



比较基因组学解析谷物醋醅中巴氏醋杆菌和欧洲驹形杆菌的功能差异

彭铭烨^{1,2}, 黄婷^{1,2}, 张晓娟^{2,3}, 柴丽娟^{2,3}, 陆震鸣^{2,3}, 史劲松^{3,4}, 许正宏^{1,2,3,5*}

- 1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122
- 4 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122
- 5 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

彭铭烨, 黄婷, 张晓娟, 柴丽娟, 陆震鸣, 史劲松, 许正宏. 比较基因组学解析谷物醋醅中巴氏醋杆菌和欧洲驹形杆菌的功能差异[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 638-655.

PENG Mingye, HUANG Ting, ZHANG Xiaojuan, CHAI Lijuan, LU Zhenming, SHI Jinsong, XU Zhenghong. Comparative genomics reveals the functional differences between *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus* in vinegar pei of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 638-655.

摘要: 【目的】基于比较基因组分析, 探究镇江香醋醋醅中不同醋酸菌的功能差异。【方法】利用分离培养技术结合 16S rRNA 基因全长测序获得不同分类地位的醋酸菌; 应用比较基因组学结合发酵性能实现不同醋酸菌生长和代谢的差异比较。【结果】巴氏醋杆菌和欧洲驹形杆菌为镇江香醋醋醅中的主要醋酸菌。其中, 欧洲驹形杆菌的 GC 含量更高、基因组更大。功能注释结果表明巴氏醋杆菌和欧洲驹形杆菌的碳水化合物、氨基酸相关基因数量及种类差异较大, 欧洲驹形杆菌的碳水化合物活性酶数量更多。相比巴氏醋杆菌, 欧洲驹形杆菌中富集的功能差异基因主要参与磷酸戊糖途径、脂肪酸生物合成、果糖和甘露糖代谢等代谢途径。验证结果表明欧洲驹形杆菌可通过产生更多的乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和大量的 ATP, 并改变细胞膜脂肪酸组成来提高乙醇的转化率。【结论】明确了巴氏醋杆菌和欧洲驹形杆菌基因之间的差异。欧洲驹形杆菌通过更多的能量积累、更高的乙醇转化相关酶活性和细胞膜脂肪酸组成的改变, 来改善胞内微环境以适应高酸环境。本研究得到的结果可加深对不同醋酸菌耐酸机制的理解。

关键词: 比较基因组; 镇江香醋; 醋醅; 功能差异

资助项目: 国家自然科学基金(31771967)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31771967).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206, E-mail: zhengxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-06-01; Accepted: 2022-07-25; Published online: 2022-10-08

Comparative genomics reveals the functional differences between *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus* in vinegar pei of Zhenjiang aromatic vinegar

PENG Mingye^{1,2}, HUANG Ting^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{2,3}, CHAI Lijuan^{2,3}, LU Zhenming^{2,3}, SHI Jinsong^{3,4}, XU Zhenghong^{1,2,3,5*}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Jiangsu Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

5 National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

Abstract: [Objective] To explore the functional differences of different acetic acid bacteria in the vinegar pei of Zhenjiang aromatic vinegar via comparative genomics. **[Methods]** The taxonomic status of acetic acid bacteria were identified by culture-dependent technology and 16S rRNA gene full-length sequencing. The growth and metabolism of different acetic acid bacteria were compared by comparative genomic analysis combined with fermentation performance tests. **[Results]** *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus* were the main acetic acid bacteria in the vinegar pei of Zhenjiang aromatic vinegar. *K. europaeus* had higher GC content and larger genome than *A. pasteurianus*. Functional annotation showed that the number and types of the genes involved in carbohydrate and amino acid metabolism varied greatly between *A. pasteurianus* and *K. europaeus*, and the number of carbohydrate-active enzymes was higher in *K. europaeus*. The functionally differential genes in *K. europaeus* compared with *A. pasteurianus* were mainly involved in the pentose phosphate pathway, fatty acid biosynthesis, and fructose and mannose metabolism. The verification experiment showed that *K. europaeus* increased the conversion rate of alcohol by producing more alcohol dehydrogenase, acetaldehyde dehydrogenase, and ATP and changing the fatty acid composition of the cell membrane. **[Conclusion]** This study revealed the genetic differences between *A. pasteurianus* and *K. europaeus* in vinegar pei. *K. europaeus* can improve the intracellular microenvironment to adapt to the high acid environment by massively producing energy and the enzymes involved in ethanol conversion and changing the composition of fatty acids in cell membrane. The results of this study can deepen the understanding of the acid tolerance mechanisms of different acetic acid bacteria.

Keywords: comparative genome; Zhenjiang aromatic vinegar; vinegar pei; functional difference

醋酸菌作为一种重要的酿造微生物种类, 具有独特的氧化糖或酒精的能力, 广泛分布于含糖、酒精和酸性环境中, 尤其是发酵食品和

饮料^[1]。乙酸是醋酸菌的主要代谢终产物, 既可改善发酵食品的风味, 又能增强醋酸菌在工业生产中的生态位优势^[2]。迄今为止, 对

醋酸菌的研究已有 100 多年的历史。随着分子生物学方法的不断发展,大致可将醋酸菌分为 18 个属^[3],其中醋杆菌属(*Acetobacter*)、驹形杆菌属(*Komagataeibacter*)、葡糖醋杆菌属(*Gluconobacter*)和葡糖酸醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)由于具有良好的醋酸发酵能力和耐酸特性^[4],被广泛用于食醋的工业生产。巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)可耐受 6%–10%的乙酸,在亚洲通常用于液态及固态谷物醋的工业生产^[5-6];在欧洲,欧洲驹形杆菌(*Komagataeibacter europaeus*)被用于深层液态食醋及乙酸的工业生产,其能耐受约 15%–20%的乙酸^[4-5]。在乙酸发酵过程中,基于细胞膜上的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)和乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)的两步连续反应可将乙醇不完全氧化为乙酸^[7]。

随着高通量测序技术的普及,越来越多的醋酸菌菌株全基因组序列信息得以完善,为醋酸菌生物学分类及功能基因的发现奠定了基础。通过对不同亲缘关系物种的基因组进行比较基因组学分析,了解不同物种在基因组结构、基因功能等不同方面的异同,进而得到相关功能基因预测与定位、系统进化关系等方面的信息,有助于筛选与生态适应性相关的适应性变异,进一步明确醋酸菌的功能差异^[8]。早期的比较基因组学分析表明,与 *A. pasteurianus* 相比,*K. europaeus* 的基因组能编码相对较多的膜结合 ADH,且 *K. europaeus* 产生的膜结合 ADH 酶活力和稳定性均优于 *A. pasteurianus*^[9-10]。Wang 等^[11]应用比较基因组学对 2 株 *K. europaeus* 和 4 株 *A. pasteurianus* 进行研究,结果表明 *K. europaeus* 比 *A. pasteurianus* 具有更多编码假定 ABC 转运蛋白的基因。此外,*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 (非纤维素产生菌)可

通过静态培养转化为纤维素产生菌,其通过单核苷酸缺失使纤维素合成酶操纵子 *bcsBI* 基因发生移码突变^[12]。因此,醋酸菌的功能受基因和环境因素共同调控。

近年来,扩增子测序技术被广泛用于研究传统谷物醋的微生物群落组成,在传统谷物醋发酵过程中,普遍存在醋杆菌属和驹形杆菌属^[13-14]。Peng 等^[15]结合纯培养技术方法发现传统谷物醋中醋酸菌主要由 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 组成。然而,基于基因组学全面对这 2 种醋酸菌的功能研究还知之甚少,并且缺乏深入的比较分析。在本研究中,使用醋酸菌筛选培养基确定镇江香醋醋醅中醋酸菌的种类,随后从 NCBI 数据库中选择完整度高的基因组进行比较研究,探究其系统发育关系,尝试从基因层面揭示不同种类醋酸菌的功能差异,并使用筛选菌株对其功能进行验证,为优良醋酸菌菌株的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株分离

称取 1 g 发酵 18 d 的镇江香醋醋醅样品,加入到 100 mL 无菌水中,30 °C 培养 1 d,吸取上清液,梯度稀释后涂布于含有 2% (质量体积分数) CaCO_3 的 LB 固体平板(2%葡萄糖,1%酵母粉和 1.5%琼脂),置于 30 °C 培养箱培养 3 d,将产生透明圈的菌落进行划线分离,挑取单菌落至 LB 液态培养基(2%葡萄糖和 1%酵母粉)中,30 °C、180 r/min 振荡培养 2 d,收集菌液,备用。

1.2 菌株鉴定

使用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取单个菌落的 DNA,具体操作步骤参照产品说明书。以细菌总 DNA 为模板,利用引物 27F

(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因的扩增, 并对其测序^[16]。测序结果通过与 GenBank 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较, 并使用 MEGA 11.0 进行系统发育分析^[17], 从而得到分离菌株的进化关系。

1.3 菌株及其近缘物种的特征

从 NCBI 数据库(2021.03)中选择与分离菌株相似性最高的物种进行比较基因组分析, 并选择 1 株与分离菌株密切相关的物种作为外群。从 NCBI 数据库下载这些菌株的基因组序列, 使用 CheckM^[18]评估其准确性和完整性。

1.4 基因组注释

使用 Prokka^[19]对下载菌株进行基因组注释。将下载菌株蛋白序列与直系同源基因簇^[20](clusters of orthologous groups, COG)数据库进行 BLASTp^[21] (E value $<1e^{-10}$, identity 值 $\geq 40\%$)比对进行功能注释。

1.5 系统发育及泛-核基因组分析

使用 Orthofinder^[22]进行基因家族鉴定, 利用 OrthoMCL^[23]鉴定基因组中保守的单拷贝直系同源基因, 通过 MAFFT^[24]进行多序列比对, 基于最大似然法和“LG+G4+F”模型, 以密切相关的物种作为外群, 利用 RAxML^[25]构建系统发育树。使用 Roary^[26]软件计算泛基因组和核心基因组。

1.6 碳水化合物活性酶分析

基于碳水化合物活性酶^[27] (carbohydrate-active enzymes, CAZymes) 数据库, 使用 dbCAN2 软件中 HMMER 3^[28] (E value $<1e^{-5}$)进行碳水化合物活性酶注释。

1.7 验证分析

将材料和方法 1.1 中分离菌株的 OD_{600} 值稀释至 0.7, 5 mL 稀释后培养液接种于 95 mL LB

液体培养基(115 °C 灭菌 20 min 后加入 4 mL 乙醇和 0.5 mL 乙酸)中, 30 °C、180 r/min 培养 2 d, 分别检测 OD_{600} 值、产酸量、ATP 含量、细胞膜脂肪酸组成及 ADH 和 ALDH 的酶活。

参照《GB 12456—2021 食品安全国家标准食品中总酸的测定》测定总酸含量; 使用 ATP 含量测定试剂盒(比色法)测定 ATP 含量; 采用比色法测定细胞内及发酵液中 ADH 和 ALDH 的酶活, 具体操作参考文献[29], 酶活的定义: 在 25 °C、pH 4.0 条件下, 1 min 氧化 1 μ mol 乙醇或乙醛的酶量为一个酶活力单位(U); 收集发酵后的菌体, 根据参考文献[30]中前处理步骤得到脂肪酸, 参照《GB 5009.168—2016 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》检测菌体细胞膜的脂肪酸组成。

1.8 数据分析

所有实验重复进行 3 次, 数据结果以平均值 \pm 标准差的形式表示。采用 t 检验比较不同种类醋酸菌之间的基因组大小、编码基因数量差异及代谢生长差异。使用 Mann-Whitney U 检验 CAZymes 数量差异。利用 DESeq2 分析功能基因差异^[31]。使用 clusterProfiler 进行富集分析^[32]。利用 R 软件实现功能基因和 CAZymes 的主成分分析(principal component analysis, PCA)。

2 结果与分析

2.1 醋酸菌的分离及鉴定

醋酸菌在 LB 固体平板培养 72 h 时菌落直径约为 1–2 mm, 菌落形态呈圆形、表面凸起、湿润、较光滑、白色, 不透明, 不产孢。从平板上挑选 120 个菌落进行培养, 并对 16S rRNA 基因全长进行测序。测序得到的基因序列与 GenBank 数据库比对结果表明, 35 株(Group1)与 *A. pasteurianus* LMG 1262^T 的同源性最高, 为

98.61%–99.87%；82 株(Group2)与 *K. europaeus* LMG 18890^T 的同源性最高,为 98.22%–99.79%。通过 neighbor-joining 法构建同源性最高的分离菌株与已知醋酸菌的系统发育树表明,来自 Group1 的菌株 JNSFL-09 和来自 Group2 的菌株 JNSFL-27 分别位于 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 进化树内部(图 1A)。故菌株 JNSFL-09 和 JNSFL-27 分别被鉴定为 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus*, 命名为 *A. pasteurianus* JNSFL-09 和 *K. europaeus* JNSFL-27。

2.2 基因组的一般特征及系统发育分析

基于分离鉴定结果,从 NCBI 数据库中下载了 31 株 *A. pasteurianus* 和 7 株 *K. europaeus* 的基因组序列。由表 1 可知,31 株 *A. pasteurianus* 基因组的 GC 含量为 51.98%–53.31%,基因组大小为 2.81–3.76 Mb,基因数量从 2 090 到 3 976 不等。与 *A. pasteurianus* 的基因组相比,*K. europaeus* 基因组的 GC 含量更高,在 61.24%–61.7%之间;基因组大小更大,在 3.63–4.23 Mb 之间;基因数量更多,从 3 484 到 4 327 不等;表明 *A. pasteurianus* 与 *K. europaeus* 之间存在较大差异。此外,根据数据库信息可知,大多数 *A. pasteurianus* 都是从米醋及米酒中分离得到的,而 *K. europaeus* 则是从红葡萄酒、康普茶及杨梅中分离得到的,表明 *A. pasteurianus* 与 *K. europaeus* 具有不同的生境适应性。所有菌株的基因组完整度均大于 95%,表明这些菌株序列质量高、完整性好、污染少,能准确揭示其生物序列信息。

串联核心基因比对常用于构建不同菌株基因组的系统发育树。通过比较所有下载菌株基因组序列,共鉴定出 760 个单拷贝核心基因。基于这些单拷贝基因的串联序列,采用最大似然法构建系统发育树,另以巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)作为外群。

A. pasteurianus 与 *K. europaeus* 可明显被划分为 2 个不同分支(图 1B)。尽管醋酸菌的生境多样化,但我们观察到分离自同一生境的菌株通常具有更近的进化关系,表明生境选择在进化是保守的,而不是随机分布在醋酸菌谱系中。

2.3 泛-核基因集的构建

为评估不同种类醋酸菌菌株之间的基因组差异,分别构建 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的泛-核基因集。31 株 *A. pasteurianus* 的泛基因集包含 11 289 个基因,相当于 *A. pasteurianus* 基因组平均基因数量的 3 倍以上(图 2A)。基因累积曲线结果说明,随着新菌株的加入,核心基因组数量不断减少,而泛基因组则呈逐渐增加趋势,说明 *A. pasteurianus* 基因组为开放式基因组,同时也说明 *A. pasteurianus* 具有较高的遗传多样性。我们也在 *K. europaeus* 基因组观察到相似的变化(图 2B)。*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 菌株中分别存在包含 1 181 和 2 233 个基因的核心基因集,4 184 和 4 428 个基因的菌株特异基因集,而其他的附属基因分布于多个基因组中(图 2C、2D)。这些菌株的特异基因可能通过基因水平转移来自其他物种。

2.4 核心、附属和菌株特异基因的功能

利用 COG 数据库分别对 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的核心、附属和菌株特异基因进行功能注释。结果表明 COG 数据库能确定 *A. pasteurianus* 中 91.28%的核心基因、48.35%的菌株特异基因和 53.92%的附属基因的功能类别,而 *K. europaeus* 中只有 87.24%的核心基因、55.49%的菌株特异基因和 64.58%的附属基因的功能类别能被鉴定。*A. pasteurianus* 核心基因中与代谢相关的基因数量最多,核心基因、附属基因和菌株特异基因中与代谢功能相关的基因比例分别为 42.3%、30.21%和 25.01%

表 1 本研究所有基因组的基因组特征

Table 1 Genomic features of all the genomes studied in this study

Feature	Genome Size (bp)	G+C content (%)	Scaffolds	Genes	Sources	Completeness (%)	NCBI assembly accession
<i>A. pasteurianus</i> LMG 1262 ¹	2 982 393	53.11	141	2 914	–	100	GCA_000285275.1
<i>A. pasteurianus</i> 386B	3 078 647	52.86	8	2 942	Spontaneous cocoa bean heap	100	GCA_000723785.1
<i>A. pasteurianus</i> 3P3	3 014 186	52.34	101	2 952	Submerged wine vinegar	99.50	GCA_000285315.1
<i>A. pasteurianus</i> Ab3	2 806 148	53.28	1	2 746	Zhejiang rosy vinegar	99.50	GCA_001183745.1
<i>A. pasteurianus</i> AD	2 825 772	52.74	133	2 703	Whole fly	99.50	GCA_001953595.1
<i>A. pasteurianus</i> BCRC 14118	3 041 722	52.56	187	3 479	–	98.71	GCA_003332175.1
<i>A. pasteurianus</i> BCRC 14145	2 990 778	53.10	220	2 090	–	95.58	GCA_003332155.1
<i>A. pasteurianus</i> CICC 22518	3 056 995	52.01	3	2 852	Vinegar	95.97	GCA_009914215.1
<i>A. pasteurianus</i> DM	3 127 455	52.85	1	3 101	–	100	GCA_002220195.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3191	2 888 200	53.10	306	2 820	Rice vinegar	100	GCA_000241625.2
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01	3 340 249	53.10	7	3 122	Rice vinegar	100	GCA_000010825.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-01-42C	3 247 995	53.14	7	3 050	Rice vinegar	100	GCA_000010945.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-03	3 339 669	53.10	7	3 120	Rice vinegar	100	GCA_000010845.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-07	3 338 426	53.10	7	3 119	Rice vinegar	100	GCA_000010865.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-12	3 336 990	53.10	7	3 118	Rice vinegar	100	GCA_000010965.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-22	3 339 649	53.10	7	3 120	Rice vinegar	100	GCA_000010885.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO3 3283-26	3 339 683	53.10	7	3 120	Rice vinegar	100	GCA_000010905.1
<i>A. pasteurianus</i> IFO 3283-32	3 337 040	53.10	7	3 118	Rice vinegar	100	GCA_000010925.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 101655	3 100 990	52.75	5	2 958	Vinegar	100	GCA_000241585.3
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 106471	3 025 942	53.14	194	3 065	–	100	GCA_003850805.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3188	3 590 132	51.98	212	3 596	–	99.50	GCA_003850825.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3222	2 954 825	53.24	171	2 946	–	100	GCA_003850845.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3277	3 686 904	52.26	337	3 902	–	100	GCA_003850865.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3278	3 765 983	52.10	361	3 976	–	100	GCA_003850885.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3279	3 085 982	52.79	191	3 069	–	100	GCA_003850905.1

(待续)

(续表 1)

Feature	Genome Size (bp)	G+C content (%)	Scaffolds	Genes	Sources	Completeness (%)	NCBI assembly accession
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3280	3 645 775	52.16	305	3 798	–	100	GCA_003850925.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3284	3 095 301	52.79	213	3 158	–	100	GCA_003850945.1
<i>A. pasteurianus</i> NBRC 3299	3 011 664	52.54	111	2 940	–	99.50	GCA_003850965.1
<i>A. pasteurianus</i> SRCM 100623	3 209 998	52.85	184	3 263	Makgeolli	100	GCA_001662905.1
<i>A. pasteurianus</i> SRCM 101342	3 287 976	52.87	6	3 309	Food	99.50	GCA_002173735.1
<i>A. pasteurianus</i> SRCM 101468	3 408 817	53.31	4	3 447	Food	100	GCA_002202135.1
<i>K. europaeus</i> LMG 18890 ^T	4 227 398	61.26	321	4 327	Red wine	99.50	GCA_000285295.1
<i>K. europaeus</i> 5P3	3 989 313	61.49	256	4 008	Red wine	99.50	GCA_000285335.1
<i>K. europaeus</i> CECT 8546	4 111 638	61.31	113	3 994	Red wine	100	GCA_001273645.1
<i>K. europaeus</i> GH1	3 809 040	61.50	105	3 352	Kombucha tea	99.50	GCA_014121165.1
<i>K. europaeus</i> LMG 18494	3 991 281	61.24	216	3 958	Red wine	99.46	GCA_000227545.1
<i>K. europaeus</i> NBRC 3261	3 631 393	61.50	596	3 752	Myrica rubra	99.00	GCA_000964485.1
<i>K. europaeus</i> SRCM 101446	3 797 909	61.70	4	3 484	Food	100	GCA_002173515.1

(图 3A)。核心基因中与翻译、核糖体结构和生物合成(J)、氨基酸转运和代谢(E)和能量生产和转换(C)相关的基因数量较多, 占整个核心基因的 29.59%, 表明这些基因在 *A. pasteurianus* 中相对保守。与核心基因相比, *A. pasteurianus* 的附属基因和菌株特异基因中复制、重组和修复(L)所占比例最大, 分别为 15.31%和 24.81%; 其次分别为无机离子转运和代谢(P)、转录(K)和细胞壁/细胞膜/胞外被膜生物合成(M) (图 3B)。此外, *K. europaeus* 核心基因中与代谢功能相关的基因数量也最多, 占整个核心基因的 44.61%, 比 *A. pasteurianus* 核心基因中代谢功能基因数量增多了 90.57%。相比 *A. pasteurianus*, *K. europaeus* 核心基因中与信息存储和处理及细胞过程和信号相关的基因数量分别增加了 58.99%和 73.21%。*K. europaeus* 的附属基因和菌株特异基因中与代谢功能相关的基因数量仅

有 376 个和 430 个, 均远低于 *A. pasteurianus*。*K. europaeus* 菌株特异基因中与信息存储和处理相关的基因数量可达 1 038 个, 占整个菌株特异基因的 42.25%, 比 *A. pasteurianus* 核心基因中信息存储和处理功能基因数量多了 53.32% (图 3C)。*K. europaeus* 核心基因中与能量生产和转换(C)、氨基酸转运和代谢(E)、碳水化合物转运和代谢(G)和翻译、核糖体结构和生物合成(J)等相关的基因数量远多于 *A. pasteurianus*, 表明 *K. europaeus* 可能具有适应环境多样性的能力。相比 *A. pasteurianus*, *K. europaeus* 菌株特异基因中与复制、重组和修复(L)相关的基因数量可达 794 个, 多了 58.17%, 说明 *K. europaeus* 发生突变、重组和变异的比率远高于 *A. pasteurianus*, 易导致遗传不稳定(图 3D)。该结果与 Wang 等^[11]的研究结果一致。随后, 由 PCA 结果可知 *A. pasteurianus*

和 *K. europaeus* 的功能基因差异非常明显, 其第一和第二主成分分别可以解释 63.65% 和 30.08% (图 3E)。综上, *K. europaeus* 中参与代谢相关的功能基因数量要多于 *A. pasteurianus*。

2.5 碳水化合物活性酶的分析

通过对 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的碳水化合物活性酶进行分析, 发现 *A. pasteurianus* 的碳水化合物活性酶基因数量范围为 111–129 个, 而 *K. europaeus* 的碳水化合物活性酶基因数量

范围为 139–165 个, 表明 *K. europaeus* 的碳水化合物利用潜力要优于 *A. pasteurianus* (图 4A)。*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的碳水化合物活性酶均以糖基转移酶(GTs)家族、碳水化合物酯酶(GEs)家族和糖苷水解酶(GHs)家族为主, 但二者之间的数量差异显著($P < 0.001$) (图 4B、4C)。此外, PCA 结果也表明 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 编码的碳水化合物活性酶数量差异明显, 其第一和第二主成分分别可以解释 50.83%

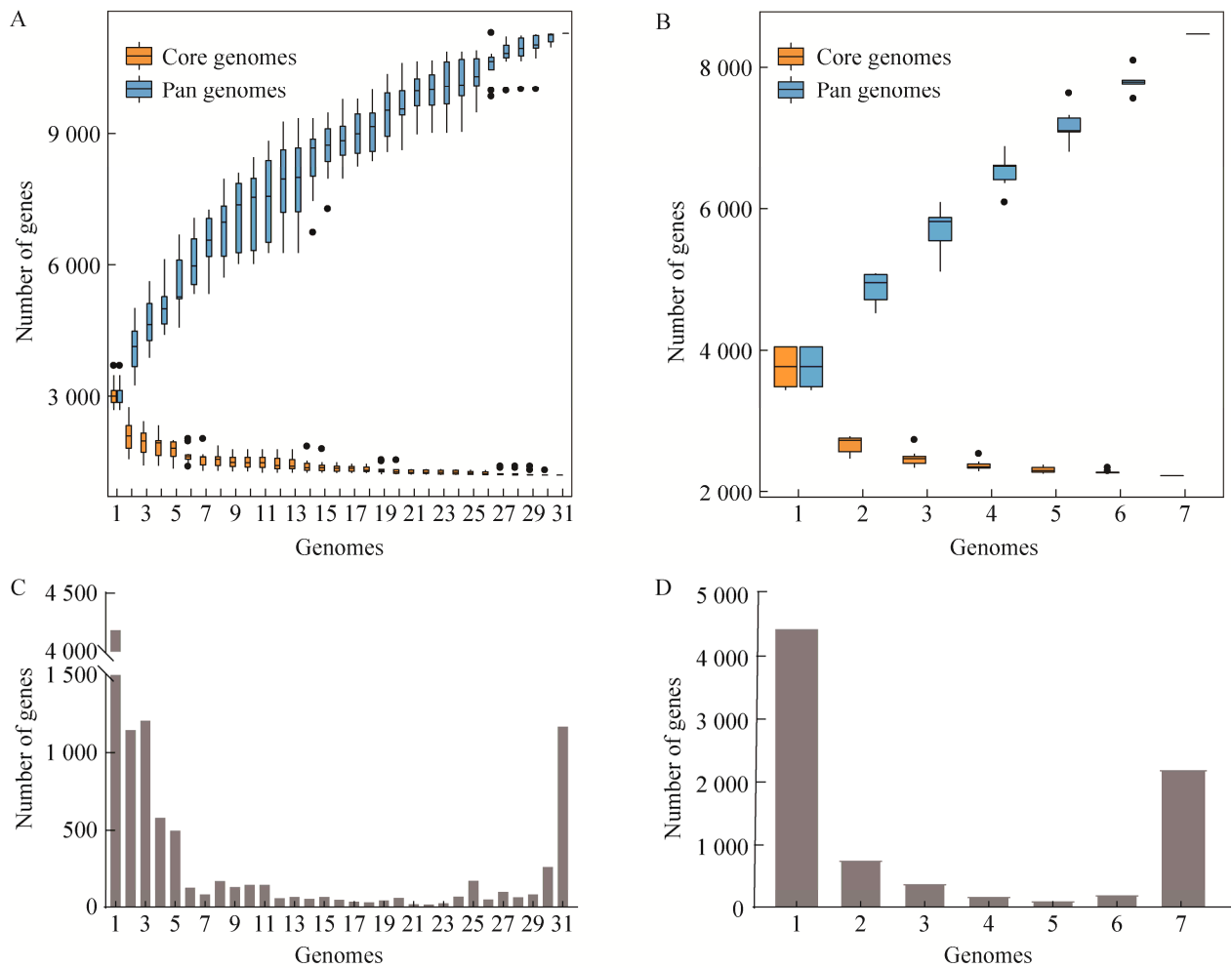


图 2 *Acetobacter pasteurianus* 和 *Komagataeibacter europaeus* 的泛-核基因组分析

Figure 2 Pan-core genome analyses of *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus* strains. A, B: Pan-genome accumulation curves of *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. C, D: Gene occurrence characteristics of *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. Boxes show the medians and the interquartile ranges, the whiskers denote the lowest and highest values that were within 1.5 times the interquartile ranges from the first and third quartiles, and outliers are shown as individual points.

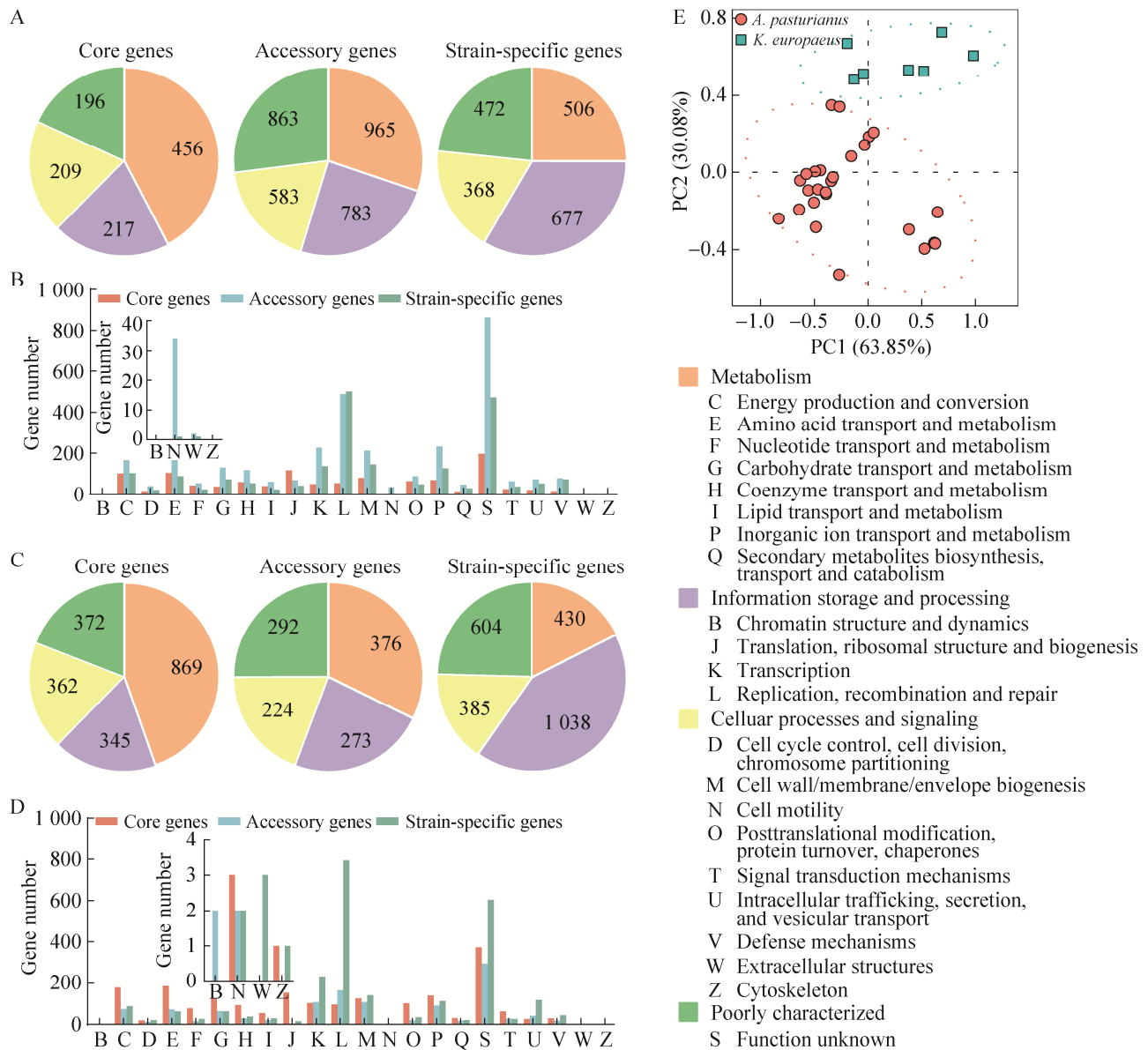


图 3 COG 功能类别在核心、附属和菌株特异基因的差异分布

Figure 3 Differential distribution of COG functional categories in core, accessory and strain-specific genes. A–C: Proportion of functional classes in core, accessory and strain-specific genes of *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. B–D: Functional categories in core, accessory and strain-specific genes of *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. E: PCA analysis.

和 14.13% (图 4D)。为进一步了解 2 种不同醋酸菌的碳水化合物代谢能力的差异, 分别对 AAs、GEs、GHs 和 GTs 家族的具体碳水化合物活性酶进行分析。*K. europaeus* 中 AAs3 ($P<0.001$)、AAs4 ($P<0.001$)、AAs8 ($P<0.01$)、AAs12 ($P<0.01$) 的基因数量显著多于 *A.*

pasteurianus (图 4E)。*A. pasteurianus* 中 CEs9 的平均基因数量为 9 个, 显著少于 *K. europaeus* 的 15 个 ($P<0.001$), 另外, *A. pasteurianus* 中 CEs3、CEs7 的基因数量也显著少于 *K. europaeus* ($P<0.001$), 而 *A. pasteurianus* 中 CEs10 的基因数量却多于 *K. europaeus* ($P<0.05$)

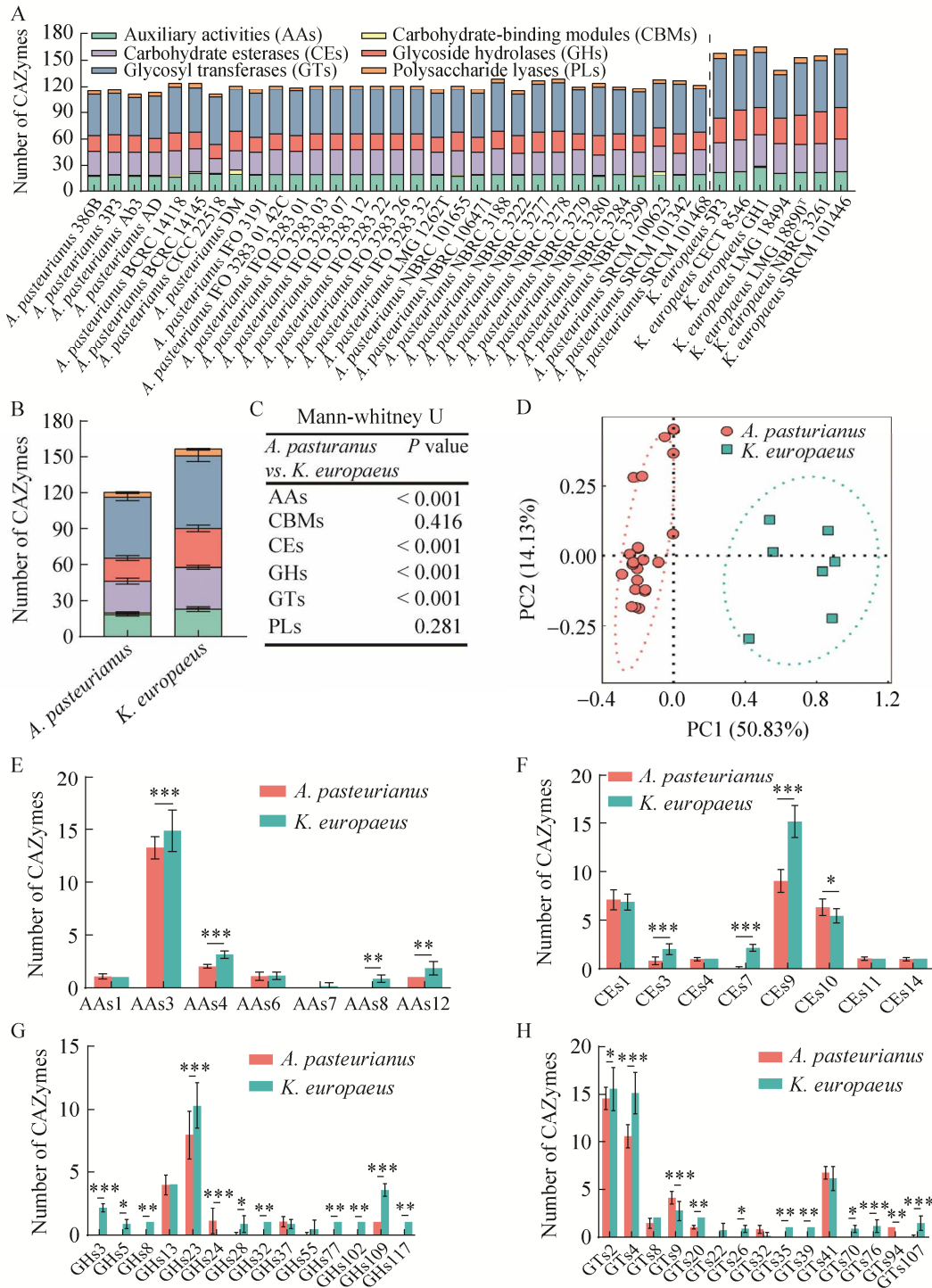


图 4 碳水化合物活性酶的差异分布

Figure 4 Differential distribution of carbohydrate active enzymes. A: Carbohydrate activity zymogram of different strains. B: Function classification. C: Mann-Whitney U test. D: PCA analysis. E–H: Differential distribution of AAs, CEs, GHs and GTs families. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$ for comparison with the number of carbohydrate active enzymes for *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. Error bars indicated standard deviation.

(图 4F)。GHs27 是 2 种醋酸菌主要的 GHs, *K. europaeus* 中 GHs27 基因数量显著多于 *A. pasteurianus* ($P < 0.001$), 且 GHs109 基因数量也显著多于 *A. pasteurianus* ($P < 0.001$), 而 GHs3、GHs5、GHs8、GHs32、GHs77、GHs102、GHs117 等基因只存在于 *K. europaeus* 中(图 4G)。GTs 是 2 种醋酸菌中最主要的碳水化合物活性酶, 其中 GTs2 和 GTs4 的基因数量最多, 发现 *A. pasteurianus* 中 GTs2 和 GTs4 的基因数量均显著少于 *K. europaeus* ($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$), 此外, GTs26、GTs35、GTs39、GTs70、GTs76、GTs107 等基因只存在于 *K. europaeus* 中(图 4H)。综上所述可知, *K. europaeus* 的碳水化合物利用潜力要优于 *A. pasteurianus*。

2.6 差异基因的分析

通过对 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 中功能基因数量的进行差异分析, 发现 82 个功能基因在 *A. pasteurianus* 中富集, 而在 *K. europaeus* 富集的功能基因高达 206 个, 包括 *bcsA*、*gutB*、*fruB* 和 *aldB* 等参与糖和乙醇代谢的功能基因(图 5A)。随后, 将鉴定的差异功能基因进行通路富集分析, 发现 ABC 转运体、磷酸转移酶系统、双组分系统、细菌趋化性、磷酸戊糖途径、不同环境的微生物代谢、脂肪酸生物合成、果糖和甘露糖代谢、氧化磷酸化、丁酸代谢、脂多糖生物合成、生物膜形成等代谢途径可在 *K. europaeus* 中被富集(图 5B)。因此, 进一步分析所富集到代谢通路的基因数量差异, 发现 *K. europaeus* 中 *coxC*、*hoxU*、*nuoB*、*nuoG* 和 *qoxD* 等参与氧化磷酸化的基因数量均显著多于 *A. pasteurianus* ($P < 0.001$) (图 5C)。 *K. europaeus* 中 *butB* 基因数量是 *A. pasteurianus* 的 5 倍左右(图 5E)。除 *acsA* 只存在于 *A. pasteurianus* 中, *waaC*、*eptA*、*eptC* 等参与脂多糖生物合成, *abfD*、*butA* 等参与丁酸代谢, *fruA*、*fruB*、

DAK、*GMPP* 等参与果糖和甘露糖代谢, *ptsL*、*ptsO* 等参与磷酸转移酶系统的功能基因只存在于 *K. europaeus* 中(图 5D–5G)。*fabG* 是 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 中主要参与脂肪酸生物合成的基因, *A. pasteurianus* 中 *fabG* 基因数量仅为 *K. europaeus* 的 50% 左右(图 5H)。*K. europaeus* 中 *devB*、*gntK*、*zwf* 等参与磷酸戊糖途径, *gtcE*、*ompR* 等参与双组分系统, *cheA*、*cheB*、*cheR*、*cheW*、*wspC*、*wspD*、*wspE* 等细菌趋化性, *kpsE*、*kpsM*、*kpsT*、*thiZ*、*troB* 等参与 ABC 转运体的功能基因数量显著多于 *A. pasteurianus* ($P < 0.001$) (图 5I–5L)。此外, *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 都具有将乙醇转化为乙酸的能力, 故进一步了解二者乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的基因数量差异。相比 *A. pasteurianus*, *K. europaeus* 中乙醇脱氢酶的基因数量显著多($P < 0.001$), 主要源自 *adh* 基因数量的差异(图 5M), 与 Wang 等的研究发现相一致^[11]。二者乙醛脱氢酶的基因数量无显著差异, 但是 *A. pasteurianus* 中 *aldH* 基因数量显著多于 *K. europaeus* ($P < 0.001$), *aldB* 基因则相反($P < 0.001$) (图 5N)。综上所述可知, *K. europaeus* 在乙酸合成及耐受相关能力可能更优于 *A. pasteurianus*。

2.7 生长代谢差异的分析

为了解 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的生长代谢差异, 利用筛选得到的 *A. pasteurianus* JNSFL-09 和 *K. europaeus* JNSFL-27 进行比较。在 LB 培养基培养 2 d 后, *A. pasteurianus* JNSFL-09 的 OD_{600} 值显著高于 *K. europaeus* JNSFL-27 ($P < 0.05$) (图 6A)。虽然 *A. pasteurianus* JNSFL-09 的产酸量可达 39.12 g/L, *K. europaeus* JNSFL-27 的产酸量仅为 33.61 g/L, 但是 *K. europaeus* JNSFL-27 的每 OD_{600} 产酸量却高达 4.38 g/L, 显著高于

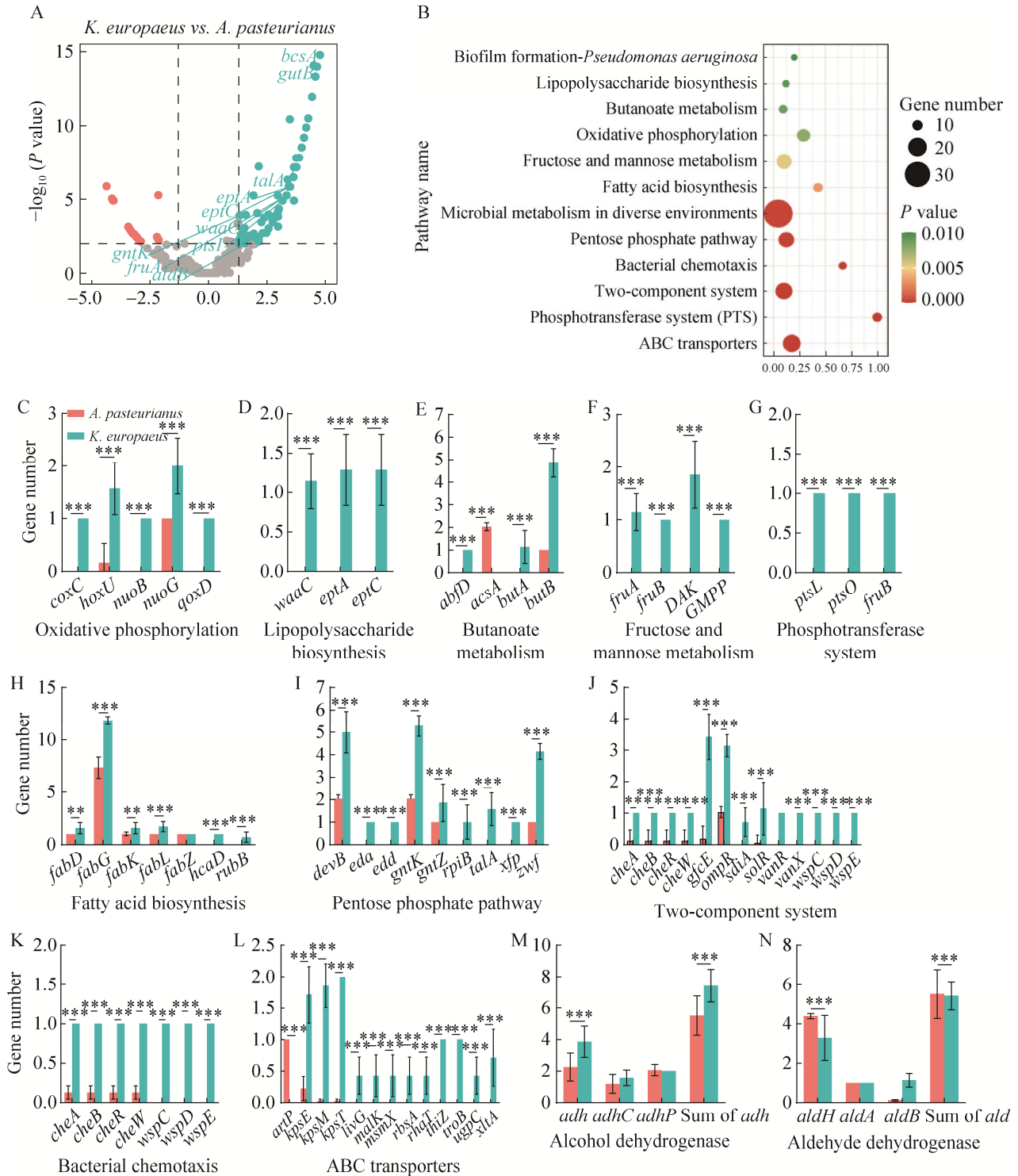


图5 *Acetobacter pasteurianus* 和 *Komagataeibacter europaeus* 的差异基因组成、分布及通路分析

Figure 5 Differential gene composition, distribution and pathway analysis of *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus*. A: Difference analysis. B: Pathway enrichment. C–N: Distribution of differential genes in different pathways. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$ for comparison with the number of functional genes for *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. Error bars indicated standard deviation.

A. pasteurianus JNSFL-09 ($P < 0.05$), 表明 *K. europaeus* 转化乙醇为乙酸的能力要强于 *A. pasteurianus* (图 6B、6C)。乙酸的生成不仅需要

相应酶的参与, 还需要消耗大量的能量, 故比较 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的产能差异, 发现 *K. europaeus* JNSFL-27 的胞内 ATP 含量可

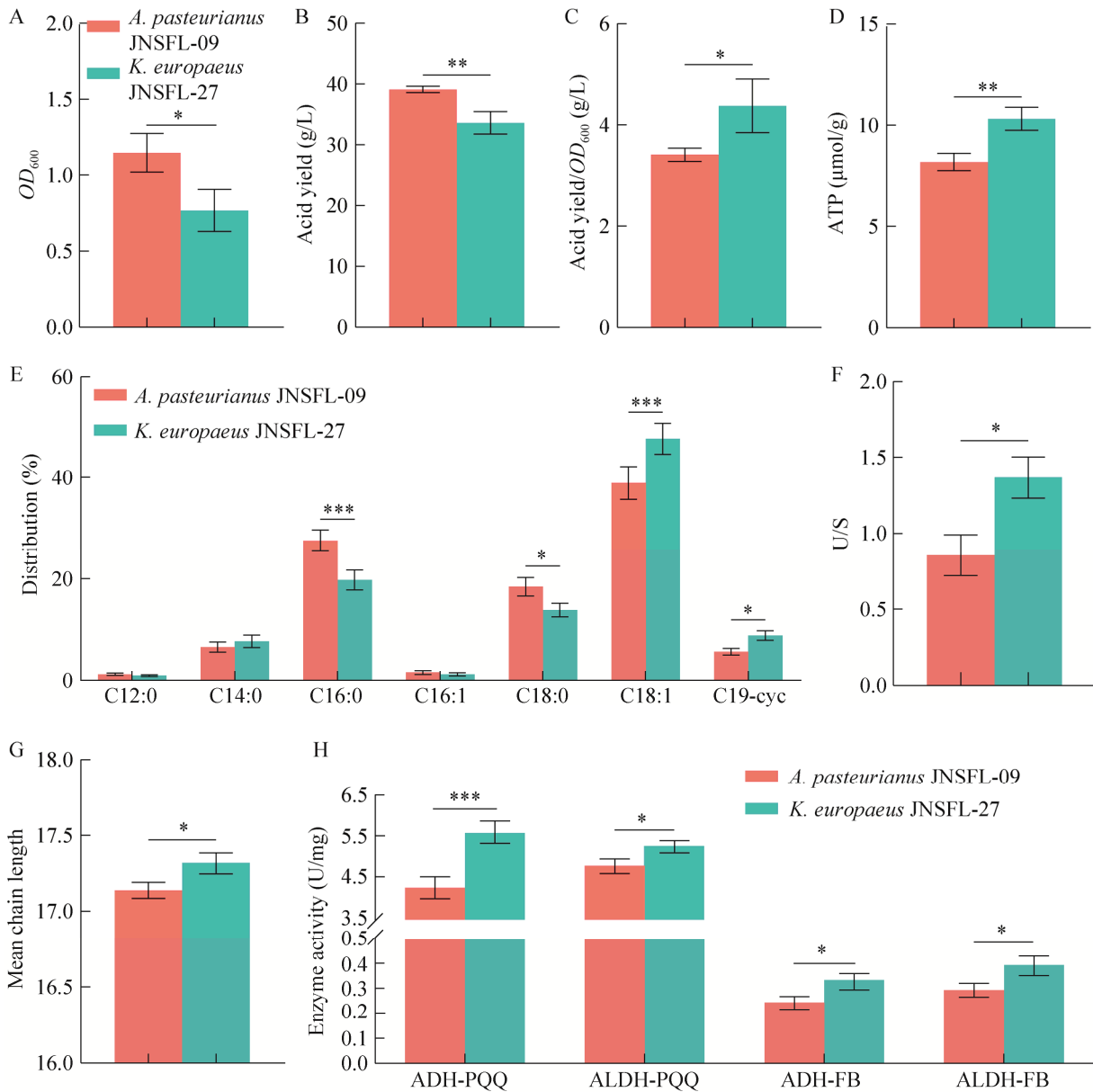


图 6 *Acetobacter pasteurianus* 和 *Komagataeibacter europaeus* 的生长代谢差异分析

Figure 6 Analysis of the difference in growth and metabolism of *Acetobacter pasteurianus* and *Komagataeibacter europaeus*. A: Differences in growth. B: Differences in acid production. C: Differences in acid production for per OD₆₀₀. D: Differences in energy metabolism. E: Differences in fatty acid composition. F: Differences in the ratio of unsaturated and saturated fatty acids. G: Differences in average chain length. H: Differences in enzyme production. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, *** indicates $P < 0.001$ for comparison with the differences in growth and metabolism of *A. pasteurianus* and *K. europaeus*. Error bars indicated standard deviation.

达 10.31 $\mu\text{mol/g}$ ，显著高于 *A. pasteurianus* JNSFL-09 ($P < 0.01$) (图 6D)。醋酸菌可通过改变细胞膜脂肪酸组成以适应酸性环境^[33]，且通过比较基因组分析也发现 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 参与脂肪酸合成的基因数量存在差异。细胞膜主要含有 7 种脂肪酸，分别为月桂酸(C12:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)、硬脂酸(C18:0)、十八碳烯酸(C18:1)和环丙烷脂肪酸(C19-cyc) (图 6E)。*A. pasteurianus* JNSFL-09 中棕榈酸和硬脂酸含量都显著高于 *K. europaeus* JNSFL-27 ($P < 0.05$)，而十八碳烯酸和环丙烷脂肪酸则相反($P < 0.05$)。此外，*K. europaeus* JNSFL-27 的不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例高达 1.37，而 *A. pasteurianus* JNSFL-09 仅为 0.86，且 *K. europaeus* JNSFL-27 的平均碳链长也显著长于 *A. pasteurianus* JNSFL-09 (图 6F、6G)。这些结果表明，*K. europaeus* 与 *A. pasteurianus* 的脂肪酸组成差异明显。脂肪酸组成不同会导致细胞膜通透性发生改变，发现 *K. europaeus* JNSFL-27 的细胞膜结合乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的酶活力均显著高于 *A. pasteurianus* JNSFL-09 ($P < 0.05$)，且发酵液中乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的酶活力也均显著高于 *A. pasteurianus* JNSFL-09 ($P < 0.05$) (图 6H)，与 Trček 等的研究结果相一致^[10]。综上所述可知，相比 *A. pasteurianus*，*K. europaeus* 可通过产更多的乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶和大量的 ATP，并改变细胞膜脂肪酸组成来提高乙醇的转化率。

3 讨论与结论

醋酸菌作为一种稳定的产乙酸菌种，广泛存在于各类酸性发酵食品中，尤其是食醋^[1]。而镇江香醋是我国传统谷物醋之一，其醋醅中含有大量不同种类的醋酸菌^[13]，然而尚缺乏在基因组层面醋酸菌的对比分析。因此，在本研究

中，我们对分离并鉴定的镇江香醋醋醅中不同醋酸菌采用比较基因组学方法分析对不同醋酸菌的功能差异进行解析，并对其进行初步验证。

镇江香醋，醋醅中醋酸杆菌属占绝大多数，且存在少量的葡糖醋杆菌属和驹形杆菌属^[13,34]。其中，*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 为主要醋酸菌，发酵后期，*K. europaeus* 数量要多于 *A. pasteurianus*，此时的醋醅中乙酸溶度高达 100–130 mg/g 干醅，不利于 *A. pasteurianus* 的生长，而 *K. europaeus* 具有较高的乙酸耐受性，能在该环境下繁殖代谢^[15]。系统发育分析结果将 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 明显划分为 2 个不同分支，而基因组信息体现，*K. europaeus* 的基因组更大，说明 *K. europaeus* 具有更多的潜在功能基因。与先前的研究相一致，较小基因组的原核生物一般占据低复杂性生态系统，而具有大基因组的原核生物可占据相对动荡的生态系统^[35]。此外，泛基因组分析表明，*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 都具有开放的基因组，导致其功能多样性。通常，分布较广的物种通常具有开放的泛基因组，使它们能够不断从环境中获取遗传物质并适应恶劣的环境，如乳酸片球菌^[36]、微小杆菌^[37]和乌斯古菌^[38]。同时，发现 *A. pasteurianus* 的可变基因约占 *A. pasteurianus* 总基因数量的 89%，而 *K. europaeus* 的可变基因仅占 73%左右，表明 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 都具有较高的多样性，且 *A. pasteurianus* 的物种多样性更高^[36]。*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的基因数量各有不同，说明 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的基因组可塑性都较高，可在不同生境下生长繁殖，且具有不同的特征^[11]。

功能注释分析表明，*A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的核心基因均以代谢为主，主要编码能量生产和转换(C)及氨基酸转运和代谢(E)

等功能,且 *K. europaeus* 编码这些功能的基因数量更多,这可能与红酒、杨梅等生境的氨基酸含量及种类更多有关。此外,相比 *A. pasteurianus*, *K. europaeus* 具有更多编码碳水化合物运输和代谢(G)及复制、重组和修复(L)的基因,说明 *K. europaeus* 的生态位更广^[38]。此外, *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 中还存在大量功能未知的基因,可能是在同源数据库中没有同源性的新基因或是只有几个初级氨基酸序列的假基因。假基因普遍存在于原核生物中,其中很大一部分来源于“失败的”基因水平转移事件^[39]。相比 *A. pasteurianus*, *K. europaeus* 具有更多参与 ABC 转运体、磷酸转移酶系统、双组分系统、细菌趋化性、磷酸戊糖途径、脂肪酸生物合成、果糖和甘露糖代谢、氧化磷酸化及生物膜形成等代谢途径的功能基因,这些基因共同导致了二者的生长代谢差异。与本研究结果相一致, *K. europaeus* 的细胞膜脂肪酸不饱和度、链长及胞内 ATP 含量均高于 *A. pasteurianus*。磷酸戊糖途径、果糖和甘露糖代谢及氧化磷酸化的增强可提高细胞的能量代谢能力,增加 ATP 含量。脂肪酸生物合成及生物膜形成会影响细胞膜的组成和通透性,并受双组分系统信号通路所介导,且乙酸胁迫会导致细胞膜脂肪酸不饱和度和链长的增加,进一步解释 *K. europaeus* 比 *A. pasteurianus* 更耐受乙酸的基因机制^[40]。细菌趋化性和双组分系统是细菌信号转导的一种主要形式,可以调节细菌对外界环境感知和响应的能力,以适应不利环境^[41]。

对碳水化合物的利用能力是细菌菌株功能的重要指标之一。本研究比较了 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的碳水化合物活性酶相关基因的差异,结果表明 *K. europaeus* 比 *A. pasteurianus* 含有更多数量的 AAs 家族、GEs 家族、GHs 家族和 GTs 家族。GHs3、GHs5、GHs8、GHs32、

GHs77、GHs102、GHs117 等基因只出现在 *K. europaeus* 中,这些基因编码 β -葡萄糖苷酶、内切甘露聚糖酶、木聚糖酶、 β -1,4-木糖糖苷酶、 α -4-葡聚糖转移酶、 α -1,3-L-半乳糖苷酶等,具有甘露糖及木聚糖降解、能量代谢和病原体防御等多种功能^[42]。GHs23 和 GHs109 主要编码肽聚糖裂解酶、胞壁酶、NAD-依赖性糖苷水解酶等,在 *K. europaeus* 中数量较多的原因可能是 *K. europaeus* 大多都分离于葡萄、杨梅等纤维素及果胶较多的生境, *K. europaeus* 为从纤维素及果胶中获得生长能源而作出的进化选择。AAs3 在 *K. europaeus* 中较多,其主要为氧化还原酶类,细菌在氧气环境中生长,细胞内会产生部分还原的活性氧包括过氧化氢、超氧自由基和羟基^[43]。这些活性氧会引起 DNA、脂类和蛋白质的氧化,对细胞造成致命的损伤,表明 *K. europaeus* 的抗氧化能力较强^[42]。*K. europaeus* 中 CEs9 数量是 *A. pasteurianus* 的 1.5 倍,CEs9 编码磷酸脱乙酰酶,可加速葡萄糖向丙酮酸的转化,为三羧酸循环提供更多底物,从而产生更多的能量用于抵御环境压力和生长代谢,进一步证明 *K. europaeus* 的环境适应性更广^[15]。

综上所述,这些结果初步明确了造成 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 表型差异的基因差异。未来,随着更多不同酸性复杂环境下 *A. pasteurianus* 和 *K. europaeus* 的分离,结合其表型比较不同微环境的基因组差异,可以更深入地解释基因功能与生境的关系,为优良醋酸菌的筛选及定向进化提供理论依据。

参考文献

- [1] GAO L, WU XD, ZHU CL, JIN ZY, WANG W, XIA XL. Metabolic engineering to improve the biomanufacturing efficiency of acetic acid bacteria: advances and prospects[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2020, 40(4): 522-538.
- [2] LYNCH KM, ZANNINI E, WILKINSON S, DAENEN

- L, ARENDT EK. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(3): 587-625.
- [3] MALIMAS T, THI LAN VU H, MURAMATSU Y, YUKPHAN P, TANASUPAWAT S, Y AMADA Y. Systematics of acetic acid bacteria[A]//*Acetic Acid Bacteria*[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, [2016] | Series: Food biology series | "A science publishers book.": CRC Press, 2017: 3-43.
- [4] ANDRÉS-BARRAO C, SAAD MM, CABELLO FERRETE E, BRAVO D, CHAPPUIS ML, ORTEGA PÉREZ R, JUNIER P, PERRET X, BARJA F. Metaproteomics and ultrastructure characterization of *Komagataeibacter* spp. involved in high-acid spirit vinegar production[J]. *Food Microbiology*, 2016, 55: 112-122.
- [5] ANDRÉS-BARRAO C, BARJA F. Acetic acid bacteria strategies contributing to acetic acid resistance during oxidative fermentation[A]//*Acetic Acid Bacteria*[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, [2016] | Series: Food biology series | "A science publishers book.": CRC Press, 2017: 92-119.
- [6] ZHENG Y, CHANG YG, XIE SK, SONG J, WANG M. Impacts of bioprocess engineering on product formation by *Acetobacter pasteurianus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(6): 2535-2541.
- [7] MATSUSHITA K, TOYAMA H, ADACHI O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1994, 36: 247-301.
- [8] 周文秀, 田呈明, 游崇娟. 云杉腐烂病菌 *Cytospora piceae* 全基因组测序及比较基因组分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3128-3148.
ZHOU WX, TIAN CM, YOU CJ. Genomic sequencing analysis of *Cytospora piceae* associated with spruce canker disease and comparative genomic analysis of *Cytospora* species[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3128-3148 (in Chinese).
- [9] 夏凯, 朱军莉, 梁新乐. 醋酸菌耐酸机理及其群体感应研究新进展[J]. *微生物学报*, 2017, 57(3): 321-332.
XIA K, ZHU JL, LIANG L. Advances in acid resistant mechanism of acetic acid bacteria and related quorum sensing system[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 321-332 (in Chinese).
- [10] TRČEK J, JERNEJC K, MATSUSHITA K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression[J]. *Extremophiles*, 2007, 11(4): 627-635.
- [11] WANG B, SHAO YC, CHEN T, CHEN WP, CHEN FS. Global insights into acetic acid resistance mechanisms and genetic stability of *Acetobacter pasteurianus* strains by comparative genomics[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 18330.
- [12] MATSUTANI M, ITO K, AZUMA Y, OGINO H, SHIRAI M, YAKUSHI T, MATSUSHITA K. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC 3288[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(17): 7229-7240.
- [13] WANG ZM, LU ZM, SHI JS, XU ZH. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26818.
- [14] NIE ZQ, ZHENG Y, XIE SK, ZHANG XL, SONG J, XIA ML, WANG M. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 9240.
- [15] PENG MY, ZHANG XJ, HUANG T, ZHONG XZ, CHAI LJ, LU ZM, SHI JS, XU ZH. *Komagataeibacter europaeus* improves community stability and function in solid-state cereal vinegar fermentation ecosystem: Non-abundant species plays important role[J]. *Food Research International*, 2021, 150: 110815.
- [16] LANE DL. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt ER, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*[M]. Chichester: Wiley, 1991: 115-175.
- [17] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [18] PARKS DH, IMELFORT M, SKENNERTON CT, HUGENHOLTZ P, TYSON GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes[J]. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043-1055.
- [19] SEEMANN T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [20] TATUSOV RL, FEDOROVA ND, JACKSON JD, JACOBS AR, KIRYUTIN B, KOONIN EV, KRYLOV DM, MAZUMDER R, MEKHEDOV SL, NIKOLSKAYA AN, RAO BS, SMIRNOV S, SVERDLOV AV, VASUDEVAN S, WOLF YI, YIN JJ, NATALE DA. The COG database: an updated version includes eukaryotes[J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4: 41.
- [21] ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410.
- [22] EMMS DM, KELLY S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 238.

- [23] LI L, STOECKERT CJ Jr, ROOS DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes[J]. *Genome Research*, 2003, 13(9): 2178-2189.
- [24] KATOH K, MISAWA K, KUMA KI, MIYATA T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(14): 3059-3066.
- [25] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [26] PAGE AJ, CUMMINS CA, HUNT M, WONG VK, REUTER S, HOLDEN MTG, FOOKES M, FALUSH D, KEANE JA, PARKHILL J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [27] DRULA E, GARRON ML, DOGAN S, LOMBARD V, HENRISSAT B, TERRAPON N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D571-D577.
- [28] FINN RD, CLEMENTS J, EDDY SR. HMMER web server: interactive sequence similarity searching[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(suppl_2): W29-W37.
- [29] 史伟, 高玲, 夏小乐. 乙酸胁迫下巴氏醋酸杆菌发酵过程中微环境水平的应答分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(11): 14-20.
- SHI W, GAO L, XIA XL. Response of *Acetobacter pasteurianus* during fermentation under acetic acid stress at microenvironment level[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(11): 14-20 (in Chinese).
- [30] 亓正良, 杨海麟, 夏小乐, 王武, 冷云伟, 余晓斌, 权武. 巴氏醋酸杆菌对发酵中醋酸胁迫的生理应答[J]. *微生物学报*, 2014, 54(3): 299-308.
- QI ZL, YANG HL, XIA O, WANG W, LENG YW, YU XB, QUAN W. Physiological response to acetic acid stress of *Acetobacter pasteurianus* during vinegar fermentation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(3): 299-308 (in Chinese).
- [31] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [32] YU GC, WANG LG, HAN YY, HE QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 2012, 16(5): 284-287.
- [33] HAN CC, XIA K, YANG JQ, ZHANG H, DeLISA MP, LIANG XL. Investigation of lipid profile in *Acetobacter pasteurianus* Ab3 against acetic acid stress during vinegar production[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(6): 909-922.
- [34] PENG MY, LU ZM, ZHANG XJ, HUANG T, DENG YJ, CHAI LJ, SHI JS, XU ZH. Distinct co-occurrence patterns and driving forces of abundant and rare bacterial communities in the multispecies solid-state fermentation process of cereal vinegar[J]. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2022, 2(2): 317-330.
- [35] CHEN MY, TENG WK, ZHAO L, HU CX, ZHOU YK, HAN BP, SONG LR, SHU WS. Comparative genomics reveals insights into cyanobacterial evolution and habitat adaptation[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(1): 211-227.
- [36] LI ZZ, SONG Q, WANG MM, REN JL, LIU SL, ZHAO SC. Comparative genomics analysis of *Pediococcus acidilactici* species[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(6): 573-583.
- [37] ZHANG DC, ZHU ZL, LI YJ, LI XD, GUAN ZY, ZHENG JS. Comparative genomics of *Exiguobacterium* reveals what makes a cosmopolitan bacterium[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e00383-21.
- [38] HUANG WC, LIU Y, ZHANG XX, ZHANG CJ, ZOU DY, ZHENG SL, XU W, LUO ZH, LIU FH, LI M. Comparative genomic analysis reveals metabolic flexibility of *Woesearchaeota*[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 5281.
- [39] KARCAGI I, DRASKOVITS G, UMENHOFFER K, FEKETE G, KOVÁCS K, MÉHI O, BALIKÓ G, SZAPPANOS B, GYÖRFY Z, FEHÉR T, BOGOS B, BLATTNER FR, PÁL C, PÓSFÁI G, PAPP B. Indispensability of horizontally transferred genes and its impact on bacterial genome streamlining[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(5): 1257-1269.
- [40] LI YJ, YAN PF, LEI QY, LI BY, SUN Y, LI SF, LEI H, XIE N. Metabolic adaptability shifts of cell membrane fatty acids of *Komagataeibacter hansenii* HDM1-3 improve acid stress resistance and survival in acidic environments[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(11): 1491-1503.
- [41] LIAO BY, YE XC, CHEN X, ZHOU YJ, CHENG L, ZHOU XD, REN B. The two-component signal transduction system and its regulation in *Candida albicans*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 1884-1899.
- [42] 安晓娜, 李伟程, 于洁, 潘琳, 莫蓝馨, 姚彩青, 张和平. 比较基因组学分析不同来源罗伊氏乳杆菌基因多样性及生境适应性[J]. *微生物学报*, 2020, 60(5): 875-886.
- AN XN, LI WC, YU J, PAN L, MO LX, YAO CQ, ZHANG HP. Comparative genomics analysis of genetic diversity and habitat adaptability of *Lactobacillus reuteri* from different sources[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(5): 875-886 (in Chinese).
- [43] SÜTZL L, LAURENT CVFP, ABRERA AT, SCHÜTZ G, LUDWIG R, HALTRICH D. Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(6): 2477-2492.