

## 降亚硝酸盐菌株短乳杆菌 JYX2 的全基因组测序及基因功能分析

李伟, 郭辉, 董乃慧, 任盈, 林心萍, 纪超凡, 张素芳\*

(大连工业大学食品学院 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室 国家海洋食品工程技术研究中心  
海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

**摘要** 从东北自然发酵酸菜中分离获得 1 株降亚硝酸盐菌株短乳杆菌 JYX2, 通过溶血试验与抗生素敏感性试验对其安全性进行评估。为阐明短乳杆菌 JYX2 的基因组特性及其亚硝酸盐降解相关基因, 采用 Pacbio 三代测序与 Illumina 二代测序技术进行全基因组测序。基于所得序列, 通过 COG、GO 及 KEGG 数据库进行基因预测与功能注释分析。利用 CARD 和 VFDB 数据库分析短乳杆菌 JYX2 的安全性。结果显示, 短乳杆菌 JYX2 在含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亚硝酸钠的 MRS 培养基中培养 24 h 后, 其对培养基中亚硝酸钠的降解效率最高可达 98.72%。该菌株未表现出溶血性, 而对庆大霉素、红霉素、氯霉素等抗生素均高度敏感(抑制圈直径  $\geq 20$  mm), 显示出良好的安全性。短乳杆菌 JYX2 的基因组由 1 条环状闭合的 DNA 以及 1 个环状的质粒组成, 基因组长度为 2 567 154 bp, GC 含量为 45.82%, 可预测 2 485 个编码基因, 65 个 tRNA 基因, 15 个 rRNA 基因以及 27 个 sRNA 基因。在 COG、GO、KEGG、CAZY、CARD 和 VFDB 数据库中, 分别注释到 1 926, 1 762, 1 823, 73, 180, 217 个功能基因。信息挖掘分析表明, 短乳杆菌 JYX2 的基因组中未检测到亚硝酸还原酶基因, 推测其亚硝酸盐降解作用可能依赖于其它酶或机制。此外, 毒力基因与耐药性基因的预测分析进一步证实了短乳杆菌 JYX2 的安全性。综上, 短乳杆菌 JYX2 具有良好的功能和安全性, 可用作发酵食品中亚硝酸盐消减的发酵菌剂。

**关键词** 短乳杆菌; 全基因组测序; 亚硝酸钠; 基因功能注释; 酸菜

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0281-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.025

食品发酵工艺不仅能有效延长食品的保质期, 还可改善食品风味<sup>[1]</sup>。东北酸菜是中国传统发酵蔬菜制品的典型代表之一<sup>[2]</sup>。在酸菜发酵过程中, 一些微生物会将蔬菜中的氮元素转化为亚硝酸盐, 造成亚硝酸盐堆积, 对人体健康构成潜在危害<sup>[3-4]</sup>, 如何快速降低酸菜发酵过程中亚硝酸盐的含量, 成为一个备受关注的问题。本研究用短乳杆菌(*Levilactobacillus brevis* JYX2)分离自东北酸菜, 是酸菜发酵过程中的常见菌种, 也是 1 株能有效降低发酵蔬菜中亚硝酸盐含量的功能菌株。

目前, 降亚硝酸盐微生物的研究集中在菌种筛选、发酵特性以及代谢产物分析, 而关于菌株全基因组特征的解析却鲜见报道。这限制了对菌株发酵代谢机制、生理生化等微生物特性的全面认识, 进而影响其深入开发和利用<sup>[5]</sup>。近年来, 生物信息学与计算技术的进步推动了全基因组测序的广

泛应用, 该技术已成为微生物物种鉴定与功能解析等方面的重要工具, 有助于对微生物基因组的精准解析、功能挖掘及其作用机制的阐明<sup>[6-9]</sup>。为解析短乳杆菌 JYX2 的基因组信息、菌株安全性以及探究高效降解亚硝酸盐的作用机理, 本研究通过全基因组从头测序获取短乳杆菌 JYX2 的基因组数据, 基于生物信息学工具及公共数据库资源完成系统的功能注释分析, 并通过溶血性试验、抗生素敏感性试验结合菌株耐药和毒力因子基因数据库注释分析, 对短乳杆菌 JYX2 进行安全性评价, 本试验为该菌株后续的开发与综合利用提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

短乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*)JYX2 分离自东北酸菜, 保存于本实验室; 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC 25923、大肠杆菌(*Escherichia coli*)Nissle 1917, 中国工业微生物菌种保藏中心; MRS 肉汤、琼脂培养基, 青岛海博生物技术有限公司。

收稿日期: 2024-12-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072185)

第一作者: 李伟, 女, 硕士生

通信作者: 张素芳 E-mail: zhangsf@dlpu.edu.cn

## 1.2 仪器与设备

Leica DM2500 光学显微镜,德国徕卡仪器有限公司;Infinite M200 多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;Micro 17R 冷冻高速离心机,美国Thermo Scientific公司;ZQZY-C8V 回转式恒温调速摇床,上海知楚仪器公司;LRH-150 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 菌株降亚硝酸盐的功能测定 为了明确短乳杆菌 JYX2 对亚硝酸盐的降解能力,试验将活化培养 16~18 h 的短乳杆菌 JYX2 以 2% 的比例接种于含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亚硝酸钠的 MRS 肉汤中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 摇床中振荡培养 48 h<sup>[10-11]</sup>。每隔 4 h 取样,参照盐酸萘乙二胺法测定菌液中亚硝酸盐含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )并计算其亚硝酸盐的降解效率<sup>[12-14]</sup>。降解效率计算公式如下:

$$\text{亚硝酸钠降解效率}(\%) = \frac{\text{初始亚硝酸钠含量} - \text{培养后亚硝酸钠含量}}{\text{初始亚硝酸钠含量}} \times 100 \quad (1)$$

## 1.3.2 安全性评价

1.3.2.1 溶血性试验 菌株溶血性的测定参照文献[15],将短乳杆菌 JYX2 接种于含 5% 脱纤维绵羊血的 MRS 琼脂平板,在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 30 h,随后对溶血情况进行评估。阳性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923,阴性对照选用益生性大肠杆菌 Nissle 1917。前者会破坏红细胞,致使菌落周围出现清晰的环带,为  $\beta$  溶血;后者虽然很少破坏红细胞,但菌落周围产生灰绿色且边缘模糊的环带,为  $\alpha$  溶血。所有试验设置 3 次及以上平行,以确保试验结果的准确性。

1.3.2.2 抗生素敏感性试验 本研究采用纸片扩散法测定短乳杆菌 JYX2 的抗生素敏感性。挑取短乳杆菌 JYX2 单菌落,接种至 MRS 培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 条件下振荡培养至对数生长期。移取 100  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布于 MRS 平板,用无菌的镊子分别放置如下抗生素药敏纸片:链霉素(10  $\mu\text{g}$ )、青霉素(10  $\mu\text{g}$ )、头孢氨苄霉素(30  $\mu\text{g}$ )、氯霉素(30  $\mu\text{g}$ )、庆大霉素(10  $\mu\text{g}$ )、红霉素(15  $\mu\text{g}$ )、米诺环素(30  $\mu\text{g}$ )、头孢唑林(30  $\mu\text{g}$ )、阿米卡星(30  $\mu\text{g}$ )、万古霉素(30  $\mu\text{g}$ ),各纸片之间的间隔保持在

24 mm 以上<sup>[16]</sup>。试验采用倒置培养方式,将接种药敏纸片的平板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中培养 24 h,培养结束后测量抑菌圈直径,进而评估短乳杆菌 JYX2 的抗生素敏感性。耐药性判定标准为:耐药(R)  $\leq$  14 mm,中度耐药(I)介于 14~20 mm 之间,敏感(S)  $\geq$  20 mm,每组重复 3 次,以确保试验的可靠性<sup>[17]</sup>。

1.3.3 短乳杆菌 JYX2 的全基因组测序 收集对数生长期的短乳杆菌 JYX2 菌体,所有样本均采用干冰保存并运输至指定检测机构(上海美吉生物医药科技有限公司)。质控合格后,分别构建 Illumina 短读长文库,并依托 Nanopore PromethION 和 Illumina NovaSeq 6000 双测序平台完成全基因组序列的测定<sup>[18-19]</sup>。

## 1.3.4 短乳杆菌 JYX 的基因组注释

1.3.4.1 基因组组装 原始数据来源于 Illumina 测序,后续利用 fastp v0.23.0 软件对其进行质控处理与读长剪切,去除低质量序列及接头污染。将质控后的 Illumina 测序数据与 Nanopore 测序数据导入 Unicycler v0.4.8 软件,在混合组装的基础上,利用 Pilon v1.22 与 SOAPdenovo2.04 对组装结果进行校正与优化,最终得到短乳杆菌 JYX2 的高质量基因组。

1.3.4.2 基因预测 在短乳杆菌 JYX2 的基因组分析中,染色体区域的基因预测通过 Prodigal 实现,质粒区域则用 GeneMarkS 软件完成<sup>[20]</sup>。通过上述分析,明确菌株功能基因的核酸序列及其编码功能蛋白的氨基酸序列,为后续基因组注释提供基础数据。

1.3.4.3 基因组圈图绘制 采用 Circos 软件绘制短乳杆菌 JYX2 的基因组图谱,从整体上呈现其基因组结构特征。该图谱包括正负链基因定位、COG 功能注释、GC 含量及基因组长度在内的多维度分析结果<sup>[21]</sup>。

1.3.4.4 基因的功能注释 通过整合 Diamond、blast2go 和 hmmer3 等工具,将短乳杆菌 JYX2 预测所得的蛋白质组序列与公共数据库(如 COG、GO 和 KEGG)进行系统比对,从而完成基因功能的注释工作<sup>[22]</sup>。

1.3.4.5 毒力基因以及耐药基因预测 本研究以 Diamond 作为比对工具,设定了  $E$ -value 阈值是

$1 \times 10^{-5}$ , 通过将短乳杆菌 JYX2 的预测基因序列与综合抗生素抗性数据库 (CARD) 和毒力因子数据库 (VFDB) 分别进行序列比对, 分析筛选出菌株中潜在的耐药基因及毒力相关基因, 为菌株安全性评估提供依据<sup>[23]</sup>。

**1.3.5 短乳杆菌 JYX2 亚硝酸盐还原酶预测** 整合 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 及 KEGG 等多个数据库资源, 采用生物信息学分析方法, 对短乳杆菌 JYX2 基因组中与亚硝酸盐还原酶功能相关的基因进行全面挖掘与系统分析, 明确该类基因的序列特征及潜在功能。

#### 1.4 数据处理

本研究的数据处理与统计分析采用多软件协同完成: 使用 Excel 2021 软件进行基础数据的整理、计算与初步分析; 采用 Origin 2021 软件 (OriginLab Corp., USA) 进行试验结果的图表绘制, 以直观呈现数据特征; 借助 SPSS 20.0 软件 (International Business Machines Corp., USA) 对基因相关数据开展统计分析, 并通过显著性差异检验中的方差分析验证数据结果的可靠性, 确保统计结论的科学性。

## 2 结果与分析

### 2.1 短乳杆菌 JYX2 的降解亚硝酸钠能力

短乳杆菌 JYX2 对亚硝酸钠降解率如图 1 所示。当培养时间达到 8~15 h 时, 短乳杆菌 JYX2 对亚硝酸钠的降解速率最快; 培养 24 h 时, 短乳杆菌 JYX2 对 MRS 培养基中亚硝酸钠的降解率达到 98.72%, 之后趋于稳定。这表明试验菌株短乳杆菌 JYX2 对亚硝酸钠具有良好的降解能力。

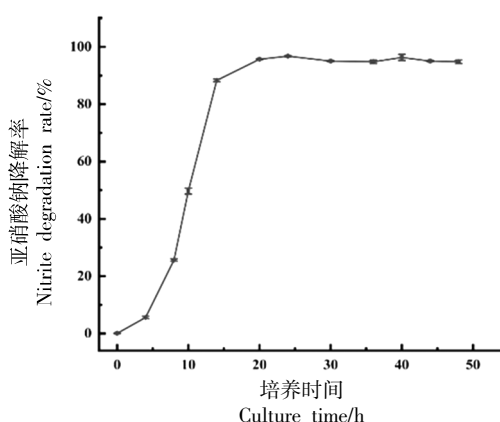


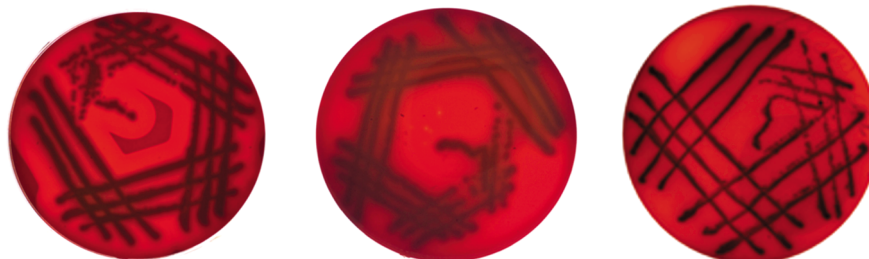
图 1 短乳杆菌 JYX2 对亚硝酸钠降解率的变化

Fig.1 Changes in the degradation rate of sodium nitrite by *L. brevis* JYX2

### 2.2 短乳杆菌 JYX2 安全性

即使在同一种属内, 菌株之间的基因组变异可能导致其表型与特性呈现明显区别。因此, 对每一株新分离菌株均应开展独立的安全性评估, 而不宜仅依据同种或同属菌株的已有安全性数据。通过系统性的检测与评价, 能够更准确地确认菌株的功能特性, 并有效排除其潜在的生物安全风险<sup>[24]</sup>。

菌株安全性评估中, 溶血活性检测是一项基础性检测。根据红细胞裂解程度和溶血环特征, 细菌溶血现象可分为  $\alpha$ 、 $\beta$  与  $\gamma$  3 种类型。 $\alpha$ -溶血为不完全溶血, 通常于菌落周边形成绿棕色溶血环;  $\beta$ -溶血属于完全溶血, 红细胞被彻底裂解, 菌落周围呈现清晰透明的溶血区域;  $\gamma$ -溶血则为无溶血现象, 菌落周围既无绿棕色变化, 也未出现透明溶血圈<sup>[25]</sup>。



(a) 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 (b) 大肠杆菌 Nissle 1917 (c) 短乳杆菌 JYX2

图 2 短乳杆菌 JYX2 溶血性活性分析结果

Fig.2 The results of hemolytic activity analysis of *L. brevis* JYX2

如图3所示,阳性对照金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的菌落周围可见清晰的 $\beta$ -溶血环,大肠杆菌 Nissle 1917(阴性对照)菌落周围出现了灰绿色且边缘模糊的环带,为 $\alpha$ -溶血表现,在培养 24 h 后,短乳杆菌 JYX2 菌落周围并未发现任何溶血现象,根据此现象可初步判定菌株短乳杆菌 JYX2 较为安全<sup>[26]</sup>。

目前,菌株抗生素耐药性问题日益严重。作为食品发酵剂,抗生素敏感试验也是菌株安全性评价的重要组成部分。短乳杆菌 JYX2 菌株抗生素敏感性试验结果如表 1 所示,该菌株对于链霉素、头孢氨苄、米诺环素表现出中度敏感,并具有一定耐受性;而对于庆大霉素、红霉素、氯霉素等其它抗生素均表现出敏感性。这表明该菌株耐药性较弱,安全性良好,适合应用于后续的发酵食品研究<sup>[27]</sup>。

### 2.3 短乳杆菌 JYX2 基因组组成与信息

短乳杆菌 JYX2 染色体的基因组圈图如图 3 所示。短乳杆菌 JYX2 的基因组由 1 条环状闭合的染色体(图 3)和 1 个环状质粒组成。基因组学分析结果表明,短乳杆菌 JYX2 的基因组长度为 2 567 154 bp,GC 含量均值为 45.82%,基因组整体特征符合短促生乳杆菌属的典型遗传特征。基因预测结果显示,该菌株基因组共编码 2 485 个功能基因,同时包含 65 个 tRNA 基因、15 个 rRNA 基因和 27 个 sRNA 基因,为菌株的遗传信息传递

表 1 短乳杆菌 JYX2 的抗生素敏感性的试验结果

Table 1 Results of antibiotic sensitivity experiments of *L. brevis* JYX2

抗生素	抑制圈的直径/mm	敏感度
链霉素	15.25 ± 1.25	I
头孢氨苄	14.56 ± 0.35	I
米诺环素	14.25 ± 1.25	I
头孢唑林	21.24 ± 0.65	S
阿米卡星	20.24 ± 1.46	S
万古霉素	20.26 ± 1.35	S
青霉素	21.23 ± 1.26	S
庆大霉素	20.23 ± 0.43	S
红霉素	24.52 ± 0.23	S
氯霉素	21.23 ± 0.54	S

注:R( $\leq 14$  mm)为耐药、I(14~20 mm)为中度敏感、S( $\geq 20$  mm)为敏感;数值表示为平均值 $\pm$ 标准差( $n=3$ )。

与代谢调控提供了基础。编码基因长度分布分析显示,其平均长度为 888.52 bp,其中长度 $\geq 500$  bp 的基因有 1 801 个,占编码基因总数的 72.48%;长度 $\geq 1 000$  bp 的基因有 815 个,占比 32.80%。此外,重复序列注释结果显示,该菌株基因组中串联重复序列 14 个,重复比例 0.09%;散在重复序列 29 个,重复比例 0.08%,重复序列占比整体较低(表 2)。

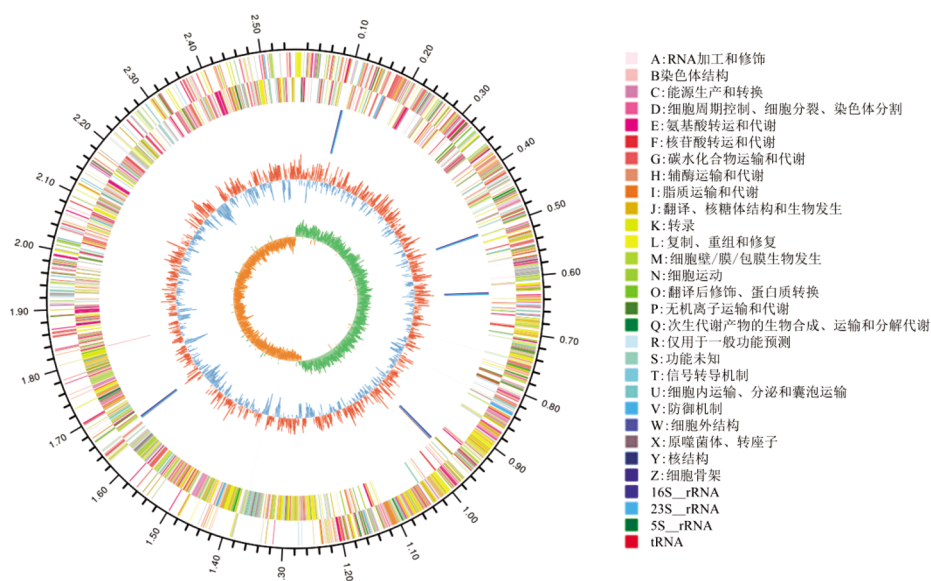


图 3 短乳杆菌 JYX2 染色体的基因组图

Fig.3 Genome map of chromosome in *L. brevis* JYX2

表 2 短乳杆菌 JYX2 的基因组统计结果

Table 2 Genome statistics of *L. brevis* JYX2

类型	基因长度/ bp	数量/个	重复比例/ %
基因平均长度	888.52	—	—
最短基因长度	90	—	—
最长基因长度	5 016	—	—
长度>500 bp	—	1 800	—
长度>1 000 bp	—	815	—
串联重复序列	—	14	0.09
散在重复序列	—	29	0.08

注：“—”表示该类别无对应统一数据。

### 2.4 短乳杆菌 JYX2 基因功能注释

基于对短乳杆菌 JYX2 的基因预测结果,对其编码序列执行了功能注释,图 4 展示了短乳杆菌 JYX2 在多种数据库中注释到的功能基因数量,其在 COG、GO、KEGG、CAZY、CARD 和 VFDB 数据库中分别注释到 1 926, 1 762, 1 823, 73, 180, 217 个功能基因。

2.4.1 COG 数据库注释 COG (Clusters of orthologous groups of proteins)数据库以已测序物种的蛋白质序列为基础,经大规模序列比对和聚类整合构建。利用该数据库进行序列比对,能够快速完成预测蛋白的功能注释、归类及进化分析,为后续的基因功能研究提供关键支撑<sup>[28]</sup>。本文采用 Illumina 和 PacBio 联合测序策略对短乳杆菌 JYX2

进行全基因组测序,注释到的基因数量为 1 926 个,其中有 COG 注释的基因占有所有基因的 77.51%,并被分配到 23 个不同的功能组(图 5)。从功能分布来看,碳水化合物转运和代谢所占比例最高(10.70%),其次为氨基酸转运和代谢(7.32%)。脂质转运代谢(4.93%)、能量生成与转换(4.62%)以及核苷酸转运和代谢(4.67%)的占比相对较低。为进一步阐明短乳杆菌 JYX2 在遗传水平上对亚硝酸盐降解的作用,分析发现了参与无机离子转运和代谢的特定 COGs,共注释到 100 个有关无机离子转运和代谢的基因,以及 102 个与辅酶转运和代谢相关的基因。

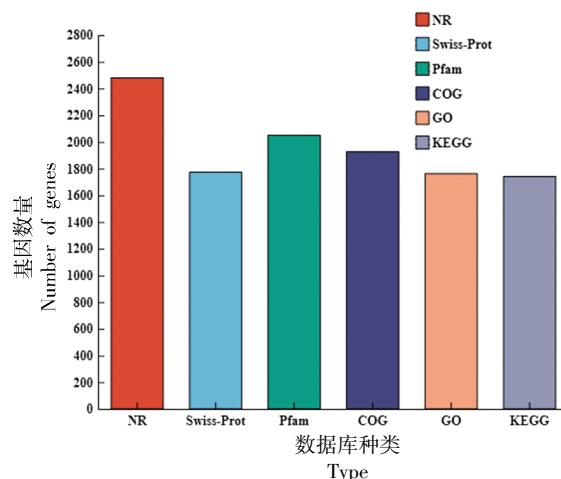


图 4 短乳杆菌 JYX2 基因功能注释统计图

Fig.4 Functional annotation statistics of *L. brevis* JYX2 gene

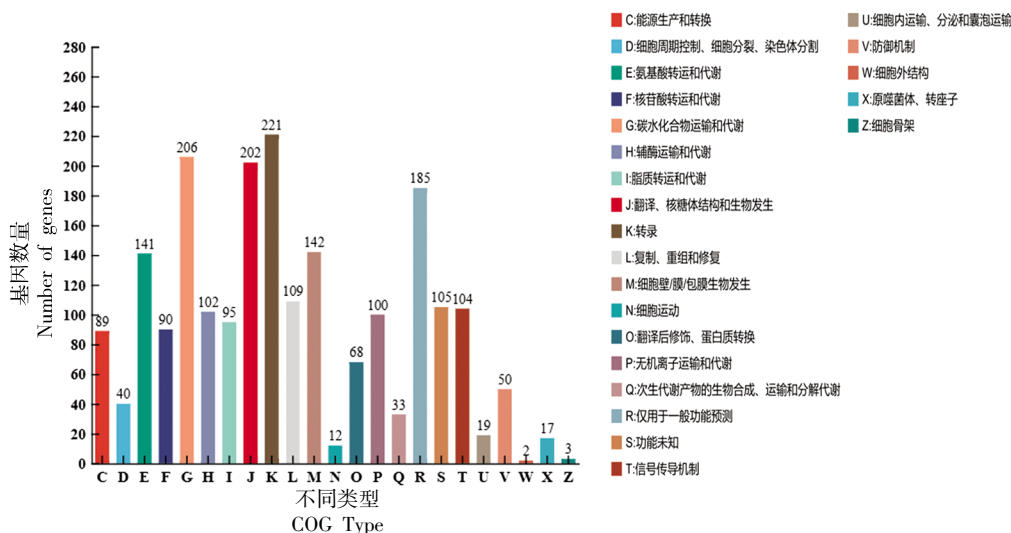


图 5 短乳杆菌 JYX2 COG 注释分类

Fig.5 Classification of *L. brevis* JYX2 COG annotations

2.4.2 GO 数据库注释 对短乳杆菌 JYX2 基因组编码的氨基酸序列进行 GO (Gene ontology) 数据库比对与功能注释, 结果显示, 共有 1 762 个基因获得相应的功能注释信息, 占该基因组预测基因总数的 70.91% (图 6)。依据序列相似性匹配的

质量, 这些注释基因可划分为 3 个主要类别。其中, 归属于分子功能 (Molecular function) 这一类的 GO 条目数量最多, 相关基因达 1 419 个, 其次是细胞组成 (896 个), 以及生物过程 (816 个)。

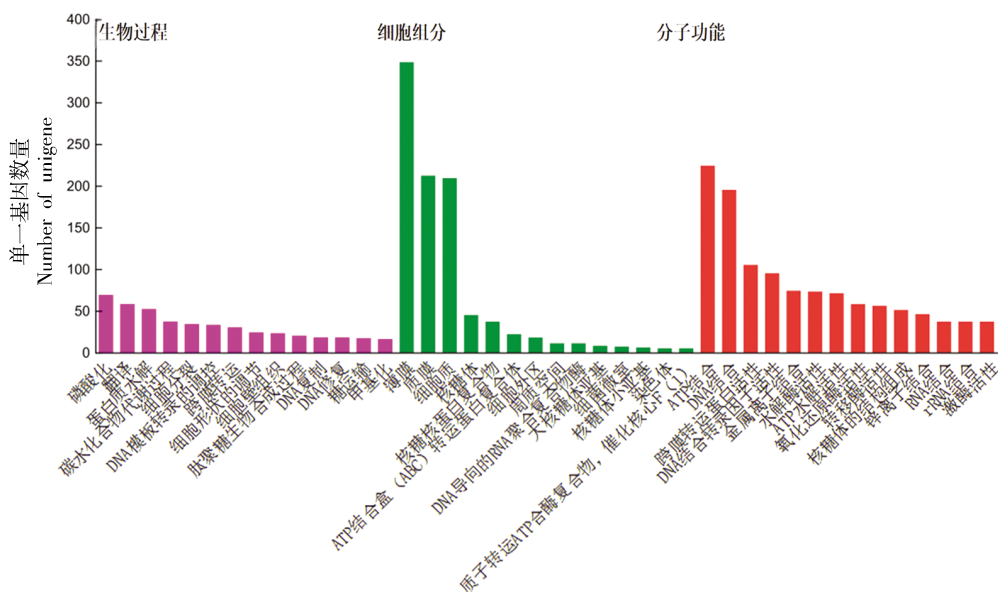


图 6 短乳杆菌 JYX2 GO 注释分类

Fig.6 Classification of *L. brevis* JYX2 GO annotations

2.4.3 KEGG 数据库注释 将短乳杆菌 JYX2 基因组数据在 KEGG 数据库进行分析, 结果如图 7 所示。该菌株共有 1 741 个基因获得了 KEGG 注释, 并根据功能分为 6 类代谢途径<sup>[29]</sup>。基因组注释结果显示, 短乳杆菌 JYX2 的基因可归为 6 大功能类别, 各类别基因数量分别为: 代谢类 1 258 个、环境信息处理类 161 个、遗传信息处理类 177 个、细胞过程类 82 个、人类疾病类 110 个及有机系统类 35 个, 其中, 代谢类基因数量占比最高, 是该菌株功能基因的核心组成部分。在代谢类基因内部, 功能细分结果显示: 全局图谱与总览图谱相关基因数量最多, 达 490 个, 丰度在代谢子类中居首位; 具体而言, 在代谢相关基因中, 注释结果显示: 与碳水化合物代谢相关的基因有 196 个, 与辅助因子及维生素代谢相关的有 107 个, 参与氨基酸代谢过程的有 88 个, 涉及聚糖生物合成与代谢的有 77 个<sup>[30]</sup>。在环境信息处理类别中, 注释到膜运输功能的基因数量最多, 达 91 个; 遗传信息处理

类别中则以翻译相关基因数量居首, 共 83 个。以上分析表明, 短乳杆菌 JYX2 在碳源利用、蛋白质合成及跨膜转运等环节具有突出的遗传特征, 其较强的物质代谢与转运潜能, 为解释该菌株能够降解复杂大分子并生成多种功能性代谢产物提供了关键的基因组学参考依据。

2.4.4 CAZY 数据库注释 利用 bCAN 碳水化合物活性酶 (CAZY) 注释算法对短乳杆菌 JYX2 进行 CAZY 注释分析<sup>[31]</sup>。碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-active enzymes, CAZymes) 是一类功能多样的酶系, 依据其结构特征与催化功能的差异, 可划分为 6 类核心蛋白质家族, 具体包括: 负责催化糖苷键水解反应的糖苷水解酶 (Glycoside hydrolases, GHs), 参与糖基转移反应以合成糖苷键的糖基转移酶 (Glycosyltransferases, GTs), 通过非水解方式断裂多糖中特定化学键的多糖裂合酶 (Polysaccharide lyases, PLs), 能够催化碳水化合物分子中酯键水解的碳水化合物酯酶 (Carbohy-

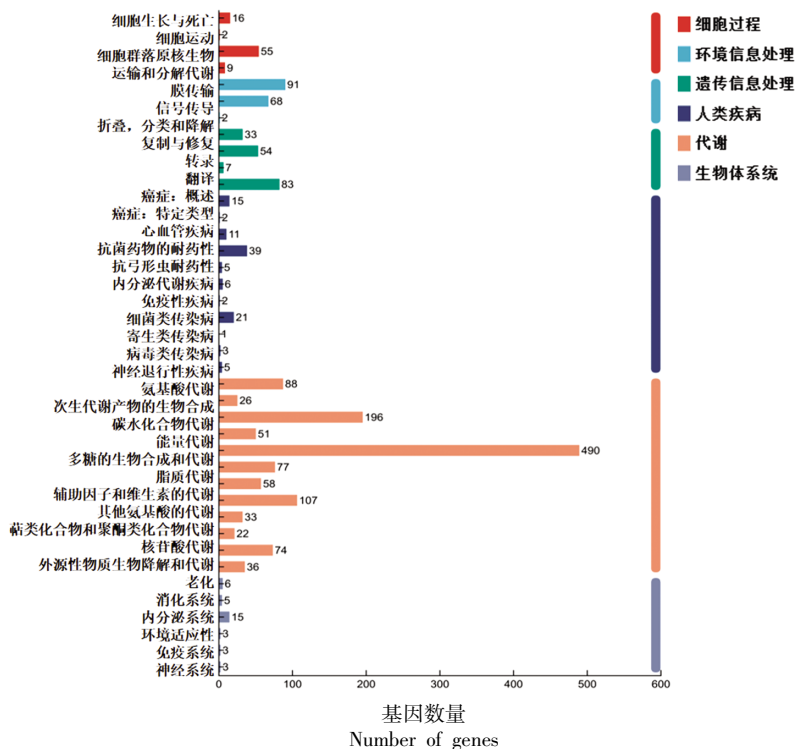


图 7 短乳杆菌 JYX2 KEGG 注释分类

Fig.7 Classification of *L. brevis* JYX2 KEGG annotations

drate esterases, CEs), 不具备催化活性却可通过结合碳水化合物辅助酶促反应的碳水化合物结合模块(Carbohydrate-binding modules, CBMs), 还包括通过氧化还原反应辅助碳水化合物代谢的辅助氧化还原酶(Auxiliary activities, AAs)。如图 8 所示, 在对碳水化合物活性酶的分类注释中, 短乳杆菌 JYX2 基因组以糖苷水解酶(GH)编码基因数量最多, 共计 37 个; 碳水化合物酯酶(CE)相关基因次之, 为 18 个。相比之下, 与辅助氧化还原酶及碳水化合物结合模块相关的基因则较为有限。

2.4.5 CARD 数据库注释 CARD(Comprehensive antibiotic resistance database) 作为当前公认的综合细菌耐药基因数据库, 被用于本研究的耐药性分析。基于序列 Identity  $\geq 45\%$  及 Coverage  $\geq 70\%$  的筛选阈值<sup>[32-33]</sup>, 通过该数据库对短乳杆菌 JYX2 进行注释, 鉴定出该菌株可能携带的耐药基因。结果如表 3 所示, 该数据库注释到 3 个可能的耐药基因信息, 包括艾法霉素抗生素、夫西丹抗生素和利福霉素抗生素。在上述常见抗生素敏感性试验中的抗生素种类, 在该筛选条件下未被注释

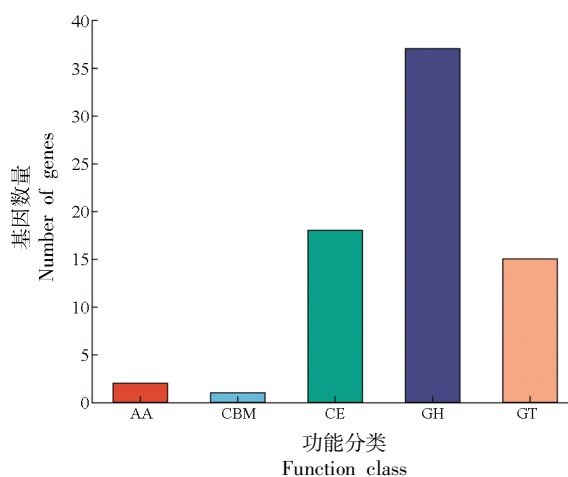


图 8 短乳杆菌 JYX2 CAZY 注释分类

Fig.8 Classification of *L. brevis* JYX2 CAZY annotations

到, 与试验结果一致。由表 3 可知, 短乳杆菌 JYX2 耐药基因相对较少, 菌株安全性相对较高, 关于被 CARD 数据库注释到的 3 种耐药分类基因信息是否有相应的耐药表征值得深入研究。

2.4.6 VFDB 数据库注释 毒力因子数据库(Virulence factors database, VFDB) 是一个专门收集、

表3 短乳杆菌 JYX2 CARD 注释结果

Table 3 Results of *L. brevis* JYX2 CARD annotation

基因编号	耐药分类	AMR 基因家族	一致性/%
Gene1454	艾法霉素抗生素	耐艾法霉素 EF-Tu	75.7
Gene1822	夫西丹抗生素	抗生素抗性 fusA	71.1
Gene1827	利福霉素抗生素	利福霉素抗性 RNA 聚合酶 $\beta$ 亚基 ( <i>rpoB</i> )	71.8

整理并系统呈现病原菌毒力因子相关信息的综合性在线资源平台。依据 VFDB 核心数据库所设定的标准(序列一致性 $\geq 80\%$ ,覆盖度 $\geq 70\%$ )<sup>[28]</sup>,对217个候选毒力基因进行筛选,未发现符合上述条件的毒力因子。进一步针对短乳杆菌 JYX2 的溶血性毒力因子进行检测,结果显示该菌株中不存在溶血性毒力因子,该生物信息学分析结果与图2所示的溶血性试验结论一致,进一步说明了该菌株的安全性较高。

### 2.5 短乳杆菌 JYX2 编码亚硝酸盐还原酶基因预测分析

亚硝酸盐降解通常包括酸降解和酶降解,对短乳杆菌 JYX2 的全基因组序列,本研究利用 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 及 KEGG 等多个数据库进行系统的功能注释与分类分析。经过进一步的信息挖掘,表明短乳杆菌 JYX2 的基因组中未检测到亚硝酸还原酶基因,推测其降解作用可能依赖于其它酶或降解机制<sup>[34]</sup>。

## 3 结论与讨论

综上,本研究中发现短乳杆菌 JYX2 对 MRS 肉汤中的亚硝酸钠具有高效降解能力。根据试验菌株的全基因组测序结果,分析得到了短乳杆菌 JYX2 的基因组基本信息,通过与多种数据库的比对,对该菌株进行基因组基本信息解析和基因功能注释。通过溶血性和抗生素敏感性试验测定,表明该菌株不具有溶血性,对庆大霉素、红霉素、氯霉素等抗生素敏感,说明菌株相对安全。通过 CARD 数据库和 VFDB 数据库比对分析,发现短乳杆菌 JYX2 仅有3个耐药基因,进一步表明其安全性较高。信息挖掘分析结果显示,短乳杆菌 JYX2 的基因组中未检测到亚硝酸还原酶基因,推测可能是其它酶或降解作用所致。综上,短乳杆菌 JYX2 具有良好的降解亚硝酸盐功能和菌株安全

性,可用作发酵食品中亚硝酸盐消减的发酵菌剂。

## 参 考 文 献

- [1] LIU S N, HAN Y, ZHOU Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651.
- [2] 朱翔,汪冬冬,明建英,等.四川泡菜和东北酸菜在发酵过程中的物质成分变化[J].中国调味品,2021,46(4): 78-81.  
ZHU X, WANG D D, MING J Y, et al. Changes of substance composition of Sichuan pickles and northeast pickled cabbage during fermentation [J]. China Condiment, 2021, 46(4): 78-81.
- [3] WANG Z X, SHAO Y Y. Effects of microbial diversity on nitrite concentration in Pao Cai, a naturally fermented cabbage product from China[J]. Food Microbiology, 2018, 72: 185-192.
- [4] 张庆芳,迟乃玉,郑学仿,等.短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)去除亚硝酸盐的研究[J].微生物学通报,2004,31(2): 6.  
ZHANG Q F, CHI N Y, ZHENG X F, et al. Study on removal of nitrite by *Lactobacillus brevis* [J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 6.
- [5] 褚琪,张艳芳,周浩然,等.*L. plantarum* SGJ-24 全基因组测序及活性相关基因的挖掘和分析[J].食品工业科技,2024,45(14): 131-138.  
CHU Q, ZHANG Y F, ZHOU H R, et al. Whole genome sequencing of *L. plantarum* SGJ-24 and mining and in-depth analysis of activity related genes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(14): 131-138.
- [6] ZHOU S, GAN M, ZHU J Y, et al. Assessment of bioleaching microbial community structure and function based on next generation sequencing technologies[J]. Minerals, 2018, 8(12): 596.
- [7] FAZLE RABBEI M, BAEK K H. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus*

- velezensis* for agricultural applications[J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 4973.
- [8] PURUSHOTHAMAN S, MEOLA M, EGLI A. Combination of whole genome sequencing and metagenomics for microbiological diagnostics[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23 (17): 9834.
- [9] WU C S, YIN Y Z, ZHU L L, et al. Metagenomic sequencing -driven multidisciplinary approaches to shed light on the untapped microbial natural products[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(3): 730-742.
- [10] WANG X Y, SONG G, HE Z, et al. Effects of salt concentration on the quality of Paocai, a fermented vegetable product from China[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101 (15): 6202-6210.
- [11] 董乃慧, 薛思宇, 董亮, 等. 氨基甲酸乙酯降解菌株的分离鉴定及其在白酒中的应用[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(7): 410-422.
- DONG N H, XUE S Y, DONG L, et al. Isolation and identification of strains degrading ethyl carbamate strain and its application in Chinese liquor[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(7): 410-422.
- [12] 奎梦漪, 薛桥丽, 康娇, 等. 云南自然发酵菜液中乳酸菌的分离鉴定及其发酵性能研究[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(8): 107-109.
- KUI M Y, XUE Q L, KANG J, et al. Isolation, identification and fermentation performance of lactic acid bacteria from natural fermented sauerkraut broth in Yunnan [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 107-109.
- [13] 邹辉, 刘晓英, 陈义伦, 等. 泡菜(白菜)腌制过程中有机酸对亚硝酸盐含量的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(11): 29-33.
- ZOU H, LIU X Y, CHEN Y L, et al. Effect of organic acids on the concentration of nitrite during pickle (Chinese cabbage) fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(11): 29-33.
- [14] 刘玮, 邱崇顺, 何宇星, 等. 一株降解亚硝酸盐植物乳杆菌的生长特性及其在泡菜制作中的应用[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(9): 119-125.
- LIU W, QIU C S, HE Y X, et al. Growth characteristics of a nitrite -degrading *Lactobacillus plantarum* and its application in pickle production [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38 (9): 119-125.
- [15] 江一帆, 滕建文, 黄丽, 等. 具有降解胆固醇益生活性和后生元特性的乳酸菌菌株筛选[J]. *食品科技*, 2023, 48(9): 9-16.
- JIANG Y F, TENG J W, HUANG L, et al. Screening of lactic acid bacteria strains with cholesterol-degrading probiotic and postbiotic properties[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(9): 9-16.
- [16] HUO Y X, ZHANG D L, WANG X N, et al. Biofunctional attributes and storage study of milk fermented by *Enterococcus italicus* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 423: 110844.
- [17] 苗超, 张宇, 杨鑫焱, 等. 降尿酸乳酸菌菌株的筛选及其全基因组分析[J]. *中国食品学报*, 2024, 24 (7): 88-99.
- MIAO C, ZHANG Y, YANG X Y, et al. Screening and whole genome analysis of lactic acid bacteria with lowering uric acid[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24 (7): 88-99.
- [18] 张悦, 蒋柠, 郑砚学, 等. 1株高产生物膜发酵乳杆菌抗胁迫特性与全基因组分析[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(10): 63-72.
- ZHANG Y, JIANG N, ZHENG Y X, et al. Stress resistance and whole genome analysis of a *Lactobacillus fermentum* with high biofilm production [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(10): 63-72.
- [19] 纪帅奇, 乌日娜, 张淘崴, 等. 枯草芽孢杆菌 SNBS-3 全基因组测序及其抑菌物质预测分析[J]. *食品科学*, 2024, 45(2): 57-63.
- JI S Q, WU R N, ZHANG T W, et al. Whole genome sequencing of *Bacillus subtilis* SNBS-3 and prediction of its antimicrobial substances [J]. *Food Science*, 2024, 45(2): 57-63.
- [20] STOTHARD P, WISHART D S. Circular genome visualization and exploration using CGView[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(4): 537-539.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] XU X J, HUANG L X, SU Y Q, et al. The complete genome sequence of *Vibrio aestuarianus* W-40 reveals virulence factor genes[J]. *Microbiologyopen*, 2018, 7(3): e00568.
- [24] MIN J K, SEOCKMO K, SUN K, et al. Safety evaluations of *Bifidobacterium bifidum* BGN4 and *Bifidobacterium longum* BORI[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1422.
- [25] SHARMA P, TOMAR S K, SANGWAN V, et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations[J]. *Journal of Food Safety*, 2016, 36(1): 38–51.
- [26] LIANG A J, WANG J L, DING L L, et al. Probiotic properties, whole-genome sequence analysis, and safety assessment of *Brevibacillus borstelensis* S8[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2024, 210: 116800.
- [27] 张甜甜, 林显华, 吕文亮, 等. 6株鼠李糖乳杆菌的安全性评价[J]. *广东饲料*, 2024, 33(1): 30–33.  
ZHANG T T, LIN X H, LÜ W L, et al. Safety evaluation of 6 strains of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *Guangdong Feed*, 2024, 33(1): 30–33.
- [28] 郭宝松, 张玉姣, 代艺伟, 等. 氨肽酶生产菌株 *Bacillus subtilis* LBJ4-5 的全基因组测序及基因功能分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(24): 32–41.  
GUO B S, ZHANG Y J, DAI Y W, et al. Whole-genome sequencing and sequence analysis of an aminopeptidase-producing *Bacillus subtilis* LBJ4-5[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(24): 32–41.
- [29] 郑雪, 梁琪, 宋雪梅, 等. 1株牦牛乳源产细菌素融合魏斯氏菌 ZW21 全基因组测序及序列分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(20): 119–126.
- ZHENG X, LIANG Q, SONG X M, et al. Whole genome sequencing and sequence analysis of a yak milk-derived bacteriocin-producing *Weissella confusa* ZW21[J]. *Food Science*, 2023, 44(20): 119–126.
- [30] XU X M, LIANG S Y, LI X, et al. Antibiotic resistance and virulence characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from Ningbo, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1459466.
- [31] REN X Y, LIU Y X, TAN Y M, et al. Sequencing and functional annotation of the whole genome of *Shiraha bambusicola* [J]. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2020, 10(1): 23–35.
- [32] 郑淼, 何梦丽, 方如雪, 等. 可缓解食物过敏的热灭活乳酸菌的筛选及其全基因组分析[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(9): 141–154.  
ZHENG M, HE M L, FANG R X, et al. Screening of heat-killed lactic acid bacteria with food allergy alleviating effects and its whole genome sequencing analysis[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2024, 24(9): 141–154.
- [33] JAGANA N, PRIYANKA T, GYANENDRA S S, et al. Whole genome sequencing-based cataloguing of antibiotic resistant genes in piggery waste borne samples[J]. *Gene*, 2023, 887: 147786.
- [34] 黄燕燕, 刘冬梅, 邝嘉华, 等. 植物乳杆菌 DMDL 9010 降解亚硝酸盐特性及其相关基因挖掘[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(11): 14–24, 184.  
HUANG Y Y, LIU D M, KUANG J H, et al. Characterization of nitrite degradation and mining related genes of *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(11): 14–24, 184.

### Whole Genome Sequencing and Gene Function Analysis of the Nitrite-Lowering Strain *Levilactobacillus brevis* JYX2

LI Wei, GUO Hui, DONG Naihui, REN Ying, LIN Xinping, JI Chaofan, ZHANG Sufang\*  
(SKL of Marine Food Processing & Safety Control, National Engineering Research Center of Seafood, Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

**Abstract** A nitrite-degrading strain, *Levilactobacillus brevis* JYX2, was isolated from naturally fermented sauerkraut in Northeast China, and its safety was evaluated through hemolysis test and antibiotic susceptibility test. To elucidate the

genomic characteristics of *L. brevis* JYX2 and its nitrite degradation-related genes, Pacbio third-generation sequencing and Illumina second-generation sequencing technologies were employed for whole-genome sequencing. Based on the obtained sequences, gene prediction and functional annotation analysis were conducted through COG, GO, and KEGG databases. Meanwhile, the safety of *L. brevis* JYX2 was analyzed using the CARD and VFDB databases. The results showed that *L. brevis* JYX2 could degrade up to 98.72% of sodium nitrite in the culture medium after 24 h of incubation in MRS medium containing 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sodium nitrite. And the strain exhibited no hemolytic activity and demonstrated high sensitivity to antibiotics such as gentamicin, erythromycin, and chloramphenicol (with inhibition zone diameters  $\geq 20$  mm), indicating a favorable safety profile. The genome of *L. brevis* JYX2 was composed of a circular closed DNA and a circular plasmid, with a genome length of 2 567 154 bp and a GC content of 45.82%. A total of 2 485 coding genes, 65 tRNA genes, 15 rRNA genes, and 27 sRNAs were predicted. Furthermore, 1 926, 1 762, 1 823, 73, 180, 217 functional genes were annotated in COG, GO, KEGG, CAZY, CARD and VFDB databases, respectively. Further analysis revealed that no nitrite reductase gene was detected in the genome of *L. brevis* JYX2, suggesting that its nitrite degradation may rely on other enzymes or mechanisms. Additionally, predictive analyses of virulence and resistance genes further confirmed the safety of the *L. brevis* JYX2 strain. In conclusion, *L. brevis* JYX2 exhibits both functional efficacy and safety, making it a suitable candidate as a fermentation agent for nitrite reduction in fermented foods.

**Keywords** *Levilactobacillus brevis*; whole genome sequencing; sodium nitrite; gene function annotation; sauerkraut