



工业微生物在渗透胁迫下的应激反应及保护措施

杨雄州, 姚国强, 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, 内蒙古 呼和浩特 010018

杨雄州, 姚国强, 于洁, 张和平. 工业微生物在渗透胁迫下的应激反应及保护措施. 微生物学报, 2022, 62(11): 4176–4187.
Yang Xiongzhou, Yao Guoqiang, Yu Jie, Zhang Heping. Response of industrial microorganisms to osmotic stress and countermeasures. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4176–4187.

摘要: 发酵工业作为生物技术产业的重要组成部分, 在我国工业结构中占据了极大比重, 而在工业发酵后期菌体代谢物、中和剂以及补料物的累积使微生物受到极大的渗透胁迫, 严重影响了细胞生长及目标产物代谢, 致使发酵产量与效率偏低。本文主要针对高渗胁迫下微生物的细胞结构、应答途径、基因、蛋白、代谢、分裂机制进行综述与分析, 并以微生物菌种特性结合工业发酵技术为改良思路, 从菌种改良、外源添加保护剂、改良中和剂、去除渗透抑制因子、膜过滤技术等方面找寻潜在渗透保护措施, 以期为发酵行业生产力水平的提升、节能减排降耗提供参考。

关键词: 发酵工业; 渗透胁迫; 渗透应激; 菌种改造; 相容性溶质

Response of industrial microorganisms to osmotic stress and countermeasures

YANG Xiongzhou, YAO Guoqiang, 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, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: Fermentation industry, as an important part of biotechnology industry, covers a large proportion in industry in China. However, microorganisms face serious osmotic stress at the late fermentation stage as a result of the accumulation of microbial metabolites, neutralizers, and supplements,

基金项目: 国家现代农业产业技术体系; 内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014); 国家自然科学基金(31972054)

Supported by the National Modern Agricultural Industry Technology System, by the Major Science Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0014) and by the National Natural Science Foundation of China (31972054)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4319940; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 26 March 2022; Revised: 30 April 2022; Published online: 15 June 2022

which seriously affects the growth of cells and the production of target product and thus results in low fermentation efficiency and low yield of target product. This paper aims to summarize and analyze cell structure, response pathways, genes, proteins, metabolism, and division of microorganisms in the presence of hyperosmotic stress, and to sum up potential measures against osmotic stress based on the characteristics of microorganisms and the current available techniques: strain improvement, addition of protective agent, improvement of neutralizers, removal of osmotic inhibitory factors, and membrane filtration technology. In summary, this study is expected to serve as a reference for raising the production in fermentation industry, saving energy, and reducing waste emission and cost.

Keywords: fermentation industry; osmotic stress; osmotic stress; strain modification; compatible solute

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、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。微生物在发酵过程中可能会面临各种胁迫作用, 如温度胁迫^[1-2]、酸胁迫^[2-4]、渗透胁迫^[5]、氧化胁迫^[6]等, 这些胁迫不同程度地抑制菌体生长繁殖, 从而使发酵不能达到理想的结果。在微生物发酵技术中, 补料培养与分批培养能够显著提高最终发酵所得菌体生物量以及目标代谢物产量, 是工业中最常使用的发酵手段。在稳定的发酵工艺及环境条件下, 发酵过程中面临的主要胁迫为渗透胁迫, 其主要形成原因是发酵过程中代谢物(如乳酸、乙酸等)与流加补料过程中未被完全利用的营养物堆积, 这些积累的粒子会使微生物在培养过程中受到严重的渗透胁迫, 抑制微生物的活性和代谢能力。因此如何解决或缓解发酵过程中微生物受到的渗透胁迫成为提高发酵产量、降低能耗的关键点之一。

1 渗透压的定义及形成原因

1.1 渗透压的定义

溶剂透过半透膜由稀溶液一边到浓溶液一边的现象称为渗透现象, 能恰好阻止渗透现象发生而施加于溶液液面的压强被称为渗透

压^[7]。荷兰化学家 Van't Hoff 整理并总结了渗透压的性质及规律, 并从理论上推导出难挥发非电解质稀溶液的渗透压力与溶液浓度和热力学温度的关系(公式 1)。

$$\pi = cRT \quad (\text{公式 1})$$

c 为摩尔浓度, 单位: mol/L。R 为理想气体常数。T 为热力学温度, 单位: K。

公式 1 表明在大气压与温度一定的条件下, 溶液的渗透压仅与溶液中不能透过半透膜的溶质粒子数有关, 且与溶质的本身性质无关。

1.2 微生物发酵中高渗形成原因

溶液的渗透压换句话说就是溶液中溶质微粒对水的吸引力, 溶质微粒越多则溶液渗透压越高, 微生物发酵为获得高产生物量或代谢产物需要在培养基中加入各种营养物质(碳源、氮源、缓冲盐、微量元素、促生长因子等)及 pH 调节剂(氢氧化钠、碳酸氢钠、氨水等)^[8], 这些加入的分子、离子以及菌体自身繁殖分裂都会使溶液的渗透压升高。大多数工业发酵的生产初始底物不会达到抑制该菌生长的渗透压, 但随着发酵时间的进行, 发酵液渗透压急速增长, 在达到一定限度后严重减缓细胞分裂速度、抑制细胞活性。为探究使渗透压升高的主要因素, 本课题组对比了十几种乳酸菌发酵液与离心上清液渗透压, 发现去除菌体的上清液比发酵液渗透压略低, 但差异不显著, 这证实了细胞个

体的积累并不是导致发酵液渗透压急剧升高的主要原因。对比不同发酵方式发现,自然发酵后的发酵液渗透压水平最低,这也与发酵水平、代谢物浓度低有关;恒 pH 分批培养法操作简单、技术成熟、发酵水平较高,但发酵过程中代谢物与中和剂的累积会使渗透压达到较高水平;恒 pH 补料培养法虽然发酵水平较高,但其补料加入的物质进一步增加了环境中的渗透压。综上所述,发酵工业中使渗透压升高的主要因素是代谢物、中和剂以及补料物的累积。

2 微生物在渗透胁迫下的应激反应

2.1 渗透压对细胞结构的影响

自由水与结合水以适当的比例在细胞中维持细胞环境及胞内渗透压,为了维持正常的细胞体积和有利于生化反应的环境,细胞质及其细胞器的水活性必须低于周围介质的水活,而渗透压的变化将会极大地影响胞内的水分含量以及水活性。当细胞处于高渗透环境时,细胞膜通透性改变,胞内水分会迅速外流,细胞体积缩小,最终甚至会质壁分离,从而造成细胞在结构和生理上的损伤^[9-10]。细胞壁与细胞膜是细胞中最先感应到外界渗透压力的结构,此外,高渗透压环境下胞外的 Na^+ 、 K^+ 和其他的一些非离子溶质,都会严重扰乱胞内 pH 稳定,胞内某些酶的构象也会发生变化^[11]。Finan 等通过使用 2 种不同的光漂白方法测量 10 kDa 葡聚糖在细胞核和细胞质内和之间的转运,发现高渗透胁迫会使细胞核尺寸显著缩小,同时染色质结构改变导致核空隙率增加,而低渗环境对细胞核几乎没有影响^[12]。高渗胁迫还会对细胞形态和细胞膜脂肪酸产生较大的影响,顾頔^[13]发现高渗胁迫下 *Brachy bacterium muris* 的细胞壁变薄,细胞趋于椭圆,细胞膜不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例增加了 69.9%,细胞膜流动性

也有所提高,这是细胞在高渗胁迫下的一种应激反应,通过改变细胞膜中的磷脂类型与比例来维持正常细胞生理状态,一般来说,在高渗环境中,细胞膜的阴离子磷脂比例会显著增加,从而保持细胞膜中的双相层。耐渗透菌株正是因为具备多种应激功能维持生理状态,才能使自身拥有更强的渗透压耐受性,所以通过研究耐渗透菌株耐受机理,可以为基因改造、寻求外源保护剂提供理论依据与指导(具体方案在下文介绍)。

2.2 渗透压下微生物的主要调控方式

微生物的渗透应答途径相当复杂,原核生物可以通过复杂而高效的信号传导途径响应外界渗透压的变化,其中最典型的也就是双组分转导途径^[14]。目前细菌中已知的双组分信号转导系统约有一千多种,且应答途径复杂繁多,下面以大肠杆菌为例阐述原核微生物的渗透应答调控。当胞内外渗透压发生变化时,直接渗透传感器通过检测水的活性启动其他传导信号从而做出反应,同时间接渗透传感器通过检测由渗透压变化造成的细胞体积、膨压、膜张力、溶质浓度等因素做出反应。在胞外渗透压高于胞内时,2 种感应器通过一系列复杂的信号传递后,激活一些关键基因的转录表达^[15], EnvZ/OmpR 是大肠杆菌中响应渗透压的关键双组分系统,当 EnvZ 激酶直接感应到高渗胁迫后,会迅速磷酸化 OmpR, OmpR 通过上调 *ompC* 基因表达,下调 *ompF* 基因表达,提高 OmpC 蛋白量,减少 OmpF 蛋白量,缩小外膜蛋白的形成孔径,从而适应高渗透压带来的不良影响^[16-17]。膜整合传感蛋白(KdpD)和细胞质反应调节因子(KdpE)作为调控 K^+ 的双组分系统,通过控制 KdpFABC 转录提升胞内 K^+ 浓度以响应渗透胁迫^[18];主要由介导离子转运的跨膜亚基 TrkH、TrkG 与外围调节亚基 TrkA 组成的 Trk 系统在 ATP 绑定蛋白 SapD 的协助下可

以快速有效地吸收胞外 K^+ ^[19], 这 2 组调控系统在高渗下共同作用, 介导胞内 K^+ 的积累。与此同时, ProP、ProU、BetT、BetU、OtsA、OtsB 等转运蛋白被相关基因转录表达, 介导脯氨酸、甜菜碱、海藻糖等相容性溶质的积累^[20]。 K^+ 与相容性溶质的积累可使胞内渗透压一定程度地提升, 从而平衡胞外渗透压环境, 但细胞对高渗的应激自我保护是有限度的, 一旦胞外渗透压远高于胞内, 细胞内环境仍会失衡, 导致细胞结构和生理上的损伤, 甚至彻底破裂失活。在面对低渗环境时, MscL 和 MscS 通道会介导溶质的流出, 同时水通道相关蛋白 AqpZ

控制水分不向外流出, 以保证胞内环境稳定^[21]。

对于真核细胞来说, 高渗甘油 (high osmolarity glycerol, HOG) 途径是应答高渗胁迫的关键响应通路。以酿酒酵母为例, HOG 途径是由 2 个不同感知方式来感知渗透变化从而激活 Hog1 以响应高渗, 一种是由 Sln1-Ypd1-Ssk1 磷脂酶系统组成, 高渗胁迫下 Sln1 失活, 从而使 Ssk1 水平上升, 激活 Ssk2 和 Ssk22, Ssk2 和 Ssk22 通过磷酸化激活 MAPK Pbs2, 最后将磷酸化信号传至 Hog1 蛋白; 而另一分支是由 Sho1 感应, MAPK Pbs2 与 MAPKK Ste11 共同作用, 最终激活 Hog1 蛋白^[22](图 1)。作为 HOG

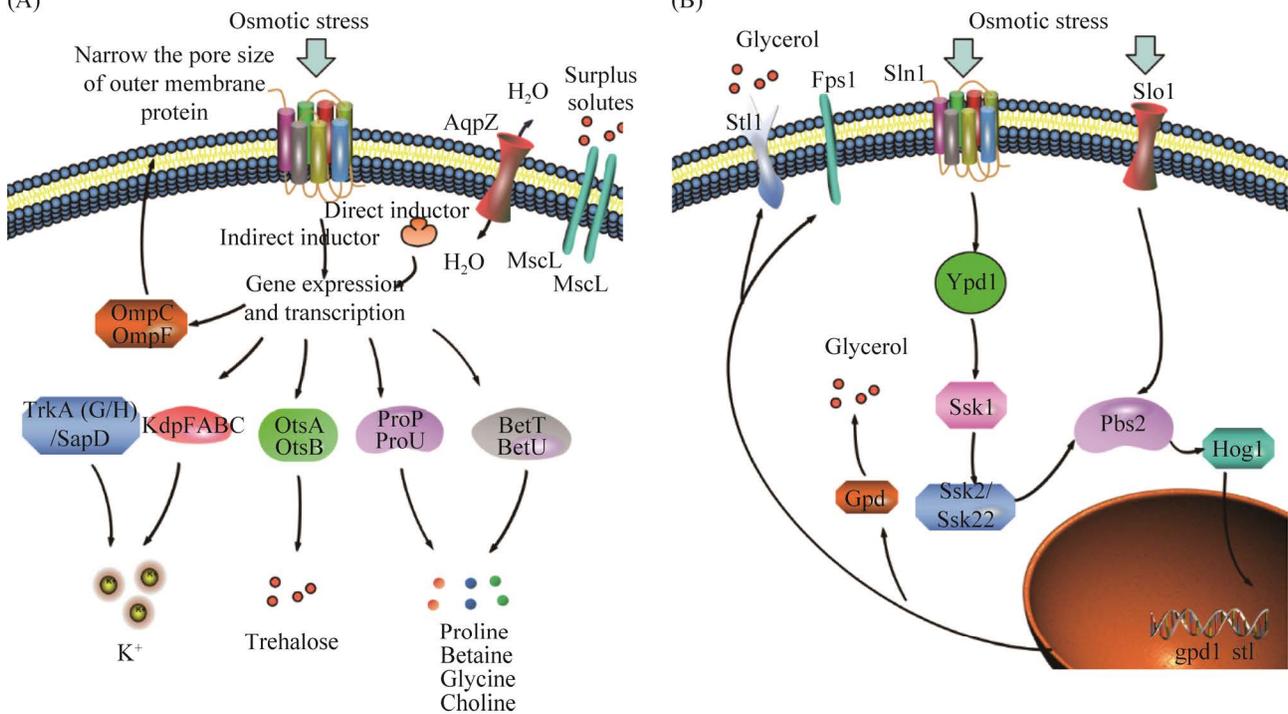


图 1 渗透应答途径^[20-23]

Figure 1 Osmotic response pathway^[20-23]. A: K^+ transporters TrkA(G/H)/SapD and KdpFABC mediate K^+ accumulation in response to high osmotic pressure. Enzymes OtsA and OtsB mediate trehalose synthesis from glucose at high osmotic pressure. Transporters ProP, ProU, BetT, and BetU mediate some compatible solutes accumulation at high osmotic pressure. By regulating the expression of OmpC and OmpF proteins, the pore size of outer membrane proteins can be reduced. Aquaporin AqpZ mediates transmembrane water flux. Mechanosensitive channels MscL and MscS mediate solute efflux in response to decreasing osmotic pressure. B: Sln1 and Sho1 are osmotic receptors in eukaryotic cells. Ypd1, Ssk1, Ssk2, Ssk22 and Pbs2 are osmotic signal transduction proteins. Hog1 activates the expression of downstream response genes. Enzymes Gpd mediates glycerol synthesis at high osmotic pressure. Transporter stl1 regulates glycerol intake. Glycerol aquaporin Fps1 closes the outward transport channel of glycerol.

途径的关键蛋白, Hog1 对于菌株的耐受渗透性起着至关重要的作用, 当细胞核接收到磷酸化的 Hog1 蛋白, 便会激活下游应答基因 *gpd1*、*stl* 等的表达, 通过 Stl1 与 Gpd 控制甘油的转运及合成, 激活甘油-水通道蛋白 Fps1 关闭甘油向外运输通道, 同时从胞外摄入甘油, 从而起到胞内快速积累甘油应激渗透胁迫、调节胞内生理状态等作用。

2.3 结合蛋白组学分析渗透胁迫

在高渗透胁迫下, 细胞不仅会发生脱水、离子紊乱、质壁分离等现象, 还会通过作用相关蛋白进而使细胞发生改变, 通过对耐渗透菌

株酶学的分析, 发现多种耐渗透菌株在细胞内能形成具有特殊功能的蛋白酶以适应环境, 目前已经有大量科研人员通过对蛋白质组的研究来进一步探索渗透压对于各种细胞的作用与影响。细胞在面对渗透胁迫时主要有 2 类蛋白进行作用, 一类是胁迫蛋白, 一类是代谢蛋白, 这些蛋白在对外界刺激时与其他分子组成一个复杂交错且具有精密调控的反应网络。如图 2 所示, 在高渗胁迫下, 渗透感应器以不同途径激活胁迫蛋白与代谢蛋白, 完成对细胞结构、离子通道以及代谢通路的调控, 从而使细胞在一定范围内能够适应不断变化的环境。目前针

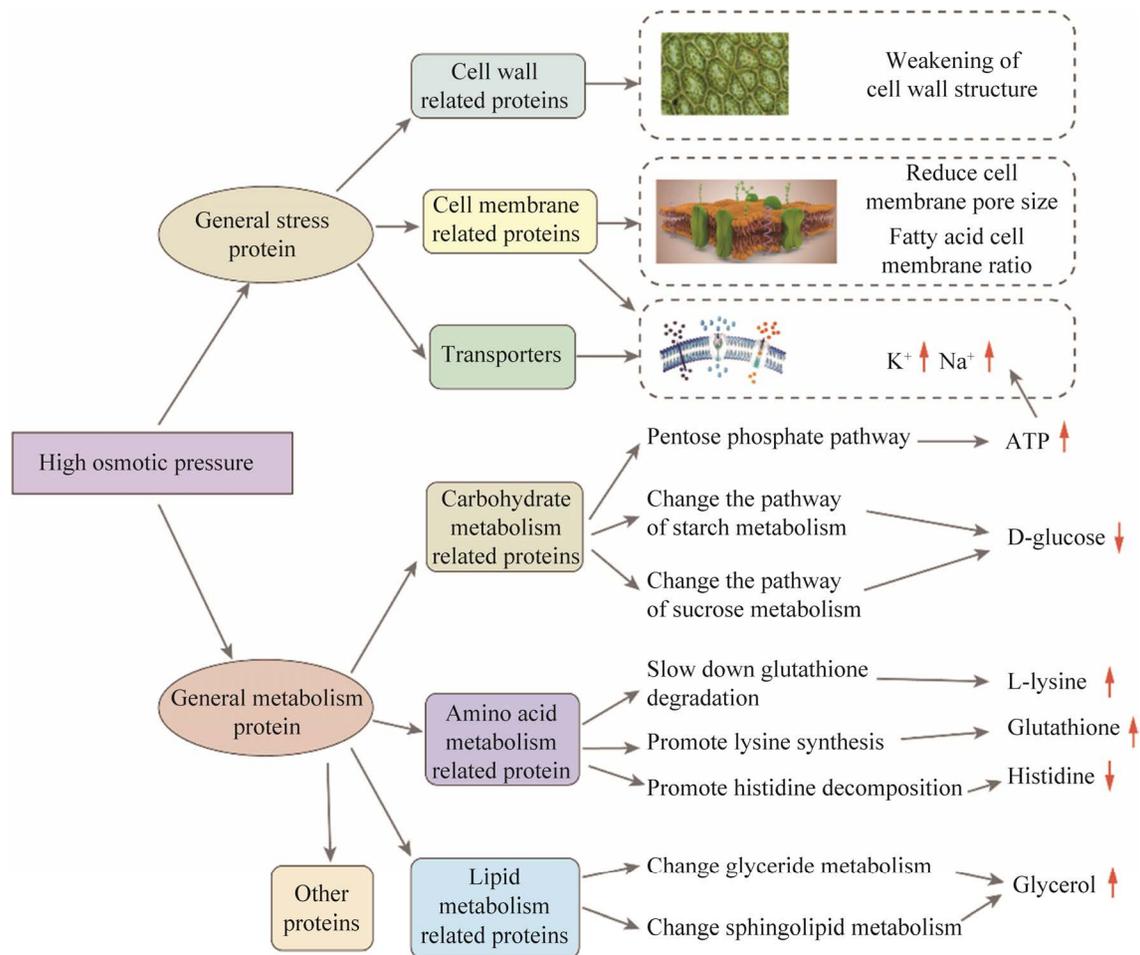


图 2 蛋白组学分析微生物部分渗透胁迫机制

Figure 2 Proteomic analysis of partial osmotic stress mechanism of microorganisms.

对微生物渗透胁迫蛋白组学的系统研究还较少, 很多只停留在细胞膜上蛋白以及代谢调节蛋白等少部分级联反应。

Luo 等^[24]基于 iTRAQ 技术对渗透胁迫下的 3 株植物乳杆菌进行了蛋白质组学分析, 发现 3 株处于对数期植物乳杆菌(TCC14917、FS5-5 和 208)在高渗胁迫下相比对照组分别有 44、57、112 个差异表达蛋白, 这些差异表达蛋白主要涉及糖代谢、氨基酸代谢、冷胁迫反应、氧化磷酸化、核苷酸代谢、多肽生物合成和蛋白质生物合成。Palomino 等^[25]发现, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 在 0.6 mol/L NaCl 的高渗条件下, S 层蛋白的分布会发生很大的变化, 在该条件下辅助蛋白 SlpX 可占 S 层总蛋白的 40%, 而对照组只能达到 10%, 这与肽聚糖和脂磷壁酸含量成反比, 所以可能是在高渗条件下增强细胞壁的一种应激反应。徐沙等^[26]通过二维电泳和 iTRAQ 技术对不同渗透压条件下光滑球拟酵母 *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 细胞内的蛋白质组差异进行分析, 发现其核糖体亚基蛋白、控制细胞分裂的蛋白、DNA 拓扑异构酶和一些转运蛋白在高渗条件下表达水平大幅上升, 此外超氧化物歧化酶和富脯蛋白的表达量随渗透压的升高而逐渐增加, 这可能与高渗环境下活性氧簇和胞内脯氨酸的积累有关。顾悦^[27]发现, 在高渗透胁迫下, 屎肠球菌 8-3 与发酵乳杆菌 2-1 中 S-核糖高半胱氨酸裂解酶 LuxS 和 S-腺苷高半胱氨酸核苷酶 Pfs 的表达量与渗透压成正相关, 而 LuxS 与 Pfs 是参与 LuxS/AI-2 群体感应系统形成的重要蛋白, 说明渗透压胁迫有诱导试验菌株的 LuxS/AI-2 系统发挥调控作用的趋势, 但其具体作用方式还没有明确的研究, 可能与菌体代谢、增强细胞壁有关。

2.4 渗透胁迫对细胞分裂造成的影响

目前渗透胁迫的机理研究中, 对代谢相关

基因与蛋白质的分析占绝大多数, 而对菌体响应渗透胁迫环境的分裂机制鲜有研究。在工业发酵中, 细胞发酵与细胞分裂息息相关, 增强细胞分裂能力可以极大程度地提高发酵产品的生产率^[28], 所以我们不仅需要生物个体活性机制的理论知识为支撑, 细胞分裂机制更是工业关注的重点。渗透胁迫是否对细胞分裂有阻碍作用, 又是如何进行阻碍, 这些问题需要 we 更加深入地研究。

细菌的分裂体通常是一种环形结构, 能够在子细胞之间形成隔膜^[29], 菌体细胞的分裂是由组成分裂体的蛋白质复合物驱动的, 其中包括 FtsA、FtsB、FtsE、FtsK、FtsL、FtsQ、FtsX、FtsZ、Ami A、AmiB、AmiC、ZapA、ZapB、MatP 等^[29-32], 通过研究这些蛋白质复合物在胁迫下的反应, 陈熙明^[33]发现, OtsA 作为细胞中的渗透感受器, 是海藻糖的相关合成酶, 其在渗透胁迫下会发生解聚合, 使得 FtsZ 的聚合减少, Z 环(DNA 复制和染色体分离后, 在细胞中间由丝和多种蛋白组成, 介导菌体隔膜形成和子细胞分离)组装停滞, 从而使节杆菌的分裂受阻。Liu 等^[34]发现 *Listeria monocytogenes* 08-5923 在乳酸钠与乙酸钠积累的渗透胁迫下菌体内 *ftsE* 基因显著表达下调, 使 FtsE 蛋白含量降低, 从而使细胞分裂受阻。涂远强^[35]发现在 2% (W/V) NaCl 的盐胁迫下, *Lactobacillus bulgaricus* sp. 1.1 的 DNA 复制并没有受到影响, 但该胁迫通过下调基因 *ftsZ* 和 *dnaA* 的表达, 抑制分裂环的组装, 从而使分裂受阻。

3 应对渗透胁迫的保护措施

不同微生物面对环境中渗透胁迫的耐受能力不同, 在工业上筛选一株具有良好耐渗透能力的菌株可以大大提高发酵效率以及菌体存活率, 而利用脱盐、添加相容性溶质去除或适应

工业废水、废料中渗透胁迫因子的方法可缩减生产成本,同时提高生产及回收利用效率,符合国家绿色可持续发展的理念,所以研究菌株渗透机理以及保护措施是提高产能的重要方向。

3.1 传统方法筛选与改造

优良的菌株是生物工业实现高效高产的基础,传统菌种筛选是指从自然界或已保藏菌株中筛选出具有特殊性能的菌株。Tian 等^[36]利用高通量筛选技术筛选出 1 株耐高渗透压的 *Lactobacillus paracasei* NCBIO01-M2 突变体,该菌不仅具有良好的耐渗透能力,还具有良好的产乳酸性能,这是因其能更灵活地调节不饱和脂肪酸比例以及细胞内相容性溶质。

传统菌株改造是指通过自然诱变、物理诱变及化学诱变等方法改良菌株某方面特性,从而提升生产效率,利用传统菌株改造方法如诱变、有性重组、驯化等^[37]能够有效获得耐渗透压菌株。多数研究者喜欢利用盐或高营养底物制造高渗透环境去驯化菌株,但这并不等同于发酵环境中的渗透胁迫,经多次模拟实验发现,使用不同种类的盐或营养物质营造相同渗透条件发酵得到的生物量存在显著差异,这可能与分子量、毒性、缓冲作用以及菌株差异有关,其中 NaCl 对发酵造成的抑制作用相对较小,是目前筛选或驯化耐渗透菌株的良好方法。李羚等^[38]利用不同浓度海盐培养基对 *Sanghuangporus baumii* 进行传代驯化,意图获得优良耐盐性能,最终得到的 *Sanghuangporus baumii* 生长速度略有提高,但差异不显著,仍受到很强的抑制作用,这也间接地证明了驯化工作中面对的重重困难。张树武等^[39]对 *Trichoderma atroviride* T-YM 进行了 3 min 紫外诱变并结合筛选处理,意图获得高效耐盐突变株,在 NaCl 溶液模拟盐胁迫条件下对比发现,突变株菌落生长速度和产孢量显著高于原始株,分别增加了 17.69%和

28.82%,可见紫外诱变可作为选育耐渗透突变株的有效方法。目前诱变、驯化等传统改造方法已相对成熟且应用较为广泛,但其过程具有一定的随机性,且筛选难度大、耗时长^[40],所以菌株的筛选工作仍需相关工作者不断地努力与优化。

3.2 基因改造

一些科研人员通过改造微生物的基因,过量表达相关酶的合成基因从而使目标具有更耐渗透压的能力。*hog1* 基因是真核微生物中有利于抵抗高渗透压环境的基因,向婷^[41]克隆了 *Rhizophagus irregularis* (AH01) *hog1* 基因的全长,发现其能够互补 *Sc hog1* 基因缺失突变株的表型,提高酵母细胞对渗透压的耐受能力。吴志勇^[42]将优化过的脯氨酸-4-羟化酶基因克隆至枯草芽孢杆菌 WB600 中,在枯草芽孢杆菌体内架构了一条反式-4-羟脯氨酸生物合成途径,同时在 WB600 基础上通过一系列基因敲除或过表达,构建了 *proB* 和 *proA* 基因过表达的重组菌 WB601 和 WB602 与 *glnA* 基因缺失的重组菌 WB603,发现 *proB* 和 *proA* 基因的过表达均能显著提升细胞合成脯氨酸的能力,而 *glnA* 基因的缺失能增强脯氨酸合成途径,提高脯氨酸的积累,2 种效应均可显著提高枯草芽孢杆菌的耐渗透压能力且可以正向叠加。Qian 等^[43]在大肠杆菌 MHK13 中表达合成了转运甘氨酸甜菜碱的关键基因 *betL*、*opuD1*、*opuD2*、*opuD3*,并在高盐条件下检测了细胞对甘氨酸甜菜碱的摄取情况,结果表明,4 种转运系统均能成功转运,该菌在高渗环境中的耐受能力也获得显著增强。利用简单的基因改造对于多基因控制的性状难以实现理想的效果,若想彻底改造菌株的耐渗透能力,必须结合菌株渗透压耐受机制,利用系统生物学和合成生物学的方法,从整体水平对生物系统进行分析设计,同时将改

造完成菌株进行适应性及遗传稳定性评估, 才可用于工业化发酵。

3.3 相容性溶质

相容性溶质(*compatible solute*)是一类能在细胞内积累到较高浓度且干扰细胞内正常生理环境易溶于水的低分子量有机化合物^[44]。若受到渗透胁迫, 菌体会通过调控胞内代谢的方式来响应负面因素的刺激, 代谢相容性溶质(如脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸、甘油、胆碱、四氢嘧啶、海藻糖、蔗糖等)^[45-47]来平衡胞内水活, 从而营造利于细胞生存繁殖的环境, 所以很多研究者通过检测微生物在受到胁迫时代谢物的变化来寻找能缓解渗透胁迫的保护剂。

高渗环境下微生物积累相容性溶质的方式有 2 种: 直接从外界环境吸收和通过自身合成, 前者需要相应的渗透酶和有关转运蛋白, 后者除了需要有关转运蛋白外, 还需一套复杂的合成酶系^[48]。通过在培养基中外源添加相容性溶质的方法可以一定程度地帮助菌体“抵抗”高渗胁迫, 细胞可以通过感受器感受胞外渗透压环境, 通过一系列复杂响应, 代谢一定量的相容

性溶质, 并控制相关蛋白从外界汲取更多的相容性溶质以保护自身, 但细胞本身可接受溶质有限, 所以渗透保护剂的效果是有限的。由于微生物的多样性, 菌株间存在很大的差异, 其基因型决定了其代谢相容性溶质的能力以及对相容性溶质的接收能力, 所以不同渗透保护剂对不同微生物的保护能力也有着很大差异。综上所述, 相容性溶质可以帮助菌株在面对渗透胁迫时起到显著的缓解作用, 从而提升发酵得率, 但在发酵工业中存在着菌株适用差异, 所以需筛选不同相容性溶质来精准应对不同菌株受到的渗透胁迫, 表 1 统计了部分相容性溶质在缓解渗透胁迫上的应用。

3.4 新型培养方法

工业上常使用恒 pH 分批培养或恒 pH 补料培养方式进行发酵, 但这 2 种方式均存在明显缺陷, 微生物的代谢产物、加入的 pH 中和剂以及不断补料加入的营养物质均会使发酵环境渗透压达到一个非常高的水平, 从而对微生物施加更高的渗透压力。一些研究者为解决传统发酵工业中的渗透胁迫的问题, 提出了很多新

表 1 相容性溶质在缓解渗透胁迫上的应用

Table 1 Application of compatible solutes in alleviating osmotic stress

Compatible solutes	Category	Strains
Proline	Amino acid	<i>Actinomyces succinate</i> ^[49] <i>Torulopsis glabrata</i> ^[50]
Betaine	Alkalines	<i>Bacillus atrophaeus</i> ^[51] <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ^[52]
Glycerol	Alcohols	<i>Candida glycerinogenes</i> ^[53]
Glycine	Amino acid	<i>Bacillus atrophaeus</i> ^[51]
Sucrose	Sugars	<i>Cyanobacteria</i> ^[54]
Trehalose	Sugars	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ^[55]
Pipecolic acid	Aromatic acid	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ^[56]
Mannitol	Alcohols	<i>Acinetobacter baumannii</i> ^[57]
Glucosylglycerol	Glycoside compounds	<i>Cyanobacteria</i> ^[58]
Glucosylglycerate	Lipid	<i>Cyanobacteria</i> ^[58]
Glutamate	Amino acid	<i>Brachybacterium muris</i> ^[13]
Tetrahydropyrimidine	Amino acid derivative	<i>Virgibacillus pantothenticus</i> ^[59]
Aspartic acid	Amino acid	<i>Lactobacillus plantarum</i> ^[60]

型发酵系统：Bähr 等^[61]利用透析补料培养的方法培养 *Escherichia coli* BL21，去除了部分小分子代谢产物，同时补充新鲜营养物质，最终生物量较普通分批培养提高了约 200 倍，但使用透析培养的方法成本高、难度大、透析耗时长、对工艺与设备的要求高，很难应用到工业生产。Sung 等^[62]采用膜过滤循环系统培养 *Leuconostoc citreum* HJ-P4，利用陶瓷膜过滤掉发酵废液，同时不断补充营养物质，最终得到的菌体浓度较分批培养提高了 6 倍，虽然生物量以及活性有着巨大提升，但这种方式也有很大的弊端，膜滤效率在后期会因膜的堵塞大大降低，而且发酵废液中也仍有大量未被利用的营养物质，清洗膜的过程也很耗时耗力，这也导致了很难实施于工业发酵中。崔树茂^[63]通过测定不同阴离子树脂对乳酸根的吸附能力，筛选出阴离子交换树脂 D319，将其与生物反应器结合创造出一种新型培养方式，利用该系统高密度培养 *Lactobacillus plantarum* CCFM 8610，吸附高密度发酵代谢生成的酸根离子，降低了环境中的渗透压，从而达到细胞生物量的提升。但这种培养方式对发酵环境人员操作水平要求较高，且只能应用于少数微生物中，不具有普适性。田锡炜^[64]发现相同浓度乳酸钙溶液的渗透压远低于乳酸铵溶液与乳酸钠溶液，于是将发酵中的补料中和剂 NH_4OH 替换为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，L-乳酸产率获得显著提高，由于乳酸钙的溶解度很低，在浓度达到一定程度后便会发生结晶现象，所以他改进了方案，使用中和剂组合策略进行发酵：发酵过程前 8 h 使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，8 h 至结束使用 NH_4OH ，这样的组合策略使发酵菌体产率提高了 2.21 倍，尽管该方法操作较为繁琐且具有一定的局限性，但为降低发酵环境渗透压提供了新思路。

4 总结与展望

渗透胁迫作为工业中发酵后期面临的主要胁迫，目前还没有完美的解决方案，本文从细胞结构、应答途径与应激反应等方面阐述了渗透环境对微生物产生的影响并简述了其部分响应及作用机理，并以此为依据提供了数种潜在可用于工业化生产的方案。

目前国内针对渗透胁迫应用于发酵工业的措施仍显不足，如今的发酵工程优化方法仍主要将发酵过程看成一个宏观的化学反应整体，以宏观环境和动力学参数来寻找最优的策略，但随着发酵技术的不断进步与发展，为追求更高的工业产量及生产效率，利用系统生物学和生物合成技术对菌株的耐渗透性改造以及工业元件的不断升级进化是必不可少的，在优化过程中关注每一种微生物本身的生理代谢特性以及不同尺度间各参数的变化与联系可以更好地解决优化中的局部与整体问题。

在未来的工业生产中一方面需要自然筛选与菌株改造提供简单易行的抗胁迫手段，另一方面需要在发酵系统上不断地更新换代，改进智能环境调控系统及过滤循环系统，在产生渗透胁迫时及时补料调控或剔除抑制因素。可以预期，随着研究的不断深入，通过对表型特异的菌株进行各组学的研究，结合代谢网络模拟以及代谢流的分析，将会对渗透胁迫的作用机制有着更清晰明确的认知，同时以此为理论依据，应用于基因改造工程、相容性溶质的筛选以及抗渗透元器件的构建，为发酵行业生产力水平的提升、节能减排降耗提供实践指导。

参考文献

- [1] Cheng C, Kao KC. Microbiology. How to survive being hot and inebriated. *Science*, 2014, 346(6205): 35–36.

- [2] 张猛, 贾星, 张和平, 马学波, 包秋华. 干酪乳杆菌 Zhang 在逆境条件下基因表达的差异分析. 中国食品学报, 2021, 21(6): 62–69.
Zhang M, Jia X, Zhang HP, Ma XB, Bao QH. Analysis of differential gene expression of *Lactobacillus casei* Zhang under adverse circumstances. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 62–69. (in Chinese)
- [3] Xu JN, Guo L, Zhao N, Meng XM, Zhang J, Wang TR, Wei XY, Fan MT. Response mechanisms to acid stress of acid-resistant bacteria and biotechnological applications in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022: 1–17.
- [4] Wu R, Zhang W, Sun T, Wu J, Yue X, Meng H, Zhang H. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 147(3): 181–187.
- [5] Doğan A, Demirci S, Aytekin AÖ, Şahin F. Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 174(1): 28–42.
- [6] De La Torre-Ruiz MA, Mozo-Villarias A, Pujol N, Petkova MI. How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. *Current Protein & Peptide Science*, 2010, 11(8): 669–679.
- [7] 张欣荣, 阎芳. 基础化学. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2016.
- [8] Choi GH, Lee NK, Paik HD. Optimization of medium composition for biomass production of *Lactobacillus plantarum* 200655 using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 31(5): 717–725.
- [9] 朱杰. 大豆慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum* 5038 耐干燥特性及不同水分胁迫响应机制的研究. 内蒙古大学博士学位论文, 2021.
- [10] Zhang Y, Zhang Y, Zhu Y, Mao S, Li Y. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3177–3186.
- [11] 刘晶. 钝齿棒杆菌中 Na^+/K^+ 转运蛋白在 L-精氨酸合成中的作用研究. 江南大学硕士学位论文, 2020.
- [12] Finan JD, Leddy HA, Guilak F. Osmotic stress alters chromatin condensation and nucleocytoplasmic transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 408(2): 230–235.
- [13] 顾頔. 中度嗜盐菌 *Brachybacterium muris* 生物学特性、盐胁迫应答的相容性溶质分子鉴定及其作用机制研究. 浙江大学硕士学位论文, 2021.
- [14] 李国涛, 薛海玲, 姚远. 细菌 Cpx 双组分信号转导系统应对外界环境变化的响应调节机制研究进展. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2881–2894.
Li GT, Xue HL, Yao Y. Research progress of Cpx two-component system in bacteria. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2881–2894. (in Chinese)
- [15] 高群. 大肠杆菌化学感受器尖端发卡结构构象变化对激酶信号的调控. 四川农业大学博士学位论文, 2019.
- [16] Marijuán PC, Navarro J, Del Moral R. On prokaryotic intelligence: strategies for sensing the environment. *BioSystems*, 2010, 99(2): 94–103.
- [17] 马世林. 嗜水气单胞菌双组分系统 ENVZ/OMPR 的功能研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2021.
- [18] Maria KA. 耻垢分枝杆菌中 KdpD/KdpE 双组份系统调控钾离子泵 KdpFABC 的研究. 华中农业大学博士学位论文, 2017.
- [19] 张晓燕. 海洋微生物钾转运蛋白基因 *trkH* 的克隆与表达. 大连理工大学硕士学位论文, 2015.
- [20] Wood JM. Osmosensing by bacteria. *Science's STKE*, 2006, 2006(357): pe43.
- [21] Bremer E, Krämer R. Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 313–334.
- [22] Krantz M, Becit E, Hohmann S. Comparative analysis of HOG pathway proteins to generate hypotheses for functional analysis. *Current Genetics*, 2006, 49(3): 152–165.
- [23] 陆信曜, 诸葛斌, 宗红, 嵇豪. 产甘油假丝酵母 HOG 途径应答研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(5): 585–594.
Lu XY, Zhuge B, Zong H, Ji H. Advances in the HOG pathway of *Candida glycerinogenes*. *Scientia Sinica: Vitae*, 2019, 49(5): 585–594. (in Chinese)
- [24] Luo X, Li M, Zhang HN, Li R, Zou YT, Wu RN, Chen YF. Comparative proteomic analysis of three *Lactobacillus plantarum* under salt stress by iTRAQ. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 101(8): 3457–3471.
- [25] Palomino MM, Waehner PM, Fina Martin J, Ojeda P, Malone L, Sánchez Rivas C, Prado Acosta M, Allievi MC, Ruzal SM. Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8475–8484.
- [26] 徐沙, 刘立明. 高渗胁迫对光滑球拟酵母转录组的影响. 食品与生物技术学报, 2014, 33(12): 1284–1293.
Xu S, Liu LM. Transcriptome analysis of *Torulopsis glabrata* under hyperosmotic stress. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(12): 1284–1293.

- (in Chinese)
- [27] 顾悦. 环境胁迫及酵母菌对乳酸菌 $Lu_5S/AI-2$ 群体感应系统的影响. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2017.
- [28] Wang X, Lin L, Dong J, Yu X. Simultaneous improvements of cell growth and polyhydroxyalkanoate production in *Pseudomonas* from a lignin derivative for lignin consolidated bioprocessing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): AEM.01469–18.
- [29] Söderström B, Chan H, Daley DO. Super-resolution images of peptidoglycan remodelling enzymes at the division site of *Escherichia coli*. *Current Genetics*, 2019, 65(1): 99–101.
- [30] Haeusser DP, Margolin W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 305–319.
- [31] Marmont LS, Bernhardt TG. A conserved sub complex within the bacterial cytokinetic ring activates cell wall synthesis by the FtsW-FtsI synthase. *PNAS*, 2020, 117(38): 23879–23885.
- [32] Yang DC, Tan K, Joachimiak A, Bernhardt TG. A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Molecular Microbiology*, 2012, 85(4): 768–781.
- [33] 陈熙明. 节杆菌中的渗透压胁迫感受器调节细胞分裂以及细胞壁发育. 兰州大学博士学位论文, 2011.
- [34] Liu X, Basu U, Miller P, McMullen LM. Differential gene expression and filamentation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to sodium lactate and sodium diacetate. *Food Microbiology*, 2017, 63: 153–158.
- [35] 涂远强. 保加利亚乳杆菌盐胁迫对菌体分裂体的作用研究. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2021.
- [36] Tian X, Wang Y, Chu J, Mohsin A, Zhuang Y. Exploring cellular fatty acid composition and intracellular metabolites of osmotic-tolerant mutant *Lactobacillus paracasei* NCBio-M2 for highly efficient lactic acid production with high initial glucose concentration. *Journal of Biotechnology*, 2018, 286: 27–35.
- [37] Steensels J, Snoek T, Meersman E, Nicolino MP, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(5): 947–995.
- [38] 李羚, 郭立忠, 李树文. 耐盐桑黄菌株筛选及其驯化. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2021, 38(3): 205–208.
Li L, Guo LZ, Li SW. Screening of saline tolerant *Sanghuangporus* sp. and its acclimatization. *Journal of Qingdao Agricultural University: Natural Science*, 2021, 38(3): 205–208. (in Chinese)
- [39] 张树武, 徐秉良, 刘佳, 石成才. 木霉耐盐突变菌株的紫外诱变选育. 干旱地区农业研究, 2019, 37(4): 263–268.
Zhang SW, Xu BL, Liu J, Shi CC. Identification of salinity tolerant mutant strain of *Trichoderma* sp. by ultraviolet mutagenesis. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2019, 37(4): 263–268. (in Chinese)
- [40] 郝小明, 陈博, 安泰. 工业微生物酸胁迫的耐受机制及改造途径. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1151–1161.
Hao XM, Chen B, An T. Pathway modification of industrial microorganisms to improve acid-stress tolerance. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(8): 1151–1161. (in Chinese)
- [41] 向婷. 渗透压胁迫下 AM 真菌 *Rhizophagus irregularis* HOG1 基因的功能研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2015.
- [42] 吴志勇. 枯草芽孢杆菌 L-脯氨酸异源延伸途径研究. 江南大学硕士学位论文, 2017.
- [43] Qian CJ, Li W, Li H, Ou D, Zhu Ge YY, Liu YD. Responses of genes for the uptake of glycine betaine in *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 under NaCl stress. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 132: 192–199.
- [44] Schwentner A, Neugebauer H, Weinmann S, Santos H, Eikmanns BJ. Exploring the potential of *Corynebacterium glutamicum* to produce the compatible solute mannosylglycerate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 748155.
- [45] Imhoff JF, Rahn T, Künzel S, Keller A, Neulinger SC. Osmotic adaptation and compatible solute biosynthesis of phototrophic bacteria as revealed from genome analyses. *Microorganisms*, 2020, 9(1): E46.
- [46] Gregory GJ, Boyd EF. Stressed out: bacterial response to high salinity using compatible solute biosynthesis and uptake systems, lessons from *Vibrionaceae*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1014–1027.
- [47] Rubinstein SM, Kolodkin-Gal I, McLoon A, Chai L, Kolter R, Losick R, Weitz DA. Osmotic pressure can regulate matrix gene expression in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(2): 426–436.
- [48] 林松洋, 郝利民, 刘鑫, 鲁来政, 康巧珍, 鲁吉珂. 乳酸菌耐盐分子机制研究进展. 食品科学, 2018, 39(3): 295–301.
Lin SY, Hao LM, Liu X, Lu LZ, Kang QZ, Lu JK. Progress in molecular mechanism of salt tolerance in lactic acid bacteria. *Food Science*, 2018, 39(3): 295–301. (in Chinese)
- [49] Fang XJ, Li J, Zheng XY, Xi YL, Chen KQ, Wei P, Ouyang PK, Jiang M. Influence of osmotic stress on fermentative production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied Biochemistry and*

- Biotechnology*, 2011, 165(1): 138–147.
- [50] Xu S, Zhou JW, Liu LM, Chen J. Proline enhances *Torulopsis glabrata* growth during hyperosmotic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 15(2): 285–292.
- [51] Anburajan L, Meena B, Vinithkumar NV, Dharani G. Molecular characterization of glycine betaine biosynthesis genes from deep sea halophilic bacteria, *Bacillus atrophaeus* NIOT-DSB21. *Ecological Genetics and Genomics*, 2021, 18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egg.2021.100080>.
- [52] Han X, Wu HY, Yu P, Zhang LJ, Zhao SN, Zhang LW. Glycine betaine transport conditions of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in salt induced hyperosmotic stress. *International Dairy Journal*, 2018, 86. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.06.007.
- [53] 郑昌欣, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 李静. 渗透压对产甘油假丝酵母磷酸果糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的调控. 应用与环境生物学报, 2017, 23(1): 123–128. Zheng CX, Zhuge B, Lu XY, Zong H, Li J. Effects of osmotic stress on phosphofructokinase and 6-phosphate glucose dehydrogenase of *Candida glycerinogenes*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, 23(1): 123–128. (in Chinese)
- [54] Nitin K, Muriel G, Zhu T, Lu XF. Compatible solutes profiling and carbohydrate feedstock from diversified *Cyanobacteria*. *Algal Research*, 2019, 43(C). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101637>.
- [55] Stracke C, Meyer BH, Hagemann A, Jo E, Lee A, Albers SV, Cha J, Braesen C, Siebers B. Salt stress response of *Sulfolobus acidocaldarius* involves complex trehalose metabolism utilizing a novel trehalose-6-phosphate synthase (TPS)/trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(24). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01565-20>
- [56] Pérez-García F, Brito LF, Wendisch VF. Function of L-pipecolic acid as compatible solute in *Corynebacterium glutamicum* as basis for its production under hyperosmolar conditions. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 340.
- [57] Zeidler S, Hubloher J, König P, Ngu ND, Scholz A, Averhoff B, Müller V. Salt induction and activation of MtlD, the key enzyme in the synthesis of the compatible solute mannitol in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Open*, 2018, 7(6): e00614.
- [58] Klähn S, Hagemann M. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(3): 551–562.
- [59] 邢庆花, 张英杰, 廖子亚, 赵百锁. 嗜盐细菌中四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶的生物合成及其生物学功能. 微生物学报, 2021, 61(6): 1428–1440. Xing QH, Zhang YJ, Liao ZY, Zhao BS. Ectoine and hydroxyectoine: biosynthesis and its biological function in halophilic bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1428–1440. (in Chinese)
- [60] Chen ZC, E JJ, Ma RZ, Zhang JY, Yao CQ, Wang RX, Zhang QL, Yang Y, Li J, Wang JG. The effect of aspartic acid on the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 and its inherent mechanism. *LWT - Food Science and Technology*, 2022, 155.
- [61] Bähr C, Leuchtle B, Lehmann C, Becker J, Jude M, Peinemann F, Arbter R, Buchs J. Dialysis shake flask for effective screening in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 69: 182–195.
- [62] Sung IK, Han NS, Kim BS. Co-production of biomass and metabolites by cell retention culture of *Leuconostoc citreum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(5): 715–720.
- [63] 崔树茂. 乳酸菌的生长抑制和冻干存活的影响因素及规律. 江南大学博士学位论文, 2017.
- [64] 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. 华东理工大学博士学位论文, 2015.

张和平, 教授, 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室主任, 长江学者特聘教授、国家杰青和国家万人计划科技创新领军人才, 一直从事乳酸菌资源的功能挖掘与开发利用, 特别是在乳酸菌种质资源库的建设、优良菌株的精准筛选和功能评价、乳酸菌制剂的加工技术及其产业化推进方面取得了多项研究成果, 获国家科学技术进步二等奖、何梁何利基金科学与技术创新奖、内蒙古科学技术特别贡献奖和教育部技术发明一等奖等多项科技奖励。

