

丁酸梭菌与酪丁酸梭菌发酵特性比较

Comparison of fermentation characteristics between *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyroburicum*

王友玲¹ 魏竹君¹ 刘 青¹

WANG You-ling¹ WEI Zhu-jun¹ LIU Qing¹

朱立磊² 肖海芳¹ 宋元达¹

ZHU Li-lei² XIAO Hai-fang¹ SONG Yuan-da¹

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东 淄博 255000;

2. 山东玉兔食品有限公司, 山东 淄博 255300)

(1. College of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China; 2. Shandong Yutu Food Co., Ltd., Zibo, Shandong 255300, China)

摘要: 从人粪便、窖泥和动物肠道内容物分离筛选出 3 株丁酸梭状芽孢杆菌, 分别命名为 *Clostridium butyricum* NK、*Clostridium butyricum* SY、*Clostridium butyricum* RX。比较丁酸梭菌 NK、丁酸梭菌 SY、丁酸梭菌 RX 和酪丁酸梭菌 ATCC25755 在合成培养基的发酵特性。结果表明: 丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 SY 生长能力较强。酪丁酸梭菌产丁酸能力较强, 而产乳酸能力低于丁酸梭菌。3 株丁酸梭菌相比较, 丁酸梭菌 NK 产丁酸能力较强, 达 2.08 g/L。

关键词: 丁酸; 丁酸梭菌; 酪丁酸梭菌; 发酵特性; 16S rDNA

Abstract: In this study, three strains of *Clostridium butyrate* were isolated from human feces, pit mud and animal intestinal contents. Which were named as *Clostridium butyricum* NK, SY and RX respectively. The fermentation characteristics of *C. butyricum* NK, SY and RX and *C. tyroburicum* ATCC25755 grown in synthetic medium were compared. The results showed that the growth ability of *C. butyricum* NK and SY were strong. *C. tyroburicum* had higher butyric acid, but lower lactic acid-production than *C. butyricum*. Compared among the three different strains of *C. butyricum*, *C. butyricum* NK had a stronger ability to produce butyric acid, with the content of 2.08 g/L in synthetic medium.

Keywords: butyric acid; *Clostridium butyricum*; *Clostridium tyroburicum*; fermentation characteristics; 16S rDNA

丁酸是一种重要的短链脂肪酸, 由结肠益生菌发酵不易消化的糖类产生。据大量的研究^[1-3]发现, 丁酸具有多重生理功能, 可为结肠细胞生长供能, 维持肠道菌群稳态和抑制肠道炎症、癌症发生等。其抑制肿瘤的首要机制是作为一种去乙酰化酶(histone deacetylase)的抑制剂, 主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质结构, 参与多种基因的表达, 从而抑制多种肿瘤细胞生长, 诱导细胞成熟分化, 诱导癌细胞凋亡^[4]。

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)是人体正常的肠道细菌, 革兰氏阳性厌氧菌, 其发酵产物以丁酸和乳酸为主, 副产物还有乙酸、丁醇、淀粉酶、脂肪酶和维生素等^[5]。由于是发酵产物, 丁酸梭菌具有极强的整肠作用, 可用于治疗肠道菌群紊乱、急慢性腹泻、肠易激综合征等, 其微生物制剂已在临床得以广泛应用^[6]。目前发现的丁酸梭菌主要是由多种来源分离纯化而得到的野生型菌株, 如牲畜粪便^[7]、河畔污泥^[8]、朗姆酒发酵液^[9]等。

酪丁酸梭菌(*Clostridium tyroburicum*)是一种典型的产丁酸微生物^[10-11], 属于有机化能异养型专性厌氧菌, 革兰氏阳性芽孢杆菌, 酪丁酸梭菌不能水解明胶、血清蛋白, 可以发酵葡萄糖、蔗糖、果糖和乳糖, 并产生丁酸、乳酸、丙酸和乙酸等短链脂肪酸^[12]。Luo 等^[13]研究了木糖、葡萄糖为碳源时丁酸的产量, 结果发现酪丁酸梭菌更偏好葡萄糖为碳源。Jiang 等^[14]利用纤维床固定化酪丁酸梭菌发酵葡萄糖, 丁酸得率达到 0.46 g/L。

基金项目: 淄博市校城融合计划发展项目(编号: 2017ZBXC004)

作者简介: 王友玲, 女, 山东理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 刘青(1985—), 女, 山东理工大学讲师, 博士。

E-mail: qingliu0906@sdu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-02

丁酸梭菌和酪丁酸梭菌作为产丁酸的代表性菌株,其各自的发酵特性和生物活性已被广泛研究。刘磊等^[15]研究发现丁酸梭菌 CBM01 最佳碳源和最佳氮源分别是葡萄糖和蛋白胨;邢宏观等^[16]采用响应面法对丁酸梭菌生物量的发酵工艺进行优化,优化后菌体数达到 1.01×10^9 个/mL;吴杰等^[17]发现丁酸梭菌对健康大鼠生长没有负面影响,对脂多糖导致的肠道蔗糖酶活性降低起到抑制作用;Liu^[18]利用基因工程技术构建了酪丁酸梭菌磷酸转乙酰酶缺失体,产酸量提高到 0.4 g/g;Song 等^[19]以褐藻为碳源,采用分批发酵和半连续发酵,丁酸产率为 0.252 g/g。由此看来对丁酸梭菌的研究大多集中于加大其生物量及其在动物饲料上的运用,而到目前为止尚未发现对丁酸梭菌和酪丁酸梭菌产丁酸量的比较研究。本研究拟以不同来源的丁酸梭菌和酪丁酸梭菌为出发菌株,比较它们在同一合成培养基中的发酵特性和产酸能力,旨在揭示不同属产丁酸菌的差异,为后期研究产丁酸菌株在代谢途径上的差异提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

Clostridium butyricum NK: 分离于山东理工大学志愿者粪便;

Clostridium butyricum SY: 分离于山东扳倒井股份有限公司酒窖窖泥;

Clostridium butyricum RX: 分离于桓台县马桥镇汇源养牛场鲁西黄牛肠道内容物;

Clostridium tyrobutyricum ATCC25755: 中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 试剂

快捷型提取 DNA 试剂盒: 山东赛恩斯科技有限公司;

葡萄糖: 分析纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司;

丁酸: 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司;

3,5-二硝基水杨酸: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;

二氯甲烷: 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备

离心机: 5038R 型, 德国 Eppendorf 公司;

电泳仪: DYY-6D 型, 北京市六一仪器厂;

pH 计: FE20 型, 梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

紫外分光光度计: UV-2600 型, 日本岛津公司;

气相色谱仪: 6980N 型, 美国安捷伦公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基

(1) 筛选培养基: 葡萄糖 8 g, 胰蛋白胨 10 g, 牛肉膏

3 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH(7.0±0.1), 121 °C 灭菌 20 min。

(2) 种子培养基: 酵母膏 3 g, 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 10 g, 可溶性淀粉 1 g, 葡萄糖 5 g, 氯化钠 3 g, 乙酸钠 3 g, 琼脂 15 g, 刃天青 3 mg, 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0±0.1, 121 °C 灭菌 20 min。

(3) 合成发酵培养基: 葡萄糖 30 g, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, 硫酸铵 3 g, 硫酸镁 0.3 g, 磷酸二氢钾 1 g, 刃天青 3 mg, 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0±0.1, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 菌种的分离纯化 参考文献[8]方法分离纯化菌种, 分别称取 1 g 粪便、窖泥和动物肠道内容物装入 9 mL 无菌无氧的厌氧管中。充分振荡后, 在无氧条件下采用 10 倍梯度稀释法制成为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀释液, 分别取 0.1 mL 涂布在固体筛选培养基, 37 °C 厌氧培养 48 h。培养基长出的单菌落进行镜检, 对符合梭状芽孢杆菌特征的单菌落划线、接种到新鲜固体筛选培养基上, 37 °C 厌氧培养 48 h, 重复上述操作 2 次。获取单菌落种子培养基悬液培养, 分别进行 16S rDNA 基因系列分析, 直到获得丁酸梭菌菌株。

1.2.3 16S rDNA 基因系列分析 按照文献[20]提取细菌基因组 DNA, 对获得的总基因组 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 采用通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTA-CGACTT-3', 扩增条件: 预变性 95 °C 5 min, 变性 95 °C 30 s; 退火 47 °C 2 min; 35 cycle; 72 °C 10 min。将 PCR 扩增片段回收, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果与 NCBI 数据库对比, 绘制发育树, 确定菌株在系统分类学上的归属菌株。

1.2.4 菌株生长特性及发酵培养 将活化的筛选菌株 NK, SY, RX 及酪丁酸梭菌 ATCC25755 菌液按 2% 接种于液体种子培养基中, 于 37 °C 恒温静置培养, 每 2 h 取样 1 次, 在波长 600 nm 处测菌液吸光度值(OD_{600}), 绘制菌株生长曲线。

将活化的菌株 NK, SY, RX 及酪丁酸梭菌 ATCC25755 菌液按 2% 接种于液体种子培养基中, 待其长至对数生长期以 3% 的接种量接种于 200 mL 合成发酵培养基, 37 °C 静置培养。发酵过程中定时取样测定菌体生物量、发酵液中还原糖含量、以及乳酸、丁酸的含量。

1.3 发酵特性指标测定

1.3.1 生物量 采用分光光度法测定发酵液在 600 nm 处的吸光值。

1.3.2 pH 值 采用 pH 计测定。

1.3.3 还原糖 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[21]。

1.3.4 丁酸和乳酸 采用气相色谱分析^[22], 发酵液经离

心后取上清液 2 mL 于提取瓶中,加入 12.5% 的硫酸—甲醇溶液 1 mL,混匀,60 °C 水浴加热 6 h,自然冷却至室温,加入 2 mL 二氯甲烷,充分振荡使其混匀,静置分层后,取下层溶液转移到新的提取瓶中,重复萃取 3 次。合并萃取液并加入饱和 NaCl 溶液 1.5 mL 洗涤,4 000 r/min 离心 5 min 后,取下层溶液进行气相分析。气相分析条件: FID 检测器, DB-FFAP 毛细管柱 (60 m × 0.32 mm × 0.25 μm), 进样口温度 260 °C, 检测器温度 250 °C。升温程序为 100 °C 保持 1 min,再以 3 °C/min 升温至 160 °C, 然后以 10 °C/min 升温至 240 °C,并保持 5 min;进样量为 1 μL,载气为氮气。

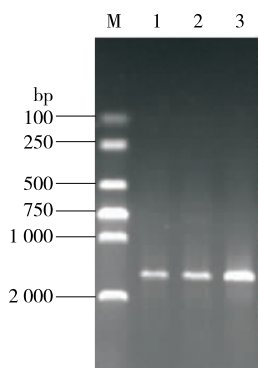
分别配制不同浓度的标准溶液,按上述处理后作标准曲线。

1.3.5 数据处理 所有试验均重复 3 次取平均值。采用 Excel 2003 对试验数据进行分析,采用 Origin 7.5 作图。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 基因序列分析

2.1.1 菌株 NK、SY、RX 16S rDNA 基因片段 PCR 产物扩增 16S rDNA 是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 系列,在结构与功能上具有高度保守性,而且大小在 1.5 kb 左右,容易利用 PCR 技术得到其序列。由图 1 可以看出,菌株 NK、SY、RX 的 PCR 扩增产物大小在 1.5 kb 左右,说明是其 16S rDNA 扩增产物。



1. 菌株 NK 2. 菌株 SY 3. 菌株 RX

图 1 菌株 NK、SY、RX 的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 PCR electropherogram of strain NK SY and RX

2.1.2 菌株 NK、SY、RX 16S rDNA 基因序列及进化发育树 经测定,菌株 NK、SY、RX 的 16S rDNA 基因序列长度分别为 1 415, 1 416, 1 412 bp。使用 DNASTAR 分析 3 株菌株的 A、G、T 和 C 比例如图 2 所示,其 A+T 所占比例分别为 47.70%, 47.74%, 47.66%, 因它们是同一属种,所以相似度很高。酪丁酸梭菌 ATCC25755 菌种的 A+T 所占比例为 47.46%,与以上菌株相比,有较大差异。

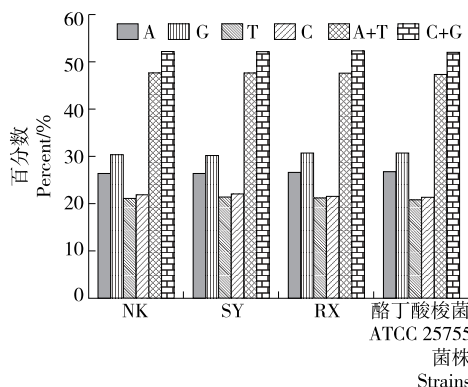


图 2 菌株 NK、SY、RX、酪丁酸梭菌 ATCC 25755 16S rDNA 基因序列 A、G、C、T 各自比例

Figure 2 A, G, C and T ratio of 16S rDNA sequence in strain NK SY RX and *Clostridium tyrobutyricum* ATCC25755

菌株 NK、SY、RX 16S rDNA 核苷酸序列在 National Center Biotechnology Information 使用 BLASTN 程序进行比对。结果显示菌株 NK、SY、RX 16S rDNA 核苷酸序列分别和 *Clostridium butyricum* W4, *Clostridium butyricum* B1, *Clostridium butyricum* DSM2477 的核苷酸序列同源率为 99%。用 MEGA 软件构建系统发育树见图 3, 菌株 NK、SY、RX 在 *Clostridium* 属发育树一个分支上,与 *Clostridium butyricum* 种的菌种在一个类群内而与其他种处于不同的分支上,所以把它们分别命名为 *Clostridium butyricum* NK、*Clostridium butyricum* SY、*Clostridium butyricum* RX。

2.1.3 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌的生长曲线 如图 4 可见,各菌株在种子培养基中生长良好,丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 SY 的对数生长期为 4~12 h,所以确定种子菌液接入发酵培养基的时间点为 8 h,同理,丁酸梭菌 RX 和酪丁酸梭菌 ATCC25755 菌液接入时间点确定为 12 h。

2.2 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基中的发酵特性比较

2.2.1 生物量的变化 随发酵进行,菌体生物量变化如图 5 所示。丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 SY 具有良好的生长性能,生长速率较丁酸梭菌 RX 和酪丁酸梭菌 ATCC25755 大,在 0~16 h 内迅速达到生长稳定期,OD₆₀₀ 分别为 7.09 和 6.44。而丁酸梭菌 RX 和酪丁酸梭菌 ATCC25755 生长速率较小,在 16 h 时仅分别为 3.80 和 3.16,并且稳定期菌体细胞浓度也比丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 SY 低。

2.2.2 还原糖的变化 碳源作为微生物生长不可或缺的能量来源之一,丁酸梭菌和酪丁酸梭菌所能够利用的碳源以葡萄糖为最佳,所以在合成发酵培养基中,以葡萄糖

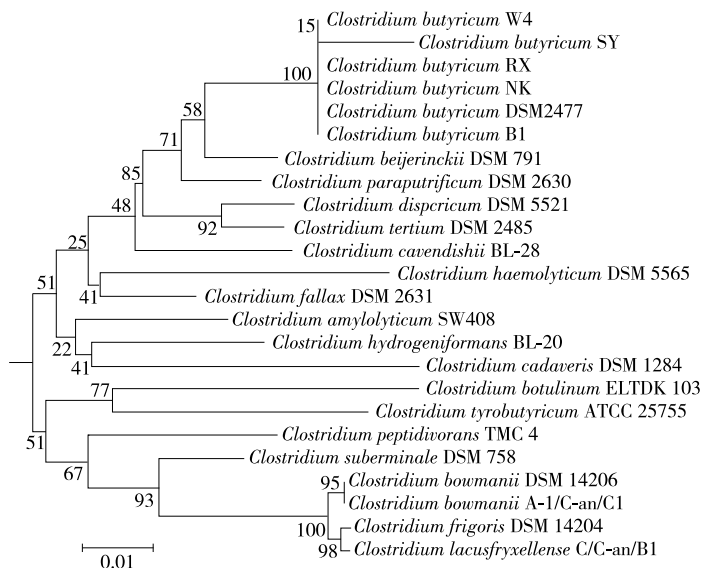


图 3 菌株 NK、SY、RX 基于 16S rDNA 基因发育树

Figure 3 16S rDNA gene-based phylogenetic tree of strain NK SY RX

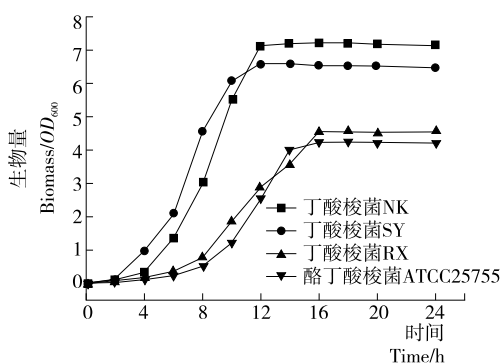


图 4 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌的生长曲线

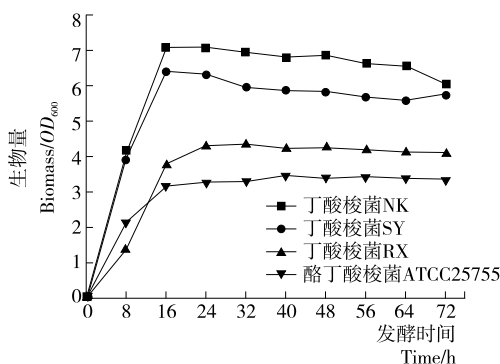
Figure 4 Growth curve of *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*

图 5 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基发酵的生物量变化

Figure 5 Biomass changes in the synthetic medium during fermentation of *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*

为碳源。如图 6 所示:发酵结束后,4 株菌种均有葡萄糖剩余,其中丁酸梭菌 NK、丁酸梭菌 SY 和丁酸梭菌 RX 在 32 h 时葡萄糖残留值相当,分别为 20.02, 19.26, 20.56 g/L,此后剩余葡萄糖变化不大,说明发酵趋于停止。在相同的发酵条件下,酪丁酸梭菌比每一株丁酸梭菌产丁酸量都要多,所以酪丁酸梭菌 ATCC25755 较 3 株丁酸梭菌而言,剩余葡萄糖较少,为 14.35 g/L。4 株菌种均有葡萄糖残留的原因是随着发酵进行酸的产生,导致 pH 下降,pH 下降到一定程度,进入衰亡期,细胞代谢能力减弱。这与 Fu 等^[23]的研究结果趋势是一致的。

2.2.3 pH 的变化 pH 对微生物生长具有显著影响,一般细菌的生长最适 pH 值为 7 左右,所以发酵培养基的初始 pH 设为 7。接入种子培养液之后,丁酸梭菌 NK、丁酸

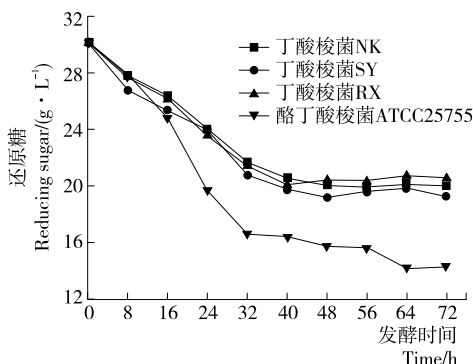


图 6 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基发酵的还原糖变化

Figure 6 Changes of reducible carbohydrate in the synthetic medium during fermentation of *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*

梭菌 SY、丁酸梭菌 RX 和酪丁酸梭菌 ATCC25755 的初始 pH 分别为 6.30, 6.17, 6.25, 6.23。随着发酵时间的延长, 由于上述菌株均是以产丁酸为主的菌株, 发酵液的 pH 呈逐渐降低趋势。3 株不同的丁酸梭菌虽然来源不同, 但是对酸的耐受度却相差不大, 32 h 细胞生物量基本上达到最大值, 还原糖也不再消耗(图 7), 此时丁酸梭菌 NK、丁酸梭菌 SY 和丁酸梭菌 RX 的 pH 分别为 4.22, 4.29, 4.24。与 3 株丁酸梭菌相比较, 酪丁酸梭菌对酸的耐受力较强, 发酵结束后, 发酵液的 pH 值为 3.85。

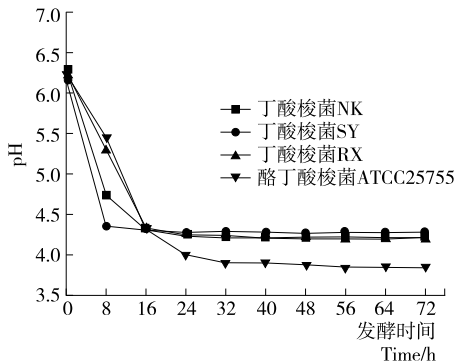


图 7 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基发酵的 pH 变化

Figure 7 Changes of pH in the synthetic medium during fermentation of *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*

2.2.4 产酸量的变化 不同菌株对原料的利用率及产酸能力不同。菌株利用葡萄糖发酵的产酸量变化如图 8 所示。由图 8 可知, 菌株丁酸梭菌 NK、丁酸梭菌 SY 及丁酸梭菌 RX 的丁酸产量变化趋势相同, 前 8 h 丁酸产量缓慢增长, 8~24 h 持续快速增长。据孔青^[24]研究, 丁酸梭菌产物形成与菌体生长的关系为非生长偶联性, 菌株在细胞生长进入稳定期才开始产生大量丁酸。到后期, 丁酸梭菌菌株由于 pH 的胁迫和细胞衰亡等原因, 产丁酸速率减缓。比较丁酸最后的积累量发现, 丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 RX 产丁酸能力差异不大, 分别为 2.07, 1.97 g/L, 得率(丁酸产量/葡萄糖消耗量)分别为 0.23, 0.21 g/g, 丁酸梭菌 SY 稍低于二者, 产丁酸量为 1.66 g/L, 得率为 0.17 g/g。酪丁酸梭菌 ATCC25755 产丁酸能力很强, 8~48 h 时产丁酸量保持快速增长, 最终达到 6.47 g/L, 得率为 0.41 g/g。Luo 等^[18]研究发现在初始葡萄糖浓度为 75 g/L 时, 酪丁酸梭菌 ATCC25755 发酵产丁酸得率为 0.36 g/g。

除丁酸外, 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌发酵产物还有乳酸^[25], 由乳酸脱氢酶催化丙酮酸而得到。如图 9 所示, 丁酸梭菌 NK、丁酸梭菌 SY 和丁酸梭菌 RX 发酵葡萄糖的乳酸产量变化趋势相同, 前 8 h 快速增长, 32 h 后基本达到稳定, 产量分别为 0.44, 0.37, 0.41 g/L。酪丁酸梭菌

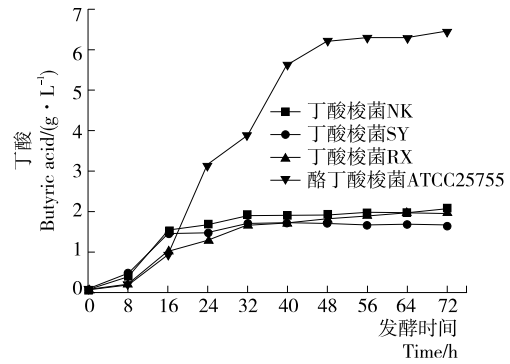


图 8 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基发酵的产丁酸量变化

Figure 8 Changes of butyric acid production in *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum* during fermentation on synthetic medium

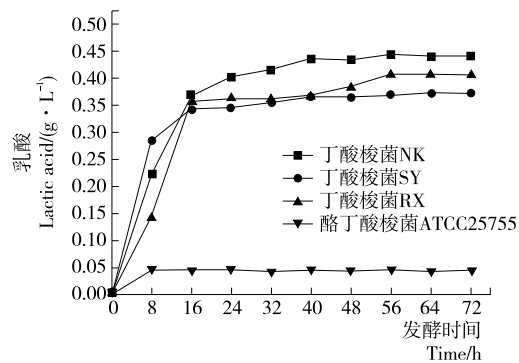


图 9 丁酸梭菌和酪丁酸梭菌在合成培养基发酵的产乳酸量变化

Figure 9 Changes of lactic acid production in the synthetic medium during fermentation of *Clostridium butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum*

ATCC25755 利用葡萄糖发酵产乳酸量较少, 仅为 0.046 g/L, 这是因为在其细胞代谢流向中, 碳作为分子骨架偏向于合成丁酸。

3 结论

本研究从人粪便、窖泥和动物肠道内容物分离筛选出 3 株梭状芽孢杆菌, 并通过 16S rDNA 核苷酸序列鉴定均为丁酸梭菌, 分别命名为 *Clostridium butyricum* NK、*Clostridium butyricum* SY、*Clostridium butyricum* RX。3 株丁酸梭菌具有不同的发酵特性, 在合成培养基中, 丁酸梭菌 NK 和丁酸梭菌 RX 的产酸能力优于丁酸梭菌 SY。另外, 丁酸梭菌与酪丁酸梭菌相比较, 由于种属的差别, 发酵特性差异显著。酪丁酸梭菌产丁酸能力优于丁酸梭菌。然而, 丁酸梭菌的生长能力和产乳酸能力高于酪丁酸梭菌。通过以上不同种和同种不同株的比较, 为研究其代谢途径差异提供基础, 有望进一步从代谢关键

点出发,进行基因改造,从而构建出优良的适合工业生产的基因工程菌。

参考文献

- [1] 卢忆, 张晓阳, 马艳莉, 等. 丁酸的生理功能研究进展[J]. 中国食物与营养, 2013, 19(2): 59-62.
- [2] VIEIRA E L, LEONEL A J, SAD A P, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(5): 430-436.
- [3] XIONG Fen, MOU Yun-zhu, XIANG Xiao-yan. Inhibition of mouse B16 melanoma by sodium butyrate correlated to tumor associated macrophages differentiation suppression[J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine, 2015, 8(3): 4 170.
- [4] 崔路佳, 高善玲, 裴风华. 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(14): 1 744-1 746.
- [5] 熊祖明, 袁杰利. 酪酸梭菌的研究与应用进展[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(12): 1 143-1 145.
- [6] 王腾浩. 新型丁酸梭菌筛选及其对断奶仔猪生长性能和肠道功能影响的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 7-8.
- [7] 迟雪. 一株丁酸梭菌的分离及其发酵纤维素产酸影响因素研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013: 9-12.
- [8] 夏会丽, 陈思思, 陈雄, 等. 丁酸梭菌的鉴定与发酵培养基配方优化[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 56-62.
- [9] 樊晓璐, 张苇莉, 吴幼茹, 等. 丁酸梭菌的分离、鉴定与基本特性研究[J]. 酿酒科技, 2017(11): 31-37.
- [10] SONG H H, MOONHO E, SIRA L, et al. Modeling of batch experimental kinetics and application to fed-batch fermentation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 53(1): 71-76.
- [11] 江凌. 纤维床固定化酪丁酸梭菌发酵廉价生物质生产丁酸的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 14-16.
- [12] 王彬. 酪丁酸梭菌微胶囊制备工艺及其体外性能评价研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 7-8.
- [13] LUO Guang-hong, ZHANG Ling, CHEN Tian-ren, et al. Butyric acid fermentation in xylose and glucose by *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Bioresources, 2017, 12(2): 2 930-2 940.
- [14] JIANG Ling, WANG Ju-fang, LIANG Shi-zhong, et al. Production of butyric acid from glucose and xylose with immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2010, 160(2): 350.
- [15] 刘磊, 田亚男, 倪学勤, 等. 丁酸梭菌 CBM01 的碳、氮源优化及其对胃肠道耐受性的研究[J]. 动物营养学报, 2017(10): 3 831-3 836.
- [16] 邢宏观, 林建国, 钟雪兆, 等. 响应面法优化丁酸梭菌发酵培养工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 237-243.
- [17] 吴杰, 邓波, 李孝辉, 等. 丁酸梭菌抑制脂多糖致急性应激大鼠肠道损伤的效果研究[J]. 动物营养学报, 2018(4): 1 530-1 537.
- [18] LIU Xiao-guang, ZHU Ying, YANG Shang-tian. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(3/4): 521-528.
- [19] SONG J H, VENTURA J R S, LEE C H, et al. Butyric acid production from brown algae using *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(1): 42-49.
- [20] 王兴洁, 魏超, 廖光敏, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(7): 40-44.
- [21] 张学英, 黄忠意, 章发盛, 等. 两种检测还原糖方法的比较[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 66-69.
- [22] 谢文明, KO Kwang-yong, LEE Kyu-seung. 土壤和白菜中低分子量有机酸的气相色谱分析[J]. 岩矿测试, 2009, 28(2): 97-100.
- [23] FU Hong-xin, YANG Shang-tian, WANG Ming-qi, et al. Butyric acid production from lignocellulosic biomass hydrolysates by engineered *Clostridium tyrobutyricum* overexpressing xylose catabolism genes for glucose and xylose co-utilization [J]. Bioresource Technology, 2017, 234: 389-396.
- [24] 孔青. 丁酸梭菌培养与发酵动力学以及调节腹泻小鼠肠道菌群平衡的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006: 45-47.
- [25] JO J H, KIM W. Carbon material distribution and flux analysis under varying glucose concentrations in hydrogen-producing *Clostridium tyrobutyricum* JM1[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 228: 103-106.