

Fibre degradation by pig microbiota

Citation for published version (APA):

Long, C. (2020). *Fibre degradation by pig microbiota*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20201126cl>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20201126cl](https://doi.org/10.26481/dis.20201126cl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Rapeseed meal (RSM), a byproduct from rapeseed oil production, is not only a suitable protein source for swine feed but also a potential energy source. RSM contains a high amount of cell wall polysaccharides, even higher when compared to soybean meal commonly used in the feed industry. A drawback of RSM is that the complex cell wall polysaccharides cannot be utilized by endogenous enzymes from monogastric animals, and also can only be partly fermented by the microbial community in the gastrointestinal tract (GIT). Therefore, enzymatic and chemical treatment on RSM were performed to improve the recalcitrant fibre degradability of RSM.

Chapter 1 reviews the carbohydrate composition in RSM, and polysaccharide degradation in RSM by microbes. The possible processing methods to increase use of recalcitrant fibres are described as well. In addition, the literature was reviewed on microbiota composition in pigs. At the end, different *in vitro* fermentation models were introduced in the chapter, including batch fermentation and dynamic fermentation models (TIM-2, SHIME and SIMGI).

Chapter 2 describes the development of the Swine Large Intestinal *in vitro* Model (SLIM), which was developed based on the human, computer-controlled, dynamic TNO *in vitro* model of the colon, nick-named TIM-2. First, physiological parameters were modified from humans to pigs. Briefly, the temperature was changed from 37 °C to 39 °C, and the pH changed from 5.8 to 5.9. Moreover, the simulated ileal efflux medium (SIEM) used to feed the microbiota in the model was modified from humans to pigs (SIEMP).

In **Chapter 3**, a shot of 5 g (modified) RSM was directly fed to the standardized swine gut microbiota, and the effect of processing methods on the RSM utilization and microbiota composition was studied in SLIM. The present study clearly demonstrated that both enzymatic and chemical pretreatment on RSM shifted its cell wall polysaccharide structure, subsequently altering microbial community composition and functional profile compared to untreated RSM, and eventually increased fibre degradability as evaluated by SCFA production. Furthermore, glycome profiling showed that the abundance of cell wall polysaccharides were dynamically changed during fermentation, and did not continuously decrease during the fermentation period as one might expect.

Continuous fermentation of the modified RSM for 48 h in SLIM was described in **Chapter 4**. The current study demonstrated that microbiota composition was significantly affected by both RSM (processed or not) and adaptation time. Unweighted UniFrac showed that microbial community composition was significantly separated between processed RSM and CON, and CELL and ALK in general changed the microbiota composition more than PECT1 and PECT2 did. Carbohydrate metabolism related microbial functions were predicted to significantly increase after the fibre fermentation period. However, degradability of the processed RSM was not improved compared to CON during the fibre fermentation period, as assessed by SCFA production, which indicated that a relative long adaptation period is needed after a diet change to RSM for swine microbiota.

In **Chapter 5**, the swine gut microbiota was adapted to (modified) RSM for 48 h first, which was followed by a shot of 5 g (modified) RSM as evaluation period. Afterwards, the degradability of (modified) RSM was validated *in vivo* (ileal cannulated pigs) by the mobile nylon bag technique. CELL and ALK feeding considerably changed the swine microbiota structure and functional profile compared to CON, which did not occur with PECT1 and PECT2. The hypothesis is entertained that this results from the different cell wall architecture of RSM once processed by this carbohydrase or alkaline treatment. The increase in relative abundance of pathways involved in carbohydrate fermentation in the microbiota fed CELL- or ALK-treated RSM can be considered as a positive effect of these treatments in fibre

utilization and SCFA production. Moreover, it was validated in pigs that CELL and ALK feeding improved the overall degradation of RSM by the mobile nylon bag technique. With all the data collectively considered, we speculate that carbohydrase enzyme, i.e. CELL, improve fibre degradation of RSM during the fermentation by changing the microbial community structure and enzymatic activity and subsequently shifting the microbiota metagenomic functional profile.

Chapter 6 describes a preliminary novel high-throughput technique to screen polysaccharide structures. The results showed high reproducibility and specificity in recognizing polysaccharides by the glycoprofiling technique, making use of fluorescently labeled carbohydrate binding modules (CBMs), which are fibre recognition domains of amongst others carbohydrases

Samenvatting

Koolzaadmeel (RSM), een bijproduct van de productie van koolzaadolie, is niet alleen een geschikte eiwitbron voor varkensvoer, maar ook een potentiële energiebron. RSM bevat een hoog gehalte aan celwandpolysacchariden, zelfs nog hoger in vergelijking met sojameel dat veel wordt gebruikt in de diervoederindustrie. Een nadeel van RSM is dat de complexe celwandpolysacchariden niet kunnen worden gebruikt door endogene enzymen van monogastrische dieren, en ook slechts gedeeltelijk kunnen worden gefermenteerd door de microbiële gemeenschap in het maagdarmkanaal. Daarom werd een enzymatische en chemische behandeling op RSM uitgevoerd om de weerbarstige vezelafbraak te verbeteren.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de koolhydraatsamenstelling in RSM en de afbraak van polysacchariden in RSM door microben. De mogelijke verwerkingsmethode om het gebruik van weerbarstige vezels te vergroten, wordt ook beschreven. Daarnaast werd ook de literatuur samengevat met betrekking tot de samenstelling van de microbiota bij varkens. Uiteindelijk zijn in het hoofdstuk verschillende *in vitro* fermentatiemodellen geïntroduceerd, waaronder batch fermentatie en dynamische fermentatie modellen (TIM-2, SHIME en SIMGI).

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van het Swine Large Intestinal *in vitro* Model (SLIM), dat is ontwikkeld op basis van het menselijke, computergestuurde, dynamische TNO *in vitro* model van het colon, met de bijnaam TIM-2. Ten eerste werden fysiologische parameters gewijzigd van mens naar varken. In het kort werd de temperatuur veranderd van 37 ° C naar 39 ° C, en de pH van 5,8 naar 5,9. Tevens werd het gesimuleerde ileale effluxmedium (SIEM), dat wordt gebruikt om de microbiota in het model te voeden, gewijzigd van mens tot varken (SIEMP).

In **Hoofdstuk 3** werd een shot van 5 g (gemodificeerde) RSM direct aan de gestandaardiseerde darmmicrobiota toegevoerd, en het effect van verwerkingsmethoden op het gebruik van RSM en de samenstelling van de microbiota werd bestudeerd in SLIM. De huidige studie toonde duidelijk aan dat zowel enzymatische als chemische voorbehandeling op RSM de polysaccharidestructuur van de celwand verschoof, waardoor de microbiële gemeenschapssamenstelling en het functionele profiel veranderden in vergelijking met onbehandeld RSM, en uiteindelijk de afbreekbaarheid van vezels verhoogde, zoals beoordeeld door korte-keten vetzuur-productie. Bovendien toonde glycome-profilering aan dat de samenstelling van de celwandpolysacchariden tijdens de fermentatie dynamisch veranderde en niet continu afnam tijdens de fermentatieperiode, zoals men zou verwachten. Continue fermentatie van de gemodificeerde RSM gedurende 48 uur in SLIM is beschreven in **Hoofdstuk 4**. De huidige studie toonde aan dat de samenstelling van microbiota significant werd beïnvloed door zowel RSM (al dan niet geprocessed) als fermentatietijd. Ongewogen UniFrac toonde aan dat de samenstelling van microbiële gemeenschappen significant gescheiden was tussen verwerkte RSM en CON, en CELL en ALK veranderden in het algemeen de samenstelling van de microbiota meer dan PECT1 en PECT2. Aan koolhydraatmetabolisme gerelateerde microbiële functies waren significant verhoogd na de vezelfermentatieperiode. De afbreekbaarheid van het verwerkte RSM was echter niet verbeterd in vergelijking met CON tijdens de vezelfermentatieperiode, zoals beoordeeld door korte-keten vetzuur-productie, wat erop wees dat een relatief lange aanpassingsperiode nodig is voor microbiota van varkens na een dieetwijziging naar RSM.

In **Hoofdstuk 5** werd de microbiota van de darm van de varkens eerst gedurende 48 uur aangepast aan (gemodificeerd) RSM, gevolgd door een inname van 5 g (gemodificeerd) RSM als evaluatieperiode. Daarna werd de afbreekbaarheid van (gemodificeerd) RSM gevalideerd in een *in vivo* studie (gecanuleerde varkens) door middel van een mobiele nylon zaktechniek. CELL- en ALK-voeding veranderden de microbiota-structuur en het functionele profiel van

varkens aanzienlijk in vergelijking met CON, wat niet voorkwam bij PECT1 en PECT2. De hypothese wordt verondersteld dat dit het gevolg is van de verschillende celwandarchitectuur van RSM, eenmaal verwerkt door deze carbohydrase of alkaline behandeling. De toename van de relatieve overvloed aan microbiële routes die gepaard gaan met koolhydraatfermentatie in CELL of ALK kan worden beschouwd als een positief effect van deze behandelingen bij vezelgebruik en korte-keten vetzuur-productie. Bovendien werd bij varkens gevalideerd dat CELL- en ALK-behandeling de algehele afbraak van RSM verbeterde met behulp van de mobiele nylon zaktechniek. Alle gegevens gezamenlijk beschouwd, speculeren we dat het carbohydrase-enzym, d.w.z. CELL, de afbraak van vezels van RSM tijdens de fermentatie verbetert door de microbiële gemeenschapsstructuur en enzymatische activiteit te veranderen en vervolgens het metagenomische functionele profiel van de microbiota te veranderen.

Hoofdstuk 6 beschrijft een niet volledige nieuwe high-throughput techniek om polysaccharidestructuren te screenen. De resultaten toonden een hoge reproduceerbaarheid en specificiteit aan bij het herkennen van polysacchariden door de glycoprofileringstechniek, gebruikmakend van fluorescent gelabelde koolhydraatbindende modules (CBM's), wat vezelherkenningsdomeinen van onder andere koolhydraat hydrolyserende enzymen zijn.

总结

菜籽粕--生产菜籽油的副产品，不仅是合适的猪的蛋白质饲料原料，而且还是潜在的能源饲料原料。菜籽粕含有大量的细胞壁多糖，与饲料企业中通常使用的豆粕相比，非淀粉多糖含量甚至更高。使用菜籽粕作为饲料原料的一个缺点是复杂的细胞壁多糖不能被单胃动物的内源酶所利用，也只能被肠道中的微生物群落部分发酵。因此，本研究对菜籽粕进行了酶和化学处理，以改善菜籽粕中纤维的降解性。

第1章回顾了菜籽粕中的碳水化合物的组成以及微生物对菜籽粕中多糖的降解。还描述了提高纤维降解率的可能的加工方法。另外，文献回顾了猪的微生物菌落组成。最后，本章介绍了不同的体外发酵模型（TIM-2，SHIME和SIMGI）。

第2章介绍了猪大肠体外模型（SLIM）的开发，该模型是基于人的，全电脑控制的，结肠体外模型（昵称为TIM-2）开发的。首先，将人的生理参数改为猪的生理参数。即，温度从37°C改变为39°C，并且pH从5.8改变为5.9。此外，微生物的培养基已从人的（SIEM）开发为猪的（SIEMP）。

在第3章中，将5克处理过的菜籽粕添加到标准化的猪肠道菌群中，并在SLIM中研究了加工方法对菜籽粕的利用率和菌群组成的影响。本研究清楚地表明，对菜籽粕的酶制剂和化学预处理均改变了其细胞壁多糖结构，与未处理的菜籽粕相比，其改变了微生物群落组成和功能特性，最终提高了纤维的降解率（通过短链脂肪酸（SCFA）的产量评估）。此外，多糖组成分析表明，发酵过程中细胞壁多糖的含量是动态变化的，并且在发酵过程中并没有如人们所预期的那样持续减少。

加工的菜籽粕在SLIM中连续发酵48小时的研究在第4章中进行了描述。当前研究表明，微生物群组成受已加工或未加工的菜籽粕和发酵时间的影响很大。未加权的UniFrac分析表明，经过处理的菜籽粕组和对照组之间的微生物群落组成差异显著，并且CELL和ALK比PECT1和PECT2更能改变微生物群落组成。纤维发酵后，与碳水化合物代谢相关的微生物功能显著增加。但是，通过SCFA产量评估，在纤维发酵期间，与对照组相比，加工后的菜籽粕的降解率并未得到改善，这表明，饲料原料改为菜籽粕后，猪的微生物菌群需要相对较长的适应期。

在第5章中，猪肠道菌群首先适应加工后的菜籽粕48小时，然后添加5克该菜籽粕作为试验期。然后，通过猪的瘘管技术，验证了加工处理确实提高了菜籽粕的降解性。与对照组相比，CELL和ALK喂养大大改变了猪的微生物菌群结构和功能，而PECT1和PECT2则没有。因此我们提出了这样的假设：这是由于通过该酶制剂或碱处理改变了菜籽粕的细胞壁结构所致。与碳水化合物利用相关的微生物丰度的增加对纤维的利用和SCFA的产生有积极作用。此外，通过移动尼龙袋技术证实在猪饲料中使用CELL和ALK可改善菜籽粕的降解率。综合考虑所有数据，我们推测，通过改变微生物群落结构和酶活性并随后改变微生物菌落的宏基因组功能谱，纤维降解酶制剂（即CELL）可提高菜籽粕中的纤维降解率。

第6章介绍了分析多糖结构的高通量技术。结果显示，通过使用荧光标记的碳水化合物结合模块（carbohydrate binding modules），该技术在糖基分析中具有很高的重现性和特异性。