

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

廉锴锋, 叶艳新, 朱伟云, 余凯凡*

南京农业大学, 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, 国家动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏 南京

廉锴锋, 叶艳新, 朱伟云, 余凯凡. 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[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1178-1191.

LIAN Kaifeng, YE Yanxin, ZHU Weiyun, YU Kaifan. Effects of mannanoligosaccharides on *in vitro* fermentation characteristics and composition of intestinal microbiota in weaned piglets[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1178-1191.

摘要: 【目的】采用微生物体外发酵技术, 以低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS)为对照, 研究甘露低聚糖(mannanoligosaccharides, MOS)对断奶仔猪肠道微生物体外发酵特性及菌群结构的影响。【方法】以仔猪空肠与结肠食糜微生物作为接种物, 分别以 FOS 和 MOS 为底物, 在 0、6、12、24、48 h 这 5 个时间点测定微生物产气量和发酵液 pH, 并收集每个时间点的发酵液用于后续微生物分析。【结果】在体外空肠微生物发酵过程中, MOS 组发酵液 pH 和产气量均显著高于 FOS 组($P<0.05$); 发酵 24 h 时, 与 FOS 相比 MOS 极显著提高了乙酸、丙酸及总短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)的含量($P<0.01$); MOS 组甲酸产量极显著低于 FOS 组($P<0.01$); 发酵 48 h 时 MOS 组乳酸含量极显著低于 FOS 组($P<0.01$)。在体外结肠微生物发酵过程中, MOS 组产气量显著高于 FOS 组($P<0.05$); 发酵 48 h 时 MOS 组甲酸、乙酸、丁酸、总 SCFAs 和乳酸的产量均极显著高于 FOS 组($P<0.01$)。空肠发酵液 16S rRNA 基因测序结果显示, 发酵 48 h 时 MOS 组 Shannon 和 Simpson 指数均极显著高于 FOS 组($P<0.01$), 且两组之间微生物菌群组成差异明显。此外, MOS 组双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、黏液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*)和巨球形菌属(*Megasphaera*)菌属的相对丰度显著高于 FOS 组($P<0.05$)。【结论】与 FOS 相比, 仔猪小肠微生物群能够利用 MOS 显著改善微生物区系, 提高 *Bifidobacterium* 等有益菌的丰度, 增加产气量, 促进乙酸等 SCFAs 的产生, 提示 MOS 具有改善仔猪小肠微生态的潜力。

关键词: 甘露低聚糖; 低聚果糖; 断奶仔猪; 肠道菌群; 体外发酵

资助项目: 国家自然科学基金(32372830)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372830).

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

Received: 2025-10-07; Accepted: 2025-11-26; Published online: 2025-12-08

Effects of mannanoligosaccharides on *in vitro* fermentation characteristics and composition of intestinal microbiota in weaned piglets

LIAN Kaifeng, YE Yanxin, ZHU Weiyun, YU Kaifan*

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

Abstract: **[Objective]** To investigate the effects of mannanoligosaccharides (MOS) on the *in vitro* fermentation characteristics and composition of intestinal microbiota in weaned piglets by using an *in vitro* microbial fermentation technique, with fructooligosaccharides (FOS) taken as the control. **[Methods]** Using microbial inocula derived from the jejunal and colonic chyme of piglets, with FOS and MOS as respective substrates, this study measured microbial gas production and fermentation broth pH at five time points (0, 6, 12, 24, and 48 h), and collected fermentation broth samples at each time point for subsequent microbial analysis. **[Results]** In the *in vitro* jejunal microbial fermentation system, both the fermentation broth pH and gas production in the MOS group were significantly higher than those in the FOS group ($P < 0.05$). At 24 h of fermentation, compared with FOS, MOS significantly increased the concentrations of acetate, propionate, and total short-chain fatty acids (SCFAs) ($P < 0.01$). The formate production in the MOS group was significantly lower than that in the FOS group ($P < 0.01$). At 48 h of fermentation, the lactate concentration in the MOS group was significantly lower than that in the FOS group ($P < 0.01$). In the *in vitro* colonic microbial fermentation system, gas production in the MOS group was significantly higher than that in the FOS group ($P < 0.05$). At 48 h of fermentation, the production of formate, acetate, butyrate, SCFAs, and lactate in the MOS group was significantly higher than that in the FOS group ($P < 0.01$). The 16S rRNA gene sequencing results of the jejunal fermentation broth revealed that at 48 h of fermentation, both the Shannon and Simpson indices in the MOS group were significantly higher than those in the FOS group ($P < 0.01$). Furthermore, the microbiota composition exhibited disparity between the MOS and FOS groups. Moreover, the relative abundances of *Bifidobacterium*, *Limosilactobacillus*, and *Megasphaera* were significantly higher in the MOS group than in the FOS group ($P < 0.05$). **[Conclusion]** Compared to FOS, MOS enabled the microbiota in the small intestine of piglets to significantly improve the microbial community structure, increase the abundance of beneficial bacteria such as *Bifidobacterium*, enhance gas production, and promote the generation of acetate and other SCFAs. These findings suggested that MOS held potential for modulating microecology in the small intestine of weaned piglets.

Keywords: mannanoligosaccharides; fructooligosaccharides; weaned piglets; intestinal microbiota; *in vitro* fermentation

近年来,我国肉类消费需求逐步攀升,集约化养殖模式在生猪产业中得到广泛推广。这种模式以高密度饲养和早期断奶等手段为特征,显著提升了生产效率,但同时也引发了一系列动物福利与健康问题。其中,仔猪因断奶应激、饲养环境等因素极易诱发腹泻、肠道炎症等疾病。自2020年7月1日我国实施饲料禁抗政策以来,所有非中药促生长类药物饲料添加剂被全面禁用,仔猪肠道健康问题愈发突出^[1]。饲料替抗产品的研究与开发逐渐成为研究热点。目前,酸化剂、益生菌、益生元、中草药及其制剂等以单一形式或组合方案作为饲料抗生素替代品已部分应用于养猪生产^[2]。益生元被定义为一种难以被宿主消化的食物成分,其作用是选择性地促进肠道特定微生物的生长与功能,进而改善宿主的肠道健康^[3]。益生元对肠道微生物菌群的刺激决定了它们的发酵活性,同时影响总短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)水平,从而对宿主机体健康产生积极影响^[4-5]。因此,对益生元的研究开发有助于其在仔猪饲料中的应用。

甘露低聚糖(mannanooligosaccharides, MOS)是一种来源于植物或酵母细胞壁的益生元,含有甘露聚糖和葡聚糖成分。作为一种功能性低聚糖类益生元, MOS在机体免疫、调节肠道菌群和抗炎等方面发挥作用,对维持宿主健康、保持肠道稳态具有重要意义^[6]。低聚果糖(fructooligosaccharide, FOS)通常存在于很多水果、蔬菜中,作为一种极具潜在利用价值的益生元,具有增强免疫、调节肠道微生态、促进机体健康等作用^[7]。FOS是研究最为深入、应用最为广泛的益生元之一。与FOS相比, MOS源于酵母细胞壁,其独特的甘露糖结构意味着其被肠道微生物利用的方式与代谢终产物可能有所不同。有研究报道, MOS在肠道内经发酵可产生对机体有利的SCFAs,如乙酸、丁酸等,从而为宿主提供大量能量来源;同时, MOS也可产生乳酸,在宿主体内发挥有益作用^[8-9]。

Kuzmenko等^[10]研究发现, MOS可阻止病原菌在宿主肠道内定殖,对肠道微生物区系有积极影响。Yu等^[11]发现,在断奶仔猪饲料中添加0.3%的MOS可有效降低产肠毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)攻毒后的腹泻发病率和肠上皮损伤。Zhao等^[12]则在断奶仔猪基础日粮中添加0.1%的MOS,发现其对仔猪的生长性能及养分消化率有一定促进作用。以上研究提示, MOS在改善仔猪肠道健康方面具有潜在应用前景。然而, MOS对仔猪肠道微生物发酵参数的影响尚不明确。

本研究采用体外发酵的方法探究MOS对仔猪肠道微生物的发酵参数及小肠微生物区系结构的影响,以期为MOS在仔猪营养领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

本研究所用的发酵底物为MOS和FOS。MOS购自山东丰泰生物科技有限公司,纯度 $\geq 90\%$; FOS购自北京厚嘉生物技术有限公司,纯度 $\geq 90\%$ 。

1.2 培养基

基础培养基组成参考Williams等^[13]、Dai等^[14]及Li等^[6]的研究,并在此基础上稍作修改。

基础培养基(g/L),按顺序依次向细颈瓶中加入0.60 g KCl、0.60 g NaCl、0.20 g CaCl₂·2H₂O、0.50 g MgSO₄·7H₂O、1.46 g KH₂PO₄、3.55 g Na₂HPO₄、1.00 g 酶解酪蛋白(trypticase)、0.54 g NH₄Cl、10.00 mL 微量元素溶液、10.00 mL 氯化血红素溶液、1.00 mL 刃天青溶液、50.00 mL 碳酸氢盐溶液(碳酸氢盐溶液配制:称取82.00 g 无水碳酸钠于烧杯中,加1.00 L沸水溶解,需现配现用)。随后加入煮沸的去离子水补齐至1.00 L,再将细颈瓶放入微波炉中加热至沸腾(反复加热煮沸3次),向其中持续通入5 h的CO₂。最后对瓶口进行微密封处理。

分装基础培养基入发酵瓶前, 在每升溶液中加入 1.00 g 半胱氨酸盐酸盐, 并用 0.20 mol/L HCl 或 0.20 mol/L NaOH 溶液调整 pH 至 6.8 左右。随后分装 90 mL 基础培养基至发酵瓶中, 盖好橡胶塞并打好铝盖, 其间持续通入 CO₂。最后向每个发酵瓶中加入 1.00 mL 的维生素磷酸溶液。

微量元素溶液: 将 15.65 mg NaVO₃、12.50 mg MnCl₂·4H₂O、25.00 mg SeO₂、125.00 mg Na₂MoO₄·2H₂O、12.50 mg ZnCl₂、12.50 mg CoCl₂·6H₂O、10.00 mg FeSO₄·7H₂O、125.00 mg NiCl₂·6H₂O、125.00 mg H₃BO₃、25.00 mg CuCl₂·2H₂O 依次加入 50 mL 烧杯中, 用 10.00 mL 0.02 mol/L HCl 溶解, 转移至 500 mL 容量瓶后用去离子水定容, 再分装在棕色瓶中存放备用。

氯化血红素溶液: 称取 0.10 g 氯高铁血红素加入 10 mL 烧杯中, 加入 5.00 mL 0.05 mol/L NaOH 溶解, 转移至 500 mL 容量瓶后持续通 CO₂, 沸水定容, 定容过程中持续通气, 随后分装在血清瓶中, 用锡纸包好存放备用。

刃天青溶液: 将 100.00 mg 的刃天青溶于 100.00 mL 去离子水中, 每升培养基加 1.00 mL 刃天青即可。

维生素磷酸溶液: 先将 27.35 g KH₂PO₄ 溶于 500.00 mL 水中制成溶液, 再将 10.25 mg 叶酸、10.20 mg 生物素、82.00 mg 泛酸钙、82.00 mg 盐酸硫胺、10.25 mg 钴胺素、82.00 mg 盐酸维生素 B₆、182.00 mg 核黄素、0.20 mg 对氨基苯甲酸、82.00 mg 烟酰胺依次融入。此溶液使用前先过滤(用 2 μm 孔径的滤纸过滤)灭菌, 并用无菌的有盖试管密封存放。

1.3 菌群接种物制备与接种

本研究所采集的肠道食糜来自杜×长×大三元杂交断奶阉公猪。选取仔猪屠宰后, 取空肠、结肠, 迅速转运至实验室。将预热的发酵瓶置于 37 °C 摇床维持恒温状态。之后分肠段取食糜, 并按 1:9 (质量体积比)的比例用无菌 PBS 进

行稀释, 参照余凯凡等^[15]的方法经四层纱布过滤即制得接种物。随后将菌群接种物装入发酵瓶, 密封并预热, 全程通 CO₂ 保持厌氧。最后取 10 mL 预热后的接种物注入含培养基的发酵瓶中。本研究所有动物实验获得南京农业大学实验动物福利与伦理委员会批准, 编号为 NJAU.No20240529104。

1.4 体外发酵试验

发酵瓶按照其底物类型分为空白对照(blank)组、MOS 组和 FOS 组, 每个发酵瓶的总体积均为 100 mL。其中试验组配制为 80 mL 基础培养基+10 mL 菌群接种物+10 mL 底物, 底物浓度为 0.1 g/mL; 空白对照组配制为 90 mL 基础培养基+10 mL 菌群接种物, 不添加底物。每组包含 4 个重复, 每个重复 1 个发酵瓶。接种菌群后, 将发酵瓶置于 37 °C 恒温摇床中进行厌氧发酵, 分别于 0、6、12、24、48 h 进行取样, 记录累积气体产量并收集发酵液样品用于后续 pH 值的测定, 以及 SCFAs、甲酸、乳酸检测和微生物 DNA 的提取。

1.5 指标测定及方法

1.5.1 累积气体产量和发酵液 pH 值

累积气体产量的测定参照 Li 等^[16]的方法, 使用气压转换器进行测量。发酵液 pH 值则使用专业 pH 计(赛默飞世尔科技公司)参照说明书对发酵液样品进行测定。

1.5.2 短链脂肪酸

短链脂肪酸的测定参照 Zhang 等^[17]的方法, 使用气相色谱仪测定 SCFAs 的浓度。

抽取 1 mL 发酵液, 在其中添加 200 μL 25% 的偏磷酸溶液后, 使用小型涡旋仪对其进行涡旋, 使之充分混匀, 随后存放于 -20 °C 过夜。解冻后, 将装有发酵液的离心管 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并通过 0.22 μm 水系聚醚砜滤膜过滤。最终取 0.6 μL 处理后样品进行上机检测。

气相色谱仪分析所用毛细柱(Supelco 公司)

规格为 30 m×0.32 mm×0.25 μm。气相色谱仪具体参数：进样器 220 °C，柱温 140 °C，检测器 210 °C，总流量 38.96 mL/min，色谱柱流量 1 mL/min，载气为氮气，压力为 75 kPa，氧气压力 45 kPa，氢气压力为 55 kPa。

1.5.3 甲酸、乳酸

使用高效液相色谱仪(依利特科技公司)对发酵液中的甲酸、乳酸含量进行测定。提取 0.6 mL 发酵液，在其中添加 120 μL 25% 偏磷酸，置于-20 °C 过夜。解冻后 12 000 r/min 离心 15 min，收集上清液再次离心，随后将上清液用直径 13 mm，孔径 0.22 μm，材质为水系聚醚砜的滤膜过滤后取样进行色谱测定。

色谱分析采用色谱柱(规格为 4.6 mm×150 mm，粒径 5 μm)，流动相由 20 mmol/L KH₂PO₄ 盐溶液与乙腈按 99:1 配比组成，流速设为 0.5 mL/min，检测波长为 210 nm，进样量为 20 μL，柱温保持在 25 °C。标准品选用乳酸(上海源叶生物科技有限公司)和甲酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.5.4 提取发酵液微生物 DNA

发酵液微生物 DNA 的提取参照 Dai 等^[14]的方法并作改良。取 2 mL 发酵液样品，4 °C、9 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，重复进行 2 次以上步骤以富集沉淀。随后加 900 μL CTAB 缓冲液，并转移至含 0.3 g 铅珠的管中进行 1 min 的研磨匀浆(30 Hz)，静置 30 s 后重复 3 次。然后在 70 °C 下孵育 20 min，再 10 000 r/min 离心 10 min，离心完毕后取 700 μL 上清液，向其中加入 5 μL 的 RNA 酶(10 mg/mL)，在 37 °C 下培养 30 min。随后加入等体积 DNA 提取液，涡旋 30 s，并以 13 000 r/min 离心 10 min，收集上清液并重复 2 次。最终取 300 μL 上清液，加入 800 μL 95% 冰乙醇，-20 °C 保存过夜。次日 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min，弃去上清液，加入 500 μL 70% 冰乙醇轻轻摇匀，再离心

5 min 并在室温下干燥 20 min，最后加 50 μL TE 缓冲液对 DNA 进行溶解。DNA 浓度、纯度使用核酸蛋白浓度检测仪器 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司)进行测定，并于 -20 °C 保存备用。

1.5.5 微生物 16S rRNA 基因测序

16S rRNA 基因测序所选择引物为 341 F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')、806 R (5'-G GACTACNNGGGTATCTAAT-3')。PCR 反应体系(20 μL)：5×*FastPfu* Buffer 4 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL，上、下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL，*TransStart FastPfu* DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.4 μL，Template DNA 10 ng，ddH₂O 补至 20 μL。PCR 反应条件：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 45 s，共 35 个循环；72 °C 终延伸 10 min；10 °C 保存。扩增完成后，依照 Illumina 基因组 DNA 文库制备流程构建双端(pair-end)文库。随后在 Illumina 平台(上海百源生物科技有限公司)按照标准方案进行 2×250 bp 双末端测序。获得的原始数据经过严格质量控制和筛选，包括去除低质量及冗余序列、序列拼接与组装，以获得功能操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。

1.6 数据分析

微生物获得 OTU 通过 MicrobiomeAnalyst 在线分析系统(<https://www.microbiomeanalyst.ca/>)，对微生物门、属水平相对丰度、α 多样性和 β 多样性进行分析。

各项测得数据经 Excel 2019 进行初步整理后，使用 SPSS (version 27.0) 软件进行统计分析，包括非参数检验(2 个或以上独立样本的 Kruskal-Wallis 检验)及单因素方差分析(one-way ANOVA, Duncan 多重比较)。绘图采用 GraphPad Prism 8 软件。结果以 $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 产气量及 pH 值

体外微生物发酵 MOS 与 FOS 在各时间点的 pH 和产气量情况如图 1 所示。在空肠微生物作用下, 6、24、48 h 时 MOS 组的产气量显著高于 FOS 组($P<0.05$), 且两组最大产气量相差约 115 mL; 在结肠微生物作用下, 24 h 和 48 h 时 MOS 组的产气量显著高于 FOS 组($P<0.05$)。

MOS 组在空肠发酵中发酵液的 pH 均显著高于 FOS 组($P<0.05$), FOS 可形成较低的酸性环境($P<0.05$); 在结肠发酵中, 两组 pH 无显著差异($P>0.05$)。

2.2 SCFAs 产量

仔猪空肠微生物发酵 MOS 与 FOS 在各时间点产 SCFAs 含量情况如表 1 所示。在 48 h 时, 与 FOS 相比 MOS 极显著地提高了发酵后乙酸含量($P<0.01$)。在 6 h 时, 与 FOS 相比 MOS 极显著地提高了丙酸含量($P<0.01$), 但 MOS 组和 FOS 组的丁酸含量无明显差异。48 h 时 MOS 组总 SCFAs 含量极显著地高于 FOS 组($P<0.01$)。

仔猪结肠微生物发酵 MOS 和 FOS 在各时间点产 SCFAs 情况如表 2 所示。在 24 h 和 48 h 时, 与 FOS 组相比 MOS 组乙酸含量较高($P<0.01$)。随着发酵时间的延长, MOS 组丙酸含量极显著

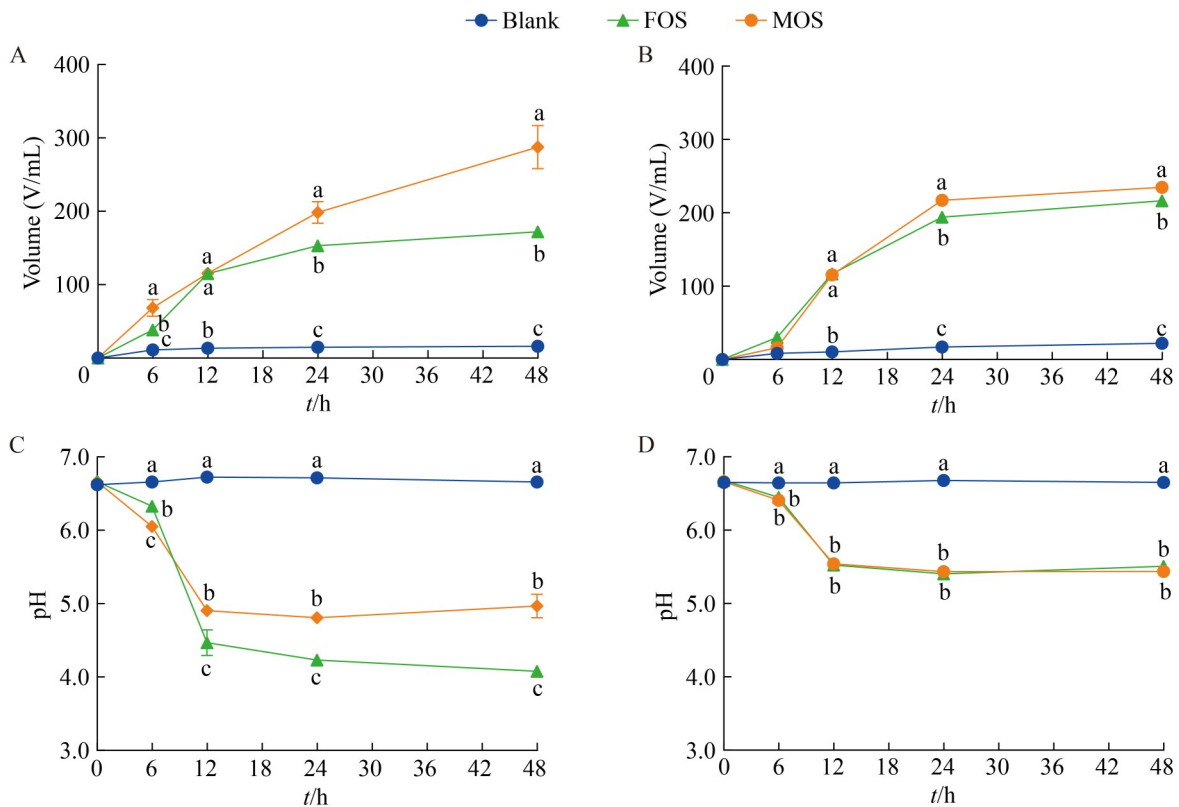


图1 空肠和结肠微生物体外发酵不同时间点pH值和产气量的变化。A: 空肠产气量; B: 结肠产气量; C: 空肠pH; D: 结肠pH。不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Figure 1 Changes in pH and gas production during *in vitro* fermentation by jejunal and colonic microbiota at different time points. A: Gas production of the jejunum; B: Gas production of the colon; C: pH of the jejunum; D: pH of the colon. Different lowercase letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

表1 空肠微生物体外发酵产SCFA含量的动态变化

Table 1 Temporal changes in SCFA production during *in vitro* fermentation by jejunal microbiota

Item	t/h	Blank	MOS	FOS	P-value
Acetate (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	3.17±0.05b	7.99±2.07a	4.49±0.62ab	0.06
	12	4.35±0.20b	8.30±0.97a	9.42±1.09a	<0.01
	24	4.53±0.12b	8.94±1.37a	7.09±1.41ab	0.06
	48	6.27±0.29b	15.35±2.11a	6.64±0.35 b	<0.01
Propionate (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	0.23±0.02a	0.08±0.03b	0.00c	<0.01
	12	0.18±0.06b	0.37±0.04a	0.38±0.07a	0.07
	24	0.50±0.04a	0.59±0.03a	0.34±0.06b	0.01
	48	0.90±0.13b	11.67±3.62a	0.45±0.14b	<0.01
Butyrate (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	0.00	0.29±0.18	0.14±0.06	0.25
	12	0.00	0.10±0.07	0.10±0.03	0.26
	24	0.00	0.20±0.11	0.03±0.03	0.14
	48	0.03±0.01	0.42±0.26	0.01±0.01	0.15
Total SCFAs (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	3.42±0.07b	8.37±2.09a	4.63±0.67ab	0.05
	12	4.53±0.24b	8.77±1.01a	9.90±1.15a	<0.01
	24	5.04±0.11b	9.73±1.45a	7.47±1.50ab	0.06
	48	7.19±0.41b	27.45±3.86a	7.09±0.49b	<0.01

Data are presented as mean±SEM. Groups with different lowercase letters within a row differ significantly ($P<0.05$; $n=4$).

地低于 FOS 组($P<0.01$)。24 h 和 48 h 时 MOS 组丁酸含量极显著地高于 FOS 组($P<0.01$)。48 h 时 MOS 组 SCFAs 的含量高于 FOS 组($P<0.01$)。

2.3 甲酸及乳酸产量

仔猪空肠微生物发酵 MOS 和 FOS 在各时间点产甲酸和乳酸情况如表 3 所示。在 0、12、24 h 时 MOS 组甲酸含量极显著地低于 FOS 组($P<0.01$)，而在 6 h 时 MOS 组甲酸含量高于 FOS 组($P<0.01$)，但 48 h 时两组之间无显著差异。此外，0 h 和 48 h 时 MOS 组乳酸含量极显著地低于 FOS 组($P<0.01$)。

仔猪结肠微生物发酵 MOS 和 FOS 在各时间点产甲酸和乳酸情况如表 4 所示。48 h 时 MOS 组甲酸含量、乳酸含量均极显著地高于 FOS 组($P<0.01$)。

2.4 空肠微生物组成

2.4.1 菌群 α 多样性和 β 多样性

仔猪空肠微生物发酵 MOS 和 FOS 在各时间点的微生物多样性结果如表 5 所示。MOS 组与 FOS 组在覆盖率(Coverage)、Chao1 指数和 ACE 指数无显著差异($P>0.05$)，而 MOS 组在发酵 48 h 的 Shannon 和 Simpson 指数极显著地高于 FOS 组($P<0.01$)。微生物 β 多样性主坐标分析(PCoA)所示(图 2)，随着发酵时间的延长，MOS 组与 FOS 组之间微生物菌群组成在 12 h 时并无明显区分，但在 48 h 时有明显区分。

2.4.2 仔猪空肠微生物菌群门属水平相对丰度

仔猪空肠微生物发酵 MOS 与 FOS 在各时

表2 结肠微生物体外发酵产SCFA含量的动态变化

Table 2 Temporal changes in SCFA production during *in vitro* fermentation by colonic microbiota

Item	t/h	Blank	MOS	FOS	P-value
Acetate (mmol/L)	0	3.86±0.34	3.86±0.34	3.86±0.34	
	6	3.30±0.57b	19.59±0.76a	20.38±0.51a	<0.01
	12	6.06±0.34b	64.84±1.91a	59.22±4.84a	<0.01
	24	15.46±0.18c	84.70±2.52a	73.88±1.13b	<0.01
	48	18.64±0.51c	86.78±2.85a	48.52±8.86b	<0.01
Propionate (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	0.00b	7.54±3.04a	11.89±0.17a	<0.01
	12	2.49±0.19c	32.40±1.06b	46.15±4.14a	<0.01
	24	3.19±0.13c	45.98±3.80b	66.35±2.20a	<0.01
	48	3.63±0.19c	51.93±2.04b	67.21±3.95a	<0.01
Butyrate (mmol/L)	0	0.00	0.00	0.00	
	6	0.00b	7.49±1.94a	9.81±2.82ab	0.02
	12	2.76±0.09b	17.37±0.75a	15.08±1.80a	<0.01
	24	3.52±0.06c	28.74±1.54a	18.96±2.72b	<0.01
	48	4.37±0.40c	35.60±2.49a	29.02±1.07b	<0.01
Total SCFAs (mmol/L)	0	3.86±0.34	3.86±0.34	3.86±0.34	
	6	3.30±0.57b	34.61±4.63a	42.08±3.15a	0.05
	12	11.30±0.49b	114.64±3.63a	120.45±1.58a	<0.01
	24	22.17±0.26b	159.41±5.11a	159.20±2.85a	<0.01
	48	26.65±1.00c	174.31±2.25a	144.74±13.59b	<0.01

Data are presented as mean±SEM. Groups with different lowercase letters within a row differ significantly ($P<0.05$; $n=4$).

表3 空肠微生物体外发酵产甲酸和乳酸含量的动态变化

Table 3 Temporal changes in formate and lactate production during *in vitro* fermentation by jejunal microbiota

Item	t/h	Blank	MOS	FOS	P-value
Formate (mmol/L)	0	0.01±0.00b	0.01±0.00b	0.04±0.00a	<0.01
	6	16.72±0.31b	35.95±3.48a	21.41±2.54b	<0.01
	12	17.55±4.13c	29.48±0.41b	43.21±1.30a	<0.01
	24	18.20±2.50b	19.57±0.84b	34.77±3.17a	<0.01
	48	6.96±0.29b	25.03±3.24a	25.79±1.32a	<0.01
Lactate (mmol/L)	0	3.83±0.03c	4.13±0.03b	4.38±0.03a	<0.01
	6	4.51±0.09b	22.71±3.78a	11.79±6.67ab	0.02
	12	5.59±0.49b	59.48±4.71a	68.70±4.83a	<0.01
	24	3.70±1.29c	61.62±3.35a	70.25±8.55a	<0.01
	48	2.54±0.16c	45.09±10.95b	79.11±0.90a	<0.01

Data are presented as mean±SEM. Groups with different lowercase letters within a row differ significantly ($P<0.05$; $n=4$).

表4 结肠微生物体外发酵产甲酸和乳酸含量的动态变化

Table 4 Temporal changes in formate and lactate production during *in vitro* fermentation by colonic microbiota

Item	t/h	Blank	MOS	FOS	P-value
Formate (mmol/L)	0	4.21±1.06	5.13±0.06	4.58±0.09	0.59
	6	2.90±0.86	5.24±2.44	2.07±0.26	0.34
	12	6.19±0.69	9.66±2.09	6.12±1.34	0.21
	24	6.97±0.22a	2.51±0.67b	2.45±0.33b	<0.01
	48	0.23±0.12b	3.77±0.16a	1.91±0.25b	<0.01
Lactate (mmol/L)	0	0.34±0.06c	2.80±0.06a	2.66±0.04a	<0.01
	6	1.96±0.05	2.24±0.39	1.73±0.03	0.33
	12	0.51±0.04b	2.79±0.09a	3.25±0.29a	<0.01
	24	0.40±0.04b	1.31±0.37a	1.44±0.20a	0.03
	48	0.43±0.04c	1.30±0.04a	0.86±0.12b	<0.01

Data are presented as mean±SEM. Groups with different lowercase letters within a row differ significantly ($P<0.05$; $n=4$).

表5 MOS和FOS对体外发酵空肠微生物菌群 α 多样性的影响Table 5 Effects of MOS and FOS on alpha diversity of jejunal microbiota during *in vitro* fermentation

Item	t/h	Blank	MOS	FOS	P-value
Coverage (%)	0	99.89±0.02	99.88±0.01	99.88±0.02	0.75
	12	99.89±0.01b	99.95±0.01a	99.93±0.01a	<0.01
	48	99.92±0.01b	99.94±0.01ab	99.95±0.01a	0.09
Diversity indices					
Simpson index	0	0.92±0.01	0.89±0.01	0.87±0.03	0.24
	12	0.61±0.02	0.67±0.02	0.67±0.03	0.18
	48	0.75±0.01a	0.79±0.02a	0.66±0.01b	<0.01
Shannon index	0	3.28±0.06a	3.03±0.09b	2.88±0.22b	0.15
	12	1.66±0.06	1.56±0.04	1.57±0.06	0.43
	48	2.19±0.08b	2.09±0.07a	1.60±0.04b	<0.01
Richness					
Chao1 index	0	282.02±8.17	286.03±7.99	265.45±22.28	0.59
	12	171.99±14.82a	99.78±2.85b	123.73±20.41b	0.02
	48	213.05±13.36a	110.74±5.71b	107.77±12.72b	<0.01
ACE index	0	279.64±9.30	286.55±7.61	270.45±22.02	0.74
	12	178.67±14.11a	107.98±2.22b	108.39±4.99b	<0.01
	48	209.71±14.59a	107.58±2.92b	109.66±13.46b	<0.01

Data are presented as mean±SEM. Groups with different lowercase letters within a row differ significantly ($P<0.05$; $n=4$).

间点发酵液菌群门水平相对丰度的变化情况如图 3A 所示。发酵液中的微生物主要由放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、蓝细菌门 (*Cyanobacteriota*)、芽孢杆菌门 (*Bacillota*)、假单胞菌门 (*Pseudomonadota*) 和梭杆菌门

(*Fusobacteriota*)组成。不同底物的优势菌门均为假单胞菌门和芽孢杆菌门。如图 3B 所示, 在 12 h 发酵阶段, 与 FOS 组相比, MOS 组芽孢杆菌门的相对丰度有降低趋势($P=0.057$), MOS 组假单胞菌门的相对丰度有升高趋势($P=0.057$)

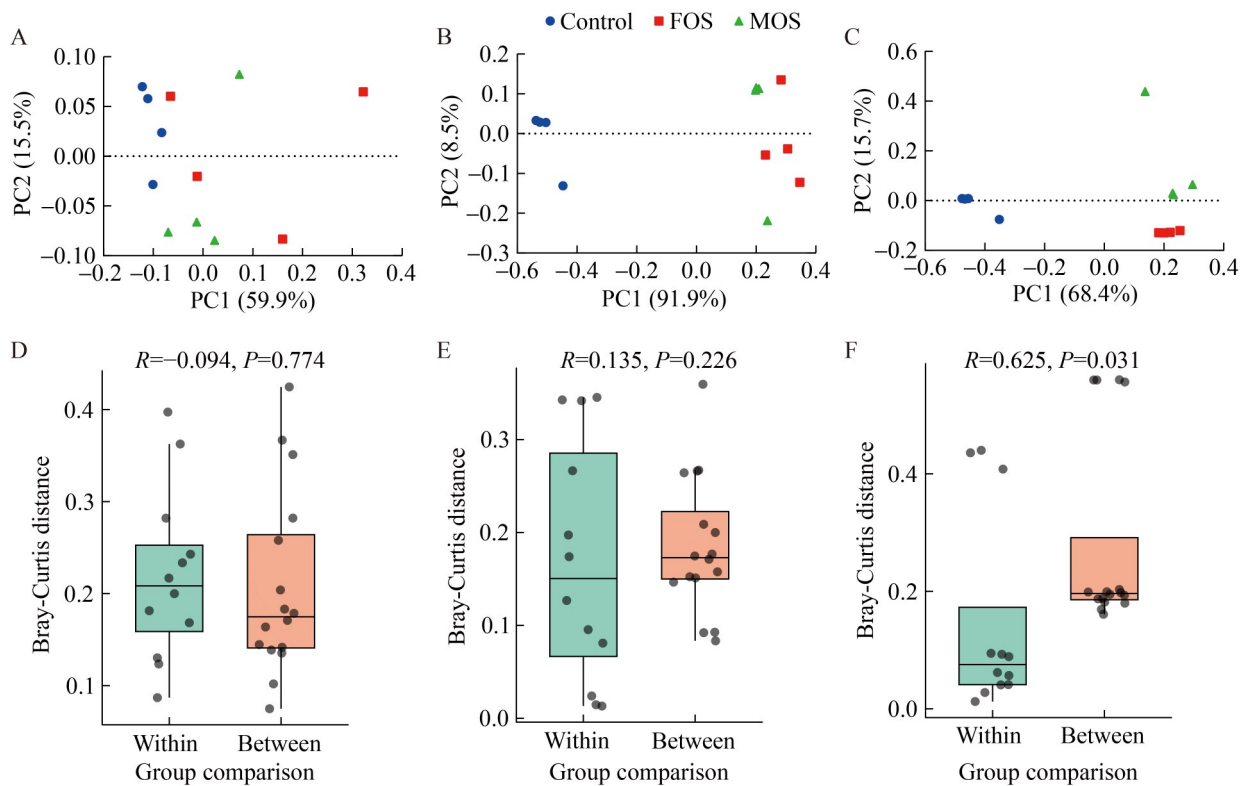


图2 MOS和FOS对体外发酵空肠微生物菌群 β 多样性的影响。A: 0 h菌群PCoA分析; B: 12 h菌群PCoA分析; C: 48 h菌群PCoA分析; D: 0 h PCoA显著性差异分析; E: 12 h PCoA显著性差异分析; F: 48 h PCoA显著性差异分析。

Figure 2 Effects of MOS and FOS on beta diversity of jejunal microbiota during *in vitro* fermentation. A: PCoA analysis of the microbiota at 0 h; B: PCoA analysis of the microbiota at 12 h; C: PCoA analysis of the microbiota at 48 h; D: Significant difference analysis of PCoA at 0 h; E: Significant difference analysis of PCoA at 12 h; F: Significant difference analysis of PCoA at 48 h.

(图 3C)。如图 3D 所示, 随着发酵时间的延长, 在 48 h 时 MOS 组放线菌门的相对丰度显著高于 FOS 组($P<0.05$)。

不同底物随发酵时间的延长, 发酵液菌群属水平相对丰度的变化如图 4 所示。各组的主要优势菌属为链球菌属(*Streptococcus*)、志贺氏菌属-埃希氏菌属(*Escherichia-Shigella*)和 *Clostridium sensu stricto 1* 等(图 4A)。不同组的优势菌属有一定差异: 发酵 12 h 后, 与 FOS 组相比, MOS 组 *Escherichia-Shigella* 的相对丰度有升高趋势($P=0.057$) (图 4B)。发酵 48 h 后, MOS 组双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、黏液乳杆菌属

(*Limosilactobacillus*)和巨球形菌属(*Megasphaera*)的相对丰度显著高于 FOS 组($P<0.05$) (图 4C-4E); MOS 组宿主关联乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)和链球菌属(*Streptococcus*)的相对丰度显著低于 FOS 组($P<0.05$) (图 4F、4G)。

3 讨论与结论

综合本研究结果, MOS 较 FOS 更有利于提升仔猪小肠菌群多样性并优化群落结构。空肠微生物发酵后, MOS 组在发酵 48 h 时的 Shannon 和 Simpson 指数高于 FOS 组, 且两组之间微生物菌群组成在 48 h 时有明显区分。在

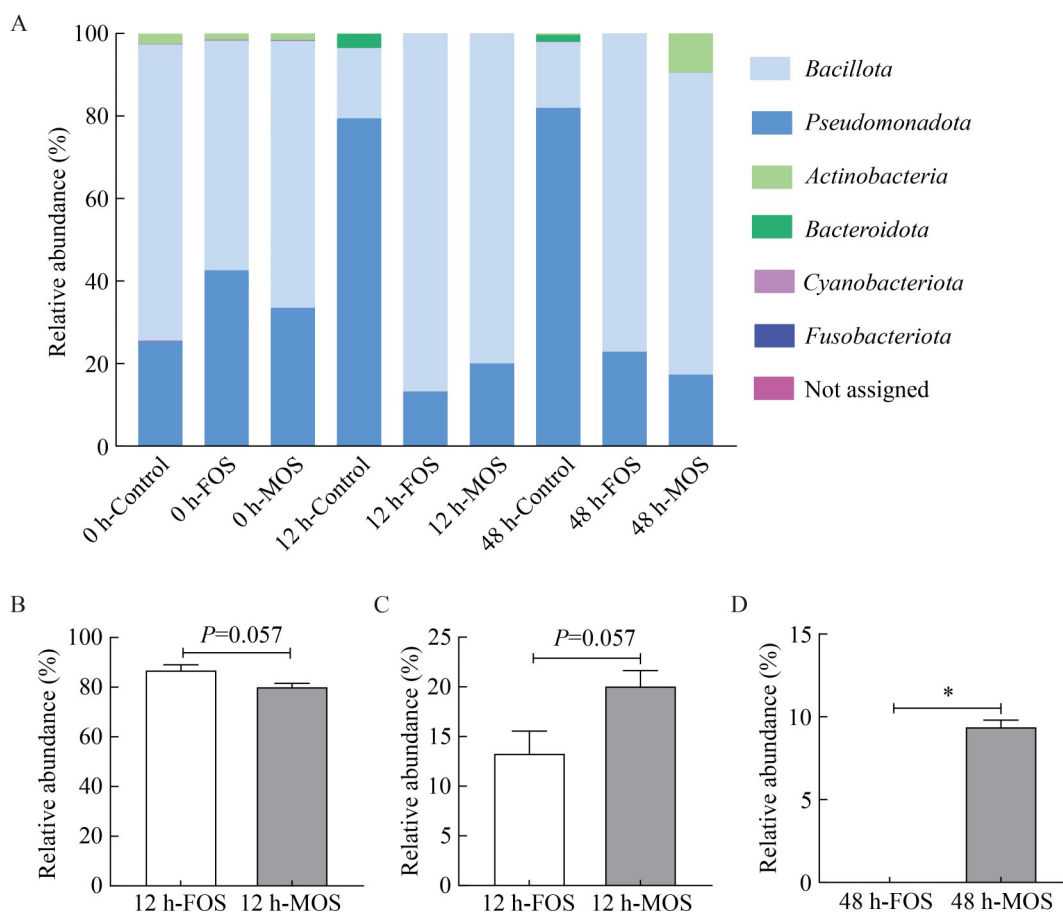


图3 MOS和FOS对体外发酵空肠微生物菌群门水平相对丰度的影响。A: 门水平微生物群落相对丰度柱状图; B: 12 h *Bacillota* 相对丰度组间比较; C: 12 h *Pseudomonadota* 相对丰度组间比较; D: 48 h *Actinobacteria* 相对丰度组间比较。

Figure 3 Effects of MOS and FOS on the relative abundance at phylum level of jejunal microbiota during *in vitro* fermentation. A: Bar plot of microbial community composition at the phylum level; B: Comparison of *Bacillota* abundance between groups at 12 h; C: Comparison of *Pseudomonadota* abundance between groups at 12 h; D: Comparison of *Actinobacteria* abundance between groups at 48 h. *: $P < 0.05$.

门、属水平上, 发酵 48 h 后, MOS 组放线菌门以及 *Bifidobacterium*、*Limosilactobacillus* 和 *Megasphaera* 菌属的相对丰度高于 FOS 组, 而 *Ligilactobacillus* 和 *Streptococcus* 菌属的相对丰度低于 FOS 组。放线菌门中的 *Bifidobacterium* 是重要的益生菌, 有助于肠道健康和免疫调节^[18]。MOS 在空肠发酵时 *Bifidobacterium*、*Limosilactobacillus* 和 *Megasphaera* 的相对丰度显著高于 FOS 发酵组, 提示 MOS 在空肠更有

利于这些有益菌的生长, 特别是 *Bifidobacterium* 的增殖。Jang 等^[19]以 2% MOS 作为碳源评估人类粪便微生物的发酵特性时也发现 MOS 增加了 *Bifidobacterium* 等共生微生物的丰度, 与本研究结果相符。

Limosilactobacillus 和 *Megasphaera* 与代谢产物的生成(如 SCFAs)有关^[20]。SCFA 是微生物发酵产生的主要代谢产物, 它不仅作为宿主的能量来源, 在调控代谢、神经及免疫系统的正

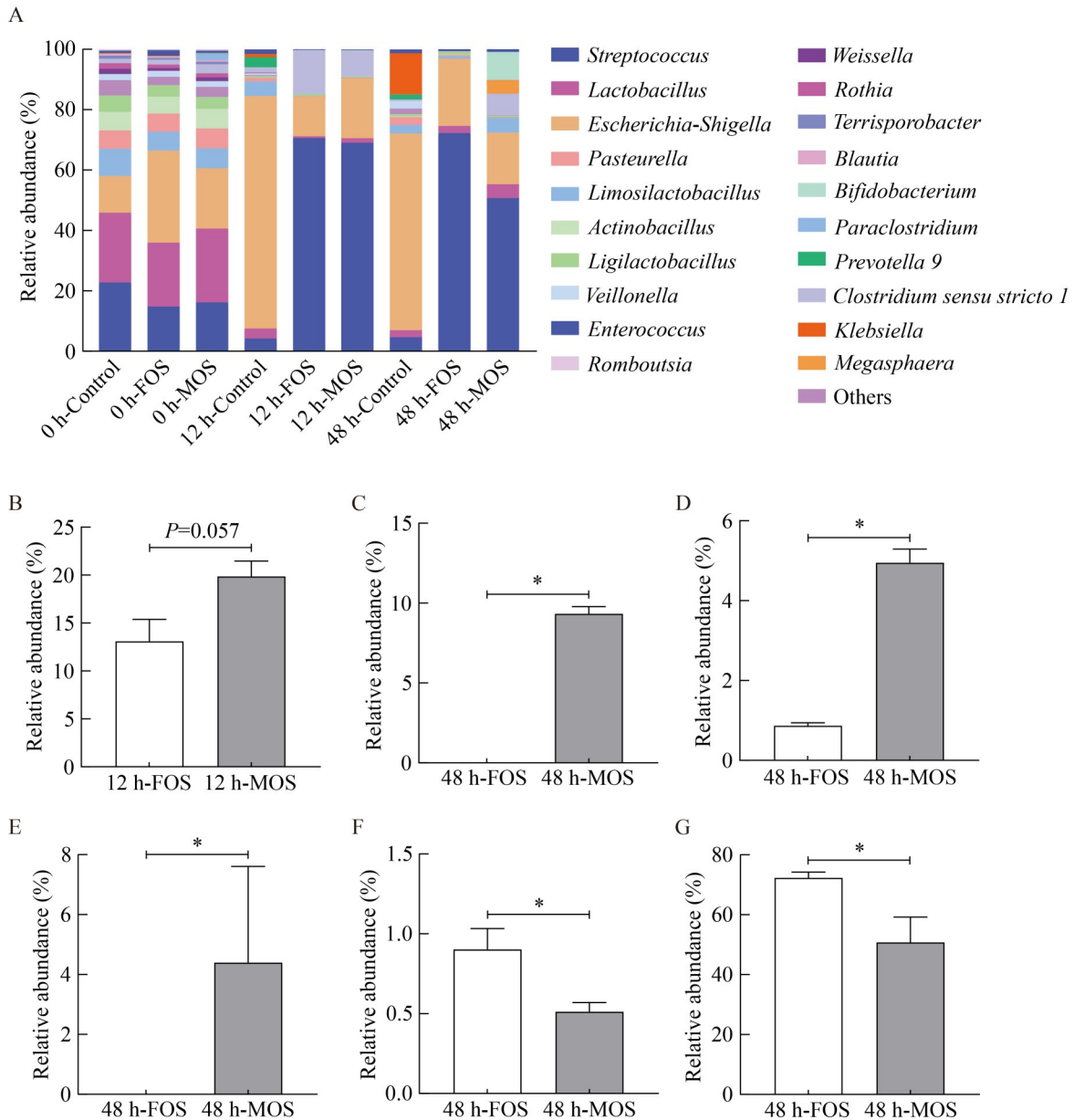


图4 MOS和FOS对体外发酵空肠微生物菌群属水平相对丰度的影响。A：属水平微生物群落相对丰度柱状图；B：12 h *Escherichia-Shigella*相对丰度组间比较；C：48 h *Bifidobacterium*相对丰度组间比较；D：48 h *Limosilactobacillus*相对丰度组间比较；E：48 h *Megasphaera*相对丰度组间比较；F：48 h *Ligilactobacillus*相对丰度组间比较；G：48 h *Streptococcus*相对丰度组间比较。

Figure 4 Effects of MOS and FOS on the relative abundance at genus level of jejunal microbiota during *in vitro* fermentation. A: Bar plot of microbial community composition at the genus level; B: Comparison of *Escherichia-Shigella* abundance between groups at 12 h; C: Comparison of *Bifidobacterium* abundance between groups at 48 h; D: Comparison of *Limosilactobacillus* abundance between groups at 48 h; E: Comparison of *Megasphaera* abundance between groups at 48 h; F: Comparison of *Ligilactobacillus* abundance between groups at 48 h; G: Comparison of *Streptococcus* abundance between groups at 48 h. *: $P < 0.05$.

常功能中起着不可或缺的作用。在空肠微生物发酵条件下,相较于FOS, MOS产生更多的乙酸和丙酸。48 h时MOS组 *Limosilactobacillus*、*Megasphaera* 菌属的相对丰度与乙酸、SCFAs含量呈显著正相关。这提示, MOS通过富集这些产乙酸菌促进了乙酸的生成,为宿主提供了更有效的能量来源,有益于肠道健康。O'Callaghan等^[21]的研究证实了MOS对急性腹泻具有改善作用。

MOS与FOS在仔猪肠道微生物发酵产气量及pH变化方面表现出显著差异。*Bifidobacterium*和*Megasphaera*是已知的产气菌,可利用发酵产生氢气、二氧化碳等气体,*Megasphaera*尤其与产气密切相关^[22]。因此,MOS组在空肠与结肠中更高的产气量,可归因于其特异性富集的产气菌属,如*Bifidobacterium*和*Megasphaera*。对于pH而言,MOS和FOS在发酵过程中均产生了SCFA,所以相对于空白对照组,二者pH均下降,且MOS在发酵前期可以快速降低pH,这对抑制肠道内的病原菌有重要意义。随着SCFA的积累,pH继续降低,有利于建立健康的微生物区系,进一步抑制病原菌生长。FOS组中*Ligilactobacillus*和*Streptococcus*的相对丰度较高,这些菌属主要通过乳酸发酵途径代谢底物,发酵过程会生成较多的乳酸,乳酸酸性较强,使得FOS组发酵液pH低于MOS组。

在有机酸代谢方面,甲酸与乳酸的生成进一步揭示了MOS和FOS的不同发酵特征。甲酸通常是某些微生物代谢的中间产物,其含量变化与底物利用速度和代谢途径有关;而乳酸是乳酸菌(如*Ligilactobacillus*、*Streptococcus*)通过乳酸发酵途径生成的主要代谢产物,也是维持肠道健康的重要能源,可通过菌种间的交叉喂养作为中间代谢物代谢产生乙酸、丙酸和丁酸^[23]。在空肠微生物发酵中,FOS组甲酸含量极显著地高于MOS组,可能是FOS结构较为简单,可被快速降解生成较多的甲酸作为中间

产物。此外,FOS组中乳酸含量较高,提示FOS更倾向于被微生物利用生成乳酸,这正与FOS组*Ligilactobacillus*和*Streptococcus*的相对丰度显著高于MOS组相对应。同时,*Megasphaera*作为乳酸利用菌,也与MOS组空肠发酵中乳酸含量的下降有关。

除此之外,对比空肠与结肠体外发酵,MOS和FOS在不同肠段的代谢差异也值得探讨。空肠发酵反应迅速,MOS通过快速提升菌群多样性并促进乙酸生成,有助于在消化吸收的主要部位强化肠道屏障、抑制病原菌定殖。结肠发酵则更为充分持久,MOS能持续产生更高浓度的乙酸和SCFAs,为宿主提供稳定能量来源并调节全身生理功能。这提示相较于FOS,MOS能够在全肠道协调发挥作用,既能在前端优化微环境,又能在后端高效供能。

综上所述,MOS和FOS展现出了不同的微生物发酵特性。与FOS相比,MOS在整个发酵过程中被肠道菌群利用产生大量乙酸等SCFAs,增加产气量;且能够显著提高空肠*Bifidobacterium*、*Limosilactobacillus*的相对丰度,改善仔猪小肠微生物区系。

作者贡献声明

廉锴锋:数据分析,论文撰写;叶艳新:体外发酵试验;朱伟云:研究方案设计与指导;余凯凡:研究方案设计,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] WEN RQ, LI C, ZHAO MY, WANG HN, TANG YZ. Withdrawal of antibiotic growth promoters in China and its impact on the foodborne pathogen *Campylobacter coli* of swine origin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1004725.
- [2] 王茜,张永明,刘建慧,赵雪城. 抗生素替代物饲料添加剂的研究应用进展[J]. *现代畜牧科技*, 2023(11): 71-75. WANG Q, ZHANG YM, LIU JH, ZHAO XC. *Progress in*

- the research and application of antibiotic substitute feed additives[J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2023(11): 71-75 (in Chinese).
- [3] SONG SK, BECK BR, KIM D, PARK J, KIM J, KIM HD, RINGØ E. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 40-48.
- [4] SIVIERI K, MORALES ML, SAAD SMI, ADORNO MA, SAKAMOTO IK, ROSSI EA. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME® model)[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(8): 894-901.
- [5] Van den ABEELE P, VENEMA K, van de WIELE T, VERSTRAETE W, POSSEMIERS S. Different human gut models reveal the distinct fermentation patterns of arabinoxylin versus inulin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(41): 9819-9827.
- [6] LI M, BAUER LL, CHEN X, WANG M, KUHLENSCHMIDT TB, KUHLENSCHMIDT MS, FAHEY GC, DONOVAN SM. Microbial composition and *in vitro* fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets[J]. *The Journal of Nutrition*, 2012, 142(4): 681-689.
- [7] 秦凯健, 王放, 杨梦琪, 张甜, 戴功建, 余肖, 吴炯. 低聚果糖影响结肠炎小鼠肠黏膜的研究[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(11): 968-974.
- QIN KJ, WANG F, YANG MQ, ZHANG T, DAI GJ, YU X, WU J. The effects of fructo-oligosaccharide on the intestinal mucosa of the mouse with inflammatory bowel disease[J]. *Immunological Journal*, 2017, 33(11): 968-974 (in Chinese).
- [8] MARY PR, HARISH PRASHANTH KV, VASU P, KAPOOR M. Structural diversity and prebiotic potential of short chain β -manno-oligosaccharides generated from guar gum by endo- β -mannanase (ManB-1601)[J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 486: 107822.
- [9] 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.
- [10] KUZMENKO OA, BOMKO V, BABENKO S, HORCHANOK AV, SLOMCHINSKY M, TYTARIOVA O, CHERNYAVSKYY O, PRISJAZHNJUK N. Influence of mannan oligosaccharides for getting high quality and ecologically safe swine production[J]. *Ukrainian Journal of Ecology*, 2018, 8: 225-229.
- [11] YU E, CHEN DW, YU B, HUANG ZQ, MAO XB, ZHENG P, LUO YH, YIN H, YU J, LUO JQ, YAN H, HE J. Mannan-oligosaccharide attenuates inflammation and intestinal epithelium injury in weaned pigs upon enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge[J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 126(7): 993-1002.
- [12] ZHAO PY, JUNG JH, KIM IH. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(3): 833-839.
- [13] 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: 445-462.
- [14] 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.
- [15] 余凯凡, 张福哲, 朱伟云. 猪不同肠段微生物体外培养对蛋氨酸的代谢特性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(5): 784-792.
- YU KF, ZHANG FZ, ZHU WY. Metabolic characteristics of methionine by *in vitro* fermentation with bacteria from different swine intestinal segment[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5): 784-792 (in Chinese).
- [16] LI YQ, HOU ZS, SHI QC, CHENG YF, ZHU WY. Methane production from different parts of corn stover via a simple co-culture of an anaerobic fungus and methanogen[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 314.
- [17] 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.
- [18] BINDA C, LOPETUSO LR, RIZZATTI G, GIBIINO G, CENNAMO V, GASBARRINI A. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2018, 50(5): 421-428.
- [19] JANG EY, HONG KB, CHANG YB, SHIN J, JUNG EY, JO K, SUH HJ. *In vitro* prebiotic effects of malto-oligosaccharides containing water-soluble dietary fiber[J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 5201.
- [20] LEE J, D'AIGLE J, ATADJA L, QUAICOE V, HONARPISHEH P, GANESH BP, HASSAN A, GRAF J, PETROSINO J, PUTLURI N, ZHU L, DURGAN DJ, BRYAN RM Jr, McCULLOUGH LD, VENNA VR. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids promote poststroke recovery in aged mice[J]. *Circulation Research*, 2020, 127(4): 453-465.
- [21] O'CALLAGHAN A, van SINDEREN D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 925.
- [22] MUTUYEMUNGU E, MOTTA-ROMERO HA, YANG QN, LIU SJ, LIU SA, SINGH M, ROSE DJ. *Megasphaera elsdenii*, a commensal member of the gut microbiota, is associated with elevated gas production during *in vitro* fermentation[J]. *Gut Microbiome*, 2023, 5: e1.
- [23] DETMAN A, MIELECKI D, CHOJNACKA A, SALAMON A, BŁASZCZYK MK, SIKORA A. Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 36.