

生防链霉菌 17-7 菌株发酵配方优化及发酵滤液稳定性研究

刘一贤, 施玉萍, 李岚岚, 戴利铭, 蔡志英*

云南省天然橡胶可持续利用研究重点实验室/云南省热带作物科学研究所, 云南景洪 666100

摘要: 为了提升链霉菌 17-7 菌株的抑菌活性, 合理利用菌株的代谢产物, 本研究以橡胶树褐根病菌为靶标菌, 采用正交试验和单因子试验相结合, 在原培养基的基础上对链霉菌 17-7 菌株的发酵培养基配方进一步优化, 获得该菌株最适宜产活性物质的配方为: 大豆粉 25 g/L、玉米粉 10 g/L、葡萄糖 10 g/L、酵母粉 2 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、NaCl 0.5 g/L、 $CaCO_3$ 0.5 g/L。发酵滤液稀释 500 倍后对橡胶树褐根病菌的相对抑菌活性为 51.37%, 较优化前提高了 17.66%, 并且具有广谱的抑菌活性。在此基础上测定了温度、紫外线辐射、蛋白酶、酸碱度和贮存条件对 17-7 菌株发酵滤液抗真菌物质稳定性的影响。结果表明: 17-7 菌株发酵滤液对高温不敏感; 紫外线照射 1 h 后发酵滤液的抑菌活性开始显著下降, 长时间紫外照射并不会丧失抑菌活性; 17-7 菌株发酵滤液还具有一定的酸碱耐受性, pH 为 3~10 时其发酵滤液均能发挥较好的抑菌活性; 并且对胰蛋白酶和胃蛋白酶不敏感; 菌株发酵滤液在低温 (4 °C) 和室温 (25 °C) 条件下贮存 120 d 仍能保持较强生物活性。对 17-7 菌株无菌发酵滤液稳定性和贮存条件的研究可为后续该菌株的开发利用提供理论依据和数据支持。

关键词: 链霉菌 17-7; 发酵配方优化; 稳定性; 抑菌活性

中图分类号: S476 **文献标志码:** A

Optimization of Fermentation Formula and Stability of Cultural Filtrate Produced by *Streptomyces samsunensis* 17-7

LIU Yixian, SHI Yuping, LI Lanlan, DAI Liming, CAI Zhiying*

Yunnan Key Laboratory of Sustainable Utilization Research on Rubber Tree / Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: In order to enhance the antifungal activity of *Streptomyces samsunensis* 17-7 strain and effectively utilize its secondary metabolites, this study focused on optimizing the fermentation medium formula. Orthogonal and single factor experiments were conducted based on the original medium, with *Phellinus noxious* as the indicator. The optimal formulation for producing active substances from the strain was determined to include 25 g/L soy powder, 10 g/L corn meal, 10 g/L glucose, 2 g/L yeast extract, 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L NaCl, and 0.5 g/L $CaCO_3$. Following a 500 times dilution, the relative antifungal activity of the fermentation solution increased to 51.37%, a 17.66% improvement compared to the previous optimization, demonstrating a broad spectrum of antifungal activity. The stability of the antifungal substance was evaluated in response to various conditions such as temperature, pH, protease, UV-irradiation, and storage. Results indicated that the fermentation broth of strain 17-7 exhibited high temperature resistance, a significant decrease in antifungal activity after one hour of UV irradiation, but retained its activity after long-term exposure to UV light. Furthermore, the broth demonstrated good acid-base tolerance, effective antibacterial activity in the pH range of 3–10, and resistance to trypsin and pepsin. The fermentation broth of strain 17-7 maintained its antifungal activity for 120 days at both 4 °C and room temperature (25 °C). This study on the stability and storage conditions of strain 17-7's fermentation broth offers valuable data for potential future applications of the strain as a biocontrol agent.

收稿日期 2024-05-22; 修回日期 2024-06-06

基金项目 云南省热带作物科学研究所青年成长基金项目 (No. QNCZ2021-2, No. QNCZ2022-3); 云南省热带作物科技创新专项资金项目 (No. RF2024-4-1)。

作者简介 刘一贤 (1988—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 热带作物病害防治。*通信作者 (Corresponding author): 蔡志英 (CAI Zhiying), E-mail: caizhiyingyn@sina.com。

Keywords: *Streptomyces samsunensi* 17-7; fermentation medium optimization; stability; antifungal activity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.021

链霉菌 (*Streptomyces*) 是放线菌门中最为庞大且极具代表性的分支, 具有强大的生态适应能力, 广泛分布于各种环境中^[1]。并且链霉菌也是目前最大的新型次生代谢产物资源菌, 是天然产物的重要工业生产菌^[2]。链霉菌产生的活性物质可用作农用杀菌剂、杀虫剂、除草剂和植物生长调节剂, 因其具有高效、低毒和环境友好等特点在农作物病虫害绿色防控中占据重要地位^[3]。

链霉菌具有大量编码天然产物的生物合成基因簇, 然而大部分基因簇在常规条件下处于沉默状态^[4]。为了增强菌株代谢产物活性, 激活链霉菌沉默基因表达, 以获得更多的活性天然产物, 非定向激活策略是普遍使用的一种方法, 即通过改变培养基的组成 (碳源、氮源、无机盐) 等方式, 诱导菌株产生更多的代谢产物^[5-7]。

天然橡胶是我国热区重要的农业产业, 也是国家重要的战略物资。我国橡胶树上已报道的病害有 91 种, 局部或全面严重危害的有 9 种^[8], 已成为制约橡胶产业发展的重要因素。运用微生物资源或其代谢产物进行生物防治已成为绿色农业潮流下的主要趋势。*Streptomyces samsunensi* 17-7 菌株是由本实验室从橡胶树根际土壤中分离到的一株具有巨大生防潜力的链霉菌, 对橡胶树褐根病菌具有较强抑制作用^[9]。但近期试验发现 17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性有所下降, 稀释 500 倍后对橡胶褐根病菌的相对抑菌活性为 33.71%, 并且该菌株发酵滤液对外界环境条件的稳定性仍不明确。为了提升 17-7 菌株的抑菌活性, 获得稳定的活性物质, 并进一步研究其发酵滤液的稳定性。本研究通过改变培养基组成, 在原培养基的基础上添加玉米粉和酵母粉, 采用正交试验和单因子试验相结合, 筛选出对橡胶褐根病菌具有最佳抑菌活性的培养基组成; 并进一步通过单因子变量试验研究外界环境对 17-7 菌株发酵滤液抑菌活性的影响, 为更好地发挥菌株的生防潜力提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 17-7 菌株 (*S. samsunensi*)、橡胶树白根病菌 (*Rigidoporus lignosus*)、橡胶树

褐根病菌 (*Phellinus noxius*)、云南链格孢 (*Alternaria yunnanensis*)、橡胶树棒孢霉落叶病菌 (*Corynespora cassicola*)、橡胶树炭疽病菌 (*Colletotrichum siamense*、*C. karstii*、*C. wanningense*、*C. plurivorum*、*C. fructicola*、*C. bananaense*、*C. brevisporum*) 均由云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究中心分离保存。

1.1.2 培养基 种子液培养为液体高氏一号培养基 (每升含可溶性淀粉 20.0 g, KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 琼脂 20 g, pH 为 7.4~7.6); 发酵基础培养基^[9] (每升含葡萄糖 20 g、大豆粉 25 g、K₂HPO₄ 1 g、NaCl 0.5 g、CaCO₃ 0.5 g); 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)。

1.1.3 主要仪器 CLIMACELL 培养箱 (美国 3M); BSD-400 博迅振荡培养箱。

1.2 方法

1.2.1 放线菌发酵滤液的制备 种子液: 挑取单个菌落接种于 100 mL 的液体高氏一号培养基中, 于 28 °C、140 r/min 振荡培养 5 d, 制成种子液。

发酵: 发酵基础培养基初始 pH 为 8, 培养基装瓶量为 150 mL/500 mL, 摇床转速为 140 r/min, 种子液的接种量为 10%, 在 28 °C 条件下培养 5 d 后, 12 000 r/min 离心 15 min, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 获得无菌发酵滤液。

1.2.2 菌丝生长速率法 以橡胶树褐根病菌为指示菌, 采用内径为 5 mm 的打孔器在活化的橡胶树褐根病菌菌落周围打取菌饼。将 PDA 培养基融化冷却至 50 °C 左右, 取 1 mL 滤液与 99 mL PDA 培养基混匀, 倒入无菌培养皿中制成带毒培养基平板。在每个平板中接入 1 个菌饼, 带菌丝的一面贴在培养基表面, 以无菌水与培养基混合的平板为对照。28 °C 下暗培养 4 d 后, 用十字交叉法测定供试菌生长直径, 计算抑制率, 抑制率 = [(对照菌直径 - 处理菌直径) / (对照菌直径 - 菌饼直径)] × 100%。

1.2.3 双碳源、双氮源对 17-7 菌株抑菌物质产生的影响 双碳源和双氮源正交试验: 基于发酵基础培养基, 选择双碳源 (葡萄糖、酵母粉) 和双氮源 (大豆粉、玉米粉) 共 4 个因素, 设置 4 个水平 (表 1), 选用 L₁₆(4⁴) 正交表进行正交试验,

表 1 发酵条件正交试验的因素和水平设计
Tab. 1 Factors and levels design of orthogonal test for fermentation conditions

水平 Level	因素 Factor			
	A 大豆粉 Soy powder (g·L ⁻¹)	B 玉米粉 Corn meal (g·L ⁻¹)	C 葡萄糖 Glucose (g·L ⁻¹)	D 酵母粉 Yeast extract (g·L ⁻¹)
1	10	5	5	2
2	15	10	10	4
3	20	15	15	6
4	25	20	20	8

发酵试验重复 3 次。将菌株发酵滤液稀释 5 倍后取 1 mL 与 99 mL PDA 培养基混匀，制成含毒平板。根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

1.2.4 无机盐筛选 以 1.2.3 中筛选出的双碳源、双氮源培养基为基础，选择 CuSO₄、ZnSO₄、MnCl₂、NaCl、FeSO₄、K₂HPO₄、CaCO₃、MgSO₄、KCl 等 9 种无机盐，按质量体积分数为 0.1% 加入双碳氮源培养基，配成含不同无机盐离子的培养基。测定不同无机盐对 17-7 菌株产生抑菌物质的影响，每个处理 3 次重复，选择抑菌活性较好的 3 种无机盐。根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

1.2.5 优化后培养基发酵滤液抑菌谱测定 分别取优化后的菌株发酵滤液原液 1 mL 或稀释 5 倍后取 1 mL 与 99 mL PDA 培养基混匀，倒入无菌培养皿中分别制成含稀释 100 倍与稀释 500 倍发酵滤液的 PDA 平板，按照 1.2.2 的方法接种 11 株病原菌，并测定抑菌率，对比优化后培养基不同稀释倍数对供试病原菌的抑菌活性。

1.2.6 发酵滤液稳定性测试 (1) 温度稳定性。将发酵滤液分别于 20、40、60、80、100 ℃ 水浴处理 30 min，取菌株发酵滤液 1 mL 与 99 mL PDA 培养基混匀。每处理重复 3 次，根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

(2) 紫外稳定性。将发酵滤液置于 15 W 紫外灯下约 20 cm 处，分别照射 1、2、3、4、5、6 h。每处理重复 3 次，根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

(3) 蛋白酶稳定性。在发酵滤液中分别加入终浓度为 1 mg/mL 的胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K，于 37 ℃ 处理 2 h，以未添加蛋白酶处理的发酵滤液为对照。每处理重复 3 次，根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

(4) 酸碱稳定性。采用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节发酵滤液 pH 为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、

13.0，放置 24 h 后再次将 pH 调回中性。每处理重复 3 次，根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

(5) 储藏稳定性。将发酵滤液分别置于 4 ℃ 和 25 ℃ 下放置 3、6、9、15、30、60、120 d。每处理重复 3 次，根据菌丝生长速率法测定抑菌率。

1.3 数据处理

利用 Excel 2003 和 SAS 9.4M6 软件对试验数据进行统计分析，利用 GraphPad Prism 8.0 软件作图，并应用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 17-7 菌株碳、氮源正交试验

选择葡萄糖、酵母粉、大豆粉、玉米粉 4 个因素，进行 4 因素 4 水平正交试验（表 2），根据抑菌活性结果，确定最终发酵配方。正交试验结果表明，4 个因素对橡胶褐根病菌抑制率的影响顺序为 B>C>A>D，最佳水平组合为 A₄B₄C₂D₁。根据方差分析的结果，主效因子 B 在 2、3、4 水平差异不显著，出于成本考虑，最佳组合为 A₄B₂C₂D₁，即大豆粉 25 g，玉米粉 10 g，葡萄糖 10 g，酵母粉 2 g。

2.2 不同无机盐对 17-7 菌株抑菌活性的影响

供试的 9 种无机盐对 17-7 菌株抑菌活性的影响具有显著差异（图 1）。添加 K₂HPO₄ 和 CaCO₃ 的抑菌活性显著高于其他无机盐离子，其次为 NaCl，选取抑菌活性较高的 3 种无机盐离子进行后续试验。根据前期研究结果^[9]，K₂HPO₄ 选择添加量为 1 g 时，17-7 菌株的抑菌活性最好，NaCl 和 CaCO₃ 不同水平添加量的抑菌率无显著差异，因此选择 NaCl 和 CaCO₃ 添加量为 0.05%，即 1 L 发酵培养基中含大豆粉 25 g、玉米粉 10 g、葡萄糖 10 g、酵母粉 2 g、K₂HPO₄ 1 g、NaCl 0.5 g、CaCO₃ 0.5 g。

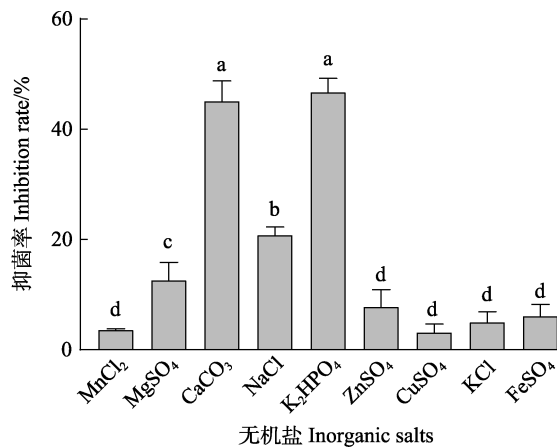
2.3 17-7 菌株发酵滤液抑菌谱测定

采用优化后 17-7 菌株的发酵滤液，对供试的 11 种橡胶树病原菌进行抑菌活性测定，发现 17-7 菌株具有广谱的抑菌活性。发酵滤液在稀释 100 倍和 500 倍时均具有较强的抑菌活性，对橡胶褐根病菌的抑菌率分别为 83.93% 和 51.37%，稀释 500 倍时抑菌率较优化前提高了 17.66%。17-7 菌株发酵滤液对炭疽病菌的抑菌效果较突出，稀释 500 倍时其抑菌率仍能达到 68.33%~78.89%（表 3）。

表 2 17-7 菌株发酵培养基中碳源、氮源正交试验结果
Tab. 2 Results of orthogonal test with carbon sources and nitrogen source on antifungal activity of submerged cultured 17-7

编号 No.	因素 Factor				抑菌率 Inhibition ratio/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	4.62±1.07 ^c
2	1	2	2	2	27.64±2.72 ^{cd}
3	1	3	3	3	25.68±4.33 ^{cd}
4	1	4	4	4	25.68±4.33 ^{cd}
5	2	1	2	3	12.00±6.59 ^e
6	2	2	1	4	26.27±4.20 ^{cd}
7	2	3	4	1	41.25±3.28 ^b
8	2	4	3	2	36.61±7.23 ^{bc}
9	3	1	3	4	25.19±1.19 ^{cd}
10	3	2	4	3	21.28±2.50 ^d
11	3	3	1	2	11.76±1.82 ^e
12	3	4	2	1	59.58±4.46 ^a
13	4	1	4	2	35.72±2.72 ^{bc}
14	4	2	3	1	41.20±2.56 ^b
15	4	3	2	4	40.15±3.35 ^b
16	4	4	1	3	28.39±4.70 ^{cd}
K ₁	20.91	19.38	17.76	36.66	
K ₂	29.03	29.10	34.84	27.93	
K ₃	29.45	29.71	32.17	21.84	
K ₄	36.37	37.57	30.98	29.32	
R	15.46	18.18	17.08	14.83	

注：不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).



不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 1 不同无机盐对 17-7 菌株发酵滤液抑菌活性的影响
Fig. 1 Effect of different inorganic salts on inhibition activity of submerged cultured strain 17-7

表 3 17-7 菌株不同稀释倍数发酵滤液对 11 种病原真菌的抑制作用
Tab. 3 Inhibition of 11 pathogenic fungi by fermentation filtrate of strain 17-7 at different dilution ratios

编号 No.	病原菌 Pathogen	抑菌率 Inhibition ratio/%	
		稀释 100 倍 Diluted 100 times	稀释 500 倍 Diluted 500 times
1	云南链格孢 (<i>A. yunnanensis</i>)	87.08±0.66 ^b	64.96±0.15 ^e
2	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. bannaense</i>)	78.68±0.65 ^{ef}	68.33±1.22 ^d
3	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. brevisporum</i>)	84.29±0.22 ^c	77.94±0.52 ^{ab}
4	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. fruticola</i>)	86.77±1.84 ^b	75.71±0.37 ^b
5	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. karstii</i>)	80.51±1.30 ^{de}	72.20±3.56 ^c
6	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. plurivorum</i>)	80.37±1.13 ^{def}	78.89±1.11 ^a
7	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. siamense</i>)	88.94±0.32 ^a	69.03±0.52 ^d
8	橡胶树炭疽病菌 (<i>C. wanningense</i>)	81.08±0.58 ^d	69.40±0.98 ^d
9	橡胶树棒孢霉落叶病菌 (<i>C. cassiicola</i>)	78.54±1.27 ^f	56.72±0.76 ^f
10	橡胶树褐根病菌 (<i>P. noxius</i>)	83.93±1.49 ^c	51.37±1.66 ^g
11	橡胶树白根病菌 (<i>R. lignosus</i>)	57.45±0.44 ^g	42.57±0.84 ^h

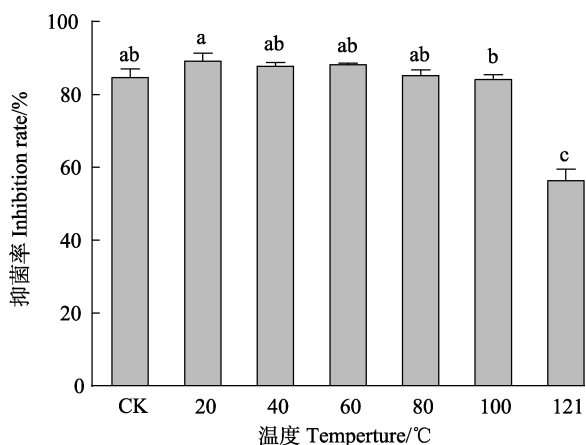
注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 发酵滤液的温度稳定性

由图 2 可以看出，在 20~100 ℃ 范围内，17-7 菌株发酵滤液热处理 30 min 均具有较好的抑菌活性，抑菌率均在 80% 以上，其中，20~80 ℃ 范围内的抑菌活性最佳，与 CK 发酵滤液抑菌活性无显著性差异；100 ℃ 时，17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性略有下降，其抑菌率为 84.31%。发酵滤液在 100 ℃ 处理 30 min 后仍具有较好的抑菌活性，说明发酵滤液中的抑菌活性物质对高温不敏感，具有较好的热稳定性。121 ℃ 处理 30 min 后，抑菌活性为 56.53%，说明发酵滤液中存在部分抑菌活性物质在高温高压条件下易失活。

2.5 发酵滤液的紫外稳定性

不同紫外照射时间对 17-7 菌株发酵滤液抑菌活性的影响具有明显差异（图 3）。紫外照射时间越长其抑菌活性越低，照射 1 h 后其抑菌率为 87.81%，与 CK 无显著差异，仍具有较好的抑

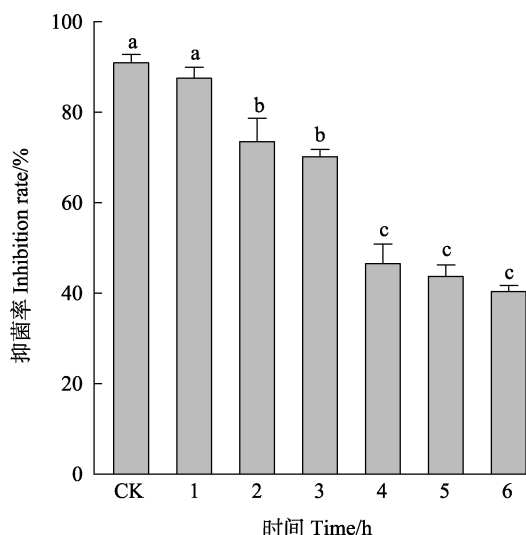


不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 2 温度对发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on antifungal activity of cultural filtrate from strain 17-7



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

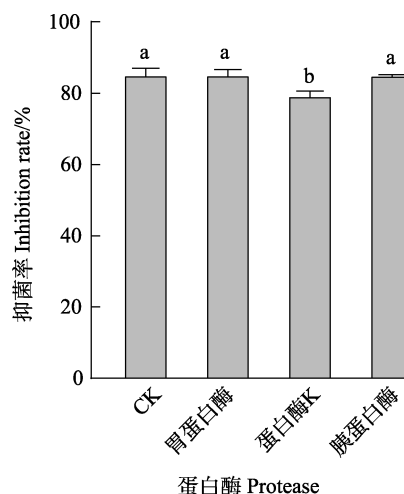
图 3 紫外照射时间对发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of UV irradiation on antifungal activity of cultural filtrate from strain 17-7

菌活性。紫外照射 2 h 后其抑菌率下降至 73.79%，照射 4 h 后抑菌率降至 46.75%，并逐渐趋于稳定。说明 17-7 菌株发酵滤液中可能存在对紫外敏感的活性物质，或者由于发酵滤液中存在某种紫外保护剂延缓了紫外线对发酵滤液抑菌活性的影响。

2.6 发酵滤液的蛋白酶稳定性

经胃蛋白酶和胰蛋白酶处理后，17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性与 CK 发酵滤液无显著差异，抑菌率均在 80% 以上，经蛋白酶 K 处理的菌株发酵滤液抑菌率为 78.98%，略有下降（图 4）。说明 17-7 菌株发酵滤液中，主要的抑菌活性物质



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

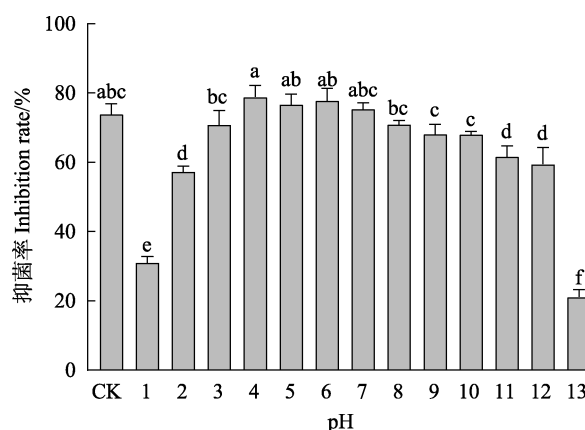
图 4 蛋白酶对发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of protease irradiation on antifungal activity of cultural filtrate from strain 17-7

对蛋白酶不敏感，代谢产物中可能存在少量的抑菌蛋白，经蛋白酶 K 处理后失活。

2.7 发酵滤液的酸碱稳定性

在酸碱稳定性试验中，17-7 菌株发酵滤液在 pH 为 4~7 时均具有较好的抑菌活性，其抑菌率与 CK 无显著差异，发酵滤液对酸性环境更为耐受，pH 为 4 时其抑菌率最大为 78.98%。pH 为 2~12 时，发酵滤液的抑菌活性变化趋缓，抑菌率仍能保持在 57.00% 以上，但强碱性环境下更容易使发酵滤液中的活性物质失活。在强酸或强碱环境下发酵滤液抑菌活性下降趋势明显，pH 为 1 和 13 时，抑菌率分别降至 31.02% 和 21.16%（图 5）。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 5 pH 对发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of pH irradiation on antifungal activity of cultural filtrate from strain 17-7

2.8 发酵滤液的储藏稳定性

在不同的储藏温度下, 17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性具有一定差异(图 6)。储藏 30 d 内, 4 °C 环境下发酵滤液抑菌活性明显高于 25 °C 环境下的抑菌活性, 4 °C 储藏 3 d 时抑菌率为 91.99%, 而 25 °C 储藏 3 d 时抑菌率降至 53.36%, 说明 17-7 菌株发酵滤液中存在一类活性物质在水相中极不稳定, 低温环境可以延缓其反应速度。值得注意的是, 30 d 后不同储存温度下的发酵滤液抑菌活性相当, 抑菌率分别为 49.18%、48.01%, 到 120 d 时呈现逐渐上升趋势, 抑菌率分别上升至 62.58%、61.91%, 均显著高于 30 d 时的抑菌率 ($P < 0.05$)。

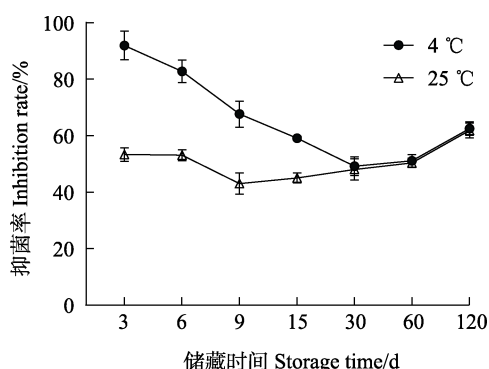


图 6 储藏时间对发酵滤液抑菌活性的影响

Fig. 6 Effect of storage irradiation on antifungal activity of cultural filtrate from strain 17-7

3 讨论

链霉菌能产生约 10 万种抗生素化合物, 占有农化应用天然产物的 70%~80%, 被称为天然产物的储存库^[10-12]。培养基组成(即碳源、氮源、无机盐等)对次级代谢产物的影响非常复杂, 且对不同微生物产生明显差异^[7, 13]。研究表明, 营养组成的变化可激发链霉菌产生不同类型的活性物质^[14]。本研究以橡胶树褐根病菌为靶标菌, 在原培养基的基础上添加了玉米粉和酵母粉, 采用正交试验和单因子试验相结合, 对链霉菌 17-7 菌株的发酵培养基进行进一步优化, 获得该菌株最适宜产活性物质的配方为: 大豆粉 25 g/L、玉米粉 10 g/L、葡萄糖 10 g/L、酵母粉 2 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、NaCl 0.5 g/L、 $CaCO_3$ 0.5 g/L, 发酵滤液稀释 500 倍后对橡胶树褐根病菌的抑菌率为 51.37%, 较优化前提高了 17.66%。

微生物生物合成基因簇的激活通常与营养类型或浓度的变化有关, 特别是碳、氮或无机盐的

变化能成功诱导微生物次生代谢产物的产生^[15]。SCHWARZ 等^[14]选择 5 株具有丰富次生代谢产物基因簇背景的菌株, 通过改变培养基组成和培养条件, 在 30 种不同培养条件下, 从发酵液中共检测到 590 个新的化合物, 编码这些化合物的基因簇数量远远超过了所预测的次生代谢产物基因簇数量。大豆粉、玉米粉等农副产品具有高蛋白质含量, 利用其作为氮源的放线菌能产生更多的活性物质^[16-17]。葡萄糖作为一种优质碳源, 被广泛应用于一些工业化生产的抗生素中, 酵母粉也是卡那霉素链霉菌(*S. kanamyceticus*)等链霉菌产抗菌素的理想碳源^[18]。本研究通过改变培养基组成和添加量, 有效提升了菌株的抑菌活性, 推测可能是由于营养成分的改变激活了一些沉默的次生代谢产物生物合成基因簇, 增加了活性物质的种类。

本研究对 17-7 菌株抑菌物质稳定性分析显示, 17-7 菌株发酵滤液具有较好的热稳定性, 100 °C 处理 30 min 后的抑菌效果与 CK 无显著差异, 但 121 °C 处理 30 min 后抑菌率降至 56.53%, 说明 17-7 菌株发酵滤液中存在一部分耐高温高压的活性物质。链霉菌发酵液普遍具有热稳定性, 如黄麻链霉菌 AUH-1 菌株发酵液在 60~80 °C 热处理下对水稻纹枯病菌的抑制率无显著差异^[19], 黄三素链霉菌 15-6 菌株发酵液在 60 °C 和 80 °C 不同时间处理后的抗菌效果也无明显改变^[20], 但是当温度明显高于 80 °C 时, 其发酵液的抗菌活性均明显降低。紫外线长时间照射会破坏 17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性, 随着紫外线照射时间的延长抑菌活性逐渐降低, 但紫外照射时间在 1 h 以内的抑菌活性与 CK 无显著差异。链霉菌能产生一些具有吸收紫外线、抗氧化活性的代谢产物, 可以通过减轻紫外线辐射的有害影响来实现光保护作用^[21]。SÁNCHEZ-SUÁREZ 等^[22]发现链霉菌代谢产生的生物碱是抗氧化化合物中最具代表性的一类, 17-7 菌株可能通过代谢产生该类物质来实现光保护特性。17-7 菌株发酵滤液还具有较好的酸碱耐受性, 并且对胰蛋白酶和胃蛋白酶不敏感, 具有较好的抑菌稳定性。pH 为 3~10 时发酵滤液均能发挥较好的抑菌活性, 只有在强酸强碱(pH 为 1 或 13)环境下会显著降低发酵滤液的抑菌活性。此外, 值得注意的是 17-7 菌株发酵滤液在 4 °C 和 25 °C 的抑菌活性均呈先降后升的趋势, 储藏 120 d 后其抑菌活性分别上升至 62.58%、61.91%,

显示 17-7 菌株具有更广泛的应用价值。

本研究以橡胶树褐根病菌为生物活性指示菌, 通过改变培养基组成提升 17-7 菌株发酵滤液的抑菌活性, 并明确了菌株发酵滤液在不同温度、酸碱度、紫外线照射、酶液处理等条件下的稳定性, 为 17-7 菌株的田间应用提供理论基础。

参考文献

- [1] VAN DER MEIJ A, WORSLEY S F, HUTCHINGS M I, VAN WEZEL G P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 392-416.
- [2] DONALD L, PIPITE A, SUBRAMANI R, OWEN J, KEYZERS R A, TAUF A T. *Streptomyces*: still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective[J]. Microbiology Research, 2022, 13(3): 418-465.
- [3] 潘明慧, 杨雪, 杜国忠, 李晓瑾, 张艳艳, 向文胜, 李珊珊. 合成生物学助力链霉菌天然产物农药创制与产业化[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 371-389.
PAN M H, YANG X, DU G Z, LI X J, ZHANG Y Y, XIANG W S, LI S S. The exploitation and bio-manufacture of natural product pesticides from *Streptomyces* by synthetic biology[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 371-389. (in Chinese)
- [4] LIU Z, ZHAO Y, HUANG C, LUO Y. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 632230.
- [5] PETTIT R K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4: 471-478.
- [6] TANAKA Y, HOSAKA T, OCHI K. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63: 477-481.
- [7] 宋国栋, 廖宏娟, 张志斌, 朱笃. 非定向激活沉默基因簇挖掘链霉菌活性次级代谢产物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(8): 1442-1456.
SONG G D, LIAO H J, ZHANG Z B, ZHU D. Advances in non-directed activation of silent gene clusters for mining active secondary metabolites of *Streptomyces*[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(8): 1442-1456. (in Chinese)
- [8] 郑服丛. 我国橡胶植保科技的现状与展望[J]. 中国热带农业, 2011(4): 37-40.
ZHENG F C. Current situation and prospect of rubber plant protection technology in China[J]. China Tropical Agriculture, 2011(4): 37-40. (in Chinese)
- [9] 刘一贤, 施玉萍, 戴利铭, 李岚岚, 蔡志英. 橡胶褐根病拮抗放线菌 17-7 的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 118-129.
LIU Y X, SHI Y P, DAI L M, LI L L, CAI Z Y. Screening, identification and fermentation optimization of an antimicrobial actinomycete strain 17-7 to *Phellinus noxius*[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 118-129. (in Chinese)
- [10] BUBICI G. *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species[J]. CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources, 2018, 13: 50.
- [11] HARIR M, BENDIF H, BELLAHCENE M, FORTAS Z, POGNI R. *Streptomyces* secondary metabolites[J]. Basic Biology and Applications of Actinobacteria, 2018, 6: 99-122.
- [12] ABDEL-RAZEK A S, EL-NAGGAR M E, ALLAM A, MORSY O M, OTHMAN S I. Microbial natural products in drug discovery[J]. Processes, 2020, 8(4): 470.
- [13] ROMANO S, JACKSON S A, PATRY S, DOBSON A D. Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms[J]. Marine Drugs, 2018, 16(7): 244.
- [14] SCHWARZ J, HUBMANN G, ROSENTHAL K, LUTZ S. Triaging of culture conditions for enhanced secondary metabolite diversity from different bacteria[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 193.
- [15] UREM M, ŚWIATEK - POLATYNSKA M A, RIGALI S, VAN WEZEL G P. Intertwining nutrient - sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*[J]. Molecular Microbiology, 2016, 102(2): 183-195.
- [16] RISDIAN C, ENDAH E S, SARASWATY V, WULANSARI H A, DIWAN A M, RATNANINGRUM D, HIDAYATI N A, MOZEF T. Production of antibacterial and antioxidant agents by Actinobacteria using soybean meal as a nitrogen source[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2023, 1201(1): 012100.
- [17] CHOI D B, CHOI O Y, SHIN H J, CHUNG D O, SHIN D Y. Tylosin production by *Streptomyces fradiae* using raw cornmeal in airlift bioreactor[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2007, 17(7): 1071-1078.
- [18] PANDEY A, SHUKLA A N U P A M, MAJUMDAR S K. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic[J]. African Journal of Biotechnology, 2005, 4(9): 13.
- [19] 杨勇, 章帅文, 张勇, 刘群, 李昆太. 黄麻链霉菌 AUH-1 发酵液的抗菌活性及其稳定性研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(2): 80-84.
YANG Y, ZHANG S W, ZHANG Y, LIU Q, LI K T. Anti-

- fungus activities and stability of fermentation broth from *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(2): 80-84. (in Chinese)
- [20] 张雨阳, 魏有海, 郭良芝, 程亮, 朱海霞, 郭青云. 黄三素链霉菌 15-6 发酵液的抑菌活性研究[J]. 湖南农业科学, 2021(9): 25-28.
- ZHANG Y Y, WEI Y H, GUO L Z, CHENG L, ZHU H X, GUO Q Y. Study on antifungal activity of the fermentation broth from *Streptomyces flavotricini* 15-6[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2021(9): 25-28. (in Chinese)
- [21] KULLAVANIJAYA P, LIM H W. Photoprotection[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2005, 52: 937-958.
- [22] SÁNCHEZ-SUÁREZ J, COY-BARRERA E, VILLAMIL L, DIAZ L. *Streptomyces*-derived metabolites with potential photoprotective properties: a systematic literature review and meta-analysis on the reported chemodiversity[J]. Molecules, 2020, 25(14): 3221.