

一株乳酸利用、丁酸产生菌的分离与鉴定及代谢特性的初步研究

刘 威, 朱伟云*, 姚 文, 毛胜勇

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室 南京 210095)

摘 要 利用改进型 Hungate 技术从猪粪中分离到一株乳酸利用、丁酸产生双重功能菌株 LB01。常规生化检测表明菌株 LB01 为革兰氏阳性、严格厌氧菌,能利用葡萄糖、果糖、麦芽糖和乳酸等碳源,并产生大量的气体;16S rRNA 序列比对表明其与 GenBank 中的 *Megasphaera hominis* 与 Uncultured rumen bacterium 3c3d-18 的同源性最高,同源性高达 99%。菌株 LB01 可以利用乳酸,并将其主要转化为丁酸和丙酸,在有葡萄糖的情况下,菌株 LB01 尚能够利用乙酸并生成丁酸。与乳杆菌 K9 共培养时,菌株 LB01 有效地利用了乳杆菌 K9 代谢过程中产生的乳酸,减缓了由于乳酸积累而造成的 pH 值下降,并且将乳酸转化为丁酸和丙酸。这些代谢特征表明菌株 LB01 是一株具有潜在应用价值的肠道益生菌,它能够利用乳酸和乙酸(补充额外能量),能有效地防止乳酸和乙酸的积累,同时生成包括丁酸在内的有益的短链脂肪酸,调控后肠道 pH,营造着微酸的环境。

关键词: 巨球形菌;乳酸;丁酸;交互饲喂;后肠道

中图分类号: Q935 Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0435-06

高等哺乳动物与人的肠道,特别是后肠道,栖生着种类众多且数量高达 10^{14} 的正常肠道微生物,这些肠道微生物与宿主构成了一个共生复合体,对宿主健康具有重要的意义^[1,2]。

在代谢上,肠道微生物之间存在着交互饲喂(cross-feeding),即一群微生物产生的代谢中间产物能够作为另一群微生物利用的底物。动物后肠存在着大量的乳酸产生菌,例如乳酸杆菌、双歧杆菌等,它们利用小肠未完全吸收的葡萄糖及利用未被小肠消化的多/寡糖,可以产生大量乳酸,但是在健康动物和人的粪便中却几乎检测不到乳酸,暗示了乳酸可能被利用而转化成其它物质。Bourriaud 等^[3]利用标记乳酸来研究乳酸的转化,发现乳酸被肠道菌主要地转化为丁酸。但是这种乳酸产生与利用之间的相对平衡在动物发生腹泻时易遭到破坏,加之乳酸不能像短链脂肪酸那样被后肠上皮细胞很好地吸收,乳酸便在后肠内迅速积累,所以腹泻粪便中乳酸的含量常高达 $20\text{mmol/g}^{[4]}$,乳酸的积累易导致动物机体酸中毒。研究进一步发现,腹泻动物体内的乙酸和丙酸浓度几乎没有变化,而丁酸浓度通常会急剧降低^[5]。因此,乳酸积累和丁酸含量降低可能是诱发后肠道疾病和功能失调的重要因素之一。

Bourriaud 等^[3]研究结论不仅阐明了乳酸在后肠里的代谢途径,同时为分离肠道乳酸利用、丁酸产生菌提供了一个策略。现有的分离丁酸菌方法大多数使用了 Barcenilla 等^[6]报道的方法,该方法在培养基中添加了大量的葡萄糖和瘤胃液,由于葡萄糖和瘤胃液能广泛地支持多种肠道微生物的生长,因此该方法不利于分离特定的丁酸产生菌,因此分离丁酸产生菌的成功机率偏小。本研究通过改进 Barcenilla 等报道的丁酸菌分离方法,利用了补充乳酸作为唯一碳源的 YCFA 培养基(详细方法见下),分离到一株乳酸利用、丁酸产生双功能菌。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Taq 酶、pGEM-T 载体(Promega);序列测序、引物合成(Invitrogen);PCR 仪(Biometra,德国);Qiaquick PCR 产物纯化试剂盒(申能博彩);PH-HJ90B 酸度计(Eutechinst,新加坡);葡萄糖试剂盒、乳酸试剂盒(南京建成);GC-14B 型气相色谱仪(日本岛津公司)

1.2 肠道菌的分离方法

1.2.1 材料与取样 取新鲜成年猪粪 1g,用 5mL 生理盐水稀释混匀,在通入 CO_2 气流条件下,将混合

基金项目: 国家“973 项目”——国家重大基础研究发展规划项目(2004CB117500-4),国家杰出青年科学基金(30025034)

* 通讯作者。Tel: 86-25-84395523 Fax: 86-25-84395314 E-mail: zhuweiyun@njau@hotmail.com

作者简介: 刘 威(1982-)男,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事消化道微生物研究。E-mail: wei1998@sina.com

收稿日期: 2006-11-17 接受日期: 2007-01-25 修回日期: 2007-03-07

液通过三层纱布过滤,滤去粪便中固体残渣。

1.2.2 富集培养:取 1mL 滤液接种到滚管中,其中装有 4.5mL YCFA 培养基,并补充 0.25%(W/V)乳酸作为唯一碳源。YCFA 培养基营养成分及配制方法参考文献^[7],调整 pH5.8~6.1。在 37℃ 下富集培养 4~5 代,每间隔 24h 传代一次。

1.2.3 挑菌和纯化:取第 5 代 24h 发酵液梯度稀释至 10^{-12} ,选择 10^{-8} ~ 10^{-12} 稀释度作为接种梯度,利用 Hungate 技术分离细菌,详细方法参见文献^[8],按上述方法,进一步纯化单株菌 3~4 次,以获得纯的菌株。

1.2.4 丁酸产生菌的筛选:利用气相色谱仪检测单株菌 24h 发酵液中短链脂肪酸产量,筛选高产丁酸菌株,检测方法参见文献^[9]。

1.3 细菌的鉴定

1.3.1 形态和生化鉴定:革兰氏染色法,光学显微镜观察;在有氧条件下培养,判断其对 O_2 的敏感性;利用补充不同碳源 YCFA 培养基厌氧培养,通过 OD_{600} 值检测细菌生长状况,判断其利用各种碳源的能力。

1.3.2 分子生物学鉴定:DNA 的提取及 PCR 扩增,16S rRNA 的克隆与测序方法参见文献^[10]。将 16S rRNA 序列递交 GenBank,获取登录号。从 GenBank 数据库中下载相关 9 株菌的 16S rRNA 序列,通过 CLUSTAL X 等软件与分离菌株的 16S rRNA 序列进行比对、分析,基于 16S rRNA 的同源性,使用 MEGA 软件中 Neighbour-Joining 法绘制进化树。

1.4 体外发酵试验和共培养试验

分别添加或组合添加乳酸、乙酸和葡萄糖到 YCFA 培养基,菌种接种比例为 2.5%(V/V),进行批次发酵试验,研究该菌株的代谢性质;选择乳杆菌 K9(本实验室分离)与其进行共培养试验,研究与乳

酸产生菌的共培养状况。

1.5 统计方法

本发酵试验重复 3 次,以每组数据的平均值进行数据统计,采用 *t* 检验。

2 结果和讨论

2.1 细菌的分离与筛选

利用改进型 Hungate 技术共计挑菌 28 株,24h 发酵终产物经气相色谱检测,筛选出一株高产丁酸菌,将其命名为菌株 LB01,丁酸产量在 24h 发酵液中大于 10mmol/L。

2.2 细菌的鉴定

2.2.1 形态特征及生化鉴定:菌落在补充葡萄糖 YCFA 固体培养基上呈圆形,表面凹凸不平,淡褐色,镜检呈革兰氏阳性,无芽胞,菌体圆球型,成对居多,偶尔成链及葡萄串状;严格厌氧,能利用葡萄糖、果糖、乳酸、麦芽糖等碳源,并产生大量气体和有机酸,其中以果糖和乳酸的利用效果为最好,优于葡萄糖,但不能利用甘露糖、阿拉伯糖、甘露醇、葡萄糖酸、甘油、乙酸、蔗糖、纤维二糖、核糖、木糖、乳糖、松三糖等。菌株 LB01 与《伯杰细菌鉴定手册》中的巨球型菌属(*Megasphaera*)的细菌特征相似。

2.2.2 分子生物学鉴定:16S rDNA 共计测出的有效长度为 1545bp,在 GenBank 中的登录号为 EF053126,与亲缘关系最近的 9 株细菌的系统进化树见图 1。菌株 LB01 属于巨球型菌属,与 Uncultured rumen bacterium 3c3d-18 和分离于人结肠的 *M. hominis* (unpublished) 关系最紧密,位于同一分枝中,同源性高达 99%,并与 *M. elsdenii* 也有着较近的亲缘关系,说明来自于人、猪及反刍动物的巨球型菌具有很高的同源性。但该菌株目前尚不能定种,还需要与模式种进行 DNA-DNA 同源性杂交,再根据同源性

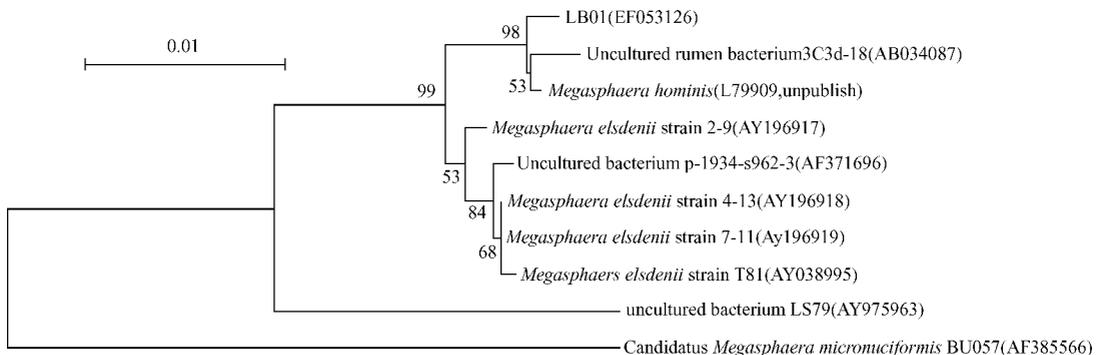


图 1 菌株 LB01 与相关细菌的进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain LB01 and related bacteria. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage support. <http://journals.im.ac.cn>

结果方能定论。

2.3 代谢性质

2.3.1 乳酸的利用特性：菌株 LB01 在补充乳酸 YCFA 培养基迅速地生长,说明了乳酸可以支持菌株 LB01 的生长。分别测定 0h、3h、6h、9h、12h 和 24h 发酵液中乳酸的浓度,结果显示菌株 LB01 几乎在 9h 之内就消耗掉添加的乳酸(图 2-A),24h 发酵终产物主要为丁酸和丙酸(表 1)。菌株 LB01 在乳酸 YCFA 培养基中比在葡萄糖 YCFA 培养基中生长迅速(数据未显示),暗示乳酸是其优先利用的底物。当在 YCFA 培养基中同时加入乳酸和葡萄糖时,发现乳酸被优先地利用,乳酸的耗尽才促进葡萄糖的

利用(图 2-B),进一步证实了乳酸是菌株 LB01 偏爱利用的碳源。

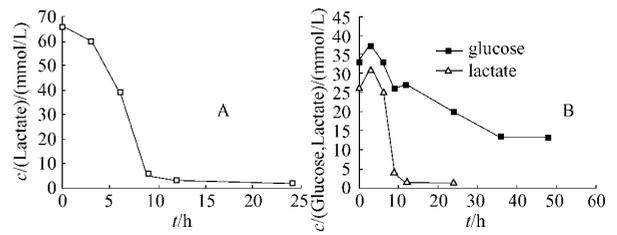


图 2 乳酸浓度(A)和乳酸-葡萄糖的浓度(B)对发酵时间的曲线图

Fig. 2 The curve of lactate concentration(A) and lactate-glucose concentration(B) and fermentation time.

表 1 菌株 LB01 在不同碳源 YCFA 培养基及共培养中短链脂肪酸的产量^a

Table 1 Fermentation end-products of strain LB01 on separated and co-cultured media supplemented with specified carbon source

	fructose	maltose	lactate	glucose	Glucose + lactate	Glucose + acetate	coculture
acetate	-0.48 ± 0.02	-2.37 ± 1.17	2.92 ± 0.10	-14.03 ± 0.84	33.86 ± 0.95	-45.61 ± 0.37	2.55 ± 0.04
propionate	— ^b	—	9.42 ± 0.64	—	11.18 ± 0.77	—	4.06 ± 0.51
butyrate	12.12 ± 0.87	10.48 ± 0.33	6.40 ± 0.07	6.47 ± 0.53	20.65 ± 2.09	35.86 ± 0.51	12.11 ± 1.13
n-valerate ^c	0.64 ± 0.14	1.30 ± 0.27	5.09 ± 0.16	0.43 ± 0.09	8.46 ± 1.37	8.46 ± 1.37	2.05 ± 0.21

a Change in concentration = the final concentration at 24h - the initial concentration at 0h. Negative value means substrate is utilized. Concentrations are the means of three values (s.d.); b value can not be detected in samples; c n-valerate comprises of valerate and isovalerate.

2.3.2 不同起始 pH 的影响：高等哺乳动物后肠道生理 pH 通常介于 5.8 ~ 6.1 之间,当 pH 低于 5.5 时,动物机体易出现亚急性酸中毒,当 pH 低于 5.2 时,动物机体易出现急性酸中毒。利用乳酸作为碳源,分别设定 5.8、5.0、4.7、和 4.5 四个 pH 梯度,体外模拟后肠正常、酸中毒,以研究菌株 LB01 的代谢特性。结果表明除了在 pH4.5 时起初 9h 的生长略微缓慢之外,菌株 LB01 在其余各个 pH 梯度均能很好地生长,生长与生理 pH 的无差异(数据未显示)。在酸中毒 pH 条件下,菌株 LB01 仍然能够生长,并伴随着发酵液 pH 的升高,发酵 24h 之后各试验组 pH 超过亚急性酸中毒的阈值(图 3),但对生理 pH

的影响不显著。这一方面说明了菌株 LB01 具有很强的耐酸能力,另一方面说明了菌株 LB01 有较强的调控肠道 pH 能力,尤其是迅速地升高酸中毒时肠道 pH,始终保持着后肠微酸的生理环境。

2.3.3 乙酸的利用：菌株 LB01 在乙酸 YCFA 培养基中不能生长,但在乙酸 YCFA 培养基中添加葡萄糖时,其生长比葡萄糖对照组生长好,暗示了乙酸可能参与该菌的某些生理代谢。气相色谱结果表明,24h 发酵液中乙酸的浓度下降,丁酸浓度显著地高于葡萄糖对照组 ($P < 0.01$,表 1)。据研究报道,许多丁酸产生菌可以通过乙酰 CoA :丁酰 CoA 转酰基路径生成丁酸,并且是丁酸生成的主要路径^[11],因此菌株 LB01 体内也可能存在这条路径。后肠内乙酸产生菌的数量庞大,乙酸浓度相对较高,在肠道发生疾病情况下,乙酸与乳酸类似,也易在肠道内积累,造成机体酸中毒,因此菌株能够利用乙酸合成丁酸的特性可以减轻乙酸积累带来的不良后果。

2.3.4 菌株 LB01-乳杆菌 K9 共培养：为了模拟小肠吸收葡萄糖失调时大量葡萄糖进入后肠的病理情况,用添加 0.8% 葡萄糖的 YCFA 培养基分别接种菌株 LB01、乳杆菌 K9 及同时接种菌株 LB01 和乳杆菌 K9。与乳杆菌 K9 单独接种组相比,混合培养组有

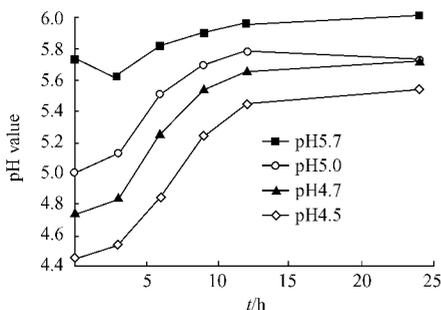


图 3 起始不同 pH 和发酵时间的变化曲线图

Fig. 3 The curve of initially various pH and fermentation time.

效地减缓了发酵液 pH 的下降,并且显著地降低发酵液中乳酸浓度(图4)24h 发酵终产物主要为丁酸和丙酸(表1)。利用 MRS 涂板计数乳杆菌 K9,单独培养与混合培养的乳杆菌 K9 数量分别为 6.6×10^8 CFU/mL 和 9.6×10^8 CFU/mL,混合培养组乳杆菌的数量比乳杆菌 K9 组略高,说明了混合组乳酸浓度的降低不是因为菌株 LB01 抑制了乳酸菌 K9 的生长,而是消耗掉了乳酸菌 K9 产生的乳酸。混合培养试验结果表明菌株 LB01 可以与乳酸产生菌共同生长,并且利用乳酸产生菌产生的乳酸,体现出交互饲养关系,并防止了乳酸积累和调控着肠道 pH。

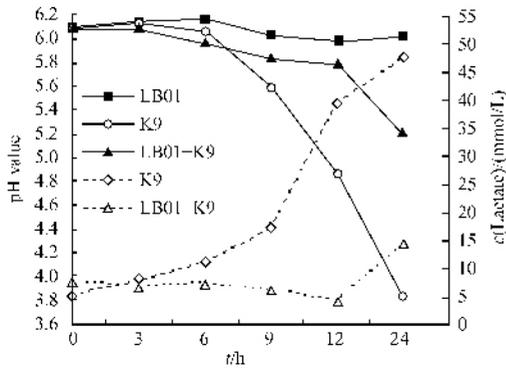


图4 单独与共培养发酵中乳酸浓度与 pH 对发酵时间变化(实线:pH 值;虚线:乳酸浓度)

Fig.4 The curve of lactate concentration and pH of the separated and co-cultured fermentation system and fermentation time (solid line :pH value ; dashed line : lactate).

3 结论

菌株 LB01 分离于猪粪,16S rRNA 序列与 *M. elsdenii* 的同源性很高。*M. elsdenii* 常见于反刍动物的瘤胃,主要的功能是利用瘤胃内乳酸和其它肠道菌水解出的可溶性产物,因此 *M. elsdenii* 是一种有效地防止瘤胃内乳酸积累的益生菌^[12]。菌株 LB01 分离自猪粪,说明了猪的后肠同样栖生着 *M. elsdenii*。现有的 GenBank 数据库也有分离于人与猪的相关菌株,因此 *M. elsdenii* 不仅是一群分布于瘤胃的益生菌,而且还可能是一群广泛分布于单胃动物后肠的正常肠道菌。但是目前对这种分布于单胃动物后肠的酸利用菌鲜有报道,远不如在反刍动物上面研究得透彻。本研究发现分离猪体内的菌株 LB01 离体代谢性质与瘤胃中 *M. elsdenii* 代谢性质很相近,推测 *M. elsdenii* 在单胃动物后肠中发挥的功能可能与在瘤胃当中的功能相似,均可以利用乳酸与乙酸,并将其转化为丁酸,从而防止乳酸和乙酸

在后肠中积累,有效地调控后肠的 pH。

除了利用乳酸和乙酸产生丁酸路径之外,菌株 LB01 体内仍然可能存在着另一条丁酸生成的路径。菌株 LB01 可以很好地利用果糖和麦芽糖,并且丁酸产量很高(表1),但我们在研究过程中发现不能利用果寡糖、菊粉、抗性淀粉等常见化学益生素(数据未显示)。尽管经小肠直接到达后肠的果糖和麦芽糖的量微乎其微,然而这些特殊的碳水化合物能够抵抗小肠的消化作用而到达后肠,在复杂的后肠中,这些碳水化合物可被另外一群微生物降解,释放出一定量的果糖和麦芽糖等简单糖类^[13]。这些简单的单糖和二糖可以被 *M. elsdenii* 直接利用,同时产生大量丁酸,这也体现出菌株 LB01 与另外某些菌群之间的交互饲养关系。基于能够促进有益菌生长而竞争性地抑制不利用菌的理念,许多特殊的碳水化合物被作为功能性食品和化学益生素而广泛地使用,其中的一大类是体内丁酸源物质^[14],但绝大多数丁酸产生菌不能直接利用这些物质。菌株 LB01 仅利用水解出的简单糖类而不能直接利用寡/多糖的代谢特性,说明它是一株具有代表性的丁酸产生菌,因此菌株 LB01 有助于阐释一些功能性食品和化学益生素在体内作用的详细机理。

菌株 LB01 产生的丁酸对宿主后肠道的健康有着特殊的意义。很早人们就发现丁酸是后肠粘膜细胞主要和偏爱的能量来源。近年来,在研究短链脂肪酸,特别是丁酸,对宿主健康作用上取得了许多突破性进展,丁酸正逐步地被证明是短链脂肪酸发挥功能的主要载体之一,成为研究后肠道调控的热点^[15,16]。结肠上皮细胞特异地表达一种单羧酸- Na^+ 共转运蛋白 SLC5A8,与小肠吸收葡萄糖机制极为相似,这个通道蛋白协助短链脂肪酸跨膜转运到结肠上皮细胞^[17]。转运蛋白 SLC5A8 在结肠中特异地表达,说明了短链脂肪酸对结肠有着特殊的生理意义。丁酸通过组蛋白乙酰化在基因组水平上调控基因表达,诱导非正常细胞的凋亡,降低结肠癌的发生率,还可以通过 NF- κ B 等信号通路抑制肠道炎症的发生^[18,19]。结肠炎和结直肠癌的发病率在西方发达国家中居高不下,在国内,由于近年来居民饮食变迁,纤维素摄入量下降,国内的发病率也出现攀升现象,研究表明丁酸产生菌群失调和丁酸浓度偏低是引起发这些疾病的最重要因素之一。丁酸产生菌在不同个体内分布差异大^[7],丁酸产生菌数量偏少的

个体在人群中有一定比例,但更多是由于膳食性纤维的摄入量减少而导致的丁酸产生菌菌群失调,造成微生物发酵的丁酸产量很少,这些个体都是结肠炎和结直肠癌高发病率的群体。菌株 LB01 与分离于人结肠的 *M. hominis* 高度同源,因此也可以作为一种潜在的人用益生菌,通过外源补充这种益生菌,平衡后肠道菌群平衡,可以提高机体内短链脂肪酸的浓度,特别是丁酸浓度。

基于以上对菌株 LB01 利用乳酸和乙酸合成丁酸,以及可能存在的利用果糖和麦芽糖等产生丁酸的讨论,表明了菌株 LB01 是一株具有开发潜力的菌株,可以作为益生菌,用来调控和改善宿主的后肠环境,可能会给当前发病率很高的结肠炎和结直肠癌患者带来福音。但是,肠道的内环境极其复杂,菌株 LB01 能否在体内发挥与体外相似的功能尚需要动物模型及临床试验来进一步地验证^[20],这也是我们正准备要做的工作。

参 考 文 献

- [1] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005, **307**(5717):1915 - 1920.
- [2] 刘 威,姚 文,朱伟云.人体与肠道微生物间的互惠共生关系.世界华人消化杂志,2006, **14**(11):1081 - 1088.
- [3] Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, et al. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol*, 2005, **99**(1):201 - 212.
- [4] Hove H, Nordgaard-Andersen I, Mortensen PB. Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. *Scand J Gastroenterol*, 1994, **29**(3):255 - 259.
- [5] Vernia P, Caprilli R, Latella G, et al. Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1988, **95**(6):1564 - 1568.
- [6] Duncan SH, Hold GL, Harnsen HJ, et al. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**(pt6):2141 - 2146.
- [7] Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(4):1654 - 1661.
- [8] Bryant MP. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr*, 1972, **25**(12):1324 - 1329.
- [9] Zhu WY, Theodorou MK, Longland AC, et al. Growth and survival of anaerobic fungi in batch and continuous-flow cultures. *Anaerobe*, 1996, **2**(1):29 - 37.
- [10] 姚 文,朱伟云,毛胜勇.16S rDNA 技术研究新生腹泻仔猪粪样细菌区系的多样性变化.微生物学报,2006, **46**(1):150 - 154.
- [11] Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, et al. Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA):acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(10):5186 - 5190.
- [12] Ouwerkerk D, Klieve AV, Forster RJ. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J Appl Microbiol*, 2002, **92**(4):753 - 758.
- [13] Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(5):3593 - 3599.
- [14] Tsukahara T, Hashizume K, Koyama H. Stimulation of butyrate production through the metabolic interaction among lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, and lactic acid-utilizing bacteria, *Megasphaera elsdenii*, in porcine cecal digesta. *Animal Sci Journal*, 2006, **77**(10):454 - 461.
- [15] Charrier C, Duncan GJ, Reid MD, et al. A novel class of CoA-transferase involved in short-chain fatty acid metabolism in butyrate-producing human colonic bacteria. *Microbiology*, 2006, **152**(pt1):179 - 185.
- [16] Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **217**(2):133 - 139.
- [17] Li H, Myeroff L, Smiraglia D, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(14):8412 - 8417.
- [18] Ragione FD, Criniti V, Pietra VD, et al. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett*, 2001, **499**(3):199 - 204.
- [19] Segain JP, Raingeard de la, Bletiere D, et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 2000, **47**(3):397 - 403.
- [20] Hashizume K, Tsukahara T, Yamada K, et al. *Megasphaera elsdenii* JCM1772T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production. *J Nutr*, 2003, **133**(10):3187 - 3190.

Isolation and identification of a lactate-utilizing , butyrate-producing bacterium and its primary metabolic characteristics

LIU Wei , ZHU Wei-yun* , YAO Wen , MAO Sheng-yong

(*Laboratory of Gastrointestinal Microbiology , College of Animal Science and Technology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China*)

Abstract :The distal mammalian gut harbors prodigiously abundant microbes , which provide unique metabolic traits to host. A lactate-utilizing , butyrate-producing bacterium , strain LB01 , was isolated from adult swine feces by utilizing modified Hungate technique with rumen liquid-independent YCFA medium supplemented with lactate as the single carbon source. It was an obligate anaerobic , Gram positive bacterium , and could utilize glucose , fructose , maltose and lactate with a large amount of gas products. 16S rRNA sequence analysis revealed that it had the high similarity with members of the genus *Megasphaera* . The metabolic characteristics of strain LB01 was investigated by using *in vitro* fermentation system. Lactate at the concentration of 65 mmol/L in YCFA medium was rapidly consumed within 9 hours and was mainly converted to propionate and butyrate after 24h. As the level of acetate declined , the concentration of butyrate rose only in the presence of glucose , suggesting that butyrate could possibly be synthesized by the acetyl CoA : butyryl CoA transferase. When co-cultured with lactic acid bacteria strain K9 , strain LB01 evidently reduced the concentration of lactate produced by strain K9 and decelerated the rapid pH drop , finally producing 12.11mmol/L butyrate and 4.06mmol/L propionate. The metabolic characteristics that strain LB01 efficiently converts toxic lactate and excessive acetate to butyrate can prevent lactate and acetate accumulation in the large intestine and maintain the slightly acidic environment of the large intestine , consequently revealing that stain LB01 could act as a potential probiotics.

Keywords : *Megasphaera* ; lactate ; butyrate ; cross-feeding ; distal gut

Foundation item :Major Project of National Program for Fundamental Research and Development of China (2004CB117500-4) ; National Natural Science of Foundation of China (30025034)

* Corresponding author. Tel :86-25-84395523 ;Fax :86-25-84395314 ;E-mail :zhuweiyunnjau@hotmail.com

Received : 17 November 2006 / Accepted : 25 January 2007 / Revised : 6 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>