罗希彦, 凌新, 王琪萌, 等. 基于全基因组分析和表型实证的唾液乳杆菌 S54 菌株的益生特性研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(13): 193−203. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070328

LUO Xiyan, LING Xin, WANG Qimeng, et al. Probiotic Characteristics of *Lactobacillus salivarius* S54 Strain Based on Genome-wide Analysis and Phenotypic Demonstration[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(13): 193−203. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070328

· 生物工程 ·

基于全基因组分析和表型实证的唾液乳杆菌 S54 菌株的益生特性研究

罗希彦[1,2], 凌　新[1,2], 王琪萌[1,2], 钟欣珂[1,2], 郭丽琼[1,2], 邹　苑[1,2], 叶志伟[1,2], 郑倩望[1,2,*], 林俊芳[1,2,*]

（1.华南农业大学食品学院, 广东广州 510640;
2.广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510640）

摘　要: 目的：本研究旨在对从水牛奶中筛选出的，具有益生潜力的唾液乳杆菌 S54 进行研究，通过全基因组测序和表型实证系统评估其安全性、耐受性及益生特性，为开发新型益生菌产品提供理论依据。方法：采用三代测序技术完成该菌株的全基因组测序，利用 CARD 和 VFDB 数据库筛查抗生素耐药基因与毒力因子基因，以评估其安全性；通过基因组挖掘工具预测其次生代谢产物合成基因簇；结合 KEGG 等数据库进行功能注释与耐受性基因分析；通过体外实验（包括胃肠液耐受性、体外抑菌能力、抗氧化能力和益生元增殖实验等）验证其益生特性。结果：该菌株基因组包含一条 1980939 bp 的环状染色体，GC 含量为 33.04%，并预测存在一个大小为 168151 bp 的质粒；未检出已知致病性毒力因子和耐药基因；发现一个编码抗菌和抗氧化活性次生代谢产物的基因簇；通过实验证实其具有良好的体外抑菌和抗氧化能力，功能注释显示其携带多种耐受性相关基因，体外实验进一步证实该菌株对高温和胃肠液有着较好的耐受能力及利用常见益生元的生长特性。结论：该唾液乳杆菌株具有优良的益生特性和安全性，可作为开发益生菌制剂或发酵乳制品的优良候选菌株，显示出较高的应用开发潜力。

关键词: 菌种筛选, 唾液乳杆菌, 全基因组测序, 基因功能注释, 益生特性

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)13−0193−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070328

本文网刊:

Probiotic Characteristics of *Lactobacillus salivarius* S54 Strain Based on Genome-wide Analysis and Phenotypic Demonstration

LUO Xiyan[1,2], LING Xin[1,2], WANG Qimeng[1,2], ZHONG Xinke[1,2], GUO Liqiong[1,2], ZOU Yuan[1,2], YE Zhiwei[1,2], ZHENG Qianwang[1,2,*], LIN Junfang[1,2,*]

（1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;
2.Research Center for Micro-ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China）

Abstract: Objective: This study aimed to investigate *Lactobacillus salivarius* S54, a strain isolated from buffalo milk with potential probiotic properties, through whole-genome sequencing and phenotypic validation to systematically evaluate its safety, tolerance, and probiotic characteristics, thereby providing a theoretical basis for developing novel probiotic products. Methods: The complete genome of the strain was sequenced using third-generation sequencing technology. Antibiotic resistance genes and virulence factor genes were screened using the CARD and VFDB databases to assess its safety. Secondary metabolite biosynthesis gene clusters were predicted via genome mining tools. Functional annotation and tolerance-related gene analysis were performed using databases such as KEGG. *In vitro* experiments, including gastrointestinal fluid toler-

收稿日期: 2025−07−28

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目（2022B0202050002）; 国家自然科学基金项目（32272785）。

作者简介: 罗希彦（2001−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1030843936@qq.com。

*** 通信作者:** 郑倩望（1988−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: zhqianw@scau.edu.cn。

林俊芳（1962−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品精准营养与健康, E-mail: linjf@scau.edu.cn。

ance, antibacterial activity, antioxidant capacity, and prebiotic utilization assays, were conducted to validate its probiotic properties. Results: The genome of *Lactobacillus salivarius* S54 consisted of a circular chromosome of 1980939 bp with a GC content of 33.04%, and a predicted plasmid of 168151 bp. No known pathogenic virulence factors or antibiotic resistance genes were detected. A gene cluster encoding antimicrobial and antioxidative secondary metabolites was identified. Functional annotation revealed multiple genes associated with tolerance, and *in vitro* experiments confirmed its strong antibacterial and antioxidant activities. The strain exhibited high tolerance to high temperatures and gastrointestinal fluids, as well as the ability to utilize common prebiotics for growth. Conclusion: *Lactobacillus salivarius* S54 demonstrates favorable probiotic properties and a high safety profile, making it a promising candidate for the development of probiotic formulations or fermented dairy products, with significant potential for future applications.

Key words: strain screening; *Lactobacillus salivarius*; whole genome sequencing; gene function annotation; probiotic properties

国际益生菌和益生元科学协会把益生菌定义为: 活的微生物, 当摄入足够量时, 它们会给宿主带来健康益处[1]。随着对益生菌功效的研究不断深入和相关知识的普及, 这类菌在改善人体健康方面展现出的巨大应用潜力正日益受到各界的关注[2−4]。各类益生菌制剂、益生菌发酵食品以及含有益生菌的传统食品层出不穷, 深受消费者青睐。然而我国关于益生菌的基础研究和产业建设起步较晚, 在益生菌制剂和益生菌食品生产过程中, 普遍缺乏具有自主知识产权的优质菌种, 许多核心菌种如乳双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等[5] 依赖进口, 导致我国每年都要向欧美国家支付高额的技术转让费用, 限制了我国益生菌产品的国际竞争力。

乳和乳制品在我国有着上千年的食用历史, 大量研究表明, 发酵乳制品和鲜乳中含有丰富的益生菌资源[6−7]。不同地区由于地理位置、气候条件和乳用动物的不同, 乳制品中含有的微生物也呈现高度多样性且具有地域特色: 蔡宏宇等[8] 对新疆哈萨克地区的鲜马奶和酸马奶的乳酸菌多样性进行分析, 结果发现鲜马奶以瑞士乳杆菌、乳酸乳球菌和嗜热链球菌为主, 酸马奶以马乳酒样乳杆菌和瑞士乳杆菌为主, 而 Zheng 等[9] 从西藏传统牦牛酸奶中筛选出一株植物乳杆菌, 该菌能产生多种抑菌素且具有良好抗菌效果。除此以外, 相较于其他来源(如肠道/粪便), 乳及乳制品分离的益生菌因长期食品应用历史与低宿主适应性, 其基因组毒力因子缺失率显著更高, 且低于食品级菌株安全阈值[10−12]。唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)为革兰氏阳性菌, 主要存在于动物口腔与肠道, 产乳酸且无过氧化氢酶, 2010 年被我国卫生部列为能够应用于食品生产加工的菌种[13], 广泛应用于食品发酵[14−15]、临床治疗[16−17] 及畜禽养殖等[18]。

全基因组分析(Whole Genome Analysis, WGA)是指对生物体的全部 DNA 序列进行测序、注释和功能分析的技术, 其核心在于全面解读基因组的结构、功能及变异, 广泛应用于医学、农业、微生物学等领域[19−21]。在益生菌菌种资源发掘过程中, 全基因组分析可系统识别益生特性相关基因, 为功能评估提供分子依据; 其结果能直接指导后续的功能验证实验。另外拥有菌株完整的全基因组数据, 对于益生菌菌株满足欧美严格的安全标准, 具备基础的国际竞争力至关重要[22], 为菌株的身份确认和安全性提供了权威的分子水平证明, 以满足合规性要求。因此, 全基因组分析已成为益生菌筛选与产业化的标准前置步骤。

本文首次从广东顺德水牛奶中分离得到一株唾液乳杆菌 S54, 对该菌株进行全基因组测序分析, 基于该基因组信息, 结合基因本体论(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、抗生素耐药性数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)和致病毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB)注释其基因组信息, 并结合耐胃肠液等表型实验, 对该菌株的安全性和益生特性进行评估。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

唾液乳杆菌 S54　分离自顺德水牛奶, 保存于华南农业大学食品学院; 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠出血大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli*)　保存于华南农业大学食品学院; 胃蛋白酶(蛋白酶活力为 3000 U/g)　上海源叶生物科技有限公司; 牛胆盐　北京索莱宝科技有限公司; 无水葡萄糖、磷酸氢二钾、七水硫酸镁、乙酸钠、硫酸锰、柠檬酸氢二铵、吐温 80　广州化学试剂厂; 牛肉膏、酵母粉、蛋白胨　英国 Oxoid 公司; 2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)　上海麦克林生化科技股份有限公司; DNA 提取试剂盒　生工生物工程(上海)股份有限公司; SQK-LSK109 连接试剂盒　北京康润诚业生物科技有限公司。

SW-CJ-1F 超净工作台　江苏苏州安泰空气技术有限公司; DSY-B-4 电热恒温水浴锅　浙江余姚工业仪器二厂; YXQ5 高压蒸汽灭菌锅　江阴滨江医疗设备有限公司; 5804R 高速冷冻离心机　德国 Eppendorf 公司; LRH-70 生化培养箱　上海一恒科学仪器有限公司; Gel DocTM×R+凝胶快速成像系统　美国 BIO-RAD 公司; Bioscreen C 全自动生长曲线分析仪　芬兰 Oy Growthcurves Ab Ltd 公司; U410

超低温冰箱　德国 Eppendorf 公司；JSM-7610FPlus 场发射扫描电镜　日本 Jeol 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌株与生长条件　唾液乳杆菌 S54 由华南农业大学食品健康与组学实验室从广东顺德水牛奶中分离筛选得到。培养基为液体 MRS，培养条件为 37 ℃ 静置培养 12 h，在进行实验前，需要将菌株在上述条件下活化 2 代后使用。

1.2.2　唾液乳杆菌 S54 的形态特征观察　将保存于 25% 甘油管中的唾液乳杆菌 S54 通过平板划线于 MRS 平板上，于 37 ℃ 的恒温培养箱下培养 48 h 后观察其形态，随后挑取单菌落于 MRS 液体培养基中，于 37 ℃ 下培养 12 h 后，取菌悬液进行革兰氏染色实验。再将剩余的菌悬液在 4000 r/min 条件下离心 5 min，收集菌体后进行扫描电镜观察。

1.2.3　菌株总 DNA 提取与全基因组的测序　将活化后的唾液乳杆菌 S54 菌液在 4 ℃、5000 r/min 条件下离心 10 min 收集菌体，使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。利用 Nanodrop、Qubit、0.35% 琼脂糖凝胶电泳对提取的基因组 DNA 进行浓度、纯度和完整性质检，利用 SQK-LSK109 连接试剂盒进行文库构建。通过 Illumina NovaSeq 6000 和 Nanopore PromethION48 测序平台对唾液乳杆菌 S54 进行全基因组测序。

1.2.4　基因组组装与注释　对测序后的原始数据进行转换和过滤后，使用 Canu v1.5 软件对过滤后 reads 进行组装，通过 Racon v3.4.3 软件利用三代 reads 对组装结果进行矫正，然后通过 Circlator v1.5.5 软件进行环化和调整起始位点，最后采用 Pilon v1.22 软件利用二代数据进一步进行纠错，得到准确度更高的基因组后进行后续分析。使用软件 Prodigal v2.6.3[23] 与 RepeatMasker v4.0.5[24] 进行基因预测。使用 Rfam 数据库（https://rfam.org/）和 tRNAscan-SE v2.0（https://toolkit.engineering.ucsc.edu/website-support/maintenance/）[25] 对 rRNA 与 tRNA 进行预测。基于 VFDB 数据库（Virulence Factor Database：https://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm）与 CARD 数据库（Comprehensive Antibiotic Research Database：https://card.mcmaster.ca/）注释毒力因子和抗性基因，用于进行安全性评价。一般功能注释则使用 GO 数据库（Gene Onotology Consortium：https://geneontology.org/）、KEGG 数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome：https://www.kegg.jp）和 eggNOG 数据库（http://eggnog6.embl.de/）。

1.2.5　基因组圈图的绘制　利用组装和预测得到的基因组信息，如 tRNA、rRNA、重复序列、GC 含量以及基因功能信息等，应用软件 Circos v0.66[26] 绘制基因组圈图，Circos 可视化基因组，清晰地展示基因组组分间的在基因组上的位置关系。

1.2.6　抑菌物质预测分析　应用软件 antiSMASH v5.0.0[27] 对菌株全唾液乳杆菌 S54 基因组中抑菌物质合成基因簇进行挖掘。

1.2.7　基因信息挖掘与预测　通过对 eggNOG、KEGG 等数据库的注释结果进行直接搜索以及查阅相关文献[21,28]，从中收集已知的、与耐受性有关的基因，与 eggNOG、KEGG 等数据库的注释结果进行比对，对菌株全基因组中与耐受性相关的基因进行挖掘。

1.2.8　生长曲线的测定　将活化后的唾液乳杆菌 S54 以 3% 的接种量接入装有 MRS 液体培养基的 100 孔板中，使用全自动生长曲线测定仪，每隔 2 h 测定菌液吸光值。以时间（h）为横坐标，吸光值（OD_{600}）为纵坐标，绘制益生菌生长曲线。

1.2.9　胃液耐受性评价　胃液的耐受性评价参照 Ye 等[29] 的方法并改进，将配制好的含胃蛋白酶 2 mg/mL 的 0.85% 生理盐水，使用 0.1 mol/mL 的盐酸溶液调节至 pH 分别为 2、3、4。随后使用 0.22 μm 滤膜过滤，制备成人体在不同情况下的模拟胃液。分别按照菌液∶模拟胃液=1∶4 进行混合，混匀后将混合液在 37 ℃ 下孵育 3 h，并在 0、1、2、3 h 测定活菌数，活菌数的测定参照 GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检测 乳酸菌检测》。按照以下公式计算存活率：

$$存活率(\%) = \frac{N}{N_0} \times 100$$

式中：N 是特定时期的活菌数（CFU/mL），N_0 是实验开始时的活菌数（CFU/mL）。

1.2.10　肠液的耐受性评价　向 pH 为 7 的生理盐水中加入胆盐，使溶液中胆盐的浓度分别为 0.05%、0.075%、0.1%，随后使用 0.22 μm 滤膜过滤。分别按照菌液∶模拟肠液=1∶4 进行混合，将混合液在 37 ℃ 下孵育 3 h，并在 0、1、2、3 h 测定活菌数，活菌数的测定方法与存活率计算公式与 1.2.9 相同。

1.2.11　耐热性评价　对活化后的唾液乳杆菌 S54 菌液进行活菌数测定，随后分别置于 45、50、55 ℃ 的水浴锅中静置 20 min，再进行活菌数的测定，按照以下公式计算存活率：

$$存活率(\%) = \frac{X}{X_0} \times 100$$

式中：X 是热处理结束后的活菌数（CFU/mL），X_0 是未经过热处理时的活菌数（CFU/mL）。

1.2.12　不同益生元对唾液乳杆菌 S54 的增殖作用研究　采用低聚果糖、低聚半乳糖、低聚异麦芽糖、水苏糖、抗性糊精、菊粉、燕麦 β-葡聚糖等益生元作为替代碳源，分别代替 MRS 培养基中的葡萄糖成分，配制成含不同益生元的培养基，以含葡萄糖（20 g/L）的常规 MRS 培养基作为阳性对照，碳源缺失的 MRS 培养基作为空白对照。将唾液乳杆菌

S54 按照 3% 接种量接种到上述培养基中，使用全自动生长曲线分析仪测定其在 24 h 内的生长曲线，以时间为横坐标，吸光值（OD_{600}）为纵坐标，绘制生长曲线。

1.2.13 细胞疏水能力的测定 依据 Jiang 等[30] 描述的方法，并进行一定的修改：将在 MRS 液体培养基中活化后的唾液乳杆菌 S54，在 6000 r/min 的条件下离心 10 min，使用 1×PBS（pH7.0）溶液洗涤两次，随后重悬至 OD_{600}=0.6，记为 Ab_i，随后按照菌液∶有机溶剂（二甲苯、氯仿、乙酸乙酯）=3∶1 的比例进行混合，在 37 ℃ 下静置 1 h，分别测定水相的 OD_{600}，记为 Ab_w，按照以下公式计算疏水能力：

$$疏水能力(\%) = \frac{Ab_i - Ab_w}{Ab_i} \times 100$$

1.2.14 细胞自聚集能力的测定 依据 Jiang 等[30] 描述的方法，并进行一定的修改：将活化后的菌液在 6000 r/min 的条件下离心 10 min，使用 1×PBS（pH7.0）溶液洗涤两次，随后重悬至 OD_{600}=0.6，记为 Ab_0，随后将菌液在 37 ℃ 条件下静置 24 h，分别在 8、12 和 24 h 测定上清液的 OD_{600}，记为 Ab_t，按照以下公式计算自聚集能力：

$$自聚集能力(\%) = \frac{Ab_0 - Ab_t}{Ab_0} \times 100$$

1.2.15 体外抑菌实验 将活化后的唾液乳杆菌 S54 在 6000 r/min 的条件下离心 10 min 收集上清液，随后使用 0.22 μm 滤膜过滤，制备成完全无菌的上清液。所用的 5 种病原菌菌液统一制成 OD_{600}=0.3，各取 0.4 mL 菌液与 40 mL 的 LB 培养基混合，倒于培养皿中。待凝固后用牛津杯打孔，向孔中加入 0.2 mL 无菌上清液，以 MRS 培养基为空白对照，在 37 ℃ 下培养 12 h，观察是否有抑菌圈形成，并用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.16 抗氧化能力 将活化后的唾液乳杆菌 S54 菌液于 6000 r/min 离心 10 mim，收集上清液经 0.22 μm 滤器过滤，制成无细胞发酵上清液（CFS）。参考文献 [31−32] 的方法测定 DPPH 自由基、$ABTS^+$ 自由基清除率；参考顾品品等[33] 的方法测定羟自由基清除率，其中，以 0.5 mg/mL 抗坏血酸作为阳性对照。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次，结果以平均值±标准偏差表示。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行显著性检验和方差分析，不同小写字母表示具有统计学差异（P<0.05），用 Origin 2024 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 唾液乳杆菌 S54 的形态特征

唾液乳杆菌 S54 单菌落颜色为乳白色、表面光滑不透明、小而凸起或大而扁平（图 1A），革兰氏染色结果为阳性菌（图 1B）。在扫描电镜下以 5000× 放大倍率观察，菌体呈现短杆状，以成对或单个的形式存在，无鞭毛存在（图 1C）。

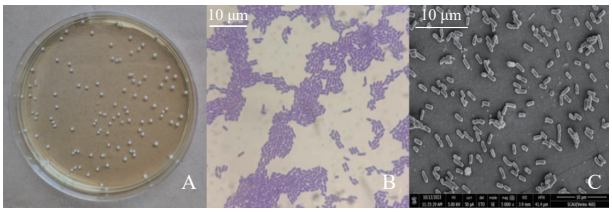


图 1 唾液乳杆菌 S54 的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of *Lactobacillus salivarius* S54

注：A 菌落特征；B 革兰氏染色结果；C 扫描电镜下菌体形态。

2.2 唾液乳杆菌 S54 基因组特征

唾液乳杆菌 S54 基因组序列由一条 1980939 bp 的环状染色体组成，GC 含量为 33.04%，预测到一个质粒的存在，大小为 168151 bp。基因组的重复序列总长度为 7670 bp，重复序列占基因组中的含量为 0.39%，共有 1901 个编码基因，编码基因总长度为 1739778 bp，平均长度为 915 bp。预测到的 tRNA 数量为 78 个，组成 rRNA 的 5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 分别有 7、7、8 个，共 22 个（表 1）。

表 1 唾液乳杆菌 S54 的基因组特征

Table 1 Genomic characteristics of *Lactobacillus salivarius* S54

特性	数量
基因组大小	1980939 bp
GC含量	33.04%
质粒数量	1
质粒大小	168151 bp
重复序列	7670 bp
重复序列占比	0.39%
编码基因数量	1901
编码基因总长度	1739778 bp
编码基因平均长度	915 bp
tRNA数量	78
rRNA数量	22

2.3 唾液乳杆菌 S54 的一般功能注释

对唾液乳杆菌 S54 的全基因组使用 GO 数据库、KEGG 数据库和 eggNOG 数据库进行一般功能注释。

2.3.1 GO 数据库注释 GO 数据库[34] 主要基于细胞组分、分子功能、生物过程这三大类对基因组进行注释，细胞组分（Cellular Component）用于描述亚细胞结构、位置和大分子复合物；分子功能（Molecular Function）用于描述基因、基因产物个体的功能；生物过程（Biological Process）用来描述基因编码的产物所参与的生物过程。

唾液乳杆菌 S54 在 GO 数据库中共注释到了 1536 个基因，结果如图 2 所示。注释到与细胞组分有关的基因有 818 个，与分子功能有关的基因有 1264 个，与生物过程有关的基因有 1137 个。在细胞

组分中，注释到最多的组分是膜（Membrane）、细胞（Cell）、细胞组分（Cell Part），分别注释到了 475、466、455 个。在分子功能中，注释到最多的是催化活性（Catalytic Activity）和结合（Binding），分别注释到 923 个和 716 个。而在生化过程中，注释到最多的是代谢过程（Metabolic Process）、细胞过程（Cellular Process），分别注释到 801 个和 686 个。

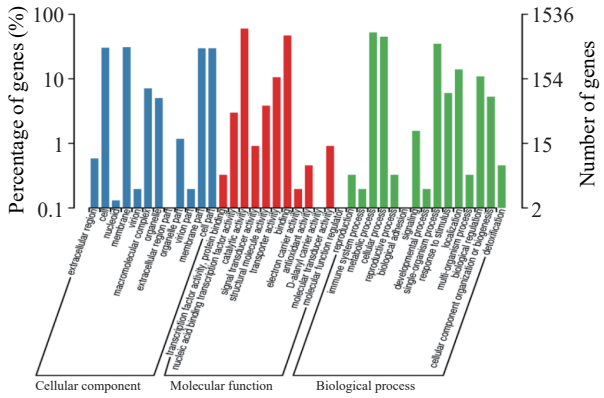


图 2　GO 功能注释分类统计图

Fig.2　GO functional annotation classification statistical chart

2.3.2　KEGG 数据库注释　KEGG 是收集基因组、生物通路、疾病、药物和化学物质的数据库[35]。主要基于环境信息处理（Environmental Information Processing）、新陈代谢（Metabolism）、人类疾病（Human Diseases）、遗传信息处理（Genetic Information Processing）、有机体系统（Organismal Systems）、细胞过程（Cellular Processes）六大类对基因组进行注释。

唾液乳杆菌 S54 在 KEGG 数据库中注释到 1071 个功能基因，结果如图 3 所示。在 6 大类中，注释到最多的是新陈代谢，共注释到了 37 种代谢类型，其中氨基酸的生物合成相关基因注释到 65 个，碳代谢相关基因注释到 55 个。在环境信息处理方面，ABC 转运蛋白和双组分系统注释到的基因数量最多，分别为 45 个和 29 个。ABC 转运蛋白能够转

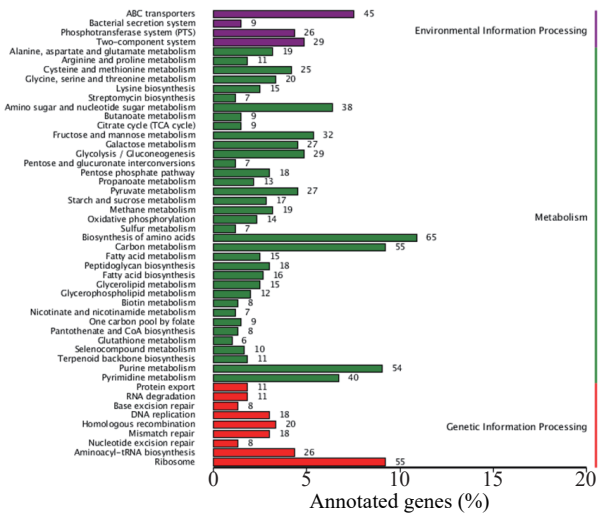


图 3　KEGG 注释分类统计图

Fig.3　KEGG annotation classification statistical chart

运多种物质，包括离子、氨基酸、糖类、脂肪酸等，而双组分系统则由组氨酸激酶（Histidine Kinase, HK）和反应调节蛋白（Response Regulator, RR）组成，帮助细菌感知并响应环境变化（如 pH、渗透压、营养、抗生素等）。在遗传信息处理方面，共注释到 9 种功能，注释到最多的是与核糖体相关的基因，共 55 个。

2.3.3　eggNOG 功能注释　eggNOG 数据库[36] 常是在 COG 数据库的基础上的持续更新，用来对新测序基因组的基因进行分类和注释。注释时通过将基因的蛋白序列和 eggNOG 数据库进行 BLAST 比对，找到 eggNOG 数据库中最相似的序列，该序列对应的注释信息和分类信息即为对应测序基因组基因的注释信息和分类信息。

唾液乳杆菌 S54 的注释结果如图 4 所示，从中可以看出注释到最多的基因为未知功能的基因（Function Unknown），共注释到 311 个。其次是复制、重组和修复（Replication, Recombination and Repair）、翻译，核糖体结构和生物合成（Translation, Ribosomal Structure and Biogenesis）、碳水化合物运输和代谢（Carbohydrate Transport and Metabolism）和仅限通用功能预测（General Function Prediction Only）和氨基酸转运与代谢（Amino Acid Transport and Metabolism），分别注释到 155、144、143、139 和 133 个。充分说明了唾液乳杆菌 S54 具有较强的碳水化合物和氨基酸利用能力，能够利用多种碳源和氮源，进而能够适应各种复杂的环境，在发酵工业、益生菌产品开发中具有重要应用潜力。

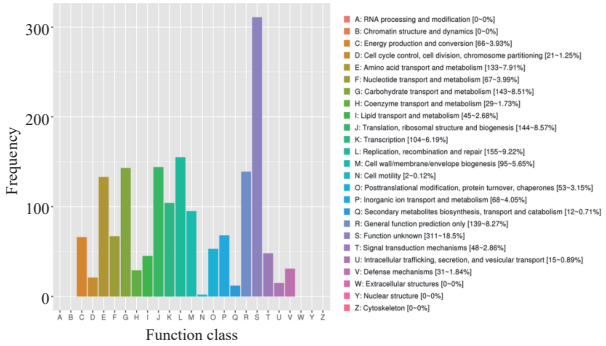


图 4　eggNOG 功能基因功能分类统计图

Fig.4　Statistical chart of functional classification of eggNOG functional genes

2.4　唾液乳杆菌 S54 的特殊功能注释

2.4.1　CARD 数据库注释　CARD[37]（Comprehensive Antibiotic Research Database）是一个持续更新的抗生素耐药性数据库，涵盖抗性基因、相关蛋白及耐药机制等信息。在唾液乳杆菌 S54 染色体上，未找到任何的抗生素抗性基因。由于不含抗生素抗性基因，唾液乳杆菌 S54 不会将抗性基因传递给其他微生物，降低了抗性基因扩散的风险，避免了因抗性基因传播而导致的抗生素耐药性问题，有助于维护抗生素的有效性。而从鸡肠黏膜中筛选得到的唾液乳

杆菌 CGMCC20700 则被预测出 10 个与抗生素耐药相关的基因，其中有 3 个相似度超过 90%[30]。这可能是由于鸡饲料往往带有抗生素成分，致使唾液乳杆菌为了存活产生了耐药性基因的漂移，这个结果表明水牛奶源唾液乳杆菌更具安全性优势，同时凸显了评估益生菌菌株来源对其安全性的重要性。

2.4.2 VFDB 数据库注释 VFDB[38]（virulence factor database）是收集了已经充分描述的细菌致病菌的绝大多数的致病因子，这些致病因子帮助致病菌建立对宿主的感染、应对宿主的免疫系统在宿主中存活并引起宿主的疾病。对唾液乳杆菌 S54 进行 VFDB 数据库的注释，共注释到 267 个可能属于毒力因子的基因，功能注释结果的可信值合理的前提下，不存在结果高度相似的毒力因子基因，与 VFDB 中毒力因子的相似度低于 60% 的基因，占所有可能存在的毒力因子总数的 97.00%，且不存在相似度>80% 且覆盖率>60% 的基因，无需进行进一步的验证，可认为该菌株无毒[39]。

2.5 基因组图谱

利用组装和预测得到的基因组信息，如 tRNA、rRNA、重复序列、GC 含量以及基因功能信息等，应用 Circos v0.66 软件绘制基因组圈图，基因组图谱如图 5 所示。

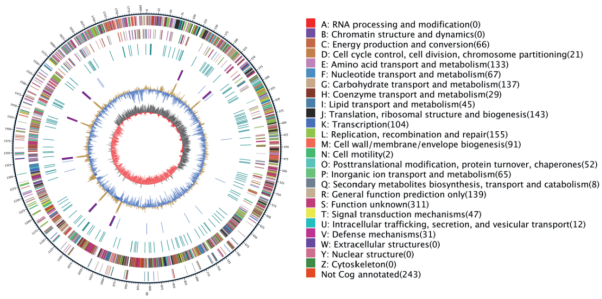


图 5 唾液乳杆菌 S54 基因组图谱

Fig.5 Genome atlas of *Lactobacillus salivarius* S54

最外面一圈为基因组大小的标示，每个刻度为 5 kb；第二圈和第三圈分别为基因组正链和负链上的基因，不同颜色代表不同的 COG 功能分类；第四圈为重复序列；第五圈为 tRNA 和 rRNA，蓝色为 tRNA，紫色是 rRNA；第六圈为 GC 含量，浅黄色部分表示该区域 GC 含量高于基因组的平均 GC 含量，峰值越高则与平均 GC 含量差异越大，蓝色部分则表示该区域 GC 含量低于基因组的平均 GC 含量；最内圈是 GC-skew，深灰色代表 G 含量大于 C 的区域，红色代表 C 含量大于 G 的区域。

2.6 抑菌物质预测分析

细菌产生的次生代谢产物是抗菌剂和其他生物活性化合物的重要来源，如抗生素、降低胆固醇的药物或抗肿瘤药物的化学物质等。利用 antiSMASH 能够准确识别编码所有已知广泛化学类别的次级代谢产物的基因簇，经测定唾液乳杆菌 S54 基因组中存在一个 T3PKS（查尔酮型聚酮合酶）基因簇，长度为 41164 bp，如图 6 所示。该基因簇广泛存在于植物、真菌与部分细菌中，能够产生具有抗菌、抗氧化和免疫调节等功能的次生产物。

2.7 耐受性相关基因的挖掘与预测

人体的胃肠道环境中，胃液酸度较高，且存在胆盐与各种酶等一系列能够威胁益生菌正常生理功能的因素。此外，益生菌在生产、储存和运输过程中也可能受到高温的影响，因此，益生菌需要具有耐热、耐酸、耐胆盐的能力才能在胃肠内生存和发挥作用。

通过直接对 KEGG、eggNOG 等注释结果进行搜索以及查阅文献和数据库，找到已知的益生特性相关基因，再与 eggNOG、KEGG 等数据库的注释结果进行比对，挖掘和预测到的耐受性相关基因如表 2 所示：唾液乳杆菌 S54 存在多种热激蛋白和分子伴侣，如 GroES、DnaK、CIpL 等，也存在逆转运蛋白和胆酰甘氨酸水解酶。这些基因的存在能够帮助益生菌适应和应对各种环境压力，从而保持益生菌的生存和活性。

2.8 生长曲线的测定

乳酸菌的生长一般要经历四个时期，即延滞期、对数期、稳定期和衰亡期。由图 7 可知，唾液乳杆菌 S54 无明显的延滞期，培养初期就能到达对数生长期。在 0~8 h 处于对数生长期，这个时期的菌体活力最强、生长繁殖迅速。8 h 后为稳定期，这个时期的菌体会产生大量的次级代谢产物，同时，稳定期的菌体对酸和高温等恶劣条件的抵抗力最强。在与大多数乳酸菌相比[40−41]，唾液乳杆菌到达稳定期所需要的时间更少，仅需要 8 h，在实际应用中能够大幅节省发酵所需的时间。

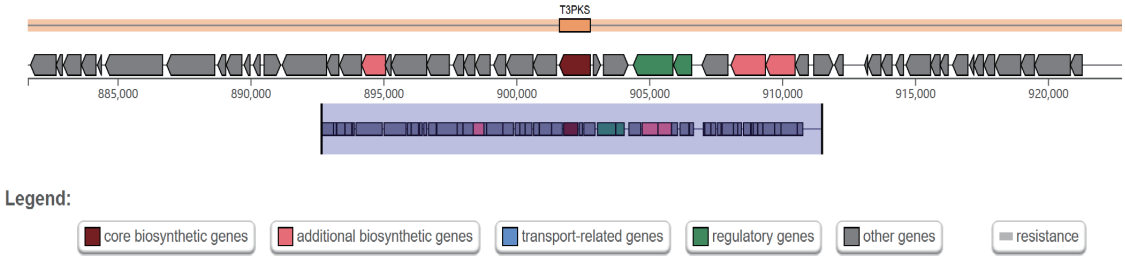


图 6 唾液乳杆菌 S54 的基因簇

Fig.6 Gene cluster of *Lactobacillus salivarius* S54

表 2　部分耐受性相关基因预测

Table 2　Prediction of partial tolerance related genes

gene ID	基因/酶	功能
GE000135	分子伴侣Hsp33	耐热性
GE000296	伴侣蛋白GroES	耐热性
GE000297	伴侣蛋白GroEL	耐热性
GE000836	分子伴侣DnaJ	耐热性
GE000837	分子伴侣DnaK	耐热性
GE000838	分子伴侣GrpE	耐热性
GE000109	H^+逆向转运蛋白-2	耐酸性
GE000552	Na^+:H^+逆向转运蛋白	耐酸性
GE000624	Na^+:H^+逆向转运蛋白	耐酸性
GE000894	胆酰甘氨酸水解酶	耐胆盐
GE001824	胆酰甘氨酸水解酶	耐胆盐

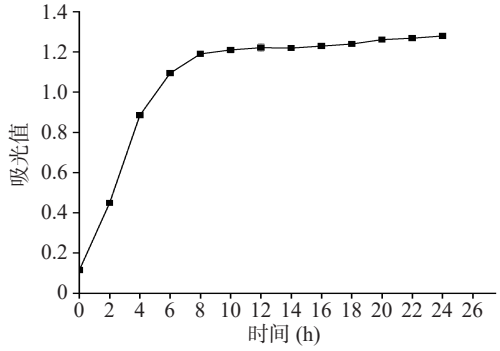


图 7　唾液乳杆菌 S54 生长曲线

Fig.7　Growth curve of *Lactobacillus salivarius* S54

2.9　耐胃液能力评价

胃酸的 pH 在进食前后会发生较大的变化，其范围一般在 2~4 之间波动，耐胃酸的益生菌能够在强酸性环境中存活下来，并且抵抗胃蛋白酶的分解，确保足够数量的活菌到达肠道，进而发挥其应有的作用。将培养至稳定期前期的唾液乳杆菌 S54 菌液，与含有 2 mg/mL 胃蛋白酶的 pH 分别为 2、3、4 的模拟胃液混合。在 37 ℃ 下反应 2 h 后，结果如图 8 所示，在 pH2 的模拟胃液中，存活率在 1~3 h 内分别为：73.82%、48.45% 和 42.33%；在 pH3 的模拟胃液中，为 75.84%、63.23%、50.55%；在 pH4 时，存活率则为：83.85%、75.60%、63.44%。在相同的条件下，

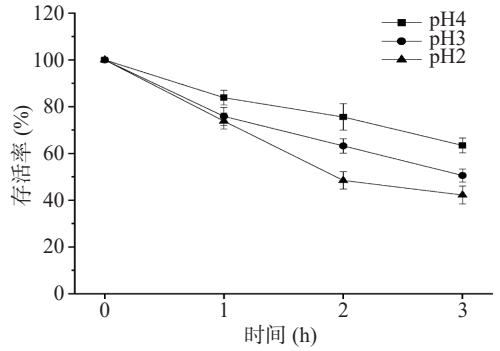


图 8　唾液乳杆菌 S54 耐胃液能力

Fig.8　Gastric juice tolerance ability of *Lactobacillus salivarius* S54

戊糖乳杆菌 ZFM94 在 pH2 的模拟胃液中反应 2 h 后的存活率只有 30.59%，而约氏乳杆菌 CNCM I-4884 的存活率则低于 25%[22,29]。唾液乳杆菌 S54 较强的耐胃液能力可能得益于在基因组中存在的与 H^+逆向转运蛋白-2 和 Na^+:H^+逆向转运蛋白相关的基因，通过排出细胞内的多余氢离子(H^+)来维持细胞内部的中性环境。

2.10　耐肠液能力评价

人体肠道内的胆盐浓度一般在 0.03%~0.3% 之间，益生菌要想在人体内发挥功效，必须要在小肠的胆盐环境中存活下来。由图 9 可知，经胆盐浓度为 0.1% 的模拟肠液处理 3 h 后，唾液乳杆菌的存活率为 16.29%，而在相对较低的 0.05% 和 0.75% 的两种胆盐溶液中，3 h 后其存活率分别为 68.69% 和 46.71%，说明其具有一定的耐胆盐性，但对高浓度的胆盐较为敏感，后续可以通过复合壁材包埋技术或定向驯化的方法来提高其在高浓度胆盐中的存活率。

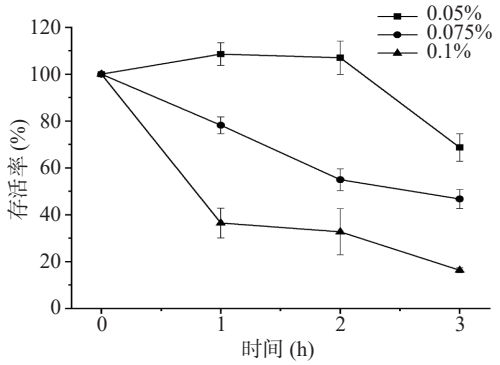


图 9　唾液乳杆菌 S54 耐肠液能力

Fig.9　Intestinal fluid resistance ability of *Lactobacillus salivarius* S54

2.11　耐热性试验

益生菌在加工、运输和储存的过程中都会受到高温的影响，对益生菌进行耐热测定可以更好地了解益生菌耐高温能力，从而更好地指导生产实践。由表 3 可知唾液乳杆菌 S54 有良好的耐热性，不但在 45 ℃ 的条件下仍然能够正常生长发育，而且经 50 ℃ 加热 20 min 其存活率依然保持在 75% 以上，结果之间均存在显著性差异。本实验结果表明，唾液乳杆菌 S54 具有优异的耐热特性，这与 Liu 等[39] 关于植物乳杆菌 cpf-43 的研究结果一致，该特性在对比中尤为显著：在 50 ℃ 水浴 20 min 的相同处理条件下，

表 3　唾液乳杆菌 S54 的耐热能力

Table 3　Thermostability of *Lactobacillus salivarius* S54

热处理前活菌数(CFU/mL)	温度(℃)	热处理后活菌数(CFU/mL)	存活率(%)
$2.97\pm0.64\times10^9$	45	$3.9\pm0.26\times10^9$	131.46 ± 8.92^a
$2.97\pm0.64\times10^9$	50	$2.33\pm0.21\times10^9$	78.65 ± 7.02^b
$2.97\pm0.64\times10^9$	55	$2.4\pm0.26\times10^7$	0.81 ± 0.00^c

注：同列不同小写字母表示具有显著性差异，$P<0.05$，表4同。

唾液乳杆菌 S54 的存活率远高于另一株鸡源唾液乳杆菌 C-1-3(其存活率近乎为 0)[42]。

2.12 益生元增殖作用的测定

将活化后的唾液乳杆菌按照 3% 的接种量接种到含不同益生元的培养基并培养 24 h,生长曲线如图 10 所示。从菌体增殖效果来看,所有添加碳源的培养基均优于空白对照。在实验组中,增殖效果由强到弱的排序为:水苏糖>低聚半乳糖>葡萄糖>菊粉>低聚异麦芽糖>β-燕麦葡聚糖>低聚果糖>抗性糊精。以水苏糖或低聚半乳糖作为碳源时,益生菌的增殖效率显著高于阳性对照组(葡萄糖),该结果与李雅丽等[43] 的研究结果一致。其原因可能是葡萄糖在培养初期(0~6 h)虽能促进菌体快速增殖,但会迅速耗尽;而水苏糖与低聚半乳糖可被缓慢利用,从而在培养中后期(6~24 h)持续支持菌体生长,最终获得更高的菌量[44]。

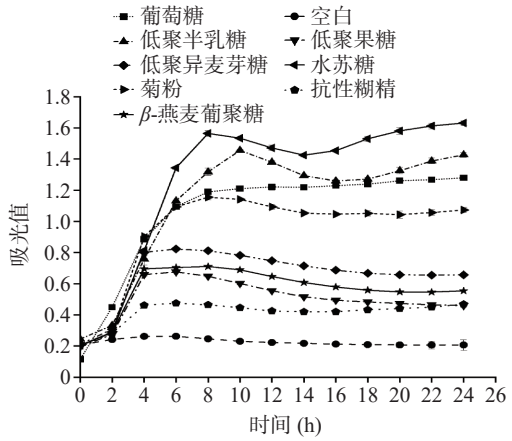


图 10 不同益生元对唾液乳杆菌 S54 的增殖作用

Fig.10 Effects of different prebiotics on the proliferation of *Lactobacillus salivarius* S54

2.13 疏水性和自聚集能力的测定

自聚集能力和疏水性通过促进生物膜的形成和增强益生菌与肠道上皮细胞或黏液层的粘附,帮助益生菌在肠道内形成稳定群落,增强定植稳定性,延长作用时间。结果如图 11 和图 12 所示,唾液乳杆菌 S54 在二甲苯和氯仿中有着较高疏水性(分别为 87.19% 和 67.11%),且自聚集能力强(在 8 h 和 24 h 时分别为 62.11% 和 75.54%),且 8 h 与 12 h 的自聚集能力无显著性差异,表明菌株细胞间的相互识别与黏附过程较为高效,能在较短时间内完成聚集。本文研究中,以二甲苯作为有机相时,其疏水性远高于文献报道中常见乳酸菌的相应范围(10%~85%)[45−46],这预示着菌株 S54 可能具有优异的黏附或定植潜能。

2.14 体外抑菌能力的测定

唾液乳杆菌 S54 对副溶血性弧菌、痢疾志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和肠出血大肠杆菌这 5 种致病菌的抑菌圈直径见表 4,结果显示本菌株对这五种病原菌的生长均有显著抑制作用,对副溶血性弧菌和痢疾志贺氏菌的抑制效果最佳,而对肠出血大肠杆菌的抑制效果相对较弱。相较于同样具备抗菌物质合成基因簇的枯草芽孢杆菌 SNBS-3[47],本菌株表现出更强的抑菌活性,其形成的抑菌圈直径显著增大 3~5 mm,而与同样含有 T3PKS 基因簇的植物乳杆菌 cqf-43 的抑菌效果类似[39],这可能得益于 T3PKS 的存在,赋予了菌株更显著的抑菌能力。

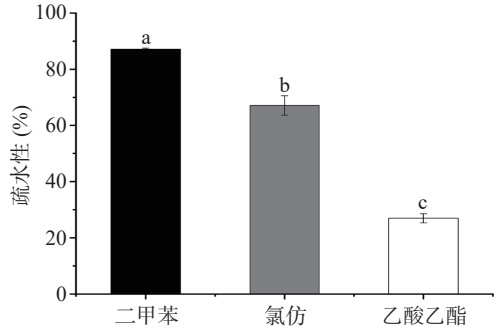


图 11 唾液乳杆菌 S54 的疏水性

Fig.11 Hydrophobicity of *Lactobacillus salivarius* S54

注:不同小写字母表示具有显著性差异,$P<0.05$,图 12 同。

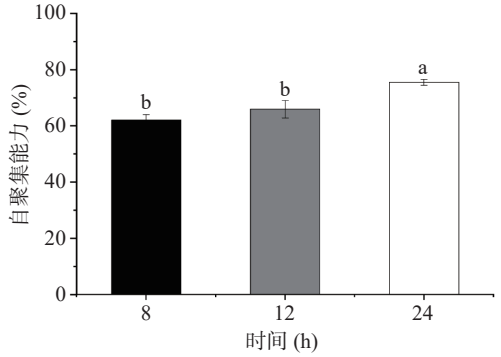


图 12 唾液乳杆菌 S54 的自聚集能力

Fig.12 Self-aggregating ability of *Lactobacillus salivarius* S54

表 4 唾液乳杆菌 S54 的体外抗菌活性

Table 4 *In vitro* antibacterial activity of *Lactobacillus salivarius* S54

致病菌	抑菌圈直径(mm)	抑菌程度	致病菌性质
副溶血性弧菌	20.60±1.13^{a}	++++	G^-
痢疾志贺氏菌	20.60±0.72^{a}	++++	G^-
鼠伤寒沙门氏菌	20.00±0.00^{ab}	++++	G^-
金黄色葡萄球菌	18.93±0.66^{b}	++++	G^+
肠出血大肠杆菌	18.87±0.53^{b}	++++	G^-

注:+:抑菌圈直径<5 mm,++:抑菌圈直径为5~10 mm,+++:抑菌圈直径为10~15 mm,++++:抑菌圈直径≥15 mm,−:无抑制作用。

2.15 抗氧化能力的测定

已有证据表明,部分益生菌可通过肠道定植发挥抗氧化作用,调控氧化还原平衡。其产生的活性代谢物能减少氧化损伤,从而延缓衰老并降低某些慢性病的发生风险[48−49]。S54 的无细胞发酵上清液(CFS)对 DPPH、$ABTS^+$和羟自由基的清除率如图 13 所示。结果表明该菌株具有优异的抗氧化能力,特别是对于羟自由基,其清除率高达 89.38%,而对 $ABTS^+$

自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 80.27% 和 62.48%，显著优于文献 [50] 报道的 16 株发酵食品源细菌菌株和文献 [51] 所报道的 40 株益生菌的 CFS 的自由基清除率，表明其抗氧化活性远超已有报道的多数同类菌株。而唾液乳杆菌 S54 的 CFS 的高自由基清除率很可能得益于在生长过程中细胞的外分泌物代谢物，如短链脂肪酸、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等[52−53]。

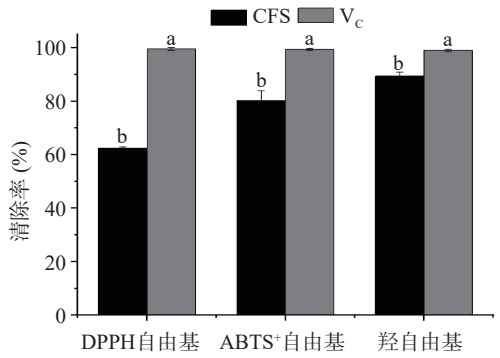


图 13　唾液乳杆菌 S54 的抗氧化能力

Fig.13　Antioxidant capacity of *Lactobacillus salivarius* S54

注：不同小写字母表示组间具有显著性差异，$P<0.05$。

3　结论

本研究首次从水牛奶中分离得到唾液乳杆菌 S54，具有优良的益生特性和工业化应用潜力。全基因组测序与表型实验证实：该菌株不仅具备丰富的碳源代谢能力、良好的胃肠液耐受、黏附定植能力和高温耐受性，还携带一个在唾液乳杆菌中较为罕见的产生抗菌、抗氧化及免疫调节活性代谢产物的稀有基因簇 T3PKS；体外抑菌和抗氧化能力突出：对多种致病菌有着显著的抑菌作用，对三种自由基的清除率均大于 60%，且不含任何已知抗生素抗性基因和不存在高度相似的毒力因子基因，安全性与其他来源的唾液乳杆菌相比更加显著。唾液乳杆菌 S54 是一株兼具安全性、功能性与应用潜力的优良候选菌株，为开发抗生素替代品、肠道健康产品及低成本工业化益生菌制剂提供新的选择。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] WANG Ting, WANG Zhe, YANG Zhipeng, et al. Effect of the fermentation broth of the mixture of *Pueraria lobata*, *Lonicera japonica*, and *Crataegus pinnatifida* by *Lactobacillus rhamnosus* 217-1 on liver health and intestinal flora in mice with alcoholic liver disease induced by liquor[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 722171.

[2] TIAN Peijun, ZOU Renying, WANG Luyao, et al. Multi-probiotics ameliorate major depressive disorder and accompanying gastrointestinal syndromes via serotonergic system regulation[J]. Journal of Advanced Research, 2023, 45: 117−125.

[3] GAO T, WANG X Y, LI Y, et al. The role of probiotics in skin health and related gut-skin axis: A review[J]. Nutrients, 2023, 15(14): 3123.

[4] IBRAHIM S A, YEBOAH P J, AYIVI R D, et al. A review and comparative perspective on health benefits of probiotic and fermented foods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2023, 58(10): 4948−4964.

[5] 酸乳菌种几乎全部依靠进口 我国亟待解除益生菌“物种危机”[J]. 乳业科学与技术, 2019, 42(3): 60-61. [Almost all yoghurt strains rely on imports, and China urgently needs to remove the "species crisis" of probiotics[J]. Dairy Science and Technology, 2019, 42(3): 60-61.]

[6] 热孜姑丽·库尔班, 张志东, 孙建, 等. 生鲜驼乳及发酵驼乳中益生乳酸菌的研究进展[J]. 食品科技, 2024, 49(1): 1−8. [RAZIGUL K, ZHANG Z D, SUN J, et al. Research progress of probiotic lacticacid bacteria in fresh and fermented camel milk[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(1): 1−8.]

[7] MOKOENA M P, MUTANDA T, OLANIRAN A O. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages[J]. Food & Nutrition Research, 2016, 60(1): 29630.

[8] 蔡宏宇, 刘文俊, 沈玲玲, 等. 基于三代测序技术分析新疆鲜马奶和酸马奶中乳酸菌菌群结构[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 291−300. [CAI Hongyu, LIU Wenjun, SHEN Lingling, et al. Analysis of the structure of lactic acid bacteria in Xinjiang fresh mare milk and koumiss using three generation sequencing technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(2): 291−300.]

[9] ZHENG Xue, LIANG Qi, ZHAO Baotang, et al. Whole genome sequencing and analysis of probiotic characteristics for *Lactiplantibacillus plantarum* EL2 isolated from yak yogurt[J]. LWT, 2024, 198: 116039.

[10] OBISESAN A O, ABIODUN O O, AYENI F A. Lactic acid bacteria isolated from women' breast milk and infants' faeces have appreciable immunogenic and probiotic potentials against diarrheagenic *E. coli* strains[J]. BMC Microbiology, 2024, 24(1): 350.

[11] SORNPLANG P, PIYADEATSOONTORN S. Probiotic isolates from unconventional sources: A review[J]. Journal of Animal Science and Technology, 2016, 58(1): 26.

[12] 王彦杰, 侯强川, 李伟程, 等. 不同分离源粪肠球菌的毒力基因比较[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2695−2707. [WANG Yanjie, HOU Qiangchuan, LI Weicheng, et al. Comparison of the virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from different environments[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2695−2707.]

[13] 李海龙, 丁小玲, 李吕木. 唾液乳杆菌的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 94−97. [LI Hailong, DING Xiaoling, LI Lümu. Advances in saliva *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius*)[J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(5): 94−97.]

[14] 吴定, 孙嘉文, 姚明兰, 等. 固定化乳酸菌发酵胡萝卜酸奶工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 296−299. [WU D, SUN J W, YAO M L, et al. Optimization of carrot yoghurt production by fermentation of immobilized *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*[J]. Food Science, 2010, 31(16): 296−299.]

[15] 殷欣, 崔凤怡, 王光强, 等. 唾液联合乳杆菌 AR809 及其胞外多糖对低脂发酵乳加工特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(21): 150−158. [YIN Xin, CUI Fengyi, WANG Guang-

qiang, et al. Effects of *Ligilactobacillus salivarius* AR809 and its exopolysaccharides on the processing characteristics of low-fat fermented milk[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(21): 150−158.]

[16] MA Nan, YANG Wei, CHEN Bairu, et al. Exploration of the primary antibiofilm substance and mechanism employed by *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 to inhibit biofilm of *Streptococcus mutans*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2025, 15: 1535539.

[17] WEI Zhen, HE Ziqi, WANG Tongyao, et al. *Lactobacillus salivarius* WZ1 inhibits the inflammatory injury of mouse jejunum caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by regulating the TLR4/NF-κB/MyD88 inflammatory pathway and gut microbiota[J]. Microorganisms, 2023, 11(3): 657.

[18] HONG Yi, ZHOU Zhou, YU Lingzi, et al. *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus agilis* feeding regulates intestinal stem cells activity by modulating crypt niche in hens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(23): 8823−8835.

[19] VENNER E, MUZNY D, SMITH J D, et al. Whole-genome sequencing as an investigational device for return of hereditary disease risk and pharmacogenomic results as part of the All of Us Research Program[J]. Genome Medicine, 2022, 14(1): 34.

[20] COLLINEAU L, BOERLIN P, CARSON C A, et al. Integrating whole-genome sequencing data into quantitative risk assessment of foodborne antimicrobial resistance: A review of opportunities and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1107.

[21] SAIDUMOHAMED B E, GANAPATHY B S. Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) gut derived *Bacillus safensis* SDG14 with enhanced probiotic competence for food and feed applications [J]. Food Research International, 2021, 150: 110475.

[22] ANNESOPHIE B, ISABELLE F, PRUNO P, et al. Genome sequence and assessment of safety and potential probiotic traits of *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4884[J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 273−273.

[23] HYATT D, CHEN G L, LoCASCIO P F, et al. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 119.

[24] TARAILO-GRAOVAC M, CHEN Nansheng. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2009, 25(1): 4.10. 1-4.10. 14.

[25] CHAN P P, LOWE T M. tRNAscan-SE: Searching for tRNA genes in genomic sequences[M]. Gene Prediction. New York, NY: Springer New York, 2019: 1-14.

[26] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL İ, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1639−1645.

[27] BLIN K, SHAW S, STEINKE K, et al. antiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W81−W87.

[28] TURPIN W, HUMBLOT C, GUYOT J P. Genetic screening of functional properties of lactic acid bacteria in a fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8722−8734.

[29] YE Kai, LI Ping, GU Qing. Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics[J]. Genomics, 2020, 112(5): 3142−3149.

[30] JIANG Yuhang, YANG Ruisi, LIN Yicen, et al. Assessment of the safety and probiotic characteristics of *Lactobacillus salivarius* CGMCC20700 based on whole-genome sequencing and phenotypic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1120263.

[31] GIRI S S, RYU E, SUKUMARAN V, et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus strains*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 66−72.

[32] XIAO Yu, XING Guangliang, RUI Xin, et al. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 210−222.

[33] 顾品品, 邢家溧, 王刚, 等. 几种体外评价乳酸菌无细胞提取物抗氧化活性方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 84−88. [GU Pinpin, XING Jiali, WANG Gang, et al. A comparison of several *in vitro* evaluation methods of *Lactobacillus* cell-free extract antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(23): 84−88.]

[34] 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.

[35] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32 Database issue: D277-D280.

[36] POWELL S, FORSLUND K, SZKLARCZYK D, et al. eggNOG v4.0: Nested orthology inference across 3686 organisms [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D231−D239.

[37] JIA B F, RAPHENYA A R, ALCOCK B, et al. CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D566−D573.

[38] CHEN L. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 33: D325−D328.

[39] LIU Baiheng, ZHONG Xiaoxia, LIU Zhiyun, et al. Probiotic potential and safety assessment of *Lactiplantibacillus plantarum* cqf-43 and whole-genome sequence analysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(24): 17570.

[40] 王蔚淼, 潘玲, 朱玮, 等. 10 株乳酸菌产酸性能的研究[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(3): 207−208. [WANG Weimiao, PAN Ling, ZHU Wei, et al. Acid-producing characteristics of ten lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(3): 207−208.]

[41] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43−48. [WANG Shuaijing, LI Xiao, LIU Lingyan, et al. Screening and identification of probiotics from yak dung and milk in Tibet[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 43−48.]

[42] 陈新亮, 邵启兵, 王超, 等. 唾液乳杆菌的分离鉴定及生物特性研究[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 157−161. [CHEN Xinliang, SHAO Qibing, WANG Chao, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus salivarius* from chicken intestine and its biological characteristics[J]. Food Science, 2016, 37(13): 157−161.]

[43] 李雅丽, 王默涵, 周志桥. 6 种低聚糖对肠道益生菌生长情况的影响及代谢产物分析[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 7−13. [LI Yali, WANG Mohan, ZHOU Zhiqiao. Effects of six oligosaccharides on the growth of intestinal probiotics and analysis of metabolites[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(3): 7−13.]

[44] 王雪, 张金泽, 段素芳, 等. 水苏糖发酵提纯菌株的筛选研究

［J］. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 94−97. ［WANG Xue, ZHANG Jinze, DUAN Sufang, et al. Study on purification of stachyose by fermentation［J］. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(10): 94−97.］

［45］ 谢秀明, 热孜姑丽·库尔班, 马彦科, 等. 阿勒泰传统酸驼乳中乳酸菌发酵乳益生活性评价［J］. 中国乳品工业, 2023, 51(8): 12−19,24. ［XIE X M, RAZIGUL K, MA Y K, et al. *In vitro* hypoglycemic activity evaluation of lactic acidbacteria fermented milk from Altay traditional sour camel milk［J］. China Dairy Industry, 2023, 51(8): 12−19,24.］

［46］ 聂亚萍, 徐梓赫, 徐显睿, 等. 高产蛋白酶乳杆菌的筛选及益生特性研究［J］. 中国乳品工业, 2025, 53(7): 5−10. ［NIE Yaping, XU Zihe, XU Xianrui, et al. Screening and probiotic characterization of high protease-producing *Lactobacillus* strains［J］. China Dairy Industry, 2025, 53(7): 5−10.］

［47］ 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 Shuaiqi, WU Rina, ZHANG Taowei, et al. Whole genome sequencing of *Bacillus subtilis* SNBS-3 and prediction of its antimicrobial substances［J］. Food Science, 2024, 45(2): 57−63.］

［48］ BOYAJIAN J L, ABOSALHA A, ISLAM P, et al. Select probiotics exhibit antioxidative and anti-inflammatory properties for gut modulation: *In vitro* analysis［J］. The EuroBiotech Journal, 2024, 8(4): 149−157.

［49］ HART A L, LAMMERS K, BRIGIDI P, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria［J］. Gut, 2004, 53(11): 1602−1609.

［50］ ANBAZHAGAN S, KANDASAMY S, KISEOK H, et al. Antioxidant and antibacterial effects of potential probiotics isolated from Korean fermented foods［J］. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(17): 10062.

［51］ 白明, 孟祥晨. 益生菌抗氧化活性及菌体抗氧化相关成分的分析［J］. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 6−11. ［BAI Ming, MENG Xiangchen. Antioxidative activity of probiotics and their internal correlative antioxidative components［J］. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 6−11.］

［52］ WU Yaping, LIU Dongmei, ZHAO Shan, et al. Assessing the safety and probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* 13002 based on complete genome and phenotype analysis［J］. LWT, 2022, 155: 112847.

［53］ 李月明, 张根生. 乳酸菌在发酵肉制品中的应用研究进展［J］. 肉类研究, 2022, 36(10): 51−56. ［LI Yueming, ZHANG Gensheng. Recent progress on the application of lactic acid bacteria in fermented meat products［J］. Meat Research, 2022, 36(10): 51−56.］