

# 丁酸梭菌发酵培养基的优化及发酵产物对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的降解

刘亚妹, 丛丽娜, 陈明\*

大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

刘亚妹, 丛丽娜, 陈明. 丁酸梭菌发酵培养基的优化及发酵产物对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的降解[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4533-4543.

LIU Yamei, CONG Lina, CHEN Ming. Fermentation medium optimization of *Clostridium butyricum* and degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by fermentation products[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4533-4543.

**摘要:**【背景】丁酸梭菌是专性厌氧的新一代芽孢益生菌, 耐热、耐酸、抗逆性强, 极具应用价值和开发前景。【目的】优化丁酸梭菌发酵培养基并初步研究其发酵液对黄曲霉菌的抑制作用和降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 的能力。【方法】利用响应面法对发酵培养基进行优化, 采用牛津杯法对丁酸梭菌发酵液抑制黄曲霉菌生长进行研究, 并通过酶联免疫法测定发酵液对 AFB<sub>1</sub> 的降解能力。【结果】优化后的发酵培养基为: 葡萄糖 18.1 g/L, 大豆蛋白胨 29.7 g/L, 磷酸氢二钾 3.8 g/L, 氯化钠 2.0 g/L, 乙酸钠 4.0 g/L, 结晶硫酸镁 1.2 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 0.3 g/L。优化后的丁酸梭菌生物量由  $8.99 \times 10^8$  个/mL 提高至  $2.28 \times 10^9$  个/mL, 是优化前的 2.54 倍。丁酸梭菌发酵液对致病真菌黄曲霉菌的抑菌效果十分显著, 其上清液经浓缩后对 AFB<sub>1</sub> 降解 72 h 的降解率达到 68.65%, 初步分析表明上清液中对 AFB<sub>1</sub> 具有脱毒作用的活性组分为丁酸梭菌分泌产生的胞外酶。【结论】本研究通过发酵培养基优化明显提高了丁酸梭菌的生物量, 并将其应用于抑制黄曲霉菌的生长与降解 AFB<sub>1</sub>, 为丁酸梭菌的规模化生产及其微生态制剂的开发应用提供了科学依据。

**关键词:** 丁酸梭菌; 培养基优化; 生物量; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; 降解

资助项目: 辽宁省教育厅高校基本科研项目(LJKZZ20220060)

This work was supported by the Scientific Research Fund Project of Education Department of Liaoning Province (LJKZZ20220060).

\*Corresponding author. E-mail: chenming@dlpu.edu.cn

Received: 2023-02-09; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-04-26

## Fermentation medium optimization of *Clostridium butyricum* and degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by fermentation products

LIU Yamei, CONG Lina, CHEN Ming\*

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] *Clostridium butyricum* is a new generation of obligate anaerobic spore-producing probiotics with strong tolerance to heat, acid, and stress, demonstrating a great application value and development prospect. [Objective] To optimize the fermentation medium of *C. butyricum* and study the activities of the fermentation broth in terms of inhibiting *Aspergillus flavus* and degrading aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). [Methods] Response surface methodology was employed to optimize the fermentation medium. The oxford cup assay was employed to examine the inhibitory activity of *C. butyricum* fermentation broth on *A. flavus* and enzyme-linked immunosorbent assay to determine the AFB<sub>1</sub>-degrading ability of the fermentation broth. [Results] The optimized fermentation medium was composed of 18.1 g/L glucose, 29.7 g/L soya peptone, 3.8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2.0 g/L NaCl, 4.0 g/L NaAc, 1.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.3 g/L L-cystine hydrochloride. After optimization, the biomass of *C. butyricum* reached 2.28×10<sup>9</sup> cells/mL, which was 2.54 times of that (8.99×10<sup>8</sup> cells/mL) before optimization. The fermentation broth of *C. butyricum* exerted a significant inhibitory effect on *A. flavus*, and the concentrated supernatant degraded 68.65% of AFB<sub>1</sub> within 72 h. The results indicated that the active components degrading AFB<sub>1</sub> in the supernatant were the extracellular enzymes produced by *C. butyricum*. [Conclusion] The biomass of *C. butyricum* was significantly increased by fermentation medium optimization, and the fermentation broth of *C. butyricum* inhibited *A. flavus* and degraded AFB<sub>1</sub>. The findings provide scientific evidence for the industrial production of *C. butyricum* and the development and application of microecological preparations.

**Keywords:** *Clostridium butyricum*; medium optimization; biomass; aflatoxin B<sub>1</sub>; degradation

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)是一种严格厌氧菌,菌体呈直杆或微弯状,生长过程中产酸产气,属于革兰氏阳性芽孢杆菌<sup>[1-2]</sup>。丁酸梭菌是当前研究的热门厌氧芽孢杆菌益生菌,主要存在于人体和动物肠道,具有耐热、耐酸、抗逆性强等优良特性<sup>[3]</sup>。丁酸梭菌在肠道内能够利用未消化的膳食纤维并产生丁酸和乙酸等短链脂肪酸<sup>[4]</sup>,为肠道细胞正常生长提供必需的营养物质;并能通过调节机体的免疫通路改善胃肠屏障功能,从而增强机体的免疫

力<sup>[5]</sup>。丁酸梭菌作为严格厌氧菌,在工业生产中主要存在着菌体浓度偏低的问题<sup>[6]</sup>,亟待提高其发酵生物量水平。

黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉等丝状真菌产生的一类次级代谢产物,具有致癌性、致畸性和致突变性,其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)确认为 I 类强致癌物质,是黄曲霉毒素中毒性最强、危害最大的一种毒素,可通过污染玉米、花生等农

产品和动物饲料被人和动物吸收<sup>[7-8]</sup>。目前在降解黄曲霉毒素的主要方法中, 物理脱毒法和化学脱毒法在脱除黄曲霉毒素时容易存在反应条件苛刻、吸附部分营养因子、脱毒效果差和成本高等问题, 生物脱毒法因其反应条件温和、高效和成本低的特点受到广泛关注<sup>[9]</sup>。

已报道的具有降解 AFB<sub>1</sub> 能力的芽孢杆菌大多为好氧菌或兼性厌氧菌, 例如枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌<sup>[10]</sup>等, 有关专性厌氧菌降解黄曲霉毒素的研究报道极少。本研究首先对丁酸梭菌的发酵培养基进行优化, 提高其发酵过程中的生物量水平, 进而对该菌株发酵液的抑制黄曲霉活性及对 AFB<sub>1</sub> 的降解能力进行研究, 以期为丁酸梭菌的规模化生产及降解 AFB<sub>1</sub> 的应用提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

丁酸梭菌(*C. butyricum*) CICC 23847, 中国工业微生物菌种保藏中心; 黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)由本实验室保藏。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

L-半胱氨酸盐酸盐, 北京索莱宝科技有限公司; 乙酸钠、可溶性淀粉、结晶硫酸镁, 天津市大茂化学试剂厂; 牛肉膏、蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒, 深圳市易瑞生物技术股份有限公司。

UV1000 紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司; C-32 密封罐、C-35 厌氧产气袋, 三菱瓦斯化学株式会社; 酶标仪, Molecular Devices 公司。

#### 1.1.3 培养基

种子培养基(g/L): 牛肉膏 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 3.0, 可溶性淀粉 1.0, 葡萄糖 5.0, 乙酸钠 3.0, 氯化钠 5.0, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, 琼脂粉 17.0 (固体培养基时用), pH 6.8。

基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 大豆蛋白胨 25.0, 磷酸氢二钾 3.0, 氯化钠 2.0, 乙酸钠 4.0, 结晶硫酸镁 1.2, L-半胱氨酸盐酸盐 0.3, pH 6.5。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 17.0, pH 自然。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 种子液制备

取-80 °C甘油管保藏的丁酸梭菌 200 μL 接种于装有 10 mL 种子培养基的试管中, 37 °C 静置厌氧培养 12 h, 作为一级种子液, 将其按 2% (体积分数)接种量接入含有 80 mL 种子培养基的 100 mL 的厌氧瓶中, 37 °C 进行静置扩大培养 12 h。

#### 1.2.2 发酵培养

制备好的种子液按照 4% (体积分数)的接种量转接入含有 200 mL 基础发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C 静置厌氧培养 24 h。

#### 1.2.3 发酵培养基的优化

以菌液的 OD<sub>600</sub> 为指标, 通过 Minitab19 数据分析软件首先对基础发酵培养基中组成的 7 个因素进行 Plackett-Burman 试验设计, 快速筛选出对丁酸梭菌生物量影响最显著的因素和最优水平范围, 然后通过最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验设计对影响显著的因素进行响应面优化。

#### 1.2.4 丁酸梭菌发酵液对黄曲霉菌的抑制效果

将丁酸梭菌以 4% (体积分数)的接种量接种至优化后的发酵培养基, 37 °C 静置培养 48 h, 室温下 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用牛津杯法测定其对黄曲霉的抑菌活性。将实验室保存的黄曲霉菌划线接种至 PDA 培养

基, 37 °C培养 4–5 d, 用无菌生理盐水将孢子洗下, 制得孢子悬液备用。首先取 100  $\mu$ L 孢子悬液涂布于 PDA 平板, 将灭菌后的牛津杯置于平板中, 向牛津杯中加入丁酸梭菌发酵浓缩液 200  $\mu$ L, 37 °C培养 36 h, 测量抑菌圈直径。

将 12 g 玉米粉接入 5 mL 未接菌发酵培养基与 1 mL 黄曲霉孢子悬液作为感染组, 将 12 g 玉米粉接入 5 mL 发酵液与 1 mL 黄曲霉孢子悬液作为试验组, 将 12 g 玉米粉接入 5 mL 未接菌发酵培养基与 1 mL 发酵液为对照组, 37 °C 避光培养 48 h, 观察丁酸梭菌发酵液对黄曲霉的抑菌效果。

### 1.2.5 发酵液降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

将丁酸梭菌以 4% (体积分数)的接种量接种于发酵培养基, 37 °C静置培养, 取培养不同时间(12、24、36 和 48 h)的发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 经 0.22  $\mu$ m 膜过滤除菌, 经真空浓缩仪浓缩得发酵浓缩液。取 900  $\mu$ L 浓缩液, 加入 100  $\mu$ L 400 ng/mL AFB<sub>1</sub> 30 °C避光静置反应不同时间(6、12、24、48、60 和 72 h)后取样, 通过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒测定 AFB<sub>1</sub> 含量。以发酵培养基为对照(含 400 ng/mL AFB<sub>1</sub>), 计算 AFB<sub>1</sub> 降解率的公式为:

$$\text{AFB}_1 \text{ 降解率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{试验组 AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{对照组 AFB}_1 \text{ 含量}} \right) \times 100 \quad (1)$$

### 1.2.6 发酵液中降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的活性组分存在部位检测

分别测定丁酸梭菌发酵液、上清液、菌体细胞降解 AFB<sub>1</sub> 的能力<sup>[11]</sup>。将丁酸梭菌按照 4% 的接种量接种于发酵培养基, 37 °C静置厌氧培养 24 h, 取 1 mL 发酵液于室温 10 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和菌体, 上清液经 0.22  $\mu$ m 膜过滤除菌, 备用; 菌体用 PBS (50 mmol/L, pH 7.0)洗涤后再于室温 10 000 r/min

离心 10 min, 离心后的菌体中加入 1 mL PBS 重悬, 备用。分别向上述发酵液、上清液、菌体悬液中添加 400 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub> 至终浓度为 40 ng/mL, 30 °C避光静置反应 72 h, 通过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒测定 AFB<sub>1</sub> 含量, 以发酵培养基为对照(含 400 ng/mL AFB<sub>1</sub>), 按照公式(1)计算 AFB<sub>1</sub> 降解率。

### 1.2.7 发酵液上清经不同处理后对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 降解率的影响

按照文献[12]中所述方法, 检测发酵液上清分别经加热、蛋白酶 K、SDS 和蛋白酶 K+SDS 这 4 种处理后对 AFB<sub>1</sub> 的降解能力。将上清液分为等体积的 4 组, 其中组 1 为沸水浴处理 10 min, 组 2、3 和 4 分别用 1 mg/mL 蛋白酶 K、1% SDS、1 mg/mL 蛋白酶 K+1% SDS 在 37 °C处理 6 h, 然后每组分别加入 400 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub> 至终浓度为 40 ng/mL, 30 °C避光静置反应 72 h, 通过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒测定 AFB<sub>1</sub> 含量, 以未处理的发酵液上清为对照(含 400 ng/mL AFB<sub>1</sub>), 按照公式(1)计算 AFB<sub>1</sub> 降解率。

### 1.2.8 数据分析

试验数据利用 Minitab19、Origin2021 与 SPSS 25 软件进行统计分析和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 响应面试验设计

Plackett-Burman 试验设计是一种利用一阶多项式方程一次快速有效地从多个变量中筛选出最重要因素的设计方法<sup>[13]</sup>。以菌体浓度 OD<sub>600</sub> 为响应值, 首先利用 Plackett-Burman 试验设计从葡萄糖(X<sub>1</sub>)、大豆蛋白胨(X<sub>2</sub>)、氯化钠(X<sub>3</sub>)、磷酸氢二钾(X<sub>4</sub>)、结晶硫酸镁(X<sub>5</sub>)、乙酸钠(X<sub>6</sub>) 和 L-半胱氨酸盐酸盐(X<sub>7</sub>)这 7 个因素中筛选出大豆蛋白胨、葡萄糖和磷酸氢二钾这 3 个对丁酸梭

菌生长具有显著性影响的因素( $P<0.05$ ), 且对丁酸梭菌的生长影响均为正效应( $t>0$ )。随后选取这 3 个因素进行最陡爬坡试验, 以  $OD_{600}$  最高的一组数据作为响应面试验的中心点。利用 Box-Behnken 试验设计进行三因素三水平的响应面分析。各因素水平设计见表 1。

## 2.2 响应面试验结果分析

借助 Minitab19 软件对表 2 中的数据进行分析, 建立二次响应面回归模型, 进而求解最优响应因子水平。试验数据拟合所得二次多项式回归方程为:

$$Y = 4.9867 + 0.0450X_1 - 0.1500X_2 + 0.1425X_4 - 0.2596X_1^2 - 0.1846X_2^2 - 0.6296X_4^2 - 0.1725X_1X_2 + 0.0075X_1X_4 - 0.1625X_2X_4$$

式中,  $Y$  为发酵液的  $OD_{600}$ 。基于上述方程绘制响应面的等高线图与曲面图, 等高线图呈椭圆形, 表明因素间交互作用显著, 等高线图呈圆形或略呈椭圆形, 则表明因素间交互作用不显著。由表 3 响应面方差分析显示模型显著( $P<0.05$ ), 且失拟项  $P=0.418>0.05$ , 说明失拟项不显著, 决定系数  $R^2=0.9973$  表明该模型对试验有很好的拟合性。 $X_1X_4$  的  $P$  值远大于 0.05, 说明葡萄糖与磷酸氢二钾的交互作用不显著, 其等高线图略呈椭圆形(图 1)。其他二次项的  $P$  值均小于 0.05, 说明这些因素间的交互作用显著, 会对发酵过程中菌株的生物量水平影响较大。

利用 Minitab19 软件分析得模型极值:  $X_1=0.2727$ 、 $X_2=-0.5758$ 、 $X_4=0.1717$ , 即葡萄糖为 18.1 g/L、大豆蛋白胨为 29.7 g/L、磷酸氢二钾为 3.8 g/L。保持基础发酵培养基中其他因素不变, 在此优化培养基的基础上进行验证试验, 培养 24 h 后菌液的  $OD_{600}$  为 5.10, 模型预测的最大响应  $OD_{600}$  为 5.04, 误差小于 5%。说明此回归方程可以应用于丁酸梭菌发酵生物量结果的预测。

表 1 Box-Behnken 设计试验因素及水平

Table 1 The factors and levels of Box-Behnken design

Coding	Factors	Levels (g/L)		
		-1	0	1
$X_1$	Glucose	13.0	17.0	21.0
$X_2$	Soya peptone	28.0	32.0	36.0
$X_4$	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	3.3	3.7	4.1

表 2 Box-Behnken 试验设计结果

Table 2 Results of Box-Behnken design

No.	$X_1$	$X_2$	$X_4$	$OD_{600}$
1	-1	-1	0	4.50
2	1	-1	0	4.89
3	-1	1	0	4.54
4	1	1	0	4.24
5	-1	0	-1	3.89
6	1	0	-1	4.01
7	-1	0	1	4.17
8	1	0	1	4.32
9	0	-1	-1	4.02
10	0	1	-1	4.05
11	0	-1	1	4.62
12	0	1	1	4.00
13	0	0	0	4.98
14	0	0	0	5.02
15	0	0	0	4.96

## 2.3 响应面优化后的生物量和总酸产量

将丁酸梭菌同时接种到基础发酵培养基与响应面优化后的发酵培养基培养 24 h 后, 用血球计数法计数, 基础发酵培养基中丁酸梭菌生物量(按细胞数计)为  $8.99 \times 10^8$  个/mL, 优化后的发酵培养基中丁酸梭菌生物量为  $2.28 \times 10^9$  个/mL, 是优化前的 2.54 倍。优化后发酵液中总产酸量为 96 mmol/L, 优化前发酵液中总产酸量为 86 mmol/L, 提高了 1.12 倍。

## 2.4 丁酸梭菌发酵液对黄曲霉的抑制效果

黄曲霉是丝状真菌中最常见的产生超强致癌毒素的致病真菌。本研究利用牛津杯法初步探索了丁酸梭菌发酵液对黄曲霉菌生长的影响。结果表明, 浓缩 5 倍后的丁酸梭菌发酵液

表3 响应面设计方差分析结果

Table 3 ANOVA for response surface design

Source	Degrees of freedom	Adjustment sum of squares	Adjustment mean square	F value	P value
Model	9	2.267 39	0.251 93	204.27	0.000
$X_1$	1	0.016 20	0.016 20	13.14	0.015
$X_2$	1	0.180 00	0.180 00	145.95	0.000
$X_4$	1	0.162 45	0.162 45	131.72	0.000
$X_1^2$	1	0.248 80	0.248 80	201.73	0.000
$X_2^2$	1	0.125 80	0.125 80	102.00	0.000
$X_4^2$	1	1.463 54	1.463 54	1 186.65	0.000
$X_1X_2$	1	0.119 02	0.119 02	96.51	0.000
$X_1X_4$	1	0.000 23	0.000 23	0.18	0.687
$X_2X_4$	1	0.105 63	0.105 63	85.64	0.000
Residual	5	0.006 17	0.001 23		
Lack of fit	3	0.004 30	0.001 43	1.54	0.418
Pure error	2	0.001 87	0.000 93		
Total	14	2.273 56			

$R^2=0.997\ 3$ , Adj  $R^2=0.992\ 4$

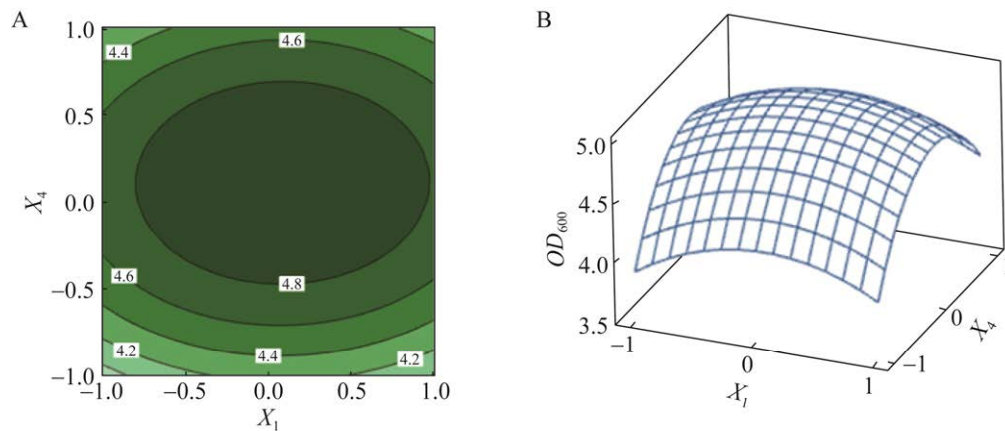


图1 磷酸氢二钾与葡萄糖的交互作用对丁酸梭菌生长影响的等高线图(A)和曲面图(B)

Figure 1 Contour (A) and surface plots (B) for interaction effects of  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  ( $X_4$ ) and glucose ( $X_1$ ) on the growth of *Clostridium butyricum*.

对黄曲霉菌有十分显著的抑菌效果(图2), 抑菌圈直径可达30 mm。进一步研究了丁酸梭菌发酵液对玉米粉中侵染黄曲霉菌的抑制作用。当共培养48 h后, 同时接种了发酵液与黄曲霉孢子悬液的试验组与接入了发酵培养基和发酵液的对照组中均未见黄曲霉菌生长, 而同时接种了发酵培养基与黄曲霉孢子悬液的感染组中黄

曲霉菌生长旺盛(图3), 表明丁酸梭菌发酵液可有效抑制玉米粉中侵染的黄曲霉菌生长。

## 2.5 丁酸梭菌发酵液对黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的降解作用

首先测定了不同培养时间的发酵浓缩液对AFB<sub>1</sub>的降解能力, 由图4可以看出, 发酵培养12 h的发酵浓缩液对AFB<sub>1</sub>降解率最低, 仅为



图 2 丁酸梭菌发酵液对黄曲霉菌的抑制作用

Figure 2 Inhibition effect of *Clostridium butyricum* fermentation broth on *Aspergillus flavus*.

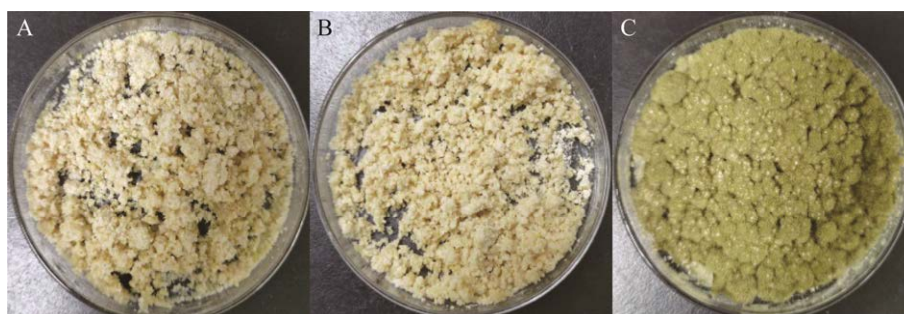


图 3 丁酸梭菌发酵液对玉米粉防止黄曲霉菌侵染的作用 A: 对照组. B: 试验组. C: 感染组

Figure 3 Effect of *Clostridium butyricum* fermentation broth on preventing *Aspergillus flavus* infection of corn meal. A: Control group. B: Experimental group. C: Infected group.

42.35%; 而发酵培养 24、36 和 48 h 的浓缩液对毒素降解率基本相同。推测丁酸梭菌发酵液中降解 AFB<sub>1</sub> 的活性组分在菌体培养 12 h 时含量较低, 培养时间超出 24 h 后活性组分含量变化不大。以发酵培养 24 h 的发酵上清液为例, 测定不同反应时间时发酵浓缩液对 AFB<sub>1</sub> 的降解能力, 由图 5 可以看出, 随着反应时间的增加, 发酵浓缩液对 AFB<sub>1</sub> 的降解率逐步增大, 0–24 h 降解率增加得较快, 24–72 h 降解率增加缓慢, 72 h 发酵浓缩液对 AFB<sub>1</sub> 降解率可达 68.65%, 72 h 后随着反应时间的增加, 发酵浓缩液对 AFB<sub>1</sub> 的降解率基本不变, 说明丁酸梭菌发酵浓缩液对 AFB<sub>1</sub> 降解效果较好。

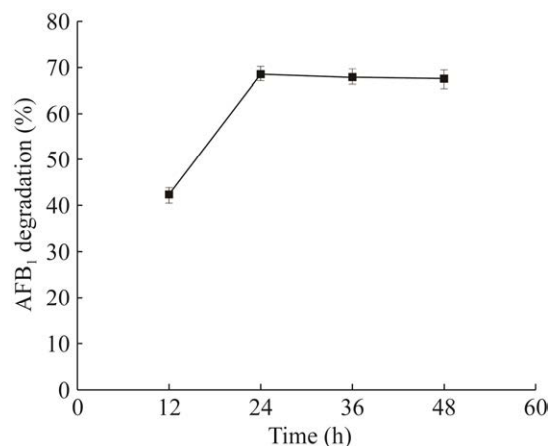


图 4 不同培养时间的发酵液对 AFB<sub>1</sub> 的降解作用  
Figure 4 Degradation of AFB<sub>1</sub> by fermentation broth of *Clostridium butyricum* with different incubation time.

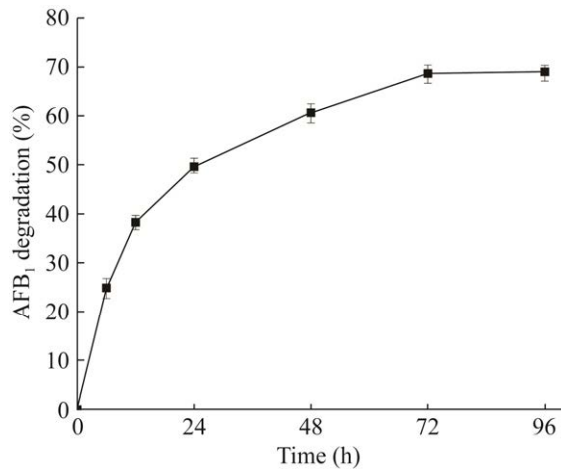


图5 24 h 发酵液对 AFB<sub>1</sub> 的降解作用

Figure 5 Degradation of AFB<sub>1</sub> by the fermentation broth of *Clostridium butyricum* cultured for 24 h.

## 2.6 发酵液中降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 活性组分存在部位的确定

分别检测了丁酸梭菌发酵液、发酵液上清、菌体悬液对 AFB<sub>1</sub> 的降解作用, 结果如图 6 所示。在反应 72 h 后, 丁酸梭菌发酵液对 AFB<sub>1</sub> 的降解率为 54.56%, 发酵液上清对 AFB<sub>1</sub> 的降解率为 53.50%, 菌体悬液对 AFB<sub>1</sub> 的降解率仅为 2.60%。由此可以看出, 发酵液上清对 AFB<sub>1</sub> 的降解率显著高于菌体对 AFB<sub>1</sub> 的降解率, 说明降解 AFB<sub>1</sub> 的活性组分主要存在于丁酸梭菌发酵液的上清部位。

## 2.7 不同处理后发酵液上清对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 降解率的影响

对丁酸梭菌发酵液上清分别进行加热、蛋白酶 K、SDS、蛋白酶 K+SDS 这 4 种处理, 比较不同处理后的发酵液上清对 AFB<sub>1</sub> 的降解效果, 结果见图 7。结果表明, 发酵液上清经热处理后, 对 AFB<sub>1</sub> 的降解率仅为 29.52%, 与对照组相比降低了 44.82%; 经过蛋白酶 K、变性剂 SDS 处理后, 上清液对 AFB<sub>1</sub> 的降解率与对照组相比分别降低了 66.54%、37.12%; 经过 SDS+蛋白酶 K 处理后, 发酵液上清对 AFB<sub>1</sub> 的

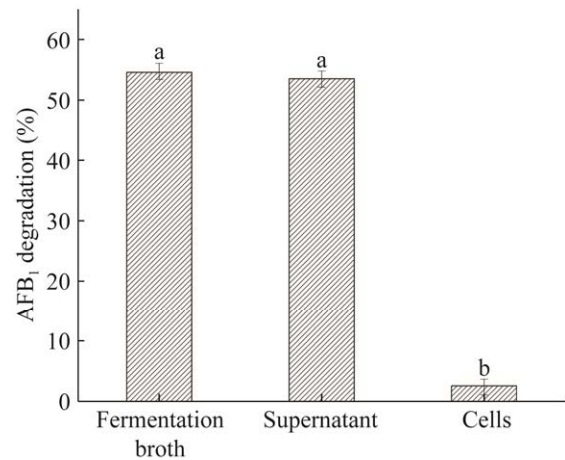


图6 丁酸梭菌发酵液、上清、菌体对 AFB<sub>1</sub> 的降解作用 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ). 下同

Figure 6 Degradation of AFB<sub>1</sub> by the fermentation broth of *Clostridium butyricum*, supernatant and cells. Different lowercase letters indicate significant ( $P<0.05$ ). The same below.

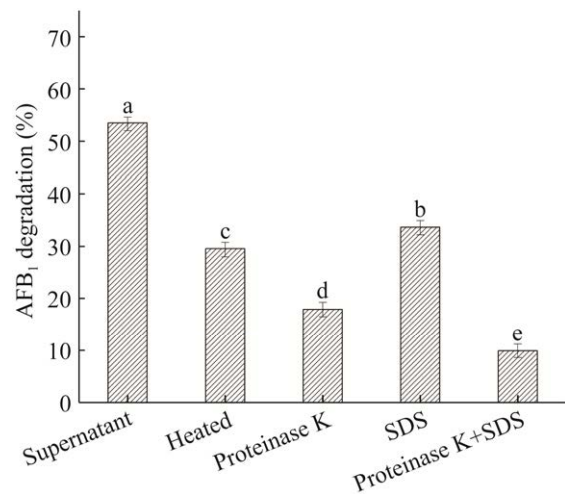


图7 不同处理后发酵液上清对 AFB<sub>1</sub> 降解率

Figure 7 Effects of different treatments of fermentation broth supernatant of *Clostridium butyricum* on AFB<sub>1</sub> degradation.

降解率仅为 9.9%。Xu 等<sup>[9]</sup>在研究沙氏芽孢杆菌降解 AFB<sub>1</sub> 时发现其发酵液上清经过蛋白酶 K+SDS 处理后, AFB<sub>1</sub> 降解率由 77.9%降低至 15.3%, 并从发酵液上清中纯化出一种 AFB<sub>1</sub> 降解



酶, 命名为芽孢杆菌黄曲霉毒素降解酶(*Bacillus aflatoxin-degrading enzyme*, BADE); Wang 等<sup>[14]</sup>分离筛选出 2 株 AFB<sub>1</sub> 降解菌, 为芽孢杆菌 H16v8 和芽孢杆菌 HGD9229, 对这 2 株菌进行共培养, 发现共培养后上清对 AFB<sub>1</sub> 降解效率相比单一菌株纯培养上清显著提升, 并对共培养液上清中 2 株菌所产 AFB<sub>1</sub> 降解酶进行了分离纯化和蛋白分子量测定。结合上述文献结果分析可以推测, 本研究的丁酸梭菌发酵液上清中对 AFB<sub>1</sub> 脱毒作用的活性组分为丁酸梭菌分泌产生的胞外酶, 催化 AFB<sub>1</sub> 发生降解。

### 3 讨论与结论

随着抗生素开始被禁止在动物饲料中使用, 益生菌及其代谢产物等可作为替代抗生素使用的产品在生产中应用更加广泛。丁酸梭菌作为芽孢类益生菌, 能够抵抗饲料加工过程和上胃肠道中的恶劣环境, 更好地定殖于肠道, 在动物饲养和食品领域具有巨大应用潜力, 因而受到广泛的关注。但是目前丁酸梭菌的发酵水平普遍不高, 缺乏对发酵培养基成分和条件进行系统的优化和研究, 从少数几篇研究中看到, 刘磊等<sup>[15]</sup>对丁酸梭菌 CBM01 的碳、氮源进行优化, 发现葡萄糖为最佳碳源、蛋白胨为最佳氮源, 其发酵生物量最高; 李雯静等<sup>[16]</sup>对羊源丁酸梭菌 HDRyYB1 的发酵工艺优化后, 其芽孢数达  $1.478 \times 10^8$  CFU/mL, 可见发酵工艺优化对提高丁酸梭菌的菌体浓度是十分必要且有效。本研究利用响应面法优化了丁酸梭菌的发酵培养基, 其优化后的培养基组成为: 葡萄糖 18.1 g/L, 大豆蛋白胨 29.7 g/L, 磷酸氢二钾 3.8 g/L, 氯化钠 2.0 g/L, 乙酸钠 4.0 g/L, 结晶硫酸镁 1.2 g/L, L-半胱氨酸盐酸盐 0.3 g/L。优化后丁酸梭菌的生物量可达  $2.28 \times 10^9$  个/mL, 是优化前的 2.54 倍, 能达到较高的发酵产酸水

平, 可为丁酸梭菌今后放大生产试验提供理论依据。

丁酸梭菌目前主要应用于临床研究、食品及动物饲料中, 研究表明丁酸梭菌能够调节肠道微生物菌群组成, 降低致病菌的数量, 促进益生菌的生长<sup>[17]</sup>, 但关于丁酸梭菌抑制黄曲霉菌生长及降解黄曲霉毒素的研究还未见报道。本研究探索性地将丁酸梭菌发酵浓缩液直接应用于抑制致病真菌黄曲霉菌的生长, 结果发现丁酸梭菌发酵液对黄曲霉菌的生长具有显著的抑制作用, 这可能是由于丁酸梭菌发酵液中产生的有机酸, 如丁酸、乙酸和丙酸能够将酸碱度降低至低于霉菌生长和抑制代谢的水平, 从而能有效地抑制黄曲霉菌的孢子萌发和菌丝生长, 也抑制了霉菌毒素的产生。

黄曲霉毒素污染严重威胁着饲料与食品安全, 每年都会造成巨大的经济损失<sup>[18]</sup>。其中, AFB<sub>1</sub> 是黄曲霉毒素中对人及动物毒性最大、致突变性和致癌性最强的天然物质<sup>[19]</sup>。微生物法降解 AFB<sub>1</sub> 是通过微生物分泌的酶的作用将 AFB<sub>1</sub> 分子破坏, 并产生无毒的降解产物<sup>[20]</sup>。近年来, 越来越多的微生物被发现具有降解 AFB<sub>1</sub> 的能力, 包括放线菌、芽孢杆菌、子囊菌门、接合菌门等<sup>[21]</sup>。Xia 等<sup>[11]</sup>以香豆素为唯一碳源从土壤中筛选出一株能够降解 AFB<sub>1</sub> 的枯草芽孢杆菌 JSW-1, 该菌株在 30 °C 培养 72 h 后对 AFB<sub>1</sub> 的降解率为 67.20%。Chen 等<sup>[8]</sup>从自然发酵泡菜中分离出一株能够有效降解 AFB<sub>1</sub> 的解淀粉芽孢杆菌 WF2020, 该菌株发酵上清液热稳定性较好, 煮沸 20 min 后仍可降解 37.16% 的 AFB<sub>1</sub>。本研究利用丁酸梭菌发酵浓缩液降解 AFB<sub>1</sub>, 反应 72 h 后的降解率可达 68.65%, 进一步试验确定了降解 AFB<sub>1</sub> 的活性组分主要存在于丁酸梭菌发酵液上清中, 为细胞分泌的胞外产物, 而不在菌体细胞中, 这与宋茂鹏等<sup>[22]</sup>

的研究结果相似。发酵液上清经加热、蛋白酶 K、SDS 和蛋白酶 K+SDS 等 4 种方法处理后,对 AFB<sub>1</sub> 的降解率显著下降,结果表明丁酸梭菌对 AFB<sub>1</sub> 的降解主要是由于菌体分泌产生的胞外酶催化 AFB<sub>1</sub> 生物降解,而不是通过菌体细胞壁对 AFB<sub>1</sub> 物理吸附。目前还未见到有关丁酸梭菌对黄曲霉毒素以及其他真菌毒素具有降解作用的报道,本研究针对厌氧菌益生菌发酵代谢产物对霉菌毒素脱毒的作用机制探索具有重要意义,为进一步开发新型生物脱毒剂奠定了基础,预计在饲料生产及养殖产业上具有较好的应用价值。

## REFERENCES

- [1] 傅云扉,魏琦麟,袁明贵,康桦华,田雅,向蓉,徐志宏. 丁酸梭菌及产丁酸代谢改造[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(1/2): 37-45.  
FU YF, WEI QL, YUAN MG, KANG HH, TIAN Y, XIANG R, XU ZH. Research progress of *Clostridium butyricum* and metabolic modification of butyric acid production[J]. China Biotechnology, 2022, 42(1/2): 37-45 (in Chinese).
- [2] TANASUPAWAT S, PRASIRTSAK B, PAKDEETO A, THONGCHUL N. Characterization and fermentation products of *Clostridium butyricum* strains isolated from Thai soils[J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2014, 4(4): 20-23.
- [3] ARIYOSHI T, HAGIHARA M, TAKAHASHI M, MIKAMO H. Effect of *Clostridium butyricum* on gastrointestinal infections[J]. Biomedicine, 2022, 10(2): 483.
- [4] STOEVA MK, GARCIA-SO J, JUSTICE N, MYERS J, TYAGI S, NEMCHEK M, MCMURDIE PJ, KOLTERMAN O, EID J. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-28.
- [5] KOH A, de VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, BÄCKHED F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites[J]. Cell, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [6] LI YH, WANG Y, LIU YY, LI X, FENG LF, LI KK. Optimization of an economical medium composition for the coculture of *Clostridium butyricum* and *Bacillus coagulans*[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 19.
- [7] WANG Y, ZHAO CX, ZHANG DD, ZHAO MM, ZHENG D, PENG MM, CHENG W, GUO P, CUI ZJ. Simultaneous degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> and zearalenone by a microbial consortium[J]. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 2018, 146: 69-76.
- [8] CHEN GJ, FANG QA, LIAO ZL, XU CW, LIANG ZB, LIU T, ZHONG QP, WANG L, FANG X, WANG J. Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF<sub>2020</sub>[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 891091.
- [9] XU L, EISA AHMED MF, SANGARE L, ZHAO YJ, SELVARAJ JN, XING FG, WANG Y, YANG HP, LIU Y. Novel aflatoxin-degrading enzyme from *Bacillus shackletonii* L7[J]. Toxins, 2017, 9(1): 36.
- [10] RAO KR, VIPIN AV, HARIPRASAD P, APPAIAH KAA, VENKATESWARAN G. Biological detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Bacillus licheniformis* CFR1[J]. Food Control, 2017, 71: 234-241.
- [11] XIA XS, ZHANG Y, LI MY, GARBA B, ZHANG Q, WANG Y, ZHANG HY, LI PW. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B<sub>1</sub> biodegradation capability[J]. Food Control, 2017, 75: 92-98.
- [12] ALBERTS JF, ENGELBRECHT Y, STEYN PS, HOLZAPFEL WH, van ZYL WH. Biological degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Rhodococcus erythropolis* cultures[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(1/2): 121-126.
- [13] BELWAL T, BHATT ID, RAWAL RS, PANDE V. Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 95: 393-403.
- [14] WANG L, HUANG W, SHA Y, YIN HC, LIANG Y, WANG X, SHEN Y, WU XQ, WU DP, WANG JS. Co-cultivation of two *Bacillus* strains for improved cell growth and enzyme production to enhance the degradation of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Toxins, 2021, 13(7): 435.
- [15] 刘磊,田亚男,倪学勤,曾东,潘康成,王鹤松. 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, 29(10): 3831-3836.  
LIU L, TIAN YN, NI XQ, ZENG D, PAN KC, WANG HS. Optimization of carbon and nitrogen sources of

- Clostridium butyricum* CBM01 and its tolerance to gastrointestinal tract[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(10): 3831-3836 (in Chinese).
- [16] 李雯静, 李则静, 田中元, 肖运才, 王喜亮, 彭健, 毕丁仁, 石德时. 羊源丁酸梭菌 HDRyYB1 发酵工艺的优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 534-540.  
LI WJ, LI ZJ, TIAN ZY, XIAO YC, WANG XL, PENG J, BI DR, SHI DS. Fermentation optimization of *Clostridium butyricum* HDRyYB1 isolated from sheep[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 534-540 (in Chinese).
- [17] CHEN DF, JIN DC, HUANG SM, WU JY, XU MQ, LIU TY, DONG WX, LIU X, WANG SN, ZHONG WL, LIU Y, JIANG RH, PIAO MY, WANG BM, CAO HL. *Clostridium butyricum*, a butyrate-producing probiotic, inhibits intestinal tumor development through modulating Wnt signaling and gut microbiota[J]. Cancer Letters, 2020, 469: 456-467.
- [18] RUSHING BR, SELIM MI. Aflatoxin B<sub>1</sub>: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 124: 81-100.
- [19] CHEN YJ, KONG Q, LIANG Y. Three newly identified peptides from *Bacillus megaterium* strongly inhibit the growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production of *Aspergillus flavus*[J]. Food Control, 2019, 95: 41-49.
- [20] 蔡俊, 田尔诺, 邵帅, 杜馨, 王常高, 林建国. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 生物脱毒的研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 726-731.  
CAI J, TIAN EN, SHAO S, DU X, WANG CG, LIN JG. Progress in biological detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 726-731 (in Chinese).
- [21] VERHEECKE C, LIBOZ T, MATHIEU F. Microbial degradation of aflatoxin B<sub>1</sub>: current status and future advances[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 1-9.
- [22] 宋茂鹏, 马现永, 邓盾, 王永飞. 假单胞菌胞外酶降解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的酶学性质[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 46-56.  
SONG MP, MA XY, DENG D, WANG YF. Characterization of an extracellular aflatoxin B<sub>1</sub> degrading enzyme from a *Pseudomonas* strain[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 46-56 (in Chinese).