

唾液酸和 6'-唾液酸乳糖对仔猪肠道微生物体外发酵特性的影响

刘晓英, 李轩, 吴海琴, 许来鹏, 赵德辉, 马季祥, 慕春龙, 朱伟云, 潘龙*

南京农业大学 动物科技学院, 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, 动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京

刘晓英, 李轩, 吴海琴, 许来鹏, 赵德辉, 马季祥, 慕春龙, 朱伟云, 潘龙. 唾液酸和 6'-唾液酸乳糖对仔猪肠道微生物体外发酵特性的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4075-4087.

LIU Xiaoying, LI Xuan, WU Haiqin, XU Laipeng, ZHAO Dehui, MA Jixiang, MU Chunlong, ZHU Weiyun, PAN Long. Effects of sialic acid and 6'-sialyllactose on *in vitro* fermentation characteristics of gut microbiota in weaned piglets[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(9): 4075-4087.

摘要: 6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL)是猪母乳寡糖中的重要组分, 唾液酸(sialic acid, SIA)是唾液酸化乳寡糖的单体, 它们均可调控人的结肠微生物结构。目前关于 SIA 和 6'-SL 在体外对仔猪结肠微生物的组成和发酵特性的影响鲜有报道。【目的】探究 SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物组成及发酵特性的影响, 为 SIA 和 6'-SL 调控哺乳仔猪肠道健康提供参考。【方法】以 3 只哺乳仔猪的结肠混合食糜为微生物接种物, 探究 SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物组成及发酵特性的影响。试验分为 4 组: 无碳源(no carbon, NCB)、乳糖(lactose, LAC)、SIA 和 6'-SL, 各组均为 4 个重复。【结果】发酵至 24 h 时, 6'-SL 组的 pH 显著高于 LAC 组($P < 0.05$); 发酵至 12 h 和 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的产气量均显著低于 LAC 组($P < 0.05$); 发酵至 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的乙酸含量均显著高于 LAC 组($P < 0.05$), 丙酸和丁酸含量均显著低于 LAC 组($P < 0.05$), 显著提高了 Chao1 指数和 ACE 指数($P < 0.05$); LAC 组、SIA 组和 6'-SL 组菌群的 β 多样性发生显著改变($P < 0.05$); 随着发酵时间延长, 与 LAC 组相比, SIA 组显著提高了芽孢杆菌门(*Bacillota*)、厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)和普氏栖粪杆菌属(*Faecalibacterium*)的相对丰度, 降低了假单胞菌门(*Pseudomonadota*)、埃希氏菌-志贺氏菌(*Escherichia-Shigella*)、光冈菌属(*Mitsuokella*)和链球菌属(*Streptococcus*)的相对丰度($P < 0.05$); 6'-SL 组显著提高了拟杆菌门(*Bacteroidetes*)普雷沃氏菌属 *Prevotella*、拟杆菌属 *Bacteroides* 和罗氏菌属 *Roseburia*, 降低了假单胞菌门、芽孢杆菌门、巨单胞菌属(*Megamonas*)、埃希氏菌-志贺氏菌、光冈菌属和普雷沃氏菌科 *NK3B31* 组(*Prevotellaceae_NK3B31_group*)的相对丰度($P < 0.05$)。

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1300403); 国家自然科学基金(31902166)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300403) and the National Natural Science Foundation of China (31902166).

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

Received: 2025-02-27; Accepted: 2025-03-28; Published online: 2025-06-05

【结论】 6'-SL 和 SIA 均可有效调控仔猪肠道菌群结构, 6'-SL 能提高拟杆菌门以及普雷沃氏菌属和拟杆菌属的相对丰度, 而 SIA 能提高芽孢杆菌门以及厌氧弧菌属的相对丰度, 且 2 种底物都明显促进仔猪结肠微生物发酵, 提高短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)产量, 尤其是乙酸。

关键词: 唾液酸; 6'-唾液酸乳糖; 体外发酵; 肠道微生物

Effects of sialic acid and 6'-sialyllactose on *in vitro* fermentation characteristics of gut microbiota in weaned piglets

LIU Xiaoying, LI Xuan, WU Haiqin, XU Laipeng, ZHAO Dehui, MA Jixiang, MU Chunlong, ZHU Weiyun, PAN Long*

Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China

Abstract: 6'-sialyllactose (6'-SL) is an important component of porcine breast milk oligosaccharides, and sialic acid (SIA) is the monomer of sialylated breast milk oligosaccharides. Both can regulate the structure of human colonic microbiota. However, there are few reports regarding the effects of SIA and 6'-SL on the composition and fermentation characteristics of piglet colonic microbiota *in vitro*. **【Objective】** To investigate the effects of SIA and 6'-SL on the composition and fermentation characteristics of colonic microbiota in suckling piglets, aiming to provide a reference for using these substances to regulate gut health in piglets. **【Methods】** We used mixed colonic chyme from three suckling piglets as the microbial inoculum. The experiment was conducted with four groups: no carbon (NCB), lactose (LAC), SIA, and 6'-SL, each with four replicates. **【Results】** After 24 h of fermentation, the pH in the 6'-SL group was higher than that in the LAC group ($P<0.05$). After fermentation for 12 h and 24 h, the gas production in the SIA and 6'-SL groups was lower than that in the LAC group ($P<0.05$). At the time point of 24 h, the SIA and 6'-SL groups had higher acetic acid content and lower propionic acid and butyric acid content than the LAC group ($P<0.05$). Moreover, the SIA and 6'-SL groups had higher Chao1 and ACE indices than the LAC group ($P<0.05$). Beta diversity of the microbial community in the LAC, SIA, and 6'-SL groups changed ($P<0.05$). As fermentation progressed, compared with LAC, SIA increased the relative abundance of *Bacillota*, *Anaerovibrio*, and *Faecalibacterium* and decreased that of *Pseudomonadota*, *Escherichia-Shigella*, *Mitsuokella*, and *Streptococcus* ($P<0.05$); 6'-SL increased the relative abundance of *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Bacteroides*, and *Roseburia* and decreased that of *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Megamonas*, *Escherichia-Shigella*, *Mitsuokella*, and *Prevotellaceae_NK3B31_group* ($P<0.05$). **【Conclusion】** Both 6'-SL and SIA can effectively regulate the gut microbiota structure in piglets. Specifically, 6'-SL increases the relative abundance of *Bacteroidetes*, *Prevotella*, and *Bacteroides*, while SIA increases that of *Bacillota* and *Anaerovibrio*. Both substances promote colonic microbial fermentation in piglets to increase the

production of short-chain fatty acids (SCFAs), especially acetic acid.

Keywords: sialic acid; 6'-sialyllactose; *in vitro* fermentation; gut microbiota

猪乳中含有仔猪生长发育所必需的多种有效成分, 包括碳水化合物、蛋白质、脂质、免疫细胞和生物活性因子等^[1-2]。猪乳寡糖是母乳中第三大固体成分, 一般由 3-10 个单糖通过糖苷键连接而成, 组成母乳寡糖的单糖主要有 D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、L-岩藻糖和唾液酸等^[3-4]。近年来, 母乳寡糖作为益生元的作用备受关注, 研究表明猪母乳寡糖可调控仔猪肠道微生物组成、增强黏膜免疫系统以及维护肠道上皮屏障功能^[5]。

唾液酸(sialic acid, SIA)是一种包含 N-乙酰神经氨酸(N-Acetylneuraminic acid, NeuAc)在内的九碳酸性单糖的总称, 具有多种生物学功能, 如神经传递、抗病毒活性、促进肠道健康和营养吸收以及加速大脑的认知发展^[6-7]。6'-唾液酸乳糖(6'-sialyllactose, 6'-SL)是母乳寡糖的重要组分, 约占母乳寡糖的 5%, 由 NeuAc 通过 α -(2,6)糖苷键连接到乳糖上^[8-9]。SIA 和 6'-SL 作为益生元调节肠道微生物群的作用备受关注。在小鼠研究中口服 SIA 改变了结肠微生物组成, 增加了拟杆菌门和芽孢杆菌门的丰度等^[10]。使用仿生胃肠道反应器研究 SIA 对健康人体肠道微生物群落组成和代谢物的影响中发现, SIA 改变了结肠肠道菌群和代谢物组成^[11]。此外, 在小鼠的饮食中加入益生元 6'-SL 会影响应激源诱导的结肠微生物群落组成的变化并维持正常的微生物群落结构^[12]。在婴儿的体外结肠模型中发现, 6'-SL 促进了婴儿粪便中双歧杆菌的生成^[13]。在配方奶粉中补充 6'-SL 可以调节新生仔猪的结肠微生物群^[14]。这些结果说明 SIA 和 6'-SL 可以抵抗消化并到达结肠供肠道微生物群使用, 进而调节肠道微生物的组成结构。然而, 目前关于 SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物及其代谢的影响还鲜有报道。

本研究以乳糖(lactose, LAC)作为对照, 采用体外发酵的方法探究 SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物组成及发酵参数的影响, 以期以 SIA 和 6'-SL 调控哺乳仔猪肠道健康提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

乳糖, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 唾液酸, 上海源叶生物科技有限公司; 6'-唾液酸乳糖, 上海毕得医药科技有限公司; 乳酸测试盒, 南京建成生物工程研究所。

气相色谱仪, 岛津公司。

1.2 培养基

以 10 g/L 的 LAC、SIA 或 6'-SL 为唯一碳源, 浓度参考叶艳新^[15]、Kato 等^[16]和 Lou 等^[17]。基础培养基的配方参考 Williams 等^[18]和叶艳新^[15], 同时参考 Li 等^[19]去掉了配方中的脂肪酸溶液。具体操作步骤如下: (1) 将配制好的培养基在微波炉中加热至沸腾(多次沸腾), 通入 CO₂ 至常温; (2) 分装前加入 1 g 半胱氨酸盐酸盐, 并用 0.2 mol/L HCl 和 0.2 mol/L NaOH 溶液调整 pH 值至 6.8 左右; (3) 按培养基和菌液 9:1 的比例将 5.4 mL 的基础培养基分装至血清瓶中, 盖好橡胶塞并打好铝盖; (4) 120 °C 灭菌 15 min; (5) 灭菌完成后将培养基放置于常温, 然后用注射器向每瓶血清瓶中注射 0.06 mL 维他命磷酸盐溶液(过夜)。

1.3 接种物制备

将 3 只哺乳仔猪屠宰后, 将肠道食糜置于厌氧自封袋中, 放在冰上, 快速运回实验室。收集 3 只哺乳仔猪结肠内容物并充分混匀, 用无菌的 PBS 以 9:1 的比例稀释。然后参照叶艳新^[15]的方法, 经四层无菌纱布过滤制备接种物。用注射器吸取 0.6 mL 接种物, 注入用 37 °C 摇床

提前预热的装有培养基的血清瓶中, 全程通入 CO₂ 以保持厌氧环境。接种完成后, 使用注射器和气压转换器将血清瓶内气压调整至 0, 然后将样品置于 37 °C 恒温振荡器中发酵。本研究所有动物实验获得南京农业大学机构动物护理和使用委员会批准, 编号为 NJAU.No20240401N06。

1.4 试验设计

在厌氧培养基中分别添加 10 g/L 的 LAC、SIA 和 6'-SL 作为唯一碳源, 然后分别接种上述制备的结肠食糜接种物, 每组 4 个重复。试验共有 4 个处理组: 无碳源 (no carbon, NCB)、LAC、SIA 和 6'-SL 组。接种后将发酵瓶在 37 °C、100 r/min 培养 24 h。

1.5 样品采集

样品发酵至 0、6、12 和 24 h 时, 将需要采样的瓶子取出放置于冰盒上, 用注射器及气压转换器测定产气量。随后将样品摇匀, 每个时间点的发酵瓶均取 3 mL 发酵液, 用于短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs)、乳酸的检测以及发酵液 DNA 的提取; 剩余样品用于测 pH 值, 并装于 15 mL 无酶离心管中备用。采集完毕后将发酵液置于 -20 °C 冰箱保存。

1.6 发酵指标测定

1.6.1 SCFAs 测定

参照 Zhang 等^[20]的方法, 使用气相色谱仪测定和计算 SCFAs 浓度。详细步骤如下: 取 1 mL 发酵液样品, 加入 200 μL 25% 的偏磷酸/巴豆酸混匀, 于 -20 °C 冰箱过夜。测定前室温解冻, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤。用 1 μL 微量进样器取 0.6 μL 过滤液上机 (气相色谱仪 SPL1、色谱柱和 FID1 温度分别设置为 210、140 和 210 °C; 测定完成后将 SPL1、色谱柱和 FID1 温度均设置为 50 °C 进行降温) 进行测定。

1.6.2 16S rRNA 基因高通量测序

发酵液细菌总 DNA 提取采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒进行提取。使用上游引物 341F

(5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和下游引物 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区。PCR 反应由上海凌恩生物科技有限公司完成。扩增纯化结束后, 在 PE250 平台进行测序。得到原始数据后进行筛选和质量控制, 以获得高质量的功能分类单元。原始数据已上传至 NCBI (登录号: PRJNA1229144)。

1.7 数据统计与分析

差异菌属和短链脂肪酸数据的相关性分析在生科云平台完成 (www.bioincloud.tech)。其余数据经 Excel 计算整理后, 使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。同一时间点内不同处理采用单因素方差分析, 邓肯法进行多重比较, 使用 GraphPad Prism 9 进行绘图。P < 0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 SIA 和 6'-SL 在仔猪结肠微生物体外发酵下的 pH 及产气量的差异

发酵液 pH 用于指示发酵环境中的产酸情况。在哺乳仔猪结肠微生物发酵过程中, NCB、LAC、SIA 和 6'-SL 组的 pH 值在 6 h 时无显著差异; 发酵至 12 h 时, SIA 和 6'-SL 组的 pH 值无显著差异, 均显著高于 LAC 组 (P < 0.05); 发酵至 24 h 时, 6'-SL 组的 pH 值显著高于 LAC 组且显著低于 NCB 组 (P < 0.05), 而 6'-SL 与 SIA 组无显著差异 (图 1A)。产气是体外发酵过程的主要特征之一。发酵至 12 h 和 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的产气量无显著差异, 均显著高于 NCB 组且显著低于 LAC 组 (P < 0.05) (图 1B)。

2.2 SIA 和 6'-SL 在仔猪结肠微生物体外发酵下的产酸差异

发酵至 12 h 时, SIA 和 LAC 组的乙酸含量无显著差异, 均显著低于 6'-SL 组且显著高于 NCB 组 (P < 0.05), 发酵至 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的乙酸含量无显著差异, 均显著高于 LAC 和

NCB 组 ($P<0.05$) (图 2A)。发酵至 12 h 时, SIA 和 NCB 组的丙酸含量无显著差异, 均显著低于 LAC 和 6'-SL 组 ($P<0.05$); 发酵至 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的丙酸和丁酸含量无显著差异,

均显著低于 LAC 组且高于 NCB 组 ($P<0.05$) (图 2B、2C)。发酵至 12 h 时, SIA 组的总短链脂肪酸含量显著低于 LAC 组和 6'-SL 组且显著高于 NCB 组 ($P<0.05$), LAC 和 6'-SL 组的总短

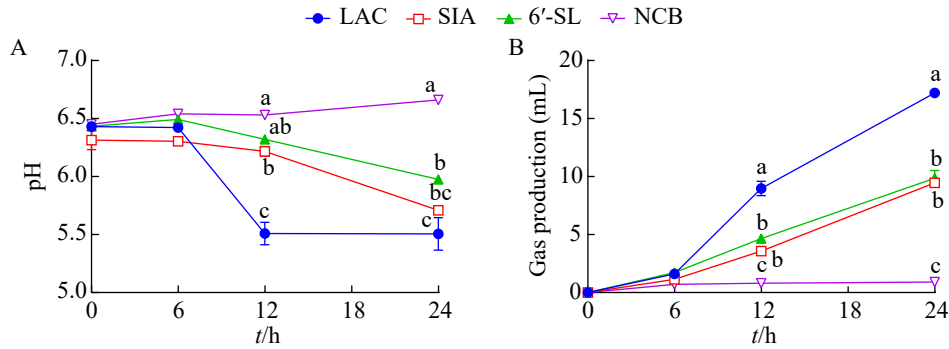


图1 结肠微生物发酵液中不同时间点pH和产气量的变化。A: pH; B: 产气量。所有数值均为平均值±SEM, 进行单因素方差分析, 邓肯检验的多重比较。标识不同字母的表示组间差异显著($P<0.05$), 下同。

Figure 1 Changes in pH and gas production at different time points in colonic microbial fermentation broth. A: pH; B: Gas production. All values are presented as mean±SEM, and one-way ANOVA followed by Duncan's test for multiple comparisons was performed. Letters indicate significant differences among groups ($P<0.05$), the same below.

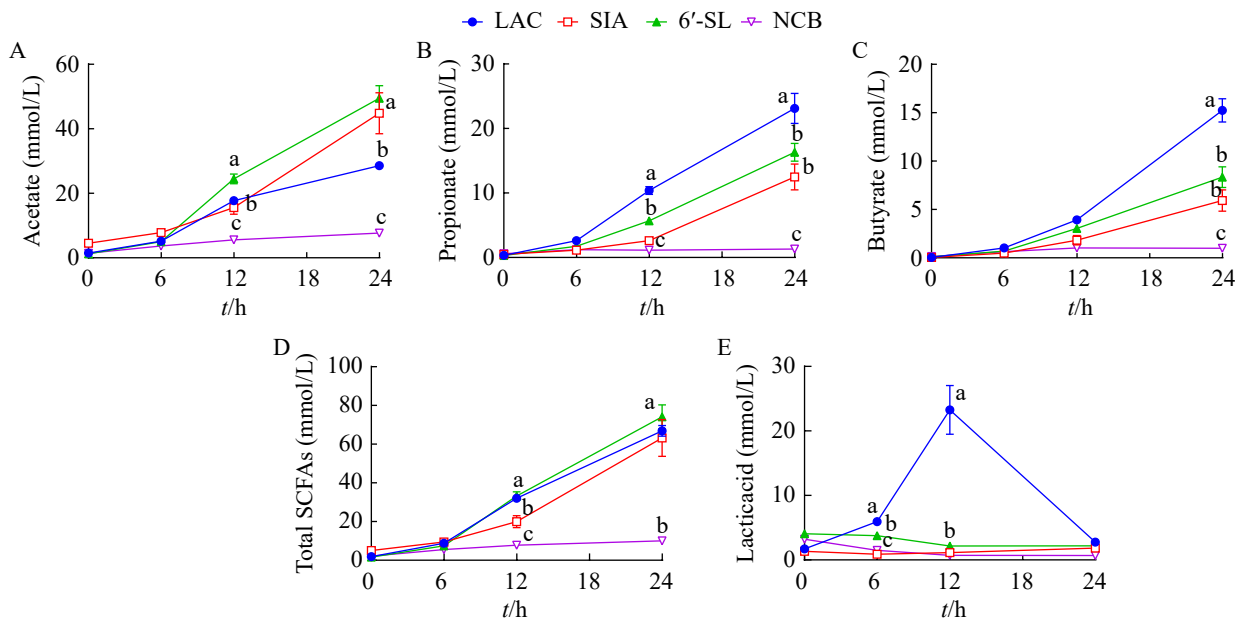


图2 不同时间点结肠微生物发酵液SCFAs和乳酸的变化。A: 乙酸; B: 丙酸; C: 丁酸; D: 总短链脂肪酸; E: 乳酸。

Figure 2 Changes in SCFAs and lactic acid in colonic microbial fermentation broth at different time points. A: Acetate; B: Propionate; C: Butyrate; D: Total SCFAs; E: Lactic acid.

链脂肪酸含量无显著差异；发酵至 24 h 时，LAC、SIA 和 6'-SL 组的总短链脂肪酸含量无显著差异，均显著高于 NCB 组 ($P < 0.05$) (图 2D)。发酵至 6 h 时，6'-SL 组的乳酸含量显著低于 LAC 组且显著高于 SIA 和 NCB 组，发酵至 12 h 时，LAC 组的乳酸含量显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$)；发酵至 24 h 时，4 组的乳酸含量无显著差异(图 2E)。

2.3 SIA 和 6'-SL 对发酵液微生物结构和组成的差异影响

2.3.1 SIA 和 6'-SL 对发酵液菌群 α 多样性的差异影响

发酵液中菌群 Chao1、ACE、Shannon 和

Simpson 指数随发酵时间发生的变化如图 3 所示。样品发酵至 6 h 时，与 LAC 和 SIA 组相比，6'-SL 组显著提高了 Shannon 指数 ($P < 0.05$)；样品发酵至 24 h 时，与 LAC 组相比，SIA 组和 6'-SL 组显著提高了 Chao1 指数和 ACE 指数 ($P < 0.05$)，且 SIA 组的 Chao1 指数和 ACE 指数均显著低于 6'-SL 组 ($P < 0.05$)；其他时间点各组之间的菌群 α 多样性均无显著差异。这些结果说明 SIA 和 6'-SL 改变了结肠微生物的结构。

2.3.2 SIA 和 6'-SL 对发酵液菌群 β 多样性的差异影响

SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物发酵的 β 多样性分析结果如图 4 所示。随着发酵时间的

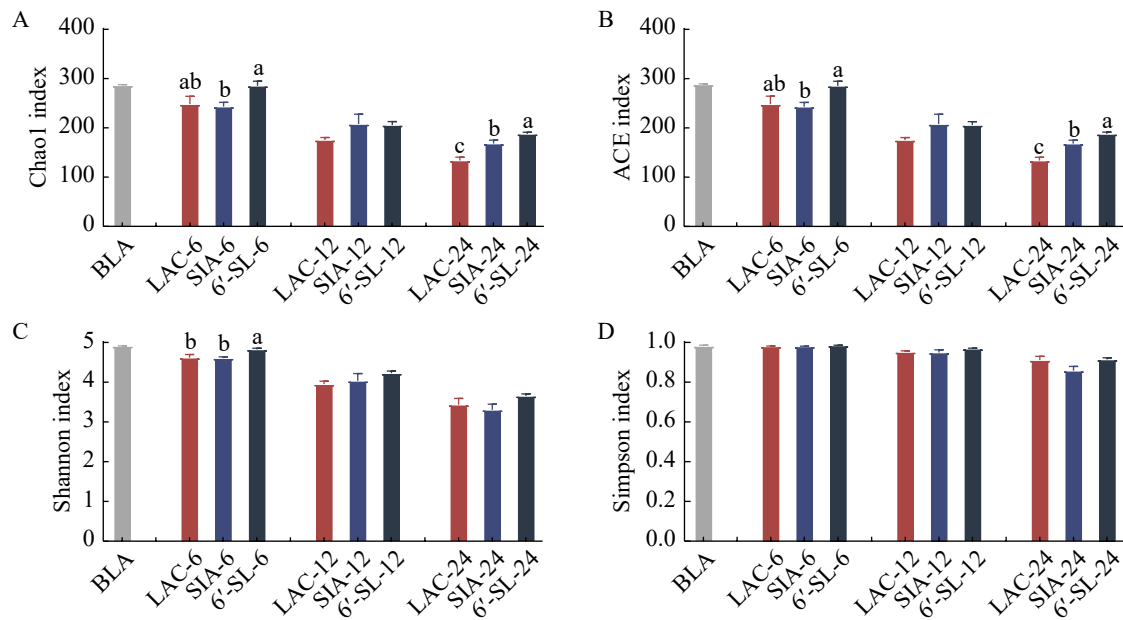


图3 不同发酵时间点SIA和6'-SL组结肠微生物 α 多样性。A: Chao1指数；B: ACE指数；C: Shannon指数；D: Simpson指数。BLA组代表NCB组0、6、12和24 h、LAC组0 h、SIA组0 h及6'-SL组0 h；LAC-6、LAC-12、LAC-24分别代表LAC组6、12和24 h；SIA-6、SIA-12、SIA-24分别代表SIA组6、12和24 h；6'-SL-6、6'-SL-12、6'-SL-24分别代表6'-SL组6、12和24 h，下同。

Figure 3 Alpha diversity of colonic microbiota in SIA and 6'-SL groups at different fermentation time points. A: Chao1 index; B: ACE index; C: Shannon index; D: Simpson index. BLA group represented 0, 6, 12, and 24 h in the NCB group, 0 h in the LAC group, 0 h in the SIA group, and 0 h in the 6'-SL group; LAC-6, LAC-12, LAC-24 represent LAC group at 6 h, 12 h, and 24 h, respectively; SIA-6, SIA-12, SIA-24 represent the SIA group at 6 h, 12 h, and 24 h, respectively; 6'-SL-6, 6'-SL-12, 6'-SL-24 represent the 6'-SL group at 6 h, 12 h, and 24 h, respectively. The same below.

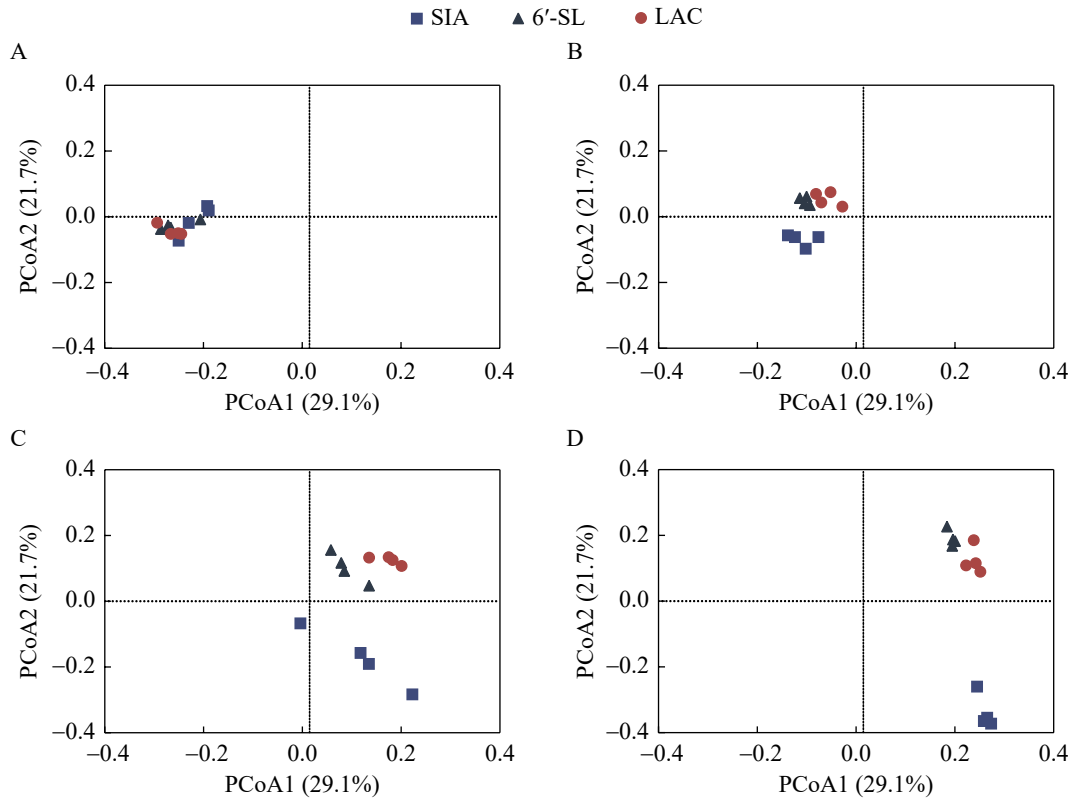


图4 SIA和6'-SL对结肠微生物β多样性的影响。A: 0 h菌群β多样性; B: 6 h菌群β多样性; C: 12 h菌群β多样性; D: 24 h菌群β多样性。

Figure 4 Effects of SIA and 6'-SL on beta diversity of colonic microbiota. A: Beta diversity of microbiota at 0 h; B: Beta diversity of microbiota at 6 h; C: Beta diversity of microbiota at 12 h; D: Beta diversity of microbiota at 24 h.

延长, LAC、SIA 和 6'-SL 组菌群的 β 多样性发生了显著改变, 且 SIA 组的菌群组成与其他两组差异明显($P < 0.05$)。

2.3.3 SIA 和 6'-SL 对发酵液菌群门水平相对丰度的差异影响

发酵 0、6、12 和 24 h 时各组的菌群门水平相对丰度如图 5 所示。在门水平上, 结肠食糜发酵液微生物主要由芽孢杆菌门(*Bacillota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、梭杆菌门(*Fusobacteriota*)、假单胞菌门(*Pseudomonadota*)和脱硫弧菌门(*Desulfobacterota*)组成。在 0 h 时, 各组的最优势菌门均为芽孢杆菌门, 其次为拟杆菌门。在 6、12 和 24 h 时, LAC 和 SIA 组的最优势菌门均为芽孢杆菌门, 其次为拟杆菌门。在 6 h 和

12 h, 6'-SL 组的最优势菌门为芽孢杆菌门, 其次为拟杆菌门, 而在 24 h 时, 6'-SL 组的最优势菌门为拟杆菌门, 其次为芽孢杆菌门。随着发酵时间的延长, 与 LAC 相比 SIA 组显著提高了芽孢杆菌门的相对丰度($P < 0.05$), 而 6'-SL 组在发酵 24 h 时显著降低了芽孢杆菌门的相对丰度($P < 0.05$)。此外, 与 LAC 相比, 6'-SL 组显著提高了拟杆菌门的相对丰度($P < 0.05$), SIA 组和 6'-SL 组均显著降低了假单胞菌门的相对丰度($P < 0.05$), 各组脱硫弧菌门的相对丰度均在不断减少。

2.3.4 SIA 和 6'-SL 对发酵液菌群属水平相对丰度的差异影响

如图 6 所示, 在 0 h 各组的最优势菌属均为普雷沃氏菌属(*Prevotella*)。随着发酵时间的延

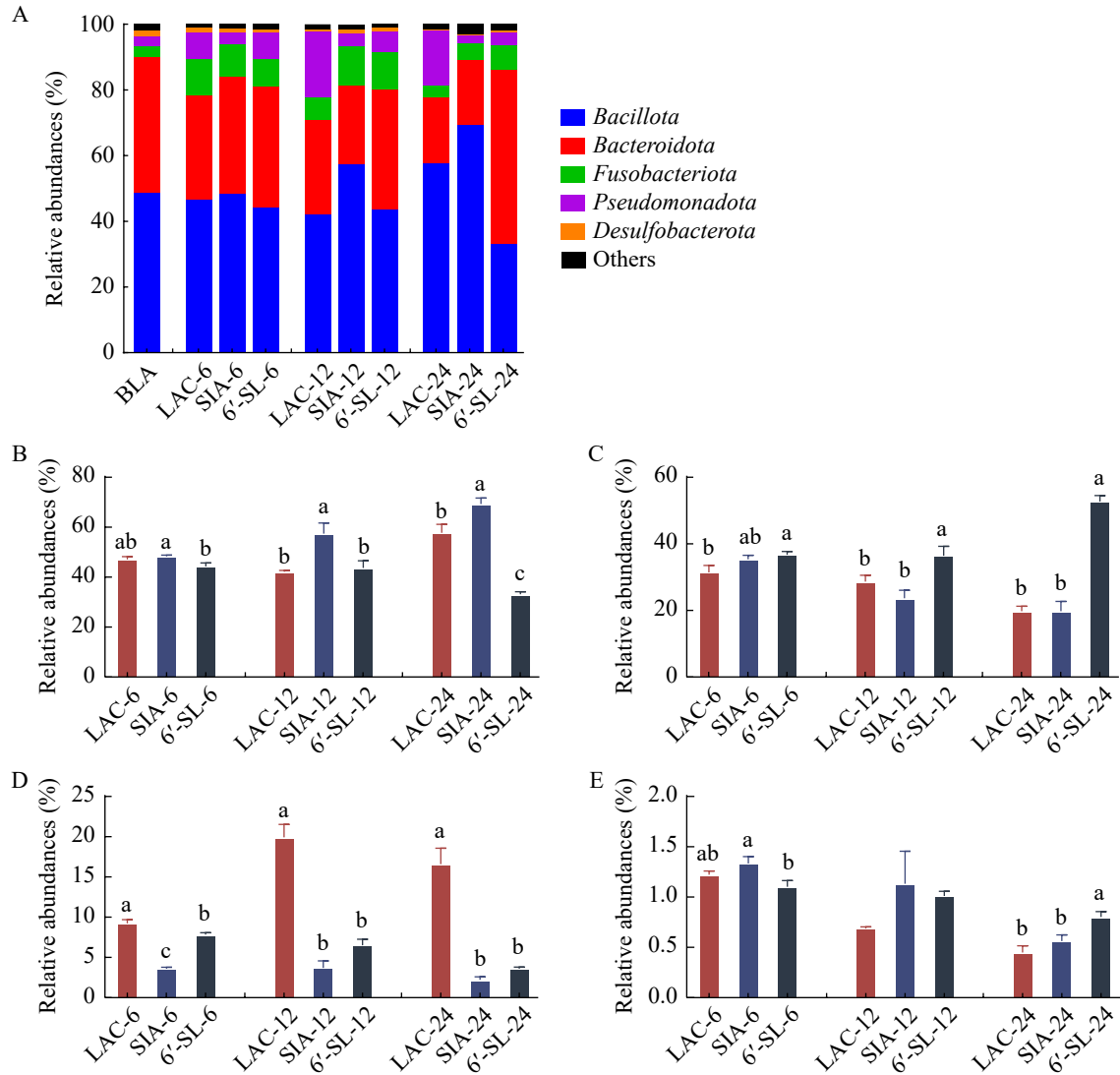


图5 不同发酵时间点SIA和6'-SL组微生物门水平相对丰度的差异。A: 不同发酵时间点结肠食糜发酵液中的top 5优势门; B: *Bacillota*的相对丰度; C: *Bacteroidota*的相对丰度; D: *Pseudomonadota*的相对丰度; E: *Desulfobacterota*的相对丰度。

Figure 5 Differences in relative abundance at the phylum level between SIA and 6'-SL groups at different fermentation time points. A: Top 5 dominant phyla in colonic chyme fermentation broth at different fermentation time points; B: Relative abundance of *Bacillota*; C: Relative abundance of *Bacteroidota*; D: Relative abundance of *Pseudomonadota*; E: Relative abundance of *Desulfobacterota*.

长, 与LAC相比, SIA组显著增加了厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)、普氏栖粪杆菌属(*Faecalibacterium*)和拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)的相对丰度, 降低了巨球型菌属(*Megasphaera*)、琥珀酸弧菌属(*Succinivibrio*)、埃希氏菌-志贺氏菌

(*Escherichia-Shigella*)、光冈菌属(*Mitsuokella*)和链球菌属(*Streptococcus*)的相对丰度($P < 0.05$); 6'-SL组显著增加了普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌属(*Prevotella_9*)、罗氏菌属(*Roseburia*)、考拉杆菌

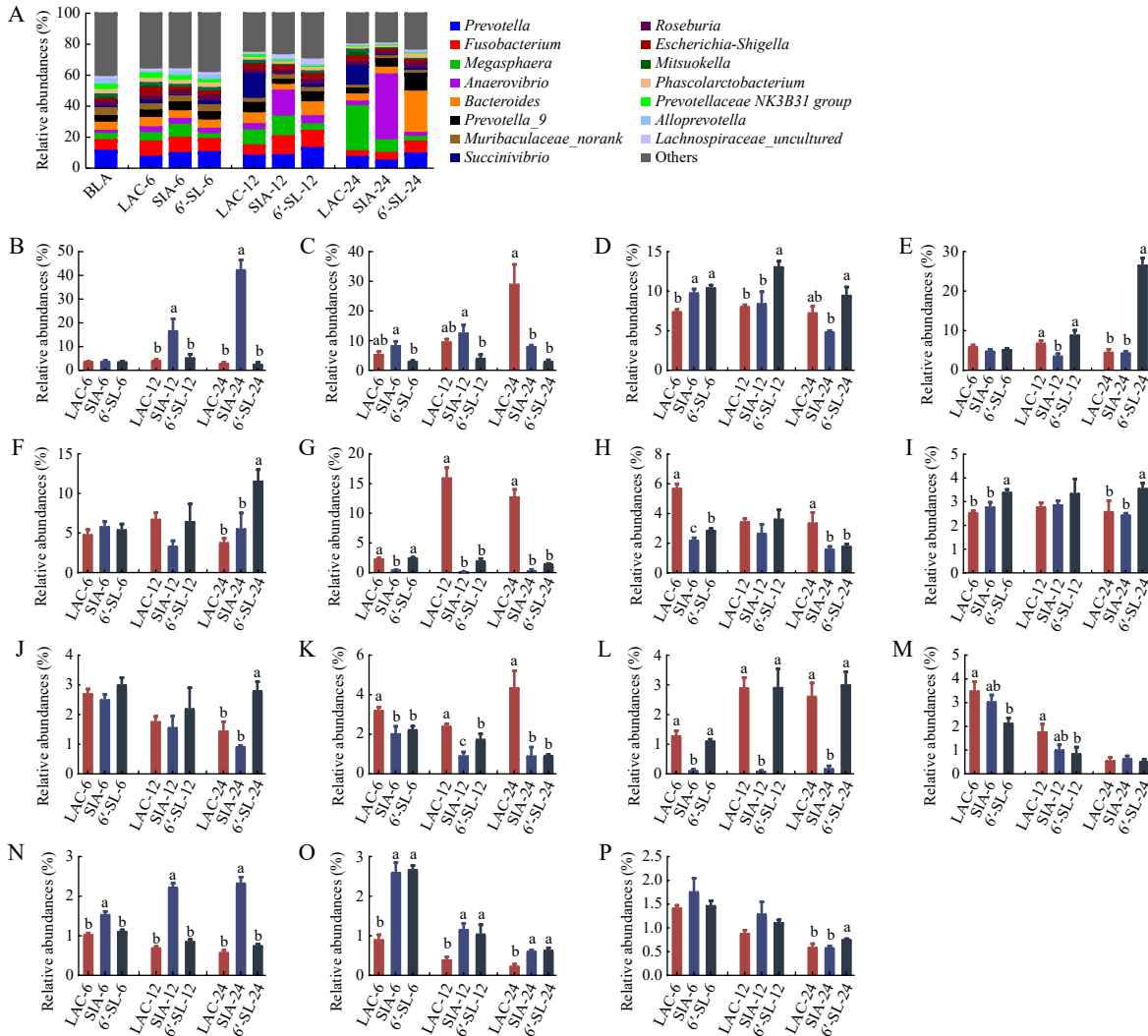


图6 不同发酵时间点SIA和6'-SL组微生物属水平相对丰度的差异。A: 不同发酵时间点结肠食糜发酵液中的top 15优势属; B: *Anaerovibrio*的相对丰度; C: *Megasphaera*的相对丰度; D: *Prevotella*的相对丰度; E: *Bacteroides*的相对丰度; F: *Prevotella_9*的相对丰度; G: *Succinivibrio*的相对丰度; H: *Escherichia-Shigella*的相对丰度; I: *Roseburia*的相对丰度; J: *Phascolarctobacterium*的相对丰度; K: *Mitsuokella*的相对丰度; L: *Streptococcus*的相对丰度; M: *Prevotellaceae NK3B31 group*的相对丰度; N: *Faecalibacterium*的相对丰度; O: *Alloprevotella*的相对丰度; P: *UCG-005*的相对丰度。任意一组的相对丰度大于1%。

Figure 6 Differences in relative abundance at the genus level between SIA and 6'-SL groups at different fermentation time points. A: Top 15 dominant genera in colonic chyme fermentation broth at different fermentation time points; B: Relative abundance of *Anaerovibrio*; C: Relative abundance of *Megasphaera*; D: Relative abundance of *Prevotella*; E: Relative abundance of *Bacteroides*; F: Relative abundance of *Prevotella_9*; G: Relative abundance of *Succinivibrio*; H: Relative abundance of *Escherichia-Shigella*; I: Relative abundance of *Roseburia*; J: Relative abundance of *Phascolarctobacterium*; K: Relative abundance of *Mitsuokella*; L: Relative abundance of *Streptococcus*; M: Relative abundance of *Prevotellaceae NK3B31 group*; N: Relative abundance of *Faecalibacterium*; O: Relative abundance of *Alloprevotella*; P: Relative abundance of *UCG-005*. The relative abundance of any one group is greater than 1%.

属 (*Phascolarctobacterium*) 和 *UGG-005* 的相对丰度, 降低了巨单胞菌属 (*Megasphaera*)、埃希氏菌-志贺氏菌 (*Escherichia-Shigella*)、光冈菌属 (*Mitsuokella*)、普雷沃氏菌科 *NK3B31* 组 (*Prevotellaceae NK3B31 group*) 的相对丰度 ($P < 0.05$)。

2.4 发酵液差异菌属和 SCFAs 含量的相关性分析

如图 7 所示, 链球菌属与丙酸和丁酸含量呈现显著正相关 ($P < 0.05$), 普雷沃氏菌科 *NK3B31* 组、*UGG-005*、拟普雷沃氏菌属和考拉杆菌属与乙酸、丙酸和丁酸含量呈现显著负相关 ($P < 0.05$), 普氏栖粪杆菌属和普雷沃氏菌属与丙酸和丁酸含量呈现显著负相关 ($P < 0.05$), 埃希氏菌-志贺氏菌和光冈菌属与乙酸含量呈现显著负相关 ($P < 0.05$)。

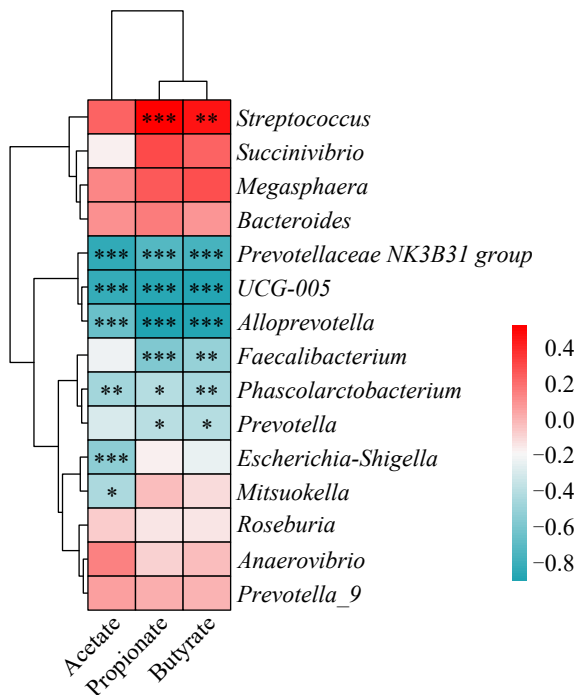


图7 发酵液差异菌属和SCFAs的相关性分析

Figure 7 Correlation analysis of differential bacterial genera and SCFAs in fermentation broth. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论

6'-SL 作为猪乳寡糖中的重要组分, 可促进仔猪结肠有益菌的定植, 改善肠道健康^[14]。然而, 目前尚不清楚 6'-SL 及其重要组成成分 SIA 如何影响仔猪肠道微生物的组成和结构以及代谢功能。本研究使用体外发酵模型, 以 LAC 作为对照, 探究 SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠中微生物群落和代谢物的影响, 为猪乳寡糖调控仔猪肠道健康提供理论依据。

产气量是评价细菌发酵底物效率的指标之一。本研究发现, NCB 组的气体 and SCFAs 含量未明显增加, 而其他各组的气体 and 总短链脂肪酸含量随着发酵时间的进行明显增加, 表明纤维或碳水化合物是驱动发酵的主要底物, 碳源类型的差异可能是影响发酵特性的主要因素^[21]。随着发酵时间的延长, SIA 和 6'-SL 组的产气量无显著差异, 均显著低于 LAC 组, 表明由于几种碳源的化学成分和结构不同, SIA 和 6'-SL 不易被细菌利用。

SCFAs 和乳酸是肠道菌群的重要代谢产物, 在维持肠道稳态、免疫调节和能量供应方面发挥着不可替代的作用^[11]。本研究中随着发酵时间的延长, LAC、SIA 和 6'-SL 组的总短链脂肪酸含量明显增加, 而 pH 明显降低。研究表明后肠发酵过程中的总短链脂肪酸含量与产气量呈正相关, 而与 pH 呈负相关^[22], 这与本研究相一致。此外, 研究表明 SIA 体外发酵成人粪便以及 6'-SL 体外发酵婴儿粪便的主要有机酸代谢产物是乙酸, 其次是丙酸和丁酸^[11,23]。本研究发现, 发酵至 24 h 时 LAC、SIA 和 6'-SL 组的主要有机酸代谢产物是乙酸, 其次是丙酸和丁酸, 这与其他研究相一致, 表明哺乳仔猪结肠微生物的乙酸代谢途径非常活跃。据报道, 乙酸和丁酸是通过醛单糖(如葡萄糖、半乳糖和甘露糖)的发酵产生的, 而丙酸主要是通过酮单糖(如果糖和阿拉伯糖)的发酵产生的^[24]。发酵至 24 h 时, SIA 和 6'-SL 组的乙酸含量显著高于 LAC

组, 而丙酸和丁酸含量显著低于 LAC 组, 这可归因于 LAC、SIA 和 6'-SL 的单糖成分组成不同。本研究发现 SIA 和 6'-SL 组的乳酸含量在整个发酵期间都比较低。乳酸作为中间体, 可不断被微生物转化为丙酸和丁酸。因此 SIA 和 6'-SL 组丙酸和丁酸的产生可分别归因于乳酸生成细菌和乳酸利用细菌之间交叉摄食的乳酸转化^[25]。这些结果表明, SIA 和 6'-SL 可以像其他益生元一样改善肠道健康。

本研究发现 SIA 和 6'-SL 改变了发酵液的菌群组成和结构。本研究中, 与 LAC 相比 SIA 组显著提高了芽孢杆菌门以及降低了假单胞菌门的相对丰度, 这可能与普氏栖粪杆菌属的显著增加和埃希氏菌-志贺氏菌的显著降低有关。普氏栖粪杆菌属是肠道中的共生菌, 作为益生菌发挥作用^[26]。埃希氏菌-志贺氏菌属是条件致病菌, 被认为是诱发仔猪腹泻的主要因素之一^[27]。这说明 SIA 可能具有促进肠道中有益菌的增殖以及抑制有害细菌繁殖的潜力。此外, 研究表明 SIA 可以显著提高芽孢杆菌门以及降低假单胞菌门的丰度^[28], 这与本研究结果相一致。厌氧弧菌属是肠道中常见的有益细菌, 它可以发酵多糖并产生 SCFAs, 是在肠道中产生乙酸和丙酸的细菌的重要成员^[29]。本研究发现 SIA 组显著增加了厌氧弧菌属的相对丰度, 这提示厌氧弧菌属具有代谢 SIA 产生乙酸和丙酸的潜力, 但是具体代谢机制还有待研究。链球菌能够发酵碳水化合物, 以乳酸作为主要的末端代谢产物^[30]。本研究发现 SIA 显著降低了链球菌属的相对丰度, 推测 SIA 组中乳酸含量较低可能是与链球菌属的减少有关。此外, 研究表明 SIA 抑制链球菌属的生长并促进猪肠道中有益细菌的生长, 这与本研究相一致^[31]。6'-SL 组显著提高了拟杆菌门但降低了芽孢杆菌门的相对丰度, 这可能取决于普雷沃氏菌属和拟杆菌属的增加以及巨单胞菌属和光冈菌属的降低。普雷沃氏菌属和拟杆菌属是肠道中主要的复合多糖降解剂, 可释放各种碳水

化合物活性酶来降解 6'-SL, 这些细菌也被认为是肠道中丙酸主要的生产者^[32]。这提示普雷沃氏菌属和拟杆菌属具有代谢 6'-SL 产生丙酸的潜力。有研究发现在配方奶粉中补充 6'-SL 能增加仔猪结肠中普雷沃氏菌属和拟杆菌属的丰度, 从而改善肠道健康^[14], 这与本研究结果相一致。巨单胞菌属可以发酵各种碳水化合物产生乳酸^[33]。这说明 6'-SL 组中乳酸含量较低可能与该细菌的减少有关。本研究发现光冈菌属与乙酸含量呈显著负相关, 说明 SIA 和 6'-SL 组中乙酸的产生可能与该菌属的减少有关。罗氏菌属是丁酸的主要生产者^[34]。本研究中 6'-SL 组显著增加了罗氏菌属的相对丰度, 提示罗氏菌属具有代谢 6'-SL 产生丁酸的潜力。6'-SL 组可以显著降低埃希氏菌-志贺氏菌的相对丰度, 且埃希氏菌-志贺氏菌属与乙酸含量呈显著负相关, 这说明 6'-SL 可能抑制肠道中潜在致病菌的定殖以及乙酸的产生可能与该菌属的减少有关。总之, SIA 和 6'-SL 可以通过不同方式调节肠道菌群的群落组成, 抑制有害病原体的生长, 促进不同种类益生菌的增殖, 改善肠道健康。

综上所述, 在体外发酵模型中, SIA 和 6'-SL 对哺乳仔猪结肠微生物群落的组成和结构的影响存在显著差异。然而, 由于肠道微生物群的多样性和复杂性, 微生物对 SIA 和 6'-SL 的利用机制仍不清楚, 后续可深入结合宏基因组、代谢组学以及交互喂养等试验进一步探究特定细菌对 SIA 和 6'-SL 的降解机制。

4 结论

本研究发现 6'-SL 和 SIA 均可有效调控仔猪肠道菌群结构, 6'-SL 能提高拟杆菌门以及普雷沃氏菌属和拟杆菌属的相对丰度, 而 SIA 能提高芽孢杆菌门以及厌氧弧菌属的相对丰度, 且 2 种底物都明显促进仔猪结肠微生物发酵, 提高 SCFAs 产量, 尤其是乙酸产量。

作者贡献声明

刘晓英：参与试验设计，试验数据收集和分析，论文撰写等；李轩：参与试验方案设计，试验和数据分析；吴海琴：参与数据分析和论文修改；许来鹏：参与试验和数据分析；赵德辉：参与试验指导和论文修改；马季祥：参与论文修改；慕春龙：试验方案设计，试验数据收集和协助分析以及论文修改；朱伟云：试验指导，论文审核修改；潘龙：论文撰写，论文修改和审核等。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 付力立, 江婧, 陶金忠, 曹随忠. 基于代谢组学的乳汁中代谢物研究进展[J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 4000-4007.
FU LL, JIANG J, TAO JZ, CAO SZ. Advances on metabolites in human and animal milks based on metabolomics[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(9): 4000-4007 (in Chinese).
- [2] ANDREAS NJ, KAMPMANN B, MEHRING LE-DOARE K. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity[J]. Early Human Development, 2015, 91(11): 629-635.
- [3] 蓝航莲, 施悦, 张丽娜, 周鹏. 4种哺乳动物乳中低聚糖的定性和定量分析研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(13): 370-378.
LAN HL, SHI Y, ZHANG LN, ZHOU P. Progress in qualitative and quantitative analysis of oligosaccharides in the milks of four mammalian species[J]. Food Science, 2022, 43(13): 370-378 (in Chinese).
- [4] CASADO B, AFFOLTER M, KUSSMANN M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids[J]. Journal of Proteomics, 2009, 73(2): 196-208.
- [5] GORMLEY A, GARAVITO-DUARTE Y, KIM SW. The role of milk oligosaccharides in enhancing intestinal microbiota, intestinal integrity, and immune function in pigs: a comparative review[J]. Biology, 2024, 13(9): 663.
- [6] VARKI A, GAGNEUX P. Multifarious roles of sialic acids in immunity[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012, 1253(1): 16-36.
- [7] STENCEL-BAERENWALD JE, REISS K, REITER DM, STEHLE T, DERMODY TS. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(11): 739-749.
- [8] SALCEDO J, FRESE SA, MILLS DA, BARILE D. Characterization of porcine milk oligosaccharides during early lactation and their relation to the fecal microbiome[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(10): 7733-7743.
- [9] 张佳妮. 猪乳游离寡糖结构及含量的比较研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG JN. Study on the structure and content of free oligosaccharides from porcine milk[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [10] MA J, GONG S, HE Y, GAO W, HAO W, LAN X. Effects of oral sialic acid on gut development, liver function and gut microbiota in mice[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(1): 20-25.
- [11] YIN ZW, ZHU L, GAO MJ, YU D, ZHANG ZJ, ZHU L, ZHAN XB. Effects of *in vitro* fermentation of polysialic acid and sialic acid on gut microbial community composition and metabolites in healthy humans[J]. Foods, 2024, 13(3): 481.
- [12] TARR AJ, GALLEY JD, FISHER SE, CHICHLOWSKI M, BERG BM, BAILEY MT. The prebiotics 3' sialyllactose and 6' sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: evidence for effects on the gut-brain axis[J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2015, 50: 166-177.
- [13] WIESE M, KHAKIMOV B, NIELSEN S, SØRENSEN H, van den BERG F, NIELSEN DS. CoMiniGut-a small volume *in vitro* colon model for the screening of gut microbial fermentation processes[J]. PeerJ, 2018, 6: e4268.
- [14] JACOBI SK, YATSUNENKO T, LI D, DASGUPTA S, YU RK, BERG BM, CHICHLOWSKI M, ODLE J. Dietary isomers of sialyllactose increase ganglioside sialic acid concentrations in the corpus callosum and cerebellum and modulate the colonic microbiota of formula-fed piglets[J]. The Journal of Nutrition, 2016, 146(2): 200-208.
- [15] 叶艳新. 2'-岩藻糖基乳糖和甘露低聚糖对断奶仔猪肠道微生物体外发酵特性及菌群结构的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2022.
YE YY. Effects of 2'-fucosyl lactose and mannose oligosaccharide on intestinal microflora and metabolism of weaned piglets were studied *in vitro*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [16] KATOH T, OJIMA MN, SAKANAKA M, ASHIDA H, GOTOH A, KATAYAMA T. Enzymatic adaptation of *Bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules[J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 481.
- [17] LOU YC, RUBIN BE, SCHOELMERICH MC, DiMARCO KS, BORGES AL, ROVINSKY R, SONG L, DOUDNA JA, BANFIELD JF. Infant microbiome cultivation and metagenomic analysis reveal *Bifidobacterium* 2'-fucosyllactose utilization can be facilitated by coexisting species[J]. Nature Communications, 2023, 14: 7417.
- [18] WILLIAMS BA, BOSCH MW, BOER H, VERSTEGEN MWA, TAMMINGA S. An *in vitro* batch culture method

- to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, 123-124(Part 1): 445-462.
- [19] LI M, BAUER LL, CHEN X, WANG M, KUHLENSCHMIDT TB, KUHLENSCHMIDT MS, FAHEY GC Jr, DONOVAN SM. Microbial composition and *in vitro* fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets1-3[J]. *The Journal of Nutrition*, 2012, 142(4): 681-689.
- [20] ZHANG CJ, YU M, YANG YX, MU CL, SU Y, ZHU WY. Effect of early antibiotic administration on cecal bacterial communities and their metabolic profiles in pigs fed diets with different protein levels[J]. *Anaerobe*, 2016, 42: 188-196.
- [21] ZHANG YN, YE YX, GUO JQ, WANG MT, LI X, REN YT, ZHU WY, YU KF. Effects of 2'-fucosyllactose on the composition and metabolic activity of intestinal microbiota from piglets after *in vitro* fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 104(3): 1553-1563.
- [22] 刘晓英, 张凯, 张梦瑶, 杨向科, 朱伟云, 潘龙. 基于猪体外仿生消化技术研究高粱与玉米养分降解效率的差异[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(6): 3995-4002.
LIU XY, ZHANG K, ZHANG MY, YANG XK, ZHU WY, PAN L. Differences in nutrient degradation efficiency between sorghum and corn based on bionic digestion of pigs *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Animals Nutrition*, 2024, 36(6): 3995-4002 (in Chinese).
- [23] MOON JS, JOO W, LI L, CHOI HS, HAN NS. *In vitro* digestion and fermentation of sialyllactoses by infant gut microflora[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21: 497-506.
- [24] WANG MM, WICHENCHOT S, HE XW, FU X, HUANG Q, ZHANG B. *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 88: 1-9.
- [25] LOUIS P, FLINT HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(1): 29-41.
- [26] FERREIRA-HALDER CV, FARIA AVS, ANDRADE SS. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2017, 31(6): 643-648.
- [27] BROWER-SINNING R, ZHONG D, GOOD M, FIREK B, BAKER R, SODHI CP, HACKAM DJ, MOROWITZ MJ. Mucosa-associated bacterial diversity in necrotizing enterocolitis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e105046.
- [28] LANGE K, BUERGER M, STALLMACH A, BRUNS T. Effects of antibiotics on gut microbiota[J]. *Digestive Diseases*, 2016, 34(3): 260-268.
- [29] OHASHI Y, USHIDA K.. Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action[J]. *Animal Science Journal*, 2009, 80(4): 361-371.
- [30] PHAM VT, LACROIX C, BRAEGGER CP, CHASSARD C. Early colonization of functional groups of microbes in the infant gut[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(7): 2246-2258.
- [31] JAHAN M, FRANCIS N, WYNN P, WANG B. The potential for sialic acid and sialylated glycoconjugates as feed additives to enhance pig health and production[J]. *Animals*, 2021, 11(8): 2318.
- [32] FLINT HJ, SCOTT KP, DUNCAN SH, LOUIS P, FORANO E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(4): 289-306.
- [33] PRABHU R, ALTMAN E, EITEMAN MA. Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8564-8570.
- [34] TAMANAI-SHACOORI Z, SMIDA I, BOUSARGHIN L, LOREAL O, MEURIC V, FONG SB, BONNAURE-MALLET M, JOLIVET-GOUGEON A. Roseburia spp.: a marker of health[J]. *Future Microbiology*, 2017, 12(2): 157-170.