

# 乳酸盐与渗透胁迫对干酪乳酪杆菌 Zhang 的损伤机理及保护措施

杨雄州, 王昊乾, 张静雯, 黄天, 于洁, 张和平\*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室  
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 乳酸菌与发酵乳制品省部共建协同创新中心 呼和浩特 010018)

**摘要** 目的:探究乳酸盐与渗透压胁迫对干酪乳酪杆菌 Zhang 的抑制作用并寻求解决方案。方法:分别使用乳酸钠、乳酸铵与氯化钠对菌体营造有机盐胁迫与渗透压胁迫,测定完全抑制浓度并绘制耐渗透曲线,通过测定菌体密度、活菌数、细胞损伤来观察 LCZ 受到的生理损伤与相容性溶质的保护效果。通过分批培养与恒定 pH 分批培养探究渗透压升高的关键因素,通过稀释发酵液以达到降低渗透压的效果,测定稀释后样品菌体密度、活菌数、干重得率的变化。结果:乳酸铵由于自身特性对 LCZ 具有强烈抑制作用;乳酸钠对 LCZ 的抑制作用较为温和,对 LCZ 起到的主要抑制作用是高渗抑制。*L*-脯氨酸对高渗环境下 LCZ 生物量积累及细胞活性均有显著保护作用,最优添加量为 2 g/L。稀释发酵液处理对恒定 pH 补料培养菌体密度与活菌数的提升效果显著,最终发酵液 OD<sub>600nm</sub> 与活菌数可达到 19.68±0.429 与 (3.439±0.110)×10<sup>10</sup> CFU/mL,分别是未稀释处理的 1.61 倍与 1.46 倍。结论:*L*-脯氨酸能够在一定程度上缓解高渗下 LCZ 的活性损伤。通过稀释发酵液处理降低发酵后期渗透压,能极大地提升发酵水平及细胞活性,研究结果为工业化生产及应用提供参考。

**关键词** 干酪乳酪杆菌 Zhang; 乳酸盐胁迫; 渗透胁迫; 相容性溶质; 高密度发酵

**文章编号** 1009-7848(2024)04-0108-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.011

副干酪乳酪杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、干酪乳酪杆菌(*Lactobacillus casei*)和鼠李糖乳酪杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)在最新分类学中被归类为乳酪杆菌属(*Lactobacillus*),被验证具有良好的益生特性以及安全性<sup>[1-2]</sup>。干酪乳酪杆菌 Zhang (*Lacticaseibacillus casei* Zhang, LCZ)作为中国自产菌株代表之一,于 2001 年分离自内蒙古锡林郭勒正蓝旗大草原传统发酵酸马奶,其益生特性及产业化应用已被大量科研与临床数据佐证与支撑<sup>[2]</sup>。

微生物发酵工业是以现代生物技术为基础,大规模生产人类所需菌体及发酵产物的重要生物产业,发酵产品涉及食品、医药、日化、纺织、农业、养殖业等各行各业,在我国社会和经济生活中具有不可替代的作用<sup>[3]</sup>。LCZ 具有优良的发酵特性、遗传稳定性与抗逆性<sup>[4-5]</sup>,然而在发酵过程中仍会受到温度胁迫<sup>[6]</sup>、酸胁迫<sup>[7]</sup>、渗透胁迫<sup>[8]</sup>、氧化胁迫<sup>[9]</sup>等一系列胁迫作用的影响,不仅使生物活性受损,

而且严重阻碍了生物量的积累。在高密度发酵过程中,由于高浓度培养基、代谢产物的积累、pH 中和剂的流加,因此发酵后期环境渗透压水平急速上升,对菌体生长繁殖造成巨大阻碍,不利于生物量与代谢产物的积累。本研究以干酪乳酪杆菌 Zhang 为研究对象,探究乳酸盐与渗透压对该菌的抑制作用,并针对关键抑制因素进行工艺及保护剂优化,以期优化出高效率、高活性以及高产量的发酵工艺,为工业化生产及应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

试验菌株干酪乳酪杆菌 Zhang (*Lacticaseibacillus casei* Zhang, LCZ)由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库(Lactic acid bacteria collection center, LABCC)提供。

### 1.2 试剂与耗材

MRS 合成培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;乳酸钠溶液(60%, V/V)、乳酸铵(20%, V/V),上海麦克林生化科技有限公司;氯化钠(分析纯级),福晨化学试剂有限公司;*L*-脯氨酸、甜菜碱、*L*-天冬氨酸,大连美仑生物技术有限公司;海藻糖,上海源叶生物科技有限公司。

收稿日期: 2023-04-13

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014);  
国家自然科学基金面上项目(31972054)

第一作者: 杨雄州,男,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

96孔酶标板,一次性培养皿,50 mL无霉无菌离心管,2 mL EP管。

### 1.3 仪器与设备

GS-MFC1203 平行生物反应器,上海顾信生物科技有限公司;M900 生物过程生化分析仪,深圳希尔曼科技有限公司;BioscreenC 全自动生长曲线测定仪,芬兰 OY 生长曲线有限公司;OSMO-MAT 3000 冰点渗透压仪,德国能泰克公司;Avanti JXN-26 高速冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;HWS28 电热恒温水浴锅、LRH-250 生化培养箱,上海一恒科技有限公司;SX-500 灭菌锅,日本 Tomy Digital Biology;FE20/EL20 pH 计,梅特勒-托利多仪器有限公司;AR2202CN 电子天平,上海奥豪斯仪器有限公司。

### 1.4 试验方法

1.4.1 活化与培养 将-80℃冰箱中保藏的菌种接种于无菌 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h,将培养好的菌液以体积分数 2%接种量接入新鲜无菌 MRS 液体培养基中,培养 24 h,重复上一步操作培养 12 h,得到 3 代培养基,备用。

1.4.2 最低抑制渗透压与完全抑制渗透压的测定

在 MRS 液体培养基中,添加不同含量的氯化钠,分别配制成 1%,2%,……,20%的氯化钠溶液,测量溶液渗透压,通过线性拟合得到氯化钠添加量与渗透压的关系公式(1):

$$\pi = 30595x + 3.4889 + \pi_0 \quad (1)$$

式中, $\pi$ ——渗透压,mOsm/kg; $x$ ——氯化钠添加量,%; $\pi_0$ ——初始培养基渗透压,mOsm/kg。

MRS 液体培养基的渗透压为 400 mOsm/kg,通过公式(1)计算氯化钠添加量,分别制备渗透压为 400,600,800,……,3 600 mOsm/kg 的 MRS 培养基,将已活化好的菌液按 2%接种量接入,充分振荡,接入微孔板中,使用全自动生长曲线仪测定每小时 OD<sub>600nm</sub> 变化,通过 OD<sub>600nm</sub> 判定最低抑制渗透压与完全抑制渗透压,同时绘制菌株生长曲线并计算最大比生长速率。

1.4.3 乳酸盐对菌株的抑制作用 在 MRS 液体培养基中,添加乳酸钠、乳酸铵,配制成 0.1,0.2,……,1.5 mol/L 的盐溶液,用 NaOH 将溶液 pH 值调节至 6.2±0.02 后,灭菌,同时用相同浓度的 NaCl 与 NH<sub>4</sub>Cl 作对照组。将已活化的二代菌液按

接种量 2%分别接入不同浓度盐溶液中,于 37℃培养 24 h,测量 OD<sub>600nm</sub> 与初始无显著性差异即为此样品的完全抑制浓度<sup>[10]</sup>。

1.4.4 相容性溶质对菌株的保护作用 按照公式(1)计算 NaCl 添加量,将 MRS 液体培养基渗透压调至 2 000 mOsm/kg,分别在培养基中加入 1,2,3 g/L 的海藻糖、L-脯氨酸、L-天冬氨酸、甜菜碱,同时用液体 MRS 培养基作空白对照组,将溶液 pH 值均调至 6.2±0.02 后,灭菌,将已活化的 2 代菌液按接种量 2%接入 3 代培养基,37℃培养 24 h,同时用液体 MRS 培养基作空白对照组,测量终点活菌数及 OD<sub>600nm</sub>。

1.4.5 细胞损伤测定 取发酵液样品,使用 PBS 倍比稀释样品,使样品的活菌数达到 1×10<sup>6</sup> CFU/mL,吸取 1 mL 菌悬液于 2 mL EP 管中,4 000×g 离心 2 min,重悬,反复清洗 2 次,使用 Syto9 荧光染料对样品进行染色,加入的最终浓度为 10 μmol/L,振荡混匀,于 37℃避光孵育 20 min,PI 荧光染料对样品进行染色,加入的最终浓度为 5 μmol/L,振荡混匀,避光孵育 20 min,使用流式细胞仪检测样品的荧光强度<sup>[11]</sup>。

1.4.6 分批培养与恒定 pH 分批培养 将活化至 3 代的种子液以 5%的接种量接入平行生物发酵罐中,通过智能调控系统将培养温度稳定控制在(37±0.1)℃,转速 200 r/min,无菌空气保压 0.03 Pa,恒定 pH 5.9±0.02,当发酵液浊度在 30 min 内增长不显著时停止发酵,此时判定为发酵终点,测量终点活菌数以及 OD<sub>600nm</sub>。

本次智能发酵系统使用 3 组工艺进行对比:试验组 1 为分批培养,将初始 pH 值调至 6.5,后续不进行 pH 调控;试验组 2 为恒定 pH 补料培养,将初始 pH 值调至 6.5,后续恒定 pH 5.9 至发酵终点,将料液完全补充入发酵罐,进行 2 次发酵,直至第 2 次发酵终点;试验组 3 为恒定 pH 稀释补料培养,将初始 pH 值调至 6.5,后续恒定 pH 5.9 至发酵终点,将料液完全补充入发酵罐,根据发酵液体积补充入相同体积灭菌蒸馏水,进行 2 次发酵,直至第 2 次发酵终点。补料物成分:7 g 葡萄糖,1.5 g 酵母浸粉,1.5 g 大豆蛋白胨,100 mL 水。

1.4.7 干重得率的计算 取发酵液样品于 50 mL 离心管中,80℃水浴灭菌 30 min,冷却至室温(25

℃), 8 000×g, 5 min 离心, 去上清, 洗涤菌体 2 次, 将离心所得菌体于烘箱(105 ℃)中烘干至恒重, 用分析天平称重, 减去空白离心管质量, 得到菌体干重, 菌体干重与对应发酵液比值即为干重得率。

1.4.8 基本指标的测定方法 活菌数的测定: 采用稀释平板菌落计数法测定。

乳酸、葡萄糖、铵离子、钠离子的测定: 发酵罐在线过滤吸取于生化分析仪中自动检测, 离线检测需取至少 1 mL 样品离心取上清于生化分析仪中检测。

菌体密度的测定: 取样品 200 μL 于酶标板中, 使用酶标仪在波长 600 nm 处测定吸光度, 需将样品吸光值稀释在 0.2~0.8。

渗透压的测定: 取样品 50 μL 于冰点渗透压仪中测定。

1.4.9 数据分析 所有试验均重复 3 次, 试验数据表示为“平均值±标准差”。差异性分析采用 SPSS 进行数据处理。方程拟合、图表绘制采用 Origin 2021 与 Excel 2010 制作。

生长曲线拟合与最大比生长速率计算采用非线性曲线拟合方程 Slogistic2:

$$y = \frac{a}{1 + \frac{a - y_0}{y_0} e^{-4W_{\max}x/a}} \quad (2)$$

式中,  $x$ ——培养时间, h;  $y$ ——菌体密度,  $OD_{600}$ ;  $y_0$ ——初始菌体密度,  $OD_{600}$ ;  $a$ ——最大菌体密度值,  $OD_{600}$ ;  $W_{\max}$ ——最大比生长速率,  $h^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 渗透压对 LCZ 的抑制作用分析

由图 1 与表 1 可知, 随着初始培养基中渗透压的增长, 在达到一定限度后, LCZ 的最终菌体密度、生长速度、最大比生长速率均呈不同程度的下降, 综合考虑最大比生长速率与最终菌体密度的受影响程度, 确定 LCZ 在渗透压 1 200 mOsm/kg 时, 开始受到抑制作用, 在渗透压为 3 200 mOsm/kg 时, 完全抑制 LCZ 的生长。

### 2.2 乳酸盐对 LCZ 的抑制作用分析

乳酸是乳酸菌发酵最主要的代谢有机酸, 有机酸的积累会导致发酵环境 pH 急速下降, 不仅

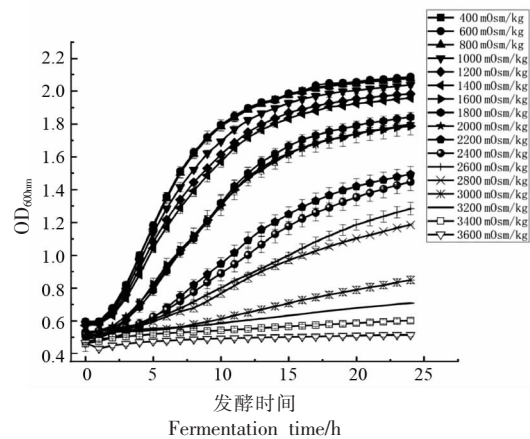


图 1 LCZ 的耐渗透压曲线

Fig.1 Osmotic pressure resistance curve of LCZ

表 1 不同初始培养渗透压对 LCZ 生长的影响

Table 1 Effect of different initial culture osmotic pressure on LCZ growth

| 初始培养渗透压/<br>mOsm·kg <sup>-1</sup> | 最大比生长速率/<br>h <sup>-1</sup> | 最大菌体密度值<br>(OD <sub>600nm</sub> ) |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 400                               | 0.143 ± 0.006 <sup>b</sup>  | 2.087 ± 0.009 <sup>a</sup>        |
| 600                               | 0.149 ± 0.006 <sup>b</sup>  | 2.087 ± 0.004 <sup>a</sup>        |
| 800                               | 0.152 ± 0.005 <sup>a</sup>  | 2.077 ± 0.018 <sup>a</sup>        |
| 1 000                             | 0.136 ± 0.005 <sup>b</sup>  | 2.038 ± 0.018 <sup>a</sup>        |
| 1 200                             | 0.125 ± 0.004 <sup>c</sup>  | 1.983 ± 0.004 <sup>ab</sup>       |
| 1 400                             | 0.107 ± 0.004 <sup>c</sup>  | 1.958 ± 0.009 <sup>ab</sup>       |
| 1 600                             | 0.095 ± 0.003 <sup>d</sup>  | 1.787 ± 0.053 <sup>c</sup>        |
| 1 800                             | 0.093 ± 0.003 <sup>d</sup>  | 1.842 ± 0.028 <sup>bc</sup>       |
| 2 000                             | 0.087 ± 0.003 <sup>d</sup>  | 1.799 ± 0.026 <sup>c</sup>        |
| 2 200                             | 0.057 ± 0.002 <sup>e</sup>  | 1.494 ± 0.048 <sup>d</sup>        |
| 2 400                             | 0.048 ± 0.001 <sup>f</sup>  | 1.448 ± 0.053 <sup>d</sup>        |
| 2 600                             | 0.044 ± 0.007 <sup>g</sup>  | 1.284 ± 0.038 <sup>e</sup>        |
| 2 800                             | 0.037 ± 0.004 <sup>g</sup>  | 1.185 ± 0.005 <sup>e</sup>        |
| 3 000                             | 0.034 ± 0.009 <sup>h</sup>  | 0.850 ± 0.023 <sup>f</sup>        |
| 3 200                             | 0.020 ± 0.002 <sup>i</sup>  | 0.708 ± 0.002 <sup>fg</sup>       |
| 3 400                             | 0.016 ± 0.001 <sup>i</sup>  | 0.602 ± 0.013 <sup>gh</sup>       |
| 3 600                             | 0.021 ± 0.002 <sup>i</sup>  | 0.515 ± 0.011 <sup>h</sup>        |

注: 不同字母表示数据间差异显著( $P < 0.05$ )。

影响菌群生长环境, 降低生长速率, 在达到一定限度时, 更会完全抑制菌体的增殖与活性。目前, 在发酵中常使用化学中和法来中和有机酸, 即通过实时检测发酵环境 pH, 流加碱性中和剂(NaOH、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、氨水等), 将 pH 调控维持到最适生长范



围。因氯化钠水溶液成中性,对菌株的抑制主要是渗透压抑制,因此使用添加相同浓度的氯化钠作为对照组。

由图 2 与表 2 可知,乳酸铵对 LCZ 的抑制作用远大于其它盐类,对比同等浓度氯化铵与乳酸钠处理的样品发现,乳酸铵形成的抑制不是源于铵离子或乳酸根离子的抑制,这可能与乳酸铵自身的抗菌特性有关。虽然在较低渗透环境下,乳酸钠、氯化钠、氯化铵的生物量水平表现均不一致,乳酸钠在较低渗透压时,对 LCZ 的生物量抑制略高于同等浓度无机盐,而乳酸钠、氯化钠、氯化铵对 LCZ 形成的完全抑制浓度相同,且添加相同浓度的盐类所形成的渗透压几乎一致,这证明乳酸钠自身对 LCZ 具有温和的抑菌作用,抑菌强度远低于乳酸铵,而高浓度乳酸钠抑菌强度与同等浓

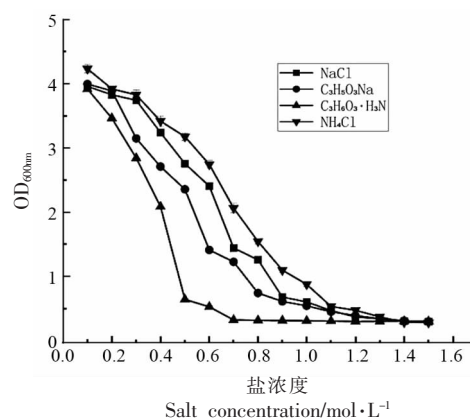


图 2 乳酸盐对 LCZ 的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of lactate on LCZ

度氯化钠相似,证明其对 LCZ 起到的主要抑制作用是由于高渗抑制所致。

表 2 不同盐类的完全抑制浓度

Table 2 Complete inhibition concentration of different salts

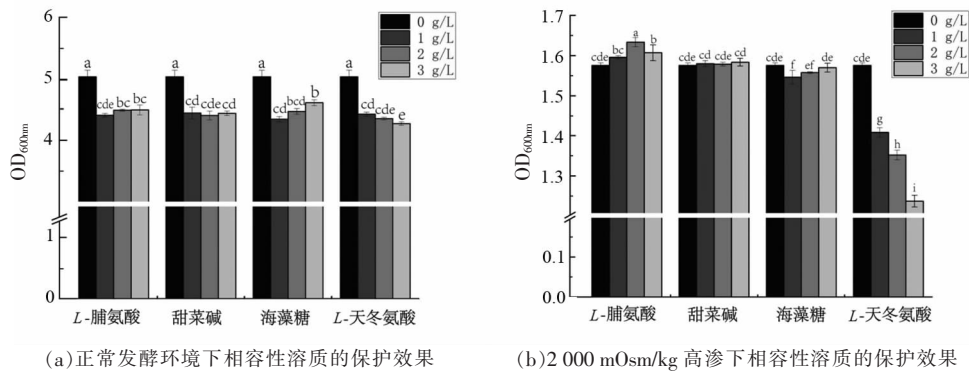
| 指标                           | 乳酸钠        | 乳酸铵       | 氯化钠        | 氯化铵        |
|------------------------------|------------|-----------|------------|------------|
| 完全抑制浓度/mol·L <sup>-1</sup>   | 1.4        | 0.7       | 1.4        | 1.4        |
| 抑制时渗透压/mOsm·kg <sup>-1</sup> | 3 176 ± 20 | 2 017 ± 8 | 3 204 ± 11 | 3 198 ± 15 |

### 2.3 相容性溶质的筛选

相容性溶质是指一类能够在细胞内积累到一定程度有助于细胞在极端渗透压下存活且不干扰胞内正常生理环境的小分子有机化合物<sup>[12]</sup>,为寻找能对 LCZ 起到保护作用的渗透保护剂,本研究选用 4 种已知具有保护作用的相容性溶质。海藻糖作为一种非还原性二糖,常用于冻干保护剂与渗透保护剂,胁迫条件下可对细菌、酵母和植物细胞起到保护细胞结构,清除多余活性氧物质,诱导关键抗氧化剂活性增加等作用<sup>[13-14]</sup>。脯氨酸已被证明在脱水、冻干、高温过程中,可以增强蛋白质和膜的稳定性,同时帮助细胞稳定胞内环境<sup>[15]</sup>。天冬氨酸已被证明在酸胁迫<sup>[16]</sup>、冷冻胁迫<sup>[17]</sup>以及渗透胁迫中,具有保护作用,翟爽<sup>[18]</sup>发现,在嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)TF96 的生长过程中,天冬氨酸是最大消耗和最大需求氨基酸。甜菜碱又称为三甲基甘氨酸,普遍存在于动植物体内,是最常见的渗透调节物之一,具有增强抗逆性、抗

盐碱等功能<sup>[19-20]</sup>。

本团队前期试验筛选不同渗透压下 4 种保护剂的保护效果,发现 L-脯氨酸、甜菜碱、海藻糖、L-天冬氨酸在 2 000 mOsm/kg 以下渗透环境均不具保护作用,作为正常培养基成分,甚至阻碍 LCZ 的繁殖。由图 3 可知,L-脯氨酸在 2 000 mOsm/kg 渗透压下保护效果显著,甜菜碱与海藻糖无显著保护作用,L-天冬氨酸反而显著抑制了高渗下菌体生物量,这证明 L-脯氨酸作为相容性溶质对 LCZ 的生物量积累具有显著保护作用,且只在高渗条件下发挥作用。细胞自身机制存在着多种交叉保护应激措施,如合成应激蛋白或调整细胞膜组成可以应对多种胁迫<sup>[21]</sup>,2 000 mOsm/kg 很有可能是 LCZ 的渗透压耐受临界点,超过此临界点菌体自身的部分应激措施可能会失效,此渗透压接近该菌高密度发酵终点渗透压,因此推测恒定 pH 分批培养中发酵水平的受限有可能受渗透胁迫的影响。



注:不同小写字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

图3 相容性溶质的筛选

Fig.3 Screening of compatible solutes

## 2.4 细胞活性与损伤情况分析

由图4可知,添加1,2,3 g/L的L-脯氨酸均能显著( $P < 0.05$ )提升2000 mOsm/kg下LCZ发酵液活菌数,L-脯氨酸添加量为2 g/L与3 g/L的样品活菌数差异不显著( $P > 0.05$ ),说明L-脯氨酸对渗透胁迫的缓解作用是有限的,在达到一定浓度后,不能继续提升活菌数,因此添加2 g/L的L-脯氨酸对LCZ的保护效果最佳,此结果与图3的初步筛选结果相符。

Syto9是一种核酸染料,可以识别所有细菌,并可同时染色活细胞与死细胞,PI也是一种核酸染料,却只能识别、染色细胞膜受损细胞。使用Syto9/PI双染料对样品进行染色,通过流式细胞术对活性细胞、受损细胞及死亡细胞计数,从而对菌体活力进行评估,具有完整细胞膜的细胞被染成绿色,而膜受损的细胞则被染成红色<sup>[22-23]</sup>。由图5可知,分别在2000 mOsm/kg发酵液中添加1,2,3 g/L的L-脯氨酸,同时设立不加L-脯氨酸的2000 mOsm/kg发酵液为对照组,细胞的受损比例逐渐减少,受损细胞占比分别达到34.97%,29.44%,26.04%,26.19%,死亡细胞占比分别达到6.40%,5.66%,4.54%,4.45%,存活细胞占比分别达到53.27%,58.30%,65.07%,61.15%,此结果表明L-脯氨酸在高渗下,具有保护细胞免受损伤与死亡的作用,这是由于LCZ在高渗下能够从外源吸收一定量的L-脯氨酸,从而使胞内环境渗透压升高,以避免细胞膜内、外渗透压差值过大导致的细胞膜损伤或裂解。

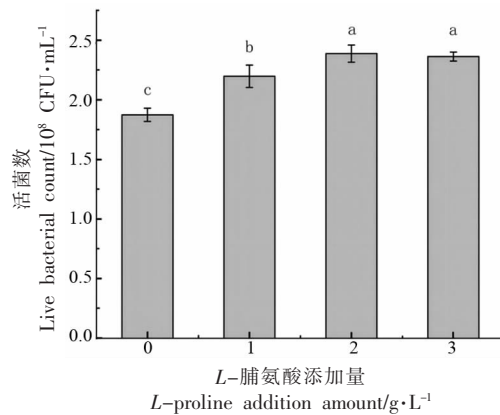


图4 L-脯氨酸添加量对高渗下LCZ活性的影响

Fig.4 Effect of L-proline addition on LCZ activity

## 2.5 分批培养与恒定pH分批培养

智能发酵系统与静态培养条件不同,所需营养物质含量也不同,因而放大培养基所用比例,使初始培养基渗透压提升到780 mOsm/kg左右,没有超出菌株开始被抑制时的渗透压。按照1.4.6节的方法,绘制分批培养、恒定pH补料培养、恒定pH稀释补料培养(试验组1,2,3)3个试验组发酵过程渗透压曲线与生长曲线,在发酵终点测定活菌数以及干重得率。试验组3在12 h后经过稀释处理,导致原始数据无法与其它试验组形成对比,对比稀释前、后的 $OD_{600nm}$ ,发现样品实际稀释了2.4倍,因此在12 h后试验组3样品数据均乘以系数2.4。

由图6可知,试验组1,2,3发酵终点 $OD_{600nm}$ 分别为 $9.26 \pm 0.131$ , $12.19 \pm 0.161$ , $19.68 \pm 0.429$ ,其

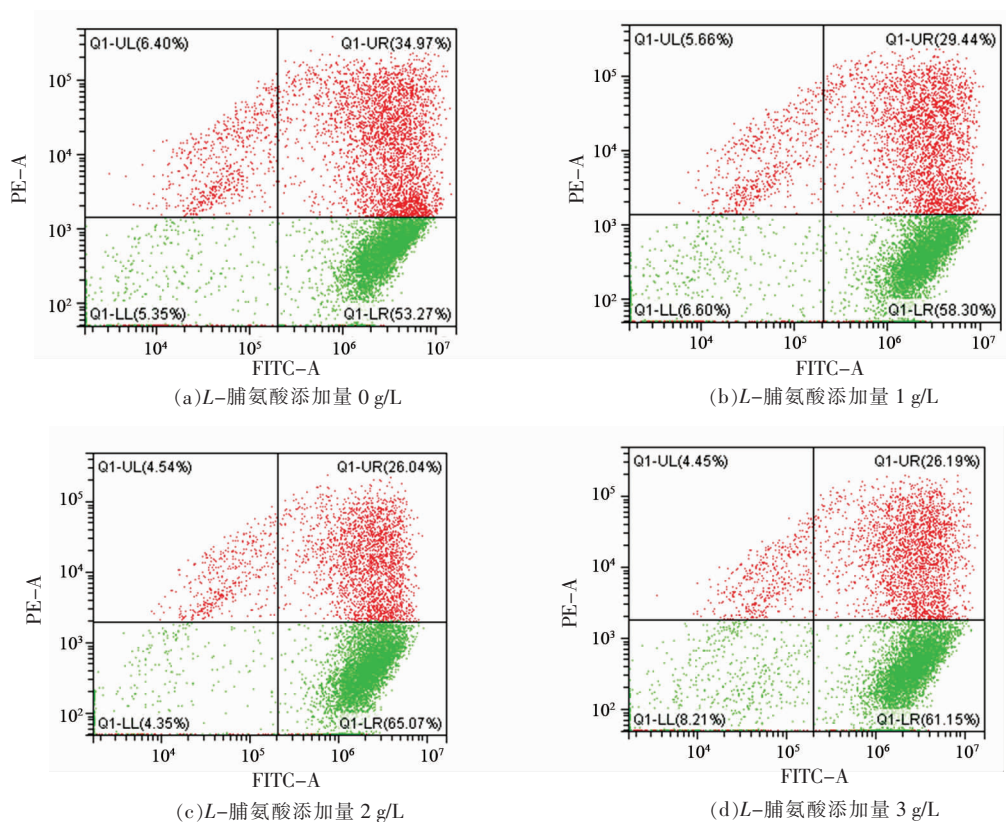


图 5 L-脯氨酸添加量对高渗下 LCZ 损伤的影响

Fig.5 Effect of L-proline addition on LCZ damage under hyperosmotic pressure

相对应的渗透压分别为(1 060±2.83), (2 210±2.83), (2 882±8.49) mOsm/kg, 恒定 pH 培养组发酵液(试验组 2,3)不论是菌体密度增长, 还是渗透压增长均远高于分批培养(试验组 1), 这是由于 LCZ 代谢的酸产物严重抑制了菌体的增长繁殖。

由于氨水的流加, 试验组 2,3 发酵液渗透压急速增长, 终点渗透压远高于试验组 1, 也远高于 LCZ 的最低抑制渗透压 1 200 mOsm/kg, 这表明恒定 pH 分批补料发酵环境中, 渗透压的升高主要是由于加入的碱性调节剂的摄入导致。

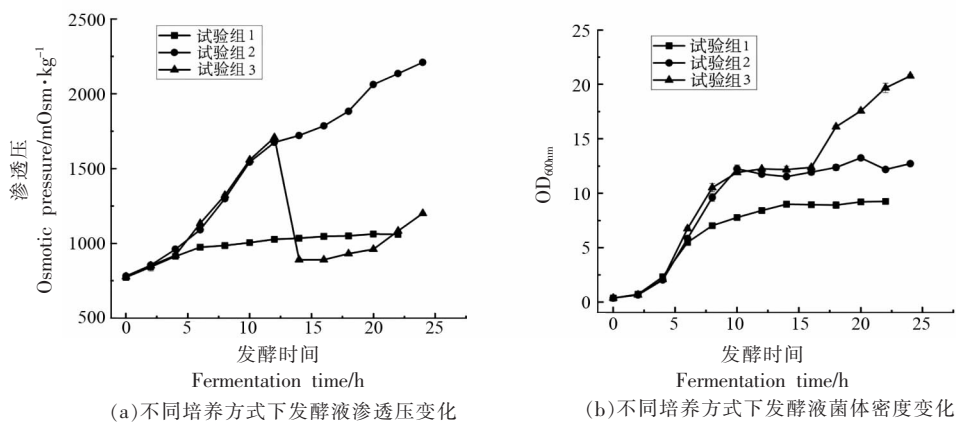


图 6 不同培养方式渗透压与菌体密度变化

Fig.6 Changes of osmotic pressure and cell density in different culture methods

干酪乳酪杆菌作为可高效生产 *L*-乳酸的潜在工业乳酸菌, *L*-乳酸在其总代谢物中所占比例极高, 且 *L*-乳酸的合成速率与菌体的生长速率和比生长速率成正相关<sup>[24]</sup>, 所以 *L*-乳酸生成量可以间接反应发酵系统中菌体的生长代谢能力, 由图 7 可知, 试验组 1, 2, 3 发酵终点乳酸质量浓度分别为 32.773, 71.323, 97.826 g/L, 这表明乳酸产量与生物量及生物活性呈正相关, 同时对试验组 1 乳酸生成量与渗透压上升量综合分析, 发现 LCZ 在未调控 pH 的环境下发酵, 虽生成了较高浓度的 *L*-乳酸, 环境渗透压增长却不明显, 这印证了乳酸生成不是渗透压生长的最主要因素, 使试验组 2, 3 渗透压急速生长的主要原因是调控 pH 所

用中和剂导致。碳源是乳酸菌生长发酵中最重要的营养物质之一<sup>[25]</sup>, 试验组 1, 2, 3 发酵终点时, 葡萄糖残余量为 24.536, 0.465, 0.554 g/L, 这表明 3 组发酵系统菌体密度变化不显著并非由于碳源不足导致。试验组 1, 2, 3 发酵终点的铵离子浓度为 0.671, 5.416, 9.389 mmol/L, 这表明发酵环境中铵离子浓度主要是由于氨水摄入所致。试验组 1, 2, 3 发酵终点钠离子浓度为 2.202, 1.711, 1.826 mmol/L, 试验组 1 基本无变化, 试验组 2, 3 总体呈下降趋势, 这是由于高渗下渗透效应导致  $\text{Na}^+$  内流<sup>[26]</sup>, 试验组 3 稀释缓解渗透胁迫后, 胞外  $\text{Na}^+$  明显回升。

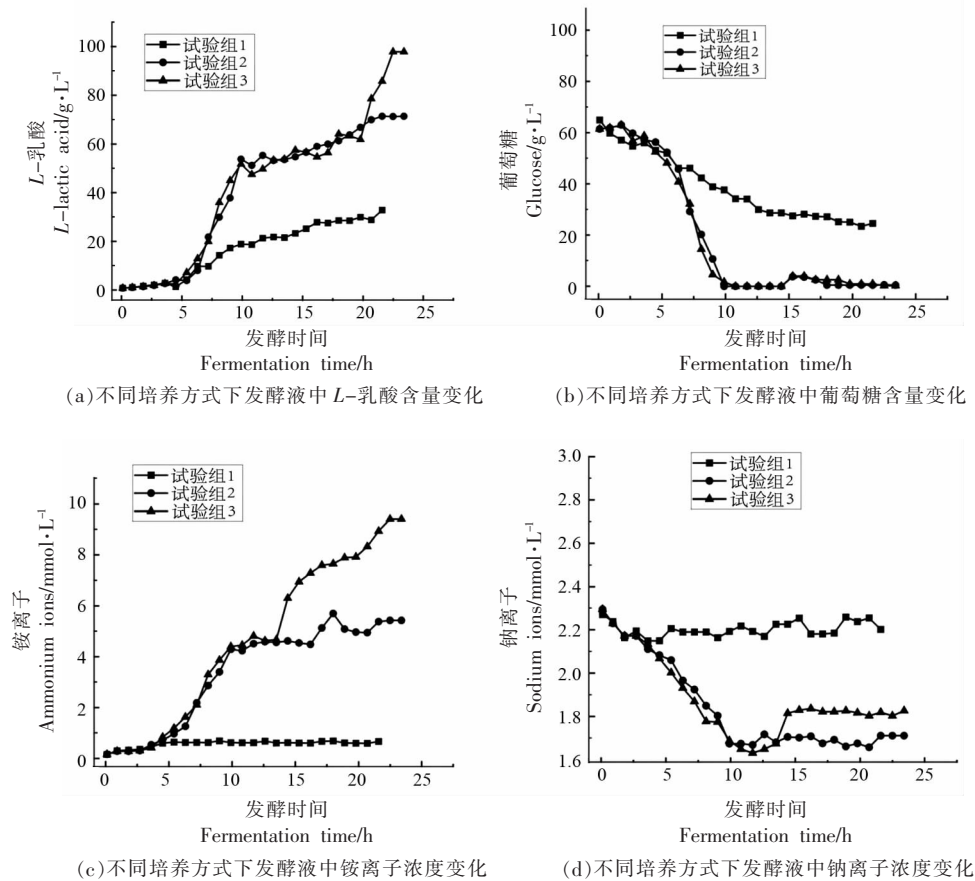


图 7 不同培养方式环境生化指标变化

Fig.7 Changes of environmental biochemical indexes in different culture methods

由图 8 可知, 试验组 1, 2, 3 的终点活菌数分别达到  $(0.367 \pm 0.0388) \times 10^{10}$ ,  $(2.350 \pm 0.050) \times 10^{10}$ ,  $(3.439 \pm 0.110) \times 10^{10}$  CFU/mL, 终点干重得率分别达到 0.371%, 0.781%, 1.601%。试验组 3 的活菌数以

及干重得率均极显著高于试验组 1, 2 ( $P < 0.01$ ), 说明降低发酵后期的环境渗透压能够有效提高生物量, 并确保菌体处于高活性状态。



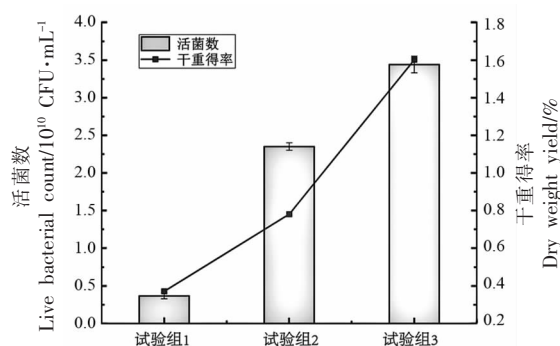


图8 不同培养方式发酵终点活菌数和干重得率

Fig.8 Number of live bacteria and dry weight yield at the end of fermentation in different culture methods

### 3 结论

本试验探究了乳酸盐与渗透压对干酪乳酪杆菌 Zhang 发酵水平的影响,以发酵最终菌体密度和最大比生长速率为评价指标。试验结果表明,LCZ 在渗透压 1 200 mOsm/kg 时,开始受到抑制作用,在渗透压 3 200 mOsm/kg 时,被完全抑制;乳酸铵由于自身特性对 LCZ 有很强的抑制作用。乳酸钠对 LCZ 的抑制作用较为温和,对 LCZ 起到的主要抑制作用是高渗抑制。

从 4 种已知相容性溶质中筛选对 LCZ 具有显著保护作用的渗透保护剂,试验结果表明,L-脯氨酸对高渗环境 (大于 2 000 mOsm/kg)LCZ 生物量积累与细胞活性均有显著保护作用,L-脯氨酸添加量为 2 g/L 时效果最佳。

本试验通过高密度发酵验证了分批培养与恒定 pH 分批培养发酵过程中,渗透压增长的主要因素,试验结果表明,乳酸不是使发酵环境渗透压升高的主要因素,氨水的流加导致了渗透压快速增长。同时结果表明,通过稀释处理缓解渗透胁迫的方法使样品在发酵终点的菌体密度、活菌数以及干重得率显著高于正常分批培养以及恒定 pH 补料培养,最终  $OD_{600nm}$  与活菌数分别达到了  $19.68 \pm 0.429$  与  $(3.439 \pm 0.110) \times 10^{10}$  CFU/mL,分别是正常恒定 pH 补料发酵的 1.61 倍与 1.46 倍,验证了渗透压对细胞生长量及活性的抑制作用,同时对发酵工业中提高发酵生物量以及菌体活性提供了参考以及指导。

### 参 考 文 献

- [1] GUERRA A F, LEMOS JUNIOR W J F, SANTOS G O, et al. *Lactobacillus paracasei* probiotic properties and survivability under stress-induced by processing and storage of ice cream bar or ice-lolly[J]. *Ciência Rural*, 2018, 48(9): 1-9.
- [2] 张和平, 武婷. 干酪乳酪杆菌 Zhang 的益生特性及其在发酵乳制品中的应用研究[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 1-7.
- [3] ZHANG H P, WU T. Beneficial properties of *Lactocaseibacillus casei* Zhang and its application in fermented dairy products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(5): 1-7.
- [4] 周景文, 高松, 刘延峰, 等. 新一代发酵工程技术: 任务与挑战[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(1): 1-11.
- [5] ZHOU J W, GAO S, LIU Y F, et al. Next generation fermentation engineering: Missions and challenges[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(1): 1-11.
- [6] WANG J C, DONG X, SHAO Y Y, et al. Genome adaptive evolution of *Lactobacillus casei* under long-term antibiotic selection pressures [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 320.
- [7] YU J, HUI W Y, CAO C X, et al. Integrative genomic and proteomic analysis of the response of *Lactobacillus casei* Zhang to glucose restriction [J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(3): 1290-1299.
- [8] BOMMASAMUDRAM J, MUTHU A, DEVAPPA S. Effect of sub-lethal heat stress on viability of *Lactocaseibacillus casei* N in spray-dried powders [J]. *LWT*, 2022, 155: 112904.
- [9] ADEWARA O A, OGUNBANWO S T. Acid stress responses of *Lactobacillus amylovorus* and *Candida kefyr* isolated from fermented sorghum gruel and their application in food fermentation [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2022, 68(4): 269-280.
- [10] LUO X, LI M, ZHANG H N, et al. Comparative proteomic analysis of three *Lactobacillus plantarum* under salt stress by iTRAQ[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 101(8): 3457-3471.



- [9] 桂亚. 鼠李糖乳杆菌的热胁迫和氧化胁迫交叉适应机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.  
GUI Y. The cross-adaptation mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* heat stress and oxidative stress [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.
- [10] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律[D]. 无锡: 江南大学, 2017.  
CUI S M. The impact factors and rules of growth inhibition and freeze-drying survival for lactic acid bacteria[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [11] HE S B, HONG X Y, HUANG T X, et al. Rapid quantification of live/dead lactic acid bacteria in probiotic products using high-sensitivity flow cytometry[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2017, 5(2): 024002.
- [12] SCHWENTNER A, NEUGEBAUER H, WEINMANN S, et al. Exploring the potential of *Corynebacterium glutamicum* to produce the compatible solute mannoglycylglycerate [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 748155.
- [13] FICHTNER F, LUNN J E. The role of trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2021, 72(1): 737-760.
- [14] FIRDOS K, NUDRAT A A, MUHAMMAD S, et al. Trehalose: A key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2019, 38(2): 606-618.
- [15] XU S, ZHOU J W, LIU L M, et al. Proline enhances *Torulopsis glabrata* growth during hyperosmotic stress[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15(2): 285-292.
- [16] KHADIDJA S R, PHILIPPE S, JOBIN M P. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 364-372.
- [17] CHEN Z C, E J J, MA R Z, et al. The effect of aspartic acid on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 and its inherent mechanism[J]. *LWT*, 2022, 155: 112929.
- [18] 翟爽. *Streptococcus thermophilus* TF96 生长过程中胞内代谢特征与氨基酸利用模式研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.  
ZHAI S. Changes of the metabolic characteristics and amino acid utilization patterns in *Streptococcus thermophilus* TF96 during of the cultures [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [19] FENG Y, MING T H, ZHOU J, et al. The response and survival mechanisms of *Staphylococcus aureus* under high salinity stress in salted foods[J]. *Foods*, 2022, 11(10): 1503.
- [20] KHEDR R A, SOROUR S G R, ABOUKHADRAH S H, et al. Alleviation of salinity stress effects on agro-physiological traits of wheat by auxin, glycine betaine, and soil additives[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022, 29(1): 534-540.
- [21] GAO X W, KONG J, ZHU H K, et al. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactococcus* response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 132(2): 802-821.
- [22] NIETOVELAZQUEZ N G, GOMEZVALDEZ A A, GONZALEZAVILA M, et al. Preliminary study on citrus oils antibacterial activity measured by flow cytometry: A step-by-step development [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(10): 1218.
- [23] GAO Y, YU H J, WEN B. The use of fluorescent techniques in combination with flow cytometry for fast counting of *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-2753 in BIFICO capsule [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(5): 1405-1410.
- [24] 田锡炜. 基于过程氧代谢和渗透压应激响应分析的乳酸发酵优化[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.  
TIAN X W. Optimization of lactic acid fermentation based on analysis of process oxygen metabolism and osmotic stress response [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015.
- [25] 杨瑞冬, 李伯海, 王元弛, 等. *Lactobacillus buchneri* IMAU80233 高密度发酵工艺优化 [J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 147-154.  
YANG R D, LI B H, WANG Y C, et al. Optimization of high cell density culture of *Lactobacillus buchneri* IMAU80233 [J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 147-154.
- [26] AMANDEEP R, DHRITI K, NITIKA K, et al. Brassinosteroids regulate functional components of antioxidative defense system in salt stressed maize seedlings [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2020, 39: 1-11.

## Damage Mechanism and Protective Measures of Lactate and Osmotic Stress on *Lactobacillus casei* Zhang

Yang Xiongzhou, Wang Haoqian, Zhang Jingwen, Huang Tian, Yu Jie, Zhang Heping\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Collaborative Innovative Center of Ministry of Education for Lactic Acid Bacteria and Fermented Dairy Products, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** Objective: To investigate the inhibitory effects of lactate and osmotic stress on *Lactobacillus casei* Zhang and to find solutions. Methods: The organic salt stress and osmotic pressure stress were created by using sodium lactate, ammonium lactate and sodium chloride, respectively, to determine the concentration of complete inhibition and plot the osmotic resistance curve, and the physiological damage to LCZ and the protective effect of compatible solutes were observed by measuring the density of the bacteria, the number of viable bacteria and cell damage. The key factors of osmotic pressure elevation were explored by batch culture and constant pH batch culture, and the effect of osmotic pressure reduction was achieved by diluting the fermentation broth, and the changes of bacterial density, viable bacterial count and dry weight yield of the samples were measured after dilution. Results: *L*-proline has a significant protective effect on LCZ biomass accumulation and cell activity under hypertonic environment, and the optimal addition amount is 2 g/L. The diluted fermentation broth treatment has a significant effect on the density and viable count of bacteria in constant pH supplemented culture. The final fermentation broth OD<sub>600nm</sub> and viable bacteria count could reach 19.68±0.429 and (3.439±0.110)×10<sup>10</sup> CFU/mL, which were 1.61 and 1.46 times of the undiluted treatment, respectively. Conclusion: *L*-proline can alleviate the activity damage of LCZ under hypertonicity to a certain extent, and reducing the osmotic pressure at the later stage of fermentation by diluting the fermentation broth treatment can greatly improve the fermentation level and cell activity, which can provide reference for industrial production and application.

**Keywords** *Lactobacillus casei* Zhang; lactate stress; osmotic stress; compatible solute; high density fermentation