枸杞多糖体外调节人体肠道菌群的功能研究

关天越[1]，任怡琳[1,2]，管祺杰[3]，史劲松[1]，许正宏[3]，耿 燕[*1]
(1. 江南大学 生命科学与健康工程学院 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学附属医院 消化内科，江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘要：为研究枸杞多糖(LBP)对人体肠道菌群结构和代谢产物的影响，对6名健康人的粪便提取物进行单独样本与混合样本的体外模拟厌氧发酵，利用16S rRNA基因高通量测序技术对发酵后肠道菌群进行结构和功能分析，并利用超高效液相色谱(UPLC)检测发酵液中的短链脂肪酸(SCFAs)浓度。结果表明，LBP能够明显改变人体肠道菌群结构与功能，提高肠道菌群中益生菌乳酸杆菌属与双歧杆菌属的丰度，并促进了SCFAs的产生。因此，LBP能够显著影响人体肠道菌群结构与功能。

关键词：枸杞多糖；肠道微生物；体外发酵；短链脂肪酸
中图分类号：R 285.5　**文章编号**：1673-1689(2023)09-0074-08　DOI：10.12441/spyswjs.20211211001

Study on the Function of *Lycium barbarum* Polysaccharide in Regulating Human Gut Microbiota *in vitro*

GUAN Tianyue[1]，*REN Yilin*[1,2]，*GUAN Qijie*[3]，*SHI Jinsong*[1]，*XU Zhenghong*[3]，*GENG Yan*[*1]
(1. School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214122, China;3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This study investigated the effects of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) on the structure and metabolites of the human gut microbiota. The individual and mixed samples of fecal extracts from six healthy individuals was subjected to anaerobic fermentation *in vitro*. The structure and function of gut microbiota after LBP fermentation were analyzed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing. The concentration of short-chain fatty acids(SCFAs) in the fermentation broth was detected by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC). The results demonstrated that LBP significantly changed the structure and function of human gut microbiota, increasing the abundance of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in gut microbiota while promoting the production of SCFAs. Consequently, LBP can markedly modulate the structure and function of human gut microbiota.

收稿日期：2021-12-11　**修回日期**：2022-03-31
基金项目：国家自然科学基金项目(31970746)；宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BCF01031)；宁夏回族自治区科技厅柔性引进“宁夏特色农产品生物加工创新团队”项目(kjt201701)；江苏高校“青蓝工程”项目。
*通信作者：耿 燕(1984—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事生物活性物质筛选及分子药理等研究。
E-mail：gengyan@jiangnan.edu.cn

Keywords: *Lycium barbarum* polysaccharide, gut microbiota, *in vitro* fermentation, short-chain fatty acids

枸杞是茄科、枸杞属植物,是我国传统的药食两用植物,其中栽培范围最广的宁夏枸杞,主要分布在我国西北地区[1]。枸杞果实是人们日常食用的主要部分[2-3]。枸杞多糖(LBP)是从果实中提取的枸杞最主要活性成分,具有广泛的药理学作用,包括抗氧化、抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤、保护肝脏、降血脂等功能[4-6]。多糖作为一种大分子活性物质往往不能在胃与小肠处分解,需经肠道菌群的分解才能被人体利用[7]。人体内肠道微生物能够协助宿主完成大量的生理生化功能,被称为人体的另一大器官[8],其数量约为人体细胞数量的 10 倍。因此,研究枸杞多糖对人体肠道菌群结构和功能的影响对探究枸杞多糖的药理活性具有重要的价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与主要仪器

枸杞粗多糖:百瑞源公司产品;AKTA 蛋白质纯化系统、DEAE-Sepharose Fast Flow 10/16 柱、Sephadex G-75 葡聚糖凝胶柱:美国 GE 公司产品;UPLC 系统(LC-30A):日本岛津公司产品。

1.2 枸杞多糖的制备

将购置的枸杞粗多糖溶于蒸馏水中,并不断搅拌使多糖充分溶解,使最终料液质量体积比为 1 g:5 mL,设置提取温度为 50 ℃,提取时间为 120 min,过滤浓缩后加入乙醇,多糖溶液与乙醇溶液体积比为 1:4,并在 4 ℃的条件下静置过夜,溶液离心取沉淀干燥后得实验用枸杞粗多糖[9-10],再应用 Sevage 法除蛋白质。使用氯仿、正丁醇试剂以 4:1 的体积比配制 Sevage 溶液,Sevage 溶液与糖溶液以 1:1 的体积比混合,搅拌 4 h 后,上层溶液为多糖溶液,中间层为蛋白质层,下层溶液为有机试剂,重复此操作 3 次至中间层无蛋白质析出[11]。再对上层多糖溶液进行脱色处理,将大孔树脂置于大烧杯中,使乙醇完全浸没树脂,并不断搅拌,以除去气泡,使之充分混合,静置 24 h;之后对树脂进行水洗、酸洗、碱洗;大孔树脂洗净后,以大孔树脂和多糖溶液 1:20 的体积比加入多糖溶液,搅拌 1 h,抽滤回收滤液,滤液冷冻干燥后,进行下一步纯化。

1.3 枸杞多糖的纯化

使用 AKTA 蛋白质纯化系统对多糖进行纯化处理[12-13]。首先使用离子交换柱进行分离,分离柱选择 DEAE-Sepharose Fast Flow 10/16 柱,超纯水(A 洗脱液)和 1 mol/L NaCl 溶液(B 洗脱液)作为流动相进行梯度洗脱,自动收集器进行收集。用苯酚-硫酸法测定溶液中多糖的质量浓度,绘制对应的洗脱曲线,并合并同一洗脱峰下的各管洗脱液,旋蒸浓缩并冷冻干燥,得到不同组分的洗脱样品[14]。之后利用相对分子质量差异对已分离出的各组分再次进行分离纯化,纯化柱选择 Sephadex G-75 葡聚糖凝胶柱,使用 0.1 mol/L NaCl 溶液作为流动相进行洗脱,使用自动收集器收集流出液。用苯酚-硫酸法测定多糖的质量浓度,并绘制对应的洗脱曲线,合并同一洗脱峰下的各管洗脱液,旋蒸浓缩,透析 48 h,每 12 h 更换超纯水,之后冷冻干燥得到纯化后的枸杞多糖样品。

1.4 体外模拟厌氧发酵

取 6 名在 3 个月内未接受抗生素治疗的健康人(男女志愿者各 3 人)粪便样本,在 PBS 溶液中离心重悬,制备成肠道菌群种子进行体外模拟厌氧发酵。本实验已通过江南大学医学院伦理审核(JNU20210618IRB19)。厌氧发酵培养基为 8.0 g/L 可溶性淀粉、4.5 g/L 酵母抽提物、3.0 g/L 胰蛋白胨、3.0 g/L 蛋白胨、0.4 g/L 胆盐 3 号、0.8 g/L *L*-半胱氨酸盐、0.5 g/L 三氯化铁红霉素、4.5 g/L 氯化钠、2.5 g/L 氯化钾、0.45 g/L 六水合氯化镁、0.2 g/L 六水合氯化钙、0.4 g/L 磷酸二氢钾、1.0 mL/L 吐温 80 和 2.0 mL/L 微量元素溶液,调节 pH 至 6.5,121 ℃灭菌 20 min。在厌氧发酵瓶中静置 48 h 后进行接种,其中,多糖组枸杞多糖加入量为 2 g/L。空白对照的厌氧发酵瓶与加入枸杞多糖的厌氧发酵瓶分别为 9 个,接种的菌种种子分别为 6 名志愿者提供的单独样本与 6 名志愿者样本经混合后的等微生物量的 3 个混合样本。其中,空白对照组为 CTRL 组、混合种子空白对照组为 CTRLMIX 组、枸杞多糖组为 LBP

组、混合种子枸杞多糖组为 LBPMIX 组。CTRL 空白对照组与 LBP 枸杞多糖组皆为 6 名志愿者的样本单独放入厌氧发酵瓶进行发酵(n=6)。CTRLMIX 混合种子空白对照组与 LBPMIX 混合种子枸杞多糖组,皆为 6 名志愿者的样本经混合后等微生物量加入厌氧发酵瓶中发酵 (n=3)。总空白对照组为 TCTRL 组,总枸杞多糖组为 TLBP 组(n=9)。

1.5 发酵液短链脂肪酸的测定

取接种后的肠道微生物体外模拟厌氧发酵液,于 1 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液并经 0.22 μm 滤膜过滤后 4 ℃保存。参照文献[15]通过 UPLC 系统测定发酵液中的短链脂肪酸浓度, 色谱柱为 InertSustain AQ-C_{18}(150 mm×2.1 mm,1.9 μm),流量 0.5 mL/min,检测波长 210 nm,柱温 40 ℃,进样量 10 μL。洗脱液 A 液为 20 mmol/L 的 NaH_2PO_4 溶液,B 液为乙腈。UPLC 的洗脱程序为 0 min 时 A 液体积分数为 95%, 在 10 min 时 A 液体积分数线性下降至 60%,之后不变至 12 min,分析程序结束。

1.6 16S rRNA 基因高通量测序与数据统计学分析

选择菌群 16S rRNA 基因的测序区域为 V3~V4 区。取微生物基因组 DNA 样品与对应的融合引物配制 PCR 反应体系,设置 PCR 反应参数进行扩增,之后使用 Agencourt AMPure XP 磁珠对扩增产物纯化, 纯化后完成 cDNA 文库的建立。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入片段大小,使用 HiSeq 平台测序。应用 DADA2 聚类方法, 通过去噪的序列,并以 100%的相似度聚类生成 ASV 序列。

两组之间显著性差异比较应用 Wilcox Test 方法,3 组及以上比较用 Kruskal Test 方法,当 P<0.05 时表示实验具有统计学差异。通过华大基因公司的微生物扩增子系统 (http://meta.bgi.com) 分析处理 16S rRNA 基因测序数据。并应用 GraphPad Prism 8.0 进行绘图与统计学分析。16S rRNA 基因测序数据汇交至国家微生物科学数据中心数据库(https://nmdc.cn/)。生物项目正式编号为 NMDC10017931,生物样本正式编号为 NMDC20029604。

2 结果与分析

2.1 枸杞多糖对肠道微生物群落多样性的影响

经 AKTA 蛋白质纯化系统纯化得到了 LBP(见图 1 和图 2)。利用人体肠道菌群体外发酵体系及 16S rRNA 基因扩增子测序, 研究 LBP 对肠道微生物群落多样性的影响。首先利用 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数来判断 LBP 对肠道微生物的 α-多样性的影响。如图 3 所示,LBP 组和 LBPMIX 组的 Chao1 指数与 ACE 指数均显著上升(P<0.05),Shannon 指数也呈上升趋势,Simpson 指数则呈下降趋势。以上结果表明 LBP 能够明显提高肠道菌群的多样性。

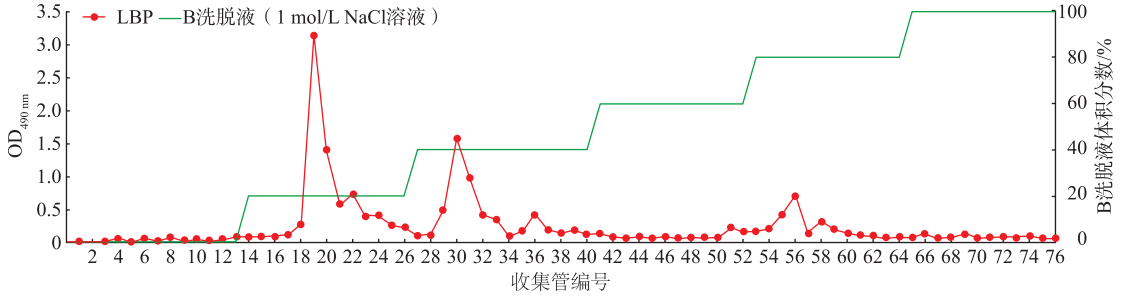


图 1 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱色谱分离

Fig. 1 Chromatographic separation of DEAE-Sepharose Fast Flow ion exchange column

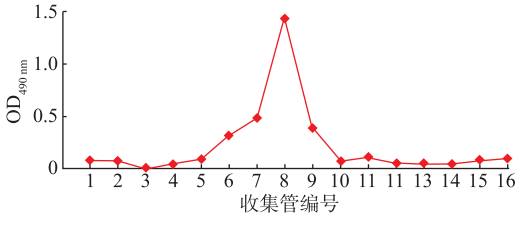
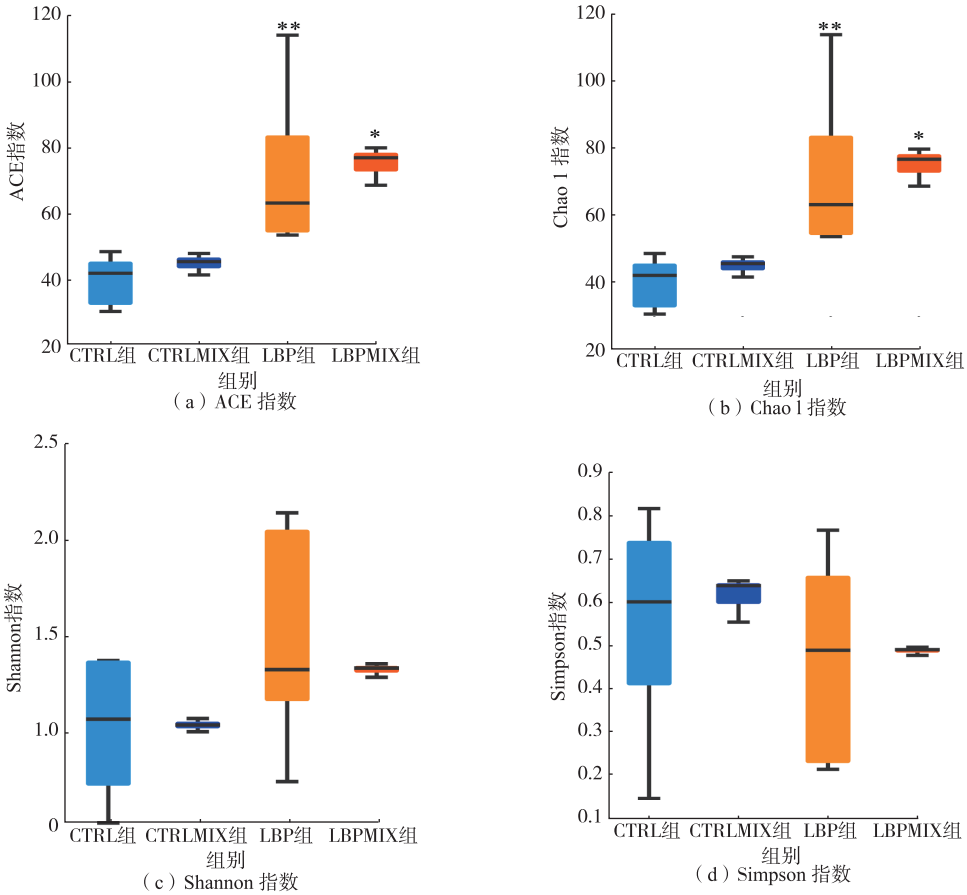


图 2 Sephadex G-75 葡聚糖凝胶柱色谱分离

Fig. 2 Chromatographic separation of Sephadex G-75 sephadex column

为了研究肠道微生物的 β-多样性的差异,基于 ASV 进行主成分分析(PCA),结果如图 4 所示。枸杞多糖组与空白对照组分别位于 PC1 的两侧,两组的混合种子发酵样本同样在图上分离明显,并分别呈现聚集状态。其中 CTRLMIX 组和 LBPMIX 组组的样本分别显示了很好的聚集, 但未与 CTRL 组和 LBP 组明显分开,说明将志愿者样本的混合处理虽提高了菌群结构的稳定性但并没有与单独发酵的



* 表示在 $P<0.05$ 水平上具有显著性差异;** 表示 $P<0.01$ 水平上具有显著性差异。

图 3　体外发酵的人体肠道微生物菌群的 α–多样性

Fig. 3　α–Diversity of human gut microbiota produced by *in vitro* fermentation

样本有显著差异,但是含 LBP 的体外发酵显著改变了肠道菌群的结构。

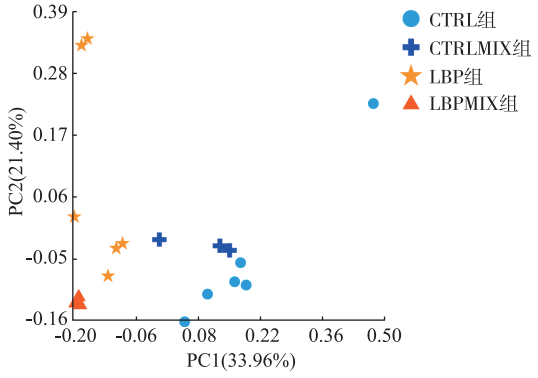


图 4　体外模拟厌氧发酵的人类肠道微生物的 PCA 分析

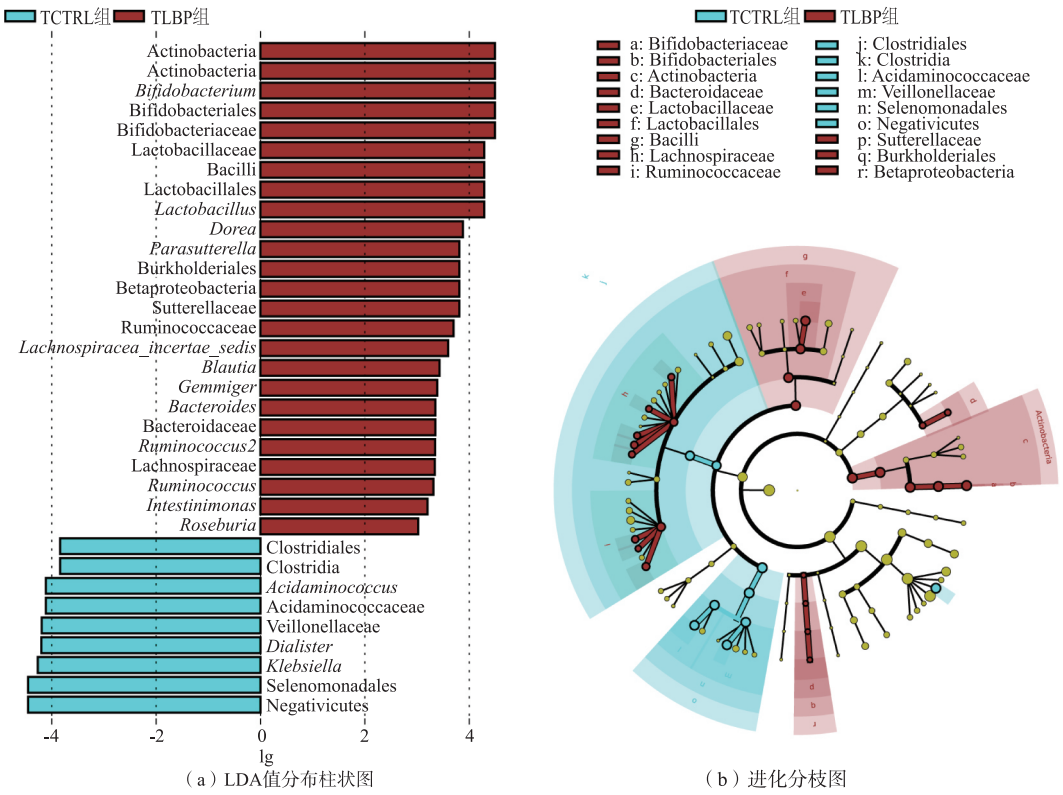
Fig. 4　PCA analysis of human gut microbiota produced by anaerobic fermentation *in vitro*

2.2　枸杞多糖对肠道微生物物种差异的影响

利用线性判别分析（linear discriminant analysis effect size,LEfSe 分析),研究添加 LBP 后与空白对照组相比具有差异性的肠道微生物。如图 5 所示,TLBP 组在属水平上具有显著性差异(LDA>2,$P<0.05$)的有乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、多尔氏菌属(*Dorea*)、毛螺菌属(*Lachnospiracea_incertae_sedis*)、肠单胞菌属(*Intestinimonas*)、罗氏菌属(*Roseburia*)等。而丰度降低的有小杆菌属(*Dialister*)、氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*)与有害的肠道致病菌属克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)等[16]。

2.3　枸杞多糖对肠道菌群功能差异的预测分析

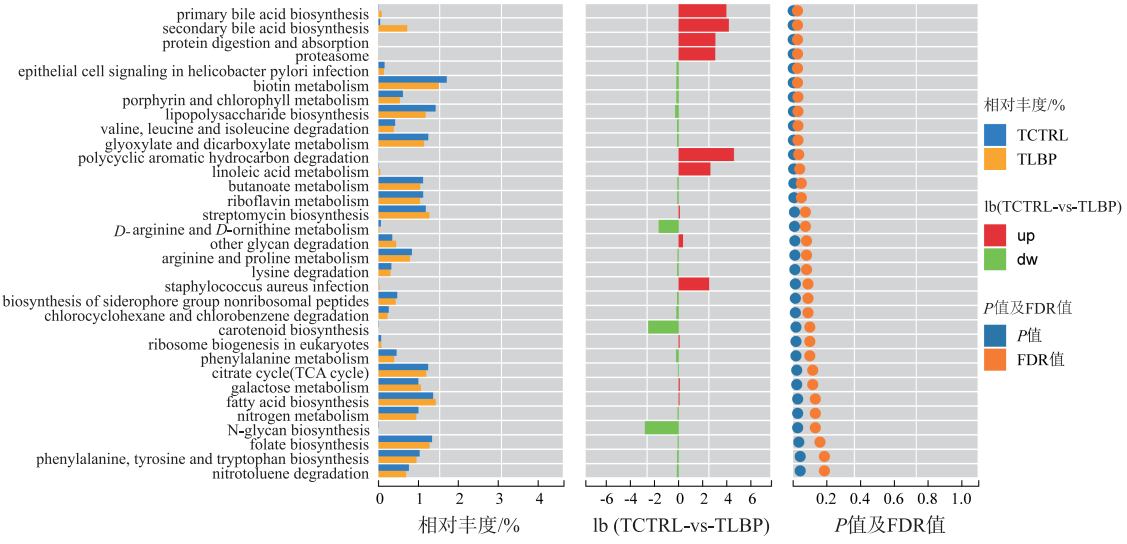
通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路功能预测含 LBP 的体外发酵对肠道菌群功能差异的影响。如图 6 所示,LBP 添加到肠道菌群体外发酵体系后,显著影响了菌群与初级和次级胆汁酸代谢(primary and secondary bile acid biosynthesis)、蛋白质的消化吸收(protein digestion and absorption)、



（a）LDA值分布柱状图　　（b）进化分枝图

图 5　LDA 值分析柱图与 LEfSe 聚类图

Fig. 5　LDA value analysis column diagram and LEfSe clustering diagram



所选择的功能差异 $P<0.05$，具有显著性差异。

图 6　肠道菌群的功能差异分析

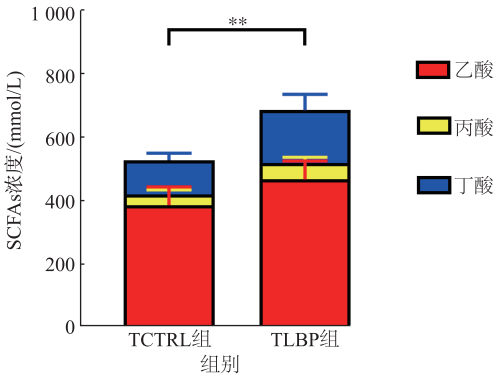
Fig. 6　Functional difference analysis of gut microbiota

亚油酸代谢（linoleic acid metabolism）和多糖代谢（other glycan degradation）等方面的功能（$P<0.05$）。

2.4　枸杞多糖对肠道微生物代谢物短链脂肪酸（SCFAs）生成的影响

SCFAs 对于肠道健康有着重要的作用[17]，也是多糖在肠道内发酵的产物[18]。通过超高效液相色谱系统对发酵液中的短链脂肪酸进行检测，并将肠道内含量最丰富的 SCFAs（如乙酸、丙酸与丁酸）的浓度进行比较。TLBP 组的乙酸、丙酸与丁酸单独组分浓度和总短链脂肪酸浓度与 TCTRL 组相比都具有

显著性差别,结果如图 7 所示。



** 表示 $P<0.01$ 水平上具有显著性差异。

图 7　发酵液中的短链脂肪酸(SCFAs)浓度

Fig. 7　Concertation of short-chain fatty acids (SCFAs) in the fermentation broth

2.5　讨论

肠道微生物是位于肠道内部的庞大微生物群,肠道菌群的细胞数达 100 万亿以上,种群至少存在 1 000 种以上,是人体拥有的最复杂的微生态系统[19]。而且它是一个对宿主健康至关重要生物反应器。这些微生物在体内参与了宿主的营养代谢活动,并作为宿主代谢的重要参与者提供许多宿主所不能合成的代谢产物,调节机体的生化生理状态[20]。肠道菌群的相对丰度与菌株丰富度与人的健康息息相关,膳食调节被认为是改变微生物菌群结构的重要方式[21]。许多中草药对肠道菌群有显著促进作用,其对肠道菌群的调节能力可能是其药理作用的来源[22]。多糖作为一种活性物质具有改善肠道功能,枸杞多糖有可能以改变肠道微生物结构的方式发挥其药理功能[23]。

通过对模拟人类肠道微生物体外厌氧发酵体系进行测序分析来研究枸杞多糖对肠道微生物的作用。菌群多样性数据显示了在发酵培养基中加入枸杞多糖后,菌群结构发生了明显变化,枸杞多糖提高了肠道菌群的丰度与多样性,并且混合种子样本的菌群丰度高于单一样本的菌群丰度。从主成分分析可知,对菌群种子样本的混合可以提高发酵后肠道微生物的丰度与促进菌群结构的稳定。并且枸杞多糖作为一种大分子活性物质可以有效影响人类的肠道微生物结构。从两组的功能差异可以看出,肠道微生物的改变使一系列代谢相关的功能上调,改善了肠道的消化能力。

多糖代谢往往由多种微生物共同作用[24]。根据 LDA 值,在具有显著性的差异物种中,总枸杞多糖组的乳酸杆菌属和双歧杆菌属是著名的益生菌菌属,还有瘤胃球菌属、布劳特氏菌属、多尔氏菌属、毛螺菌属和罗氏菌属与多糖代谢、SCFAs 生成有关,这些菌在属水平上丰度的升高对肠道起到了调节作用。乳酸杆菌是一种能够发酵产生大量乳酸的益生菌,通过拮抗有害微生物来维持肠道菌群平衡,并且是一种能够产生 SCFAs 的益生菌[25-26]。双歧杆菌同样是能够产生有机酸的益生菌,促进人体对一系列营养物质的吸收,并具有抗菌、抗癌、抗衰老、保护肝脏等功能[27]。这些益生菌影响人体的消化与健康[28-29]。多糖在肠道代谢的终产物为 SCFAs,其可以调节肠道生理功能,如维持肠道系统的正常功能和结肠上皮细胞的形态和功能、发挥抗炎作用并调节免疫系统、作为能量来源并改变菌群组成[30-31]。TLBP 组的 SCFAs 显著性增加,表明 LBP 可能通过提高肠道 SCFAs 的浓度发挥其药理作用[18,32]。除产生 SCFAs 外,枸杞多糖对肠道微生物结构及其功能的影响仍有待进一步研究。

3　结　语

综上所述,枸杞多糖能够提高人类肠道微生物的多样性,提高益生菌的丰度,降低肠道内致病菌的丰度,并促进碳水化合物代谢菌产生短链脂肪酸,最终调节机体的健康。

参考文献:

[1] 钱丹,纪瑞锋,郭威,等. 中国枸杞属种间亲缘关系和栽培枸杞起源研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(17):3282-3285.
QIAN D,JI R F,GUO W,et al. Advances in research on relationships among *Lycium* species and origin of cultivated *Lycium* in China[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2017,42(17):3282-3285. (in Chinese)

[2] SONG Y,XU B J. Diffusion profiles of health beneficial components from Goji berry (*Lyceum barbarum*) marinated in alcohol and their antioxidant capacities as affected by alcohol concentration and steeping time[J]. **Foods**,2013,2(1):32-42.

[3] CHEN P Y, SHIH T H, CHANG K C, et al. Potential of galled leaves of Goji (*Lycium chinense*) as functional food[J]. **BMC Nutrition**, 2020, 6(1): 1-10.

[4] JEONG H C, JEON S H, ZHU G Q, et al. *Lycium chinense* Mill improves hypogonadism via anti-oxidative stress and anti-apoptotic effect in old aged rat model[J]. **The Aging Male**, 2020, 23(4): 287-296.

[5] KANG Y F, XUE Y S, DU M, et al. Preventive effects of Goji berry on dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice[J]. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017, 40: 70-76.

[6] YANG Z W, WANG J, LI J G, et al. Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of polysaccharide fraction from *Cyclocarya paliurus* in high-fat emulsion-induced hyperlipidaemic mice[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 183: 11-20.

[7] KE S Z, YU Y L, XU Q L, et al. Composition-activity relationships of polysaccharides from *Saccharina japonica* in regulating gut microbiota in short-term high-fat diet-fed mice[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69(37): 11121-11130.

[8] 邬军文, 张敏, 姚昀, 等. 多糖、肠道微生物与免疫之间的相互影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(22): 315-320.
WU J W, ZHANG M, YAO Y, et al. Interaction of polysaccharides, gut microbiota and immunity[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2017, 38(22): 315-320. (in Chinese)

[9] HE L, YAN X T, LIANG J, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 198: 101-108.

[10] HENTATI F, DELATTRE C, URSU A V, et al. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 198: 589-600.

[11] ZHU R G, ZHANG X Y, WANG Y, et al. Characterization of polysaccharide fractions from fruit of *Actinidia arguta* and assessment of their antioxidant and antiglycated activities[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2019, 210: 73-84.

[12] NIE C, ZHU P L, MA S P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 188: 236-242.

[13] CAI L L, ZOU S S, LIANG D P, et al. Structural characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Sophorae tonkinensis* Radix[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 184: 354-365.

[14] CHEN Y J, JIANG X, XIE H Q, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Ramulus mori*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2018, 190: 232-239.

[15] 陈和地, 任怡琳, 耿燕, 等. 基于超高效液相色谱法快速测定短链脂肪酸方法的建立[J]. 生物加工过程, 2019, 17(4): 365-371.
CHEN H D, REN Y L, GENG Y, et al. Analysis of short chain fatty acids by ultra-performance liquid chromatography[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2019, 17(4): 365-371. (in Chinese)

[16] EFFAH C Y, SUN T W, LIU S H, et al. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health[J]. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2020, 19(1): 1-9.

[17] KAWABATA K, YOSHIOKA Y, TERAO J J. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols[J]. **Molecules**, 2019, 24(2): 1-25.

[18] DE LA CUESTA-ZULUAGA J, MUELLER N T, ÁLVAREZ-QUINTERO R, et al. Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiosis, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factors[J]. **Nutrients**, 2018, 11(1): 51.

[19] TREMAROLI V, BÄCKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. **Nature**, 2012, 489(7415): 242-249.

[20] DAVID L A, MAURICE C F, CARMODY R N, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome[J]. **Nature**, 2014, 505(7484): 559-563.

[21] DESAI M S, SEEKATZ A M, KOROPATKIN N M, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus

barrier and enhances pathogen susceptibility[J]. **Cell**,2016,167(5):1339-1353.

[22] SHANG Q S,JIANG H,CAI C,et al. Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology:an overview[J]. **Carbohydrate Polymers**,2018,179:173-185.

[23] FLINT H J,SCOTT K P,DUNCAN S H,et al. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]. **Gut Microbes**,2012,3(4):289-306.

[24] KOROPATKIN N M,CAMERON E A,MARTENS E C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota[J]. **Nature Reviews Microbiology**,2012,10(5):323-335.

[25] ZHANG J C,SUN Z H,JIANG S M,et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis[J]. **mSystems**,2019,4(2):17-19.

[26] SANDERS M E,MERENSTEIN D J,REID G,et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease:from biology to the clinic[J]. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**,2019,16(10):605-616.

[27] TURRONI F,RIBBERA A,FORONI E,et al. Human gut microbiota and *Bifidobacteria*:from composition to functionality[J]. **Antonie van Leeuwenhoek**,2008,94(1):35-50.

[28] CONLON M A,BIRD A R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health[J]. **Nutrients**,2014,7(1):17-44.

[29] PLAZA-DIAZ J,RUIZ-OJEDA F,GIL-CAMPOS M,et al. Mechanisms of action of probiotics[J]. **Advances in Nutrition**,2019,10:49-66.

[30] FU X,CAO C L,REN B B,et al. Structural characterization and *in vitro* fermentation of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its impact on gut microbiota[J]. **Carbohydrate Polymers**,2018,183:230-239.

[31] DALILE B,VAN OUDENHOVE L,VERVLIET B,et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication[J]. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**,2019,16(8):461-478.

[32] SANCHEZ H N,MORONEY J B,GAN H Q,et al. B cell-intrinsic epigenetic modulation of antibody responses by dietary fiber-derived short-chain fatty acids[J]. **Nature Communications**,2020,11(1):60.