

方桂友, 刘景, 郭庆, 等. 低蛋白饲料添加 Glu 和 Arg 对断奶仔猪肠道代谢产物与菌群的影响 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (10): 1176–1184.

FANG G Y, LIU J, GUO Q, et al. Effects of Low Protein Diet Supplemented with Glutamate and Arginine on Intestinal Metabolites and Microbiota of Weaned Piglets [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (10): 1176–1184.

低蛋白饲料添加 Glu 和 Arg 对断奶仔猪肠道代谢产物与菌群的影响

方桂友¹, 刘 景¹, 郭 庆¹, 林长光^{1,2}, 董志岩^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建光华百斯特生态农牧发展有限公司, 福建 福州 350003)

摘 要:【目的】探讨较大程度降低饲料粗蛋白质 (Crude protein, CP) 水平后添加必需氨基酸、谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道代谢产物和微生物菌群的影响。【方法】试验选用 192 头、日龄 (26±2) d 的健康“杜长大”三元杂交断奶仔猪, 平均初始体重为 (6.96±0.29) kg, 随机分成 4 个处理组, 每组 6 个重复, 每个重复 8 头猪, 试验期 16 d。组 I 为对照组, 饲料 CP 水平为 21.16%; 组 II 为低 CP 饲料组, 饲料 CP 水平为 15.97%, 补充必需氨基酸 (L-赖氨酸、DL-蛋氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸); 组 III 在组 II 基础上添加 1.50% 谷氨酸 (Glu); 组 IV 在组 II 基础上添加 1.50% Glu 和 1.00% 精氨酸 (Arg)。于正式试验期第 11~13 d 测定各处理断奶仔猪肠道代谢产物成分及微生物群落组成。【结果】组 II、组 III 和组 IV 断奶仔猪粪样腐胺和亚精胺含量均显著低于组 I ($P<0.05$), 组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$), 尸胺含量组 II 和组 III 显著低于组 I 和组 IV ($P<0.05$), 组 I 显著低于组 IV ($P<0.05$), 组 II 和组 III 间差异不显著 ($P>0.05$)。粪样乙酸和丙酸含量各组间差异不显著 ($P>0.05$), 丁酸含量组 II、组 III 和组 IV 显著高于组 I ($P<0.05$), 组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$)。仔猪肠道菌群丰富度和多样性组 II、组 III 和组 IV 显著高于组 I ($P<0.05$)。仔猪粪样菌群组成在门分类水平上, 组 II、组 III 和组 IV 厚壁菌门 (Firmicutes) 相对丰度显著高于组 I ($P<0.05$), 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度显著低于组 I ($P<0.05$)。在科属分类水平上, 各组菌群组成亦有较大差异, 组 II、组 III 和组 IV 梭菌目下未明确的科和梭菌目下未明确的属相对丰度显著高于组 I ($P<0.05$), 普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 和丁酸球菌属 (Lachnospiraceae) 相对丰度显著低于组 I ($P<0.05$), 组 IV 毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 和布劳特氏菌属 (Blautia)、乳杆菌属 (Lactobacillus) 相对丰度显著高于组 I ($P<0.05$), 组 IV 消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 和土孢杆菌属 (Terrisporobacter) 相对丰度显著低于组 I ($P<0.05$)。【结论】将饲料 CP 水平从 21.16% 降低至 15.97%, 平衡重要必需氨基酸并补充 Glu+Arg, 能降低断奶仔猪肠道生物胺含量, 提高丁酸含量, 增加肠道菌群多样性和丰富度, 影响肠道菌群组成。

关键词: 低蛋白质饲料; 谷氨酸; 精氨酸; 肠道代谢产物; 菌群; 断奶仔猪

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 10-1176-09

Effects of Low Protein Diet Supplemented with Glutamate and Arginine on Intestinal Metabolites and Microbiota of Weaned Piglets

FANG Guiyou¹, LIU Jing¹, GUO Qing¹, LIN Changguang^{1,2}, DONG Zhiyan^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Research, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Fujian Guanghua Best Eco-Agriculture Development Co., Ltd., Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: 【Objective】Effects of a highly reduced crude protein diet supplemented with glutamate (Glu) and arginine (Arg)

收稿日期: 2022-08-08 修回日期: 2023-03-08

作者简介: 方桂友 (1972—), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事养猪生产新技术研究, E-mail: faasfgy@163.com

共同第一作者: 刘景 (1967—), 男, 副研究员, 主要从事畜禽饲料资源开发利用相关研究, E-mail: fjliuj@163.com

* 通信作者: 董志岩 (1965—), 男, 研究员, 主要从事猪饲料营养与开发相关研究, E-mail: 2936237922@qq.com

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2020R10260011、2023R1024007); 福建省科技重大专项 (2021NZ029023-5)

on the intestinal metabolites and microbiota of weaned piglets were examined for aquaculture feed formulation.

【Method】One-hundred-ninety-two healthy (26 ± 2)-day-old crossbred (Duroc $\times$ Landrace $\times$ Large White) piglets with an average body weight of (6.96 ± 0.29) kg were randomly divided into 4 groups. Each group contained 6 replicates of 8 piglets each. Group I (CK) was fed on the control diet that provided 21.16% crude protein (CP). Group II was on a low-protein diet containing 15.97% CP supplemented with some limiting amino acids. Added to the Group II diet, 1.50% Glu was included for feeding Group III and 1.50% Glu plus 1.00% Arg for Group IV. From 11th to 13th day in the 16 d feeding program, metabolites and microbial community in the piglet intestines were monitored. 【Result】The fecal putrescine and spermidine of the treatment piglets were similar but significantly lower than those of CK ($P < 0.05$). The cadaverine in the Groups II and III piglets showed no significant differences but were significantly lower than that of CK or Group IV ($P < 0.05$), and that of Group I significantly lower than that of Group IV ($P < 0.05$). No significant differences were observed on the fecal acetic acid and propionic acid among all groups ($P > 0.05$), but the butyric acid in the piglets of all treatment groups was significantly higher than those of CK ($P < 0.05$). The intestinal microbiota richness and diversity of the animals under treatments were significantly higher than those of CK ($P < 0.05$). At phylum level, the relative abundance of Firmicutes in the fecal microbiota of the piglets were significantly higher under the treatments than CK ($P < 0.05$), but those of Bacteroidetes and Proteobacteria significantly lower than CK ($P < 0.05$). Significant differences were also observed among the groups at family and genus levels. The relative abundances of unspecified families and unspecified genera under clostridiales were significantly higher under the treatments than CK ($P < 0.05$), those of prevotellaceae, enterobacteriaceae, and lachnospiraceae were significantly lower under the treatments than CK ($P < 0.05$), those of lachnospiraceae, lactobacillaceae, *blautia*, and *lactobacillus* of Group IV significantly higher than those of CK ($P < 0.05$), and those of peptostreptococcaceae and *terrisporobacter* of Group IV were significantly lower than those of CK ($P < 0.05$). 【Conclusion】A forage of CP being reduced from 21.16% to 15.97% and supplemented with Glu and Arg lowered the intestinal biogenic amines, increased the butyric acid, and enhanced the diversity and richness of microbiota in the weaned piglets.

Key words: low-protein diet; glutamate; arginine; intestinal metabolites; microbiota; weaned piglets

0 引言

【研究意义】仔猪断奶时会遇到严重的饲料营养不良应激，大量未消化吸收的蛋白质在肠道内成为细菌的发酵底物；饲料中含有的大豆球蛋白（Glycinin）和 β -伴大豆球蛋白（ β -conglycinin）诱发肠道过敏反应，是导致仔猪腹泻的主要原因^[1,2]。有研究认为，降低饲料粗蛋白质（CP）水平 2~3 个百分点，添加适宜的赖氨酸（Lys）、蛋氨酸（Met）、苏氨酸（Thr）和色氨酸（Trp），不影响仔猪的生长性能，且可显著减少断奶仔猪腹泻率^[3]，但降低饲料 CP 水平 5~6 个百分点，即使再添加缬氨酸（Val）、异亮氨酸（Ile）、组氨酸（His）、苯丙氨酸（Phe）等必需氨基酸（AA）以满足仔猪对更多必需氨基酸（Essential amino acid, EAA）的需要，仍显著影响仔猪的生长性能，抑制仔猪肠道发育^[4,5]。近期的研究认为，较低蛋白质饲料仅平衡 EAA 会出现部分非必需氨基酸（NEAA）的缺乏，导致 EAA 在肝脏代谢转化为 NEAA，造成重要 EAA 的不足和比例失衡^[6]。因此，大幅降低饲料 CP 水平需要考虑 NEAA 缺乏的问题。【前人研究进展】谷氨酸（Glutamate, Glu）是一种功能性氨基酸，在细胞代谢和生理调节方面具有多

种重要作用，研究表明，97% 饲料谷氨酸在胃肠道代谢供能，饲料添加谷氨酸有利于减少消化道对其他氨基酸的能量代谢^[7]。精氨酸（Arginine, Arg）是幼龄哺乳动物的 EAA，在蛋白质合成和尿素循环代谢中发挥着重要的生理功能，是合成一氧化氮的前体物，对维持肠道结构与功能的完整、机体免疫和抗氧化应激方面有着重要作用^[8]。猪肠道中栖居着数量庞大、菌群多样的微生物。仔猪断奶阶段消化道发育不完善，肠道菌群的稳态尚未建立，易受多种因素影响^[9]，营养应激是造成仔猪断奶后肠道菌群变化的重要因素。有研究表明，饲料 CP 水平和氨基酸浓度对肠道菌群组成和丰度会产生一定的影响^[10,11]，Rist 等^[12] 和 Heo 等^[13] 研究认为，低蛋白质饲料能够抑制断奶仔猪肠道中大肠杆菌和沙门氏菌等有害菌数量，有利于断奶仔猪肠道菌群稳定，减轻断奶仔猪腹泻。本课题组前期的研究表明，仔猪断奶后饲喂低蛋白饲料并添加重要 EAA 和 Glu 可减少仔猪腹泻，降低肠黏膜屏障通透性^[14]。【本研究切入点】国内有关降低饲料蛋白质水平并平衡主要必需氨基酸对断奶仔猪肠道菌群组成影响的相关研究仍然较少^[15]，而在较低饲料蛋白质水平（饲料蛋白质水平降低幅度超过 5 个百分点）平衡主要必需氨基酸后

添加 Glu 和 Arg 对断奶仔猪肠道代谢产物和菌群影响的研究也鲜有报道。【拟解决的关键问题】本研究拟分析较低蛋白质饲料单一添加 Glu 或联合添加 Glu 和 Arg 对断奶仔猪肠道微生物代谢产物和菌群的影响，为断奶仔猪应用较低蛋白质饲料提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物的选择、分组与管理

2021 年 7 月在某猪场开展饲养试验。试验选用遗传背景相似、健康状况良好的断奶仔猪 192 头，平均断奶日龄为（26±2）d，平均初始体重为（6.96±0.29）kg，依据性别相同、体重相近的原则分成 4 个处理组，每组含 6 个重复（栏），每个重复 8 头猪（公母各 4 头），预试期 3 d，预饲期间所有猪只饲喂同一种断奶过渡饲料；预饲结束时，对仔猪进行逐头称重，上耳牌标示，试验期 16 d。试验猪饲养于一座双列式保育猪舍，塑料漏粪地面，每个猪栏约 6 m²，配备一个圆形铸铁料桶和一个乳头式饮水器，自由采食粉料，自由饮水。试验期间试验猪的饲养管理及防疫工作按照猪场的操作规程进行。

1.2 试验设计与试验饲料

采用单因子随机试验设计，试验设 4 个组，组 I（对照组）为常规蛋白质组，饲料 CP 水平为 21.16%，组 II、组 III 和组 IV 为较低蛋白质组，饲料 CP 水平分别为 15.97%、15.93% 和 15.95%，组 II 按照质量比 $m(\text{Lys}):m(\text{Met})+m(\text{Cys}):m(\text{Thr}):m(\text{Trp}):m(\text{Val}):m(\text{Ile})=100:60:65:20:68:60$ 补充相应必需氨基酸，组 III 在组 II 基础上补充 1.50% Glu，组 IV 在组 II 基础上补充 1.50% Glu 和 1.00% Arg，试验饲料营养水平及 Glu 和 Arg 补充量均参照美国国家研究委员会 NRC（2012）^[16]5~10 kg 猪营养需要量进行配制，各组饲料除 CP 和 AA 水平不同外，其他营养素组成和含量均相同，试验饲料组成与营养水平见表 1。

1.3 样品采集与指标测定

1.3.1 样品采集

饲料样品：在配制试验料时，以处理组为单位从每个包装袋各取 150 g 饲料，混匀后按照四分法收集饲料样品，冷藏保存待测饲料粗蛋白质含量。每种试验料分别取 2 个样品，表 1 中饲料 CP 含量为 2 个样品测定值的平均值。

在试验的第 11~13 天连续 3 d 于早晨饲喂前每个重复采用直肠收集法采集无污染粪样少量于 5 mL 冻存管中，放入液氮罐中迅速冷冻，之后转移至

表 1 饲料组成与营养水平（风干基础）
Table 1 Nutritional composition of basal diets (on air-dry basis)

项目 Items	组I (CK) Group I	组II Group II	组III Group III	组IV Group IV
原料 Ingredient				
玉米 Corn/%	35.12	48.00	47.00	45.00
豆粕 Soybean meal/%	15.00	6.30	6.20	6.60
膨化大豆 Extruded soybean/%	18.00	11.00	12.00	12.00
麦麸 Wheat bran/%		1.70		
鱼粉 Fish meal/%	7.00	7.00	7.00	7.00
乳清粉 Whey powder/%	16.00	16.00	16.00	16.00
蔗糖 Sucrose/%	2.00	2.00	2.00	2.00
柠檬酸 Citric acid/%	2.00	2.00	2.00	2.00
豆油 Soybean oil/%	2.50	2.26	2.56	3.15
石粉 Limestone/%	0.30	0.32	0.23	0.47
磷酸氢钙 CaHPO ₄ /%	0.54	0.72	0.82	0.60
食盐 NaCl/%	0.30	0.30	0.30	0.30
氯化胆碱 Choline chloride (50%) /%	0.08	0.08	0.08	0.08
L-赖氨酸盐酸盐 L-lysine•HCL/%	0.03	0.42	0.41	0.40
DL-蛋氨酸 DL-methionine/%	0.09	0.15	0.15	0.15
L-苏氨酸 L-threonine/%	0.03	0.20	0.20	0.20
L-色氨酸 L-tryptophan/%	0.01	0.07	0.07	0.07
L-缬氨酸 L-Valine/%		0.20	0.20	0.20
L-异亮氨酸 L-isoleucine/%		0.21	0.20	0.20
L-谷氨酸 L-glutamate/%			1.50	1.50
L-精氨酸 L-arginine/%				1.00
①预混料 Premix/%	1.00	1.00	1.00	1.00
合计 Total/%	100.00	100.00	100.00	100.00
②营养水平 Nutrient levels				
消化能 Digestible energy/ (MJ·kg ⁻¹)	14.99	14.42	14.39	14.39
净能 Net energy/ (MJ·kg ⁻¹)	10.55	10.54	10.53	10.54
粗蛋白质 Crude protein/%	21.16	15.97	15.93	15.95
粗脂肪 EE/%	8.03	6.85	7.23	7.74
中性洗涤纤维 NDF/%	7.50	7.45	6.82	6.67
酸性洗涤纤维 ADF/%	5.40	5.37	5.12	5.00
淀粉 Starch/%	24.89	32.01	31.20	30.98

续上表

项目 Items	组I (CK) Group I	组II Group II	组III Group III	组IV Group IV
标准回肠可消化氨基酸 Standardized ileal digestible amino acids				
赖氨酸 Lys/%	1.09	1.09	1.09	1.09
蛋氨酸 Met/%	0.41	0.41	0.41	0.41
蛋氨酸+胱氨酸 Met+Cys/%	0.65	0.65	0.65	0.65
苏氨酸 Thr/%	0.69	0.69	0.69	0.69
色氨酸 Trp/%	0.23	0.23	0.23	0.23
缬氨酸 Val/%	0.80	0.80	0.80	0.80
异亮氨酸 Ile/%	0.74	0.74	0.74	0.74
亮氨酸 Leu/%	1.41	1.14	1.14	1.13
总谷氨酸 Total Glu/%	3.60	2.67	4.15	4.16
总精氨酸 Total Arg/%	1.36	0.95	0.95	1.96

①预混料为每千克饲料提供：维生素A 12 500.00 IU，维生素D₃ 2 500.00 IU，维生素E 80.00 mg，维生素K₃ 3.00 mg，维生素B₁ 2.50 mg，维生素B₂ 10.00 mg，维生素B₆ 3.00 mg，维生素B₁₂ 0.035 mg，烟酸 30.00 mg，泛酸 15.00 mg，叶酸 0.45 mg，生物素 0.50 mg，铁 140.00 mg，铜 15.00 mg，锌 140.00 mg，锰 30.00 mg，碘 0.50 mg，硒 0.25 mg；②粗蛋白质为实测值，其他营养指标为计算值。
① Premix provided following nutrients in per kg of diet: VA 12 500.00 IU, VD₃ 2 500.00 IU, VE 80.00 mg, VK₃ 3.00 mg, VB₁ 2.50 mg; VB₂ 10.00 mg, VB₆ 3.00 mg, VB₁₂ 0.035 mg, nicotinic acid 30.00 mg, pantothenic acid 15.00 mg, folic acid 0.45 mg; biotin 0.50 mg, Fe 140.00 mg, Cu 15.00 mg, Zn 140.00 mg, Mn 30.00 mg, I 0.50 mg, Se 0.25 mg. ② CP is presented as measured; others, calculated values.

-80 ℃ 冰箱保存，用于测定粪样中生物胺和短链脂肪酸含量及肠道菌群 16S RNA 测序。

1.3.2 粪样生物胺和短链脂肪酸

粪样中生物胺和短链脂肪酸含量采用高效液相色谱法^[17-18]，生物胺、乙酸和丁酸的测定仪器为 RIGOL L3000 高效液相色谱仪，丙酸的测定仪器为 Thermo U3000 高效液相色谱仪。

1.3.3 粪样微生物组成

粪样菌群总 DNA 参照 Omega 公司的 Omega D40-15 试剂盒操作说明进行提取，样本总 DNA 纯化后，用 ND-1000 核酸浓度测定仪检测其浓度，采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 完整性。16S rRNA V3~V4 区扩增、基因测序文库构建和 Illumina Miseq 测序及数据生物学分析等内容委托诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.4 数据统计分析

采用 Excel 软件对试验数据进行统计处理，用 SPSS26.0 统计软件进行方差分析，用 Duncan 氏法进行多重差异显著性比较，试验结果采用平均值±标准

差表示。

2 结果与分析

2.1 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样生物胺的影响

由表 2 可知，断奶仔猪粪样腐胺和亚精胺含量组 II、组 III 和组 IV 均显著低于组 I ($P<0.05$)，组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$)。粪样尸胺含量组 II 和组 III 显著低于组 I 和组 IV ($P<0.05$)，组 I 显著低于组 IV ($P<0.05$)，组 II 和组 III 间差异不显著 ($P>0.05$)。说明降低饲料蛋白质水平和在此基础上添加谷氨酸均能显著降低断奶仔猪粪样腐胺、尸胺和亚精胺含量；而在低蛋白质水平基础上联合添加谷氨酸和精氨酸能显著降低腐胺和亚精胺含量，但显著升高尸胺的含量。

表 2 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样生物胺的影响

Table 2 Effects of low-protein diet supplemented with Glu + Arg on fecal biogenic amines of weaned piglets
(单位: $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

项目 Items	组I Group I	组II Group II	组III Group III	组IV Group IV
腐胺 Putrescine	36.10±1.45 a	23.31±0.99 b	25.63±0.61 b	27.76±1.67 b
尸胺 Cadaverine	8.66±0.48 b	5.65±0.56 c	5.44±0.22 c	13.14±0.65 a
亚精胺 Spermidine	57.86±2.21 a	25.44±1.37 b	31.46±1.39 b	27.16±1.31 b

同行数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)，表3、4同。

Data with different lowercase letters on same row indicate significant difference at $P<0.05$; those with same or no letter, no significant difference at $P>0.05$. Same for below.

2.2 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样短链脂肪酸的影响

由表 3 可知，断奶仔猪粪样乙酸和丙酸含量各组间差异不显著 ($P>0.05$)。粪样丁酸含量组 II、组 III 和组 IV 显著高于组 I ($P<0.05$)，组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$)。说明降低饲料蛋白质水平及添加谷氨酸或联合添加谷氨酸和精氨酸均能显著增加断奶仔猪粪样中丁酸的含量。

2.3 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道菌群多样性的影响

稀释曲线能反映测序数据量的合理性，当曲线趋于平缓时，说明测序数据量渐进合理，更多的数据量也只会产生较少量新的物种，如图 1 所示，试

表 3 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样短链脂肪酸的影响

Table 3 Effects of low-protein diet supplemented with Glu + Arg on fecal short-chain fatty acids of weaned piglets
(单位: $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

项目 Items	组I Group I	组II Group II	组III Group III	组IV Group IV
乙酸 Acetic acid	1.27 ± 0.09	1.43 ± 0.03	1.280 ± 0.02	1.39 ± 0.03
丙酸 Propionic acid	0.78 ± 0.01	0.81 ± 0.03	0.88 ± 0.02	0.77 ± 0.01
丁酸 Butyric acid	0.49 ± 0.03 b	0.56 ± 0.04 a	0.61 ± 0.03 a	0.64 ± 0.02 a

验各组的稀释曲线趋于平稳, 测序深度 (Coverage) 为 99.98%~99.99%, 说明测序深度已经覆盖了所有物种, 测序结果能反映试验样本中微生物的真实情况。丰度等级曲线 (Rank abundance) 能反映样品中物种的丰富度和均匀度, 如图 1 所示, 曲线较为平滑, 说明各样品中物种分布均匀。

试验 Alpha 多样性 (Alpha diversity) 分析结果如

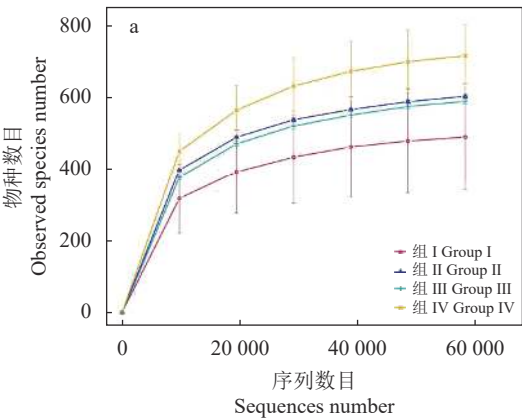
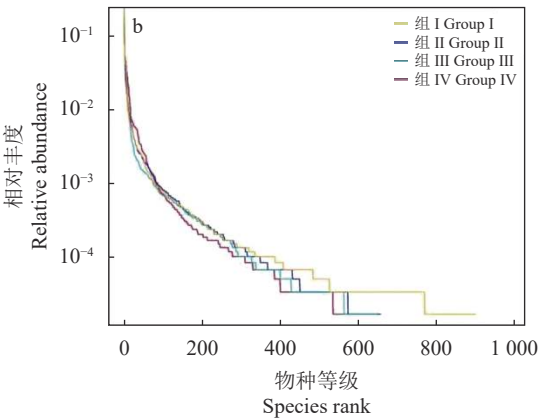


表 4 所示, ACE 指数和 Chao1 指数表示样本菌群丰富度, Shannon 指数和 Simpson 指数表示样本多样性。ACE 指数和 Chao1 指数组 II 和组 III 均高于组 I, 但差异均不显著 ($P>0.05$), 组 IV 显著高于组 I ($P<0.05$), 组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$)。Shannon 指数组 II 和组 III 均高于组 I, 但差异均不显著 ($P>0.05$), 组 IV 显著高于组 I ($P<0.05$), 组 II、组 III 和组 IV 间差异不显著 ($P>0.05$)。Simpson 指数组 II、组 III 和组 IV 均显著低于组 I ($P<0.05$)。说明低蛋白质氨基酸平衡饲料有利于提高断奶仔猪肠道菌群丰富度和多样性, 低蛋白质氨基酸平衡饲料同时添加 Glu 和 Arg 后, 效果更明显。

2.4 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道菌群结构的影响

如图 2-A 所示, 在门分类水平上, 组 I 与组 II、组 III 和组 IV 在菌群组成上有较大差异, 组 II、组 III 和组 IV 间菌群组成和占比均较为接近。组 I 断奶仔猪粪样中优势菌群依次为 70.62% 厚壁菌门 (Firmicutes)、20.83% 拟杆菌门 (Bacteroidetes)、5.83% 变形菌门 (Proteobacteria), 组 II、组 III 和



a、b 分别为稀释性曲线和 OTU 丰度等级曲线。

a and b indicate dilution curve and OTU rank-abundance curve, respectively.

图 1 粪样稀释性曲线和丰度等级曲线

Fig. 1 Dilution and OTU rank-abundance curves of fecal samples

表 4 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道菌群多样性的影响

Table 4 Effects of low-protein diet supplemented with Glu + Arg on intestinal microflora diversity of weaned piglets

项目 Items	组I Group I	组II Group II	组III Group III	组IV Group IV
物种数目 observed species	568.00 ± 36.27 b	632.33 ± 48.56 a	648.00 ± 62.78 a	680.00 ± 21.23 a
测序深度 Coverage/%	99.99	99.99	99.99	99.98
Shannon指数 Shannon index	4.68 ± 0.18 b	4.92 ± 0.04 ab	4.81 ± 0.11 ab	5.05 ± 0.13 a
Simpson指数 Simpson index	0.93 ± 0.01 a	0.86 ± 0.02 b	0.85 ± 0.02 b	0.86 ± 0.05 b
Chao1指数 Chao1 index	574.81 ± 74.76 b	631.53 ± 13.40 ab	629.60 ± 17.09 ab	658.02 ± 46.58 a
ACE指数 ACE index	590.86 ± 33.17 b	641.19 ± 17.34 ab	646.50 ± 19.77 ab	673.04 ± 47.19 a

组 IV 主要由厚壁菌门和拟杆菌门组成，其中厚壁菌门组 II、组 III、组 IV 依次为 92.59%、88.41%、89.87%，拟杆菌门组 II、组 III、组 IV 依次为 4.86%、7.90%、5.33%，变形菌门组 II、组 III、组 IV 依次为 0.45%、1.37%、2.04%，分析结果表明，组 II、组 III 和组 IV 厚壁菌门（Firmicutes）相对丰度显著高于组 I（ $P<0.05$ ），拟杆菌门（Bacteroidetes）和变形菌门（Proteobacteria）相对丰度显著低于组 I（ $P<0.05$ ）。可见低蛋白质氨基酸平衡饲料添加 Glu 或 Glu+Arg 对粪样菌群在门水平上有明显的影响，提高厚壁菌门相对丰度，降低拟杆菌门和变形菌门相对丰度。

如图 2-B 所示，在科水平上，相对丰度较高的有：梭菌目下未明确的科（unidentified-Clostridiales）占比组 I、组 II、组 III 和组 IV 依次为 21.75%、45.17%、

46.96% 和 30.36%，消化链球菌科（Peptostreptococcaceae）占比 4 个组依次为 14.65%、15.44%、13.16% 和 6.57%。

如图 2-C 所示，在属分类水平上，相对丰度较高的菌属：梭菌目下未明确的属（unidentified-Clostridiales）组 I、组 II、组 III 和组 IV 占比依次为 21.67%、45.07%、46.87% 和 30.36%，土孢杆菌属（*Terrisporobacter*）4 个组依次为 9.85%、11.49%、9.20% 和 4.23%，布劳特氏菌属（*Blautia*）4 个组依次为 5.41%、2.79%、4.23% 和 19.42%。

统计分析科属分类结果表明，组 II、组 III 和组 IV 梭菌目下未明确的科和梭菌目下未明确的属相对丰度显著高于组 I（ $P<0.05$ ），普雷沃氏菌科（*Prevotellaceae*）、肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）和丁酸球菌属（*Lachnospiraceae*）相对丰度显著低于组 I（ $P<0.05$ ），组 IV 毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）、乳杆菌科（*Lactobacillaceae*）和布劳特氏菌属（*Blautia*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）相对丰度显著高于组 I（ $P<0.05$ ），组 IV 消化链球菌科（*Peptostreptococcaceae*）和土孢杆菌属（*Terrisporobacter*）相对丰度显著低于组 I（ $P<0.05$ ）。说明低蛋白质氨基酸平衡饲料添加 Glu 或 Glu+Arg 对粪样菌群在科和属水平上存在明显的影响。

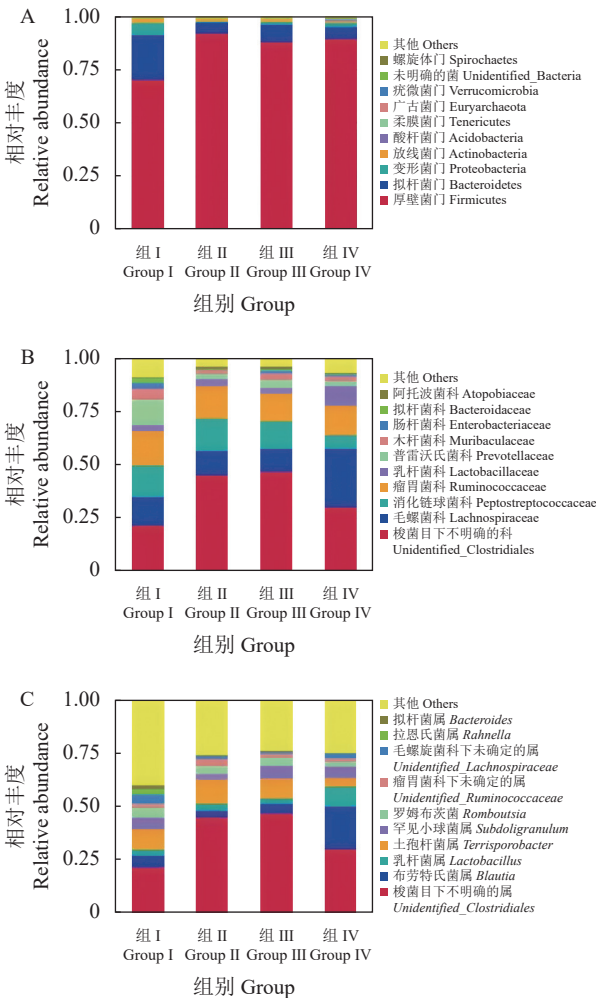
3 讨论与结论

3.1 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样生物胺的影响

如果仔猪饲料蛋白质摄入量超过其消化吸收量，未被消化吸收的蛋白质等营养物质进入后肠供微生物发酵利用，在相关酶的作用下产生生物胺等物质，肠道产生的生物胺主要有腐胺、尸胺和亚精胺等。腐胺由鸟氨酸和精氨酸经微生物分解代谢产生，尸胺由赖氨酸经脱羧基反应产生，亚精胺则由鸟氨酸等前体物质产生^[19]。本研究结果表明，低 CP 氨基酸平衡饲料添加 Glu 或 Glu+Arg 均显著降低粪样中腐胺和亚精胺的含量，而低 CP 氨基酸平衡饲料添加 Glu+Arg 比另外 3 个处理组均显著提高断奶仔猪粪样中尸胺的含量，可能原因是 Arg 和 Lys 间存在拮抗作用，饲料添加 Arg 后对 Lys 的消化吸收产生一定的抑制作用，更多的 Lys 进入后肠用于生成尸胺。总体而言，低 CP 氨基酸平衡饲料显著降低断奶仔猪后肠生物胺的含量，有利于仔猪肠道健康。

3.2 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪粪样短链脂肪酸的影响

肠道微生物能够利用未消化蛋白质及碳水化合



A、B、C 分别表示肠道菌群在门水平、科水平、属水平上的结构组成。
A, B, C represented the distruction of fecal dominant microbiota at phylum level, family level, and genus level, respectively.

图 2 粪样中优势菌群结构分布情况
Fig. 2 Distribution of dominant fecal microbes

物产生短链脂肪酸 (Short-chain fatty acids, SCFA), 也称挥发性脂肪酸 (Volatile fatty acid, VFA)。有研究认为, 降低饲料蛋白质含量可减少仔猪盲肠中 SCFA 含量, 但差异不显著^[20]。周华^[21]的研究发现低蛋白饲料提高必需氨基酸供给, 仔猪盲肠丁酸的浓度呈二次显著增加, 乙酸与丙酸则呈线性降低的趋势。本试验结果表明, 低 CP 氨基酸平衡饲料添加 Glu 或 Glu+Arg 均不影响断奶仔猪粪样乙酸和丙酸的含量, 这与前人的研究结果相近, 但粪样丁酸的含量呈现显著升高, 这与相关研究结果不同, 可能是本试验 3 个试验组比对照组饲料 CP 水平降幅较大, 其饲料组成中碳水化合物比例比对照组显著提高, 有报道认为饲料中的碳水化合物有利于提高仔猪肠道 SCFA 含量^[22], 因此, 3 个试验组粪样丁酸含量均显著高于对照组, 丁酸含量的增加有利于维护仔猪肠道和机体的健康。

3.3 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道菌群多样性的影响

饲料成分对动物肠道菌群改变占到相关影响因素比重的 57%^[23], 有研究认为低蛋白质氨基酸平衡饲料能增加生长肥育猪肠道菌群多样性和丰富度^[24], 王瑶等^[25]的研究表明, 饲料蛋白质水平从 14.0% 降至 12.5% 时, 提高盲肠菌群多样性和丰富度, 蛋白质水平降低至 11.0% 不补充支链氨基酸 (Branched-chain amino acid, BCAA), 降低菌群整体丰度和多样性, 如果补充 BCAA 则可提高盲肠菌群丰度和多样性, 说明过多降低饲料蛋白质水平可影响肠道菌群多样性和丰富度, 但补充 BCAA 则有利于提高肠道菌群多样性和丰富度。Peng 等^[26]的研究亦表明, 降低饲料蛋白质水平 5 个百分点, 可提高生长猪结肠菌群多样性。本试验结果表明, 饲料蛋白质水平降低约 5 个百分点, 平衡重要必需氨基酸 (组 II)、平衡重要必需氨基酸并补充 Glu (组 III) 对肠道菌群多样性和丰富度影响差异不显著, 但有利于增加菌群的多样性, 平衡重要必需氨基酸并补充 Glu+Arg (组 IV) 能显著提高肠道菌群多样性和丰富度, 这与相关研究结果相似, 说明较低饲料蛋白质水平对断奶仔猪肠道菌群整体的多样性和丰富度有一定影响, 而在饲料较低蛋白质水平上平衡重要必需氨基酸基础上补充 Glu+Arg 能提高断奶仔猪肠道菌群多样性和丰富度, 而肠道菌群多样性的增加有利于提高肠道抵抗致病菌感染的能力, 这与该试验组仔猪腹泻率显著低于对照组的试验结果相符合。

3.4 低蛋白质饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪肠道菌群结构的影响

肠道菌群在门水平上主要由厚壁菌门 (35%~

80%) 和拟杆菌门 (17%~60%) 组成^[27]。王晶等^[24]、王瑶等^[25]的研究均表明, 降低饲料蛋白质水平不影响肠道菌群厚壁菌门和拟杆菌门的丰度。而范沛欣^[10]的试验得出降低饲料蛋白质水平, 能够提高断奶仔猪结肠菌群厚壁菌门丰度, 降低拟杆菌门和螺旋菌门丰度。本试验结果表明降低饲料蛋白质水平并平衡重要必需氨基酸及补充 Glu 或 Glu+Arg 均能增加断奶仔猪粪样菌群厚壁菌门丰度, 降低拟杆菌门丰度, 试验结果与范沛欣的报道相同, 分析相关因素, 可能是低蛋白质饲料虽然降低饲料 CP 水平, 但饲料蛋白质消化率更高, 同时较大比例补充多种合成氨基酸及 Glu 或 Glu+Arg, 使得仔猪肠道可供厚壁菌门所属的蛋白降解梭菌目下未明确的科 (unidentified_Clostridiales) 和消化链球菌科发酵的底物更多^[10], 而且梭菌目下未明确的科 (unidentified_Clostridiales)、消化链球菌属、乳杆菌属和链球菌属等能同时利用淀粉和氨基酸, Metzler 等^[28]认为肠道菌群通常优先利用碳水化合物进行发酵, 其次是蛋白质和氨基酸, 试验中 3 个低蛋白质组淀粉含量明显高于对照组, 因此, 在科和属水平上相关菌群的丰度均高于对照组, 使得相关菌群对应的厚壁菌门丰度也显著提高。

变形菌门和肠杆菌科所属的大肠杆菌属和沙门氏菌属等多为致病菌, 是引起仔猪腹泻的重要菌群^[29], 试验结果显示, 3 个试验组变形菌门和肠杆菌科的菌群相对丰度明显低于对照组, 这与 3 个试验组仔猪腹泻率显著低于对照组的结果相符合^[14], 说明低蛋白质氨基酸平衡饲料对引发腹泻的肠道菌群有明显的抑制。

肠道稳定的菌群结构对降低断奶仔猪腹泻的发生极其重要, 需要开展更多的试验验证, 如何合理降低饲料蛋白质水平并平衡重要必需氨基酸及功能性氨基酸, 从而优化断奶仔猪肠道菌群组成, 有效缓解因断奶应激引发的腹泻。

综上所述, 将饲料 CP 水平从 21.16% 降低至 15.97%, 平衡重要必需氨基酸并补充 Glu+Arg, 能降低断奶仔猪肠道生物胺含量, 提高丁酸含量, 增加肠道菌群多样性和丰富度, 影响肠道菌群组成。

参考文献:

- [1] 夏冰, 孟庆石, 解竞静, 等. 21 日龄断奶对仔猪肠道形态、肠道通透性及肠黏膜屏障的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30 (6): 2097-2108.
- XIA B, MENG Q S, XIE J J, et al. Effects of weaning at 21 days of age on intestinal morphology, permeability and mucosal barrier of

- piglets [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30 (6) : 2097–2108. (in Chinese)
- [2] 孙鹏. 大豆抗原蛋白 Glycinin 诱发仔猪过敏反应的机理及其缓解机制的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.
- SUN P. The mechanism of soybean protein glycinin on inducing allergic reaction and attenuation in piglets[D]. Beijing: China Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [3] 张云琦, 袁海峰, 黄浩生, 等. 低蛋白氨基酸平衡日粮对断奶仔猪生产性能的影响 [J]. 饲料工业, 2001, 22 (6) : 28–30.
- ZHANG Y Q, YUAN H F, HUANG H S, et al. Effect of low protein and amino acid balanced diet on performance of weaned piglets [J]. *Feed Industry*, 2001, 22 (6) : 28–30. (in Chinese)
- [4] YUE L Y, QIAO S Y. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning [J]. *Livestock Science*, 2008, 115 (2/3) : 144–152.
- [5] 彭燮. 低蛋白日粮添加合成氨基酸或完整蛋白对仔猪生长性能、氮代谢和免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- PENG X. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids or intact protein on growth performance, nitrogen metabolism and immune function in pigs[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [6] 甄吉福, 许庆庆, 李貌, 等. 低蛋白饲料添加谷氨酸对育肥猪蛋白质利用和生产性能的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30 (2) : 507–514.
- ZHEN J F, XU Q Q, LI M, et al. Effects of low-protein diet supplemented with glutamate on protein utilization and performance of finishing pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30 (2) : 507–514. (in Chinese)
- [7] 秦颖超, 宋志文, 朱敏, 等. 谷氨酸通过保护回肠结构完整性增强猪回肠屏障功能 [J]. 动物营养学报, 2020, 32 (5) : 2101–2107.
- QIN Y C, SONG Z W, ZHU M, et al. Glutamate enhances porcine ileal barrier function via protecting ileal structural integrity [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32 (5) : 2101–2107. (in Chinese)
- [8] 黄思琪, 曲红焱, 黄大鹏, 等. L-精氨酸对冷应激仔猪生长性能、免疫功能及肝脏、肾脏中肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ 基因表达量的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (1) : 131–139.
- HUANG S Q, QU H Y, HUANG D P, et al. Effects of L-arginine on growth performance, immune function and genes expression levels of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in liver and kidney of cold-stressed piglets [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31 (1) : 131–139. (in Chinese)
- [9] PALMER C, BIK E M, DIGIULIO D B, et al. Development of the human infant intestinal microbiota [J]. *PLoS Biology*, 2007, 5 (7) : e177.
- [10] 范沛昕. 低蛋白日粮对断奶仔猪和育肥猪肠道微生物区系的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- FAN P X. Effects of low protein diets on the intestinal microbiota of weaned piglets and finishing pigs[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [11] 戴兆来. 猪小肠微生物氨基酸代谢的生态学分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- DAI Z L. Ecological analysis of the amino acid metabolism in pig small intestinal bacteria[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [12] RIST V T S, WEISS E, EKLUND M, et al. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: A review [J]. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 2013, 7 (7) : 1067–1078.
- [13] HEO J M, KIM J C, HANSEN C F, et al. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87 (9) : 2833–2843.
- [14] 方桂友, 郭庆, 刘景, 等. 低蛋白质氨基酸平衡饲料添加谷氨酸和精氨酸对断奶仔猪生长性能和血液指标的影响 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (11) : 1407–1414.
- FANG G Y, GUO Q, LIU J, et al. Effects of amino acid-balanced low-protein diet supplemented with glutamate and arginine on growth and serum indicators of weaned piglets [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (11) : 1407–1414. (in Chinese)
- [15] 虞德夫, 朱晓峰, 冯江银, 等. 低蛋白日粮对断奶仔猪生长相关激素和肠道微生物区系的影响 [J]. 微生物学报, 2019, 59 (9) : 1695–1704.
- YU D F, ZHU X F, FENG J Y, et al. Effect of low-protein diet on hormones associated with growth and on gut microbiota in weaned piglets [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59 (9) : 1695–1704. (in Chinese)
- [16] National Research Council. *Nutrient requirements of swine* [M]. The 11th revised edition. Washington DC: National Academies Press, 2012.
- [17] YANG Y X, MU C L, ZHANG J F, et al. Determination of biogenic amines in digesta by high performance liquid chromatography with precolumn dansylation [J]. *Analytical Letters*, 2014, 47 (8) : 1290–1298.
- [18] 张萍, 叶利民, 肖晓蓉, 等. 短链脂肪酸的梯度高效液相色谱法分析研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2001, 19 (5) : 294–295, 299.
- ZHANG P, YE L M, XIAO X R, et al. A study of analyzing short-chain fat acid by gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *West China Journal of Stomatology*, 2001, 19 (5) : 294–295, 299. (in Chinese)
- [19] 孔祥峰. 结肠微生物氮代谢与机体健康研究进展 [J]. 饲料与畜牧, 2013 (4) : 10–17.
- KONG X F. Research progress of microbial nitrogen metabolism in colon and body health [J]. *Animal Agriculture*, 2013 (4) : 10–17. (in Chinese)
- [20] HTOO J K, ARAIZA B A, SAUER W C, et al. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85 (12) : 3303–3312.
- [21] 周华. 低蛋白饲料添加氨基酸对断奶仔猪生长性能、肠道健康及氮

- 平衡的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- ZHOU H. Effect of amino acid supplementation in low protein diets on performance, gut health and nitrogen balance of weaned pigs[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [22] LYNCH B, CALLAN J J, O'DOHERTY J V. The interaction between dietary crude protein and fermentable carbohydrate source on piglet post weaning performance, diet digestibility and selected faecal microbial populations and volatile fatty acid concentration [J]. *Livestock Science*, 2009, 124 (1/2/3) : 93–100.
- [23] ZHANG C H, ZHANG M H, WANG S Y, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice [J]. *The ISME Journal*, 2010, 4 (2) : 232–241.
- [24] 王晶, 王四新, 刘辉, 等. 低蛋白质水平饲料对生长育肥猪生长性能及肠道菌群的影响 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30 (12) : 4864–4873.
- WANG J, WANG S X, LIU H, et al. Effects of low protein diets on growth performance and intestinal microbiota of growing-finishing pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30 (12) : 4864–4873. (in Chinese)
- [25] 王瑶, 孙志洪, 许庆庆, 等. 氨基酸平衡低蛋白质日粮对育肥猪肠道黏膜抗菌肽与微生物区系的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48 (12) : 2323–2336.
- WANG Y, SUN Z H, XU Q Q, et al. The effect of the low protein level diets with balanced amino acids on intestinal mucosa antimicrobial peptide and microbial flora of fattening pigs [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48 (12) : 2323–2336. (in Chinese)
- [26] PENG Y, YU K F, MU C L, et al. Progressive response of large intestinal bacterial community and fermentation to the stepwise decrease of dietary crude protein level in growing pigs [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101 (13) : 5415–5426.
- [27] SHOAIE S, KARLSSON F, MARDINOGLU A, et al. Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2532.
- [28] METZLER B U, VAHJEN W, BAUMGÄRTEL T, et al. Changes in bacterial populations in the ileum of pigs fed low-phosphorus diets supplemented with different sources of fermentable carbohydrates [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 148 (1) : 68–89.
- [29] BHANDARI S K, OPAPEJU F O, KRAUSE D O, et al. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: Performance and gut microbial population [J]. *Livestock Science*, 2010, 133 (1/2/3) : 185–188.
- (责任编辑: 张梅)