

枯草芽孢杆菌 N2-10 的基因组测序和比较基因组分析

孙悦龙¹, 刘浩^{1,2,3}, 朱宝成^{1,2,3}, 张伟涛⁴, 郭晓军^{*1,2,3}

1 河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071000

2 河北省饲用微生物技术创新中心, 河北 保定 071000

3 农业废弃物资源化利用河北省工程研究中心, 河北 保定 071000

4 河北省畜牧总站, 河北 石家庄 050000

孙悦龙, 刘浩, 朱宝成, 张伟涛, 郭晓军. 枯草芽孢杆菌 N2-10 的基因组测序和比较基因组分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 131-147.

SUN Yuelong, LIU Hao, ZHU Baocheng, ZHANG Weitao, GUO Xiaojun. Genome sequencing and comparative genomics analysis of *Bacillus subtilis* N2-10[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 131-147.

摘要:【背景】枯草芽孢杆菌 N2-10 是一株具有较强抑菌能力且能产纤维素酶等多种水解酶的革兰氏阳性菌, 在发酵饲料中具有较大的应用潜力。【目的】通过获得枯草芽孢杆菌 N2-10 的全基因组序列信息, 进一步解析菌株次级代谢产物合成基因信息, 并通过比较基因组学分析菌株 N2-10 与模式菌株的差异性, 为阐明 N2-10 抑菌和益生机制提供理论基础。【方法】通过二代 Illumina NovaSeq 联合三代 PacBio Sequel 测序平台, 对菌株 N2-10 进行全基因组测序, 将测序数据进行基因组组装、基因预测与功能注释, 并利用比较基因组学分析 N2-10 与其他菌株的差异。【结果】菌株 N2-10 基因组大小为 4 036 899 bp, GC 含量为 43.88%; 共编码 4 163 个编码基因, 所有编码基因总长度为 3 594 369 bp, 编码区总长度占基因组总长度的 89.04%; 含有 85 个 tRNA、10 个 5S rRNA、10 个 16S rRNA、10 个 23S rRNA, 以及 2 个 CRISPR-Cas、1 个前噬菌体和 6 个基因岛; 在 GO (gene ontolog)、COG (clusters of orthologous groups of protein)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genome)、CAZy (carbohydrate-active enzyme) 数据库中分别注释到 3 048、3 177、3 894、145 个基因; 此外, 菌株 N2-10 共注释到 10 个次级代谢产物合成基因簇, 包括根霉素 A、表面活性素、bacillaene、丰原素、儿茶酸铁载体杆菌苷、芽孢杆菌素 A、溶杆菌素生物合成基因簇和 3 个未知基因簇; 比较基因组学分析结果表明, 菌株 N2-10 与模式菌株枯草芽孢杆菌 168 具有较高

资助项目: 河北省自然科学基金(C2019204284); 河北省重点研发计划(21322906D); 河北省中央引导地方科技发展资金项目(226Z2904G)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2019204284), the Key Research and Development Project of Hebei Province (21322906D), and the Central Funding Project for Local Science and Technology Development (226Z2904G).

*Corresponding author. E-mail: guoxiaojun545@126.com

Received: 2022-06-09; Accepted: 2022-06-25; Published online: 2022-07-27

相似性。【结论】通过全基因组测序技术揭示了菌株 N2-10 的遗传信息，为深入了解 N2-10 产生多种次级代谢产物提供了参考，为进一步开发利用 N2-10 提供了坚实有力的依据。

关键词：枯草芽孢杆菌；全基因组测序；基因组图谱；比较基因组分析

Genome sequencing and comparative genomics analysis of *Bacillus subtilis* N2-10

SUN Yuelong¹, LIU Hao^{1,2,3}, ZHU Baocheng^{1,2,3}, ZHANG Weitao⁴, GUO Xiaojun^{*1,2,3}

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

2 Hebei Province Feed Microorganism Technology Innovation Center, Baoding 071000, Hebei, China

3 Hebei Engineering Research Center of Agricultural Waste Resource Utilization, Baoding 071000, Hebei, China

4 Hebei Animal Husbandry Station, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Abstract: [Background] With strong bacteriostatic activity, Gram-positive *Bacillus subtilis* N2-10 produces diverse hydrolases such as cellulase, thus showing huge potential in feed fermentation. [Objective] The whole genome of N2-10 was sequenced and the genes related to the synthesis of the secondary metabolites were analyzed. Based on comparative genomics, the difference between N2-10 and the model strain was dissected. The findings are expected to lay a theoretical basis for clarifying the bacteriostatic and probiotic mechanisms of this strain. [Methods] The genome of N2-10 was sequenced by Illumina NovaSeq and PacBioSequel, followed by genome assembly, gene prediction, and functional annotation. The differences between N2-10 and a model strain were analyzed by comparative genomics. [Results] The genome of N2-10 is 4 036 899 bp, with GC content of 43.88%. It has 4 163 coding genes with the total length of 3 594 369 bp, and the total length of the coding region accounts for 89.1% of the total genome length. In detail, it has 85 tRNA genes, 10 5S rRNA genes, 10 16S rRNA genes, 10 23S rRNA genes, 2 CRISPR-Cas sequences, and 6 gene islands. Moreover, this strain was also found to have a prophage. In addition, 3 048, 3 177, 3 894, and 145 genes were annotated in GO (gene ontology), COG (clusters of orthologous groups of proteins), KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes), and CAZy (carbohydrate-active enzymes) databases, respectively. At the same time, 10 gene clusters for the synthesis of secondary metabolites were predicted, including biosynthesis gene clusters rhizocticin A, bacillaene, fengycin, bacillibactin, subtilosin A, and bacilysin and 3 unknown gene clusters. Comparative genomics analysis showed that N2-10 had high homology with *B. subtilis* 168. [Conclusion] Through genome sequencing, we unveiled the genetic information of N2-10, providing a reference for further understanding the secondary metabolites of this strain and further development and utilization of it.

Keywords: *Bacillus subtilis*; genome sequencing; genome maps; comparative genomics analysis

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为发酵饲料的常用菌株，在提高动物生产性能、增强动物机体免疫能力、改善动物机体肠道环境等方

面效果显著^[1]。枯草芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌^[2]，是一种好氧化能异养型细菌，具有耐酸碱、耐高温、耐盐等特性^[3]，能够产生氨基酸、

维生素、有机酸和生长因子等多种参与机体新陈代谢的产物,而且分泌多种消化酶如蛋白酶、淀粉酶等^[4],有效促进蛋白质、淀粉、多糖等有机物的分解^[5]。

研究表明,枯草芽孢杆菌可有效提高家禽饲料能量转化率,促进家禽生长生产,提高肉、蛋产量,改善肉、蛋品质,降低家禽疾病发生率^[6]。李靖^[7]在奶牛日粮中加入枯草芽孢杆菌 BS041 可降低瘤胃中弯曲菌属和葡萄球菌属的丰度水平;程连平^[8]在湖羊日粮中添加枯草芽孢杆菌制剂后发现,免疫球蛋白、白细胞介素含量显著提高,瘤胃液氨态氮、有机酸含量显著提高;陈志敏等^[9]应用枯草芽孢杆菌发酵肉鸡饲料,当发酵饲料替代 10%基础日粮饲喂肉鸡后,可以显著提高生长性能,肉鸡肠道形态得到明显改善;王震^[10]应用枯草芽孢杆菌发酵麸皮,当发酵饲料替代 10%基础日粮饲喂育肥猪时,显著提高平均日增重,降低料重比。朱燕丽^[11]将枯草芽孢杆菌发酵麸皮饲喂肉鸡发现,发酵麸皮在提高肉鸡生长生产性能等方面发挥巨大作用。

本实验室前期筛选到一株枯草芽孢杆菌 N2-10,其具有较强的抑菌能力且还可以产木质纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等多种消化酶^[12],该菌株发酵秸秆后饲喂绵羊,可明显改善绵羊瘤胃的微生物多样性^[13]。此外,将其应用在家禽全价配合饲料上,显著提高了蛋鸡生长性能、生产性能,降低死淘率,有效抑制多种肠道病原菌^[14]。为了更好地研究该菌株的抑菌机制和发酵饲料在畜禽养殖中的效果,通过二代联合三代测序对枯草芽孢杆菌 N2-10 进行了全基因组测序、功能注释和次级代谢产物分析,并将该菌株与 NCBI 数据库中下载得到的模式菌株枯草芽孢杆菌 168 进行比较基因组分析,以期高效开发利用枯草芽孢杆菌 N2-10 提供生物信息学基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) N2-10,保存于河北农业大学农牧微生物实验室。

1.1.2 培 养 基

NB 培养基(g/L):牛肉膏 3.00,蛋白胨 10.00,NaCl 5.00。NA 培养基(g/L):牛肉膏 3.00,蛋白胨 10.00,NaCl 5.00,琼脂 20.00。

1.2 方 法

1.2.1 菌 株 基 因 组 提 取 及 测 序

将-80℃保存的枯草芽孢杆菌 N2-10 划线接种于 NA 培养基上,37℃培养 24 h,挑取单菌落接种于 100 mL NB 培养基中,37℃、220 r/min 培养 24 h,将菌液 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,送北京诺禾致源科技股份有限公司测序,库检合格后进行 PacBio Sequel 和 Illumina NovaSeq PE150 测序。

1.2.2 基 因 组 组 装 及 优 化

原始下机数据过滤质控后,利用 SMRT Link V5.0.1 软件(<https://www.pacb.com/support/software-downloads/>)对原始下机数据进行初步组装,将组装的数据校正后得到基因组组装数据。将组装数据优化后与组装结果进行比对分析,进行测序结果的矫正^[15]。

1.2.3 基 因 组 组 分 分 析

利用 Glimmer V3.02 (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>)和 GeneMarkS V4.3 软件(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark>)预测枯草芽孢杆菌 N2-10 基因组的编码基因^[16-17];利用 tRNAscan-SE V2.0 软件(<http://trna.ucsc.edu/software/>)预测 tRNA^[18];采用 rRNAmmer V1.2 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>)对 rRNA 进行分析^[19];使用 BLAST+V2.3.0 软件(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast>

+/2.3.0/)对 SnRNA 进行预测^[20]; 利用 Minced V3.0 软件(<https://github.com/ctSkennerton/minced>)预测 CRISPR-Cas 数量^[21]。利用 PHAST V2.3 软件 (<https://sourceforge.net/projects/phage-finder/files/>)预测前噬菌体个数^[22]; 利用 IslandViewer V4.0 软件 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/resources/>)预测基因岛数量^[23]。

1.2.4 基因功能分析

通过 Blast2go V2.5 软件(<https://www.blast2go.com/>)对 GO (gene ontolog)数据库进行注释^[24]; 通过 eggNOG V4.5.1 软件(<http://eggnogdb.embl.de/#/app/home>)对 COG (clusters of orthologous groups of proteins)数据库进行注释^[25]; 通过 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)在线数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)对 KEGG 进行注释^[26]; 通过 CAZy (carbohydrate-active enzymes) V6.0 软件 (<http://www.cazy.org/>)对 CAZy 数据库进行注释^[27]; 通过 antiSMASH V4.0.2 软件(<https://dl.secondarymetabolites.org/releases/4.0.2/>)对次级代谢产物进行注释^[28]。

1.2.5 比较基因组分析

利用 IQ-TREE V1.6.12 软件(<http://www.iqtree.org/release/v1.6.12>)构建同源单拷贝基因系统发育树, 建树方法为 maximum likelihood; 使用 Mummer V4.0 分析软件(<https://mummer4.github.io/>)进行共线性分析, 默认软件参数; 基因组分比较分析同 1.2.3; 基因组功能比较分析同 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 基因组测序及分析

枯草芽孢杆菌 N2-10 基因组中包含一条染色体, 大小为 4 036 899 bp, GC 含量为 43.88%; 共编码 4 163 个编码基因, 所有编码基因总长度为 3 594 369 bp, 编码基因平均长度为 863 bp, 编码区总长度占基因组总长度的 89.04%; 含有 85 个 tRNA, 10 个 5S rRNA、10 个 16S rRNA、

10 个 23S rRNA; 2 个 CRISPR-Cas, CRISPR1 所在区域为 494 724–494 986, 含有 5 个重复序列, 重复序列平均长度为 23 bp, 间隔序列平均长度 37 bp, CRISPR2 所在区域为 3 545 037–3 545 307, 含有 4 个重复序列, 重复序列平均长度为 28 bp, 间隔序列平均长度 53 bp; 1 个前噬菌体位于 1 313 578–1 348 279 处, 序列总长 34 702 bp, 包含 46 个基因; 含有基因岛 6 个, 基因岛总长度为 192 610 bp, 平均长度为 19 261 bp。菌株 N2-10 的基因组圈图见图 1, 其基因组序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 CP098417。

2.2 基因组功能分析

2.2.1 GO 注释结果

菌株 N2-10 的 GO 注释结果见图 2, 共有 3 048 个基因注释到 GO 功能, 占基因组的 73.22%。其中与细胞组成(cellular component)相关的基因数为 42.69%, 与分子功能(molecular function)相关的基因数为 57.03%, 与生物过程(biological process)相关的基因数为 56.40%。在生物过程方面, 与氧化还原(oxidation reduction process)、转录调控(regulation of transcription)等方面相关的基因占比 18.23%; 在分子功能方面, 与 DNA 结合(DNA binding)、ATP 结合(ATP binding)、水解酶活性(hydrolase activity)等方面相关的基因占比 20.20%; 在细胞组成方面, 与生物膜组成(integral component of membrane)等方面相关的基因占比 45.65%。

2.2.2 COG 注释结果

菌株 N2-10 的 COG 注释结果见图 3, 共有 3 177 个基因注释到 4 类 COG 功能, 20 种类型, 占基因组的 76.32%。除 19.96% 的基因未注释到具体功能, 菌株 N2-10 的功能主要集中在氨基酸的转运与代谢(amino acid transport and metabolism) (7.30%)、转录(transcription) (6.27%)、碳水化合物转运与代谢(carbohydrate transport and metabolism) (6.22%)、无机离子转运与代谢

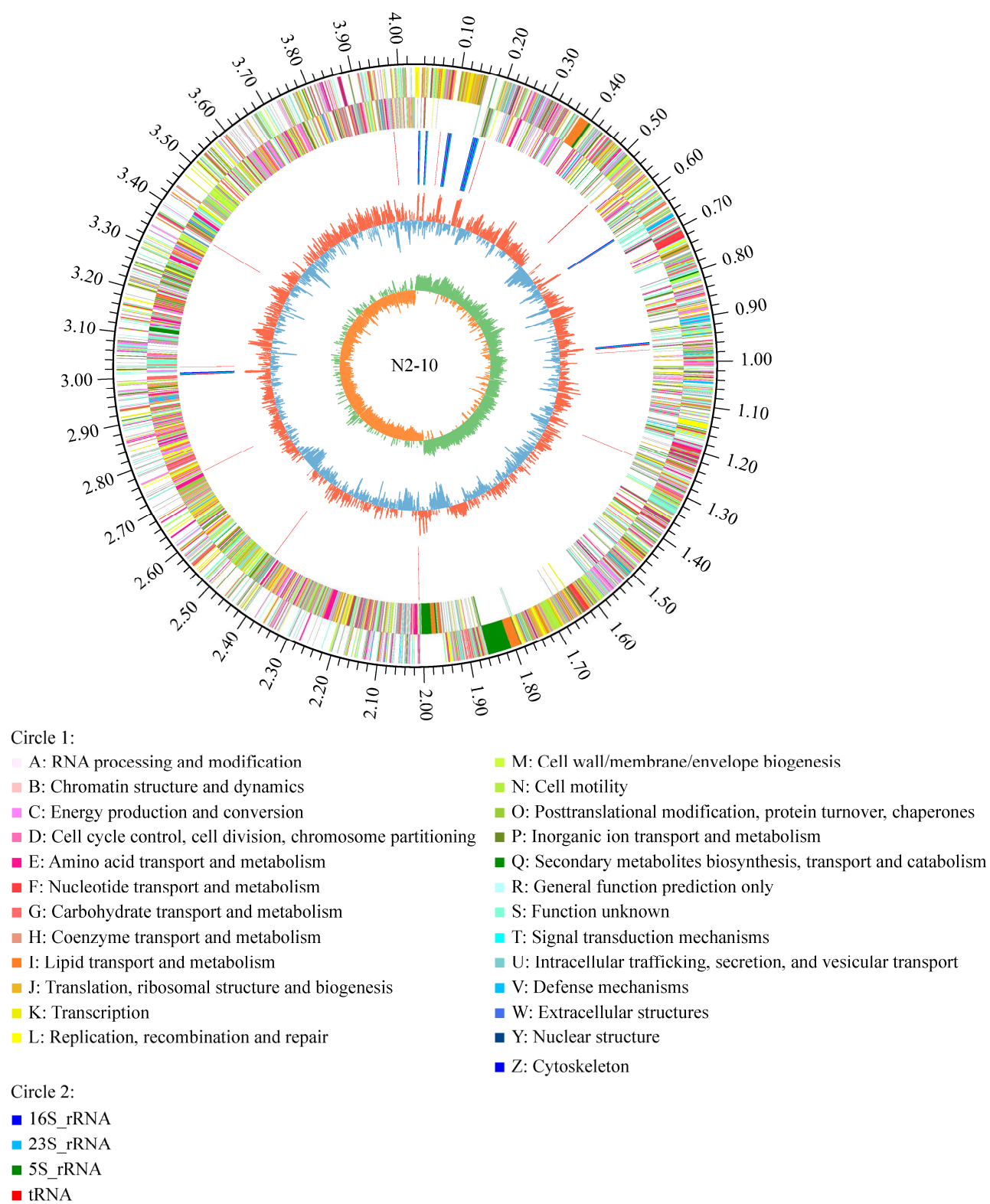


图 1 枯草芽孢杆菌 N2-10 基因组圈图
Figure 1 The circos of *Bacillus subtilis* N2-10.

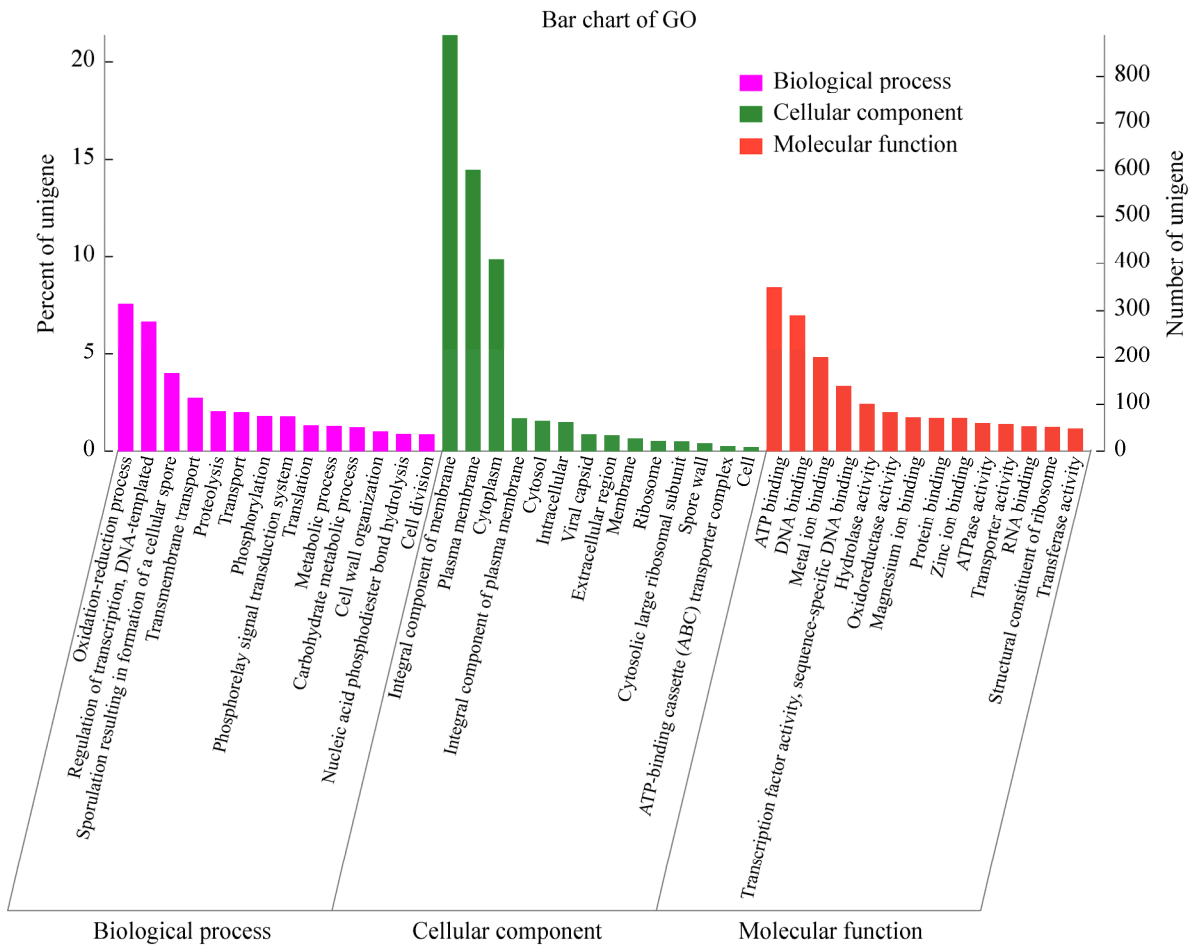


图2 枯草芽孢杆菌 N2-10 的 GO 功能分类图

Figure 2 Gene ontology annotation functional classification chart of *Bacillus subtilis* N2-10.

(inorganic ion transport and metabolism) (4.78%) 等方面。此外,有 1.37% 的基因被注释到与次级代谢产物转运和代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)相关。

2.2.3 KEGG 注释结果

N2-10 菌株的 KEGG 注释结果见图 4,共有 3 894 个基因注释到功能信息,占基因组的 93.54%。与细胞过程(cellular process)具有相关性的基因数为 3.89%,与代谢(metabolism)具有相关性的基因数为 31.40%,与人类疾病(human diseases)具有相关性的基因数为 2.02%,与遗传信息处理(genetic information processing)具有相关性的基因数为 4.42%,与生物系统(organismal

systems)具有相关性的基因数为 0.89%,与环境信息处理(environmental information processing)具有相关性的基因数为 7.76%。在 KEGG 功能注释中,与代谢通路具有相关性的基因数最多,其中碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)占比 6.78%,其次是氨基酸代谢(amino acid metabolism)占比 4.83%。另外,发现有 44 个基因与萜类和聚酮化合物的代谢(metabolism of terpenoids and polyketides)相关,其中,包括表面活性素生物合成(surfactin family lipopeptide synthetase A, B, C)及丰原素生物合成(fengycin family lipopeptide synthetase A, B, C, D, E)。

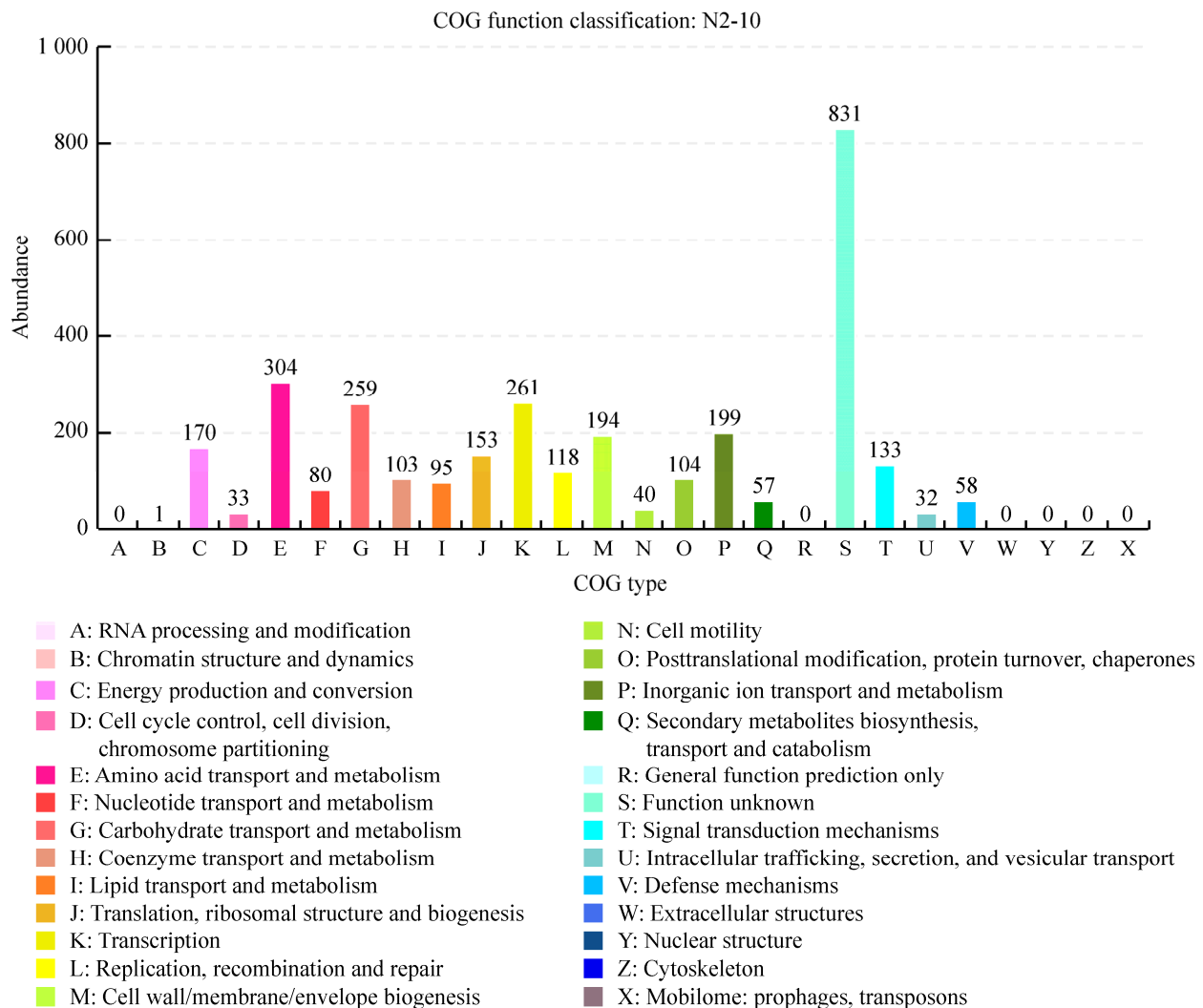


图 3 枯草芽孢杆菌 N2-10 的 COG 功能分类图

Figure 3 COG annotation functional classification chart of *Bacillus subtilis* N2-10.

2.2.4 CAZy 注释结果

菌株 N2-10 的 CAZy 注释结果见图 5, 共有 145 个基因注释到 6 类活性酶。其中, 37.24% 的基因被注释为糖苷水解酶(glycoside hydrolases), 30.34% 的基因被注释为糖基转移酶(glycosyl transferases), 20.69% 的基因被注释为碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases), 4.83% 的基因被注释为多糖裂解酶(polysaccharide lyases), 4.83% 的基因被注释为辅助活性(auxiliary activity), 还有 2.07% 的基因被注释为碳水化合物酶结合模

块(carbohydrate-binding modules)。在糖苷水解酶中, 覆盖度最高的主要是 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)、 β -1,4-木聚糖内切酶(EC 3.2.1.8)、内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4)、几丁质酶 (EC 3.2.1.14)、半乳糖苷酶(EC 3.2.1.103)等。在糖基转移酶中, UDP-葡萄糖醛酸转移酶 (EC 2.4.1.11)、纤维素合酶(EC 2.4.1.12)、蔗糖合酶 (EC 2.4.1.13)等具有较高的覆盖度。此外, 乙酰木聚糖酯酶(EC 3.1.1.72)在碳水化合物酯酶中具有较高的覆盖度。

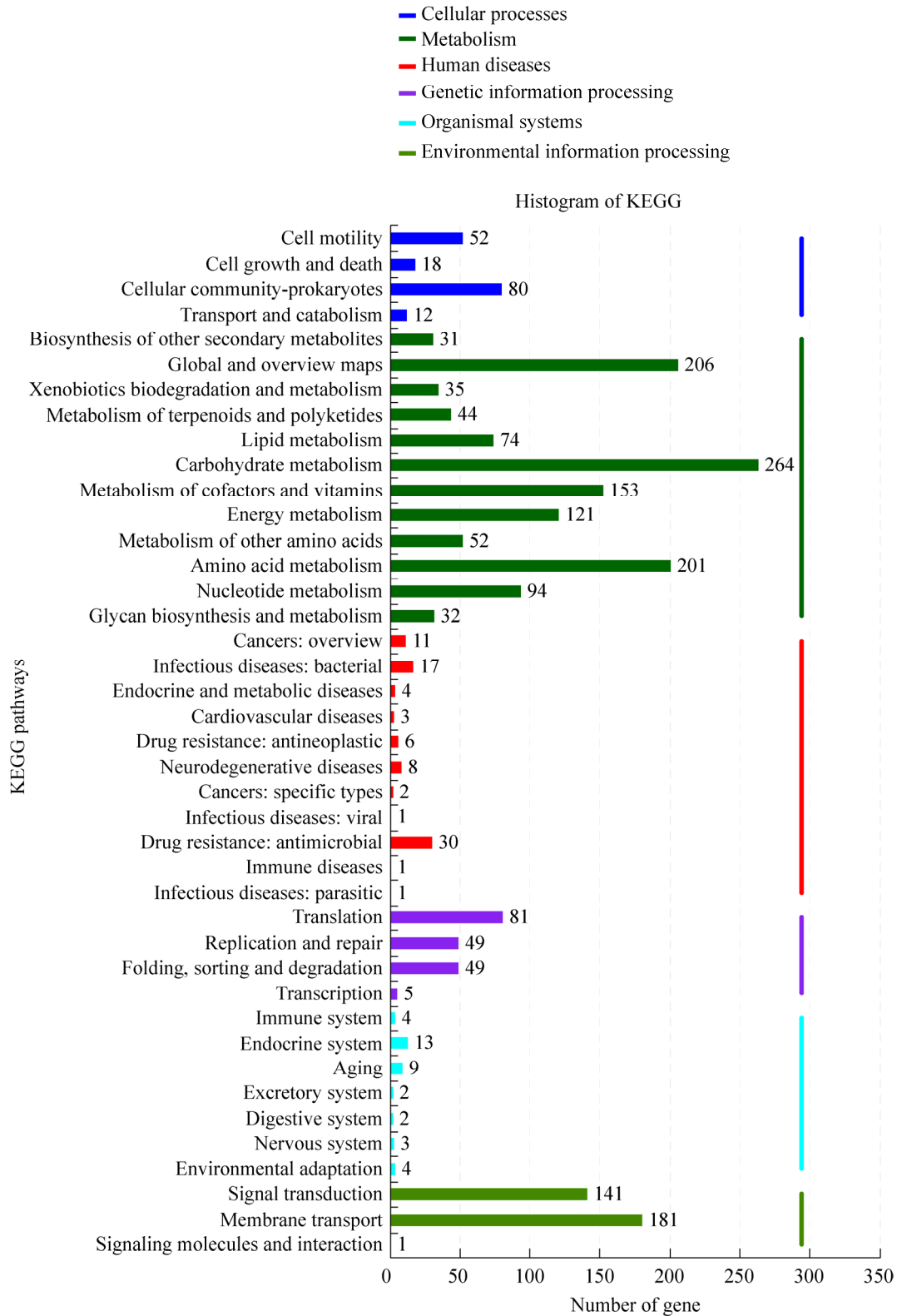


图 4 菌株 N2-10 的 KEGG 功能分类图

Figure 4 KEGG annotation functional classification chart of the *Bacillus subtilis* N2-10.

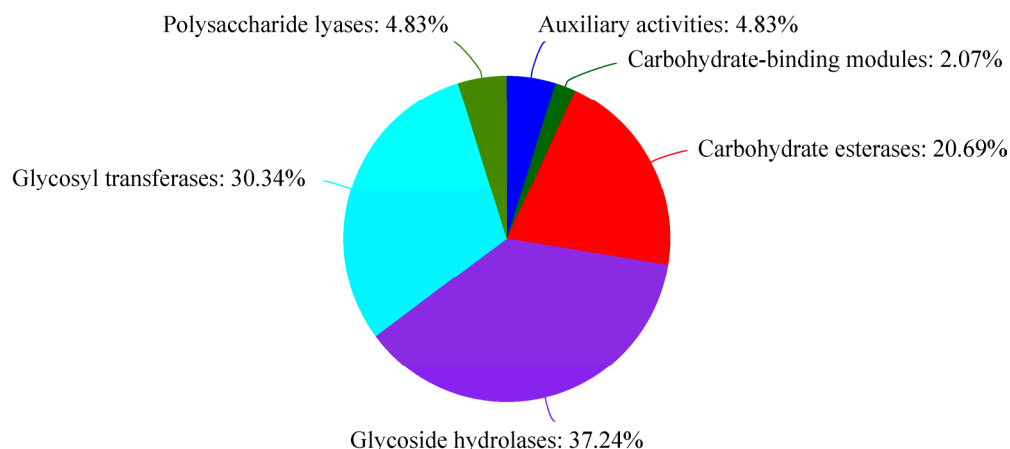


图 5 菌株 N2-10 的 CAZy 功能分类图

Figure 5 CAZy annotation functional classification chart of *Bacillus subtilis* N2-10.

2.2.5 次级代谢产物注释结果

N2-10 菌株的次级代谢产物注释结果见表 1, 共注释到 10 个次级代谢产物合成基因簇, 分别为 3 个非核糖体多肽合成酶(nrps)、2 个萜烯(terpene)、2 个塞克肽类(sactipeptide-headto tail)、1 个 nrps-transatpks-otherks、1 个第三类聚酮合酶(t3pks)和 1 个尚不明确的代谢产物。在注释的基因簇中, 根霉素(rhizocticin A)、表面活性素(surfactin)、bacillaene、丰原素(fengycin)、儿茶酸铁载体杆菌苷(bacillibactin)、芽孢杆菌素(subtilosin A)、溶杆菌素(bacilysin)生物合成基因簇为已知基因簇。此外, 还有 3 个基因簇未注释到明确的代谢产物。

2.3 比较基因组分析

2.3.1 同源单拷贝基因进化树

菌株 N2-10 基因组序列经与 NCBI 中 GenBank 比对后, 与枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* AL009126.3)、杯状芽孢杆菌 5L6 (*Cytobacillus ciccensis* CP041305.1)、地衣芽孢杆菌 ATCC 14580 (*Bacillus licheniformis* CP034569.1)、解淀粉芽孢杆菌 DSM 7 (*Bacillus amyloliquefaciens* FN597644.1)、死谷芽孢杆菌 DSM 11031 (*Bacillus vallismortis* CP026362.1) 具有较高的相似性。如图 6 所示。N2-10 与 168 菌株聚在一起, 说明 N2-10 与 168 菌株进化距离最近。

表 1 枯草芽孢杆菌 N2-10 次级代谢产物合成基因簇分类图

Table 1 antiSMASH annotation functional classification chart of *Bacillus subtilis* N2-10

Cluster ID	Type	Start	End	Similar cluster	Similarity (%)	Gene No.
Cluster1	Sactipeptide-head_to_tail	204 809	226 299	Rhizocticin biosynthetic	32	21
Cluster2	Nrps	357 110	422 501	Surfactin biosynthetic	82	49
Cluster3	Terpene	1 149 006	1 169 812	Other	0	24
Cluster4	Nrps-transatpks-otherks	1 768 961	1 878 789	Bacillaene biosynthetic	100	56
Cluster5	Nrps	1 939 075	2 022 487	Fengycin biosynthetic	100	45
Cluster6	Terpene	2 088 267	2 110 165	Other	0	23
Cluster7	t3pks	2 158 621	2 199 716	Other	0	47
Cluster8	Nrps	3 090 909	3 140 702	Bacillibactin biosynthetic	100	47
Cluster9	Sactipeptide-head_to_tail	3 659 514	3 681 125	Subtilosin A biosynthetic	100	21
Cluster10	Other	3 684 111	3 725 527	Bacilysin biosynthetic	100	43

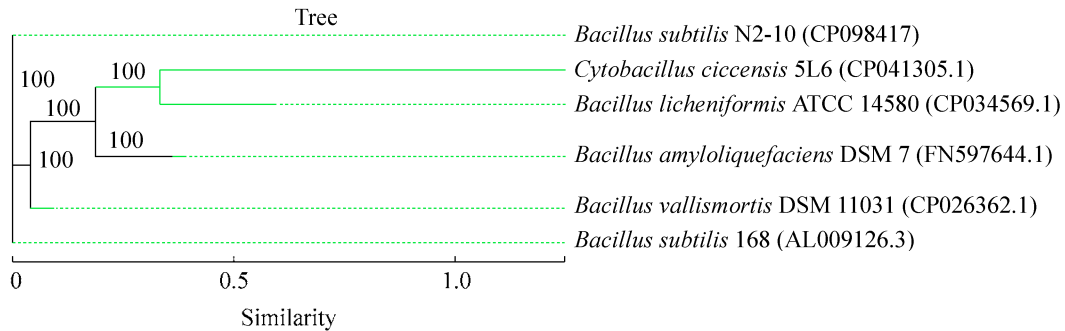


图 6 同源单拷贝基因进化树 标尺代表序列差异表现的分支长度；分支点上的数字代表自展值

Figure 6 Phylogenetic tree of homologous single copy genes. The bar shows the branch length represented by sequence differences; Numbers at the node represent the bootstrap values.

2.3.2 基因组共线性分析

在上一步分析中, N2-10 与 168 菌株基因组相似性最高, 将 2 株菌全基因组序列进行比对分析, 通过共线性分析进一步识别了两基因组的一致性及变异性。菌株 N2-10 的共线性分析结果见图 7, N2-10 与 168 菌株基因组中存在大量同源性基因, 表明 N2-10 与 168 菌株具有良好的共线性; 而非同源性基因代表了菌株 N2-10 具有自身特异性。

2.3.3 基因组组分比较分析

为进一步探究两基因组的差异, 对两基因组特征进行了比较(表 2)。由表 2 可知, 菌株 N2-10 基因组碱基数小于 168 菌株, GC 含量大于 168 菌株。N2-10 菌株基因组的编码基因数、基因岛数、前噬菌体数与 168 菌株存在差异。

2.3.4 基因功能注释比较分析

菌株 N2-10 与 168 在 GO 功能数据库中的数值比较结果具有较高的相似性, 均注释到三类生物学功能, 但菌株 N2-10 注释到的总基因数少于 168 菌株, 仅为 3 046 个基因。N2-10 基因组中与细胞组成、分子功能、生物过程相关的基因数均少于 168 菌株。菌株 N2-10 与 168 菌株在 COG 功能数据库中的数值结果具有较高的相似性, 菌株 N2-10 注释到的基因数少于 168 菌株基因组注释到的基因数, 但在 COG 类型上无

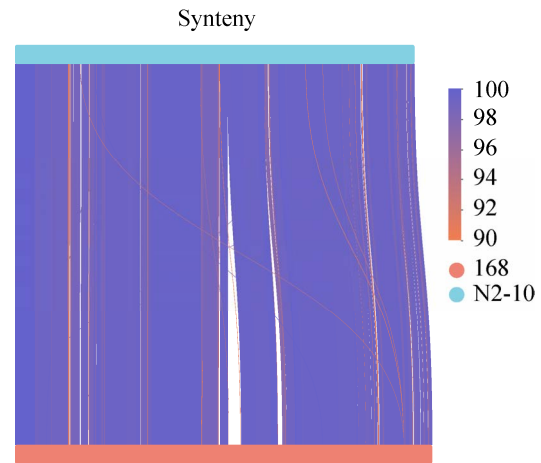


图 7 枯草芽孢杆菌 N2-10 和 168 共线性分析结果
Figure 7 Alignment results of *Bacillus subtilis* N2-10 and 168.

表 2 枯草芽孢杆菌 N2-10 和 168 基因组基本特征比较

Table 2 The general genomic characteristics of *Bacillus subtilis* N2-10 and 168

Items	<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>Bacillus subtilis</i> N2-10
Genome size (bp)	4 215 606	4 036 899
Scaffold	1	1
GC content (%)	43.51	43.88
Coding sequences	4 417	4 153
tRNA	85	85
rRNA	30	30
Gene islands	5	6
Prophage	3	1
CRISPR	2	2

差异。根据 KEGG 注释结果, 在碳水化合物代谢通路中, 相比于 168 菌株, N2-10 菌株缺失了 1 个 UTP-1-磷酸葡萄糖尿酸转移酶编码基因 (EC 2.7.7.9)、UDP-葡萄糖-4-异构酶编码基因 (EC 5.1.3.2)、N-乙酰氨基葡萄糖专用组件编码基因 (EC 2.7.1.193); 增加了 1 个果糖激酶编码基因 (EC 2.7.1.4)、 β -果糖呋喃糖苷酶编码基因 (EC 3.2.1.26)。在氨基酸代谢通路中, 相较于 168 菌株, 菌株 N2-10 具有乙酰乙酸酯 CoA-转移酶 α 亚基编码基因 (EC 2.8.3.9)、缺失了单胺氧化酶编码基因 (EC 1.4.3.4)。在碳水化合物降解酶注释方面, 菌株 N2-10 注释的糖苷水解酶编码基因数少于 168 菌株, 糖基转移酶、碳水化合物酯酶编码基因多于 168 菌株。在糖苷水解酶编码基因中, 菌株 N2-10 缺失了 1 个多聚半乳糖醛酸内切酶编码基因 (EC 3.2.1.15); 在糖基转移酶编码基因中, 相较于 168 菌株, 菌株 N2-10 具有 4-氨基-4-脱氧-1-阿拉伯糖基转移酶 (EC 2.4.2.43)、脂质-A-二糖合酶编码基因 (EC 2.4.1.182); 在碳水化合物酯酶编码基因中, N2-10 菌株相比 168 菌株增加了 3 个乙酰木聚糖酯酶编码基因 (EC 3.1.1.72)。

如表 3 所示, 168 菌株共注释到 11 个次级代谢产物合成基因簇, 其中包括 7 个已知合成基因簇和 4 个未知合成基因簇。两个基因组中 7 个次级代谢产物合成基因簇相似性较高, 每个代谢产物的编码基因数量和基因所在位置具有差异性。在 N2-10 菌株基因组中, 根霉素 (rhizoctin A) 基因簇始末位置为 204 809–226 299、表面活性素 (surfactin) 基因簇的始末位置为 357 100–422 501、bacillaene 基因簇的始末位置为 1 768 961–1 878 789、丰原素 (fengycin) 基因簇的始末位置为 1 939 075–2 022 487、儿茶酸铁载体杆菌苷 (bacillibactin) 基因簇的始末位置 3 090 909–3 140 702、芽孢杆菌素 (subtilosin

表 3 枯草芽孢杆菌 N2-10 和 168 次级代谢产物比较分析统计表

Table 3 Comparative analysis of secondary metabolites for *Bacillus subtilis* N2-10 and 168

Name	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
	168	N2-10
Rhizoctin A	23	21
Surfactin	47	49
Other	24	24
Bacillaene	55	56
Fengycin	46	45
Other	23	23
Other	47	47
Bacillibactin	46	47
Other	41	0
SubtilosinA	21	21
Bacilysin	43	43

A) 基因簇的始末位置为 3659 514–3 681 125、溶杆菌素 (bacilysin) 基因簇的始末位置为 3 684 111–3 725 527; 而在 168 菌株中, 根霉素 A 基因簇始末位置为 205 404–226 894、表面活性素基因簇的始末位置为 356 968–422 359、bacillaene 基因簇的始末位置为 1 768 725–1 878 521、丰原素基因簇的始末位置为 1 934 526–2 017 956、儿茶酸铁载体杆菌苷基因簇的始末位置为 3 260 520–3 310 259、芽孢杆菌素基因簇的始末位置为 3 826 058–3 847 669、溶杆菌素基因簇的始末位置为 3 850 669–3 892 085。

3 讨论

基因组测序技术广泛应用在基因高效、快速的探寻中。王莎等^[29]利用全基因组测序技术对内生链霉菌 (*Streptomyces* sp.) SAT1 进行了测定, 通过分析抗生素的合成途径解释了 SAT1 具有抗菌活性的原因。本试验利用 Illumina 和 PacBio 测序平台对菌株 N2-10 进行测序分析发现, 菌株 N2-10 基因组大小、GC 含量与模式菌株具有高度相似性。

在 GO 功能注释结果中, 较多的基因与分子功能相关和生物过程相关, N2-10 菌株所携带的基因参与了众多生物学过程。在 COG 功能注释结果中, N2-10 菌株的基因功能主要集中在氨基酸的转运及代谢、碳水化合物的转运及代谢、无机离子的转运及代谢, 这与 GO 功能注释结果相一致。蛋白质作为构成细胞生命的三大营养物质之一, 是构成机体组织器官的基本成分, 参与多种重要的生理活动, 因此, 饲料中必须提供足够的蛋白质才能供动物机体利用^[30]。无论是单胃动物还是反刍动物, 对于蛋白质的消化吸收都必须先将其分解为氨基酸, 才能供机体所利用^[31-32]。在 KEGG 功能注释结果中, 与碳水化合物代谢相关的基因数最多, 其次是氨基酸代谢, 这与上述注释结果相一致。此外, 还发现 44 个基因与萜类和聚酮化合物的代谢相关, 可能参与抗菌活性物质的生物合成。例如, *srfAA* (Gene0413)、*srfAB* (Gene0414)、*srfAC* (Gene0415) 均为表面活性素的生物合成基因^[33]; *ppsA* (Gene2052)、*ppsB* (Gene2051)、*ppsC* (Gene2050)、*ppsD* (Gene2049) 等为丰原素的生物合成基因^[34]。

碳水化合物在动物生长生产方面具有重要作用。碳水化合物可分为营养性多糖和结构性多糖^[35]。结构性多糖主要分为纤维素、木质素等^[36]。碳水化合物功能注释结果中显示, 菌株 N2-10 基因组中含有大量与 β -葡萄糖苷酶、 β -1,4-木聚糖内切酶、内切葡聚糖酶、乙酰木聚糖酶等相关的基因。 β -葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶属于纤维素酶家族, 在纤维素分解过程中扮演着重要角色。 β -1,4-木聚糖内切酶属于木聚糖降解酶家族, 是木聚糖水解最关键的酶, 乙酰木聚糖酶可协同木聚糖酶进行木聚糖的水解^[37]。动物饲料中含有较高比例的纤维素等结构性多糖, 难以被动物机体消化利用, 但可以

在微生物的分解作用下被机体吸收^[38], 菌株 N2-10 能够合成众多结构性多糖降解酶, 将结构性多糖转化为可供动物机体消化利用的营养物质, 进一步提高饲料转化率。

通过利用 antiSMASH 数据库进行基因比对, 发现 7 个已经报道的抗菌活性物质合成基因簇, 分别为根霉素、表面活性素、bacillaene、丰原素、儿茶酸铁载体杆菌昔、芽孢杆菌素和溶杆菌素。根霉素 A 具有广谱抗真菌作用, 在致病菌的防治中具有较大的生物潜力^[39], bacillaene 是由芽孢杆菌属产生的一类多聚烯类抑菌物质。有研究表明, bacillaene 可以介导枯草芽孢杆菌影响空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)生物膜的形成, 从而抑制此类致病菌^[40]。丰原素也是由芽孢杆菌属代谢产生的一种环状脂质肽类物质, 具有强大的抗真菌活性, 在碱性和酸性等条件下均能展现出较强的抗真菌特性和化学稳定性^[41]。儿茶酸铁载体杆菌昔对植物病原菌具有潜在抗菌活性, 可以在体内或体外抑制丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的生长。另有研究发现, 儿茶酸铁载体杆菌昔还能够通过上调特定基因介导微生物间的竞争^[42]。芽孢杆菌素 A 对某些革兰氏阳性菌具有较强抗菌活性, 研究表明, 随着菌株发生突变, 代谢产生的芽孢杆菌素 A 相应出现突变, 形成芽孢杆菌素 A1, 并展现出更强的抑菌能力^[43]。溶杆菌素是一类双肽抗菌物质, 不同于其他抗菌物质, 此类物质可以在除地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)外多个菌种中产生, 对革兰氏阴性菌具有较强抑菌活性, 目前研究证明溶杆菌素在抑制食源性病原菌中发挥主导作用^[44]。表面活性素是由芽孢杆菌属产生的一种环状脂肽类表面活性剂, 是最有效的表面活性剂之一, 由于其具有良好的抗菌和抗病毒活性, 在病原菌防治等方面具有突出作用, 值得注意

的是, 研究发现表面活性素有望成为治疗癌症和治理环境的新武器^[45]。以上也进一步证明了菌株 N2-10 基因中含有的 7 个抗菌活性物质基因簇能够为揭示菌株对多种致病菌具有抑菌作用提供理论依据。

微生物是复杂且多样的, 比较基因组学的研究能够帮助人们更清晰地了解微生物物种间的差异, 进一步探究菌株基因组基因在进化过程中发生的变化, 从而增强其对环境的适应能力^[46]。Kwon 等^[47]通过比较基因组学开发了用于食品检测枯草芽孢杆菌的引物探针, 基于此技术研发的引物探针具有较高的灵敏性和选择性。Abdelhamid 等^[48]的研究表明, 双歧杆菌属是生命早期肠道微生物菌群中最丰富的物种之一, 与人类健康具有重要联系, 通过比较基因组分析, 挖掘了双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentium*) 基因组中存在的碳水化合物降解酶系统, 解密了不同部位分离的双歧杆菌的糖酵解能力, 强调了比较基因组在揭示双歧杆菌糖酵解能力和糖酵解能力对人类肠道中碳水化合物消化利用的影响。菌株在进化过程中, 因环境选择, 易造成基因的缺失、获得和变异等^[49]。通过比较基因组学对菌株基因组进行比较分析, 更有助于加深对菌株进化能力的揭示。

本实验以枯草芽孢杆菌 168 模式菌株为参考, 对比了 N2-10 与 168 菌株的基因组结构及基因组功能。结果发现, N2-10 与 168 菌株两基因组编码的氨基酸具有同源性^[50]。在基因组组成中, 菌株 N2-10 基因组的编码基因数、基因岛数、前噬菌体数与 168 菌株存在差异, N2-10 菌株可能具有更强的环境适应能力。在碳水化合物酶方面, N2-10 菌株较 168 菌株多了 3 个乙酰木聚糖酯酶。乙酰木聚糖酯酶在 20 世纪 80 年代被发现^[51], 乙酰木聚糖酯酶分为不同家族, 具有不同的底物特异性^[52], 其作

用位点为木糖残基的 O-乙酰基^[53], 木聚糖是构成半纤维素的主要成分, 木聚糖主链骨架和侧链的降解需多种酶完成降解, 其中乙酰基是阻碍木聚糖降解的限制因素之一, 解除乙酰基的限制, 可帮助提高木聚糖的有效降解^[54]。目前, 乙酰木聚糖酯酶的催化机制研究较为透彻。此外, 乙酰木聚糖酯酶的酶协同作用也被众多研究者关注, 乙酰木聚糖酯酶与阿拉伯呋喃糖苷酶发挥协同作用, 能够有效降解木聚糖。乙酰木聚糖酯酶与纤维素酶协同作用能够促进 β -1,4 糖苷键的水解效率, 进而大幅提高纤维素降解率^[55-56]。由此可见, 菌株 N2-10 基因组中较多的乙酰基木聚糖酯酶编码基因在提高饲料碳水化合物消化率方面具有重要作用。此外, 菌株 N2-10 比 168 菌株增加了 β -果糖呋喃糖苷酶编码基因和果糖激酶编码基因。 β -果糖呋喃糖苷酶又可称为蔗糖转化酶, 能够催化蔗糖转化为葡萄糖和果糖^[57]。从本质上讲, β -果糖呋喃糖苷酶是一种水解酶, 在低聚乳果糖的生物合成中至关重要, 低聚乳果糖是一种功能性三糖, 具有低热量等特点, 可有效促进肠道双歧杆菌的生长繁殖, 抑制肠道病原菌增殖和改善肠道功能等^[58]。在本研究中, 与 168 菌株相比, N2-10 菌株催化 D-葡萄糖转化 D-果糖的效率更高。果糖激酶是果糖进一步转化分解过程中重要的酶, 可将果糖进一步磷酸化为果糖-6-磷酸。研究表明, 果糖激酶是一种双功能酶, 不仅具有催化活性, 还具有调节功能^[59]。目前已经证实果糖激酶参与糖代谢过程, 特别是果糖必须经过磷酸化后才可以进一步进行代谢; 此外, 果糖激酶还参与糖感受和信号转导过程^[60]。

在抗菌物质合成方面, N2-10 菌株含有 10 个合成基因簇。168 菌株具有 11 个合成基因簇, 包括 7 个已知基因簇和 4 个未知基因簇。两菌株基因组中, 根霉素 A、表明活性素、bacillaene、

丰原素、儿茶酸铁载体杆菌苷、芽孢杆菌素 A、溶杆菌素合成基因簇和 3 个未知基因簇具有较高相似性。尽管 N2-10 与 168 菌株合成抗菌物质的基因簇具有相似性, 但 N2-10 相对 168 菌株的抑菌能力强弱还需进一步研究。

4 结论

本文通过 Illumina NovaSeq PE150 和 PacBio Sequel 测序技术对枯草芽孢杆菌 N2-10 进行了全基因组测序, N2-10 基因组大小为 4 036 899 bp, GC 含量为 43.88%; 共编码 4 163 个编码基因; 通过分析发现, 菌株 N2-10 基因组含有根霉素 A、表明活性素、bacillaene、丰原素、儿茶酸铁载体杆菌苷、芽孢杆菌素 A、溶杆菌素等多个次级代谢产物合成基因簇, 以及 β -葡萄糖苷酶、 β -1,4-木聚糖内切酶、内切葡聚糖酶、几丁质酶、半乳糖苷酶、乙酰木聚糖酶等多种水解酶编码基因, 这对进一步解释菌株 N2-10 具有较强抑菌能力和能够产生多种水解酶提供了宝贵的依据。此外, 比较基因组学分析表明, 菌株 N2-10 与模式菌株枯草芽孢杆菌 168 具有较高相似性, 说明该菌在长期的进化中仍然保持高度的水平基因转移。本研究为进一步阐明菌株 N2-10 的作用机制和进一步开发利用 N2-10 菌株提供了坚实有力的依据。

REFERENCES

- [1] KIM HB, BOREWICZ K, WHITE BA, SINGER RS, SREEVATSAN S, TU ZJ, ISAACSON RE. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 124-1330.
- [2] BEGG DP, STEINBRECHER KA, MUL JD, CHAMBERS AP, KOHLI R, HALLER A, COHEN MB, WOODS SC, SEELEY RJ. Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis[J]. *Diabetes*, 2014, 63(11): 3798-3804.
- [3] POURABEDIN M, ZHAO X. Prebiotics and gut microbiota in chickens[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(15): fnv122.
- [4] CAI D, RAO Y, ZHAN Y, WANG Q, CHEN S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect[J]. *Journal of applied microbiology*, 2019, 126(6): 1632-1642.
- [5] 杜晓雨, 赵恺, 赵志敏, 赵吉. 枯草芽孢杆菌微生态制剂发酵研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 903-914.
DU XY, ZHAO K, ZHAO ZM, ZHAO J. Progress on *Bacillus subtilis* microbial ecological agents by fermentation[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 903-914 (in Chinese).
- [6] SEN S, INGALE SL, KIM YW, KIM JS, KIM KH, LOHAKARE JD, KIM EK, KIM HS, RYU MH, KWON IK, CHAE BJ. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology[J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 93(1): 264-268.
- [7] 李靖. 枯草芽孢杆菌对荷斯坦育成牛生长性能和瘤胃微生物区系的影响[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2019.
LI J. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance and rumen microflora in Holstein cows[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [8] 程连平. 富硒酵母和枯草芽孢杆菌对湖羊羔羊生长性能、消化和免疫机能的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018.
CHENG LP. Effect of selenium-enriched yeast and *Bacillus subtilis* on growth performance, digestion and immune function of hu lambs[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [9] 陈志敏, 郑爱娟, 常文环, 蔡辉益, 刘国华. 植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌混菌发酵饲料对肉鸡生长性能、屠宰性能和肠道结构的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(12): 3909-3916.
CHEN ZM, ZHENG AJ, CHANG WH, CAI HY, LIU GH. Effects of *Lactobacillus* and *Bacillus subtilis* mixed fermentation feed on growth performance, slaughter performance and intestinal morphology of broilers[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(12): 3909-3916 (in Chinese).
- [10] 王震. 不同菌种发酵麸皮对育肥猪生产性能、抗氧化以及粪便微生物的影响[D]. 泰安: 山东农业大学硕士

- 学位论文, 2018.
- WANG Z. Effects of different strains fermented bran on the production performance, antioxidant and fecal microorganism of pigs[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [11] 朱燕丽. 麸皮发酵物对肉鸡生产性能、养分利用率和颗粒制作影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2019.
- ZHU YL. Study on the effects of bran fermentation on performance, nutrient utilization rate and granule production of broilers[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [12] 张亚茹, 张伟涛, 王硕, 李术娜, 郭伟婷, 王树香, 李红亚. 枯草芽孢杆菌 N2-10 体外益生特性评价[J]. 饲料工业, 2020, 41(24): 12-17.
- ZHANG YR, ZHANG WT, WANG S, LI SN, GUO WT, WANG SX, LI HY. Evaluation of *in vitro* probiotic properties of *Bacillus subtilis* N₂-10[J]. Feed Industry, 2020, 41(24): 12-17 (in Chinese).
- [13] 郭威, 郭晓军, 周贤, 李术娜, 朱宝成. 复合菌剂发酵玉米秸秆对绵羊瘤胃液细菌多样性的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(4): 736-745.
- GUO W, GUO XJ, ZHOU X, LI SN, ZHU BC. Effect of corn stalk fermented by complex bacterial on rumen bacteria diversity in sheep[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(4): 736-745 (in Chinese).
- [14] 魏越波. 益生菌发酵配合饲料在蛋鸡无抗养殖上的应用[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2020.
- WEI YB. Fermentation of compound feed by probiotics and application in laying hens breeding without antibiotic[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [15] REINER J, PISANI L, QIAO WQ, SINGH R, YANG Y, SHI LS, KHAN WA, SEBRA R, COHEN N, BABU A, EDELMANN L, JABS EW, SCOTT SA. Cytogenomic identification and long-read single molecule real-time (SMRT) sequencing of a Bardet-Biedl Syndrome 9 (BBS₉) deletion[J]. Npj Genomic Medicine, 2018, 3: 3.
- [16] DELCHER AL, BRATKE KA, POWERS EC, SALZBERG SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679.
- [17] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl_2): W451-W454.
- [18] LOWE TM, EDDY SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964.
- [19] LAGESEN K, HALLIN P, RØDLAND EA, STAERFELDT HH, ROGNES T, USSERY DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [20] GARDNER PP, DAUB J, TATE JG, NAWROCKI EP, KOLBE DL, LINDGREEN S, WILKINSON AC, FINN RD, GRIFFITHS-JONES S, EDDY SR, BATEMAN A. Rfam: updates to the RNA families database[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 37(suppl_1): D136-D140.
- [21] BLAND C, RAMSEY TL, SABREE F, LOWE M, BROWN K, KYRPIDES NC, HUGENHOLTZ P. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats[J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 209.
- [22] ZHOU Y, LIANG YJ, LYNCH KH, DENNIS JJ, WISHART DS. PHAST: a fast phage search tool[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(suppl_2): W347-W352.
- [23] BERTELLI C, LAIRD MR, WILLIAMS KP, SIMON Fraser University Research Computing Group, LAU BY, HOAD G, WINSOR GL, BRINKMAN FS. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W30-W35.
- [24] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, SHERLOCK G. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [25] JENSEN LJ, JULIEN P, KUHN M, von MERING C, MULLER J, DOERKS T, BORK P. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 36(suppl_1): D250-D254.
- [26] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27-30.
- [27] LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, COUTINHO PM, HENRISSAT B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 42(D1): D490-D495.
- [28] BLIN K, WOLF T, CHEVRETTE MG, LU XW,

- SCHWALEN CJ, KAUTSAR SA, SUAREZ DURAN HG, de los SANTOS ELC, KIM HU, NAVE M, DICKSCHAT JS, MITCHELL DA, SHELEST E, BREITLING R, TAKANO E, LEE SY, WEBER T, MEDEMA MH. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W36-W41.
- [29] 王莎, 窦桂铭, 马玉超. 植物内生链霉菌 *Streptomyces* sp. SAT1 的基因组测序和比较基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3039-3053.
- WANG S, DOU GM, MA YC. Genome sequencing and comparative genome analysis of *Streptomyces* sp. SAT1[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3039-3053 (in Chinese).
- [30] 李玲玉. 线粒体脂肪酸 β -氧化对鱼类能量代谢稳态的维持及调控机制研究[D]. 上海: 华东师范大学博士学位论文, 2020.
- LI LY. The regulatory mechanisms of mitochondrial fatty acid β -oxidation in energy homeostasis maintenance of fish[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2020 (in Chinese).
- [31] 宗学阳, 张华文, 史怀平. 羔羊消化生理及消化道微生物研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(4): 124-129.
- ZONG XY, ZHANG HW, SHI HP. Advance in research on digestive physiology and gastrointestinal microflora of lambs[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(4): 124-129 (in Chinese).
- [32] WU SJ, BHAT ZF, GOUNDER RS, MOHAMED AHMED IA, AL-JUHAIMI FY, DING Y, BEKHIT AEDA. Effect of dietary protein and processing on gut microbiota—a systematic review[J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 453.
- [33] RAHMAN FB, SARKAR B, MONI RP, RAHMAN MS. Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology Reports*, 2021, 32: e00686.
- [34] STELLER S, VOLLENBROICH D, LEENDERS F, STEIN T, CONRAD B, HOFEMEISTER J, JACQUES P, THONART P, VATER J. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3[J]. *Chemistry & Biology*, 1999, 6(1): 31-41.
- [35] DASHTY M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism[J]. *Clinical Biochemistry*, 2013, 46(15): 1339-1352.
- [36] MENG M, CHENG D, HAN LR, CHEN YY, WANG CL. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola frondosa* fruiting body[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 1134-1143.
- [37] 朱天地, 何瑶, 杨标, 刘加驰, 邬敏辰. 乙酰木聚糖酯酶协同木聚糖酶降解木聚糖的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(4): 375-380.
- ZHU TD, HE Y, YANG B, LIU JC, WU MC. Combinative degradation of xylan with acetyl xylan esterase and xylanase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(4): 375-380 (in Chinese).
- [38] MOITA VHC, DUARTE ME, KIM SW. Functional roles of xylanase enhancing intestinal health and growth performance of nursery pigs by reducing the digesta viscosity and modulating the mucosa-associated microbiota in the jejunum[J]. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(5): skac116.
- [39] VILLA-RODRIGUEZ E, MORENO-ULLOA A, CASTRO-LONGORIA E, PARRA-COTA FI, de LOS SANTOS-VILLALOBOS S. Integrated omics approaches for deciphering antifungal metabolites produced by a novel *Bacillus* species, *B. cabrialesii* TE3T, against the spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum)[J]. *Microbiological Research*, 2021, 251: 126826.
- [40] EREGA A, STEFANIC P, DOGSA I, DANEVČIČ T, SIMUNOVIC K, KLANČNIK A, SMOLE MOŽI NA S, MANDIC MULEC I. Bacillaene mediates the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0295520.
- [41] GIMENEZ D, PHELAN A, MURPHY CD, COBB SL. Fengycin A analogues with enhanced chemical stability and antifungal properties[J]. *Organic Letters*, 2021, 23(12): 4672-4676.
- [42] DIMOPOULOU A, THEOLOGIDIS I, BENAKI D, KOUKOUNIA M, ZERVAKOU A, TZIMA A, DIALLINAS G, HATZINIKOLAOU DG, SKANDALIS N. Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600[J]. *mSphere*, 2021, 6(4): e0037621.
- [43] HUANG T, GENG H, MIYYAPURAM VR, SIT CS, VEDERAS JC, NAKANO MM. Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(18): 5690-5696.
- [44] NANNAN C, VU HQ, GILLIS A, CAULIER S, NGUYEN TTT, MAHILLON J. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne

- pathogens[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 327: 28-35.
- [45] SANTOS VSV, SILVEIRA E, PEREIRA BB. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2018, 21(6/7/8): 382-399.
- [46] ZHANG YZ, JALAN N, ZHOU XF, GOSS E, JONES JB, SETUBAL JC, DENG XL, WANG N. Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing *Xanthomonas*[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(10): 2128-2138.
- [47] KWON EA, LEE JI, PARK JW, KIM SS. Application of comparative genomics in the development of DNA probes to detect *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*[J]. *LWT*, 2021, 142: 110996.
- [48] ABDELHAMID AG, EL-DOUGDOUG NK. Comparative genomics of the gut commensal *Bifidobacterium bifidum* reveals adaptation to carbohydrate utilization[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 547: 155-161.
- [49] 王光路, 王梦园, 刘兰茜, 马科, 杨雪鹏. 适应性实验室进化在工业生产菌株选育中应用的进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 306-322.
WANG GL, WANG MY, LIU LX, MA K, YANG XP. Progress of adaptive laboratory evolution for industrial strain breeding[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 306-322 (in Chinese).
- [50] CABAL A, JUN SR, JENJAROENPUN P, WANCHAI V, NOOKAEW I, WONGSURAWAT T, BURGESS MJ, KOTHARI A, WASSENAAR TM, USSERY DW. Genome-based comparison of *Clostridioides difficile*: average amino acid identity analysis of core genomes[J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76(3): 801-813.
- [51] BIELY P. Microbial xylanolytic systems[J]. *Trends in Biotechnology*, 1985, 3(11): 286-290.
- [52] UHLIARIKOVÁ I, VRŠANSKÁ M, MCCLEARY BV, BIELY P. Positional specificity of acetylxylan esterases on natural polysaccharide: an NMR study[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2013, 1830(6): 3365-3372.
- [53] POUTANEN K, SUNDBERG M, KORTE H, PULS J. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 33(5): 506-510.
- [54] WANG JQ, ZHANG HM, WU MC, TANG CD. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, Auxyn10A, from *Aspergillus usamii*[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(5): 1029-1038.
- [55] MORIYOSHI K, KOMA D, YAMANAKA H, SAKAI K, OHMOTO T. Expression and characterization of a thermostable acetylxylan esterase from *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* involved in the degradation of insoluble cellulose acetate[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(12): 2495-2498.
- [56] RAWEESRI P, RIANGRUNGROJANA P, PINPHANICHAKARN P. A-l-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(18): 8981-8986.
- [57] 黄红卫, 刘艳丽, 李春. 糖苷酶的研究及其改造策略[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 55-60.
HUANG HW, LIU YL, LI C. Progress in glycosidase and modification of strategies[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 55-60 (in Chinese).
- [58] 丁为龙, 张庆明, 马旺, 吴斌, 何冰芳. β -呋喃果糖苷酶的固定化及其在低聚乳糖合成中的应用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(1): 9-16.
DING WL, ZHANG QM, MA W, WU B, HE BF. Immobilization of β -fructofuranosidase for the synthesis of lactosucrose[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 9-16 (in Chinese).
- [59] LORETI E, de BELLIS L, ALPI A, PERATA P. Why and how do plant cells sense sugars? [J]. *Annals of Botany*, 2001, 88(5): 803-812.
- [60] LEÓN P, SHEEN J. Sugar and hormone connections[J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(3): 110-116.