

## PRODUKCIJA BUTIRATA PRI ANAEROBNI VAMPNI BAKTERIJI *Pseudobutyryvibrio xylanivorans Mz5<sup>T</sup>*<sup>\*</sup>

Maša ZOREC <sup>a)</sup>, Franc Viktor NEKREP <sup>b)</sup> in Romana MARINŠEK-LOGAR <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag., e-pošta:  
[masa.zorec@bfro.uni-lj.si](mailto:masa.zorec@bfro.uni-lj.si)

<sup>b)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, prof., dr., mag.

<sup>c)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, doc., dr., mag.

Delo je prispelo 10. februarja 2003, sprejeto 30. junija 2003.

Received February 10, 2003, accepted June 30, 2003.

### IZVLEČEK

Butirat je pomemben probiotski dejavnik, ki ugodno vpliva na delovanje in preživetje kolonocitov ter v debelem črevesu deluje tudi antikancerogeno. Pred kratkim je bila na osnovi 17 sevov, izoliranih iz vampa, opisana nova vrsta *P. xylanivorans* s tipskim sevom Mz5<sup>T</sup>. Sev Mz5<sup>T</sup> je na ksilanu ovsenih plev produciral butirat in laktat kot glavna produkta fermentacije in pri tem porabljjal acetat. Producija butirata je močno narasla med logaritemsko fazo in se je še v pozni stacionarni fazi počasi povečevala. Na drugih ogljikovih hidratih (na brezovem in bukovem ksilanu, ksilozi, arabinozi in glukozi) je bila kinetika tvorbe butirata podobna. Največ butirata glede na laktat je nastajalo med zgodnjo logaritemsko fazo neodvisno od substrata. *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> bi torej lahko uporabili kot probiotik v prehrani živali tako za izboljšanje razgradnje ksilana kot tudi za povečano produkcijo butirata v debelem črevesu. Najbolje bi bilo uporabiti kulturo v zgodnji logaritemski fazi rasti, ki bi jo lahko namnožili na cenenem ogljikohidratnem viru.

Ključne besede: mikrobiologija / anaerobne bakterije / *Pseudobutyryvibrio xylanivorans* / probiotiki / butirat / vamp

## BUTYRATE PRODUCTION OF ANAEROBIC RUMEN BACTERIUM *Pseudobutyryvibrio xylanivorans Mz5<sup>T</sup>*<sup>†</sup>

### ABSTRACT

Butyrate is an important probiotic factor that beneficially affects the activity and survival of colonocytes and exerts an anticarcinogenic activity in the colon, too. Recently, on the basis of 17 rumen strains a new species *P. xylanivorans* with type strain Mz5<sup>T</sup> was established. The strain Mz5<sup>T</sup> produced butyrate and lactate as major fermentation products and utilized acetate in the medium with oat spelts xylan. Butyrate production was strongly increased during the logarithmic growth phase and was still slowly increasing in the late stationary phase. The rate of butyrate production was similar to other carbohydrates (birchwood and beechwood xylan, xylose,

\* Prispevek je del magistrskega dela Maše Zorec 'Izolacija vampne bakterije z močno ksilanolitično aktivnostjo in opis njenega encimskega sistema za razgradnjo ksilana', mentorica doc. dr. Romana Marinšek Logar.

† The article is a part of a master of science thesis 'Isolation of highly xylanolytic rumen bacterium and characterization of its enzymatic system for xylan degradation', issued by Maša Zorec, supervisor ass. prof. Romana Marinšek Logar, Ph.D.

arabinose and glucose). The bulk of butyrate with regard to lactate was formed during the early logarithmic phase regardless of substrate. Therefore, *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> could be used as probiotic in animal feed to improve xylan degradation and also for increased production of butyrate in the colon. The best choice would be a culture in the early logarithmic phase grown on an inexpensive source of carbohydrates.

Key words: microbiology / anaerobic bacteria / *Pseudobutyribacter xylanivorans* / probiotics / butyrate / rumen

## UVOD

Butirivibriji so skupina vamnih anaerobnih bakterij, ki jih druži enotna morfologija in produkcija velikih količin butirata pri fermentaciji ogljikovih hidratov. Za skupino je značilna precejšnja fenotipska in genotipska raznolikost (Čepeljnik in Marinšek Logar, 2002) in na osnovi filogenetskih analiz so znotraj skupine opredelili vsaj dve podskupini sevov, ki bi lahko tvorili različna rodova (Cotta in Forster, 2000). Sevi prve podskupine so bolj sorodni tipskemu sevu *Butyrivibrio fibrisolvens*, sevi druge pa vrsti *Pseudobutyribacter ruminis*. Pred kratkim je bila na osnovi 17 sevov iz druge podskupine opisana nova vrsta *P. xylanivorans* s tipskim sevom Mz5<sup>T</sup> (Kopecny in sod., 2003).

Sev Mz5<sup>T</sup> smo izolirali v našem laboratoriju iz vampa črno-bele frizijske krave z metodo vrtenih epruvet v gojišču, ki je kot edini dodani ogljikohidratni vir vsebovalo ksilan ovsenih plev. Sev Mz5<sup>T</sup> se je barval po Gramu negativno in je imel rahlo ukrivljene paličaste celice z enim subpolarnim bičem. V gojišču s ksilanom ovsenih plev smo kot fermentacijske produkte določili butirat in laktat ter vodik. Pri tem smo dokazali porabo acetata. Sev Mz5<sup>T</sup> ni tvoril propionata, sukcinata ali razvezjanih kratkoverižnih maščobnih kislin; etanola in formata pa v naši raziskavi nismo določali. Sev je fermentiral 11 od skupno 17 testiranih substratov, med njimi tudi glukozo, laktozo, saharozo, maltozo, ksilozo, arabinozo, celobiozo, manozo in rafinozo. Proteolitično aktivnost smo dokazali s hidrolizo želatine (Zorec, 2002).

Pri butirivibrijih so dokazali dva tipa fermentacije (Shane in sod., 1969). Pri prvem tipu se poleg butirata tvori veliko acetata in malo ali nič laktata. Pri biokemični pretvorbi piruvata so dokazali aktivnost encima butirat kinaze, ki v zadnjem koraku katalizira nastanek butirata iz butiril fosfata (Miller in Jenesel, 1979). Pri drugem tipu fermentacije se poleg butirata kot glavnega produkta tvori veliko laktata in ob tem se porablja acetat iz gojišča. Ključni encim pri tej reakciji je butiril-CoA/acetat-CoA transferaza (Diez-Gonzalez in sod., 1999). Butirivibriji uporabljajo eno ali drugo pot pretvorbe, nikoli obe.

Butirat je glavni produkt fermentacije butirivibrijev v vampu. V manjšem obsegu nastaja tudi v debelem črevesu monogastričnih živali pri mikrobnii fermentaciji vlakninskih sestavin hrane. Butirat nastaja v debelem črevesu, se naglo absorbira ter predstavlja primarni energetski vir za kolonocite, ki tako pokrije do 80 % svojih energetskih potreb (Macfarlane in Cummings, 2001). V odsotnosti butirata se pospeši apoptoza kolonocitov in reducira obnavljanje celic (Luciano in sod., 1996). Tako atrofirana sluznica se ob dodatku butirata v lumen črevesa spet obnovi. Butirat ima torej ključno vlogo pri razvoju normalnega fenotipa kolonocitov in je nujen za njihovo preživetje. Na rakave celice črevesnega endotelija pa ima butirat nasproten učinek, saj inhibira njihovo proliferacijo, spodbuja diferenciacijo in apoptozo v količinah, ki niso toksične za normalne celice (Hague in sod., 1997). Butirat je torej pomemben zaščitni dejavnik pred karcinogenezo v debelem črevesu (Velazquez in Rombeau, 1997) in uživanje vlaknin kot prekurzorjev butirata je učinkovit preventivni dejavnik pri razvoju raka (Parodi, 1997).

Butirat v črevesu znižuje pH vrednost in tako onemogoča razrast pH občutljivim patogenim bakterijam. Nizka pH vrednost tudi inhibira bakterijsko pretvorbo primarnih v sekundarne žolčne soli, ki imajo citotoksičen učinek na kolonocite (Topping in Clifton, 2001).

Zaradi splošno ugodnih učinkov butirata na procese v debelem črevesu in nasprotnih učinkov butirata na proliferacijo in apoptozo normalnih in rakavih kolonocitov se odpirajo možnosti za preventivno in terapevtsko uporabo butirata. Povečano produkcijo butirata bi lahko dosegli s selektivnim namnoževanjem butirogene flore debelega črevesa z uporabo prebiotikov (Jacobasch in sod., 1999) ali uporabo probiotikov iz skupine butirivibrijev. Butirivibriji bi bili primerni kot probiotiki tako za prašiče, ker je razgradnja vlaknin zelo podobna razgradnji v vampu (Varel in Yen, 1996), kot tudi za človeka, saj je indigena butirogena flora debelega črevesa v bližnjem sorodstvu z vamnimi butirivibriji (Barcenilla in sod., 2000).

Zaradi številnih probiotsko ugodnih učinkov butirata smo žeeli pri sevu Mz5<sup>T</sup> natančneje proučiti kinetiko tvorbe butirata, vpliv različnih ogljikohidratnih substratov na količino produciranega butirata in oceniti možnosti uporabe seva Mz5<sup>T</sup> kot probiotika.

## MATERIAL IN METODE

Za poskuse smo namnoževali *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> v gojišču M330 (DSM Catalogue of strains, medium 330). Sestavo smo prilagodili tako, da smo namesto glicerola dodali glukozo in količino ogljikovih hidratov podvojili. Poenostavili smo tudi pripravo, ki je bila bolj primerna za uporabo v epruvetah Bellco. V raziskavi smo uporabljali izpeljave osnovnega gojišča M330, kjer smo glukozo, maltozo, celobiozo in topni škrob nadomestili s 5 g l<sup>-1</sup> drugih ogljikovih hidratov: s ksilanom ovsenih plev (M330-oat), brezovim ksilanom (M330-bir), bukovim ksilanom (M330-bee), karboksimetil celulozo (M330-cmc), glukozo (M330-glc), ksilozo (M330-ksi), arabinozo (M330-ara) ali celobiozo (M330-cel).

Butirat in acetat smo ekstrahirali iz supernatantov kultur z dvojno etrsko ekstrakcijo (Holdeman in sod., 1977). Etrske ekstrakte smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A s plamenkoionizacijskim detektorjem (FID) in kapilarno kolono DB-WAX (J&W Scientific). Analiza je potekala pri temperaturnem programu od 110 °C do 160 °C s hitrostjo naraščanja temperature 9 °C na minuto (končno temperaturo smo ohranjali 1 minuto). Temperatura injektorja je bila 160 °C in temperatura detektorja 200 °C. Nosilni plin je bil helij, vodik in zrak pa detektorska plina. Kot interni standard smo vzorcem dodali krotonsko kislino in kratkoverižne maščobne kisline kvantificirali po metodi internega standarda na integratorju Chromatopac C-R6A. Kot ničeln vzorec smo analizirali neinokulirano inkubirano gojišče.

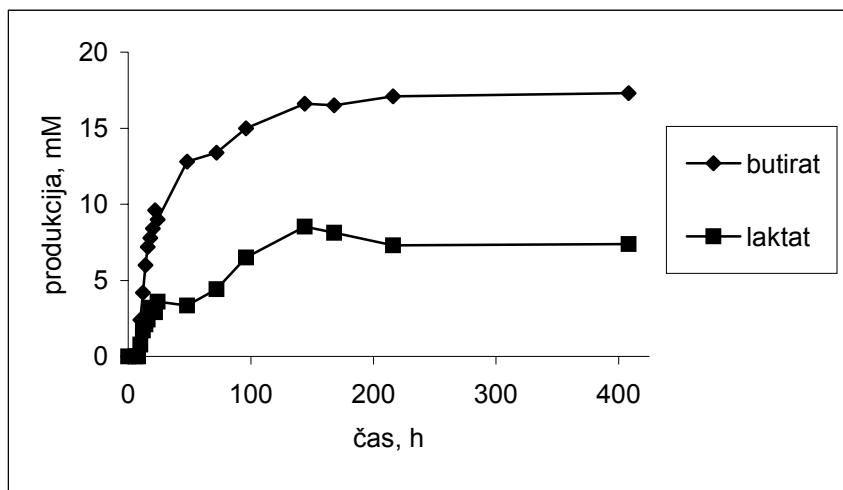
Laktat smo derivativirali z metilacijo supernatantov kultur (Holdeman in sod., 1977). Kloroformsko fazo smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A s FID in kapilarno kolono DB-WAX (J&W Scientific). Analiza je potekala pri temperaturnem programu od 95 °C do 144 °C, s hitrostjo naraščanja temperature 9 °C na minuto (začetno temperaturo smo ohranjali 1 minuto, končno pa 2 minuti). Temperatura injektorja je bila 145 °C in temperatura detektorja 200 °C. Nosilni in detektorski plini so bili enaki kot pri analizi butirata in acetata. Kvantifikacija je potekala po enakem postopku kot pri butiratu in acetatu z istim internim standardom.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Rast *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> smo spremljali kot količino proteinov v peletu po centrifugiranju kultur. V gojišču M330-oat je logaritemska faza nastopila pri 8 urah in se je pri 14 urah prevesila v stacionarno fazo, ki je trajala vsaj do 408 ur (17 dni), ko smo odvzeli zadnji vzorec. V gojiščih z drugimi ogljikovimi hidrati smo ugotovili, da kulture seva Mz5<sup>T</sup> na večini substratov v 24 urah dosežejo stacionarno fazo. Koncentracije proteinov so takrat v območju vrednosti rasti v M330-oat (od 1,6 do 1,8 mg proteinov ml<sup>-1</sup>). Sev raste slabše le na celobiozi in karboksimetil celulozi,

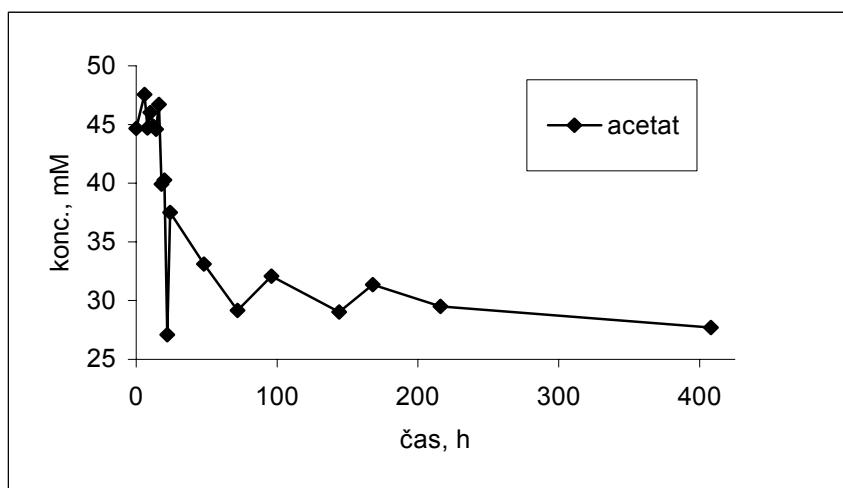
kar dokazuje njegov primarno ksilanolitični karakter. Butirivibriji so na splošno slabo celulolitični oziroma te aktivnosti nimajo.

Med rastjo seva Mz5<sup>T</sup> v gojišču M330-oat smo v supernatantih kultur s plinsko kromatograffijo zasledovali produkcijo butirata in laktata ter porabo acetata (sl. 1 in 2). Koncentracija butirata je začela močno naraščati na začetku logaritemske faze (pri 8 urah) in je pri 24 urah dosegla koncentracijo 9 mM. Do 144 ur se je koncentracija butirata počasi povečevala in pri zadnji meritvi (pri 408 urah) dosegla največjo koncentracijo 17,3 mM. Naraščanje koncentracije laktata je bilo podobno, vendar so bile koncentracije manjše. Največjo koncentracijo laktata 8,5 mM smo izmerili pri 144 urah. Koncentracija acetata se je intenzivno začela zmanjševati v začetni stacionarni fazi (pri 18 urah) in po dveh dneh dosegla končno raven porabe (približno 15 mM).



Slika 1. Producija butirata in laktata pri *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> v gojišču M330-oat.

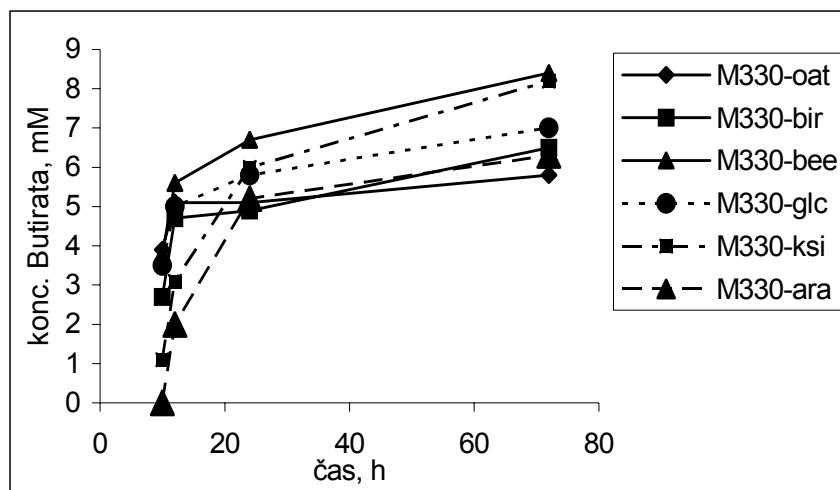
Figure 1. Butyrate and lactate production of *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in medium M330-oat.



Slika 2. Padanje koncentracije acetata z rastjo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> v gojišču M330-oat.

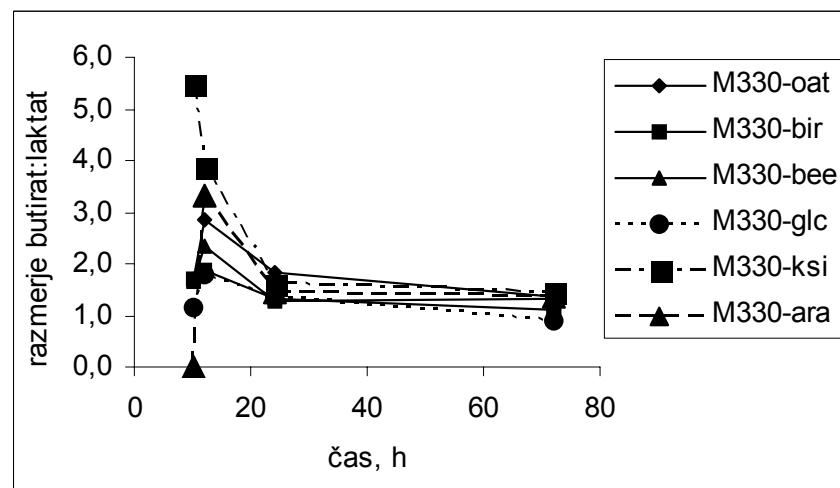
Figure 2. Acetate concentration decline with growth of *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in medium M330-oat.

Sev Mz5<sup>T</sup> na ksilanu ovsenih plev producira butirat in laktat kot glavna fermentacijska produkta (sl. 1) in ob tem porablja acetat iz gojišča (sl. 2). V začetni stacionarni fazi butirat in laktat dosežeta polovico končne vrednosti, med stacionarno fazo se produkcija upočasni, tako da smo največjo količino izmerili po 6 dneh inkubacije. Mz5 ima verjetno enako pot fermentacije, kot so jo dokazali pri *Pseudobutyryvibrio* sp. sev 49, ki ima aktiven encim butiril-CoA/acetat-CoA transferazo (Diez-Gonzales in sod., 1999). Prisotnost acetata v gojišču poveča aktivnost tega encima in inhibira sintezo laktata, na račun katerega nastaja več butirata, formata in vodika. Pri sevu Mz5<sup>T</sup> je bil v gojišču prisoten acetat, zato je produkcija laktata bolj počasna od sinteze butirata.



Slika 3. Producija butirata seva Mz5<sup>T</sup> glede na različne vire ogljikovih hidratov.

Figure 3. Production of butyrate of strain Mz5<sup>T</sup> effected by different sources carbohydrates.



Slika 4. Razmerje med butiratom in laktatom v kulturah seva Mz5<sup>T</sup> v gojiščih M330 z različnimi ogljikovimi hidrati.

Figure 4. Butyrate to lactate ratio in cultures of strain Mz5<sup>T</sup> in media M330 with different carbohydrates.

Za določanje vpliva ogljikohidratnega substrata na produkcijo butirata in laktata smo v supernatantih kultur seva Mz5<sup>T</sup> določili koncentracije butirata in laktata. Ugotovili smo, da se v

prisotnosti ksilanov iz različnih virov in monosaharidov začne pri 10 urah močna produkcija butirata in po 72 urah inkubacije dosega koncentracije od 5,8 mM v gojišču M330-oat do 8,2 mM v gojišču M330-bir (sl. 3).

Pri določanju laktata smo ugotovili, da njegova koncentracija narašča bolj počasi, največje koncentracije pa dosega v gojišču z glukozo. Pri izračunavanju razmerja med butiratom in laktatom smo pri večini substratov pri 12 urah ugotovili močno produkcijo butirata glede na laktat. Pri 24-urnih kulturah se razmerje manjša in se pri vseh substratih giblje od 1,3 do 1,8. Pri 72 urah se razmerje še zmanjša in se giblje od 0,9 pri glukozi do 1,5 pri ksilozi (sl. 4).

Sev Mz5 producira butirat in laktat kot glavna produkta fermentacije tudi iz ogljikovih hidratov, kot so brezov in bukov ksilan, ksiloza, arabinoza in glukoza. Proizvedene količine so v okviru vrednosti, ki smo jih dobili na ksilanu ovsenih plev. Razmerje med butiratom in laktatom je v logaritemski fazi rasti največje v gojišču s ksilozo in arabinozo v prid butirata, vendar se kasneje razmerja na vseh testiranih substratih izenačijo (sl. 4). Ker sta rast in produkcija končnih fermentacijskih produktov enaka na pentozah in heksozi, sev Mz5<sup>T</sup> verjetno izkorišča enako biokemijsko pot pretvorbe za obe vrsti substratov in nima fosfoketolazne aktivnosti, kot so jo dokazali pri *P. xylanivorans* CE 51 (Marounek in Petr, 1995). Sev Mz5<sup>T</sup> je zaradi kratkega generacijskega časa zelo prilagodljiv in zato uspešen pri izkoriščanju tudi drugih ksilanov in topnih ogljikovih hidratov v enaki meri kot ksilana ovsenih plev.

Možnosti biotehnološke izrabe seva Mz5<sup>T</sup> so predvsem na področju produkcije ksilanaz zaradi njegove izjemne ksilanolitične aktivnosti (Zorec, 2002). Področja aplikacij ksilanaz so predvsem na področju krmnih dodatkov za izboljšanje prebavljivosti krme, predelavi rastlinskih odpadkov in v živilski industriji med drugim tudi za produkcijo ksilooligosaharidov, ki imajo prebiotske učinke (Vazquez in sod., 2000). Poleg tega bi sev Mz5 lahko uporabili kot probiotik za izboljšanje razgradnje ksilana v vampu prežvekovalcev in debelem črevesu monogastričnih živali. Sev Mz5 je kompetitiven, saj izkorišča različne ogljikove hidrate in je zaradi kratkega generacijskega časa zelo prilagodljiv.

Zelo pomemben probiotski dejavnik pri sevu Mz5 je tudi produkcija velikih količin butirata, ki je primarni energetski vir za kolonocite in je pomemben zaščitni dejavnik pri razvoju raka na debelem črevesu. Poleg tega uravnava transportne procese epitelnih celic, uravnava črevesno peristaltiko, povečuje prekravavitev in sintezo mucusa (Topping in Clifton, 2001).

## SKLEPI

Pri *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> smo na ksilanu ovsenih plev kot glavni fermentacijski produkt določili butirat. Glede na ostale produkte fermentacije smo sklepali, da je pri pretvorbi piruvata aktiven encim butiril-CoA/acetat-CoA transferaza. Koncentracija butirata je začela intenzivno naraščati z vstopom v logaritemsko fazo in se je povečevala do pozne stacionarne faze. Z namnoževanjem seva na drugih ogljikohidratnih substratih (na brezovem in bukovem ksilanu, ksilozi, arabinozi in glukozi) smo dokazali, da je sev dobro prilagodljiv. Na teh substratih smo določili podobno kinetiko produkcije butirata kot na ksilanu ovsenih plev. Razmerje med butiratom in laktatom je bilo na vseh substratih največje v zgodnji logaritemski fazi. Butirat je pomemben probiotski dejavnik in poznavanje kinetike njegove produkcije je pomembno pri morebitni uporabi *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> kot probiotika. Dobljeni rezultati bodo v pomoč pri načrtovanju poskusov, s katerimi bi proučili probiotsko delovanje seva Mz5<sup>T</sup> *in vivo* pri prašičih in perutnini. Na osnovi te študije bi lahko predlagali uporabo kultur seva Mz5<sup>T</sup> v zgodnji logaritemski fazi, ki bi jih namnožili na cenem ogljikohidratnem viru, kot je rastlinska odpadna biomasa.

## SUMMARY

Butyribacteriosi are phylogenetically heterogenic group of anaerobic rumen bacteria that have the same morphology and produce butyrate as one of the main fermentation products on carbohydrates. Recently, on the basis of 17 isolates a new species was established, *Pseudobutyribacter xylinivorans* with type strain Mz5<sup>T</sup> (Kopecny in sod., 2003). Strain Mz5<sup>T</sup> was isolated in our laboratory and had exceptional xylanolytic abilities. It produced butyrate as one of the major fermentation products. Butyrate is an important probiotic factor and in this study we determined the rate of its production in strain Mz5<sup>T</sup> and the effect of different carbohydrates on butyrate production. When strain Mz5 was grown in the medium with oat spelt xylan the main fermentation products were butyrate and lactate. During growth acetate was utilized from the medium. Butyrate concentration increased significantly in the beginning of the logarithmic growth phase reaching maximum in the late stationary growth phase (17.3 mM). Lactate was synthesized to lesser extent probably due to the presence of acetate in the medium. Acetate stimulates the activity of butyryl-CoA/acetate-CoA transferase (butyrate forming enzyme) and inhibits lactate dehydrogenase (lactate generating enzyme) (Diez-Gonzales *et al.*, 1999). Cultivation of strain Mz5<sup>T</sup> on different carbohydrates showed us that strain Mz5<sup>T</sup> was perfectly adaptable and could utilize these substrates to the same extent as oat spelt xylan. Butyrate was the main fermentation product of strain Mz5<sup>T</sup> on different carbohydrates. Majority of butyrate in regard to lactate was produced during the logarithmic phase and afterwards the ratios on different substrates were at the same level. Strain Mz5<sup>T</sup> can be used as probiotic in animal feeds for improvement of xylan degradation. Production of butyrate is another important probiotic factor that ensures normal development and function of the colon. The results could be very helpful when further *in vivo* studies of probiotic capabilities in pigs in poultry are designed for strain Mz5<sup>T</sup>.

## VIRI

- Barcenilla, A./ Pryde, S.E./ Martin, J.C./ Duncan, S.H./ Stewart, C.S./ Henderson, C./ Flint, H.J. Phylogenetic relationship of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2000), 1654–1661.
- Čepeljnik, T./ Marinšek Logar, R. *Butyribacter* strains – important butyrate producing bacteria from animal gastrointestinal tract and current taxonomic status of strains in this genus. *Zb. Biotehn. fak. Univ. Ljublj.*, Kmet. Zooteh., 80(2002), 19–28.
- Diez-Gonzalez, F./ Bond, D.R./ Jennings, E./ Russell, J.B. Alternative schemes of butyrate production in *Butyribacter fibrisolvens* and their relationship to acetate utilization, lactate production, and phylogeny. *Arch. Microbiol.*, 171(1999), 324–330.
- DSM Catalogue of strains. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nemčija, 1993, <http://www.dsmz.de/media/med330.htm> (13. okt. 1998).
- Cotta, M./ Forster, R. The family *Lachnospiraceae*, including the genera *Butyribacter*, *Lachnospira* and *Roseburia*. V: The prokaryotes. 3rd ed., release 3.2, 2000, <http://141.150.157.117/prokPUB/chaphtm/266/COMPLETE.htm> (7. okt. 2002).
- Hague, A./ Singh, B./ Paraskeva, C. Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the *in vivo* versus *in vitro* debate. *Gastroenterology*, 112(1997), 1036–1040.
- Holdeman, L.V./ Cato, E.P./ Moore, W.E.C. Anaerobe laboratory manual. 4th edition. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977, 152 str.
- Jacobasch, G./ Schmiedl, D./ Kruschewski, M./ Schmehl, K. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel disease. *Int. J. Colorectal Dis.*, 14(1999), 201–211.
- Kopecny, J./ Marinšek Logar, R./ Zorec, M./ Mrazek, J./ Kobayashi, Y. *Butyribacter hungatei* sp. nov., and *Pseudobutyribacter xylinivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53(2003), 201–209.
- Luciano, L./ Hass, R./ Busche, R./ von Engelhardt, W./ Reale, E. Withdrawal of butyrate from the colonic mucosa triggers "mass apoptosis" primarily in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Cell Tissue Res.*, 286(1996), 81–92.

- Macfarlane, G.T./ Cummings, J.H. Metabolic aspects of the intestinal flora. V: The balance: Functional aspects of intestinal flora. *Yakult Europe B.V.*, 2001, 19–33.
- Marounek, M./ Petr, O. Fermentation of glucose and xylose in ruminal strains of *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21(1995), 272–276.
- Miller, T.L./ Jenesel, S.E. Enzymology of butyrate formation by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.*, 138(1979), 99–104.
- Parodi, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.*, 127(1997), 1055–1060.
- Shane, B.S./ Gouws, L./ Kistner, A. Cellulolytic bacteria occurring in the rumen of sheep conditioned to low-protein teff hay. *J. Gen. Microbiol.*, 55(1969), 445–457.
- Topping, D.L./ Clifton, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 81(2001), 1031–1064.
- Varel, V.H./ Yen, J.T. Microbial perspective on fiber utilization by swine. *J. Anim. Sci.*, 75 (1996), 2715–2722.
- Vazquez, M.J./ Alonso, J.L./ Dominguez, H./ Parajo, J.C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 11(2000), 387–393.
- Velazquez, O.C./ Rombeau, J.L. Butyrate. Potential role in colon cancer prevention and treatment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 427(1997), 169–181.
- Zorec, M. Izolacija vampne bakterije z močno ksilanolitično aktivnostjo in opis njenega encimskega sistema za razgradnjo ksilana. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fak., 2002, 79 str.