

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 035

一株利用乳酸产丁酸梭菌 BEY8 的鉴定及其特性

胡小红¹, 周艳¹, 陶勇², 朱晓宇², 魏娜²,
梁程², 何晓红², 高平¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 中国科学院环境与应用微生物重点实验室, 成都 610041)

摘要: 从窖泥中分离到一株能利用乳酸产丁酸的菌株 BEY8, 基于 16S rRNA 基因序列分析鉴定为梭菌属(*Clostridium*). BEY8 菌体生长和代谢乳酸的最适 pH 为 5.5~6.0, 当 pH 低于 4.8 或高于 6.5, 菌体均出现明显的生长和代谢延滞, 但最终仍能完全将乳酸转化为丁酸; 此外, 当乳酸浓度达到 156mM 时, BEY8 的生长及代谢同样出现延滞, 且延滞时间随乳酸浓度的升高而延长, 但最终都能完全将乳酸转化为丁酸, 这些特性表明该菌有较强的环境适应能力及代谢稳定性. 在 pH4.8 时, 外加乙酸可显著缩短 BEY8 的生长延滞期, 并提高其对乳酸的代谢速率, 但乙酸不能作为菌体的唯一能源生长, 而只作为电子受体参与代谢乳酸产丁酸.

关键词: 乳酸; pH; 酪丁酸梭菌; 丁酸; 转化率

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0459-06

Identification and Characterization of a *Clostridium* BEY8 to Produce Butyrate from Lactate

HU Xiao-Hong¹, ZHOU Yan¹, TAO Yong², ZHU Xiao-Yu², LIANG Cheng², HE Xiao-Hong², GAO Ping¹

(1. Collge of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: A lactate-utilizing bacterium BEY8 was isolated from a pit mud and it could produce butyrate from lactate. Based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, the strain BEY8 should belong to the genus *Clostridium*. The optimal pH values for BEY8 growth and lactate metabolism were found to be 5.5~6.0, and the lag time was observed at pH 4.8 and pH6.5, while lactate could be finally converted into butyrate as the main metabolic product. In addition, when the concentration of lactate was greater than 156 mM, the lag time was also observed, and the arrearage time prolonged with lactate concentration, but finally lactate could mainly be converted into butyrate as metabolic product. It was suggested that BEY8 has a potential to adapt to environment change, and the environmental factors do not affect the change of bacterial metabolic pathway. Furthermore, at pH4.8, the addition of acetate could significantly reduce the lag time of BEY8 growth and improve the metabolic rate of lactate, but acetate could not serve as the sole energy source for bacterial growth, instead of being the electron acceptor in the metabolism of lactate and butyrate production.

Key words: lactate; pH; *Clostridium tyrobutyricum*; butyrate; conversion rate

收稿日期: 2015-01-17

基金项目: 国家自然科学基金(31270531, 3470020), 中国科学院环境与应用微生物重点实验室开放课题(KLCAS-2012-03)

作者简介: 胡小红(1990-), 女, 四川德阳人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: 15708468782@163.com

通讯作者: 陶勇. E-mail: taoyong@cib.ac.cn; 高平. Email: gaoping99@hotmail.com

1 引言

动物或人消化道内有许多微生物能产生乳酸,而过高的乳酸容易引起导致溃疡性结肠炎、短肠综合征等疾病^[1,2]。近年来的研究表明,丁酸在维持肠道生理平衡、保持上皮细胞完全性,降低肠炎和糖尿病等方面可能发挥重要作用^[3,4]。因此肠道内能够代谢乳酸,产生丁酸的微生物类群及其作用受到越来越多学者的关注^[5,6]。丁酸产生菌常存在于一些厌氧环境中,如厌氧反应器、瘤胃、口腔和肠道^[7]。

中国白酒传统的固态发酵工艺实质是一种厌氧发酵技术。在发酵过程中,淀粉或糖类等物质在微生物作用下被转化为乙醇及小分子有机酸。其中乳酸是最容易产生的一种有机酸,特别是在浓香型白酒生产的新窖池中^[8]。过多的乳酸容易导致乳酸乙酯积累,二者浓度过高会影响酒的品质,因此传统酿造中常通过工艺调控“增己降乳”(增加己酸含量,降低乳酸含量),改善酒的品质^[9,10]。一些研究表明,通过乳酸利用菌的分离、培养及应用,可降低窖池中乳酸的含量,改善白酒的口味与品质^[11,12]。但是此前多是从好氧条件下分离菌株,再在厌氧条件下复筛获得兼性厌氧菌,这些菌株在严格厌氧下对乳酸降解率不高,限制了其进一步应用。

我们近期的研究显示,窖池微生物群落结构与肠道微生物类群有一定相似性,比如肠道中的优势菌群:瘤胃菌(*Ruminococcaceae*)、毛螺旋菌(*Lachnospiraceae*)和梭菌(*Clostridiaceae*)^[7],也是成熟窖泥中的优势菌群^[8]。因此,借鉴肠道乳酸利用菌的分离方法与研究思路^[5,13],从窖池中能够获得能够将乳酸转化为乙酸或丁酸的严格厌氧、能耐受低 pH 的功能菌,一方面可制成生物强化菌剂,应用于“增己降乳”的生物强化工艺,改善窖池的微生态环境,提高白酒的品质;另一方面,可能分离到一些新的微生物资源,用于研制肠道益生菌生态制剂。在本研究中,我们以乳酸为唯一碳源和能源,从窖泥中分离到一株严格厌氧的利用乳酸产丁酸菌株 BEY8。本文首先通过 16S rRNA 分析结合生理生化指标确定该菌的分类学地位,然后通过批次实验,研究了该菌生长及对乳酸的转化特性。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品 窖泥样品取自四川绵竹某著名酒厂 2~5 年的酿酒窖池,样品保存在冰盒中快速转移

到实验室并保存在 4~8℃。

2.1.2 培养基(YCFAL) 液体培养基包括(100mL):酪蛋白 1g;酵母浸出液 0.25g;NaHCO₃ 0.4g;半胱氨酸 0.1g;K₂HPO₄ 0.045g;KH₂PO₄ 0.045g;NaCl 0.09g, MgSO₄·7H₂O 0.009g;CaCl₂ 0.009g;血红素 1mg;生物素 1μg;钴胺素 1μg;对氨基苯甲酸 3μg;叶酸 5μg;吡哆胺 15μg;硫胺素 0.05μg;核黄素 0.05μg;刃天青 0.1mg;添加 0.5mL 乳酸作为碳源。先按照比例称取酪蛋白,酵母浸出液,NaHCO₃,半胱氨酸,K₂HPO₄,KH₂PO₄,NaCl,MgSO₄·7H₂O,CaCl₂,加水溶解,随后加入相应量的乳酸,根据实验调节 pH,通氮气以置换空气,将培养基分装到厌氧管中,并用橡胶塞密封,实现厌氧条件。121℃ 压强下灭菌 15min,待培养基冷却之后,注射器加入已过滤灭菌的维生素。YCFAL 固体培养基按 1.5%w/v 添加琼脂粉。培养基灭菌后在不烫手时,将灭好的平板和培养基移入厌氧培养箱,倒平板。

2.2 方法

2.2.1 菌种初筛 取窖泥 1g,加入 50mL YCFAL 液体培养基,在 30℃ 下震荡厌氧富集培养 5d,然后按 5% 比例接入含 YCFAL 的厌氧管继续培养,定期监测乳酸的消耗,当乳酸可快速降解时,按 10 倍稀释法稀释菌液,在厌氧箱内采用涂布的方法,均匀的涂布于 YCFAL 琼脂平板上,在 30℃ 下厌氧培养 3~5 d,挑选单一菌落,划线接种于 YCFAL 琼脂平板上进行菌种纯化,直至获得纯菌株后,接种于斜面厌氧管保存。

2.2.2 菌种复筛 将初筛出的菌种接种到装有 10mL YCFAL 液体培养基的厌氧管中,30℃ 厌氧培养 4 d。定期监测乳酸的消耗,筛选利用乳酸快、丁酸转化率高的株为目标菌株,进行下一步研究。

2.2.3 分类学鉴定 基因组 DNA 的提取:采用上海生工的 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽取试剂盒(SK8255, Sangon Biotech)的方法提取细菌 DNA。

16S rRNA 基因片段的扩增:以获得菌株的基因组 DNA 为模板,选择通用引物 27F 和 1492R,扩增菌株的 16S rRNA 基因片段。PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序。

系统发育分析与鉴定:将测得的 16 SrRNA 序列在 RDP、NCBI 和 eztaxon 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)中进行序列比对,然后从数据库中下载相关菌株的序列信息,通过

MEGA6 重新构建系统发育进化树, 分析菌株的分类学地位。

2.2.4 检测分析方法 乳酸、乙酸及丁酸等有机酸类物质使用安捷伦高效液相色谱测定 (Agilent1260 Infinity; Agilent technologies). 预处理方法: 用注射器吸取 0.2 mL 发酵液, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液稀释 10 倍后再用超细纤维过滤膜 (0.22 μm) 过滤后上机测定. 色谱条件: 色谱柱是 Hi-Plex H (300×6.5 mm), 流动相为 5 mM H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 50°C.

2.2.5 乳酸转化特性 使用 1M 的 NaOH 溶液调节液体培养基的 pH 值, 配制不同的 pH 梯度 (4.8, 5.5, 6.0, 6.5), 乳酸浓度为 66 mM, 培养温度为 30°C, 研究初始 pH 对菌株生长与转化特性的影响。

配制不同乳酸浓度 (104, 133, 156, 178 mM) 的液体培养基, 培养基成分同上, pH 均为 6.0, 培养温度为 30°C, 研究乳酸浓度对菌生长及转化影响。

在乳酸浓度为 66 mM 的液体培养基中, 添加

不同的乙酸量 (0, 17, 34, 52 mM), pH 均调为 4.8, 培养温度为 30°C, 分析外加乙酸对细菌生长与转化特性的影响。

3 结果与讨论

3.1 菌种分离及鉴定结果

使用 YCFAL 培养基初筛分离出 15 株乳酸利用菌, 然后通过复筛获得一株高效利用乳酸的厌氧菌 BEY8. 序列比对显示, BEY8 与数据库中梭菌属 (*Clostridium*) 的菌株有较高的序列相似性, 其中酪丁酸梭菌模式株 (*Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637) 是与 BEY8 最相近的模式株, 16S rRNA 序列相似性为 99.8%. 通过 RDP 的 Classifier 分类也显示 BEY8 应归为梭菌属. 进一步的系统进化树分析表明, BEY8 与酪丁酸梭菌模式株 (*Clostridium tyrobutyricum* DSM 2637) 聚为一个亚簇, 因此, 该菌应为酪丁酸梭菌 (图 1)。

3.2 BEY8 在不同初始 pH 下的生长和代谢特性

BEY8 在不同初始 pH 下的发酵特性如图 2, BEY8 在 pH 5.5~6.0 时对乳酸的转化速率最快,

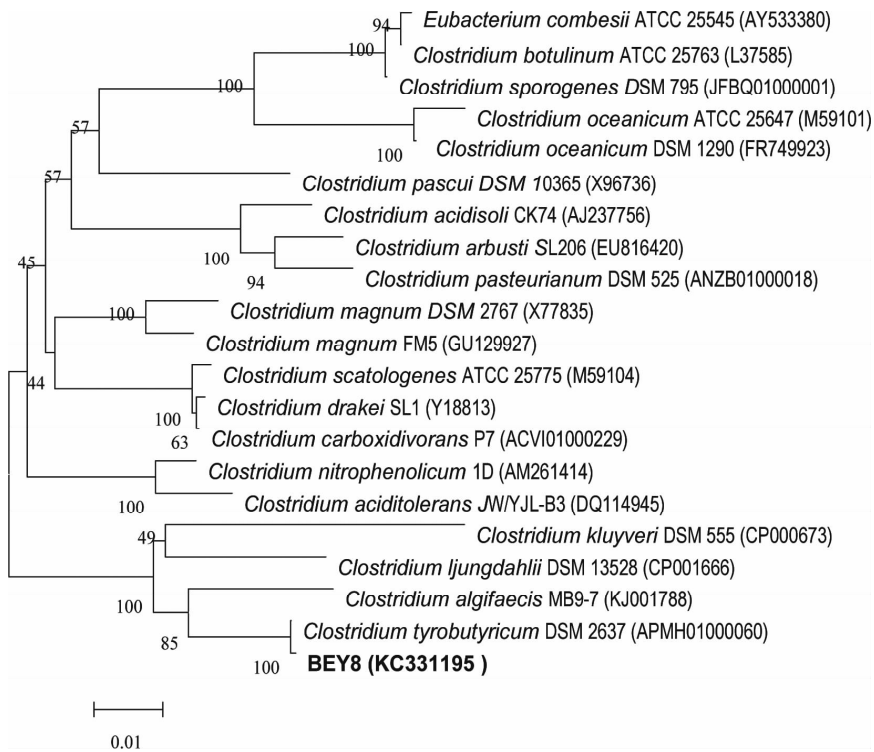


图 1 基于 neighbour-joining 法的 BEY8 系统进化树

每个分枝点的数字代表步长. 比例尺代表 1% 序列差异. 括号内数字代表 GenBank 登录号.

Fig. 1 The phylogenetic tree of BEY8 based on neighbour-joining method

The numbers at the nodes indicate the level of bootstrap. The scale bar indicates 0.01 nucleotides substitution per nucleotide position. Numbers in bracket represent GenBank accession number.

在 4 天内可将 66.56mM 乳酸完全利用,转化生成 16.63mM 丁酸(图 2b,c); 在 pH4.8 和 6.0 时(图 2a,d),会出现明显的生长和转化延滞,分别需要 7 d 和 8 d 才能将乳酸完全转化. OD 值测定显示 pH5.5~6.0 条件下,BEY8 第 2 天即开始生长,而 pH4.8 和 6.5 时,BEY8 在 5 d 和 6 d 时才开始生长,表明此 pH4.8 或 6.5 可能抑制细胞生长,继而影响其对乳酸的转化.

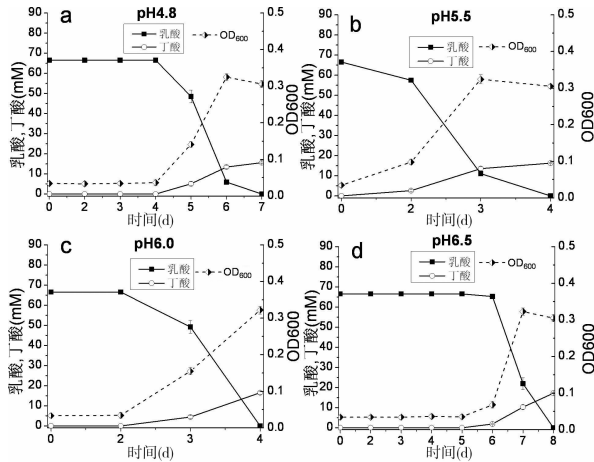


图 2 在不同初始 pH 下,菌 BEY8 的乳酸利用,丁酸产生和 OD₆₀₀ 曲线图

Fig. 2 The curve of lactate-utilizing, butyrate-producing and OD₆₀₀ by BEY8 at different initial pH

pH 是影响微生物的代谢、酶反应和产物分布的重要因子. 朱和扬发现当 pH 值从 6.3 降低到 5.7 或更低时,酪丁酸梭菌 (*C. tyrobutyricum* ATCC 25755) 的代谢途径是从木糖产生丁酸转变为形成乳酸和乙酸^[14], 他们认为 pH 影响了各种酸形成酶的表达水平而引起代谢途径的转变. 根据具体的酶的活性,在 pH6.3,负责丁酸形成的磷酸转丁酰酶 (PTB) 和催化乳酸利用的 NAD 非依赖性乳酸脱氢酶 (iLDH) 具有高的表达水平. 与此相反,在 pH5.0,负责乙酸形成的磷酸转乙酰酶 (PTA) 和催化乳酸产生的乳酸脱氢酶 (LDH) 具有高的表达水平. 另外,在 *C. tyrobutyricum* JM1 的研究中,随着 pH 值从 6.3 到 6.0,也观察到相同的代谢途径转变^[15].

然而,我们利用乳酸作为唯一碳源实验显示,在 pH4.8~6.5 之间,BEY8 均以丁酸作为主要代谢产物,除了在 pH4.8 和 6.5 有较长的延滞期外,乳酸被转化为丁酸的量是基本一致的,即约产生 0.25mol 丁酸/mol 乳酸消耗,表明 pH 并不引起

BEY8 对乳酸代谢途径的改变.

3.3 不同乳酸浓度下 BEY8 的生长和代谢特性

BEY8 在不同初始乳酸浓度下的批次实验结果如图 3 所示,当乳酸浓度为 104~133mM 时,在第 2d 可检测到 BEY8 的显著生长 (OD 明显增加),同时乳酸开始消耗并产生少量丁酸,随后在第 4 d,乳酸被完全消耗(图 3a-b). 而当乳酸浓度为 156mM 时,第 3d 才检测到细菌生长,同样的,乳酸在前 2 d 基本不下降,第 3 d 才开始减少,至第 5 d 乳酸被完全降解,表明 156mM 乳酸对 BEY8 的生长有一定程度的抑制,生长和延滞期约 2 d(图 3c). 随着乳酸浓度的进一步升高(178mM),BEY8 的生长延滞期也相应的延长到 4 d,而最终在第 7 d 乳酸被完全利用和转化(图 3d). 表 1 显示,在不同浓度乳酸下,每消耗 1mol 乳酸最终产生 0.23~0.24mol 丁酸,不同浓度乳酸对转化率没有显著影响,但乳酸浓度大于 156mM 时会引起 BEY8 的生长抑制. 此外,丙酸产量随着乳酸浓度的增加呈上升趋势,而乙酸的产量都很少.

图 2,3 显示,在较低的初始 pH(4.8)或较高的 pH(6.5),以及较高的乳酸浓度下(156mM)下,菌体生长在初期都受抑制,出现明显的生长延滞期,但是当 BEY8 度过延滞期开始生长后,均能在 2~3 d 将乳酸完全转化,并且转化率并不受环境因子的影响,表明该菌有很强的适应性,也表明 pH 值和乳酸浓度对于微生物的生长是重要的影响因子. 乳酸的抑制作用主要归因于未离解乳酸的含

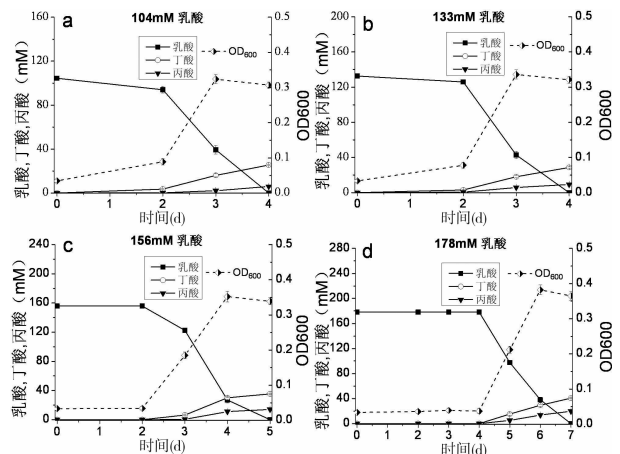


图 3 BEY8 在不同初始乳酸浓度下的乳酸消耗,丁酸、丙酸产生和 OD₆₀₀ 曲线图

Fig. 3 The curve of lactate-utilizing, butyrate-producing, propionate-producing and OD₆₀₀ by BEY8 at different initial lactate concentrations

表 1 不同初始乳酸浓度下 BEY8 的终产物含量

Tab. 1 The final production of BEY8 at different initial lactate concentrations

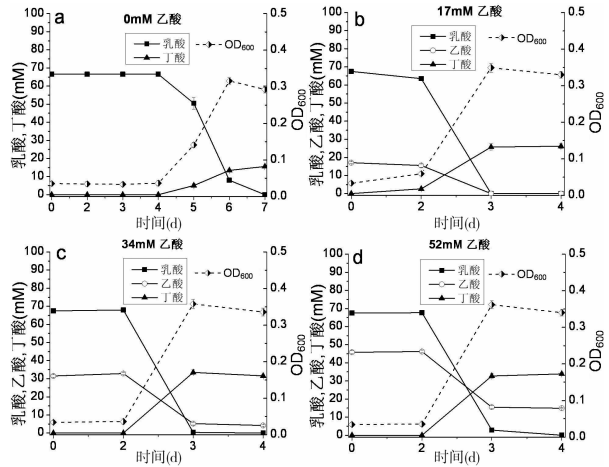
| 初始乳酸浓度 (mM) | 乳酸消耗 (mM) | 乙酸 (mM) | 丙酸 (mM) | 丁酸 (mM) | 消耗 1 mol 乳酸产生丁酸的摩尔数 |
|-------------|-----------|---------|---------|---------|---------------------|
| 104.48 | 104.48 | 0.00 | 5.94 | 24.85 | 0.24 |
| 132.68 | 132.68 | 3.75 | 9.34 | 30.05 | 0.23 |
| 155.84 | 155.84 | 2.11 | 14.13 | 35.82 | 0.23 |
| 178.04 | 178.04 | 4.96 | 19.70 | 40.75 | 0.23 |

量^[16-18]. 根据 Henderson-Hasselbach 等式计算^[16]: 未离解的酸量 (mmol l^{-1}) = 总酸量 (mmol l^{-1}) / $(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a})$. 因此未离解乳酸的浓度由总的乳酸浓度和 pH 值来确定. 未离解的乳酸分子容易渗透细胞膜, 然后在细胞内解离并在较高的细胞内 pH 下释放一个质子, 导致细胞质的酸化^[16, 19]. 当质子浓度变得过高, 则质子动力会因 pH 梯度的崩溃而中断, 导致了细胞失活和死亡. 但图 2d 显示在 pH 为 6.5 时, BEY8 同样有较长的延滞期, 这无法用乳酸解离度的原理来解释, 具体原因还有待于进一步分析.

3.4 外加乙酸对乳酸代谢的影响

在乳酸浓度 66mM, pH4.8, 30°C 条件下, 外加不同浓度乙酸, 研究其对 BEY8 的生长及乳酸代谢特性的影响. 结果如图 4b, 4c 所示, 外加乙酸后菌体生长延滞期从 4 d 缩短为 2 d, 转化速度也明显加快, 1 d 内即可将乳酸完全转化, 而对照 (无外加乙酸) 需 3d 才能乳酸才完全转化. 但是外加不同浓度乙酸的处理之间, 在菌体延滞期方面并无显著差异. 在低乙酸浓度 (17mM) 下, 乙酸在第三天被完全消耗, 而乙酸达到 34mM 和 52mM 时, 乙酸消耗量趋于稳定, 约 66mM 乳酸消耗 30mM 的乙酸. 此外, 我们发现在乙酸作为单独碳源培养基中, 发现 BEY8 不能利用乙酸生长 (数据未显示). 这些结果表明在此代谢途径中, 乳酸和乙酸分别做为电子供体和受体, 按照 2.2 : 1 的摩尔比发生反应.

对 *C. acetobutylicum*, *C. diolis*, *C. butyricum* 和 *C. beijerinckii* 这几种梭菌属细菌的研究表明^[20, 21], 乙酸的存在对乳酸发酵有非常显著的作用, 然而具体什么机制目前还不清楚. Diez-Gonzalez 等人建议, 在 *C. acetobutylicum* p262 利用乳酸的过程中乙酸可能作为电子受体^[20]. 此外, 在其它底物的代谢中乙酸也有重要作用. Chen 等人^[22]对 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052

图 4 外加不同浓度乙酸时 BEY8 的底物消耗, 丁酸产生和 OD₆₀₀ 曲线图Fig. 4 The curve of substrate consumption, butyrate formation and OD₆₀₀ by BEY8 at different concentrations of exogenously added acetate

研究发现, 乙酸钠的加入可提高和稳定可溶性产物的生产, 并增加了葡萄糖的利用. 此外, 微生物生长过程中在培养基中加入乙酸钠比没有加乙酸钠, 辅酶 A (CoA) 转移酶有更高水平的表达并具有更高的活性. Canganella 等人发现^[23], 外加乙酸促使了菌 *Clostridium thermobutyricum* 的更快生长和更多葡萄糖的消耗, 丁酸产量和最终 OD_{600nm} 值的增加. Colin 等人发现^[24], 在 *Clostridium butyricum* 发酵甘油实验中加入乙酸对其代谢和生长都有明显影响, 即乙酸增加了生物量和丁酸的产生, 降低了延滞期和 1,3-丙二醇的产生. 这些研究表明, 在发酵过程中的早期阶段, 乙酸充当间接的质子和电子受体, 但不是构成能量的基质来源. 我们的研究表明, 外加乙酸能显著缩短 BEY8 生长延滞期和提高其对乳酸的转化速率, 在这一过程中乙酸并作为菌体能源生长, 而只是作为电子受体, 这与以往的研究结论是基本一致的.

4 结论

(1) 从窖泥中分离一株严格厌氧的乳酸利用菌 BEY8, 能以乳酸为唯一碳源生长并发酵产生丁酸. 根据 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, BEY8 属于酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum* BEY8).

(2) 菌体生长和代谢的最适 pH5.5 ~ 6.0, pH4.8 或 6.5 会显著抑制菌体的生长; 当乳酸浓度达到 156mM 时, BEY8 生长同样受到抑制. 但是 pH 和乳酸浓度并不影响细菌将乳酸代谢为丁酸

的最终转化率。

(3)外加乙酸可显著缩短 BEY8 在 pH4.8 的生长延滞期,提高其对乳酸的转化速率,但乙酸不能作为菌体生长的能量,而只作为电子受体参与代谢反应。

参考文献:

- [1] Kaneko T Y, Banda H, Kurihara K, *et al.* Fecal microflora in a patient with short-bowel syndrome and identification of dominant lactobacilli[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35:3181.
- [2] Vernia P R, Caprilli G, Latella F, *et al.* Fecal lactate and ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 1988, 95: 1564.
- [3] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56:1761.
- [4] Macia L, Thorburn A N, Binge L C, *et al.* Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases [J]. Immunol Rev, 2012, 245:164.
- [5] Duncan S H, Louis P, Flint H J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5810.
- [6] Bourriaud C, Robins R J, Martin L, *et al.* Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99: 201.
- [7] Marius V, Adina C H, James M T. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)genomic Data[J]. m Bio, 2014, 5(2):00889.
- [8] Tao Y, Li J B, Rui J P, *et al.* Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of chinese strong-flavored liquor[J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(7):2254.
- [9] 陈福民.降低浓香型曲酒中的乳酸乙酯含量措施[J]. 酿酒科技, 1999, 6: 48.
- [10] 刘拓. 西凤酒生产中抑制乳酸乙酯的措施 [J]. 酿酒科技, 1995, 71(5): 105.
- [11] 镇达,郭艺山,陈茂彬.浓香白酒生产中乳酸利用菌的分离鉴定及特性研究[J]. 酿酒科技, 2009, 182(8): 52.
- [12] 杨望军,曹健,王德良,等.乳酸利用菌的筛选、应用及鉴定[J]. 中国酿造, 2012, 240(3):120.
- [13] Sato T, Matsumoto K, Okumura T. Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and in vivo administration of *Anaerostipes caccae* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2008, 66: 528.
- [14] Zhu Y, Yang S T. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum* [J]. J Biotechnol, 2004, 110(2):143.
- [15] Jo J H., Lee D S, Park J M. The effects of pH on carbon material and energy balances in hydrogen-producing *Clostridium tyrobutyricum* JM1 [J]. Bioresour Technol, 2008, 99 (17):8485.
- [16] Thylin I, Schuisky P, Lindgren S, *et al.* Influence of pH and lactic acid concentration on *Clostridium tyrobutyricum* during continuous growth in a pH-auxostat[J]. J Appl Bacteriol, 1995, 79:663.
- [17] Shelef L A. Antimicrobial effects of lactates: a review[J]. J Food Prot, 1994, 57:445.
- [18] Presser K A, Ratkowsky D A, Ross T. Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1997, 63(6):2355.
- [19] Van Ginkel S W, Logan B E. Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39:9351.
- [20] Diez-Gonzalez F, Russell J B, Hunter J B. The role of an nad-independent lactate-dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *clostridium acetobutylicum* strain p262[J]. Arch Microbio, 1995, 164 (1): 36.
- [21] Matsumoto M, Nishimura Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid[J]. J Biosci Bioeng, 2007, 103 (3):236.
- [22] Chen C K, Blaschek H P. Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 65(2):499.
- [23] Cangarella F, Kuk S. U, Morgan H, *et al.* *Clostridium thermobutyricum*: growth studies and stimulation of butyrate formation by acetate supplementation[J]. Microbial Res, 2002, 157: 149.
- [24] Colin T, Bories A, Lavigne C, *et al.* Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum* [J]. Current Microbiology, 2001, 43:238.