

核桃膳食纤维对乳杆菌属微生物体外增殖的影响

杨卫星^{1,2,3}, 田洋^{4*}, 岳曼³, 盛军², 徐昆龙⁵, 高晓余^{1,2,3*}

¹ 云南省精准营养与个性化食品制造重点实验室 昆明 650201

² 食药同源资源开发与利用教育部工程研究中心 昆明 650201

³ 云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201

⁴ 普洱学院 云南普洱 665000

⁵ 云南农业大学动物医学院 昆明 650201

摘要 为探究核桃膳食纤维对乳杆菌生长的潜在作用,分别添加不同质量浓度的膳食纤维(0.1~3.2 g/L)到 MRS 培养基中,比较其对 10 种乳杆菌生长的影响,以筛选出最佳的“纤维+菌种”组合进行增殖作用研究。结果表明,核桃不溶性纤维仅对植物乳植杆菌生长有促进作用,促进率最高为 9.95%,对其它 9 种乳杆菌均有抑制作用。核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌促进率最高,达 44.34%,其次是植物乳植杆菌(16.14%)和干酪乳酪杆菌(11.23%)。进一步研究发现,核桃可溶性纤维可显著提高唾液联合乳杆菌的生物量、活菌数和非特异性黏附能力($P<0.05$),在纤维添加量为 3.2 g/L 时,生物量和活菌数分别提高 2.86 倍和 7.28 倍,表面疏水性提高 8.81%;显著促进其生物膜的形成($P<0.05$);显著提高唾液联合乳杆菌对糖源的利用,并降低发酵液的 pH 值($P<0.05$),在纤维添加量为 3.2 g/L 时,发酵液的 pH 值最低,为 3.74。此外,核桃可溶性纤维还可显著升高唾液联合乳杆菌 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶的活性($P<0.05$)。结论:核桃可溶性纤维可通过提高唾液联合乳杆菌的 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶的活性来促进增殖,且有利于促进其黏附性与生物膜的形成。本研究结果为核桃膳食纤维作为新型益生元提供了理论参考,为其综合开发利用提供了新思路。

关键词 核桃膳食纤维; 乳杆菌; 增殖作用

文章编号 1009-7848(2025)01-0039-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.004

乳杆菌是一类能够发酵碳水化合物产生乳酸的常见益生菌,广泛存在于人体胃肠道中,在抵抗肠道致病菌感染,增强肠道上皮功能、免疫调节、抗癌等方面发挥重要作用^[1]。在体内,乳杆菌在不同的宿主肠道中差异显著,其数量因宿主遗传、年龄或疾病状态等的不同而不同^[2],同时,也会受到饮食、黏附能力、乳酸分泌、胃酸与胆盐的耐受性的影响^[3]。在体外,乳杆菌的增殖受到菌龄、碳源、氮源、pH 值的影响^[4-5]。乳杆菌被广泛用于发酵食品中,筛选高效的乳杆菌增殖剂对于实际生产具有重要意义。

唾液联合乳杆菌(*Ligilactobacillus salivarius*, *L. salivarius*) 主要是利用糖酵解途径将已糖发酵为乳酸的同型发酵乳酸菌^[6]。一项转录组学分析了唾液联合乳杆菌 Ren 可通过提高 α -半乳糖苷酶基因 *galA1* 的表达来增加对棉子糖的利用,进而促进增殖^[7]。据报道,唾液联合乳杆菌含有 β -半乳糖苷酶与乳酸脱氢酶等^[8-9],这些酶的存在能够促进乳杆菌对碳水化合物的利用和乳酸形成。同时,还有研究发现唾液联合乳杆菌含有碳水化合物利用的基因,具有发酵葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖和蔗糖的能力^[10]。在功效方面,唾液联合乳杆菌具有抗微生物活性、免疫作用以及调节肠道微生物群和屏障等功能^[11]。目前,相对于其它乳杆菌来说,唾液联合乳杆菌的应用较少,可能与其培养、干燥、贮藏和稳定性有关,需进一步研究。

膳食纤维是一种不能被人体小肠消化吸收的碳水化合物^[12],根据其溶解特性不同,可分为可溶性膳食纤维和不溶性膳食纤维两大类。膳食纤维在肠道内可通过菌群的发酵转化成乙酸、丙酸和

收稿日期: 2024-01-23

基金项目: 云南省省市一体化专项(202302AN360002); 云南省高层次科技人才及创新团队选拔专项(202305AS350025); 云南省“兴滇英才支持计划”青年人才项目(2022-0255)

第一作者: 杨卫星,男,博士生

通信作者: 田洋 E-mail: tianyang1208@163.com

高晓余 E-mail: 32137583@qq.com

丁酸等产物,这些短链脂肪酸对健康有益。乳杆菌为人体胃肠道中常见的有益菌,许多研究发现,膳食纤维能够促进乳杆菌增殖,提高乳杆菌的发酵活力^[13-15]。核桃富含不饱和脂肪酸和蛋白质,同时也含有丰富的膳食纤维。据报道,酶法制备比化学法制备获得的核桃不溶性膳食纤维更能保持纤维的原有结构,同时,酶法获得的核桃可溶性膳食纤维黏度更高^[16]。此外,研究发现核桃水溶性膳食纤维能够增加代谢综合征小鼠肠道微生物群的多样性和短链脂肪酸产生菌的相对丰度,改善高脂饮食引起的肠道微生物紊乱^[17]。然而,鲜见核桃膳食纤维影响乳杆菌属微生物生长的相关报道。为此,本研究利用纯培养方法系统的评价了核桃可溶与不溶性膳食纤维对10种乳杆菌属微生物的增殖作用,并进一步探究核桃膳食纤维促进增殖的因素,以期核桃资源的综合利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

10种乳杆菌均购自中国工业微生物菌种保藏中心(CICC),均已在食品工业中运用^[18],包括干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus casei*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、鼠李糖乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、唾液联合乳杆菌(*Ligilactobacillus salivarius*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、罗伊氏粘液乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。

1.2 材料与试剂

核桃,云南省大理州漾濞县;MRS肉汤培养基、琼脂粉、3,5-二硝基水杨酸、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、酸性蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;α-淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶,美国Sigma公司;结晶紫、二甲苯、2-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷、邻硝基苯酚、丙酮酸钠、还原型辅酶I二钠、戊二醛、苯酚、葡萄糖,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇,天津市致远化学试剂有限公司;氯仿,成都市科隆化学品有限公司;硫酸,重庆川

东化工(集团)有限公司;酒石酸钾钠、乙酸乙酯、氢氧化钠等,成都金山化学试剂有限公司;化学试剂均为分析纯级。

1.3 仪器与设备

EPOCH2酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;DZF6020真空干燥箱,巩义市予华仪器有限责任公司;PB-10 pH计,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;XO-650D超声细胞破碎仪,南京先欧仪器制造有限公司;YXQ-LS-100SII高压灭菌锅,江阴滨江医药设备有限公司;KLCZ-880A超净工作台,北京亚泰科隆仪器技术有限公司;YQX-II厌氧培养箱,上海龙跃仪器设备有限公司;LC-4017离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 核桃可溶性与不溶性纤维的制备 将脱脂核桃经α-淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶处理后,再依次经碱性蛋白酶、风味蛋白酶、酸性蛋白酶去蛋白后,离心(4 000 r/min, 15 min),残渣为核桃不溶性纤维,上清液经95%乙醇沉淀为核桃可溶性纤维。制备得到的纤维经冷冻干燥后,备用。

1.4.2 生长曲线的绘制 参考罗开莲等^[18]描述的方法,采用1%的接种量将各种乳杆菌接种在MRS液体培养基中,置于37℃培养箱中24 h,间隔2 h连续测定OD_{600nm}值。

1.4.3 菌种活化 参考罗开莲等^[18]描述的方法,从-80℃取出菌种,融化后取1 mL菌液加入9 mL MRS培养基中,12 h培养计为1代,连续传代3次后用于正式试验。

1.4.4 核桃膳食纤维对10种乳杆菌生长的影响 首先,配制含有3.2 g/L核桃膳食纤维的MRS培养基,并分别稀释至1.6,0.8,0.4,0.2,0.1 g/L,灭菌后备用。随后,接种1%的乳杆菌至含不同浓度核桃膳食纤维的培养基中,37℃培养12 h后,测定其OD_{600nm}值。以不接菌的培养基作为对照。核桃膳食纤维对各种乳杆菌生长的促进率按照公式(1)计算:

$$\text{促进率}(\%) = \frac{X_i - C_w - (X_0 - C_m)}{(X_0 - C_m)} \times 100 \quad (1)$$

式中: X_0 为接种菌液而不作纤维处理的培养基培养12 h测定的吸光度; X_i 为核桃膳食纤维处理12 h时测定的吸光度; C_m 为MRS纯培养基培

养 12 h 时测定的吸光度; C_w 为对应浓度核桃纤维样品处理 12 h 时测定的吸光度。

1.4.5 核桃可溶性膳食纤维对唾液联合乳杆菌增殖作用的评价

1.4.5.1 生物量的测定 参照谢翠娜^[19]的方法:将 1% 的唾液联合乳杆菌分别接种于 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 g/L 的核桃可溶性纤维液体培养基中, 厌氧培养 12 h 后, 于 4 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 用灭菌的 PBS 清洗菌体 3 次后, 将菌体干燥至恒重, 称重并记录。

1.4.5.2 平板计数法测定活菌数 将培养 12 h 的乳杆菌菌悬液 (分别含有 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 g/L 核桃可溶性纤维) 稀释到一定梯度后, 涂布到 MRS 固体培养基中, 37 °C 厌氧培养箱中培养 48 h 后计数。

1.4.5.3 生物膜的测定 参照杜文芳^[20]的方法测定, 将唾液联合乳杆菌 (1%) 分别接种到不含或含有 3.2 g/L 核桃可溶性纤维的 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 12 h, 弃菌液, 并使用 PBS 清洗 2 次, 随后在 37 °C 通风干燥 30 min, 即刻采用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, 弃染色液, 用 PBS 冲洗残留染色液, 再经干燥和乙醇脱色后, 测定 OD_{595nm} 值。

1.4.5.4 唾液联合乳杆菌的表面疏水性和酸碱电荷的测定 参考 Samot 等^[21]的方法测定, 在 MRS 培养基中接种 1% 的唾液联合乳杆菌, 厌氧培养 12 h, 高速离心并收集菌体 (4 °C, 10 000×g, 10 min), 随后采用 PBS 将菌体稀释至 OD_{600nm} 值为 0.6 ± 0.2 , 标记为 A_0 ; 取上述稀释后的菌液 1.5 mL, 加入二甲苯 0.5 mL, 在室温下孵育 10 min, 随后振荡 2 min, 再静置 20 min, 立即测定水相的吸光度, 记做 A_1 。表面疏水性计算如公式(2)所示。酸碱电荷的测定方法同表面疏水性相似, 仅将二甲苯替换为氯仿或乙酸乙酯, 计算方法同公式(2)。

$$\text{表面疏水率或酸碱电荷(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

1.4.5.5 pH 值的测定 采用 pH 酸度计分别测定不同纤维添加量培养 12 h, 以及 0, 3.2 g/L 纤维添加量的不同培养时段培养液的 pH 值。

1.4.5.6 菌液中总糖含量的测定 采用苯酚硫酸法测定不同培养阶段 (0, 6, 12, 24, 48 h) 菌液的总

糖含量^[22], 具体方法如下: 分别移取 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 于比色管中, 加水补至 2.0 mL, 再加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 摇匀, 加入浓硫酸 5.0 mL, 于波长 490 nm 处测定其吸光值。以葡萄糖为标准品绘制标准曲线, 定量菌液中的总糖。

1.4.5.7 菌液中还原糖含量的测定 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色法 (DNS) 测定不同培养阶段 (0, 6, 12, 24, 48 h) 菌液的总糖含量^[23], 具体方法如下: 分别移取 1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240 μ L 于比色管中, 加水补至 0.4 mL, 摇匀, 加入 DNS 溶液 0.4 mL, 沸水浴 5 min 后, 迅速冷却至室温, 加水稀释至 5 mL, 于波长 540 nm 处测定其吸光值。以葡萄糖为标准品绘制标准曲线, 定量菌液中还原糖。

1.4.5.8 乳酸脱氢酶的测定 乳酸脱氢酶酶活的测定参照李琦^[24]的方法, 首先取 0, 3.2 g/L 的核桃膳食纤维处理的培养液各 10 mL, 于 4 000 r/min 下离心 10 min 去上清, 加入 10 mL PBS, 冰水中超声破碎, 超声处理后的菌液离心 10 min (10 000 r/min), 获得上清液, 即为粗酶液; 然后连续测定反应过程中 OD_{340nm} , 并将 OD_{340nm} 的降低量 ΔA 转换为酶活。

1 个酶活单位定义为 25 °C 时每毫升酶液每分钟氧化 1 μ mol/L NADH 所需的酶。酶活力按公式 (3) 计算:

$$\text{乳酸脱氢酶(U/mL)} = \frac{V_1 \times \Delta A}{6.22 \times V_s} \quad (3)$$

式中: V_s 为测试样品的体积, mL; ΔA 为每分钟吸光度的降低值; V_1 为反应总体积, mL。

1.4.5.9 β -半乳糖苷酶的测定 β -半乳糖苷酶的测定方法主要分为产酶诱导、粗酶液制备和酶活测定 3 个步骤, 具体参照孟鸽^[23]的方法并稍作修改。首先, 取 0, 3.2 g/L 核桃可溶膳食纤维处理 12 h 的唾液联合乳杆菌菌液各 5 mL, 以 1% 的乳糖为诱导剂在 37 °C 培养 1 h; 然后, 取诱导后培养液在 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 使用 PBS 洗涤菌体, 随后再加入 5 mL PBS, 于冰水中超声破碎; 最后, 使用 PBS 配制 2 mg/mL 的 2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷作为底物, 取 0.5 mL 底物溶液 37 °C 预热 10 min 后, 加入酶液 0.5 mL, 37 °C 反应

15 min,加入 0.15 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液 2.5 mL 终止反应,于波长 420 nm 处测量吸光值;分别取质量浓度为 0,40,80,120,160,200 $\mu\text{g/mL}$ 的邻硝基苯酚标准溶液 1 mL 绘制标准曲线,测量波长 420 nm 处邻硝基苯酚的吸光度,计算酶活。

1 个酶活单位定义为每毫升酶液每分钟释放 1 $\mu\text{mol/L}$ 的邻硝基苯酚。以吸光度为纵坐标,邻硝基苯酚浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 为横坐标,绘制标准曲线。酶活按公式(4)计算:

$$\beta\text{-半乳糖苷酶活力(U/mL)} = \frac{V_1 \times c}{t \times V_2} \quad (4)$$

式中: V_1 为反应总体积, mL; c 为邻硝基苯酚浓度, $\mu\text{mol/mL}$; t 为反应时间, min; V_2 为发酵液体积, mL。

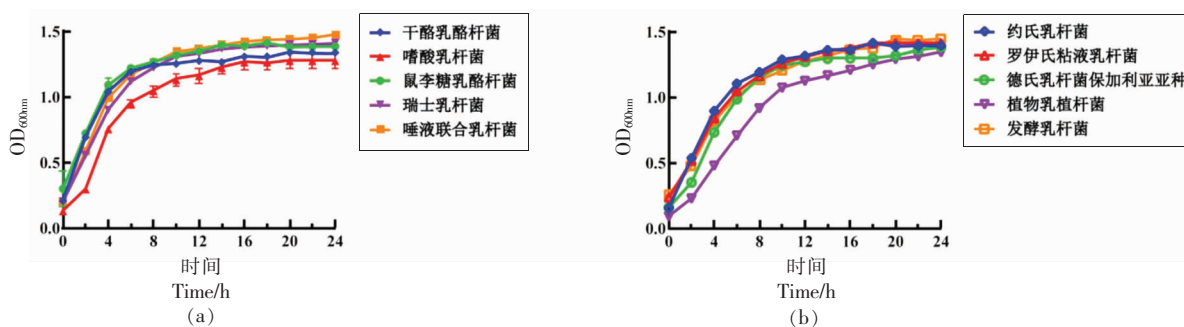


图 1 10 种乳杆菌的生长曲线

Fig.1 Growth curves of ten *Lactobacillus* species

2.2 核桃不溶性膳食纤维对乳杆菌增殖的影响

由图 2 可知,核桃不溶性纤维对植物乳植杆菌的促进作用随着添加量的变化呈先升高后降低的趋势,当不溶性纤维含量为 0.8 g/L 时,促进作用最大,达 9.95%。植物乳植杆菌在发酵过程中,受到底物、pH 值、发酵时间等因素的影响,核桃不溶性纤维对植物乳植杆菌促进作用呈先升高后降低的趋势,可能与纤维加入后环境改变有关^[25]。核桃不溶性纤维对另外 9 种乳杆菌均表现出不同程度的抑制作用。当添加量为 3.2 g/L 时,抑制率均在 20% 以上,其中对唾液联合乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种的抑制率均在 40% 以上。

植物乳植杆菌是自然界广泛存在的一种革兰氏阳性菌,具有维持肠道菌群稳态、免疫调节、改善脂质代谢等多种生理功能^[26]。研究发现,该菌可发酵葡萄糖和其它各种碳水化合物^[27]。一项全基

1.5 数据处理

试验结果以“ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ”表示,数据采用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 26.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 10 种乳杆菌的生长曲线

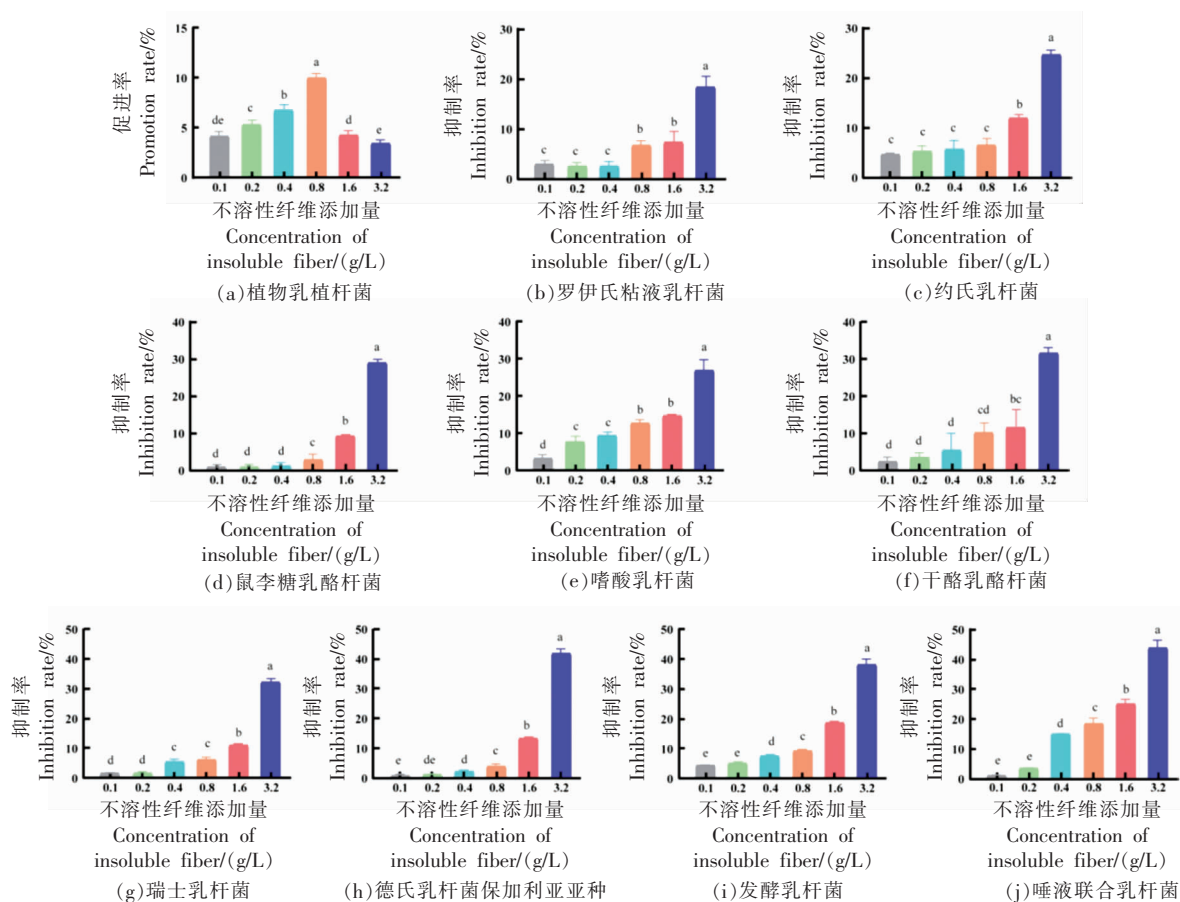
由图 1 可知,10 种乳杆菌在 MRS 培养基中正常生长。培养 2~6 h,乳杆菌处于对数生长期;培养 6~10 h,除植物乳杆菌与嗜酸乳杆菌之外的其它菌株由对数生长期逐渐进入稳定期;在 12 h 之后,10 种乳杆菌均进入生长稳定期。

基因组测序发现泡菜来源的植物乳杆菌 NCU116 基因组中,编码了 223 个与碳水化合物代谢相关的基因,包含葡萄糖、果糖、甘露糖、纤维二糖、半乳糖醇等 12 种碳源,这些基因是适宜植物基发酵的基础^[28]。另一项利用基因组学与转录组学的研究发现植物乳杆菌 ST-III 代谢低聚果糖的关键酶—— β -果糖苷酶(*SacA*),低聚果糖通过 PTS 转运系统转运进胞内后,被 *SacA* 水解成单糖^[29]。在本研究中发现,核桃不溶性纤维对植物乳植杆菌具有促进作用,可能与其含有多种碳水化合物代谢基因有关。也有研究报道了类似的结果,利用植物乳植杆菌对麦麸不溶性膳食纤维发酵后,其持水、持油和膨胀能力提高,说明植物乳植杆菌能够利用麦麸不溶性膳食纤维^[30]。此外,在本研究中还发现,核桃膳食纤维对罗伊氏粘液乳杆菌、约氏乳杆菌等 9 种乳杆菌没有促进作用,可能是由于其

缺乏相应的碳水化合物代谢相关基因或水解酶。

另有研究报道,以植物乳植杆菌 P17630 与卷曲乳杆菌 P17631 发酵添加 1 g/L 榛子皮可溶性与不溶性纤维强化的 MRS 培养基发现,卷曲乳杆菌 P17631 发酵榛子皮可溶性纤维细菌生长显著高于发酵榛子皮不溶性纤维;相反,植物乳杆菌 P17630 在榛子皮不溶性纤维存在的情况下,细菌

生长速率大于相同浓度的榛子皮可溶性纤维^[31],说明纤维发酵与其菌种有关,同时,也受到纤维结构的影响。如纤维链长、单体组成、聚合度、糖苷键类型,均有可能影响细菌发酵^[32-34]。因此,在本研究中其它 9 种乳杆菌虽不能利用核桃不溶性纤维,但可以利用核桃可溶性纤维,也可能是受纤维结构的影响。



注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 2 核桃不溶性膳食纤维对 10 种乳杆菌生长的影响

Fig.2 The effect of walnut insoluble fiber on the growth of ten *Lactobacillus* species

2.3 核桃可溶性纤维对 10 种乳杆菌生长的影响

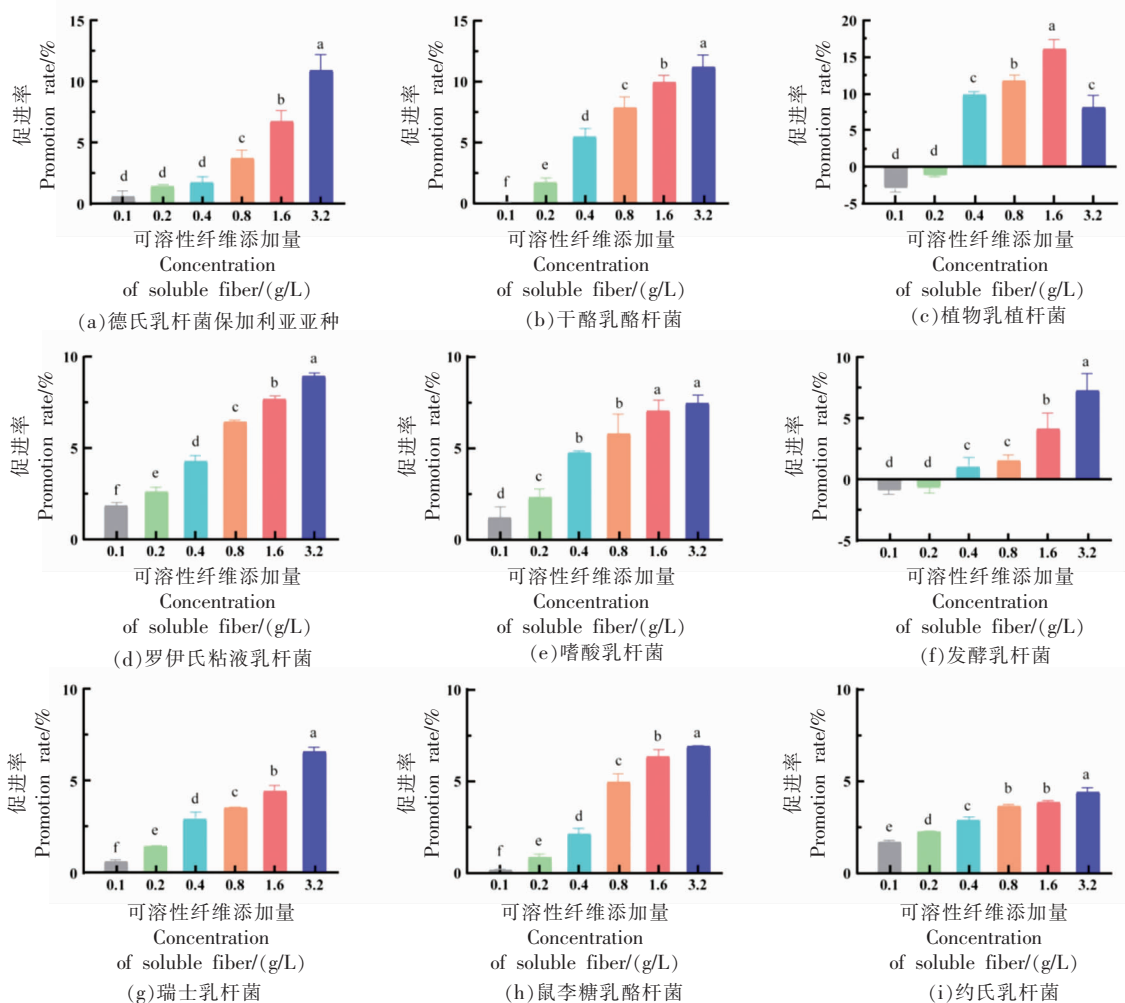
由图 3 可知,核桃可溶性纤维对 9 种乳杆菌的生长有促进作用。当含量为 1.6 g/L 时,其对植物乳植杆菌的促进率最大,达 16.14%;当含量增加至 3.2 g/L 时,其对另外 3 种乳杆菌促进率最高,分别为干酪乳酪杆菌的 11.23%、德氏乳杆菌保加利亚亚种的 10.97%和罗伊氏粘液乳杆菌的 8.93%。值得注意的是,唾液联合乳杆菌在核桃可溶性膳食纤维的干预下迅速增殖,当含量为 3.2

g/L 时,促进率可达 44.34%(图 4a)。

相比较核桃不溶性纤维,10 种乳杆菌均可利用核桃可溶性纤维,核桃可溶性纤维发酵程度高于核桃不溶性纤维,这与许多研究结果一致^[35-37]。一般来讲,可溶性纤维较不溶性纤维分子质量或聚合度更低,这可能更利于微生物发酵^[38]。虽然 10 种乳杆菌在核桃可溶性纤维的干预下都表现出增殖作用,但增殖程度各有不同。核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌的促进作用最显著,其次是植物

乳植杆菌、干酪乳酪杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种,这种菌种差异性可能与其单糖组成有关^[17]。据报道,核桃水溶性纤维的单糖组成由高到低依次为阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖和半乳糖醛酸等^[17]。研究发现,植物乳植杆菌含有L-阿

拉伯糖异构酶,能够利用阿拉伯糖与半乳糖等^[39];干酪乳杆菌G-04可发酵鼠李糖、半乳糖、葡萄糖,不可发酵阿拉伯糖和半乳糖醛酸^[40]。说明乳杆菌可能通过部分利用核桃可溶性纤维中的单糖来促进增殖。



注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 核桃可溶性纤维对9种乳杆菌生长的影响

Fig.3 The effect of walnut soluble fiber on the growth of nine *Lactobacillus* species

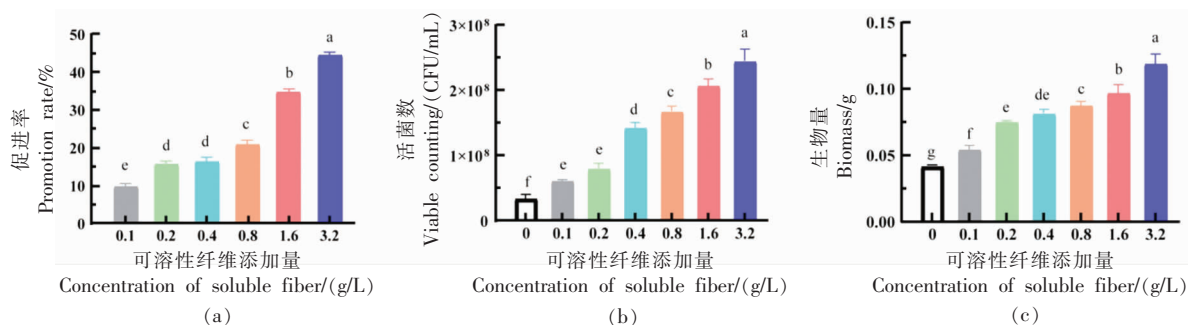
2.4 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌增殖作用的评价

2.4.1 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌增殖的影响 由图4可知,随着核桃可溶性纤维添加量的增加,对唾液联合乳杆菌的促进率逐渐增加,活菌数与生物量显著上升($P < 0.05$),且呈现一定的浓度依赖性。

2.4.2 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌生物膜和非特异性吸附能力的影响 唾液联合乳杆菌生物膜的形成情况如图5所示。当含量超过0.8 g/L时,核桃可溶性纤维能够显著促进生物膜的形成(图5a, $P < 0.05$)。唾液联合乳杆菌的表面疏水性在含有3.2 g/L的核桃可溶性纤维处理下得到了显著提高,其碱电荷显著降低($P < 0.05$),然而其酸电

荷无显著变化。黏附性是影响益生菌进入肠道定植的关键因素,添加纤维后,表面疏水性升高,细菌黏附性增加,这有利于唾液联合乳杆菌在肠道中发挥有益作用^[41]。研究发现,巯基化党参多糖能够增加鼠李糖乳杆菌的肠道黏附性,本研究结

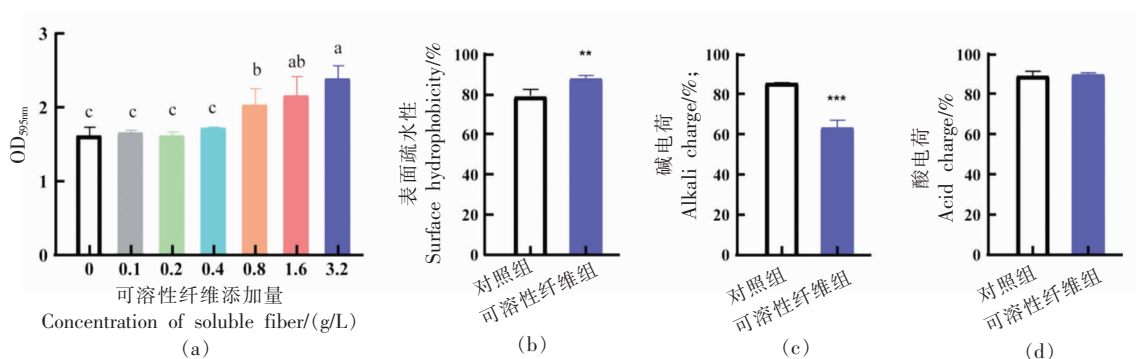
果与其类似^[42]。在较低的酸电荷和较高的碱电荷时,不利于乳杆菌生物膜的形成,本研究发现,添加纤维能够降低碱电荷,并促进唾液联合乳杆菌生物膜的形成,这有利于提高乳杆菌耐干燥和耐热性等^[43],增强乳杆菌适应性。



注:不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 4 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌的增殖作用

Fig.4 The effect of walnut soluble fiber on the growth of *L. salivarius*



注:不同字母表示差异显著($P<0.05$);与含 0%核桃可溶性纤维或对照比较,**. $P<0.01$,***. $P<0.001$ 。

图 5 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌生物膜、表面疏水性与酸碱电荷的影响

Fig.5 The effects of walnut soluble fiber on biofilm, surface hydrophobicity, and acid base charge of *L. salivarius*

2.4.3 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌发酵 pH 值、总糖与还原糖的影响 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌发酵液 pH 值、总糖和还原糖的影响如图 6 所示。随着核桃可溶性纤维含量的增加,培养液 pH 值逐渐下降(图 6a)。培养 12~48 h 期间,核桃可溶性纤维培养液的 pH 值低于对照组;在 0~6 h,总糖浓度高于对照组;在 12 h 时,还原糖浓度低于对照组(图 6b~6d)。表明核桃可溶性纤维处理可增加唾液乳杆菌对糖源的利用。此外,膳食纤维还可以通过肠道微生物发酵产生丙酸、丁酸、乳酸等多种对人体健康有益的物质^[44]。据报道,唾液联合乳杆菌除了发酵产生乳酸外,也能产

生乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸^[45]。这提示核桃可溶性纤维培养液中 pH 值的降低可能与有机酸的产生有关。

2.4.4 核桃可溶性纤维可提高 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶活性 与对照组相比,核桃可溶性纤维可显著提高 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶的活性(图 7, $P<0.05$)。研究发现,霍山石斛多糖可使嗜酸乳杆菌活菌数增加,并提高发酵液中 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶活性^[23],这与本研究结果类似。据报道, β -半乳糖苷酶存在于唾液联合乳杆菌之中,它是一种具有催化半乳糖和葡萄糖之间 β -糖苷键功能的酶,参与合成低聚半乳糖,低聚半乳糖

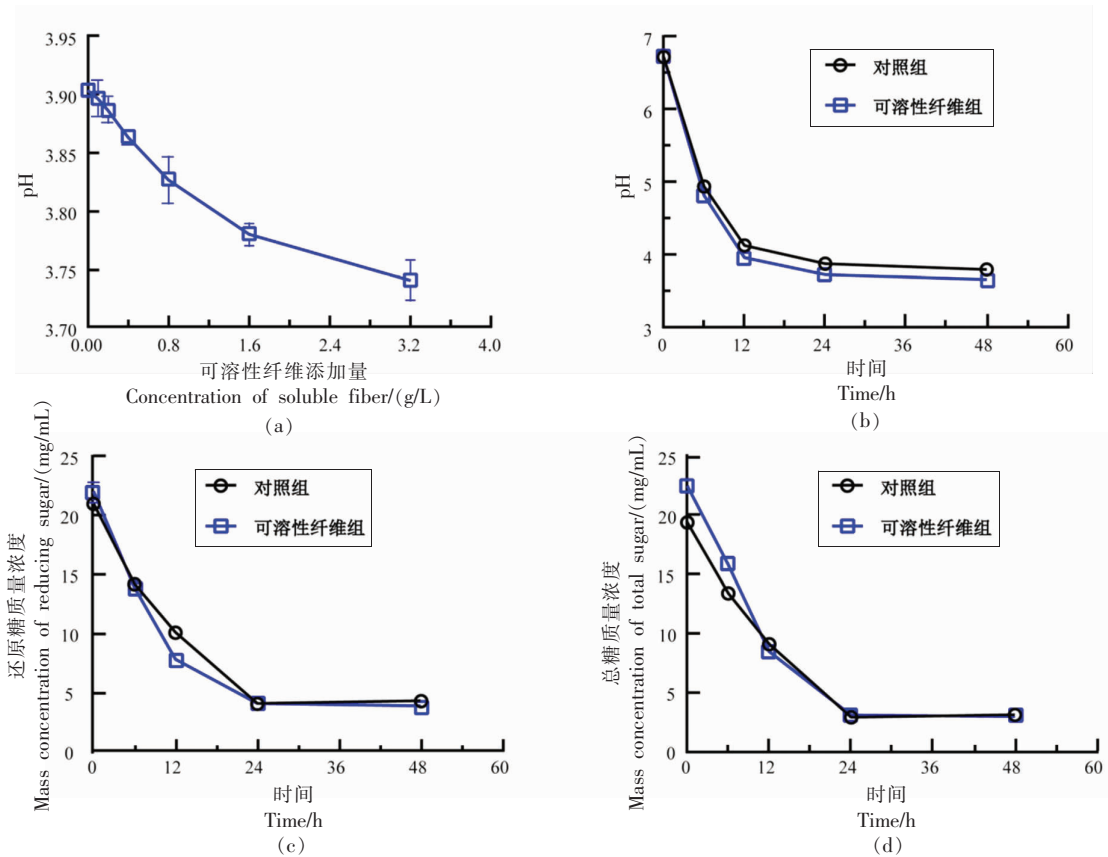
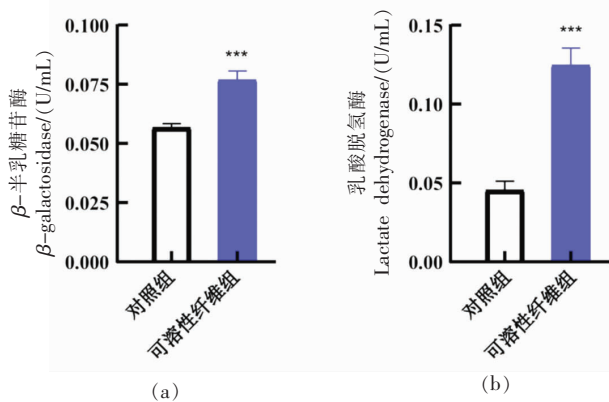


图6 核桃可溶性纤维对唾液联合乳杆菌发酵液 pH 值、总糖与还原糖的影响

Fig.6 The effects of walnut soluble fiber on pH value, total sugar, and reducing sugar of *L. salivarius* fermentation broth



注:与对照组比较,***, $P < 0.001$ 。

图7 核桃可溶性纤维对 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶活性的影响

Fig.7 The effects of walnut soluble fiber on the enzyme activity of β -galactosidase and lactate dehydrogenase

可作为增殖因子被乳杆菌利用^[46]。当核桃可溶性纤维被唾液联合乳杆菌降解后,其含有的半乳糖

可被 β -半乳糖苷酶转化为低聚半乳糖,进而促进唾液联合乳杆菌的增殖。研究发现,唾液乳杆菌能够代谢低聚果糖产生乳酸和乙酸^[47],而在本研究中,核桃可溶性纤维提高了乳酸脱氢酶的活性,这有可能进一步提高了乳酸产生效率。

3 结论

本研究比较了不同核桃不溶性或可溶性膳食纤维添加量对10种乳杆菌生长的影响。核桃不溶性膳食纤维仅能促进植物乳植杆菌的生长,对其它乳杆菌均有抑制作用。核桃可溶性膳食纤维对供试的10种乳杆菌均表现出促进作用,对唾液联合乳杆菌促进作用最显著;当核桃可溶性膳食纤维的添加量为3.2 g/L时,促进率可达44.34%。进一步探究核桃可溶性膳食纤维对唾液联合乳杆菌增殖作用发现,核桃可溶性纤维可通过提高唾液联合乳杆菌的 β -半乳糖苷酶和乳酸脱氢酶的活

性来促进增殖,且有利于增加其黏附性与生物膜的形成。这些研究结果可为核桃可溶性膳食纤维作为新型益生元提供理论支撑。

参 考 文 献

- [1] HUANG R J, WU F, ZHOU Q, et al. *Lactobacillus* and intestinal diseases: Mechanisms of action and clinical applications[J]. *Microbiological Research*, 2022, 260: 127019.
- [2] HEENEY D D, GAREAU M G, MARCO M L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 140-147.
- [3] 秦文飞, 宋馨, 夏永军, 等. 乳酸菌在肠道定植的影响因素及研究方法[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 275-283.
- QIN W F, SONG X, XIA Y J, et al. Factors affecting intestinal colonization of lactic acid bacteria and research methods for it[J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 275-283.
- [4] 姚国强, 张雪梅, 高志敏, 等. *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 增殖培养基及高密度培养工艺优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(14): 97-105.
- YAO G Q, ZHANG X M, GAO Z M, et al. Optimization of enrichment medium and high cell density cultivation of *Lactobacillus reuteri* IMAU10240 [J]. *Food Science*, 2017, 38(14): 97-105.
- [5] 余乐. 植物乳杆菌的增殖、干燥及贮藏研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- YU L. Study on proliferation, drying and conservation of *Lactobacillus plantarum*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [6] FUJISAWA T, MITSUOKA T. Homofermentative *Lactobacillus* species predominantly isolated from canine feces[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1996, 58(6): 591-593.
- [7] WANG W Z, SU D, HU H Z, et al. Unraveling the mechanism of raffinose utilization in *Ligilactobacillus salivarius* Ren by transcriptomic analysis[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(9): 229.
- [8] CHOURADDI R, KUMAR S, KUMAR B, et al. Techno-functional characterization of fecal *Lactobacilli* isolates of *Bos indicus* calves for probiotic properties [J]. *Veterinary Research Communications*, 2023, 47(3): 1285-1302.
- [9] 张董燕, 季海峰, 刘辉, 等. 猪源唾液乳杆菌对生长猪氮表观消化率及血清指标的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(7): 60-63.
- ZHANG D Y, JI H F, LIU H, et al. Effects of dietary *Lactobacillus salivarius* from swine on apparent nitrogen digestibility and serum indices of growing pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2013, 49(7): 60-63.
- [10] DEC M, STPIEŃ-PYNIĄK D, PUCHALSKI A, et al. Biodiversity of *Ligilactobacillus salivarius* strains from poultry and domestic pigeons[J]. *Animals*, 2021, 11(4): 972.
- [11] GUERRERO SANCHEZ M, PASSOT S, CAMPOY S, et al. *Ligilactobacillus salivarius* functionalities, applications, and manufacturing challenges[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 106(1): 57-80.
- [12] 扈晓杰, 韩冬, 李铎. 膳食纤维的定义、分析方法和摄入现状[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(3): 133-137.
- HU X J, HAN D, LI D. The definition, analytic methods and intake status of dietary fiber[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(3): 133-137.
- [13] SO D, WHELAN K, ROSSI M, et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2018, 107(6): 965-983.
- [14] SHI F C, ZHOU F, ZHENG X H, et al. Effects of dietary fiber compounds on characteristic human flora and metabolites mediated by the longevity dietary pattern analyzed by *in vitro* fermentation[J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5037.
- [15] REYES-REYES M, SALAZAR-MONTOYA J A, RODRÍGUEZ-PÁEZ L I, et al. *In vitro* fermentation of oligosaccharides obtained from enzymatic hydrolysis of *Opuntia streptacantha* mucilage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 99(6): 2883-2891.
- [16] 耿舒雯. 核桃粕膳食纤维理化特性分析及其咀嚼片制备工艺研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2019.
- GENG S W. Physicochemical properties of walnut dietary fibers and production technique of chewable tablet[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2019.

- [17] WANG G L, ZHONG D Y, LIU H H, et al. Water soluble dietary fiber from walnut meal as a prebiotic in preventing metabolic syndrome[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 78: 104358.
- [18] 罗开莲, 田洋, 孙娜, 等. 糖尿病药物那格列奈促进嗜酸乳杆菌生长的作用[J]. *中国微生态学杂志*, 2023, 35(3): 275-283, 290.
- LUO K L, TIAN Y, SUN N, et al. The effect of diabetes drug Nateglinide on the growth of *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2023, 35(3): 275-283, 290.
- [19] 谢翠娜. 疏水性和电荷性差异肽及其锌配合物的制备及在乳酸菌生长和发酵中的应用[D]. 广州: 广州大学, 2022.
- XIE C N. Preparation and of application during the growth and fermentation of lactic acid bacteria of hydrophobic and chargability differential peptides and their Zinc complexes[D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2022.
- [20] 杜文芳. EGCG 抑制单增李斯特菌的机理研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2018.
- DU W F. The antibacterial mechanism of mode of epigallocatechin gallate against *Listeria monocytogenes*[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2018.
- [21] SAMOT J, LEBRETON J, BADET C. Adherence capacities of oral *Lactobacilli* for potential probiotic purposes[J]. *Anaerobe*, 2011, 17(2): 69-72.
- [22] 王腾. 黄参粗多糖的益生元特性及其在发酵乳中的应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- WANG T. The prebiotic properties and application of crude *Sphallerocarpus gracilis* polysaccharides in fermented milk [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.
- [23] 孟鸽. 霍山石斛多糖对嗜酸乳杆菌生理特性影响及在发酵乳中的应用[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2017.
- MENG G. The effect of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* on physiological characteristics of *Lactobacillus acidophilus* and the application to fermented milk[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2017.
- [24] 李琦. 低 pH 条件下嗜热链球菌产酸关键酶及控制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
- LI Q. Research and control on key enzymes involved in producing lactic acid of *Streptococcus thermophilus* in low pH environment [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2010.
- [25] 马翠柳, 王金铭, 袁伟涛, 等. 植物乳杆菌的生理特性及影响其增殖的因素[J]. *特产研究*, 2023, 45(3): 169-173.
- MA C L, WANG J M, YUAN W T, et al. Physiological characteristics and factors of proliferation on *Lactobacillus plantarum*[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2023, 45(3): 169-173.
- [26] 蔡红英, 李道捷, 孟昆, 等. 植物乳杆菌的生理功能及其在家禽中的应用研究进展[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(6): 1-12.
- CAI H Y, LI D J, MENG K, et al. Research progress on physiological functions of *Lactobacillus plantarum* and its application in poultry[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(6): 1-12.
- [27] 刘超楠. 不同来源植物乳杆菌基因组以及对碳水化合物利用的比较分析[D]. 长春: 中国农业科学院, 2021.
- LIU C N. Comparative analysis of different sources of *Lactobacillus plantarum* genome and carbohydrate utilization[D]. Changchun: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [28] 黄涛. 我国传统泡菜中植物乳杆菌 NCU116 的发酵特性及益生功能相关基因解析[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- HUANG T. Genomic analysis of genes related to fermentation and probiotic characterist of *Lactobacillus plantarum* NCU116 derived from traditional Chinese sauerkraut[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [29] 陈臣. 植物乳杆菌 ST-III 全基因组序列分析及其对低聚果糖代谢通路的解析[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- CHEN C. Characterization of the complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* ST-III and its pathways for fructooligosaccharides metabolism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [30] LIAO A M, ZHANG J, YANG Z L, et al. Structural, physicochemical, and functional properties of wheat bran insoluble dietary fiber modified with probiotic fermentation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 803440.
- [31] MONTELLA R, COÏSSON J D, TRAVAGLIA F, et al. Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.): Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(1): 306-315.

- [32] RASTALL R A, GIBSON G R, GILL H S, et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(2): 145-152.
- [33] WEI B B, XIA W, WANG L, et al. Diverse prebiotic effects of isomaltodextrins with different glycosidic linkages and molecular weights on human gut bacteria *in vitro*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 279: 118986.
- [34] CHEN M, FAN B, LIU S J, et al. The *in vitro* effect of fibers with different degrees of polymerization on human gut bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 819.
- [35] 曹晶晶, 木泰华, 马梦梅. 不同乳酸菌发酵对甘薯淀粉加工浆液营养成分及感官特性的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(18): 134-142.
- CAO J J, MU T H, MA M M. Effect of fermentation with different lactic acid bacteria starter cultures on nutritional and functional components and sensory characteristics of sweet potato slurry for starch production[J]. *Food Science*, 2022, 43(18): 134-142.
- [36] 赵文婧, 陈立英. 谷子可溶性膳食纤维的理化性质、结构表征及对7种肠道菌群体外生长的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(9): 92-102.
- ZHAO W J, CHEN L Y. Physical and chemical properties and structural characterization of soluble dietary fiber from millet and its effects on the growth of seven kinds of intestinal bacteria *in vitro* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(9): 92-102.
- [37] ZHANG Z G, LIU B Y, LIU X Q, et al. Effects of steaming on sweet potato soluble dietary fiber: Content, structure, and *Lactobacillus* proliferation *in vitro*[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2023, 12(8): 1620.
- [38] MURGA-GARRIDO S M, HONG Q L, CROSS T W L, et al. Gut microbiome variation modulates the effects of dietary fiber on host metabolism[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 117.
- [39] 孙志军, 陈文薪, 凌锦, 等. 高产D-塔格糖植物乳杆菌 WU14 的L-阿拉伯糖异构酶发酵培养基优化[J]. *食品科技*, 2019, 44(5): 24-32.
- SUN Z J, CHNE W X, LING J, et al. Medium optimization of L-arabinose isomerase produced by *Lactobacillus plantarum* WU14 with high D-tagatose yield[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(5): 24-32.
- [40] 周杰民. 果胶酶高产菌株的选育及其应用[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- ZHOU J M. Study on the breeding of pectinase hyper-producer and its application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.
- [41] 金星, 贺禹丰, 周永华, 等. 具有高细胞黏附性及高生物膜形成能力的植物乳杆菌有效抑制小鼠体内空肠弯曲杆菌毒力因子的转录活性[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(14): 12-18.
- JIN X, HE Y F, ZHOU Y H, et al. *Lactobacillus plantarum* with high cell adhesion and biofilm formation ability effectively inhibits the transcriptional activities of campylobacter jejuni virulence genes in mice[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(14): 12-18.
- [42] 曹恺欣, 武俊瑞, 李默, 等. 巯基化党参多糖对鼠李糖乳杆菌肠道黏附定植作用的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(4): 45-54.
- CAO K X, WU J R, LI M, et al. Effect of thiolation modification of *Codonopsis pilosula* polysaccharide on intestinal adhesion and colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(4): 45-54.
- [43] 尹一婷. 乳杆菌生物膜成膜规律及其特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- YIN Y T. Research on regulation of *Lactobacillus* biofilm formation and their characteristics[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [44] CALATAYUD M, ABEELE P V D, GHYSELINCK J, et al. Comparative effect of 22 dietary sources of fiber on gut microbiota of healthy humans *in vitro*[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 700571.
- [45] DASH J, SETHI M, DEB S, et al. Biochemical, functional and genomic characterization of a new probiotic *Ligilactobacillus salivarius* F14 from the gut of tribes of Odisha[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(7): 171.
- [46] 赵华, 张敏, 姚梦珂, 等. 低聚半乳糖对植物乳杆菌 NMGL2 发酵乳加工特性的影响[J]. *食品科技*, 2023, 48(1): 1-7.
- ZHAO H, ZHANG M, YAO M K. Effects of galactooligosaccharides on processing characteristics of *Lactobacillus plantarum* NMGL2 fermented milk [J].

Food Science and Technology, 2023, 48(1): 1-7.
[47] 高颖, 于海龙, 周永强, 等. 唾液乳杆菌利用低聚果糖的代谢过程研究[J]. 中国酿造, 2010(12): 114-117.

GAO Y, YU H L, ZHOU Y Q, et al. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus salivarius* [J]. China Brewing, 2010(12): 114-117.

Effect of Walnut Dietary Fiber on the Proliferation Effect of *Lactobacillus in Vitro*

YANG Weixing^{1,2,3}, TIAN Yang^{4*}, YUE Man³, SHENG Jun², XU Kunlong⁵, GAO Xiaoyu^{1,2,3*}

¹Yunnan Key Laboratory of Precision Nutrition and Personalized Food Manufacturing, Kunming 650201

²Development and Utilization of Food and Drug Homology Resources Engineering Center Ministry of Education, Kunming 650201

³College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201

⁴Pu'er University, Pu'er 665000, Yunnan

⁵Animal Medical College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract To investigate the potential of walnut dietary fiber to promote the growth of *Lactobacilli*, various mass concentrations of dietary fiber (0.1 to 3.2 g/L) were added to MRS medium. The effects of walnut dietary fiber on the growth of ten strains of *Lactobacilli* were compared, and the optimal 'fiber + strain' combination was selected based on promotion rate to evaluate the proliferation effects. The results showed that walnut insoluble fiber only promoted the growth of *Lactiplantibacillus plantarum* by up to 9.95%, while inhibiting the growth of the other nine strains. In contrast, walnut soluble fiber exhibited the highest promotion rate for *Ligilactobacillus salivarius* at 44.34%, followed by *Lactiplantibacillus plantarum* (16.14%) and *Lactocaseibacillus casei* (11.23%). The effect of walnut soluble fiber on the proliferation of *Ligilactobacillus salivarius* were as follows: walnut soluble fiber significantly increased the biomass, viable count, non-specific adhesion ability ($P<0.05$). At a fiber concentration of 3.2 g/L, the biomass and viable count increased by 2.86 times and 7.28 times, respectively, and the surface hydrophobicity increased by 8.81%. Additionally, it significantly promoted the formation of biofilm ($P<0.05$), increased sugar utilization, and reduced the pH value of the fermentation broth ($P<0.05$). At 3.2 g/L fiber addition, the pH value of the fermentation broth reached its lowest point at 3.74. Furthermore, walnut soluble fiber significantly increased the activities of β -galactosidase and lactate dehydrogenase in *Ligilactobacillus salivarius* ($P<0.05$). Conclusion: walnut soluble fiber promotes the proliferation of *Ligilactobacillus salivarius* by increasing the activities of β -galactosidase and lactate dehydrogenase, and is beneficial to promoting its adhesion and biofilm formation. These findings provide a theoretical reference for the use of walnut dietary fiber as a new type of prebiotics, and offer new ideas for its comprehensive development and utilization.

Keywords walnut dietary fiber; *Lactobacillus*; proliferative effect