

酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物对小鼠生长性能、抗氧化功能和肠道健康的影响

冯焱¹, 李兆丰^{1,2}, 顾正彪^{1,2}, 班宵逢¹, 孔昊存¹, 李才明^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:为了明确酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物(ECT)在动物体内的生物效能,为其在动物饲料中的应用提供理论指导,将36只3周龄雄性BALB/c小鼠随机分为6组,分别为对照组、三丁酸甘油酯组、酶法环糊精组、麦芽糊精-三丁酸甘油酯复合物组、硅基三丁酸甘油酯组、ECT组,饲养5周后测定小鼠体重、血清生化指标、肝脏抗氧化指标、小肠绒毛高度及隐窝深度、结肠长度、结肠组织学损伤评分、结肠杯状细胞数量以及粪便中短链脂肪酸含量,探究ECT对小鼠生长性能、抗氧化功能和肠道健康的影响。结果表明:与对照组相比,ECT组日均增重增加88.37%,料重比降低45.01%,血清中三酰甘油含量降低38.88%,总抗氧化活力提高36.45%,结肠组织学损伤评分降低,结肠组织中杯状细胞数量增加23.44%,粪便中总短链脂肪酸和丁酸含量分别增加64%和196%。综上,ECT能够提高小鼠的生长性能和饲料利用率,提高肝脏抗氧化能力,还能够促进小肠发育,提高肠道中丁酸等短链脂肪酸含量,预防结肠炎症,有益于肠道健康,具备作为营养型饲料添加剂的应用潜力。

关键词:环糊精;三丁酸甘油酯;生长性能;抗氧化;肠道健康

中图分类号:TS202.3;R965.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)07-0090-09

Effects of enzymatic cyclodextrin synthesis – tributyrin inclusion complex on growth performance, antioxidant function and intestinal health of mice

FENG Yan¹, LI Zhaofeng^{1,2}, GU Zhengbiao^{1,2}, BAN Xiaofeng¹,
KONG Haocun¹, LI Caiming^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to clarify the biological effectiveness of enzymatic cyclodextrin synthesis – tributyrin inclusion complex (ECT) in animals and provide theoretical guidance for its application in animal feed, 36 3-week-old BALB/c male mice were randomly divided into 6 groups: control group, tributyrin group, enzymatic cyclodextrin group, maltodextrin – tributyrin complex group, silica – tributyrin group, and ECT group. After 5 weeks of feeding, the body weight, serum biochemical indexes, liver antioxidant indexes, villus height and crypt depth of small intestine, colon length, colonic histological injury score, colonic goblet cell number and short-chain fatty acid contents in faeces were measured to explore the effects of ECT on the growth performance, antioxidant function and intestinal health of mice. The results showed that compared with the control group, the ECT group increased the average daily weight gain by 88.37%, reduced the feed/gain by 45.01%, reduced the serum triglyceride content by 38.88%,

收稿日期:2022-05-18;修回日期:2023-04-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32072171)

作者简介:冯焱(1996),女,硕士研究生,研究方向为淀粉质资源开发与利用(E-mail)1427968212@qq.com。

通信作者:李才明,副教授(E-mail)licaiming2009@126.com。

increased the total antioxidant activity by 36.45%, reduced the colonic histological injury score, and increased the number of goblet cells in colon tissue by 23.44%. Total short-chain fatty acids and butyric acid contents in faeces increased by 64% and 196%, respectively. In conclusion,

ECT can improve the growth performance and feed utilization rate of mice, improve the antioxidant capacity of the liver, promote the development of the small intestine, increase the content of short-chain fatty acids such as butyric acid in the intestine, prevent colon inflammation, and benefit intestinal health. ECT has the application potential as a nutritional feed additive.

Key words: cyclodextrin; tributyrin; growth performance; antioxidant; intestinal health

三丁酸甘油酯(Tributyryn, TB)作为丁酸的前体物质,由丁酸和甘油酯化而成,在动物体内能被水解为甘油和 3 个丁酸分子,从而发挥其生理功效^[1]。研究表明,三丁酸甘油酯有修复小肠绒毛、抑制肠道有害菌、促进营养物质的吸收和利用、减少幼龄动物断奶应激与断奶腹泻^[2]、增加成活率等重要作用,能够显著提高仔猪^[3]和南美白对虾^[4]的生长性能,还是鱼类饲料中不可或缺的功能性成分^[5]。因此,三丁酸甘油酯在动物饲料中的高效应用具有十分重要的意义。但三丁酸甘油酯在水中溶解度低、分散性差,并且其难以到达结肠部位,生物利用率低^[6],使用性能上的不足严重影响了三丁酸甘油酯在动物饲料领域的应用。

为提升三丁酸甘油酯的流动性与分散性,浙江大学^[7]将液态三丁酸甘油酯雾化喷到制粒干燥的颗粒型白炭黑硅胶上,形成硅胶负载型三丁酸甘油酯,然后制成固态颗粒型制剂;曹胜炎等^[8]将三丁酸甘油酯、脂肪酸和乳化剂等混合,再加入 10%~20% 氢氧化钙溶液制得流散性较好的固体颗粒成品。这两种方法操作简单,明显改善了三丁酸甘油酯的使用性能,但这两种体系并不能在食品、医药等领域中应用,不具备普遍适用性。为进一步提升三丁酸甘油酯在食品领域的使用性能,江南大学^[9]将酶法合成环糊精和环糊精包合三丁酸甘油酯的过程相结合,发明了酶法包合三丁酸甘油酯的新方法,制备得到了可用于食品体系的环糊精-三丁酸甘油酯包合物。Li 等^[10]对酶法包合三丁酸甘油酯的工艺进行了优化,并表征了环糊精-三丁酸甘油酯包合物的部分结构性质,发现酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物及其复原乳液稳定性较好,使用性能佳。尽管环糊精-三丁酸甘油酯包合物提升了三丁酸甘油酯在食品体系中的使用性能,但仍缺乏其在动物体内的生物效能评价,在动物饲料中的应用缺少理论指导。基于此,本研究通过动物实验探究酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物对小鼠生长性能、抗氧化功能和肠道健康的影响,明确其在动物体内的生物效能,以期酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物在动物饲料中的应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及饲料

3 周龄 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠〔使用许可证编号 SYXK(苏)2016-0045,体质量(9±1)g〕,购自维通利华实验动物技术有限公司;全营养素配方饲料,在基础饲料(蛋白质 162.77 g/kg,脂肪 125.78 g/kg,α-亚麻酸 3 000.23 mg/kg,亚油酸 19.98 g/kg,碳水化合物 610.40 g/kg,膳食纤维 73.99 g/kg,胆碱 2 034.68 mg/kg,牛磺碱 369.94 mg/kg,左旋肉碱 369.94 mg/kg)中添加相应营养素,由江苏省协同医药生物工程有限责任公司加工;实验所用垫料、饲料经过辐照杀菌处理,饮用水经高压灭菌处理,均符合 SPF 级动物使用标准。

1.1.2 实验材料与设备

β-CGT 酶,由保藏于本实验室的含有 cgt/pST 质粒的宿主菌 *Bacillus subtilis* WB600 生产;玉米淀粉,山东大宗生物开发股份有限公司;麦芽糊精,罗盖特(中国)营养食品有限公司;三丁酸甘油酯、硅基三丁酸甘油酯,广东溢多利生物科技股份有限公司;测定所用试剂盒,南京建成生物工程研究所;其他试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

RW20 型搅拌机、T18 型高速剪切机,德国 IKA 公司;SCIENTZ 150 型高压均质机、SB-5200DTN 型超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;TW8 型恒温水浴槽,德国 Julabo 有限公司;SD-1500 型喷雾干燥机,上海沃迪自动化装备股份有限公司;GC-2010AF 气相色谱仪,日本岛津公司;实验动物全面监测系统,美国哥伦布公司;Ecoph2 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;3K15 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;UV1900PC 紫外可见分光光度计,上海翱艺仪器有限公司;TCS SP8 激光共聚焦显微镜、Eclipse Ci-L 显微镜,日本尼康公司;Pannoramic Desk 全景切片扫描仪,匈牙利 3Dhistech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 三丁酸甘油酯包合物的制备

酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物(Enzymatic cyclodextrin synthesis-tributyryn inclusion

complex, ECT) 的制备: 参照文献[10]的方法。使用去离子水将玉米淀粉配制成质量分数为 20% 的溶液, 在四口烧瓶中加入 200 g 玉米淀粉溶液, 加入 2 U/g (以玉米淀粉质量计) β -CGT 酶, 在 90 °C 下液化 30 min 后, 降温至 50 °C, 再加入 2 U/g β -CGT 酶, 40 g 三丁酸甘油酯, 反应 12 h 后, 加入 4 g 吐温 80, 以 18 000 r/min 高速剪切 2 min, 于 35 ~ 40 MPa 均质 3 次, 最后在进风温度 180 °C、出风温度 90 °C、进料温度 50 °C、进料流速 600 mL/h 条件下喷雾干燥获得 ECT。

麦芽糊精-三丁酸甘油酯复合物(Maltodextrin-tributyryl complex, MT) 的制备: 在四口烧瓶中加入 200 g 质量分数为 20% 的麦芽糊精溶液, 然后依次加入 40 g 三丁酸甘油酯和 4 g 吐温 80, 搅拌均匀。以 18 000 r/min 高速剪切 2 min, 于 35 ~ 40 MPa 均质 3 次, 最后在进风温度 180 °C、出风温度 90 °C、进料温度 50 °C、进料流速 600 mL/h 条件下喷雾干燥获得 MT。

1.2.2 酶法环糊精(Enzymatic cyclodextrin, EC) 的制备

称取一定量的 ECT 样品, 按照料溶比 1:10 加入无水乙醇, 超声 60 min 后, 于 3 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 再加入等量无水乙醇, 振荡 2 min, 离心, 弃去上清, 沉淀置于 50 °C 烘箱中烘干 10 min, 得到 EC。

1.2.3 动物实验设计

将 36 只 3 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 6 组, 分别为对照组、TB 组、EC 组、MT 组、硅基三丁酸甘油酯(Silica-tributyryl complex, ST) 组、ECT 组。其中: 对照组饲喂基础饲料, 其他实验组饲喂全营养素配方饲料, 使得含三丁酸甘油酯组别的饲料中三丁酸甘油酯有效含量为 2 000 mg/kg, 即 TB 组添加 2 000.00 mg/kg 三丁酸甘油酯, MT 组添加 5 714.29 mg/kg 麦芽糊精-三丁酸甘油酯复合物, ST 组添加 4 444.44 mg/kg 硅基三丁酸甘油酯, ECT 组添加 4 761.90 mg/kg 环糊精-三丁酸甘油酯包合物, EC 组为与 ECT 组对应的壁材组, 添加 2 761.90 mg/kg 酶法制备的环糊精。所有小鼠均置于无病原体环境, 在环境控制室温度(21 ± 1) °C, 相对湿度(55 ± 5)%, 光暗循环 12 h/12 h 条件下, 采用基础饲料适应性喂养 2 周, 期间小鼠自由饮水进食, 采用染色法随机对小鼠进行编号分组。随后给各组小鼠分别饲喂相应的饲料, 给予足量的饲料饲养 5 周, 期间小鼠自由饮食饮水。饲养结束后, 禁食 12 h, 采用 1 g/100 mL 戊巴比妥钠溶液按照 50 mg/kg (以体质量计) 腹腔注射麻醉后, 对每组小鼠进行摘眼球取血,

脱颈椎处死、解剖, 取肝脏、胃、小肠等组织, 完整地取出结肠部分, 用测量纸测量长度并记录。

1.2.4 指标测定

1.2.4.1 生长性能指标

实验开始和结束时, 分别测定实验小鼠空腹体质量; 实验期内以组为单位, 记录并统计采食量, 实验结束时计算小鼠体质量日均增重和采食饲料质量与体质量比值(料重比)。

1.2.4.2 呼吸商与能量消耗

每组取 10 周龄的小鼠 2 只, 放入实验动物全面监测系统, 适应 12 h 后, 开始监测其消耗的氧气含量以及产生的二氧化碳含量, 参照文献[11]的方法计算呼吸商和能量消耗, 并通过红外光束阻断活动监测装置, 即时监测动物的活动状态, 记录其活动次数。

1.2.4.3 血清生化指标

实验结束后对小鼠进行摘眼球取血, 将血液于 37 °C 水浴中静置待析出血清, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 于 -80 °C 保存。采用试剂盒测定血清中尿素氮(BUN)、葡萄糖(GLU)、三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)等生化指标。

1.2.4.4 肝脏指标

实验结束后取出小鼠肝脏, 称质量, 取部分肝脏, 称质量后剪碎, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下制成匀浆液, 以 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用试剂盒测定总蛋白(TP)、总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)含量等抗氧化指标。

1.2.4.5 小肠绒毛高度及隐窝深度

取部分小鼠小肠样本经 4 g/100 mL 多聚甲醛固定, 采用苏木精-伊红(H&E)染色制片^[12]。使用 Eclipse Ci-L 显微镜选取组织的目的区域进行成像, 成像完成后使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件, 统一以毫米作为标准单位, 分别测量每张切片中 5 根完整肠绒毛高度以及对应的 5 处隐窝深度。

1.2.4.6 结肠组织学损伤评分

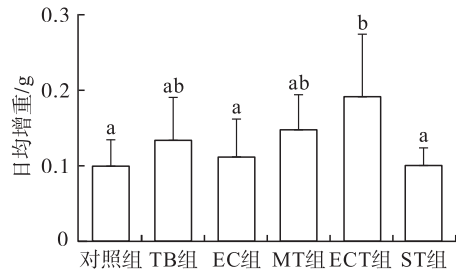
取部分小鼠结肠样本采用 H&E 染色制片^[12]。显微镜下浏览切片或使用 CaseViewer 2.2 浏览数字切片, 在不同倍数下详细观察组织结构, 仔细观察切片中典型病理改变如炎症、坏死、变性、增生以及纤维化等并记录。组织病变程度采用 5 级评分法^[13]: 无病变或极少量病变计分为 0; 有轻度病变或少量病变计分为 1; 有中度病变或中等量病变计分为 2; 有重度病变或多量病变计分为 3; 有极重度病变或大量病变计分为 4。

1.2.4.7 结肠杯状细胞数量

取部分小鼠结肠样本采用阿利新蓝-过碘酸-雪夫试剂(AB-PAS)染色制片,使用Eclipse Ci-L显微镜选取组织的目的区域进行200倍成像,成像时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。成像完成后使用Image-Pro Plus 6.0分析软件,统一以微米作为标准单位,分别计数每张切片中5处肠腺上皮的杯状细胞以及对应的绒毛上皮长度,计算出单位长度内杯状细胞数量^[14]。

1.2.4.8 粪便短链脂肪酸含量

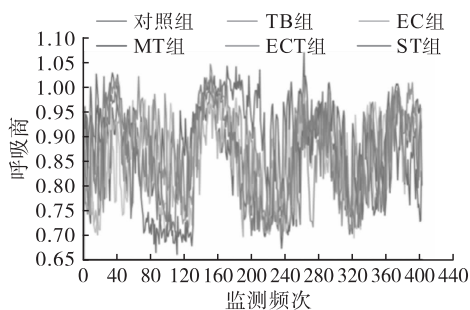
参考文献[15],采用气相色谱法测定小鼠粪便



注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

图1 小鼠日均增重及料重比

三丁酸甘油酯作为潜在的饲料营养型添加剂,通过在肠道中释放丁酸,为肠黏膜细胞的代谢靶向供能,从而调节机体肠道健康,提高动物生长性能^[17]。由图1可以看出,ECT、MT、TB组小鼠的日均增重均大于对照组,料重比显著低于对照组,表明三丁酸甘油酯的补充能够促进小鼠的生长,其中ECT组小鼠较对照组日均增重显著增加88.37% ($p < 0.05$),料重比显著降低45.01% ($p < 0.05$),效果最佳。与TB组相比,ECT组小鼠日均增重提高40.85%,料重比降低25.74%,而EC组小鼠与对照组相比日均增重无显著性差异,料重比降低8.61%,说明ECT的促生长效果优于等量三丁酸甘油酯,且这一效果不完全依赖于壁材的成分,推测由于环糊精的包合使得更多三丁酸甘油酯在肠道靶向释放,为小鼠肠道提供了更多有效丁酸,从而提高了三丁酸甘油酯的生物利用度。



中短链脂肪酸(乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸)含量。

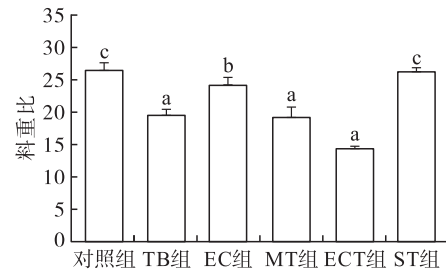
1.2.5 数据处理与分析

采用Excel 2019对数据进行处理,结果以“平均值±标准误差”表示;采用SPSS 20进行单因素方差分析(ANOVA)和Duncan检验,以确定差异的统计学意义。

2 结果与分析

2.1 三丁酸甘油酯包合物对小鼠生长性能的影响

小鼠体质量日均增重和料重比是评价其生长性能的重要指标^[16]。三丁酸甘油酯包合物对小鼠生长性能的影响如图1所示。



相比之下,ST组小鼠日均增重与料重比均与对照组无显著性差异,甚至效果略逊于TB组,表明硅基载体可能并不适合用于提升三丁酸甘油酯的生物利用度。ECT显著提高了小鼠的生长性能,且效果优于TB、MT与ST,具有作为营养型饲料添加剂的应用潜力。

2.2 三丁酸甘油酯包合物对小鼠呼吸商和能量消耗的影响

呼吸商为同一时间二氧化碳产生量和氧气消耗量的比值,其作为营养底物使用的指标,可以指示营养过剩或营养不足的代谢结果。当营养不足时,机体促进体内所存储脂肪的消耗,从而导致呼吸商降低;反之,当体内营养过剩时会导致脂肪的形成,从而使呼吸商增加,呼吸商的理论值在0.7~1.0之间^[12, 18]。图2为小鼠呼吸商和能量消耗测定结果。

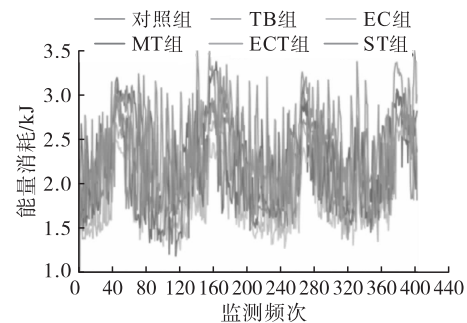


图2 小鼠呼吸商和能量消耗

由图2可以看出,各组小鼠的呼吸商基本维持在0.7~1.0的范围内,MT组的呼吸商波动较大,说明MT组的供能物质不够稳定,麦芽糊精消化较快,可迅速为机体供能,消化完毕后,脂肪成为主要供能物质,可能会导致小鼠血糖波动较大。ECT组及其他组呼吸商波动较为平稳且具有昼夜节律,营养底物消

耗情况正常,营养及健康状况良好。ECT组小鼠能量消耗相较于对照组较高,说明ECT组小鼠更为活跃,身体健康,生长状况良好。

2.3 三丁酸甘油酯包合物对小鼠血清生化指标的影响

图3为小鼠血清生化指标测定结果。

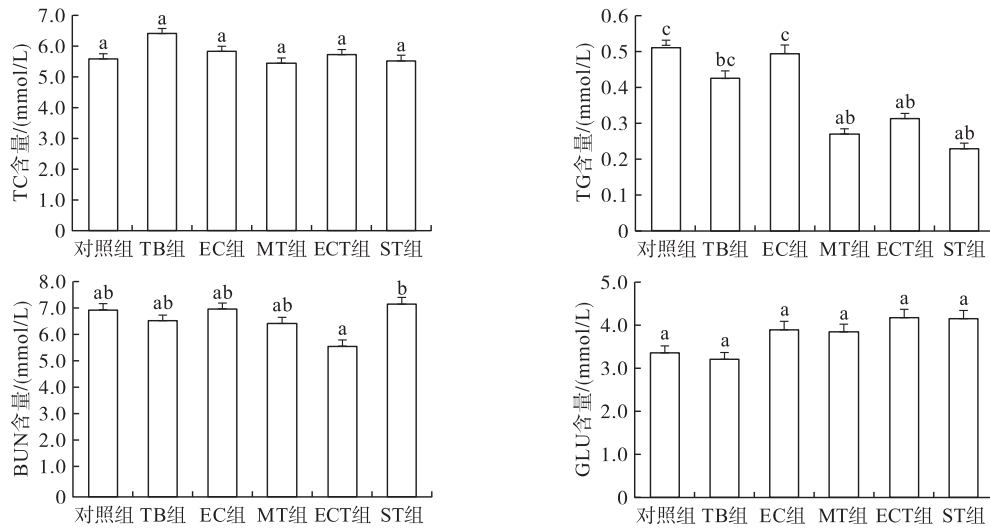


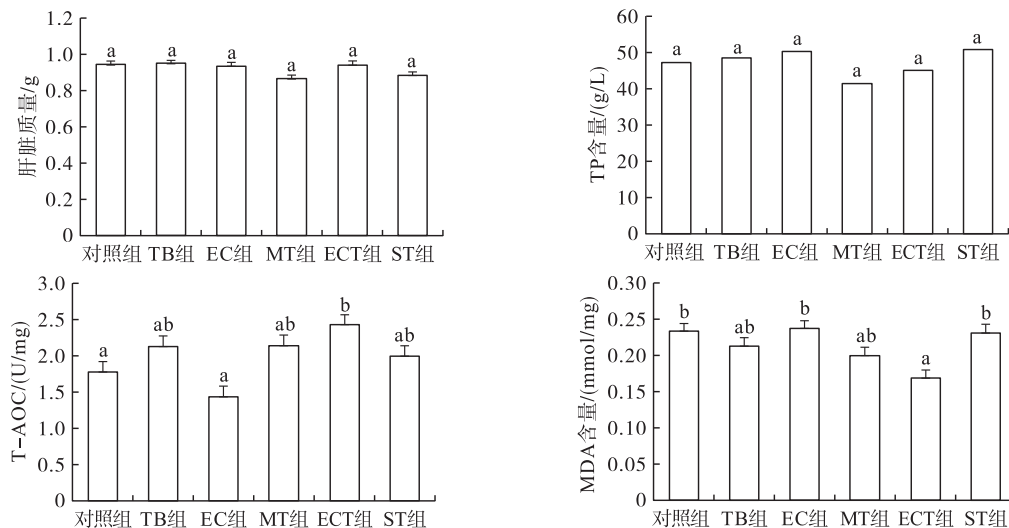
图3 小鼠血清生化指标

由图3可看出:各组小鼠血清TC与GLU含量不存在显著性差异($p > 0.05$),均处于正常范围内;MT、ECT、ST组小鼠血清TG含量显著低于对照组,且ECT组较对照组显著降低38.88% ($p < 0.05$)。BUN在反映肾衰竭方面更为敏感,是血浆中除蛋白质以外的一种含氮化合物,它从肾小球滤过而排出体外。在肾功能不全失代偿时,BUN含量将升高。本研究中ECT组小鼠血清的BUN含量显著低于ST组的($p < 0.05$),较对照组降低19.45%,提示ST组代谢产生的二氧化硅的沉积影响了小鼠的肾脏功能。ECT组的小鼠肾功能良好,机体氮沉积水平较低,代谢速率

较高^[19]。

2.4 三丁酸甘油酯包合物对小鼠肝脏指标的影响

肝脏质量反映小鼠肝脏健康状况,而肝脏中总蛋白(TP)含量反映小鼠对饲料蛋白质的吸收代谢及饲料的氨基酸平衡状况。氧化应激是指机体内活性氧族、活性氮族及抗氧化防御机制的失衡,会引起一系列损害细胞脂质、蛋白质和DNA的级联反应^[20]。总抗氧化能力(T-AOC)可以反映生物活性物质作用于生物体后体内抗氧化防御系统的状况,而丙二醛(MDA)含量是反映机体脂质过氧化程度的指标。小鼠肝脏指标测定结果见图4。



注:T-AOC和MDA含量均以肝脏中TP质量为基准计算

图4 小鼠肝脏指标

由图 4 可以看出:各组小鼠的肝脏质量及总蛋白 (TP) 含量不存在显著性差异 ($p > 0.05$), 说明各组小鼠肝脏健康状况及代谢状态差异不大; 与对照组相比, ECT 组小鼠肝脏总抗氧化能力 (T-AOC) 显著提高 36.45%, 丙二醛 (MDA) 含量显著降低 27.64% ($p < 0.05$), 说明饲料中添加 ECT 可以调控小鼠氧化应激, 提高机体抗氧化水平^[21]。

2.5 三丁酸甘油酯包合物对小鼠小肠绒毛高度及隐窝深度的影响

小肠的绒毛高度和隐窝深度是衡量肠道健康的重要指标。小肠隐窝深度代表细胞的生成率, 隐窝越浅细胞成熟度越好, 分泌功能越好^[22], 隐窝深度增加

表示分泌功能减弱。小肠绒毛为固有层和上皮共同凸向肠腔形成的叶状结构, 可将消化道中的氨基酸、葡萄糖、无机盐等营养物质吸收进血液。小肠绒毛高度增加表示小肠吸收功能提高。小肠绒毛高度/隐窝深度比值 (V/C) 越高, 表明肠道健康状况越好^[23]。研究表明, 丁酸是肠道绒毛生长主要的能量来源, 可在肠上皮细胞内直接氧化供能, 能促进干细胞增殖, 可通过增加小肠绒毛高度和降低小肠隐窝深度而扩大营养物质吸收的表面积。表 1 为各组小鼠小肠 (十二指肠、空肠、回肠) 的绒毛高度和隐窝深度测定结果。

表 1 小鼠小肠绒毛高度及隐窝深度

组别	十二指肠			空肠			回肠		
	绒毛高度/mm	隐窝深度/mm	V/C	绒毛高度/mm	隐窝深度/mm	V/C	绒毛高度/mm	隐窝深度/mm	V/C
对照组	0.430 ± 0.030 ^a	0.094 ± 0.003 ^a	4.615 ± 0.342 ^a	0.356 ± 0.012 ^a	0.083 ± 0.003 ^a	4.292 ± 0.191 ^{ab}	0.186 ± 0.016 ^a	0.075 ± 0.013 ^a	2.483 ± 0.182 ^a
TB 组	0.455 ± 0.180 ^a	0.087 ± 0.052 ^a	5.217 ± 0.524 ^a	0.319 ± 0.057 ^a	0.083 ± 0.009 ^a	3.809 ± 0.547 ^a	0.247 ± 0.041 ^a	0.073 ± 0.011 ^a	3.396 ± 0.158 ^a
EC 组	0.415 ± 0.037 ^a	0.083 ± 0.003 ^a	4.999 ± 0.303 ^a	0.287 ± 0.089 ^a	0.080 ± 0.007 ^a	3.490 ± 0.989 ^a	0.213 ± 0.010 ^a	0.079 ± 0.006 ^a	2.702 ± 0.048 ^a
MT 组	0.409 ± 0.022 ^a	0.094 ± 0.009 ^a	4.337 ± 0.344 ^a	0.364 ± 0.027 ^a	0.080 ± 0.003 ^a	4.582 ± 0.496 ^{ab}	0.221 ± 0.021 ^a	0.077 ± 0.009 ^a	2.862 ± 0.161 ^a
ECT 组	0.454 ± 0.019 ^a	0.093 ± 0.009 ^a	4.874 ± 0.348 ^a	0.298 ± 0.030 ^a	0.071 ± 0.000 ^a	5.505 ± 0.398 ^b	0.329 ± 0.059 ^a	0.072 ± 0.010 ^a	4.543 ± 0.068 ^b
ST 组	0.459 ± 0.029 ^a	0.101 ± 0.004 ^a	4.527 ± 0.410 ^a	0.359 ± 0.023 ^a	0.079 ± 0.003 ^a	4.540 ± 0.349 ^{ab}	0.212 ± 0.014 ^a	0.079 ± 0.003 ^a	2.672 ± 0.220 ^a

注: 同列不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)

由表 1 可以看出, TB 组小鼠的 V/C 在十二指肠较高, 在空肠和回肠较低, 说明三丁酸甘油酯能够有效过胃, 且在小肠前端发挥作用, 但难以达到小肠后端。ECT 组小鼠在空肠的 V/C 较对照组的增加 28.26% ($p > 0.05$), 在回肠较对照组显著增加 82.96% ($p < 0.05$), 提示 ECT 能够在小肠后端释放部分三丁酸甘油酯并产生丁酸, 促进回肠健康发育,

促进肠上皮细胞的生长与增殖以及肠道形态的完整性^[24]。

2.6 三丁酸甘油酯包合物对小鼠结肠长度的影响

结肠长度缩短被用作评价结肠损伤的宏观指标, 结肠炎会使结肠长度缩短^[25], 正常成年 BALB/c 小鼠的结肠长度在 9 cm 左右。图 5 为各组小鼠结肠长度及形态测定结果。

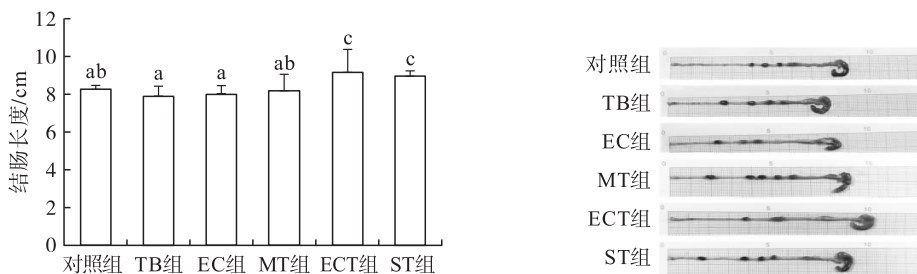


图 5 各组小鼠结肠长度及形态

由图 5 可以看出, 与对照组相比, ECT、ST 组小鼠结肠长度均显著增加 ($p < 0.05$), 其中 ECT 组显著增加 10.64%, 各组小鼠的结肠形态都较为健康, 但长度有所不同, 说明生长发育健康状况不同, TB 组与 EC 组小鼠发育较为缓慢, 说明 TB、EC 对小鼠的结肠发育作用不大, ECT 组小鼠的结肠发育状态优于对照组, 且为最佳,

说明 ECT 缓解了断奶对小鼠生长性能的影响, 使三丁酸甘油酯有效到达结肠并释放丁酸, 促进小鼠肠道发育。

2.7 三丁酸甘油酯包合物对小鼠结肠组织学损伤评分的影响

小鼠结肠组织 H&E 染色结果如图 6 所示, 组织学损伤评分结果如图 7 所示。

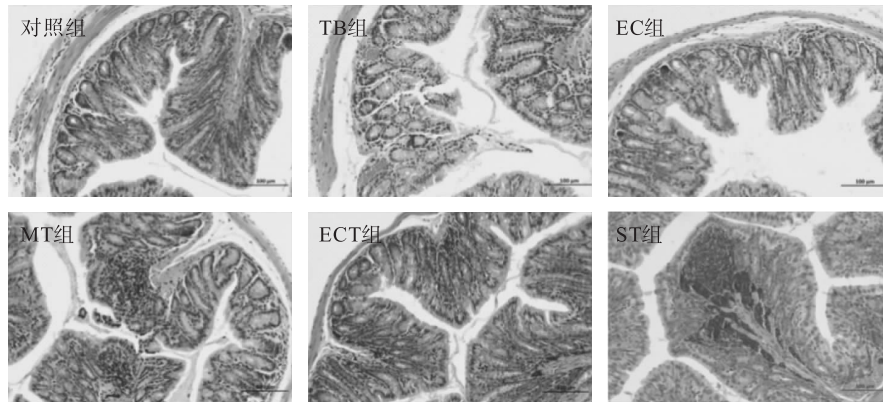


图6 小鼠结肠组织 H&E 染色结果(200 ×)

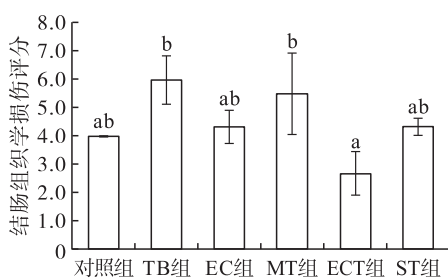


图7 小鼠结肠组织损伤学评分

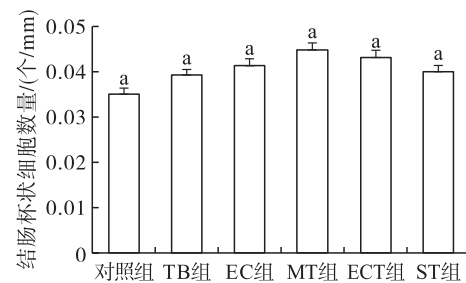


图8 小鼠结肠组织杯状细胞数量

由图6可以看出:对照组小鼠结肠组织固有层可见少量的淋巴细胞浸润,有轻微炎症;TB组和EC组小鼠结肠组织可见少量黏膜上皮脱落,固有层毛细血管充血、扩张,固有层可见少量的淋巴细胞浸润;MT组和ST组小鼠结肠组织固有层可见少量的淋巴细胞浸润,染色深的地方为弥散淋巴组织和充血淋巴细胞的淋巴管;ECT组小鼠结肠组织黏膜上皮完整,未见明显上皮细胞变性、坏死和脱落,固有层腺体数量丰富,未见明显炎症细胞浸润,结肠健康状况良好。由图7可以看出,ECT组小鼠结肠组织学损伤评分最低。综上,饲料中添加一定量的ECT有利于预防结肠炎症,维持肠道健康。

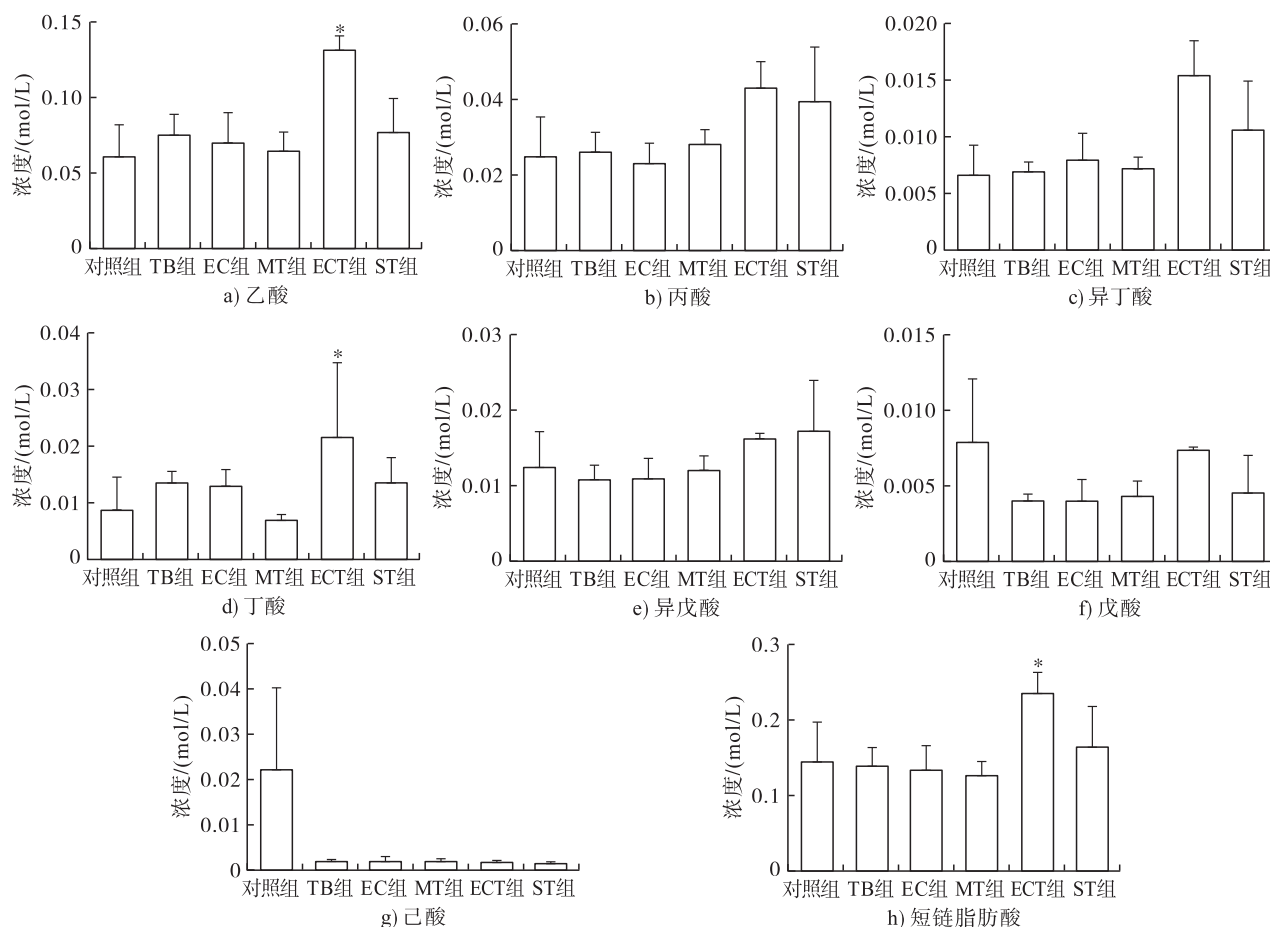
2.8 三丁酸甘油酯包合物对小鼠结肠组织杯状细胞数量的影响

杯状细胞在消化道分泌黏蛋白,防止肠道细菌毒素和其他外源性物质侵入肠道组织,同时保护肠膜不受消化酶降解,进而防止肠黏膜损伤,因此杯状细胞数量是评价肠黏蛋白分泌与评估肠道健康状况的指标^[14, 26]。图8为小鼠结肠组织杯状细胞数量测定结果。由图8可以看出,ECT组小鼠结肠组织杯状细胞数量较对照组增加23.44%,说明ECT有利于减少杯状细胞的消耗,减少炎症反应。

2.9 三丁酸甘油酯包合物对小鼠粪便短链脂肪酸含量的影响

炎症改变了肠道微环境,包括肠道菌群的种类和数量,从而使肠道中的短链脂肪酸水平发生明显变化。短链脂肪酸对于维持大肠的正常功能和结肠上皮细胞的形态和功能具有重要作用,短链脂肪酸可被后肠迅速吸收作为供能物质,也能够促进钠的吸收,调节肠道渗透压,丁酸在这方面的作用比乙酸和丙酸强,并且丁酸可增加乳酸杆菌的产量从而减少大肠杆菌的数量^[27-29]。小鼠粪便中短链脂肪酸含量如图9所示。

由图9可以看出,ECT组小鼠粪便中的总短链脂肪酸、乙酸、丁酸含量均显著高于对照组($p < 0.05$),其中总短链脂肪酸含量是对照组的1.64倍,乙酸含量为对照组的2.14倍,丁酸含量为对照组的2.96倍,提示摄入ECT能够促进小鼠肠道中产酸菌的生理活性,有助于减轻肠道炎症,促进肠道发育,维护肠道健康^[30]。事实上,幼龄动物由于肠道后端病原菌的过量繁殖和未消化饲料的不合理发酵,以及早期断奶阶段肠道黏膜和免疫系统的不完善,极易引起腹泻、结肠炎等肠道相关疾病^[16]。本研究说明ECT靶向肠道后端的健康,其定点缓释部位更符合动物自然生长饲用碳水化合物在结肠或盲肠中被微生物发酵后产生丁酸的部位,能够达到控制后肠中合理发酵的目的,促进动物肠道健康。



注：* 表示与对照组存在显著性差异 ($p < 0.05$)

图9 小鼠粪便中短链脂肪酸含量

3 结论

酶法制备的环糊精-三丁酸甘油酯包合物原料成本低、工艺简单、包合效率高,可以作为一种饲料添加剂,提高小鼠的生长性能,提高饲料利用率,有益于小鼠肾小球的过滤能力,能够有效调控氧化应激,提高机体抗氧化水平。ECT 能将三丁酸甘油酯有效递送到小肠后端及结肠部位,缓释效果良好,为回肠、结肠提供能量,提高肠道中丁酸等短链脂肪酸含量。ECT 与液态三丁酸甘油酯、市售常用硅基三丁酸甘油酯以及麦芽糊精-三丁酸甘油酯复合物相比,在提高小鼠生长性能、抗氧化能力及肠道健康等方面效果更好,且由于 ECT 具有成本低、工艺简单等优点,更适合取代抗生素作促生长剂,提高畜禽增重和饲料利用效率。

参考文献:

- [1] MIYOSHI M, SAKAKI H, USAMI M, et al. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats [J]. *Clin Nutr*, 2011, 30(2): 252-258.
- [2] 张勇, 王萌, 李方方, 等. 三丁酸甘油酯和牛至油对断奶

仔猪生长性能、血清生化指标和营养物质表观消化率的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(9): 2786-2794.

- [3] WANG C C, SHEN Z J, CAO S T, et al. Effects of tributyrin on growth performance, intestinal microflora and barrier function of weaned pigs [J/OL]. *Anim Feed Sci Technol*, 2019, 258: 114311 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114311>.
- [4] DA SILVA B C, VIEIRA F D, MOURINO J L P, et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquacult Res*, 2016, 47(2): 612-623.
- [5] 李雅敏, 刘艳莉, 石勇, 等. 三丁酸甘油酯对草鱼幼鱼体成分与形体指标及肠道消化酶的影响[J]. *现代农业科技*, 2019, 24: 185-187, 189.
- [6] LI J L, HOU Y Q, YI D, et al. Effects of tributyrin on intestinal energy status, antioxidative capacity and immune response to lipopolysaccharide challenge in broilers [J]. *Asian - Australas J Anim Sci*, 2015, 28(12): 1784-1793.
- [7] 浙江大学. 三丁酸甘油酯固态颗粒型制剂及其制备方法和应用: CN201410298903.2 [P]. 2014-10-22.
- [8] 曹胜炎, 王宏雁. 三丁酸甘油酯微胶囊的制备方法: CN201510012138.8 [P]. 2015-04-15.
- [9] 江南大学. 一种酶法包合三丁酸甘油酯的方法:

- CN201810347106.7[P]. 2018-10-12.
- [10] LI Z X, FENG Y, LI Z F, et al. Inclusion of tributyrin during enzymatic synthesis of cyclodextrins by β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 99: 105336 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105336>.
- [11] 夏淑芳. 高脂诱导的氧化应激对甲状腺激素稳态的影响及槲皮素的调节作用[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2015.
- [12] LI Y H, ADAM R, COLOMBEL J F, et al. A characterization of pro-inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced chronic relapsing colitis mice model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60: 194-201.
- [13] 黄文娟, 卢学嘉, 房其军, 等. 葛根苓连汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠结肠病理损伤及 Th17/Treg 的影响[J]. *中成药*, 2021, 43(12): 3497-3501.
- [14] EMADINIA A, TOGHYANI M, FOROOZANDEH A D, et al. Growth performance, jejunum morphology and mucin-2 gene expression of broiler Japanese quails fed low-protein diets supplemented with threonine[J]. *Ital J Anim Sci*, 2020, 19(1): 667-675.
- [15] XU Y, YU Y, SHEN Y, et al. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers[J/OL]. *Poult Sci*, 2021, 100(9): 101358 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101358>.
- [16] LIN F, LI X, WEN J, et al. Effects of coated sodium butyrate on performance, diarrhea, intestinal microflora and barrier function of pigs during the first 2-week post-weaning[J/OL]. *Anim Feed Sci Technol*, 2020, 263: 114464 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114464>.
- [17] 唐茂妍, 林冬梅. 三丁酸甘油酯在饲料中的应用进展[J]. *饲料博览*, 2019(10): 11-14, 18.
- [18] 李伟军. 不同膳食补充糖肽饮料对运动后呼吸商及糖和脂肪代谢的影响[D]. 北京: 北京体育大学, 2009.
- [19] 刘兵, 马莲香, 侯川川, 等. 微囊化三丁酸甘油酯对仔猪生长性能、抗氧化能力及粪便菌群的影响[J]. *饲料研究*, 2017(14): 18-22.
- [20] LU J, YAO J, XU Q, et al. *Clostridium butyricum* relieves diarrhea by enhancing digestive function, maintaining intestinal barrier integrity, and relieving intestinal inflammation in weaned piglets[J/OL]. *Livest Sci*, 2020, 239: 104112 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104112>.
- [21] 肖瀛, 许豪杰, 杨昌铭, 等. 肉桂精油对小鼠肝肠组织抗氧化能力以及肠道菌群结构的调节作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(7): 198-206.
- [22] 夏邹, 冯江鑫, 蒋俊劼, 等. 饲料组成及抗生素对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(8): 3594-3604.
- [23] 朱荣生, 王怀中, 齐波, 等. 饲料添加三丁酸甘油酯和核苷酸对断奶仔猪生长性能、血清生化指标和肠组织形态的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(2): 707-716.
- [24] 高玉红, 孙新胜, 刘艳琴. 乳清粉含量对断奶仔猪生产性能和消化吸收能力的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2002(7): 3-5.
- [25] 王俊通. 产共轭亚油酸乳酸菌对 DSS 诱导小鼠结肠炎的改善作用[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2016.
- [26] MONTAGNE L, PLUSKE J R, HAMPSON D J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2003, 108(1/2/3/4): 95-117.
- [27] KUMAR A, TOGHYANI M, KHERAVI S K, et al. Organic acid blends improve intestinal integrity, modulate short-chain fatty acids profiles and alter microbiota of broilers under necrotic enteritis challenge [J]. *Anim Nutr*, 2022, 8(1): 82-90.
- [28] LIU P, WANG Y, YANG G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis [J/OL]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105420 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105420>.
- [29] 臧凯丽, 江岩, 孙勇, 等. 微生态制剂调节便秘、腹泻人群肠道菌群结构与产短链脂肪酸关键菌属的相关性[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 155-165.
- [30] SULAIMAN M A, KAMARUDIN M S, ROMANO N, et al. Effects of increasing dietary carbohydrate level on feed utilisation, body composition, liver glycogen, and intestinal short chain fatty acids of hybrid lemon fin barb (*Barbonymus gonionotus* ♀ X *Hypsibarbus wetmorei* male ♂) [J/OL]. *Aquacult Rep*, 2020, 16: 100250 [2022-05-18]. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100250>.