

## 研究报告

## 羊源丁酸梭菌 HDRyYB1 发酵工艺的优化

李雯静<sup>1,2</sup> 李则静<sup>1,2</sup> 田中元<sup>1,2</sup> 肖运才<sup>1,2</sup> 王喜亮<sup>1,2</sup> 彭健<sup>1</sup>毕丁仁<sup>1,2</sup> 石德时<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 华中农业大学动物医学院 农业部兽用诊断制剂创制重点实验室 湖北 武汉 430070)

**摘要:**【目的】目前,国内外鲜有关于羊源丁酸梭菌的报道。本课题选用羊源丁酸梭菌 HDRyYB1 为研究对象,对其发酵工艺进行优化,为该菌株作为饲料添加剂应用于畜牧业生产奠定基础。【方法】采用 Plackett-Burman (PB) 试验设计法和响应面法分析并优化显著影响 HDRyYB1 菌株发酵液中芽胞数的培养基成分。【结果】发酵培养基中的面粉浓度、鱼粉浓度和米粉浓度显著影响发酵液中的芽胞数,优化后的发酵培养基组分(质量体积比)为:面粉 3.72%、鱼粉 0.90%、米粉 3.96%、酵母粉 0.60%、NaCl 0.19%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.19%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01%、NaHCO<sub>3</sub> 0.01%、CaCO<sub>3</sub> 0.48%;培养参数为:37 °C,初始 pH 为 7.2–7.4,瓶装量 100/250,接种量 3%。在此条件下, HDRyYB1 菌株发酵完全(18 h)的芽胞数为 1.478×10<sup>8</sup> CFU/mL,是优化前的 2.7 倍。【结论】HDRyYB1 菌株发酵培养基得到了优化,优化后的培养基可用于后期的扩大发酵试验,验证其在实践生产中的应用价值。

**关键词:** 丁酸梭菌, 发酵工艺, 响应面分析法, 羊源

## Fermentation optimization of *Clostridium butyricum* HDRyYB1 isolated from sheep

LI Wen-Jing<sup>1,2</sup> LI Ze-Jing<sup>1,2</sup> TIAN Zhong-Yuan<sup>1,2</sup> XIAO Yun-Cai<sup>1,2</sup>WANG Xi-Liang<sup>1,2</sup> PENG Jian<sup>1</sup> BI Ding-Ren<sup>1,2</sup> SHI De-Shi<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Key Laboratory of Development of Veterinary Diagnostic Products of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** [Objective] There is almost no report about the sheep-derived *Clostridium butyricum* in the world at present. It is the study that optimized of liquid fermentation for sheep-derived *Clostridium butyricum* HDRyYB1. This study sets the foundation for *Clostridium butyricum* HDRyYB1 industrial product as feed additive in livestock. [Methods] We used the Plackett-Burman (PB) design and

**Foundation item:** Key Technologies R&D Program of China (No. 2013BAD10B03, 2013BAD03B01)

\*Corresponding author: Tel: 86-27-87280032; E-mail: rock@mail.hzau.edu.cn

**Received:** May 27, 2015; **Accepted:** September 02, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 11, 2015

**基金项目:** 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD10B03, 2013BAD03B01)

\*通讯作者: Tel: 86-27-87280032; E-mail: rock@mail.hzau.edu.cn

**收稿日期:** 2015-05-27; **接受日期:** 2015-09-02; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-11

response surface methodology (RSM) though determining the spore number of *Clostridium butyricum* HDRyYB1 in this report. **[Results]** The results showed that the concentration of wheat flour, rice flour, fish meal had remarkable effect on the spore number. The optimum medium for incubating the *Clostridium butyricum* HDRyYB1 was composed of 3.72% wheat flour (W/V), 0.90% fish meal (W/V), 3.96% rice flour (W/V), 0.60% yeast powder (W/V), 0.19% NaCl (W/V), 0.19%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (W/V), 0.01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (W/V), 0.01%  $\text{NaHCO}_3$  (W/V), 0.48%  $\text{CaCO}_3$  (W/V), at 37 °C, pH 7.2–7.4, bottled in 100/250, inoculated quantity 3%. Under this condition, the spore number was  $1.478 \times 10^8$  colony-forming units (CFU)/mL after fermented completely in 18 h, which was 2.7 times than before. **[Conclusion]** These results indicate that the fermentation medium has been optimized, it can be used in the expanded fermentation experiment to verify its application value in production practice.

**Keywords:** *Clostridium butyricum*, Fermentation, RSM, Sheep-derived

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)又叫酪酸菌、宫入菌, 菌体呈直或微弯状, 内生芽胞, 是严格厌氧型革兰氏阳性菌, 属于硬壁菌门梭状杆菌属<sup>[1]</sup>。研究表明, 益生型丁酸梭菌不仅可以与肠道中其它益生菌共生、促进它们的生长与增殖<sup>[2-4]</sup>, 还能抑制葡萄球菌、致病性大肠杆菌、痢疾杆菌等肠道致病菌的生长, 减少致病菌分泌的有害物质(胺类、吲哚类等)在肠道中的积累<sup>[5-6]</sup>, 调节肠道微生态平衡。此外, 丁酸梭菌在代谢过程中会产生一些有益机体生长的物质(乙酸、丁酸、氨基酸等), 调节宿主肠道 pH, 促进肠道对营养物质的吸收<sup>[7-10]</sup>, 提高畜禽的生长性能。

本研究室从健康羊粪便中提取出一株具有良好益生特性和抗逆性能的丁酸梭菌, 命名为 HDRyYB1 菌株。Minitab 是常用数据分析软件之一, 具有强大的实验设计、数据管理、统计分析等功能。因此, 本研究以提高发酵液中的芽胞数为目的, 利用 Minitab 软件的 PB 试验设计和响应面试验设计, 对该菌株的液体发酵培养基进行优化, 为该菌株作为饲料添加剂应用于畜牧业生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 羊源丁酸梭菌 HDRyYB1: 筛选自健康羊的粪便, 现保藏于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

**1.1.2 主要试剂:** RCM 培养基, 购自青岛海博生物技术有限公司; 胰蛋白胨、酵母浸出物、植物蛋

白胨, 购自北京奥博星生物科技有限公司; 面粉、米粉, 购自荆州好好吃米业有限公司; 鱼粉, 购自宜昌振林科技有限公司; 葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{CaCO}_3$ , 购自武汉云鹏化工建材有限公司。

**1.1.3 培养基:** (1) 固体培养基: RCM。

(2) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 8.4, 酵母浸出物 34.5, 胰蛋白胨 36.6, 植物蛋白胨 9.7, NaCl 2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{MnSO}_4$  0.2。

(3) 基础发酵培养基(g/L): 米粉 18.9, 鱼粉 7.5, 面粉 33.0, 酵母粉 6.0, NaCl 1.9,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.9,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1,  $\text{NaHCO}_3$  0.1,  $\text{CaCO}_3$  4.8。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养方法:** 菌株活化后, 接入含有 100 mL 种子培养基的 100 mL 三角瓶中, 37 °C 静置培养 12 h 后, 以 3% 的接菌量把丁酸梭菌 HDRyYB1 种子转接入含有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C 静置培养 18 h。

**1.2.2 芽胞数的计数方法:** 取 1 mL 已发酵完成的发酵液于无菌的 10 mL 离心管中, 80 °C 水浴 10 min, 用已灭菌的 PBS 缓冲液对其进行 10 倍系列的稀释、涂布。选取菌落数在 30–300 之间的稀释度进行计算。发酵培养基芽胞数=菌落数 $\times 10^{n+1}$ , 式中 n 为菌液涂布时的稀释倍数。

### 1.3 发酵培养基各组分的优化

在基础发酵培养基的基础上, 利用 Plackett-Burman (PB) 试验设计<sup>[11]</sup>, 研究米粉( $X_1$ )、

鱼粉( $X_2$ )、面粉( $X_3$ )、酵母粉( $X_4$ )、NaCl ( $X_5$ )、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $X_6$ )、 $KH_2PO_4$  ( $X_7$ )、 $NaHCO_3$  ( $X_8$ )、 $CaCO_3$  ( $X_9$ )对丁酸梭菌产生芽胞数( $Y$ )的影响, 确定显著因素和最佳水平范围, 然后用 Box-Behnken 试验设计进行响应面优化<sup>[12]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PB 试验设计结果及分析

采用 Minitab17 软件对表 1 中发酵液中的芽胞数  $Y$  与各因素的关系进行回归分析, 得到各因素的回归系数及其显著性, 结果(表 2)表明: 面粉、鱼粉、米粉的浓度对芽胞数影响较大, 且这 3 种物质的浓度对芽胞的产生的影响都是正效应。

### 2.2 最陡爬坡试验

保持发酵培养基其它因素不变, 对米粉( $X_1$ )、鱼粉( $X_2$ )、面粉( $X_3$ ) 3 个显著因素进行最陡爬坡试验。由表 3 可知, 开始时发酵液中单位体积芽胞数( $Y$ )随  $X_1$ 、 $X_3$ 、 $X_3$  浓度的增加而升高, 第 3 组  $Y$  值达到最大, 然后随着 3 个因素浓度的升高而降低, 所以 3 个因素最优浓度在第 3 组附近, 因此以第 3 组为后续响应面试验的中心点, 进行响应面试验。

### 2.3 Box-Behnken 试验结果分析

保持发酵培养基的其它因素不变, 根据最陡爬坡试验得到的中心点, 对  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  进行 Box-Behnken 试验设计(表 4)。分析结果得芽胞数的预测值  $Y$  与 3 个显著因素的二次多项式回归方程(1):  $Y=154.111+7.708\ 33X_1+2.875\ 00X_2+9.666\ 67X_3-12.680\ 6X_1 \times X_1-12.680\ 5X_2 \times X_3-50.097\ 2X_3 \times X_3-5.250\ 00X_1 \times X_2-12.500\ 0X_1 \times X_3-13.500X_2 \times X_3$ 。

由表 5 可以看出, 该数学模型的  $F=5.06$ 、 $P=0.044<0.05$ , 说明本实验所采用的二次模型显著; 决定系数为  $0.901\ 1<0.850\ 0$ , 失拟项  $P=0.101>0.05$ , 说明本次数学模型拟合度良好, 回归方程(1)可以代替实验真实点对实验结果进行分析。由表 6 可以看出  $X_2^2$  的  $P$  值小于 0.01, 说明鱼粉的二次项对模型具有极显著的影响, 而其余的因素显著性较差, 说明  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  三者的交互作用不大。

### 2.4 发酵培养基响应面交互作用结果分析

将  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  各因素的响应值进行拟合后得到各两因素间与发酵液中单位体积芽胞数关系的三维空间曲面图和等值线图(图 1-3)。

表 1 PB 试验设计的因素水平及结果  
Table 1 Arrangement and experimental results of the PB design

实验号 Experiment No.	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	$X_3$ (%)	$X_4$ (%)	$X_5$ (%)	$X_6$ (%)	$X_7$ (%)	$X_8$ (%)	$X_9$ (%)	$Y(\times 10^6\ CFU/mL)$
1	3.00	0.75	1.00	0.20	0.14	0.14	0.03	0.03	0.16	30.33
2	1.00	0.75	3.00	0.20	0.42	0.42	0.03	0.01	0.16	41.00
3	3.00	0.25	1.00	0.60	0.42	0.42	0.03	0.03	0.16	55.00
4	1.00	0.25	3.00	0.60	0.14	0.42	0.01	0.03	0.16	0.02
5	3.00	0.25	3.00	0.20	0.14	0.42	0.03	0.01	0.48	75.33
6	1.00	0.25	1.00	0.60	0.42	0.14	0.03	0.01	0.48	29.67
7	1.00	0.25	1.00	0.20	0.14	0.14	0.01	0.01	0.16	0.01
8	3.00	0.75	3.00	0.60	0.42	0.14	0.01	0.01	0.16	56.33
9	1.00	0.75	3.00	0.60	0.14	0.14	0.03	0.03	0.48	0.12
10	3.00	0.25	3.00	0.20	0.42	0.14	0.01	0.03	0.48	62.67
11	3.00	0.75	1.00	0.60	0.14	0.42	0.01	0.01	0.48	36.00
12	1.00	0.75	1.00	0.20	0.42	0.42	0.01	0.03	0.48	14.67

表 2 PB 试验设计回归分析结果  
Table 2 The regression results for the PB design

项 Source	效应 Effective	T 值 T value	P 值 P value	重要性排序 The order of importance
X <sub>1</sub>	22.389	10.470	0.009	2
X <sub>2</sub>	14.944	6.990	0.020	3
X <sub>3</sub>	39.833	18.630	0.003	1
X <sub>4</sub>	4.056	1.900	0.198	6
X <sub>5</sub>	-4.833	-2.260	0.152	5
X <sub>6</sub>	-9.500	-4.440	0.052	4
X <sub>7</sub>	3.389	1.590	0.254	7
X <sub>8</sub>	-0.833	-0.390	0.734	9
X <sub>9</sub>	1.278	0.600	0.611	8

表 3 最陡爬坡试验设计及结果  
Table 3 Arrangement and experiment results of the  
steepest ascent path

试验组 Trial groups	X <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub> (%)	X <sub>3</sub> (%)	Y (×10 <sup>6</sup> CFU/mL)
1	2.6	0.5	3.1	53
2	3.2	0.7	3.4	101
3	3.8	0.9	3.7	134
4	4.4	1.1	4.0	111
5	5.0	1.3	4.3	84

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果  
Table 4 Arrangement and experimental results of the  
Box-Behnken design

试验组 Trial groups	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y (×10 <sup>6</sup> CFU/mL)
1	1	0	1	93.00
2	0	-1	-1	65.00
3	1	1	0	137.00
4	-1	0	-1	64.67
5	0	0	0	151.00
6	0	0	0	149.30
7	0	-1	1	128.00
8	-1	0	1	92.33
9	-1	1	0	142.30
10	0	1	1	90.67
11	-1	-1	0	110.00
12	1	0	-1	115.30
13	1	-1	0	125.70
14	0	1	-1	81.67
15	0	0	0	162.00

注：X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 分别代表因素米粉、鱼粉、面粉；X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 下水平(-1)浓度(质量体积比)分别为 3.2%、0.7%、3.4%，零水平(0)浓度(质量体积比)分别为 3.8%、0.9%、3.7%，上水平(+1)浓度(质量体积比)分别为 4.4%、1.1%、4.0%。

Note: X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> was rice flour, fish meal, wheat flour. The concentration of X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> in low level (-1) was 3.2%, 0.7%, 3.4%; in zero level (0) was 3.8%, 0.9%, 3.7%; in high level (+1) was 4.4%, 1.1%, 4.0%.

表 5 响应面试验方差分析结果  
Table 5 ANOVA results for Box-Behnken

来源 Source	自由度 df	离差平方和 SS	均方差 MS	F 值 F value	P 值 P value
回归模型 Regression model	9	12 560.18	1 395.58	5.06	0.044
线性 Linear	3	1 289.03	429.68	1.56	0.309
平方 Square	3	9 806.91	3 268.97	11.86	0.010
交互作用 Interaction	3	1 464.25	488.08	1.77	0.269
残差误差 Error of residuals	5	1 377.77	275.55		
失拟项 Lack of fit	3	1 283.03	427.68	9.03	0.101
纯误差 Pure error	2	94.74	47.37		
合计 Total	14				
决定系数 R <sup>2</sup>			0.901 1		

表 6 回归模型系数的估计  
Table 6 Effects estimates for  $Y$  model

项 Source	系数 Coefficient	系数标准误差 Coefficient standard error	$T$ 值 $T$ value	$P$ 值 $P$ value
$X_1$	7.708	5.869	1.313	0.246
$X_2$	2.875	5.869	0.490	0.645
$X_3$	9.667	5.869	1.647	0.160
$X_1 \times X_1$	-12.681	8.639	-1.468	0.202
$X_2 \times X_2$	-12.681	8.639	-1.468	0.202
$X_3 \times X_3$	-50.097	8.639	-5.799	0.002
$X_1 \times X_2$	-5.250	8.300	-0.633	0.555
$X_1 \times X_3$	-12.500	8.300	-1.506	0.192
$X_2 \times X_3$	-13.500	8.300	-1.627	0.165

利用 Minitab 17 软件分析得到该模型极值： $X_1=0.272\ 7$ 、 $X_2=0.030\ 3$ 、 $X_3=0.050\ 5$ ，结合最陡爬坡试验设计的原则和步长，解析求得实际值为 $X_1=3.963\ 62$ 、 $X_2=0.906\ 06$ 、 $X_3=3.715\ 15$ ，为方便操作，可分别取值 $X_1=3.96$ 、 $X_2=0.90$ 、 $X_3=3.72$ ，即发酵培养基中其余因素保持不变，当米粉、鱼粉、面粉的质量体积比分别为 3.96%、0.90%、3.72%时，该模型发酵液中单位体积芽胞数达到最大。

## 2.5 培养条件的优化

确定最优发酵培养基各组分浓度后，分别对丁酸梭菌的接菌量、250 mL 三角瓶的装液量和培养基

初始 pH 进行优化。由图 4 可以看出，丁酸梭菌发酵培养基的最优接种量为 3%、最优装液量为 100 mL、最优初始 pH 为 7.4。

## 2.6 优化条件前后发酵培养基的比较

分别用初始发酵培养基配方(米粉 1.89%、鱼粉 0.75%、面粉 3.30%、酵母粉 0.60%、NaCl 0.19%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.19%、 $KH_2PO_4$  0.01%、 $NaHCO_3$  0.01%、 $CaCO_3$  0.48%)和优化后发酵培养基配方(米粉 3.96%、鱼粉 0.90%、面粉 3.72%、酵母粉 0.60%、NaCl 0.19%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.19%、 $KH_2PO_4$  0.01%、 $NaHCO_3$  0.01%、 $CaCO_3$  0.48%)接种相同浓度的丁酸梭菌种子液，每组重复 5 次，进行试验。优化后发酵液芽胞数维持在  $1.50 \times 10^8$  CFU/mL，而初始发酵液的芽胞数为  $0.57 \times 10^8$  CFU/mL，优化后的发酵液比初始的芽胞数提高了 2.7 倍。

## 3 讨论

目前，笔者未见有关益生型羊源丁酸梭菌的报道。笔者所在研究室从健康羊粪便中分离筛选到益生丁酸梭菌，体内外的研究证明该菌株具有良好的抗逆性、安全性和益生特性，可用于生产实践中。本次试验的发酵培养基以淀粉质原料(米粉、面粉)作为碳源，来源广泛，价格便宜；以鱼粉和酵母粉作为有机氮源，含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸，为丁酸梭菌快速生长提供了良好的营养物

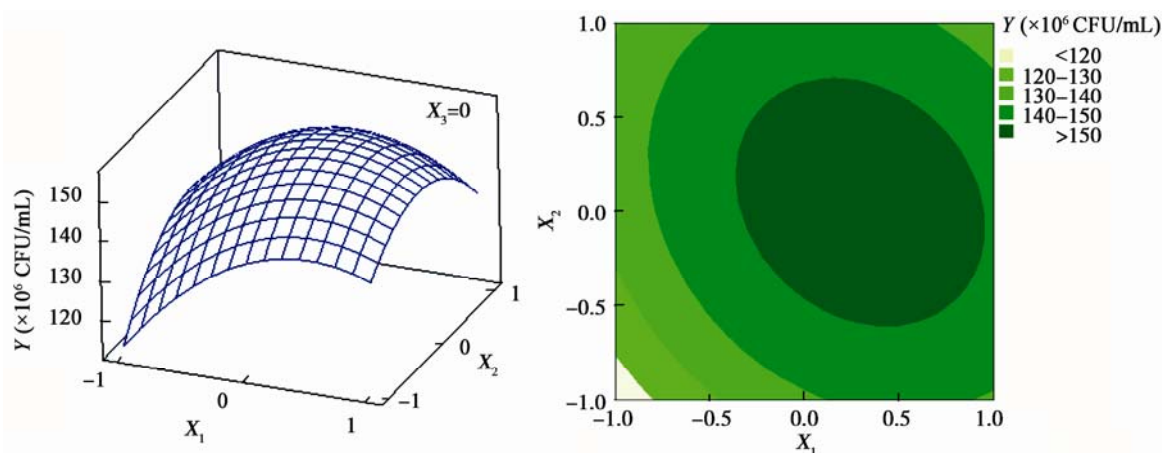


图 1  $X_1$ 、 $X_2$  交互影响发酵的曲面图和等值线图

Figure 1 Fermentation response surface for the interaction of  $X_1$  and  $X_2$

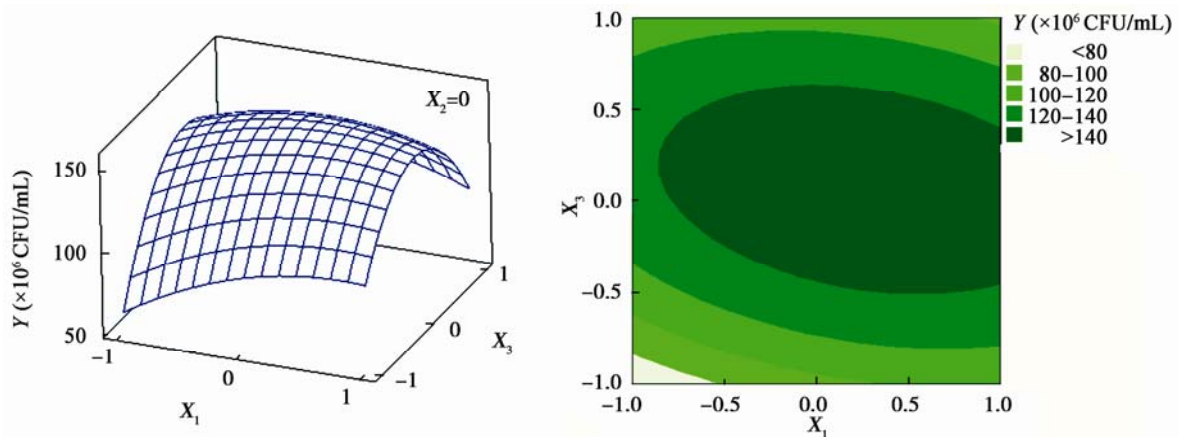
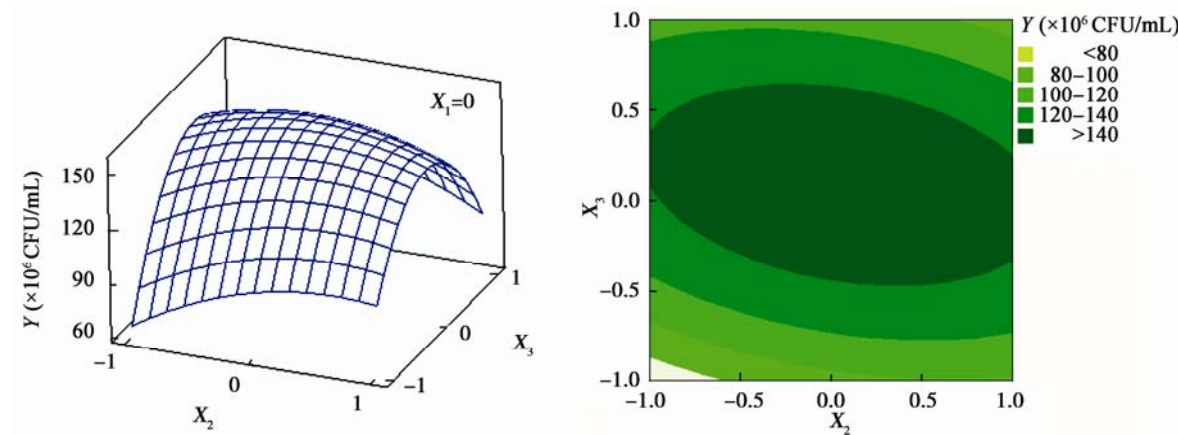
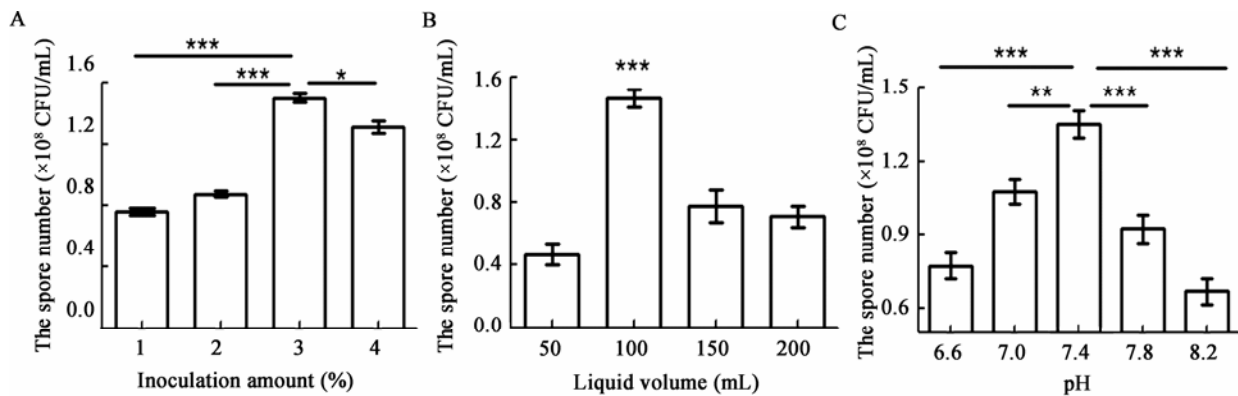
图 2  $X_1$ 、 $X_3$  交互作用影响发酵的曲面图和等值线图Figure 2 Fermentation response surface for the interaction of  $X_1$  and  $X_3$ 图 3  $X_2$ 、 $X_3$  交互作用影响发酵的曲面图和等值线图Figure 3 Fermentation response surface for the interaction of  $X_2$  and  $X_3$ 

图 4 不同接种量(A)、装液量(B)、初始 pH (C)对丁酸梭菌发酵的影响

Figure 4 Effect of inoculation amount (A), liquid volume (B), initial pH (C) on the fermentation of *Clostridium butyricum*

质、也为丁酸梭菌后期芽胞的产生打下基础。丁酸梭菌在培养 18 h 时芽胞完全成熟, 生长迅速, 为该配方的扩大实验和应用于实践提供了数据支持。

## 4 结论

(1) PB 试验设计筛选出米粉、面粉、鱼粉的浓度显著影响发酵液的芽胞数, 且 3 个因素均为正效应。

(2) 通过 Box-Behnken 设计建立了 3 个主要因素与发酵液芽胞数之间的二次回归模型, 根据该数学模型确定了发酵培养基中米粉、面粉、鱼粉的最佳浓度(质量体积比)分别为 3.96%、0.90%、3.72%, 这一结论为丁酸梭菌 HDRyYB1 后期的发酵扩大试验和工业化生产提供了数据支撑和参考依据。

## 参考文献

- [1] de Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. New York, USA: Springer, 2009: 738
- [2] Zhu XH, Tang BY, Liu J. Study on proliferation effect of *Clostridium butyrium* on intestinal available bacteria and symbiotic relation between them[J]. Chinese Journal of Microecology, 2004, 16(4): 193-194 (in Chinese)  
朱晓慧, 唐宝英, 刘佳. 酪酸菌对肠道有益菌的增殖作用和共生关系研究[J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16(4): 193-194
- [3] Liu TT, Zhang S, Deng FY, et al. Effects of glutamine and *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, small intestinal morphology and microflora in weanling piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(6): 998-1005 (in Chinese)  
刘婷婷, 张帅, 邓斐月, 等. 谷氨酰胺与丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、免疫功能、小肠形态和肠道菌群的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(6): 998-1005
- [4] Liu TT, Hua J, Wang XX, et al. *Clostridium butyricum*: effects on intestinal microflora, morphology and mucosal immunity-associated cells in egg-laying male chicks[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(11): 2210-2221 (in Chinese)  
刘婷婷, 滑静, 王晓霞, 等. 丁酸梭菌对蛋用仔公鸡肠道菌群、形态结构及黏膜免疫相关细胞的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(11): 2210-2221
- [5] Cao GT, Liu TT, Zhou L, et al. Study on the effects of *Clostridium butyricum* on pathogen and beneficial bacteria *in vitro*[J]. China Feed, 2012(4): 16-19 (in Chinese)  
曹广添, 刘婷婷, 周琳, 等. 丁酸梭菌对致病菌和有益菌的体外作用效果研究[J]. 中国饲料, 2012(4): 16-19
- [6] Zhang L, Zhou L, Yang CM, et al. The effects of the mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus rhamnosus* on intestinal pathogens[J]. China Feed, 2012(21): 9-12 (in Chinese)  
张玲, 周琳, 杨彩梅, 等. 丁酸梭菌与鼠李糖乳杆菌体外混合培养对肠道致病菌的影响[J]. 中国饲料, 2012(21): 9-12
- [7] Pan X, Wu T, Song Z, et al. Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, *Miichthys miiuy* (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of *Clostridium butyrium* CB2[J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(9): 679-686
- [8] Yang X, Zhang B, Guo Y, et al. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on fat deposition and meat quality of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2010, 89(2): 254-260
- [9] Kong Q, He GQ, Jia JL, et al. Oral administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in mice[J]. Current Microbiology, 2011, 62(2): 512-517
- [10] Song ZF, Wu TX, Cai LS, et al. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2006, 7(7): 596-602
- [11] Box GEP, Hunter JS. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces[J]. Annals of Mathematical Statistics, 1957, 28(1): 195-241
- [12] Widdel F. Cultivation of anaerobic microorganisms with hydrocarbons as growth substrates[A]//Timmis KN. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010: 3787-3798