

分类号:

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520119

益生元促进植物乳杆菌 HH-LP 56 调节猫肠道菌群及
合生元片剂的制备

Promoting effect of prebiotics on *Lactobacillus*
Plantarum HH-LP 56 in modulating feline gut
microbiota and the development of synbiotic tablets

学生姓名: 谢红

指导教师: 陶玉贵 (教授)

专 业: 生物与医药

研究方向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期： 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

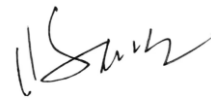
本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：



指导教师签名：



日期： 2025 年 5 月 15 日

日期： 2025 年 5 月 15 日

益生元促进植物乳杆菌 HH-LP 56 调节猫肠道菌群及合生元片剂的制备

摘 要

猫作为食肉动物，肠道具有短、宽、厚且盲肠发育不完善的解剖特点，其消化系统固有的脆弱性导致其对环境刺激和饮食刺激较为敏感。合生元作为新一代微生物制剂，将益生菌和益生元进行合理配伍，使其达到协同治疗的效果，是维持胃肠道稳态、改善机体健康的理想保健品。因此本文旨在筛选出具有协同益生效果的合生元组合，并研究其对猫肠道微生物群落的影响。主要研究内容及研究结果如下：

（1）以植物乳杆菌 HH-LP 56 (*L. plantarum*) 为研究对象，将其与果寡糖（FOS）、菊粉（Inu）、低聚半乳糖（GOS）、低聚木糖（XOS）、水苏糖（Sta）五种益生元分别构建合生元组合。通过系统评价益生元对 *L. plantarum* 的生理特性（生长曲线、短链脂肪酸产量）、黏附特性（疏水性、自聚集及共聚集能力）、耐受性（在模拟胃肠液中的存活率）及抑菌活性（大肠杆菌/金黄色葡萄

萄球菌)的影响,最终筛选出协同增效组合。结果显示 *L. plantarum* 和 FOS 的组合表现出协同益生效果, FOS 可促进 *L. plantarum* 的增殖,并且增加短链脂肪酸生成量,达 1.69 mg/mL,为各组最高;将 *L. plantarum* 在模拟胃肠液中的存活率提升至 70%;同时,该组合对致病菌(大肠杆菌/金黄色葡萄球菌)的抑制率均超过 99%。构建猫胃肠道体外模型,选择四种肠道常见菌株与不同合生元组合进行共培养实验,以常见菌的生长曲线、pH 值和最终代谢出的乳酸含量为主要指标评价不同组合对肠道菌群及微环境的影响。筛选出 FOS 和 *L. plantarum* 的组合可以维持肠道低 pH 值,并选择性抑制肠道有害菌。为进一步验证此合生元组合对猫肠道菌群的调节作用,将其投入成年健康宠物猫的饮食中,8 只成年且体重相近的美国短毛猫随机分配至实验组(n=4)和对照组(n=4),实验周期为 35 天,第一周为适应性饲养。实验组在对照组的基础饮食上额外提供 5×10^7 CFU/kg 的 *L. plantarum* 和 10 mg/kg 的 FOS,在最后一天收集新鲜粪便进行 16s rRNA 测序,结果发现实验组猫肠道菌群中有益菌如普雷沃菌属(*Prevotella*),布劳特菌属(*Blautia*),杜博西斯菌属(*Dubosiella*)等的丰度对比对照组显著提升($P<0.05$)。

(2) 猫用合生元片剂的制备采用湿法制粒工艺,原料以合生元、脱脂羊奶粉、鸡肝粉为主,分别辅以下列五种不同基质:玉米淀粉、麦芽糊精、磷酸氢钙、硬脂酸镁、滑石粉。以片剂外观、硬度、脆碎度、适口性等为评价指标,利用单因素试验考察不同配方组成对成品质量的影响,并设计 Plackett—Burman 和 Box—Behnken

响应面试验对配方配比进行最终优化。结果显示最佳配比为脱脂羊奶粉 20%、合生元 2.4%、鸡肝粉 55%、玉米淀粉 10.9%、磷酸氢钙 5.5%、滑石粉 1%、麦芽糊精 4.4%、硬脂酸镁 0.8%。

综上所述，FOS 促进了 *L. plantarum* 的增殖、代谢，可以选择性的抑制有害菌的生长定植，增加肠道中有益菌的丰度，从而达到改善菌群紊乱维持肠道微环境稳态的效果。制备的合生元羊奶片质量完好、有较高的适口性。本文为 *L. plantarum* 和 FOS 在宠物食品中的开发和应用提供了实验依据。

关键词：猫，肠道菌群，合生元，植物乳杆菌，果寡糖，响应面优化

PROMOTING EFFECT OF PREBIOTICS ON
LACTOBACILLUS PLANTARUM HH-LP 56 IN
MODULATING FELINE GUT MICROBIOTA AND THE
DEVELOPMENT OF SYNBIOTIC TABLETS

ABSTRACT

As obligate carnivores, cats possess a distinctive gastrointestinal anatomy characterized by short, wide intestines and an underdeveloped cecum. This anatomical configuration contributes to the inherent vulnerability of their digestive system, making them particularly sensitive to environmental and dietary changes. As a derivative of the new generation of probiotics, synbiotics combines probiotics and prebiotics in a reasonable way to achieve a synergistic therapeutic effect, making it an ideal health supplement for maintaining the stability of the gastrointestinal tract and improving the health of the body. Therefore, this study aims to identify the synergistic synbiotic combination for enhancing Gut health benefits and investigate its impact on the feline intestinal microbiota. The primary research contents and findings are summarized as follows:

(1) This study constructed synbiotic formulations by combining *Lactobacillus plantarum* HH-LP 56 (*L. plantarum*) with five prebiotics: fructooligosaccharides (FOS), inulin (Inu), galactooligosaccharides (GOS), xylooligosaccharides (XOS), and stachyose (Sta). Synergistic combinations were ultimately screened through systematic evaluation of the effects of prebiotics on *L. plantarum* in terms of physiological characteristics (growth kinetics, short-chain fatty acid production), adhesive properties (hydrophobicity, self-aggregation, and co-aggregation capacity), gastrointestinal tolerance (survival rate in simulated gastrointestinal fluids), and antibacterial activity (against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). The results demonstrated that the combination of *L. plantarum* and FOS exhibited synergistic probiotic effects. FOS significantly promoted *L. plantarum* proliferation and increased short-chain fatty acids (SCFAs) production to 1.69 mg/mL, the highest level among all groups; the survival rate of *L. plantarum* in simulated gastrointestinal fluid was elevated to 70%; meanwhile, the inhibition rate of this combination against pathogenic bacteria (*Escherichia coli*/*Staphylococcus aureus*) exceeded 99%. An in vitro model of the feline gastrointestinal tract was constructed. Four common intestinal strains were selected and each co-cultured with different synbiotics. The growth curves of bacteria, pH values and the final lactic acid content were used as the main indicators to evaluate the effects of different combinations on the

intestinal flora and microenvironment. The combination of FOS and *L. plantarum* can maintain a low pH value in the intestinal tract and selectively inhibit harmful intestinal flora. To further verify the regulatory effect of this synbiotic combination on the intestinal flora of cats, it was added to the diet of adult healthy pet cats. Eight adult American Shorthair cats with similar body weights were selected and randomly divided into an experimental group ($n = 4$) and a control group ($n = 4$). The experimental period was 35 days, with the first week being an adaptation period. The experimental group was given an additional 5×10^7 CFU/kg of *L. plantarum* and 10 mg/kg of FOS on the basis of the control group's basic diet. Fresh feces were collected on the last day for 16s rRNA sequencing. The results showed that the abundance of beneficial bacteria such as *Prevotella*, *Blautia*, and *Dubosiella* in the intestinal flora of the experimental group cats was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$).

(2) Feline synbiotic tablets are prepared via a wet granulation method. The primary ingredients consist of synbiotics, defatted goat milk powder, and chicken liver powder, supplemented with five distinct excipients: corn starch, maltodextrin, dicalcium phosphate, magnesium stearate, and talc. The quality of the tablets was evaluated based on appearance, hardness, friability, and palatability. Single-factor experiments were conducted to investigate the effects of different formulations on product quality, followed by Plackett-Burman and Box-Behnken response surface designs

to optimize the formulation parameters. Results demonstrated that the optimal formulation comprised: defatted sheep's milk powder (20%), synbiotics (2.4%), chicken liver powder (55%), corn starch (10.9%), dicalcium phosphate (5.5%), talc (1%), maltodextrin (4.4%), and magnesium stearate (0.8%).

In conclusion, FOS promoted the proliferation and metabolism of *L. plantarum*, selectively inhibited the growth and colonization of harmful bacteria, and increased the abundance of beneficial microbes, thereby alleviating microbial dysbiosis and maintaining intestinal microenvironment homeostasis. The prepared synbiotic sheep milk tablets demonstrated high quality and excellent palatability. This study provides experimental evidence for the development and application of *L. plantarum* and FOS in pet food formulations.

KEY WORDS: Feline, intestinal microbiota, Synbiotics, *Lactobacillus Plantarum*, fructooligosaccharides, Box Behnken

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第 1 章 绪论.....	1
1.1 引言	1
1.2 猫肠道菌群.....	1
1.2.1 肠道菌群结构特征及其生理功能	1
1.2.2 肠道菌群与机体健康	2
1.3 合生元对肠道微生物群的功能强化.....	4
1.3.1 植物乳杆菌的益生机制	4
1.3.2 益生元的益生机制	6
1.3.3 合生元协同作用促进肠道健康	6
1.4 合生元在宠物功能性食品中的应用	8
1.4.1 宠物合生元功能性产品的技术挑战与解决方案	8
1.4.2 湿法制粒技术的优势	8
1.5 课题设计意义及主要研究内容	8
1.5.1 课题设计意义	8
1.5.2 主要研究内容	9
第 2 章 植物乳杆菌与不同益生元组合的体外筛选及对猫肠道菌群的影响.....	10
2.1 引言	10
2.2 实验材料与仪器	11
2.2.1 实验材料	11
2.2.2 实验仪器	12
2.2.3 细菌及动物来源	12
2.3 实验方法与步骤.....	12
2.3.1 菌株的活化	12
2.3.2 猫胃肠液配置	13
2.3.3 植物乳杆菌 24 h 生长曲线.....	13
2.2.4 短链脂肪酸产量测定	13

2.3.5 植物乳杆菌黏附能力的测定	14
2.3.6 胃肠道耐受力测定	15
2.3.7 抑菌效应的测定	16
2.3.8 猫胃肠道体外模拟	16
2.3.9 动物实验分组及设计	17
2.3.10 猫粪便菌群 16s rRNA 分析	18
2.4 实验结果与讨论	20
2.4.1 植物乳杆菌 24 h 生长曲线	20
2.4.2 短链脂肪酸产量	21
2.4.3 黏附能力	22
2.4.4 胃肠道耐受力	23
2.4.5 CFS 的抗菌活性分析	24
2.4.6 猫胃肠道体外模拟	26
2.4.7 粪便微生物群分析	32
2.5 本章小结	36
第 3 章 湿法制粒法制备合生元羊奶片的研究	37
3.1 引言	37
3.2 实验材料与仪器	37
3.2.1 实验材料	37
3.2.2 实验仪器	38
3.2.3 适口性实验	38
3.3 实验方法与步骤	38
3.3.1 适口性实验	38
3.3.2 合生元羊奶片的制备工艺流程	39
3.3.3 原料添加量考察	39
3.3.4 润滑剂种类和添加量考察	40
3.3.5 填充剂种类和添加量考察	40
3.3.6 Plackett-Burman 试验优化配方	40
3.3.7 响应面试验优化配方	41
3.3.8 片剂质量检验	41
3.4 实验结果与讨论	42
3.4.1 单因素试验结果分析	42

3.4.2 Plackett-Burman 试验结果分析	44
3.4.3 Box-Behnken 响应面试验结果分析	45
3.4.4 验证试验	49
3.5 本章小结	49
结论与展望	50
结论	50
展望	50
参考文献	52
致谢	60

第 1 章 绪论

1.1 引言

近年来，宠物在人类生活中的角色已从传统的动物逐渐转变为家庭中不可或缺的情感依托。《2023-2024 年中国宠物行业白皮书》显示，2023 年中国宠物犬与宠物猫的数量分别达到 5175 万只和 6980 万只，养猫家庭的占比已经超过养犬家庭，这反映了中国宠物市场的偏好正在发生转变。并且随着社会经济的发展和情感需求的升级，宠物的健康与福利受到的关注日益增多^[1]，具体表现在消费者对宠物喂养方面出现越来越多元化的要求，对宠物食品中原料选择和营养成分方面格外重视，而在消费者为宠物购买的一系列营养品中，胃肠道调理类占比最大，约占 40.7%^[2]。

猫科动物具有独特的胃肠道结构，其特点是肠道相对较短且盲肠退化，这造成了其消化系统固有的脆弱性。所以胃肠道疾病是宠物猫的常发病之一，其中呕吐、腹泻、厌食或体重减轻等体征经常发生^[3]。长期以来，抗生素治疗被视为应对宠物胃肠道感染的主要预防以及治疗手段。然而药物的滥用会导致动物体内病原体产生耐药性、破坏肠道微生物群落稳定^[4]。世界卫生组织（WHO）多次警示抗生素滥用风险，促使兽医学界探索更安全的替代方案。微生态制剂因其可以调节肠道菌群平衡、增强免疫屏障及低副作用的特性成为研究热点，其中益生菌、合生元（益生菌与益生元的复合制剂）及后生元（灭活菌体及其代谢产物）的应用尤为引人注目，并将成为提升宠物肠道健康管理水平的关键。

1.2 猫肠道菌群

1.2.1 肠道菌群结构特征及其生理功能

肠道微生物由需氧菌、兼性厌氧菌和严格厌氧菌组成，研究显示，整个肠道菌群的组成与分布并不均匀，小肠主要定植有氧菌和兼性厌氧菌，

而盲肠和结肠中的优势菌种主要为兼性厌氧菌和严格厌氧菌，这对应胃肠道氧梯度的下降趋势^[5]。

猫的肠道中存在着多种细菌，其组成受多种因素影响，包括品种、地理位置、饮食习惯、年龄和整体健康状况等，但主要由厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）等组成^[6]，这些肠道核心菌群通过功能互补维系宿主健康：Firmicutes 作为碳水化合物代谢主力军，主导膳食纤维发酵并生短链脂肪酸（SCFAs），SCFAs 在动物肠道中主要参与营养物质的吸收和代谢，参与调控细胞增殖、分化和细胞凋亡等重要的生理调控过程，在维持宿主肠道健康方面发挥着重要作用^[7]；Bacteroidetes 中的拟杆菌属（*Bacteroides*）和普雷沃氏菌属（*Prevotella*）是猫肠道中的优势菌，其丰度受个体差异性的影响变化较大^[8, 9]；Actinobacteria 以双歧杆菌（*Bifidobacterium*）为代表益生菌，通过激活免疫调节通路抑制过度炎症反应^[10]；而 Proteobacteria 作为菌群稳态的“晴雨表”，其比例异常升高，如大肠埃氏菌属（*Escherichia*）、志贺氏菌属（*Shigella*）和沙门氏菌属（*Salmonella*）过度增殖，往往标志着生态失衡，可能诱发肠道炎症^[11]。

1.2.2 肠道菌群与机体健康

肠道菌群通过多重机制维持宿主健康。

（1）营养代谢与能量供给

特定的饮食能够促进特定肠道菌群的生长，进而引发宿主发酵代谢的变化，例如益生菌可以分解宿主无法消化的膳食纤维产生 SCFAs（如乙酸、丁酸、丙酸），为结肠上皮细胞提供主要能量，促进上皮细胞增殖、分化、降低细胞凋亡，对维持肠粘膜上皮细胞屏障和肠道血管屏障有重要意义^[12, 13]。肠道菌群在宿主体内不仅可以通过对营养物质的吸收、分布及代谢为宿主提供能量，还参与如调控免疫系统、影响骨代谢等过程。

（2）疾病调控

肠道菌群失衡可能导致腹胀、腹痛、腹泻和便秘等消化问题。肠道菌群失衡通过以下机制参与疾病发生发展：代谢调控层面，*Firmicutes* 与 *Bacteroidetes* 比值异常升高可增强能量摄取效率，成为肥胖发生的关键微生物标志^[14]。肥胖个体体内肠道菌群的组成往往与健康个体存在差异，特定的细菌种类有增多的风险，而有益的细菌种类则会相对减少^[15]；黏膜免疫层面，宿主肠道微生物群落的失衡会直接影响黏膜免疫系统的成熟和肠道屏障稳态的维持，加剧炎症性肠病的病理进程^[16]；神经调控层面，一些肠道菌群的代谢产物还可通过血液循环进入大脑，影响神经递质的合成和释放，进而影响情绪调节^[17]，其紊乱与动物焦虑样行为及应激反应异常密切相关。使用益生菌和益生元等干预手段来优化肠道微生物群的组成，进而缓解抑郁症状，已成为一个受到重视的研究方向^[18, 19]。这些研究揭示了肠道菌群通过能量代谢、免疫系统和神经内分泌干扰三条通路影响宿主健康的作用机制。

（3）影响肠道菌群的关键因素

肠道菌群受多种因素，包括宿主遗传、食物、环境等因素的综合影响。饮食方面，低膳食纤维饮食可通过改变肠道菌群组成、SCFAs 水平、肠黏膜屏障作用和免疫系统稳态等途径参与炎症性肠病的产生和发展^[20]。抗性淀粉可促进肠道菌群代谢生成乙酸盐、丙酸盐及丁酸盐等^[21]，以此调节肠道内 SCFAs 之间的平衡。而摄入高脂肪的食物则通过增加胆汁酸分泌抑制益生菌的生长，肠道微生物中胆汁酸水解酶活性的高低能显著影响宿主脂质代谢过程和脂肪沉积^[22]；宿主遗传与年龄方面，幼年动物因菌群系统发育未成熟，断奶期的剧烈结构重组易导致微生态失衡；老年肠道中常见的脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）可诱导巨噬细胞分泌更多的 $\text{TNF-}\alpha$ ， $\text{TNF-}\alpha$ 通过上调肌球蛋白轻链激酶加重肠上皮屏障功能障碍，降低 TJ 蛋白表达^[23]，抑制丁酸盐代谢及部分免疫功能，导致肠上皮细胞的过度增殖和代谢异常^[24]。宠物干粮中的人工添加剂则可能对肠道菌群产生潜在的负面影响，不仅抑制了肠道内有益微生物的生长，如 *Bacteroides* 和乳杆菌属（*Lactobacillus*），降低了肠道微生物的多样性，还为潜在致病菌如艰难梭菌（*Clostridioides difficile*）的增殖提供了有利条件，增加了抗生素相

关性腹泻（antibiotic-associated diarrhea, AAD）等疾病的发生风险^[25]。

1.3 合生元对肠道微生物群的功能强化

2019 年国际益生菌和益生元科学协会将合生元定义为：可被宿主微生物选择性利用的活微生物和底物组成的混合物，为宿主提供健康益处^[26]。合生元可分为互补型合生元和协同性合生元，如图 1-1 所示。互补型合生元是指在单独使用时也可对宿主产生健康益处的益生菌和益生元混合物，而协同型合生元是指活性微生物和被其选择性利用的底物组成的混合物该复合制剂可以通过协同增效机制，实现肠道菌群的功能强化^[27]。

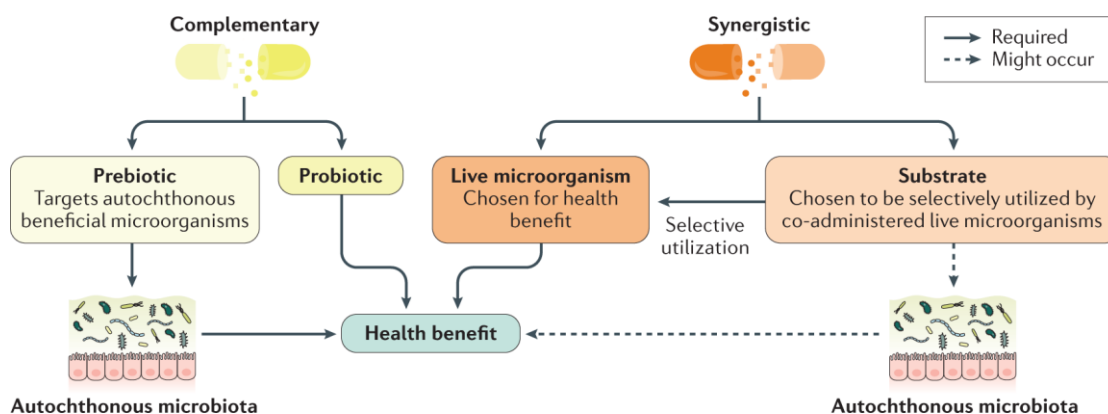


图 1-1. 合生元的分类及其机制^[26]

Figure 1-1. The classification and mechanisms of synbiotics^[26]

1.3.1 植物乳杆菌的益生机制

联合国粮食及农业组织和世界卫生组织（FAO/WHO）将益生菌定义为“活的微生物，当摄入足够量时会给宿主带来健康益处”^[28]。最常见的益生菌有 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 和酵母菌属（*Saccharomyces*）^[29]，他们通过调节免疫功能、产生抗菌化合物、改善肠道屏障和调节细胞关键信号通路等方式发挥益生作用^[30]。*L. plantarum* 是一种广泛存在于自然界的革兰氏阳性菌，可黏附并定植于机体肠道中，进而产生益生作用，其代谢产物（例如有机酸、细菌素等）能够直接作用于病原微生物^[31]。与此同时，*L. plantarum* 在极端条件下表现出较强的耐受力，包括强酸、高温、高渗透压、高胆盐等胁迫条件^[32]。这些特性为 *L. plantarum* 成为维护宠物肠道健康、减少抗生素依赖的干预手段奠定了基础。

（1）抑制病原菌，调节菌群结构。

L. plantarum 对革兰氏阳性致病菌与革兰氏阴性致病菌均具有抑制效应^[33]，其抑菌活性的大小主要受到 *L. plantarum* 的菌株来源、菌株类型和被抑制的微生物类别影响^[34]。*L. plantarum* 可以阻断病原菌对肠道上皮细胞的侵染，同时在生长的过程中与病原菌竞争营养底物，以此抑制病原菌的黏附和增殖。此外，其代谢产物乳酸、细菌素等物质可以调控肠道菌群之间的相互关系，维护肠道微生态稳定。张等人研究发现 *L. plantarum* CCFM8661 可以改变产毒素大肠杆菌（*Enterotoxigenic Escherichia coli*）对肠道菌群造成的影响，显著增加了另枝菌属（*Alistipes*）、*Blautia*、阿克曼氏菌属（*Akkermansia*）和罗氏菌属（*Roseburia*）的丰度，并降低了一些病原微生物如 *Proteobacteria* 和 *E. coli* 的相对丰度^[35]。同时还可以提升肠道内 SCFAs 浓度，有效降低 pH 值及氨浓度^[36]。

（2）免疫调节

L. plantarum 可以通过调节肠道菌群，从而改善肠道免疫力提高免疫反应，防止机体炎症的发生^[37]。其可以增强 T 细胞介导的免疫应答，通过刺激和产生不同的细胞因子调节 Th1 和 Th2 之间的平衡，提高肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、白细胞介素-1 β （IL-1 β ）、白细胞介素-6（IL-6），白细胞介素-10（IL-10）、白细胞介素-12（IL-12）、白细胞介素-2（IL-2）和干扰素- γ （IFN- γ ）的产生^[38]。其中 IL-6 可促进 B 淋巴细胞增殖、分化和诱导 Ig 产生，其含量反映着机体的体液免疫。IL-2 由凝集素或抗原激活的 T 细胞产生，其是 T 淋巴细胞存活和活化 T 淋巴细胞增殖的关键细胞因子，可以反映机体的细胞免疫^[39-41]。

（3）提高抗氧化能力

在一些外界压力下，机体会产生活性氧和自由基，从而对其造成氧化损伤。*L. plantarum* 可以提高血清和肝脏中的谷胱甘肽过氧化物酶活性，同时降低血清中丙二醛（MDA）的含量，促进抗氧化能力^[38, 42]。更有数据表明，*L. plantarum* 活性较强时，谷胱甘肽可以有效去除脂质过氧化物的最终产物，再利用活性氧的作用，有效抑制氧自由基^[43]。

(4) 降低胆固醇

血清中胆固醇升高会高血压、冠心病、动脉粥样硬化等一系列心血管疾病。目前已经提出了乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*, LAB) 降低血液中胆固醇的一些机制, 例如 LAB 降低了去结合胆盐的重吸收率, 增加了胆固醇与去结合胆盐的共沉淀^[44]; LAB 的细胞膜与胆固醇共结合^[45, 46]; 胆盐水解酶 (BSH) 催化胆盐解离^[47]; 产物短链脂肪酸也会降低血浆胆固醇水平^[48]。

(5) 其他益生功能

除上述的功能外, *L. plantarum* 还具有抗肿瘤、调控血压、保护肝脏、缓解肥胖、缓解腹泻等功能^[49-52]。

1.3.2 益生元的益生机制

2016年12月, 国际益生菌和益生元科学协会将益生元定义为: 一种被宿主微生物选择性利用并赋予健康益处的底物^[53]。其可以通过选择性地刺激肠道中一种或几种细菌的生长, 从而改善宿主健康菌群结构^[54]。核心功能是为益生菌提供专属营养支持, 通过靶向性发酵刺激有益菌生长。此外他们消化形成的次级产物最终被肠上皮吸收并通过门静脉输送到肝脏。益生元影响宿主细胞的生理过程, 参与提高免疫力、增强病原体抵抗力、矿物质摄取和降低血脂浓度^[55]。研究最多的益生元为碳水化合物包括 FOS、Inu、GOS、XOS、Sta 等。例如 GOS 是一种常用的益生元, 通过乳糖水解获得, 在宿主体内会刺激 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 的生长。FOS 可增加胃肠道对离子吸收, 降低胆固醇水平, 并刺激 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 的生长; Inu 在结肠中被 *Bifidobacterium* 分解后, 可生成 SCFAs, 降低肠道 pH 值, 增强肠上皮细胞能量代谢并减少炎症反应; 而 GOS 则通过增加肠道钙质吸收率及改善乳糖不耐受问题, 间接提升宠物消化健康。XOS 因其独特的理化特性而广为人知, 包括对肠道酶和胃酸的抵抗力、抗癌特性、抗氧化、增强免疫力和刺激有益细菌的生长^[56-58]。

1.3.3 合生元协同作用促进肠道健康

合生元通过益生菌与益生元的协同作用，实现对肠道健康的多维度调控，其核心机理可分为以下几个层面：

（1）增强益生菌的存活与定殖

益生元可以增加益生菌的耐受力，帮助其抵抗胃酸和胆汁的损害，提高到达肠道活菌的数量^[59]。除此之外，还可以提高益生菌在低温储藏和热应激中的活性^[60, 61]。

（2）促进益生菌的生长代谢

益生菌在培养基中的生长取决于其利用可发酵糖的能力，益生元可以作为“特殊营养源”，为益生菌的生长提供营养支持。研究证明，Inulin 和 FOS 可以促进副干酪乳杆菌（*Lactobacillus paracasei*）和鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）的生长^[62]。此外，GOS 在促进 *L. plantarum* BIOTECH 1074 生长的同时，还可以增加其代谢产物 SCFAs 的含量^[63]。

（3）增加抗菌活性，调节肠道菌群结构

益生元能增强益生菌的抗菌活性，使其效力高于单独使用时的效果。这种协同作用能有效调节肠道微生物群的组成，表现为放线菌的丰度增加，肠杆菌科的丰度降低^[61]。在 Zhang 等人的研究中，动物双歧杆菌乳酸亚种 BL-99 和 FOS 可以增加 *Blautia* 和 *Clostridium* 的相对丰度，同时显著降低 *Alistipes* 和 *Bacteroides* 的相对丰度，这些变化促进了 SCFAs 代谢的改变，并与 5-HT 通路相关基因的表达和血清炎症因子的调节密切相关^[64]。

（4）其他协同功能

除此之外，合生元还可以改善消化系统功能，改善矿物质的吸收，参与肝脏和心血管疾病的治疗等^[65, 66]。

这一多维度作用框架不仅揭示了合生元作用机制，更为其替代抗生素、解决宠物肠道健康问题提供了重要理论。

1.4 合生元在宠物功能性食品中的应用

1.4.1 宠物合生元功能性产品的技术挑战与解决方案

功能性宠物食品又称功能性宠物饲料、宠物保健食品，是指在基础宠物食品中添加一种或几种具有不同生物活性的物质，从而平衡和完善动物营养供给，增强宠物机体性能和增进采食性能等^[67]。其中，胃肠道健康调控类产品作为核心细分领域，主要依赖益生菌、益生元及合生元等微生物制剂的精准介入^[68]来维持肠道微生态平衡、优化消化酶活性及肠道屏障功能。然而，现行主流的膨化及烘焙宠物食品加工工艺中，高温、高压等极端生产环境对微生物制剂的抗逆性提出严峻挑战。片剂作为一种常用营养品剂型，它剂量准确、质量稳定、便于携带和喂食便捷等一系列优点^[69]，并且可以将益生菌与益生元以“后添加”方式整合至片剂中，可规避高温加工对微生物活性的热损伤。

1.4.2 湿法制粒技术的优势

目前制粒技术主要分为干法制粒和湿法制粒两大类，其中湿法制粒因其广泛的应用和重要性成为主流的制粒方法之一^[70]。湿法制粒技术主要应用于中药提取物制备固体制剂和片剂，近年来该技术也逐渐应用于制备含有天然生物活性成分的功能性产品中，其主要通过粘合剂将功能性原料与辅料粘合，依靠粒子与液体间相互作用，粘合剂填充于缝隙形成颗粒整体，为食品、药品固体制剂生产工艺中最常用的方式^[71]，其颗粒具有质量好、外形美观、流动性好、压缩成形性好等优点，并且可以改善压缩成片时裂片、硬度低、含量均匀度差等问题。

1.5 课题设计意义及主要研究内容

1.5.1 课题设计意义

随着国内伴侣动物地位的提升，消费者对宠物食品的追求更加多元化，不单要求营养均衡，更需要有改善健康、预防疾病的效果，所以一系列功能性营养品应运而生。猫胃肠道的特殊生理结构使其更加容易受到环境刺激，从而导致肠道微环境紊乱乃至炎性肠病的发生，这使得宠物主人在日常的喂养中更加注重对其肠道健康的养护。合生元是功能性宠物食品中常见的原料，具有高

效、无毒、无残留和无耐药性等特点，可以有效的维持肠道环境稳态、改善机体营养消化和吸收。但目前缺乏关于合生元在宠物中的效果验证和安全性评估研究，关于合生元的配伍研究也相对较少，限制了其在全球宠物食品市场的普及。为了筛选出具有协同益生效果的合生元，使用公认安全的 *L. plantarum* 作为益生菌，从 FOS、Inu、GOS、XOS 和 Sta 中筛选出最适配于 *L. plantarum* 的益生元，随后从体内体外双重维度探讨并验证其安全性和有效性。

1.5.2 主要研究内容

以合生元制剂开发为核心，通过系统筛选益生菌-益生元协同组合，并对其功能活性进行多维度验证，最终研制一款猫用合生元片剂。该制剂旨在优化宠物猫肠道菌群结构，为伴侣动物肠道健康管理提供创新解决方案。

(1) 复配合生元组合的筛选及体外体内模型验证

以 *L. plantarum* 作为合生元中的益生菌成分，FOS、Inu、GOS、XOS 和 Sta 作为益生元成分。从益生元对益生菌的促生长代谢能力、黏附能力、胃肠道耐受力和抑菌能力出发，筛选出具有最佳协同效应的合生元组合。随后通过模拟猫胃肠道的特点构建猫体外胃肠道模型。选取 *E. coli*、*S. aureus* 作为肠道中有害菌的代表，嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 和动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*) 作为肠道菌群中有益菌的代表，分别与模拟消化后得到的合生元无细胞上清液共培养，以上述四种指示菌的生物生长量、pH 值和最终代谢产物乳酸含量评估不同合生元对肠道微环境的影响。最后通过体内实验，对粪便进行 16s rRNA 测序来验证合生元的有效性。

(2) 猫用合生元片剂的制备

以合生元、羊奶粉、鸡肝粉为原料，滑石粉、磷酸氢钙、麦芽糊精、玉米淀粉、硬脂酸镁为辅料，通过湿法制粒工艺制备合生元羊奶片。以片剂外观、硬度、脆碎度、适口性等为评价指标，利用单因素试验考察不同配方组成对成品质量的影响，并设计 Plackett—Burman 和 Box—Behnken 响应面试验对配方中原料配比进行最终优化。

第 2 章 植物乳杆菌与不同益生元组合的体外筛选及对猫肠道菌群的影响

2.1 引言

益生菌发挥益生作用的重要前提是能够成功到达胃肠道并定植，但在其到达肠道的过程中，需要面临一些挑战，比如胃酸、胆汁盐等，这些都会使益生菌失去活性^[72]。其次，肠道中的一些病原微生物与益生菌具有相似的黏附定植功能，会竞争相同的黏附生态位，所以在这种相互竞争的过程中形成优势菌群才能发挥重要的益生作用^[73]。

L. plantarus 作为一种异型发酵乳杆菌，拥有强大的利用碳水化合物的能力，可以利用纤维二糖、甘露糖、D 核糖和 L 岩藻糖等^[74]。但不同的 *L. plantarum* 菌株拥有不同的碳水化合物代谢基因簇，这决定了菌株拥有不同的代谢谱^[75]。益生元的特性使之不被机体消化吸收，可以直接到达肠道被 LAB 等固有微生物利用。然而，所选益生元能否促进 *L. plantarum* 的生长代谢，并是否可以提高其在胃肠道中的抗逆能力和黏附能力尚不清楚。

肠道菌群与宿主的机体健康具有密切的联系。自宿主出生以来，外界的大量微生物就会黏附于体表和肠道黏膜表面，他们与宿主之间相互适应，最后形成共生关系^[2]。肠道中含有大量条件致病菌，他们会在宿主免疫低下或肠道菌群紊乱期间引发疾病，一个稳定的肠道微生物群对维持肠道的正常运转以及整体健康有促进作用^[76]，因此在日常的养护中去维护猫肠道菌群平衡至关重要。

本章以等量益生元替换 MRS 培养基中的葡萄糖，探究不同益生元对 *L. plantarum* 生长代谢影响、黏附能力的提高与否以及与常见致病菌的互作关系。随后利用体外模型探究益生元在经过胃肠道消化后是否可以继续促进 *L. plantarum* 的生长代谢并进行体内实验探究所选益生元能否对猫肠道菌群平衡和微环境造成正向影响。

2.2 实验材料与仪器

2.2.1 实验材料

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
果寡糖	河南高轩生物科技有限公司
菊粉	河南高轩生物科技有限公司
低聚半乳糖	河南高轩生物科技有限公司
低聚木糖	河南高轩生物科技有限公司
水苏糖	河南高轩生物科技有限公司
磷酸盐缓冲液 (PBS)	武汉赛维尔生物科技有限公司
人工胃液	北京范德生物科技有限公司
人工肠液	北京范德生物科技有限公司
尿素	北京范德生物科技有限公司
牛磺酸	北京范德生物科技有限公司
牛磺酸结合胆盐	北京范德生物科技有限公司
胃蛋白酶	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
胰蛋白酶	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
丙酮	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司
MRS 培养基	青岛海博生物技术有限公司
TSB 培养基	青岛海博生物技术有限公司
甲基叔丁基醚 (MTBE)	国药集团化学试剂有限公司
磷酸	国药集团化学试剂有限公司
氧气指示剂	青岛海博生物技术有限公司
2.5 L 厌氧产气包	青岛海博生物技术有限公司
2.5 L 厌氧菌培养袋	青岛海博生物技术有限公司
氧气指示剂	青岛海博生物技术有限公司
乳酸测试盒	南京建成生物工程研究所
OMEGA Soil DNA Kit	Omega Bio-Tek

2.2.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-2 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
紫外可见分光光度计	UV-3600	日本岛津公司
高速冷冻离心机	Z 326k	德国赫姆勒公司
超净工作台	BJ-2CD	上海博迅医疗生物有限公司
气相色谱-质谱仪	7890B-7000D	安捷伦科技有限公司
常温板式离心机	TD5Z	上海卢湘仪离心机有限公司
常温微型离心机 Thermo	Pico17	赛默飞世尔科技公司
电热恒温水浴箱	H-SWX-600BS	上海新苗医疗器械有限公司
超强磁力板	IMAG-96P	爱思进生物技术有限公司
96 通量核酸提取仪	NanoMagBio S-96	赛默飞世尔科技公司

2.2.3 细菌及动物来源

植物乳杆菌 HH-LP 56 由西安米先尔生物科技有限公司提供，动物双歧杆菌（BNCC185341）、嗜酸乳杆菌（BNCC185342）、大肠杆菌（BNCC336655）购自北京贝纳创联生物技术研究院，金黄色葡萄球菌（ATCC6538）购于青岛海博生物技术有限公司。

动物实验方案已获得实验动物伦理委员会批准（批准号：AD20240823），并严格遵循实验室动物使用和护理指南，以确保动物福利和参与者的知情同意。本次实验共招募了 20 只成年美国短毛猫，其中 10 只符合入选标准，它们来自同一家猫舍。这些猫年龄为 2.5 ± 0.5 岁，体重为 4 ± 0.5 kg，既往无病史，并已接受标准的疫苗接种和驱虫治疗。

2.3 实验方法与步骤

2.3.1 菌株的活化

从 -80°C 的冰箱中取出保存的 *L. plantarum*、*E. coli*、*S. aureus* 甘油管，使用接种环划线至 MRS 和 TBS 平板上， 37°C 静置培养，接种单菌落至新鲜液体培养基中，培养传代至对数期。

2.3.2 猫胃肠液配置

体外模拟消化采用了 Minekus^[77]描述的静态模拟方案进行，此外为了更加接近猫胃肠道消化系统，根据 Theysgeur^[78]和 Liu^[79]的方案对胃肠液成分进行调整，具体如表 2-3 所示。值得注意的是，由于猫缺乏唾液淀粉酶，所以模拟过程中去除了口腔阶段。

表 2-3 猫模拟胃肠液的组成

Table 2-3 Composition of feline simulated gastric fluid (SGF) and feline simulated intestinal fluid (SIF) in the vitro digestion step of experiment

Components (mg/ml)	SGF pH=2.5	SIF pH=6.5
NaCl	3.98	10.56
KCl	0.97	0.82
NaHCO ₃	0.12	2.62
KH ₂ PO ₄	0.25	6.80
MgCl ₂	0.04	0.01
CaCl ₂	0.13	0.27
Urea	0.54	0.18
Pepsin	3.20	/
Taurine	/	0.71
Taurine-binding bile salt	/	0.18
Porcine pancreatin	/	2.07
Bile salts	/	12.00

2.3.3 植物乳杆菌 24 h 生长曲线

将上述活化至对数期的 *L. plantarum* 接种至 MRS 或改良 MRS 培养基中 37 °C 恒温培养 24 h，改良的 MRS 培养基中用不同种类等浓度的益生元（20 g/L）代替葡萄糖，其他成分按照标准制备。每间隔 1 h 使用紫外可见分光光度计测量菌液在 600 nm 处的光密度，以 MRS 培养基中生长的 *L. plantarum* 作为阳性对照，无糖培养基生长的 *L. plantarum* 为阴性对照，绘制 24 h 生长曲线。

2.2.4 短链脂肪酸产量测定

（1）标准品配制

使用叔丁基甲醚（MTBE）配制 1 mg/mL 的混标储备液，使用 MTBE 稀释

分别配置成 8 个不同浓度（0.1、0.2、0.5、1、2、10、20、50 mg/L）梯度的系列标准品溶液。

（2）样品处理

1) 将上述发酵 24 h 的菌液在常温下以 8000 r/min 离心 12 min，去除底部沉淀后收集上清液，将上清液通过 0.22 μm 微孔膜过滤，获取无细胞上清液（CFS）；

2) 取 200 μL 无细胞上清液样本于 2 mL 离心管内，加入 0.2 mL 磷酸（0.5% v/v）溶液，涡旋 10 min 混匀；

3) 加入 500 μL 的 MTBE 溶剂，涡旋 3 min，冰浴超声 15 min，在 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min；吸取上清液至进样瓶中，待气相色谱-质谱仪（GC-MS）检测。

（3）GC-MS 分析条件

色谱柱：DB-FFAP（30 m*0.25 mm*0.25 μm ），载气：氦气，流速 1.0 mL/min。升温程序：90 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min，以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升高到 100 $^{\circ}\text{C}$ ，20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 150 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 0.6 min，再以 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 200 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 0.5 min，15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升高到 230 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 1 min，在选择离子监测模式（SIM）模式下对所有样品进行分析。进样口温度和质谱传输线温度分别保持在 200 $^{\circ}\text{C}$ 和 230 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.5 植物乳杆菌黏附能力的测定

（1）疏水性的测定

疏水性测定根据 Geng^[80]等人的方法加以修改进行，将 *L. plantarum* 接种于含不同益生元为碳源的 MRS 培养基中培养 18 h，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 8000 r/min 离心 12 min，弃去上清液，收集底部沉淀细菌，加入等量无菌 PBS 缓冲液洗涤两次后，重新悬浮在无菌 PBS 中调节菌液在 600 nm 处的吸光度为 0.8 ± 0.02 ，并记为 A_0 。吸取 3 mL 菌悬液与 1 mL 甲苯充分混匀，在室温下静置 1 h 使得有机相与水相分离，去除有机相后测定水相的 OD_{600} 值，记为 A_t 。疏水性计算公

式如下：

$$\text{Cell surface hydrophobicity (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100\% \quad (2-1)$$

(2) 自聚集能力测定

自聚集的测定根据 Lin^[81]的方法进行，具体如下，取 4 mL 菌悬液充分混匀（菌悬液制备方法如上），室温孵育 5 h 后，在保持静止下吸取表面菌悬液（禁止吹打），在 600 nm 下测定 OD 值，记为 A_t 。自聚集计算公式如下：

$$\text{Auto aggregation (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100\% \quad (2-2)$$

(3) 共聚集能力测定

共聚集的测定方法根据 Han^[73]等人的方法进行，简而言之，将 *E. coli* 和 *S. aureus* 在 TSB 培养基中培养 18 h，然后在 4 °C 下以 8000 r/min 离心 12 min，弃去上清液，收集底部沉淀细菌，加入等量无菌 PBS 缓冲液洗涤两次后，重新悬浮在无菌 PBS 中调节菌液在 600 nm 处的吸光度为 0.8 ± 0.02 。将病原菌悬液和制备好的 *L. plantarum* 悬液各取 2 mL 等体积混匀，在室温下孵育 5 h，在 600 nm 下测定 OD 值。共聚集计算公式如下：

$$\text{Co aggregation ability (\%)} = \left[(A_x + A_y) / 2 - A_t \right] / (A_x + A_y) / 2 \times 100\% \quad (2-3)$$

其中， A_x 和 A_y 分别代表病原菌悬液和 *L. plantarum* 悬液的初始 OD 值， A_t 则表示混合后菌悬液的 OD 值。

2.3.6 胃肠道耐受力测定

研究 *L. plantarum* 在体外模拟胃肠道中的存活率参考了 Pino^[82]的实验方法，具体操作如下：挑取 *L. plantarum* 单菌落在含不同益生元的 MRS 培养基中过夜培养，将菌体密度调节至 10^9 CFU/mL。吸取 1 mL 菌液与配置好的 SGF 在 39 °C 的水浴振荡器中以 120 r/min 的速度模拟消化 4 h。随后，将 pH 值调至 6.5，使胃蛋白酶失活。将 SGF 与 SIF 按 10:3 的比例混合，并逐步加入 1.0 M NaOH，将 pH 值校准为 6.5，模拟小肠消化过程与上述相同。模拟消化结束后通过梯度稀释涂布法分别测定 SGF 和 SIF 中的活菌数。

2.3.7 抑菌效应的测定

(1) 制备无细胞上清液 (CFS)

各称量 1.6 g 四种不同益生元溶解于 100 mL 超纯水中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 使其原始浓度为 16 mg/mL。活化 *L. plantarum* 至对数期后, 用无菌 PBS 重悬并调节 OD₆₀₀ 为 0.5。取 60 μL 菌液与 3 mL 益生元液体、2.94 mL 无糖 MRS 液体培养基混合培养 24 h, 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 r/min, 12 min), 去除底部沉淀后收集上清液, 将上清液通过 0.22 μm 微孔膜过滤, 获得 CFS。

(2) 测定最小抑制浓度 (MIC)

培养并传代指示菌 *S. aureus* 和 *E. coli*, 调节其 OD₆₀₀ 为 0.5, 加入 96 孔板中。使用微量肉汤倍比稀释法稀释 CFS, 使其最终浓度为 8 mg/mL、7.5 mg/mL、7 mg/mL、6.5 mg/mL、6 mg/mL、5.5 mg/mL、5 mg/mL、4.5 mg/mL、4 mg/mL (此浓度为益生元浓度) 加入 96 孔板中与指示菌液 1: 1 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 16 h, 使用酶标仪测定 MIC。

(3) 菌落形成单位实验 (CFU)

CFU 实验可以直观比较菌落数从而判断相同浓度下的抑菌效果, 实验方法如下: 将培养至对数期的指示菌悬液与不同浓度、种类的益生元 CFS 混合共同孵育 2 h, 将处理后的菌液均匀的涂布于 TSB 培养基中, 以单独的 *L. plantarum* CFS 为对照组。随后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养过夜, 培养完成后用平板计数法计算菌落数。

2.3.8 猫胃肠道体外模拟

按照 2.3.2 描述的猫胃肠道体外模型进行体外模拟。取 2.08 g 益生元加入 100 mL 猫胃液中模拟胃消化, 结束后与 30 mL 肠液混合进行模拟小肠消化 (使得益生元原始浓度为 16 mg/mL)。

(1) 益生元组

将无糖 MRS 液体培养基、60 μL *L. plantarum* 菌液与 3 mL 消化完成的益生元液体 (分别为 FOS、Inu、GOS、XOS) 混合后培养 24 h 后制备 CFS (制

备方法同 2.3.7)，作为合生元实验组。

（2）益生元组

3 mL 益生元消化液和 3 mL 无糖 MRS 培养基混合，作为益生元实验组。

（3）益生菌组

60 μ L *L. plantarum* 菌液、3 mL 空白消化液和 2.94 mL MRS 液体培养基培养 24 h 后制备 CFS 为益生菌实验组。

（4）对照组

3 mL 空白消化液和 3mL MRS 液体培养基混合，作为对照组。

以上四组分别与培养至对数期的 *E. coli*、*S. aureus*、*L. acidophilus*、*B. animalis* 菌液 1: 1 混合，在恒温培养箱中连续厌氧培养 24 小时。培养过程中在 0、2、4、8、16、24 h 时取样，监测其 OD₆₀₀ 和 pH 值的变化，发酵结束后使用乳酸试剂盒测定乳酸含量。

2.3.9 动物实验分组及设计

在符合要求的 10 只宠物猫中，两只猫因为腹泻问题退出了实验。剩余的 8 只猫被随机分为两组，每组四个重复，每个重复一只猫。对照组饲喂基础日粮，实验组在基础日粮外根据每只猫体重额外添加 5×10^7 CFU/kg *L. plantarum* 和 10 mg/kg 所筛选益生元。基础日粮是商业成猫猫粮，满足日常营养需求，含有以下成分和添加剂：鲜鸡肉、冻鸡腿肉、鳕鱼、冻鸡心、冻鸡肝、马铃薯淀粉、鱼油、裂壶藻粉、丝兰粉、胡萝卜、卵磷脂、牛磺酸、氯化钾、磷酸氢钙、蛋白铁、蛋白铜、蛋白锰、蛋白锌、酵母硒、氯化钠、维生素 A 乙酸酯、维生素 D₃、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 B₁₂、D-泛酸钙、烟酰胺、抗氧化剂、叶酸、D-生物素、氯化胆碱，营养水平如表 2-4 所示。整个实验维持 35 天，包括 7 天的适应期^[83, 84]和 28 天实验期，在实验期间猫被允许自由进水、饮食和活动，方案如图 2-1。最后一天在排便后 15 min 内收集新鲜粪便样本到 2 mL 一次性使用粪便采集保存管中，用液氮速冻，然后转移至 -80 °C 储存以备后续微生物群分析。

表 2-4 基于干物质的基础日粮化学成分

Table 2-4 Chemical composition of basal diets based on dry matter content

Nutrient	Content, %
Crude Protein	47.40
Crude Fat	22.05
Crude Ash	7.20
Crude fiber	2.50
Moisture	4.60
Calcium	1.22
Phosphorus	0.93
Taurine	0.20
Water-Soluble Chloride	0.30

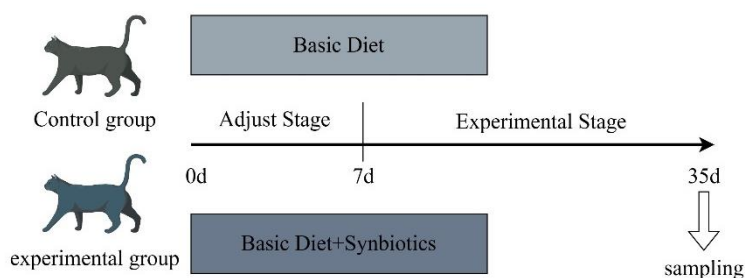


图 2-1. 对照组猫 (n=4) 喂食基础饲料, 实验组猫 (n=4) 在基础饲料上额外喂食 5×10^7 CFU/kg 的 HH-LP 56 和 10 mg/kg 的果寡糖

Figure 2-1. Cats in the control group (n=4) were fed a basal diet, whereas those in the experimental group (n=4) received the basal diet supplemented with 5×10^7 CFU/kg of HH-LP 56 and 10 mg/kg of FOS

2.3.10 猫粪便菌群 16s rRNA 分析

(1) DNA 的提取和目标片段 PCR 扩增

采用 OMEGA Soil DNA Kit 试剂盒提取猫粪便中的核酸。进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分子大小判断, 利用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。使用正向引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和反向引物 806R (5'-

GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16s rRNA 基因 V3-V4 区进行 PCR 扩增。在引物中加入特异性 7-bp, 用于多重测序。PCR 组份包括 5 μ L 缓冲液 (5 $\times$)、5 μ L High GC Buffer (5 $\times$)、0.25 μ L Q5 high-fidelity DNA polymerase (5 U/ μ L)、2 μ L (10 mM) dNTPs、1 μ L (10 μ M) 正向和反向引物、2 μ L DNA 模板和 8.75 μ L 超纯水。将 PCR 反应所需的成分配置完后, 在 PCR 仪上于 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 使模板 DNA 充分变性, 然后进入扩增循环。在每一个循环中, 先于 98 $^{\circ}$ C 保持 15 s 钟使模板变性, 然后将温度降到 50 $^{\circ}$ C, 保持 30 s, 使引物与模板充分退火; 在 72 $^{\circ}$ C 保持 30 s, 使引物在模板上延伸, 合成 DNA, 完成一个循环。重复这样的循环 25-27 次, 使扩增的 DNA 片段大量累积。最后, 在 72 $^{\circ}$ C 保持 5 min, 使产物延伸完整, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增结果进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 切取目的片段然后用 Axygen 凝胶回收试剂盒回收目的片段。利用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 对 PCR 产物在酶标仪上进行定量, 然后按照每个样品所需的数据量进行混样。随后利用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 进行建库。

1) 首先进行的末端修复, 过程是利用试剂盒中的 End Repair Mix 2 将 DNA 5' 端突出的碱基切除, 3' 端缺失的碱基补齐, 同时在 5' 端加上一个磷酸基团。

2) 在 DNA 的 3' 端单独加上一个 A 碱基, 以防止 DNA 片段的自连, 同时保证 DNA 与 3' 端有一个突出 T 碱基的测序接头相连。

3) 在序列 5' 加一个有特异性标签的接头, 使 DNA 最终杂交到 Flow Cell 上。

4) 通过 PCR 扩增已经加上接头的 DNA 片段, 然后利用 Beckman XP Beads 纯化 PCR 体系。

5) 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳来对文库做最终的片段选择与纯化。

(2) 测序

1) 取 1 μ L 文库, 在 Agilent Bioanalyzer 分析仪上用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 对文库做 2100 质检, 合格的文库只有单一的峰, 无接头。

2) 利用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega Quanti Fluor 上对文

库进行定量，合格的文库计算后浓度应在 2 nM 以上。

3) 对合格的文库，在 Illumina NovaSeq 机器上利用 NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles) 进行 2×250 bp 的双端测序。

(3) 测序数据处理与分析

1) 使用 QIIME2 对微生物组生物学信息进行分析，然后使用 DADA2 插件对序列进行质量过滤、去噪、拼接和嵌合体去除等数据处理。对上述获得的序列按 100% 的序列相似度进行归并，生成特征性序列 ASVs 以及丰度数据表格。将 ASV 特征序列与数据库中的参考序列相比对，获取每个 ASV 所对应的分类学信息，并使用 R 软件将各样本在各分类水平的鉴定结果绘制成柱状图，直观地比较不同样本的 ASV 数和分类地位鉴定结果的差异。

2) 使用 QIIME2 和 QIIME2 软件对每个样本计算以下多样性指数，包括 Chao1 指数、Observed species 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。使用 UniFrac 距离度量进行 Beta 多样性分析，调查样本间的微生物群落结构变化。采用线性判别分析效应大小 (LEfSe) 方法，检测组之间差异丰富的分类单元。

2.4 实验结果与讨论

2.4.1 植物乳杆菌 24 h 生长曲线

为了探究 *L. plantarum* 是否可以利用益生元进行生长增殖，同时为了筛选出具有协同效应的益生元组合，在 24 h 内监测 *L. plantarum* 在 600 nm 处的光密度，以判定益生元的促生长作用。

结果如图 2-2 显示，与无碳源组 (CK 组) 相比，五种益生元均可以被 *L. plantarum* 利用，7 小时后进入对数生长期，但 Sta 的益生效果远远低于其他四种益生元。其中 FOS 起到了优秀的促生长作用，甚至超过葡萄糖，这与 Wang^[85] 等人的结果不谋而合。这是因为 FOS 是由一个蔗糖分子通过 β -1,2 糖苷键与 1 至 3 个果糖分子连接构成的，*L. plantarum* 的胞外酶 β -呋喃果糖苷酶水解 FOS 释放出果糖，随后被代谢为能量来源以供生长。Inu 同样也可以部分水解释放出较短的蔗糖和果糖^[86, 87]。益生元的类型是影响益生菌生长的重要因素，不同益生菌菌株对不同的寡糖表现出不同的偏好力和亲和力，因此筛选出适合 *L.*

plantarum 的益生元尤其重要。根据本实验排除 Sta, 选用 FOS、Inu、GOS、XOS 四种益生元进行后续筛选实验。

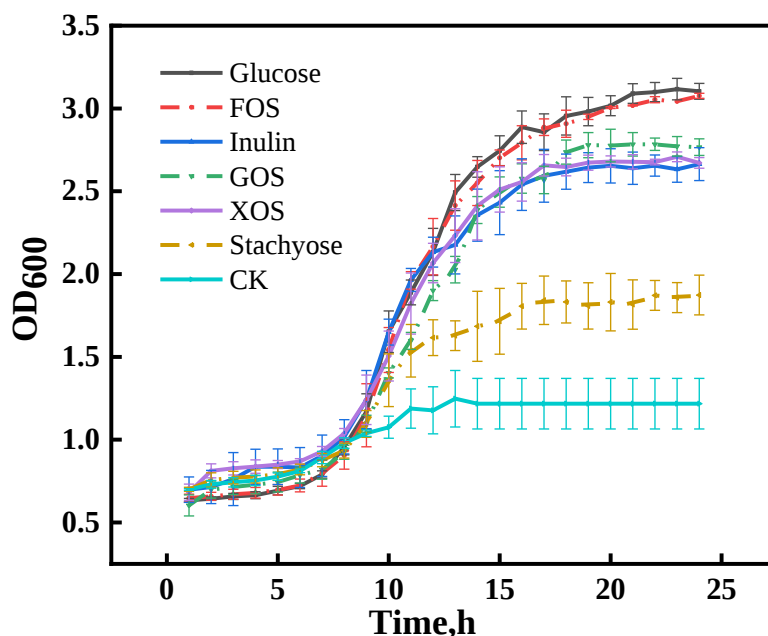


图 2-2. HH-LP 56 在含不同益生元培养基中的生长曲线, 数据表示为平均标准偏差, $n = 3$

Figure 2-2. Growth curves of HH-LP 56 in media containing different prebiotics, the results were expressed as the average SD, $n = 3$

2.4.2 短链脂肪酸产量

益生菌可以通过发酵益生元产生短链脂肪酸^[88], 其中乙酸、丙酸和丁酸等具有重要的健康益处, 有助于肠道健康、免疫调节和大脑发育^[89]。表 2-5 描述了 *L. plantarum* 利用不同益生元代谢产生的短链脂肪酸含量, 五组均产生了乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、异丁酸、异戊酸, 不同组的含量间有显著差异, 但乙酸的占比都是最高。FOS 组的含量最高, 约为 1.69 mg/mL, Inu 组的短链脂肪酸含量仅次之, 约为 1.57 mg/mL, 均高于葡萄糖的产量 (1.55 mg/mL)。相比之下, 添加 XOS 产生的短链脂肪酸含量最低, 仅为 1.36 mg/mL。 *L. plantarum* 对不同寡糖的利用程度直接影响了短链脂肪酸的产量和种类, 在产生的短链脂肪酸结构中乙酸是主要成分, 其次有少量的丙酸、丁酸等。相关研究证明乙酸能调节肠道环境的酸碱度, 维持肠道内环境稳定, 促进有益菌生长, 同时抑制病原微生物的入侵, 还能为肠道细胞提供能量, 有助于

其生长和发挥功能。此外，乙酸可以通过交叉喂养被肠道内的其他细菌代谢（如 Firmicutes 内的某些菌株能够利用乙酸合成丁酸），从而增强肠道微生物群的多样性和稳定性^[90-92]。FOS、Inu 与 *L. plantarum* 的合生元组合与葡萄糖对照组相比，产生的短链脂肪酸总量更多，表明益生元和益生菌的协同作用可能比单个成分的贡献更大。本实验结果与生长曲线相关联，联合说明了 FOS 是促进 *L. plantarum* 增殖和增加短链脂肪酸产量的最佳碳源。

表 2-5 HH-LP 56 利用不同益生元发酵 24 小时后的上清液中短链脂肪酸的含量

Table 2-5 Short-chain fatty acids in cell-free supernatants of HH-LP 56 after 24 hours of fermentation with the addition of different carbon sources

	Organic acid, mg/L fermentation broth				
	Glu	FOS	Inulin	GOS	XOS
Acetic Acid	1531.59±3.90 ^c	1675.51±4.91 ^a	1561.34±1.71 ^b	1510.16±5.50 ^d	1349.72±5.00 ^d
Propanoic Acid	5.87±0.01 ^a	3.45±0.01 ^b	3.24±0.05 ^c	3.24±0.10 ^c	3.06±0.03 ^d
Butyric Acid	2.09±0.03 ^a	1.79±0.02 ^c	1.9±0.02 ^b	1.78±0.02 ^c	1.71±0.01 ^d
Valeric Acid	1.29±0.02 ^b	1.11±0.01 ^c	1.37±0.01 ^a	1.02±0.06 ^d	0.96±0.02 ^d
Hexanoic Acid	1.37±0.01 ^b	1.08±0.09 ^c	1.47±0.01 ^a	0.93±0.02 ^d	0.90±0.01 ^d
Isobutyric Acid	3.54±0.01 ^a	1.61±0.02 ^{cd}	1.86±0.03 ^b	1.59±0.03 ^d	1.63±0.02 ^c
Isovaleric Acid	1.57±0.01 ^a	0.99±0.02 ^{bc}	1.04±0.06 ^b	0.93±0.03 ^{cd}	0.90±0.006 ^d

注：数据表示为平均标准偏差，n = 3；不同字母表示组间差异显著（ $P < 0.05$ ）

2.4.3 黏附能力

益生菌成功附着于肠道是其发挥益生作用的前提条件。细菌附着是一个多方面过程，由表面间的非特异性物理化学相互作用导致的。疏水性在细菌有效附着于肠上皮细胞方面起着关键作用。自聚集这一术语用于描述相同菌株在环境中形成细胞团的能力，这有助于生物膜的形成。共聚集指的是益生菌附着于致病菌的过程，这种机制有助于抑制致病菌在肠道内的定植^[73, 93-95]。

比较了四种不同益生元为唯一碳源时，*L. plantarum* 表现出的疏水性与自聚集能力大小。如图 2-3 A 所示，Inu 培养的 *L. plantarum* 的疏水性最高，可达到 40%，但与 FOS 和 GOS 组相比没有显著差异（ $P > 0.05$ ）。XOS 组则显著低于其他三组。Inu 组生长的 *L. plantarum* 自聚集能力显著高于其他三组，XOS 中观察到的自聚集能力最低，此结果说明 Inu 可以有效促进 *L. plantarum* 与肠

道上皮细胞的粘附（图 2-3 B）。

四种益生元培养的 *L. plantarum* 与 *E. coli* 和 *S. aureus* 的共聚集百分比均在 20%以上（图 2-3 C, D），没有显著性差异（ $P>0.05$ ），但有趣的是，与 *E. coli* 的共聚集百分比明显高于 *S. aureus*，说明四种益生元在一定程度上相同的增加 *L. plantarum* 与病原菌共聚集的能力，干扰病原菌在肠道中定植，预防被病原菌感染，但关于益生元对于致病菌的作用机制应该从多方面评估判断。在 Geng 等人^[80]的研究中，同样发现 Inu 同样促进了副干酪乳杆菌 VL8 的疏水性、自聚集能力，除此之外还增强了与鼠伤寒沙门氏菌的共聚集能力。

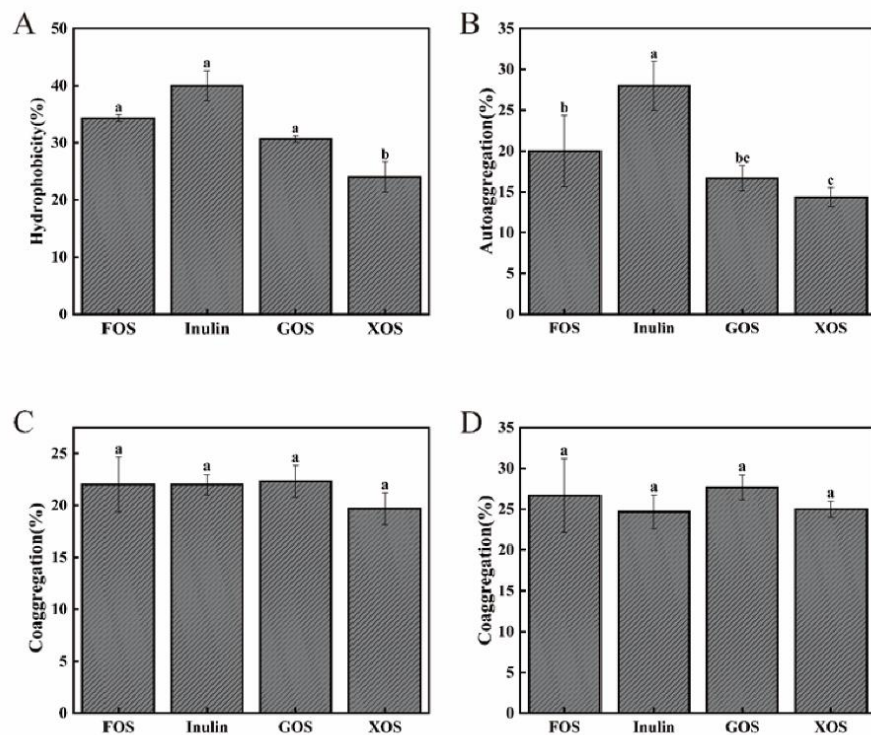


图 2-3. HH-LP 56 在含不同益生元培养基中生长的黏附能力表现（A）疏水性；（B）自聚集性；与金黄色葡萄球菌（C）和大肠杆菌（D）的共聚集能力；数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ ；不同字母表示组间差异显著（ $P < 0.05$ ）

Figure 2-3. The adhesion ability of HH-LP 56 grown in culture media containing different prebiotics (A) Hydrophobicity; (B) Auto-aggregation; Co-aggregation capacity with (C) *Staphylococcus aureus* and (D) *Escherichia coli*; the results were expressed as the average SD, $n = 3$; different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.4.4 胃肠道耐受力

益生菌是否可以耐受胃肠道的极端环境，确保存活到达肠道是其产生益生作用的重要前提。益生菌在经过胃肠道时需要克服低 pH、胆汁盐、酶和肠道蠕动这些挑战^[93]，通常通过体外模拟耐受性实验预测其在宿主肠道中的存活率^[96]。如图 2-4 所示，以四种不同益生元为碳源生长的 *L. plantarum* 在胃肠道中的存活率均达 70% 以上，且四种益生元之间无显著性差异，这表明其可以耐受猫胃肠道极端环境，成功到达肠，具有良好的耐受性。研究表明 *L. plantarum* 需要利用糖类物质合成胞外多糖，这些胞外多糖在一定程度上保护益生菌免受极端环境的伤害^[97]。因此推测所选用四种益生元均可以促进 *L. plantarum* 形成胞外多糖，导致四种益生元的保护作用差异并不显著。

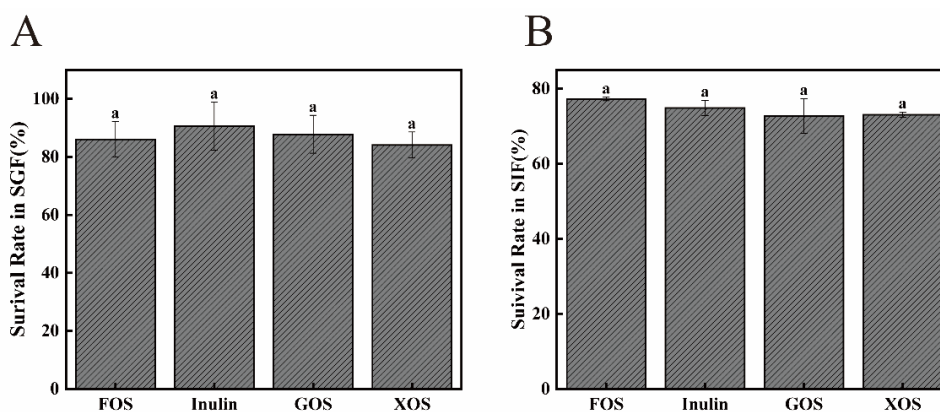


图 2-4. 不同益生元培养的 HH-LP 56 在模拟胃液和模拟肠液中的存活率，数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ ；不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 2-4. Survival Rates of HH-LP 56 Cultivated on different Prebiotics in SGF and SIF. The results were expressed as the average SD, $n = 3$; different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.4.5 CFS 的抗菌活性分析

根据 CFS 对测试菌株 MIC 实验评估（表 2-6），FOS、Inu 合生元组对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑制效果最好，浓度为 3.5 mg/mL 时可以抑制 *S. aureus*，3.25 mg/mL 时可以抑制 *E. coli*，XOS 组抑制效果最差。四种合生元组合对 *E. coli* 的最小抑菌浓度明显低于 *S. aureus*。

表 2-6 最小抑菌浓度 (mg/mL)

Table 2-6 MIC (mg/mL)				
Materials	<i>L. plantarum</i> 56			
	+FOS	+Inulin	+GOS	+XOS
<i>S. aureus</i>	3.50	3.50	3.75	4.00
<i>E. coli</i>	3.25	3.25	3.50	3.75

CFU 实验表明（图 2-5），在 4 mg/mL 的相同浓度下，四种合生元 CFS 均有显著的抗菌效果。对照组是无益生元添加的 *L. plantarum* CFS，其对 *S. aureus*、*E. coli* 抑制率分别为 91.1%、91.2%。相比而言，相同浓度下合生元 CFS 的抗菌活性大大提升，其中 FOS 和 *L. plantarum* 组抑菌率最高，对 *E. coli* 和 *S. aureus* 均在 99% 以上，而 XOS 组最低。这些结果与 MIC 实验结果相同。

有研究发现 *L. plantarum* 与 FOS 的组合会减少铜绿假单胞菌生物被膜的形成，并降低其毒力因子的生成^[98]。有趣的是，四种组合中无论对革兰氏阴性菌还是革兰氏阳性菌，*L. plantarum* 与 FOS 组合的合生元都拥有最低的 MIC 值和最高的抑菌率。且与益生菌对照组相比，合生元则表现出了更好的抑菌效果。这一点也被 Nico G^[99]等人验证，他们发现 *L. plantarum* 与 GOS 的合生元组合对抗霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）、副溶血性弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、哈维氏弧菌（*Vibrio harveyi*）时，形成的抑菌圈均大于单独益生菌形成的抑菌圈。

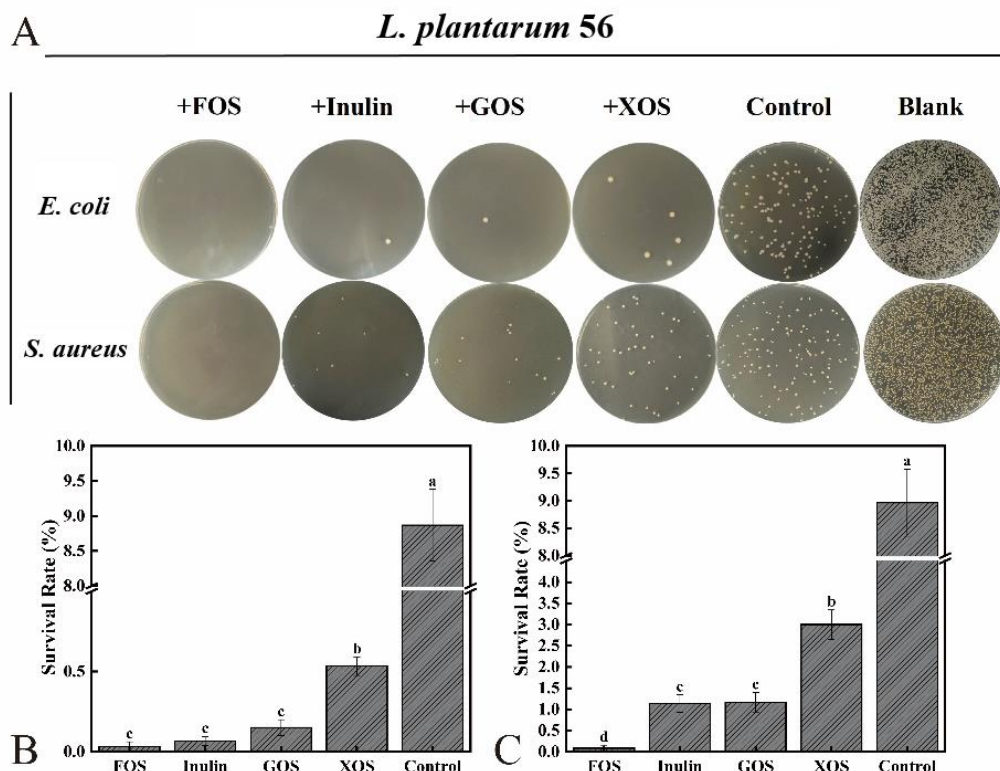


图 2-5. 将不同合生元 CFS 与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌悬液共培养 2 小时后，涂布于琼脂平板上获得平板图像；对照组用 HH-LP 56 的 CFS 处理，空白组未作任何处理；（A）相同浓度下不同合生元组的菌落形成单位实验；（B）大肠杆菌的存活率；（C）金黄色葡萄球菌的存活率。数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ ；不同字母表示组间差异显著（ $P < 0.05$ ）

Figure 2-5. Plate images were obtained after co-culturing different synbiotic CFS with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial suspensions for 2 hours, followed by spreading on agar plates; the control group was treated with the CFS of HH-LP 56 alone, while the blank group received no treatment; (A) CFU experiments of different synbiotic groups at the same concentration; (B) Survival rates of *Escherichia coli*; (C) Survival rates of *Staphylococcus aureus*; the results were expressed as the average SD, $n = 3$; different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.4.6 猫胃肠道体外模拟

为了更加全面的了解益生元、益生菌、合生元对肠道菌群的影响，选取猫肠道中四种常见菌作为指示菌代表肠道菌群，进行猫肠道体外模拟，动态监测模拟过程中生物增长量、pH、乳酸含量的变化，进而判断可能会对肠道微环境

造成的影响。

(1) 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌

如图 2-6，四种益生元对 *E. coli* 和 *S. aureus* 均无抑制作用，但对其利用度低于葡萄糖。从抗菌曲线 2-6 A2、B2 可以看出，*L. plantarum* 虽然能有效降低生物量，但抑制效果远远低于合生元组合。其中 FOS、Inu、GOS 与 *L. plantarum* 的合生元组合能有效抑制致病菌的生长，并持续 24 h，XOS 与 *L. plantarum* 组在培养 8 h 后生物量呈现上升趋势，抑菌效果变差。益生元虽然可以促进 *L. plantarum* 的生长和代谢，但 *E. coli* 与 *S. aureus* 同样也利用益生元进行生长，所以益生元与益生菌的联合使用尤为重要。

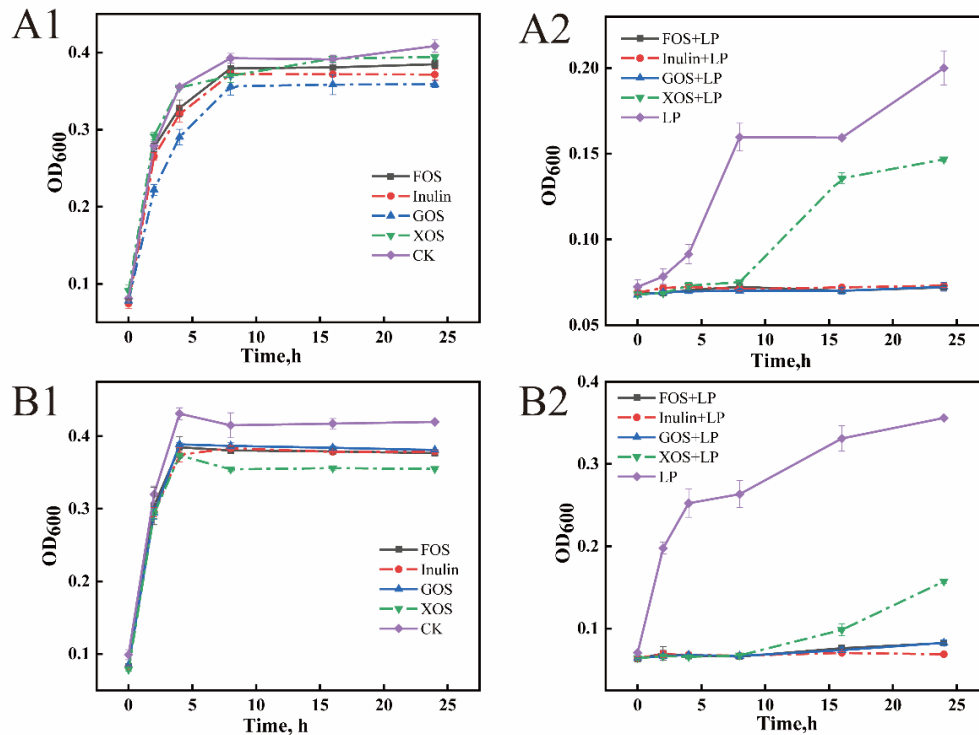


图 2-6. (A) 大肠杆菌和 (B) 金黄色葡萄球菌在不同益生元 (1) 和合生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时的动态曲线；数据表示为平均标准偏差， $n = 3$

Figure 2-6. The dynamic curves of (A) *Escherichia coli* and (B) *Staphylococcus aureus* after being cultured in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestion fluid media for 24 h; the results were expressed as the average SD, $n = 3$

图 2-7 是 *E. coli* 和 *S. aureus* 在模拟消化过程中 pH 的变化趋势。由于 *E.*

coli 和 *S. aureus* 不同程度利用益生元生长, 随着时间流逝发酵液 pH 随之降。有趣的是, 利用消化益生元发酵的 *E. coli* 增长量低于葡萄糖组, 但 pH 下降程度却高于葡萄糖组, 说明 *E. coli* 利用益生元会产生更多的酸。而 *S. aureus* 利用 Inu、GOS、木糖产酸能力均低于葡萄糖。合生元 CFS 和益生菌 CFS 组由于已经经过 *L. plantarum* 发酵, 所以起始 pH 较低, 但除 XOS 合生元和益生菌组 pH 略有下降外, 其余下降并不明显, 可能是抑制了致病菌生长的原因。

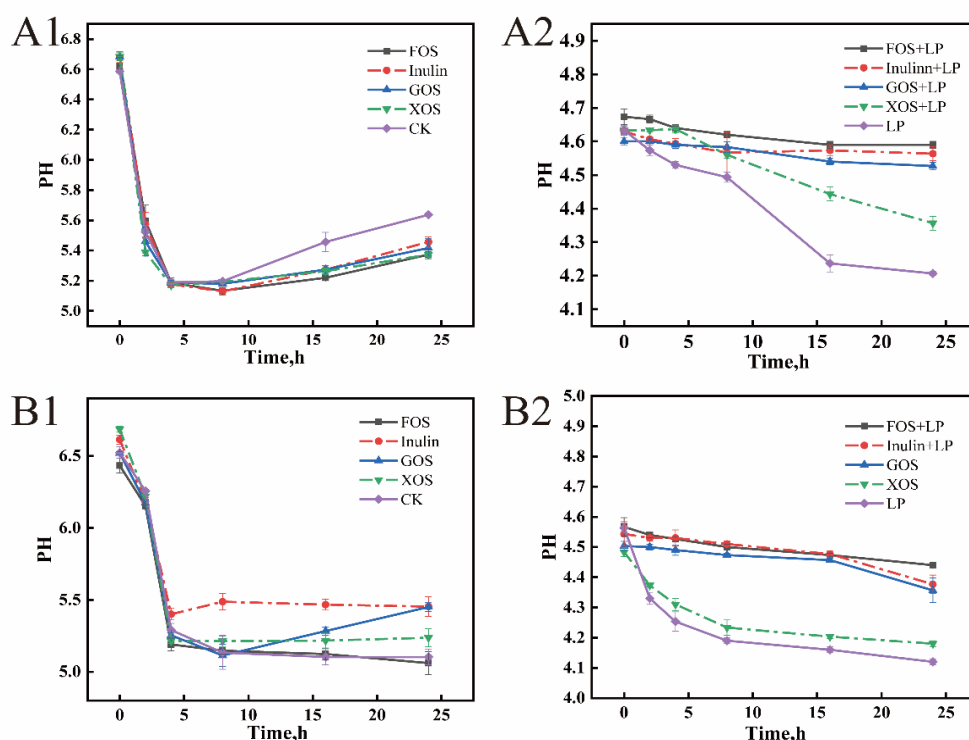


图 2-7. (A) 大肠杆菌和 (B) 金黄色葡萄球菌在不同益生元 (1) 和合生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时的 pH 曲线, 数据表示为平均标准偏差, $n = 3$

Figure 2-7. The pH changes during 24 h cultivation of (A) *Escherichia coli* and (B) *Staphylococcus aureus* in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestion fluid culture media were monitored; the results were expressed as the average SD, $n = 3$

图 2-8 为发酵结束后乳酸水平, 可以看出 *E. coli* 和 *S. aureus* 也可以利用消化后的益生元产生乳酸。其中四种益生元均增强了 *E. coli* 产乳酸的能力。而对于 *S. aureus*, FOS 的乳酸水平与葡萄糖组相当, 其余均减少了其产乳酸的水平。合生元组乳酸生成的含量高于单一益生元, 其中木糖组和 *L. plantarum* 组乳酸含量最高。

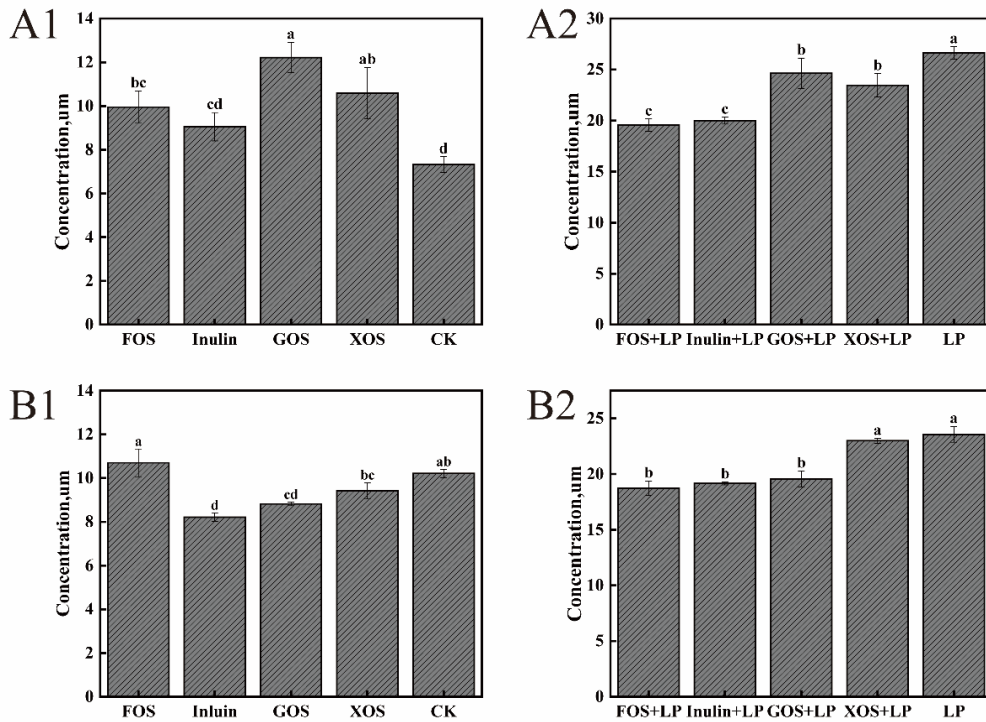


图 2-8. (A) 大肠杆菌和 (B) 金黄色葡萄球菌在不同益生元 (1) 和合生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时后的乳酸含量；数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ ；不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 2-8. The lactic acid levels of (A) *Escherichia coli* and (B) *Staphylococcus aureus* following 24-h cultivation in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestive fluid culture media; the results were expressed as the average SD, $n = 3$; different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

(2) 嗜酸乳杆菌和动物双歧杆菌

L. acidophilus 和 *B. animalis* 是猫肠道中常见的有益菌。如图 2-9 所示，四种益生元都可以很好的被有益菌利用。对于 *L. acidophilus*，四种益生元的益生作用均超过葡萄糖，FOS 对 *B. animalis* 的益生效果最大。而关于合生元是否对肠道有益菌同样抑制的问题，以乳酸链球菌素 (Nisin) 为对照进行探讨，Nisin 是最常见的商业食品防腐剂，对大多数革兰氏阳性菌均有很强的抑制特性^[100]。可以从图 2-9 A2、B2 中看出，Nisin 几乎完全抑制了有益菌的生长，而四种合生元 CFS 对有益菌的抑制作用并不明显，其中 FOS、XOS 与 *L. plantarum* 合生元组合对 *L. acidophilus* 的生长几乎没有影响，FOS、Inu、XOS 与 *L. plantarum* 合

生元组合对 *B. animalis* 也无抑制作用。

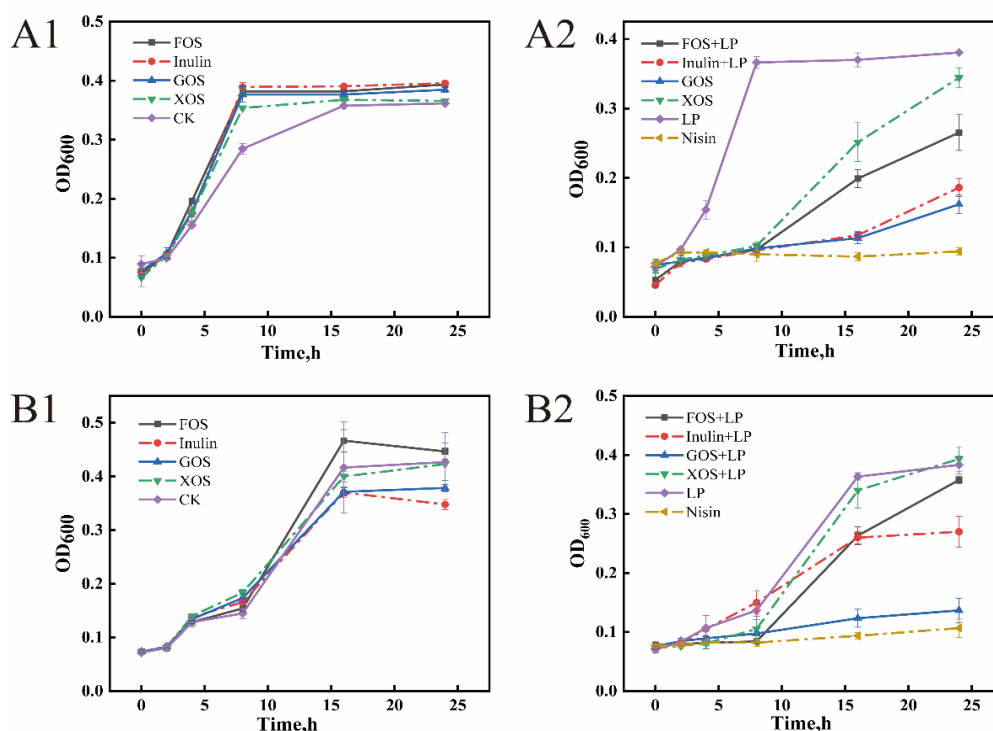


图 2-9. (A) 嗜酸乳杆菌和 (B) 动物双歧杆菌在不同益生元 (1) 和合生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时的动态曲线；数据表示为平均标准偏差， $n = 3$

Figure 2-9. The dynamic curves of (A) *Lactobacillus acidophilus* and (B) *Bifidobacterium animalis* after being cultured in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestion fluid media for 24 h; the results were expressed as the average SD, $n = 3$

图 2-10 是利用消化产物培养两种有益菌的 pH 变化，可以看出益生元组 pH 下降显著，说明两种益生菌均可以利用消化后的益生元产酸。与 *E. coli* 和 *S. aureus* 不同的是，与合生元组共培养的 *L. acidophilus* 和 *B. animalis* 的发酵液 pH 仍有下降，这会对维持肠道低 pH 值更有利。

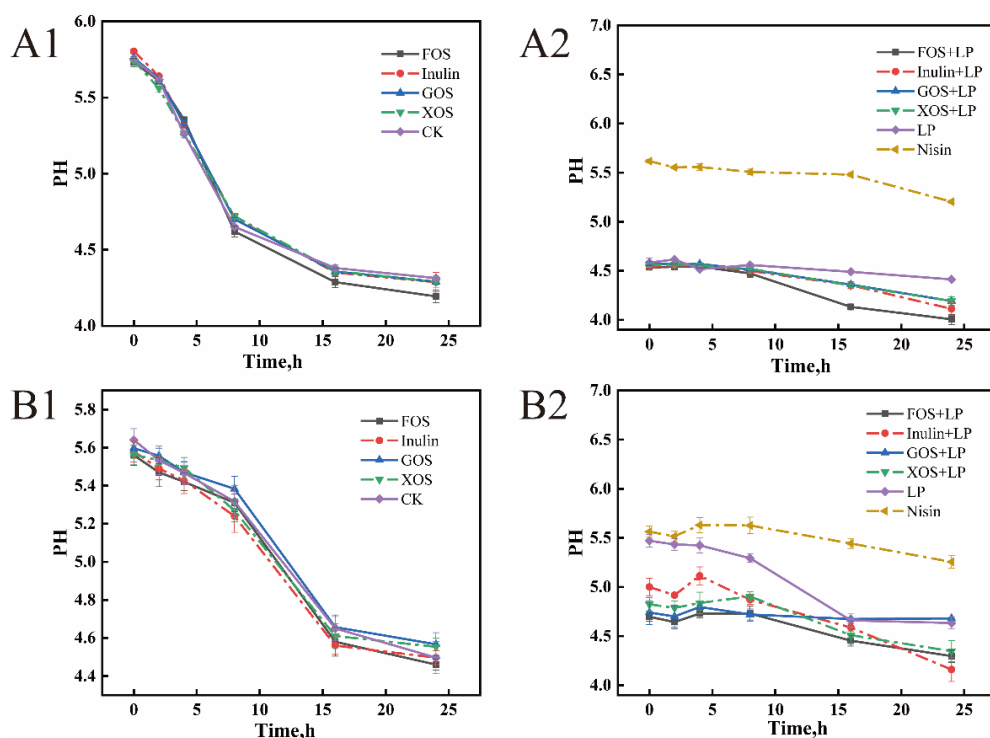


图 2-10. (A) 嗜酸乳杆菌和 (B) 动物双歧杆菌在不同益生元 (1) 和合益生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时的 pH 曲线; 数据表示为平均标准偏差, $n = 3$

Figure 2-10. The pH changes during 24 h cultivation of (A) *Lactobacillus acidophilus* and (B) *Bifidobacterium animalis* in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestion fluid culture media were monitored; the results were expressed as the average SD, $n = 3$

图 2-11 所绘的是发酵结束后乳酸含量, 与 *E. coli* 与 *S. aureus* 相比, *L. acidophilus* 和 *B. animalis* 可以更好的利用消化后的益生元产生乳酸, 但合益生元组整体乳酸水平仍是最高。Nisin 组因为抑制了有益菌的生长, 所以 pH 下降并不显著, 乳酸水平含量也最低。

在体外模拟中, FOS 和 *L. plantarum* 的合益生元表现出了最、优秀的效果, 不仅有效抑制了致病菌的生长, 而且对肠道有益菌的生长并无影响。值得注意的是, 该菌株对有益菌的抑制活性较低, 表明其在抑菌方面有潜在的选择性。Han 等人^[101]发现 *Weissella* sp. SNUL2 在抑制致病菌的前提下, 对 *L. plantarum*、清酒乳杆菌、干酪乳杆菌等均无抑制作用。同样 Zhang^[102]在体外肠道模型中也验证了 *L. plantarum* 能增加肠道内双歧杆菌等有益菌的丰度, 抑制 *E. coli*、志贺氏菌等有害菌的生长。FOS 和 *L. plantarum* 的组合通过直接对

抗或间接营养竞争机制重塑肠道微生物群的结构，抑制病原菌并为益生菌创造生态位，从而增强肠道微生物群落的稳定性。体外消化模拟实验中 pH 值的变化和乳酸含量侧面证实了这一假设。与益生菌和益生元组相比，合生元组的 pH 值降低更显著，乳酸积累更多。肠道中的微生物通过发酵益生元产生乳酸，随后乳酸又被结肠中微生物利用产生丁酸或丙酸等短链脂肪酸从而降低肠道 pH，酸性环境不利于致病菌的生长，但对生长环境偏酸性的益生菌无影响。综上结果，将选用 FOS 和 *L. plantarum* 作为合生元组合进行猫体内试验。

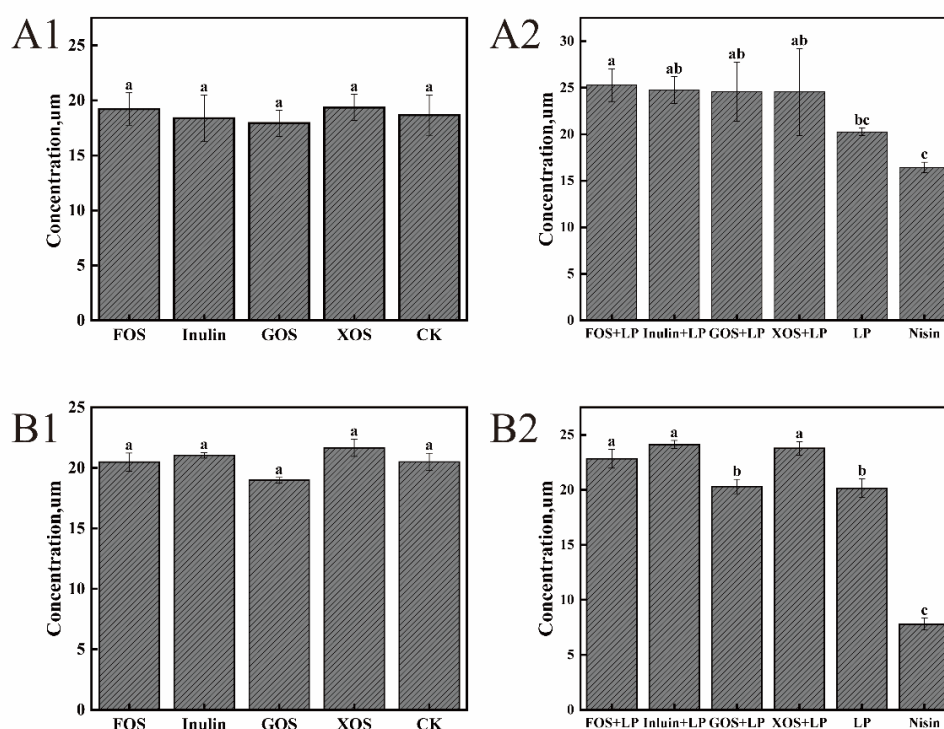


图 2-11. (A) 嗜酸乳杆菌和 (B) 动物双歧杆菌在不同益生元 (1) 和合生元 (2) 消化液培养基中培养 24 小时后的乳酸含量；数据表示为平均标准偏差， $n = 3$ ，不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 2-11. The lactic acid levels of (A) *Lactobacillus acidophilus* and (B) *Bifidobacterium animalis* following 24 h cultivation in different prebiotic (1) and synbiotic (2) digestive fluid culture media; the results were expressed as the average SD, $n = 3$; different letters denote statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.4.7 粪便微生物群分析

为了全面评估微生物群落的 α 多样性，使用了 Chao1 和 Observed species 来

表征丰富度，使用了 Shannon 和 Simpson 指数来量化多样性。Observed species 提供了实际测量的数据，而 Chao1 指数则估计未观测到的分类单元的数量^[103]。Shannon 指数反映了总体多样性，而 Simpson 指数则揭示了群落内物种的优势度^[104]。这些指数能够有效互补，从而克服了仅依赖单一指标的固有局限性，为微生物群落结构提供了更可靠的评估。如图 2-12 (A)、(B) 对组间物种丰富度的可视化显示，合生元组的微生物群丰富度大于对照组 ($P < 0.05$)。表征微生物群落多样性的 Simpson 指数和 Shannon 指数显示各组间的差异在统计学上不显著 ($P > 0.05$)。Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间，物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率，因此也被称为生境间多样性^[105]。根据图 2-13 (A) 中 PCoA 显示，并未发现实验组与对照组间的微生物群有显著性差异 ($P = 0.764$)。

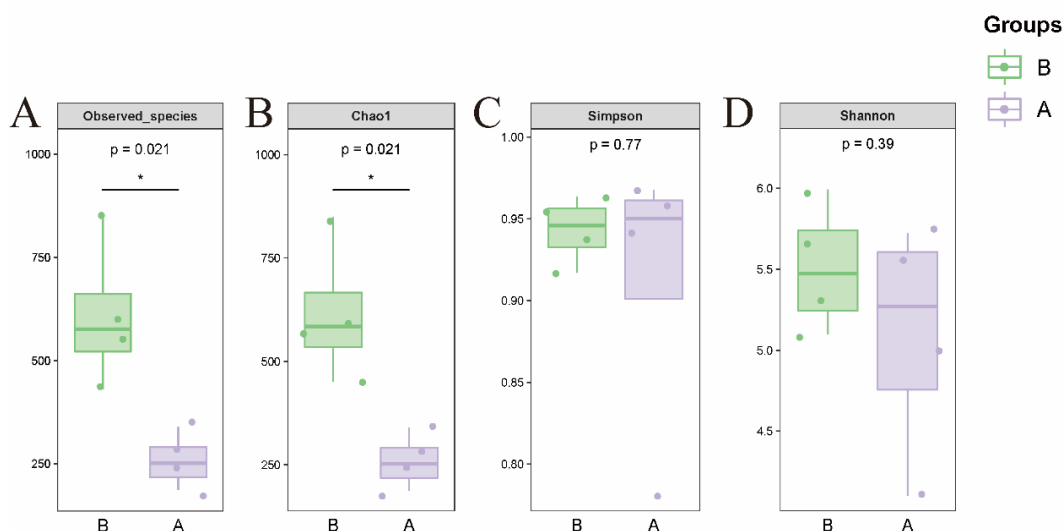


图 2-12. (A) 微生物群落的 observed species 指数；(B) 微生物群落的 Chao 指数；(C) 微生物群落的 Simpson 指数；(D) 微生物群落的 Shannon 指数；A 为对照组，B 为实验组，数据表示为平均标准偏差， $n = 4$

Figure 2-12. (A) The observed species of the microbial community of the microbial community; (B) Chao index of the microbial community; (C) Simpson index of the microbial community; (D) Shannon index of the microbial community; A represents the control group, and B represents the experimental groups; the results were expressed as the average SD, $n = 4$

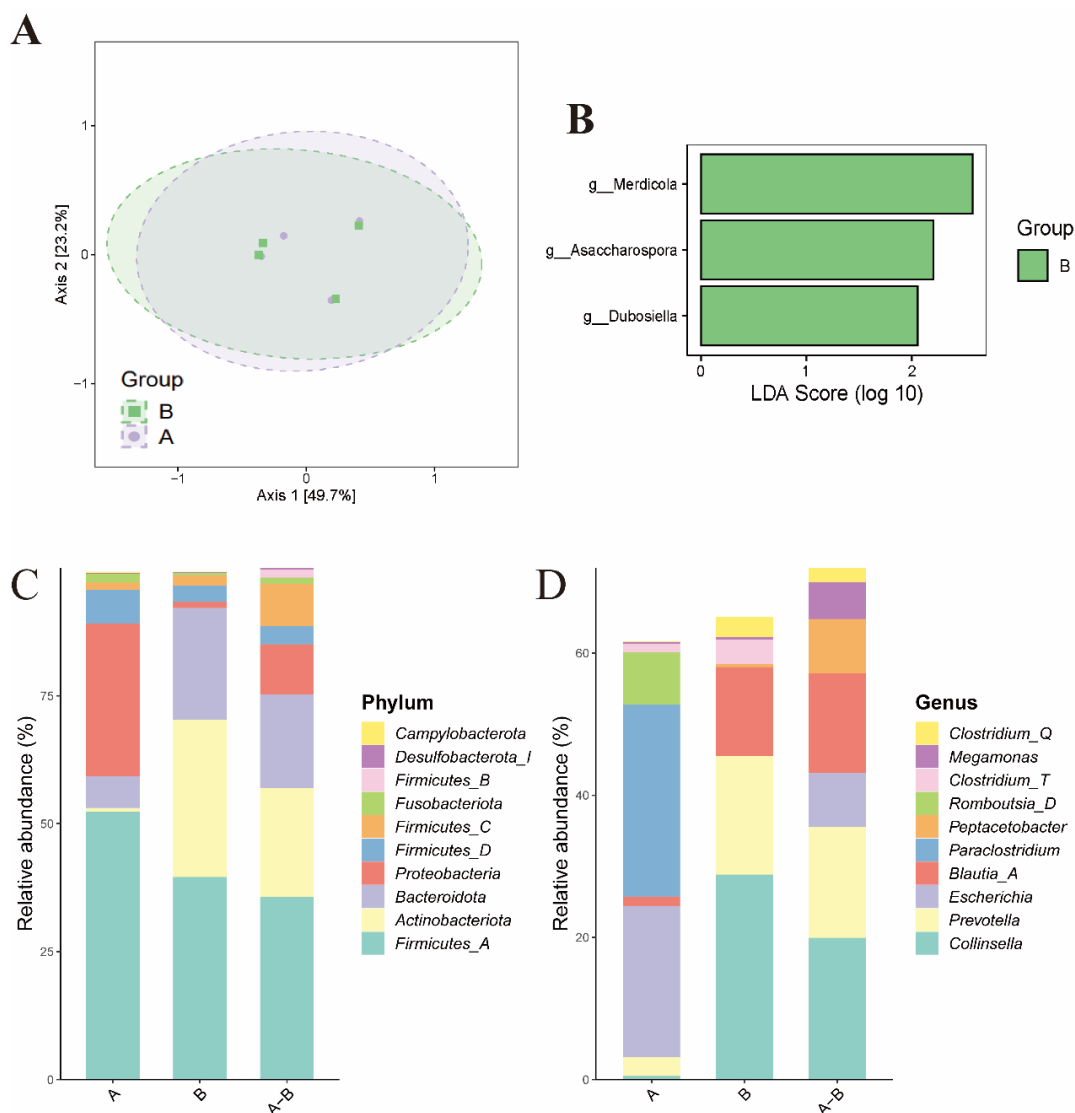


图 2-13. (A) 主坐标分析; (B) 属水平的线性判别分析; (C) 粪便微生物群在门水平上的丰度变化; (D) 粪便微生物群在属水平上的丰度变化; A 代表对照组, B 代表实验组

Figure 2-13. (A) Principal coordinate analysis; (B) The genus LDA score; (C) The abundance of the phylum level of changes in the fecal microbiota; (D) The genus level of the changes in the fecal microbiota; A represents the control group, and B represents the experimental groups

猫肠道菌群组成与品种、地理区域、饮食结构、年龄、健康情况等因素等息息相关。据研究,猫肠道微生物中通常由 Firmicutes、Proteobacteria、Bacteroidetes、和 Actinobacteria 为代表^[6],实验中对照组与实验组均一致。粪便中微生物在门和属水平上的相对丰度可视化图表中显示(图 2-13 C、D),经实验组的猫经过 FOS 和 *L. plantarum* 合生元的联合喂养后,菌群结构在门水

平上发生了很大变化, 呈现出 Firmicutes 丰度下降而 Actinobacteria 和 Bacteroidetes 丰度上升的趋势 ($P<0.05$)。既往有研究表明, Bacteroidetes 在健康的微生物组中含量丰富, 而在患有慢性肠病 (CE) 的猫中观察 Bacteroidetes 和 Actinobacteria 的丰度降低^[106]。Firmicutes / Bacteroidetes 的比值 (F/B) 相较于对照组有所下降, 该比率已被用作包括肠道炎症和肥胖在内等病理状况的生物标志物^[107], 合生元有效降低了其比例, 可能会减轻饮食诱导的肥胖和其他因素诱导的肠道菌群失调^[108]。在属水平上, 相关研究证明 *Prevotella* 属、*Bacteroides*、柯林斯菌属 (*Collinsella*)、链状杆菌属 (*Catenibacterium*)、*Blautia*、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 和巨球形菌属 (*Megasphaera*) 在猫粪微生物组中的丰度度名列前茅^[109]。实验组 *Collinsella*、*Prevotella*、*Blautia* 丰度显著上升, 而 *Escherichia*、副梭菌属 (*Paraclostridium*)、罗姆氏菌属 (*Romboutsia*) 下降 ($P<0.05$)。*Prevotella* 是重要的碳水化合物利用者, 在喂养适度蛋白质饮食的猫肠道菌群中最为丰富^[110], 且与哺乳动物肠道中丙酸盐的产生高度相关, 具有从葡萄糖或乳酸代谢中产生丙酸盐的代谢机制^[111]。所以其增加在促进肠道健康、代谢平衡和免疫支持中具有重要意义。*Blautia* 丰度与脂质代谢的改善呈正相关^[112], 并且可以通过抑制促炎细胞因子的分泌、减少氧化应激、防止肠道屏障损伤、调节 TLR4/NF- κ B 信号通路和重塑肠道菌群来缓解结肠炎^[113]。*Dubosiella* 能够调节肠内分泌细胞 (EECs) 并可能降低胃肠道疾病 (如炎症性肠病和结直肠癌) 中的血清素水平^[114]。所以实验组中 *Blautia* 和 *Dubosiella* 丰度的提升表明合生元大大增加了猫肠道的抗炎能力。

除此之外, 在实验组的高维标志物中 (图 2-13 B), 无糖孢菌属 (*Asaccharospora*) 不利用糖进行代谢, 主要分解氨基酸与蛋白质, 虽然目前对其具体功能和作用仍在研究当中, 但其特殊的代谢特性, 可能会对具有高蛋白高脂肪饮食结构的猫具有重要意义。栖粪菌属 (*Merdicola*) 也是微生物学研究中相对较新的补充, 其中粪栖菌 (*Candidatus Merdicola faecigallinarum*) 于 2021 年被确定为鸡肠道微生物组的一部分^[115], 它们的确切作用、潜在益处或致病特性仍有待阐明。

2.5 本章小结

本章主要研究了不同益生元对 *L. plantarum* 的影响，从促生长代谢能力、黏附性能、在猫胃肠道中的耐受能力以及抗菌性能四个方面进行综合评估。最后得出，除 Sta 外，其余四种益生元均在一定程度上增长了 *L. plantarum* 的性能。相比于其它组，FOS 可以最大效应的促进 *L. plantarum* 的生长，同时代谢出最高短链脂肪酸含量。而 Inu 则可以增加其疏水性和自聚性，这将有利于 *L. plantarum* 黏附于肠道上皮细胞。在抗逆性方面，四种益生元对 *L. plantarum* 的胃肠道耐受力影响区别并不显著。值得注意的是，*L. plantarum* 与益生元的组合在抗菌效果方面具有一定的协同作用，对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都具有一定的抑制作用。为了更进一步探究四种不同益生元组合对猫胃肠道微环境的影响，从体外、体内两个方面进行评价和筛选。在体外实验中发现，FOS 联合 *L. plantarum* 可以选择性的抑制有害菌如 *S. aureus* 和 *E. coli* 在肠道中的活性，还可以调整猫肠道菌群结构，显著增加了 *Prevotella*、*Blautia* 等有益菌的丰度，并且降低了 F/B 的比列，从而可能会减轻肠道炎症、增强肠道免疫。总而言之，FOS 可以有效促进 *L. plantarum* 对有害菌的拮抗作用，并有效调节猫肠道菌群结构，使之朝更健康的方向发展。本文为 *L. plantarum* 联合 FOS 的功能开发提供了理论依据。

第3章 湿法制粒法制备合生元羊奶片的研究

3.1 引言

利用益生菌及其衍生物开发功能性宠物营养品是一个很有前景的领域。乳杆菌作为研究广泛、使用安全的益生菌之一，具有卓越的益生菌特性，包括参与调节消化道菌群平衡，增强免疫反应等^[116]。第二章的研究结果表明 FOS 可以促进 *L. plantarum* 的增殖代谢，并且有效的调节猫肠道菌群结构。

湿法制粒是制作片剂中应用最广泛的一种方法，主要是在原料粉末中加入粘合剂，靠粘合剂的桥架或粘结作用使粉末聚结在一起而制备颗粒的方法。由于湿法制粒技术主要依靠经验的积累来确定各类辅料的添加，质量并不稳定，所以通过正交设计、响应面设计等优选试验来考察辅料种类、用量、工艺参数等因素对颗粒质量的影响是必要的，可以以颗粒流动性、硬度、脆碎度、感官评价等指标作为响应值来评价、筛选湿法制粒的配方及工艺参数^[117]。

羊奶中乳糖含量低，且脂肪、蛋白质、维生素的含量高，拥有较高的消化率^[118]。除此之外，因为羊奶的 α s1-酪蛋白水平低，因此不易致敏^[119]。这些特点使之一跃成为宠物猫营养品中的明星成分，被公认为新功能性食品和营养保健食品的食物基质，可以很好的携带益生菌、益生元等生物活性物质^[120]。

使用湿法制粒工艺制备一款含 *L. plantarum* 和 FOS 的合生元羊奶片，通过试验筛选辅料（例如填充剂、粘合剂等）对合生元羊奶片配方进行确定和优化，为该产品实现工业化生产提供参考。

3.2 实验材料与仪器

3.2.1 实验材料

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
植物乳杆菌 HH-LP 56	西安米先尔生物科技有限公司
果寡糖	河南高轩生物科技有限公司

续表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

试剂名称	生产厂家
鸡肝粉	芜湖卫仕生物科技有限公司
脱脂羊奶粉	芜湖卫仕生物科技有限公司
玉米淀粉	芜湖卫仕生物科技有限公司
磷酸氢钙	芜湖卫仕生物科技有限公司
硬脂酸镁	芜湖卫仕生物科技有限公司
滑石粉	芜湖卫仕生物科技有限公司
麦芽糊精	芜湖卫仕生物科技有限公司

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental equipment

仪器名称	型号	生产厂家
旋转压片机	GZP500	上海天和制药机械有限公司
片剂硬度计	YPD-300C	上海精密仪器仪表有限公司
脆碎度测试仪	CS-2	上海精密仪器仪表有限公司

3.2.3 适口性实验

本次适口性试验在卫仕生物科技有限公司所属猫舍进行。共 15 只健康猫参与适口性试验，无疾病且三个月内无服药记录，实验期间每只猫生活在独立猫柜中，每天投喂两次，保证采食量满足其正常能量需求。且除本品外不喂食其他零食，自由饮水，每天打扫猫舍卫生、清理猫砂。

3.3 实验方法与步骤

3.3.1 适口性实验

采用“双盆法”进行适口性实验。由于实验水平较多，所以对 5 个水平依次进行比较，具体方法如下：每只动物准备两个相同食碗，碗中分别加入需要对比测试的样品，根据表 3-3 中列出的标准对猫的反应进行评分，计算并记录采食率和首选率。第 2 天饲喂时，交换两个食盆的位置进行实验。每个对比实验为期 2 天，共计 8 天。

$$\text{首选率}(\%) = \frac{\text{样品选择数(次)}}{\text{试验总次数(次)}} \times 100\% \quad (3-1)$$

$$\text{采食率}(\%) = \frac{\text{样品采食量(g)}}{\text{总采食量(g)}} \times 100\% \quad (3-2)$$

表 3-3 适口性评分表

Table 3-3 Palatability Evaluation Form

分值	评分标准	评分说明
1	厌恶	嗅闻，明显后退，无采食或有干呕
2	较讨厌	嗅闻，无采食，转身或掩埋动作
3	一般	嗅闻舔鼻，不采食
4	喜欢	嗅闻后采食
5	非常喜欢	立即采食

3.3.2 合生元羊奶片的制备工艺流程

混匀：称取定量的原料及辅料混合均匀

制粒：将原料放入干燥托盘中，喷水制软材，达到“握之成团、触之及散”的要求。

干燥：将上述制成的软材平铺均匀，放于烘干箱中烘干原料，烘干后的原料水分保持在 5%-6%间。

外加：待原料冷却，按照比例加入润滑剂、*L. plantarum* 和 FOS，并混合均匀。

压片：利用旋转压片机进行压片。

3.3.3 原料添加量考察

L. plantarum HH-LP 56 冻干粉添加量为 0.2% (10^{10} cfu/g)、FOS 的添加量为 4%。因为本品为猫用合生元羊奶片，所以额外添加鸡肝粉以提高适口性，经过预实验，鸡肝粉的最适添加量为 53%。

在增加脱脂羊奶粉含量时，其他辅料保持不变，同比降低配方中玉米淀粉填充剂的含量。依次考察脱脂羊奶粉的添加量为 5%、10%、15%、20%、25%

时，成品外观、适口性、硬度和脆碎度指标的变化，以确定羊奶粉的最适添加量。

3.3.4 润滑剂种类和添加量考察

滑石粉和硬脂酸镁都是常用的润滑剂，但功效不完全相同。滑石粉可以填满颗粒表面的凹陷，降低颗粒之间的摩擦力，从而改善流动性，常常作为助流剂使用^[121]。硬脂酸镁可以有效减少药片与模具之间的摩擦，提高压片过程中的顺畅度，降低粘冲率^[122]。为了筛选出合适的润滑剂，固定原料含量以及其他辅料的种类和用量，对滑石粉、硬脂酸镁、滑石粉联合硬脂酸镁分别进行试验，在总添加水平均为 1.8%的前提下，考察不同组合的粘冲情况、颗粒流动性、成品外观、硬度和脆碎度指标。

3.3.5 填充剂种类和添加量考察

填充剂可以起到填充片剂的重量和体积的作用，从而能有效减少成品中产品计量偏差太大的问题。玉米淀粉是最常用的填充剂，其性质稳定，吸湿性小，但可压性较差，通常与麦芽糊精联合使用^[123]。由于物料中的 *L. plantarum* 冻干粉和 FOS 极易吸潮，所以在填充剂上考虑使用磷酸氢钙。对玉米淀粉、玉米淀粉+麦芽糊精、玉米淀粉+麦芽糊精+磷酸氢钙三个选项进行筛选，在总添加水平均为 24%的前提下，考察颗粒流动性、成品外观、硬度和脆碎度指标。

3.3.6 Plackett-Burman 试验优化配方

在单因素实验基础上，再利用 Design-expert 软件进行 Plackett-Burman 试验。对羊奶粉（A，g）、磷酸氢钙（B，g）、滑石粉（C，g）、硬脂酸镁（D，g）和麦芽糊精（E，g）的添加量进行考察，以感官评价得分为响应值评价各因素的影响，因素水平见表 3-4。

表 3-4 Plackett-Burman 试验因素及其水平设计

Table 3-4 Factor and Level Design for Plackett-Burman Experimental Analysis

水平	A	B	C	D	E
-1(低)	5.0	4.0	0.6	0.6	3.0
+1（高）	25.0	8.0	1.4	1.4	7.0

3.3.7 响应面试验优化配方

根据 Plackett-Burman 筛选出的主要影响因素, 进行 Box-behnken 试验进一步优化。对磷酸氢钙 (A, g)、滑石粉 (B, g)、麦芽糊精 (C, g) 的添加量 3 个因素进行考察, 以感官评价得分作为响应值, 确认片剂的最佳配方, 因素水平见表 3-5。

表 3-5 Box-Behnken 试验因素及其水平设计

Table 3-5 Factor and Level Configuration in Box-Behnken Experimental Design			
水平	A	B	C
-1	4.0	0.8	3.0
0	6.0	1.0	5.0
+1	8.0	1.2	7.0

3.3.8 片剂质量检验

(1) 感官评价

十名专业从事宠物营养品制作的成员组成评定小组, 从外观、质地、硬度及脆碎度对合生元羊奶片进行评分, 取最终评分的平均数作为感官评价指标^[124]。由于本品为宠物片剂且响应面实验中仅为微量的辅料变化, 所以在主要原料无变化的情况下, 无需重复进行适口性实验。评分细则见表 3-6。

表 3-6 感官评分标准

Table 3-6 Sensory Evaluation Standards		
指标	规则	评分
外观 (30%)	片型不完整, 表面有裂缝、缺损	0-5
	片型完整, 表面有凹凸、花斑	6-15
	片型完整, 有少量花斑	16-25
	片型完整, 表面光滑有光泽	26-30
质地 (20%)	断面组织呈粉状	0-5
	结构组织松散, 断面组织较松软	6-10
	结构组织较细密, 断面组织基本紧密	11-15
	组织结构细密均匀, 断面组织紧密	16-20

续表 3-6 感官评分标准

Table 3-6 Sensory Evaluation Standards

指标	规则	评分
硬度及脆碎度 (50%)	硬度过大或过小, 脆碎度 $>1\%$	0-10
	硬度稍大或稍小, $0.5\% < \text{脆碎度} < 1\%$	11-25
	硬度适中, $0.2\% < \text{脆碎度} < 0.5\%$	26-35
	硬度适中, 脆碎度 $<0.2\%$	36-50

(2) 硬度检测

随机选取成品 10 片, 使用片剂硬度测定仪测量片剂硬度, 硬度在 50 N-60 N 之间为宜。

(3) 脆碎度检测

随机选取成品 10 片, 用电吹风去除表面细粉, 精准称量重量, 并记录为 A_1 , 然后放入脆碎度测试仪中, 设定转速为 25 rpm, 圈数为 100 圈。结束后取出样品, 吹去表面细粉, 准确称重并记录为 A_2 , 计算前后重量损失, 减失重量 $<1\%$, 且无断裂、龟裂及粉碎即为合格。

$$\text{脆碎度}(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (3-3)$$

3.4 实验结果与讨论

3.4.1 单因素试验结果分析

(1) 脱脂羊奶粉添加量的确定

从表 3-7 可以看出, 当羊奶粉的添加量在 20% 时, 成品外观、硬度和脆碎度都达标, 并且适口性评分、首选率和采食率均最佳 (图 3-1)。羊奶粉含量低时, 由于填充剂玉米淀粉的含量过高, 影响了原材料的可压性, 导致最终成品硬度过小、外观不完整。而添加量过高时, 适口性并没有提升, 反而下降。所以固定 20% 的羊奶粉进行后续实验。

表 3-7 脱脂羊奶粉定量结果

Table 3-7 Quantitative Analysis Results for Skimmed Sheep Milk Powder

指标	羊奶粉				
	5%	10%	15%	20%	25%
片剂外观	不完整	完整	完整	完整	完整
片剂光泽	无	较好	好	好	好
硬度 (N)	11.00	28.00	55.00	60.00	62.00
脆碎度 (%)	4.00	0.21	0.19	0.20	0.02
适口性评分 (分)	3.80	3.93	4.26	4.30	4.03

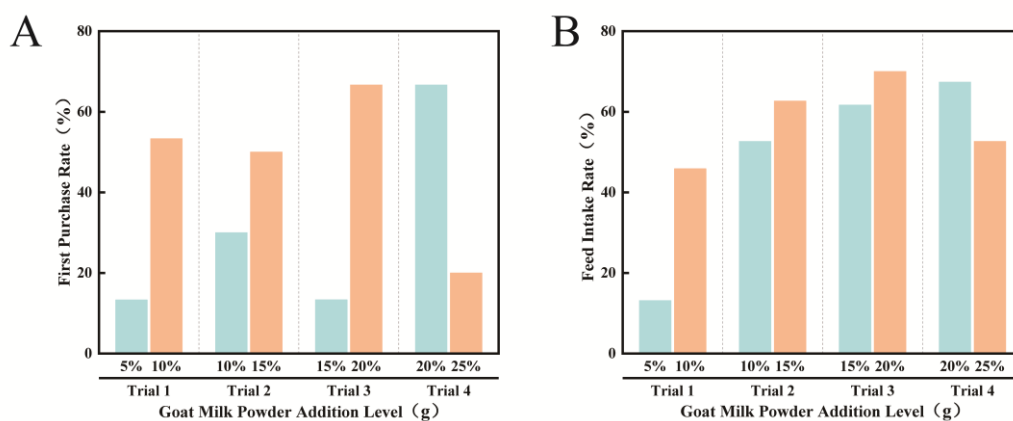


图 3-1. (A) 首采率; (B) 采食率

Figure 3-1. (A) First Purchase Rate; (B) Feed Intake Rate

(2) 润滑剂的筛选和定量

由表 3-8 可知, 不同润滑剂对成品影响较大。效果最好的是硬脂酸镁和滑石粉组, 此时颗粒流动性良好, 压片没有粘冲的情况发生, 并且成品的外观硬度均达标。原料中的鸡肝粉和羊奶粉导致整体物料油性较大, 如果单纯使用硬脂酸镁作为润滑剂, 用量过大会直接影响片剂的弹性形变, 从而影响片剂硬度, 而用量较少时也会导致物料流动差、粘冲的情况发生^[125]。但当同时使用硬脂酸镁和滑石粉时, 可以兼顾助流和抗粘的效果。

表 3-8 润滑剂筛选和定量结果

Table 3-8 Lubricant Screening and Quantification Results

指标	硬脂酸镁	滑石粉	硬脂酸镁+滑石粉
颗粒流动性	较差	好	好
粘冲情况	润滑	粘冲	润滑
成品外观	完整光滑	完整	完整光滑
硬度 (N)	34.00	45.00	55.00
脆碎度 (%)	0.27	0.40	0.19

(3) 填充剂的筛选和定量

对填充剂的筛选结果可见表 3-9。当只选用玉米淀粉时，由于含量过高，片剂的硬度不达标；玉米淀粉和麦芽糊精联合使用，虽然可以提高成品的硬度，但是同样因为原料油性的问题，会导致成品外观有花斑生成；在此基础上，额外添加磷酸氢钙后，不但解决了片剂外观花斑的问题，并且硬度也达标，这是因为磷酸氢钙在制粒时可以吸附在物料表面，降低其粘连情况的发生，从而可以改善颗粒的流动性^[126]，同时磷酸氢钙也可以作为吸油剂，提高片剂的硬度。综上所述，使用玉米淀粉、麦芽糊精和磷酸氢钙作为填充剂。

表 3-9 填充剂剂筛选和定量结果

Table 3-9 Filler Screening and Quantification Results

指标	玉米淀粉	玉米淀粉+麦芽糊精	玉米淀粉+麦芽糊精+磷酸氢钙
流动性	差	较好	好
成品外观	片剂缺损	有花斑	完整有光泽
硬度 (N)	18.00	40.00	55.00
脆碎度 (%)	/	0.38	0.19

3.4.2 Plackett-Burman 试验结果分析

根据单因素试验结果，根据表 3-10 方案进行 Plackett-Burman 试验，筛选对合生元羊奶片有显著影响的因素。对数据进行方差分析，得到回归方程：

$$Y=50.38+26.41A+4.23B+5.46C-0.175D-3.81E \quad (3-4)$$

由表 3-11 可知， $R^2=0.9814$ ，说明回归方程的拟合性好； $R^2_{adj}=0.9658$ ，表明 96.58%的试验数据的变异性可用此回归模型来解释；选择差异性因素 A、B、

C、E 四个显著性因素进行下一步优化。

表 3-10 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 4-10 Plackett-Burman Experimental Design and Results

实验号	A	B	C	D	E	感官评价（分）
1	-1	-1	-1	-1	-1	16.0
2	1	-1	-1	-1	1	64.6
3	-1	1	1	-1	1	32.1
4	1	1	-1	-1	-1	80.3
5	1	-1	1	1	1	66.9
6	-1	-1	1	-1	1	23.0
7	-1	1	-1	1	1	21.8
8	1	-1	1	1	-1	90.6
9	1	1	1	-1	-1	87.3
10	-1	1	1	1	-1	35.1
11	-1	-1	-1	1	-1	15.8
12	1	1	-1	1	1	71.0

表 3-11 Plackett-Burman 试验因素、水平及显著性分析

Table 3-11 Factors, Levels, and Significance Analysis in Plackett-Burman Design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9114.94	5	1822.99	63.16	<0.0001	**
A（羊奶粉）	8368.8	1	8368.80	289.94	<0.0001	**
B（磷酸氢钙）	214.21	1	214.21	7.42	0.0345	*
C（白炭黑）	357.52	1	357.52	12.39	0.0125	*
D（硬脂酸镁）	0.3675	1	0.3675	0.0127	0.9138	
E（麦芽糊精）	174.04	1	174.04	6.03	0.0494	*
残差	173.18	6	28.86			
总和	9288.12	11				
R ²	0.9814			Pred R ²	0.9254	
R ² _{adj}	0.9658			Adeq Precision	19.093	

注：**表示 $P<0.01$ ，*表示 $P<0.05$

3.4.3 Box-Behnken 响应面试验结果分析

根据 Plackett-Burman 试验，应该选择羊奶粉、滑石粉、磷酸氢钙以及麦芽

糊精进行下一步试验。但考虑到在单因素实验中，20%的羊奶粉添加量已经达到最高的适口性水平，同时羊奶粉含量的添加会导致生产成本显著增加，因此放弃羊奶粉这一因素的进一步优化^[127]，固定添加量为 20%。以滑石粉、磷酸氢钙和麦芽糊精的添加量为因素，根据 Box-Behnken 进行 3 因素 3 水平的试验，以感官评价分值为响应值。试验设计及结果见表 3-12。

对数据进行二次多元回归拟合，得到二次多项式方程：

$$Y=92.6-3.34A+0.5B-4.94C+0.65AB-1.18AC+BC-5.86A^2-2.64B^2-7.71C^2 \quad (3-5)$$

多元相关系数 $R^2=0.9942$ ，表明模型对实际情况的拟合较好，可以对实验结果进行分析。方差分析如表 3-13。

表 3-12 Box-Behnken 试验设计及其结果

Table 3-12 Box-Behnken Experimental Design and Results

实验号	磷酸氢钙	滑石粉	麦芽糊精	感官评分
1	4	0.6	5	88.0
2	4	1.0	3	85.7
3	4	1.0	7	79.0
4	4	1.4	5	86.9
5	6	0.6	7	75.0
6	6	0.6	3	87.7
7	6	1.0	5	93.0
8	6	1.0	5	92.0
9	6	1.0	5	92.6
10	6	1.0	5	91.9
11	6	1.0	5	93.5
12	6	1.4	7	78.8
13	6	1.4	3	87.5
14	8	0.6	5	80.0
15	8	1.0	7	70.0
16	8	1.0	3	81.4
17	8	1.4	5	81.5

表 3-13 中回归模型的 $P<0.0001$ ，表明模型极其显著，且失拟项不显著。

$R^2_{\text{adj}} = 0.9867$ ，模型拟合度好，能解释 98% 的响应值变化，能表明各因变量之间真实关系，可用来预测合生元羊奶片的感官评分。其中 A、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 项差异极显著 ($P < 0.001$)，AC、BC 项差异显著 ($P < 0.05$)。根据 F 值，各因素对感官评分的影响程度依次为：C（麦芽糊精）> A（磷酸氢钙）> B（滑石粉）。

表 3-13 Box-Behnken 试验回归模型方差分析结果

Table 3-13 ANOVA Results for the Regression Model of Box-Behnken Design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	762.43	9	84.71	132.89	<0.0001	**
A（磷酸氢钙）	89.11	1	89.11	139.78	<0.0001	*
B（滑石粉）	2.00	1	2.00	3.14	0.1198	
C（麦芽糊精）	195.03	1	195.03	305.93	<0.0001	**
AB	1.69	1	1.69	2.65	0.1475	
AC	5.52	1	5.52	8.66	0.0216	*
BC	4.00	1	4.00	6.27	0.0407	*
A^2	144.71	1	144.71	227.00	<0.0001	**
B^2	29.29	1	29.29	45.95	0.0003	**
C^2	250.45	1	250.45	392.87	<0.0001	**
残差	4.46	7	0.6375			
失拟	2.64	3	0.8808	1.94	0.2656	
CV	0.9379		R^2	0.9942		
			R^2_{adj}	0.9867		
			Pred R^2	0.9412		
			Adeq-Precision	37.5997		

注：**表示 $P < 0.01$ ，*表示 $P < 0.05$

模型响应面等高线图及 3D 图可以直观反映出各因素交互作用对响应值的影响。等高线呈现出明显的椭圆则各因素交互作用较明显，响应面曲线越陡峭则交互作用越明显。根据响应面分析结果图 3-2，可以看出 AC、BC 两个因素之间有一定的交互作用。

利用 Design-expert 对模型进行分析预测，确定磷酸氢钙取 5.5%、滑石粉取

1%、麦芽糊精取 4.4%时，响应值最大为 93.8 分。

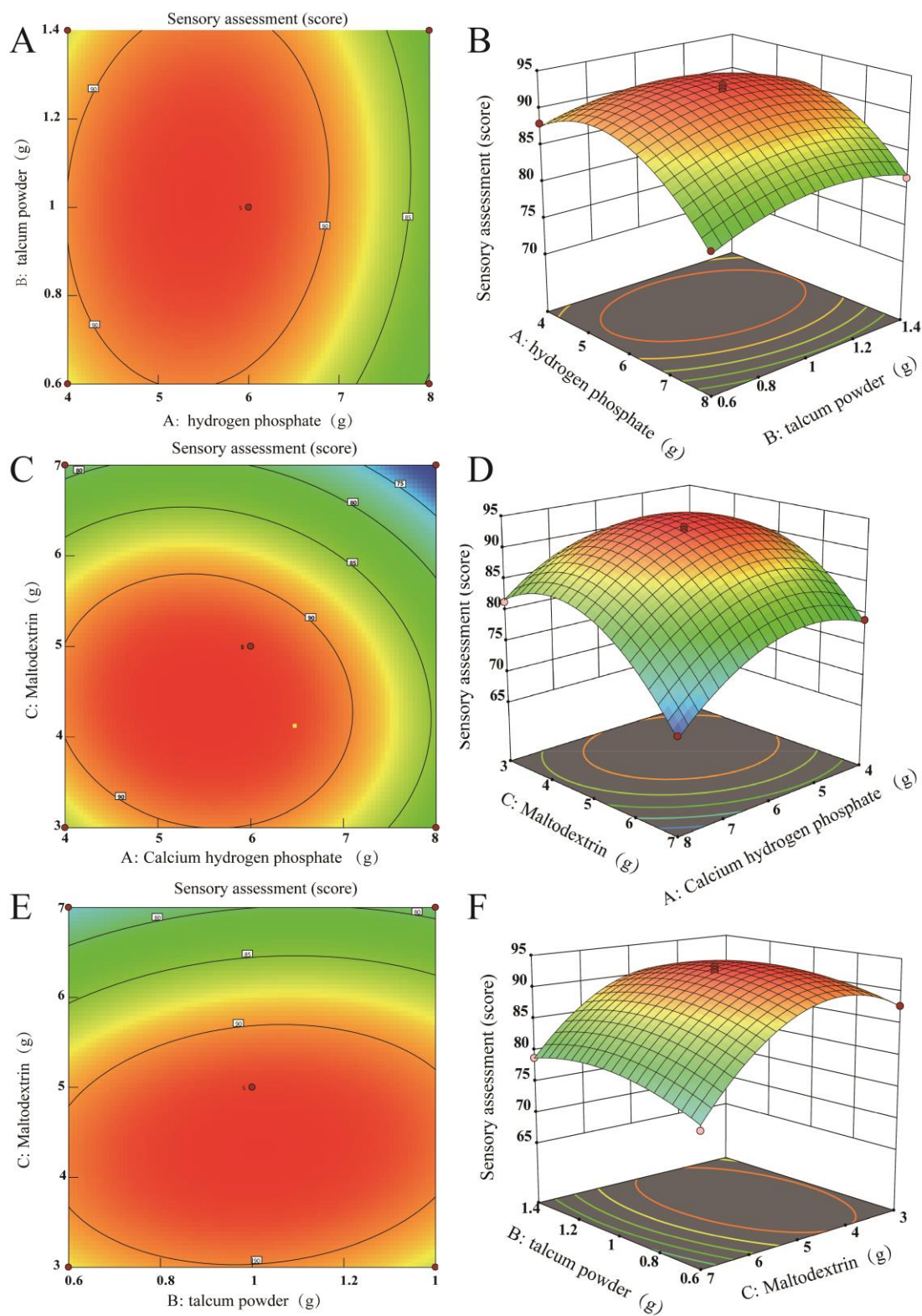


图 3-2. 因素交互作用对感官评分影响的等高线图和响应面图

Figure 3-2. Contour Plots and Response Surface Plots of Factor Interaction Effects on Sensory

Scores

3.4.4 验证试验

根据响应面得出的最优条件进行 3 次平行验证试验，测得成品片剂平均感官得分为 93.6 分，与预测结果基本一致。该模型可以较好地预测实际情况，具有实际意义。

3.5 本章小结

本试验中研究的合生元和羊奶粉复配的功能性乳制片剂，旨在促进宠物猫的胃肠道健康。片剂在营养品中的应用较为广泛，但因为原料不同，在制片的过程中可能会产生吸湿、粘冲等一系列现象，导致成品片剂质量不合格。在本品中，要保证羊奶粉含量不能过低且兼顾成品的适口性和品质的情况下，辅料的选择和添加尤为重要。本文通过一系列试验筛选出适宜的润滑剂、填充剂等，使最后生产出的片剂质量符合要求。

在宠物食品中，适口性是消费者最为重视的指标之一。影响宠物食品适口性的因素有很多，包括个体因素、食物形状、风味、大小、质地和环境因素等^[128]。所以本品除了主要的功能成分外，额外添加了鸡肝粉来提高风味，鸡肝粉的添加量是经过一系列预实验决定的，可以兼顾适口性和可压性指标。此外，羊奶粉的添加也会影响整体片剂的风味。在对不同羊奶粉比列的成品进行双盆实验时，发现随着羊奶粉的增多适口性呈现先上升后下降的趋势，20%时适口性达到峰值，推测当羊奶粉含量过低或过高时，会因为风味不足或风味过重影响猫的适口性。在后续生产中可以综合考虑更多元的动物性原料来提升适口性，并且加大参与适口性试验的宠物猫数量以提高精准度。

采用湿法制粒工艺制作猫用合生元羊奶片，在单因素考察的基础上通过响应面试验优化片剂的配方，得到的最优配方为：脱脂羊奶粉 20%、合生元 2.4%、鸡肝粉 55%、玉米淀粉 10.9%、磷酸氢钙 5.5%、滑石粉取 1%、麦芽糊精取 4.4%、硬脂酸镁 0.8%。此配方下片剂的品质最高，感官评价可高达 93.6 分。本试验为以合生元和羊奶为原料的宠物营养品开发提供了理论参考依据。

结论与展望

结论

本文首先对 *L. plantarum* 与五种不同益生元的组合进行筛选, 然后利用胃肠道体外模型研究不同合生元组合对肠道菌群乃至微环境的影响, 并利用 16s rRNA 验证合生元对猫肠道菌群结构的影响。最后, 使用湿法制粒技术, 以 *L. plantarum* 和 FOS 作为原料, 设计一款猫用合生元片配方。

(1) 从不同益生元对 *L. plantarum* 的促生长代谢能力、黏附能力、胃肠道耐受力、抗菌活性进行评估, 筛选出协同效益的合生元。结果表明, 除 Sta 外, FOS、Inu、GOS 和 XOS 均在不同程度上增加了 *L. plantarum* 的特性。通过体外模拟猫胃肠道, 探究益生菌、益生元和合生元对猫肠道常见指示菌以及肠道微环境的影响, 从四种合生元组合中筛选出了 FOS 是 *L. plantarum* 的最佳益生元。随即进行猫体内试验, 实验组在对照组的基础上额外喂养合生元, 经过 35 天后, 对其粪便进行 16s rRNA 测序, 结果表明实验组与对照组相比, *Prevotella*、*Blautia* 等有益菌的丰度显著增加 ($P<0.05$), 并且降低了 F/B 的比列, 对猫肠道菌群的调节具有正向意义。

(2) 采用湿法制粒法制备合生元羊奶片, 首先对主材料羊奶粉的适口性进行试验, 随后对整体物料的可压性进行分析, 选取合适的辅料进行调节。根据成品的硬度、外观、脆碎度和物料流动性选取适宜方案, 通过 Plackett-Burman 试验和响应面试验进行配方优化。结果显示, 当取脱脂羊奶粉 20%、合生元 2.4%、鸡肝粉 55%、玉米淀粉 10.9%、磷酸氢钙 5.5%、滑石粉取 1%、麦芽糊精取 4.4%、硬脂酸镁 0.8% 时, 片剂的品质最高, 感官评价可高达 93.6 分。

展望

综上所述, 发现当 *L. plantarum* 和 FOS 联合使用时, 可以增加益生菌的生长代谢能力, 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 有更好的拮抗效果并且对 *L. acidophilus* 和 *B. animalis* 无影响, 有一定的选择性抑菌效果。在体内实验中验证了此合生元组合对猫肠道菌群结构有正向调节作用, 并且制备了一款工艺可行的合生元羊奶片。但在此基础上, 仍有以下问题待分析:

(1) 在胃肠道模拟实验中, 可以增加肠道指示菌的种类, 从而更加全面的评估对猫肠道菌群的影响。

(2) 体内实验证明了合生元提高了 *Actinobacteria* 和 *Bacteroidetes* 的丰度, 降低了 F/B 的比值。在此基础上, 可以进行血清生化指标的化验乃至解剖实验, 多方面验证合生元可以降低猫肠道炎症和肥胖情况。

参考文献

- [1] 刘明康. 酶解黑水虻粉对猫狗采食偏好性、血液指标和肠道微生物的影响 [D], 2024.
- [2] 2023 China Pet Industry Development Report [Z]. World Pet Association. 2023
- [3] Ing N H, Steiner J M. The Use Of Diets In The Diagnosis And Treatment Of Common Gastrointestinal Diseases In Dogs And Cats [J]. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 2024, 1446: 39-53.
- [4] 徐春晗, 徐凤宇, 许祺珺. 犬用益生菌研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(08): 80-5.
- [5] Gregor G, Alexander M. Gut Microbiome: A New Player In Gastrointestinal Disease [J]. *Virchows Archiv : An International Journal Of Pathology*, 2018, 472(1): 159-72.
- [6] Grześkowiak Ł, Endo A, Beasley S, *etc.* Microbiota And Probiotics In Canine And Feline Welfare [J]. *Anaerobe*, 2015, 34: 14-23.
- [7] 赵梦迪, 李光玉, 刘可园, 等. 饲料和益生菌对犬、猫肠道菌群影响的研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2022, 34(11): 6817-29.
- [8] Alessandri G, Milani C, Mancabelli L, *etc.* The Impact Of Human-Facilitated Selection On The Gut Microbiota Of Domesticated Mammals [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2019, 95(9).
- [9] Alessandri G, Milani C, Mancabelli L, *etc.* Metagenomic Dissection Of The Canine Gut Microbiota: Insights Into Taxonomic, Metabolic And Nutritional Features [J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(4): 1331-43.
- [10] Qi C, Li Z, Tu H, *etc.* 2'-Fl And Cross-Feeding Bifidobacteria Reshaped The Gut Microbiota Of Infants With Atopic Dermatitis Ex Vivo And Prevented Dermatitis In Mice Post-Microbiota Transplantation Through Retinol Metabolism Activation [J]. *Gut Microbes*, 2025, 17(1): 2474148.
- [11] Kitae K, Jinwoo K, Sunil K, *etc.* Antioxidant And Anti-Inflammatory Effect And Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Canine And Feline Feces [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1971-.
- [12] Ahmed A-R, Nasser M, Walaa S, *etc.* Rifaximin In Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Hit Multiple Targets With A Single Shot [J]. *European Journal Of Gastroenterology & Hepatology*, 2018.
- [13] 郑晓菊. 代谢相关脂肪性肝病与肠道菌群的关系研究进展 [D], 2022.
- [14] Microbiology D O, Immunology U O M, Ann Arbor, Michigan, Usa., Microbiology D O, *etc.* Looking For A Signal In The Noise: Revisiting Obesity And The Microbiome [J]. *Mbio*, 2016, 7(4): E01018-16.
- [15] 杨洁. 人体肠道菌群失衡与慢性疾病关系的研究 [J]. *工业微生物*, 2024, 54(01): 23-5.
- [16] Leslie J L, Young V B. The Rest Of The Story: The Microbiome And Gastrointestinal Infections [J]. *Current Opinion In Microbiology*, 2015, 23: 121-5.
- [17] Radjabzadeh D, Bosch J A, Uitterlinden A G, *etc.* Gut Microbiome-Wide Association Study Of Depressive Symptoms [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7128-.
- [18] Chudzik A, Orzyłowska A, Rola R, *etc.* Probiotics, Prebiotics And Postbiotics On Mitigation Of Depression Symptoms: Modulation Of The Brain–Gut–Microbiome Axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 1000-.
- [19] Radford-Smith D E, Anthony D C. Prebiotic And Probiotic Modulation Of The Microbiota-Gut-Brain Axis In Depression [J]. *Nutrients*, 2023, 15(8).
- [20] Lewis J D, Abreu M T. Diet As A Trigger Or Therapy For Inflammatory Bowel Diseases [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(2): 398-414.E6.
- [21] Li M, Wang F F, Wang J, *etc.* Manipulation Of The Internal Structure Of Starch By Propionyl

- Treatment And Its Diverse Influence On Digestion And In Vitro Fermentation Characteristics [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 270: 118390-.
- [22] Joyce S A, MacSharry J, Casey P G, *etc.* Regulation Of Host Weight Gain And Lipid Metabolism By Bacterial Bile Acid Modification In The Gut [J]. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 2014, 111(20): 7421-6.
- [23] Zhou J W, Hou C X, Chen H Y, *etc.* P16^{ink4a} Deletion Ameliorates Damage Of Intestinal Epithelial Barrier And Microbial Dysbiosis In A Stress-Induced Premature Senescence Model Of Bmi-1 Deficiency [J]. Frontiers In Cell And Developmental Biology, 2021, 9: 671564-.
- [24] 郭文文, 齐莉莉, 王梦婷, 等. 肠道菌群与肠黏膜免疫衰老的关系 [J]. 生物化学与生物物理进展: 1-17.
- [25] Liu X, Ke L Y, Lei K, *etc.* Antibiotic-Induced Gut Microbiota Dysbiosis Has A Functional Impact On Purine Metabolism [J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 187-.
- [26] Swanson K S, Gibson G R, Hutkins R, *etc.* The International Scientific Association For Probiotics And Prebiotics (Isapp) Consensus Statement On The Definition And Scope Of Synbiotics [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2020, 17(11): 687-701.
- [27] 黄筱洋. 母乳低聚糖与动物双歧杆菌 f1-7 合生元微胶囊的制备及 6' -唾液酸乳糖益生作用研究 [D], 2024.
- [28] Colin H, Francisco G, Gregor R, *etc.* Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.[J].Nature reviews. Gastroenterology & hepatology,2014,11(8):506-14.
- [29] Gao Y X, Wang X, Xue C H, *etc.* Latest Developments In Food-Grade Delivery Systems For Probiotics: A Systematic Review [J]. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 2021, 63(20): 11-8.
- [30] Sanders M E, Merenstein D J, Reid G, *etc.* Probiotics And Prebiotics In Intestinal Health And Disease: From Biology To The Clinic [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019, 16(10): 605-16.
- [31] 李金梅. 低聚半乳糖促进植物乳杆菌拮抗产毒素蜡样芽孢杆菌的应用研究及合生元固体饮料的制备 [D], 2024.
- [32] 刘静宇. 植物乳杆菌 dy6 及其发酵豆粕对小鼠肠道生理功能的作用研究 [D], 2024.
- [33] 陆兆新, 孟凡强. 植物乳杆菌素合成及其调控机制的研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(05): 784-92.
- [34] 蔡红英, 李道捷, 孟昆, 等. 植物乳杆菌的生理功能及其在家禽中的应用研究进展 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(06): 3410-21.
- [35] Zhang Y, Chen C, Zhao J, *etc.* Lactiplantibacillus Plantarum Ccfm8661 Improves Intestinal Barrier Function And Regulates Gut Microbiota To Alleviate Enterotoxigenic Escherichia Coli-Induced Diarrhea In Mice [J]. Food Bioscience, 2025, 66: 106229.
- [36] 谢俊华. 植物乳杆菌 ncu116 对肠道健康的影响 [D], 2016.
- [37] Liu M L, Zhang X X, Hao M P, *etc.* Protective Effects Of A Novel Probiotic Strain, Lactococcus Lactis M12018, In Colitis: In Vivo And In Vitro Evidence [J]. Food & Function, 2019, 10(2): 1132-45.
- [38] Hou L, Qiu H, Dong J, *etc.* Lactiplantibacillus Plantarum Ameliorated The Negative Effects Of A Low-Protein Diet On Growth Performance, Antioxidant Capacity, Immune Status, And Gut Microbiota Of Laying Chicks [J]. Frontiers In Microbiology, 2025, 16: 1507752-.
- [39] Le B, Yang S H. Efficacy Of Lactobacillus Plantarum In Prevention Of Inflammatory Bowel

- Disease [J]. *Toxicology Reports*, 2018, 5: 314-7.
- [40] Shen X J, Yi D, Ni X Q, *etc.* Effects Of *Lactobacillus Plantarum* On Production Performance, Immune Characteristics, Antioxidant Status, And Intestinal Microflora Of Bursin-Immunized Broilers [J]. *Canadian Journal Of Microbiology*, 2014, 60(4): 193-202.
- [41] 李相安, 邹本草, 王政, 等. 复合益生菌对热应激肉鸡肠道功能的影响 [J]. *饲料工业*, 2022, 43(06): 16-21.
- [42] Assessment Of Probiotic-Supplementation On Growth Performance, Lipid Peroxidation, Antioxidant Capacity, And Cecal Microflora In Broiler Chickens [J]. *Journal Of Applied Pharmaceutical Science*, 2019: 30-9.
- [43] 刘耀文, 徐明明, 康克浪, 等. 植物乳杆菌的生理功能及其在鸡生产中的应用 [J]. *广东饲料*, 2017, 26(05): 29-31.
- [44] Bhat B, Bajaj B K. Multifarious Cholesterol Lowering Potential Of Lactic Acid Bacteria Equipped With Desired Probiotic Functional Attributes [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(5): 200.
- [45] Lim F T, Lim S M, Ramasamy K. *Pediococcus Acidilactici* Lab4 And *Lactobacillus Plantarum* Lab12 Assimilate Cholesterol And Modulate Abca1, Cd36, Npc1l1 And Scarb1 In Vitro [J]. *Beneficial Microbes*, 2017, 8(1): 97-109.
- [46] Mishra A K, Kumar S S, Ghosh A R. Probiotic *Enterococcus Faecalis* Ag5 Effectively Assimilates Cholesterol And Produces Fatty Acids Including Propionate [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2019, 366(4).
- [47] Horáčková Š, Plocková M, Demnerová K. Importance Of Microbial Defence Systems To Bile Salts And Mechanisms Of Serum Cholesterol Reduction [J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(3): 682-90.
- [48] 贺珊珊. 降胆固醇益生菌菌株及活性的研究 [D], 2020.
- [49] Wang Z, Chen H, Xiong S, *etc.* *Lactobacillus Plantarum* Smum211204 Exopolysaccharides Have Tumor-Suppressive Effects On Colorectal Cancer By Regulating Autophagy Via The Mtor Pathway [J]. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2025.
- [50] Shao J, Xia Y, Wang G, *etc.* The Bsh1 Gene Of *Lactobacillus Plantarum* Ar113 Ameliorates Liver Injury In Colitis Mice [J]. *Npj Science Of Food*, 2025, 9(1): 22-.
- [51] Jiang Y, Sun M Y, Jiang S L, *etc.* Oral Administration Of Fermented Milk From Co-Starter Containing *Lactobacillus Plantarum* y44 Shows An Ameliorating Effect On Hypertension In Spontaneously Hypertensive Rats [J]. *Foods*, 2024, 13(5).
- [52] Zhang Y, Chen C, Zhao J, *etc.* *Lactiplantibacillus Plantarum* Ccfm8661 Improves Intestinal Barrier Function And Regulates Gut Microbiota To Alleviate Enterotoxigenic *Escherichia Coli*-Induced Diarrhea In Mice [J]. *Food Bioscience*, 2025, 66: 106229-.
- [53] Gibson G R, Hutkins R, Sanders M E, *etc.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics.[J].*Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*,2017,14(8):491-502.
- [54] Abd El-Aziz A H, Mota-Rojas D, Akinjute O F, *etc.* Prebiotic Oligosaccharides As Potential Growth Promoter In Rabbits: A Review [J]. *Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition*, 2025.
- [55] Ashaolu T J, Ashaolu J O, Adeyeye S A O. Fermentation Of Prebiotics By Human Colonic Microbiota In Vitro And Short-Chain Fatty Acids Production: A Critical Review [J]. *Journal Of Applied Microbiology*, 2021, 130(3): 677-87.
- [56] Martyniak A, Wójcicka M, Rogatko I, *etc.* A Comprehensive Review Of The Usefulness Of

- Prebiotics, Probiotics, And Postbiotics In The Diagnosis And Treatment Of Small Intestine Bacterial Overgrowth [J]. *Microorganisms*, 2025, 13(1): 57-.
- [57] Bevilacqua A, Campaniello D, Speranza B, *etc.* An Update On Prebiotics And On Their Health Effects [J]. *Foods* (Basel, Switzerland), 2024, 13(3).
- [58] Singh L, Antil R, Sansanwal R, *etc.* Advances In Prebiotics, Gut Microbiota Modulation, And Nanotechnology [J]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2025, (Prepublish): 1-9.
- [59] 郭晔, 邢志凯, 李蒙, 等. 植物益生元对肠道菌群的调节及对机体糖代谢吸收的影响 [J]. *农产品加工*, 2020, (06): 52-7.
- [60] Priyanka P, Peng S K, Sim C W. Effect Of Prebiotic Supplementation On The Low-Temperature Storage Stability And In Vitro Gastrointestinal Tolerance Of Bifidobacterium Breve And Bifidobacterium Longum In Lactose And Sucrose Systems [J]. *Bioactive Carbohydrates And Dietary Fibre*, 2023, 30.
- [61] Wang J, Wang S, Liu H, *etc.* Effects Of Oligosaccharides On The Growth And Stress Tolerance Of Lactobacillus Plantarum Zlp001 In Vitro, And The Potential Synbiotic Effects Of L. Plantarum Zlp001 And Fructo-Oligosaccharide In Post-Weaning Piglets1 [J]. *Journal Of Animal Science*, 2019, 97(11): 4588-97.
- [62] Choudhary S, Singh M, Sharma D *etc.* Principal Component Analysis Of Stimulatory Effect Of Synbiotic Combination Of Indigenous Probiotic And Inulin On Antioxidant Activity Of Soymilk [J]. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 2019, 11(3): 813-9.
- [63] Dumandan N G, Kagaoan A C T, Labitag L J F, *etc.* Fermentability Assessment Of Selected Oligosaccharides By Lactiplantibacillus Plantarum Biotech 1074 Towards Short-Chain Organic Acid Production With Anti-Vibrio Efficacy [J]. *Bioresource Technology Reports*, 2024, 27: 101922-.
- [64] Zhang Q, Zhao W, Luo J, *etc.* Synergistic Defecation Effects Of Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis BI-99 And Fructooligosaccharide By Modulating Gut Microbiota [J]. *Frontiers In Immunology*, 2025, 15: 1520296-.
- [65] Yadav M K, Kumari I, Singh B, *etc.* Probiotics, Prebiotics And Synbiotics: Safe Options For Next-Generation Therapeutics [J]. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2022, (Prepublish): 1-17.
- [66] Markowiak P, Śliżewska K. Effects Of Probiotics, Prebiotics, And Synbiotics On Human Health [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): 1021-.
- [67] 武文豪, 黄鸿灿, 徐应霞, 等. 功能性宠物食品研究进展 [J]. *经济动物学报*: 1-9.
- [68] 张媛媛, 赵梦迪, 李悦垚, 等. 几种常见功能性宠物食品的健康作用 [J]. *经济动物学报*: 1-11.
- [69] 赵梦, 李佳丽, 崔慧莹, 等. 大蒜多糖片的制备处方研究 [J]. *山东畜牧兽医*, 2024, 45(07): 7-10.
- [70] 杨广迪, 敖歌, 陈杨, 等. 湿法制粒与连续制造技术的整合与创新: 在线检测、建模及工艺放大的研究进展 [J]. *中国中药杂志*: 1-15.
- [71] 崔向龙. 银杏叶片高速剪切湿法制粒工艺设计及控制 [D], 2017.
- [72] Oana K, Shimizu K, Takada T, *etc.* Manipulating The Growth Environment Through Co-Culture To Enhance Stress Tolerance And Viability Of Probiotic Strains In The Gastrointestinal Tract [J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2023: E0150223-E.
- [73] Han Q, Kong B H, Chen Q, *etc.* In Vitro Comparison Of Probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Harbin Dry Sausages And Selected Probiotics [J]. *Journal Of Functional Foods*, 2017, 32: 391-400.
- [74] Cui Y H, Wang M H, Zheng Y K, *etc.* The Carbohydrate Metabolism Of Lactiplantibacillus

- Plantarum [J]. International Journal Of Molecular Sciences, 2021, 22(24): 13452.
- [75] Bush E R, Baker S E, Macdonald D W. Global Trade In Exotic Pets 2006–2012 [J]. Conservation Biology, 2014, 28(3): 663-76.
- [76] 付婧洁, 王根宇, 刘雪连, 等. 仔猪早期断奶过程中肠道菌群变化引发细菌性腹泻的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022, (21): 41-4.
- [77] Minekus M, Alminger M, Alvito P, *etc.* A Standardised Static In Vitro Digestion Method Suitable For Food - An International Consensus [J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-24.
- [78] Theysgeur S, Cudennec B, Deracinois B, *etc.* New Bioactive Peptides Identified From A Tilapia Byproduct Hydrolysate Exerting Effects On Dpp-Iv Activity And Intestinal Hormones Regulation After Canine Gastrointestinal Simulated Digestion [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 26(1).
- [79] Liu T, Bai H S, Wang S J, *etc.* In Vitro Simulated Canine And Feline Gastrointestinal Digestion Of Fructooligosaccharides And Isomaltooligosaccharides And Their Effects On Intestinal Microbiota [J]. Animal Feed Science And Technology, 2023, 306: 115821.
- [80] Geng S, Zhang T, Gao J, *etc.* In Vitro Screening Of Synbiotics Composed Of Lactobacillus Paracasei V18 And Various Prebiotics And Mechanism To Inhibits The Growth Of Salmonella Typhimurium [J]. Lwt, 2023, 180: 114666.
- [81] Lin X N, Xia Y J, Yang Y J, *etc.* Probiotic Characteristics Of Lactobacillus Plantarum Ar113 And Its Molecular Mechanism Of Antioxidant [J]. Lwt, 2020, 126: 109278.
- [82] Pino A, Russo N, Van Hoorde K, *etc.* Piacentinu Ennese Pdo Cheese As Reservoir Of Promising Probiotic Bacteria [J]. Microorganisms, 2019, 7(8).
- [83] Li Y, Ali I, Lei Z, *etc.* Effect Of A Multistrain Probiotic On Feline Gut Health Through The Fecal Microbiota And Its Metabolite Scfas [J]. Metabolites, 2023, 13(2).
- [84] Lin C Y, Jha A R, Oba P M, *etc.* Longitudinal Fecal Microbiome And Metabolite Data Demonstrate Rapid Shifts And Subsequent Stabilization After An Abrupt Dietary Change In Healthy Adult Dogs [J]. Animal Microbiome, 2022, 4(1): 46.
- [85] Wang J, Wang S X, Liu H, *etc.* Effects Of Oligosaccharides On The Growth And Stress Tolerance Of Lactobacillus Plantarum Zlp001 In Vitro, And The Potential Synbiotic Effects Of L. Plantarum Zlp001 And Fructo-Oligosaccharide In Post-Weaning Piglets1 [J]. Journal Of Animal Science, 2019, 97(11): 4588-97.
- [86] Chen C, Zhou F F, Ren J, *etc.* Cloning, Expression And Functional Validation Of A B-Fructofuranosidase From Lactobacillus Plantarum [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(5): 758-67.
- [87] Oliveira R P D S, Perego P, Oliveira M N D, *etc.* Effect Of Inulin As A Prebiotic To Improve Growth And Counts Of A Probiotic Cocktail In Fermented Skim Milk [J]. Lwt - Food Science And Technology, 2010, 44(2): 520-3.
- [88] Jiang Y H, Li Y Y, Xin W G, *etc.* Lactiplantibacillus Plantarum Dacnjs22 Alleviates Benzo(A)Pyrene-Induced Neurobehavioral Injury In Mice: Insights From Gut Microbiota And Short-Chain Fatty Acids [J]. Food Bioscience, 2025, 64: 105865.
- [89] Smith P M, Howitt M R, Panikov N, *etc.* The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis [J]. Science (New York, Ny), 2013, 341(6145): 569-73.
- [90] Saichana N, Matsushita K, Adachi O, *etc.* Acetic Acid Bacteria: A Group Of Bacteria With Versatile Biotechnological Applications [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6 Pt 2): 1260-71.
- [91] Culp E J, Goodman A L. Cross-Feeding In The Gut Microbiome: Ecology And Mechanisms [J].

- Cell Host & Microbe, 2023, 31(4): 485-99.
- [92] Akagawa S, Akagawa Y, Nakai Y, *etc.* Fiber-Rich Barley Increases Butyric Acid-Producing Bacteria In The Human Gut Microbiota [J]. *Metabolites*, 2021, 11(8).
- [93] Cai Z, Guo Y, Zheng Q, *etc.* Screening Of A Potential Probiotic *Lactiplantibacillus Plantarum* Nuc08 And Its Synergistic Effects With Yogurt Starter [J]. *Journal Of Dairy Science*, 2024, 107(5): 2760-73.
- [94] García-Cayuela T, Korany A M, Bustos I, *etc.* Adhesion Abilities Of Dairy *Lactobacillus Plantarum* Strains Showing An Aggregation Phenotype [J]. *Food Research International*, 2014, 57: 44-50.
- [95] Van Zyl W F, Deane S M, Dicks L M T. Molecular Insights Into Probiotic Mechanisms Of Action Employed Against Intestinal Pathogenic Bacteria [J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1831339.
- [96] Li S, Zhang Y X. Sensitive Delivery Systems And Novel Encapsulation Technologies For Live Biotherapeutic Products And Probiotics [J]. *Critical Reviews In Microbiology*, 2024, 50(3): 371-84.
- [97] Salazar N, Gueimonde M, De Los Reyes-Gavilán C G, *etc.* Exopolysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria As Fermentable Substrates By The Intestinal Microbiota [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56(9): 1440-53.
- [98] Al-Saafin B A, Al-Bakri A G, Abdelrazig S, *etc.* Investigating The Effect Of The Probiotic *Lactobacillus Plantarum* And The Prebiotic Fructooligosaccharides On *Pseudomonas Aeruginosa* Metabolome, Virulence Factors And Biofilm Formation As Potential Quorum Sensing Inhibitors [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 177: 106057.
- [99] Dumandan N G, Kagaoan A C T, Labitag L J F, *etc.* Fermentability Assessment Of Selected Oligosaccharides By *Lactiplantibacillus Plantarum* Biotech 1074 Towards Short-Chain Organic Acid Production With Anti-Vibrio Efficacy [J]. *Bioresource Technology Reports*, 2024, 27: 101922.
- [100] Aouadhi C, Kmiha S, Trakhna F, *etc.* Study The Effect Of Lactoperoxidase Activation In Combination With Heat Treatment Or Nisin On The Microbiological Quality Of Raw Milk [J]. *Applied Food Research*, 2024, 4(2): 100521.
- [101] Han J W, Lee N, Kim H J, *etc.* *Weissella* Sp. *Snul2* As Potential Probiotics With Broad-Spectrum Antimicrobial Activities [J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): E28481.
- [102] Zhang Z, Xiong J, Chen L, *etc.* Potential Probiotic Characteristics And Genomic Analysis Of A New Folate-Producing Lactic Acid Bacteria *Lactiplantibacillus Plantarum* Zfm55 [J]. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 2024, 104(12): 7315-25.
- [103] Causey B D. Parametric Estimation Of The Number Of Classes In A Population [J]. *Journal Of Applied Statistics*, 2002, 29(6): 925-34.
- [104] Cassol I, Ibañez M, Bustamante J P. Key Features And Guidelines For The Application Of Microbial Alpha Diversity Metrics [J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 622.
- [105] Chen L, Xie L, Tan J, *etc.* The Gut Microbiota Regulates The Depressive-Type Behaviors And Inflammatory Processes After Severe Burn Injuries In Mice [J]. *Heliyon*, 2024, 10(4): E25617-.
- [106] Marsilio S, Pilla R, Sarawichitr B, *etc.* Characterization Of The Fecal Microbiome In Cats With Inflammatory Bowel Disease Or Alimentary Small Cell Lymphoma [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 19208.
- [107] Cox A J, West N P, Cripps A W. Obesity, Inflammation, And The Gut Microbiota [J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2015, 3(3): 207-15.

- [108] Kapoor P, Tiwari A, Sharma S, *etc.* Effect Of Anthocyanins On Gut Health Markers, Firmicutes-Bacteroidetes Ratio And Short-Chain Fatty Acids: A Systematic Review Via Meta-Analysis [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 1729.
- [109] Ganz H H, Jospin G, Rojas C A, *etc.* The Kitty Microbiome Project: Defining The Healthy Fecal "Core Microbiome" In Pet Domestic Cats [J]. Veterinary Sciences, 2022, 9(11).
- [110] Wu G D, Chen J, Hoffmann C, *etc.* Linking Long-Term Dietary Patterns With Gut Microbial Enterotypes [J]. Science (New York, Ny), 2011, 334(6052): 105-8.
- [111] Butowski C F, Thomas D G, Young W, *etc.* Addition Of Plant Dietary Fibre To A Raw Red Meat High Protein, High Fat Diet, Alters The Faecal Bacteriome And Organic Acid Profiles Of The Domestic Cat (*Felis Catus*) [J]. Plos One, 2019, 14(5): E0216072.
- [112] Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, *etc.* Blautia Genus Associated With Visceral Fat Accumulation In Adults 20-76 Years Of Age [J]. Npj Biofilms And Microbiomes, 2019, 5(1): 28.
- [113] Mao B Y, Guo W L, Cui S M, *etc.* Blautia Producta Displays Potential Probiotic Properties Against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis In Mice [J]. Food Science And Human Wellness, 2024, 13(02): 709-20.
- [114] Pramana A, Xu G, Patel M, *etc.* Abstract 2236 Dubosiella Newyorkensis Modulates Tryptophan And Serotonin Production And Related Signaling Pathways In The Enteroendocrine Cell Line Stc1 [J]. Journal Of Biological Chemistry, 2024, 300(3).
- [115] Gilroy R, Ravi A, Getino M, *etc.* Extensive Microbial Diversity Within The Chicken Gut Microbiome Revealed By Metagenomics And Culture [J]. Peerj, 2021, 9: E10941.
- [116] Zheng X, Liang Q, Zhao B, *etc.* Whole Genome Sequencing And Analysis Of Probiotic Characteristics For Lactiplantibacillus Plantarum El2 Isolated From Yak Yogurt [J]. Lwt, 2024, 198: 116039.
- [117] 王岩. 中药药剂学[M]. 化学工业出版社:201808.344.
- [118] Turck D. Cow's Milk And Goat's Milk [J]. World Review Of Nutrition And Dietetics, 2013, 108: 56-62.
- [119] A M F, S R, A G, *etc.* Goats' Milk As A Natural Source Of Lactose-Derived Oligosaccharides: Isolation By Membrane Technology [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(2): 173-81.
- [120] Milinčić D D, Kostić A Ž, Lević S, *etc.* Goat'S Milk Powder Enriched With Red (*Lycium Barbarum* L.) And Black (*Lycium Ruthenicum* Murray) Goji Berry Extracts: Chemical Characterization, Antioxidant Properties, And Prebiotic Activity [J]. Foods, 2024, 14(1): 62-.
- [121] 韩立柱, 刘帝呈, 胡坤霞, 等. 香菊片制备工艺的优化 [J]. 中成药, 2021, 43(08): 1995-2001.
- [122] 曹丹慧, 吴艳萍, 刘慧莹, 等. 多种维生素矿物质咀嚼片制备工艺研究与评价 [J]. 食品工业, 2024, 45(11): 15-9.
- [123] 郭悦. 氟雷拉纳软咀嚼片的研究开发 [D], 2024.
- [124] 包鹏. B-烟酰胺单核苷酸体外发酵对肠道微生物的影响及其片剂制备研究 [D], 2023.
- [125] 韩亚明, 苏恩谊, 黎宇盛, 等. 保健食品褪黑素维生素 b6 片的成型工艺研究 [J]. 广东化工, 2022, 49(22): 71-3+20.
- [126] 俞健. 复方盐酸氨基葡萄糖硫酸软骨素片的处方工艺研究 [J]. 海峡药学, 2012, 24(10): 28-30.
- [127] 葛松涛, 寿泉洪, 韩文凤, 等. 响应面法优化酸溶蛋白发酵工艺 [J]. 饲料工业, 2023, 44(13): 14-20.
- [128] 温超宇, 杨康, 佟放日给勒, 等. 犬、猫饲料适口性评价方法及其影响因素研究进展 [J]. 饲料工业, 2021, 42(11): 60-4.

攻读硕士学位期间学术论文发表情况

1. 猫用合生元羊奶片的制备与配方优化. 中国饲料[J] （一作）

致谢

时光飞逝，转眼间三年紧张而又充实的研究生生活即将画上句号。在这几年的学习期间，我得到了很多老师、同学和朋友的关怀和帮忙。在学位论文即将完成之际，我要向所有期间给予我支持、帮忙和鼓励的人表示我最诚挚的谢意。

首先，我要感谢指导老师陶老师对我的教导。从论文的选题、构思、撰写到最终的定稿，陶老师都给予我悉心的指导，使我的毕业论文能够顺利的完成。老师对工作的认真负责、对学术的钻研精神和严谨的学风，都是值得我终生学习的。

不积跬步何以至千里，本设计能够顺利的完成，也归功于学院各位老师的认真负责，使我能够很好的掌握和运用专业知识，并在设计中得以体现。正是有了他们的悉心帮忙和支持，才使我的毕业论文工作顺利完成。

最后，谨向在此期间给予本人包容、关爱与鼓励的家人，以及一路陪伴本人的同学和朋友致以诚挚感谢。正是得益于他们的支持与照顾，本人才得以安心学习，并顺利完成学业。