

# 一株产丁酸羊源拜氏梭菌的筛选及其培养条件优化

付域泽<sup>#</sup>, 焦帅<sup>#</sup>, 张乃锋<sup>\*</sup>

中国农业科学院饲料研究所 农业农村部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081

付域泽, 焦帅, 张乃锋. 一株产丁酸羊源拜氏梭菌的筛选及其培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5184-5193

Fu Yuze, Jiao Shuai, Zhang Naifeng. Screening and culture condition optimization of a butyrate-producing *Clostridium beijerinckii* strain from sheep[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5184-5193

**摘要:**【背景】人类和动物消化道内栖息着极其复杂和多样化的微生物群落, 这些微生物群落分布在肠道的不同位置并执行着特定的功能。近年来, 产丁酸菌逐渐成为微生物领域的研究热点, 产丁酸菌主要为产芽孢革兰氏阳性厌氧菌, 对肠道健康有重要意义。【目的】从反刍动物瘤胃中筛选出产丁酸菌株并研究其生长特性, 进一步优化其培养条件, 从而提高产丁酸菌的丁酸产量。

【方法】以绵羊瘤胃内容物为样品, 运用稀释涂布法进行产丁酸菌的筛选, 通过形态学观察和 16S rRNA 基因序列分析等方法对菌株进行鉴定。通过单因素试验与 Box-Behnken design 试验相结合, 对培养条件进行优化, 确定筛选菌株在梭菌增殖培养基(reinforced clostridium medium, RCM)中的最佳产酸培养条件。【结果】经过筛选鉴定得到的菌株为梭菌属的拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*, CB), 命名为拜氏梭菌 R8 (CB.R8)。对拜氏梭菌 R8 的培养条件进行优化, 得出该菌株在接种量为 1.22%、温度为 38.45 °C、pH 6.08 和培养时间为 64.67 h 的条件下丁酸产量为 2.48 g/L。【结论】筛选到 1 株拜氏梭菌 R8, 该菌能够在 RCM 培养基中生长并代谢产生丁酸, 具备较高的应用价值。

**关键词:** 产丁酸菌; 拜氏梭菌; 菌种鉴定; 响应面分析法

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2021SZD0014); 国家自然科学基金面上项目(31872385)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

**Supported by:** Science and Technology Key Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2021SZD0014); National Natural Science Foundation of China (31872385)

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

**\*Corresponding author:** E-mail: zhangnaifeng@caas.cn

**Received:** 2022-09-28; **Accepted:** 2022-10-13; **Published online:** 2022-10-21

# Screening and culture condition optimization of a butyrate-producing *Clostridium beijerinckii* strain from sheep

FU Yuze<sup>#</sup>, JIAO Shuai<sup>#</sup>, ZHANG Naifeng<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Feed Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Background] The digestive tracts of humans and animals harbor complex microbiota composed of diverse species which inhabit different parts of the intestine and perform specific functions. In recent years, butyrate-producing bacteria have gradually become a research hotspot in microbiology. Butyrate-producing bacteria are mainly spore-forming Gram-positive anaerobic bacteria, which are of great significance to intestinal health. [Objective] To screen butyrate-producing bacteria from the rumen of ruminants and study its growth characteristics, and further optimize its culture conditions to improve the butyrate production. [Methods] Butyrate-producing bacteria were screened from sheep rumen contents by dilution coating method and identified via morphological observation and 16S rRNA gene sequence analysis. Single factor test and Box-Behnken design were employed to optimize the acid producing conditions of the screened strain in reinforced *Clostridium* medium (RCM). [Results] The strain screened and identified was *Clostridium beijerinckii* and was named *C. beijerinckii* R8. The butyrate production of *C. beijerinckii* R8 reached 2.48 g/L under the conditions of 1.22% inoculation amount, 38.45 °C, and pH 6.08 for 64.67 h. [Conclusion] A strain of *C. beijerinckii* R8 was screened, which grows and produces butyrate in RCM, demonstrating a high application value.

**Keywords:** butyrate-producing strain; *Clostridium beijerinckii*; identification of strain; response surface methodology

人类和动物消化道内栖息着极其复杂和多样化的微生物群落, 这些微生物群落分布在肠道的不同部位并保持着相对稳定和平衡, 对宿主健康发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。产丁酸菌是一类产芽孢的革兰氏阳性严格厌氧菌, 在调控肠道菌群结构、改善宿主肠道环境及影响宿主体健康等方面发挥重大作用<sup>[2]</sup>。

虽然产丁酸菌在肠道菌群中具有重要的地位和意义, 但仍存在实际应用方面的不足。一方面, 目前研究人员从不同生境中筛选得到的菌株其丁酸产量都相对较低; 另一方面, 筛选得到的菌株主要为丁酸梭菌, 不利于产丁酸菌筛选的多元化<sup>[3]</sup>。反刍动物的瘤胃是一个天然的微生物发酵罐, 在瘤胃中栖息生存着不计其

数的微生物, 也是微生物筛选的最佳样本<sup>[4]</sup>。因此, 本研究从绵羊瘤胃内容物中分离筛选丁酸产量较高的产丁酸菌, 研究其单因素生长特性, 并利用响应面法优化其培养条件, 以期产丁酸菌的相关制剂的研发及应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

于河北省保定市某屠宰场取新鲜绵羊瘤胃内容物于离心管中低温保存。

#### 1.1.2 培养基

梭菌增殖培养基(reinforced *Clostridium* medium, RCM): 酵母浸膏 3 g, 牛肉浸膏 10 g,

胰蛋白胨 10 g, 葡萄糖 5 g, 可溶性淀粉 1 g, 氯化钠 5 g, 无水乙酸钠 3 g, 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 琼脂 20 g (固体培养基时用), 蒸馏水加至 1 000 mL; 调节 pH 7.0±0.1, 1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 30 min。

梭菌选择性培养基(trypticase sulfite neomycin agar, TSN): 酵母浸膏 10.0 g、胰蛋白胨 15.0 g、亚硫酸钠 1.0 g、柠檬酸铁 0.5 g、硫酸新霉素 0.05 g、多粘菌素 B 0.02 g、琼脂 20 g (固体培养基时用) 蒸馏水加至 1 000 mL, pH 调至 7.0±0.1, 1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 30 min<sup>[5]</sup>。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

酵母浸膏、牛肉浸膏、胰蛋白胨、葡萄糖、可溶性淀粉、氯化钠、无水乙酸钠、半胱氨酸盐酸盐、亚硫酸钠、柠檬酸铁、硫酸新霉素、多粘菌素、琼脂, 以上试剂均购自宝林科(北京)生物科技有限公司。生化恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司; 2.5 L 厌氧培养袋, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株初筛

使用生化恒温培养箱和厌氧培养袋进行厌氧菌的液体培养、分离和稀释平板计数。产丁酸菌的分离: (1) 取瘤胃内容物样品 10 g, 加入到 90 mL 无菌水中, 置于 80 °C 水浴 10 min 以灭杀非芽孢菌, 混合物转入 RCM 培养基 37 °C、21% CO<sub>2</sub> 浓度下厌氧培养 48 h。(2) 将上述培养液置于 80 °C 水浴 10 min, 转入 TSN 培养基, 37 °C 厌氧选择性富集培养 48 h。(3) 选取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-7</sup> 梯度稀释培养液, 涂布 TSN 培养基平板 37 °C、21% CO<sub>2</sub> 浓度下厌氧培养 48 h。(4) 更换样品, 重复以上步骤。(5) 将所筛得的菌株分别进行纯化传代培养 3 代以上, 得到初筛菌株。

### 1.2.2 菌株复筛

(1) 分离所有初筛菌株的 16S rRNA 基因序列: 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化细菌总 DNA, 设计合成 PCR 引物 P0 (5'-GAGT TTAGTCMTGGCTCAG-3') 和 PC3 (5'-CTAHAG GGTATCTAATCCT-3')。PCR 反应体系: 上游引物 P0 (20 μmol/L) 0.5 μL, 下游引物 PC3 (20 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2 μL, 10×PCR Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2 μL, *Taq* polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 无菌去离子水补足 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 终止反应。

(2) 对 PCR 产物进行回收纯化后送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序鉴定。测序后采用 MEGA 7.0.14 构建菌株 16S rRNA 基因的系统发育树<sup>[6]</sup>。

(3) 对鉴定结果符合产丁酸的菌株制作发酵液[1%接种量(体积分数), 37 °C、21% CO<sub>2</sub> 浓度下厌氧培养 48 h]送至中国农业科学院饲料研究所检测中心进行液相色谱产酸检测。

### 1.2.3 单因素生长特性测定

以 1%、37 °C、pH 7.0 和 24 h 为标准模型分别进行接种量、温度、pH 和生长时间的单因素生长特性测定。

(1) 最佳接种量的测定: 分别接种 1%、3%、5%、7%和 9%的种子液于 RCM 液体培养基中, 培养 24 h 后观察生长情况并测定其 OD<sub>600</sub> 和丁酸产量。

(2) 最佳生长温度的测定: 取种子液接种于 RCM 培养基, 接种后分别置于 36、37、38、39 和 40 °C 环境中, 培养 24 h 后观察生长情况并测定其 OD<sub>600</sub> 和丁酸产量。

(3) 最佳 pH 的测定: 取种子液分别接种于不同 pH (5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0) 的 RCM 培

培养基, 培养 24 h 后观察生长情况并测定其  $OD_{600}$  和丁酸产量。

(4) 最佳生长时间的测定: 取种子液接种于 RCM 培养基, 接种后分别测定其 12、24、36、48、60 和 72 h 的  $OD_{600}$  和丁酸产量。

#### 1.2.4 响应面优化组合培养条件

采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件设计响应面试验方案, 建立数学回归模型, 对产丁酸菌培养条件进行优化分析。根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 结合单因素试验结果, 分别选择接种量、温度、pH 和生长时间作为自变量, 以丁酸产量为响应值设计四因素三水平的响应面分析实验。响应面试验为 29 个试验点, 其中存在 24 个析因点和 5 个零点, 用以估计实验误差。

## 2 结果与分析

### 2.1 产丁酸菌的分离培养与鉴定

#### 2.1.1 复筛菌株初步产酸测定

将初筛所得的所有菌株发酵液进行液相色谱检测, 得到丁酸产量较高的 8 株产丁酸菌, 见表 1。

#### 2.1.2 菌落及细胞形态学观察

菌株 R8 经进一步纯化后进行个体形态、菌落特征观察。菌体在 RCM 培养基上的菌落

征图和菌体形态见图 1。菌落表面黏稠, 边缘处形成白色或乳白色一圈突起, 呈不规则圆形形态, 稍突。菌体形态为直杆状、单生、革兰氏阳性、产芽孢, 芽孢中生。

#### 2.1.3 细菌 16S rRNA 基因序列测定结果

菌株 R8 的 16S rRNA 基因扩增可见单一清晰的条带, 测序结果经 BLAST 比对显示, 与多个 *Clostridium beijerinckii* 的 16S rRNA 基因序列相似度均在 99% 以上, 确定该分离株为梭菌属(*Clostridium*)的拜氏梭菌, 命名为拜氏梭菌 R8 (CB.R8) (图 2)。

### 2.2 单因素法优化拜氏梭菌培养条件

#### 2.2.1 最佳接种量

拜氏梭菌 R8 在 1%–9% 接种范围内生长, 最佳接种量为 3% (图 3A)。在该接种量下, 生长  $OD_{600}$  值大于 1, 丁酸产量相较于 7% 略有降低但不明显, 而且接种量过高容易提前进入衰亡期。

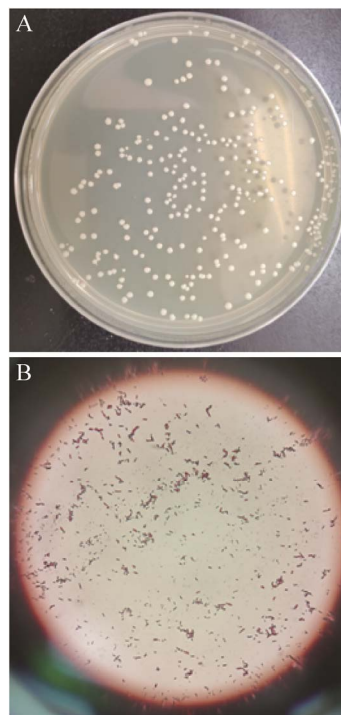


图 1 分离株的菌落特征图(A)和菌体形态图(B)  
Figure 1 Colony characteristics (A) and cell morphology (B) of isolates.

表 1 复筛菌株的初步产酸结果

Table 1 Preliminary acid production results of the rescreened strains

Strain No.	Lactic (g/L)	Formic (g/L)	Acetate (g/L)	Propionate (g/L)	Butyrate (g/L)
R8	0.04	0.02	1.23	61.58	1.97
R13	0.03	0.03	1.88	94.01	1.85
C1	0.24	0.02	1.76	88.11	1.69
R16	1.62	0.09	1.97	98.71	1.59
A4	0.09	0.03	2.10	104.82	1.58
C8	0.32	0.02	1.88	93.91	1.56
A2	0.04	0.02	1.87	93.43	1.54
D6	0.04	0.02	1.79	89.69	1.53

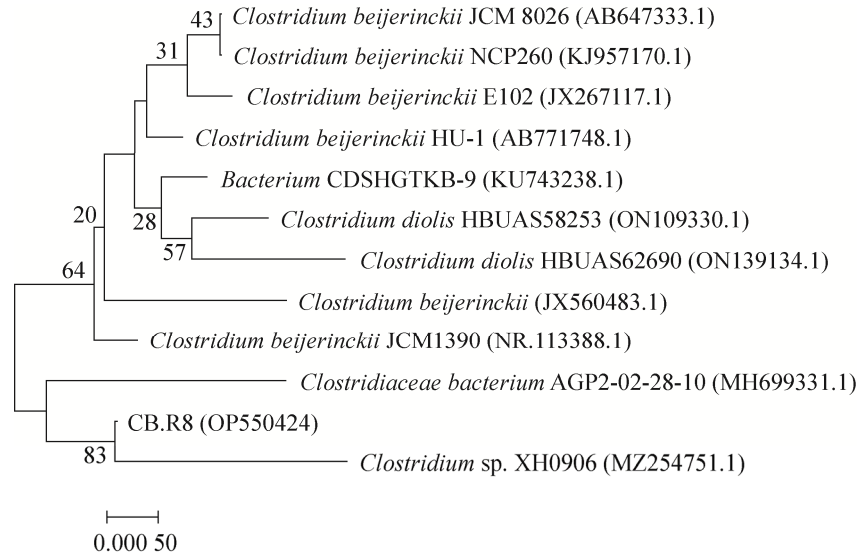


图2 拜氏梭菌 R8 (CB.R8) 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 Bootstrap 次数设置为 1 000; 括号内表示 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率; 左下角标尺表示 0.05% 的序列进化差异

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of *Clostridium beijerinckii* R8. Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; The parentheses represent the GenBank accession No.; Ruler represents 0.05% of sequence evolutionary differences.

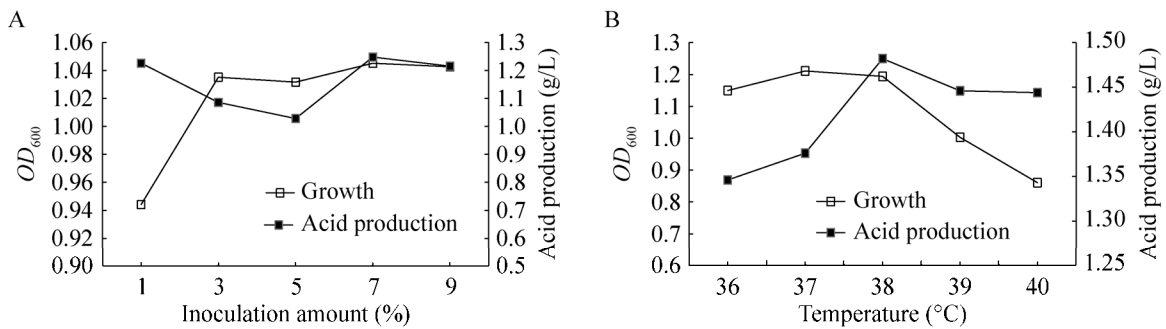


图3 不同接种量(A)和不同温度(B)条件下的生长量与丁酸产量

Figure 3 Growth and butyrate production under different inoculation amount (A) and different temperatures (B).

### 2.2.2 最佳生长温度

拜氏梭菌 R8 在 36–40 °C 范围内生长, 最佳生长温度为 38 °C (图 3B)。在该温度下, 生长  $OD_{600}$  值接近 1.2, 丁酸产量达到 1.482 g/L。

### 2.2.3 最佳生长 pH

拜氏梭菌 R8 在 pH 5.0–8.0 范围内接种生长, 最佳生长 pH 为 7.0 (图 4A), 在该生长 pH

条件下, 丁酸产量与 pH 为 6.0 的实验结果相近, 生长量优于 pH 为 6.0 的实验结果。

### 2.2.4 最佳生长时间

拜氏梭菌 R8 的时间生长曲线和产酸曲线见图 4B, 最佳生长时间为 36 h, 在 36 h 时生长量趋于平缓, 丁酸产量仍有增长。说明在 36 h 后菌株的增殖速度下降, 主要以发挥代谢功能为主。

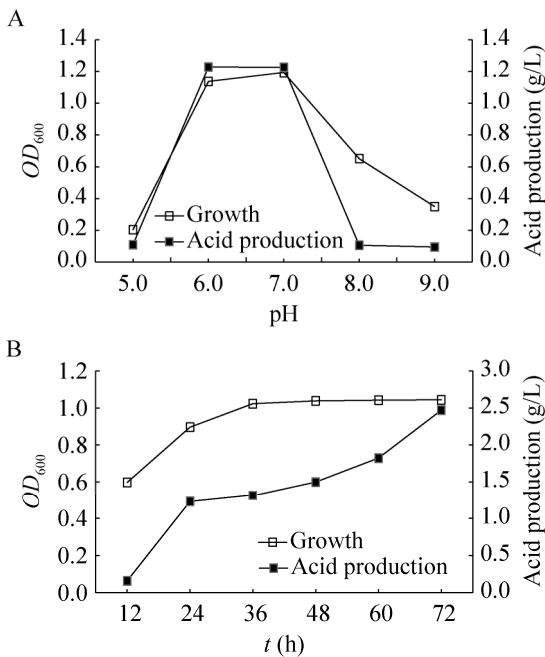


图4 不同pH(A)和不同生长时间(B)条件下的生长量与丁酸产量

Figure 4 Growth and butyrate production under different pH (A) and different time (B).

## 2.3 响应面法优化拜氏梭菌培养条件

### 2.3.1 Box-Behnken 试验因素水平

根据单因素生长特性结果,制定 Box-Behnken 试验因素水平如表 2 所示。

根据 Box-Behnken 试验因素水平表,完成响应面 29 个试验点,结果如表 3 所示。

### 2.3.2 响应面优化数据分析

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表 3 中实验数据进行二次线性回归拟合,得到回归模型

表 2 Box-Behnken 试验因素水平表

Table 2 Factor levels for Box-Behnken experiment

Factors	Coding	Low level (-1)	Intermediate level (0)	High level (1)
Inoculation amount (%)	$X_1$	1	3	5
Temperature (°C)	$X_2$	36	38	40
pH	$X_3$	6	7	8
Time (h)	$X_4$	24	48	72

表 3 Box-Behnken 试验设计的因素水平及结果  
Table 3 Factor levels and results of Box-Behnken experimental design

Experiment No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Y (butyrate production) (g/L)
1	-1	-1	0	0	0.702
2	1	-1	0	0	1.555
3	-1	1	0	0	0.660
4	1	1	0	0	1.574
5	0	0	-1	-1	2.116
6	0	0	1	-1	1.889
7	0	0	-1	1	0.056
8	0	0	1	1	0.059
9	-1	0	0	-1	0.745
10	1	0	0	-1	2.148
11	-1	0	0	1	0.033
12	1	0	0	1	0.066
13	0	-1	-1	0	1.431
14	0	1	-1	0	1.924
15	0	-1	1	0	1.920
16	0	1	1	0	1.788
17	-1	0	-1	0	0.915
18	1	0	-1	0	1.565
19	-1	0	1	0	0.745
20	1	0	1	0	1.774
21	0	-1	0	-1	2.458
22	0	1	0	-1	1.847
23	0	-1	0	1	0.055
24	0	1	0	1	0.058
25	0	0	0	0	1.732
26	0	0	0	0	1.961
27	0	0	0	0	1.598
28	0	0	0	0	1.653
29	0	0	0	0	1.587

方程:  $Y=1.71+0.41X_1-0.023X_2+0.014X_3-0.91X_4+0.015X_1X_2+0.095X_1X_3-0.34X_1X_4-0.16X_2X_3+0.15X_2X_4+0.058X_3X_4-0.46X_1^2-0.027X_2^2-4.750 \times 10^{-4}X_3^2-0.58X_4^2$ , 该方程为丁酸产量的预测响应值。为进一步确定该响应面模型拟合的数据是否有效,通过参考  $R^2$ 、 $Adj R^2$ 、 $P$  值、失拟项(lack of fit)和  $F$  值等方差分析确定模型的可行性(表 4)。由表可知,  $P$  值小于 0.000 1, 这说明该模型极显著,可信度极高;失拟项为 0.201 5 (大

于 0.05), 说明模型拟合度良好, 与响应面情况极接近, 模型建立合理; 该模型的决定系数 ( $R^2=95.94\%$ ) 与修正系数 (Adj  $R^2=91.89\%$ ) 接近, 模型预测性良好。本实验模型的变异系数 (coefficient variation,  $CV$ ) 为 17.34%, 该变异值的大小与模型的可信度成反比, 表示模型的精确度, 由标准偏差与平均值的比值得到。从丁酸产量的结果上看, 高水平 pH (1, pH 8.0) 的丁酸产量极低, 该系列的响应值影响了标准差与平均值的稳定性。综上所述, 可以利用此模型对菌株的产酸率作为响应值进行预测。

### 2.3.3 培养条件交互作用分析

利用 Design-Expert 软件对表 3 的数据进行二次多元回归拟合, 所得到的显著项二次回归方程响应面及其等高线见图 5。结合  $P$  值分析得到各培养条件之中培养时间与 pH 交互作用

最强。响应面图中曲线的弯曲程度表示结果的显著性, 等高线图呈圆形表示交互作用不显著, 呈椭圆形则表示交互作用显著, 每条曲线上丁酸产量相同, 图形颜色由蓝色变为红色表明丁酸产量由少到多, 颜色变化越深坡度越大, 即效果越显著。分析可知, 随着培养时间的增加, 响应值先增加后减少; 随着 pH 值的增加, 响应值呈先增后减变化。即当培养时间取值为 67.93–75.86 h 范围时, pH 取值为 5.87–6.62 范围时, 响应值达到最大响应区域。

### 2.3.4 响应面优化后的培养条件和丁酸产量

经过培养条件优化后的菌株在接种量为 1.22%、温度为 38.45 °C、pH 6.08 和培养时间为 64.67 h 的条件下丁酸产量为 2.479 3 g/L, 菌株在初筛阶段得到丁酸产量为 1.970 5 g/L, 优化后丁酸产量提高了 1.26 倍。

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	15.880	14	1.130	23.66	<0.000 1
$X_1$	1.990	1	1.990	41.42	<0.000 1
$X_2$	$6.075 \times 10^{-3}$	1	$6.075 \times 10^{-3}$	0.13	0.727 2
$X_3$	$2.352 \times 10^{-3}$	1	$2.352 \times 10^{-3}$	0.049	0.827 9
$X_4$	9.860	1	9.860	205.58	<0.000 1
$X_1X_2$	$9.303 \times 10^{-4}$	1	$9.303 \times 10^{-4}$	0.019	0.891 2
$X_1X_3$	0.036	1	0.036	0.75	0.401 4
$X_1X_4$	0.470	1	0.470	9.79	0.007 4
$X_2X_3$	0.098	1	0.098	2.04	0.175 5
$X_2X_4$	0.094	1	0.094	1.97	0.182 7
$X_3X_4$	0.013	1	0.013	0.28	0.607 7
$X_1^2$	1.390	1	1.390	29.00	<0.000 1
$X_2^2$	$4.633 \times 10^{-3}$	1	$4.633 \times 10^{-3}$	0.097	0.760 5
$X_3^2$	$1.464 \times 10^{-6}$	1	$1.464 \times 10^{-6}$	$3.052 \times 10^{-5}$	0.995 7
$X_4^2$	2.200	1	2.200	45.82	<0.000 1
Residual	0.670	14	0.670		
Lack of fit	0.580	10	0.580	2.42	0.201 5
Pure error	0.094	4	0.094		
Cor total	16.550	28	16.550		

$R^2=95.94\%$ , Adj  $R^2=91.89\%$ ,  $CV=17.34\%$

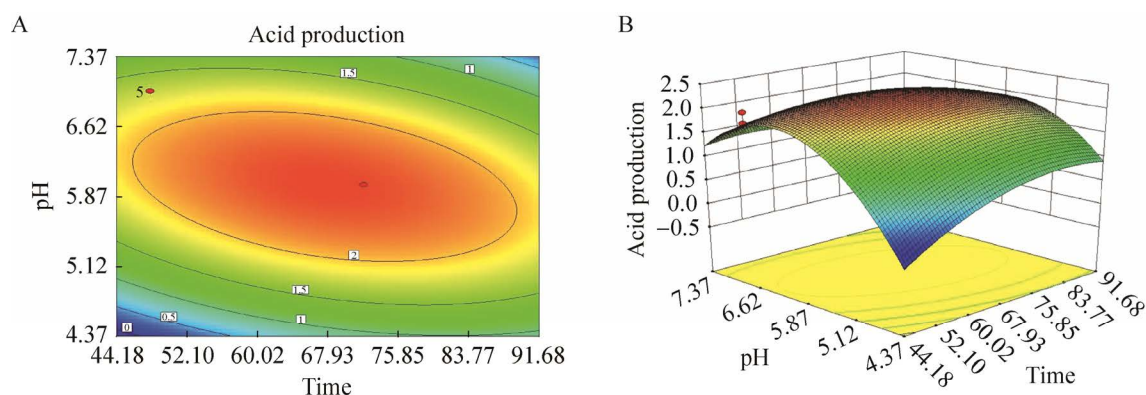


图5 培养时间和 pH 交互作用等高线(A)及响应面图(B)

Figure 5 Interaction contour (A) and response surface (B) of culture time and pH.

### 3 讨论与结论

产丁酸菌最早发现于 1930 年, McCoy 等研究得出产丁酸菌能够通过多种发酵方式(蛋白质及其衍生物的发酵、乳酸盐的发酵;碳水化合物、多元醇和糖苷的发酵)产生丁酸<sup>[7]</sup>。丁酸是结肠黏膜的主要能量来源,也是宿主细胞中基因表达、炎症、细胞分化和凋亡的重要调节剂<sup>[8]</sup>,对于维持宿主肠道健康起着关键作用。研究发现,丁酸的形成过程在细菌能量代谢中发挥了特殊作用<sup>[9]</sup>,这意味着能量代谢和微生物生态学的某些特征可能在不同产丁酸菌之间存在共享。以上结论都指出产丁酸菌在肠道菌群中具有重要的地位和意义<sup>[10-12]</sup>,但目前筛选得到的菌株其丁酸产量无法完全发挥其生物功能,产丁酸菌的菌株数据库也需要进一步扩充。

产丁酸菌的优势菌属为梭菌属,研究人员从不同生境中筛选得到的产丁酸菌多为丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)<sup>[13]</sup>,产丁酸的细菌除了丁酸梭菌外还包括普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)、罗氏弧菌(*Roseburia intestinalis*)<sup>[14]</sup>、直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)<sup>[15]</sup>和霍氏真杆菌(*Eubacterium hallii*)<sup>[16]</sup>等。其中,王腾浩等<sup>[17]</sup>和廖秀冬<sup>[18]</sup>分别筛选得到了丁酸梭菌 ZJU-F1

和丁酸梭菌 NF3,在 RCM 培养基中的丁酸产量分别为 1.87 g/L 和 1.58 g/L;方超等<sup>[19]</sup>从健康成人粪便中分离得到普拉梭菌,其丁酸产量最高为 1.4 g/L;Duncan 等<sup>[14]</sup>从健康婴儿的粪便中分离得到 5 株罗氏弧菌,其中丁酸产量最高为 1.2 g/L。本实验从绵羊瘤胃内容物中通过梭菌选择性培养基筛选得到一株丁酸产量较高的产丁酸菌,其在梭菌增殖液体培养基中丁酸的产量可达 1.97 g/L 左右,产酸结果优于前述学者研究所得结果。

拜氏梭菌是一种厌氧、杆状、产芽孢的革兰氏阳性细菌<sup>[20]</sup>,其生长温度宽泛,可利用底物范围广且无葡萄糖抑制作用,对木质纤维素水解物中的抑制剂抗性非常好<sup>[21]</sup>。本实验菌株从形态学和 16S rRNA 基因序列同源性等方面将其确定为拜氏梭菌,命名为拜氏梭菌 R8。该菌菌落表面黏稠,边缘处形成白色或乳白色一圈突起,呈不规则圆形形态,稍突。菌体形态为直杆状、单生、革兰氏阳性、产芽孢,芽孢中生。拜氏梭菌在工业生产中多用于发酵生产丁醇<sup>[22-24]</sup>,对其产丁酸的研究则鲜有报道。本实验经单因素试验与 Box-Behnken 试验得到了拜氏梭菌 R8 的最佳培养条件,在接种量为 1.22%、温度为 38.45 °C、pH 6.08 和培养时间



为 64.67 h 的条件下丁酸产量达到 2.479 3 g/L, 菌株在初筛阶段得到的丁酸产量为 1.970 5 g/L, 优化后的丁酸产量比初始的丁酸产量提高了 1.26 倍。本研究结果初步表明该菌具备潜在的应用价值, 在生物领域有广泛的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Bowring BG, Jenkins SN, Collins AM. Scouring weaner pigs have a lower abundance of butyrate-producing bacteria[J]. *Animal Production Science*, 2015, 55(12): 1448
- [2] Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2014, 63(8): 1275-1283
- [3] Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta) genomic data[J]. *mBio*, 2014, 5(2): e00889
- [4] Stewart RD, Auffret MD, Warr A, Walker AW, Roehe R, Watson M. Compendium of 4 941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8): 953-961
- [5] Barmpalia-Davis IM, Geornaras I, Kendall PA, Sofos JN. Effect of fat content on survival of *Listeria monocytogenes* during simulated digestion of inoculated beef frankfurters stored at 7 °C[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(5): 483-490
- [6] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163
- [7] McCoy E, Fred EB, Peterson WH, Hastings EG. A cultural study of certain anaerobic butyric-acid-forming bacteria[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1930, 46(2): 118-137
- [8] Chen WJ, Zhang S, Wu JF, Ye T, Wang S, Wang P, Xing DM. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis[J]. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 2020, 507: 236-241
- [9] Herrmann G, Jayamani E, Mai G, Buckel W. Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 784-791
- [10] Tye H, Yu CH, Simms LA, De Zoete MR, Kim ML, Zakrzewski M, Penington JS, Harapas CR, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Wockner LF, et al. NLRP1 restricts butyrate producing commensals to exacerbate inflammatory bowel disease[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3728
- [11] O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17057
- [12] Bui TPN, De Vos WM. Next-generation therapeutic bacteria for treatment of obesity, diabetes, and other endocrine diseases[J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021, 35(3): 101504
- [13] 刘逸凡, 蔡国林, 李晓敏, 陆健. 丁酸梭菌的筛选及其胞外多糖抗氧化性的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(5): 25-30
- Liu YF, Cai GL, Li XM, Lu J. Screening and identification of *Clostridium butyricum* and antioxidant activities of its exopolysaccharides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(5): 25-30 (in Chinese)
- [14] Duncan SH, Hold GL, Barcenilla A, Stewart CS, Flint HJ. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(5): 1615-1620
- [15] Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1802866
- [16] Koopen A, Witjes J, Wortelboer K, Majait S, Prodan A, Levin E, Herrema H, Winkelmeijer M, Aalvink S, Bergman JJGHM, et al. Duodenal *Anaerobutyricum soehngenii* infusion stimulates GLP-1 production, ameliorates glycaemic control and beneficially shapes the duodenal transcriptome in metabolic syndrome subjects: a randomised double-blind placebo-controlled cross-over study[J]. *Gut*, 2022, 71(8): 1577-1587
- [17] 王腾浩, 宗鑫, 宋德广, 汪以真. 产抑菌蛋白的丁酸梭菌的筛选和鉴定及体外益生功能研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(13): 75-81
- Wang TH, Zong X, Song DG, Wang YZ. Screening, identification and *in vitro* functional study of *Clostridium butyricum* which produce antimicrobial protein[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51(13): 75-81 (in Chinese)

- [18] 廖秀冬. 丁酸梭菌的筛选及其对动物抗氧化能力和鸡肉品质影响的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015  
Liao XD. Screening of *Clostridium butyricum* and its effects on animal antioxidation and meat quality in broiler chickens[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [19] 方超, 徐佳, 李娜, 张晓君, 申剑, 赵宇峰. 人肠道内 *Faecalibacterium prausnitzii* 的分离、鉴定及优良菌株筛选研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2866-2873  
Fang C, Xu J, Li N, Zhang XJ, Shen J, Zhao YF. Isolation, identification and excellent strain screening of *Faecalibacterium prausnitzii* in human intestinal tract[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(7): 2866-2873 (in Chinese)
- [20] 李青德, 王小芬, 孙连军. 拜氏梭菌产丁醇的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(12): 2240-2249  
Li QD, Wang XF, Sun LJ. Research progress on the butanol production by *Clostridium beijerinckii*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(12): 2240-2249 (in Chinese)
- [21] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(3): 220-227
- [22] Carrié M, Velly H, Ben-Chaabane F, Gabelle JC. Modeling fixed bed bioreactors for isopropanol and butanol production using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 immobilized on polyurethane foams[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 180: 108355
- [23] Bellido C, Loureiro Pinto M, Coca M, González-Benito G, García-Cubero MT. Acetone-butanol-ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: efficient use of penta and hexa carbohydrates[J]. Bioresource Technology, 2014, 167: 198-205
- [24] Liu J, Guo T, Wang D, Shen XN, Liu D, Niu HQ, Liang L, Ying HJ. Enhanced butanol production by increasing NADH and ATP levels in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 by insertional inactivation of Cbei\_4110[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(11): 4985-4996