

1株产VB₁₂球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1的分离、全基因组测序及分析

赵磊^{1,2}, 徐琼¹, 刘洋^{1,*}, 张奕南¹, 钟江²

(1.上海市质量监督检验技术研究院, 国家市场监管重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术), 上海 200233;

2.复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要: 为深入探究球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1 (*Lysinibacillus sphaericus* C5.1) 菌株产VB₁₂的作用机制, 利用PacBio Sequel和Illumina NovaSeq PE150相结合的方法对C5.1菌株进行全基因组测序, 并对测序数据进行拼接、基因预测及功能注释。结果表明, C5.1菌株基因组为一个环状DNA, 不含质粒, 大小为4 690 817 bp, GC含量为37.21%, 预测得到4 756个编码基因, 111个tRNA基因和34个rRNA基因。通过基因本体论、直系同源集、京都基因与基因组百科全书和转运蛋白分类数据库对C5.1菌株基因组进行注释分析, 分别匹配到3 095、3 182、4 374个和397个基因。进一步分析发现C5.1菌株基因组中包含从尿卟啉原III逐步转化合成VB₁₂的关键酶。本研究为解析C5.1菌株在臭腐乳发酵过程中的代谢机理提供遗传信息基础, 也为今后开展发酵食品中VB₁₂的生物合成机制研究提供理论支撑。

关键词: 发酵食品; 赖氨酸芽孢杆菌; VB₁₂; 全基因组测序; 基因功能注释

Isolation and Whole Genome Sequencing Analysis of VB₁₂-Producing *Lysinibacillus sphaericus* Strain C5.1

ZHAO Lei^{1,2}, XU Qiong¹, LIU Yang^{1,*}, ZHANG Yinan¹, ZHONG Jiang²

(1. Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China;

2. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: In order to explore the mechanism for the production of vitamin B₁₂ (VB₁₂) by *Lysinibacillus sphaericus* C5.1, the whole genome of this strain was sequenced on the PacBio Sequel and Illumina NovaSeq PE150 platforms. Several bioinformatics methods were then used to assemble the sequence data obtained for gene prediction and functional annotation. The results showed that the genome of strain C5.1 consisted of one circular chromosome without plasmids and was 4 690 817 bp in length with an average GC content of 37.21%, and 4 756 protein-encoding genes, 34 rRNAs, and 111 tRNAs were predicted. A total of 3 095, 3 182, 4 374, and 397 genes were respectively matched to the Gene Ontology (GO), Clusters of Orthologous Groups (COG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and Transporter Classification Database (TCDB). Furthermore, we found that the genome of strain C5.1 contained the genes encoding the key enzymes involved in the conversion of uroporphyrinogen III to VB₁₂. These results could provide an important foundation for studies on the metabolic pathways of *L. sphaericus* C5.1 during the fermentation of stinky tofu and also provide theoretical support for exploring the mechanism of vitamin B₁₂ biosynthesis in fermented foods.

Keywords: fermented food; *Lysinibacillus*; vitamin B₁₂; whole genome sequencing; gene functional annotation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220418-233

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)06-0165-07

引文格式:

赵磊, 徐琼, 刘洋, 等. 1株产VB₁₂球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1的分离、全基因组测序及分析[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 165-171. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220418-233. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2017QK167); 上海市质量监督检验技术研究院科技计划项目(KY-2021-1-SP)

第一作者简介: 赵磊(1989—)(ORCID: 0000-0002-2456-579X), 男, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: zhaolei19890117@163.com

*通信作者简介: 刘洋(1980—)(ORCID: 0000-0002-5565-034X), 女, 正高级工程师, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: liuyang@sqi.org.cn

ZHAO Lei, XU Qiong, LIU Yang, et al. Isolation and whole genome sequencing analysis of VB₁₂-producing *Lysinibacillus sphaericus* strain C5.1[J]. Food Science, 2023, 44(6): 165-171. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220418-233. <http://www.spkx.net.cn>

腐乳是传统发酵食品,因其独特的风味占据中国饮食文化一席之地。在腐乳发酵过程中,微生物会分泌产生蛋白酶、脂肪酶等多种酶将大分子物质分解成游离氨基酸、脂肪酸等小分子物质后被人体吸收^[1],同时产生大量VB₁₂、核黄素等生物活性物质^[2]。

VB₁₂又称钴胺素,是一类含钴的咕啉类化合物总称,主要以羟基钴胺素、氰基钴胺素、脱氧腺苷钴胺素和甲基钴胺素形式存在^[3]。VB₁₂是由微生物合成的最为复杂的小分子物质^[4],具有促甲基转化、维持神经组织等功能^[5],并参与人体细胞代谢,影响DNA的合成与调节,以及脂肪酸的合成和能量生成。研究表明,VB₁₂缺乏与贫血^[6-7]、高同型半胱氨酸血症^[8]、神经系统紊乱^[9]、生育能力缺陷^[10]等疾病的发生密切相关。由此可见,VB₁₂是人体不可缺少的营养物质,对人体健康起着重要作用^[11-12]。目前,VB₁₂主要是由微生物发酵获得,而应用于工业发酵生产VB₁₂的菌株主要是通过费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)和谢氏丙酸杆菌(*P. shermanii*)的厌氧发酵,以及利用脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)的好氧发酵过程完成^[13],目前,关于具有产VB₁₂功能的赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)微生物鲜有报道。此外,除费氏丙酸杆菌,未见谢氏丙酸杆菌和脱氮假单胞菌(*P. denitrificans*)相关的全基因组测序研究。

全基因组测序是针对某物种进行全部基因组碱基序列检测,并可以通过全面准确地分析物种基因组碱基序列,破译基因组所包含的遗传机制信息,具有测序覆盖度高、准确性强的优势^[14]。全基因组测序技术主要依赖于第2代和第3代测序技术的结合,二代测序技术主要包括罗氏454和Illumina HiSeq测序平台,因其测序成本低、准确度高和通量大的特征,已成为探究微生物菌群多样性、挖掘潜在代谢机制的重要手段^[15-16]。三代测序技术是指PacBio公司开发的Oxford Nanopore Technologies纳米孔单分子测序技术和SMRT技术,测序过程无需进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,具有测序读长长和测序效率高的特点^[17]。随着测序技术的飞速发展,以第2代和第3代测序技术相结合的全基因组测序已成为一种高效检测手段,被广泛应用于医学、生物等领域,并在环境微生物、肠道微生物菌群的生物学特性研究中发挥了重要的作用^[18-19]。

本研究从市售发酵臭腐乳中分离得到的1株具有高产VB₁₂功能的球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1(*Lysinibacillus sphaericus* C5.1)^[20],采用PacBio Sequel和Illumina

NovaSeq PE150测序平台对C5.1菌株进行全基因组测序,经过对测序结果组装矫正后,获得完整的C5.1菌株全基因组数据。在此基础上,通过基因功能注释解析C5.1菌株的代谢特征,旨在为今后进一步研究球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1在臭腐乳发酵过程中的代谢机理,及其产VB₁₂的作用机制提供重要的生物信息学基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

发酵臭腐乳 市售;莱士曼氏乳杆菌ATCC 7830 (*Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830)、罗伊氏乳杆菌ATCC 23272 (*L. reuteri* ATCC 23272)、植物乳杆菌ATCC 8014 (*L. plantarum* ATCC 8014) 中国工业微生物菌种保藏管理中心;细菌基因组DNA提取试剂盒天根生化科技(北京)有限公司;溶菌酶、蛋白酶K溶液(10 mg/mL) 生工生物工程(上海)股份有限公司;VB₁₂标准品(纯度≥99%) 美国Sigma-Aldrich公司;无水磷酸氢二钠、无水偏重亚硫酸钠、一水柠檬酸、无水乙醇 国药集团化学试剂有限公司;MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 固体培养基、MRS液体培养基北京陆桥技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

5804R台式高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司;GelDoc XR凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司;微量移液器(2、10、100、1 000 μL) 法国吉尔森公司;DeNovix DS-11微量分光光度计 美国DeNovix公司;ANOXOMAT MARK II厌氧培养系统 荷兰Mart Microbiology B.V公司;电热恒温培养箱 美国Shellab公司;ESCO LA2-4A1生物安全柜 新加坡艺思高公司。

1.3 方法

1.3.1 产VB₁₂菌株的分离筛选

按10倍梯度稀释对市售发酵臭腐乳样本进行稀释,使用平板涂布法,将稀释后的样本涂布于MRS固体培养基上,36℃恒温倒置培养72 h,挑选不同形态菌落至MRS液体培养基中,36℃恒温培养48 h,以菌株产VB₁₂含量为指标,并参考徐琼等^[20]报道的方法,接种对VB₁₂敏感菌株莱士曼氏乳杆菌ATCC 7830,36℃培养24 h。同时以能够积累VB₁₂的罗伊氏乳杆菌ATCC 23272作为阳性对照,以不产VB₁₂的植物乳杆菌ATCC 8014作为阴性对照,以未接菌的培养液作为空白对照^[21],按下式计算菌株产VB₁₂含量:

$$VB_{12} \text{质量浓度} / (\mu\text{g}/100 \text{ mL}) = \frac{C_x}{V} \times \frac{f}{1000} \times 100$$

式中： C_x 为测定液中 VB_{12} 含量平均值/ng； V 为试样体积/mL； f 为稀释倍数。

1.3.2 菌株分子生物学鉴定

使用快速细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株DNA，操作步骤参照试剂盒说明书进行。以C5.1菌株DNA为模板，使用细菌通用引物27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和1492R（5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'）对DNA进行PCR扩增，扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，确认16S rRNA基因在1 500 bp左右有明亮且单一性条带后，进行16S rRNA基因测序。测序结果使用BioEdit软件进行序列校正后，上传至NCBI数据库，通过BLAST序列比对分析，确定菌株信息，并选取同源性较高的菌株16S rRNA基因序列，使用MEGA软件（Version 5.1）构建系统发育树。

1.3.3 球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1总DNA提取

参照1.3.2节方法提取C5.1菌株总DNA后，分别使用1.0%琼脂糖凝胶电泳和DeNovix微量分光光度计检测C5.1菌株基因组DNA的纯度和浓度。

1.3.4 球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1全基因组测序与数据分析

分别使用PacBio Sequel平台和Illumina NovaSeq PE150平台对C5.1菌株DNA进行全基因组测序。下机数据经质控后，使用SMRT Link组装软件^[22-23]进行序列拼接组装。利用arrow软件对组装结果进行优化和校准，以去除低覆盖度及冗余的contig。将contig连接成基因组序列，得到最终组装结果。

通过GeneMarkS软件^[24]（<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>）、tRNAscan-SE软件^[25]和rRNAmmer软件^[26]进行基因预测。在此基础上，C5.1菌株的全基因组序列分别与基因本体论（Gene Ontology, GO）^[27]、京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）^[28-29]、直系同源集（Clusters of Orthologous Groups, COG）数据库^[30]和转运蛋白分类数据库（Transporter Classification Database, TCDB）^[31]进行比对分析，获取基因组功能注释信息。最后将测得的C5.1菌株全基因组测序数据提交至NCBI数据库，获得GenBank登录号为CP066226.1。

2 结果与分析

2.1 产 VB_{12} 菌株的分离筛选

对16株分离自市售发酵臭腐乳的菌株进行产 VB_{12} 能力检测，如图1所示，本研究共筛选出9株产 VB_{12} 的菌株，其产量均高于1 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 。其中，与阳性对照实验组罗伊氏乳杆菌ATCC 23272 VB_{12} 产

量（1.85 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ）相比，C5.1菌株 VB_{12} 产量可达2.07 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 。

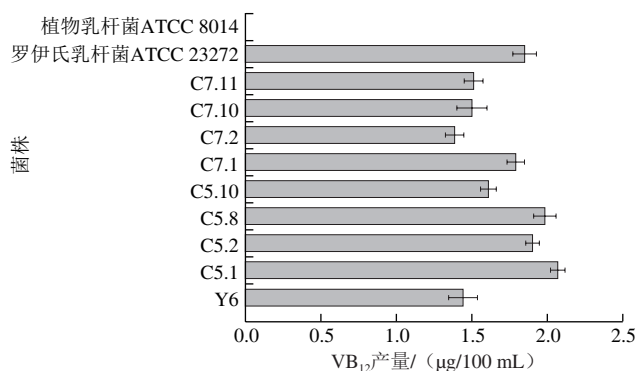


图1 不同菌株产 VB_{12} 含量 (n=3)
Fig. 1 Yield of VB_{12} contents produced by different strains (n=3)

2.2 菌株分子生物学鉴定

将具有 VB_{12} 高产能力的C5.1菌株16S rRNA基因测序结果上传至NCBI数据库，进行BLAST比对分析后，发现菌株C5.1与模式菌株球形赖氨酸芽孢杆菌DSM 28及ATCC 14577的相似度分别为99.05%和98.49%。因此，暂将其命名为球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1。进一步使用MEGA软件（Version 5.1）按Neighbor-Joining方法构建系统发育树（图2），结果发现球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1与其他球形赖氨酸芽孢杆菌成簇，并与球形赖氨酸芽孢杆菌DSM 28、HSFW 11和ATCC 14577菌株亲缘关系较近。其中，根据GenBank数据库信息显示，HSFW 11菌株（GenBank号：MT258886.1）分离自沼气池沉积物，这种低氧高渗透压的环境与市售发酵臭腐乳较为相似，推测可能是HSFW 11菌株与C5.1菌株亲缘关系较近的原因之一。

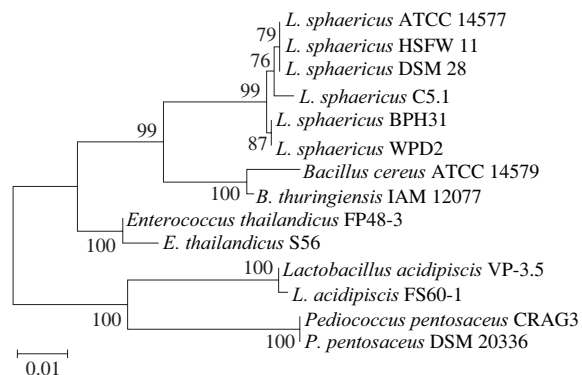


图2 C5.1菌株系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *L. sphaericus* C5.1

2.3 球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1全基因组概况

目前，关于球形赖氨酸芽孢杆菌研究主要集中在污染物降解方面^[32]，鲜见菌株产 VB_{12} 的相关报道。为更全

面地了解具有产VB₁₂能力的球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1信息,深入挖掘菌株机制,在上述研究基础上,本研究进一步对C5.1菌株进行了全基因组测序分析。

PacBio Sequel是基于纳米小孔单分子实时技术的第3代测序平台,具有测序读长长、高通量和高准确率等优势^[33]。本研究通过PacBio Sequel测序平台对C5.1菌株进行全基因组测序,并利用SMRT Link组装软件^[22-23]对序列进行基因组组装,获得3个contigs,共4 846 176 bp的序列信息,用于衡量基因组拼接效果的N50大小是4 701 366 bp。结合Illumina NovaSeq PE150测序结果对数据进行校正后,将菌株C5.1染色体序列组装成为一个环状基因组。C5.1菌株基因组大小为4 690 817 bp,GC平均含量为37.21%,没有质粒。此外,基因组还包含111个tRNA基因和34个rRNA基因。

2.4 球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1功能基因注释

将球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1的基因组数据分别通过COG、GO、TCDB和KEGG数据库进行Diamond比对,并选取得分最高的比对结果(Identity≥40%,Coverage≥40%)进行功能注释。如图3所示,C5.1菌株基因组共有4 756个基因得到注释,占基因总数的97.04%。其中,在KEGG数据库中得到功能注释的基因较多,是4 374个,占基因总数的89.25%。在COG和GO数据库中得到注释的基因分别是3 182个和3 095个,分别占基因总数的64.93%和63.15%。在TCDB中得到功能注释的基因最少,仅397个,占基因总数的8.10%。

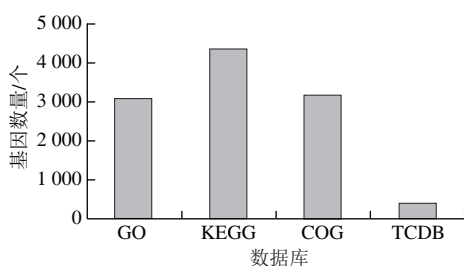


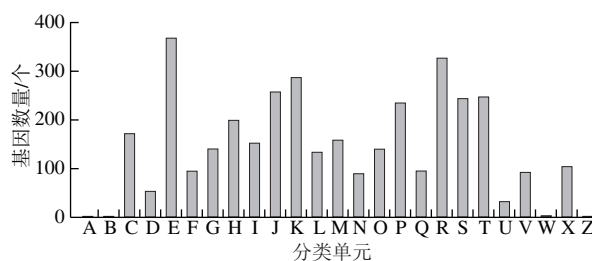
图3 C5.1菌株不同数据库基因功能注释概况

Fig. 3 Database distribution of gene functional annotation of *L. sphaericus* C5.1

2.4.1 COG数据库基因注释分析

COG是由NCBI创建并维护的蛋白数据库^[30],由细菌、藻类和真核生物完整基因组的编码蛋白系统进化关系分类构成。主要是通过比对的方法将某个蛋白序列注释到COG,并根据数据库中直系同源序列信息,推测出序列的潜在功能。如图4所示,球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1功能基因注释结果可分为25类。其中,氨基酸转运和代谢(E)的基因数量最高,为369个,其次是普通

功能预测(R)、转录(K)和翻译,核糖体结构和生物合成(J)相关的基因,分别为328、289个和259个。此外,还发现245个未知功能(S)的基因,有待后续进一步研究。



A. RNA加工和修饰; B.染色体结构和动力学; C.能力生产和转化; D.细胞周期调控,细胞分裂,染色体分离; E.氨基酸转运和代谢; F.核苷酸转运和代谢; G.碳水化合物转运和代谢; H.辅酶转运和代谢; I.脂质转运和代谢; J.翻译,核糖体结构和生物合成; K.转录; L.复制,重组和修复; M.细胞壁/细胞膜/包膜的生物合成; N.细胞运动; O.翻译后修饰,蛋白质转换,分子伴侣; P.无机离子转运和代谢; Q.次级代谢产物的合成、转运和代谢; R.普通功能预测; S.未知功能; T.信号转到机制; U.细胞内的转运、分泌和囊泡运输; V.防御机制; W.胞外结构; X.噬菌体原、转座子遗传; Z.细胞骨架。

图4 C5.1菌株COG数据库比对结果

Fig. 4 COG functional classification of *L. sphaericus* C5.1

2.4.2 GO数据库基因注释分析

通过对球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1基因组进行蛋白功能分析,共有3 095个基因在GO数据库中获得注释,结果如表1所示。C5.1菌株的GO注释分类主要集中在细胞过程、代谢过程、细胞、细胞组分、连接和催化活性等功能。其中,参与生物学途径中的细胞和代谢过程的基因分别为1 731个和1 715个,分子功能中与连接和催化活性功能相关的基因分别为1 452个和1 660个,细胞和细胞组分相关基因都为1 018个。

表1 C5.1菌株预测蛋白GO分类

Table 1 Gene ontology classification of *L. sphaericus* C5.1

GO数据库功能分类	基因功能描述	基因数量/个
生物学途径	生物附着	30
	生物调节	642
	细胞杀伤	1
	增殖	1
	细胞组分组织或生物合成	181
	细胞过程	1 731
	凋亡	5
	发育过程	62
	定位建立	575
	生长	1
	免疫系统过程	9
	定位	598
	运动	45
	代谢过程	1 715
	多有机体过程	54
	多细胞有机体过程	26

续表1

GO数据库功能分类	基因功能描述	基因数量/个
细胞学组件	生物过程负向调控	46
	氮源利用	1
	生物过程正向调控	19
	生物过程调控	627
	繁殖	94
	生殖过程	85
	应激反应	361
	节律过程	2
	信号	234
	病毒繁殖	83
	细胞	1 018
	细胞连接	1
	细胞组分	1 018
	胞外区	22
	胞外区组分	22
	大分子复合物	229
	膜封闭内腔	46
细胞器	234	
细胞器组分	117	
病毒	51	
病毒组分	51	
分子功能	抗氧化活性	15
	连接	1 452
	催化活性	1 660
	通道调节活性	3
	酶调节活性	18
	分子转导活性	136
	核酸结合转录因子活性	234
	蛋白结合转录因子活性	93
	结构分子活性	69
	转运活性	231

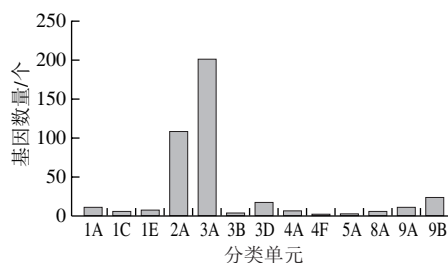
2.4.3 TCDB基因注释分析

TCDB是转运蛋白分类数据库,包括离子通道的分类系统。将球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1氨基酸序列与TCDB数据库进行比对,结果如表2所示,C5.1菌株基因组中参与初级主动运输和电化学驱动转运体功能的基因较多,分别为221个和108个,初步推测C5.1菌株可能主要是通过主动转运或电化学转运形式吸收物质或代谢产物。进一步对C5.1菌株功能基因分析,发现在基因组上,C5.1菌株与P-P磷酸化驱动转运蛋白和转运相关的基因最多,分别为201个和108个(图5)。

表2 C5.1菌株TCDB数据库一级分类结果

Table 2 First level classification of *L. sphaericus* C5.1 by TCDB

TCDB一级分类编号	功能分类说明	基因数量/个
1	通道与孔道	22
2	电化学势驱动转运体	108
3	初级主动运输	221
4	基团移位	7
5	跨膜电子载体	1
8	运输辅助因素	5
9	不完全特征性运输系统	33



1A. α 型通道; 1C.成核毒素(蛋白质和肽); 1E.穴蛋白; 2A.转运(单向转运,协同转运,逆向转运); 3A. P-P磷酸化驱动转运蛋白; 3B.脱羧反应驱动蛋白; 3D.氧化还原反应驱动蛋白; 4A.磷酸转移驱动转运蛋白; 4F.胆碱/乙醇胺磷酸化转移酶; 5A.跨膜双电子转移载体; 8A.辅转移蛋白; 9A.未知生化机制转运蛋白识别; 9B.假定转运蛋白。

图5 C5.1菌株TCDB数据库二级分类统计结果

Fig. 5 Second-level classification of *L. sphaericus* C5.1 by TCDB

2.4.4 KEGG代谢途径预测分析

表3 C5.1菌株基因组KEGG数据库主要代谢通路分析

Table 3 Major metabolic pathways of *L. sphaericus* C5.1 by KEGG

代谢通路编码	注释代谢通路名称	基因数量/个
map00230	嘌呤代谢	64
map00240	嘧啶代谢	53
map00620	丙酮酸代谢	47
map00860	卟啉和叶绿素代谢	41
map00190	氧化磷酸化	37
map00630	乙醛酸和二羧酸代谢	34
map00640	丙酸代谢	32
map00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	31
map00970	氨酰-tRNA合成	31
map00550	肽聚糖合成	30
map01212	脂肪酸代谢	30
map00010	糖酵解/糖异生	28
map00020	柠檬酸循环	27
map00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	27
map00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	27
map00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	26
map00650	丁酸代谢	25
map01210	2-氧代羧酸代谢	25
map00330	精氨酸和脯氨酸代谢	24
map00061	脂肪酸合成	23
map00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成	23
map00564	甘油磷脂代谢	22
map00300	赖氨酸合成	20
map00362	苯甲酸盐降解	20
map00790	叶酸合成	20

本研究将球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1的氨基酸序列与KEGG数据库进行比对分析,共注释得到4 374个基因。C5.1菌株的代谢通路主要与新陈代谢、遗传信息加工和细胞过程相关。细胞过程(转运和代谢、细胞运动、细胞生长和死亡等)共219个基因;遗传信息加工(翻译、转录、复制和修复等)共195个基因;参与新陈代谢的基因数量较多,共1 539个。辅因子和维生素、能量、碳水化合物以及氨基酸代谢是C5.1菌株主要涉及的代谢通路,分别得到158、113、152个和205个基因注释信息。在此基础上,通过与KEGG Pathway数据库分析,确定C5.1

菌株共197个物质代谢通路得到注释,其中,嘌呤代谢(64个)、嘧啶代谢(53个)、丙酮酸代谢(47个)、卟啉和叶绿素代谢(41个)以及氧化磷酸化(37个)等通路在C5.1菌株基因组中占比相对较多(表3)。

进一步对VB₁₂的生物合成相关通路分析,结果发现,C5.1菌株包含通过尿卟啉原III合成钴(II)吡啶 α,c -二酰胺,进而合成VB₁₂代谢通路相关基因(表4及图6)。其中,尿卟啉原III合成钴(II)吡啶 α,c -二酰胺的过程分为需氧途径和厌氧途径两种。在需氧途径中,C5.1菌株可以利用CobA通过还原作用生成二氢前咕啉,由于未注释到CobG、CobF及钴螯合酶(CobNST),C5.1菌株可能无法通过需氧途径催化得到钴(II)吡啶 α,c -二酰胺。另一方面,C5.1菌株可以利用CysG、CbiX、CbiL、CbiH、CbiF、CbiG及CbiD 7个酶通过厌氧途径将尿卟啉原III转化成钴-前咕啉6,之后在CbiJ、CbiET、CbiC和CbiA等酶的作用下,经过甲基化、脱羧及酰胺化反应生成钴(II)吡啶 α,c -二酰胺。需氧及厌氧途径在利用钴(II)吡啶 α,c -二酰胺合成VB₁₂的过程相似,只在催化酶的类型上有所差异^[34],经过还原、腺苷化、酰胺化等步骤最终生成VB₁₂。根据KEGG注释结果可初步确认C5.1菌株具有VB₁₂的生物合成能力,该结果对传统发酵食品的营养价值具有重要贡献。

表4 C5.1菌株VB₁₂合成相关基因的KEGG注释分析

Table 4 KEGG annotation analysis of genes related to vitamin B₁₂ synthesis in *L. sphaericus* C5.1

代谢途径	代谢方式	KO_ID	基因ID	KEGG注释结果	
需氧途径		K00595	C5.1_GM002863	CobL	
		K02224	C5.1_GM002859	CobB	
		K02303	C5.1_GM002857	CobA	
		K03394	C5.1_GM003690	CobA	
		K05895	C5.1_GM002862	CobI	
		K05895	C5.1_GM002866	CobK	
		K05936	C5.1_GM002861	CobM	
		K06042	C5.1_GM002865	CobH	
		K00595	C5.1_GM002863	CbiET	
		K02188	C5.1_GM002864	CbiD	
		K02189	C5.1_GM002860	CbiG	
		K02224	C5.1_GM002859	CbiA	
	厌氧途径		K02303	C5.1_GM002857	CobA
			K03394	C5.1_GM003690	CobA
		K03394	C5.1_GM002862	CbiL	
		K03795	C5.1_GM002867	CbiX	
		K05895	C5.1_GM002866	CbiJ	
		K05936	C5.1_GM002861	CbiF	
		K06042	C5.1_GM002865	CbiC	
		K21479	C5.1_GM002868	CbiH	
		K24866	C5.1_GM002858	CysG	
		K00768	C5.1_GM001092	CobT	
		K00798	C5.1_GM000461	MMAB	
		K00798	C5.1_GM004373	MMAB	
钴(II)吡啶 α,c -二酰胺合成VB ₁₂		需氧和厌氧途径	K02226	C5.1_GM002706	CobC
			K02227	C5.1_GM002711	CbiB, CobD
		K02231	C5.1_GM002705	CobP, CobU	
		K02231	C5.1_GM002708	CobP, CobU	
		K02232	C5.1_GM002854	CobQ, CbiP	
		K02233	C5.1_GM002707	CobS, CobV	
		K19221	C5.1_GM002855	CobA	

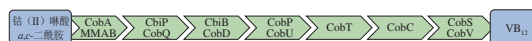
M00925尿卟啉原III \rightarrow 钴(II)吡啶 α,c -二酰胺(需氧途径)



M00924尿卟啉原III \rightarrow 钴(II)吡啶 α,c -二酰胺(厌氧途径)



M00122钴(II)吡啶 α,c -二酰胺 \rightarrow VB₁₂



蓝色方块代表与VB₁₂合成相关的化合物,绿色箭头代表C5.1菌株基因组利用KEGG数据库注释得到的与产VB₁₂相关蛋白,白色箭头代表未注释到相关蛋白。

图6 C5.1菌株产VB₁₂代谢通路注释结果

Fig. 6 Annotation of vitamin B₁₂-producing metabolic pathways in *L. sphaericus* C5.1

3 讨论与结论

Rahman等^[35]对从砷污染土地中分离得到的球形赖氨酸芽孢杆菌B1-CDA进行全基因组测序,并根据基因注释结果发现该菌株存在多个与砷修复相关的基因。Yan Wenkai等^[36]对含钙质污泥的生物反应器中分离得到的球形赖氨酸芽孢杆菌LMG 22257全基因组注释分析,预测到1个完整的尿素降解途径,及6个关键的胞外聚合物生物合成基因,结果显示了菌株在生物修复中的潜在应用价值。目前,关于具有产VB₁₂功能的赖氨酸芽孢杆菌属微生物鲜有报道。

本研究使用PacBio Sequel和Illumina NovaSeq PE150测序技术,对分离自市售发酵臭腐乳的1株具有高产VB₁₂功能的球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1进行全基因组测序。结果表明,C5.1菌株的基因组由一个环状染色体组成,不含质粒,其大小为4 690 817 bp,GC平均含量为37.21%。通过COG功能注释,发现C5.1菌株基因组中与氨基酸转运和代谢途径相关的基因较多,同时也有245个代谢途径功能未知。GO数据库注释结果说明,C5.1菌株基因组中参与连接和催化活性功能等途径有关的酶较为丰富。通过TCDB数据库注释分析,发现C5.1菌株基因组中与P-P磷酸化驱动转运蛋白和转运相关的基因最多。基于KEGG代谢途径分析发现,球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1具有VB₁₂的生物合成途径,并包含从尿卟啉原III逐步转化合成VB₁₂的关键酶,关于这些关键酶在不同氧浓度条件下对于C5.1菌株合成VB₁₂的影响仍需进一步研究。

本研究利用全基因组测序对发酵臭腐乳中分离得到的球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1进行分析,在其基因组中发现了参与VB₁₂生物合成的基因及代谢通路,为探究球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1产VB₁₂的相关机制提供了新思路。此外,本研究从基因组水平解析了球形赖氨酸芽孢杆菌C5.1代谢特性,为了解该菌株在臭腐乳发酵过程中的代谢机理提供遗传信息基础。

参考文献:

- [1] ZHAO C J, SCHIEBER A, GANZLE M G. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations: a review[J]. *Food Research International*, 2016, 89(1): 39-47. DOI:10.1016/j.foodres.2016.08.042.
- [2] 刘亚, 杨光影, 吴悦, 等. 腐乳研究进展[J]. *农产品加工(学刊)*, 2013, 23(12): 64-70. DOI:10.3969/j.issn.1671-9646(X).2013.12.022.
- [3] 李俊芳. 产维生素B₁₂乳酸菌的筛选及生物学特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007: 5.
- [4] WATANABE F, BITO T. Vitamin B₁₂ sources and microbial interaction[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2018, 243(2): 148-158. DOI:10.1177/1535370217746612.
- [5] BELL D S. Metformin-induced vitamin B₁₂ deficiency presenting as a peripheral neuropathy[J]. *Southern Medical Journal*, 2010, 103(3): 265-267. DOI:10.1097/SMJ.0b013e3181ce0e4d.
- [6] DEN ELZEN W P, WESTENDORP R G, FROLICH M, et al. Vitamin B₁₂ and folate and the risk of anemia in old age: the Leiden 85-Plus Study[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2008, 168(20): 2238-2244. DOI:10.1001/archinte.168.20.2238.
- [7] METZ J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B₁₂ or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia[J]. *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, 29(Suppl 2): S74-S85. DOI:10.1177/15648265080292S111.
- [8] HENRY O R, BENGHUZZI H, TAYLOR H A, et al. Suppression of homocysteine levels by vitamin B₁₂ and folates: age and gender dependency in the Jackson Heart Study[J]. *American Journal of Medical Sciences*, 2012, 344(2): 110-115. DOI:10.1097/MAJ.0b013e31823782a5.
- [9] PRODAN C I, COWAN L D, STONER J A, et al. Cumulative incidence of vitamin B₁₂ deficiency in patients with Alzheimer disease[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2009, 284(1/2): 144-148. DOI:10.1016/j.jns.2009.05.005.
- [10] MOLLOY A M, KIRKE P N, TROENDLE J F, et al. Maternal vitamin B₁₂ status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification[J]. *Pediatrics*, 2009, 123(3): 917-923. DOI:10.1542/peds.2008-1173.
- [11] GILLE D, SCHMID A. Vitamin B₁₂ in meat and dairy products[J]. *Nutrition Reviews*, 2015, 73(2): 106-115. DOI:10.1093/nutrit/nuu011.
- [12] WATANABE F, YABUTA Y, TANIOKA Y, et al. Biologically active vitamin B₁₂ compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6769-6775. DOI:10.1021/jf401545z.
- [13] SCOTT A I. Discovering nature's diverse pathways to vitamin B₁₂: a 35-year odyssey[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2003, 68(7): 2529-2539. DOI:10.1021/jo020728t.
- [14] 田建军, 张开屏, 赵艳红, 等. 风干肉中产脂肪酶瑞士乳杆菌TR13全基因组测序及序列分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 101-109. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190707-086.
- [15] BARTRAM A K, LYNCH M D, STEARNS J C, et al. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3846-3852. DOI:10.1128/AEM.02772-10.
- [16] LUO C, TSEMENTZI D, KYRPIDES N, et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e30087. DOI:10.1371/journal.pone.0030087.
- [17] 李秀, 强斌, 徐正中, 等. 全基因组测序在细菌耐药性分析中的应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(8): 696-699. DOI:10.3969/j.issn.1022-2694.2016.08.003.
- [18] 李尔汉, 杨慧林, 王筱兰, 等. 肌苷生产菌枯草芽孢杆菌ATCC 13952的全基因组测序及序列分析[J]. *微生物学报*, 2015, 55(12): 1560-1567. DOI:10.13343/j.cnki.wxsb.20150155.
- [19] YU Z, YANG J, ZHOU J, et al. Water stratification affects the microeukaryotic community in a subtropical deep reservoir[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, 61(2): 126-133. DOI:10.1111/jeu.12090.
- [20] 徐琼, 刘洋, 俞漪, 等. 一种产维生素B₁₂的菌株及其应用: CN 110373349 B[P]. 2022-03-27.
- [21] MUHAMMAD K, BRIGGS D, JONES G. Comparison of a competitive binding assay with *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 assay for the determination of vitamin B₁₂ in foods[J]. *Food Chemistry*, 1993, 48(4): 431-434. DOI:10.1016/0308-8146(93)90331-9.
- [22] REINER J, PISANI L, QIAO W, et al. 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. DOI:10.1038/s41525-017-0042-3.
- [23] ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH J R, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(5): 2159-2168. DOI:10.1093/nar/gky066.
- [24] BESEMER J, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2607-2618. DOI:10.1093/nar/29.12.2607.
- [25] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [26] LAGESEN K, HALLIN P, RODLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(9): 3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [27] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29. DOI:10.1038/75556.
- [28] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: D354-D357. DOI:10.1093/nar/gkj102.
- [29] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: D271-D280. DOI:10.1093/nar/gkh063.
- [30] GALPERIN M Y, MAKAROVA K S, WOLF Y I, et al. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: D261-D269. DOI:10.1093/nar/gku1223.
- [31] SAIER M H, JR REDDY V S, TAMANG D G, et al. The transporter classification database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: D251-D258. DOI:10.1093/nar/gkt1097.
- [32] WAN S G, LI G Y, AN T C, et al. Biodegradation of ethanethiol in aqueous medium by a new *Lysinibacillus sphaericus* strain RG-1 isolated from activated sludge[J]. *Biodegradation*, 2010, 21(6): 1057-1066. DOI:10.1007/s10532-010-9366-8.
- [33] NAKANO K, SHIROMA A, SHIMOJI M, et al. Advantages of genome sequencing by long-read sequencer using SMRT technology in medical area[J]. *Human Cell*, 2017, 30(3): 149-161. DOI:10.1007/s13577-017-0168-8.
- [34] SCOTT A I, ROESSNER C A. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂)[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30(4): 613-620. DOI:10.1042/BST0300613.
- [35] RAHMAN A, NAHAR N, JASS J, et al. Complete genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* B1-CDA, a bacterium that accumulates arsenic[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(1): e00999-15. DOI:10.1128/genomea.00999-15.
- [36] YAN W K, XIAO X, ZHANG Y. Complete genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* LMG 22257, a strain with ureolytic activity inducing calcium carbonate precipitation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 246: 33-35. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.02.016.