

合生元组合筛选及对仔猪生产性能和腹泻的影响

戴兆来, 董红军, 林勇, 黄瑞华, 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用体外法对4种化学益生菌和4株乳酸菌(S1、L7、L17和L18)进行了合生元组合的筛选,并在仔猪上进行了饲养试验。结果表明:4株乳酸菌均能利用菊粉(inulin)和果寡糖(FOS)产生乳酸,只有S1和L18能利用低聚木糖(XOS),低聚异麦芽糖(IMO)只能被S1利用。当以果寡糖和菊粉混合物(FOS+inulin,质量比为2:8)为底物时,各株乳酸菌生长良好,产乳酸量高,其次为果寡糖和低聚木糖混合物(FOS+XOS,质量比为1:1)。当以FOS+inulin为底物,4株乳酸菌混合培养时,24h产乳酸量最高,为 $(23.49 \pm 0.67) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以FOS+inulin为底物时,S1和混合乳酸菌均能很好地抑制肠毒素大肠杆菌 K_{88} 和混合大肠杆菌的生长,混合乳酸菌的抑菌效果优于单菌S1。饲养试验结果表明,添加乳酸菌、化学益生菌或合生元均可降低哺乳期、断奶期仔猪腹泻率,增加断奶后仔猪平均日增重,降低料重比,其中合生元作用效果最优,其次为混合化学益生菌,最后为乳酸菌,混合乳酸菌组优于单独使用S1组。结果提示,混合乳酸菌与FOS+inulin组合以及与FOS+XOS组合具有减少腹泻,提高生长性能的作用,可用于断奶期仔猪饲料。

关键词: 乳酸菌; 化学益生菌; 合生元; 肠毒素大肠杆菌; 仔猪

中图分类号: S825.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030(2008)02-0081-05

Screening of lactic acid bacteria and prebiotics for synbiotics and their effects on piglets

DAI Zhao-lai, DONG Hong-jun, LIN Yong, HUANG Rui-hua, ZHU Wei-yun*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Prebiotics (inulin, fructo-oligosaccharide (FOS), xylo-oligosaccharide (XOS) and isomalt-oligosaccharide (IMO)) and lactic acid bacteria (LAB) (S1, L7, L17 and L18) were selected for the screening of synbiotics. Their effects on diarrhea rate and growth performance of piglets were confirmed. Results showed that, both inulin and FOS stimulated the growth of four strains of LAB. S1 and L18 could utilize XOS, but only S1 could use IMO. With FOS + inulin ($m:m=2:8$) as substrate, mixed culture of LAB (Lm) was able to produce largest amount of lactate ($(23.49 \pm 0.67) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) after 24 h of fermentation. Both S1 and Lm inhibited the growth of K_{88} and mixed culture of four *Escherichia coli* strains (Km). Compared to LAB (S1 or Lm) and prebiotics (FOS + XOS or FOS + inulin), synbiotics especially Lm combined with FOS + inulin or FOS + XOS ($m:m=1:1$) could significantly decrease diarrhea rate both before and after weaning. Only Lm + (FOS + inulin) was observed to significantly improve daily weight gain before weaning. After weaning, daily weight gain increased and feed/gain ratio decreased in all treatment groups. This effect was greater in synbiotics groups than in LAB groups and prebiotics groups. The results suggest that combination of mixed LAB with FOS + inulin or FOS + XOS may be effective in feeds for weaning piglets.

Key words: lactic acid bacteria; prebiotics; synbiotics; enterotoxigenic *Escherichia coli*; piglet

益生菌是一类对宿主动物健康有益,促进肠道微生物区系平衡的活微生物,如乳酸杆菌、双歧杆菌,而化学益生菌是一类不被宿主消化酶消化,在结肠选择性促进特定细菌的生长与活动,增进宿主健康的食物成分,如寡糖;合生元是益生菌和化学益生菌的组合^[1]。益生菌或化学益生菌在猪生产中有较好的效果,如增加断奶前后仔猪的日增重,促进免疫系统发育,增加断奶仔猪肠道乳酸菌和双歧杆菌数从而减少腹泻发生^[2-5]。已有少量合生元在仔猪上应用的研究^[3],但合生元组合单一。本试验选用分离自健康仔猪肠道的乳酸菌和商品用化学益生菌对合生元组成进行了筛选,并对仔猪的作用效果进行了比较。

收稿日期: 2006-12-15

基金项目: 国家重大基础计划(2004CB117500-4); 国家杰出青年基金(30025034); 江苏省高校新技术转化项目(JH03-043)

作者简介: 戴兆来, 硕士研究生。* 通讯作者: 朱伟云, 教授, 博导, 主要从事动物消化道微生物学研究, E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 菌株和化学益生菌

4 株乳酸菌 (S1、L7、L17 和 L18) 由本研究室分离自健康仔猪肠道, 有良好的产酸能力和抑菌特性^[6-7]。肠毒素大肠杆菌 (K₈₈、K₉₉、O₁₄₁ 和 987P) 由本研究室保存。菊粉 (inulin, 纯度大于 90%) 和果寡糖 (FOS, 纯度大于 55%) 购自江南大学; 低聚木糖 (XOS, 纯度大于 35%) 由山东龙力生物科技有限公司馈赠; 低聚异麦芽糖 (IMO, 纯度大于 90%) 由广东溢多利公司馈赠。

1.2 体外筛选试验

培养基: MRS 液体培养基^[8]用于活化和培养乳酸菌, MRS 固体培养基 (MRS 液体培养基中加入 15 g · L⁻¹的琼脂) 用于计数乳酸菌活菌数。Mueller-Hinton 液体培养基^[9]用于活化和培养大肠杆菌, 麦康凯培养基用于计数大肠杆菌活菌数。基础培养基^[9]用于乳酸菌生长试验和乳酸菌抑菌试验。麦康凯培养基购自北京奥博星生物技术有限公司, 其他试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

乳酸菌生长试验: 将活化后的 4 株乳酸菌按体积分数为 2% 的接种量分别接种到含 10 g · L⁻¹化学益生菌的基础培养基的血清瓶中 (培养起始点每血清瓶含 100 mL 培养液, 每处理 3 重复), 37 °C 厌氧培养 48 h 后测定发酵液 pH 值。根据试验结果 (表 1), 选择能促进多株乳酸菌生长的化学益生菌进行组合, 组合后的复合化学益生菌 (FOS + XOS 和 FOS + inulin) 与不同的单株乳酸菌或复合乳酸菌组合 (试验分组见图 1、表 2 和表 3), 进行发酵试验, 方法同上。分别于 6、8、12 和 24 h 取出血清瓶采样, 用 Barker 等^[10]的方法测定发酵液乳酸浓度。

乳酸菌抑菌试验: 将活化后的大肠杆菌 (单株大肠杆菌 K₈₈ 或 4 株大肠杆菌混合物 (Km)) 和乳酸菌 (S1 或 4 株乳酸菌混合物 (Lm)) 分别按体积分数为 1% 接种量接种到含有 10 g · L⁻¹ FOS + inulin 基础培养基的血清瓶中 (试验分组见图 2, “+”表示共培养), 37 °C 厌氧培养 24 h, 于 0、12 和 24 h 取出血清瓶采样, 用平板计数法计数发酵液中乳酸菌和大肠杆菌活菌数。

1.3 饲养试验

试验于 3 月至 5 月在江苏省大丰某猪场进行。选取 27 窝胎次相近, 每窝大于 10 头的杜 × 长 × 大新生仔猪, 随机分成 9 组, 各组仔猪平均初始体重相近。各组仔猪分别于 7 ~ 10 日龄和 19 ~ 22 日龄每天 8:00 经口饲喂乳酸菌、化学益生菌或合生元 (每头仔猪 2 mL, 活菌数 10¹⁰ CFU · mL⁻¹, 化学益生菌质量浓度为 50 g · L⁻¹, 合生元为乳酸菌和化学益生菌按 1:1 体积比混合), 试验分组见表 4。试验期 35 d, 7 日龄开食, 21 日龄断奶, 日粮不含抗生素, 常规饲养管理。每天记录每窝仔猪腹泻情况和耗料量及每周窝重。

1.4 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 并用 SPSS 软件对数据进行方差分析和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 化学益生菌对乳酸菌生长及产乳酸的影响

根据 Fooks 等^[9]的研究, 以发酵 48 h 后发酵液 pH 值降到 4.5 以下作为判断某种化学益生菌具有选择性促进作用的依据。由表 1 可知, 4 株乳酸菌均很好地利用菊粉和果寡糖产生乳酸。当以 XOS 为底物时, S1 和 L18 生长良好。只有 S1 能很好利用 IMO, 其他 3 株乳酸菌均不能很好利用。

图 1 显示, 发酵 6 h, 复合化学益生菌 FOS + inulin 和 FOS + XOS 促进 S1 产乳酸能力显著高于单一化学益生菌 ($P < 0.05$); 发酵 8 h, inulin 和 FOS + inulin 组产乳酸量显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。inulin 和 FOS + inulin 促进 L7 产乳酸的能力显著高于 FOS ($P < 0.05$)。发酵 8 h, FOS + inulin 促进 L17

表 1 以不同化学益生菌为底物时乳酸菌的生长状况

Table 1 The growth of LAB in presence of prebiotics

益生菌 Prebiotics	乳酸菌 Lactic acid bacteria (LAB)			
	S1	L7	L17	L18
菊粉 Inulin	+	+	+	+
果寡糖 FOS	+	+	+	+
低聚木糖 XOS	+	-	-	+
低聚异麦芽糖 IMO	+	-	-	-

注: 1) “+”和“-”分别表示培养 48 h 后, 发酵液 pH 值低于或高于 4.5。“+”and“-”represent culture pH value below or above 4.5 after 48 h fermentation.

2) FOS: Fructo-oligosaccharide; XOS: Xylo-oligosaccharide; IMO: Isomalt-oligosaccharide. The same as follows.

产乳酸能力显著高于单独使用 FOS 或 inulin ($P < 0.05$)。发酵 6 h, FOS + XOS 能显著促进 L18 产乳酸, XOS 组优于含 inulin 组; 8 h 后, 这种差异不显著。

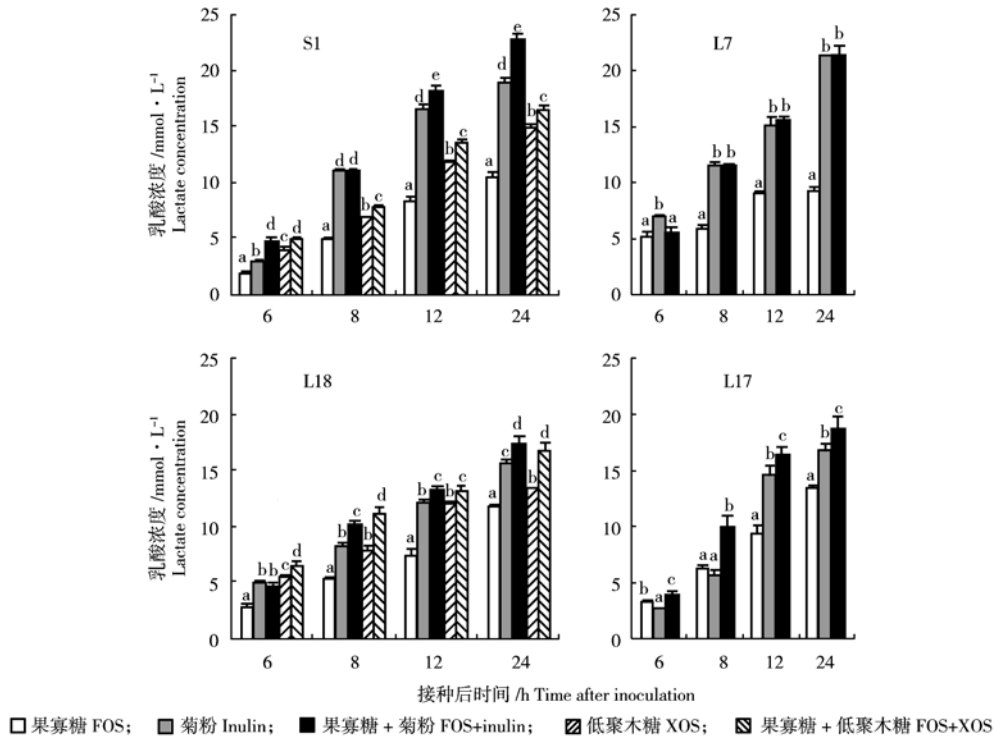


图 1 以不同化学益生菌为底物时培养不同时间培养液的乳酸浓度

Fig. 1 Effect of different prebiotics on lactate concentration of different LAB cultures

当以 FOS + XOS 为底物时 (表 2), S1 产乳酸的速率最快, 累积产量最多, 单菌产乳酸能力优于混合菌。当以 FOS + inulin 为底物时 (表 3), Lm 产乳酸最快, 产量最多; 发酵 6 h, S1 产乳酸量居中; 发酵 12 h, S1 产乳酸量与 Lm、S1 + L7 + L17 及 S1 + L7 + L18 产乳酸量差异不显著, 但显著高于其他各组 ($P < 0.05$); 发酵 24 h, S1 产乳酸量显著低于 Lm ($P < 0.05$), 与 S1 + L7 和 S1 + L7 + L18 无显著差异 ($P > 0.05$), 但显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。

表 3 以 FOS + inulin 为底物乳酸菌发酵液的乳酸浓度
Table 3 Lactate concentration in mixed culture fermentation of LAB using FOS + inulin as substrate

组别 Groups	接种后时间/h Time after inoculation		
	6	12	24
S1	8.12 ± 0.41 ^d	19.39 ± 0.36 ^a	22.00 ± 1.26 ^b
S1 + L7	4.58 ± 0.11 ^f	18.46 ± 0.54 ^b	21.03 ± 0.39 ^{bcd}
S1 + L17	5.14 ± 0.20 ^f	13.52 ± 0.62 ^e	20.19 ± 0.79 ^{cd}
S1 + L18	6.47 ± 1.69 ^e	15.66 ± 0.28 ^{cd}	20.20 ± 0.26 ^{cd}
L7 + L17	6.74 ± 0.23 ^e	17.24 ± 0.44 ^b	20.54 ± 0.76 ^{cd}
L7 + L18	6.46 ± 0.17 ^e	15.98 ± 0.31 ^c	20.11 ± 0.27 ^d
L17 + L18	8.77 ± 0.17 ^c	15.18 ± 0.62 ^d	18.04 ± 0.36 ^f
S1 + L7 + L17	7.76 ± 0.21 ^d	18.76 ± 0.35 ^a	19.16 ± 0.53 ^e
S1 + L7 + L18	9.32 ± 0.42 ^b	19.24 ± 0.14 ^a	21.22 ± 0.30 ^{bc}
Lm (mixed LAB)	10.16 ± 0.24 ^a	19.36 ± 0.12 ^a	23.49 ± 0.67 ^a

表 2 FOS + XOS 为底物时乳酸菌发酵液的乳酸浓度

Table 2 Lactate concentration in mixed culture fermentation of LAB using FOS + XOS as substrate

组别 Groups	接种后时间/h Time after inoculation		
	8	12	24
S1	9.85 ± 0.18 ^a	14.75 ± 0.39 ^a	15.86 ± 0.24 ^a
L18	6.23 ± 0.35 ^e	11.24 ± 0.32 ^c	15.92 ± 0.29 ^a
S1 + L18	8.95 ± 0.23 ^b	12.09 ± 0.28 ^b	14.75 ± 0.45 ^b

注: 同列数据后上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Values in the same column with different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as follows.

2.2 以 FOS + inulin 为底物时乳酸菌对大肠杆菌的抑制作用

由图 2 可知, 培养 12 h, 混合乳酸菌与大肠杆菌共培养组 (Lm + K₈₈ 和 Lm + Km) 中大肠杆菌总活菌数下降 (从 10¹² ~ 10¹⁰ CFU · mL⁻¹), 显著低于 K₈₈ 组和混合大肠杆菌 Km 组 ($P < 0.05$), 混合乳酸菌组间无显著差异; 乳酸菌活菌数有所增加 (从 10⁹ ~ 10¹² CFU · mL⁻¹ 以上)。培养 24 h, 混合乳酸菌组的大肠杆菌总活菌数均显著降低 (小于 10⁴ CFU · mL⁻¹), S1 + K₈₈ 组未检测到活大肠杆菌; 各组乳酸菌活菌数均有所下降。结果表明, 以 FOS + inulin 为底物时, S1 和混合乳酸菌均能很好地抑制大肠杆菌的生长, S1 能较好地抑制 K₈₈ 的生

长；对混合大肠杆菌，混合乳酸菌的抑制效果优于单菌 S1。

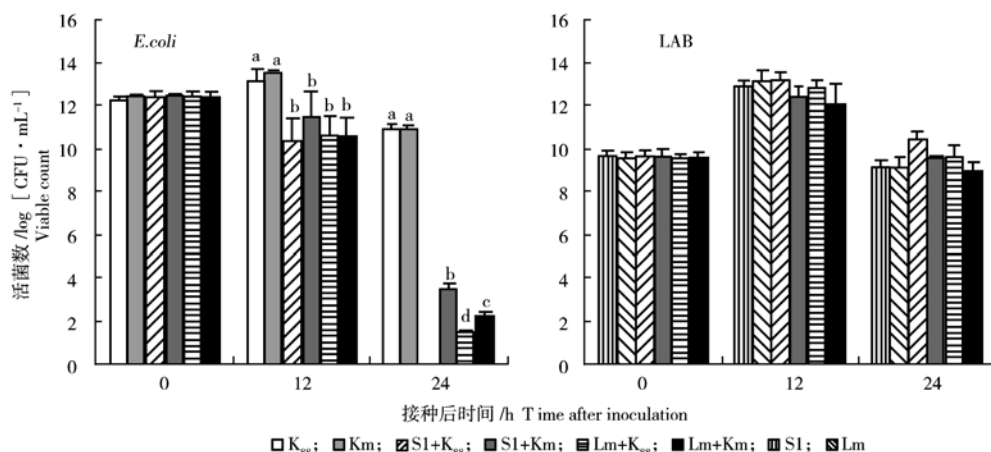


图 2 以 FOS + inulin 为底物大肠杆菌及乳酸菌混合培养发酵液中总活菌数

Fig. 2 Viable count of *E. coli* and LAB in mixed culture fermentation using FOS + inulin as substrate

2.3 对仔猪生产性能与腹泻的影响

由表 4 可知，哺乳期（1~21 日龄），各处理组平均日增重均高于对照，除合生元 Lm + (FOS + inulin) 显著高于对照外，其他各组与对照相比差异不显著；各处理组的腹泻率均显著低于对照组 ($P < 0.05$)，合生元 Lm + (FOS + inulin) 组的腹泻率比对照降低了 46%。断奶（22 日龄）至 35 日龄，各处理组平均日增重均高于对照组，其中合生元 Lm + (FOS + XOS) 组和合生元 Lm + (FOS + inulin) 组与对照相比差异显著 ($P < 0.05$)；与对照相比，各处理组均显著降低了断奶后 2 周内的料重比 ($P < 0.05$)，合生元 Lm + (FOS + XOS) 组和合生元 Lm + (FOS + inulin) 组显著低于乳酸菌组和化学益生菌组 ($P < 0.05$)；与对照相比，各处理显著降低了断奶后 2 周内的腹泻率 ($P < 0.05$)，Lm + (FOS + XOS) 组腹泻率降低 57%。

表 4 饲养试验各组日增重、料重比和腹泻率

Table 4 Effect of prebiotics, LAB and synbiotics on daily weight gain, feed/gain ratio and diarrhea rate of piglet

组别 Groups	日增重/g Daily weight gain		料重比 Feed/Gain ratio	腹泻率/% Diarrhea rate	
	1~21 日龄	22~35 日龄	22~35 日龄	1~21 日龄	22~35 日龄
	1-21 day-old	22-35 day-old	22-35 day-old	1-21 day-old	22-35 day-old
Control	189.3 ± 5.5 ^a	193.8 ± 11.3 ^a	1.64 ± 0.04 ^a	11.6 ± 1.0 ^a	10.7 ± 2.5 ^a
S1	198.0 ± 20.7 ^{ab}	197.9 ± 37.4 ^{ab}	1.53 ± 0.04 ^b	8.7 ± 0.9 ^b	7.9 ± 0.4 ^b
Lm	194.3 ± 11.6 ^{ab}	207.6 ± 25.1 ^{ab}	1.52 ± 0.05 ^b	7.5 ± 0.5 ^c	7.1 ± 0.7 ^b
FOS + XOS	212.0 ± 19.3 ^{ab}	211.5 ± 8.0 ^{ab}	1.49 ± 0.06 ^{bc}	7.2 ± 0.4 ^{cd}	6.3 ± 1.0 ^{bc}
FOS + inulin	196.7 ± 6.5 ^{ab}	214.9 ± 19.6 ^{ab}	1.52 ± 0.02 ^b	7.3 ± 0.4 ^{cd}	6.6 ± 0.4 ^{bc}
S1 + (FOS + XOS)	203.0 ± 18.4 ^{ab}	218.3 ± 20.6 ^{ab}	1.46 ± 0.05 ^{cd}	7.4 ± 0.2 ^{cd}	5.4 ± 0.9 ^c
Lm + (FOS + XOS)	208.3 ± 14.5 ^{ab}	230.6 ± 2.8 ^b	1.42 ± 0.03 ^d	6.8 ± 0.6 ^{cd}	4.5 ± 1.0 ^c
S1 + (FOS + inulin)	209.7 ± 12.7 ^{ab}	221.2 ± 10.5 ^{ab}	1.46 ± 0.02 ^{cd}	6.7 ± 0.6 ^{cd}	5.0 ± 0.2 ^c
Lm + (FOS + inulin)	220.0 ± 10.6 ^b	231.9 ± 4.3 ^b	1.42 ± 0.03 ^d	6.2 ± 0.6 ^d	4.6 ± 1.6 ^c

3 讨论

本研究表明，4 株乳酸菌能很好利用果寡糖和菊粉，低聚木糖只能被部分乳酸菌利用。与单一化学益生菌相比，果寡糖与菊粉或与低聚木糖联用可促进乳酸菌产乳酸，菊粉组优于低聚木糖组。可能是不同化学益生菌成分之间的互补，增强了其对乳酸菌生长和产乳酸的作用。FOS 是由多种低聚糖组成的混合物。有研究显示，不同细菌对其各种单体的利用不同，*Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus rhamnosus* 能代谢三糖和四糖片段，而不能代谢五糖片段；对半乳低聚糖 (galacto-oligosaccharide, GOS) 的研究显示，*L. rhamnosus* 优先利用其中的单糖和双糖，而 *Bacillus lactis* 在三糖和四糖的培养基中能更好生长；GOS 能诱导 *Bifidobacterium adolescentis* 产生专一性的半乳糖苷酶^[11]。Smiricky-Tjardes 等^[12] 的研究表明，以不同寡糖为碳源，猪粪样为接种物，体外发酵 12 h，FOS 和 XOS 产生的总挥发性脂肪酸较高并且 FOS 产丁酸量最多，短链果寡糖比中链和长链果寡糖产乙酸和丙酸的速率更快。可见，不同细菌对不同化学益生菌的利用存在差异，化学益生菌的结构对其功能的发挥有影响。

本研究还表明, 联用乳酸菌和化学益生菌饲喂开食和断奶期的仔猪可显著降低仔猪这两个阶段的腹泻率, 提高断奶后仔猪日增重, 降低料重比, 效果优于单独使用乳酸菌或化学益生菌。与体外试验相比, 虽然 S1 + (FOS + XOS) 组乳酸产量低于 S1 + (FOS + inulin) 组, 但却与其有相似的促进仔猪健康和提高生长性能的作用, 可能是乳酸菌和化学益生菌共同作用促进了仔猪肠道其他有益菌的生长, 提高肠道挥发性脂肪酸含量, 从而发挥作用。

本研究通过体外筛选得到较优的合生元组合为混合乳酸菌与 FOS + inulin 组合以及与 FOS + XOS 组合。但仔猪肠道健康受多种因素影响, 不同营养及功能性物质与消化道微生物的交互作用及对肠道健康的具体作用机制仍不明, 因此有待深入研究, 作用效果也需要更多试验的验证。

参考文献:

- [1] Collins M D, Gibson G R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 69: 1052S - 1057S
- [2] Nemcova R, Bomba A, Gancarcikova S, et al. Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosaccharides on the faecal microflora in weanling piglets [J]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 1999, 112: 225 - 228
- [3] Shim S B, Verstegen M W, Kim I H, et al. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota [J]. *Archive in Animal Nutrition*, 2005, 59(6): 419 - 427
- [4] 黄俊文, 林映才, 冯定远, 等. 纳豆菌、甘露寡糖对仔猪肠道 pH、微生物区系及肠黏膜形态的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1021 - 1027
- [5] 张常明, 李路胜, 王修启, 等. 乳酸菌对断奶仔猪生产性能及免疫力的影响 [J]. *华南农业大学学报*, 2006, 27(3): 81 - 84
- [6] 吴惠芬, 毛胜勇, 姚文, 等. 猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32: 81 - 86
- [7] 吴惠芬, 毛胜勇, 姚文, 等. 2 株猪源乳酸菌对低 pH 值和胆盐耐受性及热稳定性研究 [J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24: 265 - 268
- [8] de Man J C, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli [J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1960, 23: 130 - 135
- [9] Fooks L J, Gibson G R. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* [J]. *Anaerobe*, 2003, 9: 231 - 242
- [10] Barker S B, Summerson W H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1941, 138: 535 - 554
- [11] Rastall R A, Maitin V. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 490 - 496
- [12] Smiricky-Tjardes M R, Flickinger E A, Grieshop C M, et al. *In vitro* fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81: 2505 - 2514

责任编辑: 周广礼