

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(7):910-915; 4 July 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

高温大曲中地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis* CGMCC 3963) 的耐高温特征

吴群, 徐岩*

工业生物技术教育部重点实验室, 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 【目的】高温大曲的使用是中国酱香型白酒酿造的特征之一, 耐高温的细菌是高温大曲中重要的优势功能菌, 它们对酱香型白酒的酿造具有重要的价值。研究高温大曲中细菌的耐高温特征对于认识酱香型白酒的酿造特征具有一定的作用。【方法】本文以中国白酒高温大曲中筛选获得的一株具有自主知识产权的耐高温功能细菌地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC 3963 为对象, 测定其耐高温特征, 并首次通过细胞形态学的分析, 以及转录组学等技术的应用系统研究了 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐高温机制。【结果】地衣芽胞杆菌 *B. licheniformis* CGMCC 3963 能够耐受 55℃ 高温生长。在高温条件下, 该菌仍具有较旺盛的代谢生长能力, 且产生大量荚膜, 同时大量 I 类热休克蛋白基因以及聚谷氨酸合成基因的表达水平均得到明显提高。【结论】*B. licheniformis* CGMCC 3963 在高温下, I 类热休克蛋白以及以聚谷氨酸为主要成分的荚膜大量产生, 对功能细菌耐高温具有重要的作用。该结果首次从分子水平认识了中国白酒酿造微生物的耐高温特征, 丰富了白酒酿造微生物学的科学理论。

关键词: 大曲, 耐高温, 地衣芽胞杆菌, 热休克蛋白, 荚膜

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0910-06

中国酱香型白酒具有独特的风格特征, 高温大曲是形成酱香型白酒独特风味的重要原因之一, 对赋予白酒典型特征香的突出、优雅细腻、香味谐调、回味悠长, 尤其是空杯留香持久等特点具有重要风味贡献^[1-2]。产酱香功能细菌的耐高温特征是功能细菌在高温大曲中生存并发挥产酱香功能的重要前提^[3], 因此, 对功能细菌耐高温特征及机制的认识不仅能够丰富功能细菌生理特征机制, 而且也是酿造微生物学研究的重要内容。

众所周知, 在酿造过程中, 大曲中所积累形成的

多种微生物, 共酵生成复杂的白酒成分, 赋予了白酒独特的风格特征。高温大曲制作过程中, 品温最高可达 60℃ 以上, 这使得耐高温的细菌成为高温大曲中的重要优势功能菌^[4-5]。因此, 酱香型白酒典型风格及特征也就是高温大曲中耐高温的功能细菌作用的重要体现。因此深入认识功能细菌的耐高温特征及机制对于认识酱香型白酒的酿造特征具有重要的意义。但是, 目前包括白酒制造业的国内传统食品酿造行业都缺乏对酿造机理的认识与调控优化, 对产酱香功能细菌的研究仍只停留于传统培养角度

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA021301); 国家自然科学基金(31000806); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2010116); 中国白酒 169 计划

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85864112; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 吴群(1981-), 女, 江苏无锡, 副教授, 主要从事白酒酿造微生物学研究。E-mail: jiangnanwq@yahoo.cn

收稿日期: 2012-01-26; **修回日期:** 2012-04-06

上的研究分析, 缺乏从分子水平上对微生物功能机制的认识, 导致对微生物酿造规律及酿造关键影响因素不清晰。

针对以上问题, 本文以中国白酒高温大曲中筛选获得了具有自主知识产权的产酱香功能地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) CGMCC 3963 为对象, 研究了该菌的耐高温特征, 并首次利用细胞形态学及转录组学等技术系统研究了 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐高温机制。本文首次对白酒酿造功能微生物进行了分子特征机制的研究, 该研究对于丰富我国白酒功能微生物的理论具有积极的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *B. licheniformis* ATCC 14580 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。本研究室筛选高温大曲中产酱香 *B. licheniformis* BL-L1^[3], 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 5, 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。麸皮浸出汁: 麸皮 200 g, 加水 800 mL, 加入淀粉酶处理 10 min。待冷却后, 加入蛋白酶处理 30 min。过滤取上清液, 用 1mol/LNaOH 溶液调 pH 至 7.0。

1.2 功能细菌耐高温特征的研究

分别将 2 株 *B. licheniformis* 接种至灭菌后的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养 16 h 作为种子液, 稀释至相同浓度, 分别接种至新的灭菌后的 LB 培养基中, 分别至于不同培养温度下培养 16h 后, 平板涂布计数。

1.3 功能细菌细胞形态的测定

将产酱香细菌接种于营养琼脂培养基, 于 37℃ 培养 1 d 后观察菌落形态; 将细菌接种于种子液培养基, 于 37℃ 培养 1 d, 透射电镜观察细胞形态学特征。

1.4 功能细菌不同培养温度下基因表达差异的研究

将 *B. licheniformis* CGMCC3963 接种至 LB 液态培养基中, 37℃ 培养 16h 作为种子液, 接种至麸皮浸出汁培养基中, 分别至于 37℃ 和 55℃ 差异条件下培

养 16h, 8000 × g 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℃ 保存备用。

采用 *B. licheniformis* 基因芯片 (NimbleGen, Reykjavik, Iceland) 测定基因表达的差异, 荧光染料标记 DNA、芯片杂交、扫描以及数据分析参见文献 [6-7]。所有芯片的表达数据均为 55℃ 培养与 37℃ 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。

1.5 聚谷氨酸产量测定

聚谷氨酸产量测定采用凝胶渗透色谱仪测定, 具体条件参见文献 [8]。

2 结果

2.1 产酱香功能细菌耐高温能力的研究

以模式株 *B. licheniformis* 14580 为对照, 研究了产酱香功能细菌 *B. licheniformis* CGMCC 3963 的耐温能力。如图 1 所示, 尽管两株菌均在 45℃ 下总生物量最高, 但是相对于模式株而言, 该功能细菌在高温下的生长能力高于模式细菌, 尤其在 55℃ 下, 该功能细菌保持存活的生物量占到最高生物量 (45℃ 培养所得的生物量) 的 22%, 而模式株生长的生物量仅为其最高生物量的 1%。这也表明来自于高温大曲的功能细菌具有更高的耐温能力, 使其在高温酿造过程中具有很强的适应能力。

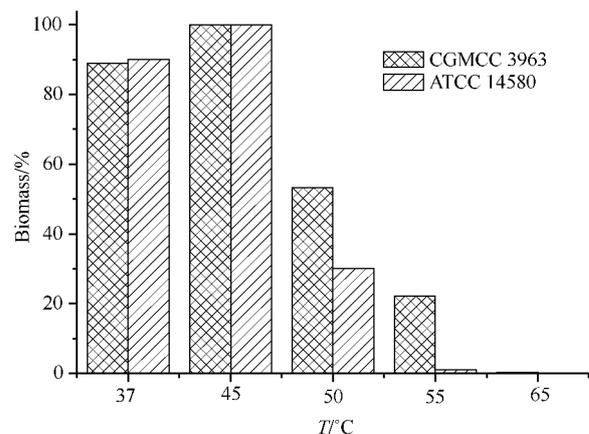


图 1 *B. licheniformis* 耐受高温能力

Fig. 1 Thermotolerant performance of *B. licheniformis*. The level of biomass was expressed as the growth percent compared with the cells growth at 45℃ (nominally, 100%).

2.2 产酱香功能细菌细胞形态的研究

采用透射电镜观察产酱香功能细菌 *B. licheniformis* CGMCC 3963 不同温度下细胞的形态, 结果如图 2 所示。从细胞形态看出, 与 37℃ 培养相比, 该菌在 55℃ 高温下培养时细胞形态和大小基本

未发生变化, 表明该菌在高温下仍然具有非常强的生命力。同时, 发现高温培养时细胞表面荚膜大量增加, 荚膜厚度超过细胞直径, 最厚达到 1 μm 左右, 这也说明高温诱导了荚膜的大量产生, 它对细胞的耐高温能力可能具有一定的作用。

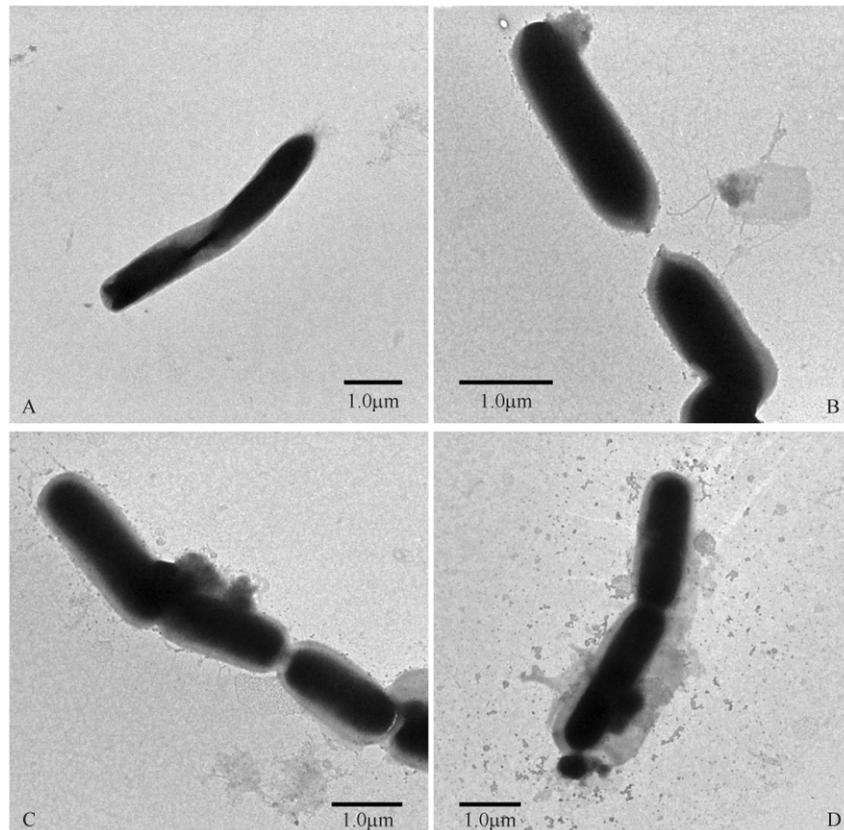


图 2 *B. licheniformis* CGMCC 3963 透射电镜观察细胞形态

Fig. 2 Electron micrograph of *B. licheniformis* CGMCC 3963. A, B: the same sample of the strain cultured at 37°C; C, D: the same sample of strain cultured at 55°C.

2.3 产酱香功能细菌耐高温的分子机制

分析其耐温机制对于产酱香的机制具有重要的价值。因此从基因组的水平分析了功能细菌 *B. licheniformis* CGMCC 3963 耐高温的机制。分别在 55℃ 和 37℃ 培养 *B. licheniformis* CGMCC 3963, 测定高温培养时基因表达变化。发现芯片上待测的 4196 个基因中, 共有 675 个基因的表达水平提高了 2 倍以上。其中, 该菌在 55℃ 培养下基因 *ywtB*, *ywtA*, *ywtC* 表达水平提高极大, 如表 1 所示。由于这 3 个基因属于聚谷氨酸合成酶基因, 因此比较了不同温度培养下发酵液中聚谷氨酸的浓度。发现菌株在 55℃ 培养时聚谷氨酸浓度为 18.6 g/L, 而 37℃ 时浓度仅为 4.2 g/L。结果表明聚谷氨酸是 *B.*

licheniformis CGMCC 3963 在高温培养条件下应激而大量产生的物质。文献报道聚谷氨酸是由 D-谷氨酸和 L-谷氨酸聚合而成的胞外聚合物, 属于细胞的荚膜成分^[9-10], 因此它对 *B. licheniformis* CGMCC 3963 耐受 55℃ 高温的特征具有重要的作用。该结果与细胞在高温下大量产生荚膜的结果是一致的。

除了聚谷氨酸合成基因外, 同时发现细胞在 55℃ 培养下, 有一系列的功能蛋白基因表达水平明显提高, 它们属于热休克蛋白基因。热休克蛋白能够作为伴侣蛋白来辅助蛋白正确折叠或辅助折叠错误的蛋白降解, 从而达到保护细胞的功能^[11]。通过全基因组水平的分析, 获得了高温下 *B. licheniformis* CGMCC 3963 表达增强的热休克蛋白基因, 表 2 列

出了上述蛋白基因及其调控蛋白基因表达水平的变化。热休克蛋白目前报道的主要有 4 类, I 类热休克蛋白主要是由 HrcA 蛋白进行直接或间接的负调控^[12], 而目的菌中该蛋白表达水平降低了一倍, 且其调控的大部分 I 类热休克蛋白表达水平均得到提高, 尤其是 *groES* 和 *groEL*, 表达分别增强 4.5 和 9.1 倍。文献报道这两个基因是在同一基因簇上, 而由于这两个基因表达水平正好是约 2 倍的差异, 因此, 推测 *groEL* 基因可能属于双拷贝基因, 这是与 *Streptomyces albus* 中相关基因的存在形式是相同的^[13]。II 类热休克蛋白主要是由 Sigma-B 因子调控的, 目前报道 Sigma-B 因子调控的相关基因共有 127 个^[14], 但是该类基因并不属于热休克保护蛋白, 在其它环境压力下同样也具有保护功能, 由于目的菌中该蛋白的表达水平未发生明显变化, 因此大部分受其直接调控的相关基因变化并不显著; III 类

热休克蛋白相关基因主要是 *clpC* 和 *clpP*, 它们主要是受 CtsR 蛋白调控, 由于 CtsR 蛋白表达未发生变化, 因此它所调控的 *clpC* 和 *clpP* 基因也未发生变化。但是 III 类热休克蛋白中还包括一些其它的相关基因, 例如 *clpE*, *clpX*, *clpQ* 等, 它们在目的菌中的表达水平也得到了提高。IV 类热休克蛋白是目前研究最少的, 目前发现的主要有 10 个相关基因, 在目的菌中只有 3 个基因的表达水平有一定提高, 分别为 *htrA*, *yvtA* 和 *ftsH* 基因。以上全局基因组水平的热休克蛋白基因表达分析结果表明, 在目的菌中 I 类热休克基因无论是变化种类还是表达提高水平方面都是最明显的。因此对于 *B. licheniformis* CGMCC 3963, 荚膜聚谷氨酸组成基因以及 I 类热休克基因的高表达对其高耐温能力起到了重要的作用。

表 1 聚谷氨酸合成酶基因系统

Table 1 Genes in polyglutamate biosynthesis system

GeneID	Gene name	Gene function	Up regulated fold change
3101045	<i>yvtB</i>	Similar to capsular polyglutamate biosynthesis	21.1
3101046	<i>yvtA</i>	Similar to capsular polyglutamate biosynthesis	10.0
3101047	<i>yvtC</i>	Similar to capsular polyglutamate biosynthesis	12.9

表 2 表达提高的热休克蛋白基因及其相关调控基因

Table 2 Heat shock related genes and regulators

Gene ID	Gene name	Gene function	Up regulated fold change
Class I heat shock genes and regulator			
3097788	<i>hrcA</i>	transcriptional repressor of class I heat-shock genes; Acts as a negative regulator of the <i>grpE-dnaK-dnaJ</i> and <i>groELS</i> class I heat shock operons by preventing heat-shock induction	0.5
3097786	<i>dnaK</i>	class I heat-shock protein (molecular chaperone)	2.6
3097774	<i>dnaJ</i>	heat-shock protein (activation of DnaK)	2.8
3097786	<i>dnaK</i>	class I heat-shock protein (molecular chaperone)	2.6
3097787	<i>grpE</i>	heat-shock protein (activation of DnaK)	2.8
3100069	<i>groES</i>	class I heat-shock protein (chaperonin)	4.5
3097938	<i>groEL</i>	class I heat-shock protein (chaperonin)	9.1
Class II heat shock genes and regulators			
3097766	<i>sigB</i>	RNA polymerase general stress sigma factor; general stress response sigma factor	1.4
Class III heat shock genes and regulators			
3100085	<i>ctsR</i>	transcriptional repressor of class III stress genes	1.1
3099047	<i>clpE</i>	ATP-dependent Clp protease-like (class III stress gene)	2.4
3098420	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease; binds and unfolds substrates as part of the ClpXP protease	2.5
3099395	<i>clpQ</i>	heat shock protein involved in degradation of misfolded proteins	2.5
Class IV heat shock genes and regulators			
3098418	<i>htrA</i>	serine protease (heat-shock protein)	1.9
3100023	<i>yvtA</i>	similar to HtrA-like serine protease	2.7
3098618	<i>ftsH</i>	cell-division protein/general stress protein	2.7

3 讨论

高温大曲中功能细菌的耐高温性质是功能细菌生存并发挥功能的重要前提,对功能细菌耐高温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的意义。本文从中国白酒高温大曲中筛选获得了具有自主知识产权的耐高温的功能 *B. licheniformis* CGMCC 3963, 并首次采用细胞形态学及转录组学等技术系统研究了功能细菌的耐高温特征及其分子机制。尽管已有报道聚谷氨酸对细胞具有保护作用,但这是首次发现高温培养能够诱导聚谷氨酸基因的高效表达以及聚谷氨酸的大量产生,这也是与聚谷氨酸的生理作用相一致的。同时本研究发现该菌在高温培养下,并不是所有的热休克蛋白表达水平均得到提高,而主要是 I 类热休克蛋白表达水平得到了较高的提高,因此推测该类热休克蛋白对该菌耐热能力也具有一定的作用。该结果首次从分子水平认识了中国白酒酿造微生物的酿造特征,不但有助于解析中国白酒的酿造机制,而且对于中国白酒的发展具有重要的理论价值。

参考文献

- [1] Zhu SK, Lu X, Ji KH. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 597 (2): 340-348.
- [2] Xu Y, Ji K. Moutai (*Maotai*): production and sensory properties // Piggott J. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research*. 1st ed. UK: Woodhead Publishing Limited, 2011:315.
- [3] 张荣, 徐岩, 范文来, 王海燕. 酱香大曲中地衣芽孢杆菌及其特征风味代谢产物的分析研究. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 2010, 40 (3):1-7.
- [4] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 24 (10): 2183-2190.
- [5] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, Xu Y. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *Journal of Industrial Microbiol Biotechnology*, 2008, 35 (6):603-609.
- [6] DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, 278 (5338):680-686.
- [7] Ye YR, Zhu Y, Pan L, Li LL, Wang XN, Lin Y. Gaining insight into the response logic of *Saccharomyces cerevisiae* to heat shock by combining expression profiles with metabolic pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 385 (3):357-362.
- [8] Wu Q, Xu H, Xu L, Ouyang P. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2: Regulation of stereochemical composition of poly(γ -glutamic acid). *Process Biochemistry*, 2006, 41:1650-1655.
- [9] Kimura K, Itoh Y. Characterization of poly- γ -glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly- γ -glutamate. *Applied Environment Microbiology*, 2003, 69 (5):2491-2497.
- [10] Shih IL, Van YT. The production of poly- $(\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*, 2001, 79 (3):207-225.
- [11] Hendrick JP, Hart FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review Biochemistry*, 1993, 62:349-384.
- [12] Selby K, Lindström M, Somervuo P, Heap JT, Minton NP, Korkeala H. Class I heat shock genes *hrcA* and *dnaK* play an important role in heat shock response and response to pH and NaCl stress of group I *Clostridium botulinum* ATCC 3502. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, doi:10.1128/AEM.02633-10.
- [13] Mazodier P, Guglielmi G, Davies J, Thompson CJ. Characterization of the *groEL-like* genes in *Streptomyces albus*. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (22):7382-7386.
- [14] Price1 CW, Fawcett P, Cérémonie H, Su N, Murphy CK, Youngman P. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2001, 41 (4):757-774.

Thermotolerance of *Bacillus licheniformis* CGMCC 3963 from high-temperature *Daqu*

Qun Wu, Yan Xu*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Objective] The use of high-temperature *Daqu* is an important characteristic in Chinese *Maotai-flavor* liquor making. Thermostable bacteria are predominant in high-temperature *Daqu*. They play important roles in *Maotai-flavor* liquor making. Learning the mechanism of thermotolerant performance of bacteria would provide insight into characteristics of this liquor making. [Methods] We determined the thermotolerance of *Bacillus licheniformis* CGMCC 3963, and analyzed cell morphology, genomics and transcriptomics. [Results] *B. licheniformis* CGMCC 3963 could survive at 55°C and produce many capsules. Genes of class I heat-shock proteins and polyglutamate biosynthesis were both up-regulated. [Conclusion] Much heat-shock proteins and capsule polyglutamate maintained the survival of cell with heat stress.

Keywords: *Daqu*, thermostability, *B. licheniformis*, heat-shock proteins, capsule

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2012AA021301), by the National Natural Science Foundation of China (31000806), by the Cooperation Project of Jiangsu Province among Industries, Universities and Institutes (BY2010116) and by the 169 Plan of Chinese Liquor

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85864112; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 26 January 2012 / Revised: 4 April 2012

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2012 年 7 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2011	月刊	48 - 51	1 - 12
2012	月刊	52	7