



引用格式:胡晓龙,李聪聪,何培新,等.酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸发酵条件优化研究[J].轻工学报,2018,33(4):21-28.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.04.003

文章编号:2096-1553(2018)04-0021-08

酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸发酵条件优化研究

Optimization of fermentation conditions for the production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum* RL1

胡晓龙¹,李聪聪¹,何培新¹,李学思²,曹振华²,李红³

HU Xiaolong¹,LI Congcong¹,HE Peixin¹,LI Xuesi²,CAO Zhenhua²,LI Hong³

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南省宋河酒业股份有限公司,河南 鹿邑 477265;

3. 五粮液集团有限公司,四川 宜宾 644000

关键词:

浓香型白酒窖泥;酪丁酸梭菌;丁酸;发酵条件优化

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Songhe Distillery Co., Ltd., Luyi 477265, China;

3. Wuliangye Group Co., Ltd., Yibin 644000, China

Key words:

Luzhou-flavor liquor pit mud; *Clostridium tyrobutyricum*; butyric acid; optimization of fermentation condition

摘要:以从浓香型白酒窖泥中分离得到的酪丁酸梭菌 RL1 (*Clostridium tyrobutyricum* RL1) 为研究对象,采用单因素试验结合正交试验优化菌株产丁酸的发酵条件。结果表明,酪丁酸梭菌 RL1 的最优产丁酸发酵条件为:发酵培养基初始 pH = 6.8,装液量 100%,培养温度 34 °C,接种量 3% (体积分数),还原剂为硫代乙醇酸钠且其添加量为 0.5 g/L。在该发酵条件下,酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量可达 10.66 g/L,较优化前提高了 41.76%。

收稿日期:2018-06-19

基金项目:中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(2017JJ012);郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(2016BSJJ018);郑州轻工业学院大学生科技活动项目

作者简介:胡晓龙(1984—),男,河南省开封市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为白酒酿造。

通信作者:何培新(1970—),男,河南省商丘市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为发酵工程。

Abstract: The fermentation conditions of *Clostridium tyrobutyricum* RL1 isolated from Luzhou-flavor liquor pit mud for the production of butyric acid was optimized using one-factor experiment combined with orthogonal experiment. The results showed that the optimal yield of butyric acid fermentation of *Clostridium tyrobutyricum* RL1 was the initial pH value 6.8, the volume of culture media 100%, the culture temperature 34 °C, the inoculation amount 3% (volume fraction) and the dosage of the deoxidizer (sodium thioglycolate) 0.5 g/L. Under the optimal fermentation conditions, the production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum* RL1 reached 10.66 g/L, which was 41.76% higher than that before optimization.

0 引言

丁酸既是浓香型白酒中重要的呈香物质之一,又可作为浓香型白酒其他重要呈香物质(如丁酸乙酯和己酸等)的合成前体^[1-2]。此外,丁酸也是一种合成其他香料物质和精细化工产品的重要原料。丁酸及其衍生物被广泛应用于化工、食品、医药、动物饲料和化妆品等行业,全世界每年的丁酸市场需求量在 8×10^4 t 以上,具有广阔的市场^[3-8]。丁酸的生产方法主要有化学合成法和微生物发酵法。从经济角度看,以丁醛氧化法为主的化学合成法因其低廉的生产成本而具有较大优势,是目前工业化生产丁酸的主要方法^[9-10]。但是,随着化石能源的日渐枯竭和化石燃料带来的严重污染,微生物发酵法因其温和的反应条件、低污染的发酵过程和可再生性等独特优势越来越受到业界的青睐^[3,11-12]。与石油基化学法相比,微生物发酵法在未来将具有巨大的市场发展潜力。

目前,微生物发酵法生产丁酸所采用的菌株主要是厌氧细菌,包括梭菌(*Clostridium* spp.)、丁酸杆菌(*Butyribacterium* spp.)、梭杆菌(*Fusobacterium* spp.)、真杆菌(*Eubacterium* spp.)、丁酸弧菌(*Butyrivibrio* spp.)、产黑色素拟杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*)、溃蚀密螺旋体(*Treponema phagedenis*)和不解糖消化链球菌(*Peptostreptococcus asaccharolyticus*)等^[13-14]。其中以对梭菌属的酪丁酸梭菌(*C. tyrobutyricum*)和丁酸梭菌(*C. butyricum*)研究较多^[8,15]。笔者前期从河南某浓香型白酒企业的窖泥样品

中分离得到 8 种梭菌,其最高相似菌分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. indolis*, *C. kluyveri*, *C. cadaveris* 和 *C. bifermentans*^[16]。其中,酪丁酸梭菌产丁酸能力最强,丁酸梭菌次之,其他梭菌产丁酸能力相对较弱。鉴于丁酸微生物发酵法的巨大发展潜力,本研究以源自窖泥的丁酸高产菌株酪丁酸梭菌 RL1 (*C. tyrobutyricum* RL1) 为出发菌株,采用单因素试验结合正交试验优化其产丁酸的发酵条件,以期为微生物发酵法生产丁酸提供理论和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

供试菌株:酪丁酸梭菌 RL1,从河南某浓香型白酒企业窖泥中分离获得,保存于郑州轻工业学院发酵工程研究室。

种子活化培养基:梭菌增强培养基(RCM 培养基)^[17]。

发酵培养基:葡萄糖 30 g/L,蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 10 g/L,酵母膏 3 g/L,NaCl 5 g/L,醋酸钠 3 g/L,半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L, pH = 6.8,于 121 °C 条件下高压灭菌 20 min;葡萄糖单独灭菌,灭菌条件同上,在使用前与其他成分混合。

主要试剂:丁酸、2-乙基丁酸,均为色谱纯,购自日本 TCI 公司;其余试剂均为市售,分析纯。

1.2 主要仪器和设备

LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产;C-11 型厌氧产气袋,

C-41 型培养袋,日本三菱公司产;ME204E 型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司产;SHP-250 型智能生化培养箱,上海鸿都电子科技有限公司产;SW-CJ-ID 型超净工作台,苏州净化设备有限公司产;TGL-16G 型离心机,上海安亭科学仪器厂产;7820A 型气相色谱仪,HP-INNOWAX 型毛细管色谱柱(30 m × 0.255 mm × 0.25 μm),美国安捷伦公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 酪丁酸梭菌 RL1 种子制备 取 -20 °C 甘油管保藏的酪丁酸梭菌 RL1 菌种 300 μL,接种于装有 10 mL RCM 培养液的试管中,置于厌氧培养袋内,于 37 °C 条件下培养 24 h,即为一级种子。再在前期研究的基础上,以体积分数 5% 的接种量将一级种子转接至工作体积为 100 mL 的厌氧瓶中,于 37 °C 条件下培养 12 h,即为二级种子。

1.3.2 酪丁酸梭菌 RL1 生长曲线与丁酸产量曲线绘制 在前期研究的基础上,将二级种子液按体积分数 5% 的接种量接种至盛有 95 mL 已灭菌的 RCM 培养液(pH = 6.8)的厌氧瓶中,于 37 °C 条件下厌氧静置培养。分别测定培养 0 h,4 h,6 h,8 h,10 h,12 h,16 h,20 h,24 h,28 h,32 h,36 h,40 h,44 h 和 48 h 发酵液的菌体浓度(600 nm 波长处的 OD 值),绘制酪丁酸梭菌 RL1 的生长曲线。同时,测定培养 0 h,8 h,16 h,24 h,36 h 和 48 h 发酵液中的丁酸浓度,绘制酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量曲线。

1.3.3 发酵液中丁酸浓度测定

1.3.3.1 丁酸标准曲线绘制 采用一元线性回归分析方法绘制丁酸标准曲线^[18]。准确称取 2.500 0 g 丁酸于容量瓶中,并用 RCM 培养基定容至 50 mL,配制成质量浓度为 50 mg/mL 的丁酸母液,分别量取 0.1 mL,0.2 mL,0.5 mL,1.0 mL 和 1.6 mL 丁酸母液于干净的 10 mL 容量瓶中,并向每个容量瓶加 40 μL 的 2-乙基丁酸作为内标,

用 RCM 液体培养基定容至刻度线,分别配制成质量浓度为 0.5 mg/mL,1.0 mg/mL,2.5 mg/mL,5.0 mg/mL 和 8.0 mg/mL 的丁酸标准溶液,经乙醚萃取和孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后上样色谱柱。以标准溶液的浓度为纵坐标,丁酸与 2-乙基丁酸的峰面积比为横坐标,绘制丁酸标准曲线。

1.3.3.2 待测液预处理 吸取 15 mL 发酵液,于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取 10 mL 上清液,加 25 μL 质量浓度为 72% 的 H₂SO₄ 进行酸解,释放有机酸,再加 40 μL 2-乙基丁酸作为内标并充分混匀,经乙醚萃取和孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤即得待测液。

1.3.3.3 气相色谱条件确定 采用气相色谱仪进行发酵液中丁酸浓度检测。色谱条件参照陈兴杰等^[19]报道的条件并稍作修改,即进样口温度 200 °C,柱箱起始温度 100 °C,保持 1 min;以 10 °C/min 的升温速率升至 220 °C,保持 2 min;检测器温度 250 °C;气体流量: H₂ 35 mL/min,空气 400 mL/min,尾吹气 20 mL/min;进样方式为分流进样,分流面积比为 20:1;进样体积 1 μL。

1.3.4 单因素试验

1.3.4.1 最适接种量的确定 分别以体积分数为 1%,3%,5%,7% 和 9% 的接种量将活化好的二级种子液接入已灭菌的发酵培养基中(每组试验 3 个平行,下同),于 37 °C 条件下培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度。

1.3.4.2 最适装液量的确定 设厌氧瓶最大工作体积为 100%,分别向厌氧瓶中装入工作体积为 30%,50%,80% 和 100% 的发酵培养基,以 3% (以下若无特殊说明,均指体积分数) 的接种量接入二级种子液,于 37 °C 条件下恒温培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度。

1.3.4.3 最适培养温度的确定 向装液量为 100% 的发酵培养基中,以 3% 的接种量接入二

级种子液,分别于 26 ℃,30 ℃,32 ℃,34 ℃,36 ℃,37 ℃,40 ℃和 44 ℃条件下培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度.

1.3.4.4 最适发酵培养基初始 pH 值的确定

用浓度为 3 mol/L 的 HCl 和 6 mol/L 的 NaOH 溶液将培养基初始 pH 值分别调为 4.0,5.0,6.2,6.5,6.8,7.1,7.4,7.7,8.0 和 9.0,以 3% 的接种量接入二级种子液,于 32 ℃条件下恒温培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度.

1.3.4.5 最适还原剂的确定

选择半胱氨酸盐,FeSO₄,硫代乙醇酸钠,Na₂SO₃ 和 Na₂S 5 种还原剂作为发酵液中的除氧剂,其初始添加量均为 0.5 g/L,以 3% 的接种量接入二级种子液,发酵培养基装液量为 100%,于 32 ℃条件下培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度.

1.3.4.6 最适还原剂添加量的确定

依据最适还原剂的确定试验结果,分别以 0 g/L,0.1 g/L,0.5 g/L,1.0 g/L,2.0 g/L,4.0 g/L,8.0 g/L,10 g/L 和 12 g/L 的添加量将最适还原剂加入发酵培养基中,以 3% 的接种量接入二级种子液,发酵培养基装液量为 100%,于 32 ℃条件下培养 48 h,测定各发酵液中的丁酸质量浓度.

1.3.5 正交试验

在单因素试验的基础上,采用正交试验优化酪丁酸梭菌 RL1 在静置培养条件下获得最优丁酸产量的发酵条件.本试验选取培养温度(A)、发酵培养基初始 pH 值(B)和装液量(C)3 个对丁酸合成影响较大的因素,综合其最佳条件设计 L₉(3³)正交试验,以确定在上述 3 个因素的作用下酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸的最优组合.表 1 为正交试验因素水平表.

1.3.6 数据分析

采用单因素方差分析方法(ANOVA)比较同一发酵培养条件下的不同水平对酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸能力的显著性影响($P < 0.05$ 为影响显著,否则为不显著).

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	因素		
	A/℃	B	C/%
1	32	6.5	50
2	34	6.8	80
3	36	7.1	100

2 结果与分析

2.1 丁酸标准曲线

按实验方法中的步骤绘制的丁酸标准曲线见图 1,其回归方程为 $y = 5.9716x + 0.4495$,其相关系数 R^2 为 0.9987,表明该曲线纵横坐标所代表的参数具有较好的相关性,可以准确定量发酵液中丁酸的质量浓度.

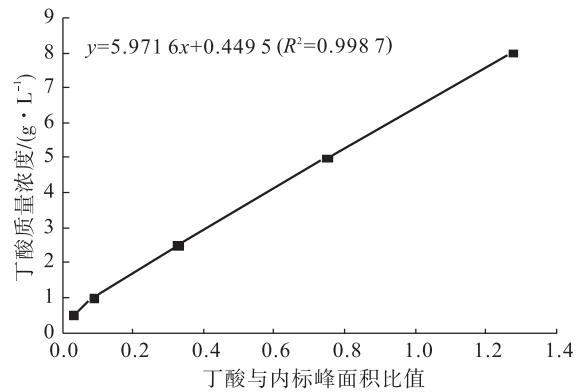


图 1 丁酸标准曲线

Fig. 1 The standard curve of butyric acid

2.2 酪丁酸梭菌 RL1 生长曲线与丁酸产量曲线

酪丁酸梭菌 RL1 生长曲线与丁酸产量曲线见图 2.由图 2 可知,酪丁酸梭菌 RL1 的发酵培养生长过程可以分为三个阶段:0~4 h 内生长缓慢,4~16 h 内快速增殖,16 h 后该菌体生长趋于稳定,菌体浓度在 32 h 达到最大值,表明该菌株的生长曲线具有典型的延滞期、对数期和稳定期.发酵液中丁酸浓度在 8~24 h 呈快速增长趋势,24 h 后增幅缓慢,趋于平稳.酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的动力学模型为生长偶联型,这对今后利用该菌株高产丁酸具有指

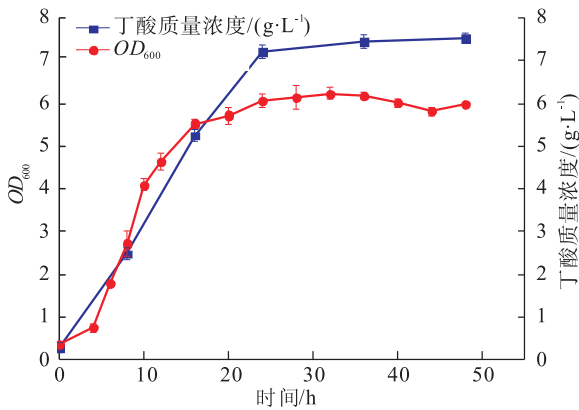


图2 酪丁酸梭菌 RL1 生长曲线与丁酸产量曲线

Fig. 2 Growth curve and butyric acid production curve of *Clostridium tyrobutyricum* RL1

导意义,即可采用有利于细胞生长的培养条件并适当延长该菌株的对数生长期。

2.3 单因素试验结果与分析

接种量、装液量、培养温度、发酵培养基初始 pH 值、还原剂和最适还原剂添加量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响试验结果见图 3。其中,曲线上方不同小写字母表示不同条件下存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3.1 接种量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 接种量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响见图 3a)。总体上讲,接种量对酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸能力影响较小。随着接种量增加,该菌株的丁酸产量先升高,然后下降并逐渐趋于稳定。当接种量为 3% 时,发酵液中的丁酸质量浓度最大,达到 8.24 g/L。因此,酪丁酸梭菌 RL1 的最适接种量为 3%。

2.3.2 装液量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 装液量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响见图 3b)。菌株在不同装液量条件下培养获得的丁酸产量存在显著差异($P < 0.05$):当装液量为 30% 时,发酵液中丁酸质量浓度仅为 0.50 g/L,显著低于其他装液量时的丁酸产量;随着装液量的增加,丁酸质量浓度显著提高,当装液量为 50% 时,丁酸质量浓度为 6.86 g/L,

约为装液量 30% 时的 14 倍;当装液量大于 50% 时,丁酸的生成量仍一直增加,但增幅越来越小;当装液量为 100% 时,发酵液中丁酸质量浓度达到最大值 8.24 g/L。酪丁酸梭菌 RL1 发酵时的丁酸产量之所以随装液量增加而增加,这主要是由于该菌株通过厌氧发酵产生丁酸,厌氧瓶中的 O_2 含量随着装液量的增加而减少,进而导致装液量多的培养基中氧化还原电位相对较低,有利于该菌株的生长繁殖;同时,该菌株在生长过程中产生大量的气体,更易将发酵瓶中的残氧通过输液管排出,能更快地为该菌株提供一个厌氧环境。因此,选取 100% 的装液量为最适装液量。

2.3.3 培养温度对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 培养温度对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响见图 3c)。在不同的培养温度下,该菌株的丁酸产量差异显著($P < 0.05$),并且随温度升高呈先上升后下降的趋势。30 ~ 37 °C 为丁酸发酵的适宜温度区间,在 32 °C 时丁酸产量达到最大值 8.92 g/L。而培养温度高于 37 °C 或低于 30 °C 时发酵液中丁酸质量浓度均显著下降($P < 0.05$),表明过高或过低的培养温度对酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸合成代谢均有显著影响。此外,与文献报道的 *C. tyrobutyricum* ATCC25755 等菌株最适发酵丁酸温度不同^[20-21],酪丁酸梭菌 RL1 最适产丁酸温度为较低的 32 °C,这可能是由于该菌株经过较低温度环境的窖泥窖池长期驯化,已具有了与 *C. tyrobutyricum* ATCC25755 等其他菌株不同的生理特征所致。因此,选取 32 °C 为最适培养温度。

2.3.4 发酵培养基初始 pH 值对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 发酵培养基初始 pH 值对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响见图 3d)。在发酵过程中,pH 值可以通过影响培养基中营养物质的解离和吸收、细胞膜通透性与胞内外酶活性等,进而影响微生物的生长和代谢活力。

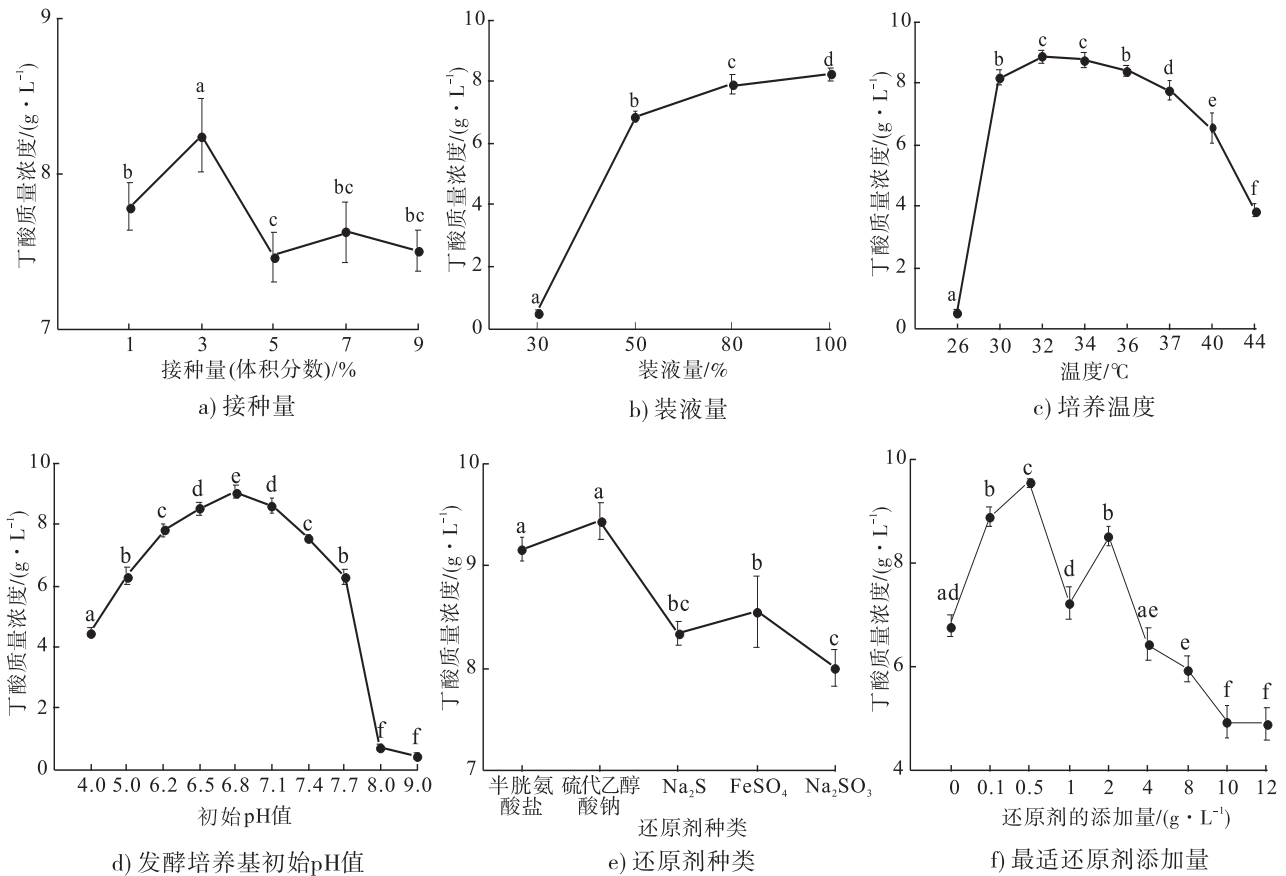


图3 酪丁酸梭菌 RL1 发酵单因素试验结果

Fig. 3 Single factor experiment analysis of fermentation conditions of *Clostridium tyrobutyricum* RL1

由图 3d)可知,酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量随培养基初始 pH 值升高呈先上升后下降的趋势,当 pH 值为 6.5~7.1 时,丁酸产量显著较高(>8 g/L),其中当 pH 值为 6.8 时,丁酸质量浓度达到最大值 9.05 g/L.此外,相对于碱性环境(pH > 7.7),该菌株在酸性环境(pH = 4.0)能产生更多的丁酸,此时丁酸质量浓度约为 pH 值为 8.0 时的 6 倍.综上,酪丁酸梭菌 RL1 在酸性(4.0 < pH < 7.0)环境下较碱性(pH > 7.7)环境下的丁酸产量明显更高,菌株在近中性 pH 条件下也能合成较多丁酸,且最适 pH 值为 6.8.因此,选取 pH 值为 6.8 为最适发酵培养基初始 pH 值.

2.3.5 还原剂对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 还原剂对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的

影响见图 3e).厌氧条件是保证酪丁酸梭菌 RL1 进行生长繁殖和丁酸发酵的重要前提,因此,添加合适的还原剂可以降低培养基中溶解氧的浓度,促进菌株生长和代谢产物丁酸的生成.由图 3e)可知,5 种还原剂对丁酸生成量的影响大小依次为:硫代乙醇酸钠 > 半胱氨酸盐 > FeSO₄ > Na₂S > Na₂SO₃,当硫代乙醇酸钠作为还原剂时发酵液中丁酸质量浓度最大,为 9.43 g/L.因此,选取硫代乙醇酸钠为最适还原剂.

2.3.6 最适还原剂添加量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响 最适还原剂硫代乙醇酸钠的添加量对酪丁酸梭菌 RL1 合成丁酸的影响见图 3f).酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量随硫代乙醇酸钠添加量的升高呈现先上升后下降的趋

势,当添加剂量为 0.5 g/L 时,丁酸质量浓度达到最大值,为 9.53 g/L. 因此,选取 0.5 g/L 为还原剂硫代乙醇酸钠的最适添加量.

2.4 正交试验结果

在单因素试验的基础上,采用 $L_9(3^3)$ 正交试验优化菌株的发酵培养条件,正交试验设计方案与结果见表 2.

表 2 正交试验设计方案与结果

Table 2 Orthogonal test design scheme and results

试验号	因素			丁酸质量浓度/ (g · L ⁻¹)
	A	B	C	
1	1	1	1	8.67
2	1	2	2	9.63
3	1	3	3	7.94
4	2	1	2	9.48
5	2	2	3	10.66
6	2	3	1	7.69
7	3	1	3	9.58
8	3	2	1	8.02
9	3	3	2	8.64
K_1	26.24	27.73	24.38	
K_2	27.83	28.31	27.75	
K_3	26.24	24.27	28.18	
k_1	8.75	9.24	8.13	
k_2	9.28	9.44	9.25	
k_3	8.75	8.09	9.40	
R	0.53	1.35	1.27	

由表 2 可知,以发酵液中丁酸浓度为指标,通过极差分析确定各影响因素的主次顺序为:发酵培养基初始 pH 值 > 装液量 > 培养温度,最优组合为 $A_2B_2C_3$,即当发酵培养基初始 pH 值为 6.8,装液量为 100%,培养温度为 34 ℃ 时,酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸能力最强. 综合单因素试验和正交试验结果可知,酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸的最优发酵条件为:发酵培养基初始 pH = 6.8,装液量 100%,培养温度 34 ℃,接种量 3%,还原剂为硫代乙醇酸钠且其添加量为 0.5 g/L. 优化后发酵液中的丁酸质量浓度可达 10.66 g/L,较优化前的 7.52 g/L 提高了 41.76%.

3 结论

本文以源自浓香型白酒窖泥的酪丁酸梭菌 RL1 为出发菌株,分别考察接种量、装液量、培养温度、发酵培养基初始 pH 值、还原剂及其添加量 6 个因素,采用单因素试验结合正交试验对菌株产丁酸的发酵条件进行了优化研究. 酪丁酸梭菌 RL1 产丁酸的最优发酵条件为:发酵培养基初始 pH = 6.8,装液量 100%,培养温度 34 ℃,接种量 3%,还原剂为硫代乙醇酸钠且其添加量为 0.5 g/L. 在该发酵条件下,酪丁酸梭菌 RL1 的丁酸产量可达 10.66 g/L,较优化前提高了 41.76%,其产丁酸条件的优化效果显著.

本研究有望缓解化石能源日渐枯竭和化石燃料严重污染带来的压力,为运用微生物发酵法生产丁酸提供理论与技术支持,从而推进微生物发酵法生产丁酸的产业化进程.

参考文献:

- [1] FAN W, QIAN M C. Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21 (2): 333.
- [2] WEIMER P J, STEVENSON D M. Isolation characterization and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94 (2): 461.
- [3] WANG J, LIN M, XU M, YANG S T. Anaerobic fermentation for production of carboxylic acids as bulk chemicals from renewable biomass [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2016, 156: 323.
- [4] LUO H, GE L, ZHANG J, et al. Enhancing butanol production under the stress environments of co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with

- exogenous butyrate addition [J]. Plos One, 2015, 10(10):e0141160.
- [5] LUO H, ZENG Q, HAN S, et al. High-efficient *n*-butanol production by co-culturing *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae* integrated with butyrate fermentative supernatant addition [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2017, 33(4):76.
- [6] RICHTER H, QURESHI N, HEGER S, et al. Prolonged conversion of *n*-butyrate to *n*-butanol with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* in a two-stage continuous culture with in-situ product removal [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(4):913.
- [7] TASHIRO Y, TAKEDA K, KOBAYASHI G, et al. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2004, 98(4):263.
- [8] 周丽春. 米糠纤维床反应器固定化发酵产丁酸的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [9] MAITI S, BRAR S K, VERMA M, et al. Chapter 7—butyric acid: A platform chemical for biofuel and high-value biochemicals [M] // Brar S K, Sarma S J, Pakshirajan K. Platform Chemical Biorefinery. Amsterdam: Elsevier Inc, 2016: 119.
- [10] YANG X, TANG S, LU T, et al. ChemInform abstract: sulfonic acid resin—Catalyzed oxidation of aldehydes to carboxylic acids by hydrogen peroxide [J]. Journal of Energy Chemistry, 2013, 44(4):659.
- [11] IVAN B, PETER W. Microbial production of short chain fatty acids from lignocellulosic biomass: Current processes and market [J]. Biomed Research International, 2016 (1): 8469357.
- [12] REPHAELI A, ZHUK R, NUDELMAN A. Pro-drugs of butyric acid from bench to bedside: Synthetic design mechanisms of action and clinical applications [J]. Drug Development Research, 2010, 50(3/4):379.
- [13] ZIGOVA J, STURAIK E. Advances in biotechnological production of butyric acid [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 24(3):153.
- [14] 邓名荣, 郭俊, 朱红惠. 微生物催化生产丁酸研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3):117.
- [15] 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.
- [16] 何培新, 李聪聪, 胡晓龙, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的浓香型白酒窖泥中可培养 *Clostridium* spp. 挥发性代谢物成分分析 [J]. 轻工学报, 2017, 32(6):1.
- [17] HU X L, DU H, XU Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214:116.
- [18] 于平, 陈凯飞, 朱祺, 等. 重组大肠杆菌生物合成 γ -氨基丁酸的发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2018(6):112.
- [19] 陈兴杰, 吴攀攀, 徐敏瑞, 等. 窖泥己酸菌和丁酸菌联合接种发酵液有机酸检测与分析 [J]. 酿酒, 2017, 44(3):60.
- [20] 项宜娟. 纤维床固定化酪丁酸梭菌产丁酸的研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2010.
- [21] 高振, 江凌, 朱丽英, 等. 纤维床固定化酪丁酸梭菌发酵大薯渣水解液生产丁酸的研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(33):16302.