

研究报告

体外法探究猪空肠和回肠黏膜微生物对低聚半乳糖和低聚甘露糖的发酵特性

吴鹏晖, 慕春龙, 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

吴鹏晖, 慕春龙, 朱伟云. 体外法探究猪空肠和回肠黏膜微生物对低聚半乳糖和低聚甘露糖的发酵特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4242-4254

Wu Penghui, Mu Chunlong, Zhu Weiyun. *In vitro* fermentation characteristics of galacto-oligosaccharides and manno-oligosaccharides by mucosal microbiota from porcine jejunum and ileum[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4242-4254

摘要: 【背景】小肠黏膜微生物是肠道菌群的重要组成部分, 大量研究表明日粮添加低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)和低聚甘露糖(manno-oligosaccharides, MOS)能够调控猪的大肠菌群结构, 但关于其调控小肠黏膜微生物的研究较少。【目的】通过体外发酵法探究猪空肠黏膜和回肠黏膜微生物发酵 GOS 和 MOS 的规律。【方法】以生长猪的空肠黏膜微生物和回肠黏膜微生物作为接种物, 以 GOS 和 MOS 作为底物进行厌氧发酵, 在发酵 0、6、12、24 h 时采样测定总菌数量、pH、氨态氮(ammonia nitrogen, $\text{NH}_3\text{-N}$)、菌体蛋白(microbial crude protein, MCP)和有机酸, 在 24 h 收集微生物提取 DNA 进行细菌定量分析。【结果】在 24 h 时, 回肠黏膜组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度显著低于空肠黏膜组, 而 MCP 浓度显著高于空肠黏膜组($P<0.05$)。在发酵的前 6 h 各组 pH 无明显变化, 有机酸积累较少。在 12 h 时, MOS 组的乳酸、乙酸、丁酸和总短链脂肪酸产量显著高于 GOS 组($P<0.05$), 此时只有回肠黏膜组有少量丙酸产生。在 24 h 时, MOS 回肠黏膜组乳酸产量最高而 pH 值最低($P<0.05$)。相较于 MOS 组, GOS 组显著提高了丙酸的产量($P<0.05$)。相较于 GOS 组, MOS 组显著提高了乙酸的产量, 在空肠黏膜组中显著提高了丁酸和总短链脂肪酸的产量($P<0.05$)。定量结果表明, 在 24 h 时, 各处理组的厚壁菌门数量都接近总菌数量, 属于优势菌门。相较于 MOS 组, GOS 组显著提高了拟杆菌门、链球菌属、韦荣氏球菌属和普拉梭菌细菌的数量, 提高了空肠黏膜组中 *Clostridium* cluster IV 和回肠黏膜组中 *Clostridium* cluster XIVa 的数量($P<0.05$)。相较于 GOS 组, MOS 组显著提高了大肠杆菌和乳酸杆菌属的数量, 提高了回肠黏膜组中罗氏菌属的数量($P<0.05$)。【结论】猪小肠黏膜微生物对 GOS 和 MOS 具有不同的发酵模式, 主要表现在有机酸的产生和促进细菌的增殖方面。GOS 具有产丙酸优势, 提高了拟杆菌门和韦荣氏

基金项目: 国家自然科学基金(32030104)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32030104)

*Corresponding author: E-mail: zhuweiyun@njau.edu.cn

Received: 2022-03-03; Accepted: 2022-04-27; Published online: 2022-06-06

球菌属的数量; MOS 促进了乙酸的产生, 提高了大肠杆菌和乳酸杆菌的数量。

关键词: 猪; 小肠黏膜微生物; 低聚半乳糖; 低聚甘露糖; 有机酸

***In vitro* fermentation characteristics of galacto-oligosaccharides and manno-oligosaccharides by mucosal microbiota from porcine jejunum and ileum**

WU Penghui, MU Chunlong, ZHU Weiyun*

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

Abstract: **[Background]** Mucosal microbiota from small intestine is an important part of gut microbiota. Many studies had shown that galacto-oligosaccharides (GOS) and manno-oligosaccharides (MOS) can regulate the gut microbiota from large intestine of pigs. However, there are few studies on its regulation of mucosal microbiota from small intestine. **[Objective]** This study aimed to explore the *in vitro* fermentation characteristics of GOS and MOS by mucosal microbiota from porcine jejunum and ileum. **[Methods]** The microbiota samples from the jejunum mucosa and ileum mucosa of growing pigs were used for the anaerobic fermentation of GOS and MOS. Total bacterial number, pH, ammonia nitrogen (NH₃-N), microbial crude protein (MCP), and organic acids were measured at 0, 6, 12, and 24 h during the fermentation. The bacteria were quantified by quantitative PCR after 24 h incubation. **[Results]** After 24 h incubation, the concentration of NH₃-N in the ileum mucosa group was lower than that in the jejunum mucosa group, while the concentration of MCP showed an opposite trend ($P < 0.05$). After 6 h incubation, the pH changed slightly because of the small amount accumulation of organic acids. After 12 h incubation, lactate, acetate, butyrate, and total short-chain fatty acids in the MOS group were significantly higher than those in the GOS group ($P < 0.05$), and only a small amount of propionic acid was produced in the ileum mucosa group. After 24 h incubation, the MOS group with the microbiota from ileum mucosa showed the highest yield of lactate and the lowest pH ($P < 0.05$). The GOS group had higher propionate yield than the MOS group ($P < 0.05$). The MOS group had higher yield of acetate than the GOS group, as well as that of butyrate and total SCFA in the jejunum mucosa group ($P < 0.05$). After 24 h incubation, *Firmicutes* showed the close number to total bacteria, being the dominant phylum. Compared with MOS, GOS increased the number of *Bacteroidetes*, *Streptococcus*, *Veillonella*, and *Faecalibacterium*, as well as that of *Clostridium* cluster IV in the jejunum mucosa group and *Clostridium* cluster XIVa in the ileum mucosa group ($P < 0.05$). Compared with GOS, MOS increased the number of *Escherichia coli* and *Lactobacillus*, as well as that of *Roseburia* in the ileum mucosa group ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The mucosal microbiota from porcine small intestine had different fermentation patterns for GOS and MOS, as manifested by the varied production of organic acids and bacterial proliferation. GOS had an advantage of propionate production and increased the number of *Bacteroidetes* and *Veillonella*. MOS promoted the production of acetate, lactate in the ileum

mucosa group and butyrate in the jejunum mucosa group, and increased the number of *Escherichia coli* and *Lactobacillus*.

Keywords: pig; mucosal microbiota from small intestine; galacto-oligosaccharides (GOS); manno-oligosaccharides (MOS); organic acid

猪的肠道中栖息着丰富的共生菌, 具有很多独特的代谢特性, 如产生碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy), 从而发酵宿主不能利用的复杂多糖, 产生对宿主有益的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)。短链脂肪酸不仅是结肠上皮细胞的能量底物, 还能作为宿主炎症和能量代谢的调节物, 同时能降低 pH 值, 改善肠道内环境以限制病原菌的生长^[1]。研究表明, 微生物具有不同的多糖代谢能力, 多糖代谢能够调控肠道菌群的组成及其代谢活性, 进而影响宿主的生理状态^[2]。低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)主要由 β -1,4 连接的半乳糖糖基组成, 可由半乳糖苷酶的转糖基作用生成。研究表明低聚半乳糖能够促进肠道中双歧杆菌的增殖, 并改善肠道屏障功能^[3]。低聚甘露糖(manno-oligosaccharides, MOS)是由甘露糖以 α -1,6 糖苷键连接的益生元寡糖, 主要来源于酵母细胞壁。杭苏琴等研究表明, 低聚甘露糖能够在体外选择性促进乳酸杆菌的生长^[4], 提高断奶仔猪肠道菌群的多样性和稳定性^[5]。因此可以通过补充寡糖的营养干预方式来调节肠道菌群结构和功能, 从而改善机体健康。

肠道微生物在宿主肠道中呈现出区室化的空间分布特点, 不同区室具有不同生态位, 不同生态位的细菌结构和代谢特性有很大的差别^[6-7]。小肠微生物的优势菌群是链球菌属、梭菌属和大肠杆菌, 主要通过快速摄取利用简单糖类来存活, 而大肠微生物的优势菌群是厚壁菌门和拟杆菌门微生物, 可以实现对复杂糖

类的降解利用^[8]。已有的研究主要关注寡糖对大肠微生物的调节, 对小肠微生物的研究很少。最近的研究发现, 人回肠微生物能够在 5 h 内快速降解 GOS 等益生元寡糖^[9]。Tian 等研究表明, 新生仔猪补充 GOS 可以提高回肠中乳酸杆菌的相对丰度和短链脂肪酸的含量, 降低大肠杆菌的相对丰度^[10]。除了肠段差异, 不同生态位即肠腔和黏膜微生物也存在组成和功能差异。研究发现, 人回肠黏膜微生物基因组存在降解 GOS 等益生元寡糖的碳水化合物活性酶的编码基因, 因此具有利用 GOS 等益生元寡糖的潜力^[11]。Gao 等研究表明, GOS 能够通过调控结肠黏膜相关微生物来缓解脂多糖诱导的肠道炎症^[12]。以上研究表明, 益生元寡糖可以调控小肠食糜和结肠黏膜的菌群结构, 并对宿主起益生作用, 然而有关寡糖与小肠黏膜微生物之间互作的研究很少。因此本研究主要通过体外发酵的方法, 探究猪空肠黏膜和回肠黏膜微生物发酵寡糖 GOS 和 MOS 的规律, 以期对猪的营养干预策略提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

磷酸缓冲液, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 乳酸测试盒, 南京建成生物工程研究所; 钴珠, 南宁安卓生物科技有限公司; 荧光定量试剂盒, 湖南艾科瑞生物工程有限公司。恒温振荡培养箱, 精骐有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 酶标仪、核酸蛋白仪, 赛默飞世尔科技公司; 气相色谱仪, 岛津公司;

珠式样品研磨器, 欧姆尼有限公司。

低聚半乳糖(QHT-GOS-90S)购自广东量子高科生物有限公司, 97.12%干物质, 包含90.12% GOS (16.74% DP2, 37.81% DP3, 22.14% DP4, 13.43% DP \geq 5), 8.05%乳糖, 1.3%葡萄糖, 0.52%半乳糖; 低聚甘露糖(纯度 90%)购自山东丰泰生物科技有限公司, 来源于酵母细胞壁。

厌氧培养基参照 Dai 等^[13]的方法制备: 发酵体系为 100 mL, 包含 10 mL 的接种物和 10 mg/mL 的底物, 初始 pH 值调整为 6.8。

收集 3 头来自同一批育肥和屠宰上市의 杜 \times 长 \times 大(Duroc \times Landrace \times Yorkshire)商品猪的新鲜小肠, 并分离 20 cm 长的中段空肠和 20 cm 长的末端回肠, 根据 Yang 等^[14]方法制备黏膜微生物接种物: 将肠段挤出食糜后放入含有磷酸缓冲液的培养皿中冲洗 3 次, 然后用新的灭菌剪刀将每条肠段剪成小段。这些肠段直接在厌氧培养基中培养 3 h 以释放出肠壁紧密连接微生物。

1.2 试验设计

采用 2 \times 2 双因素试验设计: 在厌氧培养基中分别添加 10 mg/mL 的 GOS 和 MOS 作为唯一碳源, 然后分别接种上述制备的空肠黏膜微生物和回肠黏膜微生物, 每组 4 个重复。试验共有 4 个处理组: GJ 组(GOS+空肠黏膜微生物)、MJ 组(MOS+空肠黏膜微生物)、GI 组(GOS+回肠黏膜微生物)和 MI 组(MOS+回肠黏膜微生物)。接种后将发酵瓶放入恒温振荡培养箱, 37 °C、100 r/min 培养 24 h, 分别在 0、6、12、24 h 采集发酵液样品用于后续指标的测定, 并以 0 h 作为对照。

1.3 pH、NH₃-N、MCP 及有机酸测定

用 pH 计测定发酵液 pH 值; 参照 Weatherburn 等用比色法测定氨态氮(ammonia nitrogen,

NH₃-N)浓度^[15]; 参照 Makkar 等用考马斯亮蓝法测定菌体蛋白(microbial crude protein, MCP)含量^[16]; 用乳酸测试盒参照说明书测定乳酸含量。

参照 He 等方法用岛津气相色谱仪测定短链脂肪酸含量^[17]: 1 mL 发酵液中添加 0.2 mL 偏磷酸巴豆酸混合溶液后于-20 °C 过夜, 解冻后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μ m 水相滤膜, 取 0.6 μ L 滤液上机检测, 用内标法进行定量。

1.4 发酵液细菌总 DNA 提取

用 CTAB 法提取发酵液细菌总 DNA^[18]: 将样品置入含有适量铅珠的 CTAB 溶液中, 用研磨器机械破碎, 然后用酚-氯仿-异戊醇反复抽提得到总 DNA, 用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度和纯度。

1.5 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR 对发酵液中的总菌、厚壁菌门、拟杆菌门、大肠杆菌、链球菌属、乳酸杆菌、双歧杆菌、*Clostridium cluster IV*、*Clostridium cluster XIVa*、韦荣氏球菌属、罗氏菌属、普拉梭菌进行绝对定量, 特异性引物序列(表 1)参照 Zhang 等^[19]。反应体系(20 μ L): SYBR Green Pro *Taq* 10 μ L, ddH₂O 7.2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L。各目标菌的标准质粒经 10 倍倍比梯度稀释后用作模板以绘制标准曲线。

1.6 统计分析

使用 SPSS (V 26.0)中的一般线性模型分析数据。底物和肠段设置为主效应, 两因子的交互作用设置为互作效应。当两因子之间存在显著的互作效应时, 进行单因素方差分析, 差异显著时用 Tukey 法进行多重比较。P<0.05 表示差异显著。

表 1 细菌定量 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for bacterial quantitative PCR

Bacteria	Forward primer	Reverse primer
Total bacteria	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA	ACGTCRTCCMCNCCTTCCTC
<i>Firmicutes</i>	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC
<i>Bacteroidetes</i>	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT	AGCTGACGACAACCATGCAG
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA
<i>Streptococcus</i>	ACCAGAAAGGGACGGCTAACTAC	ATCGTTTACGGCGTGGACTAC
<i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	ATTCCACCGCTACACATG
<i>Bifidobacterium</i>	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	GGTGTCTTCCCGATATCTACA
<i>Clostridium</i> cluster IV	GCACAAGCAGTGGAGT	CTTCTCCGTTTTGTCAA
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	CGGTACCTGACTAAGAAGC	AGTTYATTCTTGCGAACG
<i>Veillonella</i>	A(C/T)CAACCTGCCCTTCA	CGTCCCGATTAACAGAGCTT
<i>Roseburia</i>	GCGGTRCGGCAAGTCTGA	CCTCCGACACTCTAGTMCGAC
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	GGAGGAAGAAGTCTTCGG	AATCCGCCTACCTCTGCACT

2 结果与分析

2.1 发酵液中总菌数量和 pH 的变化

由图 1 可知, 各组总菌数量随着发酵时间的增加而逐渐上升。在 0、6、12 h, 回肠黏膜组的总菌数量显著高于空肠黏膜组($P<0.05$); 在 12 h 时, MOS 组的总菌数量显著高于 GOS 组; 在 24 h 时, 底物和肠段之间存在交互作用($P<0.01$), 其中 GOS 回肠黏膜组拷贝数最高($P<0.05$), 但与 MOS 回肠黏膜组无显著差异。

各组 pH 值在前 6 h 略有升高, 而后随着发酵的进行均呈下降趋势。在 12、24 h 时, 底物和肠段之间存在交互作用($P<0.01$); 在 12 h 时, MOS 空肠黏膜组的 pH 值显著低于其他 3 组($P<0.05$); 在 24 h 时, MOS 回肠黏膜组的 pH 值显著低于其他 3 组($P<0.05$); 在 0 h 时, 回肠黏膜组的 pH 值显著低于空肠黏膜组($P<0.01$); 在 6 h 时, GOS 组的 pH 值显著低于 MOS 组($P<0.05$)。

2.2 发酵液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 MCP 的变化

由图 2 可知, 对于 $\text{NH}_3\text{-N}$ 来说, 各组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度都是先降低后升高。在 24 h 时, 空肠黏膜组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度显著高于回肠黏膜组

($P<0.05$)。对于 MCP 来说, 各组 MCP 浓度随着发酵时间的增加而逐渐上升。在 12、24 h 时, 底物和肠段之间存在交互作用($P<0.05$); 在 12 h 时, GOS 空肠黏膜组的 MCP 浓度显著低于其他 3 组($P<0.05$); 在 24 h 时, 不论是以 GOS 为底物还是以 MOS 为底物, 回肠黏膜组的 MCP 浓度都显著高于空肠黏膜组($P<0.05$)。

2.3 发酵液中有机酸的变化

由图 3 可知, 随着发酵时间的增加, 各组的有机酸都在逐渐积累, 而且主要代谢产物是乳酸和乙酸。对于乳酸来说, 在 24 h 时, 底物和肠段之间存在交互作用($P<0.01$), MOS 回肠黏膜组的乳酸产量最高, GOS 空肠黏膜组和 MOS 空肠黏膜组的次之, GOS 回肠黏膜组的最低; 在 6、12 h 时, MOS 组的乳酸产量都高于 GOS 组($P<0.01$), 空肠黏膜组的乳酸产量都高于回肠黏膜组($P<0.01$)。对于乙酸来说, 在各时间点上底物和肠段之间均存在交互作用($P<0.05$), 而且均为 MOS 回肠黏膜组的乙酸产量最高, GOS 空肠黏膜组的乙酸产量最低($P<0.05$)。对于丙酸来说, 在 6 h 时, 各组均未检测出丙酸; 在 12 h 时, 空肠黏膜组未检测出丙酸, 回肠黏膜组

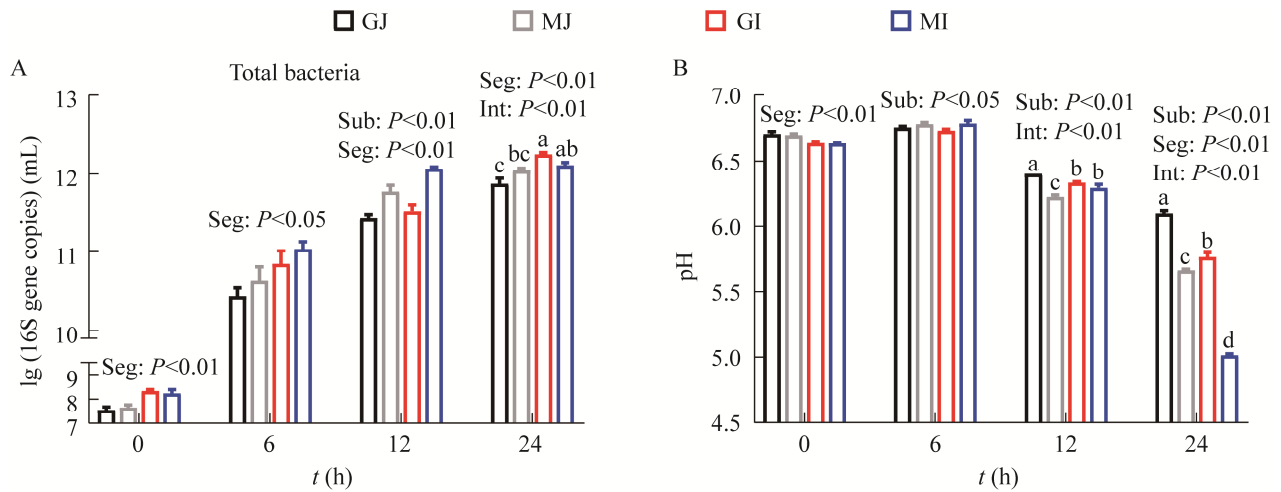


图 1 小肠黏膜微生物体外发酵 GOS、MOS 过程中总菌数量(A)和 pH 值(B)的变化 数据均表现为平均值±标准误; 底物(substrate, sub)、肠段(segment, seg)及其互作(interaction, int)设为变异来源; 同一时间点不同字母表示差异显著; GJ: GOS+空肠黏膜微生物; MJ: MOS+空肠黏膜微生物; GI: GOS+回肠黏膜微生物; MI: MOS+回肠黏膜微生物; 图 2-4 的设置同图 1

Figure 1 Changes of total bacteria numbers (A) and pH (B) during *in vitro* fermentation of GOS and MOS by small intestinal mucosal microbiota. Data are shown as mean±SEM; Substrate, segment and their interaction are sources of variation; In the same time point, values of the columns with different letter superscripts mean significant difference; GJ: GOS+jejunum mucosal microbiota; MJ: MOS+jejunum mucosal microbiota; GI: GOS+ileum mucosal microbiota; MI: MOS+ileum mucosal microbiota; The same situation for figure 2, 3 and 4.

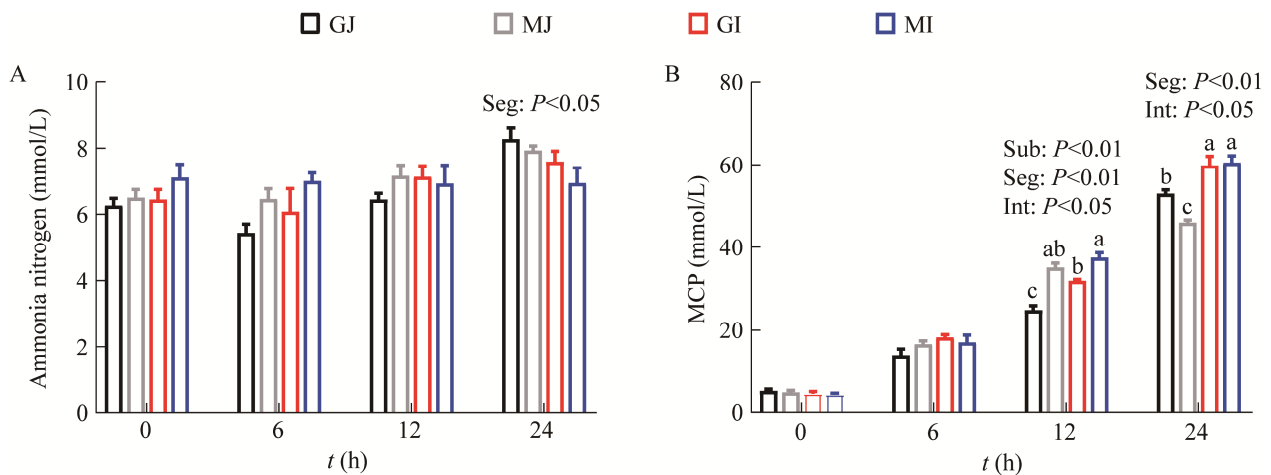


图 2 小肠黏膜微生物体外发酵 GOS、MOS 过程中 NH₃-N (A)和 MCP (B)浓度的变化

Figure 2 Changes of ammonia nitrogen (A) and microbial crude protein (B) concentrations during *in vitro* fermentation of GOS and MOS by small intestinal mucosal microbiota.

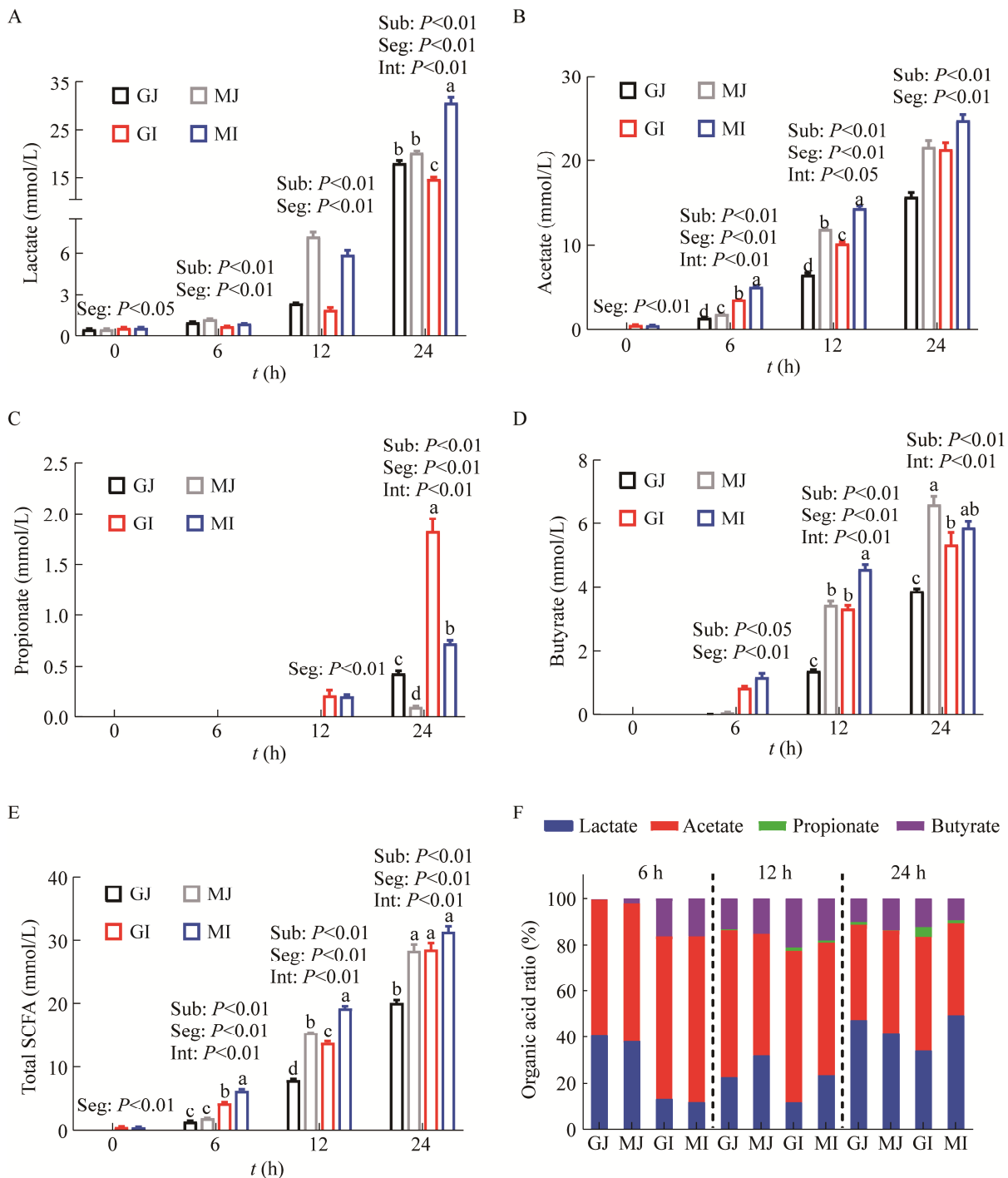


图3 小肠黏膜微生物体外发酵 GOS、MOS 过程中有机酸浓度的变化 A: 乳酸; B: 乙酸; C: 丙酸; D: 丁酸; E: 总短链脂肪酸; F: 各有机酸占总有机酸浓度的比例

Figure 3 Changes of organic acid concentrations during *in vitro* fermentation of GOS and MOS by small intestinal mucosal microbiota. A: Lactate; B: Acetate; C: Propionate; D: Butyrate; E: Total SCFA; F: The ratio of individual organic acid concentrations to total organic acid concentrations.

有少量丙酸产生,但在两种底物之间无显著差异;在 24 h 时,底物和肠段之间存在交互作用($P<0.01$),其中 GOS 回肠黏膜组的丙酸产量显著高于其他 3 组($P<0.05$)。对于丁酸来说,在 12、24 h 时,底物和肠段之间存在交互作用($P<0.01$),在 12 h 时, MOS 回肠黏膜组的丁酸产量显著高于其他 3 组($P<0.05$);在 24 h 时, MOS 空肠黏膜组和 MOS 回肠黏膜组的丁酸含量较高($P<0.05$);在 6 h 时, MOS 组的丁酸产量高于 GOS 组($P<0.05$),回肠黏膜组的丁酸产量高于空肠黏膜组($P<0.01$)。对于总短链脂肪酸来说,在各个时间点上,底物和肠段之间均存在交互作用($P<0.01$),在 6、12 h 时, MOS 回肠黏膜组的总短链脂肪酸显著高于其他 3 组($P<0.05$);在 24 h 时, GOS 空肠黏膜组的总短链脂肪酸显著低于其他 3 组($P<0.05$),而其他 3 组之间无差异。

2.4 发酵终点时细菌数量的变化

由图 4 可知,对于总菌和厚壁菌门数量来说, GOS 回肠黏膜组拷贝数最高($P<0.05$),但与 MOS 回肠黏膜组无显著差异;对于拟杆菌门和双歧杆菌来说, GOS 回肠黏膜组的拷贝数显著高于其他 3 组($P<0.05$);对于链球菌属来说, GOS 组拷贝数显著高于 MOS 组,回肠黏膜组的拷贝数显著高于空肠黏膜组($P<0.05$);对于乳酸杆菌来说, MOS 组的拷贝数显著高于 GOS 组,空肠黏膜组的拷贝数显著高于回肠黏膜组($P<0.05$);对于大肠杆菌来说, GOS 组的拷贝数要显著低于 MOS 组($P<0.05$);对于韦荣氏球菌属来说, GOS 组的拷贝数显著高于 MOS 组,回肠黏膜组的拷贝数显著高于空肠黏膜组($P<0.05$);对于罗氏菌属来说, MOS 空肠黏膜组的拷贝数显著高于其他 3 组, GOS 回肠黏膜组的拷贝数显著高于空肠黏膜组($P<0.05$);对于 *Clostridium* cluster IV 来说, GOS 空肠黏膜组的

拷贝数显著高于其他 3 组;对于 *Clostridium* cluster XIVa 来说, GOS 回肠黏膜组拷贝数最高($P<0.05$),但与 GOS 空肠黏膜组无显著差异;对于普拉梭菌来说, GOS 组的拷贝数显著高于 MOS 组,回肠黏膜组的拷贝数显著高于空肠黏膜组($P<0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 不同肠段影响小肠黏膜微生物产生 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 MCP

$\text{NH}_3\text{-N}$ 是微生物发酵蛋白质的主要末端产物,而 MCP 反映了微生物整合进自身的蛋白质数量。在本研究中,24 h 回肠黏膜组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度显著低于空肠黏膜组,而 MCP 浓度显著高于空肠黏膜组。微生物 MCP 的合成与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及可利用碳水化合物的充足补给有关,推测可能回肠黏膜微生物更能利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 产生 MCP,也可能与回肠黏膜微生物数量较高有关。

3.2 GOS 和 MOS 影响小肠黏膜微生物产生有机酸

微生物可以利用碳水化合物产生乳酸和 SCFA,这种代谢活性不仅与微生物自身的基因结构有关^[20],还与碳水化合物的各种理化特性如单糖成分、糖苷键类型、分子量大小等密切相关^[21]。在本研究中,发酵 6 h 后有机酸的积累量较少, pH 值略微升高。Friedman 等的研究表明,小肠黏膜微生物的生物量低,变形菌门和梭杆菌门等兼性厌氧菌的丰度较高,这些菌一般被认为是蛋白质发酵菌^[6],而且接种物制备过程培养基中的酪蛋白酶解物也会使得初始接种物中的蛋白质发酵菌丰度升高,因此推测发酵起始时主要是蛋白质降解菌而非糖酵解菌,这些原因可能造成了黏膜微生物对益生元寡糖利用的明显滞后。6 h 前增殖的菌可能并非主要是糖酵解菌而是肠杆菌科这类蛋白质偏好

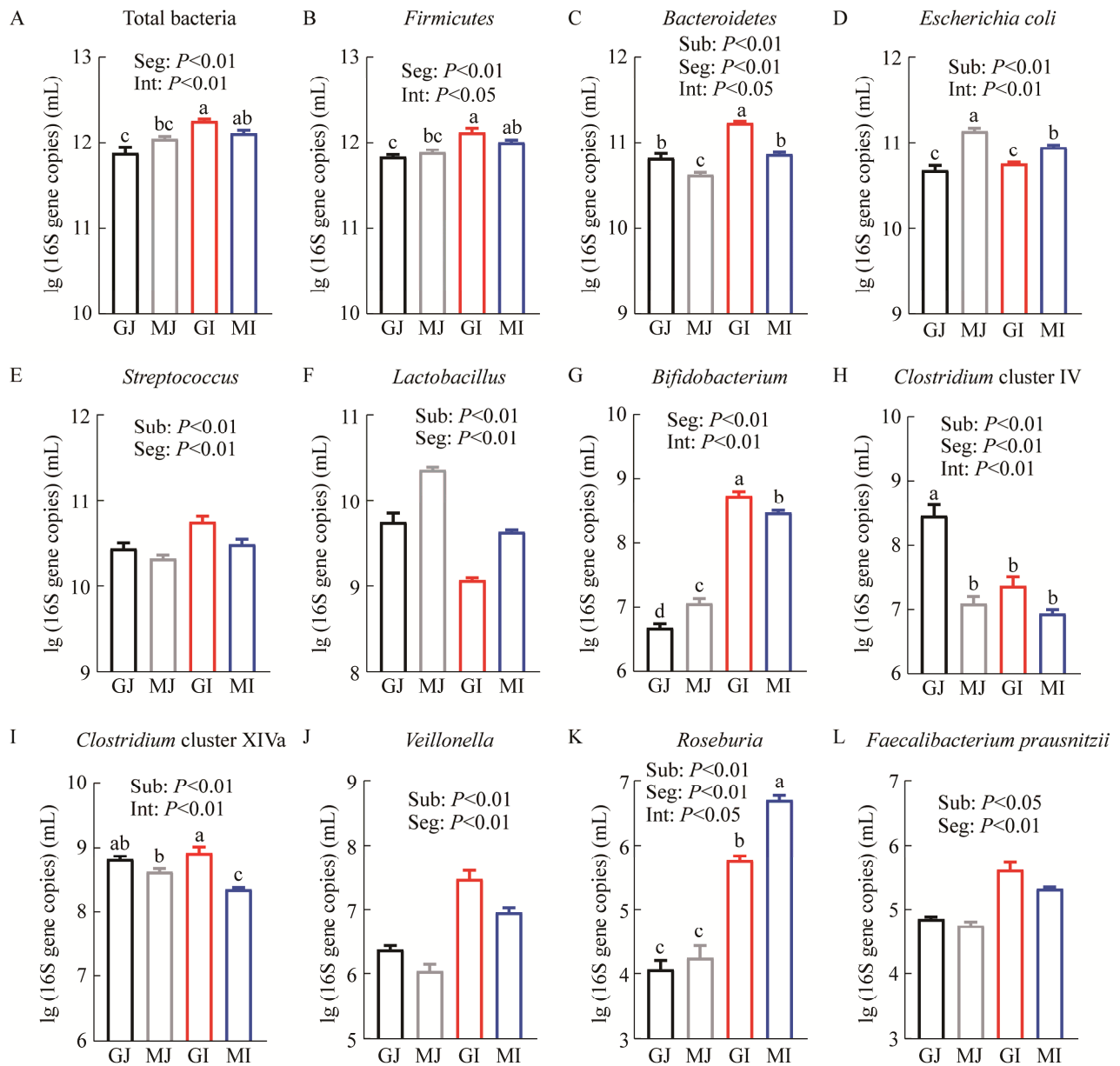


图4 小肠黏膜微生物体外发酵 GOS 和 MOS 24 h 后细菌数量的变化

Figure 4 Changes of bacterial number after 24 h *in vitro* fermentation of GOS and MOS by small intestinal mucosal microbiota.

者,可能会产生如生物胺之类的碱性代谢产物。这种类似的情况也出现在了一项以回肠微生物发酵果胶的研究中,当果胶降解菌未增殖(初始丰度极低)而其他菌增殖时,虽然总菌数量上升,但 pH 值并未下降反而上升,当果胶降解菌增殖并降解果胶后, pH 值下降。因此推测,

发酵 6 h 后 pH 值略微升高与发酵初始时相关糖酵解菌的丰度和数量较低有关^[9]。在 24 h 发酵结束时, MOS 回肠黏膜组的发酵液 pH 值显著低于其他 3 组,伴随着最高的乳酸产量和总短链脂肪酸产量。这说明发酵液中的 pH 值降低主要是由细菌有机酸代谢产物的积累引起的,

而较低的 pH 值可以抑制病原菌的生长, 并且与细菌的黏附能力密切相关^[22]。

在本研究中, 小肠黏膜微生物发酵 GOS 和 MOS 的主要有机酸代谢产物是乳酸和乙酸, 在发酵 6 h 后, 各组就有了相当程度的乙酸积累, 并且在各个时间点上, 各组中的乙酸都占总有机酸产量的 40% 以上, 而乳酸的产量随着发酵时间的增加逐渐积累, 各组发酵 24 h 后其中占总有机酸产量的 30% 以上, 表明黏膜微生物的乙酸和乳酸代谢非常活跃。在本研究中, 黏膜微生物利用 GOS 和 MOS 的代谢产物除了乳酸和乙酸外还有丙酸和丁酸, 表明黏膜微生物中也存在丙酸和丁酸产生菌, 并且 GOS 和 MOS 能够促进相关代谢途径。发酵 12 h 和 24 h 后, 各组发酵液中的 pH 值显著降低, 乳酸和 SCFA 显著积累, 表明黏膜微生物能够降解利用 GOS 和 MOS, 但在有机酸的产生方面有很大的差异。MOS 提高了发酵液中的乙酸浓度而 GOS 则提高了发酵液中的丙酸浓度, 这说明小肠黏膜微生物对 GOS 和 MOS 具有不同的发酵模式。Wei 等的研究表明, 对特定结构益生元寡糖的利用是菌株依赖性的, 这使得肠道微生物对不同结构益生元寡糖具有不同的发酵模式^[21], 因此, 不同结构的益生元寡糖可能具有不同的产酸优势。小肠黏膜这一特殊生态位的微生物发酵益生元寡糖产生的短链脂肪酸, 可能更积极地对小肠局部产生健康影响, 但考虑到体外发酵模型的限制性, 还需要继续在体内评估其益生效应。

3.3 GOS 和 MOS 调控小肠黏膜菌群结构

本研究中, 不论是在空肠黏膜组中还是在回肠黏膜组中, GOS 组的拟杆菌门数量都显著高于 MOS 组。已有研究表明, 拟杆菌属具有非常广泛的多糖降解能力, 能通过基因组内的多糖利用位点 (polysaccharide utilization locus, PUL) 感知利用周围环境中的复杂多糖^[23]。Van

Bueren 等的研究表明, 由于多糖结构上的相似性, 聚合度较高的 GOS 能激活多形拟杆菌的果胶半乳聚糖 PUL, 而聚合度较低的 GOS 能激活多形拟杆菌的黏蛋白多糖 PUL^[24]。Cuskin 等的研究发现, 多形拟杆菌能表达特异性的酵母甘露聚糖降解系统, 从而实现对不同类型酵母甘露聚糖的利用^[25]。这些结果表明 GOS 可能更能通过上调空肠黏膜组和回肠黏膜组中拟杆菌门的多糖利用位点来促进发酵。

本研究中, 24 h 发酵后各处理组的厚壁菌门数量都接近总菌数量。这表明发酵液中的优势菌门是厚壁菌门, 并且 GOS 和 MOS 能够促进小肠黏膜厚壁菌门微生物的发酵。此外, 本研究中不同厚壁菌门微生物对 GOS 和 MOS 的利用具有差异, 如 GOS 组的普拉梭菌数量较高, 而 MOS 组的乳酸杆菌数量较高。研究表明, 厚壁菌门微生物基因组内的多糖代谢基因占比较低, 因而通常是高度营养特化的, 能够通过特异性的转运蛋白将多糖转运至胞内进行降解利用^[26]。Rattanaprasert 等的研究表明, 罗伊氏乳杆菌能通过乳糖透性酶和内切型半乳糖苷酶的协作, 将 GOS 转运至胞内进行降解利用^[27]。Lindstad 等的结果表明, 普拉梭菌能够通过 ABC 转运蛋白和胞内糖苷水解酶降解利用魔芋甘露寡糖^[28]。这些结果提示, 厚壁菌门微生物一般通过特异性的转运蛋白在胞内降解利用寡糖, 因此, 转运蛋白的差异性可能是造成不同厚壁菌门微生物寡糖利用能力不同的原因之一。

本研究还发现, GOS 和 MOS 能够上调小肠黏膜微生物的不同分类群, 这可能是造成产酸差异的原因之一。相较于 MOS 组, GOS 组显著提高了拟杆菌门、链球菌属、韦荣氏球菌属和普拉梭菌的数量, 在空肠黏膜组中提高了 *Clostridium* cluster IV 的数量, 在回肠黏膜组中提高了 *Clostridium* cluster XIVa 的数量。相较于

GOS 组, MOS 组显著提高了大肠杆菌和乳酸杆菌数量, 在回肠黏膜组中提高了罗氏菌属的数量。乳酸杆菌、链球菌属和双歧杆菌等乳酸菌能够产乳酸或乙酸; 拟杆菌属和 *Clostridium* cluster IX 能够产生丙酸; *Clostridium* cluster IV 和 *Clostridium* cluster XIVa 是丁酸产生菌; 乙酸通常是肠道中来源最丰富的短链脂肪酸, 由各种各样的细菌产生^[29]。

本研究中各处理组均产生了乳酸, 在空肠黏膜组中 GOS 和 MOS 的乳酸产量无差异, 在回肠黏膜组中 MOS 的乳酸产量显著高于 GOS, 但乳酸产量与各组的链球菌、乳杆菌、双歧杆菌的数量之间未出现相关性, 这可能有两方面的原因: (1) 乳酸是多种细菌(链球菌、乳酸杆菌和双歧杆菌等)厌氧发酵的产物, 本研究中 MOS 组显著提高了链球菌的数量和空肠黏膜组中双歧杆菌的数量, GOS 组显著提高了乳酸杆菌和回肠黏膜组中双歧杆菌的数量, 因此不能简单地将乳酸产量归结到某一类微生物上, 而是所有产乳酸菌共同作用的结果。后续可以通过分离链球菌、乳酸杆菌等相关微生物进行纯培养, 比较其利用 GOS 和 MOS 产乳酸的能力。(2) 乳酸是一种中间代谢产物, 可被互养菌(cross-feeder)转化成丙酸和丁酸。本研究中 GOS 组的丙酸显著高于 MOS 组, 而且定量的结果表明 GOS 组的 *Veillonella* 数量显著高于 MOS 组。研究表明韦荣氏球菌能以乳酸为唯一碳源生成丙酸^[30], 因此推测发酵液中可能存在如韦荣氏球菌之类的互养菌, 能将乳酸转化成丙酸。在本研究中, GOS 组丙酸浓度显著增大, 可能是由于提升的拟杆菌门和韦荣氏球菌数量引起的。然而丁酸浓度的增大并未伴随着相关分类群细菌如 *Clostridium* cluster IV 和 *Clostridium* cluster XIVa 的数量增加。这可能是由于分类学上的标签并不能良好地反映其代谢能力, 由于

细菌基因组的广泛突变性, 使得传统的分类学手段会失真。Medina 等的研究表明, 在 16S rRNA 基因水平上, 相较于健康人类, 溃疡性结肠炎患者的拟杆菌属丰度降低, 但是其中来源于拟杆菌属的丙酸激酶基因丰度却提高了^[31]。因此, 在基因水平而非分类学水平上的定量可能会更准确地反映细菌的代谢活性。

3.4 小肠黏膜微生物利用 GOS 和 MOS 的肠段特异性

本实验中, 在有机酸和细菌定量的结果中, 肠段主效应经常有显著性变化, 如回肠黏膜组的乙酸浓度显著高于空肠黏膜组, 而空肠黏膜组的乳酸杆菌数量显著高于回肠黏膜组。此外, 肠段和底物经常会有显著的交互作用, 这说明在空肠黏膜和回肠黏膜组中益生元寡糖所起的效应不一致, 甚至起到了相反的效应, 如在空肠黏膜组中 GOS 显著增加了双歧杆菌的数量, 而在回肠黏膜组中却是 MOS 显著增加了双歧杆菌的数量, 这可能是由于初始接种物的不同造成的。研究表明食物干预后的菌群变化具有个体差异性, 与宿主原始微生物组成有很大关联^[9], 而 Friedman 等的研究表明不同部位小肠黏膜的微生物组成有很大的区别^[6]。肠道微生物是一个动态的互作系统, 细菌多糖利用基因的表达不仅与底物密切相关, 还会受到系统内其他微生物的影响^[32]。因此, 在这种复杂的微生物互作网络中, 不同区室细菌组成的差异化也会造成其对益生元寡糖代谢特征的差异化。

综上所述, 在体外发酵模型中, GOS 和 MOS 能够调控猪小肠黏膜微生物的组成及其代谢产物, 并且这种调控效果具有肠段特异性。

REFERENCES

- [1] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(6): 341-352

- [2] Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(5): 323-335
- [3] Estorninos E, Lawenko RB, Palestroque E, Sprenger N, Benyacoub J, Kortman GAM, Boekhorst J, Bettler J, Cercamondi CI, Berger B. Term infant formula supplemented with milk-derived oligosaccharides shifts the gut microbiota closer to that of human milk-fed infants and improves intestinal immune defense: a randomized controlled trial[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2021, 115(1): 142-153
- [4] 杭苏琴, 戴兆来, 朱伟云. 甘露寡糖对纯培养和共培养的乳酸杆菌体外生长的影响[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 51-56
Hang SQ, Dai ZL, Zhu WY. Effects of mannan-oligosaccharide on the growth of *Lactobacillus* pure culture and co-culture[J]. *Microbiology*, 2009, 36(1): 51-56 (in Chinese)
- [5] 杭苏琴, 毛胜勇, 黄瑞华, 苏勇, 朱伟云. 断奶仔猪饲喂甘露寡糖后粪样菌群的变化[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(5): 701-705
Hang SQ, Mao SY, Huang RH, Su Y, Zhu WY. Effect of mannan-oligosaccharide on bacterial community of piglet after weaning[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(5): 701-705 (in Chinese)
- [6] Friedman ES, Bittinger K, Esipova TV, Hou L, Chau L, Jiang J, Mesaros C, Lund PJ, Liang X, Fitzgerald GA, et al. Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(16): 4170-4175
- [7] Mu CL, Yang YX, Su Y, Zoetendal EG, Zhu WY. Differences in microbiota membership along the gastrointestinal tract of piglets and their differential alterations following an early-life antibiotic intervention[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 797
- [8] Zoetendal EG, Raes J, Van Den Bogert B, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, Bork P, Wels M, De Vos WM, Kleerebezem M. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(7): 1415-1426
- [9] Trijp MPH, Rösch C, An R, Keshtkar S, Logtenberg MJ, Hermes GDA, Zoetendal EG, Schols HA, Hooiveld GJEJ. Fermentation kinetics of selected dietary fibers by human small intestinal microbiota depend on the type of fiber and subject[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(20): 2000455
- [10] Tian SY, Wang J, Yu H, Wang J, Zhu WY. Changes in ileal microbial composition and microbial metabolism by an early-life galacto-oligosaccharides intervention in a neonatal porcine model[J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1753
- [11] Cecchini DA, Laville E, Laguerre S, Robe P, Leclerc M, Doré J, Henrissat B, Remaud-Siméon M, Monsan P, Potocki-Véronèse G. Functional metagenomics reveals novel pathways of prebiotic breakdown by human gut bacteria[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72766
- [12] Gao R, Tian SY, Wang J, Zhu WY. Galacto-oligosaccharides improve barrier function and relieve colonic inflammation via modulating mucosa-associated microbiota composition in lipopolysaccharides-challenged piglets[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 92
- [13] Dai ZL, Zhang J, Wu GY, Zhu WY. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine[J]. *Amino Acids*, 2010, 39(5): 1201-1215
- [14] Yang YX, Dai ZL, Zhu WY. Important impacts of intestinal bacteria on utilization of dietary amino acids in pigs[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(11): 2489-2501
- [15] Weatherburn MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971-974
- [16] Makkar HPS, Sharma OP, Dawra RK, Negi SS. Simple determination of microbial protein in rumen liquor[J]. *Journal of Dairy Science*, 1982, 65(11): 2170-2173
- [17] He XY, Sun WW, Ge T, Mu CL, Zhu WY. An increase in corn resistant starch decreases protein fermentation and modulates gut microbiota during *in vitro* cultivation of pig large intestinal inocula[J]. *Animal Nutrition*, 2017, 3(3): 219-224
- [18] Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854-3859
- [19] Zhang CJ, Yu M, Yang YX, Mu CL, Su Y, Zhu WY. Differential effect of early antibiotic intervention on bacterial fermentation patterns and mucosal gene expression in the colon of pigs under diets with different protein levels[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 2493-2505
- [20] Almeida A, Nayfach S, Boland M, Strozzi F, Beracochea M, Shi ZJ, Pollard KS, Sakharova E, Parks DH, Hugenholtz P, et al. A unified catalog of 204 938

- reference genomes from the human gut microbiome[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(1): 105-114
- [21] Wei XY, Fu XD, Xiao MS, Liu ZM, Zhang LW, Mou HJ. Dietary galactosyl and mannosyl carbohydrates: *in-vitro* assessment of prebiotic effects[J]. *Food Chemistry*, 2020, 329: 127179
- [22] Wu Z, Wang G, Wang WW, Pan DD, Peng LY, Lian LW. Proteomics analysis of the adhesion activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 upon growth in an intestine-like pH environment[J]. *Proteomics*, 2018, 18(5/6): 1700308
- [23] Martens EC, Lowe EC, Chiang H, Pudlo NA, Wu M, McNulty NP, Abbott DW, Henrissat B, Gilbert HJ, Bolam DN, et al. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts[J]. *PLoS Biology*, 2011, 9(12): e1001221
- [24] Van Bueren AL, Mulder M, Van Leeuwen S, Dijkhuizen L. Prebiotic galactooligosaccharides activate mucin and pectic galactan utilization pathways in the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40478
- [25] Cuskin F, Lowe EC, Temple MJ, Zhu YP, Cameron EA, Pudlo NA, Porter NT, Urs K, Thompson AJ, Cartmell A, et al. Human gut *Bacteroidetes* can utilize yeast mannan through a selfish mechanism[J]. *Nature*, 2015, 517(7533): 165-169
- [26] Cockburn DW, Koropatkin NM. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(16): 3230-3252
- [27] Rattanaprasert M, Van Pijkeren JP, Ramer-Tait AE, Quintero M, Kok CR, Walter J, Hutkins RW. Genes involved in galactooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus reuteri* and their ecological role in the gastrointestinal tract[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(22): e01788-e01719
- [28] Lindstad LJ, Lo G, Leivers S, Lu ZJ, Michalak L, Pereira GV, Røhr ÅK, Martens EC, Mckee LS, Louis P, et al. Human gut *Faecalibacterium prausnitzii* deploys a highly efficient conserved system to cross-feed on β -mannan-derived oligosaccharides[J]. *mBio*, 2021, 12(3): e0362820
- [29] Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(1): 29-41
- [30] Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham LD, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, et al. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1104-1109
- [31] Medina JM, Fernández-López R, Crespo J, Cruz F. Propionate fermentative genes of the gut microbiome decrease in inflammatory bowel disease[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(10): 2176
- [32] Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, Shah N, Wang CY, Magrini V, Wilson RK, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla[J]. *PNAS*, 2009, 106(14): 5859-5864