

李民, 杨展, 刘凯龙, 等. 发酵体系 pH 控制对短双歧杆菌分裂周期的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(18): 232–239. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110022

LI Min, YANG Zhan, LIU Kailong, et al. Effect of pH Control in Fermentation System on Division Cycle of *Bifidobacterium breve*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(18): 232–239. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110022

· 生物工程 ·

发酵体系 pH 控制对短双歧杆菌分裂周期的影响

李 民, 杨 展, 刘凯龙, 张晓源, 张 怡, 张文羿, 张和平, 姚国强*

(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, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘 要: pH 控制是双歧杆菌高密度培养过程中关键的调控手段之一, 但关于 pH 调控菌体分裂增殖机制的研究较少。本研究以短双歧杆菌 B2798 为研究对象, 基于细胞增殖荧光探针 (Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl ester, CFDA-SE) 对菌体细胞进行标记, 采用流式细胞术检测该菌株在不同发酵体系 pH 条件下的菌体分裂进程, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) 技术对菌体分裂过程中关键基因进行定量检测, 探究不同发酵体系 pH 对其分裂周期的影响。结果表明: 在 pH5.30 的发酵体系中菌体分裂数可达 7 次, 高于其他 pH 条件的试验组, 进一步测定活菌数达 $(1.39 \pm 0.04) \times 10^{10}$ CFU/mL, 显著大于其他 pH 条件试验组 ($P < 0.05$), 说明在此 pH 条件下菌体不仅分裂旺盛, 且存活率高。发酵体系 pH5.30 时, 分裂相关基因 *ftsZ* 与 *sepF* 表达量较 pH6.30 试验组显著上调 61.86% 与 131.36% ($P < 0.05$), 较 pH4.30 组显著上调 78.13% 和 80.31% ($P < 0.05$)。综上所述, 发酵体系 pH 通过调控菌体分裂, 影响活菌数量以及调控分裂相关基因的表达, 共同作用形成了一个有利于菌体快速分裂增殖的环境, 为精准发酵提供理论支持。

关键词: 短双歧杆菌, 发酵体系 pH, 荧光探针, 流式细胞术, 分裂周期, 分裂基因

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)18-0232-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024110022

本文网刊:



Effect of pH Control in Fermentation System on Division Cycle of *Bifidobacterium breve*

LI Min, YANG Zhan, LIU Kailong, ZHANG Xiaoyuan, ZHANG Yi, ZHANG Wenyi,
ZHANG Heping, YAO Guoqiang*

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

Abstract: pH control was a key regulatory strategy in the high-density cultivation of *Bifidobacteria*. However, research into the mechanisms by which pH regulates cell division and proliferation remains limited. In this study, *Bifidobacterium breve* B2798 was used as the model organism. Cells were labeled with the fluorescent proliferation probe Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester (CFDA-SE), and flow cytometry was utilized to monitor bacterial division dynamics under varying fermentation pH conditions. Quantitative real-time PCR (qPCR) was applied to measure the expression levels of

收稿日期: 2024-11-04

基金项目: 国家自然科学基金 (32272293, 32394053); 国家重点研发计划 (2022YFD2100700); 内蒙古农业大学高层次/优秀博士人才引进科研启动项目 (NDYB2021-17)。

作者简介: 李民 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳酸菌资源开发与利用, E-mail: 13739357809@163.com。

* 通信作者: 姚国强 (1985-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 乳酸菌资源开发与利用, E-mail: yaoguoqiang1985@163.com。

key genes involved in cell division, aiming to investigate the influence of fermentation pH on its division cycle. The results showed that at a fermentation pH of 5.30, cells underwent up to 7 division cycles, a higher number than observed at other pH levels. The viable cell count at this pH was $(1.39 \pm 0.04) \times 10^{10}$ CFU/mL, significantly higher than that at other pH ($P < 0.05$), indicating that cells not only divide actively but also maintain high viability. At pH 5.30, the expression of division-related genes *ftsZ* and *sepF* was upregulated by 61.86% and 131.36%, respectively, compared to pH 6.30 ($P < 0.05$), and by 78.13% and 80.31%, respectively, compared to pH 4.30 ($P < 0.05$). In conclusion, fermentation pH regulates cell division by influencing viable cell counts and regulating the expression of division-related genes, collectively creating an optimal environment for rapid cellular proliferation. This mechanistic insight provides theoretical support for precision fermentation in achieving high-density cultivation and yield optimization

Key words: *Bifidobacterium breve*; fermentation pH; fluorescent probe; flow cytometry; cell cycle; cell division genes

双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)是具有益生菌特性的主要微生物类群之一^[1]。它具有预防人体肠道疾病^[2]、预防或改善人体肥胖^[3]、改善便秘情况^[4]、增强人体免疫力等多种益生功能^[5]。

细菌分裂过程及其调控机制是生物学研究中的根本问题,大多数细菌采用“二分裂”方式分裂,分裂过程主要包括遗传物质复制和分离、细胞内隔膜形成与子细胞形成等关键步骤^[6]。完整有序的分裂进程即为细胞周期,细菌分裂周期可分为三个阶段,B、C和D时期。B时期是菌体细胞自诞生至遗传物质开始复制;C时期是菌体细胞自遗传物质开始复制至复制终止;D时期是菌体细胞染色体复制终止至分裂完成^[7]。影响细菌细胞分裂状态的原因十分复杂,而培养条件是调控乳酸菌在高密度发酵过程中生长和代谢的关键变量。在实验室小试或工业生产中,培养温度^[8]、pH^[9]、营养物质^[10]、毒性物质^[11]、群体感应副产物^[12]等是引起菌体生理状态改变的主要因素,直接影响乳酸菌在高密度发酵过程中的生长与代谢活动。

传统检测双歧杆菌分裂增殖状态常用的方法有显微镜观察法和平板计数法^[13]。显微镜观察法较为简单快速,但只能提供定性或半定量的信息^[14];平板计数法可提供较为准确的定量数据,但操作过程较为复杂,且需要培养较长时间,并且无法评判不同培养条件下菌体生理状态变化差异^[15]。较传统方法而言,流式细胞术具有高通量、高灵敏度和高准确性等特点,可在短时间对 $10^6 \sim 10^7$ 个单细胞检测分析,对菌群数量准确量化^[16],还可在单细胞层面对菌体生理状态进行全面评估^[17],并结合实时荧光定量 PCR(real-time quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)技术对样本中基因表达量进行定量检测^[18],其中绝对定量法是利用已知的标准曲线来计算测定样本中基因表达量的过程,能够精确检测未知样本中特定基因或 DNA 序列的拷贝数^[19]。

本研究以短双歧杆菌 B2798 为研究对象,采用荧光示踪法,应用流式细胞术对高密度发酵过程中菌体分裂周期进行检测,分析不同发酵体系 pH 条件下短双歧杆菌 B2798 细胞分裂周期差异,通过 qPCR 技术对菌体分裂过程中分裂关键基因 *ftsZ* 和 *sepF* 进行绝对定量验证,探究发酵体系 pH 对菌体分裂的

影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

短双歧杆菌 B2798(*Bifidobacterium breve* B2798) 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室菌种资源库提供,以下简称为 B2798;细菌学蛋白胨、牛肉浸粉 生化试剂,广东环凯微生物科技有限公司;酵母浸粉 生化试剂,安琪酵母股份有限公司;葡萄糖(分析纯) 柠檬酸三铵(分析纯) 无水乙酸钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)、磷酸氢二钾(分析纯)、吐温-80(分析纯)、硫酸镁(分析纯)、硫酸锰(分析纯)、琼脂 生化试剂,国药集团化学试剂有限公司;L-半胱氨酸盐酸盐 分析纯,上海源叶生物科技有限公司;CFDA-SE 细胞增殖示踪荧光探针(生化试剂)、二甲基亚砜(分析纯) 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;TRIzol 提取试剂 生化试剂,天根生化科技(北京)有限公司;HiFiScript cDNA 第一链合成试剂盒、2XUltraSYBR Mixure(生化试剂) 康为世纪生物科技有限公司。

FC-MS 平行生物反应器 上海顾信生物科技有限公司;M-online 生物过程生化分析仪 深圳西尔曼科技有限公司;Mo Flo Astrios EQ 流式细胞仪 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;ZJJH-C1112C 无菌工作台 上海智城分析仪器有限公司;TGL-16B 台式高速离心机 德国艾本德公司;GRX-9203A 全自动干热灭菌器 上海一恒科技有限公司;FE-28S pH 计 瑞士梅特勒-托利多公司;SpectraMax M2 多功能酶标仪 美国美谷分子公司;HWS-18 水浴锅 上海坤诚科学仪器有限公司;AR2202CN 电子天平 上海奥豪斯仪器有限公司;E0385 超声波细胞破碎仪 上海碧云天生物技术有限公司;DDY-6C 双稳定时电泳仪、JY04S-3C 凝胶成像仪 北京君意东方电泳设备有限公司;SLAN96S 荧光定量 PCR 仪 上海宏石医疗科技有限公司;ND5000 超微量可见光紫外分光光度计 北京百泰克生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化与扩培 将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保藏的 B2798 菌种冻存管取出,置于超净工作台自然解

冻后接种于改良 MRS 液体培养基中, $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h。活化后以 2%(v/v)接种量传至第三代(同条件培养)后以体积比 5%(v/v)接种至平行生物反应器中, 每个 pH 试验组设置三个平行罐体, 使用质量分数为 25% 的 NaOH 溶液统一调节初始 pH 为 (6.50 ± 0.02) , 第一组使用质量分数为 25% 的 NaOH 溶液回调至 $\text{pH}(6.80\pm 0.02)$, 其余试验组由初始 pH (6.50 ± 0.02) 自然发酵至 $\text{pH}(6.30\pm 0.02)$ 、 $\text{pH}(5.80\pm 0.02)$ 、 $\text{pH}(5.30\pm 0.02)$ 、 $\text{pH}(4.80\pm 0.02)$ 、 $\text{pH}(4.30\pm 0.02)$ 时流加质量分数为 25% 的 NaOH 溶液恒控 pH, 设置发酵温度 $(37.0\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$, 充入氮气进行高密度发酵。

1.2.2 染料浓度优化

1.2.2.1 荧光染料选择 细胞增殖荧光探针(Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA-SE)可渗透细胞膜进入胞内, 广泛用于细胞增殖测定和细胞示踪^[20]。可通过被动运输方式穿透细胞膜进入胞内, 然后在酯酶的催化下转变为一种阳离子荧光素琥珀酰亚胺酯(Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), CFSE 与细胞内的蛋白质共价结合, 从而长期保留在胞内。CFDA-SE 染料可用于检测细胞增殖, 标记的细胞均一稳定, CFDA-SE 标记的荧光可随着细胞的分裂增殖而被子代细胞均匀继承, 其含量的衰减与细胞分裂次数成正比, 可检测分裂 8 次甚至更多次的细胞, 使用流式细胞仪进行检测分析^[21]。

1.2.2.2 荧光染料浓度选择 使用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解 CFDA-SE 探针粉末, 采用 0、100、200、300、900、1500、2100 $\mu\text{mol/L}$ 七个浓度梯度进行测试。对三代种子液进行标记, 以 2%(v/v)接种量接种到 4 代发酵液中, 在 $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 、初始 pH6.50、恒控 pH5.90 条件下厌氧动态培养, 使用 M-online 生化分析仪检测培养过程中乳酸产量, 采用流式细胞术检测培养过程中活菌数, 根据检测结果判断最佳染料使用终浓度。

1.2.2.3 荧光染料毒性测试 不同浓度染料标记菌体为试验组, 未染色标记菌体为对照组, 在动态培养过程中定时取样, 采用平板计数法检测培养过程中活菌数, 使用固体改良 MRS 培养基, $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 倒置厌氧培养 $(72\pm 0.5)\text{h}$, 每个样品设置三个平行, 活菌计数单位 CFU/mL。统计后对比不同组别活菌数差异, 评估染料对 B2798 菌体细胞毒性。

1.2.3 菌体分裂状态检测

1.2.3.1 流式细胞术检测菌体分裂状态 使用 CFDA-SE 染料标记菌体细胞, 收集并清洗菌体细胞后重悬至原体积, 然后将菌体浓度调整至 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL 上机。采用流式细胞术, 激发波长 $\text{Ex}=494\text{ nm}$, 发射波长 $\text{Em}=521\text{ nm}$, 进行检测, 收集 $(1\times 10^4)\text{events}$ 数据, 并拟合反卷积峰。

1.2.3.2 活菌数测定 发酵过程中定时取样, 采用平

板计数法进行活菌数测定, 将发酵液样本用无菌生理盐水进行梯度稀释, 直到稀释到合适浓度, 使用移液枪吸取 1.0 mL 的菌悬液并注入无菌培养皿中, 随后采用倾注法将适量固体改良 MRS 培养基倒入培养皿中, 摇匀凝固后置于 $(37.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 环境中倒置培养 $(72.0\pm 0.5)\text{h}$, 每个样品设置三个平行^[22], 活菌计数单位 CFU/mL。

1.2.4 基因表达验证 培养过程中, 根据生长曲线取各试验组中延滞期、对数初期、对数中期、对数末期、稳定期、衰亡期样品进行分裂相关基因表达量的绝对定量验证。

1.2.4.1 特异性引物设计 根据 B2798 全基因组数据, 对分裂关键基因 *ftsZ*^[23] 和 *sepF*^[24] 进行注释, 设计特异性引物, 如表 1 所示。

表 1 相关基因引物信息
Table 1 Related gene primer information

引物名称	引物序列(5'-3')	碱基数	产物长度(bp)
<i>ftsZ</i> -F	CTGCACCACGTCGTTTTCAC	20	178
<i>ftsZ</i> -R	CCTCGGCTATCTCGATCTCG	20	
<i>sepF</i> -F	CTTCTCGTGCTTACGGGACA	20	348
<i>sepF</i> -R	CTGAGGCAATCATGGGCATA	20	

1.2.4.2 标准品曲线建立 PCR 纯化产物的连接体系: 在 0.2 mL EP 管中依次加入 Solution I、ddH₂O、Control Insert、PUC57 Vector, 瞬时离心混匀, 在 PCR 仪中连接 2~3 h; 制备标准曲线样本: 对构建好的质粒进行测序鉴定, 确认无误后, 测定其在 260 nm 波长下的光密度值, 结果见表 2。

表 2 质粒 OD_{260 nm} 值
Table 2 OD_{260 nm} value of plasmid

质粒名称	长度(bp)	浓度(ng/ μL)	拷贝数(copies/ μL)
<i>sepF</i> -zl	348	1	2.98×10^9
<i>ftsZ</i> -zl	178	1	3.15×10^9

通过公式换算为拷贝数(copies/ μL)。

$$\text{拷贝数}\left(\frac{\text{copies}}{\mu\text{L}}\right)=\frac{C\times 10^{-9}\times N_A}{\text{分子量}\times 660}$$

式中, N_A 表示阿伏伽德罗常数, 6.023×10^{23} ; C 表示浓度(ng/ μL); 分子量表示载体的大小加目的基因的大小。质粒名称: PUC57, 质粒大小: 2710 bp。将构建好的各质粒进行梯度稀释, 使用标准品的 $10^1\sim 10^5$ 稀释液用于构建标准曲线。

得出 *ftsZ* 标准曲线为: $y=-3.5581x+37.0471(R^2=0.9995)$; *sepF* 标准曲线为: $y=-2.8611x+30.5872(R^2=0.9947)$ 。

1.2.4.3 样本准备 根据试剂盒说明书提取菌体中总 RNA, 而后将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 用于后续 qPCR 扩增。

1.2.4.4 qPCR 反应体系配制 在 2 mL EP 管中加入 10 μL 2 $\times$ UltraSYBR Mixture(2 $\times$)、0.25 μL Primer

F(5 $\mu\text{mol/L}$)、0.25 μL Primer R(5 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL cDNA, 使用无菌无酶双蒸水补至 20 μL 。

1.2.4.5 qPCR 程序 初始变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min; 循环阶段包括变性、退火和延伸, 变性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 s, 退火: 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 s, 延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 s; 荧光信号采集: 在每个扩增循环结束时, 在延伸阶段进行荧光信号的测定。反应循环次数为 35 次。

1.3 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行差异分析, 差异分析使用方差分析法 (Analysis of Variance, ANOVA), $P<0.05$ 时, 认为差异显著。数据汇总整理使用 Microsoft Excel 2021 软件。流式细胞术结果汇总处理以及反卷积峰拟合使用 FlowJo 10.9.0 软件。其他图形绘制使用 Origin 2022 软件, 图形排版使用 Adobe Illustrator 2021 软件。基因表达相关数据和图谱从定量软件中导出进行分析。

2 结果与分析

2.1 染料最佳浓度确定

CFDA-SE 染料标记活细胞, 可用于追踪分裂增殖的菌体细胞, 但高浓度荧光标记会对 B2798 菌体生理活性产生毒害作用^[25]。溶解 CFDA-SE 染料的溶剂 DMSO 常被作为稳定的染色载体使用, 但其具有弱氧化性, 对严格厌氧培养的短双歧杆菌分裂增殖有影响^[26]。因此需进行染料浓度优化, 采用在满足分裂检测分析要求的同时对菌体生理状态影响最小的染料浓度进行后续试验。

由图 1A 和表 3 可知, 不同染料浓度下菌体生长情况, 试验组与对照组菌体密度存在差异, 但生长趋势一致, 染料浓度 $\leq 900\ \mu\text{mol/L}$ 时, 菌体密度与最大比生长速率虽低于未标记试验组, 但无显著差异 ($P>0.05$)。对不同浓度染料染色的 B2798 在相同培养时期进行活菌计数, 全程保持避光。由表 3 可知, 刚接种菌种后, 各试验组与未标记组初始活菌数差异不显著 ($P>0.05$)。随培养时间增加至对数末期染料浓度 $\leq 900\ \mu\text{mol/mL}$ 试验组活菌数虽略低于未标记组 (1.01 ± 0.04) $\times 10^{10}$ CFU/mL, 但组间无显著差异 ($P>0.05$)。对数末期的其他两组试验组 1500 $\mu\text{mol/L}$ 活菌数 (8.72 ± 0.41) $\times 10^9$ CFU/mL 与 2100 $\mu\text{mol/L}$ 活菌数 (8.53 ± 0.42) $\times 10^9$ CFU/mL, 显著低于未标记组 ($P<0.05$)。

由图 1B 不同染料浓度下菌体产酸情况可知, 试验组与对照组产酸趋势一致, 随染料浓度增加, 菌体产酸能力受到抑制, 有研究表明较高浓度梯度的染料会对菌体产酸能力以及活菌数造成影响^[27]。当染料浓度 $\leq 900\ \mu\text{mol/L}$ 时, 各试验组至发酵终点乳酸累积量无显著差异 ($P>0.05$); 染料浓度 $>900\ \mu\text{mol/L}$ 时, 产酸速率及乳酸累积量都显著低于未标记组 ($P<0.05$)。

综上所述, 染料浓度 900 $\mu\text{mol/L}$ 时对菌体增殖代谢影响小, 对菌体培养过程中的抑制作用不明显。

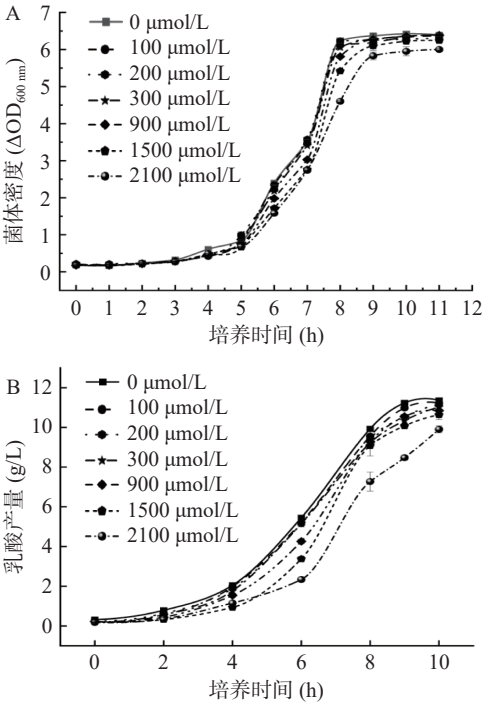


图 1 染料浓度对菌体密度和乳酸菌产量的影响

Fig.1 Effect of dye concentration on cell density and lactic acid bacteria yield

注: A: 不同浓度染料染色后菌体生长曲线; B: 不同浓度染料染色后乳酸生成量曲线。

表 3 不同浓度染料染色后活菌数与最大比生长速率 ($\bar{x}\pm S$, $n=3$)

染料浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	接种后活菌数 ($\times 10^8$ CFU/mL)	对数中期活菌数 ($\times 10^9$ CFU/mL)	对数末期活菌数 ($\times 10^9$ CFU/mL)	最大比生长速率 μ_{max} (h^{-1})
0	0.72 ± 0.04^a	3.06 ± 0.13^a	10.07 ± 0.42^a	0.96 ± 0.01^a
100	0.69 ± 0.03^a	2.69 ± 0.41^a	9.87 ± 0.59^a	0.95 ± 0.01^a
200	0.67 ± 0.05^a	2.55 ± 0.32^a	9.73 ± 0.59^a	0.95 ± 0.01^a
300	0.66 ± 0.03^a	2.67 ± 0.28^a	9.72 ± 0.42^a	0.95 ± 0.01^a
900	0.62 ± 0.02^a	2.57 ± 0.31^a	9.63 ± 0.49^a	0.94 ± 0.02^a
1500	0.75 ± 0.04^a	1.97 ± 0.17^b	8.72 ± 0.41^b	0.88 ± 0.01^b
2100	0.69 ± 0.04^a	1.71 ± 0.14^c	8.53 ± 0.42^b	0.82 ± 0.01^c

注: 同列不同小写字母表示不同组间的显著性差异 ($P<0.05$)。

因此, 本研究采用终浓度 900 $\mu\text{mol/L}$ 的 CFDA-SE 染料进行后续试验。

2.2 发酵体系 pH 对 B2798 可培养性与菌体分裂的影响

双歧杆菌高密度发酵过程中酸性产物的积累可诱导培养基酸化, 从而抑制菌体增殖^[28]。发酵过程中定时取样进行活菌计数, 如图 2 所示。随培养时间增加, B2798 可培养活菌数均呈现先增后减的趋势, 随发酵体系 pH 控制值降低, 活菌数呈先上升后下降的趋势。各试验组延滞期活菌数无显著差异 ($P>0.05$), 进入对数期时活菌数差异显著增大。至对数末期, 发酵体系 pH5.30 活菌数 (1.39 ± 0.04) $\times$

10^{10} CFU/mL, 显著高于其他试验组 ($P<0.05$)。由图 2 可知, 发酵体系 pH 每降 1 时, 活菌数差异较大。因此, 选择发酵体系 pH4.30、5.30、6.30 试验组进行后续试验。

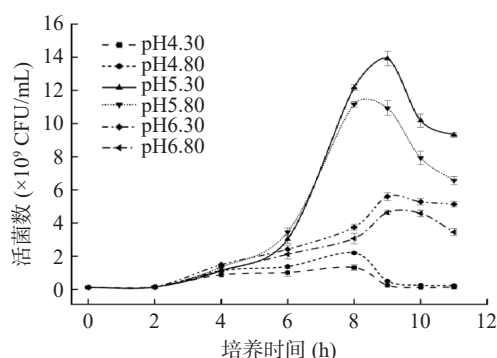


图 2 不同发酵体系 pH 条件下 B2798 可培养活菌数
Fig.2 Number of viable bacteria that can be cultured in B2798 under different pH conditions

高密度培养过程中不同发酵体系 pH 条件下菌体分裂存在差异, 将菌体样本上机检测后, 可得到荧光强度分布结果, 该结果反映不同发酵体系 pH 条件下菌体分裂分布情况。使用 FlowJo 软件进行拟合, 对荧光强度进行量化, 拟合每得到 1 个反卷积峰则代表 1 个世代群体, 即菌体细胞进行 1 次有效分裂。

如图 3 所示, 黑色曲线为下机未拟合荧光分布直方图, 拟合后使用绿色峰标识不同世代群体, 拟合曲线的准确性由拟合均方根误差值 (Root Mean Square Error, RMSE) 判定, 细胞增殖拟合中 RMSE ≤ 0.5 时, 视为拟合有效^[29]。

由图 3 可知, 三个 pH 条件下反卷积峰拟合 RMSE 值均小于 0.5, 拟合有效。培养后上机检测发现各试验组均发生荧光偏移, 说明菌体在进行分裂增殖。

结合拟合后反卷积峰对各个世代群体量化, “0 世代”群体数量的下调与其他群体数量上调, 说明菌体的分裂进程在持续进行, 各世代群体数量也在发生动态变化。由表 4 可知, 不同发酵体系 pH 条件下菌体分裂世代数存在差异, 当发酵体系 pH6.30 时,

菌体分裂世代数为 5 次; 发酵体系 pH5.30 时, 分裂世代数为 7 次; 发酵体系 pH4.30 时, 分裂世代数为 3 次。菌群集中分裂数随 pH 降低呈现先增后减的趋势, 由于分裂过程不同步, 发酵体系 pH5.30 时菌体分布更趋向于高世代群体, 表明在发酵体系 pH5.30 时菌体分裂进程更快。

表 4 不同发酵体系 pH 条件下 B2798 分裂数对比
Table 4 Comparison of cleavage number of B2798 under different pH conditions of fermentation system

pH	分裂数(次)	群体集中分布数	生长周期(h)	平均分裂周期(min)
6.30	5	2	8.00 ± 0.50^b	96.00 ± 3.00^b
5.30	7	4	9.00 ± 0.50^a	77.14 ± 2.14^c
4.30	3	3	6.50 ± 0.50^c	130.00 ± 5.00^a

注: 同列不同小写字母表示不同组别间的显著性差异 ($P<0.05$)。

2.3 分裂相关基因表达验证

如图 4 所示, 由琼脂糖凝胶电泳结果可知, 各分组条带呈清晰连续带状, 说明特异性引物特异性较好, 无非特异性扩增, 可进行后续定量试验。

如图 5 所示, *fisZ* 和 *sepF* 的扩增曲线图呈指数增长形式, 基线期平整, 指数期峰值波动明显, 拐点趋势相同, 平台期平整, 各平行试验间重复性好。 *fisZ* 和 *sepF* 的溶解曲线图表现为均一单峰, 溶解温度 85~90 °C 之间, 表明 PCR 产物特异性良好。说明 qPCR 实验结果良好, 可进行后续定量试验。

分别以模板起始拷贝数对数值为 x 轴, 以 *fisZ* 与 *sepF* 的 Ct 值为 y 轴建立标曲, 如图 6, 结果表明两条标准曲线线性相关性菌良好 ($R^2>0.99$), 满足 qPCR 要求。

fisZ 基因编码的蛋白质是一种 GTPase, 在细菌分裂中起至关重要的作用。FtsZ 蛋白能够在胞内形成一个动态结构, 称为“Z 环”, 其负责招募其他蛋白至分裂位点, 最终引起细胞壁膜收缩和分裂^[30]。 *sepF* 基因编码的蛋白与 FtsZ 蛋白相互作用, 调节“Z 环”的功能, SepF 蛋白可通过与 FtsZ 蛋白结合来调节其捆绑和分裂位点的定位, 这种相互作用对于 FtsZ 蛋白的正确功能和细菌细胞的正常分裂至关重要^[31]。

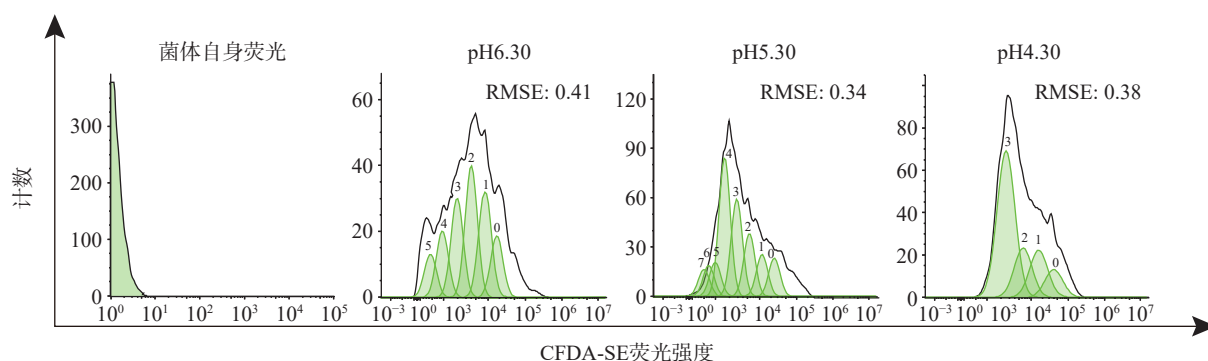


图 3 不同 pH 条件下 B2798 反卷积峰拟合图

Fig.3 Fitting diagram of B2798 deconvolution peak under different pH conditions of fermentation system

注: RMSE 表示拟合均方根误差值。

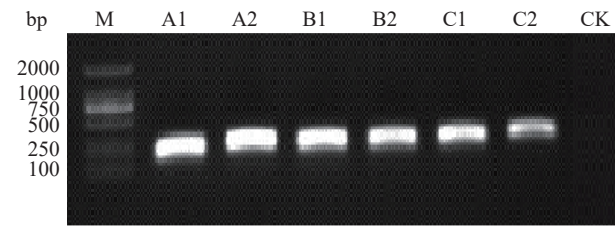


图 4 RNA 质检结果

Fig.4 Results of RNA quality test

注: M: DL2000 DNA Marker; A: pH6.30; B: pH5.30; C: pH4.30; CK: 阴性对照。

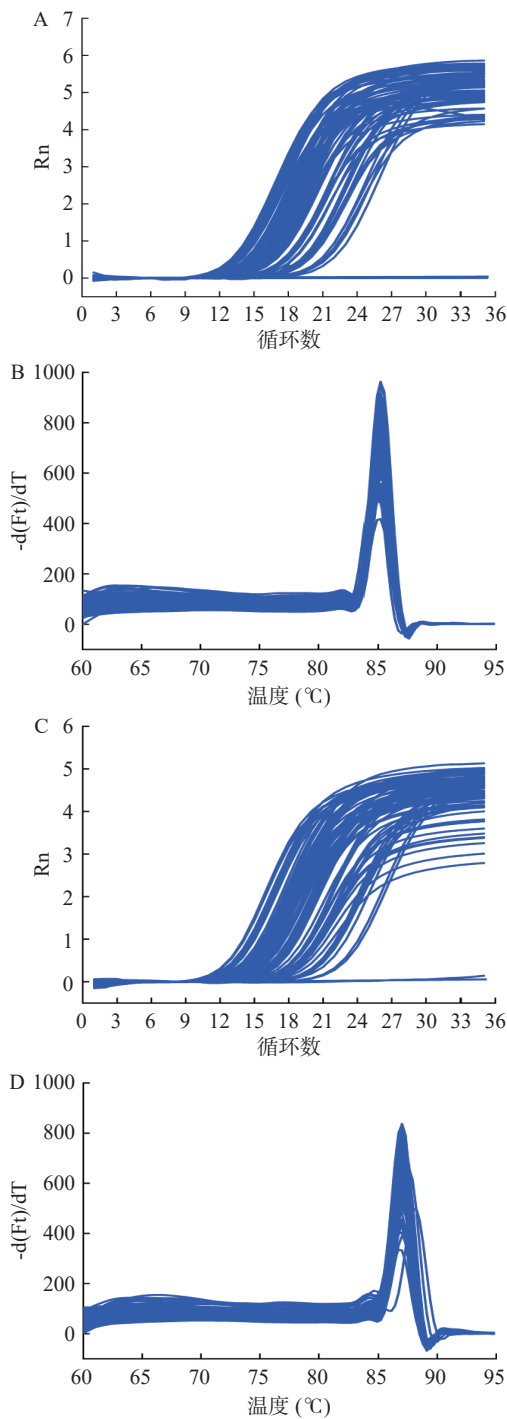


图 5 *ftsZ* 和 *sepF* 扩增曲线与溶解曲线

Fig.5 Amplification and melting curves of *ftsZ* and *sepF*

注: A: *ftsZ* 扩增曲线; B: *ftsZ* 溶解曲线; C: *sepF* 扩增曲线; D: *sepF* 溶解曲线。

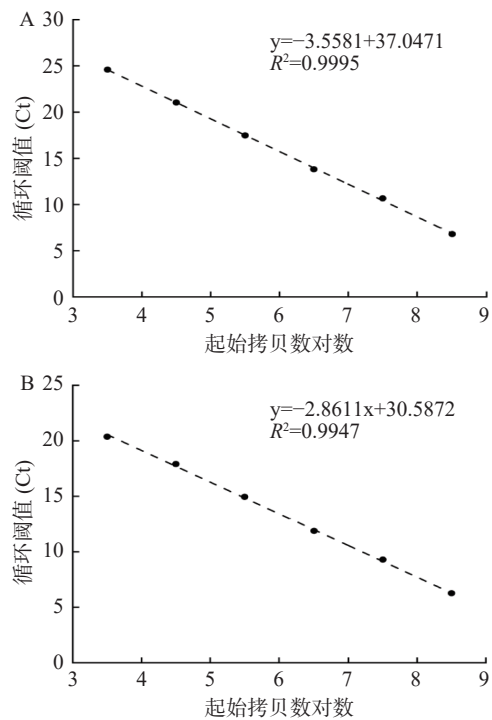


图 6 *ftsZ* 与 *sepF* 标准曲线

Fig.6 Standard curves of *ftsZ* and *sepF*

注: A: *ftsZ* 标准曲线; B: *sepF* 标准曲线。

由图 7 可知, 各试验组 *ftsZ* 与 *sepF* 基因表达量随培养时间增加, 均呈现对数初期至对数中期表达量上调, 对数中期表达量达到最高, 对数末期至衰亡期表达量下调的趋势, 这是由于对数中期时菌体大量分裂增殖, 调控菌体分裂相关基因表达量会随之显著上调, 至稳定期时, 菌体分裂增殖受抑制, 相关基因表达量则会下调^[32]。随发酵体系 pH 下降, *sepF* 与 *ftsZ* 基因表达量先降后升, 发酵体系 pH5.30 试验组对数中期 *ftsZ* 表达量为 $(4.71 \pm 0.97) \times 10^6$ copies。发酵体系 pH6.30 试验组对数中期 *ftsZ* 表达量 $(2.91 \pm 0.19) \times$

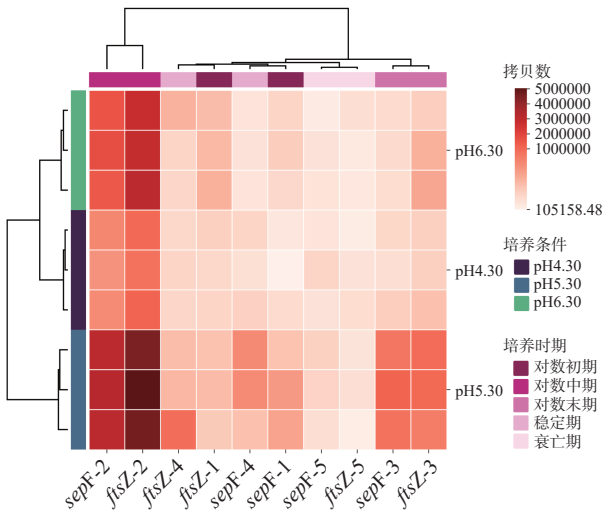


图 7 *ftsZ* 与 *sepF* 基因的绝对定量

Fig.7 Absolute quantification of *ftsZ* and *sepF* genes

注: *ftsZ*-1、2、3、4、5 与 *sepF*-1、2、3、4、5 表示各试验组对数初期、对数中期、对数末期、稳定期、衰亡期分裂相关基因表达量。

10^6 copies, 较发酵体系 pH5.30 试验组显著下调 38% ($P<0.05$); 发酵体系 pH4.30 试验组对数中期 *ftsZ* 表达量 (1.03 ± 0.29) $\times 10^6$ copies, 较发酵体系 pH5.30 试验组显著下调 78.13% ($P<0.05$)。发酵体系 pH5.30 试验组对数中期 *sepF* 表达量为 (3.91 ± 0.42) $\times 10^6$ copies。发酵体系 pH6.30 试验组对数中期 *sepF* 表达量 (1.69 ± 0.35) $\times 10^6$ copies, 较发酵体系 pH5.30 试验组显著下调 57% ($P<0.05$); 发酵体系 pH4.30 试验组对数中期 *sepF* 表达量 (0.77 ± 0.12) $\times 10^6$ copies, 较发酵体系 pH5.30 试验组显著下调 80.31% ($P<0.05$)。SepF 蛋白与 FtsZ 蛋白结合调控分裂位点, 且对于菌体细胞分裂中隔膜厚度的调节起至关重要的作用^[33]。*sepF* 基因在菌体分裂过程中与 *ftsZ* 进行互作, 当 *ftsZ* 基因表达量下调时, *sepF* 基因表达量也随之下调, 本研究结果与之一致。

结合 2.2 实验结果可知, *ftsZ* 与 *sepF* 表达量上调时, 活菌数呈显著上升趋势, 分裂数增加, 菌体平均分裂周期时间显著缩短 ($P<0.05$)。弱酸性环境可能促进 B2798 增殖生长, 但发酵体系 pH 低于某一阈值时, 也可能影响菌体细胞结构功能^[34]。有研究发现, 较低培养体系 pH 条件下 FtsZ 蛋白形成原丝的过程受阻, 导致其呈现出聚态, 从而抑制菌体的分裂^[35]。因此, 在发酵体系 pH4.30 时, 菌体分裂相关基因因表达受阻, 使得菌体分裂受到抑制, 导致该试验组活菌数显著低于发酵体系 pH5.30 与发酵体系 pH6.30 试验组 ($P<0.05$)。

3 结论

本研究采用荧光示踪法(CFDA-SE 染料标记菌体细胞)和流式细胞术对该菌株分裂周期进行检测。结果表明, 发酵体系 pH5.30 时, 菌体分裂数可达 7 次, 活菌数较发酵体系 pH6.30 组显著增加 248.11%, 且平均分裂周期时间缩短, *ftsZ* 与 *sepF* 表达量显著上调 ($P<0.05$)。然而, 当发酵体系 pH 降至 4.30 时, 菌体分裂数下降至 3 次, 活菌数较发酵体系 pH6.30 组显著降低 76.47%, 平均分裂周期时间增加, *ftsZ* 与 *sepF* 表达量显著下调 ($P<0.05$)。上述结果表明, 短双歧杆菌 B2798 分裂进程受发酵体系 pH 的影响显著。较低的发酵体系 pH 能促进菌体细胞分裂, 但当 pH 低于某一阈值时, 分裂进程受到抑制, 表现为分裂相关基因表达量下降、活菌数减少以及分裂周期延长等现象, 最终影响菌体细胞的分裂增殖。

本研究初步揭示了发酵体系 pH 对短双歧杆菌 B2798 分裂周期的影响机制, 为双歧杆菌生理状态的调控提供了研究思路, 也为双歧杆菌工业化生产中工艺优化提供了参考。然而, 实际发酵生产中, 菌体分裂受诸多复杂因素共同作用, 仍需进一步探讨。未来的研究可通过对优化培养条件, 量化分裂过程中的动力学参数以及优化培养基成分等方式, 调控菌体分裂, 提升菌体活性与抗逆性, 实现高活性、高活菌数双歧杆菌制剂的开发。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] KU S, HAQUE M A, JANG M J, et al. The role of *Bifidobacterium* in longevity and the future of probiotics[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2024, 33(9): 2097–2110.
- [2] SUN S, ZHANG Q, LI D, et al. Heat-killed *Bifidobacterium longum* BBMN68 and inulin protect against high-fat diet-induced obesity by modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 11: 1406070.
- [3] PIERRO F D, ZERBINATI N, CAZZANIGA M, et al. The anti-constipation effect of *Bifidobacterium longum* W11 is likely due to a key genetic factor governing arabinan utilization[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(8): 1626.
- [4] WANG H C, HE Y, DANG D T, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CCFM1274 relieved allergic asthma symptoms by modifying intestinal tryptophan metabolism in mice[J]. *Food & function*, 2024, 15(17): 8810–8822.
- [5] LEE J, JO J, WAN J, et al. *In vitro* evaluation of probiotic properties and anti-pathogenic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as potential probiotics[J]. *Foods*, 2024, 13(14): 2301.
- [6] 张明磊, 何亚文. 细菌分裂调控 Min 系统的功能、机制及应用研究进展[J]. *微生物前沿*, 2024, 13(1): 35–48. [ZHANG Minglei, HE Yawen. Research progress on the function, mechanism, and application of the bacterial division-regulating Min system[J]. *Frontiers of Microbiology*, 2024, 13(1): 35–48.]
- [7] WANG J D, LEVIN P A. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2009, 7(11): 822–827.
- [8] JONATHAN I, DEVANTHI P V P, ARHAM A G A, et al. Effects of temperature shock on viability and stress-related gene expression in, a probiotic lactic acid bacteria[J]. *IOP Conference Series; Earth and Environmental Science*, 2023, 1255(1): 012068.
- [9] NGUYEN P T, NGUYEN H T. Environmental stress for improving the functionality of lactic acid bacteria in malolactic fermentation[J]. *The Microbe*, 2024, 4: 100138.
- [10] WANG Z, ZHONG H, LI J, et al. Statistical optimization of cassava starch medium for D-lactic acid production using *Leuconostoc mesenteroides* ZL01[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2024, 204: 109247.
- [11] DERUNET S A, SELIMZYANOVA A I, RYKOV S V, et al. Strategies to enhance stress tolerance in lactic acid bacteria across diverse stress conditions[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2024, 40(4): 126.
- [12] WOODS K E, AKHTER S, RODRIGUEZ B, et al. Characterization of natural product inhibitors of quorum sensing reveals competitive inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR by orthovanillin[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024: e0068124.
- [13] FU Y, ZHOU W, WANG Z, et al. Detection method of microbial colony of common morel (*Morchella vulgaris* (Pers.) Boud.) based on CO₂ and TDLAS technology[J]. *Infrared Physics and Technology*, 2024, 141: 105461.
- [14] ZHANG Y, GAO Z, HE L. Integration of surface swab with optical microscopy for detection and quantification of bacterial cells from stainless-steel surfaces[J]. *Letters in Applied Microbiology*,

2024.

- [15] SOMERTON B T, MORGAN B L. Comparison of plate counting with flow cytometry, using four different fluorescent dye techniques, for the enumeration of *Bacillus cereus* in milk[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2024, 223: 106978.
- [16] LIU X, ZHOU J H, YAN R P, et al. An optimized PDMS microfluidic device for ultra-fast and high-throughput imaging flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(16): 3571-3580.
- [17] PAOLO B, ALESSANDRA F, LORENZO M. Application of flow cytometry for rapid bacterial enumeration and cells physiological state detection to predict acidification capacity of natural whey starters[J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e19146.
- [18] Development of a real-time quantitative PCR based on a TaqMan-MGB probe for the rapid detection of *T. haneyi*[J]. *Equine Veterinary Journal*, 2024, 56(S60): 49.
- [19] LAMEIRA I, PINTO A S, LIMA Â, et al. Optimized bacterial absolute quantification method by qPCR using an exogenous bacterial culture as a normalization strategy in triple-species BV-like biofilms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2024, 219: 106895.
- [20] POZZOBON V, LAGIRARDE J, ARNOUDTS C, et al. Microalgal cell division tracking using CFSE[J]. *Algal Research*, 2024, 80: 103501.
- [21] CHEN S, GONG P, ZHANG J, et al. Quantitative analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell division and death using fluorescent dye tracking[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2020, 169: 105832.
- [22] AFSHARI A, HASHEMI M, ZAMANPOUR S, et al. Counting and identifying probiotics: From a systematic comparison of three common methods to proposing an appropriate method for identification[J]. *Current Nutrition & Food Science*, 2024, 20(2): 175-190.
- [23] KNAPP B D, SHI H, HUANG K C. Complex state transitions of the bacterial cell division protein FtsZ[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2024: mbcE23110446.
- [24] VALLADARES A, PICOSI S, CORRALES-GUERRERO L, et al. The role of *SepF* in cell division and diazotrophic growth in the multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *Microbiological Research*, 2023, 277: 127489.
- [25] HANSEN G, JOHANSEN C L, HONORÉ A H, et al. Fluorescent labelling negatively affects the physiology of *Lactococcus lactis*[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 130-138.
- [26] ŚWIECŁO A, JANUŚ E, KRZEPILKO A, et al. The effect of DMSO on *Saccharomyces cerevisiae* yeast with different energy metabolism and antioxidant status[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 21974.
- [27] 杨展, 姚国强, 刘凯龙, 等. 培养温度对长双歧杆菌婴儿亚种 B8762 分裂周期的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(2): 52-58. [YANG Zhan, YAO Guoqiang, LIU Kailong. Effect of culture temperature on division cycle of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* B8762[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2025, 51(2): 52-58.]
- [28] ZHANG Z, YIN B, LIU F, et al. Effect of the initial pH of the culture medium on the nutrient consumption pattern of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and the improvement of acid resistance by purine and pyrimidine compounds[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2024.
- [29] LI M Y, WANG H Z, YANG Z W et al. DeepTM: A deep learning algorithm for prediction of melting temperature of thermophilic proteins directly from sequences[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 5544-5560.
- [30] CUI X H, WEI Y C, LI X G, et al. N-terminus GTPase domain of the cytoskeleton protein *FtsZ* plays a critical role in its adaptation to high hydrostatic pressure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1441398.
- [31] DEY S, ZHOU H X. Membrane tethering of *SepF*, a membrane anchor for the mycobacterium tuberculosis z-ring[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2022, 434(21): 167817.
- [32] 郭慧颖. 保加利亚乳杆菌盐胁迫响应基因对菌体分裂增殖的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018. [WU Huiying. Effect of salt stress response genes on cell division and proliferation in *Lactobacillus bulgaricus*[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018.]
- [33] LIU W, ZHANG C, ZHANG H, et al. Molecular basis for curvature formation in *SepF* polymerization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2024, 121(9): e2316922121.
- [34] 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.
- [35] SANTRA M K, PANDA D. Acid-induced loss of functional properties of bacterial cell division protein *FtsZ*: evidence for an alternative conformation at acidic pH[J]. *Proteins*, 2007, 67(1): 177-188.