



体外法探究不同氨基酸形式酪蛋白水解物对猪小肠微生物的影响

刘靖, 慕春龙, 余凯凡, 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

摘要:【目的】通过体外法探究猪小肠不同肠段肠腔微生物和肠壁微生物对两种不同氨基酸形式的酪蛋白水解物的发酵特性。【方法】以生长猪的十二指肠、空肠、回肠肠腔食糜或者肠壁微生物为接种物, 分别以酸水解酪蛋白(以游离氨基酸为主)和酶水解酪蛋白(以小肽为主)为底物, 37 °C 厌氧培养发酵, 于 0、3、6、12 h 采样, 测定微生物蛋白(MCP)以及用 real time-PCR 进行菌群分析。【结果】(1) 肠腔微生物发酵不同酪蛋白水解物: 十二指肠和回肠酶水解酪蛋白组 MCP 的含量显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$)。十二指肠酶水解酪蛋白组总菌、Firmicutes 数量显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$)。回肠发酵 6 h 后, 酶水解酪蛋白组 *Escherichia coli* 和 Firmicutes 的数量显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$); 发酵 12 h 后, 酶水解酪蛋白组总菌、*Lactobacillus*、*E. coli* 的数量均显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$)。(2) 肠壁微生物发酵不同酪蛋白水解物: 发酵 12 h 后, 十二指肠和回肠酶水解酪蛋白组 MCP 含量显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$)。十二指肠酶水解酪蛋白组 *Lactobacillus*、Firmicutes 数量分别极显著、显著高于酸水解酪蛋白组; 回肠 Firmicutes 数量在酶水解酪蛋白组显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.05$)。【结论】十二指肠和回肠的肠腔和肠壁微生物都能够利用小肽, 且在一定程度上对小肽的利用更具优势。

关键词: 猪, 酸水解酪蛋白, 酶水解酪蛋白, 小肠微生物

猪小肠是蛋白质代谢的重要场所, 近年的研究逐渐关注小肠中微生物的功能。这些微生物在肠道中代谢活跃, 参与机体代谢, 抵御病原菌入侵, 调控宿主免疫。研究表明, 猪小肠微生物能够参与氨基酸首过肠道代谢。Dai 等^[1]研究发现, 体外培养的仔猪十二指肠、空肠、回肠微生物可

以代谢多种必需氨基酸, 且对不同氨基酸其代谢率也不相同。Yang 等^[2]体外培养研究表明, 猪小肠肠壁微生物也能够代谢氨基酸, 但与肠腔微生物对氨基酸的代谢存在一定差异: 肠腔微生物能够更多地分解代谢多种游离氨基酸, 而肠壁微生物既能分解代谢部分氨基酸, 也具有合成氨基酸

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2013CB127300); 国家自然科学基金(31430082)

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

收稿日期: 2017-01-13; 修回日期: 2017-04-25; 网络出版日期: 2017-04-27

的能力。Su 等^[3]研究显示猪小肠空肠、回肠食糜中微生物和肠壁中的微生物的组成存在差异。此外,大量研究表明,反刍动物瘤胃中多种细菌优先利用小肽^[4]。然而,猪小肠微生物是否能够直接代谢利用小肽,目前研究甚少。因此,本试验拟通过体外发酵法,以酶水解酪蛋白(以小肽为主)和酸水解酪蛋白(以游离氨基酸为主)为氮源,探究小肠不同肠段(十二指肠、空肠、回肠)、区位(肠腔和肠壁)微生物是否可以直接代谢利用小肽,并比较其代谢不同氨基酸形式底物的差异。

1 材料和方法

1.1 底物、接种物和培养基的制备

底物:酸水解酪蛋白(Casein acid hydrolysate)和酶水解酪蛋白(Casein enzymatic hydrolysate)均购买自北京索莱宝科技有限公司。两种酪蛋白水解物氨基酸组成相同,主要含有:丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、酪氨酸和缬氨酸,只是两者肽氨基酸和游离氨基酸的比例有差异。酶水解酪蛋白组中氨基酸主要以小肽的方式存在,酸水解酪蛋白组中氨基酸主要以游离氨基酸的方式存在。

微生物接种物来自 5 头健康的杜×长×大肥育猪(饲喂玉米-豆粕日粮)。肠腔微生物的制备:分离肠段采集十二指肠、空肠和回肠食糜,以 1 g 食糜加 9 mL 稀释液的比例加入已预热的 37 °C 灭菌磷酸缓冲液进行混匀。将混合液用 4 层无菌粗棉纱布过滤至持续通 CO₂ 的厌氧发酵瓶中,打好铝盖,作为肠腔微生物接种物。紧密连接微生物的制备参照 Yang^[2]所述:将振荡后的肠段放

入含有厌氧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。培养基参考戴兆来等^[1]的方法配制。

1.2 试验设计

在微生物发酵液中分别添加 5.5 g/L 酶水解酪蛋白或等氮含量的酸水解酪蛋白作为试验组,不添加底物的组作为空白对照组,每组 4 个重复。培养基中唯一的氮源是酪蛋白水解物。接种后厌氧发酵瓶在 37 °C 水浴锅培养 12 h,并分别在 0、3、6、12 h 采样进行相关指标测定。

1.3 体外发酵指标测定及微生物分析

用 NanoDrop 2000c 分光光度计(美国, Thermo Fisher),参照 Makker 等^[5]方法测定发酵微生物蛋白(microbial protein, MCP)。主要步骤如下: -20 °C 冻存样品室温下解冻,取 3 mL 发酵液样品 1000 r/min 离心 8 min (除去饲料残渣)。取 2 mL 上清液 15000 r/min 离心 20 min (收集细菌)。取上清用考马斯亮蓝法测定发酵液中微生物蛋白的含量。

参照 Zoetendal 等^[6]的方法,先用珠磨法机械破碎样品,再用酚-氯仿-异戊醇提取发酵液样品总 DNA。采用核酸蛋白仪 Nanodrop 2100 spectrophotometer (美国, Thermo Fisher)对提取的 DNA 进行检测。

采用 real-time PCR 对发酵液样品进行总菌、乳酸杆菌、大肠杆菌、厚壁菌门以及拟杆菌门的绝对定量,使用引物参照 Zhang 等^[7],引物序列见表 1,仪器为 Step One Plus (Life Technologies, CA, USA)。反应体系为: 10 μL SYBR Green PCR Super Mix (TaKaRa), 0.4 μL ROX 染料, 0.4 μL 上游引物, 0.4 μL 下游引物, 6.8 μL 灭菌超纯水, 0.2 μL DNA 模板。PCR 扩增程序为: 95 °C 30 s; 95 °C

表 1. 本试验所用引物序列
Table 1. Primers used in this study

Items	Forward primer	Reverse primer	Amplicon/bp
Total bacteria	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA	ACGTCRTCCMCNCCTTCCTC	146
Bacteroidetes	GGARCATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACACCATGCAG	126
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC	127
<i>Escherichia coli</i>	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	96
<i>Lactobacillus</i>	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	ATTCCACCGCTACTACTAG	345

5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 5 s 循环 1 次。每组 4 个重复, 每个 DNA 样品 3 个重复。标准曲线由 10^9 以 1:10 梯度稀释至 10^3 , 每个稀释度设 3 个重复。

1.4 数据处理

发酵指标等数据经 Excel 2007 初步统计处理后, 采用独立样本 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

2 结果和分析

2.1 小肠不同部位微生物发酵两种酪蛋白水解物过程中 MCP 含量变化

由图 1 可知, 肠腔微生物发酵不同酪蛋白水解物: 十二指肠、回肠发酵 6 h 后酶水解酪蛋白组 MCP 含量显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.05$); 空肠发酵 12 h 过程中两组 MCP 的含量无显著差异。肠壁微生物发酵不同酪蛋白水解物: 十二指肠在发酵 3 h、12 h 酶水解酪蛋白组 MCP 含量显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.05$); 回肠发酵 3 h 后, 酶水解酪蛋白组 MCP 含量显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.05$); 空肠发酵 12 h 过程中两组的 MCP 含量差异不显著。

2.2 小肠不同部位微生物发酵两种酪蛋白水解物过程中微生物数量变化

为了探究猪小肠不同肠段、区位微生物发酵两种酪蛋白水解物对细菌数量的影响, 对细菌 16S rRNA 基因进行定量分析。

2.2.1 肠腔微生物发酵不同酪蛋白水解物过程中微生物数量的变化: 如图 2 至图 4, 发酵 12 h 后, 十二指肠酶水解酪蛋白组的总菌、Firmicutes 数量显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.05$), *Lactobacillus* 和 *E. coli* 的数量则呈现出酶水解酪蛋白组高于酸水解酪蛋白组的趋势 (P 值分别为 0.087 和 0.082)。空肠总菌、Firmicutes、Bacteroidetes、*Lactobacillus* 以及 *E. coli* 数量在两组间差异均不显著。回肠发酵 6 h 后, 总菌数量呈现出酶水解酪蛋白组高于酸水解酪蛋白组的趋势 ($P = 0.056$), *E. coli* 和 Firmicutes 的数量则在酶水解酪蛋白组极显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.001$); 发酵 12 h 后, 酶水解酪蛋白组总菌、*Lactobacillus* 和 *E. coli* 的数量均显著高于酸水解酪蛋白组 ($P < 0.05$)。

2.2.2 肠壁微生物发酵不同酪蛋白水解过程中微生物数量的变化: 如图 2 至图 4, 发酵 12 h 后, 十二指肠酶水解酪蛋白组 *Lactobacillus* 和 Firmicutes 数量分别极显著、显著高于酸水解酪蛋

白组, 而总菌的数量在酶水解酪蛋白组有高于酸水解酪蛋白组的趋势但差异不显著($P=0.056$)。Bacteroidetes 数量差异不显著。空肠总菌、Firmicutes、Bacteroidetes、*Lactobacillus* 和 *E. coli* 数量在两组间差异均不显著。回肠 Firmicutes 数量

在酶水解酪蛋白组极显著高于酸水解酪蛋白组($P<0.001$), 而 *E. coli* 的数量在酸水解酪蛋白组有高于酶水解酪蛋白组的趋势, 但差异不显著($P=0.051$), 总菌和 *Lactobacillus* 的数量则在两组间无显著差异。

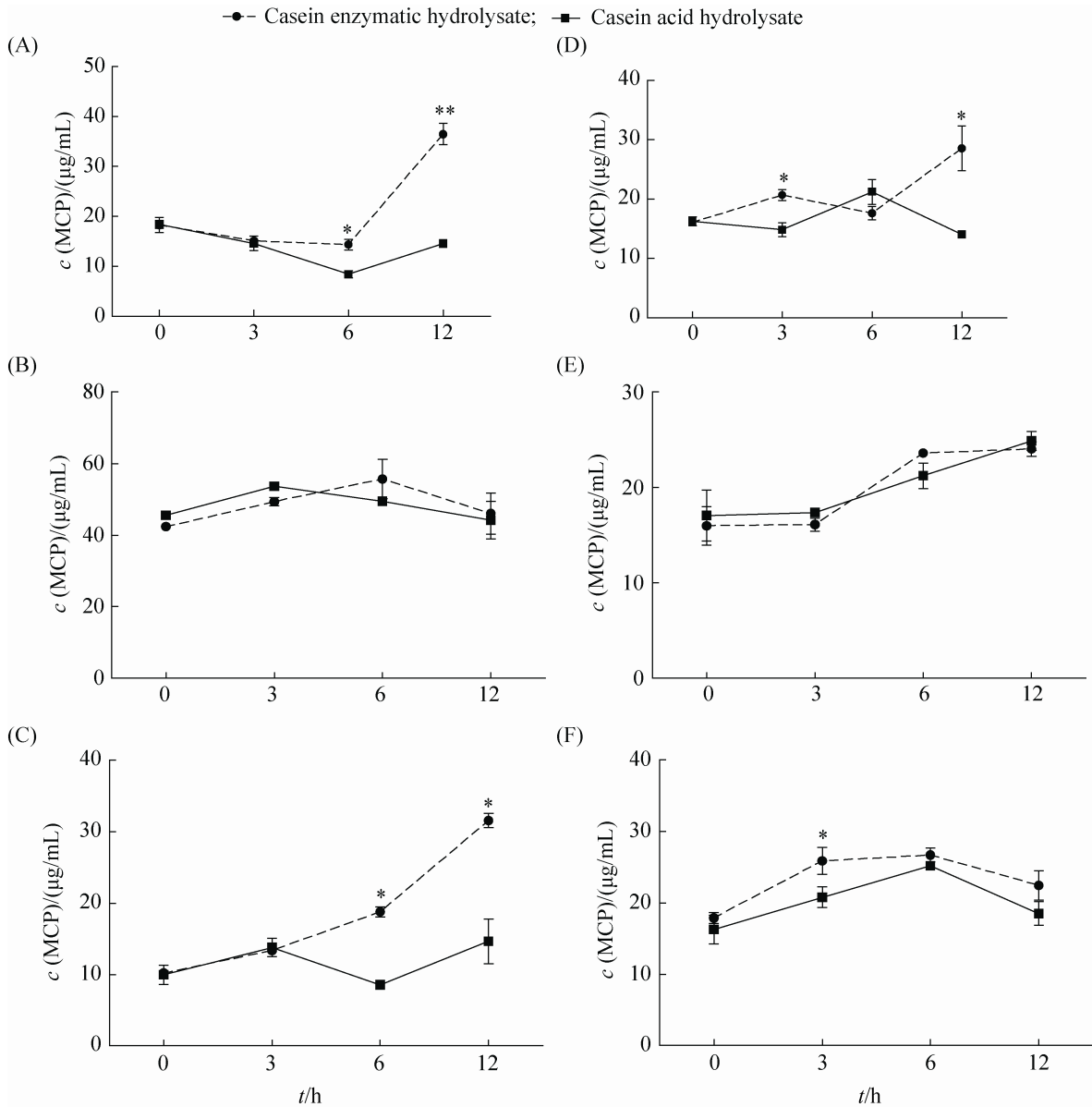


图 1. 体外发酵 12 h MCP 浓度的变化

Figure 1. Changes of MCP concentration during 12 h *in vitro* fermentation. (A–C): changes of MCP concentration of luminal bacteria on two different casein hydrolysates. (D–F): changes of MCP concentration of gut wall bacteria on two different casein hydrolysates. A and D: Duodenum; B and E: Jejunum; C and F: Ileum. *: $P<0.05$, **: $P<0.001$. The same situation for figure 2, 3 and 4.

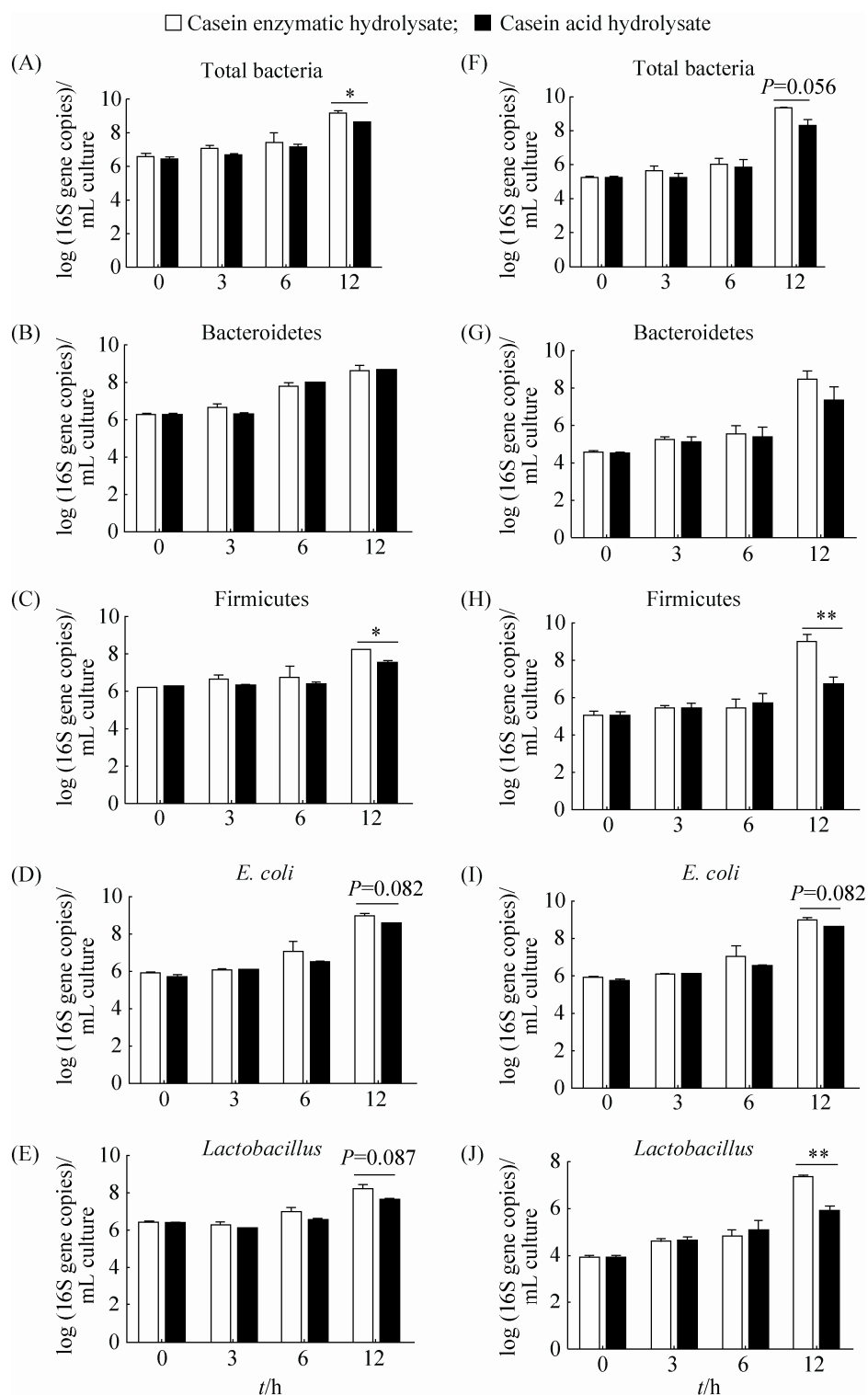


图 2. 微生物体外发酵不同时间十二指肠微生物数量的变化

Figure 2. Changes of bacteria numbers in duodenum during 12 h *in vitro* incubation. A–E: changes of bacteria numbers of luminal bacteria on two different casein hydrolysates. F–J: changes of bacteria numbers of gut wall bacteria on two different casein hydrolysates.

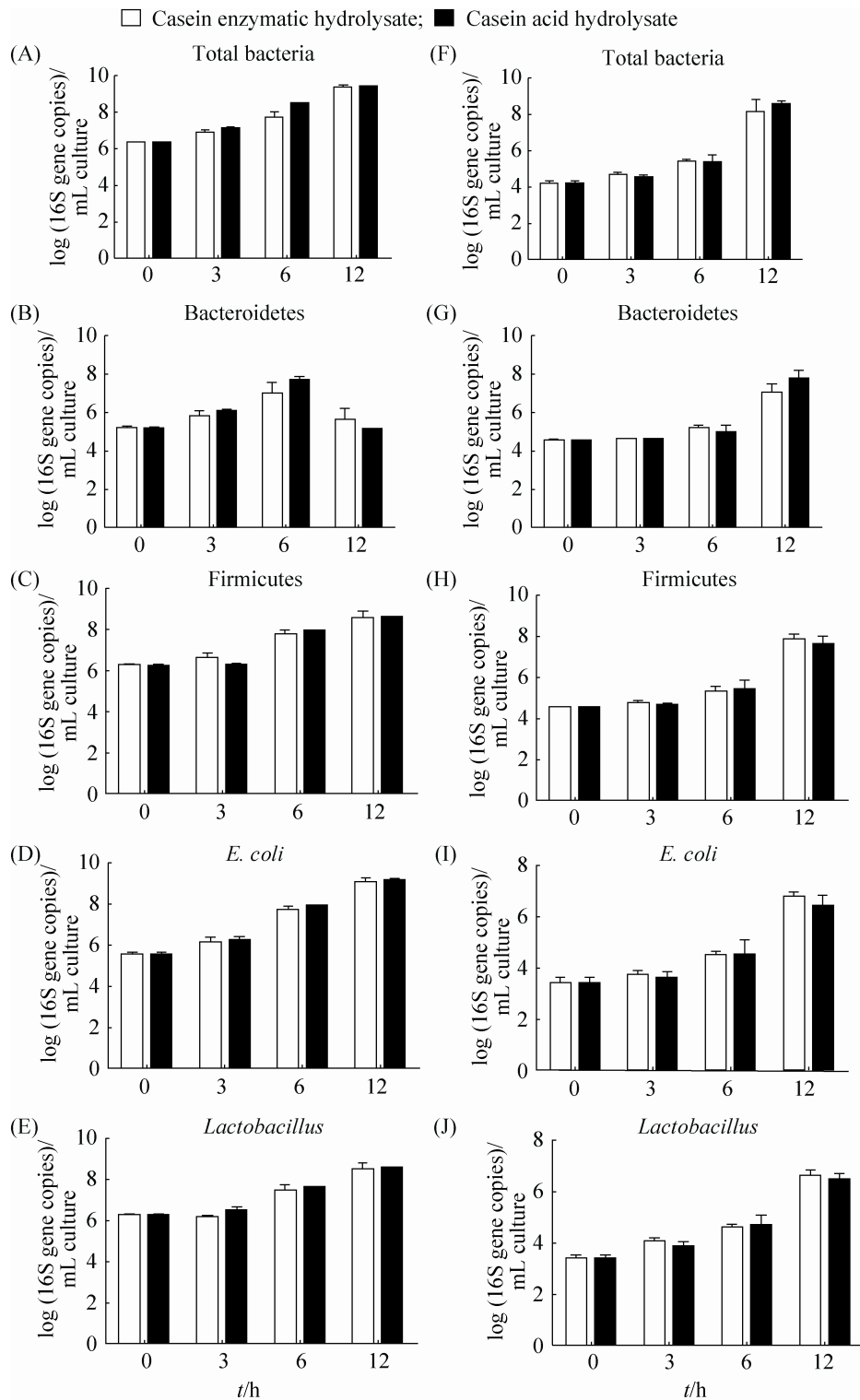


图 3. 微生物体外发酵不同时间空肠微生物数量的变化

Figure 3. Changes of bacteria numbers in jejunum during 12 h *in vitro* incubation. A–E: changes of bacteria numbers of luminal bacteria on two different casein hydrolysates. F–J: changes of bacteria numbers of gut wall bacteria on two different casein hydrolysates.

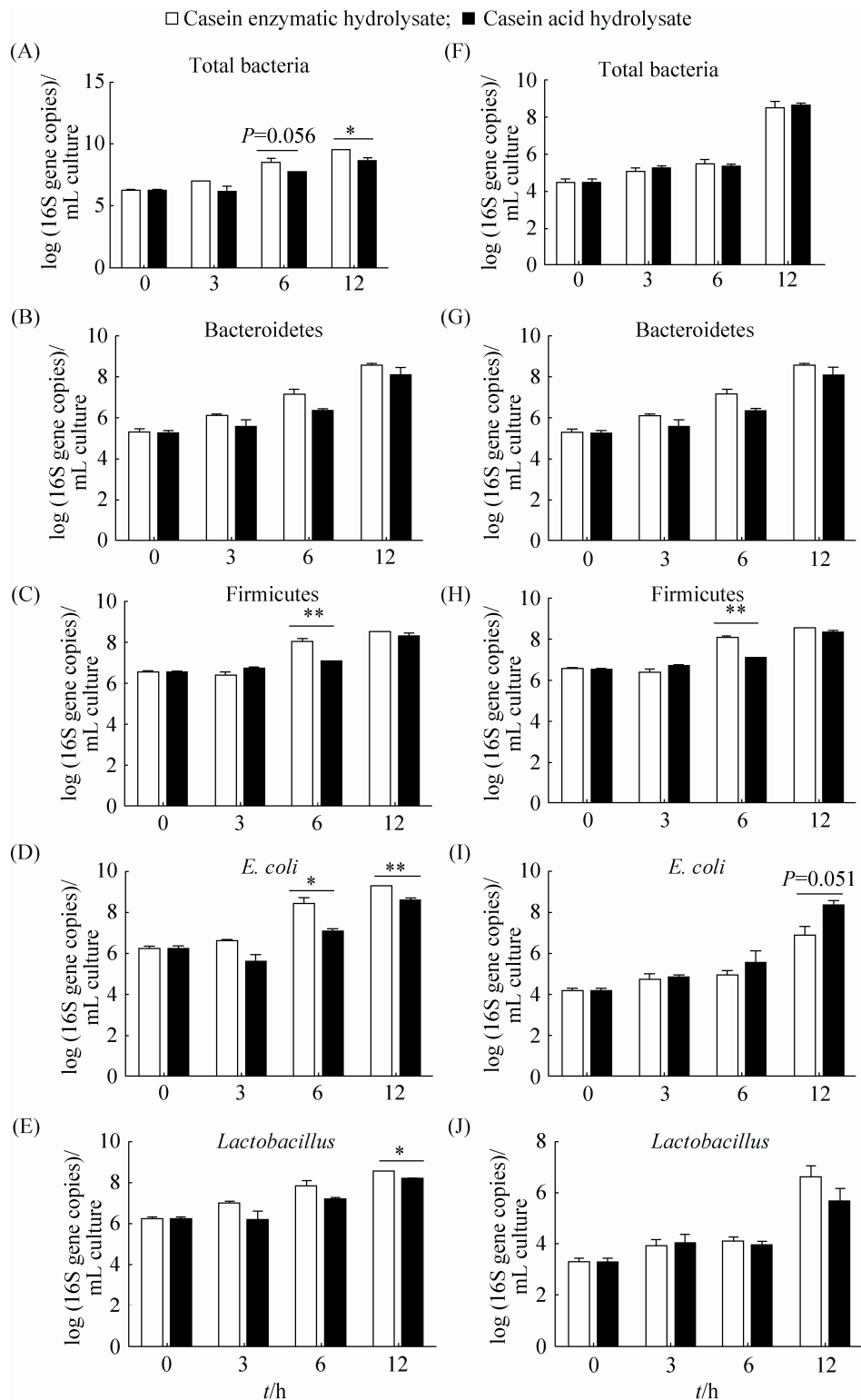


图 4. 微生物体外发酵不同时间回肠微生物数量的变化

Figure 4. Changes of bacteria numbers in ileum during 12 h *in vitro* incubation. A–E: changes of bacteria numbers of luminal bacteria on two different casein hydrolysates. F–J: changes of bacteria numbers of gut wall bacteria on two different casein hydrolysates.

3 讨论

3.1 不同氨基酸形式酪蛋白水解物对小肠微生物发酵中 MCP 合成的影响

微生物可以利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、氨基酸等合成 MCP。MCP 浓度反映着微生物利用底物为自身合成蛋白质的能力。本试验中, 发酵 3 h 后, 肠腔和肠壁微生物发酵两种酪蛋白水解物, 酶水解酪蛋白组的 MCP 含量均高于酸水解酪蛋白组。这表明在一定程度上, 与游离氨基酸相比, 肠道微生物对小肽有更强的利用能力, 更倾向于以小肽为其氮源进行生长代谢。对于反刍动物, 很多瘤胃细菌优先利用小肽^[4], 而且其对肽的利用存在浓度的限制。体内试验中瘤胃微生物最适肽浓度为 $\leq 6.4 \text{ mmol/L}$, 体外试验中最适肽浓度为 $1.8\text{--}7.1 \text{ mmol/L}$ ^[8]。对于小肠微生物最适的肽浓度, 还需要进一步的探究。

3.2 以不同氨基酸形式酪蛋白水解物为底物发酵下小肠细菌数量的变化规律

单胃动物小肠中定殖着大量的微生物, 这些微生物参与经过胃内消化后进入小肠的营养物质的首过代谢^[9]。本研究 real-time PCR 结果显示, 肠腔微生物在发酵两种酪蛋白水解物的终点时, 十二指肠和回肠中总菌、*Lactobacillus*、*E. coli* 和 Firmicutes 的数量在酶水解酪蛋白组高于酸水解酪蛋白组。该结果提示, 这些细菌更倾向于利用以小肽形式存在的氮源, 这也与 MCP 的结果一致。肠壁微生物在发酵两种酪蛋白水解物的终点时, 十二指肠总菌、*Lactobacillus* 和 Firmicutes 数量, 酶水解酪蛋白组显著高于酸水解酪蛋白组。肠道微生物表现出的对小肽更强的利用能力, 可能与细菌的氨基酸和小肽的转运载体有关。已有研究表明, 细菌中肽的转运机制主要是转运系统

中的 ABC 超家族, 而氨基酸的转运则通常依赖于质子的结合或者 Na^+ 的浓度梯度^[10]。细菌倾向于利用以小肽形式存在的氮可能是因为这种方式更加节能, 吸收进入细胞的小肽可以被细胞内的肽酶降解为氨基酸进一步利用, 或者在能量充足的情况下直接参与合成菌体蛋白。

3.3 不同氨基酸形式底物微生物发酵的肠段特异性

本试验中, 十二指肠及回肠的肠腔和肠壁微生物对两种不同氨基酸形式的酪蛋白水解物的利用出现差异, 但是空肠的肠腔和肠壁微生物对氨基酸利用上未见显著差异。一方面是因为消化道不同部位微生物区系组成存在差异。研究发现, 空肠微生物的优势菌门为厚壁菌门, 占到微生物总量的 90% 以上, 回肠微生物的优势菌门也是厚壁菌门, 但其占到微生物总量的 95% 以上^[11]。本实验室先前的报道指出, 体外条件下猪小肠微生物对氨基酸的代谢是区室化的(即肠段特异性)^[1]。这同时也提示小肠细菌对特定氨基酸或者小肽的利用可能需要不同细菌之间的协作。另外, 可能是空肠中氨基酸利用菌和小肽利用菌的比例与回肠中二者的比例存在差异, 但目前无此类相关文献报道, 具体原因还需要进一步探究。另一方面因为不同肠段的生理功能和内环境的不同, 如 pH 和离子浓度等都会影响肠道细菌的组成以及日粮的代谢。有研究表明 pH 和碳水化合物会影响肠道细菌对肽和氨基酸的发酵: 低 pH 高碳水化合物情况下, 微生物利用氨基酸或肽产生 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的初始速率以及累计氨的产量降低^[12]。此外细菌利用肽和氨基酸等营养物质时, 通常需要离子(Na^+ , H^+) 浓度梯度驱动^[13]。这些研究表明, 细菌对氨基酸和小肽的利用受细菌细胞外环境的影响。

4 结论

体外发酵体系中, 肠腔和肠壁微生物发酵两种不同酪蛋白水解物时, 酶水解酪蛋白组的 MCP 的产量高于酸水解酪蛋白组。与以游离氨基酸为主的酸水解酪蛋白相比, 猪小肠肠腔和肠壁微生物对以小肽为主的酶水解酪蛋白具有更强的利用能力。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Yang YX, Dai ZL, Zhu WY. Important impacts of intestinal bacteria on utilization of dietary amino acids in pigs. *Amino Acids*, 2014, 46(11): 2489–2501.
- [3] Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(3): 546–555.
- [4] Ling JR, Armstead IP. The *in vitro* uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 78(2): 116–124.
- [5] 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.
- [6] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3854–3859.
- [7] 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 2493–2505.
- [8] Fu CJ, Felton EE, Lehmkuhler JW, Kerley MS. Ruminant peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(5): 1305–1312.
- [9] Yang YX, Mu CL, Zhu WY. Roles of bacteria in first-pass intestinal metabolism of amino acids. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(1): 15–20. (in Chinese)
杨宇翔, 慕春龙, 朱伟云. 细菌在氨基酸首过肠道代谢中的作用. *动物营养学报*, 2015, 27(1): 15–20.
- [10] Richardson AJ, McKain N, Wallace RJ. Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 6.
- [11] Isaacson R, Kim HB. The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews*, 2012, 13(1): 100–109.
- [12] Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(4): 355–368.
- [13] Martin SA. Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *Journal of Animal Science*, 1994, 72(11): 3019–3031.

Effect of two different casein hydrolysates on small intestinal bacteria of growing pigs

Jing Liu, Chunlong Mu, Kaifan Yu, Weiyun Zhu*

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

Abstract: [Objective] This study was aimed to explore the effect of different casein hydrolysates on small intestinal bacteria of pigs. [Methods] Luminal and gut wall bacteria from duodenum, jejunum and ileum in Duroc, Landrace and Yorkshire hybridization pigs were used as inocula. Casein acid hydrolysate and casein enzymatic hydrolysate were fermented at 37 °C for 12 h. Samples were collected at 0, 3, 6 and 12 h to measure microbial protein and detect the alteration of bacteria community. [Results] After inoculated with the luminal bacteria, the concentration of microbial protein in duodenum and ileum in casein enzymatic hydrolysate group was higher compared with casein acid hydrolysate group and the casein enzymatic hydrolysate group had higher total bacteria number and Firmicutes in duodenum after 12 h incubation ($P<0.05$). In the casein enzymatic hydrolysate group, the numbers of total bacteria, *Lactobacillus* and *Escherichia coli* were higher than those in casein acid hydrolysate group after 12 h incubation in ileum. For the gut wall bacteria: in duodenum and ileum, after 12 h incubation, the concentration of microbial protein in the casein enzymatic hydrolysate group was higher than that in casein acid hydrolysate group ($P<0.05$). The number of *Lactobacillus* and Firmicutes in the casein enzymatic hydrolysate group was higher than those in the casein acid hydrolysate group in duodenum ($P<0.05$) and the number of Firmicutes was higher in the casein enzymatic hydrolysate group than that in the casein acid hydrolysate group in ileum. ($P<0.05$). [Conclusion] Compared with casein acid hydrolysate, casein enzymatic hydrolysate can promote the bacterial protein synthesis and stimulate the growth of Firmicutes in duodenum and ileum.

Keywords: pig, casein acid hydrolysate, casein enzymatic hydrolysate, small intestinal microbiota

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Basic Research Program of China (2013CB127300) and by the National Natural Science Foundation of China (31430082)

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

Received: 13 January 2017; Revised: 25 April 2017; Published online: 27 April 2017