

紫菜复合酶解液改善饮食诱导肥胖和调节肠道菌群作用

程泉杰, 张玉莹, 常耀光, 薛长湖, 唐庆娟*
(中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266003)

摘要 使用中性蛋白酶和自制紫菜多糖酶降解坛紫菜,制备紫菜复合酶解液。结合 16S rRNA 测序、气相色谱检测、荧光定量 PCR 分析,探究两种酶解液对饮食诱导肥胖和肠道菌群的影响。结果表明,紫菜复合酶解液能有效调节高脂饮食小鼠血清脂质水平,降低白色脂肪含量和脂肪细胞大小。这可能是由于复合酶解液可以抑制肝脏中脂肪合成相关基因(*DGAT1*、*DGAT2*)的表达,促进脂肪组织中脂肪分解相关基因(*AGTL*、*HSL*)的表达。同时,紫菜复合酶解液促进有益菌 *Muribaculaceae* 和螺杆菌科的增殖,抑制有害菌链球菌科的生长,并上调“甘油酯代谢”等脂代谢相关通路。总之,紫菜复合酶解液能有效改善饮食诱导的肥胖,调节与肥胖相关的肠道菌群组成和功能。复合酶解液有潜力用于新型功能饮料的开发,有助于促进紫菜的高值化利用。

关键词 坛紫菜; 复合酶解液; 高脂饮食; 肠道菌群; 脂质代谢

文章编号 1009-7848(2022)11-0133-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.11.015

近年来,肥胖及相关代谢疾病已成为全球性疾病。肠道菌群组成和功能的变化与肥胖的发生息息相关^[1],是通过膳食干预改善肥胖的重要靶点。海藻提取物等精加工产品可调节肠道菌群,辅助改善肥胖等慢性病,是食品行业的研究热点之一^[2]。紫菜隶属于红藻类,营养价值高,是一种药食同源的藻。然而,当前对于紫菜产品的研究多集中于初加工产品,为数不多的精深加工产品主要有紫菜酱、紫菜油和紫菜饮料。目前,紫菜饮料的制作主要通过水提或蛋白酶降解制备紫菜原液,并利用食品添加剂调节风味^[3]。该方法制作工艺简单,然而,其中含有高分子质量紫菜多糖,导致产品黏度较大,不利于后续的澄清过滤^[4]。

紫菜多糖具有降血脂、调节免疫等多种生物活性^[5]。通过物理法、化学法或酶法降解多糖,是充分发挥其生物活性,提高相关产品稳定性的有效途径^[6]。酶解法条件温和且分子质量易控制,然而,专一酶不易获得^[7]。沈照鹏等^[8]利用市售琼胶酶降解紫菜,发现酶解可促进紫菜中营养物质溶出,尤其是总糖和还原糖含量显著增加。本实验室前期从海洋细菌中克隆一种新型 GH16 β -紫菜酶,并

将其与中性蛋白酶一同用于降解坛紫菜,所得复合酶解液与单纯蛋白酶酶解液相比黏度更低、紫菜转化率更高^[9-10]。然而,其紫菜酶解液生物活性仍需进一步研究。

综上,本研究利用中性蛋白酶和紫菜多糖酶制作紫菜复合酶解液,并通过高脂饮食小鼠模型探究其对饮食诱导肥胖的影响,以及对肠道菌群的调节作用。研究结果可为提高坛紫菜的附加值提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

坛紫菜,东山县远扬藻业有限公司。SPF 级 C57BL/6J 小鼠(雄性,6 周龄, $n=40$),济南朋悦实验动物繁育有限公司。10%低脂饲料、45%高脂饲料,南通特洛菲饲料科技有限公司,饲料配方见表 1。中性蛋白酶,南宁东恒华道生物科技有限责任公司;紫菜多糖酶 Por16A_Wf,实验室自制。苏木精伊红(HE)染液,武汉赛维尔生物科技有限公司;Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司;总胆固醇(TC)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;RNA 纯化试剂盒,自天根生化科技有限公司;5 \times All-In-One RT 裂解反转录一体试剂盒和 Eva Green Express 2 \times q PCR Master Mix,abm 公司。

收稿日期: 2021-11-12

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2019GHY112058)

第一作者: 程泉杰,女,硕士

通信作者: 唐庆娟 E-mail: tangqingjuan@ouc.edu.cn

表1 动物实验饲料成分

原料	10%低脂饲料/	45%高脂饲料/
	g·kg ⁻¹	g·kg ⁻¹
酪蛋白	200	233
玉米淀粉	506	85
糊精	125	117
蔗糖	69	201
豆油	25	29
猪油	20	207
纤维素	50	58
矿物质	45	52
维生素	10	12
L-胱氨酸	3	3
酒石酸胆碱	2	2
TBHQ	0.05	0.05
合计	1 055	1 000
能量系数	3.58	4.73

1.2 仪器与设备

电动荧光显微镜(NIKON/Ni-E),日本尼康公司;酶标仪(SPARK 10M),瑞士TECAN;Nanodrop 2000/2000C(分光光度计),美国Thermo Scientific公司;Miseq测序平台,美国Illumina公司。

1.3 试验方法

1.3.1 紫菜酶解液的制备

1) 紫菜单一酶解液 向40 g紫菜中加入800 mL pH 6.5的蒸馏水,静置复水,加入中性蛋白酶酶解。酶解条件:按照10 500 U/g的加酶量添加中性蛋白酶2 g,在45 °C酶解6 h;酶解结束后,在100 °C水浴10 min灭酶,取出后自然沉降,4 000 r/min离心15 min,所得上清液即紫菜单一酶解液。

2) 紫菜复合酶解液 向酶解液中添加紫菜多糖酶Por16A_Wf继续酶解。酶解条件:加酶量0.5 U/g,35 °C酶解2 h,于100 °C水浴中加热10 min灭酶,然后4 000 r/min离心15 min,所得上清液即紫菜复合酶解液。

1.3.2 紫菜酶解液理化性质分析

1) 紫菜的酶解利用率 将紫菜酶解液离心,所得沉淀冻干称重,计算沉淀占干紫菜粉的比重。

2) 紫菜酶解液黏度的测定 使用流变仪在25 °C下测定样品黏度,剪切速率为0~100 s⁻¹。

3) 紫菜酶解液离心分离率及静置分层率测定 取10 mL酶解液于离心管中,于4 °C中放置7 d,8 000 r/min离心10 min,取出上层溶液测定体积。离心分离率(%)=(上层溶液体积/总体积)×100。取10 mL酶解液于刻度试管中,于4 °C放置7 d,测定析出水层的高度(Lw)和饮料总高度(Ls)。静置分层率(%)=(Lw/Ls)×100。

4) 紫菜酶解液中紫菜还原糖含量的测定 采用羟基苯甲酰肼(pHBH)法测定紫菜蛋白酶解液和紫菜复合酶解液中还原糖的含量。

1.3.3 动物饲养与取样 动物实验经中国海洋大学食品科学与工程学院动物伦理委员会批准后进行(编号SPXY2020061602)。将32只雄性C57BL/6J小鼠暂养1周后,按照其体重随机分为4组,低脂饮食组(LFD)、高脂饮食组(HFD)、紫菜单一酶解液组(SPEH)、紫菜复合酶解液组(CPEH),每组8只(图1)。除LFD组饲喂10%低脂饲料,其余各组均饲喂45%高脂饲料。饲喂1周后,LFD组和HFD组均灌胃生理盐水,SPEH组和CPEH组分别灌胃两种紫菜酶解液【300 mg/(kg bw)】。小鼠两只1笼,饲养环境为室温(23±2) °C,湿度55%~58%。第10周结束时,处死小鼠,取小肠、肝脏等组织,于-80 °C保存。

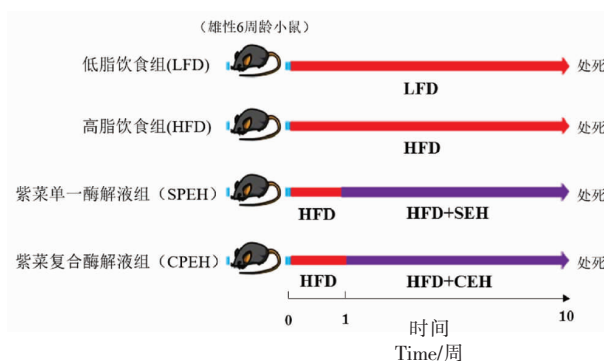


图1 动物实验设计图

Fig.1 Schematic illustration of animal experiment

1.3.4 小鼠体重、摄食量及体脂率的测定 饲养期间,每两天检测1次小鼠体重和摄食量。小鼠处死后,分别剥离皮下脂肪、附睾脂肪和肾周脂肪计算体脂率^[11]。

1.3.5 血清脂质水平的测定 取小鼠血浆于灭菌离心管中,15 000 r/min离心10 min后取上清。用

1.1 节中的试剂盒测定 TC、HDL-c 水平,操作方法参照说明书。

1.3.6 脂肪组织 HE 病理学分析 取白色脂肪组织用 4%多聚甲醛固定,将其切成 4 μm 的玻片,用 HE 染色^[11]。使用电动荧光显微镜观察脂肪细胞形态并拍照。各组选定 5 个切片,每个切片随机选取 8~10 个视野,采用 Image J 软件统计脂肪大小,取平均值。

1.3.7 荧光定量 PCR 分析 使用 Trizol 提取肝

脏、白色脂肪中的总 RNA。使用 RNA 纯化试剂盒去除蛋白质、无机盐离子等。使用 5 \times All-In-One RT 反转录试剂盒制备 cDNA。实时荧光定量 PCR 按照 EvaGreen Express 2 \times qPCR MasterMix 试剂盒说明书操作。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s(45 个循环); 5 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$ (0.5 $^{\circ}\text{C}/10$ s), mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算。引物序列(表 2)参考之前的研究进行设计^[12-13]。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

基因	正向(5'-3')	反向(3'-5')
<i>DAGT1</i>	AGGACGGACACGACGAT	GAACGCAGTCACAGGAAA
<i>DAGT2</i>	TCCTGTCTTTCCTCGTGC	ACCTTCTTGGGCGTGT
<i>ATGL</i>	TCTACTGTGGGCTGATACCT	GTGGAAGTGTCTCGTGGG
<i>HSL</i>	AGCACTACAAACGCAACGA	CTGAATGATCCGCTCAAAC

1.3.8 短链脂肪酸(SCFAs)分析 采用 Cao 等^[14]的方法检测粪便中 SCFAs 含量。称取粪便样品,加入超纯水(0.1 g:600 μL)后搅碎,漩涡振荡混匀。加入 50%硫酸酸化处理后离心,取上清,分别加入内标二乙基丁酸和等体积无水乙醚,取 1 μL 用于气相色谱分析(安捷伦 GC 6890)。载气为高纯氮气,所选色谱柱为安捷伦 CB-FFAP(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm)。检测器为氢火焰离子化检测器(FID)。

1.3.9 16S rRNA 扩增子测序分析 以提取的粪便 DNA 为模板,采用细菌 515F/926R 引物扩增 16S rRNA 的 V4~V5 高变区序列。参考李晶等^[15]的方法,进行 PCR 纯化和扩增,所得 PCR 产物采用 Agencourt Ampure XP bead kit 核酸纯化试剂盒纯化回收。纯化后的扩增产物使用 Tru Seq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建,文库合格后,使用 Miseq 测序平台上机测序。

采用 MiSeq 控制软件 MCS 2.4.1 进行数据的预处理。FastQC0.11.2 软件进行测序原始数据的质量控制。随后双端读长的序列经 PandaSeq 2.8 软件拼接成 Contigs。由 QIIME pipeline 1.9.1 去除接头和引物序列后,测序数据使用 Green Gene 数据库中的数据信息进行快速多序列比对,进行物种

注释分析,所得的 OTU 表用于后续分析。利用 R 3.6.1 中的 ANCOMBC 程序包分析科水平上的显著差异菌,用 selbal 程序包做 balance 分析,并用 Tax4Fun 程序包做肠道菌群功能预测分析。利用 STAMP 软件筛选具有显著差异的肠道菌群功能(通路和酶)。

1.4 数据处理

所有试验数据均用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,作图均采用 GraphPad Prism 8.0 专业软件,结果以平均值 \pm 标准差表示,组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 紫菜酶解液理化性质

2.1.1 紫菜的酶解利用率 单一酶解液和复合酶解液的紫菜酶解利用率分别为 63%和 78%,表明紫菜多糖酶的使用有利于对紫菜的充分利用。

2.1.2 紫菜酶解液黏度 图 2 为剪切速率对紫菜酶解液黏度的影响。在剪切速率为 0~100 s^{-1} 的条件下,紫菜单一酶解液的黏度为 2~15 Pa \cdot s,紫菜复合酶解液的黏度为 1.9~8.5 Pa \cdot s。由此可知,在紫菜多糖酶的作用下,复合酶解液的流变性与水接近,表明紫菜多糖酶显著降低了酶解液的黏度。

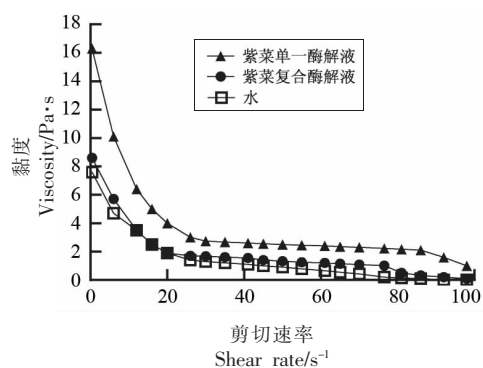


图2 紫菜酶解液黏度

Fig.2 Viscosity of the porphyra enzymatic hydrolysate

2.1.3 紫菜酶解液的稳定性 如表3所示,两种酶解液离心分离率和静置分层率间存在明显的差异,表明在不添加食品稳定剂时,复合酶解液放置7 d后稳定性高于单一酶解液。

2.1.4 紫菜酶解液中还原糖含量 如表4所示,与紫菜单一酶解液相比,复合酶解液中还原糖含量增加了17.5%(以干质量计)。这说明在紫菜溶胀复水及蛋白酶酶解过程中,紫菜多糖被溶出,并在紫菜多糖酶的作用下被水解。

2.2 紫菜酶解液对肥胖小鼠体重、摄食量及能量摄入量的影响

肥胖的发生是因长期能量摄入过剩,临床上以体重增加和脂肪异常堆积为主要特点。饲养期间小鼠的体重和摄食量变化见图3a和3b,各组小鼠体重保持稳定增长。摄入高脂饮食后,HFD组小鼠体重增长率显著高于LFD组($P<0.001$),CPEH组小鼠体重增长率明显低于HFD组($P<0.05$),而CPEH干预对HFD小鼠能量摄入无明显影响。

2.3 紫菜酶解液对肥胖小鼠血脂水平的影响

长期摄入高脂膳食导致血清TC水平上升,同时用于转运胆固醇的HDL-c含量下降^[16]。如图4所示,用紫菜酶解液干预后,SPEH组和CPEH组的血脂水在一定程度上得到改善,其中CPEH改善血脂水平效果更为显著($P<0.05$)。

2.4 紫菜酶解液对肥胖小鼠脂肪细胞形态和体脂率的影响

脂肪细胞形态和尺寸的变化是脂肪沉积的重要特征^[17]。如图5所示,LFD组小鼠细胞面积小,

表3 紫菜酶解液稳定性

Table 3 The stability of the porphyra enzymatic hydrolysate

	紫菜单一酶解液	紫菜复合酶解液
离心分离率/%	91	100
静置分层率/%	6	0

表4 紫菜酶解液还原糖含量

Table 4 Reducing sugar content in the porphyra enzymatic hydrolysate

	紫菜单一酶解液	紫菜复合酶解液
还原糖吸光值	0.2503	0.4289
还原糖含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.78	15.55

各细胞间大小均匀;HFD组小鼠脂肪面积大,大小不均匀且细胞形态不规则。紫菜酶解液干预后,SPEH组小鼠脂肪细胞形态、尺寸均未得到明显改善;CPEH组与LFD组脂肪的大小和数量较为接近。总之,紫菜复合酶解液可有效改善高脂饮食诱导的肥胖,且效果优于单一酶解液。

2.5 紫菜酶解液对肥胖小鼠脂代谢相关基因的影响

饮食诱导脂代谢紊乱主要表现为脂肪合成水平升高,而脂肪分解利用水平下降。肝脏是人体源性TG合成的重要场所。二脂酰甘油酰基转移酶(DGAT1和DGAT2)能催化TG合成的最后一步^[18]。如图6所示,与HFD组比较,CPEH组肝脏DAGT1的mRNA的表达水平降低了31.62%,且肝脏DAGT2的mRNA的表达水平显著降低($P<0.05$)。

脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)和激素敏感脂肪酶(HSL)是参与细胞内TG降解的关键酶^[19]。与HFD组比较,SPEH组的白色脂肪ATGL和HSL的mRNA的表达水平显著升高($P<0.05$)。结果表明,紫菜复合酶解液干预显著改善饮食诱导的脂代谢紊乱。

2.6 紫菜酶解液对SCFAs合成的影响

SCFAs是肠道菌群的主要代谢产物,在宿主脂质代谢调节中发挥积极的作用^[20]。如图7所示,与LFD组相比,HFD组的乙酸、丙酸和丁酸水平分别下降了45.9%,40.6%和38.3%。与HFD组相比,CPEH组的乙酸、丙酸、异丁酸的水平显著增

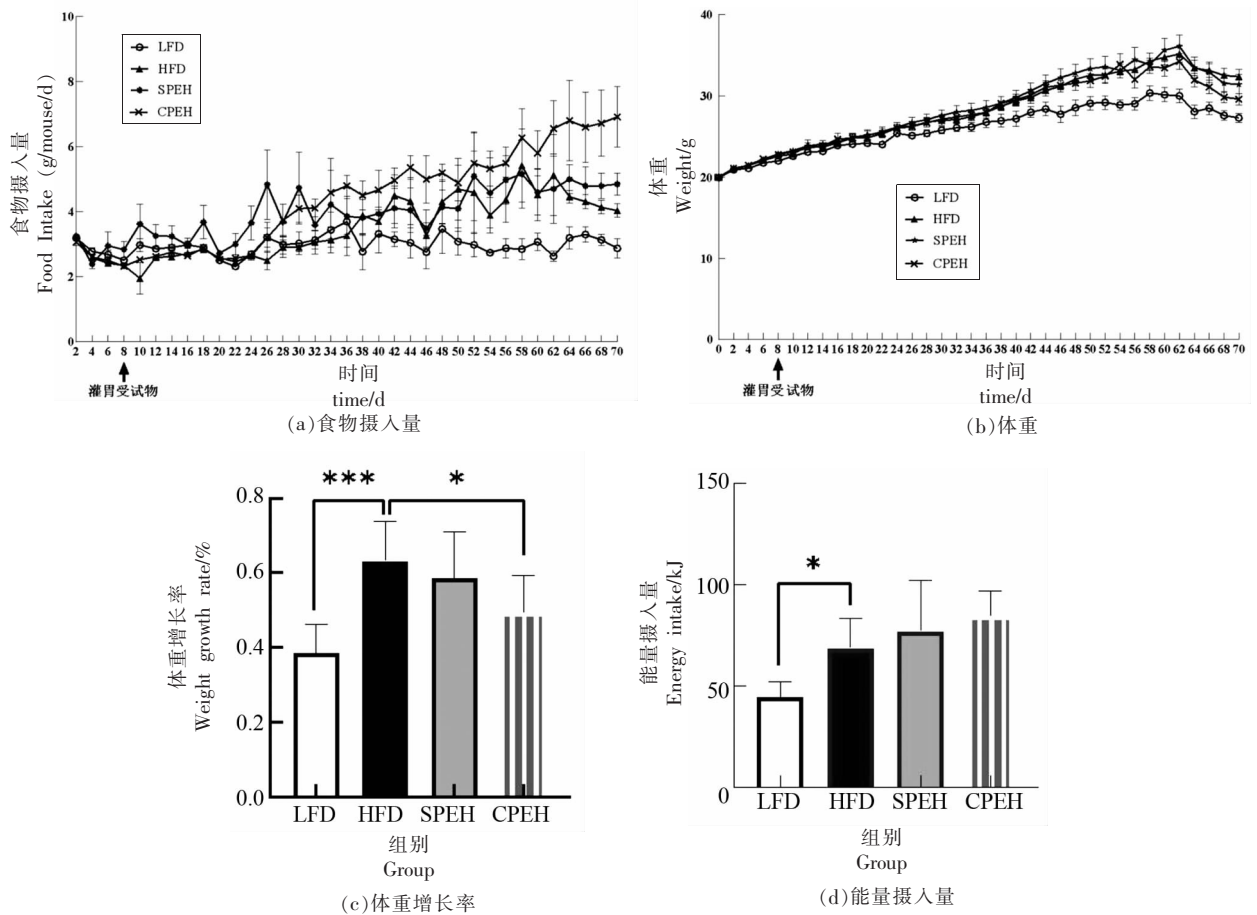
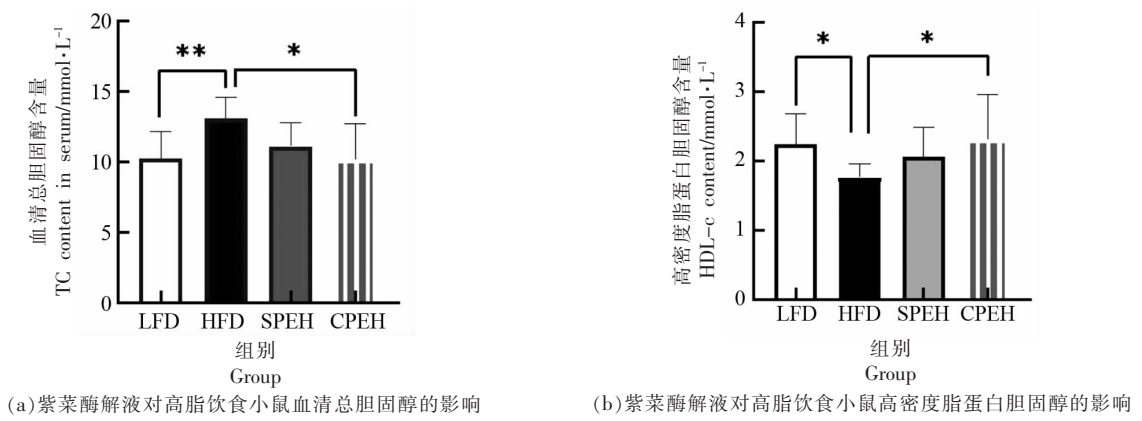


图 3 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠体重、摄食量、体重增长率及能量摄入量的影响

Fig.3 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on body weight, food intake, body weight growth rate and mean energy intake in high fat diet-fed mice



(a)紫菜酶解液对高脂饮食小鼠血清总胆固醇的影响

(b)紫菜酶解液对高脂饮食小鼠高密度脂蛋白胆固醇的影响

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, $n = 8$ 。

图 4 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠血清脂质水平的影响

Fig.4 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on serum lipid levels in high fat diet-fed mice

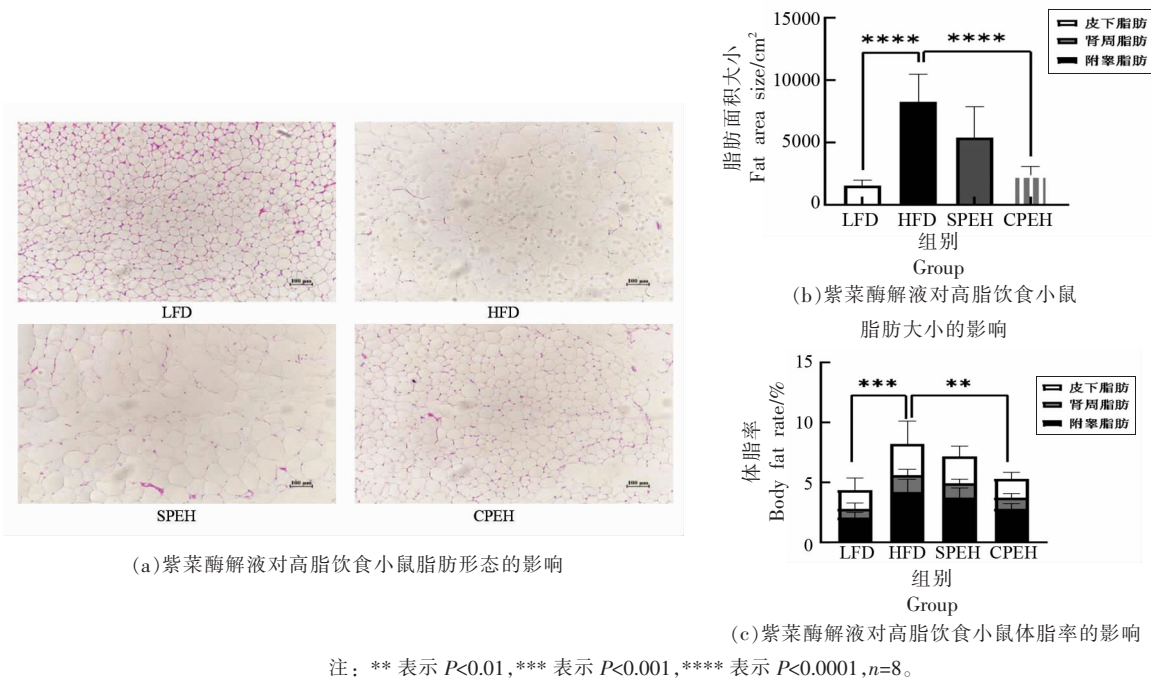


图5 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠脂肪细胞形态、大小及体脂率的影响

Fig.5 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on adipocyte morphology and size, and body fat percentage of high fat diet-fed mice

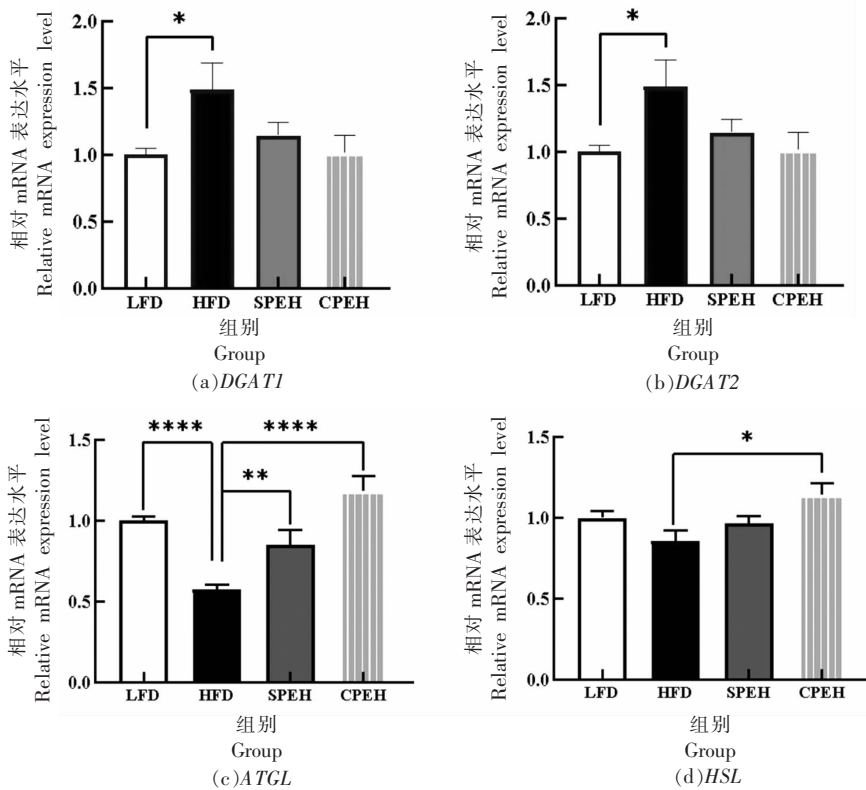


图6 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠脂代谢相关基因表达的影响

Fig.6 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on genes related to lipid metabolism of high fat diet-fed mice

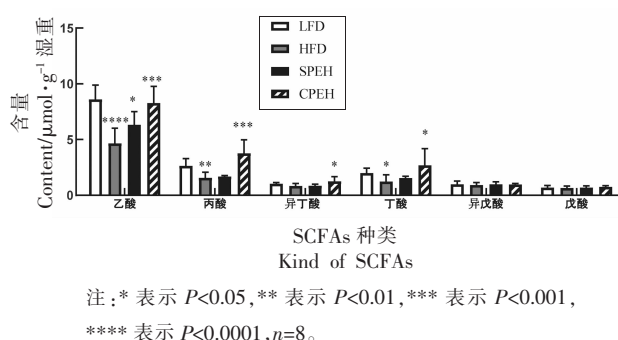


图 7 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠粪便中 SCFAs 含量的影响

Fig.7 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on fecal SCFAs content in high fat diet-fed mice

加($P < 0.05$)。总之,紫菜复合酶解液干预 10 周,可促进 HFD 小鼠结肠内 SCFAs 的产生,说明复合酶解液干预或许有助于调节 HFD 小鼠肠道菌群。

2.7 紫菜酶解液对肥胖小鼠肠道菌群结构和组成的影响

2.7.1 对肥胖小鼠厚壁菌门和拟杆菌门比例的影响 研究表明,肥胖人群中厚壁菌门和拟杆菌门比例(Firmicutes/Bacteroidetes, F/B)升高,并且通过饮食干预可降低 F/B 比例^[21]。图 8 可知,与 HFD 组相比,CPEH 组小鼠肠道菌群中 F/B 比例显著降低($P < 0.5$)。

2.7.2 对肥胖小鼠肠道菌群组成的影响 利用 ANCOM 来分析组间显著差异的肠道细菌,结果见表 5。与 LFD 组比较,HFD 组链球菌科(Streptococcaceae)等相对丰度显著增加(校正后的 P 值(Adjusted P value)小于 0.01),红蝾菌科(Coriobacteriaceae)等相对丰度显著减少(校正后的 P 值小于 0.01)。SPEH 组红蝾菌科等相对丰度显著高于 HFD 组(校正后的 P 值小于 0.01)。与 HFD 组相比,CPEH 组 Muribaculaceae 和螺杆菌科(Helicobacteraceae)等相对丰度显著增加(校正后的 P 值小于 0.01),链球菌科相对丰度显著减少(校正后的 P 值小于 0.01)。以上结果表明紫菜酶解液的干预对高脂饮食小鼠肠道菌群组成影响显著。

采用 Selbal 分析,研究高脂饮食和两种紫菜酶解液显著调节的肠道细菌特征。如图 9a 所示,由葡萄球菌科和毛螺菌科组成的整体平衡,准确预测了低脂饮食小鼠和高脂饮食小鼠之间微生物

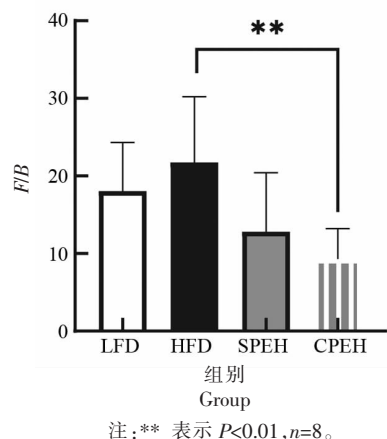


图 8 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠厚壁菌门和拟杆菌门 (F/B) 比例的影响

Fig.8 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes (F/B) in high fat diet-fed

特征的变化($AUC = 1.0$)。由图 9b 可知,厌氧菌科(Anaerovoracaceae)和链球菌科组成的平衡可以解释复合酶解液调节的微生物特征。链球菌科和厌氧菌科之间的平衡值为正值,较低的平衡值表明 CPEH 减少了链球菌科的相对丰度。类似的,由消化链球菌科(Peptostreptococcaceae)和 Muribaculaceae 组成的平衡对 SPEH 处理具有很高的预测准确性($AUC = 0.953$, 图 9c)。

2.8 紫菜酶解液对微生物功能的影响

将 16s 测序数据与 KEGG 数据库比对,对肠道菌群进行功能注释,进而将菌群功能与宿主代谢相联系。利用 STAMP 软件分析组间显著差异的 KEGG 通路,尤其是与脂代谢相关的通路。由图 10a~10c 可知,与 LFD 组相比,HFD 组有 3 条通路(“脂代谢”“磷酸酯和次磷酸酯代谢”和“甘油酯代谢”)被抑制。此外,紫菜复合酶解液干预显著上调了“甘油酯代谢”。

值得注意的是,在 HFD 组和 CPEH 组间具有显著差异的酶,多与能量代谢、脂代谢等有关。由图 10d~10f 可知,其中 3 种酶(K00057“甘油-3-磷酸脱氢酶[EC:1.1.1.94]”,K01755“精氨酸代琥珀酸裂解酶[EC:4.3.2.1]”和 K01940“精氨酸琥珀酸合酶[EC:6.3.4.5]”)在 HFD 组中显著富集。而与 HFD 组相比,CPEH 组中的 3 种酶的丰度均显著降低($P < 0.5$)。CPEH 干预影响了肠道菌群的功能。

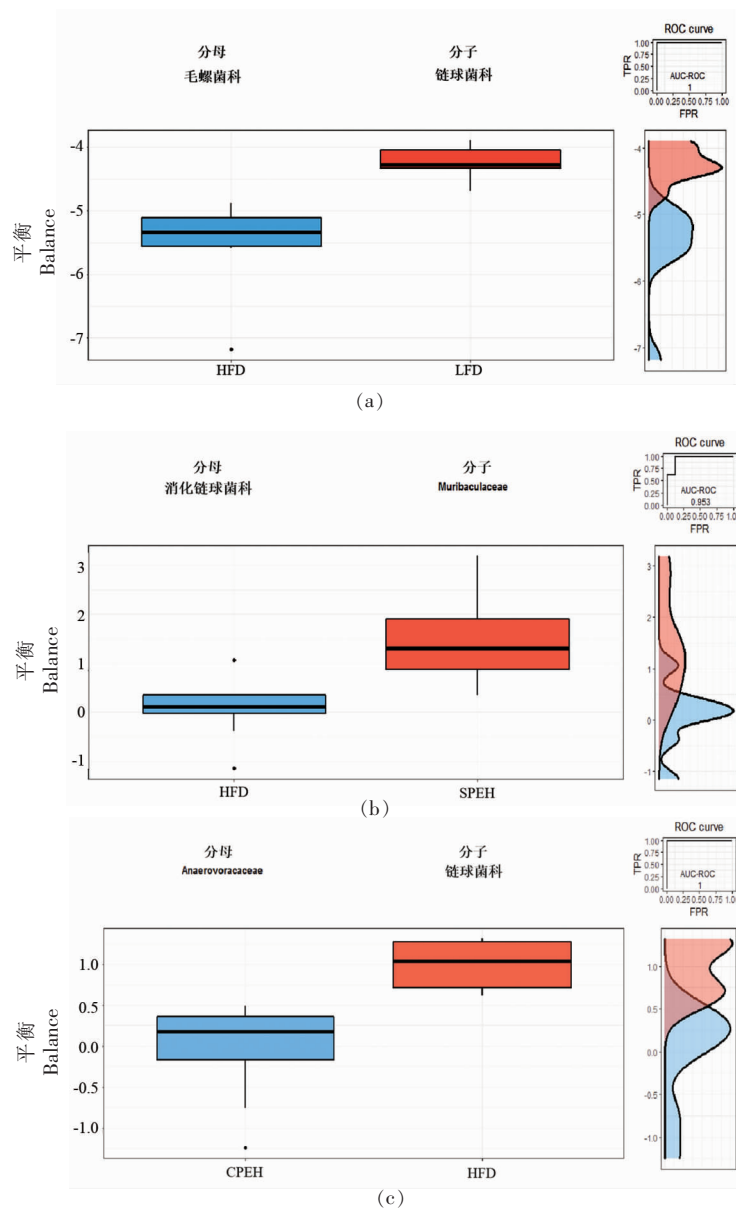


图9 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠肠道菌群特征的影响

Fig.9 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on gut microbial feature of high fat diet-fed mice

表5 基于 ANCOM 分析的科水平上组间显著差异的肠道细菌

Table 5 Differentially abundant taxa at family level between groups identified by ANCOM

(A)	相对丰度/%		P 值	校正后的 P 值
	LFD	HFD		
巴恩斯氏菌科	0.0005 ± 0.0009	0.0002 ± 0.0007	0	0
拜叶林克氏菌科	0.0002 ± 0.0007	0.0021 ± 0.0027	0	0
红螬菌科	0.0025 ± 0.0007	0.0002 ± 0.0024	0	0
Parvibacter	0.0007 ± 0.0003	0.0014 ± 0.0002	0	0
链球菌科	0.0500 ± 0.0611	0.1412 ± 0.1827	0	0
消化球菌科	0.0476 ± 0.0413	0.1479 ± 0.152	0	0.01
脱硫弧菌属	0.0843 ± 0.0733	0.0224 ± 0.0188	0	0.04

表 6 基于 ANCOM 分析的科水平上组间显著差异的肠道细菌

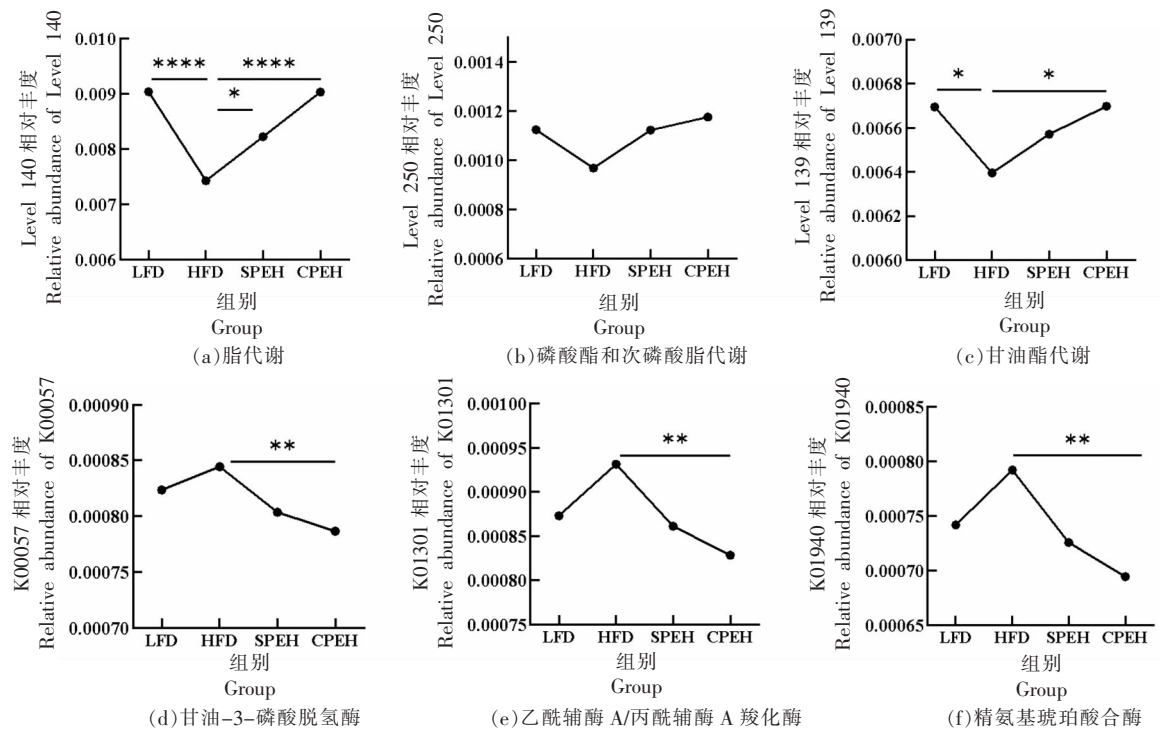
Table 6 Differentially abundant taxa at family level between groups identified by ANCOM

(B)	相对丰度/%		P 值	校正后的 P 值
	HFD	SPEH		
红螬菌科	0.0002 ± 0.0024	0.0013 ± 0.0020	0	0
盐单细胞科	0.0004 ± 0.0007	0.0012 ± 0.0014	0	0
拜叶林克氏菌科	0.0021 ± 0.0027	0.0007 ± 0.0014	0	0
摩根氏菌科	0.0010 ± 0.0022	0.0015 ± 0.0020	0	0
丹毒丝菌科	0.0033 ± 0.0086	0.0010 ± 0.0017	0	0

表 7 基于 ANCOM 分析的科水平上组间显著差异的肠道细菌

Table 7 Differentially abundant taxa at family level between groups identified by ANCOM

(C)	相对丰度/%		P 值	校正后的 P 值
	HFD	CPEH		
拜叶林克氏菌科	0.0021 ± 0.0027	0.0009 ± 0.0026	0	0
微球菌科	0.0023 ± 0.0041	0.0006 ± 0.0018	0	0
螺旋杆菌科	0.0008 ± 0.0017	0.0423 ± 0.1057	0	0
Monoglobaceae	0.0045 ± 0.0050	0.0099 ± 0.0073	0	0
韦荣氏球菌科	0.0010 ± 0.0015	0.0004 ± 0.0011	0	0
Muribaculaceae	1.0991 ± 0.6727	5.6999 ± 4.2240	0	0
假单胞菌科	0.0028 ± 0.0068	0.0045 ± 0.0078	0	0
根瘤菌科	0.0035 ± 0.0071	0.0016 ± 0.0020	0	0
链球菌科	0.1412 ± 0.1827	0.0417 ± 0.0365	0	0.03



注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, **** 表示 $P < 0.0001$, $n=8$ 。

图 10 紫菜酶解液对高脂饮食小鼠肠道菌群功能的影响

Fig.10 Effects of the porphyra enzymatic hydrolysate on gut microbial function of high fat diet-fed mice

综上,摄入紫菜复合酶解液可以调节肠道菌群组成,改善肠道细菌脂质代谢功能,从而有助于预防高脂饮食诱导的肥胖。

3 结果与讨论

本研究表明,紫菜多糖酶的使用提高了紫菜的酶解利用率,改善了酶解液的黏度和稳定性。此外,紫菜复合酶解液可有效预防高脂饮食诱导的肥胖,其机制是在转录水平上抑制肝脏脂肪的合成,促进脂肪组织中脂肪水解,进而降低血清脂质水平,减少体脂蓄积。

SCFAs 主要由乙酸组成,可参与调节宿主代谢调节,减少脂肪堆积^[22]。紫菜复合酶解液提高了粪便中 SCFAs(尤其是乙酸和丙酸)的水平。Xu 等^[23]利用坛紫菜多糖作为唯一碳源培养肠道菌群,发现肠道菌群可以降解紫菜多糖,从而促进 SCFAs 合成。由此推测,与紫菜单一酶解液相比,复合酶解液中含有被降解的多糖,更容易被肠道菌群利用,增加了 SCFAs 的产量,从而有助于改善饮食诱导的脂代谢紊乱。

肥胖患者肠道菌群组成会发生显著变化^[24]。紫菜复合酶解液的干预可以降低高脂饮食小鼠肠道内 *F/B* 比例,或许有助于改善宿主的能量代谢^[25]。有研究指出,长期摄入高脂饮食会导致 *Muribaculaceae* 和螺杆菌科丰度降低,而链球菌科丰度增加^[26]。复合酶解液干预有助于提高 *Muribaculaceae* 和螺杆菌科的相对丰度,很可能与饮食诱导肥胖的改善有关^[27]。根据功能预测的结果,紫菜复合酶解液干预可以改善脂代谢相关通路(如“甘油酯代谢”)。Cao 等^[28]研究表明“甘油酯代谢”通路与高脂饮食诱导肥胖的发生密切相关,表明复合酶解液干预可以促进肠道菌群分解、利用脂质。总之,肠道菌群在紫菜复合酶解液改善饮食诱导脂质代谢中发挥了重要的作用。

4 结论

紫菜复合酶解液干预可以改善肠道菌群结构和组成,调节与脂质代谢相关的肠道菌群功能,并且预防高脂饮食诱导的肥胖。后续研究将在复合酶解液的基础上,添加辅料制备紫菜饮料,并进一步探究其生物活性。

参 考 文 献

- [1] RIDAURA V K, FAITH J J, REY F E, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1241-1244.
- [2] 张璇,禹海文,周君,等.浒苔对小鼠营养性肥胖的预防作用[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(11): 42-48.
ZHANG X, YU H W, ZHOU J, et al. Prevention effect of *Enteromorpha prolifera* on nutritionally obese mice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(11): 42-48.
- [3] 沈照鹏,刘蓓,高笑,等.紫菜精素饮料的研制[J]. *食品科技*, 2011, 36(12): 103-107.
SHEN Z P, LIU B, GAO X, et al. Development of laver fine meal drink[J]. *Food Science and Technology*, 2011, 36(12): 103-107.
- [4] 伍宏.紫菜复合功能饮料的研制[D].福州:福建农林大学,2011.
WU H. The development of laver compound functional drink[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2011.
- [5] GONG G, ZHAO J, WANG C, et al. Structural characterization and antioxidant activities of the degradation products from *Porphyra haitanensis* polysaccharides[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 7(11): 9-9.
- [6] 银小倩,梁梅芳,李鹤宾,等.微泡菌 ALW1 昆布多糖酶的酶学性质及其酶解产物的抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 47-52.
YIN X Q, LIANG M F, LI H B, et al. Enzymatic-characterization of laminarinase from *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of its hydrolysates [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 47-52.
- [7] 韩莎莎,黄臻颖,沈照鹏,等.酶法降解坛紫菜多糖及其产物分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(21): 145-149.
HAN S S, HUANG Z Y, SHEN Z P, et al. Enzymatic degradation of polysaccharide from *porphyra haitanensis* and analysis of its products [J]. *Food Science*, 2015, 36(21): 145-149.
- [8] 沈照鹏,孙书娟,崔欣,等.琼胶酶酶解 2 种紫菜及酶解成分分析[J]. *生物加工过程*, 2018, 16(4):

- 107-112.
- SHEN Z P, SUN S J, CUI X, et al. Hydrolysis of two porphyra by agarase and analysis of their hydrolysates [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2018, 16(4): 107-112.
- [9] ZHANG Y Y, CHANG Y G, SHEN J J, et al. Expression and characterization of a novel β -porphyranase from marine bacterium *Wenyingshuangia fucanilytica*: A biotechnological tool for degrading porphyran [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(33): 9307-9313.
- [10] 张玉莹, 常耀光, 申晶晶, 等. *Wenyingshuangia* 属海洋细菌产紫菜多糖酶的克隆表达与性质及其在紫菜复合酶解中的应用 [J]. 水产学报, 2021, 45(7): 1-12.
- ZHANG Y Y, CHANG Y G, SHEN J J, et al. Expression and characterization of a porphyranase from marine bacterium *Wenyingshuangia fucanilytica* and its application in compound enzymolysis of pyropia [J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(7): 1-12.
- [11] 朱涵, 谭莎莎, 杨虹, 等. 丁酸钠对饮食诱导肥胖大鼠的作用 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2015, 41(2): 195-200.
- ZHU H, TAN S S, YANG H, et al. Effect of sodium butyrate on diet-induced obesity in the sprague-dawley rat [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2015, 41(2): 195-200.
- [12] NASSIR F, ADEWOLE O L, BRUNT E M, et al. CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice [J]. Journal of Lipid Research, 2013, 54(11): 2988-2997.
- [13] LI H, DONG M, LIU W, et al. Peripheral IL-6/STAT3 signaling promotes beiging of white fat [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2021, 1868(10): 119080.
- [14] CAO W, WANG C, CHIN Y, et al. DHA-phospholipids (DHA-PL) and EPA-phospholipids (EPA-PL) prevent intestinal dysfunction induced by chronic stress [J]. Food & Function, 2019, 10(1): 277-288.
- [15] 李晶, 张娜, 宋佳, 等. 新琼四糖通过改善肠道微环境对力竭运动小鼠脂质代谢的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(1): 165-171.
- LI J, ZHANG N, SONG J, et al. Neogartetraose protects mice against exhaustive exercise-induced dyslipidemia by modulating gut microbial composition and function [J]. Food Science, 2018, 39(1): 165-171.
- [16] 陆婧婧, 宋月, 岳莹雪, 等. 两株植物乳杆菌联合抑制高脂诱导小鼠肥胖的形成 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 286-290.
- LU J J, SONG Y, YUE Y X, et al. Two *Lactobacillus plantarum* combined to inhibit the formation of obesity induced by high fat in mice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 286-290.
- [17] GRILLO C A, MULDER P, MACHT V A, et al. Dietary restriction reverses obesity-induced anhedonia [J]. Physiology & Behavior, 2014, 10(128): 126-132.
- [18] CHITRAJU C, WALTHER T C, FARESE R V. The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes [J]. Journal of Lipid Research, 2019, 60(6): 1112-1120.
- [19] MORAK M, SCHMIDINGER H, RIESENHUBER G, et al. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) deficiencies affect expression of lipolytic activities in mouse adipose tissues [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(12): 1777-1789.
- [20] CANI P D, VAN HUL M, LEFORT C, et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis [J]. Nature Metabolism, 2019, 1(1): 34-46.
- [21] XU P, MIN L, ZHANG J, et al. Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children [J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 283.
- [22] FERNANDO F, THIBAUT V, MÉLANIE L, et al. Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts [J]. Current Obesity Reports, 2015, 4(4): 389-400.
- [23] XU S, AWEYA J J, LI N, et al. Microbial catabolism of *Porphyra haitanensis* polysaccharides by human gut microbiota [J]. Food Chemistry, 2019, 289(2019): 177-186.
- [24] CHEN G, XIE M, WAN P, et al. Fuzhuan brick tea polysaccharides attenuate metabolic syndrome in

- high-fat diet induced mice in association with modulation in the gut microbiota[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2018, 66(11): 2783–2795.
- [25] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027–1031.
- [26] PETERS B A, SHAPIRO J A, CHURCH T R, et al. A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–13.
- [27] SCHWIERTZ A, TARAS D, SCHÄFER K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects[J]. *Obesity*, 2010, 18(1): 190–195.
- [28] CAO W, CHIN Y, CHEN X, et al. The role of gut microbiota in the resistance to obesity in mice fed a high fat diet[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2020, 71(4): 453–463.

Effect of Complex Enzymatic Hydrolysate of Porphyra on Improving High Fat Diet-induced Obesity and Regulating Intestinal Flora

Cheng Xiaojie, Zhang Yuying, Chang Yaoguang, Xue Changhu, Tang Qingjuan*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong)

Abstract The compound enzymatic hydrolysate of Porphyra (CPEH) was prepared using a novel porphyranase (EC 3.2.1.178) and neutral protease. Then 16S rRNA gene sequencing, gas chromatography and real-time PCR analysis were used to analyze the effects of CPEH on diet-induced obesity (DIO) and gut microbiome in HFD-fed mice. The results suggested that CPEH improved blood lipid levels, alleviated body fat deposition, and reduced adipocyte size. Possibly because CPEH could repress the expression of genes (*DGAT1* and *DGAT2*) related to triglyceride synthesis in liver, and promote gene expression of enzymes (*ATGL* and *HSL*) related to lipolysis in adipose tissue. Furthermore, CPEH promoted the proliferation of beneficial bacteria (Muribaculaceae and Helicobacteraceae) related to obesity and repressed the growth of harmful bacteria (Streptococcaceae). CPEH also regulated the abundance of KEGG pathways associated with lipid metabolism, such as 'Glycerolipid_metabolism'. In summary, CPEH effectively prevented high fat diet-induced obesity and regulated gut microbial composition and function. CPEH has potential to be applied to the development of functional beverage. This study could contribute to the high value application of low valued Porphyra.

Keywords porphyra; compound enzymatic hydrolysate; high fat diet; gut microbiome; lipid metabolism