得抑菌率为 72.51%, 与实验预测的 73.267 6%非常接近, 与优化前的 51.15%相比, 抑制率提高了 21.36%。两者之间良好的拟合度反映了该模型的准确可靠性, 说明了响应面优化法可以很好地预测发酵液 pH、温度及装液量对马铃薯干腐病原菌抑制率的影响。

3 讨论与结论

响应面法是通过数值模拟得到一些数据, 拟合出一个响应面, 利用该响应面进行可靠性分析^[14]。对于传统数理统计方法来说, 单因素试验只能考虑单一因素的影响, 无法判断各因

素之间是否存在交互作用^[15]。正交试验虽然可以判断各因素之间的交互作用, 但需要做大量的试验, 需要明确的函数表达式, 而且只能处理离散的水平值。然而, 响应面法在很大程度上弥补了这 2 种传统数理统计方法的不足, 不仅能研究几种因素之间的交互作用, 还能对区域外的响应值进行预测, 运用较少的试验次数得到高精密度的回归方程, 从而得到多种试验变量间的最优组合^[16-22]。目前, 响应面法多应用于食品学、医药学、化工业及工程学^[23-24]。元秀晔等^[25]利用响应面法优化丁酸梭菌 BLCC1-0022 发酵液培养基, 提高其活菌率和芽孢率。申若男等^[26]利用响应面法优化厚朴温中汤提取工艺, 使中汤出膏率提高到 24.1%。王飞娟等^[27]采用响应面法优化细辛挥发油超声辅助提取工艺, 使细辛挥发油提取率提高到 3.374%。王保华等^[28]通过响应面法优化对调磁块与内外转子, 使空式磁力齿轮效率获得了进一步上升, 同时减少了谐波含量。

本研究通过单因素试验筛选出萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵参数的最佳范围, 最终利用响应面模型分析, 得出最优发酵配方为淀粉 10.72 g/L、酵母粉 23.60 g/L、MgSO₄·7H₂O 16.00 g/L、CaCO₃ 1.14 g/L、KH₂PO₄ 8.00 g/L 和 K₂HPO₄ 16.00 g/L。最优发酵条件为装液量 102.89 mL、pH 8.64、温度 28.73 °C、摇床转速 200 r/min、培养时间 3 d、接种量 2%。截至目前, 利用响应面法提高萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*) 对马铃薯干腐病原菌抑菌活性的发酵配方及发酵条件的优化研究鲜有报道。本研究对萎缩芽孢杆菌 E20303 发酵配方及发酵条件进行响应面优化, 使菌株 E20303 对马铃薯干腐病原菌的抑菌率提高到 72.51%。在今后的研究中, 课题组还将对萎缩芽孢杆菌 E20303 对马铃薯干腐病原菌的抑菌活性物质的稳定性、抑菌

物质的种类与作用机制, 以及田间防治效果等方面进行研究, 从而为后续马铃薯干腐病新型生防菌剂及生防制剂的开发奠定坚实的理论基础。

REFERENCES

- [1] 李金花, 王蒂, 柴兆祥, Burgess L. 甘肃省马铃薯镰刀菌干腐病优势病原的分离鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 456-463
Li JH, Wang D, Chai ZX, Burgess L. Isolation and identification of the dominant pathogens causing potato *Fusarium* dry rot in Gansu province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2011, 41(5): 456-463 (in Chinese)
- [2] Khan NI, Schisler DA, Boehm MJ, Slininger PJ, Bothast RJ. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Gibberella Zeae*[J]. Plant Disease, 2001, 85(12): 1253-1258
- [3] Schisler DA, Slininger PJ, Hanson LE, Loria R. Potato cultivar, pathogen isolate and antagonist cultivation medium influence the efficacy and ranking of bacterial antagonists of *Fusarium* dry rot[J]. Biocontrol Science and Technology, 2000, 10(3): 267-279
- [4] 沈硕. 中度嗜盐菌 ST77 及其萃取物对马铃薯干腐病的防效及菌株鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2021, 50(4): 460-465
Shen S. Preventive effect of moderately halophilic strain ST77 and its extracts on potato dry rot pathogen and its identification[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2021, 50(4): 460-465 (in Chinese)
- [5] Tuesta-Popolizio DA, Velázquez-Fernández JB, Rodríguez-Campos J, Contreras-Ramos SM. *Thalassobacillus*, a genus of extreme to moderate environmental halophiles with biotechnological potential[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(9): 1-13
- [6] 孔凡晶, 王现洁. 青藏高原盐湖嗜盐微生物资源及应用前景[J]. 科技导报, 2017, 35(12): 27-31
Kong FJ, Wang XJ. Halophilic microorganisms in salt lakes on Tibet Plateau and their potential application[J]. Science & Technology Review, 2017, 35(12): 27-31 (in Chinese)
- [7] 沈硕. 青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的群落结构与多样性[J]. 微生物学报, 2017, 57(4): 490-499

- Shen S. Community structure and diversity of culturable moderate halophilic bacteria isolated from Qrhan Salt Lake on Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 490-499 (in Chinese)
- [8] 沈硕, 王舰. 青海盐湖地区嗜盐菌的分离纯化及抑制植物病原菌的活性初探[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(1): 79-81, 88
Shen S, Wang J. Isolation, petrification and inhibitory activity against plant pathogenic fungi of halophilic strains from Qinghai Salt Lake[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(1): 79-81, 88 (in Chinese)
- [9] 他永全, 沈硕. 察尔汗盐湖嗜盐菌 CEH-ST79 对马铃薯干腐病的抑制活性及鉴定[J]. *青海大学学报*, 2018, 36(6): 1-8
Ta YQ, Shen S. Inhibitory activity against potato dry rot and identification of halophilic bacteria CEH-ST79 isolated from Qrhan Salt Lake[J]. *Journal of Qinghai University*, 2018, 36(6): 1-8 (in Chinese)
- [10] 胡英杰, 沈硕, 贾鹏莉, 陈菲儿. 中度嗜盐菌抑制马铃薯干腐病病原菌活性的筛选及活性菌株的鉴定[J]. *青海大学学报*, 2021, 39(1): 24-30
Hu YJ, Shen S, Jia PL, Chen FE. Screening of moderate halophiles against the pathogen activity of potato dry rot and identification of active strains[J]. *Journal of Qinghai University*, 2021, 39(1): 24-30 (in Chinese)
- [11] 徐志周, 王明元, 杜锦鹏, 刘建福, 欧树文, 秦紫艺, 杨可然. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1611-1618
Xu ZZ, Wang MY, Du JP, Liu JF, Ou SW, Qin ZY, Yang KR. Isolation, identification and fermentation optimization of an antagonistic bacterial strain HQB-1 against banana wilt disease[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1611-1618 (in Chinese)
- [12] 他永全. 抑制马铃薯 Y 病毒活性菌株的筛选及其活性组分的研究[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2019
Ta YQ. Study on screening of the inhibitory strains against potato virus Y and its active fractions[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2019 (in Chinese)
- [13] 张广臣, 雷虹, 何欣, 单钰毓. 微生物发酵培养基优化中的现代数学统计学方法[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(5): 110-113
Zhang GC, Lei H, He X, Shan YY. Modern mathematical statistical methods in optimization of fermentation medium[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(5): 110-113 (in Chinese)
- [14] 张学刚. 一种改进响应面法结构可靠度计算方法[J]. *机械强度*, 2018, 40(6): 1382-1388
Zhang XG. Structural reliability analysis based on an improvement of the response surface method[J]. *Journal of Mechanical Strength*, 2018, 40(6): 1382-1388 (in Chinese)
- [15] 李敏, 白耘樵, 黎秋玲, 李志, 周智友, 李汉广. 响应面法优化异养培养条件提高链带藻 *Z₈* 油脂产量的研究[J]. *江西农业大学学报*, 2021, 43(4): 910-918
Li M, Bai YF, Li QL, Li Z, Zhou ZY, Li HG. Enhancement of lipid production in *Desmodesmus intermedius* Z₈ by optimization of heterotrophic culture conditions using response surface method[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2021, 43(4): 910-918 (in Chinese)
- [16] 李莉, 张赛, 何强, 胡学斌. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. *实验室研究与探索*, 2015, 34(8): 41-45
Li L, Zhang S, He Q, Hu XB. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2015, 34(8): 41-45 (in Chinese)
- [17] 于雅静, 单虹宇, 孔露, 孔茂竹, 吕远平. 响应面法优化玫瑰花色苷超声辅助提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(13): 173-179
Yu YJ, Shan HY, Kong L, Kong MZ, Lv YP. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process for anthocyanins from *Rosa rugosa* by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(13): 173-179 (in Chinese)
- [18] 黄琳, 许忠平, 闫菲, 单孟颖, 徐泽华, 欧阳微, 宋佳. 蜂蜜艾尔精酿啤酒酿造工艺研究[J]. *中国酿造*, 2019, 38(3): 134-138
Huang L, Xu ZP, Yan F, Shan MY, Xu ZH, Ouyang W, Song J. Brewing process of honey ale craft beer[J]. *China Brewing*, 2019, 38(3): 134-138 (in Chinese)
- [19] 范丽霞, 胡晓苹, 刘文波, Rajaofera Mamy Jayne Nelly, 唐中发, 缪卫国. 响应面试验优化链霉菌 Z331-A 的发酵条件[J]. *中国酿造*, 2018, 37(4): 77-82
Fan LX, Hu XP, Liu WB, Nelly RMJ, Tang ZF, Miao WG. Optimization of fermentation conditions of *Streptomyces* Z331-A by response surface experiments[J]. *China Brewing*, 2018, 37(4): 77-82 (in Chinese)
- [20] 胡瑞萍, 丁贤, 李来好, 李俊伟, 伍文超, 徐宁. 响应面法优化枯草芽孢杆菌 NHS1 产芽孢发酵培养[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(2): 605-612
Hu RP, Ding X, Li LH, Li JW, Wu WC, Xu N.

- Optimization of fermentation medium composition by response surface methodology for the spore production of *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2018, 37(2): 605-612 (in Chinese)
- [21] 周国庆, 谭玉梅, 王亚萍, 黄永会, 任锡毅, 刘永翔, 刘作易. 响应面法优化“金花”菌培养基配方[J]. 山地农业生物学报, 2018, 37(2): 27-32
Zhou GQ, Tan YM, Wang YP, Huang YH, Ren XY, Liu YX, Liu ZY. Optimization of the formulation of liquid media for the culture of *Aspergillus cristatus* by response surface method[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2018, 37(2): 27-32 (in Chinese)
- [22] 王明. 基于响应面法的土霉素高产菌株 S189 发酵培养基优化[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(23): 25-27
Wang M. Medium optimization for high producing strains of oxytetracycline S189 by using response surface methodology[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(23): 25-27 (in Chinese)
- [23] 张艳, 李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用[J]. 吉林化工学院学报, 2012, 29(7): 20-26
Zhang Y, Li YZ. Response surface methodology and its application in pharmacy domain[J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2012, 29(7): 20-26 (in Chinese)
- [24] 李书颖, 朱天辉. 响应面法优化杜仲黑斑病菌生防芽孢杆菌的发酵参数[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 133-141
Li SY, Zhu TH. Optimization of fermentation parameters of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Pestalotiopsis trachicarpicola* by using response surface methodology[J]. Plant Protection, 2020, 46(5): 133-141 (in Chinese)
- [25] 亓秀晔, 张志焱, 谢全喜, 刘乃芝, 郭杨丽, 徐海燕, 谷巍. 丁酸梭菌的生物学特性分析及发酵培养基优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 71-76
Qi XY, Zhang ZY, Xie QX, Liu NZ, Guo YL, Xu HY, Gu W. Biological characteristics and fermentation medium optimization of *Clostridium butyricum*[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 71-76 (in Chinese)
- [26] 申若男, 罗菊元, 张晴, 刘雪纯, 胡文均, 张泽康, 王昌海, 陆洋, 白洁. Box-Behnken 响应面法优化厚朴温中汤提取工艺[J]. 中国现代中药, 2022. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210903004
Shen RN, Luo JY, Zhang Q, Liu XC, Hu WJ, Zhang ZK, Wang CH, Lu Y, Bai J. Optimization of extraction process of Houpu Wenzhong decoction by box Behnken response surface methodology[J]. Modern Chinese traditional medicine, 2022. DOI: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210903004 (in Chinese)
- [27] 王飞娟, 杨长花, 刘峰, 王月茹, 彭修娟, 李华. 响应面法优化细辛挥发油超声辅助提取工艺[J]. 化学与生物工程, 2022, 39(1): 21-24, 39
Wang FJ, Yang CH, Liu F, Wang YR, Peng XJ, Li H. Optimization in ultrasonic-assisted extraction process of volatile oil from asari radix et rhizoma by response surface methodology[J]. Chemistry & Bioengineering, 2022, 39(1): 21-24, 39 (in Chinese)
- [28] 王保华, 葛新锋, 杨波, 胡草笛. 真空式磁力齿轮结构参数响应面法优化及其性能分析[J]. 中国工程机械学报, 2021, 19(6): 487-491, 499
Wang BH, Ge XF, Yang B, Hu CD. Optimization of structural parameters of vacuum magnetic gear by response surface method and its performance analysis[J]. Chinese Journal of Construction Machinery, 2021, 19(6): 487-491, 499 (in Chinese)