



乙醇对瘤胃细菌发酵纤维类饲料产短链脂肪酸能力的影响

林淼^{Δ*} 封丽梅^Δ 王阔鹏 陈映良 胡梓轩

扬州大学动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009

摘 要:【背景】瘤胃细菌发酵碳水化合物产生的短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acid, SCFA), 可作为燃料和化工产品的前体物。乙醇在碳链延伸产生己酸过程中具有重要作用, 但对瘤胃发酵不同纤维类饲料产己酸能力的研究少有报道。【目的】揭示乙醇对纤维类饲料体外瘤胃发酵的 SCFA 产量差异, 挖掘潜在的产 C5 和 C6 脂肪酸细菌。【方法】利用体外连续传代和 Illumina HiSeq 测序等技术, 比较了添加乙醇对 6 种饲料产 SCFA 能力的影响以及细菌群落结构的差异。【结果】6 种纤维类饲料的总 SCFA 产量顺序为黑麦草>小黑麦草>燕麦草>玉米芯>稻秸>甜叶菊。添加乙醇显著提高了小黑麦草、黑麦草的戊酸和己酸产量; 细菌群落以厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为优势菌门, 乙醇显著提高了燕麦草组和小黑麦草组的放线菌门(*Actinobacteria*)和软壁菌门(*Tenericutes*)相对丰度; 种水平上, 甜叶菊、稻秸和玉米芯的优势菌与燕麦草、小黑麦草和黑麦草的优势菌相对丰度不同。相对丰度前 10 的细菌中, *Prevotella* sp. DJF CP65、*Clostridium butyricum* 和 *Bifidobacterium thermophilum* 相对丰度与戊酸产量呈显著正相关, *C. butyricum* 相对丰度与己酸产量呈显著正相关。【结论】瘤胃细菌体外发酵纤维类饲料并添加乙醇可生产更多戊酸和己酸, 该结果为筛选可培养瘤胃细菌用于体外发酵提高戊酸和己酸产量、挖掘瘤胃细菌功能提供了参考数据。

关键词: 乙醇, 细菌多样性, 纤维类饲料, 戊酸, 己酸

Effect of ethanol on *in vitro* short chain fatty acid yield by ruminal bacteria fermented on fiber substrateLIN Miao^{Δ*} FENG Limei^Δ WANG Kuopeng CHEN Yingliang HU Zixuan

College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: [Background] Short chain fatty acids (SCFA) produced by ruminal bacteria fermentation of carbohydrates can be used as the fuels and chemical precursors. Ethanol plays an important role in the production of caproic acid by carbon chain extension, but the effect of ethanol on the caproic acid

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31301997); China Agriculture Research System (CARS-36); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions; Jiangsu Association of Science and Technology Youth Science and Technology Talent Promotion Project

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: linmiao@yzu.edu.cn

Received: 24-02-2020; Accepted: 19-03-2020; Published online: 28-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31301997); 国家现代农业产业技术体系(CARS-36); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省科协青年科技人才托举工程

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: linmiao@yzu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-24; 接受日期: 2020-03-19; 网络首发日期: 2020-05-28

production capacity of feed with different fibers fermented in rumen is rarely reported. **[Objective]** To reveal the difference in SCFA yield of ethanol on rumen fermentation of fiber feed *in vitro*, and to explore the potential bacteria producing C5 and C6 fatty acids. **[Methods]** *In vitro* continuous passage culture technology and Illumina HiSeq sequencing technology were used to compare the effects of ethanol on SCFA-producing capacity of six feeds, as well as the differences in bacterial community structure. **[Results]** The total SCFA yield of 6 kinds of fiber feed was ryegrass straw>triticale straw>oat straw>corn cob>rice straw>stevia straw. The yield of valeric acid and caproic acid of triticale straw and ryegrass straw was significantly increased by adding ethanol. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were the dominant bacteria phylum, and ethanol significantly increased the relative abundance of *Actinobacteria* and *Tenericutes* phylum in oat straw and triticale straw group. At the species level, the relative abundance of dominant bacteria of stevia straw, rice straw and corn cob was different from that of oat straw, triticale straw and ryegrass straw. Among the bacteria with the top 10 relative abundance, the relative abundance of *Prevotella* sp. DJF CP65, *Clostridium butyricum* and *Bifidobacterium thermophilum* showed significant positive correlation with the yield of valeric acid. *C. butyricum* relative abundance was significantly positively correlated with caproic acid yield. **[Conclusion]** More valeric acid and caproic acid can be produced by fermentation of fiber feed with ethanol *in vitro*. The results provide reference data for screening ruminal bacteria that can be cultured for *in vitro* fermentation to increase the yield of valeric acid and caproic acid, and to explore the functions of ruminal bacteria.

Keywords: ethanol, bacteria diversity, fiber type feed, valeric acid, caproic acid

生物能源在可持续发展和能源再生方面具有很大的潜力,被认为是未来能源供应的主要组成部分。目前多利用生物发酵木质化纤维制造乙醇^[1-2],但通过生物发酵是否能够产生其他高附加值产品尚有待进一步研究。羧酸盐平台是一个具有潜力的研究方向,其利用微生物的厌氧发酵,降解纤维产生短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acid, SCFA)^[3]。瘤胃微生物的发酵是一个天然的生物发酵系统,可产生大量的 SCFA,其组分以乙酸、丙酸和丁酸为主,占 90%以上,戊酸和己酸产量较少(1%–2%)。C2–C4 脂肪酸属于水溶性脂肪酸,具有较强的挥发性,但戊酸和己酸可以溶于有机溶剂中,并且与 C2–C4 脂肪酸相比,其含有更多能量,可作为生物能源的前体物质,具有更高的经济价值^[4]。目前对戊酸经济价值的研究较少,而己酸在抗菌剂、饲料添加剂、风味剂、化工原料方面较大的应用潜力^[5-8]。

己酸合成的最初底物是乙酸,细菌可利用乙醇或乳酸为电子供体,通过反向 β 氧化延长乙酸碳链合成丁酸和己酸^[9]。*Clostridium kluyveri* 是目

前报道的可用于生产己酸的典型细菌^[10],这类细菌也存在于瘤胃中^[4]。Pradhan 等在荷斯坦奶牛瘤胃中灌注乙醇 5 周,发现瘤胃液中丙酸比例下降,戊酸和己酸比例上升^[11]。数十年来,体外瘤胃液接种法多用于对饲料进行发酵,用以表征饲料的消化率,阐明反刍动物群落的重要代谢活动,如纤维降解、蛋白发酵、产甲烷等^[12]。与活体发酵相比,体外厌氧发酵可以生产更多的有机酸。将牛瘤胃液与柳枝稷共培养,经过长期传代后发现,添加乙醇可以显著提高乙酸和己酸的产量^[13],有助于细菌利用有机废弃物生产己酸^[14],这表明体外培养可以实现可培养瘤胃细菌的功能挖掘。然而在体外培养条件下添加乙醇对瘤胃细菌降解不同类型的植物产 SCFA 的能力的影响少有报道。

本研究选用了 6 种在反刍动物饲料中已有应用的粗饲料与瘤胃液共培养,研究添加乙醇对第 8 代发酵液 SCFA 产量和细菌群落结构的影响,为揭示利用 6 种粗饲料发酵产 SCFA,尤其是发酵产 C5 和 C6 脂肪酸能力的潜在细菌提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将甜叶菊、稻秸、玉米芯、燕麦草、小黑麦草和黑麦草(来自扬州大学动物营养与饲料工程技术研究中心)分别经 65 °C 干燥 48 h 后得到风干样品, 再粉碎过 0.50 mm 筛, 密封备用。分别以 0.16 g 玉米酒精糟(Distillers Dried Grains with Solubles, DDGS)和 0.80 g 试验研究材料为发酵底物, 在晨饲前采集瘤胃内容物, 经 4 层无菌纱布过滤后, 迅速带回实验室。瘤胃液来自扬州大学实验农牧场(高邮)带有永久性瘤胃瘘管的干奶期荷斯坦奶牛。人工培养缓冲液参照 Menke 等^[15]方法配制。

偏磷酸、硫化钠, 国药集团化学试剂有限公司。气相色谱仪、高速离心机, Thermo 公司; 气压测定计, CeComp Electronics 公司; 恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 高通量测序 Illumina HiSeq 平台, 北京诺禾致源生物技术有限公司。

1.2 培养方法

试验使用 150 mL 体积的厌氧培养瓶为培养装置, 采集瘤胃液前称取发酵底物于培养瓶中, 加入 15 mL 缓冲液, 持续通入 CO₂ 10 min, 加入 2.5% (质量体积分数)的硫化钠溶液 0.15 mL 后, 胶塞密封, 光照至刃天青褪色。每瓶加入 2 mL 瘤胃液, 胶塞密封加铝盖后, 于 39 °C 静置培养 72 h, 视为第一代。以不加乙醇为对照组, 以加 0.2 mL 乙醇为试验组, 每组 3 个平行。每 72 h 传代一次, 传代量为 2 mL, 其他操作同上。共连续培养 8 代。

1.3 样品采集和测定

在每次传代前和 72 h 培养结束时, 测定气压和发酵液 pH 值。

收集第 8 代的发酵混合液, 按陈志远等^[16]方法对样品进行去蛋白处理和 SCFA 的测定: 12 000 r/min 离心 20 min 发酵液, 在上清液中加入

25%的偏磷酸(上清液:偏磷酸体积比为 5:1, 偏磷酸溶液含 60 mmol/L 巴豆酸), -20 °C 冷冻过夜, 之后再次离心(12 000 r/min, 20 min), 经 0.22 μm 水相滤膜过滤后, 利用气相色谱仪测定乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸的含量。色谱条件: NUKOLTM Capillary Column (Supelco)毛细柱, 30 m×0.32 mm×0.25 μm, 柱温 130 °C, FID 检测器, 检测温度 180 °C, 载气为氮气, 进样量 1.0 μL。

按 Lin 等^[13]方法提取细菌基因组 DNA。按照张雪娇等^[17]的方法, 选用 16S rRNA V4 区的 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物采用高通量测序 Illumina HiSeq 平台分析细菌群落结构。使用 Mothur 软件以一致性(Identity)为 97%将序列聚类成为 OTU, 进行细菌群落结构与 SCFA 产量的 Spearman 相关分析; 用 GraphPad 绘制发酵液 pH 值、产气量、细菌 Chao1 和 Shannon 指数图; 通过 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean)绘制聚类树分析样本间的相似性。

1.4 统计方法

以 SPSS 21.0 软件中单因素 ANOVA 方法进行差异显著性分析, 以组别为变量, 用 Tukey 进行多重比较。对于不同处理指标, 在不服从正态分布时做非参数检验重新分析显著性。试验结果以“平均数±标准差”表示, 以 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 体外发酵参数分析

6种植物与瘤胃液共培养, 传至第8代的SCFA产量见图1。从总SCFA(乙酸+丙酸+丁酸+戊酸+己酸)产量来看, 黑麦草最高, 小黑麦草次之, 甜叶菊显著低于其他5组($P<0.05$)。添加乙醇后, 小黑麦草的总SCFA产量显著降低($P<0.05$), 其他各组无显著差异。

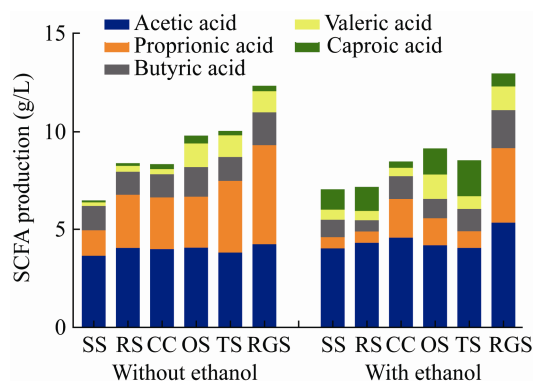


图1 乙醇对6种植物的瘤胃体外发酵液SCFA产量的影响(第8代)

Figure 1 The effect of ethanol on SCFA yield in 6 grass type fermentation with and without ethanol *in vitro* (8th generation)

注: SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。Without ethanol: 对照组; With ethanol: 乙醇添加组

Note: SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. Without ethanol: Control; With ethanol: Supplement with ethanol

进一步分析可得, 各组的乙酸产量无显著差异($P>0.05$)。丙酸产量上, 黑麦草最高, 甜叶菊最低($P<0.05$); 添加乙醇显著降低了甜叶菊、稻秸、小黑麦草和黑麦草的丙酸产量($P<0.05$)。丁酸产量

上各组间无显著差异($P>0.05$), 但添加乙醇显著降低了甜叶菊和稻秸的丁酸产量($P<0.05$)。燕麦草、小黑麦草和黑麦草的戊酸产量显著高于甜叶菊、稻秸和玉米芯($P<0.05$), 添加乙醇显著提高了小黑麦草的戊酸产量($P<0.05$)。玉米芯、燕麦草、小黑麦草和黑麦草的己酸产量显著高于甜叶菊和稻秸($P<0.05$), 添加乙醇显著提高了甜叶菊、黑麦草和小黑麦草的己酸产量($P<0.05$)。

不同发酵底物与瘤胃液共培养, 传至第8代的气体产量和 pH 值见图 2。燕麦草、小黑麦草和黑麦草的产气量较高($P<0.05$), 但 pH 值较低。添加乙醇不改变发酵液产气量, 但提高了甜叶菊、稻秸和小黑麦草的发酵液 pH 值($P<0.05$)。

2.2 体外发酵细菌群落结构的 α 多样性分析

乙醇对各组的瘤胃体外发酵液细菌 Chao1 指数和 Shannon 指数的影响见图 3。体外培养并传代 8 次后, Chao1 指数从高到低顺序为: 稻秸>玉米芯>甜叶菊>黑麦草>燕麦草>小黑麦草; 添加乙醇后的 Chao1 指数从高到低顺序为: 稻秸>玉米芯>甜叶菊>黑麦草>小黑麦草>燕麦草。Shannon 指数从高到低顺序为: 稻秸>黑麦草>燕麦草>甜叶菊>玉米

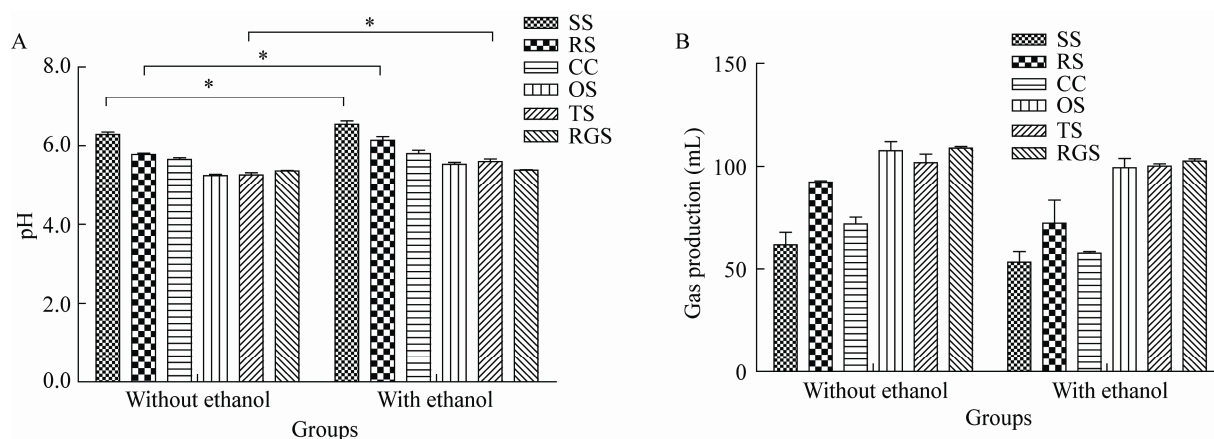


图2 乙醇对6种植物的瘤胃体外发酵液pH值和产气量的影响(第8代)

Figure 2 The effect of ethanol on pH value and gas production in 6 grass type fermentation with and without ethanol *in vitro* (8th generation)

注: A: pH值; B: 产气量。SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。Without ethanol: 对照组; With ethanol: 乙醇添加组。*: 同一种底物添加乙醇与对应的对照组数据差异显著($P<0.05$)

Note: A: pH value; B: Gas production. SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. Without ethanol: Control; With ethanol: Supplement with ethanol. *: Significant difference of same substrate with ethanol relative to that of its corresponding control date ($P<0.05$)

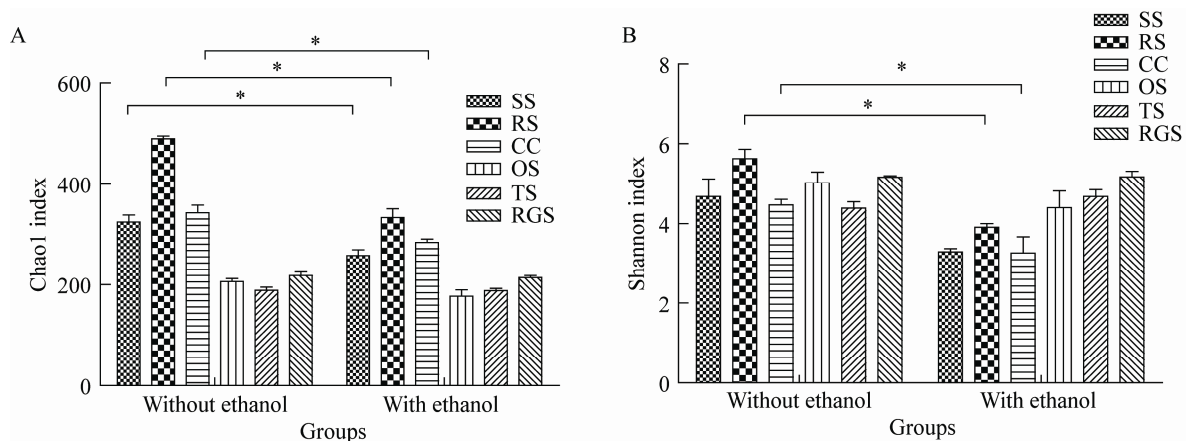


图3 乙醇对6种植物的瘤胃体外发酵液细菌Alpha指数的影响(第8代)

Figure 3 Alpha analysis of ruminal bacteria in 6 grass type fermentation with and without ethanol *in vitro* (8th generation)

注: A: Chao1 指数; B: Shannon 指数。SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。Without ethanol: 对照组; With ethanol: 乙醇添加组

Note: A: Chao1 index; B: Shannon index. SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. Without ethanol: Control; With ethanol: Supplement with ethanol

芯>小黑麦草; 添加乙醇后的 Shannon 指数从高到低顺序为: 黑麦草>小黑麦草>燕麦草>稻秸>甜叶菊>玉米芯。添加乙醇对燕麦草、小黑麦草和黑麦草的 Chao1 和 Shannon 指数无显著影响, 但乙醇显著降低了甜叶菊的 Chao1 指数, 并且显著降低了稻秸和玉米芯的 Chao1 和 Shannon 指数($P < 0.05$)。

2.3 体外发酵液细菌丰度和群落相似性分析

使用 UPGMA 对样品进行基于 Unweighted UniFrac 方法的门水平聚类分析, 结果见图 4。由图 4A 可知, 6 种植物的发酵液细菌区系可分为 2 大类, 其中燕麦草和小黑麦草的细菌群落相似度较高, 并与黑麦草的细菌区系聚为一类; 稻秸和玉米芯的瘤胃细菌群落相似度较高, 并与甜叶菊的细菌区系聚为一类。由图 4B 可知, 甜叶菊的细菌群落区系与其他 5 种发酵底物相似性最低, 独立为一类, 其他相似性分析结果与不添加乙醇的发酵底物相似。

进一步分析乙醇对每组培养 8 代后菌门相对丰度的影响见表 1。体外发酵液以厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌门。添加乙醇后, 甜叶菊和玉米芯组

的软壁菌门相对丰度显著降低, 而燕麦草和小黑麦草组的相对丰度显著升高; 稻秸和小黑麦草组的厚壁菌门相对丰度显著降低, 拟杆菌门相对丰度显著升高; 燕麦草、小黑麦草和黑麦草组放线菌门的数目相对丰度显著升高($P < 0.05$)。

选取了相对丰度前 10 的细菌进行差异分析, 比较添加乙醇对体外发酵液细菌相对丰度的影响。由图 5 可见, 甜叶菊、稻秸和玉米芯的优势菌与燕麦草、小黑麦草和黑麦草的优势菌相对丰度不同。甜叶菊前 10 的细菌相对丰度很低。稻秸和玉米芯组的 *Lachnospiraceae bacterium* RM29、*Prevotella ruminicola* 和 *Bacteroidales bacterium* RM68 的相对丰度较高($P < 0.05$); 添加乙醇提高了 *Bacteroidales bacterium* RM68 的相对丰度($P < 0.05$)。不同的是, 燕麦草、小黑麦草和黑麦草组的 *Prevotella* sp. DJF CP65、*Clostridium butyricum* 和 *Bifidobacterium thermophilum* 相对丰度较高($P < 0.05$), 且 *Treponema* sp. Ru2 在黑麦草组相对丰度较高($P < 0.05$)。添加乙醇提高了 *Prevotella* sp. DJF CP65、*Clostridium butyricum* 和 *Bifidobacterium*

thermophilum 的相对丰度 ($P<0.05$), 降低了 *Treponema* sp. Ru2 在黑麦草组的相对丰度 ($P<0.05$)。

2.4 体外发酵细菌群落与 SCFA 产量的相关性分析

表 2 为丰度为前 10 的细菌与 SCFA 产量之间的相关性分析。由表 2 可知, *L. bacterium* RM29、

B. bacterium RM68 和 *T. bryantii* 相对丰度与戊酸产量呈极显著负相关 ($P<0.01$), 与己酸产量呈显著负相关 ($P<0.05$); *Prevotella* sp. DJF CP65 相对丰度与丙酸、丁酸产量呈显著正相关 ($P<0.05$), 与戊酸产量呈极显著正相关 ($P<0.01$); *P. ruminicola* 相对丰度与丙酸、丁酸和戊酸产量呈极显著负相

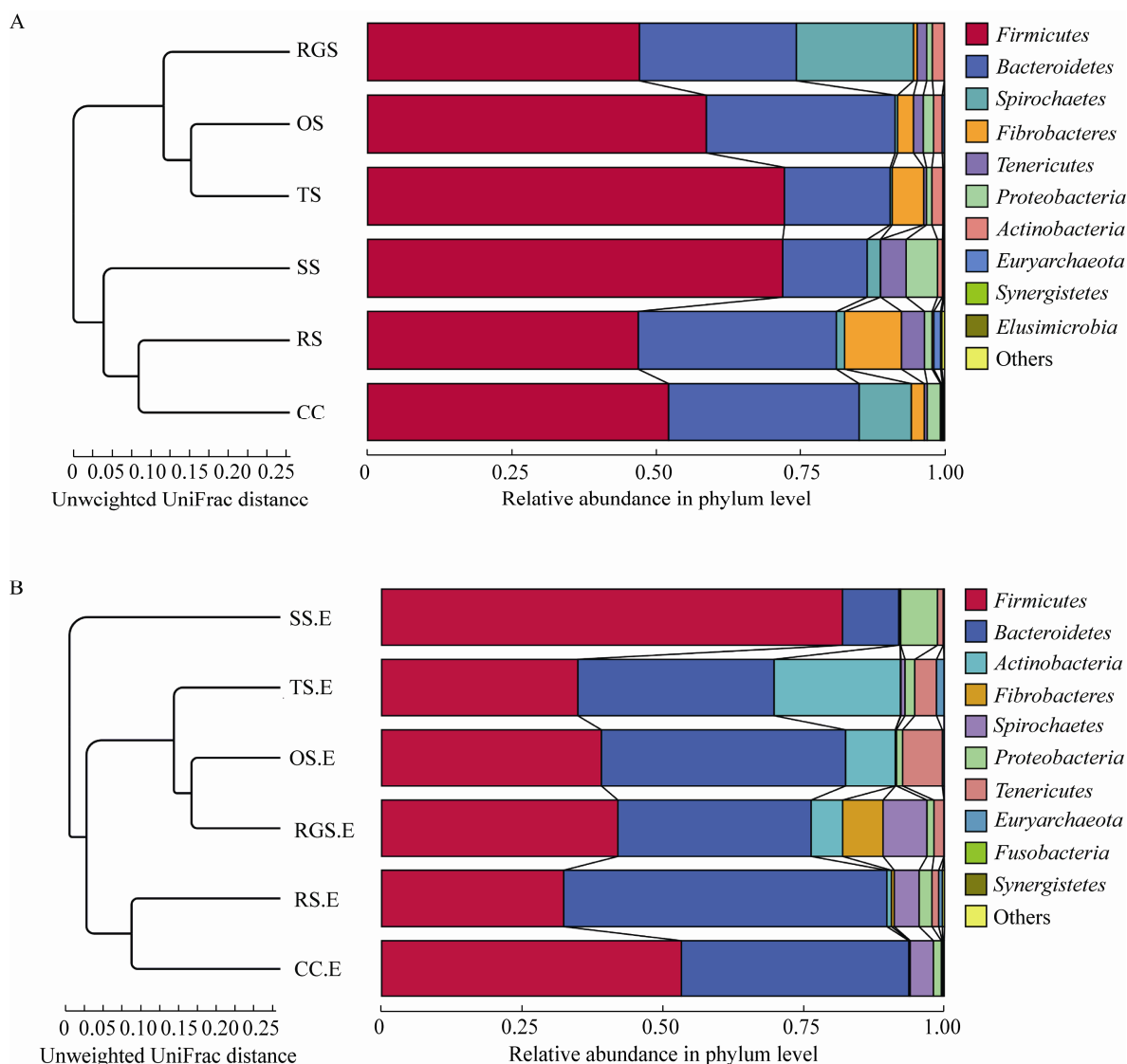


图 4 体外发酵及添加乙醇的瘤胃细菌群落间相似性聚类树(门水平, 第 8 代)

Figure 4 Similarity tree of ruminal bacteria in fermentation with and without ethanol *in vitro* (phylum, 8th generation)

注: A: 不加乙醇组; B: 乙醇添加组。SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。后缀 E 代表添加乙醇

Note: A: Without ethanol; B: With ethanol. SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. E represent with ethanol

表 1 乙醇对体外发酵细菌群落相对丰度的影响(门水平, 前 7)

Table 1 Effects of ethanol on relative abundance of ruminal bacteria (phylum, top 7)

项目 Items	厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	螺旋体门 <i>Spirochaetes</i>	放线菌门 <i>Actinobacteria</i>	纤维杆菌门 <i>Fibrobacteres</i>	变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	软壁菌门 <i>Tenericutes</i>
SS	71.93±7.23	14.67±4.02	2.29±0.07	0.84±0.06	0.03±0.01	5.43±1.12	4.43±1.45a
RS	46.92±2.55a	34.35±3.53b	1.43±0.23	0.30±0.09	9.86±2.18	1.33±0.60	3.95±0.38
CC	52.17±8.21	33.06±5.31	9.04±3.18	0.16±0.04	2.27±0.93	2.29±0.42	0.47±0.06a
OS	58.73±6.66	32.72±6.40	0.41±0.27	1.49±0.82b	2.75±0.32	1.87±0.90	1.69±0.36b
TS	72.24±10.05a	18.36±6.78b	0.33±0.07	1.93±0.82b	5.48±6.39	0.94±0.15	0.45±0.15b
RGS	47.12±7.66	27.21±3.95	20.30±4.67	2.08±0.70b	0.64±0.40	0.95±0.32	1.66±0.29
SS.E	81.89±3.23	10.04±0.25	0.09±0.04	0.20±0.09	0.01±0.01	6.55±2.86	1.04±0.55b
RS.E	32.36±0.27b	57.45±1.85a	4.43±1.88	0.77±0.36	0.53±0.07	2.27±0.25	1.19±0.02
CC.E	53.26±8.29	40.42±5.10	4.10±2.67	0.15±0.06	0.11±0.06	1.47±0.60	0.16±0.10b
OS.E	39.08±8.35	43.39±9.07	0.18±0.11	8.80±1.46a	0.05±0.03	1.12±0.41	7.04±1.88a
TS.E	34.86±8.32b	34.89±8.92a	0.69±0.09	22.46±1.80a	0.09±0.04	1.76±0.66	3.88±0.54a
RGS.E	41.97±8.57	34.36±5.24	7.82±3.58	5.61±1.64a	7.17±3.00	1.24±0.12	1.77±0.36

注: SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。后缀 E 代表添加乙醇。相同发酵底物不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. E represent with ethanol. The same substrate type with different lowercase letters show significant difference at 0.05 level

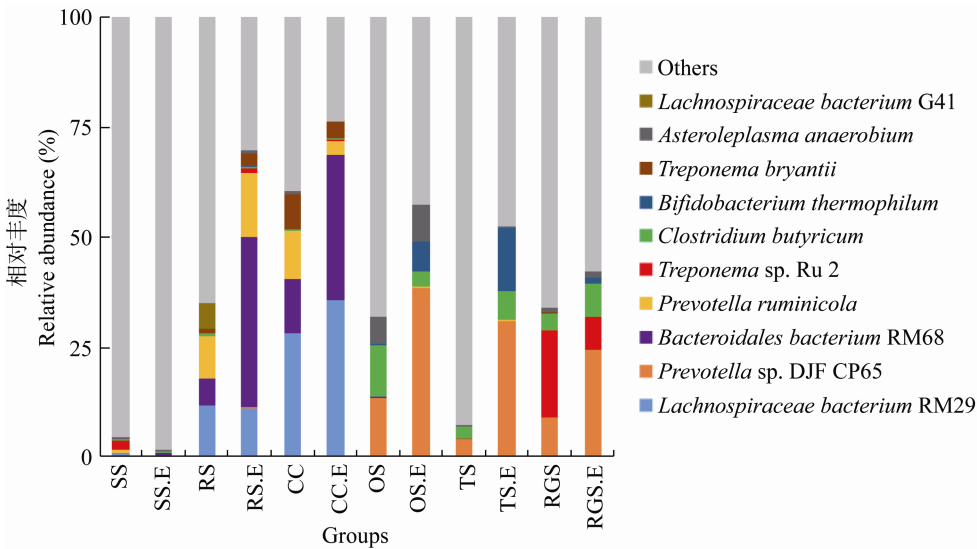


图 5 乙醇对瘤胃细菌相对丰度的影响(种水平, 前 10)

Figure 5 Effects of ethanol on relative abundance of ruminal bacteria (species, top10)

注: SS: 甜叶菊组; RS: 稻秸组; CC: 玉米芯组; OS: 燕麦草组; TS: 小黑麦草组; RGS: 黑麦草组。后缀 E 代表添加乙醇

Note: SS: Stevia straw; RS: Rice straw; CC: Corncob; OS: Oat straw; TS: Triticale straw; RGS: Ryegrass straw. E represent with ethanol

关($P<0.01$); *C. butyricum* 相对丰度与丙酸和己酸产量呈显著正相关($P<0.05$), 与戊酸产量呈极显著正相关($P<0.01$); *B. thermophilum* 和 *Asteroleplasma anaerobium* 相对丰度与戊酸产量呈极显著正相关($P<0.01$); *Lachnospiraceae bacterium G41* 相对丰度与丙酸产量呈显著负相关($P<0.05$)。

3 讨论

SCFA 产量和发酵产气量是评价饲料营养价值的重要指标, 通常这 2 个指标数值高时代表该发酵底物的营养物质含量较高。瘤胃细菌可发酵碳水化合物和蛋白质产生丙酮酸, 并再进一步降解为 SCFA^[18]。本研究中燕麦草、小黑麦草和黑麦草

表 2 发酵液细菌相对丰度与 SCFA 产量的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of bacterial community diversity and SCFA yield *in vitro*

Items	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Valeric acid	Caproic acid
<i>Lachnospiraceae bacterium</i> RM29	0.083 4	-0.225 8	-0.224 1	-0.730 0**	-0.355 5*
<i>Prevotella</i> sp. DJF CP65	0.058 7	0.368 1*	0.339 8*	0.801 0**	0.246 7
<i>Bacteroidales bacterium</i> RM68	-0.117 7	-0.237 4	-0.275 0	-0.628 1**	-0.380 1*
<i>Prevotella ruminicola</i>	-0.069 1	-0.556 3**	-0.468 6**	-0.468 4**	0.052 1
<i>Treponema</i> sp. Ru2	0.203 5	0.169 9	0.200 9	-0.068 4	-0.186 6
<i>Clostridium butyricum</i>	0.244 3	0.412 9*	0.281 6	0.796 1**	0.339 0*
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	-0.271 7	0.122 7	0.057 7	0.450 7**	0.093 6
<i>Treponema bryantii</i>	0.058 2	-0.116 9	-0.086 7	-0.643 3**	-0.366 8*
<i>Asteroleplasma anaerobium</i>	0.199 2	0.244 3	0.305 5	0.642 5**	0.229 6
<i>Lachnospiraceae bacterium</i> G41	-0.193 4	-0.383 8*	-0.317 6	-0.042 1	0.160 5

注：*：显著相关($P < 0.05$)；**：极显著相关($P < 0.01$)

Note: *: That correlation is significant at 0.05 level; **: That correlation is significant at 0.01 level

发酵液的产气量和 SCFA 总产量较高, pH 值较低, 说明这 3 种底物的营养物质含量较高, 更有利于细菌的发酵。 α 多样性指数中 Chao1 指数反映微生物群落的丰富度, Shannon 指数反映微生物群落的多样性。Chao1 指数越大, 说明群落丰富度越高; Shannon 指数越大, 说明群落的多样性越高。本研究中, 添加乙醇不改变燕麦草、小黑麦草和黑麦草的 Chao1 指数和 Shannon 指数, 说明乙醇对以营养价值高的纤维类饲料为发酵底物的细菌群落丰富度和多样性影响较小。

普雷沃氏菌属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 在瘤胃细菌中丰度最高。这类细菌可以发酵蛋白质产生氨基酸和氨, 也可以降解碳水化合物产生丙酮酸, 终产物是乙酸、丙酸和丁酸^[18]。Fraga 等报道普雷沃氏菌(*Prevotella bryantii* 3C5)在瘤胃内可提高乙酸和丁酸的比例^[19]。本研究中普雷沃氏菌(*Prevotella* sp. DJF CP65)相对丰度与戊酸产量呈显著正相关, 但该菌是否能够产戊酸未见报道, 需要进一步研究。

本研究还发现添加乙醇显著提高了小黑麦草组放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度, 而且相对丰度从 1.93% 升高到 22.46%, 这与 Lin 等^[13]报道的添加乙醇提高了放线菌门相对丰度的结果一致。嗜热双歧杆菌(*B. thermophilum*)属于放线菌门双歧

杆菌属(*Bifidobacterium*), 是动物肠道中的有益菌群。双歧杆菌的主要发酵底物是碳水化合物, 双歧杆菌在碳充足时发酵产生乳酸和乙酸, 在碳不足时发酵产生甲酸和乙酸^[20]。丁酸梭菌(*C. butyricum*)属于厚壁菌门(*Firmicutes*)梭菌属(*Clostridiales*), 在梭菌属中已报道了很多株可利用乙醇生产丁酸和己酸的菌种, 如 *Clostridium kluyveri*、*Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755、*Clostridium* sp. BS-1、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ljungdahlii* 和 *Clostridium ragsdalei*^[21-25]。其中, 克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)被认为是在体外培养中可利用窖泥或污泥等有机物最典型的己酸菌^[26]。郭威等^[27]共培养放线菌和己酸菌的结果表明, 放线菌不产生己酸, 但可以耐受一定量的乙醇, 并促进己酸菌利用乙酸和乙醇产己酸。相反, 蒋敏等^[28]的研究表明, 青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)可产生乙酸、丁酸、戊酸和己酸; Lambrecht 等^[29]也检测到双歧杆菌相对丰度随己酸产量的升高而升高, 当不再合成己酸时, 该菌消失。本研究发现, 添加乙醇后小黑麦草组的戊酸和己酸产量显著升高, 并且嗜热双歧杆菌和丁酸梭菌相对丰度显著升高, 嗜热双歧杆菌相对丰度与戊酸产量呈显著正相关, 丁酸梭菌相对丰度与

戊酸、己酸产量呈显著正相关, 这说明嗜热双歧杆菌和丁酸梭菌在瘤胃体外发酵产戊酸和己酸中具有重要作用。

4 结论

瘤胃体外传代培养技术研究表明, 甜叶菊、稻秸和玉米芯的 SCFA 产能低于燕麦草、小黑麦草和黑麦草, 后三者更有助于细菌利用乙醇产生戊酸和己酸。瘤胃丁酸梭菌和嗜热双歧杆菌可促进发酵产戊酸和己酸。

REFERENCES

- [1] Bai L, Li CM, Lv T, Du Y, Yang Y, Tian S. Research progress on the biological conversion of energy grass to cellulosic ethanol[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(5): 50-56 (in Chinese)
白龙, 李春美, 吕途, 杜颖, 杨玥, 田沈. 生物转化能源草制取纤维素乙醇的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 50-56
- [2] Cao YQ, Liu YY, Hu NJ, Hu XW, Zhang Y, Zhao Y, Wu AM. Current status and prospects of fuel ethanol production[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(4): 163-169 (in Chinese)
曹运齐, 刘云云, 胡南江, 胡晓玮, 张瑶, 赵于, 吴霁民. 燃料乙醇的发展现状分析及前景展望[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(4): 163-169
- [3] Njokweni SG, Weimer PJ, Warburg L, Marelize B, Willem HZ. Valorisation of the invasive species, *Prosopis juliflora*, using the carboxylate platform to produce volatile fatty acids[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121602
- [4] Weimer PJ, Kohn RA. Impacts of ruminal microorganisms on the production of fuels: how can we intercede from the outside?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3389-3398
- [5] Wasewar KL. Reactive extraction: an intensifying approach for carboxylic acid separation[J]. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2012, 3(4): 249-255
- [6] Zentek J, Buchheit-Renko S, Ferrara F, Vahjen W, Van Kessel AG, Pieper R. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2011, 12(1): 83-93
- [7] Serhan M, Mattar J, Debs L. Concentrated yogurt (Labneh) made of a mixture of goats' and cows' milk: physicochemical, microbiological and sensory analysis[J]. *Small Ruminant Research*, 2016, 138: 46-52
- [8] Nagao K, Yanagita T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome[J]. *Pharmacological Research*, 2010, 61(3): 208-212
- [9] De Araújo Cavalcante W, Leitão RC, Gehring TA, Angenent LT, Santaella ST. Anaerobic fermentation for *n*-caproic acid production: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 54: 106-119
- [10] Chwialkowska J, Duber A, Zagrodnik R, Walkiewicz F, Łężyk M, Oleskowicz-Popiel P. Caproic acid production from acid whey via open culture fermentation-evaluation of the role of electron donors and downstream processing[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 74-83
- [11] Pradhan K, Hemken RW. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants[J]. *Journal of Dairy Science*, 1970, 53(12): 1739-1746
- [12] Yañez-Ruiz DR, Bannink A, Dijkstra J, Kebreab E, Morgavi DP, O'Kiely P, Reynolds CK, Schwarm A, Shingfield KJ, Yu Z, et al. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants: a review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 216: 1-18
- [13] Lin M, Dai XX, Weimer PJ. Shifts in fermentation end products and bacterial community composition in long-term, sequentially transferred *in vitro* ruminal enrichment cultures fed switchgrass with and without ethanol as a co-substrate[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121324
- [14] Chen WS, Strik DPBTB, Buisman CJN, Kroeze C. Production of caproic acid from mixed organic waste: an environmental life cycle perspective[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(12): 7159-7168
- [15] Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 1979, 93(1): 217-222
- [16] Chen ZY, Ma TT, Fang W, Zuo XX, Lin M, Zhao GQ. Effects of dietary nitrate dosage on ruminal nitrate disappearance rate, fermentation parameters and concentration of blood methemoglobin of *Hu Sheep*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(2): 95-104 (in Chinese)
陈志远, 马婷婷, 方伟, 左晓昕, 林森, 赵国琦. 日粮硝酸盐水平对湖羊瘤胃硝态氮动态消失率、发酵参数及血液高铁血红蛋白含量的影响[J]. *草业学报*, 2016, 25(2): 95-104
- [17] Zhang XJ, Wang LZ. Effects of dietary neutral detergent fibre level on structure and composition of rumen bacteria in goats[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(4): 1377-1386 (in Chinese)
张雪娇, 王立志. 饲料中性洗涤纤维水平对山羊瘤胃细菌结构及组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(4): 1377-1386
- [18] Xing BS, Han YL, Wang XC, Wen JW, Cao SF, Zhang KD, Li Q, Yuan HL. Persistent action of cow rumen

- microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136529
- [19] Fraga M, Fernández S, Perelmutter K, Pomiés N, Cajarville C, Zunino P. The use of *Prevotella bryantii* 3C5 for modulation of the ruminal environment in an ovine model[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(S1): 101-106
- [20] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, 62(1): 67-72
- [21] Andersen SJ, De Groof V, Khor WC, Roume H, Props R, Coma M, Rabaey K. A *Clostridium* group IV species dominates and suppresses a mixed culture fermentation by tolerance to medium chain fatty acids products[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2017, 5: 8
- [22] Kim H, Jeon BS, Pandey A, Sang BI. New coculture system of *Clostridium* spp. and *Megasphaera hexanoica* using submerged hollow-fiber membrane bioreactors for caproic acid production[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 498-503
- [23] Jeon BS, Kim BC, Um Y, Sang BI. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(5): 1161-1167
- [24] Richter H, Molitor B, Diender M, Sousa DZ, Angenent LT. A narrow pH range supports butanol, hexanol, and octanol production from syngas in a continuous co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extraction[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1773
- [25] Perez JM, Richter H, Loftus SE, Angenent LT. Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(4): 1066-1077
- [26] Seedorf H, Fricke WF, Veith B, Brüggemann H, Liesegang H, Strittmatter A, Miethke M, Buckel W, Hinderberge J, Li FL, et al. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2128-2133
- [27] Guo W, Huang Y, Xie YQ, Fang SL, Chen MB. Screening of fine actinomycetes that promoting caproic acid bacteria producing caproic acid[J]. *Liquor Making*, 2016, 43(3): 47-51 (in Chinese)
郭威, 黄宇, 谢逾群, 方尚玲, 陈茂彬. 促己酸菌产己酸的优良放线菌的筛选[J]. *酿酒*, 2016, 43(3): 47-51
- [28] Jiang M, Wang M, Li H, Shi JS. Investigation on the regular patterns of konjac mannan oligosaccharide utilization by different bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 14-19 (in Chinese)
蒋敏, 王苗, 李恒, 史劲松. 不同微生物对魔芋低聚甘露糖的降解与利用比较[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 14-19
- [29] Lambrecht J, Cichocki N, Schattenberg F, Kleinsteuber S, Harms H, Müller S, Sträuber H. Key sub-community dynamics of medium-chain carboxylate production[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 92