

人肠道微生物对海带岩藻聚糖硫酸酯及其寡糖的降解利用*

谢洁玲¹ 史晓翀² 史姣霞¹ 于彤¹ 李八方¹ 赵雪^{1①}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003; 2. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 采用人肠道微生物体外厌氧发酵技术, 研究人肠道微生物对不同分子量岩藻聚糖硫酸酯的降解利用。分别将五个志愿者的肠道微生物接种到以高分子量和低分子量岩藻聚糖硫酸酯为唯一碳源的培养基中, 酵解 48h 后, 采用 TLC 和 PAGE 分析分子量变化, PMP-HPLC 分析单糖组成变化, GC 分析短链脂肪酸的生成情况。结果发现: 在人肠道微生物体外降解岩藻聚糖硫酸酯的体系中, 岩藻聚糖硫酸酯寡糖和低分子量组分(10—20kDa)含量显著降低, 而且酵解产物的单糖组成没有变化, 说明被人肠道微生物彻底降解利用; 而人肠道微生物对高分子量岩藻聚糖硫酸酯(>20kDa) 的降解和利用度很低, 产物的半乳糖和甘露糖的比例明显下降。低分子量和高分子量岩藻聚糖硫酸酯在酵解后均生成短链脂肪酸乙酸、丙酸和丁酸, 但在高分子量岩藻聚糖硫酸酯发酵液中还生成了支链脂肪酸(异丁酸、异戊酸)和戊酸。研究结果表明, 人肠道微生物能够彻底降解利用复杂的海带岩藻聚糖硫酸酯寡糖和低分子量组分, 但是对高分子量岩藻聚糖硫酸酯的降解率很低。单糖分析说明人肠道微生物能够降解和利用多糖中的所有单糖, 产生有利于肠道健康的短链脂肪酸, 但是只有低分子量岩藻聚糖硫酸酯能够抑制支链脂肪酸生成。

关键词 岩藻聚糖硫酸酯; 人体肠道微生物; 岩藻聚糖硫酸酯寡糖; 降解; 短链脂肪酸

中图分类号 Q539 **doi:** 10.11693/hyhz20160600138

从海带中提取出来的岩藻聚糖硫酸酯(fucoidan)是一种水溶性的杂多糖, 硫酸酯化的 α -L-岩藻糖残基是大多数分子的基本组成成分, 其具备的抗血栓、抗凝血、抗肿瘤以及调节体内免疫的活性已经得到广泛认可 (Pomin *et al.*, 2008; 陈安进等, 2012; Wijesinghe *et al.*, 2012)。口服不同分子量聚糖硫酸酯表现出很好的提高免疫力活性(李芳等, 2012)。而岩藻聚糖硫酸酯作为一种非淀粉大分子硫酸多糖, 结构较为复杂, 由于人体自身缺乏与之相关的消化酶, 无法在上消化道被降解利用, 几乎全进入大肠中, 所以高分子量岩藻聚糖硫酸酯是无法被直接吸收转运到体内的。而口服岩藻聚糖硫酸酯如何发挥其免疫调节活性, 是一个未知的难题。因此研究岩藻聚糖硫酸

酯的消化吸收对其生物活性的研究具有重要的意义。有报道结肠特别是盲肠中的微生物可以降解非淀粉多糖, 胃和小肠则不能(Barthe *et al.*, 2004), 原因是非淀粉多糖不能被人类自身的酶系所消化 (Buddington *et al.*, 2002), 所以非淀粉多糖不易被胃肠消化吸收, 几乎全部进入大肠。人体肠道中的微生物种类超过 1000 种, 菌总数高达 10^{14} 。Gill 等(2006)通过基因测序并构建元基因文库, 发现肠道微生物的基因库中富含参与多糖代谢的基因。日本的 Czjzek 课题组发现在其本国人的肠道微生物的宏基因组中存在琼胶和紫菜多糖水解酶的基因(Hehemann *et al.*, 2010)。经过更深入的研究, 该课题组还发现 *Z. galactanovorans* 中含有褐藻胶降解基因的操纵子

* 山东省重点研发计划, 2015GSF115028 号; 海洋公益性行业科研专项经费项目, 201505022 号; 国家自然科学基金委-山东省海洋科学研究联合基金, U1406402 号。谢洁玲, 硕士研究生, E-mail: xjlxiejieling@163.com

通讯作者: 赵雪, 女, 副教授, E-mail: zhaoxue@ouc.edu.cn

收稿日期: 2016-06-29, 收修改稿日期: 2016-08-09

(Thomas *et al.*, 2012)。Li 从中国人的粪便微生物中分离出能够降解琼胶和卡拉胶的菌株(李苗苗, 2014; Li *et al.*, 2014)。研究证明人肠道微生物可以降解这些海洋硫酸多糖, 并对肠道有益菌有促进作用。研究表明, 肠道微生物在人体的营养物质代谢过程中起着重要作用, 其中酵解多糖的代谢终产物—短链脂肪酸(SCFAs), 主要是乙酸、丙酸、丁酸, 不仅能为宿主和肠道微生物本身的生长繁殖提供能量, 且具有抗病原微生物、改善肠道功能、调节免疫、抗炎、抗肿瘤等重要作用(陈燕等, 2006)。但是支链脂肪酸(BCFAs)如异丁酸和异戊酸, 只能由支链氨基酸发酵产生。由于人体内的酶不能降解蛋白质产生支链脂肪酸, 所以肠道中的支链脂肪酸主要是由肠道微生物对蛋白质进行厌氧发酵所产生的, 蛋白质的发酵还会产生氨类、酚类、吲哚等对人体有害的物质, 这与大肠癌、溃疡结肠炎等密切相关, 因此这个过程总体上被认为是对人体健康不利的(周中凯等, 2014)。

海带岩藻聚糖硫酸酯是一种结构复杂的海洋硫酸多糖, 主要含有岩藻糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、甘露糖和葡萄糖, 还含有微量的氨基葡萄糖、鼠李糖、氨基半乳糖和木糖, 糖链上还含有大量的半乳糖和岩藻糖支链。人肠道微生物是否能够降解利用复杂的岩藻聚糖硫酸酯, 目前还没有研究报道。本文利用体外发酵模型, 研究了人体肠道微生物对高、低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的降解, 并对降解产物中的多糖组成和短链脂肪酸进行分析, 为更进一步地探究岩藻多糖与肠道微生物的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海带岩藻聚糖是本实验室从威海产海带中, 采用酸浸泡、水提取和醇沉法获得, 采用 10kDa 透析袋透析脱盐, 冻干后得到高分子量海带岩藻聚糖硫酸酯(HMWF)。

1.2 试剂

单糖标准品甘露糖、葡萄糖、岩藻糖、半乳糖、木糖、鼠李糖、氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和乳糖购自美国 Sigma 公司; 6 种短链脂肪酸标准品(乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸)和二乙基丁酸购自阿拉丁工业公司。

1.3 仪器

MLS-3750 高温高压灭菌锅, 日本 SANYO 株式会社; Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公

司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; 电喷雾 LTQ-Orbitrap XL 质谱, 美国 thermo 公司; Agilent 6890 型气相色谱仪, 美国安捷伦公司。

1.4 实验方法

1.4.1 低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的制备 称取 1.0g 岩藻聚糖多糖和 0.08g 醋酸铜溶于 15mL 蒸馏水中, 用 2mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 以 3mL/h 的速度加入 4.5% H₂O₂, 60°C 水浴反应 4h(pH 为 7.5—8.0), 反应结束后用 Chelex 100 树脂除去 Cu²⁺。用 500Da 透析袋透析除盐, 浓缩, 冻干后得到低分子量岩藻聚糖硫酸酯(LMWF)(赵雪等, 2011)。

1.4.2 培养基的配制 在无碳源培养基(蛋白胨、胰蛋白胨、粘液素、3[#]胆盐、血红素、L-半胱氨酸、微量元素、混合维生素)中分别加入 5g/L HMWF 或 LMWF 为唯一碳源, 调节 pH 至 6.4—6.5。各自取 5mL 分装至 25mL 厌氧瓶, 充氮气后密封, 高压灭菌锅 115°C 灭菌 40min。

1.4.3 人粪便样品的收集和接种 提供实验样本的 5 位志愿者(编号为 Nos.1—5)身体健康, 采样前 2 个月内无服用益生元、抗生素记录。取志愿者粪便, 用 0.1mol/L 灭菌的磷酸缓冲液(pH 7.0)配成 20%(w/v)的悬浮液, 充分混匀后离心去残渣。取 0.5mL 粪便菌悬液, 分别接种至 HMWF 和 LMWF 培养基中, 置于厌氧培养箱中, 37°C 培养 48h, 并于 0h 和 48h 取样 1mL。

1.4.4 低分子量岩藻聚糖硫酸酯分子量的测定 低分子量岩藻聚糖硫酸酯用 0.2mol/L NaCl 配成 10mg/mL 溶液, 用高效凝胶色谱来确定分子量的大小。色谱仪: Agilent 1100 高效液相色谱仪; 色谱柱: TSK-gel G2500 PWxl 色谱柱(7.8cm×30cm); 检测器: 示差检测器(G1362A RID); 流动相: 0.2mol/L NaCl; 流速: 0.5mL/min; 柱温: 40°C; 标准品: 分子量为 1kDa 的葡聚糖、岩藻糖(MW164.16)和分子量为 5000Da、6000—10000Da 的硫酸葡聚糖, 分子量为 180Da、2500Da、4600Da、7100Da 和 10000Da 的右旋糖酐。Agilent GPC 软件计算样品洗脱峰的重均分子量和分散系数。

1.4.5 薄层层析法(TLC)检测降解情况 所取样品在 12000r/min 离心 10min, 然后取上清液, 在硅胶板上点样 1.2μL, 以反应 0h 的样品作对照, 放置于甲酸: 正丁醇: 水=6:4:1(v:v:v)的展开剂中展开两次后, 吹干, 用苯胺-二苯胺显色剂(0.2mL 苯胺、0.1mL HCl、0.2g

二苯胺和 1mL 85%磷酸溶于 10mL 丙酮中)浸润后吹干, 在电炉上加热显色(焦广玲等, 2007)。

1.4.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测降解情况 所取样品在 12000r/min 离心 10min, 然后取上清液 10 μ L, 与 50%蔗糖 1:1 混匀。采用 5%的浓缩胶和 15%的分离胶来进行电泳分析, 电压 200V, 时间 30min。将胶放入 5%(w/v)的阿利新蓝溶液中(2%乙酸配制)染色 1h, 再用 2%乙酸脱色两次(郭峰君等, 2014)。

1.4.7 高效液相色谱法(HPLC)分析岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成 所取样品在 12000r/min 离心 10min, 取 0.4mL 上清液于 5mL 安瓿瓶中, 加 2mL 2mol/L 三氟乙酸后充 N₂ 封瓶, 110 $^{\circ}$ C 消化 8h, 冷却后空气吹干, 加甲醇吹干, 重复 3 次以确保除尽三氟乙酸, 然后用 100 μ L 超纯水溶解, 再用 0.3mol/L NaOH 调成中性, 定容至 200 μ L, 6000r/min 离心 10min 后取 90 μ L 上清液和 10 μ L 20mmol/L 乳糖内标至干净离心管中, 另外, 10 种浓度均为 20mmol/L 的单糖标准品各加 10 μ L 至另一干净离心管中, 在相同条件下进行 PMP 衍生。色谱柱: EC-C18 分离柱(4.6mm \times 150mm, 5 μ m); 检测器: 紫外检测器(245nm); 流速: 0.3mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: 流动相 A: 磷酸缓冲液(pH 为 6.7 的 0.1mol/L KH₂PO₄):乙腈=82:18, 流动相 B: 磷酸缓冲液(pH 为 6.7 的 0.1mol/L KH₂PO₄):乙腈=65:35; 时间梯度: 0—40min; 浓度梯度: 5%—50%; 进样量 10 μ L(尹利昂等, 2009)。

1.4.8 气相色谱法(GC)测定短链脂肪酸 取 2mL 培养液 12000r/min 离心 10min, 取上清液, 加入 1/10 体积 50% H₂SO₄, 再加入 3 倍体积乙醚, 振荡混匀 35min, 12000r/min 离心 10min, 收集乙醚层, 浓缩, 用于气相色谱分析(Zhang *et al.*, 2012)。气相色谱条件: 载气: N₂; 分流比: 20:1; 流速: 3mL/min; 色谱柱: HP-INNOWAS; 升温程序: 80 $^{\circ}$ C 保持 0.5min, 以 8 $^{\circ}$ C/min 升到 150 $^{\circ}$ C, 保持 1min, 再以 20 $^{\circ}$ C/min 升到 200 $^{\circ}$ C, 保持 5min; 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C; 进样量: 1 μ L; 检测器: FID; 检测器温度: 250 $^{\circ}$ C。

1.4.9 统计学处理 数据采用 Excel 2007 统计分析, 实验结果以平均数 \pm 标准偏差($\bar{X} \pm S$)表示。

2 结果与分析

2.1 岩藻聚糖硫酸酯化学性质的比较

海带岩藻聚糖硫酸酯的分子量很高, 大于 500kDa, 经过自由基氧化降解, 多糖的分子量显著下降。图 1 为高效凝胶色谱法测定低分子量岩藻聚糖

硫酸酯分子量的色谱图。采用系列分子量的葡聚糖标准品制作标准曲线, 计算得到低分子量岩藻聚糖硫酸酯的重均分子量为 7.74kDa, 分散系数为 1.02。在自由基氧化降解过程中, 糖链上硫酸根含量低的葡萄糖醛酸、甘露糖、半乳糖容易被降解成单糖和寡糖, 在用 500Da 的透析袋透析的过程中, 部分寡糖和单糖损失, 因此, 造成高分子量和低分子量岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成之间存在差异。

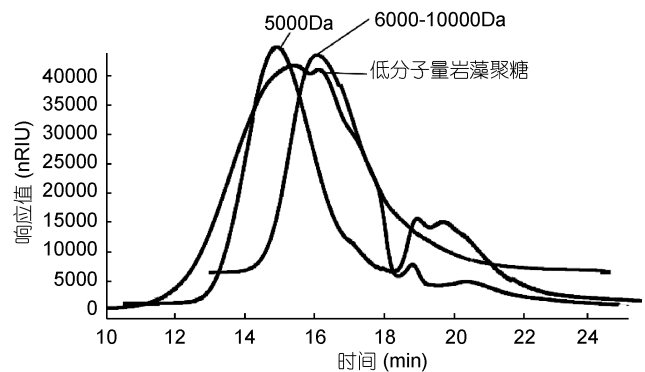


图 1 低分子量岩藻聚糖硫酸酯分子量测定的高效液相色谱图

Fig.1 The HPLC chromatogram showing the molecular weight of LMWF

注: 5000Da: 5000Da 的硫酸葡聚糖标准品; 6000—10000Da: 6000—10000Da 的硫酸葡聚糖标准品

2.2 人体肠道微生物对岩藻聚糖硫酸酯的降解利用 高分子量和低分子量岩藻聚糖硫酸酯经不同人的肠道微生物发酵培养后, 采用 TLC 和 PAGE 分析岩藻聚糖硫酸酯的降解情况。

图 2 为 TLC 分析不同分子量岩藻聚糖硫酸酯在肠道微生物酵解前后其寡糖含量的变化。图 2a 中 TLC 分析表明, 低分子量岩藻聚糖硫酸酯中含有较多单糖、寡糖和多糖。被肠道微生物酵解 48h 之后, No.1、No.2 和 No.5 中的寡糖几乎是完全降解, No.3 和 No.4 中的寡糖被部分降解。而图 2b 中 TLC 分析表明, 高分子量岩藻聚糖硫酸酯中不含寡糖, 但是酵解 48h 后, 可以看到有少量的寡糖生成, 多糖部分降解程度很低, 这说明只有少量高分子量岩藻聚糖硫酸酯被肠道微生物降解利用。比较发现, 岩藻聚糖硫酸酯寡糖更容易被肠道微生物降解利用, 而高分子量岩藻聚糖硫酸酯很难被肠道微生物降解利用。

图 3 为 PAGE 分析不同分子量海带岩藻聚糖硫酸酯在肠道微生物酵解前后高分子量部分的降解情况, 分子量采用 10kDa 和 40kDa 的硫酸葡聚糖作为标准对照。图 3a PAGE 分析表明, 酵解 48h 后, 低分子

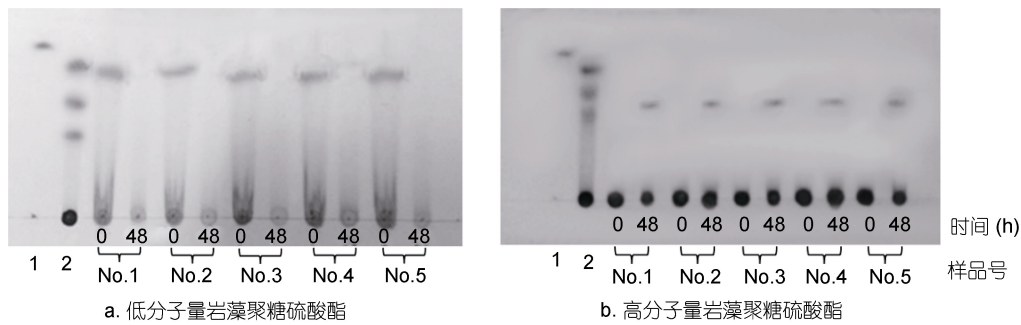


图 2 TLC 分析 Nos.1—5 人肠道微生物降解低分子量和高分子量海带岩藻聚糖硫酸酯

Fig.2 TLC analysis on the LMWF and HMWF after being degraded by Nos.1—5 human gut microbiota

注: 1: 岩藻糖单糖; 2: 硫酸软骨素酶解产物; Nos.1—5: 依次为 Nos.1—5 志愿者的肠道微生物对高、低岩藻聚糖硫酸酯的降解

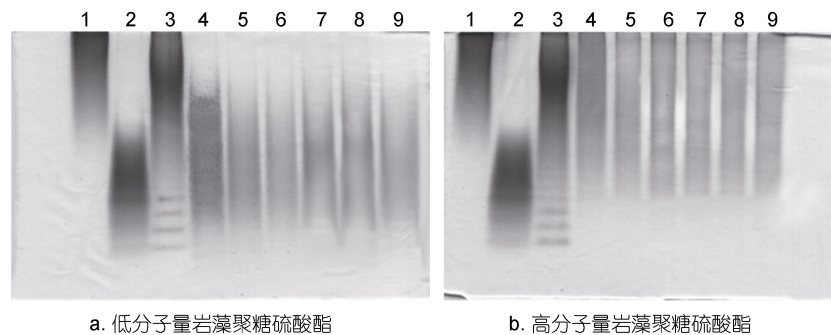


图 3 PAGE 分析 Nos.1—5 肠道微生物降解低分子量和高分子量海带岩藻聚糖硫酸酯

Fig.3 PAGE analysis on the LMWF and HMWF after being degraded by Nos.1—5 human gut microbiota

注: 1: 40kDa 的葡聚糖; 2: 10kDa 的葡聚糖; 3: 硫酸软骨素酶解产物; a-4: 低分子量岩藻聚糖原糖; b-4: 高分子量岩藻聚糖原糖; 5—9: 依次为 Nos.1—5 志愿者的肠道微生物对低分子量岩藻聚糖硫酸酯或高分子量岩藻聚糖硫酸酯的降解产物

量岩藻聚糖硫酸酯分子量分布在 10—20kDa 之间的组分显著减少, 说明分子量在 10—20kDa 的低分子量岩藻聚糖硫酸酯也能够被肠道菌群降解利用。图 3b PAGE 分析表明, 高分子量岩藻聚糖硫酸酯分子量大于 20kDa, 酵解 48h 后, 高分子量组分的含量有所下降, 说明高分子量岩藻聚糖硫酸酯有少量能被肠道微生物降解。

结合 TLC 与 PAGE 的结果表明, 肠道微生物对高分子量岩藻聚糖硫酸酯利用度很低, 当岩藻聚糖硫酸酯被自由基降解产生寡糖和 10—20kDa 的低分子量多糖时, 才能很好地被肠道微生物降解利用。

2.3 发酵前后单糖组成的变化

表 1 为岩藻聚糖硫酸酯经人肠道微生物酵解前后的单糖组成比较。高分子量岩藻聚糖硫酸酯中单糖组成复杂, 主要含有岩藻糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、甘露糖和葡萄糖, 还含有微量的氨基葡萄糖、鼠李糖、氨基半乳糖和木糖。酵解 48h 后, 发酵体系中, 高分子量岩藻聚糖硫酸酯中岩藻糖的含量明显升高, 半乳糖和甘露糖的含量有所降低, 说明人体肠道生

物对高分子量岩藻聚糖硫酸酯中的半乳糖和甘露糖成分利用较多。低分子量岩藻聚糖硫酸酯主要是由岩藻糖和半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成。发酵 48h 后, 发酵体系中剩余的低分子量岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成基本不变。结合 TLC 和 PAGE 分析结果表明, 肠道微生物能够很好地降解利用低分子量岩藻聚糖硫酸酯, 但是对低分子量岩藻聚糖硫酸酯的利用没有选择性, 剩余组分的单糖仍然保留原糖的结构组成。

由表 1 可看出, 高分子量和低分子量岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成之间存在差异, 这是由于高分子量岩藻聚糖硫酸酯在自由基降解制备低分子量岩藻聚糖硫酸酯时, 糖链上硫酸根含量低的葡萄糖醛酸、甘露糖、半乳糖容易被降解成单糖和寡糖, 这些单糖和寡糖有可能在透析除盐的过程中部分损失。

2.4 发酵前后短链脂肪酸的测定结果

表 2 为人肠道微生物厌氧酵解后岩藻聚糖硫酸酯发酵液中短链脂肪酸的变化。肠道微生物在低分子量岩藻聚糖硫酸酯培养基中发酵 48h 后, 发酵液中主要产生乙酸和丙酸, 还有少量的丁酸, 说明肠道微生

表 1 人肠道菌群酵解对岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成的影响

Tab.1 Changes in monosaccharide composition of fucoidan of different molecular weights after human gut microbial degradation

组分	高分子量岩藻聚糖硫酸酯	酵解后的高分子量岩藻聚糖硫酸酯	低分子量岩藻聚糖硫酸酯	酵解后的低分子量岩藻聚糖硫酸酯
甘露糖	3.73	2.69	2.74	3.13
氨基葡萄糖	1.26	1.59	0.96	1.83
鼠李糖	1.49	—	1.15	1.20
葡萄糖醛酸	12.96	10.7	6.29	6.80
氨基半乳糖	0.52	—	—	—
葡萄糖	3.06	3.54	2.01	3.20
半乳糖	31.27	26.54	31.57	30.27
木糖	1.49	1.65	0.77	0.98
岩藻糖	44.22	53.28	54.50	52.57

注: 各单糖的比例为单糖占总糖含量的摩尔百分比(%)

表 2 人肠道微生物厌氧酵解岩藻聚糖硫酸酯后短链脂肪酸的变化

Tab.2 The contents of short-chain fatty acids in fucoidan medium after human gut microbiota fermentation in anaerobic culture system *in vitro*

组别	高分子量岩藻聚糖硫酸酯($\mu\text{g/mL}$)		低分子量岩藻聚糖硫酸酯($\mu\text{g/mL}$)	
	0h	48h	0h	48h
乙酸	50.91 \pm 4.42	399.37 \pm 11.69	27.17 \pm 2.17	417.54 \pm 19.54
丙酸	—	224.20 \pm 9.02	—	245.06 \pm 12.00
丁酸	—	82.90 \pm 8.42	—	82.40 \pm 6.31
异丁酸	—	41.58 \pm 6.40	—	—
异戊酸	—	33.62 \pm 4.75	—	—
戊酸	—	38.72 \pm 3.26	—	—

物能将低分子量岩藻聚糖硫酸酯进一步降解为乙酸、丙酸和丁酸。而肠道微生物在分子量岩藻聚糖硫酸酯培养基中发酵 48h 后, 乙酸、丙酸、丁酸的含量有明显增加, 说明肠道微生物也能将分子量岩藻聚糖硫酸酯降解为乙酸、丙酸和丁酸, 但同时产生了少量的异丁酸、异戊酸、戊酸, 说明肠道微生物对蛋白质进行了无氧酵解(周中凯等, 2014)。由此可见, 低分子量岩藻聚糖硫酸酯和高分子量岩藻聚糖硫酸酯均能被肠道微生物降解生成短链脂肪酸, 但是低分子量岩藻聚糖硫酸酯可以特异性地抑制肠道微生物对蛋白质的无氧酵解。

3 讨论

本实验分别用五个志愿者的肠道微生物降解高分子量海带岩藻聚糖硫酸酯和低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯, 发现低分子量岩藻聚糖硫酸酯中的寡糖基本被消耗殆尽, 且低分子量岩藻聚糖硫酸酯组分中 10—20kDa 的岩藻聚糖也部分被消耗, 但是发酵体

系中剩余的岩藻聚糖硫酸酯的单糖组成基本不变, 这说明肠道微生物能够很好地降解利用低分子量岩藻聚糖硫酸酯, 对岩藻聚糖硫酸酯中各种单糖的利用没有选择性。推断肠道微生物产生的多糖降解酶种类很多, 不仅能降解岩藻糖苷键, 而且能降解甘露糖、半乳糖、葡萄糖和糖醛酸等。然而, 只有少量分子量大于 20kDa 的高分子量岩藻聚糖硫酸酯被降解成为寡糖, 且其单糖成分中的半乳糖和甘露糖被利用得较多, 这说明肠道微生物对岩藻聚糖硫酸酯降解利用的难易程度与其分子量的大小有关。研究结果与 Li(李苗苗, 2014; Li *et al*, 2014)研究肠道微生物降解琼胶和卡拉胶结果类似, 肠道微生物只能降解利用琼胶和卡拉胶寡糖, 而对高分子量琼胶和卡拉胶降解能力很低, 肠道微生物中产生了 α -琼胶酶和 β -卡拉胶酶。本研究中肠道微生物对复杂的岩藻聚糖硫酸酯的降解进一步证明, 肠道微生物也能够产生降解岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖和糖醛酸的糖苷键的酶。

低分子量岩藻聚糖硫酸酯培养基在被肠道微生物酵解之后产生了乙酸、丙酸、丁酸, 研究证明短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸)主要是由厌氧菌对不消化的碳水化合物酵解产生的, 其不仅为肠道微生物生长繁殖和结肠粘膜提供能量, 而且还能维护粘膜免疫细胞, 减少促炎症因子生成, 修复粘膜炎症, 有利于人体的健康(许勤等, 1999)。然而高分子量岩藻聚糖硫酸酯发酵液中不仅产生乙酸、丙酸和丁酸, 还生成了少量异丁酸和异戊酸, 这些支链脂肪酸(异丁酸、异戊酸)并不是糖酵解的产物, 而是由支链氨基酸厌氧发酵所产生的, 支链氨基酸厌氧发酵还会产生氨类、酚类、吲哚等对人体有害的物质(周中凯等, 2014)。

4 结论

人体肠道微生物能够很好地降解利用低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯, 同时经人体肠道微生物发酵后只产生了乙酸、丙酸、丁酸, 抑制了蛋白质的厌氧酵解, 说明低分子量岩藻聚糖硫酸酯比高分子量岩藻聚糖硫酸酯更有利于人体肠道的健康, 为更进一步地探究岩藻多糖与肠道微生物的相互作用奠定了基础。

参 考 文 献

- 尹利昂, 陈士国, 薛长湖等, 2009. 4种海参中含岩藻糖支链的硫酸软骨素化学组成差异的分析. 中国海洋大学学报, 39(S1): 63—68
- 许勤, 吴文溪, 1999. 短链脂肪酸的代谢及其在肠道外科中的应用. 肠外与肠内营养, 6(4): 218—223
- 李芳, 李八方, 王景峰等, 2012. 海带岩藻聚糖硫酸酯对小鼠的免疫调节作用. 食品科学, 33(5): 238—242
- 李苗苗, 2014. 人体肠道微生物对琼胶与 κ -卡拉胶及其寡糖的降解和利用研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 104
- 陈燕, 曹郁生, 刘晓华, 2006. 短链脂肪酸与肠道菌群. 江西科学, 24(1): 38—40, 69
- 陈安进, 赵雪, 张芳, 2012. 不同相对分子量岩藻聚糖硫酸酯抗血栓活性比较及机制探讨. 中国药理学杂志, 47(6): 431—434
- 周中凯, 杨艳, 郑排云等, 2014. 肠道微生物蛋白质的发酵与肠道健康的关系. 食品科学, 35(1): 303—309
- 赵雪, 李芳, 董诗竹等, 2011. 相对低分子量海带岩藻聚糖硫酸酯的制备及其对纤溶系统的影响. 中国海洋药物杂志, 30(3): 25—30
- 郭峰君, 胡靖, 赵雪, 2014. 海带岩藻聚糖硫酸酯降解及基本结构分析. 食品工业科技, 35(18): 93—97
- 焦广玲, 于广利, 赵峡, 2007. 几种寡糖和单糖在不同展开体系中的薄层色谱行为. 中国生化药物杂志, 28(6): 372—374
- Buddington K K, Donahoo J B, Buddington R K, 2002. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. The Journal of Nutrition, 132(3): 472—477
- Barthe L, Woodley J, Lavit M *et al*, 2004. In vitro intestinal degradation and absorption of chondroitin sulfate, a glycosaminoglycan drug. Arzneimittelforschung, 54(5): 286—292
- Gill S R, Pop M, DeBoy R T *et al*, 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, 312(5778): 1355—1359
- Hehemann J H, Correc G, Barbeyron T *et al*, 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. Nature, 464(7290): 908—912
- Li M M, Li G S, Zhu L Y *et al*, 2014. Isolation and characterization of an agaro-oligosaccharide (AO)-hydrolyzing bacterium from the gut microflora of Chinese individuals. PLoS One, 9(3): e91106
- Pomin V H, Mourão P A S, 2008. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. Glycobiology, 18(12): 1016—1027
- Thomas F, Barbeyron T, Tonon T *et al*, 2012. Characterization of the first alginolytic operons in a marine bacterium: from their emergence in marine *Flavobacteriia* to their independent transfers to marine *Proteobacteria*, and human gut *Bacteroides*. Environmental Microbiology, 14(9): 2379—2394
- Wijesinghe W A J P, Jeon Y J, 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: a review. Carbohydrate Polymers, 88(1): 13—20
- Zhang X, Zhao Y F, Zhang M H *et al*, 2012. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. PLoS One, 7(8): e42529

HUMAN GUT MICROBES DEGRADE AND UTILIZE FUCOIDAN AND ITS OLIGOSACCHARIDES FROM *LAMINARIA JAPONICA* *IN VITRO*

XIE Jie-Ling¹, SHI Xiao-Chong², SHI Jiao-Xia¹, Yu Tong¹, LI Ba-Fang¹, ZHAO Xue¹

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract To investigate the degradation and utilization of fucoidan from *Laminaria japonica* of different molecular weights with human gut microbiota, we sampled human gut microbiota from five volunteers *in vitro*. High- and low-molecular-weight fucoidan (coded HMWF and LMWF, respectively) were fermented with the microbiota in anaerobic culture system *in vitro* for 48h. TLC and PAGE were used to analyze the degradation of fucoidan. PMP-HPLC and GC were used to analyze the monosaccharide composition and short chain fatty acids in fermentation product, respectively. Results show that the content of oligosaccharides and low-molecular-weight fucoidan (10—20kDa) decreased markedly, while the monosaccharide composition of degradation products remained unchanged, indicating that the LMWF could be degraded entirely and utilized by human gut microbiota in anaerobic culture system *in vitro*. However, only small amounts of HMWF (>20kDa) could be degraded to oligosaccharides, and the proportions of galactose and mannose in the fermentation product decreased significantly. GC analysis showed that both LMWF and HMWF could be degraded to acetic acid, propionic acid and butyric acid (short-chain fatty acids). Branched-chain fatty acids (isobutyric acid and isovaleric acid) and valeric acid could be detected in HMWF medium only. Therefore, human gut microbiota can degrade and utilize complex fucoidan oligosaccharides and low-molecular-weight fractions from *L. japonica* in anaerobic culture system *in vitro*; however, it could be difficult to degrade a large-molecular-weight fucoidan with human gut microbiota. All sugars in the fucoidan oligosaccharides and large-molecular-weight fucoidan could be utilized by the microbiota to produce short-chain fatty acids, which is good for intestinal tract health. However, only LMWF could inhibit the produce of branched-chain fatty acids with human gut microbiota.

Key words fucoidan; human gut microbiota; fucoidan oligosaccharides; degradation; short chain fatty acids