

4 种红藻的体外模拟消化酵解特性及其抗炎作用

周怡倩¹, 郑明静^{1,2,3}, 洪涛^{1,2,3*}, 朱艳冰^{1,2,3}, 倪辉^{1,2,3}, 姜泽东^{1,2,3}

¹集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021

²福建省食品微生物学与酶工程重点实验室 福建厦门 361021

³厦门市食品生物技术研究中心 福建厦门 361021)

摘要 目的:通过体外模拟消化酵解和细胞炎症模型探究江蓠、红毛藻、麒麟菜和坛紫菜等 4 种经济红藻的消化酵解特性及其抗炎潜力,为红藻的高附加值开发提供依据。方法:通过体外模拟口胃肠消化和结肠发酵,测定 4 种红藻中总糖、还原糖、蛋白质和总酚的去向。利用 16S rRNA 基因 Illumina MiSeq 测序分析红藻对肠道菌群的影响,同时通过高效液相色谱法分析发酵产物中短链脂肪酸的含量,并采用脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型评价 4 种红藻发酵产物的抗炎活性。结果:在口胃肠消化过程中,坛紫菜对碳水化合物、蛋白质及酚类物质具有较好的生物利用度。难以消化的部分到达结肠后充当肠道微生物群的能量来源,其中坛紫菜在发酵过程中产生更多的短链脂肪酸。同时,4 种红藻均表现出调节肠道菌群的能力,包括提高拟杆菌门的丰度,降低厚壁菌门/拟杆菌门的比值。此外,红藻发酵液对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞炎症损伤具有显著抑制作用,红毛藻发酵液具有更好的抑制效果。结论:4 种红藻经模拟消化后有较好的生物可及性,能够调节肠道微生物群,同时表现出较好的抗炎潜力,为基于红藻的高值活性产品的开发提供科学依据。

关键词 红藻;模拟消化;模拟酵解;肠道菌群;抗炎

文章编号 1009-7848(2024)04-0118-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.012

海洋红藻是世界上最大的大型藻类群体,具有重要的经济价值,主要养殖品种有麒麟菜(*Eucheuma muricatum*)、江蓠(*Gracilaria lemaneiformis*)、坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)和红毛藻(*Bangia fusco-purpurea*)等^[1]。红藻中富含的多种膳食营养成分如多糖、蛋白、多酚等对人体健康具有积极的调控作用^[2],包括缓解糖尿病、高血糖、高血脂和心脑血管疾病等慢性疾病^[3-4]。目前研究大多探讨各类红藻提取物的结构和功能特性,而对于红藻在人体消化道中各营养成分的动态变化及其消化酵解产物对人体肠道健康的影响鲜有报道。

体外消化酵解模型是模拟人类消化酵解时的生理条件,研究摄入物质的变化、相互作用以及营养物质生物可及性的有用工具^[5],具有简单灵活、成本低、重现性好等益处^[6]。田雨等^[7]发现坛紫菜作为较好的酚类物质来源,经体外模拟消化后其酚

类物质具有较高的生物可及性和抗氧化活性,且对肠道菌群有明显的调节作用。Shannon 等^[8]报道食用海藻中多糖、多酚等成分经模拟消化后生物利用度提高,经酵解后增加肠道菌群多样性和短链脂肪酸产量。Shen 等^[9]研究发现经体外模拟结肠发酵后,麒麟菜来源的 ι 型卡拉胶和茶多酚混合物可以通过增加有益菌和短链脂肪酸含量减轻肠道炎症反应。综上所述,体外模拟消化酵解模型能够被应用于探究不同红藻的消化酵解特性,为基于海洋红藻的精深加工和高值产品开发利用提供参考。

基于此,本研究利用体外口胃肠消化和结肠发酵模型测定 4 种海洋红藻活性成分的去向,探究不同红藻消化产物对肠道微生态的调节与产生短链脂肪酸的影响。通过脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型评价不同红藻酵解产物的抗炎活性,旨在通过探讨 4 种红藻的体外消化酵解特性及其对肠道健康的促进潜力,为以精准营养为导向的基于红藻抗炎饮食设计和开发提供理论参考。

收稿日期: 2023-08-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972081);福建省自然科学基金面上项目(2023J01774);福建省科技经济融合服务平台项目(B21022)

第一作者: 周怡倩,女,硕士生

通信作者: 洪涛 E-mail: taohong94@jmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

红毛藻 (Ban), 福建莆田市南日岛; 坛紫菜 (Por), 渔礼味水产有限公司 (中国福建); 江蓐 (Gra)、麒麟菜 (Euc), 绿新 (福建) 食品有限公司 (中国福建); 小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 中国科学院细胞库 (National collection of authenticated cell cultures); 其它试剂 (均为分析纯级), 国药集团化学试剂有限公司 (中国上海)。

1.2 仪器与设备

BioTek Cytation-5 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; HERAcell VIOS 160I CO₂ 细胞培养箱, 赛默飞世尔科技公司; YXQ-100S II 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; Avanti J26XP 高速冷冻离心机, 德国贝克曼公司; LC-20AT 高效液相色谱仪, 岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 海藻原料制备 红毛藻、江蓐、麒麟菜和坛紫菜经水洗后, 于烘箱中 60 °C 烘干至恒重, 使用超微粉碎机分别将不同海藻样品粉碎后, 过 100 目筛, 将各样品在 65 °C 下进行巴氏灭菌 30 min, 备用。

1.3.2 模拟上消化道 (口-胃-小肠) 消化 体外消化过程参考 Brodtkorb 等^[10]的方法并略作修改。收集消化过程中不同时间点消化样品, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液储存于 4 °C 下, 以供后续测量, 并于 1 周内分析 4 种海藻的营养物质含量变化。

1.3.3 模拟结肠发酵 体外结肠发酵过程参考 Lopez-Barrera 等^[11]方法并略作修改。在发酵 0, 6, 12, 24 h 时收集样品储存在 -80 °C, 用于后续测定短链脂肪酸 (Short chain fatty acids, SCFAs) 和肠道菌群组成, 每次测试一式 3 份。

1.3.4 总糖和还原糖含量的测定 还原糖含量的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸法^[12], 总碳水化合物含量通过苯酚-硫酸法^[13]测定。

1.3.5 蛋白质含量的测定 蛋白质含量按照 BCA 试剂盒的方法测定, 取 20 μL 的海藻消化上清液于 96 孔板的样品孔中, 向样品孔中加入 200 μL 的 BCA 工作液, 在 37 °C 下孵育 30 min。用酶标仪测定 OD_{562nm} 值。

1.3.6 总酚含量的测定 模拟消化过程中结合的酚类物质是通过福林酚法^[14]测定。使用没食子酸 (0~100 μg/ml) 的标准曲线 $Y = 6.559X + 0.057$ ($R^2 = 0.9974$), 根据标准曲线计算总酚含量。

1.3.7 体外发酵过程中 pH 值和 SCFAs 分析 用 pH 计测定空白组和海藻组在发酵时间为 0, 6, 12, 24 h 的 pH 值。通过高效液相色谱对 SCFAs 的含量进行测量分析。色谱柱: Ultimate LP-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 (40 ± 0.1) °C, 流动相 (A) 磷酸盐缓冲液 (80%, pH 2.86) 和 (B) 乙腈, 流速 0.8 mL/min, 进样 20 μL, UV 紫外光检测器的波长为 210 nm。样品需与 100 μL 10% 浓盐酸充分混合处理, 3 mL 无水乙醚, 萃取 20 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相, 再加入 0.5 mL 1 mol/L NaOH 缓慢摇动 20 min 后离心取水相, 再加入 100 μL 的浓盐酸, 过 0.22 μm 滤膜。使用浓度在 2.5~100 mmol/L 之间的纯 SCFAs (乙酸、丙酸、丁酸、正戊酸、异戊酸) 建立标准曲线, 以定量样品中 SCFAs 的浓度。

1.3.8 肠道微生物群分析 发酵 24 h 后, 将发酵液迅速保存于液氮中, 储存于 -80 °C 的超低温冰箱中。通过 DNA 提取试剂盒的说明书上具体操作步骤提取各酵解液中的 DNA, 使用引物对 16S rRNA 基因的 V3-V4 进行 PCR 扩增^[15], 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的片段长度与浓度。采用 NovaSeq 6000 平台 SP-XP (PE250) 双端测序策略对文库进行测序, 随后进行生物信息学分析。

1.3.9 巨噬细胞的培养和细胞活力的测定 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 的培养是用含 10% 胎牛血清、1 × 双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 的 DMEM 培养基培养, 于 37 °C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 将长至生长对数期的 RAW264.7 细胞以 2 × 10⁴ cells/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后, 用 100 μL 含有不同浓度的 4 种红藻发酵上清液 (12.5, 25, 50, 100 μL/mL) 的培养基再次孵育细胞 4 h, 最后用含 LPS (1 μg/mL) 培养基培养 12 h。弃去每孔上清, 用 1 × 的 PBS 清洗 2 次, 加入 50 μL 的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 30 min。PBS 再次清洗 2 次后, 加入 100 μL 的 DMSO 振荡培养 30 min, 通过酶标仪测定 OD_{570nm} 值, 用下

列公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{OD}_{\text{样品组}} - \text{OD}_{\text{对照组}}}{\text{OD}_{\text{空白组}} - \text{OD}_{\text{对照组}}} \quad (1)$$

式中,样品组——发酵液干预的试验组;对照组——未经干预的试验组;空白组——DMSO的 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 值。

1.3.10 一氧化氮(NO)的测定 将RAW264.7细胞以 2×10^4 cells/孔的密度接种于96孔板中,过夜培养后,分别向贴壁的RAW264.7细胞中加入100 μL 含海藻发酵上清液(终浓度分别为12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$)的生长培养基,空白组和对照组加入100 μL 生长培养基,于培养箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后,再向海藻发酵液处理组和对照组加入LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理12 h。每孔取50 μL 上清液加入100 μL Griess试剂(含3 mol/L 磺胺酸,30 mg/L *N*-1-(萘基)乙二胺二盐酸盐,质量分数为25%冰醋酸)后,室温避光孵育15 min,在波长570 nm处的吸光度计算出上清液中NO浓度。

1.4 统计分析

每次测试重复3次。使用SPSS 25.0软件对结果进行分析,以“平均值 \pm 标准差”表示。利用IBM SPSS Statistics 25进行方差与显著性分析, $P < 0.05$ 被认为是具有统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 体外消化过程中红藻化学成分含量变化

首先,对江蓠、红毛藻、麒麟菜和坛紫菜等4种红藻中的营养物质含量进行测定,结果如表1所示。红毛藻和坛紫菜中多酚含量较高,而麒麟菜和江蓠中总糖含量较高,坛紫菜中蛋白具有较高的蛋白含量。红藻在体外模拟消化过程中总糖和还原糖的变化如表2、3所示,由于口腔消化时间较短,4种海藻在消化5 min内的还原糖含量没有显著变化(表3)。胃肠消化阶段中还原糖含量显著增加($P < 0.05$)这是由于低pH值环境以及胃肠道消化酶的作用所致。

表1 4种红藻中不同营养物质含量

Table 1 Different nutrients content in four red algae

红藻	总酚/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	总糖/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	蛋白质/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	还原糖/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
Gra	0.348 ± 0.015^b	549.065 ± 9.613^b	22.912 ± 0.801^c	11.684 ± 0.326^b
Ban	4.406 ± 0.113^a	270.608 ± 6.936^d	58.929 ± 1.989^b	12.553 ± 0.376^a
Euc	1.326 ± 0.113^b	650.032 ± 10.540^a	9.740 ± 0.717^d	10.054 ± 0.282^c
Por	3.972 ± 0.087^a	447.910 ± 8.174^c	104.166 ± 2.461^a	9.5114 ± 0.094^c

注:不同字母代表4种海藻之间具有显著性差异($P < 0.05$),下同。

表2 模拟消化的不同时间点4种红藻的总糖含量变化

Table 2 Changes of total carbohydrates content of four red algae at different time points during simulated digestion

模拟消化时间/min	总糖/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$			
	Gra	Ban	Euc	Por
口腔消化				
0	0.1203 ± 0.0045^a	0.0893 ± 0.0027^b	0.0367 ± 0.0009^c	0.1152 ± 0.0147^a
5	0.2178 ± 0.0135^a	0.1821 ± 0.0008^b	0.0729 ± 0.0101^c	0.1233 ± 0.0017^c
胃消化				
15	0.8755 ± 0.0202^a	0.5927 ± 0.0059^b	0.4865 ± 0.0756^c	0.4072 ± 0.0078^c
30	0.9748 ± 0.0130^a	0.7489 ± 0.0318^b	0.5322 ± 0.0950^c	0.5148 ± 0.0207^c
60	1.0737 ± 0.0175^a	0.8083 ± 0.0588^b	0.5412 ± 0.0303^c	0.6536 ± 0.0084^c
120	1.2307 ± 0.0084^a	0.8403 ± 0.0134^b	0.5949 ± 0.0439^c	0.7697 ± 0.0186^c
180	1.2901 ± 0.0126^a	0.8560 ± 0.0078^b	0.6210 ± 0.0557^c	0.8628 ± 0.0114^b
小肠消化				
15	1.2925 ± 0.0575^a	0.8680 ± 0.0716^b	0.6961 ± 0.0422^c	0.9662 ± 0.0672^b
30	1.2940 ± 0.1394^a	0.8707 ± 0.0201^{bc}	0.7006 ± 0.0422^c	1.0055 ± 0.0532^b
60	1.3019 ± 0.2005^a	0.8770 ± 0.0140^{bc}	0.7069 ± 0.0451^c	1.0655 ± 0.0096^{ab}
120	1.3236 ± 0.1664^a	0.9066 ± 0.1184^{bc}	0.7227 ± 0.0201^c	1.1307 ± 0.0048^{ab}
180	1.3914 ± 0.1525^a	0.9276 ± 0.1708^b	0.7654 ± 0.0462^b	1.1442 ± 0.2543^{ab}

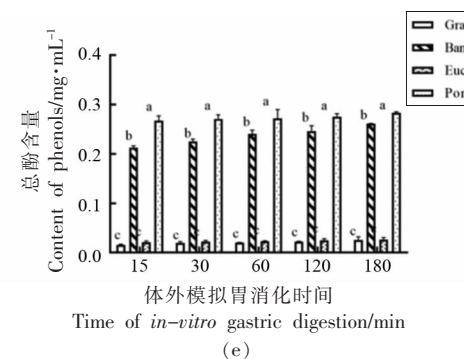
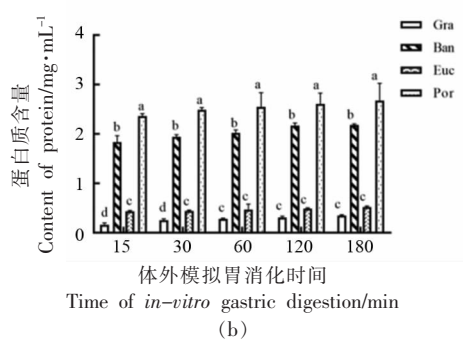
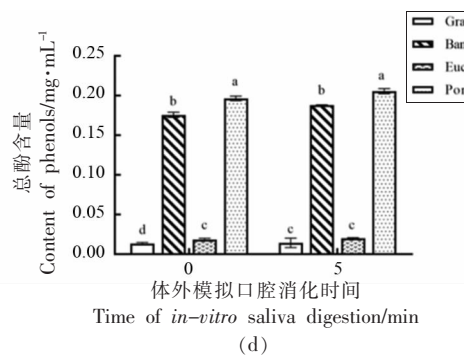
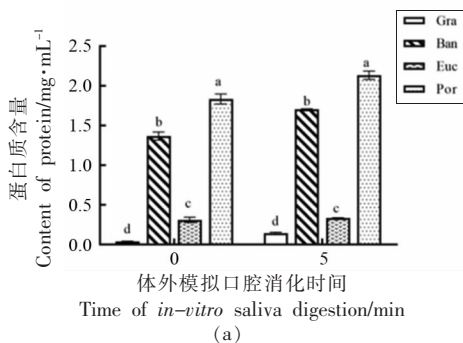
表 3 模拟消化的不同时间点 4 种红藻的还原糖含量变化

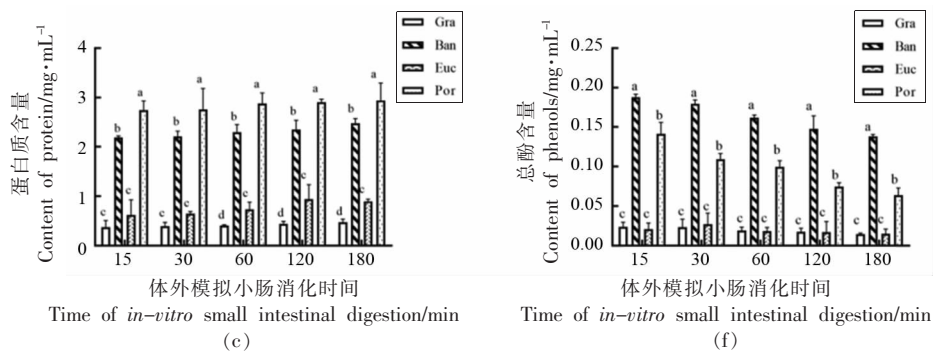
Table 3 Changes in reducing sugar content of four red algae at different time points during simulated digestion

模拟消化时间/min	还原糖/mg·mL ⁻¹			
	Gra	Ban	Euc	Por
口腔消化				
0	0.2936 ± 0.0463 ^a	0.0198 ± 0.0059 ^b	0.0540 ± 0.0332 ^b	0.0356 ± 0.0050 ^b
5	0.3886 ± 0.0565 ^a	0.0274 ± 0.0050 ^b	0.0665 ± 0.0044 ^b	0.0451 ± 0.0144 ^b
胃消化				
15	0.6594 ± 0.0627 ^a	0.0315 ± 0.0111 ^b	0.0880 ± 0.0092 ^b	0.0657 ± 0.0111 ^b
30	0.6627 ± 0.0169 ^a	0.0369 ± 0.0133 ^c	0.0766 ± 0.0104 ^b	0.0728 ± 0.0102 ^b
60	0.6774 ± 0.0831 ^a	0.0532 ± 0.0292 ^b	0.0788 ± 0.0041 ^b	0.0918 ± 0.0061 ^b
120	0.7132 ± 0.0584 ^a	0.0608 ± 0.0126 ^b	0.0853 ± 0.0067 ^b	0.1059 ± 0.0189 ^b
180	0.7741 ± 0.0347 ^a	0.0641 ± 0.0047 ^b	0.0858 ± 0.0241 ^b	0.1173 ± 0.0161 ^b
小肠消化				
15	1.0408 ± 0.0347 ^a	0.2336 ± 0.0107 ^b	0.0891 ± 0.0207 ^c	0.1205 ± 0.0133 ^c
30	1.2787 ± 0.0565 ^a	0.2401 ± 0.0041 ^b	0.0913 ± 0.0148 ^c	0.1260 ± 0.0229 ^c
60	1.4449 ± 0.0055 ^a	0.2412 ± 0.0092 ^b	0.0956 ± 0.0126 ^d	0.1369 ± 0.0236 ^c
120	1.4525 ± 0.0156 ^a	0.2575 ± 0.0324 ^b	0.0967 ± 0.0177 ^d	0.1401 ± 0.0346 ^c
180	1.5014 ± 0.0748 ^a	0.2586 ± 0.0216 ^b	0.1021 ± 0.0363 ^c	0.1499 ± 0.0593 ^{bc}

在消化过程中，红藻的蛋白质释放量均随消化时间延长而增加(图 1),不同红藻的蛋白质消化能力存在显著性差异($P<0.05$)。其中,坛紫菜和红毛藻表现出更好的蛋白质消化能力, 小肠消化后, 坛紫菜中释放的蛋白质含量最高为 2.942 mg/mL,红毛藻次之,为 2.475 mg/mL,江蓼释放的蛋

白质含量最低为 0.470 mg/mL。4 种海藻中酚类物质含量在胃消化阶段显著升高($P<0.05$),这是由于胃环境低 pH 值破坏酚类物质与蛋白质和多糖等物质的结合,从而总酚的释放增加,而经过小肠消化环境时, 酚类物质在较高 pH 值下不稳定导致总酚含量随小肠消化时间延长而减少^[16]。





注:(a~c)蛋白质含量变化;(d~f)总酚含量变化;不同字母代表4种海藻之间具有显著性差异(P<0.05),下同。

图1 模拟消化的不同时间点4种海藻的营养物质含量变化

Fig.1 Changes in nutrient content of four seaweeds at different time points of simulated digestion

2.2 体外发酵过程中红藻对肠道菌群的影响

2.2.1 不同红藻发酵液 pH 值的变化 不同红藻消化产物经体外模拟发酵后发酵液 pH 值的变化如图 2 所示。发酵初期,各组样品的 pH 值均为 7.4。随发酵时间的延长,所有样品的 pH 均显著降低(P<0.05)。江蓠、红毛藻、麒麟菜、坛紫菜组在发酵 24 h 后 pH 值分别降低至 6.70±0.02 (ΔpH=0.70), 6.79±0.02 (ΔpH=0.61), 6.74±0.02 (ΔpH=0.66), 6.77±0.01 (ΔpH=0.63)。江蓠在各发酵时间点的 pH 值降低程度均显著低于其它 3 种红藻 (P<0.05),表明江蓠可能更容易被肠道菌群利用。结肠环境中的 pH 值降低可能与海藻中营养物质被肠道菌群降解利用产生 SCFAs 等酸性代谢产物有关^[7],同时有研究表明弱酸性的环境可以促进肠道有益菌的生长,并且抑制有害菌的增殖^[18]。

2.2.2 不同红藻发酵液中短链脂肪酸含量的变化

图 3 反映了红藻在结肠发酵过程中短链脂肪酸的产量,4 种红藻组的总 SCFAs 含量显著高于空

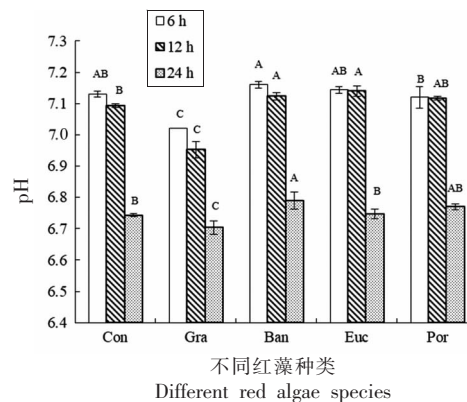
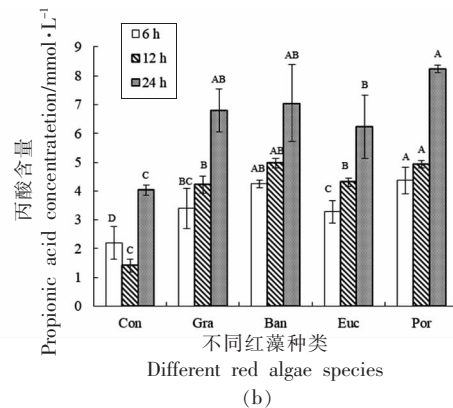
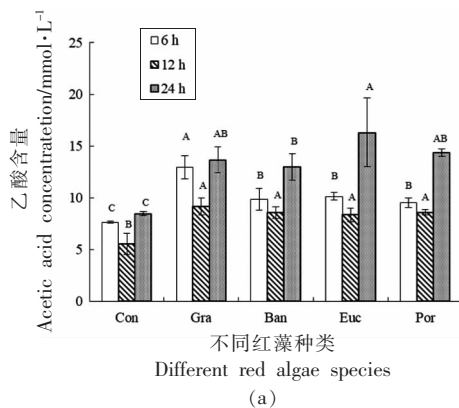


图2 模拟结肠发酵过程中的 pH 值变化

Fig.2 Changes of pH during simulated colonic fermentation

白组 (P<0.05),表明 4 种红藻在发酵过程中均能被肠道菌群发酵利用,主要产生的 SCFA 为乙酸、丙酸和异戊酸。结肠发酵 6 h 时,江蓠产生的乙酸和总短链脂肪酸最高,为 12.96 mmol/L 和 20.65 mmol/L,显著高于其它红藻组与空白组 (P<0.05),



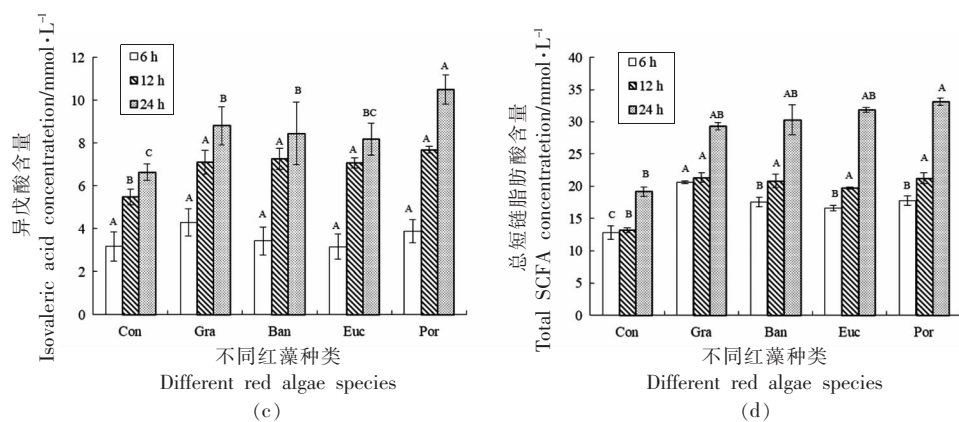


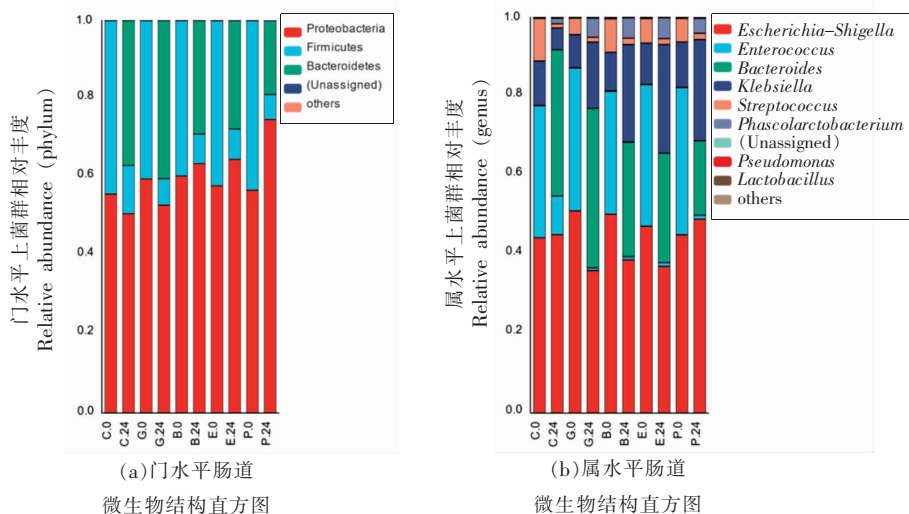
图 3 模拟结肠发酵过程中 SCFA 的变化

Fig.3 Changes of SCFA content during colonic fermentation

结肠发酵 24 h 后,肠道菌群利用坛紫菜发酵产生异戊酸及丙酸含量最高, 达到 10.51 mmol/L 和 8.24 mmol/L,显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。这表明坛紫菜中活性物质在结肠发酵过程中能够更好的被肠道微生物菌群利用, 具有更高的生物可及性,因此产生更多的短链脂肪酸。

2.2.3 不同红藻对肠道微生物组成变化的影响
为进一步研究 4 种红藻消化产物在模拟酵解过程中对微生物组成的影响,分析了发酵前与发酵 24 h 后不同水平下的菌群特征。从门水平上看,肠道菌群的组成主要分为变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 这 3 个门类,其中厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌门(图 4a)。随着发酵时间的延长,4 种红藻发酵液中拟

杆菌门的丰度显著增加 ($P < 0.05$),厚壁菌门的丰度显著减低 ($P < 0.05$),厚壁菌门/拟杆菌门的比值降低,说明 4 种红藻均能调整肠道菌群稳态。结合图 4c 显示出江蓠具有最好的肠道菌群稳态调节能力,其次是红毛藻和麒麟菜。从属水平上看(图 4b),埃希氏菌属 (*Escherichia*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、是发酵后的核心微生物,其中拟杆菌属、埃希氏菌在海藻发酵中占主导地位,结合图 4d,发酵 24 h 后拟杆菌属和考拉杆菌属的丰度显著增加 ($P < 0.05$),且 4 种海藻组显著高于空白组 ($P < 0.05$),红毛藻组的考拉杆菌属丰度最高。有研究表明,考拉杆菌属是影响人的胖瘦、减肥效果以及维持肠道菌群动态平衡的核心菌属。



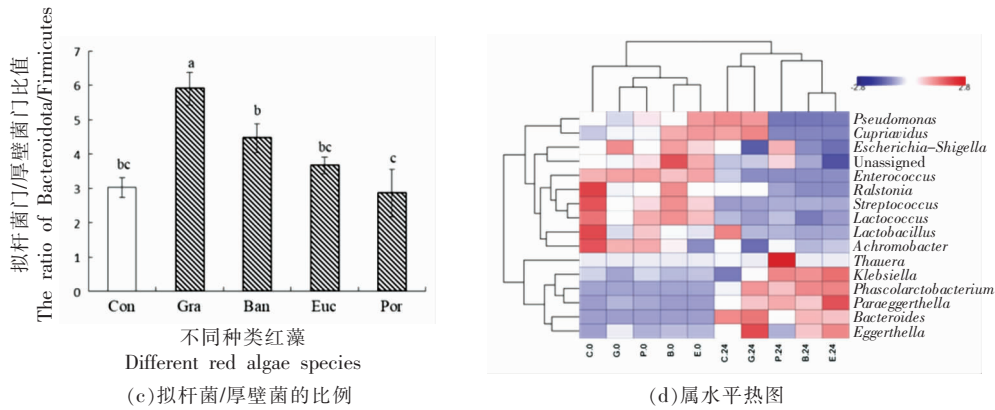


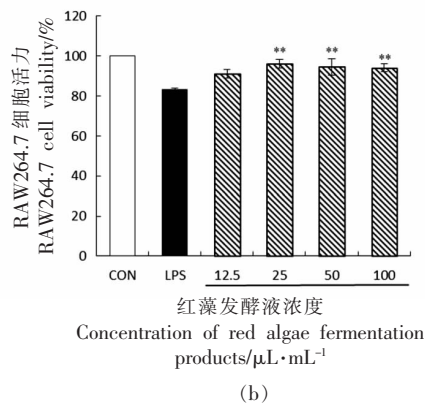
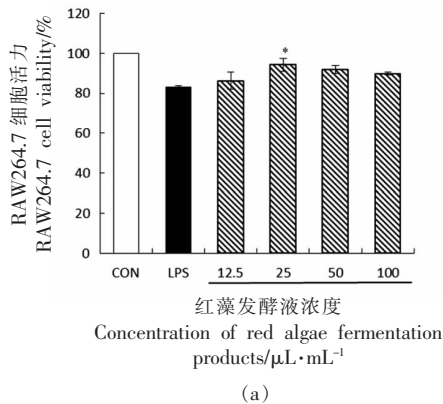
图4 肠道微生物群落结构

Fig.4 Structure of gut microbial community

2.2.4 4种红藻发酵液对 RAW 264.7 细胞活力和 NO 生成的影响 4种红藻发酵液对 LPS 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞的细胞活力和炎症标志物 NO 的影响如图 5 所示。与空白组相比,经 LPS 刺激的对照组细胞活力显著降低至 83.13% ($P < 0.05$),表明 LPS 对 RAW264.7 细胞增殖有抑制作用。添加红藻发酵液进行干预处理后,RAW264.7 的细胞活力显著高于对照组 ($P < 0.05$),4 种红藻在 12.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度下的细胞活力高于 LPS 诱导的对照组。在 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 下,红毛藻发酵液促进 LPS 诱导细胞炎症损伤后的细胞活力,为 94.68%,其次为麒麟菜和江蓠发酵液,细胞活力分别为 94.68% 和 94.37%。50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度下细胞活力开始降低,而所有处理均显示出高细胞活力 ($>85\%$),表明红藻发酵液能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活

力降低。

红藻发酵液对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞产生 NO 的影响如图 6 所示。与空白组 NO 水平为 1.79 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 相比,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激 RAW264.7 细胞内 NO 水平显著增加到 38.12 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ($P < 0.05$),表明 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 能够诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应。添加红藻发酵液后,细胞内 NO 水平明显低于对照组,且细胞内 NO 产生量随着样品浓度的增加而呈下降趋势 ($P < 0.05$)。发酵液浓度为 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,红毛藻抑制细胞产生 NO 浓度最低,为 10.17 $\mu\text{mol}/\text{L}$,其次为麒麟菜和坛紫菜,分别为 11.45 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 11.53 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。这一结果表明,海藻发酵液能够通过抑制 LPS 诱导细胞产生 NO 从而抑制细胞炎症,且红毛藻发酵液对于细胞炎症的抑制作用最好。



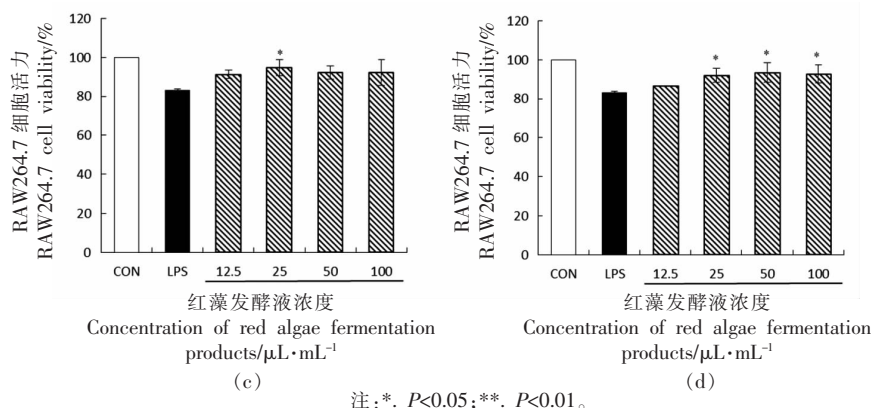


图 5 海藻发酵液对 RAW 264.7 细胞活力的影响

Fig.5 Effect of seaweed fermentation products on cell viability of RAW 264.7

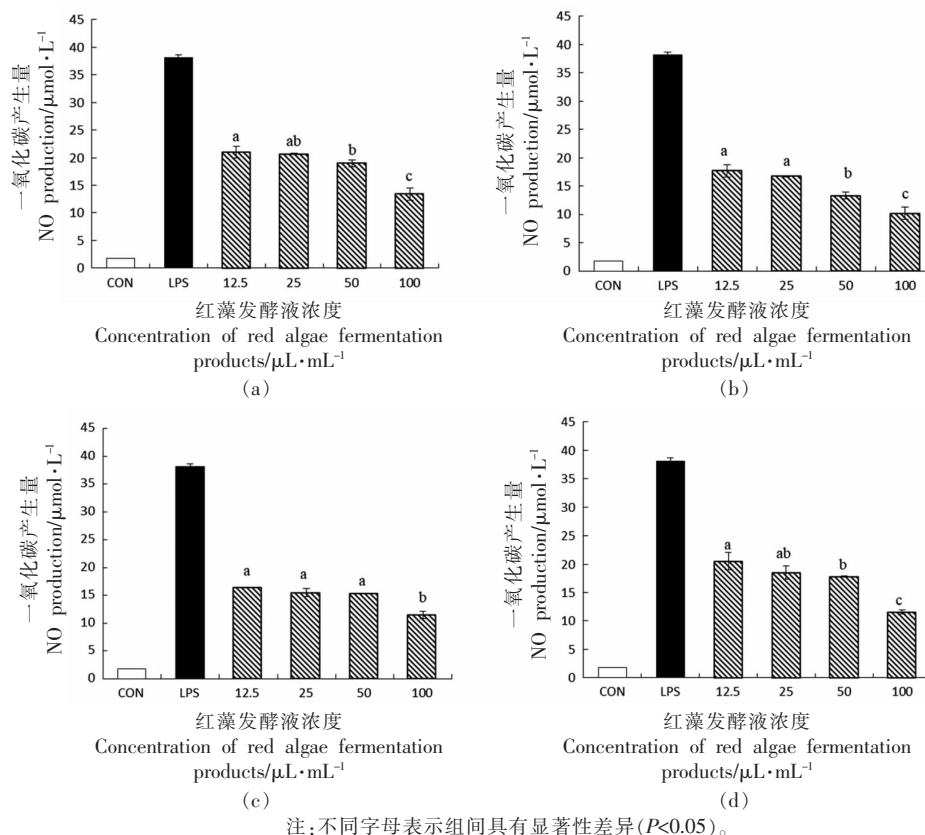


图 6 海藻发酵液对 RAW 264.7 细胞 NO 生成的影响

Fig.6 Effect of seaweed fermentation products on NO production of RAW 264.7

3 讨论

研究表明, 消化道中的酶作用于海藻多糖及膳食纤维后, 产生具有益生元潜力的消化产物能促进人体肠道健康^[19]。根据图 1 显示, 由于胃蛋白酶以及低 pH 值环境的作用, 4 种红藻在胃消化阶段的营养活性成分释放量最高。坛紫菜与红毛藻

组蛋白含量分别为 104.17 mg/g 与 58.93 mg/g 显著高于麒麟菜与江蓠, 因此在体外模拟消化过程中, 坛紫菜表现出更好的蛋白消化能力。坛紫菜和红毛藻在口胃肠消化过程中, 释放出的多酚含量显著高于麒麟菜和江蓠 ($P < 0.05$), 然而在模拟消化过程中产生的多酚含量较少, 这可能与红藻中

的酚类物质主要在结肠发酵过程中代谢并产生对人类健康相关的不饱和脂肪酸相关^[20]。

肠道微生物群有助于保持宿主代谢的稳态^[21], SCFAs 是食物经肠道菌群酵解后产生的代谢产物,其产生受到饮食与肠道微生物组相互作用的影响^[22]。4种红藻发酵产生的 SCFA 含量如图3所示,主要包括乙酸、丙酸和异戊酸,乙酸为红藻发酵中产生的主要短链脂肪酸。体系中未检测出丁酸,可能是因为丁酸含量未达到检出限。4种红藻产生短链脂肪酸的含量均显著高于空白组,表明红藻对结肠中短链脂肪酸的产生有积极作用。江蓼、红毛藻、麒麟菜、坛紫菜在进行结肠发酵24h后,乙酸的含量分别是空白组的1.61,1.53,1.92,1.70倍。结肠发酵24h后,坛紫菜组的总短链脂肪酸含量最高,为33.13 mmol/L,在24h后达到空白组的1.73倍。乙酸已被证实能防止LPS引起的肠道屏障损伤,以及恢复炎症诱导的屏障通透性破坏,从而在上皮屏障发挥保护作用^[23],高浓度的乙酸可以防止体重增加、内脏脂肪堆积和肥胖^[24]。丙酸能够减少葡萄糖堆积,促进脂肪酸氧化^[25],从而通过调节FFA3通路保护肝脏^[26]。

结肠发酵阶段的微生态环境是由大量生活在胃肠道中的菌群组成的,海藻中活性成分可以被肠道微生物群利用,从而产生有益作用,增强有益细菌的生长,抑制有害微生物群^[27]。临床研究表明,肥胖个体的胰岛素水平低,拟杆菌门/厚壁菌门比值小^[28]。结合图4可以看出,江蓼和红毛藻可能通过增加拟杆菌门丰度、降低厚壁菌门的丰度从而具有较好的抑制肥胖效果。拟杆菌属可以通过Wood-Ljungdahl通路和丙酮酸脱羧途径生成乙酰辅酶A,从而产生乙酸^[29-30],这与4种红藻发酵液中乙酸含量的增加一致。同时,4种海藻发酵后均检测到考拉杆菌属的丰度增加,研究证明考拉杆菌属可以利用琥珀酸与丙酮酸产生短链脂肪酸,为其它有益菌的生长繁殖提供能量^[31]。

MTT法能够检测活细胞线粒体脱氢酶活性,从而反应活细胞数量和细胞活力^[32]。结果表明,随着海藻发酵液浓度的增加,RAW264.7细胞的细胞活力均显著高于对照组,当海藻发酵液浓度为25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,红毛藻发酵液对细胞活力的影响最大。RAW264.7巨噬细胞在LPS存在下,释放的细

胞因子在炎症反应中发挥着关键作用^[33]。其中,一氧化氮作为炎症介质广泛分布于各种组织和器官中,在机体免疫和维持机体稳态中起着重要作用^[34-35]。LPS诱导RAW264.7细胞的NO产生增加,红藻发酵液能够降低细胞产生NO,其中红毛藻发酵液抑制细胞产生NO效果最好。

4 结论

本研究利用体外模拟消化酵解模型对4种红藻的消化酵解特性进行研究,并利用LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型探究红藻发酵液对细胞炎症的影响。结果表明,4种红藻在体外模拟消化过程中,坛紫菜对碳水化合物、蛋白质及酚类物质表现出较好的生物利用度。在体外模拟酵解过程中,不同红藻消化液对肠道菌群组成均有显著性影响,包括降低厚壁菌门/拟杆菌门的比例,提高拟杆菌属和考拉杆菌属的丰度等。红毛藻发酵产生的代谢产物在LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型中通过抑制NO的产生表现出较强的抗炎潜力。综上所述,坛紫菜对营养物质消化过程中及短链脂肪酸的产生表现出较好的生物可利用性,红毛藻经结肠发酵后对LPS诱导的细胞炎症抑制作用最好。本研究从消化酵解特性的角度为4种红藻的肠道健康促进潜力提供科学依据,并为基于红藻的抗炎饮食设计开发提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] WANG X L, HE L W, MA Y C, et al. Economically important red algae resources along the Chinese coast: History, status, and prospects for their utilization[J]. *Algal Research -Biomass Biofuels and Bioproducts*, 2020, 46: 101817.
- [2] OVERLAND M, MYDLAND L T, SKREDE A. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(1): 13-24.
- [3] ALVES C, SILVA J, PINTEUS S, et al. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 777.
- [4] TANNA B, MISHRA A. Metabolites unravel nu-

- traceutical potential of edible seaweeds: An emerging source of functional food[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(6): 1613–1624.
- [5] KUMARI P, UJALA, BHARGAVA B. Phytochemicals from edible flowers: Opening a new arena for healthy lifestyle [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 78: 104375.
- [6] 矫春娜, 张健, 刘芳, 等. 体外模拟消化在水产品营养活性物质研究中的应用进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(8): 421–428.
- JIAO C N, ZHANG J, LIU F, et al. Research progress on the application of *in vitro* digestion model in nutritional active substances of aquatic products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(8): 421–428.
- [7] 田雨, 郭莹莹, 李娜, 等. 体外消化和结肠发酵对不同采收期坛紫菜中酚类物质生物可及性和肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(20): 157–164.
- TIAN Y, GUO Y Y, LI N, et al. Effects of digestion and colonic fermentation *in vitro* on bioaccessibility of phenolic compounds in *Porphyra haitanensis* harvested at different times and effect of *Porphyra haitanensis* on gut microbiota [J]. *Food Science*, 2022, 43(20): 157–164.
- [8] SHANNON E, CONLON M, HAYES M. Seaweed components as potential modulators of the gut microbiota[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(7): 358.
- [9] SHEN S Q, YANG W Q, LI L J, et al. *In vitro* fermentation of seaweed polysaccharides and tea polyphenol blends by human intestinal flora and their effects on intestinal inflammation [J]. *Food & Function*, 2023, 14(2): 1133–1147.
- [10] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion [J]. *Nature Protocols*, 2019, 14(4): 991–1014.
- [11] LOPEZ-BARRERA D M, VAZQUEZ-SANCHEZ K, LOARCA-PINA M G, et al. Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators *in vitro* [J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 282–290.
- [12] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 31(3): 426–428.
- [13] MECOZZI M. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005, 79(1): 84–90.
- [14] ZHANG L, WU T, ZHANG Y L, et al. Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro* [J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134111.
- [15] LI Z T, HU G A, ZHU L, et al. *In vitro* digestion and fecal fermentation of highly resistant starch rice and its effect on the gut microbiota[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361: 130095.
- [16] LI X J, GUO R, WU X J, et al. Dynamic digestion of tamarind seed polysaccharide: Indigestibility in gastrointestinal simulations and gut microbiota changes *in vitro* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 239: 116194.
- [17] MA G X, XU Q, DU H J, et al. Characterization of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* during simulated gastrointestinal digestion and fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131303.
- [18] SLAVIN J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits[J]. *Nutrients*, 2013, 5(4): 1417–1435.
- [19] WANG L, LIN X, ZHANG J C, et al. Extraction methods for the releasing of bound phenolics from *Rubus idaeus* L. leaves and seeds [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 135: 1–9.
- [20] AIRANTHI M K, HOSOKAWA M, MIYASHITA K. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(1): C104–C111.
- [21] PERON G, HIDALGO-LIBERONA N, GONZALEZ-DOMINGUEZ R, et al. Exploring the molecular pathways behind the effects of nutrients and dietary polyphenols on gut microbiota and intestinal permeability: A perspective on the potential of metabolomics and future clinical applications[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(7): 1780–1789.
- [22] MORRISON D J, PRESTON T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *GUT MICROBES*, 2016, 7(3): 189–200.
- [23] LEE C, KIM B G, KIM J H, et al. Sodium butyrate inhibits the NF- κ B signaling pathway

- and histone deacetylation, and attenuates experimental colitis in an IL-10 independent manner[J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 51: 47-56.
- [24] ABREU Y A A, MILKE-GARCIA M P, ARGUELLO-AREVALO G A, et al. Dietary fiber and the microbiota: A narrative review by a group of experts from the Asociacion Mexicana de Gastroenterologia[J]. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*, 2021, 86(3): 287-304.
- [25] PEREDO -LOVILLO A, ROMERO -LUNA H E, JIMENEZ-FERNANDEZ M. Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism[J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109473.
- [26] FERNÁNDEZ J, REDONDO-BLANCO S, GUTIÉRREZ-DEL-RÍO I, et al. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 25: 511-522.
- [27] CIAN R E, DRAGO S R, DE MEDINA F S, et al. Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 5358-5383.
- [28] LIU Y T, DUAN X Y, DUAN S Q, et al. Effects of *in vitro* digestion and fecal fermentation on the stability and metabolic behavior of polysaccharides from *Craterellus cornucopioides*[J]. *Food & Function*, 2020, 11(8): 6899-6910.
- [29] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [30] AKHTAR M, CHEN Y, MA Z Y, et al. Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation[J]. *Animal Nutrition*, 2022, 8: 350-360.
- [31] YANG X Y, JIANG W H, CHENG J L, et al. Reductions in intestinal taurine-conjugated bile acids and short-chain fatty acid-producing bacteria might be novel mechanisms of type 2 diabetes mellitus in otsuka long-evans tokushima fatty rats[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2022, 130(4): 237-247.
- [32] XIONG L, OUYANG K H, JIANG Y, et al. Chemical composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide and inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 107: 1898-1907.
- [33] OISHI Y, MANABE I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration [J]. *International Immunology*, 2018, 30(11): 511-528.
- [34] ZHEN D, XUAN T Q, HU B Q, et al. Pteryxin attenuates LPS-induced inflammatory responses and inhibits NLRP3 inflammasome activation in RAW264.7 cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 284: 114753.
- [35] HUANG Y Y, WANG Y H, XU J W, et al. Propacin, a coumarinolignoid isolated from durian, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages through the MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Food & Function*, 2020, 11(1): 596-605.

***In Vitro* Simulated Digestive and Fermentation Properties of Four Kinds of Red Algae and Their Anti-inflammatory Effect**

Zhou Yiqian¹, Zheng Mingjing^{1,2,3}, Hong Tao^{1,2,3*}, Zhu Yanbing^{1,2,3}, Ni Hui^{1,2,3}, Jiang Zedong^{1,2,3}

⁽¹⁾College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian

⁽²⁾Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian

⁽³⁾Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, Fujian)

Abstract Objective: The aim of this study was to explore the digestive and fermentation properties of four economic red algae, including *Gracilaria lemaneiformis*, *Bangia fusco-purpurea*, *Eucheuma muricatum* and *Porphyra haitanensis*. Additionally, the anti-inflammatory potential of their fermentation products was evaluated, so as to provide evidences for the high value-added development of red algae. Methods: The changes of total carbohydrates, reducing sugars, proteins and

total phenols in four red algae were determined by simulating oral and gastrointestinal digestion and colonic fermentation *in vitro*. The effects of red algae on intestinal microbiota were analyzed by Illumina MiSeq sequencing of 16S rRNA gene. The content of short-chain fatty acids in fermentation products was analyzed by high performance liquid chromatography. The anti-inflammatory activity of different fermentation products was evaluated by LPS-induced RAW264.7 cell model. Results: During *in vitro* simulated digestion, *Porphyra haitanensis* exhibited better bioavailability of carbohydrates, proteins and phenolics. The indigestible portion of these red algae reached the colon and were fermented by the intestinal microbiota. *Porphyra haitanensis* produced more short-chain fatty acids during fermentation, while all four red algae showed the ability to regulate the intestinal flora, increase the abundance of *Bacteroidetes* and decrease the ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes*. All fermentation products exhibited significant inhibitory effect on LPS-induced inflammatory injury in RAW264.7 cells, and the *Bangia fusco-purpurea* fermentation product had a better inhibitory effect than others. Conclusion: Four red algae exhibited good bioaccessibility after *in vitro* simulated digestion. They were able to modulate the intestinal microbiota composition and showed potential anti-inflammatory activity. These results provided a basis for the development of high-value active products based on red algae.

Keywords red algae; simulated digestion; simulated fermentation; gut microbiota; anti-inflammatory