

## 基于代谢组学探究乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布和脂肪酸组成的影响

要 铎<sup>1,2</sup>, 张 月<sup>1</sup>, 刘 婷<sup>1</sup>, 郭月英<sup>1</sup>, 孙雪峰<sup>3</sup>, 靳 焯<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018

<sup>2</sup> 内蒙古自治区质量和标准化研究院 呼和浩特 010070

<sup>3</sup> 乌拉特中旗畜牧工作站 内蒙古巴彦淖尔 015300

**摘要** 选取对照组(基础日粮)和乳酸菌组(基础日粮添加乳酸菌)苏尼特羊各 12 只为实验材料( $n=24$ ),测定其脂肪分布与脂肪酸组成,并通过代谢组学探究乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布和脂肪酸组成的影响。结果表明:乳酸菌组苏尼特羊背最长肌和股二头肌脂肪含量,背最长肌和股二头肌中豆蔻油酸和二十二碳六烯酸的含量,背最长肌中棕榈酸、 $\gamma$ -亚麻酸和花生四烯酸的含量,股二头肌中单不饱和脂肪酸、棕榈油酸和油酸的含量,皮下脂肪中豆蔻油酸的含量,尾部脂肪中反式油酸、反式亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸的含量显著高于对照组( $P<0.05$ ),腹部皮下脂肪含量和尾部脂肪占比,背最长肌和股二头肌反式亚油酸的含量,股二头肌月桂酸的含量,皮下脂肪中月桂酸和棕榈酸的含量显著低于对照组( $P<0.05$ ),通过代谢组学研究发现了背最长肌和尾部胆碱和脂肪酸代谢通路的显著变化,具体来说,乳酸菌组苏尼特羊背最长肌中磷酸胆碱和胞苷二磷酸胆碱水平显著高于对照组,尾部脂肪反之( $P<0.05$ ),背最长肌中油酸、 $\alpha$ -亚麻酸和尾部脂肪中棕榈油酸、 $\gamma$ -亚麻酸水平显著低于对照组( $P<0.05$ )。综上,乳酸菌在一定程度上影响苏尼特羊胆碱和脂肪酸代谢通路,进而改善其脂肪分布和脂肪酸组成。

**关键词** 乳酸菌; 苏尼特羊; 脂肪分布; 脂肪酸组成; 代谢组学

**文章编号** 1009-7848(2023)04-0066-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.007

苏尼特羊作为肉用优良品种已成为内蒙古地区草原羊特色品牌,是该地区草原羊肉的标志。随着国家生态战略的实施,饲养方式由传统的天然放牧逐渐过渡到舍饲,这种转变的确带来明显的生态环境效应和巨大的社会效益,然而,与此同时舍饲羊肉用品质劣化成为消费者的普遍共识<sup>[1]</sup>。具体而言,舍饲育肥羊产生大量的蓄积脂肪,消费者普遍认为脂肪摄入过多对人体健康有害,因此苏尼特羊大块蓄积脂肪并不受欢迎,而从食用角度来说,肌肉脂肪的存在对苏尼特羊的食用品质和营养价值有着非常重要的影响,这对研究者来说是一个两难的问题。通过影响脂肪代谢的途径来探究改善动物脂肪分布与脂肪酸组成的调控手段,变得尤为重要。

脂肪代谢是一个复杂的生物学过程,包括胃肠道的消化吸收、循环系统的吸收和毛细淋巴管吸收过量的间质液并将其转移至淋巴管以返回血

液循环等,受遗传、年龄、环境和营养水平等多重因素的调控<sup>[2]</sup>。近年来,越来越多种类的饲料添加剂用于提高饲料中营养物质的利用率,进而提高家畜的肉用品质,如外源酶制剂、特殊营养素和乳酸菌,其中乳酸菌可以给反刍动物供给更多的代谢能和氨基酸平衡混合物,改善其生长性能和肉用品质<sup>[2-3]</sup>。窦露等<sup>[4]</sup>研究表明,在日粮中添加乳酸菌可以改善羊肉风味,提高生长性能和抗氧化能力。Tian 等<sup>[5]</sup>通过在日粮中添加乳酸杆菌改善了猪肉的滴水损失和嫩度。也有研究发现在猪饲料中添加益生菌可显著提高猪肉中的单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸含量<sup>[6]</sup>。

前期的研究发现乳酸菌可以改善苏尼特羊胃肠道菌群结构和肉用品质<sup>[7]</sup>,而本研究主要致力于乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成的影响,结合肌肉和脂肪组织代谢组学研究,探讨乳酸菌改善苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成可能的影响机制,为提高羊肉品质和经济效益提供数据支撑。

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160589,32060519)

第一作者: 要铎,男,博士生

通信作者: 靳焯 E-mail: jinyyec@sohu.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验动物来源于内蒙古巴彦淖尔市乌拉特中旗川井苏木哈拉图嘎查牧场,育有苏尼特羔羊 150 只。选择 3 月龄,健康无病、体质量相近的苏尼特羔羊 24 只为实验对象(公母各半),分为乳酸菌组和对照组,每组 12 只。两组苏尼特羔羊分别圈养在 20 m<sup>2</sup> 的羊圈中,饲料主要以育肥饲料和玉米为主,比例为 3:2,且不含抗生素。乳酸菌组苏尼特羊的基础日粮中另添加 1% 育肥饲料重的商业乳酸菌饲料添加剂(乳安邦)。实验期自由饮水,实验期 90 d。现场屠宰并称质量,采集背最长肌、股二头肌、尾部脂肪和胸腹部皮下组织样品,立即置于液氮或-20℃冰箱保存,用于后续代谢组学及脂肪分布与脂肪酸组成的测定。

乳安邦复合制剂(活菌数 $\geq 1.5 \times 10^9$  CFU/g,主要成分为乳酸杆菌 *Lactobacillus casei* HM-09、*Lactobacillus plantarum* HM-10),内蒙古和美科盛生物技术有限公司;甲醇、正己烷为色谱纯,三氯甲烷三氟化硼-乙醚络合物、氯化钠、氢氧化钠、无水硫酸钠、乙醚为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司;37 种脂肪酸甲酯的混标、乙腈、乙醇胺为色谱纯级,美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪器与设备

AB Triple TOF 6600 质谱仪,美国 AB SCI-EX 公司;Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Sciex GC 气相色谱仪,天美(中国)科学仪器有限公司;Eppendorf 5417 冷冻离心机,德国 Eppendorf 生物公司;UMC-5 型斩切机,德国 Stephan 公司;Foss Analytical A/S 型食品分析仪,福斯华(北京)科贸有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;HJ-6 型多头磁力搅拌加热器,江苏荣华仪器制造有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 脂肪分布的测定 将羊胴体分割为尾脂、肌肉组织和胸腹部皮下组织并称量,取样后使用食品分析仪进行扫描分析,测得胸腹部皮下组织、背最长肌和股二头肌脂肪含量。根据公式(1)计算:

$$\text{尾部脂肪占比} = \frac{\text{尾部脂肪质量/kg}}{\text{胴体质量/kg}} \times 100\%$$

(1)

1.3.2 脂肪酸组成的测定 脂肪酸的提取与气相色谱条件:参照王柏辉等<sup>[1]</sup>的方法进行脂肪酸的提取和测定,结果为该脂肪酸峰面积与总脂肪酸峰面积之和的百分比(占比)。

### 1.3.3 代谢组学的测定

1) 样本预处理 肌肉组织样品的预处理程序:从-80℃冰箱中取出 80 mg 样品,在 200  $\mu$ L 水中匀浆,涡旋 60 s,加入 800  $\mu$ L 甲醇和乙腈溶液(1:1, V/V),涡旋 60 s,低温超声 30 min,2 次,置于-20℃沉淀 1 h 以沉淀蛋白。4℃,14 000 $\times$ g 离心 20 min,取上清,冷冻干燥,-80℃保存样本。

脂肪组织样本的预处理程序:4℃环境下缓慢解冻后,取适量样本加入预冷甲醇/乙腈/水溶液(2:2:1, V/V),涡旋混合,低温超声 30 min,-20℃静置 10 min,14 000 $\times$ g 4℃离心 20 min,取上清真空干燥,-80℃保存样本。

2) 色谱条件 采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统(Ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC)色谱柱进行分离。自动进样器和柱的温度分别保持在 4℃和 25℃,流速 0.3 mL/min。流动相为 25 mmol/L 乙酸铵、25 mmol/L 氢氧化铵水溶液和乙腈溶剂。样品的洗脱梯度程序:95%乙腈溶剂,0.5 min;6.5 min 内线性还原至 65%;1 min 内减到 40%,维持 1 min;0.1 min 增至 95%,维持 2.9 min,流速为 0.3 mL/min。将质量控制(Quality control, QC)样品插入样品队列,通过总离子流图(Total ion chromatogram, TIC)监测和评价系统的稳定性和实验数据的可靠性。

3) 质谱条件 样本检测完毕后,采用 AB Triple TOF 6600 质谱(Mass spectrum, MS)仪采集样品的一级、二级谱图。亲水相互作用色谱(Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)的电喷雾电离源(Electrospray ionization, ESI)条件如下:离子源气体 1 为 60,离子源气体 2 为 60,气帘(Curtain gas, CUR)为 30,源温度为 600℃,在正离子和负离子模式下电压浮动在 $\pm 5$  500 V。在 MS 采集中,TOF MS 扫描和产物

离子扫描分别设置范围为 60~1 000 u 和 25~1 000 u。TOF MS 扫描和产物离子扫描的累积时间分别设置为 0.20 s/spectrum 和 0.05 s/spectrum。二级质谱由信息依赖采集 (Information dependent acquisition, IDA) 获得, 选择高灵敏度模式。参数设定为: 碰撞能量固定在 35 V $\pm$ 15 eV; 去簇电压 (Declustering potential, DP):  $\pm$ 60 V (正负两种模式); IDA 设置: 4 u 内同位素排除, 每个周期监测的候选离子数设为 6。

4) 生物信息分析 为了确定饲料中添加乳酸菌可能影响的代谢途径, 使用京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 途径数据库对代谢物进行评估。KEGG 通路的富集分析显示了实验设计中反映生物处理对各途径影响的差异代谢物, 进而研究其生物学机制。

#### 1.4 数据处理与统计分析

采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 数据以“平均值 $\pm$ 标准误差”表示。用单因素分析法进行差异性分析, 选择  $P < 0.05$  的概率水平作为所有检验的统计学显著性的极限。代谢组学使用 ProteoWizard (版本 3.0.8789) 对肌肉组织样本的原始 MS 数据进行处理, 将其转换为 MzXML 格式 (.wiff)。在使用总峰强度进行归一化后, 将处理后的数据上传到 SIMCA-P 进行多变量数据分析, 包括无监督主成分分析 (Principal component analysis, PCA), 监督偏最小二乘判别分析 (Partial least square discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)。在单变量水平上, 使用  $t$  检验评估, 计算变量投影重要度 (Variable importance for the projection, VIP), 当 VIP 值  $> 1$  作为标准, 筛选具有变量重要性的代谢物, 以确定其显著性。KEGG 富集分析采用 Fisher 精确检验和 Fold change 判断, Fold change 值  $> 1$  时, 表示上调, Fold change 值  $< 1$  时, 表示下调。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布的影响

饲料添加乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布的影响如表 1 所示。由表 1 所知, 乳酸菌组苏尼特羊背最

表 1 饲料添加乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布的影响  
Table 1 Effect of dietary *Lactobacillus* supplementation on carcass fat distribution of Sunit sheep

部位	乳酸菌组脂肪含量/%	对照组脂肪含量/%
背最长肌	3.73 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
股二头肌	2.72 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	1.97 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
胸部皮下	42.63 $\pm$ 3.75	44.04 $\pm$ 6.86
腹部皮下	47.10 $\pm$ 3.55 <sup>b</sup>	54.93 $\pm$ 3.73 <sup>a</sup>
尾部脂肪占比	6.47 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>	8.01 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>

注: 同行同部位小写字母肩注不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

长肌和股二头肌脂肪含量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 腹部皮下脂肪含量和尾部脂肪占比显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 胸部皮下脂肪含量有此趋势而不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明饲料添加乳酸菌可提高苏尼特羊肌肉脂肪含量, 降低蓄积脂肪含量, 分析原因可能是乳酸菌调节了反刍动物胃肠道菌群结构, 影响其对脂质营养的消化、吸收和转运, 最终影响其脂肪分布<sup>[7]</sup>。

### 2.2 乳酸菌对苏尼特羊脂肪酸组成的影响

2.2.1 肌肉组织 饲料添加乳酸菌对苏尼特羊肌肉组织脂肪酸组成的影响如表 2 所示。研究表明, 饲料添加乳酸菌对苏尼特羊肌肉脂肪酸组成有很大的影响, 如提高了多不饱和脂肪酸的含量<sup>[7]</sup>。乳酸作为乳酸菌在胃肠道中主要的代谢产物之一, 通过激活 GPR81/羟基羧酸受体 1 来抑制脂肪细胞的脂解, 进而更多的脂肪酸储存在肌肉脂肪中<sup>[8]</sup>。由表 2 可知, 乳酸菌组苏尼特羊背最长肌和股二头肌中豆蔻油酸和二十二碳六烯酸的含量, 背最长肌中棕榈酸、 $\gamma$ -亚麻酸和花生四烯酸的含量, 股二头肌中单不饱和脂肪酸、棕榈油酸和油酸的含量显著大于对照组 ( $P < 0.05$ ), 背最长肌和股二头肌反式亚油酸的含量, 股二头肌月桂酸的含量显著小于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明从整体上看, 饲料添加乳酸菌可以降低肌肉中反式脂肪酸含量, 提高不饱和脂肪酸含量, 尤其是功能性脂肪酸, 如  $\gamma$ -亚麻酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸, 这与杜瑞和<sup>[7]</sup>Ross 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致, 故饲料添加乳酸菌可以改善苏尼特羊肌肉脂肪酸组成。

表 2 饲料添加乳酸菌对苏尼特羊肌肉组织中脂肪酸组成的影响

Table 2 Effects of dietary *Lactobacillus* supplementation on fatty acids profile in the muscular tissue of Sunit sheep

部位 脂肪酸组成/%	背最长肌		股二头肌	
	乳酸菌组	对照组	乳酸菌组	对照组
癸酸(C10:0)	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
月桂酸(C12:0)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.10 <sup>a</sup>
肉豆蔻酸(C14:0)	1.68 ± 0.22	1.62 ± 0.15	1.56 ± 0.19	1.50 ± 0.16
豆蔻油酸(C14:1)	1.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>
棕榈酸(C16:0)	23.36 ± 0.77 <sup>a</sup>	22.28 ± 0.51 <sup>b</sup>	20.32 ± 0.75	20.37 ± 0.54
棕榈油酸(C16:1)	2.27 ± 0.25	2.23 ± 0.26	3.62 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.10 <sup>b</sup>
硬脂酸(C18:0)	15.72 ± 0.61	14.67 ± 0.93	14.35 ± 0.75	14.72 ± 0.44
反式油酸(C18:1 n-9t)	1.44 ± 0.35	1.36 ± 0.25	1.50 ± 0.25	1.33 ± 0.21
油酸(C18:1 n-9c)	44.47 ± 0.99	45.47 ± 1.40	44.56 ± 1.68 <sup>a</sup>	42.22 ± 1.75 <sup>b</sup>
反式亚油酸(C18:2 n-6t)	0.32 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.15 <sup>a</sup>
亚油酸(C18:2 n-6c)	9.28 ± 1.72	10.75 ± 0.45	11.41 ± 1.89	11.49 ± 1.44
γ-亚麻酸(C18:3 n-6)	0.40 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.15	0.24 ± 0.04
α-亚麻酸(C18:3 n-3)	0.58 ± 0.07	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.10	0.61 ± 0.05
共轭亚油酸(C18:2)	0.60 ± 0.03	0.64 ± 0.18	0.54 ± 0.07	0.50 ± 0.05
花生四烯酸(C20:4)	0.40 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.06	0.40 ± 0.02
二十碳五烯酸(C20:5)	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.41 ± 0.01
二十二碳五烯酸(C22:5)	0.65 ± 0.06	0.59 ± 0.08	0.69 ± 0.13	0.76 ± 0.11
二十二碳六烯酸(C22:6)	0.74 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>b</sup>
饱和脂肪酸	40.14 ± 1.68	39.14 ± 1.38	36.51 ± 1.92	37.19 ± 0.99
单不饱和脂肪酸	48.03 ± 1.99	48.45 ± 1.22	51.14 ± 1.90 <sup>a</sup>	46.14 ± 1.50 <sup>b</sup>
多不饱和脂肪酸	11.88 ± 2.19	12.10 ± 1.68	14.69 ± 2.11	16.5 ± 1.160

注:同行同部位小写字母肩注不同表示差异显著( $P<0.05$ )。

2.2.2 脂肪组织 饲料添加乳酸菌对苏尼特羊脂肪组织脂肪酸组成的影响如表 3 所示。研究表明,乳酸菌可粘附于肠黏膜表面,占据其有限的空间以防有害菌的过度繁殖,促进瘤胃内细菌分泌丙酸,进入瘤胃液,从而维系胃肠道菌群的平衡,其机制是通过竞争和抑制方法,使胃肠道内微生物结构发生改变,如改变脂质代谢途径,最终影响脂肪酸组成<sup>[10]</sup>。由表 3 可知,乳酸菌组苏尼特羊皮下脂肪中豆蔻油酸的含量,尾部脂肪中反式油酸、反式亚油酸和 α-亚麻酸的含量显著高于对照组( $P<0.05$ ),皮下脂肪中月桂酸和棕榈酸的含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。从整体上看,饲料添加乳酸菌提高了苏尼特羊蓄积脂肪的不饱和脂肪酸含量,降低其饱和脂肪酸含量,故饲料添加乳酸菌可以改善苏尼特羊脂肪组织的脂肪酸组成。

### 2.3 乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布和脂肪酸组成影响机制的探究

为探究乳酸菌对苏尼特羊脂肪分布和脂肪酸组成的影响机制,采用代谢组学对背最长肌和尾部脂肪组织中差异代谢物及其通路进行研究。结果表明,经 QC 样本确认试验仪器的稳定性和数据的可靠性之后,利用 XCMS 提取具有正离子模式和负离子模式的肌肉和脂肪组织样本代谢物离子峰。基于统计分析以及从 PLS-DA 和 OPLS-DA 获得的 VIP 值,乳酸菌组和对照组苏尼特羊之间有 45 种肌肉组织代谢物有显著差异(VIP>1),脂肪组织有 32 种代谢物有显著差异(VIP>1)。从中选择在肌肉和脂肪组织中脂肪代谢相关差异代谢物,如表 4 所示。由表可知,乳酸菌组苏尼特羊背最长肌中二酰甘油(Diacylglycerol, DAG)、磷酸胆

表3 饲粮添加乳酸菌对苏尼特羊脂肪组织中脂肪酸组成的影响

Table 3 Effect of dietary *Lactobacillus* supplementation on fatty acids profile in the fat tissue of Sunit sheep

部位	皮下脂肪		尾部脂肪	
	脂肪酸组成/%	乳酸菌组	对照组	脂肪酸组成/%
癸酸(C10:0)	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.08	0.16 ± 0.03
月桂酸(C12:0)	0.13 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.08	0.19 ± 0.02
肉豆蔻酸(C14:0)	0.20 ± 0.04	0.23 ± 0.04	2.74 ± 0.35	2.85 ± 0.16
豆蔻油酸(C14:1)	0.54 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.17	0.89 ± 0.13
棕榈酸(C16:0)	21.46 ± 1.08 <sup>b</sup>	26.76 ± 2.50 <sup>a</sup>	23.12 ± 2.12	21.8 ± 2.83
棕榈油酸(C16:1)	2.31 ± 0.54	2.17 ± 0.50	2.76 ± 0.61	2.56 ± 0.44
硬脂酸(C18:0)	30.58 ± 1.38	27.78 ± 1.14	17.78 ± 1.53	17.39 ± 2.46
反式油酸(C18:1 n-9t)	1.11 ± 0.08	1.59 ± 0.59	4.39 ± 0.85 <sup>a</sup>	2.19 ± 1.02 <sup>b</sup>
油酸(C18:1 n-9c)	35.50 ± 1.48	36.3 ± 7.00	45.74 ± 6.09	48.75 ± 2.30
反式亚油酸(C18:2 n-6t)	0.43 ± 0.03	0.45 ± 0.08	0.39 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.04 <sup>b</sup>
亚油酸(C18:2 n-6c)	2.84 ± 0.62	3.13 ± 0.29	2.57 ± 0.51	2.91 ± 0.39
γ-亚麻酸(C18:3 n-6)	0.27 ± 0.05	0.29 ± 0.11	0.32 ± 0.07	0.31 ± 0.04
α-亚麻酸(C18:3 n-3)	0.65 ± 0.06	0.72 ± 0.06	0.90 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>b</sup>
共轭亚油酸(C18:2)	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.02
花生四烯酸(C20:4)	0.17 ± 0.06	0.20 ± 0.07	0.29 ± 0.17	0.35 ± 0.11
二十碳五烯酸(C20:5)	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01
二十二碳五烯酸(C22:5)	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.03
二十二碳六烯酸(C22:6)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.02
饱和脂肪酸	53.02 ± 2.63	55.79 ± 4.36	41.53 ± 2.51	42.73 ± 3.66
单不饱和脂肪酸	40.45 ± 2.01	39.68 ± 4.33	53.12 ± 2.44	53.43 ± 2.59
多不饱和脂肪酸	4.75 ± 1.30	5.47 ± 1.21	5.32 ± 1.16	4.65 ± 0.83

注:同行同部位小写字母肩注不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

表4 乳酸菌组和对照组肌肉和脂肪组织中的显著性差异代谢物

Table 4 The significantly changed metabolites in the muscular and fat tissue between *Lactobacillus* dietary and control group

部位	离子模式	代谢差异物	VIP	差异倍数	$m/z$	保留时间/s	相关代谢途径
背最长肌	ESI(+)	二酰甘油	1.0910	0.7131	627.5335	190.0720	胆碱代谢
	ESI(+)	磷酸胆碱	6.5313	0.5397	184.0726	497.9830	胆碱代谢
	ESI(+)	胞苷二磷酸胆碱	2.0254	0.6775	489.1134	442.6170	胆碱代谢
	ESI(-)	油酸	10.2947	0.7449	281.2481	63.7170	脂肪酸代谢
	ESI(+)	α-亚麻酸	2.5899	0.8092	296.2574	35.0220	脂肪酸代谢
尾部脂肪	ESI(-)	9R, 10S-EpOME	2.2572	0.6961	295.2267	55.7230	脂肪酸代谢
	ESI(+)	磷酸胆碱	6.83	2.18	184.07	925.36	胆碱代谢
	ESI(+)	胞苷二磷酸胆碱	1.98	4.43	489.11	885.14	胆碱代谢
	ESI(-)	棕榈油酸	7.09	0.87	253.22	71.91	脂肪酸代谢
	ESI(-)	γ-亚麻酸	9.66	0.56	277.22	70.79	脂肪酸代谢

注: $m/z$ 表示质子数和电荷数的比值。

碱(Phosphocholine, PC)、胞苷二磷酸胆碱(Cytidine diphosphate choline, CDP-choline)、油酸、α-亚麻

酸和 9R, 10S-EpOME 含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 乳酸菌组苏尼特羊尾部脂肪中磷酸胆碱和

胞苷二磷酸胆碱含量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),  $\gamma$ -亚麻酸和棕榈油酸含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。此外,为评估补充乳酸菌引起的肌肉和脂肪组织代谢变化,找到乳酸菌影响苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成的合理机制,通过 KEGG 通路富集分析对脂肪沉积相关途径进行筛选,得出乳酸菌组和对照组苏尼特羊胆碱和脂肪酸代谢途径存在差异,值得进一步讨论。

### 3 讨论

脂肪分布与脂肪酸组成是苏尼特羊宰前生长发育的结果,反映生命周期内脂肪和脂肪酸含量在肉羊体内的沉积水平。苏尼特羊尾部脂肪大量沉积,肌内脂肪含量较少,形成“肥多瘦少”的情况,加之近年来片面地追求家畜的生长速度,造成绝大多数苏尼特羊脂肪过度沉积,分布失衡,而瘦肉的价格远高于肥肉,最终降低了养殖的经济效益,造成不必要的资源浪费<sup>[11]</sup>。过量的脂肪摄入还会引起各种疾病,如肥胖、糖尿病和冠状动脉硬化疾病等,不利于人体健康,而在食用品质方面,肌内脂肪含量和嫩度呈正相关,同时降低滴水损失和烹饪损失,从而提高肌肉的保水力,影响肉质的多汁性<sup>[12-13]</sup>。另外,有观点表明,脂肪酸组成对人体的影响要大于脂肪的影响<sup>[14]</sup>,因此,研究苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成对改善其肉用品质具有重大意义。

本研究发现饲料添加乳酸菌可提高肌内脂肪含量,降低蓄积脂肪含量,而且在脂肪酸组成方面也有所改善,具体来说,饲料添加乳酸菌可以降低肌肉组织中反式脂肪酸含量,提高不饱和脂肪酸含量,尤其是功能性脂肪酸,如  $\gamma$ -亚麻酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸,同时提高了苏尼特羊蓄积脂肪中不饱和脂肪酸含量,降低其饱和脂肪酸含量。分析原因可能是乳酸菌进入动物胃肠道后,通过改变厚壁菌门与拟杆菌门的比例,影响胃肠道菌群结构,影响脂肪酸的消化吸收,如饲喂乳酸菌会提高瘤胃中亚麻酸和共轭亚油酸前体物质的含量,同时一定程度上抑制瘤胃中部分氢化菌(如丁酸弧菌)的活性,不饱和脂肪酸的氢化作用因此被削弱<sup>[15-16]</sup>,最终脂质代谢途径发生变化,促进苏尼特羊肌内脂肪的沉积,改善其肉用品质<sup>[7,10,17]</sup>。

虽然动物脂质被批评为健康风险因素,但是肉制品是多不饱和脂肪酸的主要来源,随着脂肪营养研究的不断深入,脂肪酸对疾病的预防作用日益受到人们的重视<sup>[18]</sup>。例如,亚麻酸是长链脂肪酸合成的前体物质,具有广泛的生物学意义<sup>[19]</sup>,花生四烯酸具有免疫调节、抗炎、抗氧化、降血脂、抗肿瘤和保护皮肤等多种生理功能<sup>[20-22]</sup>。二十二碳六烯酸具有抗氧化、抗衰老、提高记忆力及思维能力的作用,对记忆力减退、老年性痴呆有一定疗效,同时有助于感染 SARS-CoV-2 的患者的康复<sup>[23-24]</sup>。此外,近年来反式脂肪酸受到广泛的关注,其对人体健康的危害甚至大于饱和脂肪酸<sup>[25]</sup>,而天然来源的反式脂肪酸对机体健康的不良影响尚不明显,相关研究证据并不充分<sup>[26]</sup>。总之,饲料添加乳酸菌提高了肉中功能性脂肪酸含量,降低了反式脂肪酸含量,更有益人体健康。

在微生物和脂质代谢的因果关系和分子机制研究领域,胃肠道与肌肉和脂肪之间的传播和交流机制尚未被发现和阐明<sup>[27]</sup>,故本研究探究乳酸菌对肌肉和脂肪组织脂肪代谢的影响,通过 UH-PLC-Q-TOF/MS 的非靶向代谢组学研究发现了肌肉和脂肪组织中胆碱和脂肪酸代谢途径的显著变化,说明该途径是乳酸菌改善苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成的重要原因之一。胆碱代谢途径可通过 DAG 调控糖脂代谢,如图 1 所示,主要包括甘油磷酸胆碱(Glycerophosphocholine, GPC)、游离胆碱 (Free choline, Cho)、PC、CDP-choline 和 DAG。GPC 磷酸二酯酶将 GPC 降解为胆碱,返回胆碱代谢途径<sup>[28]</sup>。其中,磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PtdCho)是哺乳动物细胞膜中最丰富的磷脂,PtdCho 是经 Kennedy 途径由游离胆碱合成的,中间产物主要有 PC 和 CDP-choline。在此过程中,DAG 作为脂质锚定物,使 CDP-choline 转化为 PtdCho。此外,DAG 酯化可生成甘油三酯(Triacylglyceride, TAG),后者包含与甘油主链结合的 3 个脂肪酸链,也可通过其它复杂的途径合成<sup>[29]</sup>。故 TAG 的形成与胆碱代谢途径直接相关,通过来自 1,2-甘油磷酸二酯的代谢物 DAG 与糖脂代谢相互作用<sup>[30]</sup>。

本研究中乳酸菌苏尼特羊背最长肌中胆碱代谢途径中 DAG, PC, CDP-choline 含量较低,说明

摄入乳酸菌可能对该途径产生抑制作用,有更多的 DAG 用于脂质合成,如 Michel 等<sup>[11]</sup>研究发现胆碱缺乏导致 PC 钝化,通过诱导肌细胞胆碱缺乏直接导致 DAG 和脂肪酸用于 TAG 合成的可用性增加。对于脂肪组织来说,胆碱代谢途径同样适用,尾部脂肪中 CDP-choline 和 PC 含量较高,说明相较于对照组,乳酸菌组苏尼特羊尾部脂肪中胆碱

代谢途径可能受到激活,与肌肉组织相反,获取更多的 DAG 用于合成 PtdCho, 与 TAG 合成存在一定的竞争性关系,故饲料添加乳酸菌不利于苏尼特羊尾部的脂肪沉积。总之,乳酸菌组和对照组苏尼特羊脂肪分布差异可能是由胆碱代谢途径的变化所致。

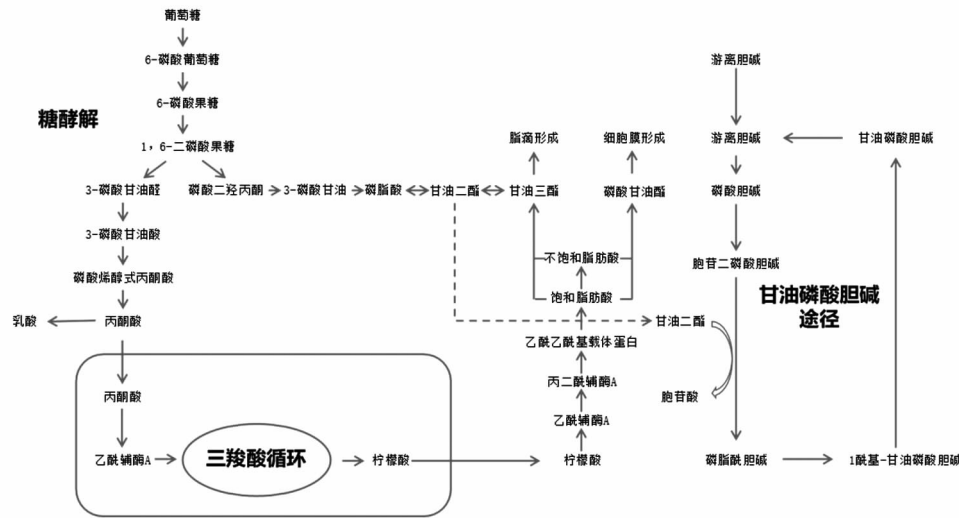


图1 胆碱代谢通路与糖脂代谢

Fig.1 The choline metabolic pathway and glucolipid metabolism

研究表明,在 TAG 合成之后,在内质网的两张小叶之间重新形成了脂滴。当脂滴在非脂肪组织中通过脂解作用分解时,它们会从 TAG 中释放出脂肪酸,并参与各种过程,包括脂肪酸氧化,细胞生长,细胞膜合成以及各种脂质介体的合成。本试验中,乳酸菌组苏尼特羊背最长肌中游离的油酸、 $\alpha$ -亚麻酸及其分解代谢产物 9R,10S-EpOME 的含量降低,说明这些脂肪酸的降低可能是用于 TAG 的合成,这与 Hildreth 等<sup>[32]</sup>的观点一致。乳酸菌组苏尼特羊尾部脂肪  $\gamma$ -亚麻酸和棕榈油酸含量较低,推测乳酸菌组苏尼特羊尾部脂肪中脂肪酸合成可能受到抑制,不利于脂肪沉积,导致乳酸菌组苏尼特羊尾部脂肪占比比较低。总之,饲料添加乳酸菌引起了苏尼特羊肌肉和脂肪组织中部分脂肪酸含量的变化,最终改变了苏尼特羊肉的脂肪分布和脂肪酸组成。

#### 4 结论

由于反刍动物胃肠道微生物的生物氢化作用

减少了饲料中不饱和脂肪酸的吸收,加之肉羊产业集约化育肥模式中的高精料条件,导致肉羊脂肪分布异常和脂肪酸组成失衡,进而降低了羊肉的肉用品质,而本试验通过饲喂乳酸菌改善了苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成,从脂肪分布上看,乳酸菌可提高苏尼特羊肌内脂肪含量,降低皮下脂肪含量和尾部脂肪占比,这有利于改善苏尼特羊的屠宰性能和食用品质;从脂肪酸组成来看,乳酸菌可降低肌肉组织中反式脂肪酸含量,提高不饱和脂肪酸含量,尤其是功能性脂肪酸,如  $\gamma$ -亚麻酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸,同时提高了苏尼特羊蓄积脂肪中不饱和脂肪酸含量,降低其饱和脂肪酸含量,这有利于提高苏尼特羊肉的营养价值。经代谢组学分析,饲料添加乳酸菌引起肌肉和脂肪组织胆碱和脂肪酸代谢途径的显著变化,推测该途径是乳酸菌改善苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成的重要原因之一。综上,对于消费者和生产者来说,饲料添加乳酸菌在改善苏尼特羊脂肪分布与脂肪酸组成方面有着突出的优势,而

其影响机制研究为调控苏尼特羊肉用品质提供了一定的理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] 王柏辉. 饲养方式对苏尼特羊胃肠道菌群、脂肪酸代谢和羊肉品质的影响及机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.  
WANG B H. Effects of feeding regimens on gastrointestinal microbiota, fatty acid metabolism and meat quality of Sunit sheep and its underlying mechanism[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [2] 伍国耀. 动物营养学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2017: 278–281.  
WU G Y. Principles of animal nutrition[M]. Beijing: Science Press, 2017: 278–281.
- [3] CHIKWANHA O C, VAHMANI P, MUCHENJE V, et al. Nutritional enhancement of sheep meat fatty acid profile for human health and wellbeing[J]. Food Research International, 2018, 104: 25–38.
- [4] 窦露, 刘畅, 巴吉木色, 等. 日粮添加乳酸菌对苏尼特羊生长、肉品质、风味物质和抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 25–32.  
DOU L, LIU C, BA J M S, et al. Effects of dietary lactic acid bacteria on growth, meat quality, flavor compounds and antioxidant capacity of Sunit sheep[J]. Food Science, 2021, 42(1): 25–32.
- [5] TIAN Z, CUI Y, LU H, et al. Effect of long-term dietary probiotic *Lactobacillus reuteri* 1 or antibiotics on meat quality, muscular amino acids and fatty acids in pigs[J]. Meat Science, 2021, 171: 108234.
- [6] LIN B, LUO J, YIMING L I, et al. Research on the effect of microbial fermentation feeds on slaughter performance and meat quality in pig with large-scale feeding[J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(10): 2329–2331.
- [7] 杜瑞. 益生菌对苏尼特羊胃肠道菌群、脂肪酸代谢及肉品质的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.  
DU R. Effects of probiotics on gastrointestinal microbiota, fatty acid metabolism and meat quality of Sunit sheep[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [8] BROOKS G A. Lactate as a fulcrum of metabolism [J]. Redox Biology, 2020, 35: 101454.
- [9] ROSS G R, NIEUWENHOVE C, GONZÁLEZ S. Fatty acid profile of pig meat after probiotic administration[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2012, 60(23): 5974–5978.
- [10] PARK S J, BEAK S H, JUNG D J S, et al. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—A review [J]. Asian–Australasian Journal of Animal Sciences, 2018, 31(7): 1043–1061.
- [11] 双金, 黎明, 敖力格日玛, 等. 亚麻籽对肉羊体脂脂肪酸组成的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 930–939.  
SHUANG J, LI M, AO L G R M, et al. Effects of flaxseed on fatty acid composition of body fat in meat sheep[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(4): 930–939.
- [12] PICARD B, GAGAOUA M, AL–JAMMAS M, et al. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect[J]. PeerJ, 2018, 6: e4891.
- [13] WOOD J D, NUTE G R, RICHARDSON R I, et al. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs[J]. Meat Science, 2004, 67(4): 651–667.
- [14] BOJKOVA B, WINKLEWSKI P J, WSZEDYBYL–WINKLEWSKA M. Dietary fat and cancer—which is good, which is bad, and the body of evidence[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4114.
- [15] BHATTACHARJEE B, PAL P K, CHATTOPADHYAY A, et al. Oleic acid protects against cadmium induced cardiac and hepatic tissue injury in male Wistar rats: A mechanistic study [J]. 2020, 244: 117324.
- [16] 冉林武, 黄克和, 李灵恩, 等. 富硒益生菌对山羊瘤胃发酵和瘤胃液脂肪酸含量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 99–104.  
RAN L W, HUANG K H, LI L E, et al. Effects of Se-enriched probiotics supplementation on rumen fermentation and fatty acids concentration of rumen fluid in goats[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(5): 99–104.
- [17] 臧凯丽, 贾彦, 崔文静, 等. 瑞士乳杆菌调控小鼠肠道菌群变化规律的研究[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 156–164.  
ZANG K L, JIA Y, CUI W J, et al. Modulation of



- probiotic *Lactobacillus helveticus* on gut microbiota in mice[J]. Food Science, 2018, 39(1): 156–164.
- [18] PEWAN S B, OTTO J R, HUERLIMANN R, et al. Genetics of Omega-3 Long-Chain polyunsaturated fatty acid metabolism and meat eating quality in Tattykeel Australian white lambs[J]. Genes, 2020, 11(5): e587.
- [19] ZHANG C, ZHANG H, LIU M, et al. Effect of breed on the volatile compound precursors and odor profile attributes of lamb meat[J]. Foods, 2020, 9(9): 1178.
- [20] AL-KHUDAIRY L, HARTLEY L, CLAR C, et al. Omega 6 fatty acids for the primary prevention of cardiovascular disease[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2015, 11(11): 011094.
- [21] ZHANG L, JIA N N, YANG R H, et al. Eicosapentaenoic acid reduces inflammation and apoptosis by SREBP1/TLR4/MYD88[J]. Bratislava Medical Journal, 2020, 121(11): 822–829.
- [22] SAITO Y, NAKAMURA K, ITO H. Effects of eicosapentaenoic acid on arterial calcification[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5455.
- [23] YAMAGISHI K, IKEDA A, CHEI C L, et al. Serum  $\alpha$ -linolenic and other  $\omega$ -3 fatty acids, and risk of disabling dementia: Community-based nested case-control study[J]. Clinical Nutrition, 2017, 36(3): 793–797.
- [24] ROGERO M M, LEAO M C, SANTANA T M, et al. Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2020, 156: 190–199.
- [25] 姚梦莹, 梁倩, 崔岩岩, 等. 不饱和脂肪酸经氧化反应形成反式脂肪酸机理研究进展[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(2): 170–178.
- YAO M Y, LIANG Q, CUI Y Y, et al. Research progress on the formation mechanism of trans-fatty acids from unsaturated fatty acids using oxidation pathway[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(2): 170–178.
- [26] SABINE T, BURDGE G C, JONES E L, et al. Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2006, 83(4): 744.
- [27] WANG K, LIANG X, PANG Y, et al. The role of gut microbiota in host lipid metabolism: An eye on causation and connection[J]. Small Methods, 2019, 4(7): 1900604.
- [28] CAO M D, DOPKENS M, KRISHNAMACHARY B, et al. Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer[J]. NMR in Biomedicine, 2012, 25(9): 1033–1042.
- [29] SONKAR K, AYYAPPAN V, TRESSLER C M, et al. Focus on the glycerophosphocholine pathway in choline phospholipid metabolism of cancer[J]. NMR Biomed, 2019, 32(10): e4112.
- [30] NOMURA D K, CRAVATT B F. Lipid metabolism in cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1831(10): 1497–1498.
- [31] MICHEL V, SINGH R K, BAKOVIC M. The impact of choline availability on muscle lipid metabolism[J]. Food & Function, 2011, 2(1): 53–62.
- [32] HILDRETH K, KODANI S D, HAMMOCK B D, et al. Cytochrome P450-derived linoleic acid metabolites EpOMEs and DiHOMEs: A review of recent studies[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 86: 108484.

### Effects of Dietary *Lactobacillus* on Fat Distribution and Fatty Acids Profile in Sunit Sheep Based on Metabonomics

Yao Duo<sup>1,2</sup>, Zhang Yue<sup>1</sup>, Liu Ting<sup>1</sup>, Guo Yueying<sup>1</sup>, Sun Xuefeng<sup>3</sup>, Jin Ye<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

<sup>2</sup>Inner Mongolia Institute of Quality and Standardization, Hohhot 010070

<sup>3</sup>Animal Husbandry Workstation of Urad Zhongqi, Bayan Nur 015300, Inner Mongolia)

**Abstract** Twelve-four Sunit lamb were equally allocated into two groups, which were fed a basic diet alone or supple-

mented with *Lactobacillus*. The effect mechanism on fat distribution and fatty acid profile of Sunit sheep was studied by measuring their fat distribution, fatty acids profile and metabolomics of longissimus thoracis (LT) and tail fat (TF). The results showed that the fat content of LT and biceps femoris (BF), the content of myristic acid and docosahexenoic acid in LT and BF, palmitic acid,  $\gamma$ -linolenic acid and arachidonic acid in LT, monounsaturated fatty acid, palmitoleic acid and oleic acid in BF, cardamom oleic acid in subcutaneous fat (SF), trans-oleic acid, trans-linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid in TF were significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The fat content of abdominal SF and the proportion of TF, the content of trans-linoleic acid in LT and BF, lauric acid in BF and SF, palmitic acid in SF were significantly lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). At the same time, significant changes in choline metabolism and fatty acids metabolism pathways of LT and TF were found based on metabolomics. Specifically, the levels of phosphocholine and cytidine diphosphocholine in LT of were significantly higher than those in control group, but the TF was opposite ( $P < 0.05$ ). The levels of oleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid in LT and palmitoleic acid,  $\gamma$ -linolenic acid in TF were significantly lower than those in control group ( $P < 0.05$ ). In conclusion, *Lactobacillus* affected the choline and fatty acid metabolic pathways of Sunit sheep to a certain extent, and then improved its fat distribution and fatty acids profile.

**Keywords** *Lactobacillus*; Sunit sheep; fat distribution; fatty acids profile; metabonomics