白酒酿造过程中 *Lactobacillus panis* 乳酸合成关键环境因子的鉴定

杨 帆[1,2]，杨玉波[2]，刘延峰[1,3]，李江华[3]，王 莉[4]，陈 坚[*3,5]

（1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 贵州茅台酒股份有限公司，贵州 遵义 564501；3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；4. 中国贵州茅台酒厂（集团）有限责任公司，贵州 遵义 564501；5. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要： *Lactobacillus panis* 是酱香型白酒酿造过程中主要产乳酸微生物。然而，不同环境因子对 *L. panis* 乳酸合成及乳酸合成途径关键基因的表达尚未有相关研究。作者分析了温度、乳酸、乙醇及葡萄糖 4 种不同的发酵过程相关的典型环境因子对 *L. panis* 乳酸产量的影响。结果表明，不同环境条件能够显著调节 *L. panis* 的生长和乳酸产量，且乳酸和乙醇是酿造过程中其乳酸合成的关键影响因素。当添加 10.0 g/L 乳酸后，*L. panis* 的乳酸产量最高，达到 12.3 g/L；当添加体积分数 4.0% 乙醇后，*L. panis* 的乳酸产量最低，仅为 7.2 g/L。使用实时荧光定量 PCR 方法对不同条件下 *L. panis* 乳酸合成相关基因的表达进行分析，结果表明添加乳酸能够显著上调包括编码 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶的 *ldhL* 和 *ldhD* 在内的乳酸合成基因的表达。然而，添加乙醇会导致 *L. panis* 乳酸合成相关基因的整体显著下调。分析调控乳酸合成的关键环境因素，对于白酒酿造过程中乳酸和酿造微生物群落调控及白酒质量控制具有重要意义。

关键词： 白酒酿造过程；乳酸；*Lactobacillus panis*；关键环境因子

中图分类号：TS 201.3　**文章编号：**1673-1689(2021)01-0036-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.01.005

Identification of Key Environmental Factors of Lactic Acid Biosynthesis by *Lactobacillus panis* for Chinese Liquor Brewing

YANG Fan[1,2], *YANG Yubo*[2], *LIU Yanfeng*[1,3], *LI Jianghua*[3], *WANG Li*[4], *CHEN Jian*[*3,5]

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Kweichow Moutai Distillery Co., Ltd., Zunyi 564501, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Kweichow Moutai Group, Zunyi 564501, China; 5. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *Lactobacillus panis* has been identified as the major lactic acid-producing bacterium in the fermentation of *Maotai*-flavor liquor. However, the effects of different environmental conditions on lactic acid metabolism and expression level of key genes in the lactic acid pathways of *L. panis* have not been studied. In this work, different environmental factors relevant to fermentation processes were selected, such as temperature, lactic acid, ethanol, and glucose concentrations.

收稿日期： 2019-12-30

基金项目： 国家自然科学基金项目(31972854)；国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目(LITE2018-16)。

* **通信作者：** 陈　坚(1962—)，男，博士，教授，博士研究生导师，中国工程院院士，主要从事发酵工程研究。E-mail：jchen@jiangnan.edu.cn

Results showed that under different environmental conditions, the growth and lactic acid yield of *L. panis* were significantly regulated. Lactic acid and ethanol were identified to be the key factors of lactic acid biosynthesis by *L. panis*. The maximum amount (12.3 g/L) of lactic acid was achieved when 10 g/L lactic acid was added to the growth medium. In contrast, the addition of 40 g/L ethanol reduced lactic acid production to 7.2 g/L, which was the lowest level among the different environmental conditions. Quantitative real-time PCR analysis of key genes involved in lactic acid metabolism with lactic acid supplementation showed that lactic acid addition significantly facilitated up-regulation of key gene for lactic acid synthesis, including *ldhL* and *ldhD* encoding L-lactic acid dehydrogenase and D-lactic acid dehydrogenase, respectively. However, their expression levels were down-regulated if ethanol added, implying a decreased metabolic flux through the lactic acid synthetic pathway. The analysis of key environmental factors determining lactic acid production of *L. panis* is of great significance for modulation of lactic acid synthesis during fermentation, and would also be useful for controlling the brewing microbial community and quality of the liquor.

Keywords: Chinese liquor brewing, lactic acid, *Lactobacillus panis*, key environmental factors

乳酸菌被广泛用于发酵乳制品、酸菜、泡菜等发酵食品中,其中乳酸是乳酸菌利用糖类发酵代谢的主要终产物[1-3]。乳酸也是中国白酒中主要的有机酸之一,能减少酒精的刺激感,降低酒的涩味从而使酒体更加丰满醇和。此外,乳酸还是风味物质乳酸乙酯的重要前体物质,乳酸乙酯能够增加酒体的醇甜感、醇厚度,是重要的呈味和呈香物质[4]。同时,乳酸还具有调节其他酿造微生物生长的作用,这对白酒酿造具有重要的意义[5-7]。

酱香白酒是中国最受欢迎的白酒之一,其生产需要经两次投料(下沙和造沙)和多轮次发酵。随着溶氧的降低和酸度的增加,在每一个轮次的固态发酵的中后期,乳酸菌便成为酒醅中的优势菌[8]。发酵产物,尤其是乳酸等非挥发性产物不可避免地会影响下一轮次的微生物群落结构,从而进一步影响下一轮次产酒的产量和质量。*Lactobacillus panis* 是一种厌氧的专性异型乳酸发酵乳酸菌,属于第Ⅲ类型乳杆菌,其发酵终产物为乳酸、乙酸、乙醇和 CO_2[9]。*L. panis* 最早是从发面中分离出的,是一种广泛存在于谷物类发酵制品中的典型乳杆菌[10-11]。前期研究发现,*L. panis* 是造沙轮次中主要的产乳酸微生物[12]。因此,其生长和乳酸代谢对后续生产过程中微生物群落结构、基酒的产量、风味均有重要影响。

乳酸菌的生长和代谢取决于其对 pH、温度和营养等环境条件的感知和响应能力[13]。因此,改变这些环境条件会影响 *L. panis* 的乳酸合成。明晰这一调节机制将为通过调节酿造环境条件来控制乳酸合成提供指导,从而为实现酱香型白酒的质量提升奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和培养基

1.1.1 菌株 本研究所用菌株为从酱香白酒酒醅中分离获得的 *L. panis*。

1.1.2 改良 MRS 培养基的制备 将酱香型白酒生产过程中的酒醅与水以 1 g:2 mL 的比例混合,400 r/min 振荡 15 min,然后 30 ℃超声 20 min,过滤超声后的浸提液,然后将滤液 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液。将制备的酒醅浸提液与 MRS 液态培养基以 1 mL:1 g 的比例混合,在灭菌之前将改良 MRS 培养基的 pH 调节至 5.0。经测定,改良 MRS 培养基中含葡萄糖 15 g/L、乙醇 0.5 g/L、乳酸2.5 g/L。

1.1.3 发酵培养条件

1)菌种复苏扩培 将 *L. panis* 接种于液态 MRS 培养基中,于 37 ℃条件下厌氧培养至 $A_{600\ nm}$ 为 1.0 左右。

2)种子液接种 将扩培后的种子液以体积分数 2%的量接种于不同类型的发酵培养基中,分析不同温度、乳酸质量浓度、乙醇体积分数及葡萄糖质量浓度对 *L. panis* 的乳酸代谢的影响。

3)温度条件　将种子液接种于发酵培养基后，分别置于30、37、42、45 ℃下培养。

4）乳酸质量浓度　将种子液分别接种于含4、8、10、15 g/L乳酸的改良MRS培养基中后，37 ℃下培养。

5）乙醇体积分数　将种子液分别接种于含乙醇体积分数0.5%、1.0%、2.0%、4.0%改良MRS培养基中后，37 ℃下培养。

6）葡萄糖质量浓度　将种子液分别接种于含20、40、80、120 g/L葡萄糖的改良MRS培养基后，37 ℃下培养。

7)对照　将种子液接种于不额外添加乳酸、乙醇和葡萄糖的改良MRS培养基中，37 ℃下培养作为对照。

1.2　方法

1.2.1　*L. panis* 生长曲线的测定　将菌种活化接种于不同条件下后，以不含菌液的改良MRS培养基作为对照，定时在波长600 nm处测定培养液的吸光度值($A_{600\,nm}$)，每组实验3个平行，取均值。以$A_{600\,nm}$为纵坐标，培养时间为横坐标，绘制生长曲线图。

1.2.2　*L. panis* 乳酸产量的测定　在发酵开始和结束时，使用高效液相色谱（HPLC）系统（安捷伦1260，安捷伦科技公司产品）测定发酵液中的乳酸含量。取发酵液1 mL在4 ℃下12 000 r/min离心10 min，将上清液稀释，然后使用膜滤(0.22 μm)过滤。使用C18色谱柱通过以下条件进行乳酸测定：色谱柱温度为30 ℃，含体积分数0.2%甲醇的磷酸水溶液(A)和超纯水(B)用作流动相，流量0.8 mL/min，进样体积为10 μL。

1.2.3　总RNA提取　菌体培养至对数期时，取培养液2 mL，4 ℃下12 000 r/min离心2 min收集菌体，仔细去除上清液后，用含溶菌酶的TE缓冲液100 μL彻底重悬菌体，37 ℃孵育10 min。按照RNAprep pure Cell / Bacteria Kit(Tiangen)提取说明书提取总RNA，并电泳判断RNA的完整性。总RNA浓度通过使用Thermo Spectronic分光仪测量260 nm处的吸光度确定。

1.2.4　cDNA合成　使用PrimeScript™RT试剂盒和gDNA Eraser(TaKaRa)进行反转录合成cDNA，其中反转录体系的RNA质量为1 μg，反转录体系为20 μL。反应条件：37 ℃变性5 min后，在37 ℃下反应15 min。最后，将反应在85 ℃灭活5 s。反转录后的样品在-20 ℃条件下保存，用于实时荧光定量PCR。

1.2.5　实时荧光定量PCR（RT-qPCR）　不同条件下，靶标基因的表达水平使用TB Green™ Premix Ex Taq™ II(Takara)试剂盒进行分析，其中靶标基因和内参基因(16S rDNA)的引物根据*L. panis*全基因组序列进行设计，具体见表1。反应体系：TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)(2×)10 μL；上下游引物各0.8 μL，cDNA反应液1.6 μL，灭菌重蒸水6.8 μL，总体系为20 μL。

使用Roche Cobas® 480进行实时荧光定量PCR，不同反应体系样品做3个重复。反应程序：预变性：95 ℃ 30 s；PCR反应：95 ℃ 5 s，60 ℃ 10 s，循环40次。

表1　实时荧光定量PCR引物

Table 1　Primers used in quantitative real-time PCR analysis

基因	引物序列	功能
16S rRNA	F：CCACAACTGATTCAACACGGTGCTACT	内参基因
	R: GCAACGGTATCCCTTTCCTTGTTCTTCT	
hk	F: TTAGCGGTTACTGGCTGGCGTC	葡萄糖激酶
	R: GTGGAGTTCGGCGGTGTGAGTA	
pk	F: CCTAACTACCGTGACTTCGCTGTTG	己糖磷酸酮酶
	R: GATACCTTCCATCCATTGACGCTTGT	
gapB	F: ACGCATGATAAGATTGCTGTTACCTACC	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
	R: ACACCCTTCCGAGAACCAAGAACAC	
pgk	F: TCCATCAGGTGCTTCTACTGGTGAAC	磷酸甘油酸激酶
	R: ACCGTCTAACTTAATCATTGCCTTGTCG	
pgm	F: GATTAAGGATGGCGTTGTTGGTGATGAC	磷酸甘油酸变位酶
	R: AGTAGGTTGGAAAGCCGTTCAGCAA	

续表 1

基因	引物序列	功能
pyk	F: TGGGCAAGTAAGCATCCTAACATTGAA	丙酮酸激酶
	R: CATCTTAGTAACACCTTCGTCAGCAAGT	
ldhD	F: CTGACAAGGGAATTGCCCAGGGAAT	D–乳酸脱氢酶
	R: CGCCGTAATGCCGTTCGTTCAAC	
ldhL	F: TAAGGCGGCTAACGGTGGAGGT	L–乳酸脱氢酶
	R: CGATGTGCTTGGGATGCTGGATGT	

2 结果与讨论

2.1 不同环境条件下 *L. panis* 的生长情况

将酱香型白酒固态发酵初期的条件（37 ℃，60 g/L 葡萄糖，无乳酸和乙醇）作为对照组，不同环境条件对 *L. panis* 生长情况的影响如图 1 所示。由结果可知，*L. panis* 的最佳生长温度为 42 ℃，其 $A_{600\ nm}$ 值最高为 1.14，比对照高 7.7%，见图 1(a)。相比之下，在 30 ℃和 45 ℃下，其最高 $A_{600\ nm}$ 值分别比对照低 31.1%和 39.7%。此外，添加乳酸能显著促进 *L. panis* 的生长，当乳酸质量浓度为 8.0 g/L 时，其 $A_{600\ nm}$ 值最高达 1.38，比对照高约 30.4 %，见图 1(b)，相反地，当添加乙醇体积分数至 4.0%时，*L. panis* 的最大 $A_{600\ nm}$ 下降约 37.8%，见图 1(c)。当葡萄糖质量浓度在 20~80 g/L 时，*L. panis* 的生长情况较好，随着葡萄糖质量浓度的进一步提高，*L. panis* 的生长开始受到抑制，当葡萄糖质量浓度为 120 g/L 时，其最高 $A_{600\ nm}$ 值已降至 0.95，见图 1(d)。

不同环境条件下 *L. panis* 的生长变化充分说明了在酿造过程中，环境变化会显著影响 *L. panis* 的生长。发酵过程中，微生物的代谢受一系列环境因素的影响，这些环境因素决定了微生物的生存环境[14-15]。本研究结果中，*L. panis* 可以在 45 ℃下良好生长，这可以归因于经过酱香酒生产过程（发酵过程温度可达 45 ℃）的长期驯化后，其对高温产生了良好的适应性。

2.2 不同环境条件下 *L. panis* 的乳酸产量

通过比较不同环境条件扰动下 *L. panis* 的乳酸产量来初步判定环境条件对 *L. panis* 乳酸合成的影响。结果表明，37 ℃下 *L. panis* 的乳酸产量最高，为

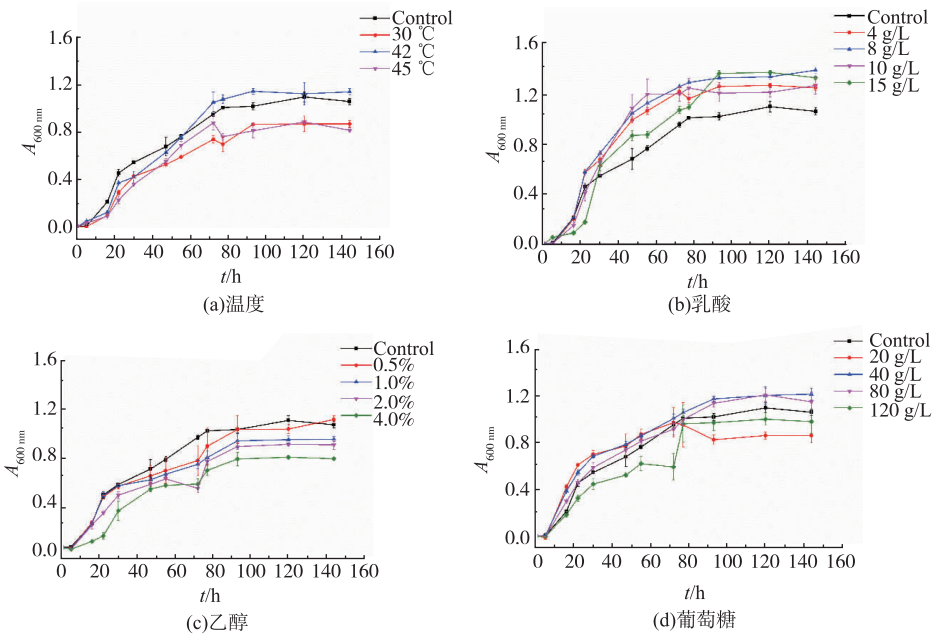


图 1　不同条件下 *L. panis* 的生长情况

Fig. 1　Cell growth of *L. panis* under different temperature

10.9 g/L,分别比 30、42 ℃和 45 ℃高 7.9%、19.7%和 11.2%,见图 2(a)。此外,添加适量的乳酸会促进*L. panis* 的生长及乳酸产量。在培养基中,由于乳酸不仅调节 pH,而且还可以用作代谢前体物质,因此,添加乳酸可能会促进 *L. panis* 的生长和产酸。当乳酸添加量为 10 g/L 时,*L. panis* 的乳酸产量为12.3 g/L(培养基中的乳酸总质量浓度为 22.3 g/L),然而,当乳酸添加量高于 10 g/L 后,*L. panis* 的乳酸产量会随着乳酸添加量的增加而减少,见图 2(b)。相反地,与对照相比,随着乙醇体积分数的增加,*L. panis* 的乳酸产量随之减少, 当乙醇体积分数为 4.0%时,*L. panis* 的乳酸质量浓度降低约 34.3%,结果见图 2(c)。同时,乙醇对 *L. panis* 乳酸产量的影响趋势与其对 *L. panis* 的生长影响趋势一致。此外,*L. panis* 的最适葡萄糖质量浓度为 60 g/L, 其乳酸产量为 10.9 g/L,见图 2(d)。从乳酸产量初步判定,酿造过程中影响 *L. panis* 乳酸合成的主要环境因素为乳酸和乙醇。

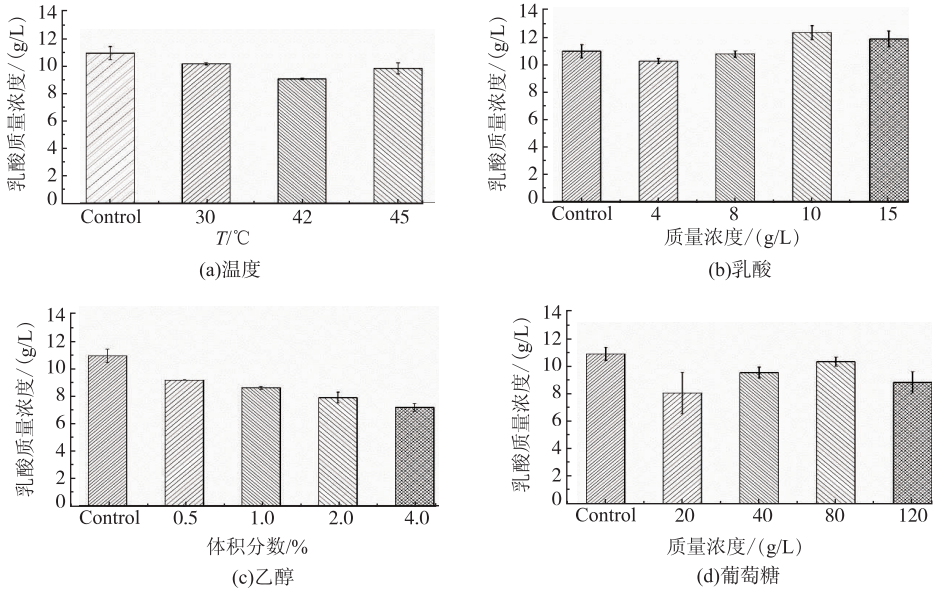


图 2　不同条件下 *L. panis* 的乳酸产量

Fig. 2　Yield of lactic acid produced by *L. panis* under different conditions

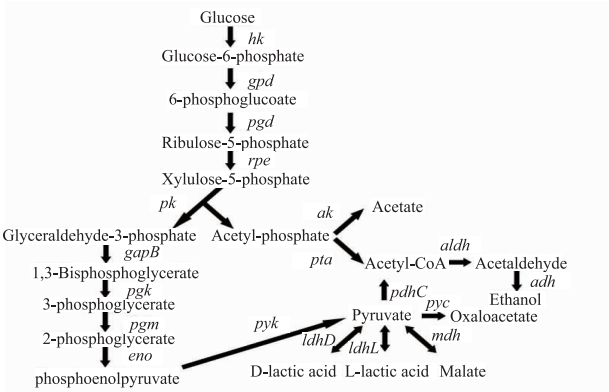
2.3　不同环境条件下 *L. panis* 乳酸合成关键基因表达水平的分析

根据不同环境条件下 *L. panis* 的乳酸产量结果得出, 乳酸及乙醇对 *L. panis* 的乳酸合成具有较显著影响。因此,为进一步研究环境因素对 *L. panis* 乳酸合成的影响,采用 RT-qPCR 技术对 *L. panis* 中乳酸合成相关基因(图 3)的表达进行分析,结果如图 4 所示。

酸是在食品和饮料发酵过程中由乳酸菌自身产生的重要环境压力[16]。添加乳酸可上调乳酸合成相关基因的表达,从而提高乳酸产量。

分别添加 10 g/L 或 15 g/L 的乳酸后,*L. panis* 中所有乳酸合成路径中的相关基因的表达均出现显著上调。其中,编码能催化丙酮酸生成乳酸的 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶的基因——*ldhL* 和 *ldhD* 分别上调了 6.55 倍(10 g/L)和 7.57 倍(15 g/L)。研究表明,在酸性环境下,磷酸甘油酸激酶、磷酸丙酮酸水合酶和丙酮酸激酶等糖酵解相关酶的表达会上调[17-18],这与本研究的结果一致。此外,本研究与 Wu 等在 *L. casei* 中所观察到的现象一致,*L. panis* 中包括 *gapB*、*pgm* 和 *pgk* 在内的编码葡萄糖代谢相关酶的基因表达的上调,表明酸性环境促进的 *L. panis* 糖酵解代谢活性[18]。而且 *ldhL*、*pk* 和 *gapB* 的上调,可能会提高 *L. panis* 在酸性环境下的存活率[19-20]。

乙醇是酿造微生物组的白酒酿造过程中的主要压力因素之一。研究表明,当细胞直接受到体积分数 1.2%乙醇处理时, 蛋白质的合成和稳定性降低。此外,在乙醇中,*Oenococcus oeni* 的碳水化合物转运系统,与细胞壁和膜成分生物合成相关的基因

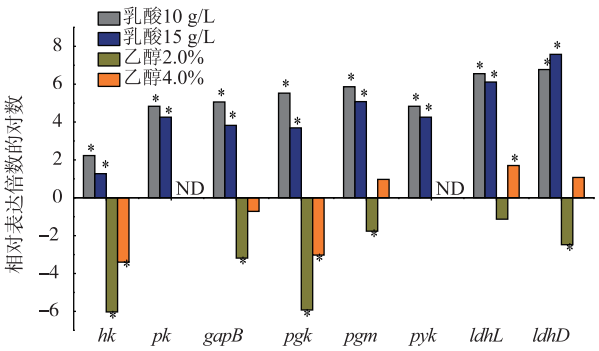


基因及其对应编码的酶:*hk*:葡萄糖激酶,*gpd*:6-磷酸-葡萄糖脱氢酶,*rpe*:磷酸核酮糖 3-差向异构酶,*pk*:己糖磷酸酮酶,*ak*:乙酸激酶,*pta*:磷酸转乙酰酶,*aldh*:乙醛脱氢酶,*adh*:乙醇脱氢酶,*gapB*:甘油醛-3-磷酸脱氢酶,*pgk*:磷酸甘油酸激酶,*pgm*:磷酸甘油酸变位酶,*eno*:磷酸丙酮酸水合酶,*pyk*:丙酮酸激酶,*ldhL*:L-乳酸脱氢酶,*ldhD*:D-乳酸脱氢酶,*pdhC*:丙酮酸脱氢酶 E1 组酶,*mdh*:苹果酸脱氢酶,*pyc*:丙酮酸羧化酶。

图 3 葡萄糖为底物条件下 *L. panis* 的乳酸代谢途径

Fig. 3 Lactic acid metabolic pathways with glucose as substrate in *L. panis*

被下调[21]。添加乙醇后,乳酸合成途径中大多数基因的表达水平显著下调,这表明在乙醇胁迫下,*L. panis* 中心代谢途径的代谢通量被下调。与对照相比,添加体积分数 2.0%乙醇后,*ldhL* 和 *ldhD* 分别下调 1.13 倍和 2.48 倍。但是,当添加体积分数 4.0%的乙醇后,*ldhL* 却上调了 1.71 倍,这可能与基因表达的时间特异性有关。而且,乙醇胁迫下,乳酸产量减少后,编码葡萄糖代谢酶的基因(如 *gapB*、*pgk*、*pgm* 和 *pyk*)也受到了抑制,在克鲁维酵母 CCT 7735 中也发现了类似的结果[22]。此外,*ldhL* 和 *ldhD* 的表达情况与乳酸产量的不一致也进一步证实由丙酮酸生成乳酸的产量不会受到 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶表达的限制[23]。



每个条件 3 重复,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,ND 表示未检出。

图 4 环境因素对 *L. panis* 乳酸合成路径相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of environmental factors on the expression level of genes involved in the lactic acid pathway

3 结 语

作者揭示了酿造过程中不同环境条件对 *L. panis* 乳酸产量的影响,并进一步对从酱香型白酒酿造微生物群落中分离出的 *L. panis* 的乳酸合成关键基因的表达进行了定量分析。结果表明,添加乳酸能显著上调 *L. panis* 乳酸合成途径的关键基因表达水平,且能促进其乳酸的合成;而添加乙醇则会下调这些基因并抑制乳酸的合成。明确影响乳酸合成的关键环境因素将为进一步解析其乳酸代谢机制并且在发酵过程中调节乳酸合成提供重要的指导。

参考文献:

[1] ABDEL-RAHMAN M A,TASHIRO Y,SONOMOTO K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes[J]. **Biotechnology Advances**,2013,31(6):877-902.

[2] KIMOTO-NIRA H,MORIYA N,HAYAKAWA S,et al. Effects of rare sugar D-allulose on acid production and probiotic activities of dairy lactic acid bacteria[J]. **Journal of Dairy Science**,2017,100(7):5936-5944.

[3] VINUSHA K S,DEEPIKA K,JOHNSON T S,et al. Proteomic studies on lactic acid bacteria:a review[J]. **Biochemistry and Biophysics Reports**,2018,14(C):140-148.

[4] 杜海,邢敏钰,徐岩. 芝麻香型白酒酿造过程中乳酸菌分离及其碳源利用特征[J]. 食品与发酵工业,2018,44(1):13-18.

[5] LV X C,WENG X,ZHANG W,et al. Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine as determined by PCR-mediated DGGE[J]. **Food Control**,2012,28(2):426-434.

[6] LE L A Y,COTON E,LE B,et al. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and

propionibacteria[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2016, 239: 79-85.

[7] MAGNUSSON J, STROM K, ROOS S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2003, 219(1): 129-135.

[8] 吴莉莉, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群的差异性分析[J]. 微生物学通报, 2013(12): 28-34.

[9] KANG T S, KORBER D R, TANAKA T. Contributions of citrate in redox potential maintenance and ATP production: metabolic pathways and their regulation in *Lactobacillus panis* PM1 [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97 (19): 8693-8703.

[10] WIESE B G, STROHMAR W, RAINEY F A, et al. *Lactobacillus panis* sp. from sourdough with a long fermentation period[J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1996, 46(2): 449-453.

[11] OLSTORPE M, AXELSSON L, SCHNURER J, et al. Effect of starter culture inoculation on feed hygiene and microbial population development in fermented pig feed composed of a cereal grain mix with wet wheat distillers' grain[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 108(1): 129-138.

[12] YANG F, CHEN L Q, LIU Y F, et al. Identification of microorganisms producing lactic acid during solid-state fermentation of Maotai flavour liquor[J]. **Journal of Institution Brewing**, 2019, 125: 171-177.

[13] BUCK B L, AZCARATEPERIL M A, KLAENHAMMER T R. Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 107(1): 269-279.

[14] ENGQVIST M. Correlating enzyme annotations with a large set of microbial growth temperatures reveals metabolic adaptations to growth at diverse temperatures[J]. **BMC Microbiology**, 2018, 18(1): 177.

[15] KOPONEN J, LAAKSO K, KOSKENNIEMI K, et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. **Journal of Proteomics**, 2012, 75(4): 1357-1374.

[16] ANGELIS M D, GOBBETTI M. Environmental stress responses in Lactobacillus: a review[J]. **Proteomics**, 2004, 4(1): 106-122.

[17] FERNANDEZ A, OGAWA J, STEPHANIE P, et al. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*[J]. **Proteomics**, 2008, 8(15): 3154-3163.

[18] WU R, ZHANG W, SUN T, et al. Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2011, 147(3): 181-187.

[19] WILKINS J C, HOMER K A, BEIGHTON D. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(5): 2382-2390.

[20] WOUTERS J A, KAMPHUIS H H, HUGENHOLTZ J, et al. Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(9): 3686-3691.

[21] BONOMO M G, TOMASO K, CALABRONE L, et al. Ethanol stress in *Oenococcus oeni*: transcriptional response and complex physiological mechanisms[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2018, 125(1): 2-15.

[22] DINIZ R, VILLADA J, ALVIM M, et al. Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast kluyveromyces marxianus CCT 7735 under ethanol stress[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2017, 101(18): 6969-6980.

[23] SERRAZANETTI D, GUERZONI M, CORSETTI A, et al. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in *Lactobacilli*[J]. **Food Microbiology**, 2009, 26(7): 700-711.