

盐胁迫下枯草芽孢杆菌降解组胺的转录组学分析

邓义佳^{1,2}, 王润东^{1,2}, 檀茜倩¹, 李学鹏¹, 张宇昊^{2,3*}, 张 宾⁴, 励建荣^{1*}

¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

²西南大学食品科学学院 重庆 400715

³川渝共建特色食品重庆市重点实验室 重庆 400715

⁴浙江海洋大学食品与药学院 浙江舟山 316022

摘要 为探究枯草芽孢杆菌在盐胁迫下降解组胺的机制,以枯草芽孢杆菌 JZXJ-7 为试验菌株,在添加 170 mmol/L 和 340 mmol/L NaCl 的液态培养环境中培养 48 h,通过测定组胺降解率和菌落生长情况,同时对降解菌株进行转录组高通量测序,筛选不同 NaCl 添加组的菌株在降胺过程中的差异基因表达和相关代谢通路分析。结果表明,添加 170 mmol/L 和 340 mmol/L NaCl 后组胺的降解率显著高于空白组($P<0.05$),分别为 62.93% 和 84.87%;菌落总数显著增加($P<0.05$),分别为 4.13×10^5 CFU/mL 和 4.53×10^5 CFU/mL。转录组分析发现,盐胁迫组的差异表达基因显著上调,主要上调功能基因为丝氨酸乙酰转移酶、主协同转运蛋白超家族(MFS)转运蛋白和 I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶,显著下调的功能基因为组氨酸激酶、II 型 3-脱氢酸脱水酶和莽草酸脱氢酶。GO 功能富集分析主要涉及代谢过程、细胞转化、细胞解剖实体、结构分子活性、催化活性和结合能力等。KEGG 代谢途径涉及丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径、双组分系统和精氨酸生物合成等。研究结果说明,盐胁迫更有利于枯草芽孢杆菌促进基因表达,激活代谢通路,提高组胺降解率。本研究为后续菌株应用于食品发酵行业,进一步高效降解生物胺提供重要的理论基础和参考依据。

关键词 枯草芽孢杆菌; 组胺; 转录组; 降解率; 差异基因表达

文章编号 1009-7848(2024)08-0435-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.039

发酵水产品是水产品经微生物长期发酵,形成具有独特风味的酱汁调味料,如虾酱、鱼露、海鲜酱油等^[1-2]。然而,水产原料中富含蛋白质,发酵过程中易降解蛋白质形成游离氨基酸,具有脱羧酶活性的微生物将氨基酸脱羧转化形成生物胺(Biogenic amine, BAs),如组胺、腐胺、尸胺等^[3-4],其中组胺毒性最强,人体摄入过量将产生头痛、呕吐和腹泻等症状。有报道称虾酱^[5]和鱼露^[6]在发酵后组胺超标,含量高达 36.35 mg/kg 和 115.30 mg/kg,存在一定的安全隐患。

组胺是一种具有生物活性、含氮的低分子质量的有机碱性化合物,在水产品发酵过程中难以被降解^[7]。从部分发酵水产品中分离的细菌,在高

盐环境下具有显著的降解组胺的作用,可作为潜在发酵剂。如朱翠翠等^[8]从鱼露中分离库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*),50 mg/L 组胺降解率高达 98.61%。吴彩叶等^[9]从发酵鲭鱼中分离的产氮假单胞菌(*Pseudomonas azotoformans*),组胺降解率达 40.7%。目前,从发酵水产品中分离筛选降胺菌作为发酵剂,成为水产品加工过程中控制生物胺的重要途径。分离自高盐环境胁迫下的细菌,长期生存于逆环境条件下,自我保护及适应能力较强,对生物胺的降解能力尤为突出。然而,目前较多研究仅从效果方面评估菌株的降解能力,未探明其机制。研究团队从虾酱中分离出 1 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)JZXJ-7,其在盐胁迫下具有显著的降解组胺的能力。枯草芽孢杆菌为一种新型绿色益生菌型添加剂,已获我国批准使用,并获得欧洲食品安全局(EFSA)和美国食品药品监督管理局(FDA)的双重安全认证^[10-11]。枯草芽孢杆菌被报道在发酵过程中可产生大量细菌素如多黏菌素、枯草菌素,以及活性酶类如蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶等^[12],从仅应用于生物饲料添加^[13]和抑制致病

收稿日期: 2023-08-05

基金项目:“十三五”国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新重点专项(2019YFD0901702);国家自然科学基金项目(32201929;32202134);2022 年重庆市博士后特别资助项目

第一作者: 邓义佳,女,博士

通信作者: 张宇昊 E-mail: zhy1203@163.com

励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

菌^[4]方面,逐渐扩展到发酵食品的加工生产^[5]。芽孢杆菌属作为工业发酵菌种的益生效应已被发现,并应用于食品发酵过程中降解有害物质。

为进一步阐述枯草芽孢杆菌在发酵水产品中的降胺机制,以虾酱中分离的枯草芽孢杆菌 JZXJ-7 为研究对象,探究其在 170 mmol/L 和 340 mmol/L NaCl 胁迫下的降解组胺效应。通过转录组测序(RNA-Seq)技术分析发酵降解组胺过程中代谢途径基因表达差异图谱,为揭示枯草芽孢杆菌在盐胁迫下的降胺机理,开发绿色高效的除胺发酵剂提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验菌株 枯草芽孢杆菌 JZXJ-7(*Bacillus subtilis*, 保藏号:GDMCC62458),分离自虾酱,保藏于渤海大学食品科学与工程学院。

1.1.2 试验试剂 组胺标准品(≥98.3%),美国 Sigma 公司;Trizol Reagent 提取剂,美国 Invitrogen 公司;核糖体 RNA 去除试剂盒,Epicentre Ribozero 公司;NEBNext RNA 定向文库制备试剂盒,赛默飞世尔科技公司;AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒,上海生工生物有限公司;LB(Luria-Bertani)肉汤琼脂培养基(含胰蛋白胨 10.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,酵母浸粉 5.0 g/L,pH 值为 7.2~7.4),购于沈阳化学试剂厂;无菌 PBS 溶液(pH=7.4)、葡萄糖、氯化钠、酵母提取物、蛋白胨、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化锰、七水合硫酸镁、氯化钙、五水合硫酸铜、氯化钠、乙腈、乙酸铵、碳酸氢钠、氢氧化钠,分析纯级,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

NanoDropOne 超微量紫外分光光度计,美国 Thermo 公司;4200 TapeStation 自动化电泳系统,美国 Agilent 公司;LDZX-50KBS 立式蒸汽压力灭菌锅,上海申安医疗器械厂;JM-B 6002 电子天平,诸暨市超泽衡器设备有限公司;XW-80A 旋涡式振荡混合器,江西福迪医疗设备厂;H2050R 高速冷冻离心机,上海穗康仪器有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏州净化设备有限公司;SPX-250B-Z 生化培养箱,上海博讯实业有限公司;Agetent1100 高效液相色谱,美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌种子液制备 挑取枯草芽孢杆菌单菌落在 LB 肉汤琼脂培养基中 36 ℃ 培养 24 h 后,再以种子液 1% 接种量接种于 LB 培养基中,培养 24 h,随后 4 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min 收集菌体,用 pH=7.0 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次后,将菌体重悬于 2 mL PBS 溶液中备用。

1.3.2 枯草芽孢杆菌对组胺的降解率测定 配制 1 L 液体发酵培养基:内含 0.5% 葡萄糖、0.15% 酵母提取物、0.25% 蛋白胨、1 mmol/L KH_2PO_4 、1 mmol/L K_2HPO_4 、2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.6 mmol/L CaCl_2 、0.4 mmol/L MnCl_2 、2.5 mmol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,调节 pH=7.1,试验组分别添加 170 mmol/L 和 340 mmol/L NaCl,对照组不添加 NaCl。取 6 mL 发酵培养液,加入 50 mg/L 组胺标准溶液,将种子液以 1.5% 的接种量接种于培养基中,37 ℃、120 r/min 培养 48 h。分别测定对照组(ρ_0)与处理组(ρ_1)上清液中的组胺质量浓度(mg/L),按式(1)计算组胺的降解率。

$$\text{降解率}(\%) = (\rho_0 - \rho_1) / \rho_0 \times 100 \quad (1)$$

组胺检测参考李丽萍^[6]等的方法并稍作改进。培养液经 5 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 上清液加入乙腈水溶液(体积比 17:3)稀释定容至 5 mL 容量瓶中,过 0.22 μm 滤膜后经超高效液相色谱串联质谱仪分析。流动相为 A:乙腈,B:0.1% 甲酸-15 mmol/L 乙酸铵溶液,采用外标法定量。液相色谱柱:Hypersil Gold-C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm,5 μm),流速:0.3 mL/min,进样体积:2 μL ,柱温:35 ℃。

1.3.3 枯草芽孢杆菌菌落总数测定 分别取 48 h 培养的发酵液经适当稀释后,取 1 mL 涂布于 LB 肉汤琼脂培养基中,培养 24 h 后进行平板计数,计算菌落总数。

1.3.4 枯草芽孢杆菌降解组胺的 RNA 提取、检测及测序 培养液离心后收集菌体,液氮冻干后采用 Trizol 法提取样品总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳对 RNA 的降解程度和污染状况进行检测,用 Nonodrop 对 RNA 的浓度和纯度进行精确检测,检测合格后,使用核糖体 RNA 去除试剂盒去除核糖体 RNA。将上述检测合格后的总 RNA 送至广东美格基因科技有限公司,使用 NEB Next RNA 定

向文库制备试剂盒进行 Illumina 文库构建, 对于质检合格的文库将采用 Illumina 高通量测序平台进行 PE150 测序。对测序后得到的原始测序序列 (Raw reads) 质量进行评估, 并根据单个碱基质量值必须大于 15, 剪切滑窗的大小为 4 且滑窗内的平均质量值必须大于 20 和质控后 reads 的长度必须大于 75 bp 的要求进行数据质量控制。

1.3.5 差异表达基因分析及功能分析 将获得的高质量序列使用 Bowtie2 软件将质控后的测序数据与 Rfam 数据库中的核糖体序列进行比对, 得到去除核糖体的数据。再使用 Bowtie2 将去除核糖体的数据与参考基因组进行比对, 得到 BAM 格式的结果文件, 并统计比对结果。将比对数据用于基因表达量统计、表达量差异分析、功能注释分析 (GO 富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析)、功能富集分析, 阈值设置为 $P < 0.05$ 。

1.3.6 关键基因荧光定量 PCR 检测 分别提取处理后 3 组枯草芽孢杆菌菌株 RNA 并逆转录成

cDNA, 选择显著差异的甘氨酸/丝氨酸/苏氨酸代谢通路的 8 个差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 进行荧光定量 PCR 验证。使用 Primer Premier 6.0 软件对基因引物进行设计, 如表 1 所示, 引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。cDNA 逆转录反应混合物: 1 μ L 样品 RNA, 1 μ L 特异性引物, 9 μ L RNase free ddH₂O, 混匀后 1 000 r/min 离心 5 s, 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后冰浴 30 s, 再离心 5 s, 添加 4 μ L 5 \times Reaction Buffer, 1 μ L RNase Inhibitor (40 U/ μ L), 2 μ L dNTP Mix (10 mmol/L), 2 μ L AMV RT (10 U/ μ L), 轻轻混匀后离心 5 s。PCR 转录条件: 42 $^{\circ}$ C 50 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。再以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应, 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 120 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 45 个循环。以 *rpoB*^[17] 作为内参基因, 每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较目的基因的相对表达水平。

表 1 目的基因荧光定量 PCR 引物

Table 1 Fluorescent quantitative PCR primers of targeted genes

基因 ID	基因名	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
gene-F1602_88164	<i>rpoB</i>	F: TGTCCGCATGATCGCAC R: TCAAGCGTATTTTCGCAGGT	175
gene-F1602_03400	<i>aroQ</i>	F: GGTGCATAGTACCTCATG R: CTGACGTACGAATCGATA	263
gene-F1602_23710	<i>rpmE</i>	F: TCGATCGACTGACCATCG R: GTCTAGCATCCTGACTAC	152
gene-F1602_08025	<i>speB</i>	F: GTCGATGCATGCTAGCTA R: TCTTAGCGTATACTAGGT	117
gene-F1602_20275	<i>murC</i>	F: GTCATCGATCGATCCTAC R: CTATCGAGCTATCGATTG	169
gene-F1602_09635	<i>preA</i>	F: AGTCGATTCGATCCTAAC R: GTCCTAGCTAGGTCATTAG	158
gene-F1602_21020	<i>pcaH</i>	F: TGCTAGTAGCTAATCGTTA R: ATCGGCTAGGACCTAGAAC	134

1.4 数据分析

每组试验均重复 3 次, 数据表示为 “Mean \pm SD” 形式, 采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 检验, 使用 Graphpad Prism 9.0 进行作图分析, 以 $P < 0.05$ 标记为具有显著性差异。

2 结果与分析

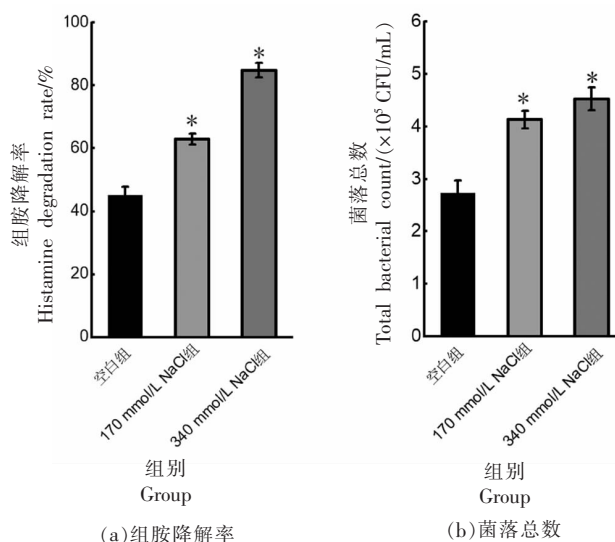
2.1 盐胁迫下枯草芽孢杆菌发酵降组胺能力及菌落总数测定

如图 1a 所示, 枯草芽孢杆菌发酵 48 h 后, 对组胺的降解能力较为显著。在空白组中枯草芽孢杆菌对组胺的降解率为 (45.18 \pm 3.97)% , 在 170

mmol/L NaCl 胁迫下,枯草芽孢杆菌降解率显著升高,达 $(62.93\pm 3.69)\%$ ($P<0.05$),而在 340 mmol/L NaCl 胁迫下,降解率高达 $(84.87\pm 5.35)\%$ ($P<0.05$),表明盐胁迫显著提高枯草芽孢杆菌的降解组胺的能力。在降解过程中,测得空白组的枯草芽孢杆菌菌落总数 $(2.73\pm 0.32)\times 10^5$ CFU/mL,在添加 NaCl 后,培养 48 h 菌落总数显著升高,分别为 4.13×10^5 CFU/mL 和 4.53×10^5 CFU/mL(图 1b)。

2.2 测序数据质量评估

将 3 个试验组处理后的枯草芽孢杆菌菌体样本进行转录组学测序分析,测得序列经质控后每个样本序列总数(Clean reads)均大于 1.1×10^7 条,原始数据 31.77 Gb,平均每个样品总碱基数为 3.53 Gb,Q20 范围为 99.01%~99.11%,Q30 范围为 96.11%~96.52%,GC 含量范围为 56.93%~59.37%,Clean bases 占总数据量的比例达的 92.33%以上(表 2)。数据评估结果表明过滤后所获得的序列质量较好,可靠性高,所选参考基因组能够满足后续分析的需求。



注:“*”表示添加 NaCl 组与空白组相比差异显著($P<0.05$)。

图 1 不同浓度 NaCl 胁迫下的枯草芽孢杆菌培养 48 h 对组胺的降解率(a)和菌落总数(b)

Fig.1 Degradation rate of histamine (a) and total bacteria counts (b) of *B. subtilis* after cultured for 48 h under different concentrations of salt stress

表 2 样本测序数据评估

Table 2 Evaluation of sample sequencing data

样本	质控后序列总数	总数据量/Gb	Q20/%	Q30/%	GC 含量/%	Clean bases 占总数据量 的比例/%
空白组-S1	11 167 082	3.26	99.10	96.43	56.93	93.24
空白组-S2	13 608 828	3.99	99.01	96.11	56.95	93.15
空白组-S3	12 732 729	3.72	99.09	96.38	57.29	93.42
170 mmol/L NaCl 组-S1	11 064 565	3.20	99.11	96.52	58.60	92.33
170 mmol/L NaCl 组-S2	11 762 116	3.42	99.03	96.28	59.37	92.75
170 mmol/L NaCl 组-S3	12 809 387	3.76	99.11	96.48	58.55	93.57
340 mmol/L NaCl 组-S1	13 261 777	3.89	99.05	96.27	58.58	93.07
340 mmol/L NaCl 组-S2	11 123 396	3.24	99.07	96.36	58.47	92.80
340 mmol/L NaCl 组-S3	11 348 915	3.29	99.10	96.46	58.57	92.37

注:Q20 表示碱基正确识别率在 99%以上的碱基所占百分比;Q30 表示碱基正确识别率在 99.9%以上的碱基所占百分比。

2.3 基因表达主成分分析和趋势分析

主成分分析(Principal component analysis, PCA)可对不同样本的基因表达等综合指标进行降维比较,经贡献得分与组间距离判断组间聚类程度及样品间的相关性^[18]。对 3 组枯草芽孢杆菌样品的基因表达差异规律进行 PCA 分析,得到第 1 主成分(PC1)的贡献率为 64%,第 2 主成分(PC2)的贡献率为 24%,空白组与 170 mmol/L

NaCl 组内样品聚类较紧密,分别位于第 1 象限和第 2 象限。340 mmol/L NaCl 组样本 S2 和 S3 主要聚类在第 3 象限,样本 S1 主要在第 4 象限(图 2),由 PCA 分析可得,2 个试验组与空白组相比基因表达均具有显著差异。

从趋势分析图可得(图 3),空白组基因表达量显著高于处理组的趋势 1,基因分配为 320, P 值为 0.00028,表明差异显著(图 3a)。基因表达趋

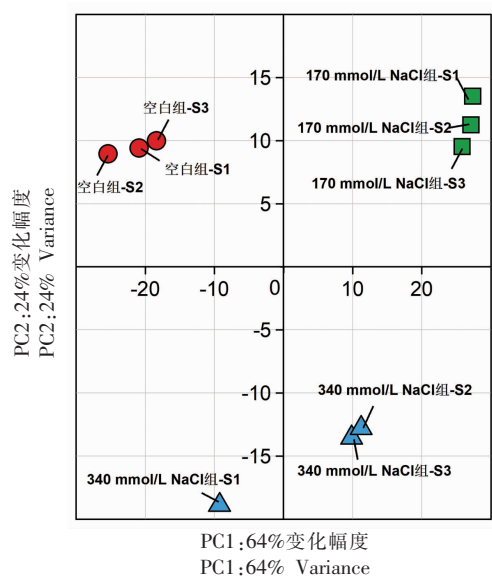


图 2 不同浓度 NaCl 处理枯草芽孢杆菌表达基因的主成分分析

Fig.2 Principal component analysis (PCA) gene expression of *B. subtilis* treated by different concentrations of NaCl

势 2、3、4 的 P 值显著高于 0.05, 判断为组间差异不显著(图 3b、3c、3d)。趋势 5 为组间基因表达量呈先升高后降低趋势, P 值为 9.5×10^{-11} , 表示为组间差异显著(图 3e)。趋势 6 为基因空白组的表达量低于 2 组试验组, 基因分配为 971, P 值为 1.8×10^{-25} , 表明基因趋势具有显著差异(图 3f)。趋势 7 为组间基因逐渐上升趋势, 基因分配为 321, P 值为 2.9×10^{-10} , 表明此趋势组间具有显著差异(图 3g)。

2.4 差异表达基因数量及种类分析

由组间两两比较分析得出, 170 mmol/L 试验组与空白组相比共检出基因总数 1 317 个, 其中显著上调基因为 803 个, 下调基因为 514 个(图 4a)。340 mmol/L 试验组与空白组相比得到显著差异表达基因共 1 042 个, 其中显著上调 569 个, 显著下调 473 个(图 4b)。170 mmol/L 组与 340 mmol/L 组相比, 得出显著差异基因总数为 174 个, 其中显著上调为 109 个, 显著下调为 65 个(图 4c)。

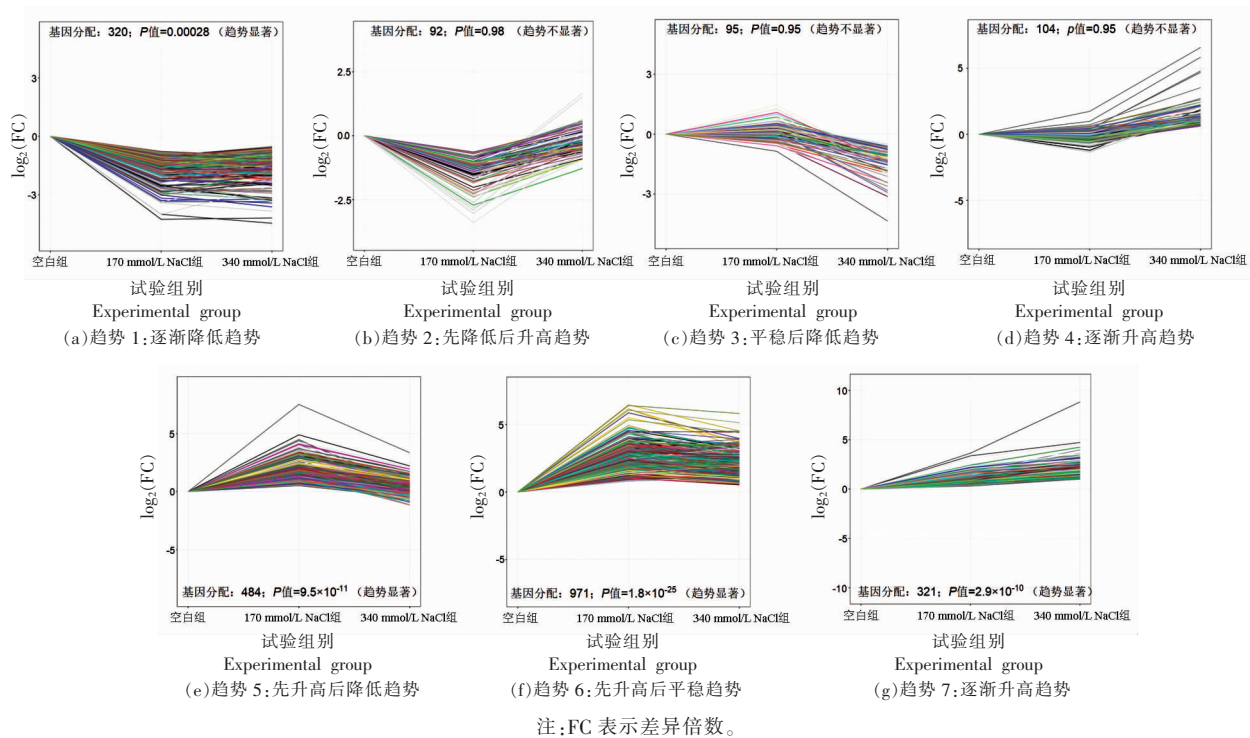


图 3 不同浓度 NaCl 处理对枯草芽孢杆菌表达基因趋势分析

Fig.3 Trend analysis of gene expression of *B. subtilis* after treated by different concentrations of NaCl

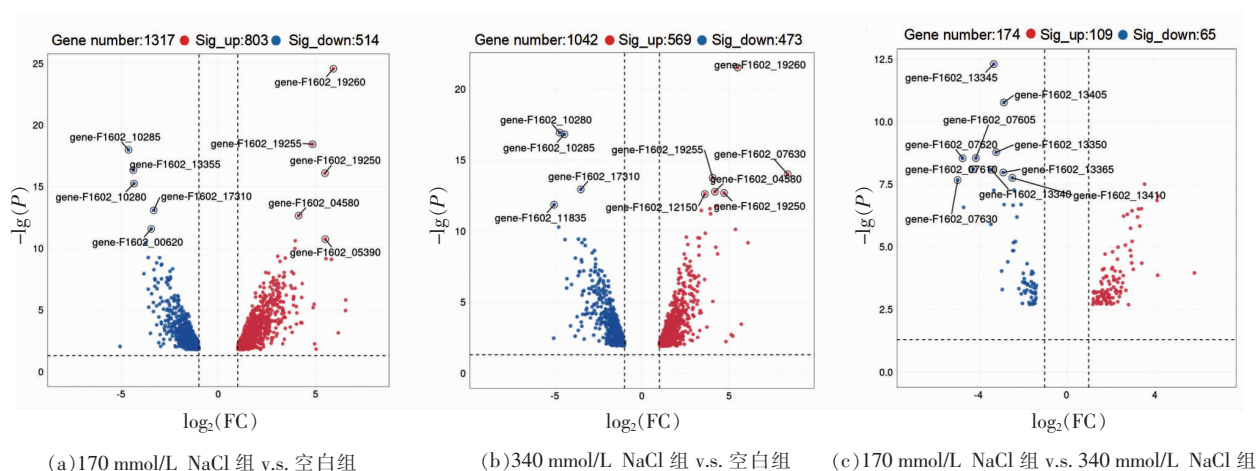


图4 基于组间比较的基因表达差异分析

Fig.4 Analysis of gene expression differences based on comparison between groups

经组间比较筛选得出 $\log_2(\text{FC})$ 绝对值大于 3 的表达基因, 得出 170 mmol/L NaCl 组与空白组显著上调的主要有丝氨酸乙酰转移酶, $\log_2(\text{FC})$ 值达 5.92, FDR 值为 1.13×10^{-21} 。其余主要有 AGE 家族差向异构酶、主协同转运蛋白超家族(MFS)转运蛋白、alanyl-tRNA 编辑蛋白质和 I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 4.13~5.51, P 值显著低于 0.001 且容错率 (False discovery rate, FDR) 较低, 为 7.56×10^{-16} ~ 7.66×10^{-9} 。显著下调的表达基因主要有组氨酸激酶、假定蛋白、莽草酸脱氢酶、PQQ-依赖性脱氢酶和 II 型 3-脱氢酸脱水酶, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 -4.62~-3.32, FDR 值为 1.46×10^{-15} ~ 1.26×10^{-9} 。

340 mmol/L NaCl 组与空白组相比显著上调的基因主要有 APC 家族通透酶和丝氨酸乙酰转移酶, $\log_2(\text{FC})$ 值分别为 8.37 和 5.49, 其余主要有

MFS 转运蛋白、I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶和 alanyl-tRNA 编辑蛋白质, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 3.60~4.71。显著上调基因 P 值范围为 3.02×10^{-22} ~ 2.45×10^{-13} , FDR 值为 1.29×10^{-18} ~ 1.16×10^{-10} 。显著下调基因主要有组氨酸激酶、II 型 3-脱氢酸脱水酶、莽草酸脱氢酶、CoA 转换酶亚基 A, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 -5.04~-3.51。

170 mmol/L NaCl 组与 340 mmol/L NaCl 组比较得出显著上调基因主要有脲酶亚基 γ 、SH3 结构域蛋白质、DUF4223 结构域蛋白质、D-甘油酸酯脱氢酶和假定蛋白, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 3.53~5.79。显著下调基因主要有 FAD-结合氧化还原酶、乙醛脱氢酶(NADP⁺)、4-羟脯氨酸差向酶、二氢二吡啶甲酸合酶家族蛋白和 APC 家族通透酶, $\log_2(\text{FC})$ 值范围为 -4.94~-4.11(表 3)。

表3 组间两两比较表达量差异较大的基因

Table 3 Genes with large differences in expression between groups

组间比较	基因 ID	$\log_2(\text{FC})$ 值	P 值	FDR 值	功能描述
170 mmol/L NaCl 组 v.s. 空白组	gene-F1602_19260	5.92	2.66×10^{-25}	1.13×10^{-21}	丝氨酸乙酰转移酶
	gene-F1602_05390	5.51	1.79×10^{-11}	7.66×10^{-9}	AGE 家族差向异构酶
	gene-F1602_19250	5.49	7.95×10^{-17}	6.79×10^{-14}	MFS 转运蛋白
	gene-F1602_19255	4.85	3.54×10^{-19}	7.56×10^{-16}	alanyl-tRNA 编辑蛋白质
	gene-F1602_04580	4.13	2.21×10^{-13}	1.18×10^{-10}	I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶
	gene-F1602_17310	-3.32	8.18×10^{-14}	4.99×10^{-11}	组氨酸激酶
	gene-F1602_00620	-3.45	2.65×10^{-12}	1.26×10^{-9}	假定蛋白
	gene-F1602_10280	-4.34	5.56×10^{-16}	3.95×10^{-13}	莽草酸脱氢酶

(续表 3)

组间比较	基因 ID	log ₂ (FC)值	P 值	FDR 值	功能描述
340 mmol/L NaCl 组 v.s.空白组	gene-F1602_13355	-4.38	4.48×10 ⁻¹⁷	4.78×10 ⁻¹⁴	PQQ-依赖性脱氢酶
	gene-F1602_10285	-4.62	1.02×10 ⁻¹⁸	1.46×10 ⁻¹⁵	II 型 3-脱氢酸脱水酶
	gene-F1602_07630	8.37	9.86×10 ⁻¹⁵	1.05×10 ⁻¹¹	APC 家族通透酶
	gene-F1602_19260	5.49	3.02×10 ⁻²²	1.29×10 ⁻¹⁸	丝氨酸乙酰转移酶
	gene-F1602_19250	4.71	2.05×10 ⁻¹³	1.09×10 ⁻¹⁰	MFS 转运蛋白
	gene-F1602_04580	4.18	1.68×10 ⁻¹³	1.02×10 ⁻¹⁰	I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶
	gene-F1602_19255	4.05	1.76×10 ⁻¹⁴	1.51×10 ⁻¹¹	alanyl-tRNA 编辑蛋白质
	gene-F1602_12150	3.60	2.45×10 ⁻¹³	1.16×10 ⁻¹⁰	MFS 转运蛋白
	gene-F1602_17310	-3.51	1.15×10 ⁻¹³	8.16×10 ⁻¹¹	组氨酸激酶
	gene-F1602_10285	-4.45	1.51×10 ⁻¹⁷	2.15×10 ⁻¹⁴	II 型 3-脱氢酸脱水酶
170 mmol/L NaCl 组 v.s.340 mmol/L NaCl 组	gene-F1602_10280	-4.73	1.15×10 ⁻¹⁷	2.15×10 ⁻¹⁴	莽草酸脱氢酶
	gene-F1602_11835	-5.04	1.37×10 ⁻¹²	5.84×10 ⁻¹⁰	CoA 转换酶亚基 A
	gene-F1602_13790	5.79	1.10×10 ⁻⁵	8.48×10 ⁻⁶	脲酶亚基 γ
	gene-F1602_07560	4.15	9.35×10 ⁻⁸	2.85×10 ⁻⁵	SH3 结构域蛋白质
	gene-F1602_07575	4.12	1.35×10 ⁻⁵	9.76×10 ⁻⁴	DUF4223 结构域蛋白质
	gene-F1602_13110	4.10	1.39×10 ⁻⁷	3.94×10 ⁻⁵	D-甘油酸酯脱氢酶
	gene-F1602_07565	3.53	3.08×10 ⁻⁸	1.19×10 ⁻⁵	假定蛋白
	gene-F1602_07605	-4.11	2.84×10 ⁻⁹	2.45×10 ⁻⁶	FAD-结合氧化还原酶
	gene-F1602_07610	-4.23	7.86×10 ⁻⁹	5.00×10 ⁻⁶	乙醛脱氢酶(NADP ⁺)
	gene-F1602_07625	-4.66	2.62×10 ⁻⁷	5.88×10 ⁻⁵	4-羟脯氨酸差向酶
gene-F1602_07620	-4.71	2.87×10 ⁻⁹	2.45×10 ⁻⁶	二氢二吡啶甲酸合酶家族蛋白	
gene-F1602_07630	-4.94	2.13×10 ⁻⁸	9.07×10 ⁻⁶	APC 家族通透酶	

2.5 差异表达基因的 GO 功能富集分析

对枯草芽孢杆菌在盐胁迫下降解组胺的差异表达基因进行 GO 功能注释分析,结果如图 5 所示,得出差异表达基因主要来自催化活性、细胞解剖实体和代谢过程 3 大类,共有 305 个基因来自催化功能,主要与结合功能有关,基因个数达 182 个,其次为结构分子活性、转运蛋白活性和转录调节活性,差异基因分别为 47,38,22 个。细胞解剖实体功能分类所含较少,主要与蛋白复合物和细胞实体有关。参与代谢过程的差异基因共有 365 个,主要与细胞过程、生物调节和细胞定位有关,差异基因数量分别为 194,71,58 个。

对两两组间的 GO 功能分析差异比较分析,结果如图 6 所示,170 mmol/L NaCl 组与空白组相比,关于代谢过程、细胞转化、细胞解剖实体、结构分子活性、催化活性和结合能力的差异表达基因数量显著上调(图 6a)。340 mmol/L NaCl 组与空白组相比,差异基因功能富集分类与 170 mmol/L NaCl 组相同,而上调基因显著降低,主要基因来

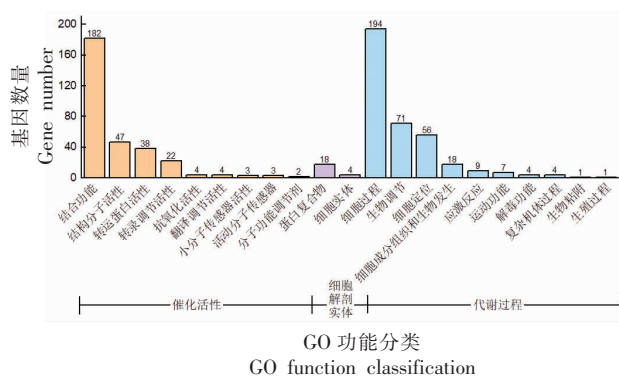


图 5 盐胁迫下枯草芽孢杆菌差异表达基因 GO 功能分类统计

Fig.5 GO functional annotations of DEGs in *B. subtilis* under salt stress

源途径为代谢过程、催化活性和结合能力,下调基因显著多于上调基因(图 6b)。170 mmol/L NaCl 组与 340 mmol/L NaCl 组相比,代谢过程、细胞转化、细胞解剖实体、催化活性和结合能力差异表达基因显著上调。

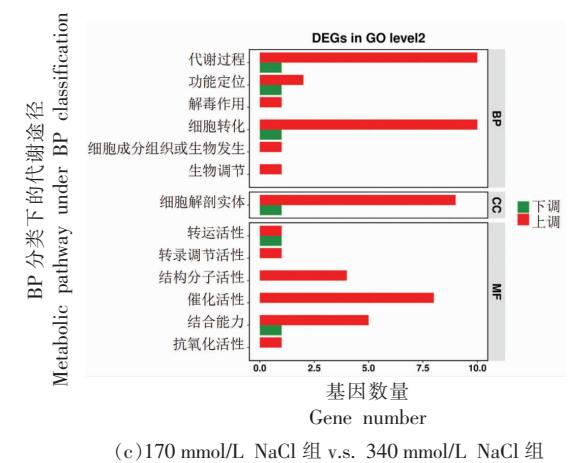
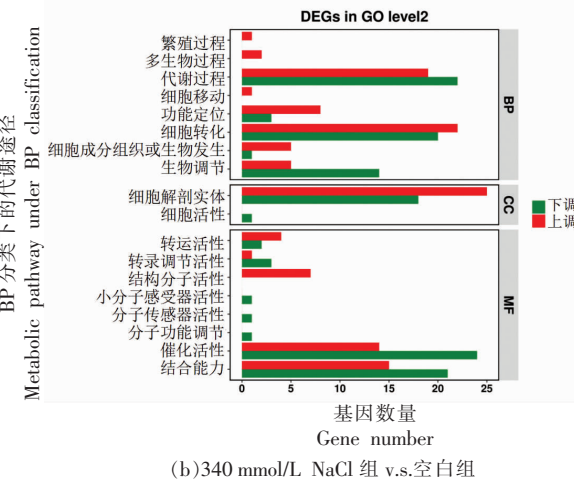
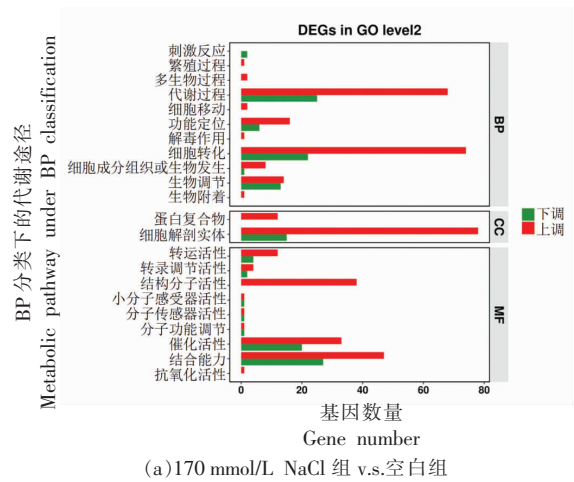


图 6 GO 功能富集的组间比较差异分析

Fig.6 Intergroup comparative difference analysis of GO functional enrichment

2.6 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对枯草芽孢杆菌经盐胁迫下降解组胺的 KEGG 代谢通路进行显著性分析，如图 7 所示，

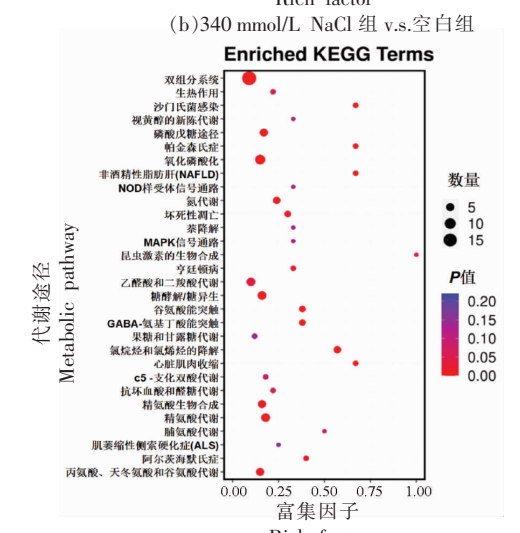
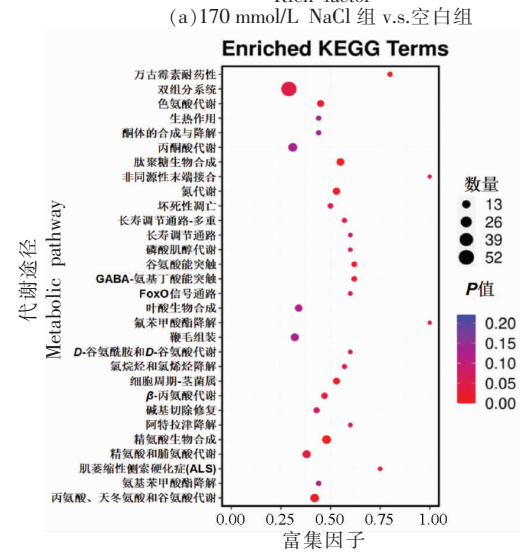
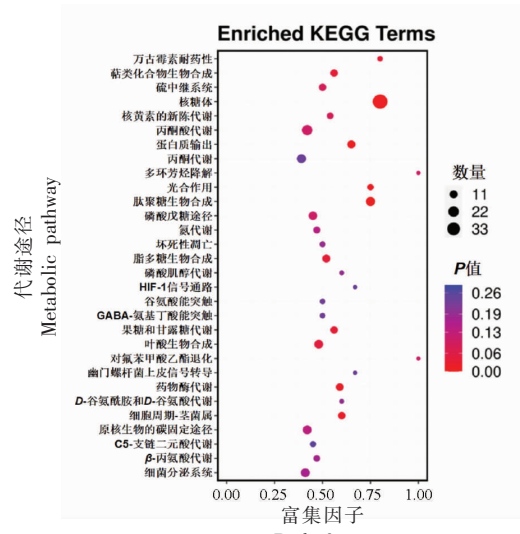


图 7 差异表达基因 KEGG 功能富集分析

Fig.7 KEGG pathway functional enrichment analysis of DEGs

170 mmol/L NaCl 组与对照组相比,富集程度较高,差异基因数目较多的相关途径有核糖体、肽聚糖生物合成、丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径和蛋白质输出等(图 7a),340 mmol/L NaCl 组与对照组相比,差异表达基因主要富集的代谢通路为双组分系统、肽聚糖生物合成、丙酮酸代谢、氮代谢、精氨酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢等。170 mmol/L NaCl 组与 340 mmol/L NaCl 组相比,主要富集的代谢通路有双组分系统、磷酸戊糖途径、氧化磷酸化、乙醛酸和二羧酸代谢、糖酵解/糖异生、精氨酸生物合成、精氨酸代谢和脯氨酸代谢等。

2.7 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

对前期筛选出的枯草芽孢杆菌相对表达量差别较大的 6 个基因,选择 170 mmol/L NaCl 组与空白组培 48 h 后进行 RT-qPCR 验证,如图 8 所示,经验证得出基因 gene-F1602_03400(*aroQ*)与 gene-F1602_20275(*murC*)的 PCR 相对表达量虽与测序结果一致为正值,但高于测序结果, $\log_2(\text{FC})$ 值为 4.75 和 5.46, gene-F1602_23710(*rpmE*)和 gene-F1602_08025(*speB*)的 PCR 相对表达量低于测序结果, $\log_2(\text{FC})$ 值为 2.22 和 1.80, gene-F1602_09635(*preA*)和 gene-F1602_21020(*pcaH*)的 PCR 相对表达量为负值,与测序结果一致。6 个基因的表达量变化趋势与测序结果相符,表明转录组测序的分析结果准确可靠。

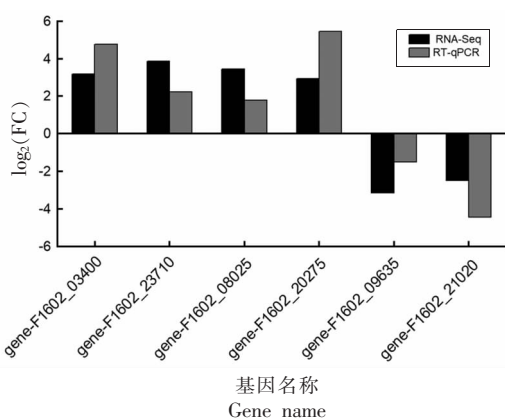


图 8 枯草芽孢杆菌差异表达基因 RT-qPCR 验证结果
Fig.8 RT-qPCR validation results of DEGs in *B. subtilis*

3 讨论

水产发酵制品目前已逐渐成为消费者青睐的

食品,随着国家和公众对食品安全的重视程度和要求越来越高,有效控制发酵过程中的生物胺迫在眉睫。近年来,通过从发酵产品中分离筛选出能高效降解组胺的潜在有益菌株。目前已有多种降解菌株被筛选分离,如植物乳杆菌(*Lactobacillus kplantarum*)^[19]、库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)^[18]和盐反硝化枝芽孢杆菌(*Virgibacillus halodenitrificans*)^[20]等,虽然这些降解菌的代谢酶活性及降解率已进行研究,但在盐胁迫下的代谢机制尚不清楚。本研究利用 RNA-seq 技术研究枯草芽孢杆菌在盐胁迫下降解组胺的基因表达差异,旨在探寻驱动芽孢杆菌降解生物胺的主要代谢途径,为今后对绿色降解菌的功能开发和潜在应用提供理论依据。

经测序结果表明,170 mmol/L NaCl 处理后,上调基因为 803 个,而 340 mmol/L NaCl 处理后表达基因上调 569 个,表明盐度升高对基因表达具有抑制效应。然而,降解率逐渐升高,枯草芽孢杆菌在 340 mmol/L 盐胁迫下对组胺的降解率达 84.87%,且菌落总数增加,说明在适当盐胁迫条件下,枯草芽孢杆菌的自我保护能力被激活,导致抗逆能力增强。在食品加工过程中,强酸碱、高温、高渗透压和高盐胁迫环境使存在于食品中细菌在抗逆性和功能性基因表达方面显著增强,称为交叉保护作用(Cross protection)。Vlker 等^[21]曾报道了盐胁迫可使枯草芽孢杆菌的 GroEL、DnaK 和 ClpP 应激蛋白表达增强,可保护细胞免受致命盐应激的伤害。通过转录组发现,枯草芽孢杆菌经 170 mmol/L 和 340 mmol/L 的 NaCl 处理后,在高效降解组胺的同时,会驱动大多数基因显著表达,其中相对表达量较高的有丝氨酸乙酰转移酶(Serine acetyltransferase, SAT)和 I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶(Type I secretion system permease/ATPase)。丝氨酸乙酰转移酶是催化丝氨酸转化为氧乙酰丝氨酸的反应,合成半胱氨酸的关键酶,是目前发现的耐盐基因之一,与抗氧化防御和钠稳态有关^[22]。半胱氨酸产量的增加可增强细胞菌株对渗透胁迫的抵抗力,如大肠杆菌对通过积累丝氨酸乙酰基转移酶增强对镍和钴的抗性^[23]。因此,在盐胁迫条件下,枯草芽孢杆菌的丝氨酸乙酰转移酶基因表达显著增强了对盐胁迫的耐受性,使菌

落总数在盐胁迫下呈显著升高趋势。另外,ATP 酶的表达升高表明枯草芽孢杆菌在降解组胺过程中释放大量能量,供给菌体的繁殖与代谢。MFS 转运蛋白作为一类跨膜运输的重要协助蛋白,承担机体转运单糖、多糖、氨基酸、微生物等小分子的功能,同时还在病毒入侵、病菌抗药性、外源物质转运方面具有重要作用^[24]。楼杨^[25]发现对禾谷镰刀菌 MFS 蛋白在抑菌物质胁迫下参与调控禾谷镰刀菌对咪唑胺、戊唑醇、咯菌腈和异菌脲等多种药剂的转运。本研究中枯草芽孢杆菌的 MFS 蛋白在 170 mmol/L 和 340 mmol/L NaCl 胁迫组与对照组相比均显著表达,推断其与协助钠离子与组胺及代谢产物的外排有关。另外,枯草芽孢杆菌的 II 型 3-脱氢酸脱水酶和莽草酸脱氢酶基因的表达显著降低,这两种酶属于莽草酸途径,可催化生成莽草酸和没食子酸,是连接初级代谢和次级代谢的桥梁^[26],表明在盐胁迫下,枯草芽孢杆菌降解组胺导致莽草酸代谢途径收到抑制。

经 GO 功能富集分析发现,枯草芽孢杆菌降解组胺过程中的表达基因主要富集在代谢过程、细胞转化、细胞解剖实体、催化活性和结合能力方面。其中代谢过程占比较高,主要有磷酸戊糖途径、氧化磷酸化、乙醛酸和二羧酸代谢、糖酵解/糖异生途径等,表明菌株在降解组胺过程中,大量代谢供能途径被激活。通过 KEGG 代谢途径分析,得出在 340 mmol/L NaCl 胁迫下降解组胺的过程中,枯草芽孢杆菌的差异表达基因主要来源于双组分系统。双组分系统(Two component system, TCS)是细菌信号转导的重要形式,在生物体内感知和传递信号,并对细胞内环境变化进行适应性反应,广泛参与细菌生长代谢、分裂繁殖、抗菌耐药性等生理过程^[27]。组氨酸激酶作为 TCS 重要的膜传感器激酶,参与调控细胞耐药、抗菌、渗透压和应激等功能。本研究中,盐胁迫显著抑制枯草芽孢杆菌的组氨酸激酶基因表达,表明菌株在盐渗透方面的适应性较弱,可能通过提高外排泵相关基因表达,提高对组胺的降解能力。近年来,枯草芽孢杆菌作为适应性较强的非致病性革兰氏阳性菌,广泛应用于多种有害物质的降解,如脱氧雪腐镰刀菌烯醇^[28]、邻苯二甲酸酯^[29]和芳香烃^[30]等。丰富的酶系统提高了自身的抗逆性和环境适应性,

为促进枯草芽孢杆菌在食品加工及安全方面的工业化应用提供良好基础。

4 结论

本试验通过 RNA-Seq 转录组测序探究了枯草芽孢杆菌在盐胁迫下降解组胺的机制。结果表明,170 mmol/L NaCl 激活 803 个基因上调,340 mmol/L NaCl 激活 569 个基因上调。显著上调的基因主要有丝氨酸乙酰转移酶、MFS 转运蛋白、I 型分泌系统渗透酶/ATP 酶,下调的基因主要有组氨酸激酶、莽草酸脱氢酶和 II 型 3-脱氢酸脱水酶。GO 功能富集主要涉及代谢过程、细胞转化、细胞解剖实体、结构分子活性、催化活性和结合能力等。KEGG 代谢途径主要涉及丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径、双组分系统和精氨酸生物合成等。实时荧光定量 PCR 验证了该通路中部分 DEGs 的转录水平。本研究为枯草芽孢杆菌在盐胁迫下降解生物胺的广泛应用提供重要的理论基础和参考依据。

参 考 文 献

- [1] NGUYEN A D Q, SEKAR A, KIM M, et al. Fish sauce fermentation using *Marinococcus halotolerans* SPQ isolate as a starter culture[J]. Food Science and Nutrition, 2020, 9(2): 651-661.
- [2] YU J, LU K, SUN J Y, et al. The flavor and antioxidant activity change pattern of shrimp head paste during fermentation[J]. Journal of Ocean University of China, 2022, 21(1): 195-203.
- [3] JIANG W, XU Y, LI C S, et al. Biogenic amines in commercially produced Yulu, a Chinese fermented fish sauce[J]. Food Additives and Contaminants: Part B-Surveillance, 2014, 7(1): 25-29.
- [4] SANG X, LI K X, ZHU Y L, et al. The impact of microbial diversity on biogenic amines formation in grasshopper sub shrimp paste during the fermentation [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 782.
- [5] LI W Y, LU H Q, HE Z H, et al. Quality characteristics and bacterial community of a Chinese salt-fermented shrimp paste[J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 136(2): 110358.
- [6] MA X X, SANG X, YAN C Y et al. Dynamics of bacterial composition and association with quality

- formation and biogenic amines accumulation during fish sauce spontaneous fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(13): e0069022.
- [7] CHUNG B Y, PARK S Y, BYUN Y S, et al. Effect of different cooking methods on histamine levels in selected foods[J]. Annals of Dermatology, 2017, 29(6): 706-714.
- [8] 朱翠翠, 王海英, 赵玉莹, 等. 鱼露中组胺降解菌的分离筛选及耐受性[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(3): 8-15.
- ZHU C C, WANG H Y, ZHAO Y Y, et al. Isolation, screening and tolerance of histamine degrading strains from fish sauce[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(3): 8-15.
- [9] 吴彩叶, 汤海青, 欧昌荣. 发酵鲭鱼中一株组胺降解菌的系统发育分析及特性研究[J]. 核农学报, 2022, 36(4): 795-803.
- WU C Y, TANG H Q, OU C R. Phylogenetic analysis and characterization of a histamine-degrading strain in fermented mackerel and its growth and degradation characteristics[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(4): 795-803.
- [10] URDACI M C, LEFEVRE M, LAFFORGUE G, et al. Antidiarrheal action of *Bacillus subtilis* CU1 CNCM I-2745 and *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4547 in mice[J]. Frontiers In Microbiology, 2018, 9(9): 1537.
- [11] JEZEWSKA-FRACKOWIAK J, SEROCZYNSKA K, BANASZCZYK J, et al. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species[J]. Acta Biochimica Polonica, 2018, 65(4): 509-519.
- [12] 王宏浩, 张高瑜, 逯梦凡, 等. 枯草芽孢杆菌 ZX-11 培养条件及抑菌性能研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 138-143.
- WANG H H, ZHANG G Y, LU M F, et al. Culture conditions and antibacterial property of *Bacillus subtilis* ZX-11[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 138-143.
- [13] KRUSE S, PIERRE F, MORLOCK G E. Effects of the probiotic activity of *Bacillus subtilis* DSM 29784 in cultures and feeding stuff[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(38): 11272-11281.
- [14] SHARMA G, DANG S, GUPTA S, et al. Antibacterial activity, cytotoxicity, and the mechanism of action of bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101[J]. Medical Principles and Practice, 2018, 27(2): 186-192.
- [15] CAI C C, ZHANG M, CHEN H M, et al. Enhancement of norisoprenoid and acetoin production for improving the aroma of fermented mango juice by *Bacillus subtilis*-HNU-B3[J]. Process Biochemistry, 2022, 113: 177-184.
- [16] 李丽萍, 范赛, 张楠, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定红酒中4种生物胺含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4883-4888.
- LI L P, FAN S, ZHANG N, et al. Determination of 4 kinds of biogenic amines in wine by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(12): 4883-4888.
- [17] NEL S, DAVIS S B, ENDO A, et al. Differentiation between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* isolated from a South African sugarcane processing factory using ARDRA and *rpoB* gene sequencing[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(10): 1453-1457.
- [18] YANG W L, ZHAO P, LIU Y, et al. Transcriptome analysis of lncRNA expression patterns in human congenital lung malformations[J]. BMC genomics, 2021, 22(1): 861.
- [19] NIU T, LI X, GUO Y, et al. Identification of a lactic acid bacteria to degrade biogenic amines in Chinese rice wine and its enzymatic mechanism[J]. Foods, 2019, 8(8): 312.
- [20] 赵一睿, 桑雪, 毕景然, 等. 螭虾酱中生物胺降解菌的特性及应用[J]. 大连工业大学学报, 2022, 41(1): 1-6.
- ZHAO Y R, SANG X, BI J R, et al. Characteristics research and application of biogenic amine degrading bacteria in grasshopper sub shrimp paste[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2022, 41(1): 1-6.
- [21] VLKER U, MACH H, SCHMID R, et al. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1992, 138(10): 2125-2135.
- [22] SERRANO R, MONTESINOS C, GAXIOLA R, et al. Functional genomics of salt tolerance: The yeast overexpression approach[J]. Acta Horticulturae, 2003, 609: 31-38.
- [23] FREEMAN J L, PERSANS M W, NIEMAN K, et

- al. Nickel and cobalt resistance engineered in *Escherichia coli* by overexpression of serine acetyltransferase from the nickel hyperaccumulator plant *Thlaspi goesingense* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8627–8633.
- [24] VARELA J A, PURICELLI M, MONTINE N, et al. Expansion and diversification of MFS transporters in *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3330.
- [25] 楼杨. 禾谷镰刀菌 MFS 蛋白应对环境胁迫的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- LOU Y. Function analysis of MFS transporters in response to environmental stresses in *Fusarium graminearum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [26] 孙平, 章国营, 向萍, 等. 茶树中莽草酸途径 DHD/SDH 基因的表达调控[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(2): 322–327.
- SUN P, ZHANG G Y, XIANG P, et al. Expression and regulation of the shikimic acid pathway gene DHD/SDH in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(2): 322–327.
- [27] 李莹玉, 贺小贤, 蒋合阳, 等. 组氨酸激酶 BaeS 对溶藻弧菌毒力因子和环境应激的作用[J]. *陕西科技大学学报*, 2022, 40(1): 57–64.
- LI Y Y, HE X X, JIANG H Y, et al. Effect of histidine kinase baes on virulence factors and environmental stress of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Shaanxi University of Science and Technology*, 2022, 40(1): 57–64.
- [28] JIA R, CAO L R, LIU W B, et al. Detoxification of deoxynivalenol by *Bacillus subtilis* ASAG 216 and characterization the degradation process[J]. *European Food Research and Technology*, 2021, 247 (1): 67–76.
- [29] XU Y Q, LIU X, ZHAO J R, et al. An efficient phthalate ester-degrading *Bacillus subtilis*: Degradation kinetics, metabolic pathway, and catalytic mechanism of the key enzyme[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 273: 116461.
- [30] VELUPILLAIMANI D, MUTHAIYAN A. Potential of *Bacillus subtilis* from marine environment to degrade aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Sustainability*, 2019, 2(4): 381–389.

Transcriptomic Analysis of Histamine Degradation by *Bacillus subtilis* under Salt Stress

Deng Yijia^{1,2}, Wang Rundong^{1,2}, Tan Xiqian¹, Li Xuepeng¹, Zhang Yuhao^{2,3*}, Zhang Bin⁴, Li Jianrong^{1*}

¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715

³Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715

⁴College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang)

Abstract In order to explore the mechanism of histamine degradation of *Bacillus subtilis* under salt stress, *B. subtilis* JZXJ-7 was used as the experimental strain, and cultured in liquid culture environment with 170 mmol/L and 340 mmol/L NaCl for 48 h. Histamine degradation rate and colony growth were measured, and transcriptome high-throughput sequencing was performed on the degraded strain. The differential gene expression and related metabolic pathways of strains in different NaCl addition groups were detected during reducing amine process. Results showed that the degradation rate of histamine after adding 170 mmol/L and 340 mmol/L NaCl was significantly higher than control group ($P < 0.05$), which were 62.93% and 84.87%, respectively. The total number of colonies was significantly increased ($P < 0.05$), which were 4.13×10^5 CFU/mL and 4.53×10^5 CFU/mL, respectively. Transcriptome analysis showed that differentially expressed genes were significantly up-regulated in the salt stress group, and the main up-regulated functional genes were serine acetyltransferase, major facilitator superfamily (MFS) transporter and type I secretory system penetrase. The significantly down-regulated functional genes were histidine kinase, type II 3-dehydroate dehydrase and shikimic dehydrogenase. GO functional enrichment analysis mainly involved metabolic process, cell transformation, cell anatomical entity, structural molecular activity, catalytic activity and binding ability. The metabolic pathway of KEGG involved pyruvate metabolism, pen-

tose phosphate pathway, two-component system and arginine biosynthesis. Results revealed that salt stress was more conducive to *B. subtilis* to promote gene expression, activate metabolic pathways, and increase histamine degradation rate. This study provided an important theoretical basis and reference for the subsequent strains to be applied in food fermentation industry to further degrade biogenic amines efficiently.

Keywords *Bacillus subtilis*; histamine; transcriptome; degradation rate; differential gene expression