

产酱香地衣芽孢杆菌 CGMCC 3963 耐受特征及基于 转录组学的耐受机制分析

彭素琴 吴群 徐岩*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 酿酒科学与酶技术中心 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】地衣芽孢杆菌是茅台酒高温大曲中能产酱香风味物质的主要微生物,对酱香型白酒的酿造具有重要价值。而酱香型白酒的酿造环境具有高渗、高温、酸性、高乙醇胁迫等特征,研究产酱香地衣芽孢杆菌在环境胁迫下的耐受特征有利于认识酱香型白酒的酿造特征。

【方法】以一株产酱香地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* CGMCC 3963)为研究对象,测定其耐渗、耐酸、耐乙醇特征,并从比较转录组学角度系统分析 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐受机制。【结果】*B. licheniformis* CGMCC 3963 在 15% 的 KCl、15% 的 NaCl、pH 4.0 的酸性环境或 6% 乙醇浓度下的生长情况明显优于不产酱香的模式菌株 *B. licheniformis* ATCC 14580。转录组比较分析显示 *B. licheniformis* CGMCC 3963 中一系列与耐受相关的基因表达有差异。【结论】来源于酿造环境的 *B. licheniformis* CGMCC 3963 耐受能力强于 *B. licheniformis* ATCC 14580, 一系列与耐受相关的基因表达有差异。编码脯氨酸和甜菜碱等溶质转运、离子外排、钾离子通道蛋白等基因的差异表达,使得高渗胁迫下 *B. licheniformis* CGMCC 3963 生长明显优于 *B. licheniformis* ATCC 14580; 编码 II 类热休克蛋白、乙醇脱氢酶、氧化应激、pH 动态平衡等相关基因的差异表达,在提高菌株耐受酸性环境能力上起了重要作用; II 类及 III 类热休克基因的高表达对 *B. licheniformis* CGMCC 3963 耐乙醇能力起了重要作用。

关键词: 酱香, 地衣芽孢杆菌, 耐受机制, 转录组学

Tolerance characteristics of *Bacillus licheniformis* CGMCC 3963 and tolerance mechanisms based on transcriptome analysis

PENG Su-Qin WU Qun XU Yan*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] *Bacillus licheniformis* is the predominant microbe producing Maotai-flavor in high-temperature Daqu which plays important roles in Maotai-flavor liquor making. Learning the mechanisms of tolerance to this liquor making environment with hypertonic, acid and ethanol stress

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301, 2013AA102108); 国家自然科学基金项目(31000806, 31371822, 31271921); 2011 协同创新计划

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; Fax: 86-510-85864112; ✉: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2014-03-04; 接受日期: 2014-04-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-30

would provide an insight into characteristics of this liquor making. **[Methods]** The resistance to hypertonic, acid and ethanol of *B. licheniformis* CGMCC 3963 which produces Maotai-flavor was measured. The tolerance mechanisms were analyzed on comparative transcriptomics level. **[Results]** The growth of *B. licheniformis* CGMCC 3963 in 15% KCl, 15% NaCl, pH 4.0 or 6% ethanol concentration was significantly better than that of *B. licheniformis* ATCC 14580. Comparative transcriptome analysis revealed a series of genes differently expressed in *B. licheniformis* CGMCC 3963. **[Conclusion]** Compared with *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. licheniformis* CGMCC 3963 possessed a stronger tolerance ability and differently expressed a series of genes related to stress tolerance. Differently expressed genes encoding solute transport, potassium channel protein played important roles in improving the tolerance to osmotic stress; genes related to class II heat shock proteins, dehydrogenase, oxidative stress and pH homeostasis made significant contributions to the resistance to acid of *B. licheniformis* CGMCC 3963; class II and class III heat shock genes were important to ethanol tolerance ability of *B. licheniformis* CGMCC 3963.

Keywords: Maotai-flavor, *Bacillus licheniformis*, Tolerance mechanism, Transcriptomics

中国酱香型白酒“三高两长”(高温制曲、高温堆积发酵、高温馏酒、生产周期长、贮存时间长)的独特工艺造就了酱香型白酒独特的风味特征。关于茅台酒高温大曲微生物的研究表明能产酱香风味的微生物大多是芽孢杆菌属^[1]。产酱香功能细菌的耐受特征是功能细菌在酿造环境中生存并发挥产酱香功能的重要前提。而酱香型白酒的酿造环境是一个温度最高可达 60 °C 以上^[2]、高渗、酸度可达 2 以上^[3]、乙醇可达 10% (相当于水溶液中 15%)^[4] 以上的固态发酵环境, 因此, 对产酱香 *Bacillus licheniformis* 在环境胁迫下的耐受特征及机制的认识不仅有利于丰富地衣芽孢杆菌生理特征机制, 而且有利于认识酱香型白酒的酿造特征。

目前, 对 *B. licheniformis* 胁迫应激反应的研究主要集中在葡萄糖、氮源、磷酸盐的饥饿反应, 以及过氧化应激、细胞膜应激反应等方面^[5-8]。同时对 *B. licheniformis* 的热应激、高渗应激、乙醇应激^[9-11] 机制也有了一定的认识。目前报道的革兰氏阳性菌酸胁迫应激保护机制可分为 4 种, 第一种为 SigB 因子调控的一般应激响应, 这一应激反应不仅与酸胁迫有关, 而且在其他环境压力下也具有保护作用^[2]。第二种为代谢重排, 细胞通过调节自身的代谢途径来适应外界胁迫环境, 主要由乙偶姻生产途径、丙酮酸代谢途径、氨基酸代谢途径。第三种保护机制为细胞通过消耗质子或者酸性物质、产

生碱性物质的方式来维持细胞内部的 pH 动态平衡。第四种是通过诱导刺激氧化应激反应来达到保护细胞的效果, 主要包括一些编码硫氧还蛋白、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等的基因^[12]。而酱香型白酒酿造环境是一个高温、高渗、酸性、乙醇多重胁迫的环境, 在这个过程中产酱香芽孢杆菌是优势菌群, 缺乏系统地从基因组水平上对微生物耐受功能机制的认识, 对微生物酿造规律及影响因素不清楚。因此深入认识产酱香功能细菌在白酒酿造多重胁迫环境下的耐受特征及机制对于认识酱香型白酒的酿造特征具有重要意义。

本文以第一株从中国白酒酿造过程中筛选得到的、已完成全基因组测序的产酱香 *Bacillus licheniformis* CGMCC 3963^[13] 为研究对象, 研究了该菌的耐高渗、耐酸、耐乙醇特征, 并利用比较转录组学技术首次系统地分析了 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐受机制, 从基因组学角度上分析了该产酱香功能菌能够从长期环境筛选和进化过程中保留下来的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *B. licheniformis* ATCC 14580 购于上海市工业微生物研究所。本研究室筛选的产酱香 *B. licheniformis* BL-L1, 保藏于中国普通微生物菌

种保藏管理中心, 编号为 CGMCC 3963。

1.1.2 培养基: 斜面保藏培养基(g/L): 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。耐受实验培养基: LB 培养基中添加相应质量浓度的 KCl、NaCl、乙醇, 或者以乙酸:乳酸=1:1 (体积比)调节 pH 至相应值。

1.2 方法

1.2.1 产酱香 *B. licheniformis* 耐受特征研究: 分别将 2 株 *B. licheniformis* 接种至灭菌的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 16 h 作为种子液, 稀释至相同浓度后, 分别接种至新灭菌的耐受实验培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养, 不同时间取样, 用分光光度计测定其在波长 600 nm 下的 OD 值, 并绘制生长曲线。

1.2.2 产酱香 *B. licheniformis* 胁迫条件下基因表达差异的研究: 将 *B. licheniformis* CGMCC 3963 和 *B. licheniformis* ATCC 14580 接种至 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 16 h 作为种子液, 接种至高粱浸出汁培养基中, 培养基配方参见文献[14]。55 °C 培养至对数中期后 8 000 r/min 离心收集菌体, 用无菌水洗涤 1 次, 在液氮中速冻 10 min 以上, -80 °C 保存备用。采用 *B. licheniformis* 基因芯片 (NimbleGen, Reykjavik, Iceland) 测定基因表达的差异, RNA 抽提、芯片杂交、扫描以及数据分析参见文献[9]。所有芯片的表达数据均为 *B. licheniformis* CGMCC 3963 与 *B. licheniformis* ATCC 14580 两株菌培养的比值, 如果比值 > 2.0 或 < 0.5, 并且经 SAM 软件(<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM/>)进行 One class 方法检验 $P < 0.05$ 的基因认为是差异表达基因。对于 qPCR 样品, 使用 TaKaRa 公司的试剂, 将抽提的 RNA 用随机引物反转录成 cDNA 后使用基因特异性引物, SYBR 荧光染料法检测实际表达情况。16S rRNA 为内参基因, 内参基因引物如下: 5'-GTAACCTGCCTGTAAGACTG-3' (上游引物) 和 5'-TGTCTCAGTCC

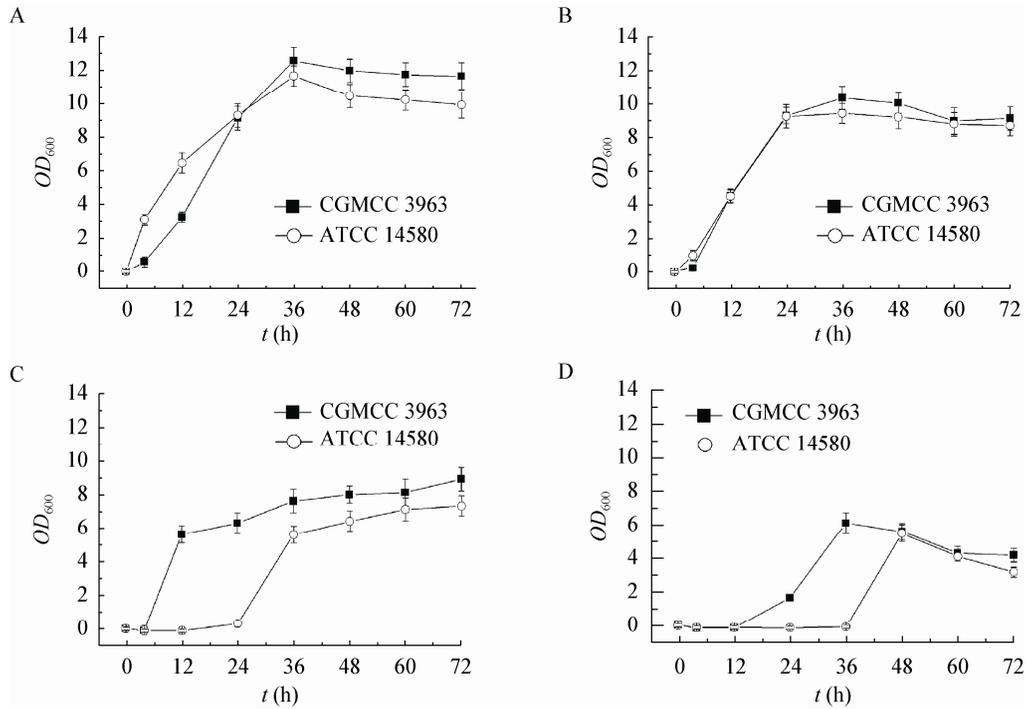
CAGTGTG-3' (下游引物)。基因特异性引物如下, *yugO*: 5'-AGGCAAGGTGAACACTACAGAGG-3' (上游引物) 和 5'-TTGCAGTGTGGCATCATC-3' (下游引物); *glcP*: 5'-AGCCTGTACACCGTACATC-3' (上游引物) 和 5'-CATCGTTGACTTCATCGG-3' (下游引物); *dps*: 5'-TACACAGAAGCGGCAGAG-3' (上游引物) 和 5'-CATCGTTGACTTCATCGG-3' (下游引物)。

2 结果与分析

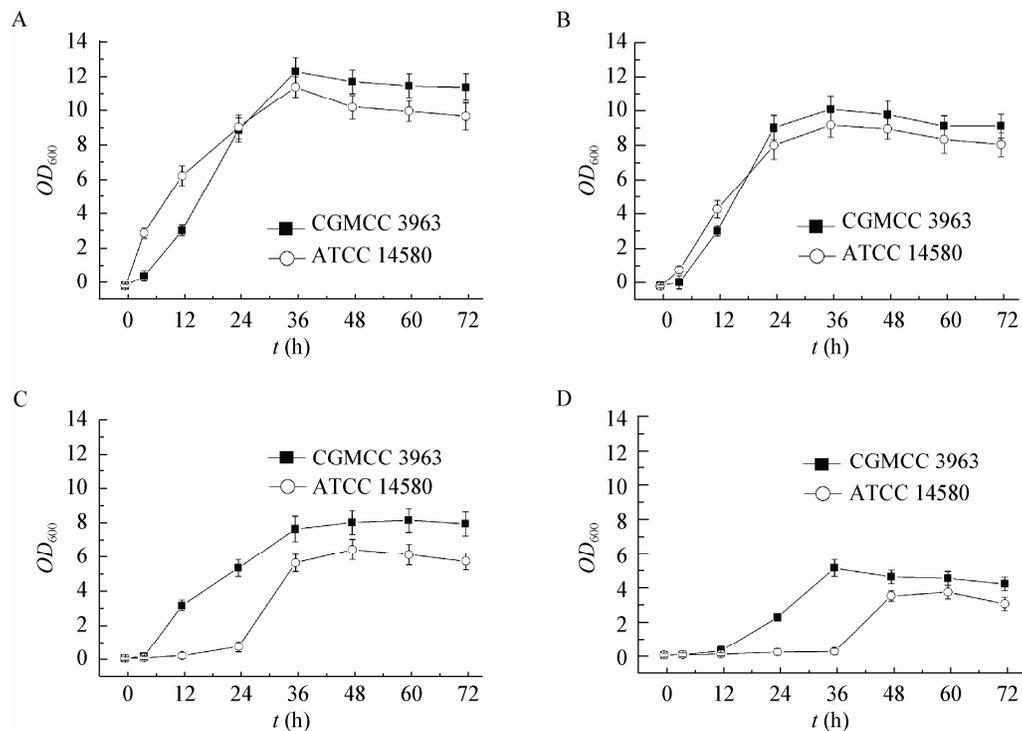
2.1 产酱香 *B. licheniformis* 耐受特征的研究

2.1.1 产酱香 *B. licheniformis* 耐高渗能力的研究: 以 *B. licheniformis* ATCC 14580 为对照, 研究了产酱香 *B. licheniformis* CGMCC 3963 在不同 KCl、不同 NaCl 浓度下的生长情况。如图 1、2 所示, 同一菌株在相同 KCl、NaCl 浓度下生长趋势基本一致。尽管两株菌在 0、5% 的低盐浓度下生长能力差不多, 但是在 10%、15% 的高盐浓度下 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的延滞期短, 能够更快地适应环境进行生长。这表明来自于白酒酿造环境中的 *B. licheniformis* CGMCC 3963 具有更高的耐渗能力, 在高渗酿造过程中具有很强的适应能力。

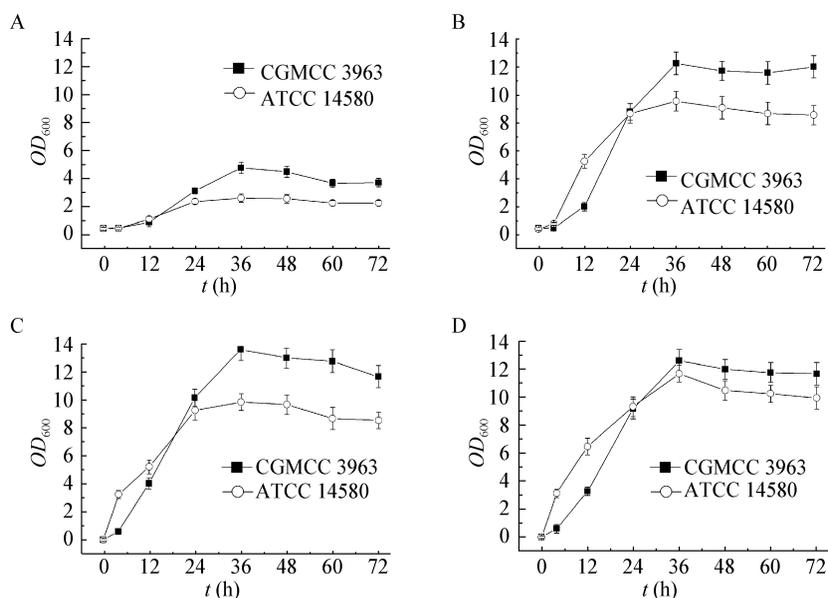
2.1.2 产酱香 *B. licheniformis* 耐酸性的研究: 以 *B. licheniformis* ATCC 14580 为对照, 研究了产酱香 *B. licheniformis* CGMCC 3963 在酸性和中性环境下的生长情况。如图 3 所示, 无论在中性还是酸性条件下, *B. licheniformis* CGMCC 3963 生长优于 *B. licheniformis* ATCC 14580。尽管在发酵初期, *B. licheniformis* ATCC 14580 生长较快, 但是在 24 h 以内 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的生物量将达到或者超过 ATCC 14580。而且可以看到 *B. licheniformis* CGMCC 3963 在 pH 6.0 下的最大生物量要比其在 pH 7.0 下的高, 说明 *B. licheniformis* CGMCC 3963 嗜微酸性环境。总之, 从白酒酿造环境中筛选得到的 *B. licheniformis* CGMCC 3963 菌株在酸性环境下的生长潜力要大于 *B. licheniformis* ATCC 14580 菌株, 更能耐受酸性环境。

图1 *B. licheniformis* 耐受 KCl 能力的比较Figure 1 Tolerant performance of *B. licheniformis* to KCl

Note: A: Without KCl; B: 5% KCl; C: 10% KCl; D: 15% KCl.

图2 *B. licheniformis* 耐受 NaCl 能力的比较Figure 2 Tolerant performance of *B. licheniformis* to NaCl

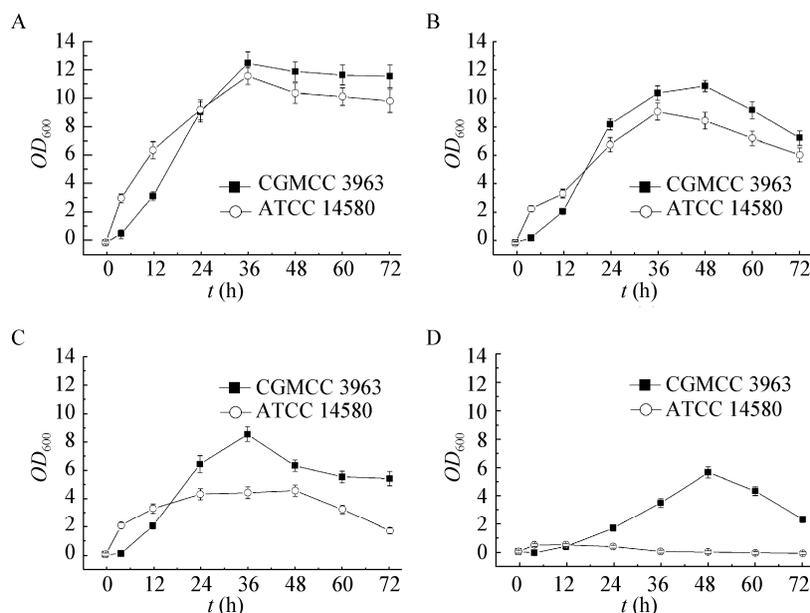
Note: A: Without NaCl; B: 5% NaCl; C: 10% NaCl; D: 15% NaCl.

图3 *B. licheniformis* 耐酸能力的比较Figure 3 Tolerant performance of *B. licheniformis* to acid

Note: A: pH 4.0; B: pH 5.0; C: pH 6.0; D: pH 7.0.

2.1.3 产酱香 *B. licheniformis* 耐乙醇能力的研究:
以 *B. licheniformis* ATCC 14580 为对照, 研究了产酱香 *B. licheniformis* CGMCC 3963 在不同乙醇浓度下的生长情况。如图 4 所示, 可以看到在 0、2%乙醇浓度下, *B. licheniformis* CGMCC 3963 的生长潜力仅稍大于 *B. licheniformis* ATCC 14580; 而 4%乙醇浓度

下, 其生长优势明显; 6%乙醇浓度下 *B. licheniformis* ATCC14580 不生长, 而 *B. licheniformis* CGMCC 3963 虽生长受限但是最高生物量能达到无乙醇浓度下的 50%。这表明来自于白酒酿造环境的产酱香 *B. licheniformis* CGMCC 3963 具有更高的耐受乙醇能力, 其在白酒酿造过程中具有很强的适应能力。

图4 *B. licheniformis* 耐乙醇能力的比较Figure 4 Tolerant performance of *B. licheniformis* to ethanol

Note: A: Without ethanol; B: 2% Ethanol; C: 4% Ethanol; D: 6% Ethanol.

2.2 产酱香 *B. licheniformis* 耐受特征的分子机制

分析菌株的耐受机制对于其产酱香机制的剖析具有重要的价值。高温大曲的使用是中国酱香型白酒酿造的特征之一,高温是酱香风味产生的一个关键因素^[9],因此比较了 *B. licheniformis* CGMCC 3963 与 *B. licheniformis* ATCC 14580 在酱香型白酒酿造环境(55 °C 高温)条件下的转录表达情况,从基因组水平上分析了来源于多重胁迫条件下 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐受机制。已有研究表明,细菌在环境胁迫刺激下会诱导基因产生更多或更少的一系列蛋白来适应外界环境。芽孢杆菌的应激反应包括特异性应激反应和一般应激反应^[15]。在革兰氏阳性菌中,一般应激反应由 SigB 因子控制,在多种环境胁迫下具有保护作用^[2]。

基因芯片一共比较了 4 180 个基因的表达情况,结果显示,*B. licheniformis* CGMCC 3963 与 *B. licheniformis* ATCC 14580 相比,有 1 842 个基因为差异表达基因,这 1 842 个基因中有 825 个基因表达上调(其中上调到 10 倍以上的基因多达 336 个),1 017 个基因表达下调(下调到 0.2 及以下的基因多达 263 个)。深入研究发现,表达上调的基因中有 308 个基因是功能未知的 Hypothetical protein,表达下调的基因中有 173 个基因为功能未知的 Hypothetical protein,这些 Hypothetical protein 可能为菌株耐受胁迫反应发挥了重要作用。此外,一系列与耐高渗、耐酸、耐乙醇相关的基因表达发生了变化。

2.2.1 基于转录组数据的耐高渗分子机制: Bremer^[16]发现芽孢杆菌在高渗条件下的存活和生

长依靠高度整合细胞的一般应激调控和特异性渗透胁迫适应反应。Hahne 等^[15]研究发现基因表达诱导与大的调控子 SigB、SigW、SigM 以及 SigX 有关,相容性溶质和离子的转运体,在盐压力适应中发挥了明显的作用。SigW、SigM 和 SigX 是 3 个大的细胞质外功能(Extracytoplasmic function, ECF)调控子,特异性的调控细胞膜应激反应,受高渗胁迫的影响,调控的操纵子分别有 34、7 和 15 个^[15,17]。

转录组比较分析结果显示一系列与钠离子、钾离子转运相关的基因表达水平在 *B. licheniformis* CGMCC 3963 和 *B. licheniformis* ATCC 14580 之间具有明显差异(表 1)。据文献报道,芽孢杆菌转移到渗透压升高的环境中,第一阶段适应反应是迅速从周围环境中大量吸收 K⁺,第二阶段是相容性溶质的积累及胞内 K⁺浓度的再次降低。在枯草芽孢杆菌菌株长时间适应高盐环境中,假设的 K⁺通道 *yugO* 和 K⁺外排 *yhaU* 表达显著上调^[15]。基因芯片结果显示,*B. licheniformis* CGMCC 3963 中与 K⁺、Na⁺转运和外排相关的 *yugO*、*ywcA*、*yqeW* 基因以及编码 BLi01229 的基因等表达显著上调,同时与 K⁺、Na⁺吸收相关的 *ktrB2*、*ktrD* 基因表达下降(表 1),以严格控制胞内 K⁺、Na⁺浓度。*yugO* 表达的显著变化(提高到 9.9 倍),说明 K⁺转运对菌株耐受高渗发挥了重要作用。为了验证基因芯片结果的可靠性,用 qPCR 方法分析了这个基因的 mRNA 水平,结果显示 *yugO* 基因表达水平为 8.9, qPCR 分析结果与基因芯片结果基本一致。

表 1 与钾离子、钠离子转运相关基因
Table 1 Transport-related genes of potassium or sodium

基因号 Gene ID	基因名 Gene symbol	基因功能 Gene function	倍数变化 Fold change
3099416	<i>yugO</i>	Cation channel protein YugO	9.9
3100662	<i>ywcA</i>	Na ⁺ /solute symporter YwcA	2.7
3097768	<i>yqeW</i>	Sodium/phosphate symporter YqeW	8.7
3101220	BLi01229	Major facilitator superfamily protein	19.2
3101577	<i>ktrB2</i>	Potassium uptake protein KtrB	0.3
3100122	<i>ktrD</i>	Low affinity potassium transporter integral membrane subunit KtrD	0.3

除了与 K^+ 、 Na^+ 转运相关的基因外, 转录组结果显示, 与相容性溶质合成及转运相关的基因表达也提高了(表 2)。从前体谷氨酸合成渗透压保护剂脯氨酸所必需的遗传因子包括编码 γ -谷氨酰激酶、 γ -谷氨酰磷酸还原酶和吡咯啉-5-羧酸还原酶的基因^[18], 这几个基因表达上调。文献报道芽孢杆菌在高渗条件下的特异性应激反应包括特别是脯氨酸、甘氨酸甜菜碱、四氢嘧啶在内的渗透压保护剂的合成和吸收^[16]。此外, 与甜菜碱、脯氨酸转运相关的一系列基因(*ycgO*、*ycgH* 等)表达水平提高很大。

此外, 大的调控子 SigB、SigW、SigM、SigX 以及受 SigW、SigM、SigX 直接调控的绝大部分基因的表达没有明显差异, 仅部分受 SigB 直接调

控的基因表达变化显著(表 3)。而由表 1、2 可以看出, 白酒酿造环境对 *B. licheniformis* CGMCC 3963 中与 K^+ 、 Na^+ 外排以及脯氨酸合成及转运相关基因的诱导能力比 *B. licheniformis* ATCC 14580 强。这说明, 特异性应激反应相关基因的差异表达是来源于白酒酿造环境的 *B. licheniformis* CGMCC 3963 表现出更强的耐高渗能力的关键原因。

2.2.2 基于转录组数据的耐酸分子机制: 革兰氏阳性菌在酸胁迫下的保护机制包括一般应激响应、代谢重组、pH 动态平衡和诱导氧化应激反应^[12]。转录组比较分析显示 *B. licheniformis* CGMCC 3963 相对于 *B. licheniformis* ATCC 14580 有一系列代表性基因表达发生变化(表 4)。典型的代谢重排包括

表 2 脯氨酸生物合成及转运相关基因
Table 2 Proline biosynthesis and transport related genes

基因号 Gene ID	基因名 Gene symbol	基因功能 Gene function	倍数变化 Fold change
Genes related to proline biosynthesis			
3100671	<i>proB2</i>	Gamma-glutamyl kinase	2.3
3097972	<i>proA</i>	Gamma-glutamyl phosphate reductase	2.3
3099789	<i>proH</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase	2.3
Genes related to proline transport			
3100102	<i>ycgO</i>	Similar to proline permease	13.2
3099208	<i>ycgH</i>	Similar to amino acid transporter	9.8
3099653	<i>rocE</i>	Amino acid permease	7.7
3101521	<i>yhcG</i>	Putative glycine betaine/L-proline transport	6.9

表 3 乙醇耐受相关基因
Table 3 Genes associated with resistance to ethanol

基因号 Gene ID	基因名 Gene symbol	基因功能 Gene function	倍数变化 Fold change
Class II heat shock genes (sigB-dependent general stress response genes)			
3099065	<i>dps</i>	Stress- and starvation-induced gene controlled by sigB	4.8
3097623	<i>ydaG</i>	General stress protein	5.1
3099367	<i>yraA</i>	Similar to general stress protein	2.9
3099206	<i>yabT</i>	Serine/threonine-protein kinase	10.2
3101554	<i>yocK</i>	General stress protein	2.8
3101039	<i>ywtG</i>	General stress major facilitator superfamily protein	4.5
Class III heat shock genes			
3100277	<i>mcsA</i>	Modulator of CtsR repression	2.1
3100565	<i>mcsB</i>	Modulator of CtsR repression	2.3
3099047	<i>clpE</i>	ATP-dependent Clp protease-like	3.3
31011251	<i>clpP2</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP	2.8

乙偶姻、乳酸、乙醇、丙酮酸发酵途径重排^[12], *B. licheniformis* CGMCC 3963 中与前两者相关的基因变化并不显著,但是利用丙酮酸生成乙醇,同时产生 CO₂ 和消耗质子,这一反应是 *B. licheniformis* CGMCC 3963 细胞应对胞内低 pH 的一个代谢重组响应。另外,表达上调的 *rocF*、*nrgA*、*cdd* 基因能够以产生碱性物质氨的方式,*nhaX*、*glcP* 以转运质子的方式来维持 pH 动态平衡。暴露于酸胁迫环境下,氧化应激相关的基因诱导了二次氧化应激反应(过氧化氢酶,超氧化物歧化酶等),转录组结果显示,这部分基因表达变化显著,过氧化调节子的转录抑制因子 *perR* 下调到 0.22。此外,部分一般应激响应基因表达显著上调(表 3)。qPCR 验证 *glcP* 表达提高为 10.8 倍,与基因芯片结果一致。由此可见,*B. licheniformis* CGMCC 3963 耐酸能力更强主要是因为它与一般应激响应相关的基因、乙醇脱氢酶的基因、氧化应激相关的基因、pH 动态平衡相关的基因发生了差异表达。

2.2.3 基于转录组数据的耐乙醇分子机制: 据文献报道,革兰氏阳性菌在乙醇胁迫下能够诱导编码柠檬酸代谢、胞被膜组成以及热胁迫下交叉保护基因的表达^[19]。热休克基因主要由 4 类, I 类热休克基因主要由 *hrcA* 进行负调控, II 类热休克基因包括由 SigB 因子调控的对多种环境压力都具有保护作用的上百个一般应激响应基因, III 类主要是受 CtsR 负调控的 *clpC*、*clpP*、*clpE*、*clpX* 等基因, IV 类热休克基因主要有 *ftsH*、*htrA* 等 10 个基因^[2]。转录组比较分析显示, *B. licheniformis* CGMCC 3963 相对于 *B. licheniformis* ATCC 14580, 柠檬酸途径只有两个基因的表达略有上调, 脂磷壁酸的生物合成相关基因、I 类和 IV 类热休克基因表达几无差异, 而部分由 SigB 调控的 II 类、CtsR 负调控的 III 类热休克基因表达明显上调(表 3)。qPCR 验证 *dps* 表达提高为 4.6 倍, 与基因芯片结果一致。推测 II 类及 III 类热休克基因的高表达对 *B. licheniformis* CGMCC 3963 耐乙醇能力起了重要作用。

表 4 与耐酸相关的基因
Table 4 Genes associated with resistance to acid

基因号 Gene ID	基因名 Gene symbol	基因功能 Gene function	倍数变化 Fold change
Metabolic rearrangements			
3101039	<i>adhB</i>	Alcohol dehydrogenase	6.90
3100484	<i>yhxC</i>	Similar to alcohol dehydrogenase	37.60
3099534	<i>yjmD</i>	Similar to alcohol dehydrogenase	5.20
pH homeostasis			
3099067	<i>rocF</i>	Arginase	3.00
3101122	<i>nrgA</i>	Ammonium transporter	2.90
3097717	<i>cdd</i>	Cytidine deaminase Cdd	2.10
3099262	<i>nhaX</i>	Putative regulatory gene for NhaC	3.80
3101312	<i>glcP</i>	Glucose/mannose H ⁺ symporter	11.50
Secondary oxidative stress			
3101594	<i>katE1</i>	Catalase 2	2.10
3101270	<i>katE2</i>	Catalase 2	3.10
3098958	<i>sodF</i>	Superoxide dismutase	18.30
3099082	<i>yojM</i>	Similar to superoxide dismutase	24.60
3100352	<i>perR</i>	Transcriptional repressor of the peroxide regulon	0.22

3 讨论

产酱香 *B. licheniformis* 耐受特征是功能细菌生存并发挥功能的重要前提, 对其耐受特征及机制的认识对于认识酱香型白酒的酿造特征具有重要意义。本文通过对产酱香功能菌 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的多种耐受特征进行研究, 结合比较转录组学, 分析了产酱香功能菌的多种耐受机制。研究发现, *B. licheniformis* CGMCC 3963 相对于模式菌株 *B. licheniformis* ATCC 14580, 高温条件下一系列与耐高温、耐酸、耐乙醇相关的基因差异表达, 说明热胁迫诱导的基因对其他胁迫具有交叉保护作用。除了 SigB 因子调控的一般应激响应基因表达上调外, 与耐受其他环境相关的特异性应激基因表达也发生了变化, 表明来源于多重胁迫环境下的 *B. licheniformis* CGMCC 3963 在长期的环境适应和筛选过程中, 受到其中高温刺激时能够更强地诱导与其他耐受相关的特异性基因的表达, 最终使得 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的环境适应能力更强。该结果运用比较转录组学技术系统地分析了产酱香细菌的多种耐受机制, 能为酿造过程中高耐受能力菌株的筛选和富集提供一定指导, 不仅有利于解析酱香型白酒的酿造机制, 而且对于中国白酒的发展具有重要的实际应用价值和理论价值。

参考文献

- [1] 杨国华, 邱树毅, 黄永光. 酱香白酒生产中产香微生物研究[J]. 中国酿造, 2011(4): 24-27.
- [2] 吴群, 徐岩. 高温大曲中地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* CGMCC 3963) 的耐高温特征[J]. 微生物学报, 2012, 52(7): 910-915.
- [3] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 326.
- [4] 董永胜, 王瑞明. 白酒固态发酵中解除产物乙醇抑制作用的初步研究[J]. 酿酒科技, 2007(7): 2.
- [5] Voigt B, Hoi le T, Jurgen B, et al. The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*[J]. Proteomics, 2007, 7(3): 413-423.

- [6] Hoi le T, Voigt B, Jurgen B, et al. The phosphate-starvation response of *Bacillus licheniformis*[J]. Proteomics, 2006, 6(12): 3582-3601.
- [7] Schroeter R, Voigt B, Jurgen B, et al. The peroxide stress response of *Bacillus licheniformis*[J]. Proteomics, 2011, 11(14): 2851-2866.
- [8] Wecke T, Veith B, Ehrenreich A, et al. Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(21): 7500-7511.
- [9] Wu Q, Xu Y. Transcriptome profiling of heat-resistant strain *Bacillus licheniformis* CGMCC3962 producing Maotai flavor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(8): 2033-2038.
- [10] Schroeter R, Hoffmann T, Voigt B, et al. Stress responses of the industrial workhorse *Bacillus licheniformis* to osmotic challenges[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80956.
- [11] Voigt B, Schroeter R, Jurgen B, et al. The response of *Bacillus licheniformis* to heat and ethanol stress and the role of the SigB regulon[J]. Proteomics, 2013, 13(14): 2140-2161.
- [12] Mols M, Abee T. *Bacillus cereus* responses to acid stress[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(11): 2835-2843.
- [13] Wu Q, Peng S, Yu Y, et al. Genome sequence of *Bacillus licheniformis* CGMCC3963, a stress-resistant strain isolated in a Chinese traditional solid-state liquor-making process[J]. Genome Announcements, 2013, 1(1): e00060-12.
- [14] 吴徐建. 酱香型白酒酿造过程中微生物群落结构变化及一株优势细菌功能研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013.
- [15] Hahne H, Mader U, Otto A, et al. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 192(3): 870-882.
- [16] Bremer E. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria[J]. Bacterial Stress Responses, 2000: 79-97.
- [17] Siervo N, Makita Y, de Hoon M, et al. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(suppl 1): D93-D96.
- [18] Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, et al. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(19): 5335-5346.
- [19] van Bokhorst-van de Veen H, Abee T, Tempelaars M, et al. Short- and long-term adaptation to ethanol stress and its cross-protective consequences in *Lactobacillus plantarum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5247-5256.