

## 研究报告

# 海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵液粗提物的群体感应抑制活性及其发酵条件优化

王昱<sup>#1</sup>, 李峰<sup>#2</sup>, 张虹<sup>\*3</sup>

1 潍坊医学院临床医学院, 山东 潍坊 261053

2 潍坊市人民医院全科医学科, 山东 潍坊 261000

3 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053

王昱, 李峰, 张虹. 海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵液粗提物的群体感应抑制活性及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 894-908.

WANG Yu, LI Feng, ZHANG Hong. Quorum sensing inhibitory activity and fermentation condition optimization of crude extract of the marine bacterial strain *Vibrio* sp. LA-05[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 894-908.

**摘要:**【背景】海洋微生物代谢产物被认为是发掘新型天然活性物质的潜在来源, 其中不可避免地包含新型群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSIs)。响应面法是运用多元二次回归模型拟合各因素和响应值之间的函数关系, 对各因素及其交互作用进行评价, 可有效地从影响代谢产物发酵条件的各因素中预测出最佳条件。【目的】以紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) ATCC 12472<sup>T</sup>为指示菌株, 研究海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵液粗提物的群体感应抑制活性。在单因素试验基础上, 应用响应面法对菌株发酵条件进行优化, 以提高其发酵代谢产物中活性物质的产量。【方法】使用琼脂平板扩散法进行初筛后, 通过分析发酵液粗提物对紫色杆菌生长曲线及紫色素产量的影响研究其群体感应抑制活性。在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 设计原则, 以紫色素抑制率为响应值, 通过响应面法优化菌株发酵条件, 从而提高其发酵液中活性物质的产量。【结果】在基本不影响紫色杆菌正常生长的浓度范围内, 粗提物可不同程度地抑制紫色素的产生。模型预测结果表明, 最优发酵条件为发酵时间 37.59 h、发酵温度 19.28 °C、摇床转速 154.21 r/min、接种量 2.37%, 紫色素抑制率预测值为 53.38%。经试验验证, 紫色素抑制率为 52.85%±0.64%, 与模型理论预测值相近, 表明该回归模型与实际实验结果拟合程度较高, 模型可信度好, 具有可行性。【结论】海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵液粗提物具有群体感应抑制活性。本实验通过响应面法获得了该菌株的最优发酵条件, 这为后续新型群体感应抑制剂的研究奠定了基础。

**关键词:** 海洋弧菌 LA-05; 发酵代谢产物; 群体感应; 响应面法; 发酵条件

资助项目: 潍坊医学院博士科研启动基金

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Doctoral Research Foundation of Weifang Medical University.

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: zhanghong@wfm.edu.cn

Received: 2022-10-14; Accepted: 2022-11-21; Published online: 2022-12-15

## Quorum sensing inhibitory activity and fermentation condition optimization of crude extract of the marine bacterial strain *Vibrio* sp. LA-05

WANG Yu<sup>#1</sup>, LI Feng<sup>#2</sup>, ZHANG Hong<sup>\*3</sup>

1 School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China

2 General Medicine Department, Weifang People's Hospital, Weifang 261000, Shandong, China

3 School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong, China

**Abstract:** [Background] The metabolites of marine microorganisms are considered ideal sources for discovering natural active substances, which inevitably include novel quorum sensing inhibitors (QSIs). Response surface method uses multivariate quadratic regression model to fit the relationship between each factor and response value and evaluate the effects of factors and their interaction, which can effectively screen out the best conditions of the factors affecting the microbial fermentation for metabolite production. [Objective] The quorum sensing inhibitory activity of the crude extract of the marine bacterial strain *Vibrio* sp. LA-05 was investigated with *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472<sup>T</sup> as the indicator strain. To improve the production of active substances in the crude extract, we employed response surface method to optimize the fermentation conditions of the strain on the basis of single factor experiments. [Methods] After preliminarily screening by the agar plate diffusion method, the growth curves and violacein production of *C. violaceum* ATCC 12472<sup>T</sup> were employed to evaluate the quorum sensing inhibitory activity of the crude extract. On the basis of single factor experiments, fermentation conditions were optimized by Box-Behnken design and response surface method with violacein inhibition rate as a response value to improve the production of active substances in the crude extract. [Results] Within the concentration range that did not affect the growth of *C. violaceum* ATCC 12472<sup>T</sup>, the crude extract inhibited the production of violacein to various degrees. The fermentation conditions were optimized as fermentation with the inoculum amount of 2.37% at 19.28 °C and 154.21 r/min for 37.59 h, the extract obtained under which had the expected inhibition rate of 53.38%. The verification experiment showed that the inhibition rate of violacein was 52.85%±0.64%, close to the model predicted value. This result indicated that the regression model had a good fitting degree with the experimental results, being reliable and feasible. [Conclusion] The crude extract of the marine bacterial strain *Vibrio* sp. LA-05 possesses quorum sensing inhibitory activity. The fermentation conditions of this strain are optimized by response surface method, which will lay a foundation for the research and development of novel QSIs.

**Keywords:** marine bacterial strain *Vibrio* sp. LA-05; fermentation metabolites; quorum sensing; response surface method; fermentation conditions

过度使用和滥用抗生素会使细菌产生耐药性<sup>[1]</sup>。抗生素耐药性已经成为 21 世纪全球公共卫生面临的重要问题之一<sup>[2]</sup>。使用抗生素的初始阶段,大部分敏感菌株会被不断杀死。然而,在抗生素持续存在的压力下,少数存活的不敏感菌株代谢途径会发生改变,如改变抗生素作用位点、阻止抗生素进入胞内、分泌抗生素灭活酶等,它们可以抵抗抗生素并继续繁殖,进而使细菌产生抗生素耐药性<sup>[3]</sup>。抗生素耐药性已经对患者、临床医药、公共卫生和畜牧业等造成严重影响,主要包括资源浪费和经济损失<sup>[4]</sup>。因此,人们迫切需要探索新的有效策略来对抗细菌致病性和抗生素耐药性。

群体感应(quorum sensing, QS)是一种遗传调节系统,可以帮助细菌进行细胞间沟通并控制其群体行为。它是指在细菌生长过程中,由于群体密度增加,导致其生理和生化特性发生变化,显示出少量菌体或单个菌体所不具备的特征<sup>[5]</sup>。被称为自诱导物的信号分子在细菌群体感应系统中发挥着至关重要的作用,它们由一系列相关合成酶以细胞密度依赖的方式产生<sup>[6-7]</sup>。当细菌种群密度达到阈值时,信号分子与细胞质受体相互作用,通过包括受体蛋白在内相关蛋白的信号传递,最终诱导或抑制信号传递到胞内以调节特定基因的表达,从而调控微生物的群体行为,如生物发光<sup>[8]</sup>、毒力因子产生<sup>[9]</sup>、生物膜形成<sup>[10]</sup>、运动性<sup>[11-12]</sup>和细胞外多糖产生<sup>[13]</sup>等。群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSIs)是指那些可以抑制或者干扰细菌群体感应现象的物质,它们在不影响细菌正常生长的前提下,可以降低细菌毒力因子的产量或直接抑制细菌毒力因子的产生<sup>[14]</sup>。换句话说,当 QSIs 作用于细菌时导致其致病性减弱,而细菌的生存并未受到强大的选择压力,因此,细菌产生抗生素耐药性的可能性

也将大大降低。综上所述,群体感应抑制剂为靶向治疗细菌感染性疾病和减少病原微生物产生抗生素耐药性提供了新的思路和方向。

海洋占地球总面积的 70%以上,其未被开发的栖息地中蕴藏着丰富且稀有的生物资源。海洋生态环境复杂多变,具有高盐、高压、寡营养、常年高温或低温等特点<sup>[15]</sup>。海洋微生物经过长期持续的缓慢进化,已形成独特的代谢机制来适应海洋相对特殊的生态环境,这极大地增加了发现新型活性物质的可能性。因此,海洋微生物代谢产物被认为是发现新型天然活性化合物的潜在来源,其中不可避免地包括新的群体感应抑制剂<sup>[16]</sup>。近年来,研究表明许多海洋来源的微生物代谢产物具有群体感应抑制活性,在防治由病原微生物引起的疾病方面具有较大应用潜力<sup>[17]</sup>。紫色杆菌是一种兼性厌氧革兰氏阴性菌,具有单一群体感应系统 CviR-CviI。紫色素是紫色杆菌分泌的一种代谢产物,受 CviR-CviI 系统直接调控<sup>[18]</sup>。因此,通常将紫色杆菌作为筛选群体感应抑制剂的模式菌株,对紫色素抑制率的大小可以反映其群体感应抑制活性的强弱。

单因素试验是发酵工艺中一种常用的优化发酵条件方法,可为进一步进行响应面优化奠定基础。响应面法是一种统计学方法,能够同时评价和优化发酵体系中影响微生物生物量、微生物代谢产物的各因素及各因素间的相互作用。另外,由于响应面法能够快速准确地确定因素的最佳条件,并预测不同因素水平下的生物量及其代谢产物产量,所以被普遍应用于微生物发酵条件的优化<sup>[19-21]</sup>。

在前期研究中,从胶州湾(中国黄海, 36°09'N, 120°32'E)海洋沉积物中筛选出一株被鉴定为弧菌属的菌株,命名为 *Vibrio* sp. LA-05<sup>[22]</sup>。本研究使用琼脂平板扩散法对该菌发酵液粗提

物的群体感应抑制活性进行初步评估后,为了提高发酵液中活性物质产量,以粗提物对紫色杆菌紫色素抑制率为指标,在单因素试验基础上,通过响应面分析对该菌株发酵条件进行优化,以期后续粗提物中活性物质的追踪、分离、结构鉴定和活性评估奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验菌株

研究所用的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 菌株分离于胶州湾海洋沉积物。菌落形态、生理生化特性、16S rRNA 基因序列及系统发育树分析表明该菌为弧菌属。该菌株已保藏在隶属于世界微生物数据中心(World Data Centre for Microorganisms, WDCM)的中国典型培养物保藏中心(China Centre for Type Culture Collection, CCTCC),保藏编号为 CCTCC M 2018089。指示菌株紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) ATCC 12472<sup>T</sup>为本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

海水取自胶州湾(中国黄海, 36°09'N, 120°32'E),先静置去除不溶性大颗粒,再使用 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

海水培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.0, pH 7.0–7.2, 121 °C 灭菌 20 min 后备用。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨和酵母粉, Oxoid 公司; 氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 琼脂粉, Solarbio 公司; 乙酸乙酯, 国药集团化学试剂有限公司; 二甲亚砜, 国药集团化学试剂有限公司。高压灭菌锅, Zealway 仪器有限公司; 台式冷冻高速离心机, Sigma 离心机有限公司; 旋转蒸发器, 东京理化器械株式会社; 涡旋振荡器, 常州锐品精密仪器有限公司; 酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 发酵代谢产物粗提物的制备

将保存的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 按 1% 接种量接种到海水培养基中, 在 20 °C、150 r/min 条件下培养 24 h, 活化后备用。将活化后的菌液按 2% 接种量接种到海水培养基中, 在 20 °C、150 r/min 条件下发酵培养 36 h。孵育结束后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。取上清液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤, 除去不溶性菌体和沉淀。在分液漏斗中倒入处理好的发酵上清, 加入等体积乙酸乙酯, 充分振荡混匀后静置 20 min, 收集上层有机相, 每批上清液用乙酸乙酯萃取 3 次。将收集到的有机相倒入旋转蒸发瓶中, 用旋转蒸发器真空浓缩至黄褐色膏状, 称重后记录。用甲醇将获得的膏状粗提物配制成 100 mg/mL 样品溶液, 再经 0.22 μm 有机相滤膜过滤除菌, 放于 4 °C 冰箱储存备用。

#### 1.2.2 琼脂平板扩散法检测粗提物群体感应抑制活性

将冻存的紫色杆菌按 3% 接种量接种到 LB 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下培养过夜活化后备用。配制 LB 琼脂培养基, 经高压灭菌处理后, 置于超净工作台内自然冷却, 待其温度冷却至 37 °C 左右时按 2% 接种量加入活化好的菌液, 充分混匀后倒入无菌培养皿, 静置 15 min 至完全凝固。用打孔器在平板上打孔, 分别将 30 μL 不同浓度的发酵液粗提物(4、6、8、10、12 mg/mL, 甲醇为溶剂)依次加入到孔内, 同时以甲醇作为对照, 用封口膜密封后放入恒温培养箱中, 28 °C 静置培养 24 h 后观察结果, 每个浓度设置 3 个平行。

#### 1.2.3 不同浓度粗提物对紫色杆菌生长曲线及紫色素产量的影响

将活化后的紫色杆菌菌液按 2% 接种量接种到 LB 液体培养基中, 分别加入不同体积样品溶液(100 mg/mL)使培养基中发酵液粗提物的终浓度为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mg/mL, 同时以未加入

粗提物样品的实验组作为阴性对照, 在 28 °C、150 r/min 条件下培养 48 h。每隔 12 h 从三角瓶中取 200  $\mu$ L 发酵液至 96 孔板中, 每个浓度做 4 个复孔, 用酶标仪测量  $OD_{600}$  值并绘制生长曲线。

在分析粗提物对紫色杆菌紫色素产量的影响时, 对菌株的活化、接种和培养条件与上述一致, 但培养时间为 12 h。培养结束后取 1 mL 发酵液至 1.5 mL 微型离心管(Eppendorf, EP)中, 14 000 r/min 离心 10 min, 使紫色素和菌体沉淀, 去除上清液后, 加入等体积二甲基亚砜, 用涡旋振荡器充分振荡, 使紫色素充分溶解, 然后 14 000 r/min 离心 10 min 使菌体沉淀。从 EP 管中取 650  $\mu$ L 上清液加入到微量比色皿中, 使用紫外分光光度计测量  $OD_{585}$ , 每组设置 3 个平行<sup>[23]</sup>。

$$\text{紫色素抑制率} = \frac{\text{control}OD_{585} - \text{test}OD_{585}}{\text{control}OD_{585}} \times 100\%$$

#### 1.2.4 单因素试验设计

单因素试验分别以发酵时间(h)、发酵温度(°C)、摇床转速(r/min)及接种量(%)为考察因素, 以粗提物对紫色素产量的抑制率为考察指标<sup>[24]</sup>, 根据其结果综合评估不同发酵条件对发酵代谢产物粗提物群体感应抑制活性的影响。在进行该部分试验时, 使用的粗提物终浓度均为 0.10 mg/mL。

##### 1) 发酵时间对紫色素抑制率的影响

将活化后的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 按 2%接种量接种到海水培养基中, 发酵时间梯度设置为 12、24、36、48、60 h。

其他条件设置为发酵温度 20 °C, 摇床转速 150 r/min, 接种量 2%。孵育结束后按照 1.2.1 中方法制备粗提物, 称重并编号记录, 然后按照 1.2.3 中方法检测不同发酵时间获得的粗提物的紫色素抑制率。

##### 2) 发酵温度对紫色素抑制率的影响

将活化后的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 按

2%接种量接种到海水培养基中, 发酵温度梯度设置为 15、20、25、30、35 °C。

其他条件设置为发酵时间 36 h, 摇床转速 150 r/min, 接种量 2%。孵育结束后按照 1.2.1 中方法制备粗提物, 称重并编号记录, 然后按照 1.2.3 中方法检测不同发酵温度获得的粗提物的紫色素抑制率。

##### 3) 摇床转速对紫色素抑制率的影响

将活化后的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 按 2%接种量接种到海水培养基中, 摇床转速梯度设置为 90、120、150、180、210 r/min。

其他条件设置为发酵时间 36 h, 发酵温度 20 °C, 接种量 2%。孵育结束后按照 1.2.1 中方法制备粗提物, 称重并编号记录, 然后按照 1.2.3 中方法检测不同摇床转速获得的粗提物的紫色素抑制率。

##### 4) 接种量对紫色素抑制率的影响

将活化后的海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 按 2%接种量接种到海水培养基中, 接种量梯度设置为 1%、2%、3%、4%、5%。

其他条件设置为发酵时间 36 h, 发酵温度 20 °C, 摇床转速 150 r/min。孵育结束后按照 1.2.1 中方法制备粗提物, 称重并编号记录, 然后按照 1.2.3 中方法检测不同接种量获得的粗提物的紫色素抑制率。

#### 1.2.5 响应面法优化试验

在单因素试验结果基础上, 采用 Box-Behnken 设计原则选取发酵时间(h)、发酵温度(°C)、摇床转速(r/min)、接种量(%)为变量, 以紫色素抑制率为响应值, 设计四因素三水平响应面分析试验, 优化海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 的发酵条件<sup>[25]</sup>。在每一个变量中, 用-1、0、1 编码低、中、高 3 个水平, 试验因素与水平如表 1 所示。在进行该部分试验时, 使用的粗提物终浓度均为 0.10 mg/mL。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface experiment factors and levels

| 水平     | 因素 Factors              |                                 |                        |                       |
|--------|-------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Levels | A 发酵时间                  | B 发酵温度                          | C 摇床转速                 | D 接种量                 |
|        | A Fermentation time (h) | B Fermentation temperature (°C) | C Shaker speed (r/min) | D Inoculum amount (%) |
| -1     | 24                      | 15                              | 120                    | 1                     |
| 0      | 36                      | 20                              | 150                    | 2                     |
| 1      | 48                      | 25                              | 180                    | 3                     |

### 1.3 数据分析

所有数据均采用单因素方差分析, Dunn's 多重比较检验, 结果以平均数±标准差( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )表示, 并由 Origin 2021 绘制图表, 所有试验至少进行 3 次。  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  分别为差异显著或极显著。响应面试验采用 Design-Expert 11 软件设计实验并对回归模型进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵代谢产物粗提物群体感应抑制活性分析

#### 2.1.1 群体感应抑制活性初筛

由图 1 琼脂平板扩散法实验结果可知, 粗提物浓度为 6、8、10 mg/mL 时均有明显的紫色素抑制圈(蓝色箭头标注), 而在 12 mg/mL 时出现明显的半透明抑菌圈(黄色箭头标注), 表明发酵代谢产物粗提物具有群体感应抑制活性, 即粗提物中含有群体感应抑制剂。

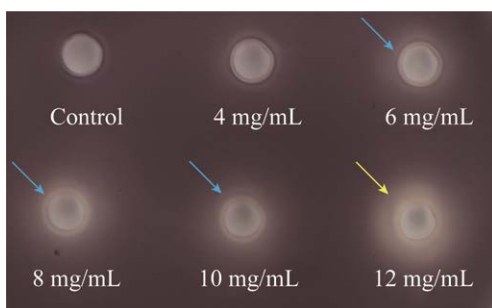


图 1 琼脂平板扩散法结果

Figure 1 Result of the agar plate diffusion method.

#### 2.1.2 粗提物对紫色杆菌生长曲线及紫色素产量的影响

由图 2A 不同浓度粗提物对紫色杆菌生长曲线的影响可知, 当终浓度为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 时, 粗提物对紫色杆菌的生长基本不产生影响; 当终浓度为 0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mg/mL 时紫色杆菌能够生长, 但其生长受到一定影响。由此可知, 发酵代谢产物粗提物在 0.01–0.10 mg/mL 范围内基本不影响紫色杆菌正常生长。

由图 2B 不同浓度发酵代谢产物粗提物对紫色素产量的影响可知, 紫色素抑制率随着粗提物浓度的增加而增大, 当粗提物终浓度为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 时, 抑制率分别为 7.54%、9.98%、13.55%、32.61%、41.62% 和 53.36%。在不影响紫色杆菌正常生长的情况下, 当粗提物浓度为 0.10 mg/mL 时对紫色素抑制能力最强, 而且经检验差异显著( $P < 0.05$ )。因此, 在进行单因素试验及响应面优化试验时, 粗提物浓度均为 0.10 mg/mL。

### 2.2 单因素试验结果

#### 2.2.1 发酵时间对紫色素抑制率的影响

由图 3A 可知, 当发酵温度为 20 °C、转速为 150 r/min、接种量为 2% 时, 随着发酵时间的不断延长, 紫色素抑制率呈先上升后略有下降的趋势。当发酵时间为 36 h 时达到最高值。因此, 选择发酵时间 36 h 为最佳。

#### 2.2.2 发酵温度对紫色素抑制率的影响

由图 3B 可知, 当发酵时间为 36 h、转速为 150 r/min、接种量为 2% 时, 随着发酵温度的不断增加, 紫色素抑制率呈先上升后明显下降的趋

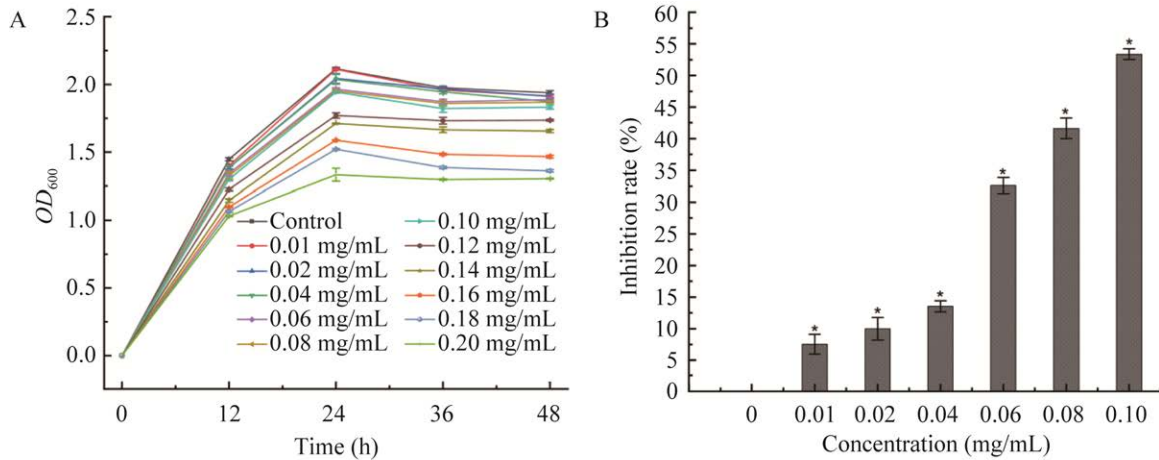


图 2 不同浓度粗提物对紫色杆菌生长(A)及紫色素产量(B)的影响 0: 粗提物样品添加量为 0 mg/mL, 其对应的紫色素抑制率为 0%.\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较差异显著

Figure 2 Effect of crude extracts at different concentrations on growth (A) and violacein production (B) of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472<sup>T</sup>. 0: The amount of crude extracts is 0 mg/mL, and the violacein inhibition rate is 0. \*:  $P < 0.05$ , the difference is significant as compared to control.

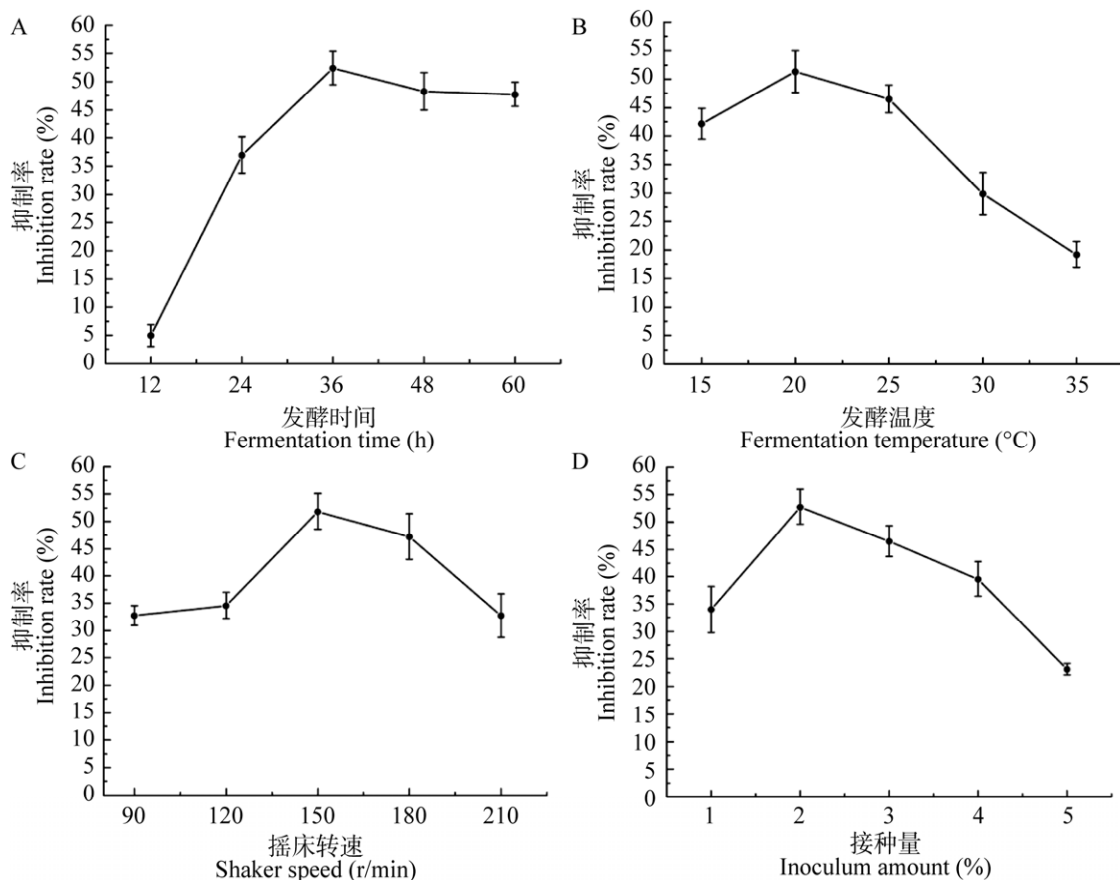


图 3 四种不同因素对紫色素产量的影响 A: 发酵时间. B: 发酵温度. C: 摇床转速. D: 接种量

Figure 3 Effect of four different factors on violacein production. A: Fermentation time. B: Fermentation temperature. C: Shaker speed. D: Inoculum amount.

势。当发酵温度为 20 °C 时达到最高值。因此, 选择发酵温度 20 °C 为最佳。

### 2.2.3 摇床转速对紫色素抑制率的影响

由图 3C 可知, 当发酵时间为 36 h、发酵温度为 20 °C、接种量为 2% 时, 随着摇床转速的不断增加, 紫色素抑制率呈先上升后下降的趋势。当摇床转速为 150 r/min 时达到最高值。因此, 选择摇床转速 150 r/min 为最佳。

### 2.2.4 接种量对紫色素抑制率的影响

由图 3D 可知, 当发酵时间为 36 h、发酵温度为 20 °C、转速为 150 r/min 时, 随着接种量的不断增加, 紫色素抑制率呈先上升后明显下降的趋势。当接种量为 2% 时达到最高值。因此, 选择接种量 2% 为最佳。

## 2.3 响应面试验设计及显著性分析

以单因素试验最优值为中心水平, 采用 Box-Behnken 设计原则, 以发酵时间(h)、发酵温度(°C)、摇床转速(r/min)、接种量(%)为变量, 以紫色素抑制率为响应值, 设计四因素三水平实验, 实验设计及结果见表 2。利用 Design-Expert 11 软件对表 2 实验数据进行二次多元回归拟合, 得到抑制率(Y)对发酵时间(A)、发酵温度(B)、摇床转速(C)、接种量(D)这 4 个变量的二次多项回归拟合方程为:

$$Y=52.57+1.14A-1.21B+1.55C+2.91D+0.49AB-0.005AC-1.13AD+0.59BC-0.13BD-0.67CD-2.45A^2-3.86B^2-4.37C^2-3.63D^2 (R^2=0.9384)$$

由表 3 可知, 该回归模型方程  $F=15.23$ ,

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experiment design and results

| 实验序号             | 编码水平 Design levels                |   |                                  |                                | 抑制率                 |
|------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Experimental No. | A 发酵时间<br>A Fermentation time (h) | B 发酵温度<br>B Fermentation temperature (°C) | C 摇床转速<br>C Shaker speed (r/min) | D 接种量<br>D Inoculum amount (%) | Inhibition rate (%) |
| 1                | 0                                 | 0   | 0                                | 0                              | 52.85               |
| 2                | 0                                 | 0   | 0                                | 0                              | 51.64               |
| 3                | 1                                 | 1   | 0                                | 0                              | 45.57               |
| 4                | 0                                 | 0   | 1                                | -1                             | 41.84               |
| 5                | 0                                 | -1  | -1                               | 0                              | 45.88               |
| 6                | 0                                 | 0   | 0                                | 0                              | 51.30               |
| 7                | 0                                 | 0   | 0                                | 0                              | 53.37               |
| 8                | -1                                | -1  | 0                                | 0                              | 46.99               |
| 9                | -1                                | 0   | 0                                | 1                              | 48.91               |
| 10               | 0                                 | -1  | 1                                | 0                              | 46.55               |
| 11               | 0                                 | 0   | -1                               | 1                              | 47.70               |
| 12               | 1                                 | 0   | 0                                | -1                             | 46.89               |
| 13               | 0                                 | 0   | 1                                | 1                              | 48.76               |
| 14               | 0                                 | 1   | 1                                | 0                              | 44.54               |
| 15               | -1                                | 0   | 1                                | 0                              | 47.23               |
| 16               | -1                                | 0   | -1                               | 0                              | 42.18               |
| 17               | -1                                | 0   | 0                                | -1                             | 42.20               |
| 18               | 1                                 | -1  | 0                                | 0                              | 47.87               |
| 19               | 1                                 | 0   | 0                                | 1                              | 49.08               |
| 20               | 0                                 | 1   | -1                               | 0                              | 41.50               |
| 21               | 1                                 | 0   | -1                               | 0                              | 44.71               |
| 22               | 0                                 | -1  | 0                                | -1                             | 43.18               |
| 23               | 0                                 | -1  | 0                                | 1                              | 48.19               |
| 24               | -1                                | 1   | 0                                | 0                              | 42.73               |
| 25               | 1                                 | 0   | 1                                | 0                              | 49.74               |
| 26               | 0                                 | 0   | -1                               | -1                             | 38.12               |
| 27               | 0                                 | 1   | 0                                | 1                              | 47.15               |
| 28               | 0                                 | 0   | 0                                | 0                              | 53.71               |
| 29               | 0                                 | 1   | 0                                | -1                             | 42.66               |



表3 回归模型显著性检验及方差分析

Table 3 Significance test and analysis of variance for the regression model

| 来源<br>Source          | 平方和<br>Sum of squares | 自由度<br><i>df</i> | 均方<br>Mean square | <i>F</i> | <i>P</i> | 显著性<br>Significance |
|-----------------------|-----------------------|------------------|-------------------|----------|----------|---------------------|
| 模型 Model              | 399.95                | 14               | 28.57             | 15.23    | <0.000 1 | Significant         |
| <i>A</i>              | 15.46                 | 1                | 15.46             | 8.24     | 0.012 3  |                     |
| <i>B</i>              | 17.55                 | 1                | 17.55             | 9.35     | 0.008 5  |                     |
| <i>C</i>              | 28.74                 | 1                | 28.74             | 15.32    | 0.001 6  |                     |
| <i>D</i>              | 101.5                 | 1                | 101.5             | 54.1     | <0.000 1 |                     |
| <i>AB</i>             | 0.96                  | 1                | 0.96              | 0.51     | 0.486 1  |                     |
| <i>AC</i>             | 1.00E-04              | 1                | 1.00E-04          | 5.33E-05 | 0.994 3  |                     |
| <i>AD</i>             | 5.11                  | 1                | 5.11              | 2.72     | 0.121 2  |                     |
| <i>BC</i>             | 1.40                  | 1                | 1.4               | 0.75     | 0.401 5  |                     |
| <i>BD</i>             | 0.068                 | 1                | 0.068             | 0.036    | 0.852 2  |                     |
| <i>CD</i>             | 1.77                  | 1                | 1.77              | 0.94     | 0.348    |                     |
| <i>A</i> <sup>2</sup> | 38.88                 | 1                | 38.88             | 20.72    | 0.000 5  |                     |
| <i>B</i> <sup>2</sup> | 96.62                 | 1                | 96.62             | 51.5     | <0.000 1 |                     |
| <i>C</i> <sup>2</sup> | 123.7                 | 1                | 123.7             | 65.94    | <0.000 1 |                     |
| <i>D</i> <sup>2</sup> | 85.27                 | 1                | 85.27             | 45.45    | <0.000 1 |                     |
| 残差 Residual           | 26.26                 | 14               | 1.88              |          |          |                     |
| 失拟项 Lack of fit       | 21.77                 | 10               | 2.18              | 1.94     | 0.274 1  | Not significant     |
| 净误差 Pure error        | 4.50                  | 4                | 1.12              |          |          |                     |
| 总误差 Cor total         | 426.21                | 28               |                   |          |          |                     |

$P < 0.000 1$ , 说明此模型极显著。失拟项为  $P = 0.274 1 > 0.05$ , 失拟不显著, 说明此模型拟合程度较高, 可信度好。调整决定系数  $R^2$  (adj) = 0.876 8 与模型相关系数  $R^2 = 0.938 4$  较为接近, 而且调整决定系数  $R^2$  (adj) = 0.876 8 与  $R^2$  (pred) = 0.689 3 差值  $< 0.2$ , 说明该回归模型得到的抑制率预测值与实验值的拟合度良好。离散系数 (coefficient of variance, CV) = 2.94%, 说明实验的可靠性和精确度高, 可以忽略因为实验误差导致的不能拟合的情况。信噪比 Adeq Precision = 13.312  $> 4$ , 说明该回归模型响应信号强, 可信度高, 可以拟合上述实验结果。综上所述, 该模型可以用于对紫色素抑制率, 即粗提物群体感应抑制活性或粗提物中群体感应抑制剂含量的预测。一次项接种量 (*D*)、二次项发酵温度 (*B*<sup>2</sup>)、摇床转速 (*C*<sup>2</sup>) 和接种量 (*D*<sup>2</sup>) 对紫色素产量的影响极显著

( $P < 0.000 1$ ), 一次项发酵时间 (*A*)、发酵温度 (*B*)、摇床转速 (*C*) 和二次项发酵时间 (*A*<sup>2</sup>) 对紫色素产量的影响显著 ( $P < 0.05$ ), 说明这 4 个单因素对紫色素抑制率的影响不是简单的线性关系, 而是存在交互作用。

#### 2.4 三维响应面图和等高线分析

响应面是响应值对实验因素所构成的三维空间曲面图, 能够较为直观地反映各因素对响应值的影响程度, 从响应面分析图上能清楚地看出最佳响应值所对应的各实验因素的具体条件, 并且可直观地反映各因素之间交互作用的大小<sup>[26-27]</sup>。响应面坡度能反映两因素的交互作用是否显著, 坡度越陡, 表明其交互作用越显著, 坡度越平稳则表明其交互作用越不显著。此外, 等高线的形状也能表示两因素间交互作用的强弱<sup>[28]</sup>。由图 4 可知, 6 个响应面三维立体图均为

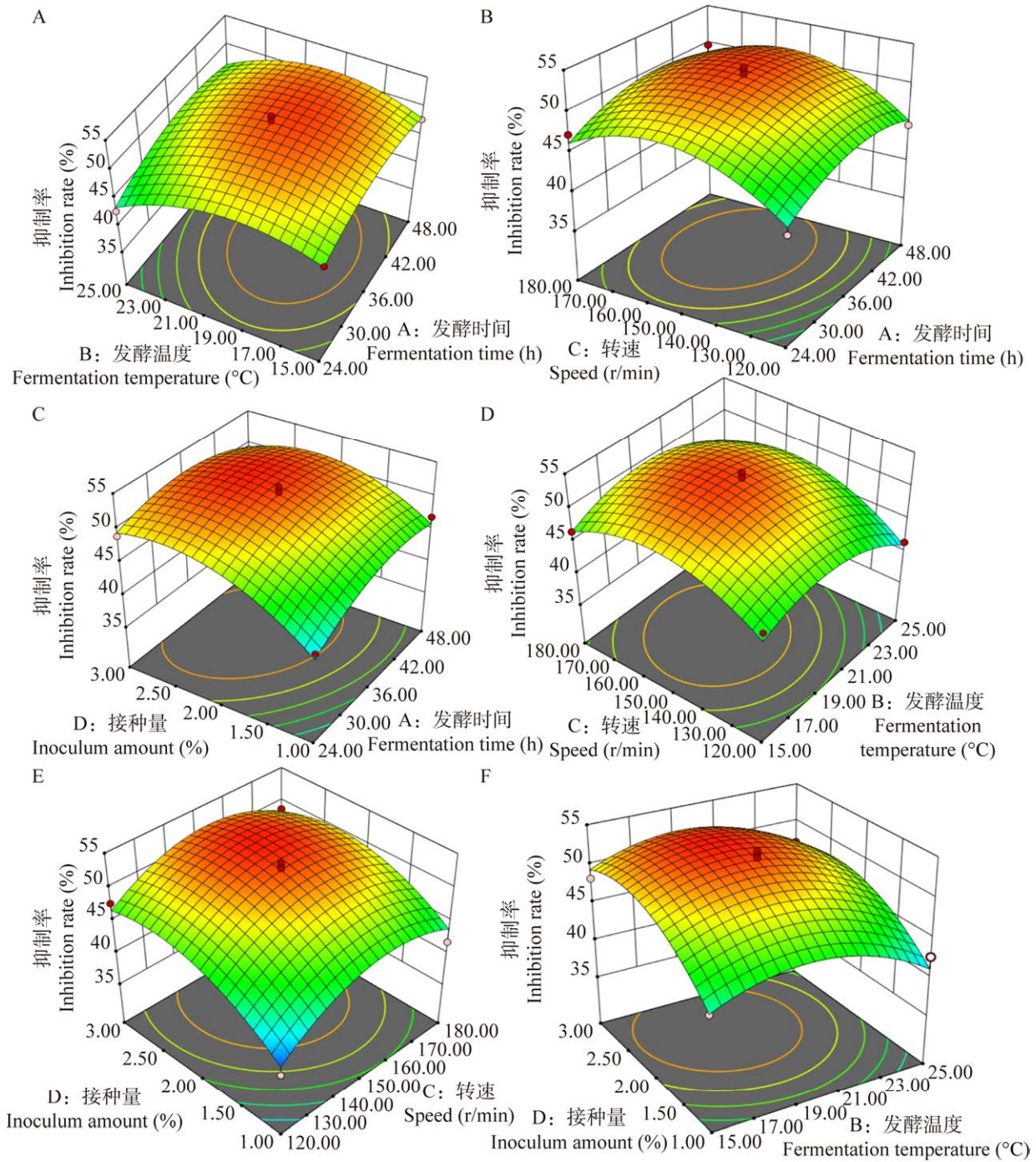


图 4 各因素对紫色素产量交互影响的三维曲面图 A: 发酵时间和发酵温度之间的交互影响. B: 发酵时间和摇床转速之间的交互影响. C: 发酵时间和接种量之间的交互影响. D: 发酵温度和摇床转速之间的交互影响. E: 摇床转速和接种量之间的交互影响. F: 发酵温度和接种量之间的交互影响

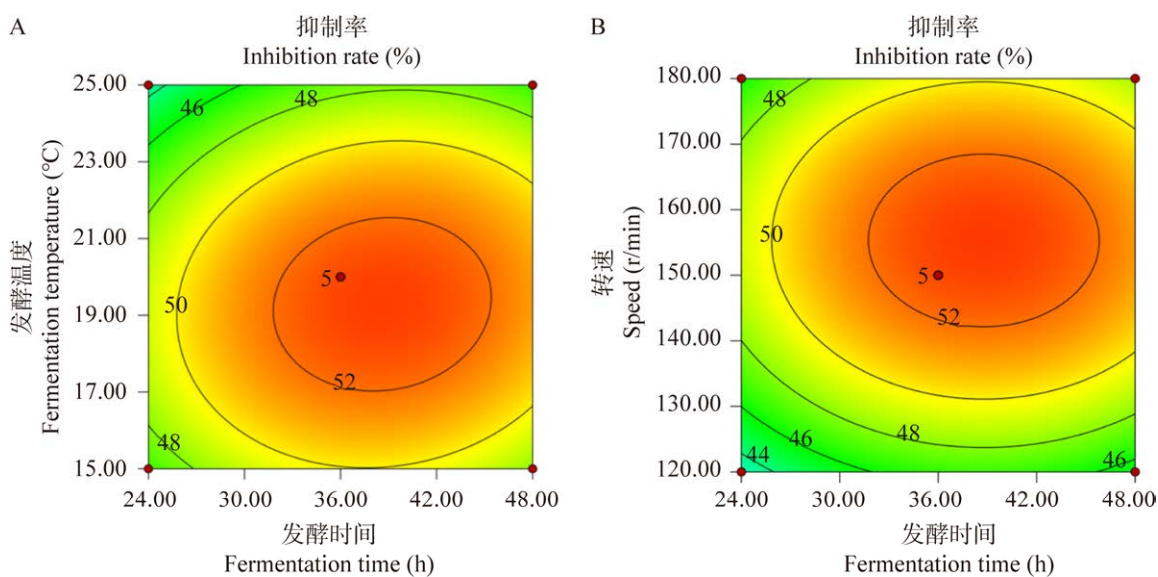
Figure 4 Three-dimensional stereogram of mutual-influence for different factors on violacein production. A: Mutual-influence for fermentation time and fermentation temperature. B: Mutual-influence for fermentation time and shaker speed. C: Mutual-influence for fermentation time and inoculum amount. D: Mutual-influence for fermentation temperature and shaker speed. E: Mutual-influence for shaker speed and inoculum amount. F: Mutual-influence for fermentation temperature and inoculum amount.

光滑的曲面且开口向下,说明在实验设计的四因素三水平范围内能够得到发酵代谢产物粗提物对紫色素产量的最大抑制率。由图 4A 可知,随着发酵时间和发酵温度的升高,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,发酵温度对紫色素抑制率的影响大于发酵时间。由图 4B 可知,随着发酵时间和摇床转速的增加,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,摇床转速对紫色素抑制率的影响大于发酵时间。由图 4C 可知,随着发酵时间和接种量的增加,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,接种量对紫色素抑制率的影响大于发酵时间。由图 4D 可知,随着发酵温度和摇床转速的增加,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,摇床转速对紫色素抑制率的影响大于发酵温度。由图 4E 可知,随着接种量和摇床转速的增加,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,接种量对紫色素抑制率的影响相对转速略大,但差异不明显。由图 4F 可知,随着发酵温度和接种量的增加,紫色素抑制率均呈先上升后下降趋势,接种量对紫色素抑制率

的影响大于发酵温度。由图 5A–5C 可以看出,等高线形状接近于椭圆形,说明所对应的两因素交互作用对紫色素抑制率影响较大。综上所述,各因素对紫色素抑制率的影响依次为接种量>摇床转速>发酵温度>发酵时间,该结果与回归模型方差分析结果相一致。

## 2.5 验证实验

通过响应面法优化试验预测分析,海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 代谢产物粗提物的最适发酵条件为发酵时间 37.59 h、发酵温度 19.28 °C、摇床转速 154.21 r/min、接种量 2.37%,在该条件下紫色素抑制率为 53.38%,根据实际实验操作情况,调整发酵时间为 36 h、发酵温度为 20 °C、摇床转速为 150 r/min、接种量为 2%,在该条件下经验证实验得到紫色素抑制率为 52.85%±0.64%,与预测值的相对误差较小,表明该回归模型与实际实验结果拟合程度较高,能够真实地反映发酵时间、发酵温度、摇床转速、接种量对紫色素产量的影响,具有可行性和可信度。



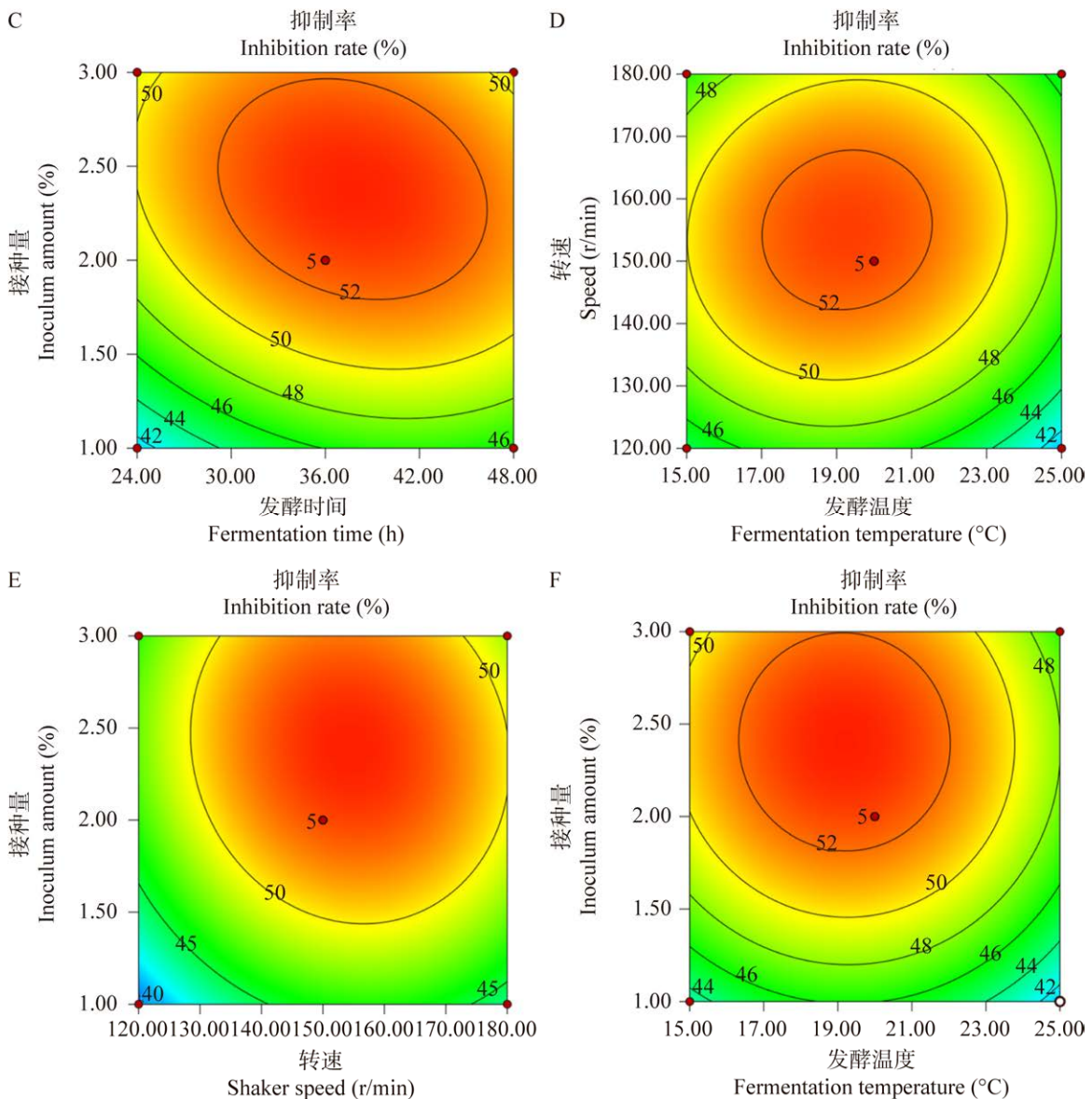


图 5 各因素对紫色素产量交互影响的等高线图 A: 发酵时间和发酵温度之间的交互影响. B: 发酵时间和摇床转速之间的交互影响. C: 发酵时间和接种量之间的交互影响. D: 发酵温度和摇床转速之间的交互影响. E: 摇床转速和接种量之间的交互影响. F: 发酵温度和接种量之间的交互影响

Figure 5 Contour plot of mutual-influence for different factors on violacein production. A: Mutual-influence for fermentation time and fermentation temperature. B: Mutual-influence for fermentation time and shaker speed. C: Mutual-influence for fermentation time and inoculum amount. D: Mutual-influence for fermentation temperature and shaker speed. E: Mutual-influence for shaker speed and inoculum amount. F: Mutual-influence for fermentation temperature and inoculum amount.

### 3 讨论与结论

紫色杆菌是常用于筛选群体感应抑制剂的模式菌株. 本文通过琼脂平板扩散法初步研究了

海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵代谢产物粗提物的群体感应抑制活性, 并分析了不同浓度粗提物对紫色杆菌生长及紫色素产量的影响. 结果表明, 粗提物具有群体感应抑制活性, 在几乎不影

响紫色杆菌正常生长情况下,能够明显抑制紫色素产生。

为提高海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 发酵代谢产物中活性物质产量,本研究分别从发酵时间、发酵温度、摇床转速、接种量这4个因素应用单因素试验对菌株发酵条件进行优化。细菌生长曲线分为迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期4个时期。发酵时间对微生物生长繁殖及其代谢产物的积累非常重要,代谢产物积累量最多的时期是在稳定期。当稳定期结束,细菌进入衰亡期后会发菌体破碎释放出其他物质,不利于活性物质的分离纯化<sup>[29]</sup>。实验结果表明,发酵时间为36 h时,粗提物对紫色杆菌紫色素抑制率最高。适宜的发醇温度可以加快细菌细胞分裂,提高发酵液中活菌含量,有利于代谢产物的积累,而发酵温度偏高或偏低均不利于菌体生长和代谢产物积累<sup>[30]</sup>。实验结果表明,发酵温度为20℃时,粗提物对紫色杆菌紫色素抑制率最高。适宜的摇床转速可使培养液中细菌与溶解氧充分接触,但超出适宜的摇床转速容易对细菌造成机械损伤,降低发酵液中活菌量,进而影响细菌代谢产物的积累。实验结果表明,摇床转速为150 r/min时,粗提物对紫色杆菌紫色素抑制率最高。适宜的接种量有利于细菌生长繁殖及其代谢产物积累,接种量较小时细菌生长繁殖缓慢,培养时间成本高,但在超出适宜接种量后,培养的环境中的营养物质消耗太快,会对其代谢产物产生一定影响<sup>[31]</sup>。实验结果表明,接种量为2%时,粗提物对紫色素抑制率最高。

由于海洋弧菌(*Vibrio* sp.) LA-05 代谢产物的发酵条件优化涉及多个因素和水平,若是采用传统的正交实验会造成繁重的工作量,并且很难得到理想的结果,所以采用响应面法优化其发酵条件。响应面法运用多元二次回归模型拟合各

因素和响应值之间的函数关系,通过实验设计、数学建模和模型检验对各因素及其交互作用进行评价,可以有效地从影响代谢产物发酵条件的各因素中筛选出最佳条件,从而实现其条件优化<sup>[32]</sup>。赵月等<sup>[29]</sup>通过响应面法优化试验对蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) BCCY-22 发酵条件进行优化后,生物量是优化前的135.94%;陈成等<sup>[30]</sup>通过响应面法优化产 $\beta$ -内酰胺酶菌*Bacillus cereus* B03的发酵条件,优化后该菌株产 $\beta$ -内酰胺酶的酶活力为113 278.7 U/mL,为优化之前酶活力的1.28倍;郭春生等<sup>[33]</sup>通过响应面法优化高产四甲基吡嗪微生物的发酵条件,优化后四甲基吡嗪产量可达(166.19 $\pm$ 2.79) mg/L,较优化前提高了48%。本研究在单因素试验基础上,响应面法优化试验模型理论预测结果分析表明,最佳发酵条件为:发酵时间37.59 h,发酵温度19.28℃,摇床转速154.21 r/min,接种量2.37%,紫色素抑制率预测值为53.38%。经验证实验得到紫色素抑制为52.85% $\pm$ 0.64%,与模型理论预测值相近,说明该模型回归性良好,本次实验的拟合程度高。本研究的实验和理论结果将为后续从粗提物中分离和鉴定活性物质,进而探究其生物活性、细胞毒性及其在病原微生物防治、食品防腐、水产养殖等方面的应用奠定基础。

## 致谢

感谢潍坊医学院公共卫生检测中心为我们提供的实验平台和仪器支持。

## REFERENCES

- [1] RASKO DA, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(2): 117-128.
- [2] MOHR KI. History of antibiotics research[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2016, 398:

- 237-272.
- [3] 沙国萌, 陈冠军, 陈彤, 王禄山. 抗生素耐药性的研究进展与控制策略[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3369-3379.
- SHA GM, CHEN GJ, CHEN T, WANG LS. Strategies for controlling antibiotic resistance: a review[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3369-3379 (in Chinese).
- [4] MOREHEAD MS, SCARBROUGH C. Emergence of global antibiotic resistance[J]. Primary Care, 2018, 45(3): 467-484.
- [5] ABISADO RG, BENOMAR S, KLAUS JR, DANDEKAR AA, CHANDLER JR. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions[J]. mBio, 2018, 9(3): e02331-e02317.
- [6] EVANS KC, BENOMAR S, CAMUY-VÉLEZ LA, NASSERI EB, WANG XF, NEUENSWANDER B, CHANDLER JR. Quorum-sensing control of antibiotic resistance stabilizes cooperation in *Chromobacterium violaceum*[J]. The ISME Journal, 2018, 12(5): 1263-1272.
- [7] PAPPENFORTH K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 576-588.
- [8] ENGBRECHT J, NEALSON K, SILVERMAN M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*[J]. Cell, 1983, 32(3): 773-781.
- [9] MOK N, CHAN SY, LIU SY, CHUA SL. Vanillin inhibits PqsR-mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Food & Function, 2020, 11(7): 6496-6508.
- [10] KIM SG, YOON YH, CHOI JW, RHA KS, PARK YH. Effect of furanone on experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation: *in vitro* study[J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2012, 76(11): 1575-1578.
- [11] KHAN F, PHAM DTN, OLOKETUYI SF, KIM YM. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 33-49.
- [12] O'TOOLE GA, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 295-304.
- [13] O'LOUGHLIN CT, MILLER LC, SIRYAPORN A, DRESCHER K, SEMMELHACK MF, BASSLER BL. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(44): 17981-17986.
- [14] CHEN X, ZHANG LK, ZHANG MX, LIU HY, LU PR, LIN KJ. Quorum sensing inhibitors: a patent review (2014–2018)[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018, 28(12): 849-865.
- [15] BEYGMORADI A, HOMAIEI A, HEMMATI R, SANTOS-MORIANO P, HORMIGO D, FERNÁNDEZ-LUCAS J. Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(23): 9937-9948.
- [16] PAOLI L, RUSCHEWEYH HJ, FORNERIS CC, HUBRICH F, KAUTSAR S, BHUSHAN A, LOTTI A, CLAYSSSEN Q, SALAZAR G, MILANESE A, CARLSTRÖM CI, PAPADOPOULOU C, GEHRIG D, KARASIKOV M, MUSTAFA H, LARRALDE M, CARROLL LM, SÁNCHEZ P, ZAYED AA, CRONIN DR, et al. Biosynthetic potential of the global ocean microbiome[J]. Nature, 2022, 607(7917): 111-118.
- [17] DEFOIRDT T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(4): 313-328.
- [18] BURT SA, OJO-FAKUNLE VTA, WOERTMAN J, VELDHUIZEN EJA. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93414.
- [19] LATHA S, SIVARANJANI G, DHANASEKARAN D. Response surface methodology: a non-conventional statistical tool to maximize the throughput of *Streptomyces* species biomass and their bioactive metabolites[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2017, 43(5): 567-582.
- [20] KHATIB I, CHOW MYT, RUAN JF, CIPOLLA D, CHAN HK. Modeling of a spray drying method to produce ciprofloxacin nanocrystals inside the liposomes utilizing a response surface methodology: Box-Behnken experimental design[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 597: 120277.
- [21] AGREBI R, HADDAR A, HAJJI M, FRIKHA F, MANNI L, JELLOULI K, NASRI M. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1049-1061.
- [22] ZHANG H, LI H, LIU HR, LANG DA, XU H, ZHU H. The application of a halotolerant metalloprotease from

- marine bacterium *Vibrio* sp. LA-05 in liquid detergent formulations[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 142: 18-25.
- [23]QAIS FA, AHMAD I, HUSAIN FM, ALOMAR SY, AHMAD N, ALBALAWI F, ALAM P, ALBALAWI T. Interference of quorum sensing regulated bacterial virulence factors and biofilms by *Plumbago zeylanica* extract[J]. Microscopy Research and Technique, 2021, 84(12): 3150-3160.
- [24]CHANG AP, SUN SW, LI L, DAI XY, LI H, HE QM, ZHU H. Tyrosol from marine fungi, a novel quorum sensing inhibitor against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Bioorganic chemistry, 2019, 91: 103140.
- [25]张誉葵, 许永华, 文湘穗, 王雨濛, 方平, 任跃英, 李宝全, 冷世和. 响应面法优化北五味子褐斑病内生防真菌淡紫拟青霉 WG9 发酵工艺及发酵产物稳定性研究[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1561-1574.
- ZHANG YQ, XU YH, WEN XS, WANG YM, FANG P, REN YY, LI BQ, LENG SH. Response surface methodology for optimizing fermentation process of the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum* WG9 preventing *Schisandra chinensis* brown spot disease[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1561-1574 (in Chinese).
- [26]吴翔, 甘炳成, 谢丽源, 谭昊, 黄忠乾, 彭卫红. 响应面法优化细菌 MY07 产 IAA 液体发酵培养基[J]. 生物技术, 2015, 25(2): 201-204.
- WU X, GAN BC, XIE LY, TAN H, HUANG ZQ, PENG WH. Application of response surface methodology for optimization of liquid fermentation medium for IAA secretion by MY07[J]. Biotechnology, 2015, 25(2): 201-204. (in Chinese).
- [27]胡彦丽, 潘利利, 闫淑珍, 陈双林. 双对苯醌的抗氧化活性分析及其固体发酵条件优化[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 199-207.
- HU YL, PAN LL, YAN SZ, CHEN SL. Analysis of antioxidant activity of 2,7-dihydroxy-3,6,9-trimethyl-9H-xanthene-1,4,5,8-tetraone and optimization of solid-state fermentation conditions for its production[J]. Food Science, 2022, 43(14): 199-207 (in Chinese).
- [28]古明朗, 郭影琪, 尹永祺, 何旭东. 响应面法优化西兰花芽苗富集异硫氰酸酯发芽工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 239-247.
- GU ML, GUO YQ, YIN YQ, HE XD. Optimization of germination process of isothiocyanate enrichment in broccoli sprouts by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 239-247 (in Chinese).
- [29]赵月, 杨亚楠, 李雅华, 赵洪海, 咸洪泉. 生防细菌蜡样芽孢杆菌 BCCY-22 发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2022, 37(7): 938-945.
- ZHAO Y, YANG YN, LI YH, ZHAO HH, XIAN HQ. Optimizing fermentation of biocontrol bacterium *Bacillus cereus* BCCY-22[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(7): 938-945 (in Chinese).
- [30]陈成, 宁喜斌. 响应面法优化产  $\beta$ -内酰胺酶菌 *Bacillus cereus* B03 的发酵条件[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 138-145.
- CHEN C, NING XB. Optimization of fermentation conditions of  $\beta$ -lactamase producing bacteria *Bacillus cereus* B03 by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 138-145 (in Chinese).
- [31]任静静, 杨铭伟, 剡根强, 蒋建军, 王鹏雁. 环境因子及接种量对单增李斯特菌生长的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(5): 1491-1497.
- REN JJ, YANG MW, YAN GQ, JIANG JJ, WANG PY. Effect of environmental factors and different inoculum size on growth state of *Listeria monocytogenes*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(5): 1491-1497 (in Chinese).
- [32]吕贞儿. 天然产物提取工艺优化与次生代谢产物成分的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2013.
- LYU ZE. Optimization of natural products extraction condition and research of the constituents of secondary metabolite[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2013 (in Chinese).
- [33]郭春生, 杨舟, 乔月梅, 杨婧, 赵永红, 李林达, 李力群. 高产四甲基吡嗪微生物的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(9): 80-85.
- GUO CS, YANG Z, QIAO YM, YANG J, ZHAO YH, LI LD, LI LQ. Screening, identification and fermentation conditions optimization of high yield tetramethylpyrazine microorganism[J]. China Brewing, 2022, 41(9): 80-85 (in Chinese).