



体外法研究猪后肠道对芳香族氨基酸的发酵特性

马梅蕾, 何香玉, 朱伟云*

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

摘要: 【目的】采用体外发酵技术探究芳香族氨基酸在猪后肠的发酵特性。【方法】以杜×长×大育肥猪回肠、盲肠和结肠食糜为接种物, 接种于10 mmol/L单一氨基酸的培养基中, 37 °C培养24 h, 测定4、8、12、16和24 h的产气量(GP), 采集0 h和24 h样品, 测定样品中的氨氮(NH₃-N)和微生物蛋白(MCP)浓度, 利用变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和Real-time PCR定量技术分析体外培养中参与代谢特定氨基酸的细菌组成及数量。【结果】不同芳香族氨基酸的发酵液中NH₃-N和MCP浓度存在极显著差异($P<0.01$), 肠段对GP、NH₃-N和MCP影响极显著($P<0.01$), 且芳香族氨基酸与肠段对GP、NH₃-N和MCP浓度均存在交互作用($P<0.01$)。定量PCR表明, 芳香族氨基酸和肠段均显著影响发酵液中总菌数量($P<0.05$)。DGGE分析显示, 同一肠段不同芳香族氨基酸组的细菌群落结构具有高度的相似性, 其中回肠Phe组和Tyr组、结肠Tyr组和Trp组的相似性分别高达87.9%和80.5%, 盲肠和结肠微生物香农指数变化显著($P<0.05$)。【结论】不同芳香族氨基酸的肠道代谢菌具有差异性, 与Trp和Phe相比, Tyr的盲肠和结肠代谢菌多样性较低, 与Trp和Tyr相比, Phe更多地合成菌体; 特定芳香族氨基酸的不同肠道发酵去向不同, 与回肠和盲肠比, 结肠中芳香族氨基酸更多地合成菌体。

关键词: 体外发酵, 肠段, 芳香族氨基酸, 细菌菌群

芳香族氨基酸(Aromatic amino acid, AAA)是一类含有芳香环的 α -氨基酸, 包括苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp), 其中苯丙氨酸和色氨酸是人体的必需氨基酸, 在生命活动中起着极其重要的作用。有报道指出芳香族氨基酸能够通过抑制重塑基因的表达来下调破骨细胞的分化, 进而促进体内骨量的增加, 且体内芳香族氨

基酸浓度过高或过低也将引起机体代谢的紊乱^[1]。近年来, 国内外对氨基酸肠道代谢的研究, 主要集中在小肠肠壁细胞的吸收利用和肠道细菌对氨基酸的发酵^[2]。Dai等^[3]通过体外培养和继代研究发现猪小肠(十二指肠、空肠和回肠)对Phe和Trp的代谢很有限, 显著低于其他必需氨基酸。然而, 有关大肠中这些氨基酸的代谢研究则鲜有报

基金项目: 国家自然科学基金(31430082); 国家“973计划”(2013CB127300); 江苏省自然科学基金(BK20130058)

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

收稿日期: 2016-03-15; 修回日期: 2016-05-10; 网络出版日期: 2016-05-13

道。故本研究通过体外发酵技术探究单一芳香族氨基酸在猪后肠发酵的特异性及肠段效应, 分析比较代谢特定芳香族氨基酸的细菌菌群组成与结构, 为日粮中氨基酸的添加及后肠的N营养素的利用提供参考数据和理论支持。

1 材料和方法

1.1 接种物制备

回肠、盲肠和结肠的食糜样品取自于4头健康的杜×长×大育肥猪(玉米-豆粕日粮)。分别采集3个肠段的中段内容物, 混匀, 称量。用量筒量取37 °C预热的灭菌磷酸盐缓冲液稀释(PBS), PBS与食糜样品的稀释比例为9:1。将混合液经4层无菌纱布滤过至充满CO₂的血清瓶中。另外, 分别测定回肠、盲肠和结肠中这3种芳香族氨基酸的含量, 其含量在0.1 μmol/L左右(此部分数据尚未发表)。整个过程严格厌氧。

磷酸盐缓冲溶液(PBS): 称取4.0 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.72 g Na₂HPO₄·2H₂O和0.12 g KH₂PO₄用少量去离子水溶解, 并定容至500 mL, 混匀后115 °C灭菌15 min。

1.2 培养基制备

厌氧培养基及其制备参考Dai等^[3]的方法。培养基持续通入CO₂约6 h, 至溶液澄清呈淡黄色后, 分装88 mL至血清瓶, 115 °C灭菌15 min。氨基酸培养基需将10 mL氨基酸母液注入血清瓶中使终浓度为10 mmol/L。接种前将1 mL维生素溶液和1 mL还原剂溶液注入培养基, 37 °C预热30 min。

1.3 试验设计

每种氨基酸均设3个处理组和1个正对照组, 每组3个重复。其中3个处理组分别接种5 mL回肠稀释液、盲肠稀释液或结肠稀释液于10 mmol/L单一氨基酸(Phe、Tyr或Trp) 37 °C预热的培养基中, 正对照组无接种物添加。另设3个负对照组,

负对照组分别将5 mL接种物注入37 °C预热的无氨基酸基础培养基。最后, 将所有血清瓶置于37 °C水浴锅中培养24 h。

1.4 发酵指标测定

参照朱伟云等^[4]测定发酵过程4、8、12、16及24 h的产气量(GP); 培养24 h后冰水浴结束发酵, 参照Weatherburn等^[5]改进方法测定NH₃-N浓度; 参照Makkar等^[6]改进方法测定菌体蛋白MCP浓度。

1.5 总菌DNA的提取、PCR-DGGE和Real-time PCR

参照文献Zhu等^[7], 采用珠磨法(bead-beating)及酚-氯仿-异戊醇抽提发酵液样品基因组DNA, 使用Taq DNA polymerase试剂盒(上海生工)使用引物U968-GC和L1401R对细菌16S rRNA的V6-V8可变区进行PCR扩增, 并对扩增产物进行DGGE分析。采用伯乐Dcode™系统(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)进行变性梯度凝胶电泳, 变性梯度为39%–49%。使用GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)及扫描, 并使用GelCompare II 软件对DGGE图谱进行相似性分析。

根据Denman等^[8]采用Real-time PCR对发酵液样品进行总菌的绝对定量, 实验仪器为Step One Plus (Life Technologies, CA, USA)。引物P1/P2由生工生物技术(上海)有限公司合成。反应体系(20 μL): 10 μL SYBP Green PCR Super mix (TaKaRa), 上游引物0.4 μL、下游引物0.4 μL、0.4 μL ROX染料、6.8 μL灭菌超纯水及2 μL待测DNA样品。反应参数: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环; 95 °C 15 s, 循环1次。每个DNA样品做3个重复。标准曲线由10⁹以1:10梯度稀释至10³, 每个稀释梯度设3个重复。

1.6 数据统计分析

发酵指标等试验数据经Excel 2010整理后, 利用SPSS 17.0 进行多因素方差分析, 用Duncan氏

法进行多重比较。实验结果以平均值(Mean)表示, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果和分析

2.1 体外发酵产气量的变化

由表1可以看出: 随着时间的延长产气量逐渐上升, 前8 h发酵产气较为缓慢, 8 h以后发酵产气效率增加, 且同一芳香族氨基酸发酵的产气量累积规律相似。芳香族氨基酸对体外发酵产气影响不显著。肠道食糜对产气量影响显著($P < 0.05$), 且12 h以后呈现极显著影响($P < 0.001$), 其中回肠产气量最高, 盲肠和结肠产气量较低。肠道与芳香族氨基酸对各时间点产气量有显著的交互作用($P < 0.05$), 16 h以后呈现极显著的交互作用($P < 0.001$), 其中回肠Trp组最高, 结肠Tyr组最低, 产气量分别为72.97 mL和44.70 mL。结果提

示, 肠道不同部位对芳香族氨基酸的利用不一致, Phe、Tyr和Trp肠道代谢存在区室化效应。

2.2 体外发酵24 h后NH₃-N和MCP浓度的变化

由表2可以看出, 至发酵终点时, 培养液中NH₃-N浓度呈现下降的状态(结肠中Phe组例外), MCP浓度适当升高。NH₃-N测定结果显示, 芳香族氨基酸对培养液中NH₃-N浓度变化影响极显著($P < 0.001$), Tyr组体外发酵中NH₃-N浓度变化最大, Trp组居中, Phe组最小, 且结肠Phe组培养液中NH₃-N浓度升高了5.69 mg/L。肠道对培养液中NH₃-N浓度变化影响极显著($P < 0.01$), 回肠和结肠组显著高于盲肠组($P < 0.05$)。肠道和芳香族氨基酸对培养液中NH₃-N浓度变化有极显著的交互作用($P < 0.001$), 其中结肠Tyr组和Trp组中NH₃-N浓度变化较大, 体外培养24 h后发酵液中NH₃-N浓度分别下降了22.18 mg/L和20.12 mg/L。

表1. 不同肠段芳香族氨基酸体外厌氧发酵产气量变化

Table 1. Cumulative gas production of aromatic amino acids in different intestinal segments during *in vitro* fermentation

Segment	Amino acid	Gas production/mL				
		4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
Ileum	Phe	0.63	10.97	27.77	46.47	65.07
	Tyr	5.77	16.37	33.33	52.30	72.97
	Trp	1.93	13.30	30.63	50.47	69.60
Cecum	Phe	7.00	14.46	23.67	35.30	58.07
	Tyr	2.50	7.56	15.37	24.10	45.17
	Trp	4.10	9.53	17.13	26.57	47.70
Colon	Phe	2.37	7.57	16.03	27.33	50.13
	Tyr	2.50	7.83	15.20	24.37	44.70
	Trp	2.07	11.60	20.53	29.43	52.53
SEM		0.353	0.343	0.374	0.437	0.600
<i>P</i> -value AA		0.649	0.843	0.716	0.294	0.154
<i>P</i> -value Segment		0.102	0.023	<0.001	<0.001	<0.001
<i>P</i> -value AA × Segment		0.027	0.026	0.025	0.008	0.001

In the same column, values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

表2. 芳香族氨基酸体外发酵24 h后NH₃-N和MCP的浓度变化Table 2. Concentrations of NH₃-N and MCP of aromatic amino acids in different intestinal segments during *in vitro* fermentation after 24 h

Segment	NH ₃ -N [*] /(mg/L)			SEM	P AA	MCP ^{**} /(mg/L)			SEM	P AA
	Phe	Tyr	Trp			Phe	Tyr	Trp		
Ileum	-12.37 ^{Ab}	-14.89 ^{Ba}	-12.00 ^{Bb}	0.41	0.055	70.61 ^{Bc}	0.94 ^{Aa}	35.67 ^{Ab}	3.71	0.001
Cecum	-0.94 ^{Bb}	-16.28 ^{Ba}	-13.15 ^{Ba}	0.57	<0.001	34.56 ^{Ab}	8.56 ^{Aa}	45.33 ^{Ab}	3.42	0.012
Colon	5.69 ^{Cb}	-22.18 ^{Aa}	-20.12 ^{Aa}	0.347	<0.001	104.94 ^{Cb}	74.83 ^{Ba}	91.44 ^{Bab}	4.28	0.074
SEM	2.68	1.16	1.32			10.88	12.03	9.20		
P-value Segment	<0.001	<0.001	<0.001			0.002	<0.001	0.002		
P-value AA × Segment	<0.001					0.009				

* A positive value indicated that concentration of NH₃-N increased, and a negative value indicated that concentration of NH₃-N decreased *in vitro* fermentation after 24 h; ** A positive value indicated that concentration of MCP increased *in vitro* fermentation after 24 h. Capitals indicate significant for the same substrate with different segments; small letters indicate significant difference between intestinal segment with different substrates. Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

芳香族氨基酸对培养液中MCP浓度变化影响极显著($P < 0.001$), 发酵24 h后, Phe组MCP浓度变化最大, Trp组MCP浓度变化居中, Tyr组变化最小。肠道对培养液中MCP浓度变化影响极显著($P < 0.001$), 结肠组显著高于回肠和盲肠组($P < 0.05$), 且Phe组中不同肠道发酵, 其MCP浓度的变化存在显著性差异($P < 0.05$), 符合结肠>回肠>盲肠。肠道和芳香族氨基酸对MCP浓度变化存在极显著的交互作用($P < 0.01$), 结肠Phe组和Trp组的MCP浓度变化最大, 分别升高了104.94 mg/L和91.44 mg/L, 回肠Tyr组MCP浓度变化最小, 仅上升了0.94 mg/L。NH₃-N和MCP的测定结果说明Phe、Tyr和Trp的肠道代谢和利用途径存在差异。

2.3 回、盲、结肠体外培养中利用芳香族氨基酸的菌群结构与数量

DGGE图谱(图1)显示了芳香族氨基酸的后肠发酵微生物菌群的复杂多样。Phe组、Tyr组和Trp组的图谱上显现许多共有条带, 相似性分析表明, 回肠Phe组和Tyr组、结肠Tyr组和Trp组的相似性分别高达87.9%和80.5%, 且回肠和盲肠中Phe组和Tyr组具有较高的相似性, 这可能与动物

机体内能够完成Phe向Tyr转化有关。但是氨基酸组间也存在了一些差异性条带, 组间DGGE图谱上优势条带在位置、灰度及数量上有明显差异, Phe组优势条带部分区别于Tyr组和Trp组。盲肠组和结肠组微生物条带数量庞大, 更为复杂, 且微生物的香农指数变化显著($P < 0.05$), Tyr组在盲肠和结肠中均呈现出较低的水平。这些结果表明不同芳香族氨基酸的添加可以引起肠道细菌群落结构变化的差异。

取等量样品通过定量分析发酵液中的总菌数量, 结果显示芳香族氨基酸和肠道均能够显著性影响培养液中总菌数量($P < 0.05$), 其中Trp组总菌数量显著低于Phe组和Tyr组, 结肠总菌数量显著高于回肠组与盲肠组。同一氨基酸添加不同肠段处理组比较, 只有Trp组受肠段影响显著($P < 0.05$), 总菌数量存在回肠<盲肠<结肠的关系。肠道对Phe和Tyr有影响趋势($P < 0.1$)。同一肠段不同芳香族氨基酸处理组比较, 回肠处理Trp组总菌数量显著低于与其它AA组($P < 0.05$); 盲肠和结肠中Phe组、Tyr组与Trp组的总菌数量均没有显著性差异(表3)。

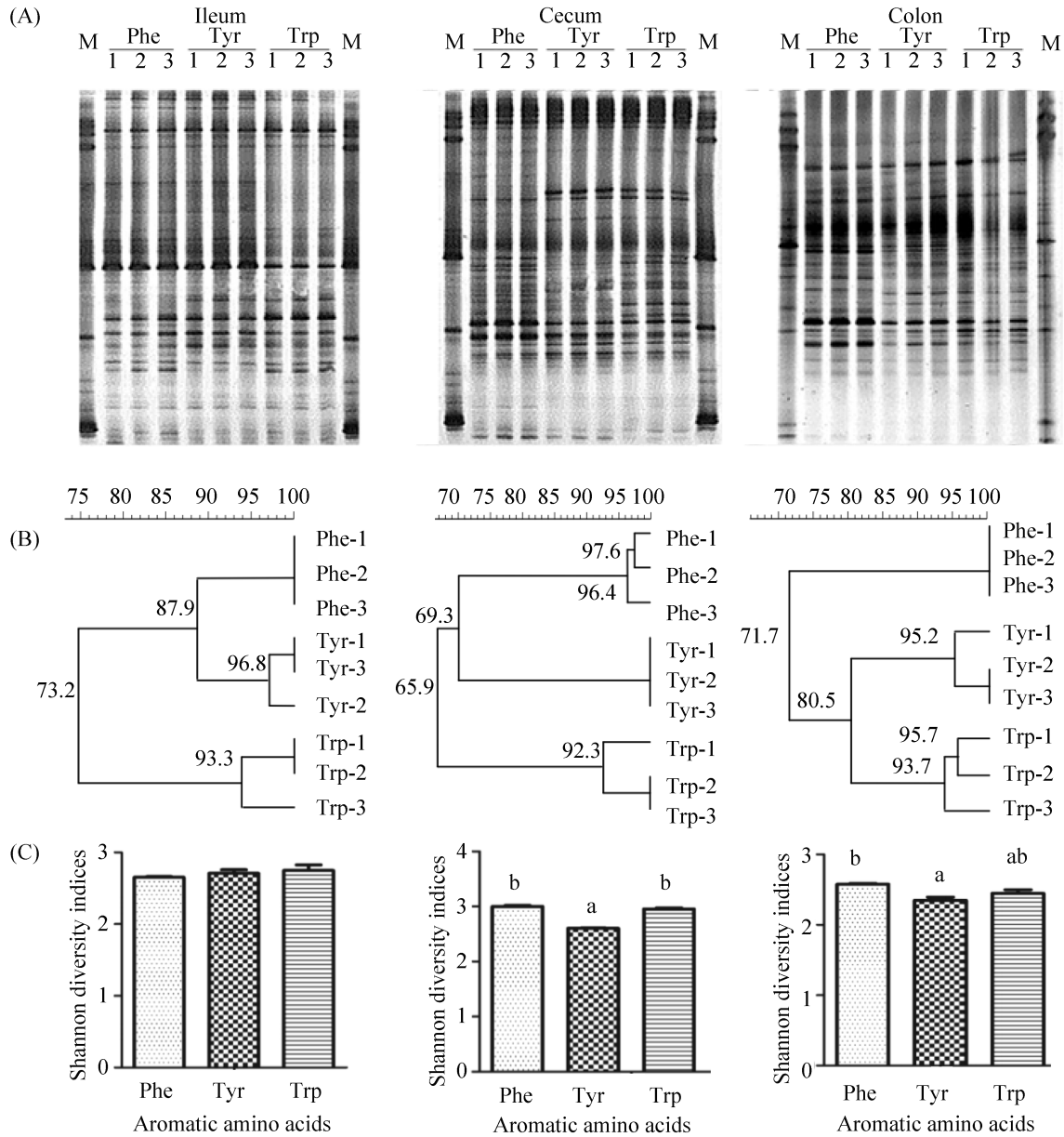


图 1. 芳香族氨基酸体外培养24 h不同肠段微生物DGGE图谱(A)、聚类分析(B)及香农指数(C)的变化

Figure 1. DGGE profiles (A), cluster analysis (B) and Shannon-Wiener index (C) of microbial community in different intestinal compartments after 24 h cultivation of aromatic amino acids. A: M, marker includes different PCR products of five bands excised from a previous experiment; 1–3, represent triplicate samples from each group. C: columns with different letters mean significant difference ($P < 0.05$). Phe: phenylalanine; Tyr: tyrosine; Trp: tryptophan.

3 讨论

3.1 芳香族氨基酸体外发酵特性的评价

通常情况下, 体外产气法常用于饲料营养价

值的评定。日粮中非结构性碳水化合物的发酵产气效率最高, 其次是蛋白质、多肽和氨基酸, 而结构性碳水化合物最低。本试验中氨基酸组间产气量无差异, 其原因可能是葡萄糖作为唯一碳

表3. 体外发酵芳香族氨基酸试验中细菌总菌的数量 [Lg(copies/mL)]

Table 3. Copy numbers of total bacteria of aromatic amino acids during *in vitro* fermentation for 24 h [Lg(copies/mL)]

Segments	AA			SEM	P-value AA
	Phe	Tyr	Trp		
Ileum	9.163 ^b	9.197 ^b	8.643 ^{Aa}	0.059	0.02
Cecum	9.161	9.236	9.058 ^B	0.058	0.52
Colon	9.557	9.512	9.352 ^C	0.051	0.24
SEM	0.069	0.051	0.043		
P-value Segment	0.093	0.086	0.020		
P-value AA× Segment	0.172				

Capitals indicate significant for the same substrate with different segments; small letters indicate significant difference between intestinal segment with different substrates. Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

源, 其含量相对丰富, 经24 h体外培养, 发酵液中葡萄糖发酵产气, 为细菌利用氨基酸合成菌体蛋白提供能量。

3.2 芳香族氨基酸体外发酵过程中NH₃-N和MCP浓度变化

发酵液中NH₃-N是芳香族氨基酸与食糜中含氮物质的降解及微生物对NH₃-N利用的综合反映。肠道细菌能够利用NH₃-N合成MCP。在本研究中, 经过24 h培养, 氨基酸组普遍呈现NH₃-N浓度下降(结肠Phe组除外)、MCP浓度上升的状态, 其原因可能是发酵液中碳源丰富, 且非结构性碳水化合物利用菌含量较多, 此类细菌在氨基酸存在时能够大量利用NH₃-N和芳香族氨基酸合成MCP, 代谢产生NH₃-N水平相对较低, 进而导致发酵液中NH₃-N含量降低, MCP含量升高。这与氨基酸组产气量无差异的原因相一致。Pieper等^[9]和Williams等^[10]关于日粮成分的研究也都证明了肠道微生物的发酵受碳氮比例的影响。

本研究中, 氨基酸组中NH₃-N浓度变化和MCP浓度变化规律相反, 即NH₃-N浓度下降表现

为: Phe组<Trp组<Tyr组, MCP浓度上升表现为: Phe组>Trp组>Tyr组。本研究采用Bradford法测定微生物蛋白, 其原理就是染料与蛋白质中碱性氨基酸(特别是Arg)和芳香族氨基酸残基的结合^[11]。因此, 这一结果反应了芳香族氨基酸参与MCP合成的量存在一定的差异, 同时也说明Phe和Trp不仅是构成动物机体的必需氨基酸, 而且也是微生物蛋白的重要组成成分。与Phe相比, Tyr和Trp参与合成MCP的量较低, 这与Phe在生物体内物质转化有关。L-Phe经苯丙氨酸羟化酶羟基化可以生成L-Tyr, 为菌体蛋白的合成提供原料, 且此反应是不可逆的^[12]。Gertsman等^[13]研究发现Trp具有促进其它氨基酸合成蛋白质的作用, 但其本身利用量相对较低。

3.3 芳香族氨基酸发酵的肠道区室性

本研究中肠道微生物的体外发酵产气、NH₃-N和MCP浓度均存在肠段区室性, 回肠组产气量和NH₃-N下降值明显高于盲肠与结肠组, 而结肠MCP浓度最高。其原因是不同肠道食糜接种物中的营养底物成分以及微生物菌群不同。小肠和大肠因其生理功能和内环境的不同, 日粮的肠道代谢存在区室化特征: 小肠主要是进行大分子营养物质的消化吸收(以小肽和氨基酸为主), 大肠内则进行未被消化的蛋白质、碳水化合物的微生物发酵。同时, 小肠中微生物菌群相对于大肠较少, 大肠中结肠菌群又相对多于盲肠。本研究中回肠食糜接种物中含有高水平的碳水化合物和蛋白质, 直接导致回肠组底物发酵活跃, 产气效率较高, NH₃-N利用和MCP合成加快。同时又因为结肠食糜接种中微生物种类与数量相对较高, 所以导致结肠MCP合成量最大。

3.4 芳香族氨基酸体外培养中细菌群落结构和数量的变化

本研究DGGE图谱中, 相同位置出现了许多共有条带和一些特异性的条带, 表明实验组之间存在差异性, 说明发酵底物的不同引起发酵液中

细菌群落结构变化的差异。本实验室已有研究报道指出日粮成分能够影响肠道微生物的组成, Zhou等^[14]研究发现低蛋白日粮能够显著性降低盲肠乳杆菌属(*Lactobacillus*)和结肠链球菌属(*Streptococcus*)的数量,同时引起盲肠普雷沃氏菌属(*Prevotella*),粪球菌属(*Coprococcus*)和结肠八联球菌属(*Sarcina*)等细菌数量的上升。Russell等^[15]通过高蛋白中等碳水化合物和高蛋白低碳水化合物日粮的交叉实验也发现高蛋白低碳水化合物日粮能够导致粪中毛螺菌科罗氏菌属(*Roseburia*)和真细菌属(*Eubacterium*)及其代谢产物丁酸和短链脂肪酸总量的下降。本研究中,从优势条带、相似性分析和香农指数证实盲肠和结肠中Phe组细菌菌落结构明显区别与Tyr组,与Trp组在香农指数上无差异,其可能原因主要有:一是微生物对Phe和Trp的生物合成与代谢利用更为普遍;二是Phe和Trp除了是人和动物的必需氨基酸,也可能是某些微生物的必需氨基酸。同时,本研究中总菌数量定量分析表明,体外培养24 h后Trp组总菌数量较其他两组低,说明Trp的肠道合成菌体作用弱于Phe和Tyr。Xu等^[16]研究证实Trp经微生物转化可以生成粪臭素和吲哚等有害的物质,进而也可以扰乱肠道群落结构影响机体健康。同时,本研究发现回肠组总菌数量较结肠组低,与盲肠组无差异,这可能是由于结肠细菌对芳香族氨基酸的利用能力较回肠更强。另一方面,也说明了肠道细菌群落结构的区室化效应。

本试验探究了猪后肠道单一芳香族氨基酸的发酵特性,在下一步研究中,将进行混合芳香族氨基酸在猪后肠道的发酵和氨基酸代谢水平及去向的研究。

4 结论

不同芳香族氨基酸能够引起发酵液中NH₃-N、MCP、总菌数量和细菌群落结构的变化,就肠道菌体合成作用而言Phe的效果更佳;肠道微生物体外发酵的差异则是由肠道区室化效应引起的。

参考文献

- [1] El Refaey M, Zhong Q, Ding KH, Shi XM, Xu JR, Bollag WB, Hill WD, Chutkan N, Robbins R, Nadeau H, Johnson M, Hamrick MW, Isales CM. Impact of dietary aromatic amino acids on osteoclastic activity. *Calcified Tissue International*, 2014, 95(2): 174–182.
- [2] Wu GY. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(8): 1249–1252.
- [3] 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.
- [4] Zhu WY, Mao SY, Wang QJ, Yao W, Theodorou MK. Study on the screening of anaerobic fungi by *in vitro* fermentation. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(3): 44–48. (in Chinese)
朱伟云, 毛胜勇, 王全军, 姚文, Theodorou MK. 厌氧真菌体外发酵筛选技术的研究. *南京农业大学学报*, 2001, 24(3): 44–48.
- [5] Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971–974.
- [6] Makkar HPS, Sharma OP, Dawra RK, Negi SS. Simple determination of microbial protein in rumen liquor. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(11): 2170–2173.
- [7] Zhu WY, Williams BA, Konstantinov SR, Tamminga S, De Vos WM, Akkermans ADL. Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during *in vitro* fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculum. *Anaerobe*, 2003, 9(4): 175–180.
- [8] Denman SE, McSweeney CS. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 58(3): 572–582.
- [9] Pieper R, Neumann K, Krger S, Richter JF, Wang J, Martin L, Bindelle J, Htoo JK, Vahjen V, Van Kessel AG, Zentek J. Influence of fermentable carbohydrates or protein on large intestinal and urinary metabolomic profiles in piglets. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(Suppl 4): 34–36.
- [10] Williams BA, Zhang DG, Lisle AT, Mikkelsen D, McSweeney CS, Kang S, Bryden WL, Gidley MJ. Soluble arabinoxylan enhances large intestinal microbial health biomarkers in pigs fed a red meat-containing diet. *Nutrition*, 2016, 32(4): 491–497.
- [11] Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation//Walker JM. Basic protein and peptide protocols. Totowa, N.J.: Humana Press, 1994: 9–15.
- [12] Wang QP, Tang AG. Phenylalanine metabolic disorders and diseases. *Foreign Medical Sciences • Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, 2001, 21(6): 451–453. (in Chinese)

- 王清平. 苯丙氨酸代谢失调与疾病. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(6): 451–453.
- [13] Gertsman I, Gangoiti JA, Nyhan WL, Barshop BA. Perturbations of tyrosine metabolism promote the indolepyruvate pathway *via* tryptophan in host and microbiome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2015, 114(3): 431–437.
- [14] Zhou LP, Fang LD, Sun Y, Su Y, Zhu WY. Effects of the dietary protein level on the microbial composition and metabolomic profile in the hindgut of the pig. *Anaerobe*, 2016, 38: 61–69.
- [15] Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, Duncan G, Johnstone AM, Lobley GE, Wallace RJ, Duthie GG, Flint HJ. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 93(5): 1062–1072.
- [16] Xu ZR, Hu CH, Wang MQ. Effects of fructooligosaccharide on conversion of L-tryptophan to skatole and indole by mixed populations of pig fecal bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48(2): 83–89.

Metabolic pattern of pig hindgut bacteria on aromatic amino acids by an *in vitro* fermentation method

Meilei Ma, Xiangyu He, Weiyun Zhu*

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

Abstract: [Objective] This experiment was conducted to study different metabolic patterns of pig hindgut bacteria on aromatic amino acids by an *in vitro* fermentation method. [Methods] Ileum, cecum and colon chyme in Duroc, Landrace and Yorkshire goods hybridization pigs were taken as inoculum. The single aromatic amino acid concentration was kept 10 mmol/L in fermentation flask. Then the fermentation flask was incubated at 37 °C for 24 h. Gas production was measured at 4, 8, 12, 16 and 24 h, and samples of fermentation collected at 0 h and 24 h were used to measure ammonia nitrogen NH₃-N and microbial crude protein (MCP). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real-time PCR were used to monitor and quantify the development of bacteria community in zymotic fluid. [Results] The concentrations of NH₃-N and MCP were significantly affected by aromatic amino acids and intestinal segments ($P < 0.01$). Intestinal segments also affected gas production (GP) significantly ($P < 0.01$). NH₃-N, MCP and GP were affected by interaction of aromatic amino acids and intestinal segments. DGGE analysis showed bacteria of aromatic amino acids shared amount of bands together, especially similarity analysis of DGGE profile of Phe and Tyr in ileum, Tyr and Trp in colon were 87.9% and 80.5% separately. Shannon diversity indices analysis revealed that aromatic amino acids in cecum and colon varied significantly ($P < 0.05$). Real-time PCR results showed that the quantity of total bacteria were affected by aromatic amino acids and intestinal segments significantly ($P < 0.05$). [Conclusion] The potential as proportion of different aromatic amino acids are different. Compared with Trp and Phe, the diversity of bacteria utilizing Tyr in cecum or colon is low; compared with Tyr and Trp, a large number of Phe participated in synthesizing bacteria. The fermentation pattern of specific aromatic amino acids in different intestinal segment was unique. Compared with ileum and cecum, much more aromatic amino acids participated in the synthesis of bacteria in colon.

Keywords: *in vitro*, intestinal segment, aromatic amino acids, bacteria community

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31430082), by the National Program on Key Basic Research Project of China (2013CB127300) and by the Jiangsu Province Natural Science Foundation (BK20130058)

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

Received: 15 March 2016; Revised: 10 May 2016; Published online: 13 May 2016