

山羊原奶中可培养乳酸菌多样性及菌株的体外益生特性分析

王涛

Diversity and *in Vitro* Probiotic Characteristics of Culturable Lactic Acid Bacteria from Goat's Raw Milk

WANG Tao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110244>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

新疆和田地区人源肠道乳酸菌的筛选及其体外益生特性分析

Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Intestinal Tract of Mothers and Infants in Hotan, Xinjiang

食品工业科技. 2024, 45(5): 134-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050063>

抗幽门螺旋杆菌乳酸菌的筛选与益生特性评价

Screening of Lactic Acid Bacteria with Anti-*Helicobacter pylori* Activity and Evaluation of Their Probiotic Characteristics

食品工业科技. 2021, 42(20): 140-148 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020061>

西藏曲拉和发酵乳中抗氧化和益生特性乳酸菌的筛选及鉴定

Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria with Antioxidant and Probiotic Properties from Qula and Fermented Milk in Tibet

食品工业科技. 2019, 40(2): 142-147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.02.025>

产ACE抑制肽乳酸菌的筛选、益生特性评定及应用

Screening, Probiotic Properties Evaluation and Application of ACE-inhibitory Peptide-producing Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2022, 43(10): 149-157 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080212>

淬灭副溶血弧菌群体感应的乳酸菌益生特性研究

Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Quenching Quorum-sensing of *Vibrio parahaemolyticus*

食品工业科技. 2023, 44(8): 180-186 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070186>

驼乳制品中抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性乳酸菌的筛选及益生特性研究

Screening and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Inhibiting α -Amylase and α -Glucosidase Activities in Camel Dairy Products

食品工业科技. 2022, 43(19): 191-201 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022020053>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

王涛. 山羊原奶中可培养乳酸菌多样性及菌株的体外益生特性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 141–149. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110244

WANG Tao. Diversity and *in Vitro* Probiotic Characteristics of Culturable Lactic Acid Bacteria from Goat's Raw Milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 141–149. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110244

· 生物工程 ·

山羊原奶中可培养乳酸菌多样性及菌株的 体外益生特性分析

王 涛

(兰州资源环境职业技术大学环境与化工学院, 甘肃兰州 730021)

摘 要: 本研究旨在了解新疆地区山羊原奶中乳酸菌的益生特性、加工特性和安全性, 以期为开发功能性乳品奠定一定的基础。实验采用 16S rRNA 基因测序结合 Rep-PCR 指纹分型技术对分离出的乳酸菌菌株进行遗传差异分析, 检测它们对酸和胆盐的耐受性并对耐受性较好的菌株进行模拟胃肠液耐受性、细胞表面特性 (疏水性和自凝聚)、抗菌活性、工艺逆境耐受性 (溶菌酶、热) 及药敏试验, 来评价菌株的体外益生特性和安全性, 通过主成分分析筛选最优的益生菌株。研究从 15 份山羊乳样品中共分离得到 23 株乳酸菌, 包括 *Leuconostoc mesenteroides* (9 株)、*Lactiplantibacillus plantarum* (6 株)、*Latilactobacillus curvatus* (4 株)、*Enterococcus faecium* (2 株)、*Enterococcus durans* (2 株)。基于对酸和胆盐耐受性进行初筛的结果表明, 有 7 株菌具有较好的耐受性。其中, 2 株植物乳杆菌 (*L. plantarum* SY43-10 和 *L. plantarum* SY43-4) 的模拟胃液和肠液处理后活菌数均高于 5 lg CFU/mL; 24 h 自凝集率大于 27%、并具有良好的疏水性; 热和溶菌酶处理后的活菌数仍大于 7 lg CFU/mL; 药敏试验显示 2 株菌对氨苄西林和氯霉素表现敏感, 对头孢西丁、红霉素和青霉素表现中度敏感或敏感。因此, 菌株 SY43-10 和 SY43-4 可作为优良的益生菌株, 通过体内实验进一步应用于发酵乳品和功能性产品。

关键词: 山羊乳, 乳酸菌, 菌株筛选, 主成分分析, 益生特性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0141-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110244

本文网刊:



Diversity and *in Vitro* Probiotic Characteristics of Culturable Lactic Acid Bacteria from Goat's Raw Milk

WANG Tao

(College of Environment and Chemical Engineering, Lanzhou Resources and Environment Voc-Tech University,
Lanzhou 730021, China)

Abstract: This study was to assess the probiotic attributes, technological properties and safety profiles of lactic acid bacteria isolated from local raw goat milk in Xinjiang, and built a cornerstone of exploitation of functional dairy products. Isolates were analyzed the genetic differences by 16S rRNA gene sequence combined Rep-PCR fingerprint typing technology. Preliminary screening under acid and bile salt base conditions were conducted and before the following experiments, including simulated gastrointestinal fluid tolerance, cell surface properties (hydrophobicity and autoaggregation), antimicrobial activity, processing stress tolerance (lysozyme and heat), and antibiotic sensitivity. Principal component analysis (PCA) was used to identify and screen the strains with optimal probiotic properties. This study found that the 23 lactic acid bacteria strains were isolated from 15 goat milk samples, including *Leuconostoc mesenteroides* (9 isolates), *Lactiplantibacillus plantarum* (6 isolates), *Latilactobacillus curvatus* (4 isolates), *Enterococcus faecium* (2 isolates) and *Enterococcus durans* (2 isolates). Seven strains were able to maintain considerable viable bacterial counts under pH2.0 and 0.3% bile salt conditions, indicating their high tolerance to acid and bile salt. Among them, strain SY43-10 and strain SY43-4 possessed a high tolerance towards simulated gastrointestinal fluid with over 5 lg CFU/mL after treatment, high self-agglutination rates of over 27% after 24 h and high hydrophobicity. Meanwhile, the viable counts

收稿日期: 2023-11-26

作者简介: 王涛 (1970-), 女, 本科, 副教授, 研究方向: 生物技术与应用, E-mail: 1210214865@qq.com。

after heat and lysozyme treatment of these two strains were more than 7 lg CFU/mL. Both of the two strains were susceptible to ampicillin and chloramphenicol, and were intermediate or susceptible to cefoxitin, erythromycin, and penicillin. In conclusion, strains *Lactiplantibacillus plantarum* SY43-10 and *Lactiplantibacillus plantarum* SY43-4 can be used as potential beneficial strains for further development of fermented dairy and functional products.

Key words: goat's milk; lactic acid bacteria (LAB); strain screening; principal component analysis; probiotic characteristics

自从人类驯化动物、依赖畜牧业养殖业促进人类社会的发展以来,动物原料乳因为含有蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质等丰富的营养物质以及微量的生物活性物质,千百年来成为人类首选的营养、功能食品^[1]。山羊奶及其乳制品具有低致敏性、营养丰富、易消化等特有的生理生化性质^[2-3]。不同动物原料乳中具有复杂多样的微生物,丰富的营养物质为不同的外源微生物提供了理想的栖息生境,通过各种途径进入原料乳,形成了复杂多样的原料乳微生物(microbiota)^[4-5]。资料显示,门水平上,原料乳中的微生物以 *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria* 和 *Bacteroides* 为主,但是不同的动物原料乳在属水平上微生物组的差异很大^[6-7]。研究发现,动物饲养场地的地理位置、植被、水源、空气,饲养动物乳头接触到的卧具、土壤、青草、饲料以及挤奶设备和人员的卫生状况,都会影响原料乳微生物组成^[4]。栖息于原料乳中的微生物对原料乳本身和后续加工乳品的品质起着重要作用,如 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Streptococcus* 等乳酸菌和酵母菌能够促进乳品的功能发酵,决定原料乳加工乳品的风味、质地、香味和感官品质^[8-10]。

从生态学角度来看,高等哺乳动物原料乳微生物主要来自动物的栖息环境,包括植被、饲草以及接触的人和其它动物,因此动物原料乳是开发野生型优良乳酸菌及潜在益生菌的天然宝库^[11-12]。近年来随着人们健康意识不断提高,从动物原料乳中开发具有益生特性的乳酸菌资源成为研究热点^[11,13-14]。同时,从乳品消费群体明显的地域性以及肠道微生态理论出发,从本地特色乳品中更有可能筛选到适应于当地饮食习惯人群的益生菌,开发这些乳酸菌将有助于本地企业研发符合当地居民肠道微生态的功能性食品^[15]。

我国新疆地区的畜牧业发达,乳源丰富,各民族自古就有动物原料乳自然发酵手工制作、食用的发酵乳制品,被认为是不可或缺的具有益生功能的营养食品,譬如奶疙瘩、酸马奶等。目前报道乳酸菌资源大多来自于发酵制品,而从动物原料乳中筛选益生菌的报道相对较少^[16-18]。本研究以新疆哈密采集的山羊乳为研究对象,通过培养法分离乳酸菌,对分离的菌株进行体外的安全性和功能性评价,筛选出具有高效益生特性的益生菌株,以期为提高区域性山羊乳及制品的加工和发展提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山羊乳样品 采自新疆哈密地区巴里坤牧区;

改良的 MRS 培养基、PYG 培养基、TSA 培养基

北京博奥拓达科技有限公司;溶菌酶(20000 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、胃蛋白酶(30000 U/g)、盐酸、猪胆盐、氯仿、二甲苯、乙酸乙酯 天津市巴斯夫化工有限公司;PCR 引物 苏州金唯智生物科技有限公司;致泻大肠埃希氏菌(CICC 10411)、鼠伤寒沙门氏菌(CICC 10420)、产肠毒素大肠埃希氏菌(CICC 10421)、出血性大肠埃希氏菌(CICC 21530)

中国工业微生物菌种保存管理中心(CICC);单核细胞增生李斯特氏菌(CGMCC 1.9136)、血清型肠炎沙门氏菌(CGMCC 1.10754)、金黄色葡萄球菌(CICC 21600) 中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

Mini Beadbeater-16 型珠磨式组织研磨器 美国 Biospec 公司;TC-512 型 PCR 仪 英国 Techne 公司;Quantum-ST5 型凝胶成像系统 法国 VILBER LOURMAT 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集 采样时,采样人员佩戴一次性手套,用无菌生理盐水清洗山羊乳头及周围,弃去头三把奶,收集 10 mL 山羊乳于无菌采样管中,贴好标签,置于-20 ℃ 车载冰箱,72 h 内运回实验室,立即进行菌种的分离鉴定。

1.2.2 乳酸菌分离与初步鉴定 取 1 mL 山羊乳于 9 mL 无菌生理盐水(浓度为 0.85%)中,充分振荡混匀。采用十倍梯度稀释法稀释样品,取稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 的样品悬浮液 100 μ L 分别涂布到 MRS 固体培养皿上,每个梯度做 2 次平行,37 ℃ 培养 48 h。每个培养皿挑选 8 个不同形态、大小和颜色的单菌落重复划线,直到出现菌落完全一致的纯菌株为止。纯菌株经革兰氏染色镜检为阳性、过氧化氢酶为阴性的视为疑似乳酸菌。疑似乳酸菌保存于-80 ℃ 25% 甘油中备用。按照 Randazzo 等^[19]描述的方法提取菌株 DNA,采用 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')进行 PCR 扩增。扩增体系及程序按照 Yu 等^[20]的方法进行。PCR 产物纯化后,送至苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序结果提交至 GenBank 数据库中进行序列同源性比对(BLAST)。

1.2.3 基于 rep-PCR 指纹对乳酸菌的遗传差异分析

rep-PCR 指纹分析采用引物 ERIC1(5'-GTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')和 ERIC2(5'-AGTAAGTG

ACTGGGGTGAGCG-3')对提取的菌株 DNA 进行 PCR 扩增。扩增体系和条件按照 Matsumiya 等^[21]的方法进行,扩增产物用 1.2%(w/v)的琼脂糖凝胶电泳检验,电泳结束后,在紫外凝胶成像仪中观察电泳结果并拍照,并用 Gel Compar II(v6.5)软件对 DNA 指纹图谱进行聚类分析。

1.2.4 耐酸和耐胆盐特性 将纯化、保藏的乳酸菌菌株在 MRS 肉汤中 37 ℃ 培养 24 h,传代 3 次后,10000 r/min 离心 5 min 后收集菌体并用 40 mL pH7.2 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次并重悬制备待测菌悬液。吸取 5 mL 待测菌液离心后加入等体积 pH2.5、pH2.0 的 MRS 肉汤,分别在 0 和 2 h 取样进行平板涂布菌落计数。用同样方法加入等体积 0.3%、0.5% 和 1% 牛胆盐处理的 MRS 肉汤,37 ℃ 保温培养 3 h 后取样进行平板涂布菌落计数。

1.2.5 模拟胃肠液的耐受性分析 按照 Yin 等^[22]的方法制备模拟胃液和肠液。吸取 1 mL 待测液与 9 mL 人工胃液混合均匀后 37 ℃ 培养,分别在 0、90 和 180 min 进行活菌计数,用同样方法将待测液与人工肠液混合,分别于 0、120 和 240 min 后进行活菌计数。

1.2.6 自凝聚能力分析 根据 Li 等^[23]描述的方法测定自凝聚能力,乳酸菌活化三代后,离心收集菌体,磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2)洗涤两次。菌体用 PBS(pH7.2)重悬至浓度为 10^8 CFU/mL,将菌液在 37 ℃ 下放置 0、3、24 h,检测在 600 nm 处吸光度。自凝聚集能力计算公式:

$$\text{自凝聚集能力(\%)} = [(A_t - A_0)/A_0] \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: A_t 表示 t 时刻的吸光度; A_0 表示 $t=0$ 时的吸光度。

1.2.7 疏水性分析 根据 Katarzyna 等^[24]描述的方法测定菌株的疏水性,将细胞悬浮液分别与等体积氯仿,二甲苯和乙酸乙酯混合,静置分层,在 600 nm 处测定水相的吸光度。疏水性计算公式:

$$\text{疏水性(\%)} = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: A_0 、 A_t 分别是试剂混匀前后菌液在 600 nm 处的吸光度。

1.2.8 常见病原菌抑菌活性测定 按照 Mishra 等^[25]描述的方法测菌株的抗菌活性,采用牛津杯法测定菌株对 7 种病原菌:致泻大肠埃希氏菌(CICC 10411)、鼠伤寒沙门氏菌(CICC 10420)、产肠毒素大肠埃希氏菌(CICC 10421)、出血性大肠埃希氏菌(CICC 21530)、单核细胞增生李斯特氏菌(CGMCC 1.9136)、血清型肠炎沙门氏菌(CGMCC 1.10754)和金黄色葡萄球菌(CICC 21600)的抑制作用。将生长至对数期的致病菌用生理盐水(0.85%)梯度稀释至 10^{-6} ~ 10^{-7} CFU/mL,均匀涂布在每种致病菌相对应的固体

培养基表面,随后在固体培养基上放置牛津杯,并在牛津杯中加入 200 μ L 已培养 24 h 的乳酸菌上清液,以不加乳酸菌的 MRS 培养基为空白对照。在 4 ℃ 预扩散 6 h 后,转入 37 ℃ 培养 24 h,测定抑菌圈直径。

1.2.9 耐热及溶菌酶耐受性分析 将菌株在 60 ℃ 水浴中处理 5 min,取合适的稀释度进行平板菌落计数。将待测菌株细胞重悬在含有 100 mg/L 溶菌酶的 MRS 液体培养基中,分别静止 0、30、90 min 后,采用 MRS 进行平板活菌菌落计数。

1.2.10 药敏实验 根据 Das 等^[26]方法对菌株进行 12 种抗生素药敏实验,抗生素药敏实验采用纸片琼脂扩散法(K-B 法)进行,将培养至对数期的菌株离心,弃去上清,菌体用 PBS(pH=7.2)重悬至浓度为 10^8 CFU/mL。吸取 100 μ L 菌悬液涂布至 MRS 固体培养基表面,用镊子将药敏纸片贴在涂有菌悬液的固体培养基表面,37 ℃ 培养 24 h,测量抑菌圈直径。使用的抗生素包括:头孢西丁(FOX, 30 μ g)、苯唑西林(OXA, 1 μ g)、红霉素(ERY, 15 μ g)、氨苄西林(AMP, 10 μ g)、复方新诺明(SXT, 25 μ g)、左氧氟沙星(LEV, 5 μ g)、青霉素(PEN, 10 μ g)、环丙沙星(CIP, 5 μ g)、替考拉宁(TEC, 30 μ g)、氯霉素(CHL, 30 μ g)、庆大霉素(GEN, 120 μ g)、多粘菌素(PB, 300 μ g)。

1.3 数据处理

每个实验均进行 3 次重复,实验数据运用 SPSS 26.0 分析,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。组间比较采用单因素方差分析,并使用 Tukey 事后检验校正 P 值,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 Minitab 17.0 对菌株进行主成分分析(PCA),根据菌株益生特征综合得到的权重,按照 Sharma^[27]所使用的方法确定最佳者。采用 Origin 2018 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离与菌株系统发育分析

从 15 份山羊原乳样品中共分离得到 85 株菌株,根据 ERIC-rep-PCR 指纹分析图谱,确定共有 23 个不同的带谱,每个 rep-PCR 带谱选择一个菌株,采用 16S rRNA 基因测序,经 NCBI 的 BLAST 同源性比对,确定为 5 个种,包括 *Leuconostoc mesenteroides*(9 株)、*Lactiplantibacillus plantarum*(6 株)、*Latilactobacillus curvatus*(4 株)、*Enterococcus faecium*(2 株)、*Enterococcus durans*(2 株)(表 1,图 1A)。

根据 ERIC 引物的 rep-PCR 指纹分型技术对 23 株乳酸菌进行聚类分析,如图 1B 所示,23 株乳酸菌获得清晰的电泳图谱,片段大小主要在 100~5000 bp 之间,每个菌株扩增条带在 6~11 之间,指纹图谱带型较丰富。根据指纹相似性,在 40% 的相似性水平上,23 株乳酸菌可被聚为 5 个组。A 组包含 2 株 *Enterococcus durans*;B 组包含 2 株 *Enterococcus faecium* 和 1 株 *Leuconostoc mesenteroides*;C 组共包含

表 1 山羊原奶中筛选出的 23 株乳酸菌
Table 1 23 strains of LAB were screened from goat raw milk

代表菌株	相同带型菌株编号	BLAST最匹配种	相似度(%)
SY43-4	SY43(10、16、8、13)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (MK045823.1)	100
SY50-1	SY50(22、21、15)	<i>Latilactobacillus curvatus</i> (MN372055.1)	99
SY43-3	SY43(14)	<i>Enterococcus durans</i> (JF896445.1)	99
SY42-16	SY42(15、4); SY-50(24)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (MG754625.1)	100
SY42-17	SY42(10、12); SY-50(4)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (MK182840.1)	100
SY42-18	SY42(13)	<i>Enterococcus faecium</i> (KJ156974.1)	99
SY43-7		<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (MN720603.1)	100
SY50-11		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (KT924430.1)	100

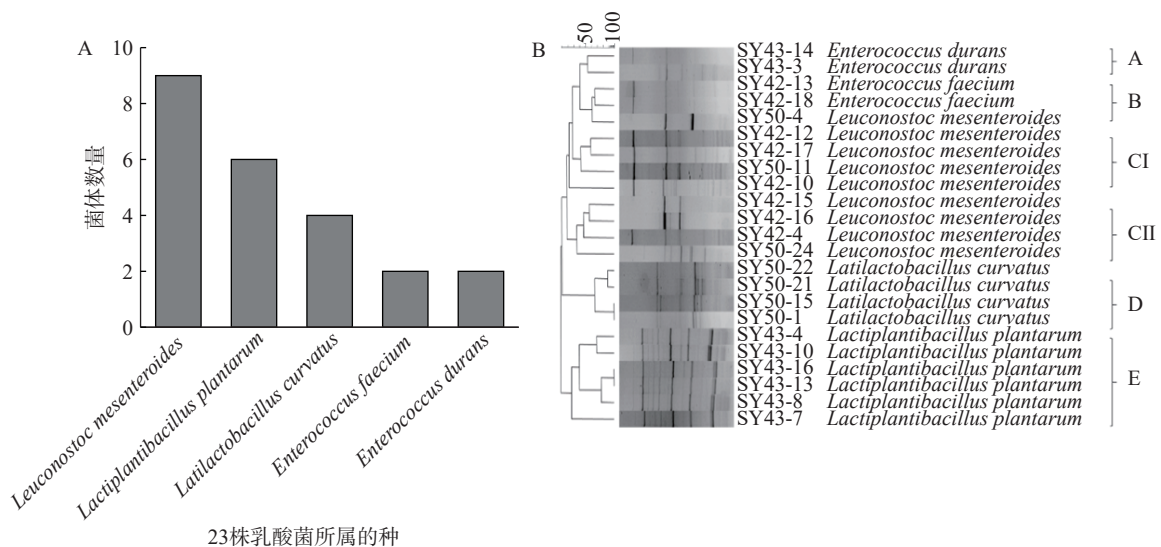


图 1 山羊原奶乳酸菌的分离鉴定及遗传差异

Fig.1 Isolation, identification and genetic difference of LAB in goat raw milk

两个亚群 8 株菌, C I 和 C II 各包含 4 株, 全部为 *Leuconostoc mesenterioide*; D 组只有 3 株 *Latilactobacillus curvatus*; 6 株 *Lactiplantibacillus plantarum* 则被划分到 E 组。

2.2 耐酸、耐胆盐特性

微生物能够作为益生菌的一个基本条件就是能够耐受人体胃肠道的恶劣环境, 益生菌能够耐受酸和

胆盐的暴露才能在胃和小肠中存活^[28]。表 2 显示了 23 株乳酸菌在不同酸和胆盐浓度的耐受性结果。在 pH2.0 的酸性条件下培养 2 h 后 23 株乳酸菌均可以存活, 活菌数下降约 1.54~6.31 lg CFU/mL。总体上, 有 10 株菌株 (SY50-4、SY50-15、SY43-3、SY43-4、SY43-8、SY43-10、SY43-13、SY42-16、SY42-15 和 SY42-4) 具有较好的耐酸性, 活菌数下降

表 2 山羊原奶中筛选的 23 株乳酸菌的酸和胆盐耐受性特征

Table 2 Acid and bile salt tolerance characteristics of 23 strains of LAB in goat raw milk

种属	菌株编号	耐酸(lg CFU/mL)		耐胆盐(lg CFU/mL)			
		原液	pH2.0	0.3%	0.5%	1.0%	
屎肠球菌	SY42-13	8.89±0.23 ^{de}	5.15±0.42 ^{ef}	4.26±0.09 ^h	2.24±0.25 ^{ijkl}	0.92±0.18 ^{fg}	
	SY42-18	9.91±0.38 ^a	5.48±0.27 ^e	5.58±0.35 ^{bcd}	3.54±0.46 ^{def}	1.92±0.53 ^{cd}	
	SY50-22	9.68±0.36 ^{abc}	3.45±0.40 ^j	5.09±0.70 ^{def}	3.10±0.39 ^{fgh}	0.00±0.00 ^h	
弯曲广布乳杆菌	SY50-21	9.70±0.66 ^{ab}	5.60±0.12 ^{de}	5.44±0.15 ^{bcd}	3.57±0.19 ^{def}	1.27±0.16 ^{efg}	
	SY50-15	8.48±0.26 ^c	6.48±0.30 ^{bc}	4.54±0.42 ^{gh}	2.06±0.14 ^{kl}	0.00±0.00 ^h	
	SY50-1	9.44±0.38 ^{abcd}	5.45±0.33 ^e	5.60±0.49 ^{bcd}	2.55±0.33 ^{hij}	0.79±0.70 ^g	
植物乳植杆菌	SY43-4	8.84±0.30 ^{de}	7.30±0.32 ^a	6.56±0.64 ^a	5.76±0.08 ^a	3.32±0.18 ^{ab}	
	SY43-10	8.94±0.45 ^{cde}	6.51±0.56 ^{bc}	6.07±0.06 ^{ab}	5.38±0.21 ^a	3.67±0.21 ^{ab}	
	SY43-16	9.94±0.34 ^a	5.32±0.21 ^e	3.57±0.27 ^j	1.97±0.57 ^{kl}	0.00±0.00 ^h	
	SY43-13	9.24±0.19 ^{abcde}	7.51±0.38 ^a	5.25±0.08 ^{cde}	3.27±0.32 ^{efg}	1.68±0.48 ^{de}	
	SY43-8	9.00±0.43 ^{bcd}	6.30±0.06 ^{bcd}	4.55±0.29 ^{gh}	2.26±0.13 ^{ijkl}	1.02±0.19 ^{fg}	
	SY43-7	9.13±0.19 ^{bcd}	5.72±0.15 ^{cde}	4.92±0.39 ^{efg}	2.76±0.74 ^{ghi}	1.39±0.51 ^{ef}	

续表 2

种属	菌株编号	耐酸(lg CFU/mL)		耐胆盐(lg CFU/mL)		
		原液	pH2.0	0.3%	0.5%	1.0%
耐久肠球菌	SY43-3	9.54±0.49 ^{abcd}	6.29±0.41 ^{bcd}	5.15±0.06 ^{cdef}	4.11±0.34 ^{bcd}	3.21±0.26 ^{ab}
	SY43-14	9.42±0.39 ^{abcd}	4.01±0.97 ^{hi}	4.13±0.16 ⁱ	2.23±0.35 ^{ijkl}	0.00±0.00 ^h
	SY42-16	9.16±0.08 ^{bcd}	6.06±0.34 ^{cd}	6.05±0.03 ^{ab}	4.49±0.19 ^b	3.65±0.44 ^a
	SY42-12	9.05±0.37 ^{bcd}	4.24±0.22 ^h	4.35±0.31 ^{gh}	1.62±0.48 ^l	0.00±0.00 ^h
	SY42-17	8.90±0.23 ^{de}	4.44±0.37 ^{fgh}	4.91±0.24 ^{efg}	2.43±0.23 ^{ijk}	0.00±0.00 ^h
	SY42-15	9.02±0.55 ^{bcd}	6.84±0.57 ^{ab}	5.67±0.17 ^{bcd}	3.27±0.16 ^{efg}	2.22±0.10 ^c
肠膜明串珠菌	SY42-4	8.90±0.35 ^{de}	6.14±0.44 ^{cd}		3.45±0.38 ^{ef}	2.23±0.08 ^c
	SY42-12	8.86±0.42 ^{de}	3.90±0.79 ^{hi}		0.00±0.00 ^m	0.00±0.00 ^h
	SY50-11	9.73±0.51 ^{ab}	4.37±0.42 ^{gh}		3.82±0.56 ^{cde}	1.36±0.16 ^{ef}
	SY50-24	9.71±0.53 ^{ab}	3.40±0.22 ⁱ		1.83±0.30 ^{kl}	0.00±0.00 ^h
	SY50-4	9.45±0.19 ^{abcd}	6.10±0.38 ^{cd}		4.26±0.30 ^{bc}	2.84±0.38 ^b

注：数值为三次平均值±标准误差；同列数据标有a~n小写字母表示差异显著(P<0.05)。

约 1.54~3.35 lg CFU/mL。随着胆盐浓度的升高，23 株乳酸菌的活菌数均降低。0.3% 胆盐处理 3 h 后，23 株乳酸菌活菌数降低了 2.28~6.45 lg CFU/mL。0.5% 胆盐处理 3 h 后，1 株菌(SY42-12)完全不能存活，其余菌的活菌数降低了 3.08~7.97 lg CFU/mL。1% 胆盐 3 h 处理后，8 株菌完全不能存活，8 株菌的活菌数降低了 7.56~8.43 lg CFU/mL；而有 7 株菌(SY50-4、SY43-3、SY43-4、SY43-10、SY42-4、SY42-15 和 SY42-16)表现出较好的胆盐耐受性，其活菌数降低了 5.27~6.80 lg CFU/mL。基于对 23 株乳酸菌的酸和胆盐的耐受性筛选，本研究最终筛选获得 7 株乳酸菌(SY50-4、SY43-3、SY43-4、SY43-10、SY42-4、SY42-15 和 SY42-16)用于进一步的分析其益生特性。

2.3 模拟胃肠液耐受性

益生菌发挥益生作用的前提是以活菌状态通过人体胃肠道并且经过胃肠道屏障后在体内还有较高的存活率。人胃的环境是高酸性的，且由于饮食影响，pH 会在 1.5~3.0 范围内变化。人体肠液主要为胆汁和胰液，益生菌经过肠液时，会受到胆汁盐和胰蛋白酶的抑制作用^[29]。选择酸和胆盐耐受性较好的 7 株菌用于模拟胃肠液耐受性分析。由图 2 所示，SY43-4、SY43-10、SY43-3、SY42-16 在模拟的胃液处理 180 min 后活菌数在 7.83~8.48 lg CFU/mL，其活菌数高于其他 3 株菌。SY43-4 和 SY43-10 在模拟的肠液处理 240 min 后活菌数高于其他菌，分别为 7.34 lg CFU/mL 和 7.86 lg CFU/mL。结果表明，7 株菌中有 2 株菌(SY43-4 和 SY43-10)表现出了较好的胃肠道耐受性。

2.4 自凝聚和疏水性

细菌粘附在粘膜表明是肠道定植和提供健康益处所必需的，因此，粘附能力是益生菌的重要筛选标准。研究表明乳酸菌的自凝聚能力和表面疏水性与其对宿主肠道细胞的黏附能力是呈正相关的，因此将自凝聚和疏水性用于筛选优良益生菌的重要指标^[30]。7 株菌的自凝聚和疏水性测定结果见图 3。

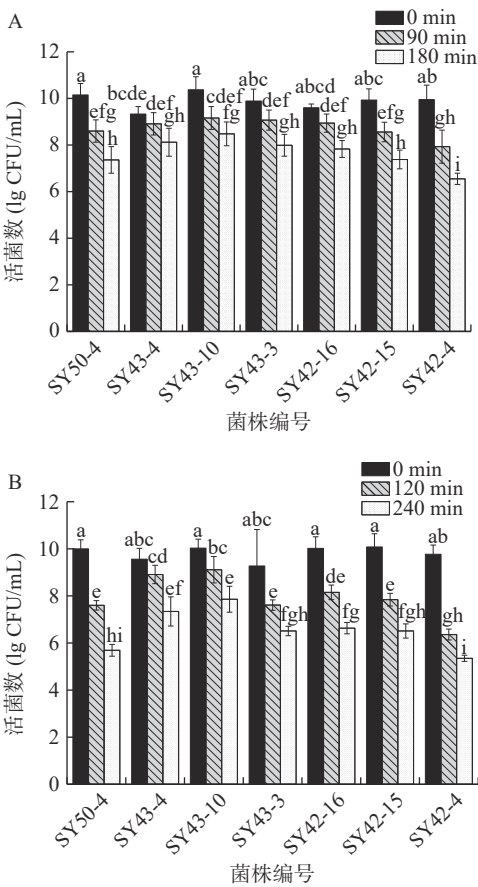


图 2 七株代表性乳酸菌经模拟胃液(A)、肠液(B)处理后的耐受性

Fig.2 Tolerance of 7 representative strains of LAB to simulated gastric juice (A) gastroenteric fluid (B)

注：不同小写字母代表差异显著(P<0.05)，相同代表差异不显著，图 3~图 4 同。

7 株试验菌株在 37 ℃ 培养 3 h 和 24 h 期间，所有菌株具有自凝聚能力，其自凝聚范围分别为 3.43%~9.05% 和 9.55%~36.09%。培养 24 h 后，菌株 SY43-4(36.09%)和 SY43-10(27.84%)表现出相对较高的自凝聚率(图 3A)，其自凝聚能力显著高于其他菌(P<0.05)。选择二甲苯作为疏水性有机溶剂，检测乳酸菌的表面疏水性；选择氯仿作为路易斯酸，乙酸乙

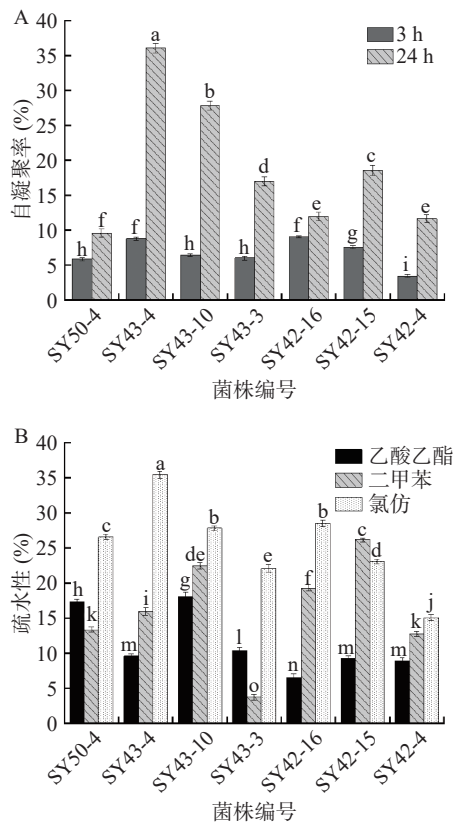


图3 七株代表性乳酸菌的自凝聚性(A)、疏水性(B)特征

Fig.3 Autoaggregation (A) and hydrophobicity (B) characteristics of 7 representative strains of LAB

酯作为路易斯碱,检测乳酸菌的表面所带电荷^[31]。由图 3B 可知所有菌株均具有一定的疏水性,不同试验菌株的疏水性存在显著差异($P<0.05$)。除菌株 SY42-15 外,其余试验菌株对氯仿的亲合力高于对乙酸乙酯和二甲苯。SY43-4、SY43-10、SY42-16 和 SY50-4 对氯仿的疏水性显著高于其他菌($P<0.05$),表明其对肠道的黏附性可能较强。

2.5 菌株对热和溶菌酶的耐受性

益生菌最大的缺点就是在高温环境下容易失活,限制了其的生产应用。此外,益生菌经过口腔到达人体胃肠道的过程中会受到口腔中天然杀菌物质溶菌酶的抑制,研究报道其质量浓度为 0~57 $\mu\text{g/mL}$,因此益生菌能否耐受溶菌酶是重要筛选指标之一^[30]。图 4 列出了 7 株试验菌株对热和溶菌酶

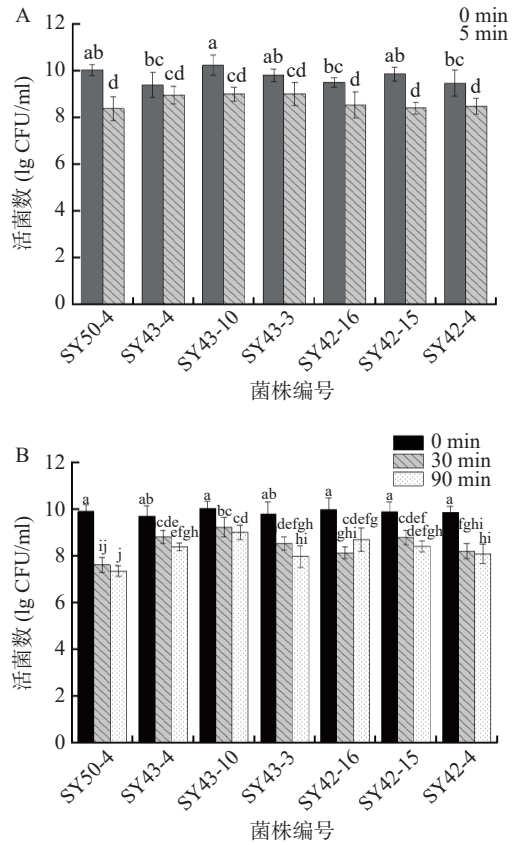


图4 七株代表性乳酸菌对热处理(A)、溶菌酶(B)的耐受性

Fig.4 Tolerance of 7 representative strains of LAB to heat treatment (A) and lysozyme (B)

(100 mg/mL) 的耐受性结果,7 株试验菌株经过 60 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min 后活菌数降低($P<0.05$),下降的范围为 0.65~1.22 $\lg \text{CFU/mL}$,其中菌株 SY43-10、SY43-4 和 SY43-3 具有较好的热耐受性。在溶菌酶耐受试验中,在 100 mg/mL 浓度的溶菌酶培养 90 min 期间活菌数减少量均小于 2.5 $\lg \text{CFU/mL}$,说明 7 株菌均对 100 mg/mL 浓度的溶菌酶具有很好的耐受性。

2.6 抗菌活性

抑菌能力是评价乳酸菌益生作用的重要指标。乳酸菌通过阻断病原菌对肠道上皮细胞的侵染实现其抑菌作用^[31]。本研究采用牛津杯法检测 7 株乳酸菌对常见致病菌的抑菌活性见表 3,试验菌株中有 3 株乳酸菌(SY43-4、SY43-10、SY43-3)抑菌谱较

表3 七株代表乳酸菌对指示菌的抑菌活性

Table 3 Antibacterial activity of 7 representative strains of LAB against indicator pathogens

菌株	21530	SM	10411	10421	10420	21600	LS
SY50-4	-	-	-	-	-	-	+++
SY43-4	+++	+++	++	-	+++	++	-
SY43-10	+	+++	+	+++	+++	++	+
SY43-3	+++	+++	+	+	+++	+	-
SY42-16	-	-	-	+	-	-	+++
SY42-15	-	-	-	-	-	-	++
SY42-4	-	-	-	-	-	-	+++

注:-, 阴性(=8 mm); +, 阳性(8~11 mm); ++, 11~14 mm; +++, >14 mm; 21530: 出血性大肠埃希氏菌(CICC 21530); SM: 血清型肠炎沙门氏菌(CGMCC 1.10754); 10411: 致泻大肠埃希氏菌(CICC 10411); 10421: 产肠毒素大肠埃希氏菌(CICC 10421); 10420: 鼠伤寒沙门氏菌(CICC 10420); 21600: 金黄色葡萄球菌(CICC 21600); LS: 单核细胞增生李斯特氏菌(CGMCC 1.9136)。

表 4 七株代表乳酸菌的抗生素耐药性分析

Table 4 Antibiotic resistance of 7 representative strains of LAB

菌株	FOX	OXA	AMP	SXT	LEV	PEN	CIP	TEC	CHL	GEN	PB	ERY
SY50-4	S	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	I
SY43-4	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S
SY43-10	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S
SY43-3	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	S
SY42-16	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	I
SY42-15	I	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	I
SY42-4	I	R	S	R	R	I	I	R	S	R	R	I

注: FOX: 头孢西丁; OXA: 苯唑西林; AMP: 氨苄西林; SXT: 复方新诺明; LEV: 左氧氟沙星; PEN: 青霉素; CIP: 环丙沙星; TEC: 替考拉宁; CHL: 氯霉素; GEN: 庆大霉素; PB: 多粘菌素; ERY: 红霉素; S: 敏感, I: 中度敏感, R: 耐药。

广,可以抑制致泻大肠埃希氏菌,鼠伤寒沙门氏菌,出血性大肠埃希氏菌,血清型肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。而 SY50-4、SY42-16、SY42-15、SY42-4 抑菌谱较窄,仅表现出对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌效果。

2.7 药敏试验

抗生素耐药性是评估菌株是否安全的重要依据^[32]。本研究选用 12 种常见的抗生素对 7 株乳酸菌进行抗生素耐药实验。结果如表 4 所示,7 株菌对氨苄西林和氯霉素表现敏感,对头孢西丁、红霉素和青霉素表现中度敏感或敏感,而对苯唑西林、复方新诺明、左氧氟沙星、替考拉林、庆大霉素和多粘菌素则表现耐药性。

2.8 主成分分析

主成分分析能够区分并筛选具有潜在的益生特性的分离菌株。PCA 图分析结果(图 5)展示了分离菌株在不同益生特征实验中的贡献率和相关性。各分离菌株在耐酸耐胆盐、模拟胃肠液耐受性、自凝聚率和疏水性、对热和溶菌酶耐受性、抑菌活性和耐药性各个变量下总贡献率为 67.9%,不同分离菌株逐渐沿着 PC1(贡献率 52.1%)和 PC2(贡献率 15.8%)拉开距离,说明在不同试验条件下,分离菌株对各变量的响应存在明显的差异;SY42-16、SY42-15、SY42-4、SY50-4 与抗生素耐性的相关性最显著,SY42-4 与 SL、PEN、CIP、CHL、FOX 表现出最高的相关性;SY43-10 在模拟胃肠液试验结果中,与不同处理组的变量间表现出最高的相关性;SY43-4 与 SY43-

3 在抗菌试验中,与 10420、10411、21600、21530、SM 五种指示菌抑菌活性表现出最高的相关性,并且对 LEV 的耐受性较强。综合分析结果表明,分离乳酸菌株 SY43-10 和 SY43-4 具有较好的益生特性。

3 讨论与结论

我国西部地区地域广袤、气候差异显著、生态环境复杂,区域特色规模化动物养殖为当地各民族提供了多样的天然乳品,孕育了极其丰富的乳酸菌资源和遗传多样性。因此,目前大部分乳酸菌资源开发来源于发酵制品,而从动物原乳中筛选益生菌鲜有报道。研究发现,不同生态来源的乳酸菌菌株,人工加工产品的发酵过程相当于驯养过程,连续生长在固定的乳品发酵环境中,菌株基因组由于长期的环境适应性,会导致基因组有关基因丢失和突变,致使重要的表型性状减弱、甚至消失^[33]。相反,原奶中的微生物很可能来自动物饲养的饲草以及接触的环境中的植被,很可能孕育了丰富的野生乳酸菌资源^[4],为人们筛选到优良的发酵剂、益生菌提供了来源。本研究从新疆山羊原乳中分离筛选乳酸菌并对其体外益生特性和安全性进行评价,以期筛选到优良的本土化菌株,为开发符合当地居民肠道微生态化平衡的功能性和新型食品提供理论参考依据。

本研究从新疆哈密地区 15 份山羊乳样品中分离筛选出 23 株乳酸菌,包括 4 个属 5 个种,其中 *Leuconostoc mesenteroides* 和 *Lactiplantibacillus plantarum* 是分离率最高的种,与其它地域来源有关的报道存在差异。马青雯等^[34]从 6 份云南山羊乳饼中鉴定出 46 株乳酸菌,划分为 3 个属,6 个种,其中优势菌为 *Enterococcus faecium*。Veettil 等^[11]发现印度山羊原奶中优势菌群为 *Enterococcus durans* 和 *L. plantarum*。有人对巴西山羊原奶研究显示,优势种为 *Weissella cibaria*、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *L. plantarum*^[14]。孟加拉国山羊原乳中乳酸菌多样性较高,分离到 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Lactococcus* 和 *Pediococcus* 多个属的菌株,其中 *Lactobacillus* 是最优势的属,占比 50% 以上^[12]。因此,不同地区畜牧业环境(地理、经纬度、气候、植被等)的差异很可能是造成这种差异的原因。但是,总体上 *L. plantarum*、干酪

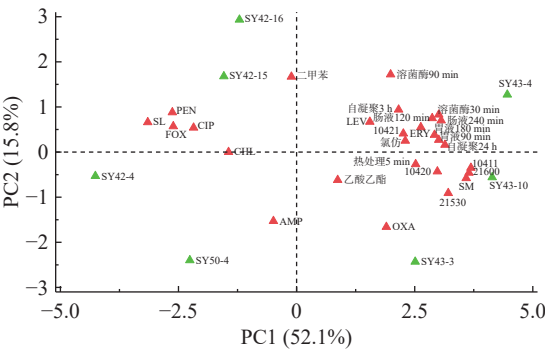


图 5 基于体外益生菌特征的主成分分析对优良菌株的筛选

Fig.5 Screening of optimal strains based on principal component analysis for *in vitro* probiotic characteristics

乳杆菌 (*Lactocaseibacillus casei*)、副干酪乳杆菌 (*Lactocaseibacillus paracasei*) 是最广泛报道的乳酸菌。在实践上, *L. plantarum* 是目前应用开发最广泛的乳杆菌种类, 不同植物基材料和人体肠道来源的植物乳杆菌被广泛报道作为益生菌, 应用于发酵饮料以及益生菌制剂缓解人体肥胖、结肠炎、糖尿病、癌症等疾病, 显示更广泛的应用潜力^[35]。未来动物原料乳仍然是开发野生型优良乳酸菌及潜在益生菌的天然宝库, 尤其从消费群体的地域性以及肠道微生态角度, 从本地食品更容易筛选到适应当地饮食习惯人群的益生菌菌株的认识, 开发区域性的乳酸菌资源仍然很有必要。

益生菌的胃肠道耐受性是很重要的筛选特征, 口服益生菌制剂, 在乳酸菌通过胃、小肠到达大肠之前, 因不耐受酸度和胆汁很容易被淘汰, 因此是益生菌菌株能否在肠道中定殖的先决条件。本研究对分离得到的 23 株乳酸菌进行酸和胆盐耐受性初筛基础上, 选择酸和胆盐耐受性较好的 7 株菌 (SY50-4、SY43-3、SY43-4、SY43-10、SY42-16、SY42-15 和 SY42-4) 进一步进行自凝聚、疏水性、耐热和溶菌酶抗性、抑菌性及药敏实验。综合这些特征, 基于主成分分析来量化不同体外益生属性对最优益生菌菌株筛选的贡献, 通过排名来探究筛选潜在益生菌候选者的可行性^[36]。分析显示, 两株植物乳杆菌 *L. plantarum* SY43-10 和 *L. plantarum* SY43-4, 在 pH2.5 人工胃液的活菌数可以保持在 8 lg CFU/mL 以上, 在 pH7.5 人工肠液的活菌数达到 7 lg CFU/mL 以上; 经过耐热和溶菌酶处理后, 活菌数仍然可达到 8 lg CFU/mL 以上, 尤其对人体常见腹泻病原菌致泻大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、出血性大肠埃希氏菌、血清型肠炎沙门氏菌和金黄色葡萄球菌均有较强的抑菌功能, 具有广谱抑菌性能。耐药性是微生物本身的生存策略之一, 与抗生药的存在没有直接关系。相对来说, 乳杆菌由质粒携带可移动耐药基因的几率较小, 检测到耐药性也较低^[37], 一般被认为是安全的。本研究显示, 除对苯唑西林、复方新诺明、左氧氟沙星、替考拉林、庆大霉素和多粘菌表现一定耐药外, 对其它抗生药均表现敏感或中度敏感。

本研究从山羊原奶筛选野生型乳酸菌 23 株, 基于对酸和胆盐耐受性选择较好的 7 株菌进一步进行主成分分析筛选。结果表明, 依据自凝聚、疏水性、耐热、溶菌酶抗性、抑菌及药敏多个表型特征, 两株植物乳杆菌 *L. plantarum* SY43-10 和 *L. plantarum* SY43-4 显示了优良的益生菌潜力, 有望进一步通过动物造模的体内实验来验证专一的益生菌特征, 为进一步应用于功能性乳品加工、后生元饮料的开发奠定基础。

参考文献

- [1] HAJARA A, WOLFGANG M, TETYANA R, et al. The effects of dairy and dairy derivatives on the gut microbiota: A systematic literature review[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1799533.
- [2] SLACANAC V, BOZANIC R, HARDI J, et al. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2010, 63(2): 171–89.
- [3] RANADHEERA C S, NAUMOVSKI N, AJLOUNI S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 22: 109–114.
- [4] LISA Q, ORLA O S, CATHERINE S, et al. The complex microbiota of raw milk[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37(5): 664–698.
- [5] PARENTE E, RICCIARDI A, ZOTTA T. The microbiota of dairy milk: A review[J]. *International Dairy Journal*, 2020, 107: 104714.
- [6] NAN L, YUEZHU W, CHUNPING Y, et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 2371.
- [7] S S R, C S E S L, R D S M, et al. Changes in bovine milk bacterial microbiome from healthy and subclinical mastitis affected animals of the Girolando, Gyr, Guzera, and Holstein breeds[J]. *International Microbiology*, 2022, 25(4): 803–815.
- [8] VAN KRANENBURG R, KLEEREBEZEM M, VLIEG J V, et al. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12(2–3): 111–121.
- [9] LISA Q, ORLA O S, P B T, et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5717–5723.
- [10] PICON A, GARDE S, ÁVILA M, et al. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 58: 14–22.
- [11] VEETIL V, CHITRA V. Probiotic lactic acid bacteria from goat's milk potential producer of bacteriocin: Evidence from liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2022, 16(1): 305–317.
- [12] ZAKIRUL I M, ELIAS U M, TANVIR R M, et al. Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties[J]. *Small Ruminant Research*, 2021, 205: 106532.
- [13] 娜日苏, 如意, 刘文俊, 等. 中东亚不同地区酸马奶中乳酸菌分离鉴定及优良菌株筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(17): 120–126. [NA R S, RU Y, LIU W J, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria in kumiss in different regions of central and East Asia and screening of excellent strains[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(17): 120–126.]
- [14] SILVA L A D, NETO J H P L, CARDARELLI H R. Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria[J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(2): 1497–1505.
- [15] SYBESMA W, KORT R, LEE Y K. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries?[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(4): 197–200.
- [16] NURAIDA L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2015, 4(2): 47–55.

- [17] MAO B, YAN S. Lactic acid bacteria and fermented fruits and vegetables[J]. *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications*, 2019: 181–209.
- [18] 袁晓霞, 韩慧玲, 李华, 等. 内蒙古地区传统制作奶豆腐和乌日莫中乳酸菌多样性及分布特征[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(5): 2029–2043. [YUAN X X, HAN H L, LI H, et al. Diversity and distribution characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional milk curd and Urimo in Inner Mongolia[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(5): 2029–2043.]
- [19] RANDAZZO C, TORRIANI S, AKKERMANS A, et al. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 1882–1892.
- [20] YU J, WANG W H, MENGHE B L G, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(7): 3224–3229.
- [21] MATSUMIYA Y, KATO N, WATANABE K, et al. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. *J Infect Chemother*, 2002, 8(1): 43–49.
- [22] YIN K W, UTHUMPORN U, ROSMA A, et al. Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(5): 1369–1376.
- [23] LI H, A. G H, MAHMOUD A H, et al. Partial characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Chinese dairy products[J]. *International Journal of Food Properties*, 2021, 24(1): 446–456.
- [24] KATARZYNA G, ANNA S, JOANNA F F, et al. Adhesive and hydrophobic properties of the selected LAB isolated from gastrointestinal tract of farming animals[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 63(2): 311–314.
- [25] MISHRA V, PRASAD D N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(1): 109–115.
- [26] DAS P, KHOWALA S, BISWAS S. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples[J]. *LWT*, 2016, 73: 383–390.
- [27] SHARMA S. Principal component analysis (PCA) to rank countries on their readiness for e-tail[J]. *Journal of Retail & Leisure Property*, 2008, 7: 87–94.
- [28] AYYASH M M, ABDALLA A K, ALKALBANI N S, et al. Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(8): 8363–8379.
- [29] MADJIREBAYE P, XIAO M, MAHAMAT B, et al. *In vitro* characteristics of lactic acid bacteria probiotics performance and antioxidant effect of fermented soymilk[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101952.
- [30] RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ S, FERNÁNDEZ-PACHECO P, SESEÑA S, et al. Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry[J]. *LWT*, 2021, 143: 111142.
- [31] BAUTISTA-GALLEGO J, ARROYO-LÓPEZ F N, RANT-SIOU K, et al. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential[J]. *Food Research International*, 2013, 50(1): 135–142.
- [32] ANISIMOVA E, YARULLINA D. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(12): 1407–1416.
- [33] PAPIZADEH M, ROHANI M, NAHREVANIAN H, et al. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 118–131.
- [34] 马青雯, 王馨聆, 王昱敬, 等. 山羊乳饼中乳酸菌的分离鉴定及优良乳酸菌的初步筛选[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(3): 8–12.
- [35] MA Q W, WANG X L, WANG Y J. Preliminary screening and isolation and identification of lactic acid bacteria in goat dairy cake[J]. *China Dairy Industry*, 2018, 46(3): 8–12.]
- [36] ANDREA C, MARTINA A, GIUSEPPE C, et al. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: Something to carefully consider[J]. *Food Microbiology*, 2022, 103: 103934.
- [37] NATALIA G, NATALIA B, ROBERTA P, et al. Health-promoting role of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fermented foods[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 349.
- [38] MALLAPPA R H, SINGH D K, ROKANA N, et al. Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis[J]. *LWT*, 2019, 105: 272–281.