



# 基于宏基因组研究植物乳酸菌或博落回提取物对山羊回肠微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的影响

张小丽<sup>1,2</sup>, 谭支良<sup>1</sup>, 焦金真<sup>1\*</sup>

1 中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室 畜禽养殖污染控制与资源化技术国家工程实验室 湖南省动物营养生理与代谢过程重点实验室, 湖南 长沙 410125

2 中国科学院大学, 北京 100049

张小丽, 谭支良, 焦金真. 基于宏基因组研究植物乳酸菌或博落回提取物对山羊回肠微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4218-4231.

ZHANG Xiaoli, TAN Zhiliang, JIAO Jinzhen. *Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* affects the biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> by ileal microbiota of weaned goats: a metagenomics study[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4218-4231.

**摘要:** 【目的】探索研究反刍动物胃肠道微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的方法, 并评估植物乳酸菌或博落回提取物对断奶山羊回肠食糜微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的影响。【方法】选取体重相近年龄相仿的断奶黑山羊 20 只, 随机分为对照组(CON, n=7)、乳酸菌组(LAC, n=7)和博落回组(MAC, n=6)。CON 组饲喂普通的日粮, LAC 组饲喂基础日粮+10 g/d 的植物乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* P-8 strains, 4.0×10<sup>9</sup> CFU/g), MAC 组饲喂基础日粮+0.3 g/d 的博落回提取物(*Macleaya cordata* 3.75%)。试验结束后, 采集回肠中段食糜样品。利用宏基因组测序技术, 比对最新功能基因数据库 VB12Path 和公共数据库 KEGG, 分析植物乳酸菌和博落回提取物对山羊回肠食糜微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的影响。【结果】结果显示, 比对 VB12Path 数据库共注释到 55 个与维生素 B<sub>12</sub> 合成相关的基因。与 CON 组相比, LAC 组和 MAC 组中合成维生素 B<sub>12</sub> 基因的丰富度和均匀度降低(P<0.05)。3 组间基因的 β 多样性也有显著的差异(P<0.05); 比对 KEGG 数据库共注释到 49 个与维生素 B<sub>12</sub> 合成相关的基因, LAC 组的多样性与 CON 组没有差异, 但 MAC 组的 α 多样性显著降低(P<0.05)。值得注意的是, 比对 VB12Path 数据库和 KEGG 数据库均发现 LAC 组和 MAC 组中参与前咕啉 2 合成途径、参与无氧合成途径、有氧合成途径、参与重排转换途径以及腺苷钴胺素合成途径的部分基因(*glxX*、*cbiT*、*cobT* 和 *btuD* 等)的丰度均显著地高于 CON 组(P<0.05)。【结

资助项目: 国家自然科学基金(31972992)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31972992).

\*Corresponding author. E-mail: jjz@isa.ac.cn

Received: 2023-03-20; Accepted: 2023-05-22; Published online: 2023-05-27

论】2个数据库比对后的相似结果表明博落回提取物在对断奶山羊回肠微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 相关代谢上与植物乳酸菌的作用相似, 均可以通过改变其多样性和提高部分关键基因的丰度, 从而影响微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的潜能, 为后期博落回提取物和植物乳酸菌在畜牧养殖中的运用提供一定的理论支撑。此外, 2个数据库比对的差异提示未来研究胃肠道微生物维生素 B<sub>12</sub> 相关代谢时, 应用多个数据库比对, 能更全面精确地进行评价, 为后期分析过程奠定研究基础和提供新的思路。

关键词: 山羊; 宏基因组; 回肠; 益生元; 维生素 B<sub>12</sub> 合成

## ***Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* affects the biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> by ileal microbiota of weaned goats: a metagenomics study**

ZHANG Xiaoli<sup>1,2</sup>, TAN Zhiliang<sup>1</sup>, JIAO Jinzhen<sup>1\*</sup>

1 CAS Key Laboratory of Agroecological Processes in Subtropical Region, National Engineering Laboratory for Pollution Control and Waste Utilization in Livestock and Poultry Production; Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Nutritional Physiology and Metabolic Process, Institute of Subtropical Agriculture, The Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract: [Objective]** To explore the vitamin B<sub>12</sub> synthesis in ruminant gastrointestinal and evaluate the effect of *Lactobacillus plantarum* (LAC) or *Macleaya cordata* (MAC) on the synthesis of vitamin B<sub>12</sub> by the ileal microbiota of weaned goats. **[Methods]** Twenty weaned black goats with similar body weights and ages were randomly assigned into a control group ( $n=7$ ), a LAC group ( $n=7$ ), and a MAC group ( $n=6$ ). The control group was fed with a normal diet, and the LAC and MAC groups with normal diets supplemented with LAC P-8 at  $4.0 \times 10^9$  CFU/g and 0.3 g/d MAC (3.75%), respectively. The contents in the middle section of ileum were collected for metagenomic sequencing. VB12Path and KEGG were employed to analyze the sequencing results. **[Results]** A total 55 and 49 key genes associated with vitamin B<sub>12</sub> synthesis were identified in VB12Path and KEGG, respectively. The alpha and beta diversity of genes involved in vitamin B<sub>12</sub> synthesis were changed by the supplementation of LAC or MAC ( $P < 0.05$ ). Compared with that in the control group, the diversity of the LAC group showed little difference and that of the MAC group decreased ( $P < 0.05$ ). The abundance of genes involved in precorrin-2 synthesis pathway, aerobic and anaerobic synthesis pathways, salvage pathway, and Post-AdoCbi-P pathway (e.g., *gltX*, *cblT*, *cobT*, and *btuD*) in LAC and MAC groups was higher than that in the control group. **[Conclusion]** The supplementation of LAC or MAC enhanced the synthesis of vitamin B<sub>12</sub> by ileal microorganisms. This study expands our understanding and analytical method of the microbial vitamin B<sub>12</sub> synthesis.

**Keywords:** goats; metagenome; ileum; prebiotics; vitamin B<sub>12</sub> synthesis

维生素 B<sub>12</sub> (又称为钴胺素)是生命体不可或缺的营养素, 机体中以二脱氧腺苷钴胺素和甲钴胺素 2 种辅酶的形式参与嘌呤和嘧啶的合成、甲基的转移、氨基酸及碳水化合物和脂肪酸的代谢<sup>[1]</sup>。研究发现, 维生素 B<sub>12</sub> 或钴的含量与动物的生产性能密切相关<sup>[2]</sup>。值得注意的是, 动物自身没有合成维生素 B<sub>12</sub> 的能力<sup>[3]</sup>, 一般通过外源补充或在钴供应充足的情况下, 由胃肠道中的细菌和古菌合成<sup>[2]</sup>。研究表明<sup>[1]</sup>, 微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 是在酶的催化下, 利用五碳的谷氨酸或者四碳的甘氨酸经过一系列的缩合、脱氢、转氨和脱氨等反应生成前咕啉 2 (precorrin-2 synthesis pathway); 前咕啉 2 可通过无氧合成途径(anaerobic pathway)或有氧合成途径(aerobic pathway), 经过脱水、脱氨, 在不同的甲基转移酶的作用下完成环的缩合和去乙酰基作用及钴原子的并入, 最终得到钴(II)啉酸 a,c-二酰胺; 再由腺苷钴胺素合成途径(post-AdoCbi-P pathway)最终生成维生素 B<sub>12</sub>。此外, 类咕啉通过重排转换合成途径(salvage pathway)也能得到维生素 B<sub>12</sub>。

早期由于技术手段的局限性, 一般是通过细菌和藻类的共培养来研究维生素 B<sub>12</sub> 的合成代谢<sup>[4]</sup>。得益于基因技术的不断创新和发展, 宏基因组学可较为全面地分析复杂环境中微生物群落的结构和功能<sup>[5]</sup>。但是由于维生素 B<sub>12</sub> 合成过程复杂, 很多反应步骤相似, 同源性高, 导致传统的公共数据库无法准确地区分序列相似且高度同源但参与不同合成途径的基因<sup>[6]</sup>。例如, eggNOG 和 COG 等数据库无法将参与有氧途径的 *cbi* 基因和参与无氧途径的 *cob* 基因区分开。利用常见的公共数据库比对, 容易出现假阳性结果<sup>[6]</sup>。为了解决以上的问题, 研究者们一直努力构建特异性更强、更精确、更全面的功能数据库<sup>[4]</sup>。经文献调研, 近期海洋微生物

学者针对微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 构建了一个较为完整的数据库: VB12Path 数据库。该数据库包含 60 个参与维生素 B<sub>12</sub> 的基因, 有 287 731 条序列和 21 154 个分类单元。该数据库在基因水平上, 包含的基因涵盖了所有参与维生素 B<sub>12</sub> 合成代谢相关的关键基因。此外, 在序列水平上, 该数据库所用的序列整合了 Swiss-Prot、TrEMBL 和 NCBI RefSeq 等多个数据库, 并经过反复地校对, 确保了序列的完整性和准确性, 因此应用该数据库能更精确、更全面地分析复杂环境中微生物的维生素 B<sub>12</sub> 合成代谢<sup>[4]</sup>。但是由于数据库较新, 且目前缺乏利用该数据库研究反刍动物胃肠道微生物维生素 B<sub>12</sub> 代谢的文献, 无法确定是否在反刍动物胃肠道上同样适用, 更没有利用这个数据库与其他数据库(KEGG)比对结果比较。因此本研究目的之一是利用 VB12Path 数据库完成对反刍动物胃肠道微生物维生素 B<sub>12</sub> 合成的方法探索, 同时与传统 KEGG 数据库比对结果进行比较, 为后续的研究奠定基础 and 提供方法。

羔羊的培育是养羊业规模化和集约化重要的环节, 直接影响养殖业的经济效益, 其中断奶是羔羊培育过程中关键的一个阶段。鉴于小肠壁分布大量的毛细血管, 是机体吸收营养物质的重要部位。且由于突然给予动物固体饲料, 断奶会引起回肠微生物迅速变化, 日粮中的营养成分也会影响回肠微生物的定殖<sup>[7]</sup>。此外, 本课题组未发表的数据显示, 相较于瘤胃和盲肠(77.58 pg/mL、183.68 pg/g), 回肠中的维生素 B<sub>12</sub> 的浓度最高(816.62 pg/g)。因此本研究将回肠作为研究对象。乳酸菌作为益生菌添加剂来缓解断奶应激已被广泛研究。例如, 日粮中添加乳酸菌可以改善羔羊的肠道菌群平衡, 提高机体免疫力, 降低炎症反应和腹泻率<sup>[8]</sup>。此外, 本课题组前期研究表明, 断奶

羔羊日粮中添加植物乳酸菌可以减轻羔羊的肠道氧化损伤<sup>[9]</sup>。博落回提取物是一种纯天然的草本物质,在畜禽养殖中具有重要的应用价值。研究表明博落回提取物可以通过改变血清中氨基酸代谢调节机体的免疫,缓解炎症反应,增强机体的免疫力,同时还可以抑制肠道中有害菌的增殖,促进益生菌的生长,从而维持肠道健康<sup>[10]</sup>。笔者猜想博落回提取物与植物乳酸菌对肠道微生物的作用有相似的效果。因此本研究以断奶羔羊为试验动物模型,以回肠为例,首先探讨添加益生菌植物乳酸菌或者益生元博落回提取物对断奶羔羊肠道微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的影响,然后比较宏基因组比对 2 个数据库在研究中的异同,为后续研究反刍动物胃肠道微生物维生素 B<sub>12</sub> 合成奠定研究基础和提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计与动物管理

此动物试验的所有程序均符合《实验动物护理和使用指南》,动物的使用由中国科学院亚热带农业生态研究所动物伦理委员会批准。饲养试验分为预试期 2 周和正试期 4 周。选择初始体重为(5.63±0.30) kg、平均年龄(30±2) d 的断奶黑山羊 20 只,随机分为对照组(CON, 7 只)、乳酸菌组(LAC, 7 只)和博落回组(MAC, 6 只)。CON 组仅饲喂基础日粮,LAC 组饲喂基础日粮+10 g/d 的植物乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* P-8 strains, 4.0×10<sup>9</sup> CFU/g),MAC 组饲喂基础日粮+0.3 g/d 的博落回提取物(*Macleaya cordata*, 3.75%),植物乳酸菌和博落回提取物均以干粉的形式添加混合到精料中。基础日粮精粗比为 4:6,粗料为干花生藤,精料成分及组成参考 Yang 等<sup>[11]</sup>精料中含玉米 166.7 g/kg,膨化大豆 321 g/kg,豆粕 133.4 g/kg,脂肪粉 182.1 g/kg,乳清粉 114.5 g/kg,碳酸钙 10.4 g/kg,

碳酸氢钙 25.2 g/kg,食盐 13.3 g/kg 和预混料 33.4 g/kg。断奶羔羊单笼饲养于通风良好、环境整洁的实验楼,定期驱虫,每日 8:30 和 17:30 各喂料 1 次,自由饮水。

### 1.2 样品采集

按照国家标准化牛羊屠宰的方法,宰前空腹 24 h,颈部放血致死,屠宰后立即无菌操作<sup>[12]</sup>,取回肠中段适量的食糜于无菌无酶离心管中,液氮速冻,存于-80 °C 冰箱,用于 DNA 的提取及后续分析。

### 1.3 微生物 DNA 的提取

食糜微生物 DNA 的提取采用 Sino 公司的动物粪便总 DNA 试剂盒。为尽可能获得革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的总 DNA,同时又不影响 DNA 的完整性,去除抑制物后,加入裂解液的同时加入直径 0.1 mm 和 0.5 mm 的氧化锆珠子,在多样品组织研磨仪 TissueLyser-24 (Jingxin)上研磨破碎 1 min。之后将破壁温度从 70 °C 上调至 85 °C 进行 DNA 的提取<sup>[13]</sup>。提取的 DNA 用 1% 凝胶电泳检测其完整性。用微量紫外分光光度计 ND-1000 测定其核酸浓度 (ng/μL) 及纯度 ( $OD_{260}/OD_{280}$ ),并于-20 °C 保存备用。

### 1.4 宏基因组测序建库及质控

采用宏基因组测序,首先取 1 μg 基因组 DNA,使用 Covaris S220 (Woburn) 超声波打断,使得样本条带集中到 200–400 bp 间。然后,经过末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化和 PCR 扩增等完成文库制备,接着用 Illumina HiSeq X 测序仪器用双端测序模式 (PE150) 进行测序。下机数据使用 Trimmomatic<sup>[14]</sup> 对原始序列 reads 去除接头和低质量 reads。然后用 BWA mem 算法(参数: -M -k 32 -t 16, <http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>)将质控后的 reads blast 到山羊基因组 (*capra hircus*

ARS1), 以除去宿主基因组污染和低质量的 reads, 从而得到 clean reads, 用于进一步的分析(BioProject ID: PRJNA946320)。

### 1.5 宏基因组维生素 B<sub>12</sub> 生物信息分析

采用 Zhou 等<sup>[6]</sup>的方法, 将测序得到的 clean data 与维生素 B<sub>12</sub> 合成相关的功能基因数据库 VB12Path 比对, 得到各基因在每个样品中的丰度。简而言之, 首先利用 seqkit stats 得到样品中每个 reads 的条数等信息作为后续流程所需要的 metadata 文件, 选择样品中最小的条数作为抽平次数。然后解压合并 database 作为后续流程所需要的 annotations 文件, 最后选择 -m diamond 比对方法。比对后得到的 VB12\_functional\_profile.txt 作为微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 相关基因的注释丰度特征表, 以备后续统计分析。

利用传统的宏基因分析流程, 将质控后的 clean data 用 Megahit 进行组装<sup>[15]</sup>, 组装后的 contig 进行基因预测后利用 CD-HIT 软件<sup>[16]</sup>进行聚类(参数为: 95% identity、90% coverage)构建非冗余基因集。接着使用 BLASTP 与 KEGG 数据库比对得到样品中微生物的基因功能注释信息。

### 1.6 数据统计分析及可视化

将利用 VB12Path 数据库比对得到的微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 相关基因特征表和公共数据库 KEGG 得到的功能注释结果使用 R 软件进行统计分析及可视化。使用 R 中的 reshape2 和 vegan 包对数据进行整理<sup>[17]</sup>, 用 pairwiseAdonis 进行数据的统计<sup>[18]</sup>, 用 ggplot2 和 complexheatmap 进行统计数据的可视化<sup>[19]</sup>。对维生素 B<sub>12</sub> 相关基因的  $\alpha$  多样性进行 ANOVA 分析,  $\beta$  多样性基于 Bray-Curtis 距离矩阵进行 Adonis 分析, 整理各维生素 B<sub>12</sub> 生物合成通路的基因丰度, 显著水平设置为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序数据及比对基因概述

宏基因组下机数据, 通过质控和去宿主后, 每个样本 clean reads 数范围在 1 036 040–35 875 264 条间。将 20 个样本的 clean data 直接与 VB12Path 数据库比对, 一共得到了 55 个基因和对应的 5 个 pathway。将每个基因在样品中的丰度值进行 log<sub>10</sub> 转换后绘制柱状图。如图 1A 所示, 参与前咕啉 2 合成(precorrin-2 synthesis)的基因丰度最高, 参与无氧途径(anaerobic)合成通路的基因有 13 个, 且丰度仅次于参与前咕啉 2 合成的基因, 参与重排转换合成途径(salvage)的基因的丰度最低。

将 20 个样本的非冗余基因集与 KEGG 数据库比对后, 筛选得到 49 个参与维生素 B<sub>12</sub> 合成代谢相关的基因。同样地, 将这些基因的丰度进行 log<sub>10</sub> 转化后绘制柱状图, 结果显示(图 1B), 参与前咕啉 2 合成的基因丰度仍是最高, 参与重排转换合成途径的基因丰度最低, 但是参与有氧途径的基因有 12 个, 无氧途径有 9 个。

### 2.2 植物乳酸菌或博落回提取物对回肠微生物生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的基因的多样性的影响

如图 2 所示, 通过 VB12Path 数据库比对的结果显示, 与 CON 组相比, LAC 组和 MAC 组的 Shannon 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数均显著降低( $P < 0.05$ ), 提示植物乳酸菌和博落回提取物降低了维生素 B<sub>12</sub> 相关基因的丰富度和均匀度(图 2A)。此外, PCoA 分析结果显示(图 2B), CON 组与 LAC 组, CON 组与 MAC 组以及 LAC 组与 MAC 组间 PCoA1 和 PCoA2、PCoA1 和 PCoA3、PCoA2 和 PCoA3 之间均有较远的距离, 表明 3 个处理组的  $\beta$  多



参与有氧途径合成维生素 B<sub>12</sub> 的基因中, 与 CON 组相比, LAC 组和 MAC 组中 *cobT* 的丰度均显著提高( $P<0.05$ ), LAC 组与 MAC 组间没有显著差异( $P>0.05$ ); 参与无氧途径合成维生素 B<sub>12</sub> 的基因中, 与 CON 组相比, LAC 组中 *cbiC* 和 *cbiT* 的丰度都显著提高( $P<0.05$ ), 同时 *cbiA* 和 *cbiD* 也有提高的趋势( $0.05<P<0.10$ )。此外, LAC 组和 MAC 组中 *cbiE* 和 *cbiJ* 的丰度均显著降低( $P<0.05$ ); 参与前咕啉 2 合成通路的基因中, 与 CON 组相比, LAC 组和 MAC 组中 *gltX* 和 *hemB* 的丰度均显著地增加了, 同时, MAC 组的丰度显著高于 LAC 组中的丰度 ( $P<0.05$ ), 其他基因的丰度在 3 个组之间没有显著的差异( $P>0.05$ ); 参与重排转换合成通路的基因中, 与 CON 组相比, LAC 组和 MAC

组中 *btuD* 的丰度均显著增加, 同时 MAC 组中的丰度显著高于 LAC 组( $P<0.05$ )。此外, LAC 组和 MAC 组中 *btuC* 的丰度 2 组间没有差异, 但均有低于 CON 组的趋势( $0.05<P<0.10$ ); 参与腺苷钴胺素合成通路的基因中, *pduX* 和 *pduS* 在 LAC 组中几乎没有丰度, 但 MAC 组中 *pduX* 的丰度显著高于 CON 组。LAC 组中 *cobC-ado* 的丰度显著高于 CON 组( $P<0.05$ ), 但与 MAC 组没有显著差异( $P>0.05$ )。

相似地, 比对 KEGG 数据库时(图 3B), 参与有氧途径的基因 *cobN* 的丰度 LAC 组和 MAC 组均显著低于 CON 组, 同时 LAC 组显著低于 MAC 组( $P<0.05$ ), 基因 *prmA* 的丰度 LAC 组显著高于 CON 组( $P<0.05$ ), 基因 *cobM* 的丰度在 MAC 组显著降低( $P<0.05$ ); 参与无氧途径中的

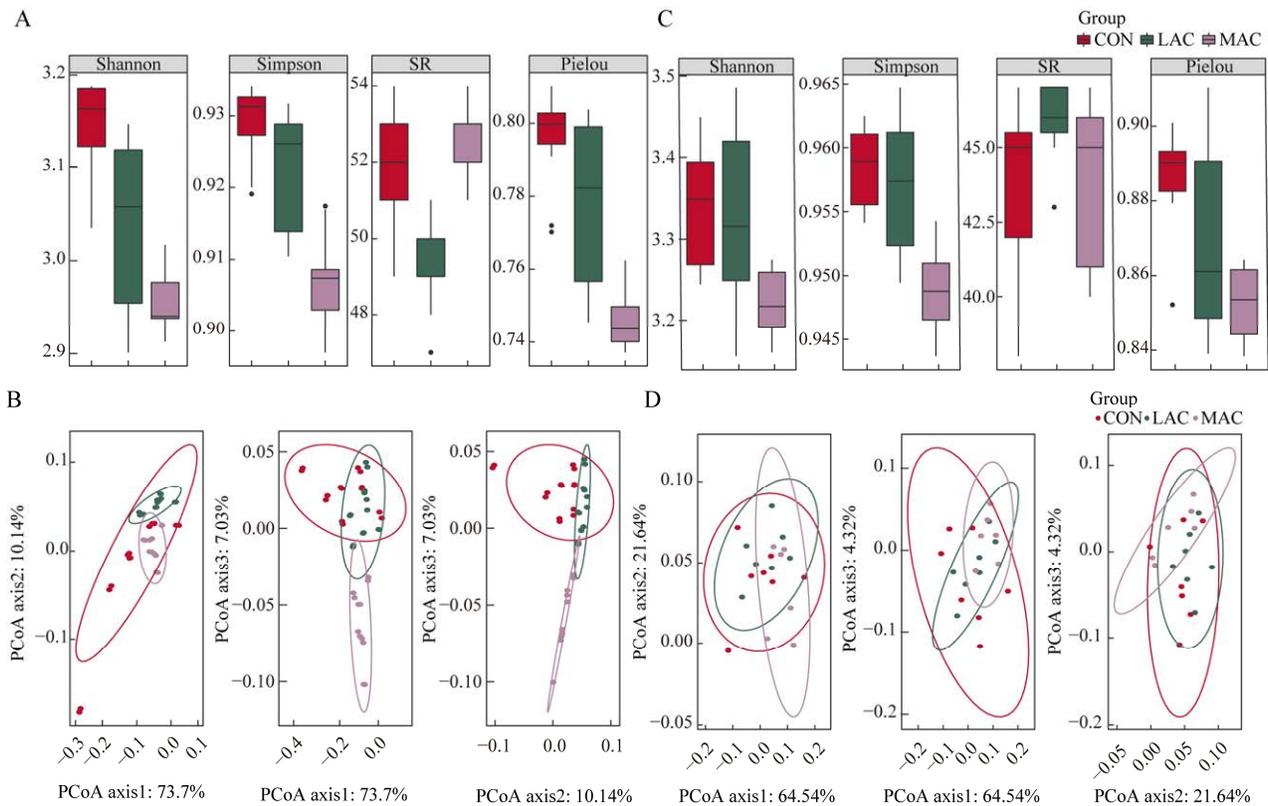


图 2 两数据库比对参与维生素 B<sub>12</sub> 代谢的基因的多样性

Figure 2 The diversity of the genes involved in vitamin B<sub>12</sub> synthesis from VB12Path and KEGG. A: Alpha diversity of VB12Path. B: Beta diversity of VB12Path. C: Alpha diversity of KEGG. D: Beta diversity of KEGG.

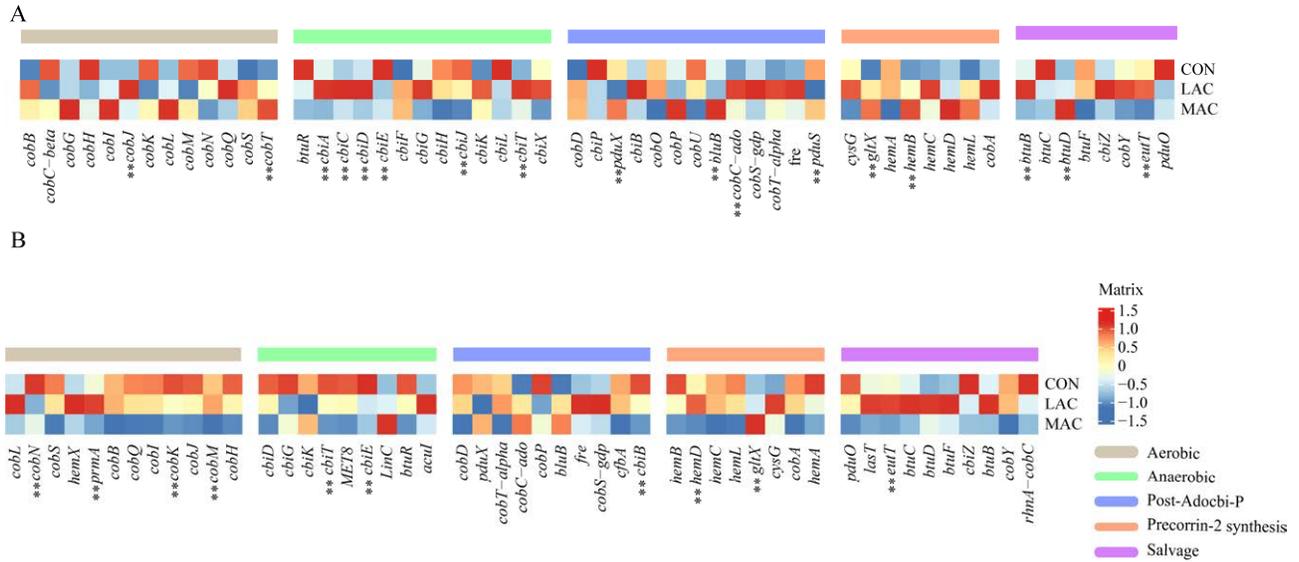


图 3 比对两个数据库参与维生素 B<sub>12</sub> 合成途径的基因丰度概况  
 Figure 3 The profile of genes involved in vitamin B<sub>12</sub> synthesis blast VB12Path (A) and KEGG (B).

基因 *cbiT* 和 *cbiE* 的丰度 LAC 组和 MAC 组 2 组间没有显著差异，但均显著低于 CON 组 ( $P < 0.05$ )，而基因 *acuI* 的丰度 LAC 组有高于另外 2 组的趋势；参与腺苷钴胺素合成途径的基因 *pduX* 在 LAC 组几乎没有丰度，*cbiB* 的丰度 LAC 组和 MAC 组显著低于 CON 组，同时 MAC 组显著低于 LAC 组；参与前咕啉 2 合成途径中的基因 *gltX* 的丰度 LAC 组显著高于 CON 组，MAC 组的丰度显著高于 LAC 组 ( $P < 0.05$ )，基因 *hemD* 的丰度 LAC 组显著高于 MAC 组和 CON 组；参与重排转换合成通路的基因 *eutT* 的丰度 LAC 组显著高于 MAC 组和 CON 组 ( $P < 0.05$ )，其他参与维生素 B<sub>12</sub> 代谢的基因在 3 组间没有显著的差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 两个数据库比对研究微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的不同

如图 4 所示，利用 2 个不同数据库比对结果不同，从基因的数量来看(图 4A)，通过比对 VB12Path 数据库得到的基因比通过 KEGG 数

据库比对基因的多 12.2% (55 vs. 49)。此外，PCoA 主成分分析结果显示，2 个数据库比对的结果有显著差异(图 4B,  $P < 0.01$ )。更有趣的是，相同基因在样品中的平均丰度 2 个数据库比对的结果也有显著差异(图 4C)，例如与 KEGG 数据库比对相比，VB12Path 数据库比对结果中参与有氧途径基因 *cobQ*、*cobJ* 和 *cobC-beta* 等丰度增加，但是基因 *cobS*、*hemX* 和 *prmA* 的丰度降低；参与无氧途径基因 *cbiD* 丰度增加，基因 *cbiA* 和 *cbiC* 仅仅在 VB12Path 数据库中能注释得到；参与前咕啉 2 合成途径的基因 *cbiB*、*cobD* 和 *cobO* 的丰度 VB12Path 数据库高于 KEGG 数据库的比对结果；所有参与重排转换途径的基因的丰度 VB12Path 数据库比对结果均高于 KEGG 数据库的结果，且基因 *cobU* 仅能在 VB12Path 数据库中比得到；参与腺苷钴胺素合成途径的基因 *cbiG*、*cbiK* 和 *cbiT* 的丰度 VB12Path 数据库高于 KEGG 数据库的比对结果，且基因 *cbiF*、*cbiH*、*cbiJ*、

*cbiL* 和 *cbiX* 仅能在 VB12Path 数据库中比对得到。除此之外, 各合成途径的总丰度占比除了重排转换途径(均占 2%)外, 其余途径占比各不相同(图 5), 利用 KEGG 数据库比对后, 前咕啉 2 合

成途径、厌氧途径、需氧途径和腺苷钴胺素合成途径分别占比为 24%、17%、37%和 21%, 而利用 VB12Path 数据库比对后, 对应途径的占比为 51%、11%、24%和 13%。

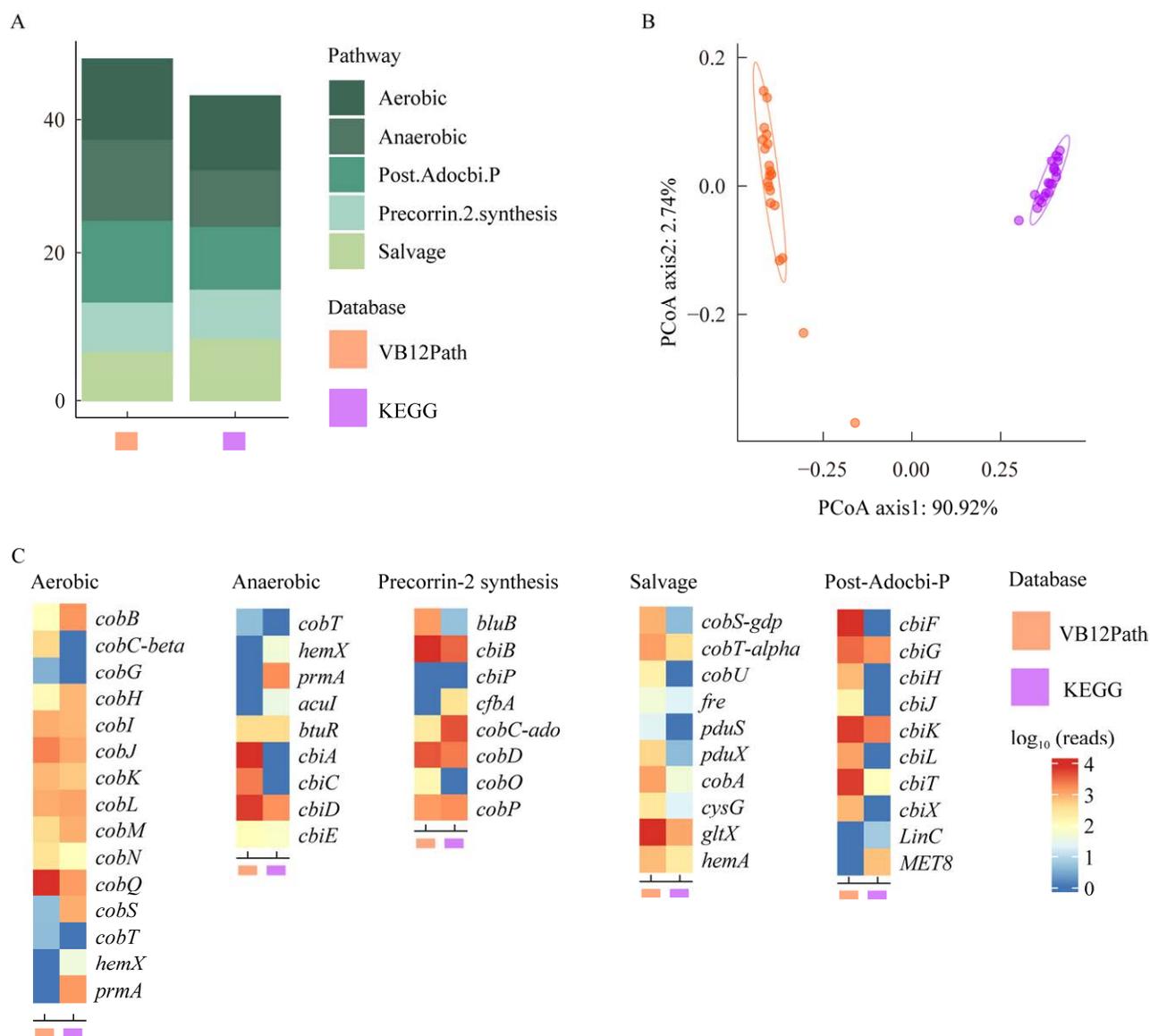


图 4 两个数据库比对结果比较概况

Figure 4 The profile of the blast results from VB12Path database and KEGG database. A: The numbers of total genes. B: Principal coordinate analysis (PCoA) profile of genes from VB12Path and KEGG database. C: The profile of relative abundance of genes involved in different pathway.

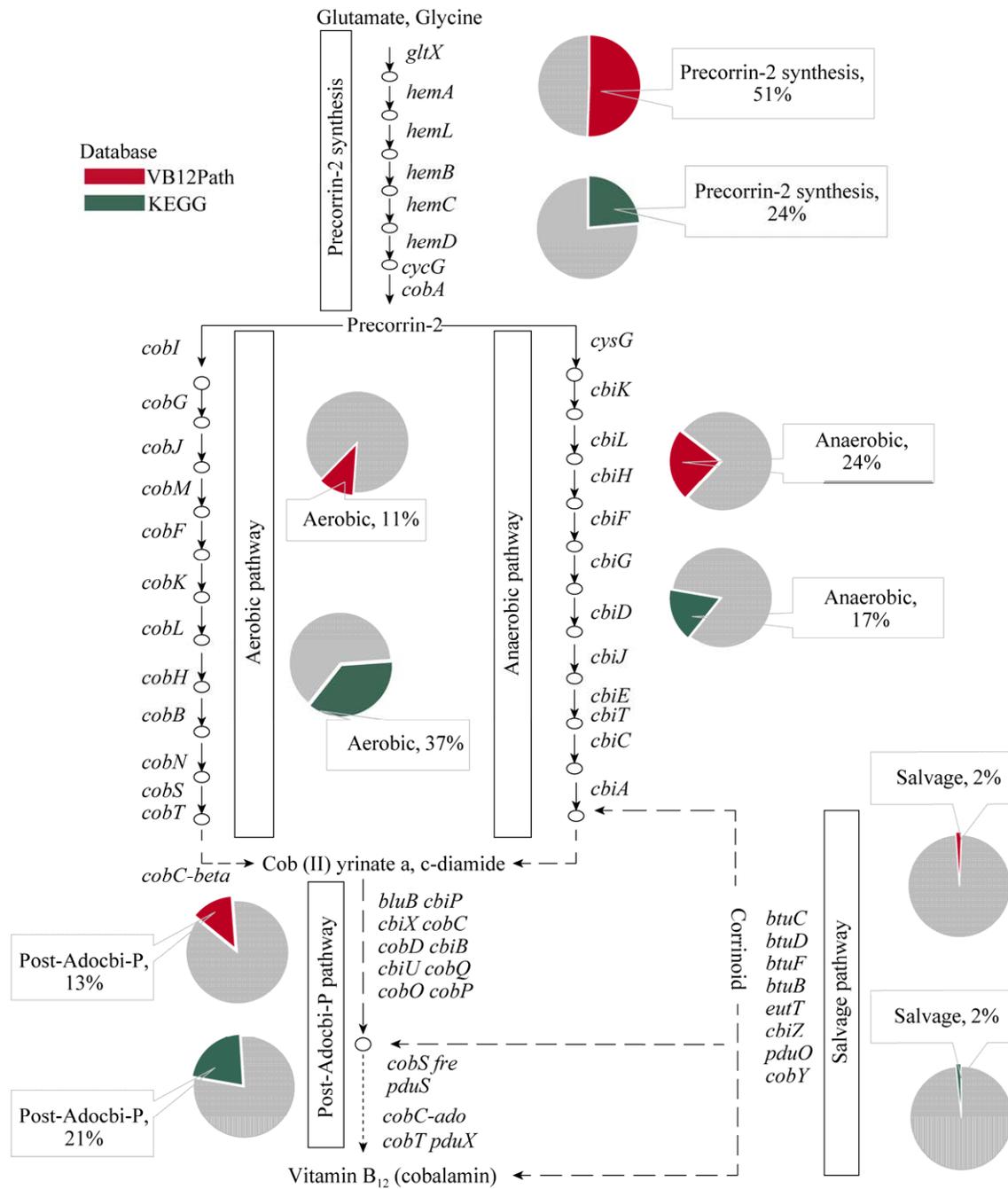


图5 维生素 B<sub>12</sub> 合成途径及其 VB12Path 数据库(红色)和 KEGG 数据库(青色)比对结果占比情况  
 Figure 5 The pathway of cobalamin synthesis and their percentage in VB12Path (red) and KEGG (cyan) database.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 两个数据库比对的优劣

维生素 B<sub>12</sub> 是生命体中不可或缺的结构最复

杂的微量元素, 参与机体中一系列的生理过程<sup>[1]</sup>。但是维生素 B<sub>12</sub> 的合成是由细菌或古菌依赖 60 个基因和 30 多个酶进行的极其复杂的过程<sup>[20]</sup>。掌握微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 的过程, 有利于利用合

成生物学手段来人工合成维生素 B<sub>12</sub>。本研究利用宏基因组测序技术,选择近期学者构建的微生物维生素 B<sub>12</sub> 相关的功能基因库 VB12Path 和传统分析流程进行研究。结果显示,通过 VB12Path 数据库一共注释到了 55 个参与维生素 B<sub>12</sub> 合成相关的基因,5 个维生素 B<sub>12</sub> 合成的 pathway。注释到的基因中包括了参与重排转换途径的基因 *pduO*,该基因催化钴啉醇腺苷酰胺化过程<sup>[21]</sup>。研究表明,公共数据库没有基因 *pduO* 的完整信息,如果利用常见的公共数据库则无法精确注释到该基因<sup>[6]</sup>。此外,本研究结果显示参与前咕啉 2 合成的基因的丰度最高,*gltX* 基因占总体基因的 14.6%–18.3%,*hemB* 基因占 9.0%–10.8%,*hemL* 基因占 7.0%–9.1%,这一结果与 Zhou 等<sup>[6]</sup>在人类肠道环境的结果相似。另外,我们结果发现除了 51%注释到前咕啉 2 合成途径外,有 24%参与无氧合成途径,仅有 11%参与有氧合成途径,但是海洋生物学家们的研究表明,除 59%序列参与前咕啉 2 合成外,有 22%参与有氧途径合成途径<sup>[6]</sup>。推测引起 2 个研究中相悖结果的原因可能是由于样本所在的环境不同,回肠中的氧分压低,主要的微生物为厌氧微生物<sup>[22]</sup>。总体来说,利用 VB12Path 数据库研究维生素 B<sub>12</sub> 合成相关的功能基因是合理的,且注释比对的结果更精确、更全面。但值得注意的是,由于 VB12Path 数据库中仅包含关于维生素 B<sub>12</sub> 代谢相关基因的序列,没有相关的物种分类情况。此外,由于比对方法是直接将 clean reads 与功能基因比对,没有进行非冗余基因集的处理后用统一的 Gene ID 去比对,因此通过 VB12Path 数据库无法得到基因与微生物之间的关系。而传统的分析流程中将非冗余基因集与 NR 数据库和 KEGG 数据库联合比对,由于 Gene ID 的唯一性,可以分析得到特定基因的微生物的相对比

例。例如, Li 等<sup>[23]</sup>在关于高纤维日粮和高淀粉日粮对反刍动物瘤胃甲烷代谢差异的研究显示,瘤胃在不同日粮条件下碳水化合物酶代谢基因有差异,且引起这些差异的原因可能是由于纤维溶解菌和淀粉菌比例的不同导致。因此,利用传统流程比对得到物种和功能注释的方法,更有利于掌握胃肠道微生物的代谢详细的过程。但是特异性的功能基因数据库 VB12Path 比对得到的基因会更精确、更全面。本研究为未来研究胃肠道微生物合成维生素 B<sub>12</sub> 提供新的见解和思路。

### 3.2 植物乳酸菌对维生素 B<sub>12</sub> 合成影响

植物乳酸菌是从植物性发酵食品中分离筛选出来的一类乳酸菌,相较于动物性乳酸菌具有更强的耐酸和耐胆盐能力,可以在营养不均的恶劣环境中生存,因此肠道内的存活率更高,定殖能力更强。故而植物乳酸菌可以作为益生菌改善肠道内环境,提高机体的免疫力等<sup>[9]</sup>。研究表明,新生羔羊补喂复合乳酸菌有利于羔羊胃肠道菌群的建立,增强羔羊胃肠道粘膜免疫<sup>[24]</sup>。断奶羔羊日粮中添加植物乳酸菌可以通过降低 MDA 浓度,提高 SOD 和 GSH-Px 的活性,从而缓解断奶导致的肠道氧化损伤<sup>[9]</sup>。植物乳酸菌通过保护肠道形态和通透性以及紧密连接蛋白的表达来改善肠道免疫功能,调节胃肠道微生物组成,进而降低腹泻的发生<sup>[8]</sup>。犊牛和羔羊发生痢疾时,使用益生菌治疗,可以改善肠道内的微生物,缓解腹泻<sup>[25]</sup>,提高饲料的转化率<sup>[26]</sup>。除此之外,研究人员指出,乳酸菌(*Lactobacillus reuteri*) CRL1098 可以在缺少维生素 B<sub>12</sub> 的培养基中正常生长,首次证明了乳酸菌可能可以合成维生素 B<sub>12</sub><sup>[3]</sup>。此后,宏基因组和比较基因组研究发现,乳酸菌中至少有 30 个参与维生素 B<sub>12</sub> 的基因,其中 *cob* 和 *cbi* 基因与沙门氏菌(*Salmonella enteric*)

和李斯特菌(*Listeria innocua*)非常相似<sup>[3]</sup>。本研究结果显示, CON组与LAC组间维生素B<sub>12</sub>合成相关基因的多样性有显著差异, 提示胃肠道中含有参与维生素B<sub>12</sub>代谢基因的微生物的组成和结构发生改变。此外, 本研究结果显示, LAC组中参与前咕啉2合成途径(*gltX*和*hemB*)、参与无氧合成途径(*cbiC*、*cbiT*、*cbiA*和*cbiD*)、有氧合成途径(*cobT*)、参与重排转换途径(*btuD*)以及腺苷钴胺素合成途径(*cobC-ado*)的部分关键基因的丰度均显著地高于CON组。综上所述, 植物乳酸菌可以改善胃肠道微生物群落结构和组成, 加之乳酸菌自身拥有可以合成维生素B<sub>12</sub>的能力。由此推测, 日粮中添加植物乳酸菌, 可以通过改善胃肠道内微生物的群落结构和定殖, 提高参与维生素B<sub>12</sub>代谢相关的基因的丰度, 从而促进回肠微生物维生素B<sub>12</sub>的合成。

### 3.3 博落回提取物对维生素B<sub>12</sub>合成影响

博落回是罂粟科博落回属多年生高大草本植物, 在我国南部省份多有分布, 博落回中含有多种天然活性成分。在畜牧养殖应用中有抗菌、杀虫、增强免疫力、抗肿瘤等生物学特性, 对动物的血液生化指标也有一定的改善<sup>[27]</sup>。博落回提取物(主要活性物质: 生物碱)在畜禽养殖中更是起着重要的作用。研究表明, 日粮中添加博落回提取物, 可以提高畜禽免疫力, 增强抗氧化应激的能力, 改善肠道功能, 从而提高畜禽生产<sup>[9]</sup>。我们之前的研究发现, 在饲料中添加博落回提取物对断奶羔羊的生产性能没有影响, 但能使血清代谢组发生改变, 从而加速机体新陈代谢, 调节机体免疫机制, 增强机体抗炎与应激能力, 起到与抗生素类似的功效<sup>[10]</sup>。此外研究表明, 博落回提取物可以抑制肠道中有害菌的增殖, 促进益生菌的生长, 从而维持肠道健康<sup>[28]</sup>。我们的结果显示, 通过比对

VB12Path数据库, 与CON组相比, 添加博落回提取物降低了回肠微生物合成维生素B<sub>12</sub>相关基因的 $\alpha$ 多样性, 且部分基因的丰度发生了变化。与LAC组相似, MAC组中参与前咕啉2合成途径(*gltX*和*hemB*)、有氧合成途径(*cobT*)、参与重排转换途径(*btuD*)以及腺苷钴胺素合成途径(*pduX*)中部分基因的丰度均显著高于CON组。揭示博落回提取物与植物乳酸菌在断奶羔羊的回肠微生物维生素B<sub>12</sub>相关代谢上有相近的功能, 可以提高微生物合成维生素B<sub>12</sub>相关基因的丰度。鉴于博落回提取物可以抑制肠道内有害菌的增殖, 促进益生菌的生长<sup>[28]</sup>, 推测日粮中添加博落回提取物提高维生素B<sub>12</sub>相关基因丰度是由于改善肠道内微生物的群落结构, 促进有合成维生素B<sub>12</sub>能力的微生物的定殖引起的。但本研究的不足之处在于, 由于样本缺失, 没有对肠道及日粮中维生素B<sub>12</sub>的浓度进行定量测定。此外, 没有对功能基因的序列进行物种注释, 这些内容在后续的研究中应该加以考虑和完善。

首先, 本研究利用宏基因组技术, 阐明了益生菌植物乳酸菌和益生元博落回提取物对回肠微生物维生素B<sub>12</sub>合成代谢的益生机理, 为后续博落回提取物和植物乳酸菌在畜牧养殖中的运用提供一定的理论支撑。其次, 本研究选择特异性的功能基因数据库和常用的公共数据库, 较为精确全面地分析了维生素B<sub>12</sub>的代谢过程, 这些结果揭示未来研究胃肠道微生物维生素相关代谢过程时, 应用多个数据库比对, 能更全面精确地评价, 联合多数据库比对也有利于探究相关基因变化的机制。

### 参考文献

- [1] FANG H, KANG J, ZHANG DW. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>: a review and future perspectives[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 15.

- [2] FRANCO-LOPEZ J, DUPLESSIS M, BUI A, REYMOND C, POISSON W, BLAIS L, CHONG J, GERVAIS R, RICO DE, CUE RI, GIRARD CL, RONHOLM J. Correlations between the composition of the bovine microbiota and vitamin B<sub>12</sub> abundance[J]. *mSystems*, 2020, 5(2): e00107-20.
- [3] LEBLANC JG, LAIÑO JE, del VALLE MJ, VANNINI V, van SINDEREN D, TARANTO MP, de VALDEZ GF, de GIORI GS, SESMA F. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(6): 1297-1309.
- [4] JIN XK, YANG YF, CAO HH, GAO BL, ZHAO Z. Eco-phylogenetic analyses reveal divergent evolution of vitamin B<sub>12</sub> metabolism in the marine bacterial family ‘*Psychromonadaceae*’[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2022, 14(1): 147-163.
- [5] MALMUTHUGE N, LIANG GX, GUAN LL. Regulation of rumen development in neonatal ruminants through microbial metagenomes and host transcriptomes[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 172.
- [6] ZHOU JY, YU XL, LIU JH, QIN W, HE ZL, STAHL D, JIAO NZ, ZHOU JZ, TU QC. VB12Path for accurate metagenomic profiling of microbially driven cobalamin synthesis pathways[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e0049721.
- [7] MEALE SJ, CHAUCHEYRAS-DURAND F, BERENDS H, GUAN LL, STEELE MA. From pre-to postweaning: transformation of the young calf’s gastrointestinal tract[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(7): 5984-5995.
- [8] 王海玉, 郭云霞, 丁亚伟, 田星哲, 段春辉, 张英杰, 刘月琴, 纪守坤, 严慧. 复合益生菌对羔羊粪便微生物及免疫指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(3): 1816-1826.  
WANG HY, GUO YX, DING YW, TIAN XZ, DUAN CH, ZHANG YJ, LIU YQ, JI SK, YAN H. Effects of compound probiotics on fecal microorganisms and immune indexes of lambs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(3): 1816-1826 (in Chinese).
- [9] CHEN K, LIU Y, CHENG Y, YAN QX, ZHOU CS, HE ZX, ZENG JG, HE JH, TAN ZL. Supplementation of *Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* extract alleviates oxidative damage induced by weaning in the lower gut of young goats[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2020, 10(4): 548.
- [10] 罗志斌, 张小丽, 谭支良, 何流琴, 焦金真, 李建中. 博落回提取物对断奶山羊血清代谢组的影响[J]. *微生物学报*, 2023, 32(1): 55-61, 68.  
LUO ZB, ZHANG XL, TAN ZL, HE LQ, JIAO JZ, LI JZ. Effect of extract of *Macleaya cordata* on serum metabolome of weaned goats[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2023, 32(1): 55-61, 68 (in Chinese).
- [11] YANG C, CHEN Y, LI XL, LI HQ, YAN QX, HE ZX, TAN ZL. Effects of dietary *Macleaya cordata* extract inclusion on transcriptomes and inflammatory response in the lower gut of early weaned goats[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2021, 272(0377-8401): 114792.
- [12] ZHANG XL, WU J, HAN XF, TAN ZL, JIAO JZ. Effects of rumen-protected glucose on ileal microbiota and genes involved in ileal epithelial metabolism and immune homeostasis in transition dairy cows[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 254: 114199.
- [13] ZHANG XL, LI XP, WU J, JIAO JZ, HE ZX, TAN ZL, HAN XF. Rumen-protected glucose supplementation in transition dairy cows shifts fermentation patterns and enhances mucosal immunity[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 1182-1188.
- [14] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [15] LI DH, LIU CM, LUO RB, SADAKANE K, LAM TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [16] LI WZ, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [17] JOST L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components[J]. *Ecology*, 2007, 88(10): 2427-2439.
- [18] MARTINEZ AP. pairwiseAdonis: pairwise multilevel comparison using adonis[Z]. R package version04, 2020. <https://github.com/pmartinezarbizu/pairwiseAdonis#citation>.
- [19] GU ZG, EILS R, SCHLESNER M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(18): 2847-2849.
- [20] SCOTT AI. Reflections on the discovery of nature’s pathways to vitamin B<sub>12</sub>[J]. *The Chemical Record*, 2001, 1(3): 212-227.

- [21] FENECH M. The role of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in genomic stability of human cells[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 475(1-2): 57-67.
- [22] DONALDSON GP, LEE SM, MAZMANIAN SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(1): 20-32.
- [23] LI QS, WANG R, MA ZY, ZHANG XM, JIAO JZ, ZHANG ZG, UNGERFELD EM, YI KL, ZHANG BZ, LONG L, LONG Y, TAO Y, HUANG T, GREENING C, TAN ZL, WANG M. Dietary selection of metabolically distinct microorganisms drives hydrogen metabolism in ruminants[J]. The ISME Journal, 2022, 16(11): 2535-2546.
- [24] 吴婷婷. 补喂绵羊瘤胃液、益生菌对 28 日龄羔羊胃肠道菌群及免疫的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学博士学位论文, 2016.
- WU TT. The effects of supplement with ruminal fluid, probiotics on the gastrointestinal microbiota and immunity of lambs aged 28 days[D]. Urumqi: Doctoral Dissertation of Xinjiang Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [25] 李红斌. 益生菌在畜牧养殖中的应用[J]. 畜牧兽医学, 2019(3): 23-24.
- LI HB. Application of probiotics in animal husbandry[J]. Animal Science and Veterinary Science 2019(3): 23-24 (in Chinese).
- [26] 董晓丽. 益生菌的筛选鉴定及其对断奶仔猪、犊牛生长和消化道微生物的影响[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2013.
- DONG XL. Identification of probiotics and effects of probiotics on weaned piglets, calves and the gastrointestinal microbiota[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural sciences, 2013 (in Chinese).
- [27] 梁观金. 博落回的生物学特性及其提取物在养禽生产中的应用[J]. 广东饲料, 2021, 30(3): 31-33.
- LIANG GJ. Biological characteristics of *Macleaya cordata* and application of its extract in poultry production[J]. Guangdong Feed, 2021, 30(3): 31-33 (in Chinese).
- [28] 张灵梅, 朱晋佳, 杨玲媛, 汤少勋. 博落回在畜禽生产中的应用研究[J]. 激光生物学报, 2020, 29(2): 113-119.
- ZHANG LM, ZHU JJ, YANG LY, TANG SX. A study on the application of *Macleaya cordata* in livestock production[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2020, 29(2): 113-119 (in Chinese).