



猪不同肠段微生物体外培养对蛋氨酸的代谢特性

余凯凡, 张福哲, 朱伟云*

江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 南京农业大学消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】旨在通过微生物体外发酵技术, 以回肠微生物为参照, 研究猪盲肠及结肠微生物对在小肠微生物中代谢率较低的蛋氨酸的代谢特性。【方法】采集 4 头健康 100 kg 左右杜×长×大杂交猪的盲肠、结肠与回肠食糜作为接种物, 分别接种于 10 mmol/L 蛋氨酸的培养基中, 37 °C 体外培养 24 h。分别设含蛋氨酸溶液和含各肠段食糜接种物的空白对照组。【结果】(1) 不同肠段微生物以蛋氨酸为底物体外发酵, 盲肠组蛋氨酸消失率(21.9%)显著高于结肠组(16.7%)与回肠组(16.3%) ($P<0.05$)。盲肠组总 SCFA 量显著高于结肠与回肠组($P<0.05$), 伴随着 pH 值下降程度最高; 盲肠组 MCP 产量也显著高于结肠与回肠组($P<0.05$); 在产气量与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度上, 盲肠组与结肠组均显著低于回肠组($P<0.05$)。 (2) 以蛋氨酸为底物体外发酵, 门水平上, 总菌、厚壁菌门含量在各肠段组间无显著差异($P>0.05$), 拟杆菌门含量在盲肠组最高; 与不加蛋氨酸底物的对照组比较, 三个肠段试验组总菌、厚壁菌门含量均显著高于对照组($P<0.05$), 而拟杆菌门含量在试验组与对照组间差异不显著($P>0.05$)。属水平上, 盲肠组和结肠组大肠杆菌属数量显著低于回肠组($P<0.05$), 而柔嫩梭菌属和梭菌 XIV 属数量在盲肠组和结肠组均高于回肠组; 各肠段组间双歧杆菌数量无显著差异($P>0.05$)。【结论】以蛋氨酸为底物, 体外培养猪盲肠微生物对蛋氨酸代谢率高于回肠微生物, 伴随着其他发酵参数的变化, 并且发酵产生更多的菌体蛋白。相比于回肠微生物发酵, 大肠微生物发酵后, 柔嫩梭菌属和梭菌 XIV 属数量较高, 而大肠杆菌属数量较低。

关键词: 体外发酵, 大肠微生物, 蛋氨酸, 猪

蛋氨酸是动物体内必需氨基酸之一, 其在参与机体蛋白质合成以及维持机体免疫功能等方面发挥重要作用。营养学新观点认为, 日粮中的大量氨基酸并没被吸收进入门静脉, 而在肠道内被代谢利用^[1]。其中, 蛋氨酸到达猪门静脉的净平衡

约 69%^[2]。氨基酸在肠道中可被肠黏膜细胞代谢利用, 也可能被肠道中数量繁多、复杂多样的微生物菌群所代谢。Chen 等^[3-4]研究发现, 肠上皮细胞主要代谢支链氨基酸, 而对于蛋氨酸的代谢几乎可以忽略不计, 表明肠上皮细胞难以代谢蛋

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2013CB127300); 国家自然科学基金(31430082)

*通信作者。Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-05-17; 修回日期: 2017-08-09; 网络出版日期: 2017-09-28

氨酸。Dai 等研究表明,猪小肠微生物可少量代谢蛋氨酸^[5];有意思的是,从十二指肠、空肠到回肠肠段,越靠近后肠肠段的微生物对蛋氨酸的代谢利用率越高。随着肠段向后到大肠,大肠微生物对进入到该肠段的蛋氨酸是否代谢尚不清楚,探明大肠微生物对蛋氨酸的代谢有助于丰富氨基酸营养理论。本研究采用微生物体外发酵技术以猪回肠微生物为参照,研究了盲肠、结肠微生物对蛋氨酸的代谢特性,并分析比较了可能参与蛋氨酸代谢的细菌区系丰度。

1 材料和方法

1.1 培养基与接种物制备

厌氧培养基参考 Williams 等^[6]和 Dai 等^[5]的方法配置。培养基持续通入 CO₂,至溶液澄清呈淡黄色后,每血清瓶分装 88 mL,高压灭菌。在基础培养基中,注入 100 mmol/L 蛋氨酸母液 10 mL 作为蛋氨酸培养基。接种前加入 1 mL 维生素溶液和 1 mL 还原剂溶液,并将培养基 37 °C 预热。

选取 3 头健康的 6 月龄杜×长×大育肥猪,采集回肠、盲肠和结肠中段内容物,分别将不同肠段的 3 份样品进行混匀、称量。37 °C 预热的 PBS 迅速冲洗食糜到持续通 CO₂ 的灭菌血清瓶, PBS 与食糜按 1:9 比例混匀,4 层无菌纱布过滤后作为接种物。

1.2 体外发酵

原代培养 3 个处理组分别为基础培养基+蛋氨酸溶液+回肠或盲肠或结肠食糜接种物;对照组一中含有基础培养基和蛋氨酸溶液;对照组二分别为基础培养基+回肠或盲肠或结肠食糜接种物。各 4 个重复。5 mL 接种物注入到预热培养基,37 °C 培养 24 h。

继代培养使用原代培养 24 h 的发酵液作为接种物接种 10 mL,37 °C 培养,24 h 为一代,连续传 6 代。采集继代培养的第 2、4、6 代的 0 h 和 24 h 发酵液。

1.3 发酵指标测定

测定 0 h 与培养 24 h 发酵液 pH 值。在发酵的 4、8、12、16 和 24 h,参照 Theodorou 等^[7]方法测定产气量。分别参照 Muftic 方法^[8]测定 24 h 发酵液的氨态氮(NH₃-N),比色法测定菌体蛋白(MCP)浓度。使用仪器 GC-14B 型气相色谱仪(日本岛津公司)测定 24 h 发酵液的短链脂肪酸(SCFA),参考 Zhang 等^[9]的方法。取发酵样品 1 mL 加 0.2 mL 25% 偏磷酸和巴豆酸(内标法,100 mL 溶液中含巴豆酸 0.6464g)混合液 1 mL,12000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 进行测定。柱温 110 °C,进样温度为 180 °C,检测器温度为 180 °C。

1.4 蛋氨酸测定

使用仪器高效液相色谱仪(Agilent 1100)测定发酵液蛋氨酸。样品前处理:200 μL 发酵液,13000×g、4 °C 离心 10 min。转移 100 μL 上清加入 100 μL 1.5 mol/L 冰 HClO₄,混匀后加入 50 μL 2 mol/L 冰 K₂CO₃。打开盖子,释放 CO₂。13000×g 4 °C 离心 10 min。转移上清至新的 1.5 mL 离心管。取 100 μL 样品,加入样品瓶中,再加入 100 μL 1.2% 苯甲酸,100 μL 饱和 K₂B₄O₇,100 μL 内标,1.4 mL 水。HPLC 检测:色谱柱 C₁₈,4.6 mm×250 mm;流速,1.1 mL/min;柱温,20–25 °C;检测波长,Ex 340 nm,Em 455 nm;进样:15 μL 样品溶液+15 μL OPA 溶液,反应 1 min。流动相:流动相 A,27.3 g 三水乙酸铵溶于 1.6 L 水中,加入 96 μL 6 mol/L HCl,180 mL 甲醇,10 mL 四氢呋喃,定容至 2 L (pH 7.2);流动相 B,100% 甲醇。

1.5 DNA 提取和 Real-time PCR 定量菌群

DNA 提取参照 Zoetendal 等^[10], 用磁珠法破碎, 苯酚氯仿萃取。实时定量 PCR 使用 Step One Plus™ 平台、SYBR Premix Ex Taq 酶体系对发酵液中总菌、厚壁菌门、拟杆菌门以及大肠杆菌、柔嫩梭菌、梭菌 XIV 和双歧杆菌属进行定量分析, 引物序列见表 1。分别以相应的 16S rRNA 基因作为模板制作各目标菌定量的标准曲线。

1.6 数据统计分析

氨基酸消失率按照公式(1)计算。

$$D_{24}(\%) = [(AA_0 - AA_{24}) A(PC_0 - PC_{24}) - (NC_0 - NC_{24})] / AA_0 \quad \text{公式(1)}$$

D_{24} 是 24 h 的蛋氨酸消失率, AA_0 、 AA_{24} 是各

处理组 0 h、24 h 的蛋氨酸浓度, PC_0 、 NC_0 分别是对照组 1、对照组 2 在 0 h 的蛋氨酸浓度, PC_{24} 、 NC_{24} 分别是对照组 1、对照组 2 在 24 h 的蛋氨酸浓度。

2 结果和分析

2.1 体外发酵 24 h 的累积产气量和 pH 值变化

不同肠段微生物以蛋氨酸为底物体外发酵 24 h 的累积产气量变化见表 2。微生物在 24 h 的发酵过程中, 累积产气量不断增加; 累积产气量由高到低依次为回肠组、盲肠组与结肠组, 其中盲肠组与结肠组累积产气量显著低于回肠组($P < 0.05$)。

表 1. 实时定量 PCR 引物序列
Table 1. Primers used in this study

Target organisms	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	References
Total bacteria	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA	ACGTCRTCCMCNCTTCCTC	[10]
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC	[11]
Bacteroidetes	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT	AGCTGACGACAACCATGCAG	[12]
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	GCACAAGCAGTGGAGT	CTTCCTCCGTTTTGTCAA	[13]
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	[14]
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	CGGTACCTGACTAAGAAGC	AGTTTYATTCTTGCGAACG	[15]
<i>Bifidobacterium</i> spp.	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	GGTGTCTTCCCGATATCTACA	[16]

表 2. 体外发酵 24 h 的累积产气量变化

Table 2. Cumulative gas production during 24 h *in vitro* fermentation (mL)

t/h	Ileum	Cecum	Colon
4	1.35±0.33	2.50±0.43	2.40±0.41
8	5.85±0.48	6.00±0.15	3.95±0.91
12	13.75±1.14 ^a	7.42±0.38 ^b	5.57±0.76 ^b
16	15.10±1.10 ^a	8.87±0.34 ^b	7.67±0.04 ^b
24	20.87±1.11 ^a	18.62±0.34 ^b	16.12±1.03 ^c

Values in the table are mean±SEM. In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

微生物体外发酵 24 h 的 pH 变化见表 3。各肠段试验组 24 h pH 值与 0 h pH 值相比显著降低($P < 0.05$); 回肠试验组与对照组 24 h pH 值无显著差异($P > 0.05$), 而盲肠试验组、结肠试验组与各自肠段对照组相比 24 h pH 值显著下降($P < 0.05$)。

2.2 体外发酵 24 h 的 SCFA 产量

不同肠段微生物以蛋氨酸为底物体外发酵 24 h 的 SCFA 产量见表 4。盲肠组总 SCFA 产量显著高于结肠组与回肠组($P < 0.05$); 回肠组丙酸和戊酸产量较高, 而盲肠与结肠组乙酸和丁酸产量较

表 3. 体外发酵 24 h 的 pH 变化

Table 3. Changes of pH value during 24 h *in vitro* fermentation

Segments	Met		Control 2	
	0 h	24 h	0 h	24 h
Ileum	6.79±0.01 ^a	6.51±0.01 ^b	6.76±0.02 ^a	6.54±0.01 ^b
Cecum	6.76±0.02 ^a	6.47±0.03 ^b	6.74±0.02 ^a	6.67±0.02 ^a
Colon	6.80±0.01 ^a	6.55±0.01 ^b	6.79±0.01 ^a	6.63±0.02 ^a

表 4. 不同肠段微生物体外发酵 24 h SCFA 产量 (mmol/L)

Table 4. Concentration of SCFA after 24 h *in vitro* fermentation (mmol/L)

Items	Ileum	Cecum	Colon
Acetate	—	2.81±0.28 ^a	1.46±0.16 ^b
Propionate	4.91±0.03 ^a	3.11±0.17 ^b	2.62±0.17 ^b
Butyrate	0.62±0.09 ^b	2.40±0.11 ^a	2.02±0.12 ^a
Valerate	0.40±0.06 ^a	0.06±0.01 ^b	0.01±0.01 ^b
Isobutyrate	0.07±0.03	0.05±0.01	0.05±0.01
Isovalerate	0.03±0.01	0.06±0.02	0.06±0.03
Total BCFA	0.10±0.04	0.11±0.03	0.11±0.04
Total SCFA	4.64±0.40 ^b	8.50±0.48 ^a	6.22±0.20 ^b

高。支链脂肪酸异丁酸与异戊酸在三组中产量都很低, 且无显著差异。

2.3 体外发酵 24 h 的 NH₃-N 和 MCP 浓度

不同肠段微生物以蛋氨酸为底物体外发酵 24 h 的 MCP 与 NH₃-N 的结果见图 1。盲肠组 MCP 产量显著高于回肠组与结肠组($P<0.05$), 回肠组与结肠组间差异不显著。盲肠组与结肠组 NH₃-N 浓度显著低于回肠组($P<0.05$), 盲肠组与结肠组间差异不显著。

2.4 体外发酵 24 h 的蛋氨酸消失率

不同肠段微生物体外发酵 24 h 后蛋氨酸消失率见图 2。盲肠组蛋氨酸消失率显著高于回肠组和结肠组($P<0.05$), 回肠组与结肠组间蛋氨酸消失率差异不显著。

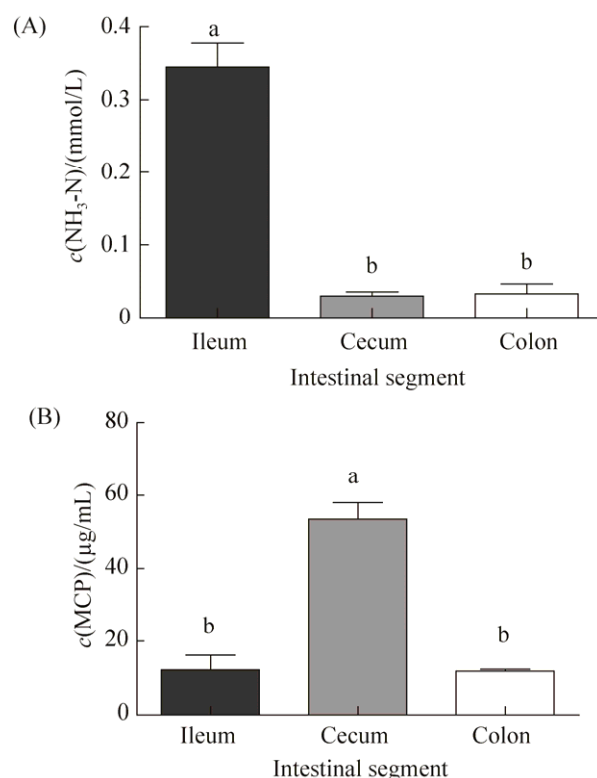
图 1. 体外发酵 24 h NH₃-N 和 MCP 浓度变化

Figure 1. Concentrations of NH₃-N and MCP after 24 h *in vitro* fermentation. Values are the mean±SEM. Values with different letters (a, b) are significantly different ($P<0.05$).

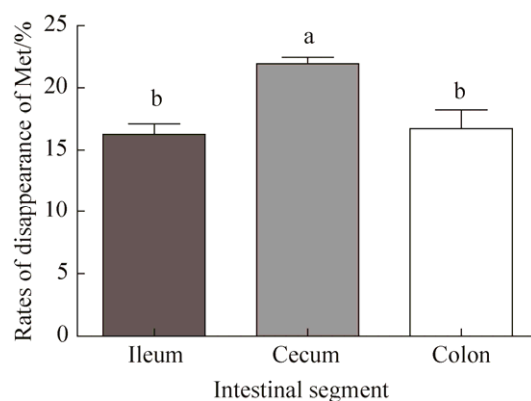


图 2. 体外发酵 24 h 蛋氨酸消失率

Figure 2. Rates of disappearance (%) of Methionine after 24 h *in vitro* fermentation. Values are the mean±SEM. Values with different letters (a, b) are significantly different ($P<0.05$).

2.5 体外发酵 24 h 菌群变化

体外发酵 24 h 后, 发酵液中总菌、厚壁菌门和拟杆菌门的数量见表 5。以蛋氨酸为底物, 总菌、厚壁菌门含量在各肠段组间无显著差异, 拟杆菌门含量在盲肠组最高。与不加蛋氨酸底物的对照

组比较, 3 个肠段试验组总菌、厚壁菌门含量均显著高于对照组($P<0.05$), 而拟杆菌门含量在试验组与对照组间差异不显著($P>0.05$)。

属水平上, 大肠杆菌、柔嫩梭菌、梭菌 XIV 和双歧杆菌的数量见表 6。盲肠组和结肠组大肠杆

表 5. 体外发酵 24 h 细菌总菌、厚壁菌门、拟杆菌门数量

Table 5. Copy numbers of total bacteria, Firmicutes and Bacteroidetes after 24 h *in vitro* fermentation [Lg(copies/mL)]

Items	Group	Segments			SEM	P value
		Ileum	Cecum	Colon		
Total bacteria	Met	11.34 ^a	11.37 ^a	11.13 ^a	0.06	0.20
	Control 2	10.62 ^b	10.60 ^b	10.72 ^b	0.05	0.21
	SEM	0.17	0.27	0.22		
	P value	<0.01	<0.01	<0.01		
Firmicutes	Met	10.65 ^a	10.88 ^a	10.68 ^a	0.05	0.18
	Control 2	10.31 ^b	10.20 ^b	10.28 ^b	0.05	0.21
	SEM	0.05	0.20	0.18		
	P value	<0.01	<0.01	<0.01		
Bacteroidetes	Met	9.93 ^{AB}	10.00 ^A	9.68 ^B	0.06	0.07
	Control 2	9.96	9.87	9.86	0.04	0.58
	SEM	0.04	0.11	0.12		
	P value	0.85	<0.01	<0.05		

Values in the table are mean±SEM. Values in the same row or column, which do not share the same small letter or capital letter are significantly different ($P<0.05$), respectively.

表 6. 体外发酵 24 h 大肠杆菌、双歧杆菌、柔嫩梭菌、梭菌 XIV 数量

Table 6. Copy numbers of *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium leptum* subgroup, *Clostridium* cluster XIVa after 24 h *in vitro* fermentation [Lg(copies/mL)]

Items	Group	Segments			SEM	P value
		Ileum	Cecum	Colon		
<i>Escherichia coli</i>	Met	10.65 ^{Aa}	7.76 ^{Bb}	7.93 ^{Bb}	0.47	<0.01
	Control 2	10.50 ^{Ab}	8.06 ^{Ba}	8.40 ^{Ca}	0.38	<0.01
	SEM	0.04	0.07	0.08		
	P value	<0.05	<0.01	<0.01		
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Met	8.99	8.90 ^a	8.87 ^a	0.05	0.64
	Control 2	8.96 ^A	8.12 ^{Bb}	8.18 ^{Bb}	0.14	<0.01
	SEM	0.02	0.14	0.11		
	P value	0.60	<0.01	<0.01		
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	Met	8.27 ^{Ba}	9.51 ^{Aa}	9.11 ^{Aa}	0.20	<0.05
	Control 2	7.62 ^{Cb}	8.14 ^{Bb}	8.44 ^{Ab}	0.12	<0.01
	SEM	0.10	0.20	0.12		
	P value	<0.01	<0.01	<0.05		
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	Met	10.25 ^{Ba}	10.76 ^{Aa}	10.54 ^{ABa}	0.09	0.05
	Control 2	9.27 ^{Bb}	9.59 ^{Ab}	9.66 ^{Ab}	0.07	<0.05
	SEM	0.16	0.17	0.13		
	P value	<0.05	<0.01	<0.01		

Values in the table are mean±SEM. Values in the same row or column, which do not share the same small letter or capital letter are significantly different ($P<0.05$), respectively.

菌属数量显著低于回肠组($P<0.05$), 而柔嫩梭菌属和梭菌 *XIV* 属数量在盲肠组和结肠组均高于回肠组; 各肠段组间双歧杆菌数量无显著差异($P>0.05$)。与不加蛋氨酸底物的对照组比较, 大肠杆菌数量在回肠试验组显著高于对照组, 而在盲肠和结肠试验组则显著低于对照组($P<0.05$); 双歧杆菌属数量在盲肠和结肠试验组显著高于对照组($P<0.05$), 而在回肠试验组与对照组无显著差异($P>0.05$); 柔嫩梭菌属和梭菌 *XIV* 属数量在 3 个肠段试验组均显著高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 不同肠段微生物体外培养发酵参数的比较

pH 对肠道微生物的生存有十分重要的影响, 猪肠道内由前肠到后肠 pH 呈逐渐增加的趋势^[17], 大肠微生物的最适 pH 一般为 6.5–7.5 左右。在猪肠道内, SCFA 和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量均可影响 pH 值变化。本研究中培养液的 pH 在 24 h 培养过程中呈逐渐降低的趋势, 这主要是生成的酸累加作用造成的。盲肠组在 24 h 发酵过程与对照组相比下降最多, 表明盲肠内酸的累计产生量最多, 这也与盲肠接种物体外发酵总 SCFA 产量最高的结果相吻合。

猪肠道中 SCFA 是微生物发酵的主要终产物之一^[18–19], 研究表明肠道上皮可吸收 94.4%–97.6% 产生的 SCFA^[20]。之前认为 SCFA 的产生主要来自纤维以及抗性淀粉^[21], 不过后来人们发现大肠内未消化的蛋白质代谢也是 SCFA 的重要来源^[22]。本研究发现, 盲肠接种物发酵, 其乙酸、丙酸、丁酸以及总 SCFA 含量都处于较高的水平, 这暗示了体外条件下盲肠微生物对蛋氨酸的利用能力在 3 个肠段中最强。

3.2 不同肠段微生物体外培养 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、MCP 的比较

$\text{NH}_3\text{-N}$ 的含量一定程度上可以反映出微生物分解含氮物质产生 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及其摄取利用的情况, 是机体氮代谢水平的重要指标之一^[23]。一般机体肠道内氨的浓度很低, 然而在日粮蛋白质增加的情况下肠腔以及粪中氨浓度会显著升高^[24]。产生的氨可被肠黏膜吸收^[25]; 此外, 在有能量和碳架的情况下, $\text{NH}_3\text{-N}$ 是微生物合成 MCP 的主要氮源。MCP 浓度反映微生物利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、氨基酸等底物合成蛋白质的能力。本研究中, 回肠组 $\text{NH}_3\text{-N}$ 产生量显著高于盲肠组与结肠组, 而相对的形成 MCP 的含量较少, 提示回肠内产氨的细菌较多, 蛋氨酸在回肠组中一个显著的代谢去路是形成了 $\text{NH}_3\text{-N}$, 而利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的细菌相对较少。相比较, 盲肠微生物利用蛋氨酸体外发酵合成了较多的 MCP, 提示较回、结肠微生物, 盲肠微生物氮代谢的主要代谢去路为微生物自身增殖利用。

3.3 大肠微生物与小肠微生物对蛋氨酸代谢率的比较

研究表明, 不同肠段微生物对于同一种氨基酸的利用存在肠段特异性^[26–27], 然而此前的研究关注小肠微生物对氨基酸代谢的影响。本研究发现, 盲肠组的蛋氨酸消失率显著高于回肠组与结肠组, 同时不同肠段微生物利用蛋氨酸得到的代谢产物也存在较大差异, 提示不同肠段优势菌群各不相同, 造成对蛋氨酸利用效率、代谢产物含量有所不同。

3.4 不同肠段微生物对蛋氨酸代谢的菌群区系变化

已有研究表明, *Clostridium*、*Bacteriodes* 及 *Peptostreptococcus* 属细菌在大肠中可作为发酵氨基酸的细菌^[4,28], 以单一蛋氨酸作为氮底物哪些细

菌对其代谢利用能力强尚无定论。一些研究表明,日粮蛋氨酸摄入会显著影响肠道微生物区系。李永洙^[29]在蛋鸡低蛋白日粮中额外添加蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸时发现,蛋鸡盲肠内乳杆菌、梭菌属和普雷沃氏菌属显著增加,并可显著改善蛋鸡生产性能。王洪荣^[30]体外培养瘤胃微生物并选择性缺省个别种类氨基酸,发现缺少蛋氨酸会显著限制细菌以及原虫的生长。本研究发现,以蛋氨酸为底物,盲肠组总菌、厚壁菌门、拟杆菌门数量均为3个肠段最高,这与盲肠蛋氨酸消失率及MCP较高的结果一致,体现出细菌数量与蛋氨酸代谢效率有关。

在属水平上,本研究中以蛋氨酸为底物,盲肠组和结肠组大肠杆菌属数量显著低于回肠组,同时也显著低于不加蛋氨酸底物的对照组的大肠杆菌数量。大肠杆菌为革兰氏阴性菌,它与其他种类细菌的繁殖存在竞争作用。盲肠与结肠试验组中大肠杆菌数量少,可能是因为盲肠与结肠接种物中其他细菌含量丰富,发酵过程中大量繁殖,与大肠杆菌形成了竞争性抑制作用;而回肠接种物中总体细菌数量较少,在发酵过程中对大肠杆菌的抑制能力较弱,导致回肠试验组大肠杆菌大量繁殖。本研究中另外还发现,大肠杆菌属数量与NH₃N含量显著正相关。柔嫩梭菌属是厚壁菌门的主要成员之一,同时也是最主要的产丁酸菌之一^[31]。本研究中,盲肠组柔嫩梭菌含量最高,其发酵产生丁酸的含量在三组间也最高,两者间存在显著正相关。相比于未加蛋氨酸底物对照组,蛋氨酸试验组中柔嫩梭菌属和梭菌XIV属在3个肠段均较高,提示这2个菌属中可能依赖蛋氨酸作为氮源。

4 结论

综上所述,猪盲肠、结肠与回肠微生物以蛋

氨酸为底物体外发酵,盲肠微生物对蛋氨酸的代谢率较高,伴随着其他发酵参数的变化,并且发酵产生更多的菌体蛋白。与回肠微生物发酵相比,盲肠和结肠微生物发酵后的大肠杆菌属数量较低,而柔嫩梭菌属和梭菌XIV属数量较高。

参考文献

- [1] Wu GY. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition*, 2010, 1(1): 31–37.
- [2] Shoveller AK, Brunton JA, Pencharz PB, Ball RO. The methionine requirement is lower in neonatal piglets fed parenterally than in those fed enterally. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(5): 1390–1397.
- [3] Chen LX, Li P, Wang JJ, Li XL, Gao HJ, Yin YL, Hou YQ, Wu GY. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 143–152.
- [4] Chen LX, Yin YL, Jobgen WS, Jobgen SC, Knabe DA, Hu WX, Wu GY. *In vitro* oxidation of essential amino acids by jejunal mucosal cells of growing pigs. *Livestock Science*, 2007, 109(1/3): 19–23.
- [5] Dai ZL, Zhang J, Wu GY, Zhu WY. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. *Amino Acids*, 2010, 39(5): 1201–1215.
- [6] Williams BA, Bosch MW, Boer H, Verstegen MWA, Tamminga S. An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, 123–124: 445–462.
- [7] Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, Mcallan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 48(3–4): 185–197.
- [8] Muftic MK. A new phenol-hypochlorite reaction for ammonia. *Nature*, 1964, 201(4919): 622–623.
- [9] Zhang CJ, Yu M, Yang YX, Mu CL, Su Y, Zhu WY. Effect of early antibiotic administration on cecal bacterial communities and their metabolic profiles in pigs fed diets with different protein levels. *Anaerobe*, 2016, 42: 188–196.
- [10] Zoetendal EG, Akkermans ADL, de vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from

- human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854–3859.
- [11] Xin JG, Zeng D, Wang HS, Ni XQ, Yi D, Pan KC, Jing B. Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(15): 6817–6829.
- [12] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837–848.
- [13] Shen J, Zhang BR, Wei GF, Pang X, Wei H, Li M, Zhang Y, Jia W, Zhao LP. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5232–5238.
- [14] Huijsdens XW, Linskens RK, Mak MT, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(12): 4423–4427.
- [15] Hartman AL, Lough DM, Barupal DK, Fiehn O, Fishbein T, Zasloff M, Eisen JA. Human gut microbiome adopts an alternative state following small bowel transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(40): 17187–17192.
- [16] Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze XL, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal*, 2011, 5(2): 220–230.
- [17] Rao H. The factors affecting gastrointestinal pH and pepsin activity in weaned piglets. *Swine Industry Science*, 2008, (6): 58–60. (in Chinese)
饶辉. 影响断奶仔猪胃肠道 pH 值及胃蛋白酶活性的因素. 猪业科学, 2008, (6): 58–60.
- [18] Elsdon SR, Hilton MG, Waller JM. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by Clostridia. *Archives of Microbiology*, 1976, 107(3): 283–288.
- [19] Rechkemmer G, Rönna K, von Engelhardt W. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1988, 90(4): 563–568.
- [20] Christensen DN, Knudsen KEB, Wolstrup J, Jensen BB. Integration of ileum cannulated pigs and in vitro fermentation to quantify the effect of diet composition on the amount of short-chain fatty acids available from fermentation in the large intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79(5): 755–762.
- [21] Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 2010, 61(3): 219–225.
- [22] Mortensen PB, Holtug K, Bonnén H, Clausen MR. The degradation of amino acids, proteins, and blood to short-chain fatty acids in colon is prevented by lactulose. *Gastroenterology*, 1990, 98(2): 353–360.
- [23] Wang YQ, Yu L, Wang CM, Zhao GQ, Sun LS, Huang J. Effects of different dietary protein level on pH, NH₃-N and urea-N in gastrointestinal tract of Hu sheep. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 40(3): 34–39. (in Chinese)
王雅倩, 俞路, 王春梅, 赵国琦, 孙龙生, 黄俊. 日粮蛋白质水平对湖羊胃肠道 pH、氨态氮及尿素氮的影响. 畜牧与兽医, 2008, 40(3): 34–39.
- [24] Geypens B, Claus D, Evenepoel P, Hiele M, Maes B, Peeters M, Rutgeerts P, Ghooys Y. Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*, 1997, 41(1): 70–76.
- [25] Summerskill WH, Wolpert E. Ammonia metabolism in the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1970, 23(5): 633–639.
- [26] 张京. 猪小肠氨基酸代谢菌的分离和鉴定. 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
- [27] 戴兆来. 猪小肠微生物氨基酸代谢的生态学分析. 南京农业大学博士学位论文, 2010.
- [28] Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(4): 355–368.
- [29] Li YZ. Effect of amino acids supplementation in low-protein feed on the performance and cecal microflora structure of laying hens. *Journal of China Agricultural University*, 2012, 17(2): 108–116. (in Chinese)
李永沫. 氨基酸对蛋鸡生产性能及盲肠微生物菌群结构的影响. 中国农业大学学报, 2012, 17(2): 108–116.
- [30] Wang HR, Xu AQ, Wang MZ, Li SX, Wang HL, Zhang HW. Effects of amino acids on the rumen microbes growth and fermentation in vitro. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*,

2010, 41(9): 1109–1116. (in Chinese)

王洪荣, 徐爱秋, 王梦芝, 李世霞, 王欢莉, 张红伟. 氨基酸对体外培养瘤胃微生物生长及发酵的影响. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9): 1109–1116.

[31] Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, Duncan SH, Stewart CS, Henderson C, Flint HJ. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1654–1661.

Metabolic characteristics of methionine by *in vitro* fermentation with bacteria from different swine intestinal segment

Kaifan Yu, Fuzhe Zhang, Weiyun Zhu*

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] This study aims to study metabolic characteristics of methionine by caecal and colonic bacteria compared with ileal bacteria from pigs using *in vitro* fermentation. [Methods] We took ileal, caecal and colonic chyme from four Duroc×Landrace×Yorkshire hybridization pigs as inoculum, and fermented *in vitro* separately. Control group 1 was without adding the chyme and Control group 2 was without adding methionine. [Results] Methionine disappeared 21.9% in the cecum group, significantly higher than that in the ileum group (16.3%) and colon group (16.7%) ($P<0.05$). The cecum group had the highest amount of short chain fatty acids ($P<0.05$), with the highest decrease of pH value. Moreover, the cecum group had the highest concentration of microbial crude protein, compared with the other two groups ($P<0.05$). Nevertheless, gas production and ammonia nitrogen (NH_3N) concentration in the ileum group were significantly higher than those in the cecum and colon group ($P<0.05$). At the phylum level, total bacteria and Firmicutes population were similar among all groups ($P>0.05$), and the counts of Bacteroidetes was highest in the cecum group. At the genus level, *Escherichia coli* counts in the cecum and colon group were significant lower than that in the ileum group ($P<0.05$), whereas the counts of *Clostridium leptum* and *Clostridium cluster XIVa* in the cecum and colon group were both higher than those in the ileum group. *Bifidobacterium* counts were similar among all groups ($P>0.05$). [Conclusion] *In vitro* fermentation using methionine as a substrate, the utilization rate of methionine by caecal bacteria is higher than that by ileal bacteria from pigs, accomplished with altering other fermentation parameters and producing microbial protein. Compared with *in vitro* fermentation of ileal bacteria, the counts of *Clostridium leptum* and *Clostridium cluster XIVa* are higher, whereas the *Escherichia coli* counts is lower after fermentation of the large intestinal bacteria.

Keywords: *in vitro* fermentation, large intestinal bacteria, methionine, pigs

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (2013CB127300) and by the National Natural Science Foundation of China (31430082)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

Received: 17 May 2017; Revised: 9 August 2017; Published online: 28 September 2017