DOI:10.12441/spyswjs.20240523002 [文章编号] 1673-1689(2025)01-0115-10

适于沙棘汁发酵的乳酸菌适应性进化策略研究

陈彦辉[1] 张智锋[2,3] 庄 姣[1] 齐 瑾[1] 高 岩[1] 王彦娟[4] 剧 柠[1*]

(1. 宁夏大学食品科学与工程学院,宁夏 银川 750021; 2. 华中农业大学食品科学技术学院,湖北 武汉 430070; 3. 宁夏华信达健康科技有限公司,宁夏 灵武 751400; 4. 鄂尔多斯市发展和改革委员会综合保障中心,内蒙古 鄂尔多斯 017010)

摘要:【目的】利用沙棘汁中主要的有机酸胁迫促进乳酸菌的适应性进化,从而提高其在沙棘汁中的抗逆性。**【方法】**首先从宁夏浆水中分离得到的8株乳酸菌里筛选出2株适用于沙棘汁发酵的菌株;接着采用*L*-苹果酸、奎宁酸胁迫进行乳酸菌适应性进化处理,并对这2种策略提高目标菌株耐受性的效果进行比较分析。选择*L*-苹果酸胁迫对菌株LP-1适应性进化125 d。**【结果】**改良后的菌株LP-1-679在发酵沙棘汁时可积累高达0.4 g/L的乳酸,苹果酸消耗率为88.24%,分别是出发菌株的2.67倍和6.60倍,且具备一定的遗传稳定性。与初始菌株相比,菌株LP-1-679中部分饱和脂肪酸(C14:0、C21:0)质量分数有所下降,不饱和脂肪酸(C16:1、C18:1n9c、C22:1n9)质量分数有所上升。**【结论】**经过酸胁迫乳酸菌得到一株发酵性能好、遗传稳定性强的菌株,该菌株可能是通过调整细胞膜中脂肪酸的组成来抵御酸胁迫。

关键词:乳酸菌;沙棘;适应性进化;*L*-苹果酸;酸胁迫

Strategies for Adaptive Evolution of Lactic Acid Bacteria for Seabuckthorn Juice Fermentation

CHEN Yanhui[1] *ZHANG Zhifeng*[2,3] *ZHUANG Jiao*[1] *QI Jin*[1] *GAO Yan*[1] *WANG Yanjuan*[4] *JU Ning*[1*]

(1. School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Ningxia Huaxinda Health Technology Co., Ltd., Lingwu 751400, China; 4. Integrated Security Centre, Ordos Development and Reform Commission, Ordos 017010, China)

Abstract: [**Objective**] To enhance the stress resistance of lactic acid bacteria in seabuckthorn juice by inducing the adaptive evolution of the bacteria under the stress of main organic acids. [**Method**] First, two strains of lactic acid bacteria suitable for fermenting seabuckthorn juice were selected from eight strains isolated from Jiangshui collected from Ningxia. Adaptive evolution was induced under *L*-malic acid and quinic acid stress, and the two strategies were compared regarding the performance in improving stress resistance of the strains. Subsequently, strain LP-1 was subjected to *L*-malic acid stress for 125 d. [**Result**] The fermentation of seabuckthorn juice with the modified strain LP-1-679 showed a lactic acid yield of 0.4 g/L and a malic acid consumption rate of 88.24%, which were 2.67 and 6.60 times those of the original strain, respectively. Moreover, strain LP-1-679 exhibited genetic stability. Compared with the original strain, strain LP-1-679 led to a decrease in the mass fraction of saturated fatty acids (C14:0 and C21:0) and an increase in the mass fraction of unsaturated fatty acids (C16:1,

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金项目(2022AAC03023);宁夏回族自治区重点研发计划项目(2021BEF02022)。

通信作者:剧柠(1979—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事乳制品加工及乳酸菌资源利用研究。E-mail: juning1122@163.com

收稿日期:2024-05-23 **修回日期:**2024-10-29

C18: 1n9c, and C22: 1n9). [**Conclusion**] A lactic acid bacterial strain with good fermentation performance and strong genetic stability is obtained after acid stress treatment. This strain might resist acid stress by adjusting the composition of fatty acids in the cell membrane.

Keywords: lactic acid bacteria; seabuckthorn; adaptive evolution; *L*-malic acid; acid stress

沙棘果实为黄色、橘色或红色的椭圆状小浆果[1]。沙棘果实富含多酚、黄酮、维生素C、类胡萝卜素、甾醇和有机酸等多种对人体有益的生物活性物质[2-3]，在抗氧化、免疫调节、黏膜保护、抗癌、改善代谢综合征等方面具有显著效果[4-6]。沙棘果实常被用于制作健康食品，如沙棘饮料、沙棘原浆、冻干沙棘粉等产品，但由于其产品口感酸涩且甜度较低，难以吸引消费者，限制了沙棘类产品的生产及其在食品工业中的应用[7]。造成沙棘汁口感辛锐的*L*-苹果酸，经乳酸菌发酵后脱羧，可以转化为口感柔和的乳酸[1]，同时增加了酯类等风味物质的含量[8]，可有效改善沙棘汁的整体风味。此外，乳酸菌还能将具有涩味的大分子结合态糖苷类物质分解为无涩味且更易吸收的小分子游离态活性多酚，从而提高沙棘汁的生物利用度及其抗氧化、抗菌能力[9-10]。

沙棘果实中的有机酸质量浓度高达7.27 g/dL[4]，主要以苹果酸和奎宁酸为主，占沙棘浆果有机酸的90%以上[11]。研究表明，酸胁迫会导致乳酸菌细胞内pH降低，破坏其接近中性的动态平衡环境，进而导致细胞活性丧失，最终影响乳酸菌益生功能的发挥和生物活性成分的产生[12-14]。适应性进化被广泛用于细菌性状改良，在不影响其他优良性状的前提下，可以在较短时间内改善细菌的目标表型和生理特性[15]。目前，细菌的适应性进化主要通过热、冷、渗透压、酸、胆盐、氧等胁迫，使部分细菌获得优良性状并可以稳定遗传[16]。吴重德[12]通过对干酪乳酪杆菌进行为期70 d的乳酸胁迫适应性进化，获得抗性菌株，该菌株生物量较原始菌株提高了60%，比生长速率增加了10%，对乳酸胁迫的耐受性提高了638倍。解寒[17]采用柠檬酸胁迫对植物乳植杆菌（*Lactiplantibacillus plantarum*）进行了180 d的适应性进化，发现菌株的柠檬酸抗逆性显著提高且具有遗传稳定性，在以柠檬酸为主体的果蔬汁中也表现出显著的生长优势。

作者以宁夏自然发酵浆水中分离筛选出的8株乳酸菌为出发菌株，分别考察了它们在含*L*-苹果酸、奎宁酸的MRS培养基及沙棘汁中的生长性能和发酵特性，并筛选出特性良好的乳酸菌。另外，比较了*L*-苹果酸胁迫及奎宁酸胁迫的适应性进化策略，分析了最佳策略下驯化的优良菌株在沙棘汁中的发酵性能及其遗传稳定性，旨在为开发适于沙棘汁发酵的乳酸菌菌种提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

植物乳植杆菌LP-1、LP-2、LP-3、LP-4，发酵粘液乳杆菌（*Limosilactobacillus fermentus*）LF-1、LF-2、LF-3、LF-4均由作者所在实验室前期采集的宁夏自然发酵浆水中分离得到[18]，所有菌株均经过生理生化及16S rDNA测序鉴定。

沙棘原浆：宁夏华信达生物科技有限公司，原料产地为新疆克州，品种为阿勒泰大果沙棘，使用前经超高温瞬时灭菌；*L*-苹果酸（分析纯）：常茂生物化学工程股份有限公司；奎宁酸（分析纯）：西安优铂汇生物科技有限责任公司；乳酸含量试剂盒（酶法-可见显色法）、*L*-苹果酸含量试剂盒（酶法-可见显色法）：苏州格锐思生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

立式高压蒸汽灭菌锅：LDZX-50KBS型，上海申安医疗机械厂；紫外可见分光光度计：752N型，上海仪电科学仪器股份有限公司；酶标仪：EPOCH2 NS-SN型，美国BIOTEK有限公司；恒温培养箱：BSP-150型，上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 菌种接种量的控制

供试菌株在MRS液体培养基中活化3代后，用质量浓度为8.5 g/L的生理盐水离心洗涤菌体3次。弃去上清液，用质量浓度为8.5 g/L的生理盐水对底部菌泥进行重悬并混匀。采用麦氏比浊管及分光光度计控制菌悬液OD_{625}值为0.64~0.80，调整菌悬液浓度为1×10^8 CFU/mL，4 ℃保存备用。

1.3.2 乳酸菌发酵性能的测定

1）生物量测定：采用分光光度法测定细菌悬浮液的OD_{600}值。

2）活菌数测定：参考GB 4789.35—2023对乳酸菌进行计数[19]。

3）pH测定：参考GB 5009.237—2016测定样品的pH[20]。

4）*L*-苹果酸、乳酸测定：按照试剂盒说明书对样品中的*L*-苹果酸和乳酸进行测定。

1.3.3 适应性进化菌株的筛选

1）菌株在MRS培养基中生长和发酵性能比较：将8株乳酸菌按体积分数2%分别接种到MRS培养基中，于37 ℃发酵培养20 h。在此过程中，将样品分成2个检测组：一组利用酶标仪对各菌株的生物量进行定期检测，每15 min检测一次；另一组于37 ℃恒温厌氧培养20 h，测定活菌数和pH。

2）菌株*L*-苹果酸耐受性比较：将8株乳酸菌以1×10^8 CFU/mL分别接种至含有5.0、10.0、15.0 g/L *L*-苹果酸的MRS培养基中，于37 ℃恒温厌氧发酵20 h，测定其生物量和乳酸质量浓度。

3）菌株奎宁酸耐受性比较：试验步骤与菌株*L*-苹果酸耐受性比较相同，仅将*L*-苹果酸替换成质量浓度为10.0、15.0、20.0 g/L的奎宁酸即可。

4）菌株在沙棘汁中的发酵性能比较：首先将8株乳酸菌以1×10^8 CFU/mL接种于沙棘汁（沙棘原浆与水质量比为1∶3，含2 g/dL的蔗糖，121 ℃灭菌15 min）中，于37 ℃恒温厌氧培养48 h。测定各菌株产生的*L*-苹果酸与乳酸质量浓度。

1.3.4 菌株适应性进化策略

1）传代试验：确定已筛选出的2株菌（LP-1、LF-3）的传代周期和生长代数[17,21]。

2）*L*-苹果酸适应性进化试验[17]：将菌株LP-1、LF-3活化后，以体积分数2%接种于*L*-苹果酸质量浓度为12.5 g/L的MRS培养基中，连续传代30 d，穿刺保藏当前进化的菌株。

3）奎宁酸适应性进化试验：除将*L*-苹果酸替换成质量浓度为17.5 g/L的奎宁酸外，其余步骤同*L*-苹果酸适应性进化试验。

4）驯化菌株发酵沙棘汁效果比较：选取原始菌株、*L*-苹果酸适应性进化30 d获得的2株菌（LF-3驯化173代、LP-1驯化163代，分别编号为LF-3-173、LP-1-163）及奎宁酸适应性进化30 d获得的2株菌（LF-3驯化173代、LP-1驯化163代，分别编号为LFQ-3-173、LPQ-1-163），活化后以1×10^8 CFU/mL接种于沙棘汁（沙棘原浆与水质量比为1∶1，含2 g/dL的蔗糖，121 ℃灭菌15 min）中，37 ℃恒温厌氧培养48 h。通过测定各菌株产生的苹果酸与乳酸质量浓度确定最佳驯化策略。

1.3.5 最佳适应性进化策略效果分析

采用最佳适应性进化策略对所筛选菌株（LP-1）进行为期4个月的驯化[17]。具体操作为：菌株活化后以体积分数2%接种于含*L*-苹果酸的MRS培养基中，连续传代培养。待菌株在当前*L*-苹果酸质量浓度下稳定生长10 d后，穿刺保藏当前进化代数的菌株。同时，增加*L*-苹果酸的质量浓度继续进行适应性进化。

1）驯化后菌株抗逆特性分析[17]：选取原始菌株LP-1和实验室适应性进化125代、472代、679代获得的菌株，分别在标准MRS培养基及含有不同质量浓度（12.5、14.5、16.0 g/L）*L*-苹果酸的MRS培养基中于37 ℃恒温厌氧培养24 h，测定培养液的生长OD_{600}值和乳酸质量浓度。

2）驯化后菌株发酵沙棘汁效果分析：选取菌株LP-1和适应性进化125代、320代、472代、679代获得的菌株，活化后以1×10^8 CFU/mL接种于沙棘汁（沙棘原浆与水质量比为1∶1，含2 g/dL的蔗糖，121 ℃灭菌15 min）中，于37 ℃恒温厌氧培养48 h。测定各菌株产生的苹果酸和乳酸质量浓度。

3）遗传稳定性评估：将出发菌株LP-1和适应性进化后得到的菌株LP-1-679在MRS培养基中连续传代培养10 d，以1×10^8 CFU/mL接种于沙棘汁（沙棘原浆与水质量比为1∶1，含2 g/dL的蔗糖，121 ℃灭菌15 min）中，于37 ℃恒温厌氧培养48 h。测定各菌株产生的苹果酸和乳酸质量浓度，比较其发酵沙棘汁的性能。同时，再置于含16.0 g/L *L*-苹果酸的MRS培养基中连续传代培养10 d，观察其耐受性是否稳定遗传。

1.3.6 适应性进化菌株细胞膜中脂肪酸组成及质量分数的测定

选取出发菌株LP-1、*L*-苹果酸适应性进化后得到的2株菌LP-1-320、LP-1-679，以1×10^8 CFU/mL分别接种于100 mL含不同质量浓度（0、13.5、16.0 g/L）*L*-苹果酸的MRS培养基中，于37 ℃发酵24 h。离心收集菌体，并用无菌水重悬后离心洗涤3次，冻干备

用。脂肪酸甲酯化参考甘永琦等[22]的方法，脂肪酸参考 GB 5009.168—2016[23]进行测定。

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次，结果以均数±标准差表示。采用 Origin 2024 进行图表制作，采用 IBM SPSS 23.0 进行单因素方差分析（ANOVA），$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 出发菌株的筛选

2.1.1 不同菌株在 MRS 培养基中的生长情况

8 株乳酸菌在 MRS 培养基中生长和发酵性能如图 1 所示。植物乳植杆菌的生物量总体上高于发酵粘液乳杆菌，且稳定期持续时间更长；但发酵粘液乳杆菌进入对数期的时间更早，启动发酵更快，见图 1（a）。菌株发酵过程中活菌数的变化见图 1（b），结果表明，除发酵粘液乳杆菌 LF-1 外，其余 7 株菌在生长 5 h 后活菌数均超过 6.3×10^8 CFU/mL，20 h 后超过 20.0×10^8 CFU/mL。植物乳植杆菌与发酵粘液乳杆菌在 0~8 h 内 pH 均迅速下降，8~20 h 逐渐趋于稳定，见图 1（c）。经过 20 h 的发酵后，植物乳植杆菌的 pH 整体低于发酵粘液乳杆菌，且 4 株菌的 pH 基本相同，其中 LP-2 的 pH 最低，为 3.73。

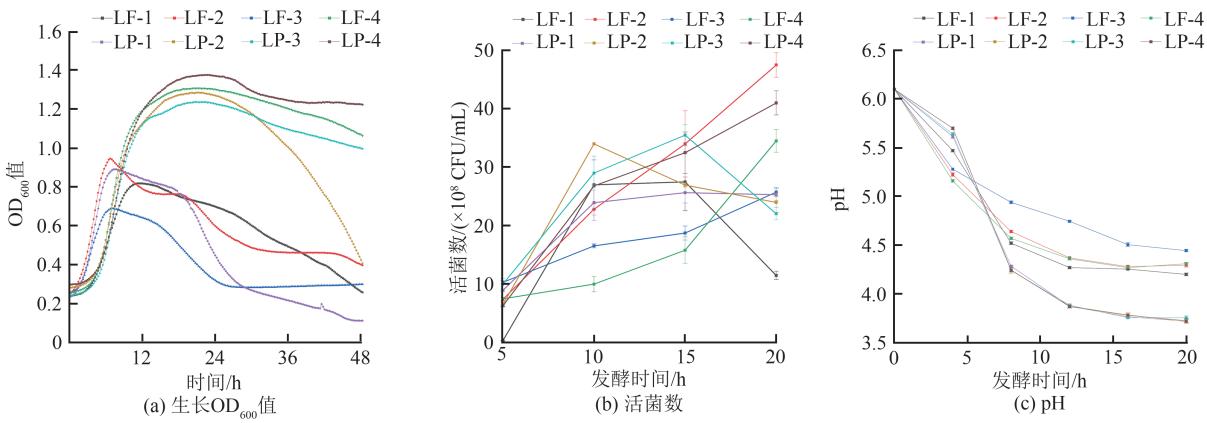


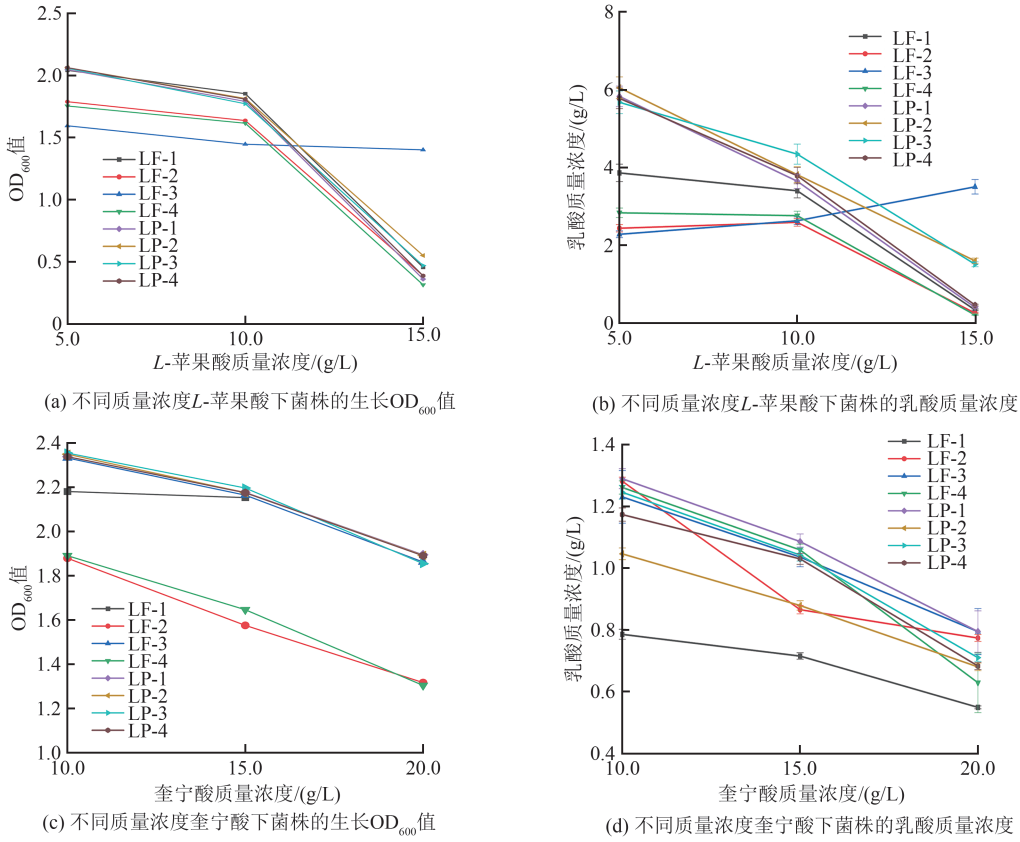
图 1 8 株乳酸菌在 MRS 培养基中的生长和发酵性能

Fig. 1 Growth and fermentation performance of eight strains of lactic acid bacteria in the MRS medium

2.1.2 不同菌株对 *L*-苹果酸、奎宁酸耐受性的比较结果

沙棘汁中的有机酸主要为 *L*-苹果酸和奎宁酸，其质量浓度分别为 1~60 g/L 和 7~49 g/L[11]，可显著抑制乳酸菌的生长。因此，研究 *L*-苹果酸和奎宁酸质量浓度对乳酸菌生长的影响，对于适应性进化菌株选择及有机酸质量浓度梯度设置有重要意义。供试菌株在含 5.0、10.0、15.0 g/L *L*-苹果酸的 MRS 培养基中的生长情况和乳酸积累情况见图 2（a）~（b）。可以看出，*L*-苹果酸显著抑制了乳酸菌的生长繁殖，特别是当质量浓度高于 10.0 g/L 时，OD_{600} 值与 *L*-苹果酸质量浓度呈正相关。此外，当 *L*-苹果酸质量浓度高于 10.0 g/L 时，积累的乳酸质量浓度也呈下降趋势。乳酸菌在 *L*-苹果酸胁迫下的生长能力不仅受 *L*-苹果酸质量浓度的影响，还取决于乳酸菌的种类。LF-3 菌株的生长状况和积累的乳酸质量浓度明显高于其他 7 株菌。在 *L*-苹果酸质量浓度为 15.0 g/L 时，LF-3 的 OD_{600} 值高达 1.4，而其他菌株的 OD_{600} 值约为 0.5。在检测乳酸质量浓度时发现，在 15.0 g/L 的 *L*-苹果酸存在下，LF-3 仍可积累 3.5 g/L 的乳酸，表明该菌株对高质量浓度 *L*-苹果酸的胁迫具有良好的耐受能力。根据各菌株的生长状况，确定出发菌株适应性进化的最佳初始 *L*-苹果酸质量浓度为 12.5 g/L。

供试菌株在含 10.0、15.0、20.0 g/L 奎宁酸的 MRS 培养基中的生长情况和乳酸积累情况见图 2（c）~（d）。根据各菌株在不同质量浓度奎宁酸胁迫下的状态，确定出发菌株适应性进化的最佳初始奎宁酸质量浓度为 17.5 g/L。另外，相较于 *L*-苹果酸，各菌株对奎宁酸表现出更强的耐受性，但各菌株在奎宁酸存在下积累的乳酸质量浓度显著低于 *L*-苹果酸存在下的积累量。表明 *L*-苹果酸与奎宁酸对乳酸菌生理性能的影



(a) 不同质量浓度*L*-苹果酸下菌株的生长OD_{600}值　(b) 不同质量浓度*L*-苹果酸下菌株的乳酸质量浓度

(c) 不同质量浓度奎宁酸下菌株的生长OD_{600}值　(d) 不同质量浓度奎宁酸下菌株的乳酸质量浓度

图 2　不同质量浓度的*L*-苹果酸和奎宁酸对MRS培养基中乳酸菌的影响

Fig. 2　Effects of *L*-malic acid and quinic acid at different mass concentrations on lactic acid bacteria in the MRS medium

响机制不同，*L*-苹果酸对乳酸菌的生长活力表现出更强的抑制能力，而奎宁酸对乳酸合成的抑制效果优于其对乳酸菌生长活力的抑制效果。

2.1.3　不同菌株在沙棘汁中的发酵性能比较

8株乳酸菌在沙棘汁中生长48 h后，*L*-苹果酸和乳酸质量浓度见图3。经过乳酸菌的发酵作用，沙棘汁中的*L*-苹果酸质量浓度明显降低，而乳酸质量浓度则明显升高。菌株LF-3对*L*-苹果酸的利用率超过90%，乳酸质量浓度为0.64 g/L，显著高于其他7株菌（$P<0.05$），因此选择菌株LF-3用于后续试验。同时，从4株植物乳植杆菌中选择*L*-苹果酸消耗量和乳酸质量浓度最高的LP-1用于后续试验。

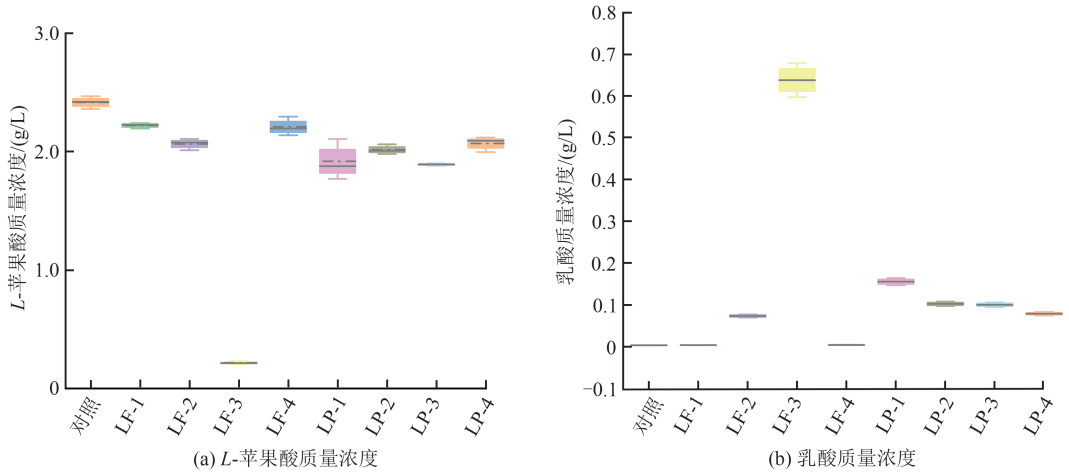
2.2　菌株适应性进化

2.2.1　出发菌株传代周期和生长代数的确定

根据LP-1和LF-3的生长曲线，选择2株菌相对稳定的时期作为适应性进化的传代周期，即菌株LP-1选择24 h作为一个传代周期，菌株LF-3选择8 h作为一个传代周期。对2株菌的初始菌落数（N_O）和最终菌落数（N_f）进行平板计数。结果表明，LP-1的N_O和N_f分别为2.63×10^8、1.41×10^{10} CFU/mL，一个周期内（24 h）的生长代数为5.43代；LF-3的N_O和N_f分别为2.24×10^8、7.94×10^{10} CFU/mL，一个周期内（8 h）的生长代数为5.78代。

2.2.2　*L*-苹果酸、奎宁酸胁迫菌株适应性进化结果

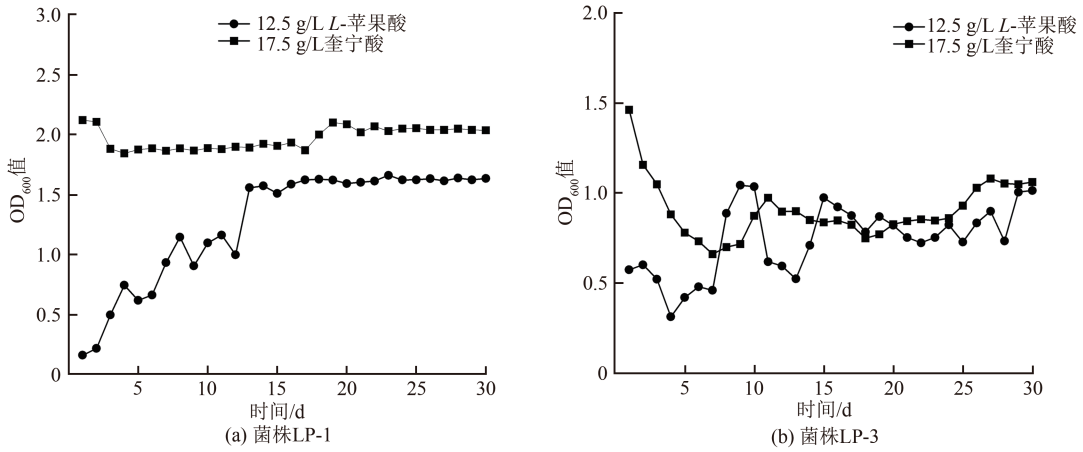
采用质量浓度为12.5 g/L的*L*-苹果酸和17.5 g/L的奎宁酸胁迫菌株LP-1和LF-3适应性进化30 d，结果见图4。菌株LP-1的生长明显受到*L*-苹果酸的抑制，随着时间的延长，当OD_{600}值达到1.6时，菌株生长趋于稳定。奎宁酸对菌株LP-1生长的抑制没有*L*-苹果酸明显，初始OD_{600}值略有下降；到17 d时，菌株OD_{600}值开始增加，生长逐渐趋于稳定，菌株LP-1的OD_{600}值最终保持在2.0。菌株LF-3在*L*-苹果酸胁迫前期，OD_{600}值波动较大；随着传代次数的增加，波动幅度开始变小。面临奎宁酸胁迫时，起初菌株生长受到奎宁酸抑制，OD_{600}值开始下降。随着传代次数的增加，菌株



(a) *L*-苹果酸质量浓度　(b) 乳酸质量浓度

图 3　8 株乳酸菌发酵沙棘汁时 *L*-苹果酸和乳酸质量浓度

Fig. 3　Mass concentrations of *L*-malic acid and lactic acid in seabuckthorn juice fermented with eight strains of lactic acid bacteria



(a) 菌株LP-1　(b) 菌株LP-3

图 4　*L*-苹果酸、奎宁酸胁迫菌株 LP-1、LF-3 适应性进化过程中的生物量

Fig. 4　Biomass of strains LP-1 and LF-3 during adaptive evolution to *L*-malic acid and quinic acid

OD_{600} 值开始增加，生长逐渐趋于稳定，OD_{600} 值保持在 1.0 左右。在适应性进化 30 d 后，菌株 LP-1 进化后获得菌株 LP-1-163 和 LPQ-1-163，菌株 LF-3 进化后获得菌株 LF-3-173 和 LFQ-3-173，穿刺保藏用于后续分析。

2.2.3　2 种适应性进化策略比较

通过测定发酵后沙棘汁中 *L*-苹果酸和乳酸质量浓度，对 2 种适应性进化策略进行比较，结果见表 1。通过 *L*-苹果酸胁迫菌株 LP-1 适应性进化获得的菌株 LP-1-163 生长状况最好，*L*-苹果酸质量浓度最低，*L*-苹果酸消耗率达 72.31%；乳酸质量浓度最高，达 0.39 g/L。因此，选择菌株 LP-1 用于后续试验。作者采用的阿勒泰大果沙棘中奎宁酸较多[24]，但采用奎宁酸胁迫获得的菌株在沙棘汁中的生长性能弱于 *L*-苹果酸，具体机制还需进一步探究。

2.3　最佳适应性进化策略效果分析

2.3.1　适应性进化过程菌株 LP-1 生物量的变化

整个适应性进化过程历时 125 d，*L*-苹果酸质量

表 1　2 种适应性进化策略获得菌株发酵沙棘汁能力的比较

Table 1　Comparison on two adaptive evolutionary strategies for obtaining the strains capable of fermenting seabuckthorn juice

菌株	*L*-苹果酸质量浓度/（g/L）	乳酸质量浓度/（g/L）
对照	3.07±0.11^{a}	0.01±0.00^{e}
LP-1	1.92±0.17^{b}	0.16±0.01^{c}
LP-1-163	0.85±0.03^{d}	0.39±0.01^{a}
LPQ-1-163	2.10±0.16^{b}	0.03±0.00^{e}
LF-3	1.51±0.01^{c}	0.13±0.03^{c}
LF-3-173	1.84±0.04^{b}	0.31±0.03^{b}
LFQ-3-173	1.99±0.21^{b}	0.08±0.00^{d}

注：同列不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

浓度从12.5 g/L增加至16.0 g/L，见图5。出发菌株LP-1在*L*-苹果酸质量浓度为12.5 g/L的条件下适应性进化23 d。在初始阶段，菌株生长明显受到*L*-苹果酸的抑制，OD_{600}值仅为0.16。随着传代次数的增加，菌株逐渐适应了*L*-苹果酸胁迫，OD_{600}值逐渐升高，并保持在1.6左右。当*L*-苹果酸质量浓度为13.5 g/L时，菌株OD_{600}值下降且波动较大，到34 d菌株OD_{600}值降至1.3左右。随着传代次数的增加，菌株可以在*L*-苹果酸质量浓度为13.5 g/L的培养基中稳定生长。10 d后继续增大*L*-苹果酸质量浓度至14.5 g/L，菌株OD_{600}值再次下降并开始波动。传代20 d后，菌株生长OD_{600}值维持在1.3~1.4。当*L*-苹果酸的质量浓度进一步提升至16.0 g/L，经过32 d的连续传代后，菌株显示出稳定的生长特性，其OD_{600}值保持在1.3左右。表明通过逐步增加*L*-苹果酸质量浓度的适应性进化，实现了出发菌株在*L*-苹果酸质量浓度为16.0 g/L的培养基中的稳定生长。

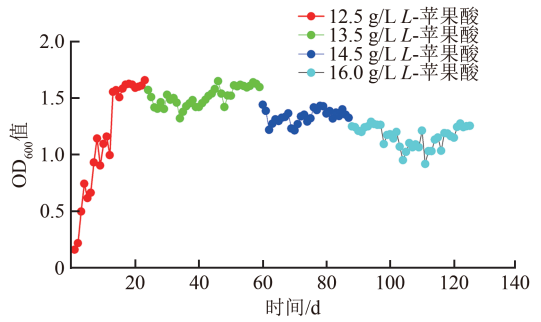


图5　菌株LP-1耐受*L*-苹果酸适应性进化过程中的生物量

Fig. 5　Biomass of strain LP-1 during the adaptive evolution to *L*-malic acid

2.3.2　驯化后菌株抗逆特性分析

菌株LP-1驯化代数越高，其在含更高质量浓度*L*-苹果酸的培养基上生长越好，积累的乳酸质量浓度也越高，见图6。在含12.5 g/L *L*-苹果酸的培养基中生长时，LP-1-679的OD_{600}值为1.49±0.06，是菌株LP-1的5.40倍；积累的乳酸为0.48 g/L，是菌株LP-1的6.15倍。在含14.5 g/L *L*-苹果酸的培养基中生长时，LP-1-679的OD_{600}值为1.28±0.01，是菌株LP-1的4.92倍；积累的乳酸质量浓度为0.42 g/L，是菌株LP-1的10.50倍。在含16.0 g/L *L*-苹果酸的培养基中生长时，LP-1-679的OD_{600}值为0.84±0.06，是菌株LP-1的4.67倍，积累的乳酸质量浓度为0.22 g/L，是LP-1的8.15倍。表明适应性进化后获得的不同进化代数的菌株对酸胁迫的耐受性及生长性能均得到了显著提高。

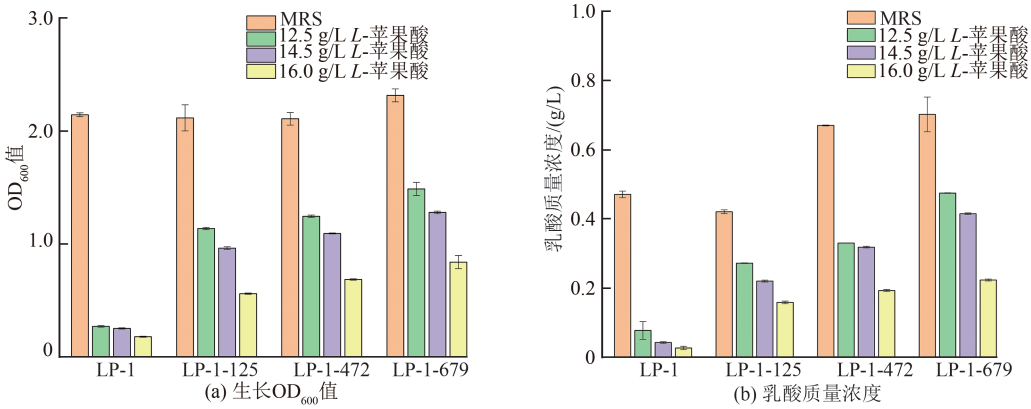


图6　不同驯化时间菌株在不同*L*-苹果酸质量浓度下的生长OD_{600}值和乳酸质量浓度

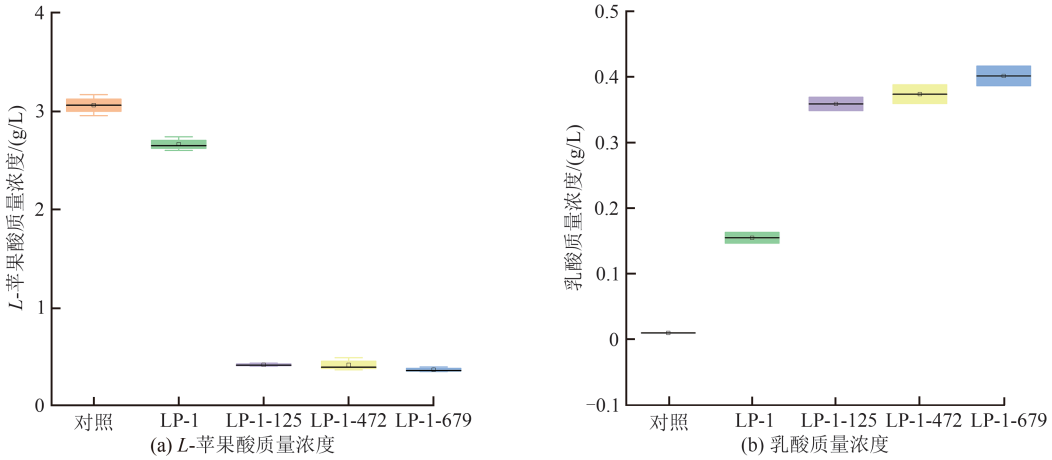
Fig. 6　OD_{600} and lactic acid mass concentrations of strains exposed to different mass concentrations of *L*-malic acid for different time periods

随着适应性进化代数的增加，出发菌株LP-1在沙棘汁中产乳酸的能力越来越强，菌株LP-1-679的乳酸质量浓度达到0.4 g/L，是出发菌株LP-1的2.67倍，见图7。随着适应性进化代数的增加，菌株消耗*L*-苹果酸的能力没有明显增强，这可能是由于苹果酸的质量浓度已经降到了很低的水平。菌株LP-1-679发酵后的*L*-苹果酸质量浓度仅为0.37 g/L，而*L*-苹果酸消耗率为88.24%，是出发菌株LP-1的6.60倍。

2.3.3　驯化菌株的遗传稳定性评估

将出发菌株LP-1和驯化菌株LP-1-679分别置于MRS培养基和含16.0 g/L *L*-苹果酸的MRS培养基中培养10 d，以评估菌株在酸性压力环境下的生长和耐酸能力。经过连续传代培养，菌株的生物量

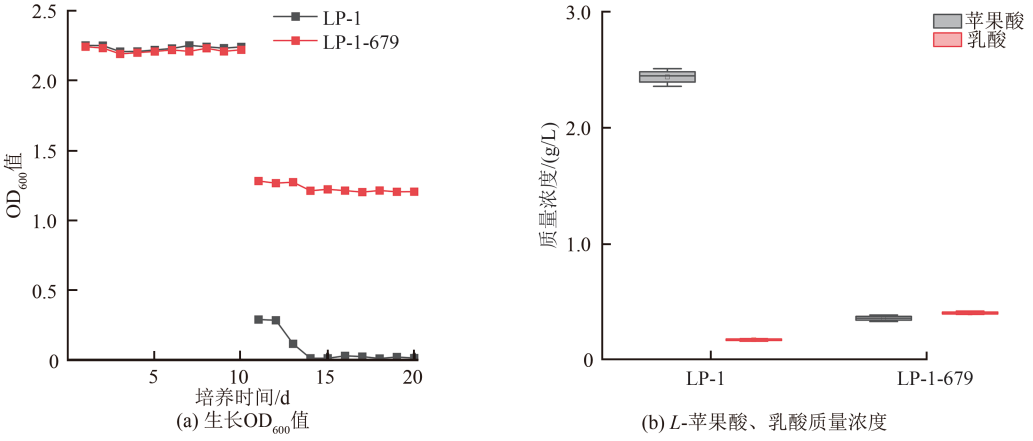
和对酸性环境的抗性均未出现明显变化，见图8(a)。驯化菌株LP-1-679置于MRS培养基中培养10 d后，再接种到沙棘汁中，菌株仍然具备与传代前相当的*L*-苹果酸消耗能力及积累乳酸的能力，说明通过驯化获得的菌株遗传性能稳定，见图8(b)。



(a) *L*-苹果酸质量浓度　(b) 乳酸质量浓度

图7　不同代数适应性进化菌株发酵沙棘汁能力的比较

Fig. 7　Comparison on the fermentation performance of different generations of strains for seabuckthorn juice



(a) 生长OD_{600}值　(b) *L*-苹果酸、乳酸质量浓度

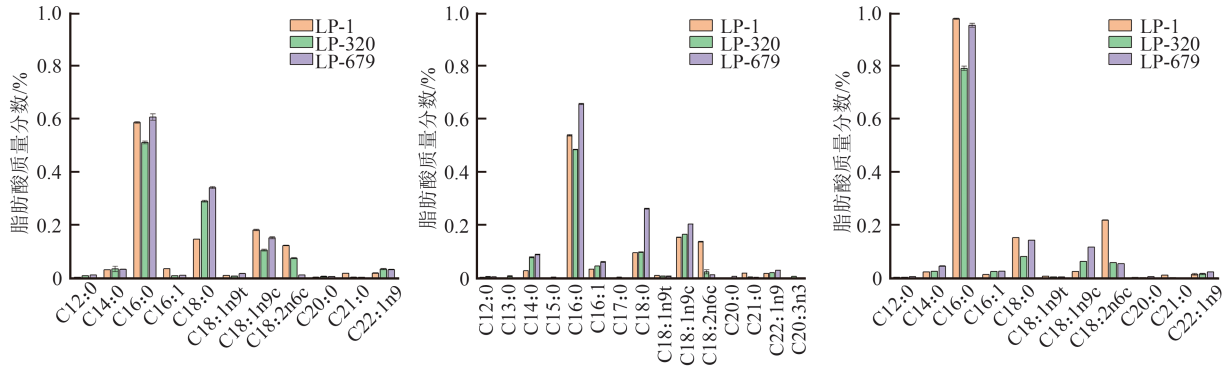
图8　驯化菌株遗传稳定性评价

Fig. 8　Genetic stability of strains obtained by domestication

2.3.4　适应性进化前后菌株细胞膜中脂肪酸组成及质量分数变化

细菌通过改变细胞膜中脂肪酸的组成与质量分数来调整流动性，从而应对环境压力，确保细胞膜处于最佳状态并持续发挥作用[25]。刘怀龙等[26]对酸适应前后乳酸乳球菌膜脂肪酸组成进行了测定，发现酸适应后，该菌不饱和脂肪酸质量分数从30.77%上升至42.93%，饱和脂肪酸质量分数从69.23%下降到57.07%，且有新的长链不饱和脂肪酸C19:1n6产生。本研究中适应性进化前后菌株在MRS培养基中的脂肪酸组成与质量分数见图9(a)。检出的饱和脂肪酸(C12:0、C14:0、C16:0、C18:0、C20:0、C21:0)中，C16:0和C18:0质量分数较高，达63.74%~77.15%。不饱和脂肪酸(C16:1、C18:1n9t、C18:1n9c、C18:2n6c、C22:1n9)中质量分数较高的有C18:1n9c、C18:2n6c、C22:1n9。随着适应性进化代数的增加，C18:0质量分数逐渐增加，C16:1、C18:2n6c、C21:0质量分数逐渐降低。适应性进化前后菌株在*L*-苹果酸质量浓度为13.5 g/L的培养基中生长的脂肪酸组成与质量分数见图9(b)。检出的脂肪酸种类有15种，多于菌株在其他2种培养基中生长时的脂肪酸检出数量。在该条件下，新检出了脂肪酸C13:0、C15:0、C17:0和C20:3n3，表明*L*-苹果酸胁迫菌株适应性进化诱导产生了新的脂

肪酸。适应性进化前后菌株在16.0 g/L *L*-苹果酸的培养基中生长的脂肪酸组成与质量分数见图9(c)，结果发现检测出的脂肪酸种类与菌株在MRS培养基生长时完全一致，说明在适应性进化过程中，菌株的脂肪酸组成发生了变化并最终趋于稳定，这与解寒[17]的报道一致。随着进化代数的增加，菌株的不饱和脂肪酸质量分数也随之增加。在*L*-苹果酸质量浓度为13.5、16.0 g/L的培养基中，随着进化代数的增加，菌株细胞膜中不饱和脂肪酸C16:1、C18:1n9c、C22:1n9的质量分数也随之增加；而饱和脂肪酸C14:0、C21:0的质量分数则随之降低。部分不饱和脂肪酸质量分数在菌株适应性进化后提高，促进了细胞膜的流动性[27]，这可能是导致菌株对*L*-苹果酸耐受性提高的一个因素。



(a) MRS培养基　(b) 含13.5 g/L *L*-苹果酸的培养基　(c) 含16.0 g/L *L*-苹果酸的培养基

图9　适应性进化前后菌株细胞膜中脂肪酸组成和质量分数变化

Fig. 9　Changes in the composition and content of fatty acids in the cell membranes of strains before and after adaptive evolution

3　结论

对宁夏自然发酵浆水中分离出的8株乳酸菌进行*L*-苹果酸、奎宁酸及沙棘汁耐受试验，筛选出性能较好的菌株LP-1和LF-3，并进行酸胁迫适应性进化。2株菌在含*L*-苹果酸、奎宁酸的培养基中适应性进化30 d后，菌株LP-1通过*L*-苹果酸胁迫适应性进化获得的菌株LP-1-163生长性能最佳。进一步采用*L*-苹果酸胁迫对菌株LP-1适应性进化125 d，获得了菌株LP-1-679。该菌株发酵沙棘汁时，积累的乳酸质量浓度可达0.4 g/L、苹果酸消耗率为88.24%，分别是出发菌株的2.67倍和6.60倍。LP-1-679在MRS培养基中传代10 d后，仍能在添加了16 g/L *L*-苹果酸的培养基和沙棘汁中稳定生长，表明该菌株具有遗传稳定性。对适应性进化前后菌株细胞膜的脂肪酸组成和质量分数分析发现，进化后的菌株与出发菌株LP-1相比，部分饱和脂肪酸质量分数下降，而不饱和脂肪酸质量分数增加。该研究为适用于类似沙棘汁发酵的乳酸菌菌种选育提供了依据。

参考文献

[1] MARKKINEN N, LAAKSONEN O, YANG B R. Impact of malolactic fermentation with *Lactobacillus plantarum* on volatile compounds of sea buckthorn juice [J]. European Food Research and Technology, 2021, 247:719-736.

[2] GE X J, TANG N Y, HUANG Y X, et al. Fermentative and physicochemical properties of fermented milk supplemented with sea buckthorn (*Hippophae eleagnaceae* L.)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153:112484.

[3] SCHUBERTOVÁ S, KREPSOVÁ Z, JANOTKOVÁ L, et al. Exploitation of sea buckthorn fruit for novel fermented foods production:a review[J]. Processes, 2021, 9(5):749.

[4] TKACZ K, CHMIELEWSKA J, TURKIEWICZ I P, et al. Dynamics of changes in organic acids, sugars and phenolic compounds and antioxidant activity of sea buckthorn and sea buckthorn-apple juices during malolactic fermentation [J]. Food Chemistry, 2020, 332:127382.

[5] SHEN F, ZHUANG J C, WANG Q Q, et al. Enhancement in the metabolic profile of sea buckthorn juice *via* fermentation for its better efficacy on attenuating diet-induced metabolic syndrome by targeting gut microbiota[J]. Food Research International, 2022, 162(Pt A):111948.

[6] 曹红，杨金凤，单丽娜，等. 新疆沙棘果实中总黄酮超声辅助提取工艺研究[J]. 食品与生物技术学报，2011，30(3)：348-352.
CAO H, YANG J F, SHAN L N, et al. Study on extraction technology of total flavonoids from Xinjiang seabuckthorn fruit by ultrasonic-assisted method[J]. Journal of Food Science

and Biotechnology，2011，30(3)：348-352.(in Chinese)

[7] MARKKINEN N，LAAKSONEN O，NAHKU R，et al. Impact of lactic acid fermentation on acids，sugars，and phenolic compounds in black chokeberry and sea buckthorn juices[J]. Food Chemistry，2019，286：204-215.

[8] 李静静，唐凤仙，赵馨馨，等. 不同预处理对发酵沙棘汁理化特性及挥发性风味化合物的影响[J]. 中国酿造，2023，42(7)：196-201.
LI J J，TANG F X，ZHAO X X，et al. Effects of different pretreatment on physicochemical properties and volatile flavor compounds of fermented seabuckthorn juice [J]. China Brewing，2023，42(7)：196-201.(in Chinese)

[9] LIU X L，LYU M S，MAIMAITIYIMING R，et al. Development of fermented sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice and investigation of its antioxidant and antimicrobial activity[J]. Frontiers in Nutrition，2023，10：1120748.

[10] 毛新亮，王憬，周明，等. 发酵沙棘原果汁的乳酸菌筛选及工艺优化[J]. 现代食品科技，2023，39(9)：106-112.
MAO X L，WANG J，ZHOU M，et al. Screening and optimization of lactic acid bacteria for fermentation of seabuckthorn juice [J]. Modern Food Science and Technology，2023，39(9)：106-112.

[11] GÂTLAN A M，GUTT G. Sea buckthorn in plant based diets. An analytical approach of sea buckthorn fruits composition：nutritional value，applications，and health benefits[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health，2021，18(17)：8986.

[12] 吴重德. 干酪乳杆菌抵御酸胁迫的生理机制解析[D]. 无锡：江南大学，2012.

[13] 姜云芸. 生物被膜在长双歧杆菌BBMN68m耐酸反应中的作用机制[D]. 北京：中国农业大学，2016.

[14] 张梦汝，张娟，堵国成，等. 外源添加亮氨酸提高乳酸乳球菌酸胁迫抗性[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(2)：134-139.
ZHANG M R，ZHANG J，DU G C，et al. Exogenous leucine improved the acid tolerance of *Lactococcus lactis* under acid stress[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2015，34(2)：134-139.(in Chinese)

[15] YANG C C，YE L D，GU J L，et al. Directed evolution of mandelate racemase by a novel high-throughput screening method [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2017，101：1063-1072.

[16] 王光路，王梦园，刘兰茜，等. 适应性实验室进化在工业生产菌株选育中应用的进展[J]. 微生物学通报，2022，49(1)：306-322.
WANG G L，WANG M Y，LIU L X，et al. Progress of adaptive laboratory evolution for industrial strain breeding [J]. Microbiology China，2022，49(1)：306-322.(in Chinese)

[17] 解寒. 乳酸菌耐受柠檬酸的适应性进化及其机制解析[D]. 无锡：江南大学，2021.

[18] LI P Y，JU N，ZHANG S Z，et al. Evaluation of microbial diversity of Jiangshui from the Ningxia Hui Autonomous Region in China [J]. Food Biotechnology，2022，36(2)：173-190.

[19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验：GB 4789.35—2023[S]. 北京：中国标准出版社，2024.

[20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品pH值的测定：GB 5009.237—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[21] 安璟. 乳酸菌胁迫反应的影响因素及其耐热性的研究[D]. 武汉：华中农业大学，2019.

[22] 甘永琦，朱斌. 乳酶生菌种脂肪酸组分的GC-MS检测分析[J]. 药物分析杂志，2017，37(12)：2145-2153.
GAN Y Q，ZHU B. GC-MS determination of fatty acids in lactasin strain[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis，2017，37(12)：2145-2153.(in Chinese)

[23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定：GB 5009.168—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2017.

[24] 苏婷婷. 四种沙棘果实营养与活性成分的比较及中国沙棘酚类物质的体外模拟消化[D]. 兰州：甘肃农业大学，2023.

[25] MYKYTCZUK N C，TREVORS J T，LEDUC L G，et al. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology，2007，95(1/2/3)：60-82.

[26] 刘怀龙，孟祥晨. 酸适应对一株乳酸乳球菌膜脂肪酸组成和膜蛋白表达的影响[J]. 微生物学报，2008，48(11)：1459-1465.
LIU H L，MENG X C. Influence of acid adaptation on membrane fatty acid profile and expression of membrane proteins in *Lactococcus lactis*[J]. Acta Microbiologica Sinica，2008，48(11)：1459-1465.(in Chinese)

[27] 胡锦超，沈文琦，徐超业，等. 微生物酸胁迫耐受性能强化的研究进展[J]. 生物技术通报，2023，39(11)：137-149.
HU J C，SHEN W Q，XU C Y，et al. Research advances in the enhancement of microbial tolerance to acid stress [J]. Biotechnology Bulletin，2023，39(11)：137-149.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）