



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

山竹醇提取工艺优化及其对断奶仔猪 肠道微生物区系的影响

OPTIMIZATION OF ETHANOL EXTRACTION FROM
GARCINOL AND ITS EFFECT ON INTESTINAL
MICROFLORA OF WEANED PIGLETS

研究生：徐明明

CANDIDATE: XU MINGMING

学 号：2019302120030

STUDENT NO:

学位类型：农业硕士

DEGREE TYPE: MASTER OF AGRICULTURE

导 师：黄飞若 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR HUANG FEIRUO

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二一年六月

华中农业大学硕士学位论文

山竹醇提取工艺优化及其对断奶仔猪肠道微生物区系的影响

Optimization of Ethanol Extraction from Garcinol and Its Effect on Intestinal Microflora of Weaned Piglets

研 究 生：徐明明

学 号：2019302120030

指 导 教 师：黄飞若 教授

指 导 小 组：黄飞若 教授

孙铝辉 教授

齐智利 副教授

张妮娅 副教授

许庆彪 副研究员

专业：农业硕士（畜牧）

研究方向：养殖


获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2021 年 6 月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二〇二一年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
<p>独创性声明</p> <p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> 研究生签名: 徐明明 时间: 2021 年 6 月 8 日 </div>			
<p>学位论文使用授权书</p> <p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保存提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p> <p>注: 保密学位论文 (即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文) 在解密后适用于本授权书。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="width: 45%;"> <p>学位论文作者签名: 徐明明</p> <p>签名日期: 2021 年 6 月 8 日</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>导师签名: </p> <p>签名日期: 2021 年 6 月 8 日</p> </div> </div>			

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

目 录

摘 要	i
Abstract.....	iii
缩略词表	v
第一章 文献综述	1
1 前言	1
2 多酚类化合物在猪生产中的应用	2
2.1 多酚类化合物分类与来源.....	2
2.2 多酚类化合物对猪的免疫调节作用.....	4
2.3 多酚类化合物抗氧化活性与猪肉品质.....	4
2.4 多酚类化合物抗菌作用与猪肠道健康.....	5
2.4.1 肠道物理屏障功能	5
2.4.2 肠道微生物	5
3 多酚类化合物单体提取工艺特点	6
3.1 溶剂浸提法.....	6
3.2 超声波辅助提取法.....	7
3.3 微波辅助提取法.....	7
3.4 生物酶解提取法.....	7
4 山竹醇的生物学功能和提取工艺	8
4.1 山竹醇的植物来源.....	8
4.1.1 印度藤黄	8
4.1.2 藤黄果	9
4.1.3 大叶藤黄	10
4.2 山竹醇的生物学功能.....	10
4.2.1 山竹醇抗氧化作用	11
4.2.2 山竹醇抗炎作用	12
4.2.3 山竹醇抑菌作用	12
4.3 山竹醇的提取工艺.....	13
5 研究目的与意义	14
第二章 山竹醇提取工艺的优化	15

1 引言	15
2 材料与方法	15
2.1 试验材料	15
2.2 试验试剂与仪器	15
2.3 试验设计与方法	16
2.3.1 样品处理	16
2.3.2 样品选择	16
2.3.3 工艺流程	18
2.3.4 样品液中山竹醇含量的测定	18
2.4 印度藤黄果皮中山竹醇的提取优化	19
2.4.1 单因素试验	19
2.4.2 正交试验优化	20
2.4.3 验证试验	21
2.5 印度藤黄果中山竹醇粗品的制备	21
2.6 数据处理与统计分析	21
3 结果与分析	22
3.1 单因素试验	22
3.1.1 乙醇浓度对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响	22
3.1.2 超声温度对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响	22
3.1.3 超声时间对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响	23
3.1.4 料液比对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响	23
3.2 正交试验	24
3.3 验证试验	24
3.4 山竹醇粗品的测定	25
4 讨论	25
5 小结	26
第三章 山竹醇对断奶仔猪生长性能、肠道屏障和肠道微生物区系的影响	27
1 引言	27
2 材料与方法	27
2.1 试验材料	27

2.2 试验设计与试验动物	27
2.3 饲养管理	28
2.4 样品采集及处理	29
2.4.1 血样采集及处理	29
2.4.2 肠道样品采集及处理	29
2.5 检测指标	29
2.5.1 生长性能指标	29
2.5.2 腹泻率	29
2.5.3 肠道形态结构测定	30
2.5.4 血清生化指标	30
2.5.5 肠道微生物菌群检测	30
2.6 数据处理与统计分析	33
3 结果与分析	33
3.1 山竹醇对断奶仔猪生长性能的影响	33
3.2 山竹醇对断奶仔猪腹泻率的影响	34
3.3 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜形态的影响	34
3.4 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜通透性的影响	35
3.5 肠道微生物检测结果	35
3.5.1 结肠菌群 Alpha 多样性分析	35
3.5.2 结肠菌群 Beta 多样性分析	36
3.5.3 肠道菌群物种组成分析	36
3.5.4 肠道主要菌群组成	38
4 讨论	39
4.1 山竹醇对断奶仔猪生长性能和腹泻率的影响	39
4.2 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜物理屏障的影响	39
4.3 山竹醇对断奶仔猪肠道微生物区系的影响	40
5 小结	41
第四章 结语	42
1 研究结论	42
2 创新点	42

3 不足	42
参考文献	43
致 谢	58

摘 要

抗生素常被添加在日粮中来防治仔猪腹泻，随着抗生素的负面影响越来越大，且国家禁抗法律的发布，需寻找其它添加剂替代。本试验选取了印度藤黄果皮作为提取材料，通过超声波辅助技术提取山竹醇，并进一步探究山竹醇对断奶仔猪生长性能、腹泻、肠道屏障和肠道微生物的影响。将 144 头健康的“杜×长×大”断奶仔猪（ 24 ± 1 d, 7.19 ± 0.28 kg）随机分为 4 组：CON 组（对照组，基础日粮）、LGar 组（基础日粮+200 mg/kg 山竹醇组）、MGar 组（基础日粮+400 mg/kg 山竹醇组）、HGar 组（基础日粮+600 mg/kg 山竹醇组），每组 4 个重复。饲喂 14 d 后，前腔静脉采血后处死，取空肠、回肠和结肠各段组织和内容物，检测相关指标。主要研究结果如下：

（1）山竹醇的提取工艺结果如下：将四种藤黄属植物粉末用乙醇浸提两天后，经高效液相色谱仪检测，印度藤黄果皮中山竹醇的含量最高为 2.05%。以印度藤黄果皮为原料，探索山竹醇超声辅助提取的最优工艺为 $C_{\text{乙醇}}=70\%$ 、 $T_{\text{温度}}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液比}}=1:25$ ，在此工艺下山竹醇的提取率为 3.02%，比传统工艺提高了 47.32%。

（2）生长性能和腹泻结果如下：与 CON 组相比，LGar 组、MGar 组、HGar 组的平均日增重(ADG)均显著增加($P<0.05$)，分别提高了 24.23%、31.01%、29.04%；料重比(F/G)均显著下降($P<0.05$)，分别降低了 12.83%、13.27%、10.62%；腹泻率(DI)均显著降低($P<0.05$)，分别降低了 29.88%、36.75%、54.84%。

（3）肠道屏障结果如下：山竹醇对断奶仔猪血清中内皮素(ET-1)、一氧化氮酶(NO)水平影响不显著($P>0.05$)，但显著降低二胺氧化酶(DAO)和 D-乳酸(D-Lac)含量($P<0.05$)；山竹醇降低断奶仔猪空肠的隐窝深度($P<0.05$)，提高空肠和回肠的绒毛高度和绒隐比($P<0.05$)。

（4）肠道微生物结果如下：结肠微生物群落分析显示，与 CON 组和 LGar 组相比，MGar 组、HGar 组显著提高断奶仔猪微生物区系的 *Alpha* 多样性和 *Beta* 多样性($P<0.05$)；在门水平上，MGar 组和 HGar 组的变形菌门的相对丰度减少，厚壁菌门等的相对丰度增加；在目水平上，MGar 组和 HGar 组的肠杆菌目的相对丰度减少，乳酸杆菌目等的相对丰度增加；在属水平上，MGar 组和 HGar 组显著增加了假

单胞菌属、链球菌属、贪铜菌属、乳酸杆菌属、放线菌属、韦荣氏球菌属的相对丰度 ($P<0.05$)。对空肠和回肠进行定量检测,发现与 CON 组和 LGar 组相比, MGar 组和 HGAr 组显著促进乳酸杆菌的增殖 ($P<0.05$),抑制大肠杆菌的生长 ($P<0.05$)。

综上所述,超声辅助提取下印度藤黄果皮中山竹醇的最佳提取工艺为 $C_{\text{乙醇}}=70\%$ 、 $T_{\text{温度}}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液比}}=1:25$,在此工艺下山竹醇的提取率为 3.02%,比传统工艺提高了 47.32%;山竹醇可以通过降低断奶仔猪的肠道通透性和改善肠道形态,丰富断奶仔猪肠道微生物的数量和种类,促进乳酸杆菌的增殖,抑制大肠杆菌的生长,从而改善腹泻率,提高生长性能。

关键词: 山竹醇; 超声波辅助提取; 断奶仔猪; 腹泻; 肠道微生物

Abstract

In this experiment, garcinol was extracted from the rind of *Garcinia indica* by ultrasonic extraction to explore the effects of garcinol on the growth performance, diarrhea, intestinal barrier and intestinal microbes in weaned piglets. 144 healthy "Duroc \times Landrace \times Yorkshire" weaned piglets (24 ± 1 d, 7.19 ± 0.28 kg) were randomly divided into 4 groups: CON group (control group, basic diet), LGar group (low garcinol, basic diet + 200 mg/kg garcinol), MGar group (middle garcinol, basic diet + 400 mg/kg garcinol), HGar group (high garcinol, basic diet + 600 mg/kg garcinol), which had 4 replicates in each group. After 14 days of feeding, blood was collected from the anterior vena cava. The tissues and contents of each segment of jejunum, ileum, and colon were collected to detect indicators. The main findings are as follows:

(1) The results of the extraction process of garcinol are as follows: Among the four kinds of *Garcinia* powder, the rind of *Garcinia indica* had the highest concentration of garcinol after two days of ethanol extraction, which contained 2.05% by high performance liquid chromatography. The best extraction process of garcinol from the rind of *Garcinia indica* was $C_{ethanol}=70\%$, $T_{temperature}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{time}=30\text{ min}$, and $R_{material-liquid\ ratio}=1:25$. The extraction rate of garcinol is 3.02% by this process, which is 47.32% higher than the traditional process.

(2) The results of growth performance and diarrhea are as follows: Compared with the CON group, the average daily gain of the LGar, MGar and HGar groups increased significantly ($P<0.05$) by 24.23%, 31.01% and 29.04%; the feed-to-weight ratio was significantly reduced ($P<0.05$) by 12.83%, 13.27% and 10.62%; the diarrhea incidence was significantly reduced ($P<0.05$) by 29.88%, 36.75% and 54.84%.

(3) The results of the intestinal barrier are as follows: Endothelin (ET-1) and nitric oxide (NO) levels had no significant difference in serum of weaned piglets ($P>0.05$), but diamine oxidase (DAO) and D-lactic acid (D-Lac) content in serum were significantly reduced ($P<0.05$) after the treatment of garcinol. Garcinol reduces significantly ($P<0.05$)

the crypt depth of the jejunum, and increase significantly ($P<0.05$) the villus height and the ratio of villus height to crypt depth of the jejunum and ileum.

(4) The results of intestinal microbes are as follows: Compared with the CON and LGar group, the Alpha diversity and Beta diversity in the weaned piglet were significantly increased ($P<0.05$) in the MGar and HGar groups. At the phylum level, the relative abundance of Proteobacteria in the MGar and HGar groups was decreased, and the relative abundance of Firmicutes were increased; at the order level, the relative abundance of *Enterobactriales* in the MGar and HGar groups was decreased, the relative abundance of *Lactobacillales* were increased; at the genus level, the relative abundance of *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Cupriavidus*, *Lactobacillus*, *Actinobacillus* and *Veillonella* were significantly increased ($P<0.05$) in the MGar and HGar groups. Quantitative detection of jejunum and ileum showed that compared with CON and LGar group, the number of *Lactobacilli* was significantly increased ($P<0.05$) and the number of *Escherichia coli* was significantly reduced ($P<0.05$) in MGar and HGar group.

In summary, the best extraction process of garcinol from the rind of *Garcinia indica* was $C_{ethanol}=70\%$, $T_{temperature}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_{time}=30\text{ min}$, and $R_{material-liquid\text{ ratio}}=1:25$. The extraction rate of garcinol is 3.02% by this process, which is 47.32% higher than the traditional process; garcinol can reduce the intestinal permeability and improve the intestinal morphology, enrich the number and types of intestinal microbes in the weaned piglet, increase the number of *Lactobacillus*, reduce the number of *Escherichia coli*, which improved the rate of diarrhea and the growth performance.

Keywords: Garcinol; Ultrasonic assisted extraction; Weaned piglets; Diarrhea; Intestinal microorganism

缩略词表

(Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文名称
Abbr.	English name	Chinese name
ADFI	Average daily feed intake	平均日采食量
ADG	Average daily gain	平均日增重
DAO	Diamine oxidase	二胺氧化酶
DI	Diarrhea incidence	腹泻率
<i>D</i> -Lac	<i>D</i> -lactic acid	<i>D</i> -乳酸
DSS	Dextran sulphate sodium	葡聚糖硫酸钠
FBW	Final body weight	末重
F/G	Feed/Gain ratio	料重比
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HGar	High garcinol	高浓度山竹醇
IBW	Initial body weight	始重
IL	Interleukin	白细胞介素
LGar	Low garcinol	低浓度山竹醇
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MGar	Mid garcinol	中浓度山竹醇
MIC	Minimal inhibitory concentration	最低抑菌浓度
NF- κ B	Nuclear factor- κ B	核转录因子
NMDS	Nonmetric Multidimensional Scaling	非度量多维尺度分析
PCA	Principal Components Analysis	主成分分析
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PPAPs	Polycyclic polyprenylated acyphloroglucinols	多环多异戊烯基间苯三酚类化合物
SEM	Standard error of mean	平均数标准误
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	肿瘤坏死因子- α

第一章 文献综述

1 前言

在生猪养殖中,为了缩短母猪的非生产时间和生猪出栏时间,阻断某些疾病的传播,实现全进全出的管理模式,提高经济效益,猪场普遍采用早期断奶技术(Tang et al 2005, Kong et al 2007)。但早期断奶要求仔猪必须迅速适应环境、心理和日粮等因素的变化,容易造成仔猪采食量下降、腹泻等应激症状(Laine et al 2008, Gresse et al 2017)。这些不良症状产生的生理原因主要是仔猪免疫系统、消化系统等发育不完善,同时断奶会导致仔猪尚未发育健全的肠道屏障受到损害和肠道菌群紊乱(Yin et al 2009, Smith and Clark 2010)。当仔猪肠道微生态平衡被打破,病原体就会入侵和定殖,从而引起各种疾病,特别是炎症和腹泻,增加养猪治疗的成本,严重甚至会导致仔猪死亡,造成巨大的损失(Campbell et al 2013)。目前我国仔猪早期断奶管理尚未达到发达国家水平,断奶后仔猪易发生腹泻(黄群兰和杨宾 2015)。如何降低早期断奶仔猪的腹泻发病率,使其平稳度过断奶期并快速生长,是养猪业亟需解决的关键技术问题。

在饲料中添加植物提取物能增强畜禽的抗病力,改善肠道健康,缓解应激,提高生产性能,预防多种疾病(Shah et al 2014, Fang et al 2014)。其中,藤黄属植物就是一类典型的植物提取物原料。藤黄属植物是一种传统中草药,具有药食两用的性质,既能用来做调味剂,又能用来治疗腹泻和肠道寄生虫等疾病(Padhye et al 2009, Baliga et al 2011)。随着科学技术的进步,人们对藤黄属植物的研究越来越深入,并从中提取到多种活性物质,山竹醇就是其中之一(Sahu et al 1989)。山竹醇与姜黄素结构相似,是一种优良的抗氧化剂,已被广泛用作啮齿动物的膳食补充剂(Yoshida et al 2005, Jing et al 2014)。体内外试验表明,山竹醇可以清除自由基,具有抗氧化作用(Liao et al 2004, Hong et al 2007);可以抑制核转录因子(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活,具有抗炎作用(Wang et al 2017);可以改变小鼠的肠道菌群组成,具有抑菌作用(Lee et al 2019);且山竹醇对啮齿动物的生长性能、繁殖性能、临床症状、行为特征等无影响,毒性低(Muhammed et al 2018)。为此我们设想,山竹醇可能是一种安全的功能性饲料添加剂,将其添加在日粮中可能可以改善断奶仔猪腹泻的情况,促进仔猪的健康生长。

目前对山竹醇的研究主要集中在小鼠和人体细胞的抗炎作用和抗氧化活性 (Majeed et al 2020, Kang et al 2020)，对断奶仔猪各方面的研究报道都很少。本研究通过对现有山竹醇提取工艺进行梳理，发现山竹醇的提取效率和提取率均较低，有很大的提升空间。故本研究采用超声辅助提取技术优化山竹醇提取工艺，提高提取率，为山竹醇的工业化生产及在畜禽养殖生产中的应用提供技术支持。同时，探索山竹醇对断奶仔猪肠道微生区系的影响，了解山竹醇的生物学效应，为其作为功能性饲料添加剂提供理论基础。

2 多酚类化合物在猪生产中的应用

自 2006 年欧盟禁止使用饲料抗生素以来，人们开始寻找能够维持动物健康和改善动物性能的饲料添加剂，植物产生的天然化合物是主要候选物质之一。研究表明多酚类化合物具有抗炎、抗氧化和抑菌等功能 (Xia et al 2014)。由于氧化应激、炎症和肠道健康与动物生长发育息息相关，多酚类化合物被认为是一种具有潜力的饲料添加剂。

2.1 多酚类化合物分类与来源

在我国，植物很早就开始作为药物直接或间接预防和治愈某些疾病，但多用于人的保健和治疗。随着时代的发展和社会的需要，人们研究将植物提取物应用于畜禽日粮中，发现其可以改善畜产品质量，增强机体抗病力，保证畜禽的健康 (Martins 2013, Roleira et al 2015)。我国地大物博，植物资源丰富，植物原料的饲料添加剂具有广阔的市场空间和巨大的发展潜力。在植物复杂的成分中，多酚类化合物是植物中最丰富的次级代谢产物，它们可以参与植物的生长繁殖过程，如固氮、防动物采食、引诱动物授粉等 (Crozier et al 2006)。多酚类化合物常含有多个酚环，因此被称为多酚 (Randhir et al 2004)，这些化合物主要以复杂的生物聚合物的形式存在于水果、蔬菜、豆类、酒类等食物中，其分类和重要食物来源如表 1-1 所示。

表 1-1 多酚类化合物的分类和重要植物来源

Table 1-1 Classification and important plant sources of phenolic compounds

多酚类化合物 Phenolic Compounds		植物种类 Plant species	参考文献 References
类黄酮化合物 Flavonoids	黄酮醇类 Flavonols	苹果、橙子、葡萄柚、葡萄、蓝莓、卷心菜、生菜、西兰花、萝卜、洋葱、番荔枝、绿茶、红酒、银杏叶	(Aherne and O'Brien 2002, Manach et al 2004, Harnly et al 2006, Thilakarathna and Rupasinghe 2013)
	黄酮类 Flavones	芹菜、辣椒、香菜、百里香、柠檬、蔷薇果、薄荷	
	黄烷酮类 Flavanones	番茄、薄荷、柑橘类水果（主要是橙子和葡萄柚）	
	黄烷醇类 Flavanols	茶、红酒、巧克力、苹果、猕猴桃	
	异黄酮类 Isoflavones	豆科植物、豆类制品	
酚酸 Phenolic acids	花青素 Anthocyanidins	樱桃、草莓、葡萄、红酒、葡萄干、蓝莓、卷心菜、萝卜、洋葱、紫薯	(De Simón et al 1992, Robbins 2003, Vinayagam et al 2016)
	羟基肉桂酸 Hydroxycinnamic acids	苹果、梨、李子、樱桃、杏子、桃子、蓝莓、银杏叶、桑椹叶、烟草叶、土豆、菠菜、生菜、卷心菜、豆类、萝卜、土豆、西兰花、卷甘蓝、芦笋、橄榄油、葡萄酒、咖啡、柑橘汁、谷物	
	羟基苯甲酸 Hydroxybenzoic acids	葡萄、草莓、竹果、洋葱、茶	
	单宁 Tannins	绿茶、红茶、红酒	
	二苯乙烯 Stilbenes	葡萄、桑葚、花生、浆果	(Stervbo et al 2007)
	木脂素 Lignans	亚麻籽、向日葵籽、芝麻籽、谷物、胡萝卜、洋葱、香葱、苹果、樱桃、蓝莓、草莓、坚果、茶、咖啡	(Ide et al 2003, Durazzo et al 2013)

2.2 多酚类化合物对猪的免疫调节作用

NF- κ B 可调节多种促炎基因的转录 (Vallabhapurapu and Karin 2009), 研究报道, 葡萄籽提取物可抑制仔猪小肠内 NF- κ B 的激活, 而发挥抗炎作用 (Gessner et al 2013)。氧化物是 NF- κ B 的激活剂, 因而机体抗氧化能力的强弱能反应机体抵抗力和健康状况, 多酚类化合物可以改善猪的抗氧化状态而增强免疫力 (Pantano et al 2006)。Wolffram 研究表明, 在低维生素 E 供应的条件下, 添加槲皮素可提高生长猪血浆和肝脏中维生素 E 浓度, 并降低血浆中脂质过氧化产物。多酚类化合物还能调节白细胞介素、干扰素等的合成, 刺激淋巴细胞的分裂与转化, 分泌细胞因子, 提高机体抗体水平, 增强抵抗力 (Wolffram 2011)。Deng 等发现, 茶多酚可以通过降低断奶仔猪血清中 γ -干扰素和白细胞介素-1 (IL-1) 的浓度, 提高 IL-4 的浓度, 增加 T 淋巴细胞的数量, 调节断奶仔猪由于氧化应激引起的免疫损伤 (Deng et al 2010)。Meng 等试验发现, 给泌乳期母猪饲喂白藜芦醇, 可以降低仔猪断奶后肠道中 IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平, 抑制炎症反应 (Meng et al 2019)。此外, 白藜芦醇可以调节体液免疫应答 (Fu et al 2018), 提高仔猪的肠道免疫功能 (Gan et al 2019a)。由以上研究结果可知, 多酚类化合物可作为提高猪抗炎和免疫力的饲料添加剂。

2.3 多酚类化合物抗氧化活性与猪肉品质

生猪转变成肉类产品需经过一系列的加工处理, 而猪肉时常会发生理化性质的变化, 导致活性物质的积累, 引发蛋白质和脂质的氧化。然而, 肉制品的过度氧化往往会导致质地恶化、味道变差、变色和营养损失, 所有这些都会影响消费者的选择 (Martin-Puzon and Rivera 2015)。多酚类化合物具有良好的抗氧化活性, 将其添加到日粮中能提高猪肉品质 (Yan et al 2018)。Zhang 等报道, 白藜芦醇可以降低育肥猪背膘厚度, 减少皮下脂肪沉积, 从而改善胴体特性 (Zhang et al 2015)。Xu 等发现苹果多酚能降低育肥猪的背膘厚度、腹部脂肪组织指数、背最长肌的亮度和色度, 提高背最长肌中肌苷酸、谷氨酸、 α -亚麻酸、二十二碳六烯酸等含量, 改善育肥猪的胴体性状、肉色和肉味, 提高育肥猪的肉营养价值 (Xu et al 2019)。Cheng 等研究表明, 桑树多酚能提高猪肉基质中肌浆蛋白和肌纤维蛋白的氧化稳定性 (Cheng et al 2020)。Meng 等研究发现, 白藜芦醇能降低了育肥猪背最长肌滴水损失、乳酸、丙二醛水平以及肌球蛋白重链 IIb (MyHC-IIb) mRNA 和蛋白表达量,

提高了 pH₂₄、超氧化物歧化酶水平以及肌球蛋白重链 I (MyHC-I) mRNA 和蛋白表达量, 改变了肌纤维特性和抗氧化状态, 改善猪肉品质 (Meng et al 2020), Zhou 等发现杜仲叶多酚也有类似效果 (Zhou et al 2016)。

2.4 多酚类化合物抗菌作用与猪肠道健康

肠道健康对维持机体的健康有重要的作用, 尤其是肠道屏障的完整性和肠道微生物的稳定 (Groschwitz and Hogan 2009)。多酚类化合物能显著改善猪的肠道健康, 是一种潜在的功能性饲料添加剂。

2.4.1 肠道物理屏障功能

完整的肠黏膜形态结构能保证营养物质消化吸收, 有效减少饲料中抗营养因子的刺激, 阻止肠道内有害物质的侵袭, 可作为猪肠道健康的评价标准 (Qin et al 2019)。绒毛高度、隐窝深度和绒隐比是评价小肠消化吸收能力的指标 (Oliver et al 2002)。研究发现, 苹果多酚可提高断奶仔猪空肠和回肠绒毛的宽度和高度 (Sehm et al 2007), 葡萄籽多酚能增加十二指肠绒毛隐比 (Fiesel et al 2014), 从而促进营养物质的吸收。血清中 *D*-Lac、二胺氧化酶 (DAO)、内皮素-1 (ET-1) 和一氧化氮酶 (NO) 水平是评价肠黏膜通透性的指标 (Fukudome et al 2014); 紧密连接蛋白 (Occludin、Claudin-1 和 ZO-1) 可反应肠黏膜的完整性 (Wu et al 2014)。Xu 等试验表明, 冬青多酚可提高肠道内源酶活性、肠道紧密连接蛋白 mRNA 的表达, 缓解应激源对仔猪肠道造成的伤害 (Xu et al 2020)。Xun 等发现, 姜黄素可以降低断奶仔猪血清中 *D*-Lac、DAO 含量, 提高空肠绒毛高度和绒隐比, 降低空肠的隐窝深度, 改善肠道黏膜的完整性和通透性, 且效果优于喹酮, 可作为一种替代喹酮的潜在饲料添加剂 (Xun et al 2015)。此外, 白藜芦醇不仅能改善断奶仔猪肠道形态, 缓解断奶仔猪腹泻症状 (Meng et al 2019), 而且能预防敌草快诱导的仔猪空肠黏膜 occludin、claudin-1 和 ZO-1 水平下降, 减轻敌草快诱导的仔猪肠道损伤 (Cao et al 2019)。由此可见, 多酚类化合物能有效调控仔猪的肠道物理屏障, 维护肠道健康。

2.4.2 肠道微生物

肠道内定植着复杂多样的微生物群落, 它们对多酚类化合物的代谢有着重要作用, 同时多酚类化合物本身及代谢产物可以改变肠道微生物的种类、数量, 对肠道微生态产生影响 (张露滢等 2019)。Xu 等研究表明, 冬青多酚可提高仔猪结肠中厚壁菌门丰度, 减少拟杆菌门丰度 (Xu et al 2020)。Choy 等在母猪日粮中添加 1%

的葡萄籽原花青素增加了乳杆菌科的丰度 (Choy et al 2014)。Jang 等发现, 在公猪日粮中添加可可粉 (主要成分类黄酮) 可增加有益菌的丰度, 调节局部肠道免疫标志物, 促进肠道健康 (Jang et al 2016)。Fiesel 等报道, 给猪饲喂富含多酚的植物, 猪肠道中链球菌和梭状芽孢杆菌减少了 (Fiesel et al 2014)。瞿秋红研究发现, 白藜芦醇可以增加乳杆菌属等有益菌相对丰度, 减少猪链球菌等致病菌的相对丰度 (瞿秋红 2020)。胡瑶莲等也表明, 白藜芦醇可以增加育肥猪结肠有益菌 (双歧杆菌) 数量, 减少有害菌 (大肠杆菌) 数量 (胡瑶莲等 2019)。综上所述, 多酚类化合物能够通过调节肠道菌群的组成, 促进肠道健康。

3 多酚类化合物单体提取工艺特点

多酚类化合物由于种类多、结构复杂, 导致其提取研究进展缓慢。随着对多酚类化合物的需求不断增加, 多酚类化合物在食品、畜牧业等 (食品稳定剂、抗微生物剂、抗氧化剂和功能性添加剂等) 中的应用日益广泛, 近年来多酚类化合物的研究越来越多。但从植物中提取多酚类化合物尚未有系统的提取方式, 而随着科技的发展, 超声波、微波等新技术相继应用到多酚类化合物的提取中并取得了良好的效果。

3.1 溶剂浸提法

溶剂浸提法是根据相似相溶原理, 综合各个因素选择对产物溶解度好的溶剂, 把样品浸泡在溶剂中, 在特定条件下将目标产物浸提出来, 它是多酚类化合物提取中经常使用的提取方法, 常用的溶剂有水、有机溶剂和油脂等。天然植物的提取率与提取所用的溶剂密切相关, 多项研究表明, 多酚类化合物的提取率随溶剂极性的不同而不同, 如用甲醇提取大戟茎皮中的多酚 (Gloria et al 2010), 用 75% 乙醇提取余甘子树皮多酚 (Yang et al 2015), 它们比水更有效。此外, Hayouni 等报道, 单独使用或混合使用的水和有机溶剂, 如丙酮/水/乙酸 (90/9.5/0.5) 和乙酸乙酯/甲醇/水 (60/30/10), 显著影响了苍柏和刺柏果实提取物的总多酚含量 (Hayouni et al 2007)。醇类溶剂通常被用于从自然资源中提取酚类物质, 尽管它们对酚类物质的选择性不高, 但总萃取物的收率相当高。特别是, 醇和水的混合物比相应的单组分溶剂体系萃取酚类成分更有效 (Pinelo et al 2005, Yilmaz and Toledo 2006)。但有些有机试剂含有毒性且易燃 (如甲醇), 存在安全隐患, 如无特殊情况, 一般选用毒性较低的溶剂, 如乙醇、正丁醇、甘油等 (Bartnick et al 2006)。溶剂浸提法设备需

求低、操作简单，但一般得到的产物纯度较低，需要进一步去除杂质，且需要大量溶剂，提取时间长。

3.2 超声波辅助提取法

超声波辅助提取法是利用超声波(20-100 kHz)提取目标产物的提取技术之一，与溶液浸提法相比，它能减少溶剂消耗，降低反应温度和能量输入，在更短的时间内提取目标产物。超声辅助提取是基于超声波的空化现象，即超声产生的压力差是气泡突然生长和破裂，当达到一定程度，会产生强大的微射流和冲击波作用于细胞膜或细胞壁上，使其破碎，加速细胞内物质的溶解 (Umego et al 2021)。近年来，对超声波辅助提取法进行优化，如从柑桔皮 (Khan et al 2010)、云杉树皮 (Ghitescu et al 2015)、紫甘薯 (Zhu et al 2016) 和黑刺花 (Elez Garofulić et al 2018) 等中提取多酚类化合物，提取效果良好。超声波辅助提取操作简单，可作为一种高效、环保的提取方法来提取植物中的多酚类化合物，具有很强的工业发展潜力。

3.3 微波辅助提取法

微波辅助提取是一种相对较新的快速提取天然植物化合物方法，它利用微波能加热与样品接触的极性溶剂，使植物细胞内外产生压力而破碎，溶质向外扩散并溶解在溶剂中，减少提取时间和溶剂消耗 (Pérez-Serradilla and De Castro 2011)。它还能以更低的成本获得更高的提取率和更稳定的目标产物 (Monica et al 2010)。Dahmoune 等发现用微波辅助提取法提取紫薇叶中多酚类化合物的时间比用超声辅助提取法和传统提取法分别短 14 倍和 15 倍 (Dahmoune et al 2015)。Da Porto 和 Natolino 报道，与超声辅助提取和溶剂浸提法相比，用微波辅助提取藏红花中的总花青素提取率最高 (Da Porto and Natolino 2018)，Nayak 等用微波辅助提取法提取柑橘皮中多酚类化合物也得到一样的结果 (Nayak et al 2015)。

3.4 生物酶解提取法

酶解是一个非常普遍和重要的过程，特别是在涉及生物化合物的提取、分离和纯化过程中。生物酶解是利用酶选择性地分解植物细胞壁，使植物中的目标产物易于溶解，从而提高提取率的方法。Kong 等用纤维素酶提取金银花的多酚，提取率可达 3.03% (Kong et al 2016)。谢蓝华等研究表明，在提取单枞茶中的茶多酚中使用复合植物水解酶，在最佳提取工艺下提取率可达 25.82%，与传统提取工艺相比提高了 69.87% (谢蓝华等 2013)。Zheng 等发现，与溶剂浸提法相比，将复合多糖酶

用来提取未熟苹果中多酚类化合物提取率高了约 3 倍 (Zheng et al 2009)。酶容易受溶剂 pH 值、反应温度等的影响而失去活性, 同时如果搅拌不均匀、底物聚集等原因会导致底物与酶接触时间变短, 这些都对提取效果产生影响, 在提取过程中需要注意控制提取条件。而正因为酶解法反应条件温和, 所以得到的目标产物纯度和稳定性都比较好, 更具优势 (Umego et al 2021)。

4 山竹醇的生物学功能和提取工艺

藤黄属是藤黄科中最大的一个属, 其属种类繁多 (约 390 种), 具有很高的经济价值。在我国藤黄属植物资源丰富 (约 21 种), 主要分布在两广、云南等亚热带和热带地区。藤黄属植物因其良好的功效受到人们的广泛关注, 研究人员对藤黄属植物的次级代谢产物进行了研究, 发现其含有多种化合物, 山竹醇是其成分之一 (中国科学院中国植物志委员会 1990)。

4.1 山竹醇的植物来源

4.1.1 印度藤黄

印度藤黄果 (*Garcinia indica*, 俗名可可果 Kokum) 是一种具有酸甜味的热带水果, 原产地是印度西高止山脉地区, 现广泛分布于印度、非洲和中国等的热带地区。(Hemshekhhar et al 2011, Parle and Dhamija 2013)。印度藤黄果的果树可高达 10-20 m, 是一种热带常青树, 它成熟果实呈红色或者深紫色, 内含 3-8 颗种子, 呈球状, 直径 2.5-3 cm。据报道, 栽培 15 年以上的老树, 一株可产 30-50 kg 的可可果, 一公顷可产 8.5 t (Jagtap et al 2015)。印度藤黄鲜果在室温下一般可保存 5 d 左右, 在低温下保存时间较长; 传统上, 一般晒干保存。研究表明, 新鲜印度藤黄果皮 (如图 1-1) 含有 80% 的水分, 2% 的粗蛋白质, 2.8% 的单宁, 5% 的果胶, 14% 的粗纤维, 4.1% 的总糖, 1.4% 的脂肪, 2.4% 的色素, 22% 的羟基柠檬酸 (Krishnamurthy et al 1982)。印度藤黄果十分受欢迎, 可作为香料添加于各种食品中, 例如咖喱、酸辣酱、泡菜和饮料等 (Jagtap et al 2015); 也可作为传统中药, 用于治疗肠胃胀气、便秘、消化不良等消化问题 (Nadia et al 2012)。研究表明, 印度藤黄果中富含黄酮类、氧杂蒽酮和多聚异戊烯基取代间苯三酚类化合物 (Polycyclic polyprenylated acyphloroglucinols, PPAPs) 等生物活性物质, 具有抗氧化、抗炎、抗菌和抗溃疡等生理活性 (Baliga et al 2011)。



图 1-1 印度藤黄果皮

Fig. 1-1 The rind of dried *Garcinia indica*

4.1.2 藤黄果

藤黄果 (*Garcinia cambogia*, 简称 *G.cambogia*, 又称 *Goraka*) 果树是一种中小型的树, 高达 12 m, 树冠圆形, 树枝下垂; 果实成熟时是黄色、橙色或红色, 有 6 至 8 个种子。藤黄果 (如图 1-2) 原产于印度、尼泊尔、斯里兰卡等地, 现分布在中国、马来西亚、菲律宾等亚洲亚热带地区 (Abraham et al 2006)。藤黄果可以食用, 但酸性很强, 通常不能生吃, 可以制成含有高浓度维生素 C 的滋补品 (Pandey et al 2013)。藤黄果也是一种经济上重要的香料树, 以晒干的烟熏果皮为价值, 广泛用作调味料, 特别是在鱼咖喱中。藤黄果也可用作传统中药, 用来治疗便秘、痔疮、风湿、水肿、月经不调和肠寄生虫的传统药物 (Duke 1985); 也被用于兽医, 用冲洗剂治疗牛的口腔疾病, 和盐一起用于治疗鱼类疾病等 (Abraham et al 2006)。但藤黄果的植物化学成分尚未得到全面的研究和报道, 初步的分析表明, 从藤黄果植物的各个部位分离出氧杂蒽酮、苯甲酮、有机酸、氨基酸等生物活性物质 (Subhashini et al 2011, Semwal et al 2015)。



图 1-2 藤黄果

Fig. 1-2 *Garcinia cambogia*

4.1.3 大叶藤黄

大叶藤黄 (*Garcinia xanthochymus*, 简称 *G.xanthochymus*) 是藤黄科藤黄属植物, 亦称人面果、黄心果、大叶山竹子、岭南倒捻子等, 常绿乔木, 主要分布于我国云南、两广等南方地区 (中国科学院中国植物志委员会 1990)。果实呈圆球形或者卵球形 (如图 1-3), 直径 4-5 cm; 果皮上有凸出的果疤。大叶藤黄的嫩果可用来制作各种高级的果脯、果酱等, 芳香宜人, 食后令人回味无穷, 深受国内外人民的喜爱; 其嫩叶可以当作蔬菜食用; 除可食用外, 其植株各部分均可入药, 是我国传统的傣药之一, 主要用来肝胆疾病、食物中毒、痢疾腹泻, 也可用于驱虫 (季丰等 2012)。研究报道, 从大叶藤黄植物的根、叶、果实中分离得到有二苯甲酮衍生物、有机酸、黄酮、生物碱、三萜和多异戊烯基吡喃酮等多种化合物 (Chanmahasathien et al 2003, Han et al 2010)。



图 1-3 大叶藤黄

Fig. 1-3 *Garcinia xanthochymus*

4.2 山竹醇的生物学功能

山竹醇也称山竹子素, 英文名: Garcinol、Camboginol, 是从印度藤黄及其他藤黄属植物的果实、树皮、叶、根等中提取出来的一种 B 型 PPAPs 化合物 (Iinuma et al 1998)。山竹醇的化学式为 $C_{38}H_{50}O_6$ (结构如图 1-4), 分子量为 602, 熔点 122 °C, 易溶于有机溶剂, 难溶于水, 在乙醇溶液中的紫外吸收光谱范围为 229 nm 到 365 nm, 是一种黄色针状晶体 (Yamaguchi et al 1999)。山竹醇有酚羟基和 β -二酮官能团, 具有抗氧化、抗炎性、抑菌和抗溃疡等生理活性, 是一种极具有应用潜力的植物提取物 (Pan et al 2001)。

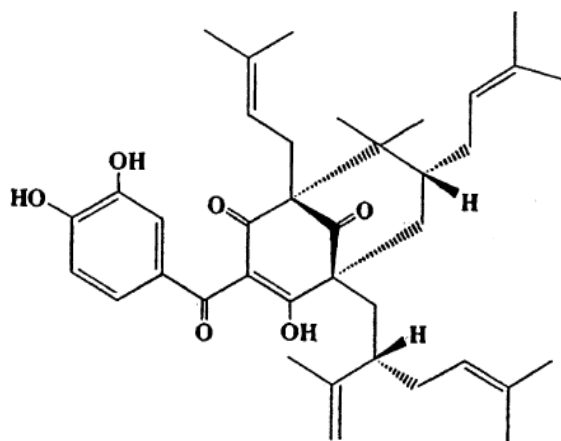


图 1-4 山竹醇化学结构

Fig. 1-4 Chemical structure of garcinol

4.2.1 山竹醇抗氧化作用

抗氧化剂（如维生素 E 和抗坏血酸等）能有效缓解和预防应激产生的自由基对机体造成的不良影响（Ralf et al 2000, Shaikh et al 2014）。研究表明，在胶束体系作为亚油酸盐在乳化体系中的光氧化反应模型中，山竹醇表现出中等的抗氧化活性；在氧化酶体系中，乳化的山竹醇对超氧阴离子的清除率与生育酚相同，低于抗坏血酸和儿茶素；在芬顿反应体系中，山竹醇抑制羟基自由基的形成速率小于抗坏血酸，但强于儿茶素和生育酚；在自由基清除试验中，山竹醇自由基的清除活性大约是生育酚的 3 倍，强于儿茶素；在 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}/\text{DMSO}$ 体系中，山竹醇的甲基自由基清除能力低于生育酚，但对羟基自由基的清除能力强于生育酚，对超氧阴离子的清除能力与生育酚相同（Yamaguchi et al 2000a, Yamaguchi et al 2000b）。Tanaka 等研究发现，山竹醇可以增强小鼠肝脏谷胱甘肽酶和醌还原酶活性，抑制 O_2^- 和 NO 的产生（Tanaka et al 2000）。Panda 等研究表明在啮齿动物日粮中添加 400 mg/kg、800 mg/kg 的藤黄果水提物，可以恢复和增强内源性抗氧化酶活性，抑制细胞膜脂质过氧化，保护肝细胞（Panda et al 2012）。综上所述，山竹醇在体内外均具有较强的抗氧化功能，是一种天然存在的抗氧化剂。对山竹醇氧化机理进行研究发现，山竹醇抗氧化反应的主要位点包括 1,3-二酮、酚环和异戊烯基的双键，当山竹醇与自由基反应时会发生单电子转移，从烯醇化的羟基上去质子化与 1,3-二酮形成共振对，而减少或消除自由基，发挥其抗氧化作用（Sang et al 2001, Sang et al 2002）。

4.2.2 山竹醇抗炎作用

脂多糖（LPS）在体内会激活炎症反应的相关通路，合成释放多种炎性因子，而引起机体炎症反应（Desaldealer et al 2014）。有研究发现，山竹醇可以通过阻断 LPS 与 Toll 受体的结合，抑制 NF- κ B 等炎症通路的激活，从而抑制细胞炎症因子的表达（Liao et al 2005, Hong et al 2006）。Tsai 等研究表明，山竹醇能降低葡聚糖硫酸钠（Dextran sulphate sodium, DSS）诱导结肠细胞中促炎因子 NO 和环氧合酶 2 的表达，降低结肠炎的发生；同时，山竹醇也可以通过改变谷草转氨酶、甘油三酯和总胆固醇水平，抑制促炎细胞因子和增殖细胞核抗原的表达，从而降低结肠炎症发生率（Tsai et al 2014）。De Jong 等试验结果显示，山竹醇在体内外均能降低炎症细胞因子 TNF- α （Tumor necrosis factor）的表达。由上可知，山竹醇可以通过干扰炎症反应发挥抗炎作用（De Jong et al 2017）。

4.2.3 山竹醇抑菌作用

山竹醇具有显著的抑菌性。研究报道，山竹醇对革兰氏阳性、阴性球菌和抗酸杆菌具有中等的抗菌活性，但在山竹醇所有测试浓度中对病毒无抗菌活性；与两性霉素 B 相比，山竹醇显示出良好的抗真菌和皮肤癣菌活性，但对酵母表现不活跃（Bakana et al 1987）。Rukachaisirikul 等发现山竹醇对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用显著，优于庆大霉素，最低抑菌浓度（MIC）为 16 μ g/ml（Rukachaisirikul et al 2005）。Chatterjee 等研究表明，克拉霉素和山竹醇对幽门螺杆菌的杀菌作用随时间和浓度的变化而变化。在 30 min，克拉霉素的抑菌效果比山竹醇好；在 6 h，山竹醇对幽门螺杆菌的 MIC 为 31.5 μ g/ml，而克拉霉素对幽门螺杆菌的 MIC 为 62.5 μ g/ml；在 12 h，克拉霉素对幽门螺杆菌的 MIC 为 31.5 μ g/ml，山竹醇所有浓度均能完全抑制幽门螺杆菌。由此可见，山竹醇对幽门螺杆菌的抑制效果比克拉霉素好（Chatterjee et al 2003）。Negi 和 Jayaprakasha 试验证明，山竹醇对芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为 2 μ g/ml，对李斯特菌的 MIC 为 25 μ g/ml；对大肠杆菌与鼠疫杆菌效果不显著（Negi and Jayaprakasha 2004）。Lee 等研究发现，山竹醇可以作为一种新型的肠道菌群调节剂，预防高脂日粮引起的肠道菌群失调（Lee et al 2019）。

4.3 山竹醇的提取工艺

山竹醇是从藤黄属植物中提取出来的一种次级代谢产物，具有多种生物活性。但山竹醇提取工艺的研究比较滞后，提取效率和提取率均比较低（如表 1-2），有较大的提升空间。

表 1-2 山竹醇提取工艺调查表
Table 1-2 Survey of extraction process of garcinol

原料 Material	山竹醇得率 Productivity of garcinol	文献 References
G.huillensis	用 80% 乙醇溶液提取 272 g <i>G.huillensis</i> 的干茎皮 2 h，然后经过萃取和分离提取到 274 mg 山竹醇，产率 0.1%	(Bakana et al 1987)
G.pedunculata	用甲醇浸泡 2 kg <i>G.pedunculata</i> 果皮 1 个月，用硅胶柱提纯后，得到山竹醇 112 mg，产率 0.0056%	(Sahu et al 1989)
G.purpurea	室温下，用甲醇提取 850 g <i>G.purpurea</i> 48 h，经苯萃取后，以正己烷：乙酸乙酯为洗脱剂脱，过真空液相色谱硅胶柱，得 5 g 山竹醇，产率 0.59%	(Iinuma et al 1996)
G.bancana	将 <i>G.bancana</i> 的细枝甲醇萃取物 88 g，经过一系列柱层析，得 106 mg 山竹醇，产率 0.12%	(Rukachaisirikul et al 2005)
G.cambogia	用苯、乙酸乙酯和 70% 的甲醇依次提取 1 kg <i>G.cambogia</i> 的干树皮，然后将 25 g 苯提取物（共 30 g）过硅胶柱（洗脱液苯：苯酮，20：1），得山竹醇 500 mg，产率 0.06%	(Iinuma et al 1998)
	用乙醇作溶剂，经过一系列提纯，从 200 g 藤黄果中提取山竹醇约 168 mg	(Masullo et al 2008)
	将 200g <i>G.indica</i> 干果皮用 600 ml 水 115 °C 高压 15 min，过滤后将 50 g 滤渣用 500 ml 乙醇在室温下提取 3 h，经萃取后过 ODS 柱层析，得山竹醇 150 mg，产率约为 0.3%	(Yamaguchi et al 1999)
G.indica	用索氏抽提器以正己烷和苯为溶剂各提取 200 g <i>G.indica</i> 干果皮，分别得 8.8 g 和 3.6 g 提取物，以 1：1 混合 6 g，过硅胶柱得 607 mg 山竹醇，产率约为 0.36%	(Negi and Jayaprakasha 2004)
	从 500g <i>G.indica</i> 干果皮中提取到 5 g 山竹醇	(Biersack 2016)
G.esculenta	采用高速逆流色谱法从 105.270 g 山木瓜枝中分离得到 281 mg 山竹醇，产率 0.27%	(汪永玲等 2017)
G.nobilis	用甲醇提取 1.3 kg <i>G.nobilis</i> 的树叶，经过萃取、过柱层析，得到 7.5 mg 山竹醇	(Fouotsa et al 2020)

目前，国内外提取山竹醇主要方法是溶剂浸提法。山竹醇的提取工艺流程一般步骤如下：将藤黄属原料用烘箱烘干后粉碎，称取粉碎的样品，用有机溶剂（甲醇、乙醇等）提取多次，合并滤液在 50 °C 减压浓缩冷冻干燥后，将得到的粗提物过柱层析，用洗脱液逐步洗脱，洗脱液在紫外 254 nm 下进行监测并收集。将收集的洗脱液采用旋转蒸发器浓缩干燥后，经两次结晶后得淡黄色的晶体即为山竹醇（高效液相色谱仪进行鉴定）（Yamaguchi et al 2000a）。这种提取方式得到的山竹醇产率较低，为此我们考虑将超声波辅助提取应用于山竹醇的提取中。Martín-García 等研究报道，用超声波辅助提取啤酒渣中的原花青素，原花青素的得率是常规提取的两倍以上（Martín-García et al 2019）。Hadidi 等用超声波辅助提取紫花苜蓿叶中的总皂苷，也有类似的结果：总皂苷得率是热回流提取的 2 倍，且提取效率和生物活性更高（Hadidi et al 2020）。但超声波辅助提取技术在山竹醇提取方面的应用鲜有报道。山竹醇与姜黄素结构相似，而超声波却很早应用于姜黄素的提取。研究发现，与溶剂浸提法相比，超声波辅助提取不仅可以缩短姜黄素的提取时间（郭辰旭 2018），还能将姜黄素的提取率提高 35%（刘树兴等 2004）。因此，深入探索高效的提取方法十分重要。本研究选取了有机溶剂结合超声辅助提取技术，以期提高印度藤黄果皮中山竹醇的提取效率和提取率。

5 研究目的与意义

山竹醇因其优良的生理活性为其在饲料中的运用创造了良好的条件。在我国，山竹醇在饲料中的应用还处于萌芽阶段，关于山竹醇的提取工艺和对仔猪肠道微生物区系的研究报道很少。本研究通过提取试验探索山竹醇的最优提取工艺，通过饲养试验阐明山竹醇对断奶仔猪的生物学效应，为猪饲料中绿色添加剂的研制与应用提供科学依据。

第二章 山竹醇提取工艺的优化

1 引言

山竹醇在印度藤黄果皮中含量 2%-3%，而山竹醇的提取产率较低，为 15%-50% (Ciochina and Grossman 2006)。为了其能更好的在生产中应用，如何高效提取印度藤黄果皮中的山竹醇是关键。提取效果取决于提取条件，因此探索合适的提取工艺是非常重要的。本研究通过对比四种藤黄属植物，经高效液相色谱仪检测，选择了含量较高的印度藤黄果皮为原料，通过检测山竹醇的含量，反映超声辅助提取印度藤黄果皮中山竹醇提取工艺的好坏，为山竹醇工业化的生产提供依据。

2 材料与方法

2.1 试验材料

人面果、藤黄果、山竹、印度藤黄果皮

2.2 试验试剂与仪器

本实验中使用的的主要试剂及仪器见表 2-1。

表 2-1 主要试剂和设备
Table 2-1 Main reagents and equipment

名称	规格/型号	生产厂家
山竹醇标准品	10 mg/盒，纯度：≥95%	APExBIO (America)
甲醇	色谱纯 AR 500 ml	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯 AR 500 ml	国药集团化学试剂有限公司
正己烷	分析纯 AR 500 ml	国药集团化学试剂有限公司
乙腈	分析纯/色谱纯 AR 500 ml	国药集团化学试剂有限公司
高效液相色谱仪	M8307AA	安捷伦科技有限公司
多级流水式中药粉碎机	BL-3500	台州巴菱电器有限公司
分析天平 (十万分之一)	AUW220D	日本岛津
电子天平	AR124CN	奥豪斯仪器有限公司
电热鼓风干燥箱	101-1 AB	天津市泰斯特仪器
超声波清洗器	SB-52000DT	宁波新芝生物科技
旋转蒸发器	RE-52	上海亚荣生化仪器厂
真空冷冻干燥机	FD-27	北京德天佑科技发展有限公司
抽滤瓶	GG-17 承压<0.06 MPa	天津市奥淇洛谱有限公司

2.3 试验设计与方法

2.3.1 样品处理

将四种藤黄属果实处理后放在烘箱中（65 °C）干燥 18 h，用多级流水式中药粉碎机制成粉末，过 40 目筛，用自封袋装好备用。

2.3.2 样品选择

本试验前期摸索了山竹醇高效液相色谱的检测条件，如图 2-1。然后将四种藤黄属原料粉末（人面果、藤黄果、山竹、印度藤黄果皮）分别用 80% 的乙醇水溶液在室温下浸提 2 d，定容后取上清液用高效液相色谱仪进行检测（检测波长 254 nm），如图 2-2。对检测数据进行分析，如表 2-2 和图 2-3 可知山竹醇标准液浓度与峰面积呈显著的线性相关。并由此算出四种果实中山竹醇的含量：人面果，4037.22 mg/kg（0.40%）；藤黄果，1587.90 mg/kg（0.16%）；山竹，无；印度藤黄果皮，20507.25 mg/kg（2.05%）。因此，本试验选择了检测结果最高的印度藤黄果皮作为提取实验的材料。

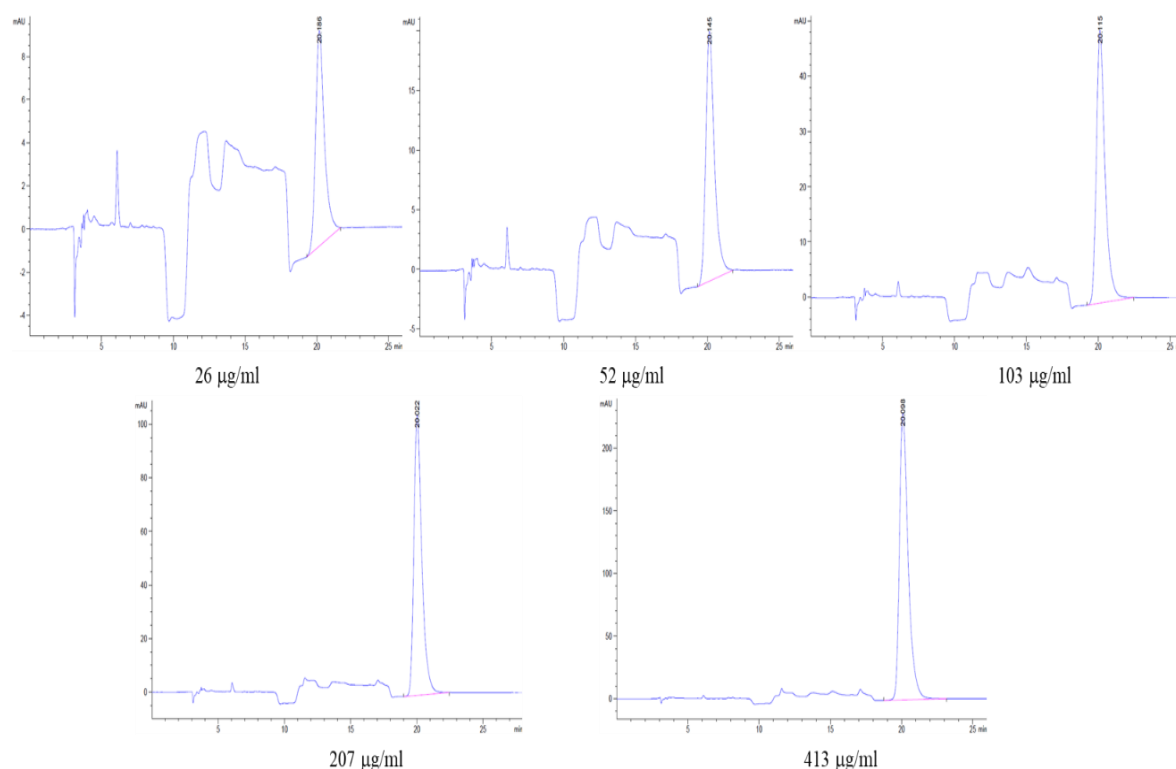


图 2-1 山竹醇标品液高效液相色谱图

Fig. 2-1 Standard liquid high performance liquid chromatography of garcinol

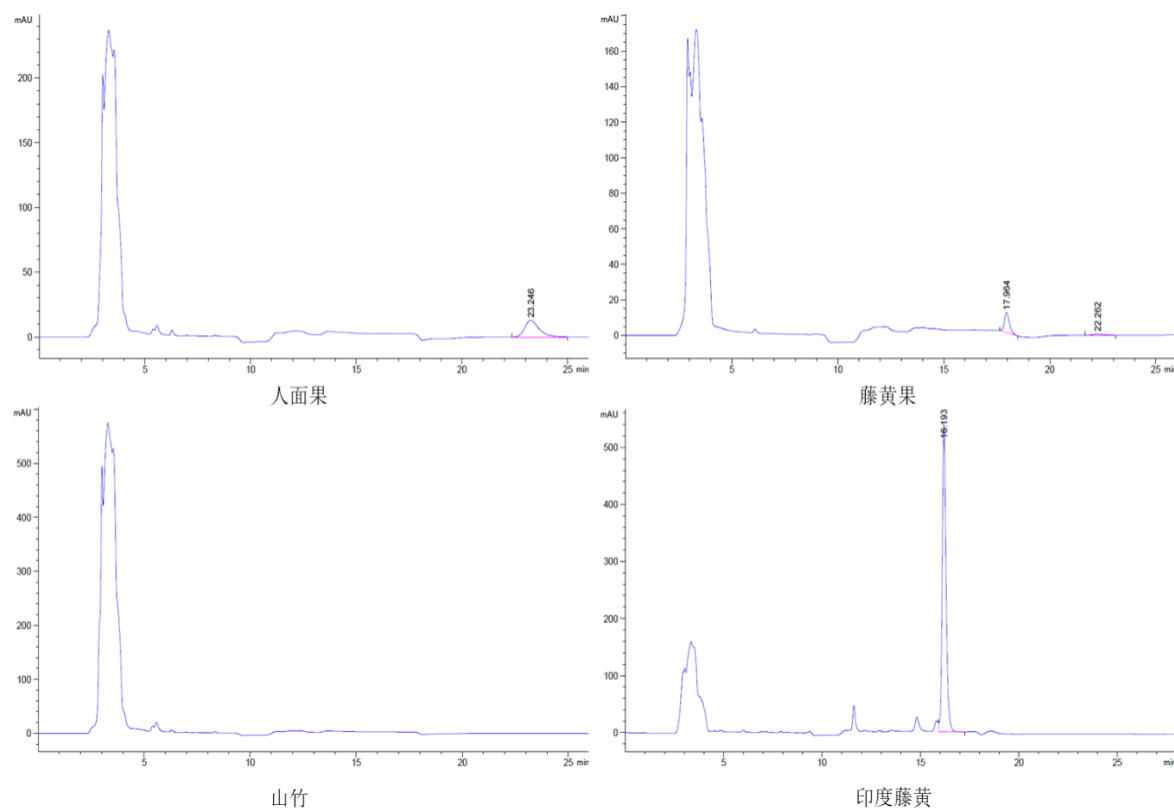


图 2-2 四种藤黄属果实高效液相色谱检测图

Fig. 2-2 Detection of four species of garcinia fruits by high performance liquid chromatography

表 2-2 高效液相色谱仪检测结果

Table 2-2 Table 2-2 High performance liquid chromatograph test results

序号	样品	浓度/称量	峰面积 (mAU*s)
1		26 $\mu\text{g/ml}$	427.62
2		52 $\mu\text{g/ml}$	877.96
3	山竹醇标品液	103 $\mu\text{g/ml}$	2070.10
4		207 $\mu\text{g/ml}$	4376.03
5		413 $\mu\text{g/ml}$	9753.01
6	人面果	1.0005 g	604.26
7	藤黄果	1.0010 g	11.15
8	山竹	1.0002 g	0
9	印度藤黄	0.9960 g	4571.47

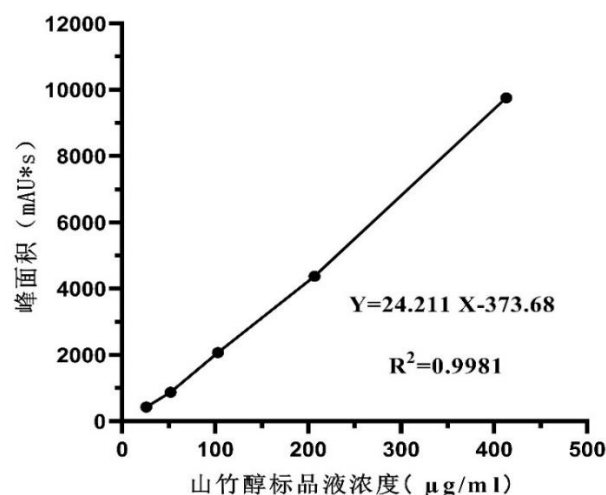


图 2-3 山竹醇标品液高效液相色谱曲线

Fig. 2-3 Garcinol standard liquid high performance liquid chromatography curve

2.3.3 工艺流程

以印度藤黄果皮粗提液中山竹醇含量为考察指标，分别考察乙醇浓度、超声温度、超声时间、料液比四个因素对山竹醇提取率的影响，每个反应条件设 3 个重复。在单因素试验筛选的基础上，选取影响山竹醇提取率较大的因素为自变量，采用正交法进行优化试验并进行验证。将此工艺下得到的提取液经两次结晶进一步提纯后，使用高效液相色谱仪检测样品中山竹醇含量。

2.3.4 样品液中山竹醇含量的测定

样品液的制备：准确称取印度藤黄果皮粉末 1.0000 g 于锥形瓶中，在试验设计条件下超声辅助提取一定时间，抽滤，重复 2 次，将滤液合并并定容，得印度藤黄果皮提取液。

样品液中山竹醇含量的测定：取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取 20 μL 供高效液相色谱仪测定，根据标准曲线计算提取液中山竹醇提取率（如下）。

$$\omega = \frac{C \times V}{m} \times K$$

式中：

ω —试样中山竹醇的含量，单位：mg/kg；

C —从标准曲线上测得待测液中山竹醇的浓度，单位：μg/mL；

V —试样中加入的提取液的体积，单位：ml；

m —试样的质量，单位：g；

K —为稀释倍数。

2.4 印度藤黄果皮中山竹醇的提取优化

2.4.1 单因素试验

精确称取一定量的印度藤黄果皮粉末，采取超声波辅助浸提法对印度藤黄果皮粉末进行提取，选取乙醇浓度 ($C_{\text{乙醇}}$)、超声温度 ($T_{\text{温度}}$)、超声时间 ($t_{\text{时间}}$)、料液比 ($R_{\text{料液比}}$) 作为考察因素，以印度藤黄果皮中山竹醇提取率作为指标，进行系列的单因素试验。具体实验方案见表 2-3。

表 2-3 单因素试验设计
Table 2-3 Single factor test design

$C_{\text{乙醇}}$ (%)	$T_{\text{温度}}$ (°C)	$t_{\text{时间}}$ (min)	$R_{\text{料液比}}$ (g/ml)
40、50、60、 70、80、90	40	30	1: 25
80	20、30、40、 50、60、70	30	1: 25
80	40	10、20、30、 40、50、60	1: 25
80	40	30	1: 8、1: 15、1: 25、 1: 35、1: 45、1: 55

2.4.1.1 乙醇浓度对印度藤黄果皮中山竹醇提取的影响

准确称取 6 份粉碎后过 40 目的印度藤黄果皮粉末，每份 1.000 g，置于 50 ml 三角瓶中，分别加入 40%、50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液，在 40 °C、料液比为 1: 25 下超声提取 30 min 后抽滤，将滤渣按相同方式重复提取一次，合并滤液，定容于 100 ml 容量瓶。静止 15 min 后，取上清液按 2.3.4 的方法测定山竹醇含量。每次试验均重复 3 次，取平均值。

2.4.1.2 超声温度对印度藤黄果皮中山竹醇提取的影响

准确称取 6 份粉碎后过 40 目的印度藤黄果皮粉末，每份 1.000 g，置于 50 ml 三角瓶中，加入 80% 乙醇溶液，分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下、以料液比 1: 25 超声提取 30 min 后抽滤，将滤渣按相同方式重复提取一次，合并滤液，定容于 100 ml 容量瓶。静止 15 min 后，取上清液按 2.3.4 的方法测定山竹醇含量。每次试验均重复 3 次，取平均值。

2.4.1.3 超声时间对印度藤黄果皮中山竹醇提取的影响

准确称取 6 份粉碎后过 40 目的印度藤黄果皮粉末，每份 1.000 g，置于 50 ml 三角瓶中，加入 80% 乙醇溶液，在 40 °C、料液比为 1: 25 条件下分别提取 10、20、30、40、50、60 min 后抽滤，将滤渣按相同方式重复提取一次，合并滤液，定容于 100 ml 容量瓶。静止 15 min 后，取上清液按 2.3.4 的方法测定山竹醇含量。每次试验均重复 3 次，取平均值。

2.4.1.4 料液比对印度藤黄果皮山竹醇提取的影响

准确称取 6 份粉碎后过 40 目的印度藤黄果皮粉末，每份 1.000 g，置于 50 ml 三角瓶中，加入 80% 乙醇溶液，提取的料液比分别为 1: 8、1: 15、1: 25、1: 35、1: 45、1: 55，在 40 °C 下超声提取 30 min 后抽滤，将滤渣按相同方式重复提取一次，合并滤液，定容于 250 ml 容量瓶。静止 15 min 后，取上清液按 2.3.4 的方法测定山竹醇含量。每次试验均重复 3 次，取平均值。

2.4.2 正交试验优化

在单因素试验的基础上，设计乙醇浓度、超声温度、超声时间、料液比 4 因素中最优水平的周边 3 水平做正交实验，以考察各因素的互作对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响。以印度藤黄果皮中山竹醇含量为评价指标，确定最佳的提取工艺。 $L_9(3^4)$ 正交设计方案，见下表 2-4、表 2-5。

表 2-4 正交实验因素水平设计

Table 2-4 Horizontal design of orthogonal experimental factors

水平	因素			
	$C_{乙醇} (%)$	$T_{温度} (°C)$	$t_{时间} (min)$	$R_{料液比} (g/ml)$
1	70	30	20	1: 15
2	80	40	30	1: 25
3	90	50	40	1: 35

表 2-5 正交实验方案设计

Table 2-5 Design of orthogonal experimental scheme

实验	C 乙醇 (%)	T 温度 ($^{\circ}\text{C}$)	t 时间 (min)	R 料液比 (g/ml)
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

2.4.3 验证试验

为了进一步考察上述工艺的稳定性 and 合理性,按正交试验所筛选出的最佳工艺条件下进行重复试验 3 次,测定印度藤黄果皮中山竹醇含量。

2.5 印度藤黄果中山竹醇粗品的制备

按上述最佳提取工艺,提取印度藤黄果皮。将得到的提取液经 55°C 旋转蒸发除去有机溶剂后,冷冻干燥得粗提粉末。将粉末溶解在正己烷中,溶液在小于 5°C 下冷却 2 d,从溶液中收集黄色非晶体沉淀物,并用冷己烷在玻璃过滤器上清洗。在真空干燥器中干燥后,将产物在热乙腈中溶解,在室温下再结晶,收集黄色晶体后用高效液相色谱仪进行鉴定。

2.6 数据处理与统计分析

试验数据用 Excel 2019 软件进行整理后,采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行回归分析。

3 结果与分析

3.1 单因素试验

3.1.1 乙醇浓度对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响

由图 2-4 可知, $C_{\text{乙醇}}$ 在 40%-60% 时, 山竹醇提取率上升明显; 在 60%-90% 时, 山竹醇提取率先升高后降低, 变化幅度较小, 且当 $C_{\text{乙醇}}=80\%$ 时, 山竹醇提取率最高。

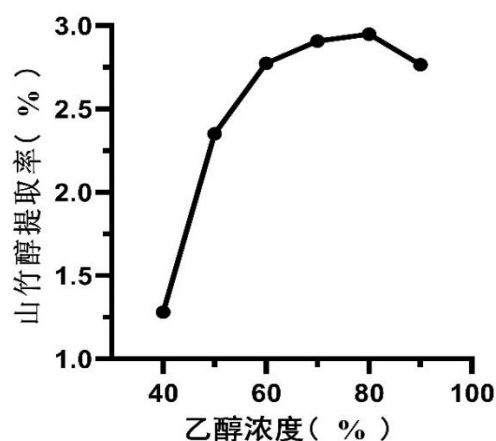


图 2-4 乙醇浓度对山竹醇提取率的影响

Fig. 2-4 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of garcinol

3.1.2 超声温度对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响

由图 2-5 可知, $T_{\text{温度}}$ 上升时, 山竹醇提取率逐渐增加, 当 $T_{\text{温度}}=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 山竹醇的提取率最高; 当 $T_{\text{温度}}$ 超过 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 山竹醇的提取率开始下降; $T_{\text{温度}}$ 超过 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 山竹醇的提取率出现明显下降。

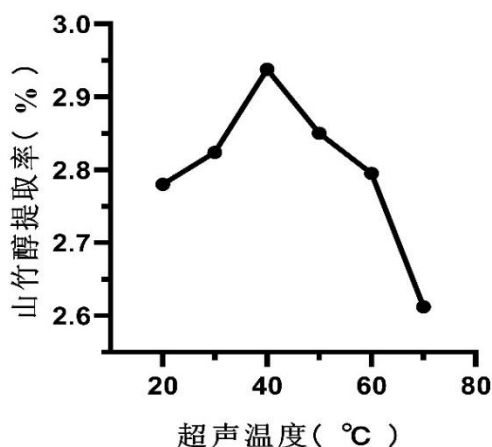


图 2-5 超声温度对山竹醇提取率的影响

Fig. 2-5 Effect of ultrasonic temperature on the extraction yield of garcinol

3.1.3 超声时间对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响

由图 2-6 可知, 山竹醇提取率随 t 时间的增加先升高后降低, 当 $t_{\text{时间}}=30 \text{ min}$ 时, 山竹醇提取率最高。

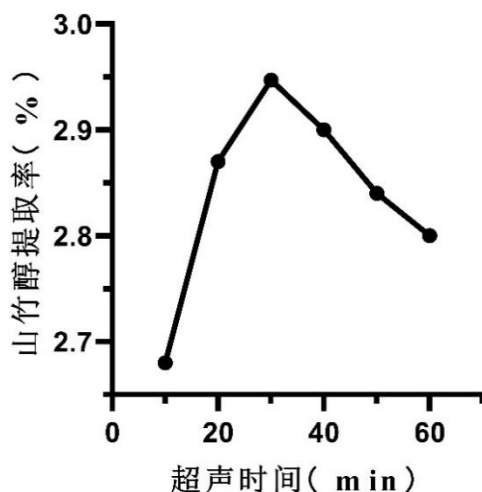


图 2-6 超声时间对山竹醇提取率的影响

Fig. 2-6 Effect of ultrasonic time on the extraction yield of garcinol

3.1.4 料液比对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响

由图 2-7 可知, 当 $R_{\text{料液比}}=1:25$ 时, 山竹醇提取率最高; 当 $R_{\text{料液比}}$ 继续升高时, 山竹醇提取率开始下降, 但幅度很小。

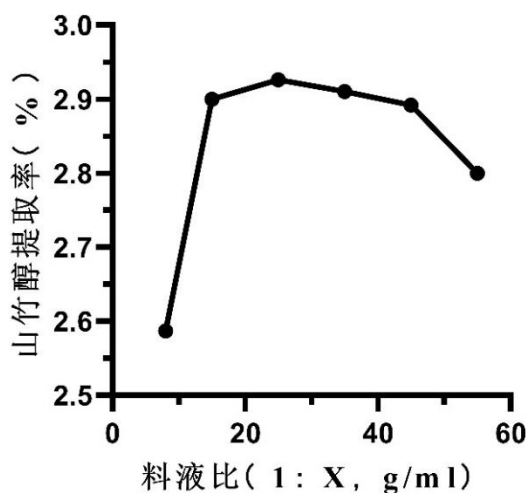


图 2-7 料液比对山竹醇提取率的影响

Fig. 2-7 Effect of solid-liquid ratio on the extraction yield of garcinol

3.2 正交试验

极差反映该因素对山竹醇提取率的影响，由表 2-6 可知，各因素对山竹醇提取率的影响如下： $C_{乙醇} > T_{温度} > R_{料液比} > t_{时间}$ 。山竹醇的最佳提取工艺 $C_{乙醇}=70\%$ 、 $T_{温度}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{时间}=30\text{ min}$ 、 $R_{料液比}=1:25$ 。

表 2-6 正交试验结果
Table 2-6 Results of orthogonal experiment

序号	$C_{乙醇}$ (%)	$T_{温度}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$t_{时间}$ (min)	$R_{料液比}$ (g/ml)	山竹醇提取率 (%)
1	70	30	20	1:15	2.865
2	70	40	30	1:25	2.961
3	70	50	40	1:35	2.968
4	80	30	30	1:35	2.820
5	80	40	40	1:15	2.780
6	80	50	20	1:25	2.885
7	90	30	40	1:25	2.803
8	90	40	20	1:35	2.786
9	90	50	30	1:15	2.858
K_1	8.794	8.488	8.536	8.503	
K_2	8.485	8.527	8.639	8.649	
K_3	8.447	8.711	8.551	8.574	
极差	0.347	0.223	0.103	0.146	
优化水平	$C_{乙醇} 1$	$T_{温度} 3$	$t_{时间} 2$	$R_{料液比} 2$	
因素主次	$C_{乙醇} > T_{温度} > R_{料液比} > t_{时间}$				
最优方案	$C_{乙醇} 1 T_{温度} 3 t_{时间} 2 R_{料液比} 2$				

3.3 验证试验

对 3.3 中所确定的最佳提取条件进行验证，结果如表 2-7。此条件下，3 个重复试验印度藤黄果皮中山竹醇的提取率分别为 2.98%、3.02%、3.07%，平均提取率为 3.02%。

表 2-7 验证试验结果
Table 2-7 Verify test results

序号	称重 (g)	山竹醇提取率 (%)
1	1.0013	2.98
2	1.0039	3.02
3	1.0049	3.07

3.4 山竹醇粗品的测定

制备得到的山竹醇粗品为黄褐色粉末，如图 2-8 可知，经高效液相色谱检测印度藤黄果皮粗品中山竹醇含量为 32.84%。

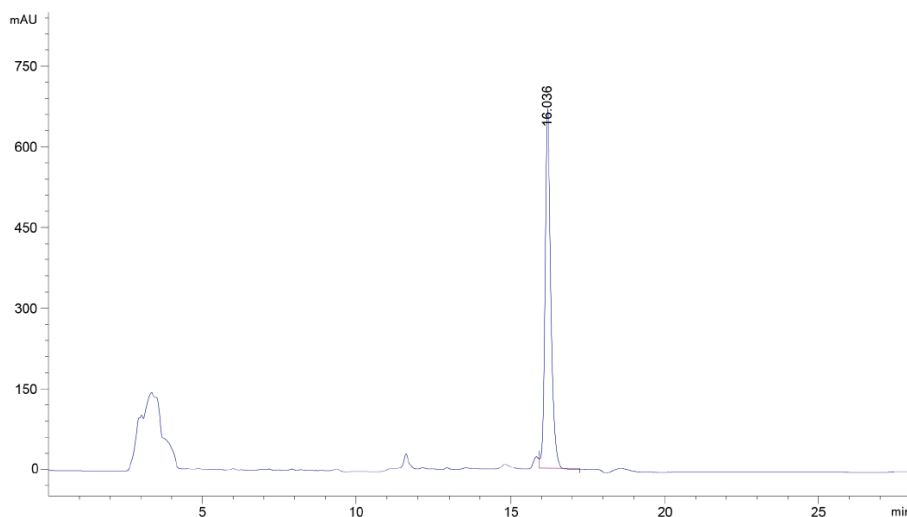


图 2-8 山竹醇粗品的高效液相色谱图

Fig 2-8 High performance liquid chromatography of crude garcinol

4 讨论

本试验在超声波辅助提取下，选取毒性更低、安全系数更好的乙醇为提取溶剂，优化印度藤黄果皮中山竹醇的提取工艺。试验开始前，先摸索了山竹醇高效液相色谱的检测条件。然后将采购的四种果实进行检测，选择了含量最高的印度藤黄果皮作为提取原料。试验先考察了 $C_{\text{乙醇}}$ 、 $T_{\text{温度}}$ 、 $t_{\text{时间}}$ 、 $R_{\text{料液比}}$ 四个单因素对印度藤黄果皮中山竹醇提取率的影响，结果表明各因素山竹醇提取率最高点分别为 $C_{\text{乙醇}}=80\%$ 、 $T_{\text{温度}}=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液比}}=1:25$ 。山竹醇易溶于乙醇，当 $C_{\text{乙醇}}$ 低时，山竹醇溶解不完全，随着 $C_{\text{乙醇}}$ 的升高山竹醇提取率也会相应的提高；当 $C_{\text{乙醇}}$ 较高时，印度藤黄果皮一些亲脂性物质也会溶出，与山竹醇竞争乙醇，导致山竹醇的提取率下降，但下降幅度比较小。结合试验结果，考虑提取成本， $C_{\text{乙醇}}$ 合理范围为 60%-80%。同理，当 $R_{\text{料液比}}$ 较低时，印度藤黄果皮中山竹醇也会溶解不完全，导致测定结果偏低；当 $R_{\text{料液比}}$ 过高时，溶液体积分数过大，超声波难于作用到印度藤黄果皮粉末，超声效果降低，导致山竹醇提取率降低，同时还会造成浪费。综合考虑， $R_{\text{料液比}}$ 合理范围为 1:15-1:35。而 $T_{\text{温度}}$ 和 $t_{\text{时间}}$ 也能影响印度藤黄果皮中山竹醇的提取率。温度能影响分子的运动速度，当 $T_{\text{温度}}$ 较低时，印度藤黄果皮中山竹醇分子运动速度慢，不

能完全扩散到乙醇中；随着 $T_{\text{温度}}$ 的升高，山竹醇分子运动速度加快，更好的溶于乙醇提取溶剂中；但当 $T_{\text{温度}}$ 过高时，可能会造成山竹醇结构发生变化，同时也会加速溶剂中乙醇的挥发，导致提取剂浓度下降，山竹醇提取率也会相应降低。根据本试验结果， $T_{\text{温度}}$ 的合理范围为 30-50 °C。 $t_{\text{时间}}$ 过短时，山竹醇不能完全溶解于溶剂中；当 $t_{\text{时间}}$ 过长时，溶解出来的山竹醇可能会发生氧化反应，影响其纯度，同时也会增加能量消耗，本试验 $t_{\text{时间}}$ 合理范围 20-40 min。

单因素试验没有考虑各因素之间的互作效应，为此本试验用正交试验来优化印度藤黄果皮中山竹醇的提取工艺。由试验结果可知， $C_{\text{乙醇}}$ 对印度藤黄果皮中山竹醇的提取率影响最大， $t_{\text{时间}}$ 对山竹醇提取率的影响最小，并对正交试验得到的最佳提取方案进行验证，证明该提取条件有较好的稳定性和重复性，所得最佳工艺是可靠的。最终确定了最佳提取工艺为 $C_{\text{乙醇}}=70\%$ 、 $T_{\text{温度}}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液比}}=1:25$ ，在此工艺山竹醇的提取率为 3.02%，与传统溶液浸提法（见本章 2.3.2）相比，提高了 47.32%。在此工艺下得到的样品液经旋转浓缩、冷冻干燥后，经过两次结晶纯化后得到山竹醇含量为 32.84% 的印度藤黄果皮粗品。

5 小结

（1）由单因素试验可知，各因素最佳提取条件为 $C_{\text{乙醇}}=80\%$ 、 $T_{\text{温度}}=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液比}}=1:25$ 。

（2）根据正交和验证试验可知，印度藤黄果中山竹醇的最佳提取工艺为 $C_{\text{乙醇}}=70\%$ 、 $T_{\text{温度}}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{\text{时间}}=30\text{ min}$ 、 $R_{\text{料液}}=1:25$ ，在此工艺山竹醇的提取率为 3.02%，与传统工艺相比提高了 47.32%。

（3）经纯化后，印度藤黄果皮粗品中山竹醇含量为 32.84%。

第三章 山竹醇对断奶仔猪生长性能、肠道屏障和肠道微生物区系的影响

1 引言

仔猪腹泻是养猪业中常见且危害性极大的生产问题。研究表明,通过营养调控可以缓解仔猪的断奶应激,改善仔猪肠道健康,防治仔猪腹泻(Lalles 2012)。为保障仔猪健康生长,提高生产效益,生产上常在日粮中使用抗生素等添加剂。但使用这些添加剂会导致细菌耐药性、食品安全等问题,限制畜牧业发展。为保证畜牧业持续健康的发展,我国制定了一系列法律法规,禁止饲料中使用除中草药外的促生长类药物饲料添加剂,并限制了铜锌的用量(Han et al 2020)。针对这一问题,全球的营养学家已做了大量的工作,找到了除添加抗生素外的多种解决措施,如添加酸化剂、酶制剂、植物提取物、使用发酵饲料和易消化的原料等,对仔猪断奶造成的影响均有一定改善作用。其中植物提取物因其量大易得、性佳效好,一直是人们研究的热点。

山竹醇是从藤黄属植物的主要活性成分,具有抑菌、抗炎、抗氧化等生理功能。本课题组在前期试验中证明山竹醇能提高猪的生长性能,增强抗氧化能力,是一种具有可开发和应用前景的饲料添加剂(贺琼玉等 2019)。然而,山竹醇对断奶仔猪肠道健康鲜有报道。本研究将山竹醇添加到日粮中饲喂断奶仔猪,探究其对断奶仔猪肠道健康的影响,为山竹醇在仔猪生产上的应用提供理论依据。

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料

山竹醇源于实验室自提,含量为 32.84%。

2.2 试验设计与试验动物

本试验采用单因素随机分组试验设计,选取健康状况良好、胎次和体重(7.19 ± 0.28 kg)相近的 24 日龄“杜×长×大”断奶仔猪 144 头,随机分为 4 个组,每组 4 个重复,每个重复 9 头,饲喂 14 d。试验处理如下:CON 组,基础日粮;LGar 组,基础日粮+200 mg/kg 山竹醇;MGar 组,基础日粮+400 mg/kg 山竹醇;HGar 组,基础日粮+600 mg/kg 山竹醇。试验基础日粮参照 NRC (2012) 断奶仔猪营养需要标准设计,基础日粮的组成及营养水平如表 3-1。

表 3-1 基础日粮组成及营养水平（风干基础）

Table 3-1 Composition and nutrient levels of the basal diet (as fed basis)

原料 Ingredient	含量, % Content	营养水平 Nutrient level	
玉米 Corn	58.08	消化能 DE, MJ/kg	14.39
豆粕 Soybean meal	20.00	粗蛋白 CP, %	20.57
乳清粉 Dried whey	10.00	钙 Ca, %	0.85
鱼粉 Fish meal	4.00	有效磷 P, %	0.46
大豆油 Soybean oil	3.00	赖氨酸 Lys, %	1.70
碳酸钙 Calcium carbonate	0.85	蛋氨酸 Met, %	0.66
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	1.00	蛋+半胱氨酸 Met+Cys, %	0.97
碳酸氢钠 Sodium bicarbonate	0.15	苏氨酸 Thr, %	1.06
盐 Salt	0.15	色氨酸 Trp, %	0.28
L-赖氨酸 L-Lys	0.87		
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.22		
苏氨酸 Thr	0.30		
色氨酸 Trp	0.08		
预混料 Premix	1.30		
合计 Total	100		

注：预混料以沸石为载体，为每千克日粮提供：维生素 A，2200 IU；维生素 D₃，220 IU；维生素 E，16 IU；维生素 K₃，0.5 mg；维生素 C，200 mg；硫胺素，1.5 mg；核黄素，4 mg；吡哆醇，7 mg；钴胺素，0.02 mg；泛酸，12 mg；烟酸，30 mg；叶酸，0.3 mg；生物素，0.08 mg；Fe (FeSO₄ H₂O)，100 mg；Cu(CuSO₄ 5H₂O)，6 mg；Mn(MnSO₄ 5H₂O)，4 mg；Zn(ZnSO₄ 5H₂O)，100 mg；(Ca(IO₃)₂)，0.14 mg；Se(Na₂SeO₃)，0.30 mg；Co(CoSeO₄ 7H₂O)，0.15 mg。

Note: Provided per kilogram of diet: vitamin A, 2200 IU; vitamin D₃, 220 IU; vitamin E, 16 IU; vitamin K₃, 0.5 mg; vitamin C, 200 mg; thiamin, 1.5 mg; riboflavin, 4 mg; pyridoxine, 7 mg; cyanocobalamin, 0.02 mg; pantothenic acid, 12 mg; niacin, 30 mg; folic acid, 0.3 mg; biotin, 0.08 mg; Fe(FeSO₄·H₂O), 100 mg; Cu(CuSO₄·5H₂O), 6 mg; Mn(MnSO₄·H₂O), 4 mg; Zn(ZnSO₄·H₂O), 100 mg; I(Ca(IO₃)₂), 0.14 mg; Se(Na₂SeO₃), 0.30 mg; Co(CoSO₄·7H₂O), 0.15 mg. The carrier was zeolite.

2.3 饲养管理

试验在湖北十堰武当农牧有限公司进行，采用漏缝水泥地板。试验开始之前对猪舍进行严格消毒。试验期间，猪舍温度为 24~25 ℃，相对湿度为 55%~65%；仔猪按照常规程序进行免疫，自由采食，自由饮水，每天记录采食量；每周进行畜禽圈舍卫生以及消毒工作，确保仔猪生长环境干净，减少环境污染。试验期间腹泻仔猪不用药物治疗。

2.4 样品采集及处理

2.4.1 血样采集及处理

饲养试验结束后，将所有断奶仔猪禁食 12 h，从每个重复随机抽取 3 头前腔静脉采 15 mL 非抗凝血于真空采血管，静置 30 min 后，以 3500 r/min 离心 10 min，将血清分装于 1.5 mL 无菌离心管中，于 -20 °C 保存待测。

2.4.2 肠道样品采集及处理

断奶仔猪采血后，静脉注射戊巴比妥钠麻醉，颈动脉放血，剖开腹腔，将小肠从其肠系膜处取下并立即放入冰块中，把小肠分为十二指肠、空肠、回肠。

2.4.2.1 肠黏膜染色取样

立即取空肠中部和回肠远端各 2 cm，用预冷的无菌生理盐水轻轻除净肠道内容物，保存于 4% 多聚甲醛中，用于观察肠黏膜形态结构的变化。

2.4.2.2 肠道微生物测定取样

冰上采集空肠、回肠和结肠内容物于 2 ml 冻存管中，液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱冻存，用于测定肠道菌群 DNA。

2.5 检测指标

2.5.1 生长性能指标

试验期间每天准确记录断奶仔猪采食量，在试验开始和结束时对各组仔猪进行空腹称重，然后计算平均日增重 (Average daily gain, ADG)、平均日采食量 (Average daily feed intake, ADFI) 和耗料增重比 (Feed : Gain Rate, F/G)。

始重 (IBW): 试验开始时所称的断奶仔猪重量 (g)

末重 (FBW): 试验结束时所称的断奶仔猪重量 (g)

$ADG (g/d) = (\text{结束时体重 } g - \text{初始体重 } g) / \text{头数} / \text{试验天数 } d$

$ADFI (g/d) = \text{每栏总采食量 } g / \text{头数} / \text{试验天数 } d$

$F/G = ADFI / ADG$

2.5.2 腹泻率

试验期间每天检查断奶仔猪肛门有无红肿、粪便污染及生病死亡情况，并做好记录；每日观察断奶仔猪粪便颜色、形状，判断腹泻状况，根据腹泻仔猪耳标号进

行统计和记录，计算断奶仔猪腹泻率（Diarrhea incidence, DI）。腹泻状态评分表（见表 3-2）如下（Qin et al 2019）。

表 3-2 腹泻状态评分标准

Table 3-2 The score standard of diarrhea index

腹泻程度 Degree	粪便状态 State of feces	评分 Score
正常 Normal	条形或粒状 Solid and cloddy	0
轻度 Light diarrhoea	软粪能成形 Soft with shape	1
中度 Mild diarrhoea	稠状，不成形，水分含量高 Sticky, semi-solid, high water content	2
严重 Heavy diarrhoea	液状，不成形，水样粪便 Liquid, unformed, liquid feces	3

腹泻率（%）=腹泻仔猪头数/仔猪总头数×100

2.5.3 肠道形态结构测定

将空肠和回肠从甲醛溶液取出后，经乙醇逐级脱水、二甲苯透明和石蜡包埋后，在室温下切成 5 μm 厚切片，然后置于载玻片上展片，60 °C 烘干脱蜡后用 H&E 染色，最后脱水封片。石蜡切片放在光学显微镜下进行绒毛高度和隐窝深度的测定。在计算机图像分析软件 Image Pro Plus 6.0 下，在每张玻片上至少选取 9 根完整绒毛测定每个绒毛所对应的绒毛高度和隐窝深度（Gao et al 2013）。

绒毛高度：从肠腺开口至绒毛顶端的垂直高度；

隐窝深度：从黏膜肌层至肠腺开口处的垂直高度；

绒隐比：绒毛高度与隐窝深度的比值。

2.5.4 血清生化指标

将低温保存的血清样品在室温下解冻，采用全自动生化分析仪（Beckman CX4）测定血清中 DAO、D-Lac、ET-1 和 NO 水平，具体操作参考说明书。

2.5.5 肠道微生物菌群检测

2.5.5.1 样品处理

从-80 °C 冰箱里取出空肠、回肠和结肠肠段于冰上解冻肠段样品。

2.5.5.2 空肠、回肠主要微生物定量分析

采用荧光定量 PCR 法对空肠和回肠内容物中大肠杆菌和乳酸杆菌进行相对定量检测, 引物见表 3-3。在 iCycler IQTM 实时监测系统上进行 PCR 检测。反应混合液共 25 μL , 包含 12.5 μl 的 IQ SYBR Green Supermix 混合液, 上下引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 5 μL 的模板 DNA, ddH₂O 补充至总体积。

采用种特异性引物 LAC 1 和引物 Lab 0677 对乳酸杆菌进行定量, 定量条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ DNA 预变性 3 min, 接下来是 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 下底物退火和延伸 1 min, 设置为 40 个循环。大肠杆菌在定量中使用上引物 K88AD 和下引物 K88AD, 遵循的条件是在 92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 的条件下变性, 75 $^{\circ}\text{C}$ 下 45 s 结合和扩增, 设置为 40 个循环。通过测定每个处理组的 DNA 含量 (试验 DNA 的检测采用 3 个重复), 计算其平均值。

表 3-3 大肠杆菌和乳酸菌引物

Table 3-3 Primers used for *Escherichia coli* and *Lactobacillus*

菌种 Bacteria	引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	Reference
乳酸菌 <i>Lactobacillus</i>	Forward: LAC1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	(Su et al 2008)
	Reverse: Lab0677	CACCGCTACACATGGAG	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	Forward: K88 AD	GGCACTAAAGTTGGTTCA	(Alexa et al 2001)
	Reverse: K88 AD	CACCCTTGAGTTCAGAATT	

2.5.5.3 结肠内容物基因组 DNA 的提取

将所采的肠道内容物使用组织研磨仪磨成浆液, 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取结肠内容物 (约 0.2 g) 细菌基因组总 DNA, 在利用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白分析仪检测 DNA 的纯度和浓度。以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 评价 DNA 的纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.6~1.9 范围的样品用于下一步 PCR, 调整 DNA 浓度为 30 ng/ μL 。

2.5.5.4 PCR 扩增

以稀释好的 DNA 为模板, 选择 16S rRNA 的 V₃-V₄ 区域作为目标 DNA 的序列, 进行 PCR 扩增; 引物序列为 338 F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。反应条件采用三步法 PCR 扩增程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 循环 25 次。

2.5.5.5 凝胶电泳

PCR 产物使用琼脂糖凝胶进行电泳检测后,根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,采用回收试剂盒回收产物。最后构建文库,使用 Illumina MiSeq 平台进行上机测序。

2.5.5.6 微生物组数据生物信息学分析

采用 Illumina MiSeq 平台获得的下机数据,排序完成后,对下机的原始数据进行过滤,以保证排除干扰因素。通过 Qiime 软件进行拼接,基于有效数据进行 OTUs (Operational Taxonomic Units) 聚类 and 物种分类分析,并将 OUT 和物种注释的结果结合,从而得到每个样品具体的 OTUs 和分类谱系的分析结果。综合各处理组内和组间的 OTUs 进行丰富度和多样性指数等分析,同时对物种注释在各个分类水平(门、目、属)进行群落结构的统计学分析。最终,在以上分析的基础上,进行一系列基于 OTUs、物种组成的聚类分析、NMDS 和 PCA 等统计比较分析,以此挖掘样品之间的物种组成差异。

Alpha 多样性 (Alpha Diversity) 可反映肠道微生物群落丰富度和多样性,常用 Chao 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数来度量。Chao 指数和 ACE 指数能反映微生物区系的丰富度,二者数值越大,代表微生物数量越多。Shannon 指数和 Simpson 指数能反映微生物区系的多样性,Shannon 指数越大,说明微生物多样性越高;Simpson 指数越大,说明微生物多样性越低。

Beta 多样性 (Beta Diversity) 可反映样品间是否具有显著的微生物群落差异,可用 PCA 和 NMDS 来度量。主成分分析 (Principal Components Analysis, PCA) 也称主分量分析,是揭示大样本、多变量数据或样本之间内在关系的一种方法,旨在利用降维的思想,把多指标转化为少数几个综合指标,降低观测空间的维数,以获取最主要的信息。PCA 是一种简化数据集的技术,它的实质是一个线性变换,这个变换把数据变换到一个新的坐标系统中,使得任何数据投影的第一大方差在第一个坐标(称为第一主成分)上,第二大方差在第二个坐标(第二主成分)上,依次类推。主成分分析经常用来减少数据集的维数,同时保持数据集的对方差贡献最大的特征。通过 PCA 可以观察个体或群体间的差异。非度量多维尺度分析 (Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS) 是一种将多维空间的研究对象(样本或变量)简化到低维空间进行定位、分析和归类,同时又保留对象间原始关系的数据分析方法,常用于比较样本或组之间的差异。

2.6 数据处理与统计分析

试验数据用 Excel 2019 软件进行整理后, 采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和显著性检测, 用 Duncan 法进行多重比较, 数据结果以“平均值±标准差”形式表示, $P<0.05$ 表示差异显著, $P>0.05$ 表示差异不显著。

3 结果与分析

3.1 山竹醇对断奶仔猪生长性能的影响

由表 3-4 可知, 各组断奶仔猪 ADFI、FBW 和 IBW 没有明显差异 ($P>0.05$), 但随着日粮中山竹醇含量的增加, 仔猪的 ADFI 和 FBW 均呈一定的上升趋势。说明在日粮中添加山竹醇对适口性影响不大, 没有影响仔猪的采食量, 反而有上升的趋势。与 CON 组相比, LGar 组、MGar 组、HGar 组的 ADG 均显著增加 ($P<0.05$), 分别提高了 24.23%、31.01%、29.04%; F/G 均显著下降 ($P<0.05$), 分别降低了 12.83%、13.27%、10.62%。

表 3-4 山竹醇对断奶仔猪生长性能的影响

Table 3-4 Effects of garcinol on growth performance in weaned piglets

项目 Items	对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	P 值 P-value
		LGar	MGar	HGar		
始重 (IBW, kg)	7.21	7.19	7.18	7.20	0.03	0.741
末重 (FBW, kg)	11.35	12.56	12.62	12.79	0.17	0.069
平均日增重 (ADG, g/d)	154.67 ^b	192.15 ^a	202.63 ^a	199.58 ^a	5.27	0.041
平均日采食量 (ADFI, g/d)	349.53	379.46	396.72	402.68	11.56	0.421
料重比 (F/G)	2.26 ^a	1.97 ^b	1.96 ^b	2.02 ^c	0.05	0.022

SEM: 均值的总标准误。

SEM: The total standard error of the mean.

3.2 山竹醇对断奶仔猪腹泻率的影响

由表 3-5 可知, LGar 组、MGar 组、HGar 组的 DI 显著低于 CON 组, 与 CON 组相比分别降低了 29.88% ($P<0.05$)、36.75% ($P<0.05$)、54.84% ($P<0.05$)。且 HGar 组的 DI 显著低于 LGar 组、MGar 组, 与其相比分别降低了 35.59% ($P<0.05$)、28.59% ($P<0.05$)。说明山竹醇能明显改善断奶仔猪的腹泻状况, 且随着剂量的增加效果越来越明显。

表 3-5 山竹醇对断奶仔猪腹泻率的影响
Table 3-5 Effects of garcinol on diarrhea rate in weaned piglets

项目 Items	对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	P 值 P-value
		LGar	MGar	HGar		
腹泻率, % (Diarrhea incidence)	10.34 ^a	7.25 ^b	6.54 ^b	4.67 ^c	0.7	0.006

3.3 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜形态的影响

由表 3-6 所示, 与 CON 组相比, 山竹醇组能显著降低空肠的隐窝深度($P<0.05$), 提高空肠和回肠的绒毛高度和绒隐比 ($P<0.05$)。且在山竹醇组中, HGar 组的效果优于 LGar 组、MGar 组 ($P<0.05$)。说明山竹醇可以改善断奶仔猪肠黏膜形态结构, 且随着日粮中山竹醇剂量的增加效果越来越明显。

表 3-6 山竹醇对断奶仔猪肠道形态的影响
Table 3-6 Effects of garcinol on small intestine structure in weaned piglets

	项目 Items	对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
			LGar	MGar	HGar		
空肠 Jejunum	绒毛高度 Villus height/ μm	310.26 ^a	319.52 ^b	324.67 ^b	375.64 ^c	4.36	0.041
	隐窝深度 Crypt depth/ μm	108.35 ^a	105.67 ^b	96.27 ^b	87.36 ^c	3.24	0.024
	绒隐比 V/C	2.86 ^a	3.02 ^b	3.37 ^b	4.30 ^c	0.10	0.016
回肠 Ileum	绒毛高度 Villus height/ μm	267.63 ^a	346.57 ^b	342.27 ^b	398.43 ^c	9.24	0.472
	隐窝深度 Crypt depth/ μm	90.83	92.67	87.67	88.59	2.89	0.008
	绒隐比 V/C	2.95 ^a	3.74 ^b	3.91 ^b	4.49 ^c	0.12	0.016

3.4 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜通透性的影响

由表 3-7 可知, 各组断奶仔猪血清中 ET-1、NO 水平没有明显差异 ($P>0.05$); 但与 CON 组相比, 山竹醇组均显著降低了血清中 DAO ($P<0.05$)、D-Lac 水平 ($P<0.05$); 且 HGar 组 DAO 和 D-Lac 含量显著低于 LGar、MGar 组 ($P<0.05$)。说明山竹醇可以显著降低断奶仔猪肠黏膜的通透性, 且日粮中山竹醇剂量越高效果越明显。

表 3-7 山竹醇对断奶仔猪肠道通透性的影响

Table 3-7 Effects of garcinol on intestinal permeability in weaned piglets

项目 Items	对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	P 值 P-value
		LGar	MGar	HGar		
DAO (ng/mL)	39.46 ^a	10.76 ^b	9.56 ^b	5.67 ^c	2.79	0.005
D-Lac (μmol/mL)	55.26 ^a	39.47 ^b	32.79 ^b	27.64 ^c	1.98	0.013
ET-1 (ng/L)	130.67	110.47	95.26	91.58	5.04	0.348
NO (μmol/L)	54.23	44.26	41.89	43.28	1.67	0.461

3.5 肠道微生物检测结果

3.5.1 结肠菌群 Alpha 多样性分析

使用 16S rRNA 高通量测序对 48 头仔猪的结肠内容物进行分析, 结果见表 3-8。由表 3-8 可知, CON 组和 LGar 组、MGar 组和 HGar 组的丰富度指数和多样性指数无显著变化 ($P>0.05$); 与 CON 组和 LGar 组相比, MGar 组和 HGar 组的丰富度指数和多样性指数显著增加 ($P<0.05$), 且 MGar 组的效果最好。

表 3-8 山竹醇对断奶仔猪结肠 α 菌群多样性的影响

Table 3-8 Effect of garcinol on colonic bacterial community alpha diversity in weaned piglet

项目 Items		对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	P 值 P-value
			LGar	MGar	HGar		
丰富度指数	Chao	361.50 ^b	350.97 ^b	770.00 ^a	712.51 ^a	53.85	0.038
Richness index	Ace	364.51 ^b	357.41 ^b	772.20 ^a	713.90 ^a	53.71	0.026
多样性指数	Shannon	1.74 ^b	1.97 ^b	6.92 ^a	6.10 ^a	0.71	0.008
Diversity index	Simpson	0.31 ^b	0.35 ^b	0.97 ^a	0.96 ^a	0.10	0.017

3.5.2 结肠菌群 *Beta* 多样性分析

结肠 β 多样性结果如图 3-1 所示, CON 组与 LGar 组、MGar 组和 HGar 组两两之间的微生物群落相似, 而 MGar 组和 HGar 组与 CON 组和 LGar 组的差异性较大。

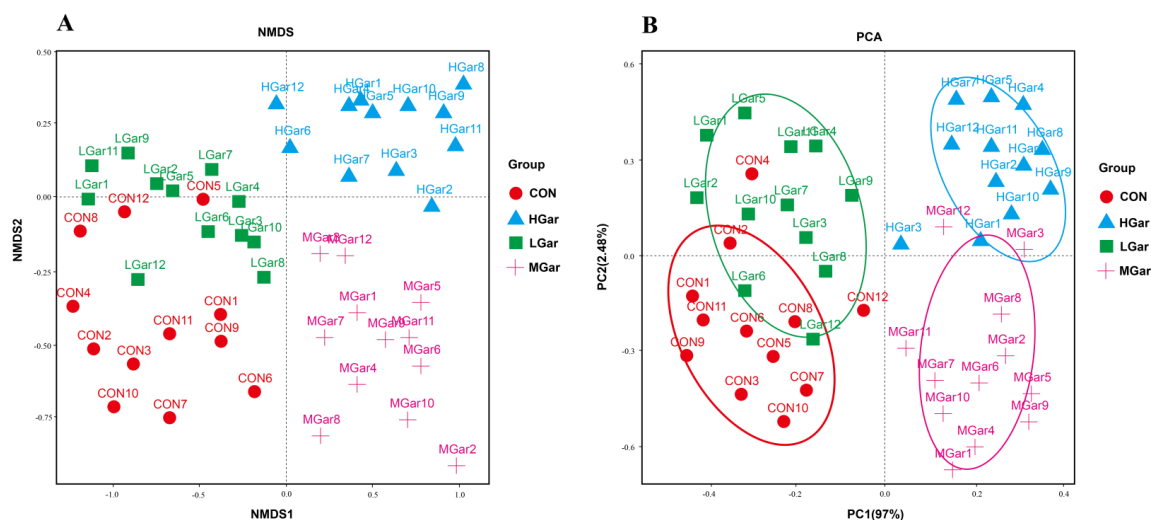


图 3-1 微生物结构分析

Fig. 3-1 Microbial structure analysis: a NMDS analysis, b PCA. n = 12

3.5.3 肠道菌群物种组成分析

3.5.3.1 山竹醇对结肠内容物微生物区系门水平的影响

如图 3-2 所示, 与 CON 组和 LGar 组相比, MGar 组和 HGar 组的变形菌门丰度减少, 厚壁菌门、放线菌门、软壁菌门和拟杆菌门丰度增加。

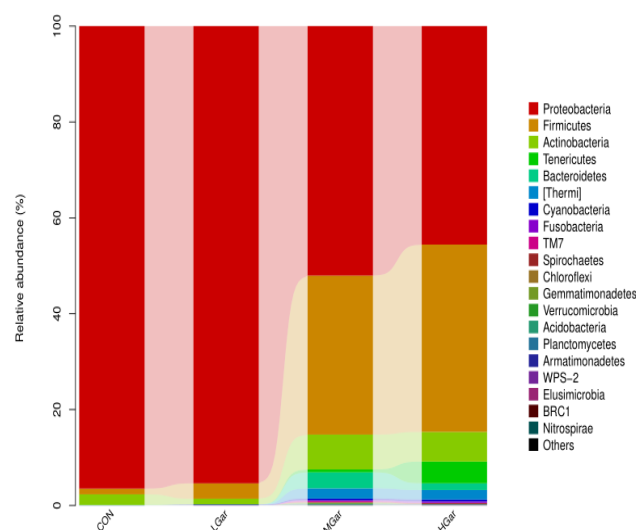


图 3-2 断奶仔猪结肠菌群物种门水平分类柱状图

Fig. 3-2 Barchart of colonic microbial composition in weaned piglets at the phylum level

3.5.3.2 山竹醇对结肠内容物微生物区系目水平的影响

如图 3-3 所示，与 CON 组和 LGar 组相比，MGar 组和 HGar 组的肠杆菌目丰度减少，乳酸杆菌目、梭菌目、假单胞菌目、放线杆菌目、伯克氏菌目、巴斯德氏菌目和支原体目的相对丰度增加。

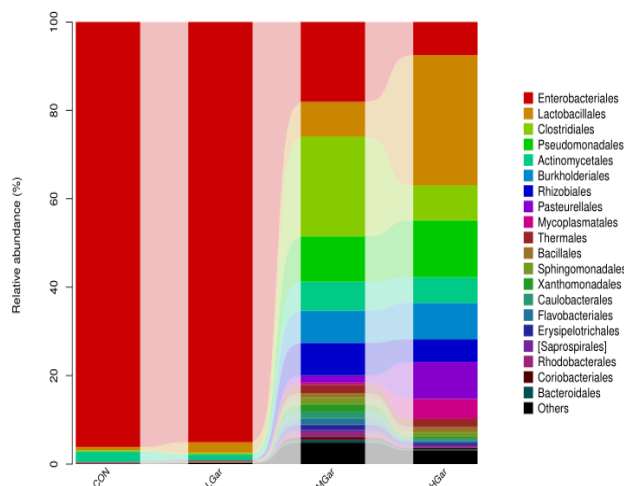


图 3-3 断奶仔猪结肠菌群物种目水平分类柱状图

Fig. 3-3 Barchart of colonic microbial composition in weaned piglets at the order level

3.5.3.3 山竹醇对结肠内容物微生物区系属水平的影响

如图 3-4、图 3-5 所示，与 CON 组和 LGar 组相比，MGar 组、HGar 组显著增加了假单胞菌属、链球菌属、贪铜菌属、乳酸杆菌属、放线杆菌属、韦荣氏球菌属这 6 个属的相对丰度 ($P<0.05$)。与 MGar 组相比，HGar 组除贪铜菌属外其它 5 个菌属的相对丰度均显著增加 ($P<0.05$)。

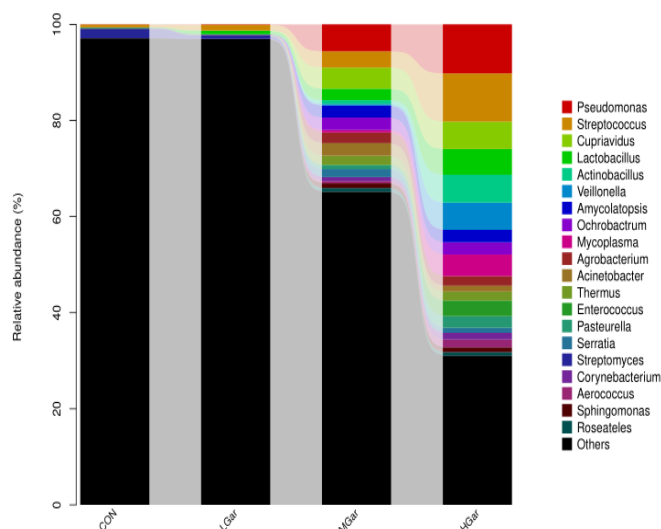


图 3-4 断奶仔猪结肠菌群物种属水平分类柱状图

Fig. 3-4 Barchart of colonic microbial composition in weaned piglets at the genus level

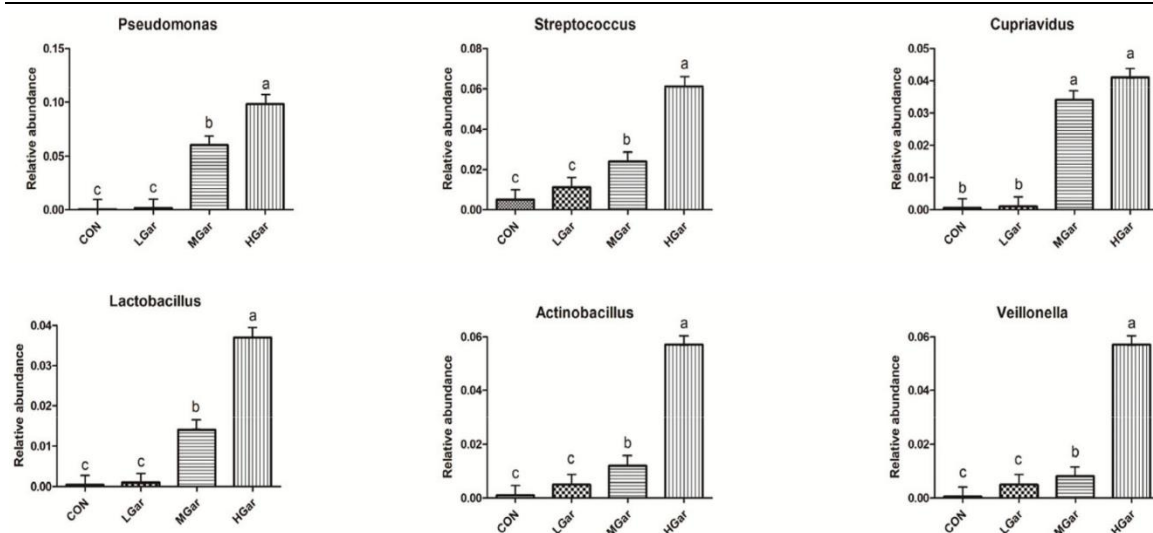


图 3-5 断奶仔猪结肠菌群物种优势菌群属丰度差异

Fig. 3-5 Differences in the abundance of dominant bacteria genera in colonic flora species in weaned piglets

3.5.4 肠道主要菌群组成

由表 3-9 可知, CON 组与 LGar 组、MGar 组与 HGar 组两两之间大肠杆菌的数量未出现明显变化 ($P>0.05$), 乳酸杆菌数量也没有明显改变 ($P>0.05$); 与 CON 组和 LGar 组相比, MGar 组和 HGar 组空肠和回肠中乳酸杆菌大量增殖 ($P<0.05$), 大肠杆菌受到抑制 ($P<0.05$)。

表 3-9 空肠、回肠食糜中总大肠杆菌、乳酸菌

 Table 3-9 Total *Escherichia coli*, *Lactobacillus* in jejunum and ileum samples

项目 Items		对照组 CON	山竹醇组 Garcinol group			标准误 SEM	P 值 P-value
			LGar	MGar	HGar		
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	空肠	8.55 ^a	8.17 ^a	7.23 ^b	7.24 ^b	0.86	0.024
	回肠	8.74 ^a	8.21 ^a	7.42 ^b	7.36 ^b	0.44	0.037
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	空肠	7.69 ^b	8.03 ^b	8.64 ^a	8.56 ^a	0.68	0.041
	回肠	7.91 ^b	8.25 ^b	8.97 ^a	8.82 ^a	0.32	0.038

4 讨论

4.1 山竹醇对断奶仔猪生长性能和腹泻率的影响

国内外对断奶引起的仔猪腹泻和发育迟缓进行了大量研究,发现营养调控是一种有效的防治措施。有研究报道,在日粮中添加植物提取物(如大蒜素、原花青素等)可以促进断奶仔猪的生长性能,改善腹泻(Hao et al 2015, 何锦晶和赵跟社 2015)。本试验选择的印度藤黄果皮提取物山竹醇与姜黄素同属于多酚类化合物,含有相似的活性基团,具有抗氧化、抗炎和抑菌等多种生物活性,长期以来在传统医学中用来治疗便秘、肠胃胀气、消化不良等肠道问题(Iinuma et al 1996, Yamaguchi et al 2000a, Nadia et al 2012)。山竹醇鲜有在断奶仔猪上的报道,但研究表明,姜黄素可以调节断奶仔猪肠道菌群,缓解肠道炎症,维护肠道健康,改善仔猪腹泻,这与本试验对山竹醇的研究结果一致(Gan et al 2019b)。表明山竹醇可有效缓解断奶引起的仔猪腹泻,这可能与肠道健康的改善有关。腹泻会严重影响断奶仔猪的生长性能,仔猪腹泻率越低意味肠道更健康,仔猪的生长性能也会相应提高。本试验结果表明,山竹醇能显著提高断奶仔猪的 ADG 和 F/G,这与贺琼玉等(2019)研究结果一致。研究表明,给雄鼠灌胃 30 mg/ml 的山竹醇 14 d 和给雌鼠饲喂 2000 mg/kg 的山竹醇 90 d,均没有观察到不良反应(Yamaguchi et al 1999, Muhammed et al 2018)。同时,本试验以山竹醇饲喂断奶仔猪均未观察到不良反应。说明山竹醇可以作为一种安全的促生长饲料添加剂在仔猪生产上应用。

4.2 山竹醇对断奶仔猪肠黏膜物理屏障的影响

肠道健康与肠黏膜通透性与完整性密切相关。断奶会造成仔猪肠道损伤,破坏肠黏膜的完整性,使肠黏膜通透性增加,导致肠道内细菌和毒素等物质可以通过细胞间隙进入血液(Hu et al 2013)。同时,小肠上皮绒毛细胞中 DAO 和肠道细菌最终代谢产物 *D*-Lac 会释放到血液中,因此可以通过检测血清中 DAO 和 *D*-Lac 水平间接反映肠道黏膜的完整性和通透性情况(Johnston et al 2001, Peace et al 2011)。本试验研究结果表明,山竹醇可以显著降低断奶仔猪血清中 DAO 和 *D*-Lac 水平,且随山竹醇剂量的增加效果越显著。肠道通透性越低,仔猪肠道越健康,腹泻率也会降低。本试验肠道通透性与腹泻率检测结果趋于一致,说明山竹醇能缓解断奶引起的仔猪肠通透性变化,这可能也是山竹醇能改善仔猪腹泻的原因之一。

研究表明,肠道营养物质利用率与绒毛高度和绒毛隐比正相关,与隐窝深度负相关 (Clevers and Hans 2013)。有研究报道,山竹醇可显著改善 DSS 诱导的隐窝异常病灶的形成和肠黏膜损伤的形态学特征 (Tsai et al 2014)。本试验结果表明,山竹醇能显著改善仔猪肠黏膜形态,这与料重比结果相似。说明山竹醇可以减轻断奶应激对肠道的损伤,促进肠道上皮组织的自我修复,增强小肠的消化吸收能力,从而提高断奶仔猪生产性能。

4.3 山竹醇对断奶仔猪肠道微生物区系的影响

仔猪一出生,胃肠道就被复杂多样的微生物定值 (Zhang et al 2016),这种微生物群及其代谢产物构成了抵抗病原体的屏障 (Lee and Hase 2014),并有助于免疫系统的发育 (Ouweland et al 2002),促进营养物质的吸收 (Kau AL 2011),而断奶会严重影响仔猪肠道微生物区系的平衡 (Frese et al 2015)。随着植物提取物的研究发展,人们发现植物提取物能调节肠道微生态平衡,维护肠道健康。本研究主要对断奶仔猪结肠微生物进行了分析,同时对空肠和回肠大肠杆菌和乳酸杆菌进行了定量分析。本试验对结肠微生物通过 *Alpha* 多样性分析,发现在日粮中添加山竹醇可增加断奶仔猪结肠微生物的丰富度和多样性。说明山竹醇能够提高断奶仔猪肠道菌群间的互作效应,增强机体抗应激能力,维持肠道微生态稳态。前期研究中山竹醇能有效改善腹泻情况也说明山竹醇对断奶仔猪肠道微生物具有调控作用。另外,本试验通过 *Beta* 多样性分析中的 PCA 和 NMDS,分析山竹醇对各组断奶仔猪个体之间结肠微生物整体结构差异的影响,结果也表明,山竹醇可以影响断奶仔猪结肠微生物的多样性。为了进一步研究山竹醇对断奶仔猪结肠微生物的具体影响,本试验对肠道样品从门、目、属三个水平进行了分析。从门水平肠道微生物物种丰度聚类图可知,变形菌门是优势菌种。大肠杆菌、沙门氏菌等多种病原菌属于变形菌门,本试验中随着山竹醇剂量的升高变形菌门丰度下降,说明有害菌的数量也相应减少。从目水平看,肠杆菌目和乳酸杆菌目物种丰度排名靠前,且随着山竹醇剂量的升高肠杆菌目的丰度显著下降,乳酸杆菌目的丰度显著上升。在属水平,本研究试验结果表明,断奶仔猪日粮中添加山竹醇能提高结肠中假单胞菌属、乳酸杆菌属等的相对丰度。目前使用的益生菌大多属于乳酸杆菌 (如鼠李糖乳杆菌),这些乳酸杆菌会使体重增加,调节免疫系统,预防腹泻,改善猪健康。而大肠杆菌大量增殖时,会引起仔猪的腹泻 (Hou et al 2015)。对空肠和回肠检测发现,山竹醇能促进乳酸

杆菌的增殖，抑制大肠杆菌的生长，这与结肠菌群变化趋势相符，而这可能是仔猪生长性能和腹泻率得到改善的原因。综上所述，山竹醇可以丰富断奶仔猪肠道微生物的数量和种类，提高肠道菌群间的互作效应和缓冲能力，促进乳酸杆菌的增殖，抑制大肠杆菌的生长，从而维护肠道健康，促进仔猪的健康生长。

5 小结

在日粮中添加山竹醇能改善断奶仔猪的生长性能和腹泻率；降低断奶仔猪血清中 DAO 和 *D*-Lac 的含量，降低隐窝深度，提高绒毛高度和绒隐比，改善肠道屏障功能；丰富断奶仔猪肠道微生物的数量和种类，提高有益菌数量，降低有害菌数量，促进肠道健康。

第四章 结语

1 研究结论

(1) 以乙醇为溶剂，超声波辅助提取印度藤黄果皮中山竹醇的最优工艺为 $C_{乙醇}=70\%$ 、 $T_{温度}=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $t_{时间}=30\text{ min}$ 、 $R_{料液比}=1:25$ ，在此工艺下山竹醇的提取率为 3.02%，比传统工艺提高了 47.32%。

(2) 本试验以不同剂量的山竹醇饲喂断奶仔猪 14 d，通过检测相关指标，得到如下结论：山竹醇可以通过降低断奶仔猪的肠道通透性，改善肠道形态，丰富肠道微生物的数量和种类，提高乳酸杆菌的数量，降低大肠杆菌的数量，从而降低腹泻率，提高生长性能。

2 创新点

(1) 本研究将超声波辅助提取引入到山竹醇的提取中，优化了山竹醇的提取，为其工业化生产提供了理论基础。

(2) 本研究探究了山竹醇对断奶仔猪肠道健康的影响，为了解山竹醇的生物学效应及其作为功能性添加剂提供科学的依据。

3 不足

(1) 本试验只对印度藤黄果皮进行了粗提，所得产品中山竹醇含量仅为 32.84%，产品纯度有待进一步提升。

(2) 一般来说，仔猪肠道微生物区系的稳定需要 4-6 周，本试验天数只有 14 天，加上只有 4 个试验组，可能不足以评价断奶仔猪生长状况和肠道菌群的变化。此外，山竹醇引起肠道微生物群改变的机制是表面的，需进一步的研究。

参考文献

1. 郭辰旭. 新型连续流动超声辅助提取技术用于姜黄素的提取. [硕士学位论文]. 大连: 大连医科大学, 2018
2. 何锦晶, 赵跟社. 大蒜素在断奶仔猪生产中的应用. 山西科技, 2015, 30: 101-103
3. 贺琼玉, 邵亚飞, 姚卫磊, 王同心, 夏军, 黄飞若. 饲料添加山竹醇对氧化应激仔猪生长性能、抗氧化功能及肝脏脂质合成的影响. 动物营养学报, 2019, 31: 5834-5845
4. 胡瑶莲, 张恒志, 陈代文, 何军, 郑萍, 毛湘冰, 虞洁, 黄志清, 罗钧秋, 罗玉衡, 余冰. 白藜芦醇对生长育肥猪抗氧化能力、空肠黏膜免疫及结肠菌群的影响. 动物营养学报, 2019, 31: 459-468
5. 季丰, 李占林, 牛生吏, 华会明. 大叶藤黄茎皮化学成分研究. 中国药物化学杂志, 2012, 22: 507-510
6. 刘树兴, 胡小军, 张薇, 罗雪婷. 超声强化提取姜黄色素的研究. 食品科技, 2004: 53-55
7. 瞿秋红. 白藜芦醇对猪肠道微生物区系、炎症相关基因和紧密连接蛋白表达的影响研究. [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2020
8. 汪永玲, 张宝军, 付文卫. 高速逆流色谱在快速筛选中药天然产物活性成分中的应用. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19: 265-275
9. 谢蓝华, 肖南, 张嘉怡, 江东文, 杜冰, 杨公明. 复合酶解辅助乙醇提取茶多酚工艺研究. 茶叶科学, 2013, 33: 27-33
10. 杨宾, 黄群兰. 仔猪腹泻的病因及综合防治技术. 山东畜牧兽医, 2015, 36: 23-25
11. 张露滢, 赵健, 兰欢, 曾榛, 宋家乐. 植物多酚类化合物与肠道通透性相关研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28: 1421-1424
12. 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第五十卷. 北京: 科学出版社, 1990. 91-96
13. Abraham Z, Malik SK, Rao GE, Narayanan SL, Biju S. Collection and characterisation of malabar tamarind [*Garcinia cambogia* (Gaertn.) Desr.]. *Genet Resour Crop Ev*, 2006, 53: 401-406

14. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002, 18: 75-81
15. Alexa P, Štouračová K, Hamík J, Rychlík I. Gene typing of the colonisation factors K88 (F4) in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets. *Vet med*, 2001, 46: 46-49
16. Bakana P, Claeys M, Totté J, Pieters L, Hoof LV, Vemba T, Van Den Berghe D, Vlietinck AJ. Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia huillensis*. *J Ethnopharmacol*, 1987, 21: 75-84
17. Baliga MS, Bhat HP, Pai RJ, Bloor R, Palatty PL. The chemistry and medicinal uses of the underutilized Indian fruit tree *Garcinia indica* Choisy (kokum): A review. *Food Res Int*, 2011, 44: 1790-1799
18. Bartnick DD, Mohler CM, Houlihan M. Methods for the production of food grade extracts. USA patent , US20060088627. 2006-04-27
19. Brusotti G, Ngueyem TA, Biesuz R, Caccialanza G. Optimum extraction process of polyphenols from *Bridelia grandis* stem bark using experimental design. *J Sep Sci*, 2010, 33: 1692-1697
20. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol*, 2013, 4: 19
21. Cao ST, Shen ZJ, Wang CC, Zhang QH, Hong QH, He YH, Hu CH. Resveratrol improves intestinal barrier function, alleviates mitochondrial dysfunction and induces mitophagy in diquat challenged piglets. *Food Funct*, 2019, 10: 344-354
22. Chanmahasathien W, Li Y, Satake M, Oshima Y, Ishibashi M, Ruangrunsi N, Ohizumi Y. Prenylated xanthenes from *Garcinia xanthochymus*. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51: 1332-1334
23. Chatterjee A, Yasmin T, Bagchi D, Stohs SJ. The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protykin® compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Mol Cell Biochem*, 2003, 243: 29-35

24. Cheng J, Xu L, Xiang R, Liu X, Zhu M. Effects of mulberry polyphenols on oxidation stability of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in dried minced pork slices during processing and storage. *Meat Sci*, 2020, 160: 107973
25. Choy YY, Quifer-Rada P, Holstege DM, Frese SA, Calvert CC, Mills DA, Lamuela-Raventos RM, Waterhouse AL. Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins. *Food Funct*, 2014, 5: 2298-2308
26. Ciochina R, Grossman RB. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chem Rev*, 2006, 106: 3963-3986
27. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 2013, 154: 274-284
28. Crozier A, Yokota T, Jaganath IB, Marks S, Saltmarsh M, Clifford MN. Secondary metabolites as dietary components in plant-based foods and beverages. UK: Blackwell Publishing, 2006: 208-302
29. Da Porto C, Natolino A. Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chem*, 2018, 258: 137-143
30. Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chem*, 2015, 166: 585-595
31. De Jong RCM, Ewing MM, De Vries MR, Karper JC, Bastiaansen AJNM, Peters HAB, Baghana F, Van Den Elsen PJ, Gongora C, Jukema JW, Quax PHA. The epigenetic factor PCAF regulates vascular inflammation and is essential for intimal hyperplasia development. *PLoS One*, 2017, 12: e0185820
32. Deng Q, Xu J, Yu B, He J, Zhang K, Ding X, Chen D. Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress. *Arch Anim Nutr*, 2010, 64: 12-21
33. Desaldeleer C, Ferret-Bernard S, Quelen FD, Normand LL, Perrier C, Savary G, Rom  V, Michel C, Mourot J, Hu  rou-Luron I, Boudry G. Maternal 18: 3n-3 favors

- piglet intestinal passage of LPS and promotes intestinal anti-inflammatory response to this bacterial ligand. *J Nutr Biochem*, 2014, 25: 1090-1098
34. De Simón BF, Hernández T, Estrella I, Gómez-Cordovés C. Variation in phenol content in grapes during ripening: Low-molecular-weight phenols. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1992, 194: 351-354
35. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, 2000, 267: 4912-4916
36. Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton: CRC press. 1985, 5: 300-304
37. Durazzo A, Zaccaria M, Polito A, Maiani G, Carcea M. Lignan content in cereals, buckwheat and derived foods. *Foods*, 2013, 2: 53-63
38. Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol*, 2014, 4: 177
39. Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Brnčić M, Dragović-Uzelac V. UPLC-MS profiling of blackthorn flower polyphenols isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J Food Sci*, 2018, 83: 2782-2789
40. Fang CL, Sun H, Wu J, Niu HH, Feng J. Effects of sodium butyrate on growth performance, haematological and immunological characteristics of weanling piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2014, 98: 680-685
41. Fiesel A, Gessner DK, Most E, Eder K. Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Vet Res*, 2014, 10: 196
42. Fouotsa H, Dzoyem JP, Lannang AM, Stammeler HG, Mbazoa CD, Luhmer M, Nkengfack AE, Allémann É, Delie F, Meyer F, Sewald N. Antiproliferative activity of a new xanthone derivative from leaves of *Garcinia nobilis* Engl. *Nat Prod Res*, 2020, 13: 1-8
43. Frese SA, Parker K, Calvert CC, Mills DA. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 2015, 3: 28

44. Fu Q, Cui Q, Yang Y, Zhao X, Song X, Wang G, Bai L, Chen S, Tian Y, Zou Y, Li L, Yue G, Jia R, Yin Z. Effect of Resveratrol Dry Suspension on Immune Function of Piglets. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5952707
45. Fukudome I, Kobayashi M, Dabanaka K, Maeda H, Okamoto K, Okabayashi T, Baba R, Kumagai N, Oba K, Fujita M, Hanazaki K. Diamine oxidase as a marker of intestinal mucosal injury and the effect of soluble dietary fiber on gastrointestinal tract toxicity after intravenous 5-fluorouracil treatment in rats. *Med Mol Morphol*, 2014, 47: 100-107
46. Gallo M, Ferracane R, Graziani G, Ritieni A, Fogliano V. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, 2010, 15: 6365-6374
47. Gan Z, Wei W, Li Y, Wu J, Zhao Y, Zhang L, Wang T, Zhong X. Curcumin and resveratrol regulate intestinal bacteria and alleviate intestinal inflammation in weaned piglets. *Molecules*, 2019, 24: 1220
48. Gan Z, Wei W, Wu J, Zhao Y, Zhang L, Wang T, Zhong X. Resveratrol and Curcumin improve intestinal mucosal integrity and decrease m6A RNA methylation in the intestine of weaning piglets. *ACS Omega*, 2019, 4: 17438-17446
49. Gao Y, Han F, Huang X, Rong Y, Yi H, Wang Y. Changes in gut microbial populations, intestinal morphology, expression of tight junction proteins, and cytokine production between two pig breeds after challenge with *Escherichia coli* K88: a comparative study. *J Anim Sci*, 2013, 91: 5614-5625
50. Gessner DK, Fiesel A, Most E, Dinges J, Wen G, Ringseis R, Eder K. Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. *Acta Vet Scand*, 2013, 55: 18
51. Ghitescu RE, Volf I, Carausu C, Bühlmann AM, Gilca IA, Popa VI. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrason Sonochem*, 2015, 22: 535-541

52. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends Microbiol*, 2017, 25: 851-873
53. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124: 3-20
54. Hadidi M, Ibarz A, Pagan J. Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. *Food Chem*, 2020, 309: 125786
55. Han QB, Qiao CF, Song JZ, Yang NY, Cao XW, Peng Y, Yang DJ, Chen SL, Xu HX. Cytotoxic prenylated phenolic compounds from the twig bark of *Garcinia xanthochymus*. *Chem Biodivers*, 2010, 4: 940-946
56. Han Y, Tang C, Li Y, Yu Y, Zhan T, Zhao Q, Zhang J. Effects of dietary supplementation with *clostridium butyricum* on growth performance, serum immunity, intestinal morphology, and microbiota as an antibiotic alternative in weaned piglets. *Animals*, 2020, 10: 2287
57. Hao R, Li Q, Zhao J, Li H, Wang W, Gao J. Effects of grape seed procyanidins on growth performance, immune function and antioxidant capacity in weaned piglets. *Livest Sci*, 2015, 178: 237-242
58. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, Gebhardt S. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 9966-9977
59. Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*, 2007, 105: 1126-1134
60. Hemshekhar M, Sunitha K, Santhosh MS, Devaraja S, Kemparaju K, Vishwanath BS, Niranjana SR, Girish KS. An overview on genus *garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 325-351
61. Hong J, Kwon SJ, Sang S, Ju J, Zhou JN, Ho CT, Huang MT, Yang CS. Effects of garcinol and its derivatives on intestinal cell growth: Inhibitory effects and

- autooxidation-dependent growth-stimulatory effects. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 1211-1221
62. Hong J, Sang S, Park HJ, Kwon SJ, Suh N, Huang MT, Ho CT, Yang CS. Modulation of arachidonic acid metabolism and nitric oxide synthesis by garcinol and its derivatives. *Carcinogenesis*, 2006, 27: 278-286
63. Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Qiao S. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J Anim Sci Biotechnol*. 2015, 6: 14
64. Hu CH, Xiao K, Luan ZS, Song J. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J Anim Sci*. 2013, 91: 1094-1101
65. Ide T, Kushiro M, Takahashi Y, Shinohara K, Fukuda N, Sirato-Yasumoto S. Sesamin, a sesame lignan, as a potent serum lipid-lowering food component. *Jpn Agric Res Q*, 2003, 37, 151–158
66. Iinuma M, Ito T, Miyake R, Tosa H, Tanaka T, Chelladurai V. A xanthone from *Garcinia cambogia*. *Phytochemistry*, 1998, 47: 1169-1170
67. Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Kanamaru S, Asai F, Kobayashi Y, Miyauchi K, Shimano R. Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 311-314
68. Jagtap P, Bhise K, Prakya V. A phytopharmacological review on *Garcinia indica*. *J Herb Med*, 2015, 3: 2-7
69. Jang S, Sun J, Chen P, Lakshman S, Molokin A, Harnly JM, Vinyard BT, Urban JF, Davis CD, Solano-Aguilar G. Flavanol-Enriched Cocoa powder alters the intestinal microbiota, tissue and fluid metabolite profiles, and intestinal gene expression in pigs. *J Nutr*, 2016, 146: 673-680
70. Jing Y, Ai Q, Lin L, Dai J, Jia M, Zhou D, Che Q, Wan J, Jiang R, Zhang L. Protective effects of garcinol in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced apoptotic liver injury. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19: 373-380

71. Johnston SD, Smye M, Watson RP. Intestinal permeability tests in coeliac disease. *Clin Lab*, 2001, 47: 143-150
72. Kang Y, Sun Y, Li T, Ren Z. Garcinol protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Mol Cell Probes*, 2020, 54: 101672
73. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 2011, 474: 327-336
74. Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem*, 2010, 119: 851-858
75. Kong F, Yu S, Bi Y, Huang X, Huang M. Optimization of process parameters and kinetic model of enzymatic extraction of polyphenols from *Lonicerae flos*. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12: 70-74
76. Kong XF, Wu GY, Liao YP, Hou ZP, Liu HJ, Yin FG, Li TJ, Huang RL, Zhang YM, Deng D. Dietary supplementation with Chinese herbal ultra - fine powder enhances cellular and humoral immunity in early - weaned piglets. *Livest Sci*, 2007, 108: 94-98
77. Krishnamurthy N, Lewis YS, Ravindranath B. Chemical constituents of kokum fruit rind. *J Food Sci Tech*, 1982, 19: 97-100
78. Laine TM, Lyytikäinen T, Yliäho M, Anttila M. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet Scand*, 2008, 50: 21
79. Lallès JP. Long term effects of pre- and early postnatal nutrition and environment on the gut. *J Anim Sci*, 2012, 4: 421-429
80. Lee PS, Teng CY, Kalyanam N, Ho CT, Pan MH. Garcinol reduces obesity in High-Fat-Diet-Fed Mice by modulating gut microbiota composition. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63: e1800390
81. Lee WJ, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 416-424

82. Liao CH, Ho CT, Lin JK. Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329: 1306-1314
83. Liao CH, Sang S, Liang YC, Ho CT, Lin JK. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. *Mol Carcinog*, 2004, 41: 140-149
84. Luehring M, Blank R, Wolfram S. Vitamin E-sparing and vitamin E-independent antioxidative effects of the flavonol quercetin in growing pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 2011, 169: 199-207
85. Majeed M, Bani S, Bhat B, Pandey A, Mundkur L, Neupane P. Safety profile of 40% Garcinol from *Garcinia indica* in experimental rodents. *Toxicol Rep*, 2018, 5: 750-758
86. Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Lawrence L, Mundkur L. Novel combinatorial regimen of garcinol and curcuminoids for Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) in Mice. *Sci Rep*, 2020, 10: 7440
87. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79: 727-747
88. Martín-García B, Pasini F, Verardo V, Díaz-de-Cerio E, Tylewicz U, Gómez-Caravaca AM, Caboni MF. Optimization of Sonotrode Ultrasonic-Assisted Extraction of Proanthocyanidins from Brewers' Spent Grains. *Antioxidants*, 2019, 8: 282
89. Martin-Puzon J, Rivera WL. Free-radical scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. (Molluginaceae) roots, stems and leaves. *Asian Pac J Trop Dis*, 2015, 5: 711-715
90. Masullo M, Bassarello C, Suzuki H, Pizza C, Piacente S. Polyisoprenylated benzophenones and an unusual polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the fruits of *Garcinia cambogia*. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 5205-5210
91. Meng Q, Sun S, Bai Y, Luo Z, Li Z, Shi B, Shan A. Effects of dietary resveratrol supplementation in sows on antioxidative status, myofiber characteristic and meat quality of offspring. *Meat Sci*, 2020, 167: 108176

92. Meng Q, Sun S, Luo Z, Shi B, Shan A, Cheng B. Maternal dietary resveratrol alleviates weaning-associated diarrhea and intestinal inflammation in pig offspring by changing intestinal gene expression and microbiota. *Food Funct*, 2019, 10: 5626-5643
93. Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, Khodir M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. *Food Chem*, 2015, 187: 507-516
94. Negi PS, Jayaprakasha GK. Control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria by Garcinol and Garcinia indica extracts and their antioxidant activity. *J Food Sci Educ*, 2004, 69: 61-65
95. Okuda T, Ito H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants—hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 2011, 16: 2191-2217
96. Oliver WT, Mathews SA, Phillips O, Jones EE, Odle J, Harrell RJ. Efficacy of partially hydrolyzed corn syrup solids as a replacement for lactose in manufactured liquid diets for neonatal pigs. *J Anim Sci*, 2002, 80: 143-153
97. Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr*, 2002, 41: 132-137
98. Padhye S, Ahmad A, Oswal N, Sarkar FH. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from Garcinia indica Choisy and its synthetic analogs. *J Hematol Oncol*, 2009, 2: 38
99. Pan MH, Chang WL, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1464-1474
100. Panda V, Ashar H, Srinath S. Antioxidant and hepatoprotective effect of Garcinia indica fruit rind in ethanol-induced hepatic damage in rodents. *Interdiscip Toxicol*. 2012, 5: 207-213

101. Pandey MM, Rastogi S, Rawat AK. Indian traditional ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 376327
102. Pantano C, Reynaert NL, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*. 2006, 8: 1791-1806
103. Parle M, Dhamija I. Golden benefits of drinking kokam-cola. *Int. Res. J. Pharm*, 2013, 4: 5-9
104. Peace RM, Campbell J, Polo J, Crenshaw J, Russell L, Moeser A. Spray-dried porcine plasma influences intestinal barrier function, inflammation, and diarrhea in weaned pigs. *J Nutr*, 2011, 141: 1312-1317
105. Pérez-Serradilla JA, De Castro MDL. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chem*, 2011, 124: 1652-1659
106. Pinelo M, Fabbro PD, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem*, 2005, 92: 109-117
107. Qin LS, Ji W, Wang JL, Li B, Hu JP, Wu X. Effects of dietary supplementation with yeast glycoprotein on growth performance, intestinal mucosal morphology, immune response and colonic microbiota in weaned piglets. *Food Funct*, 2019, 10: 2359-2371
108. Randhir R, Lin YT, Shetty K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004, 13: 295-307
109. Robbins, RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 2866–2887.
110. Roleira FM, Tavares-da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem*, 2015, 183: 235-258

111. Rukachaisirikul V, Naklue W, Sukpondma Y, Phongpaichit S. An antibacterial biphenyl derivative from *Garcinia bancana* MIQ. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 342-343
112. Saadat N, Gupta SV. Potential role of garcinol as an anticancer agent. *J Oncol*. 2012, 2012: 647206
113. Sahu A, Das B, Chatterjee A. Polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia pedunculata*. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1233-1235
114. Sang S, Liao CH., and, Pan MH, Rosen RT. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, 2002, 58: 10095-10102
115. Sang S, Pan MH, Cheng X, Bai N, Stark RE, Rosen RT, Lin-Shiau SY, Lin JK, Ho C. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol and their antitumor activities. *Tetrahedron*, 2001, 57: 9931-9938
116. Sehm J, Lindermayer H, Dummer C, Treutter D, Pfaffl MW. The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2007, 91: 289-296
117. Semwal RB, Semwal DK, Vermaak I, Viljoen A. A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia*, 2015, 102: 134-148
118. Shah MA, Bosco SJ, Mir SA. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Sci*, 2014, 98: 21-33
119. Shaikh R, Pund M, Dawane A, Iliyas S. Evaluation of anticancer, antioxidant, and possible anti-inflammatory properties of selected medicinal plants used in indian traditional medication. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4: 253-257
120. Smith F, Clark JE, Overman BL, Tozel CC, Huang JH, Rivier JE, Blikslager AT, Moeser AJ. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298: G352-363
121. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem*, 2007, 101: 449-457

122. Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY. 16S ribosomal RNA-based methods to monitor changes in the hindgut bacterial community of piglets after oral administration of *Lactobacillus sobrius* S1. *Anaerobe*, 2008, 14: 78-86
123. Subhashini N, Nagarajan G, Kaviman S. In vitro antioxidant and anticholinesterase activities of *Garcinia combogia*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2011, 3: 129-132
124. Tanaka T, Kohno H, Shimada R, Kagami S, Yamaguchi F, Kataoka S, Ariga T, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 1183-1189
125. Tang ZR, Yin YL, Nyachoti CM, Huang RL, Li TJ, Yang C, Yang XJ, Gong J, Peng J, Qi DS, Xing JJ, Sun ZH, Fan MZ. Effect of dietary supplementation of chitosan and galacto-mannan-oligosaccharide on serum parameters and the insulin-like growth factor-I mRNA expression in early-weaned piglets. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 28: 430-441
126. Thilakarathna SH, Rupasinghe HP. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 2013, 5: 3367-3387
127. Tsai ML, Chiou YS, Chiou LY, Ho CT, Pan MH. Garcinol suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in mice. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58: 1820-1829
128. Umego EC, He R, Ren W, Xu H, Ma H. Ultrasonic-Assisted Enzymolysis: principle and applications. *Process Biochem*, 2021, 100: 59-68
129. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733
130. Vinayagam R, Jayachandran M, Xu B. Antidiabetic effects of simple phenolic acids: a comprehensive review. *Phytother Res*, 2016, 30: 184-199
131. Wang YW, Zhang X, Chen CL, Liu QZ, Xu JW, Qian QQ, Li WY, Qian YN. Protective effects of Garcinol against neuropathic pain-Evidence from in vivo and in vitro studies. *Neurosci Lett*, 2017, 647: 85-90

132. Wu M, Xiao H, Ren W, Yin J, Tan B, Liu G, Li L, Nyachoti CM, Xiong X, Wu G. Therapeutic effects of glutamic acid in piglets challenged with deoxynivalenol. *PLoS One*, 2014, 9: e100591
133. Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci*. 2010, 11: 622-646
134. Xu X, Chen X, Chen D, Yu B, Yin J, Huang Z. Effects of dietary apple polyphenol supplementation on carcass traits, meat quality, muscle amino acid and fatty acid composition in finishing pigs. *Food Funct*, 2019, 10: 7426-7434
135. Xu X, Hua H, Wang L, He P, Zhang L, Qin Q, Yu C, Wang X, Zhang G, Liu Y. Holly polyphenols alleviate intestinal inflammation and alter microbiota composition in lipopolysaccharide-challenged pigs. *Br J Nutr*, 2020, 123: 881-891
136. Xun W, Shi L, Zhou H, Hou G, Cao T, Zhao C. Effects of curcumin on growth performance, jejunal mucosal membrane integrity, morphology and immune status in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int Immunopharmacol*. 2015, 27: 46-52
137. Yamaguchi F , Saito M , Ishikawa H , Kataoka S, Ariga T. Containing polyisoprenylated benzophenone derivatives as effective ingredients and having a variety of functions for maintaining health such as anti-ulcer activity, the maillard reaction inhibiting activity, anti-oxidation activity, oxygen. USA patent, US5972357A. 1999-10-23
138. Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 180-185
139. Yamaguchi F, Saito M, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2320-2325
140. Yan S, Shao H, Zhou Z, Wang Q, Zhao L, Yang X. Non-extractable polyphenols of green tea and their antioxidant, anti- α -glucosidase capacity, and release during in vitro digestion. *J Funct Foods*, 2018, 42: 129-136

141. Yang L, Jiang JG, Li WF, Chen J, Wang DY, Zhu L. Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *J Sep Sci*, 2009, 32: 1437-1444
142. Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J Food Compos Anal*, 2006, 19: 41-48
143. Yin FG, Liu YL, Yin YL, Kong XF, Huang RL, Li TJ, Wu GY, Hou Y. Dietary supplementation with *Astragalus* polysaccharide enhances ileal digestibilities and serum concentrations of amino acids in early weaned piglets. *Amino Acids*, 2009, 37: 263-270
144. Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, Hara A, Sugie S, Shibata T, Mori H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, 2005, 221: 29-39
145. Zhang C, Luo J, Yu B, Zheng P, Huang Z, Mao X, He J, Yu J, Chen J, Chen D. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat Sci*, 2015, 102: 15-21
146. Zhang D, Ji H, Liu H, Wang S, Wang J, Wang Y. Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 10081-10093
147. Zheng HZ, Hwang IW, Chung SK. Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10: 912-919
148. Zhou Y, Ruan Z, Li XL, Mi SM, Jiang M, Liu WH, Yang HS, Wu X, Jiang GL, Yin YL. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf polyphenol supplementation improves meat quality and regulates myofiber type in finishing pigs. *J Anim Sci*, 2016, 94: 164-168
149. Zhu Z, Jiang T, He J, Barba FJ, Cravotto G, Koubaa M. Ultrasound-Assisted Extraction, centrifugation and ultrafiltration: multistage process for polyphenol recovery from purple sweet potatoes. *Molecules*, 2016, 21: 1584

致 谢

光阴似箭、日月如梭，两年研究生时光转瞬即逝。从学校到社会，又从社会到学校，我有幸成为狮子山下的一名动科学子，遇到了才思敏捷、知识渊博的老师，团结和谐、勇于创新的实验团队，青春活力、朝气蓬勃的同学们。在华农求学路上的点点滴滴，每一步都离不开师友的鞭策与帮助。值此论文完成之际，对所有关心、爱护、帮助我的人们表示最诚挚的感谢与最美好的祝愿！

本研究课题是在黄飞若教授的悉心指导下完成的。黄老师在我的论文选题、试验设计、试验开展、论文撰写及修改过程中给予了精心的指导和帮助，使我得以顺利完成课题的研究。黄老师见证我的进步和成长，也包容了我的个性和不足，值此毕业之际，我要向黄老师致以最衷心的感谢！

感谢动科楼 A302 实验室师兄王同心、姚卫磊、秦龙山、邵亚飞、张黎、夏军，师姐贺琼玉、李娟、高景、李晗，同学张政、黄璐、徐鸿润、吴燕、张定然、邢小光，师弟郭宝印、金泰民，师妹温淑、闫艳霞等对我生活上和学习上的帮助与指导，让我留下一段难忘的人生历程！

感谢孟宇翔同学和植科院孟令会师姐、张明星师姐、周星星师姐对我试验的帮助！

感谢我的亲人、朋友在这两年的学习生活中给予的支持、鼓励和信任！

感谢在百忙之中评审本论文的各位专家和学者！

最后，再次感谢所有关心、支持和帮助我的老师、同学、朋友和家人们！祝大家工作顺利，生活幸福！

徐明明

2021 年 4 月 13 日