

乳酸菌

——在畜牧业中的应用

王春风 主编

吉林科学技术出版社

责任编辑：司荣科
封面设计：张云龙

ISBN 7-5384-3236-1



9 787538 432367

定 价：32.00 元

乳酸菌

——在畜牧业中的应用

王春风 主编

吉林科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

乳酸菌:在畜牧业中的应用/王春风主编. —长春:

吉林科学技术出版社, 2006

ISBN 7-5384-3236-1

I. 乳... II. 王... III. 乳酸细菌—应用—畜牧业
IV. ①Q939.11②S8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 109501 号

乳酸菌——在畜牧业中的应用

王春风 主编

责任编辑 司荣科 封面设计 张云龙

*

吉林科学技术出版社出版、发行

长春市东文印刷厂印刷

*

850×1168 毫米 32 开本 10.25 印张 250 000 字

2005 年 7 月第 1 版 2005 年 7 月第 1 次印刷

定价:32.00 元

ISBN 7-5384-3236-1/S·392

版权所有 翻印必究

如有印装质量问题,可寄本社退换。

社址 长春市人民大街 4646 号 邮编 130021

发行部电话 0431-5677817 5635177

电子信箱 JLKJCBS@public.cc.jl.cn

传真 0431-5635185 5677817

网址 www.jkpbs.com 实名 吉林科技出版社

主 编 王春风

主 校 王红宁

编 者 (以姓氏笔画排列)

王会岩 叶丽萍 吴庆海 张云龙

胡静涛 杨桂连 赵 丹

编者序

1998年至2001年期间,本人在中国农业大学攻读博士学位期间进行博士论文研究题目是《共生乳酸杆菌非抗性表达载体的构建及柔嫩艾美耳球虫S07基因的表达》。由于该研究内容在预防兽医学领域具有一定的创新性,因此我对该研究内容产生了极大的兴趣。

博士毕业后回到了母校—吉林农业大学,非常幸运的是该研究领域得到了吉林农业大学青年教师启动基金(No. 2002-QQN-002)、中国博士后科学基金项目(No. 2002031156)、吉林省科技厅项目(No. 20020220)、吉林省杰出青年基金(No. 20030118)、国家自然科学基金项目(No. 30200199)和国家863计划(No. 2003AA241121002)的继续资助。

这些较好的科研条件极大地鼓舞了我和我的学生们,促使我们致力于科研的探索和决心为乳酸菌在畜牧业中的研究与应用方面贡献我们的一份力量。

为此,我们在汲取国内和国际乳酸菌学家的理论与实践的基础上,并结合我们自己这几年的科研工作,编写了《乳酸菌在畜牧业中的应用》这本书,该书介绍了乳酸菌的遗传与基因工程的最新发展动态和研究成果,同时保留了乳酸菌的益生功能在畜牧业中的重要作用。我们希望本书能为从事乳酸菌教学和科研的人员及相关专业人员提供参考。

本书编写过程中,得到了中国农业大学刘尚高教授、吉林农业大学李玉教授、何昭阳教授、钱爱东教授极大的关心和支持;在稿件审阅中四川农业大学王红宁教授提出宝贵的意见和建议;

高云航博士、杨桂连博士、王会岩硕士、张鹏举硕士都做了大量深入细致的工作。

在此一并表示我最衷心的感谢。

由于乳酸菌的研究进展日新月异，天天有新研究成果发表，并且它涉及的知识十分广泛。虽然我们尽可能较全面系统地反映和介绍当今国内外乳酸菌在畜牧业研究方面的状况和资料。囿于我们的知识面和学术水平，疏漏和错误在所难免，恳请同行和读者批评、斧正。

王春风

2005 年 8 月于吉林农业大学

目 录

第一章 乳酸菌的分类鉴定	(1)
第一节 乳酸菌及其分类地位	(1)
第二节 革兰氏阳性无芽孢杆菌	(6)
第三节 形成内生芽孢的杆菌	(25)
第四节 革兰氏阳性兼性厌氧球菌	(28)
第五节 不规则形的专性厌氧菌	(42)
第六节 分子生物学方法在乳酸菌分类鉴定中的应用 ..	(49)
参考文献	(59)
第二章 乳酸菌的分离培养的保藏	(66)
第一节 乳酸菌的培养	(66)
第二节 乳酸菌的保藏	(83)
参考文献	(90)
第三章 乳酸菌在动物体内的分布	(92)
第一节 乳酸菌在反刍动物体内的分布	(92)
第二节 乳酸菌在单胃动物体内的分布	(96)
第三节 乳酸菌在家禽体内的分布	(103)
第四节 乳酸菌在水生动物体内的分布	(108)
第五节 乳酸菌在特种动物和实验动物体内的分布	(110)
参考文献	(113)
第四章 乳酸菌的代谢	(115)
第一节 乳酸菌的营养	(116)
第二节 乳酸菌碳源的分解代谢	(119)
第三节 乳酸菌的蛋白水解系统	(127)

第四节 乳酸菌对有机酸的代谢	(130)
第五节 乳酸菌的代谢产物	(137)
参考文献	(148)
第五章 乳酸菌在发酵饲料中的应用	(151)
第一节 发酵饲料概述	(151)
第二节 乳酸菌在微生物发酵秸秆饲料中的应用	(156)
第三节 乳酸菌在微生物发酵液体饲料中的应用	(165)
参考文献	(171)
第六章 乳酸菌在青贮饲料中的应用	(173)
第一节 概述	(173)
第二节 青饲料的种类	(174)
第三节 青贮的原理	(178)
第四节 青贮中的有益微生物与添加剂	(180)
第五节 青贮饲料的制备工艺	(185)
第六节 青贮饲料的质量的评定	(189)
第七节 青贮饲料的使用	(193)
参考文献	(198)
第七章 乳酸菌在微生物饲料添加剂中的应用	(200)
第一节 概述	(201)
第二节 乳酸菌饲料添加剂	(210)
第三节 微生物饲料添加剂的生产工艺	(214)
第四节 微生物饲料添加剂与环境保护	(218)
参考文献	(221)
第八章 乳酸菌在动物疾病防制中的应用	(223)
第一节 概念	(223)
第二节 乳酸菌预防疾病的机制	(224)
第三节 乳酸菌与黏膜免疫	(231)
第四节 乳酸菌在动物疾病防制中的应用	(247)

参考文献	(257)
第九章 乳酸菌的遗传与基因工程	(260)
第一节 乳酸菌的染色体组成与特征	(260)
第二节 乳酸乳球菌基因克隆和表达系统	(279)
第三节 乳酸杆菌基因转化质粒载体系统	(281)
第四节 食品级载体表达系统	(285)
第五节 乳酸菌的未来	(295)
参考文献	(301)

第一章 乳酸菌的分类鉴定

第一节 乳酸菌及其分类地位

一、乳酸菌的概念

乳酸菌是什么？不同研究领域的专业人员所给出的答案各不相同。通常认为乳酸菌是一类能够代谢糖类、产生 50% 以上乳酸的细菌通称。它们具有一定的蛋白质水解能力，但对脂肪分解能力相对较弱。具有这些功能的细菌包括：乳酸杆菌（*Lactobacillus*）、链球菌（*Streptococcus*）、念球菌（*Leuconostoc*）等。这些细菌广泛的分布于世界各地，人体以及动物的体内都有着大量的乳酸菌。它们在工业、农业以及医学等领域发挥着重要作用。乳酸菌为习惯用语，并不是分类学上的正式用语，在 20 世纪初就形成了这样一个缺乏严格定义的习惯名称。当时“*Lacticacid bacteria* (LAB)”与“使牛乳酸败的生物”是同义词。所以，最先从牛乳中分离纯化的一种细菌被称为“*Bacterium lactis*”（可能相当于现在所称的“*Lactococcus lactis*”）。当发现使乳酸败的细菌与从其他环境中分离到的产乳酸细菌具有相似性以后，对这些细菌的分类及命名有了长足的进步。然而，即使当 Orla - Jensen 等在 1919 年将自己对这些产乳酸细菌分类及命名的结果发表后，关于乳酸菌的概念仍然混淆不清。Orla - Jensen 等的分类方法在乳酸菌分类学上有重大的意义，尽管至今在很大的程度上已经被修改。虽然乳酸菌的名称并不能够科学的概括它的特性，但是却易于为人们所理解和接受，因此沿用至今。传统的理解乳酸菌的

范围比较狭窄。随着现代生物技术以及分子生物学的迅速发展,乳酸菌的包含范畴正在逐步的扩大,它所涉及的相关科属也随之增加。在对这些菌群进行系统的研究以前,有必要对它的分类以及所涉及到的相关科属进行了解。

二、分类地位

因为不存在对乳酸菌的明确定义,一般的关于乳酸菌的描述难免会遇到例外的情况。比较贴切的描述是:革兰氏阳性,细胞色素缺失,触酶阴性,不生成芽孢,厌氧环境中生存,对氧具有一定的耐受性;需要的营养丰富,营养需求苛刻,在糖发酵时进行严格的发酵方式,耐酸,最终产物为乳酸。根据以上比较典型的乳酸菌定义及特征描述,目前乳酸菌的分类在国际上较为通用的是 Bergey 氏细菌鉴定手册(以下简称手册),该书自 1923 年问世以来至今已有 9 个版本,以第 7 版和第 8 版(见表 1-1)

表 1-1 乳酸菌的分类位置简表

Bergey 氏细菌鉴定手册		Bergey 氏系统细菌学手册 新版(1984~1989)	近年建立的新属
第 7 版(1957)	第 8 版(1974)		
裂殖菌纲	原核生物界	第 12 部分 革兰氏阳性球菌科 II 异常球菌科	I. 革兰氏阳性球菌
真细菌目	细菌部分	其他属	肠球菌属(1984)
科 X. 乳杆菌科	第 14 部分 革兰氏阳性球菌	链球菌属	乳球菌属(1984)
I. 链球菌族	a. 好氧和/或兼性厌氧菌科 II 链球菌科	化脓溶血链球菌	漫游球菌属(1989)
1. 双球菌属	1. 链球菌属	口腔链球菌	糖球菌属(1984)
2. 链球菌属	2. 明串珠菌属	乳酸链球菌	四联球菌属(1990)
3. 片球菌属	3. 片球菌属	肠球菌	酒球菌属(1995)
4. 明串珠菌属	4. 气球菌属	厌氧链球菌	乳球形菌属(1995)
II. 乳杆菌族	5. 李生菌属	其他链球菌	营养缺陷菌属(1995)
1. 乳杆菌属		明串珠菌属	II. 革兰氏阳性无芽孢杆菌和不规则杆菌
科 XII. 棒杆菌科	第 15 部分 形成内生芽孢杆菌和球菌	片球菌属	肉食杆菌属(1987)
2. 利斯特氏菌属			

续表

Bergey氏细菌鉴定手册		Bergey氏系统细菌学手册 新版(1984-1989)	近年建立的新属
第7版(1957)	第8版(1974)		
3. 丹毒丝菌属	科 I. 芽孢杆菌科 1. 芽孢杆菌属 少数种 2. 芽孢乳杆菌属 第16部分 革兰氏阳性无芽孢杆菌 科 I. 乳杆菌科 乳杆菌属 位置未定属 丹毒丝菌属 第17部分 放线菌和 有关菌位置未定属微 杆菌属 放线菌目 放线菌科 属 III. 双歧杆菌属	气球菌属	奇异菌属(1992) 魏斯氏菌属 (1993)
4. 微杆菌属		孪生菌属	
科 VII. 芽孢杆菌科		第13部分 形成内生 芽孢的杆菌和球菌	
2. 芽孢杆菌属 少数种		芽孢杆菌属	
		芽孢乳杆菌属	
		第14部分 规则无芽 孢革兰氏阳性杆菌	
		乳杆菌属	
		丹毒丝菌属	
		环丝菌属	
		第15部分 不规则无 芽孢革兰氏阳性杆菌	
		微杆菌属	
		双歧杆菌属	

进行比较, 会发现这二个版本在对乳酸菌的分类鉴定上已经有了很多不同的地方。比如在手册7版中产乳酸的细菌列入真细菌目 (*Eubacteriales*) 下的乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、棒杆菌科 (*Corynebacteriaceae*) 和芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的有关属内; 在手册第8版列入不同部分的链球菌科 (*Streptococcaceae*)、芽孢杆菌乳杆菌科和放线菌目 (*Actinomycetales*) 下放线菌科 (*Actinomycetales*) 的有关属。手册的新版中在不同部分的乳酸菌的有关属与第8版比较增加了环丝菌属 (*Brochothrix*), 链球菌属 (*Streptococcus*) 中分别不同的类型菌加以描述, 属中的内容也大为丰富, 增加了许多新种。手册的第7版出版以后乳酸菌各属的分类情况发生很大的变动。以前的“*Streptococcus*”被分为三个属: *Enterococcus* (*E.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Streptococcus sensu stricto* (严格意义的链球菌)。后来, 其中部分可运动、类似乳球

菌的乳酸菌重新组成一个新的属：*Vagococcus* (V.)。而乳杆菌属 (*Lactobacillus*) (*Leuconostoc*, *Pediococcus*) 的分类情况则基本上没有大的变动，但是其中部分以前被归入乳杆菌属的棒型乳酸菌被划分到一个新的属：*Carnobacterium* 肉食杆菌属；以前的 *Pediococcus halophilus* 被升格为一个新的属：*Tetragenococcus* 四联球菌属；部分曾属于 *Lactobacillus* 或 *Leuconostoc* 的兼性发酵乳酸菌构成了一个独立的遗传簇，被分离出来形成另外一个属：*Weissella*；以前的 *Leuconostoc oenos*，即“葡萄酒明串珠菌”也被升格为一个新的属：*Oenococcus* (葡萄球菌属)。此外，在 1992 年以后，部分以前被归入乳酸菌不同属的菌株由于生理或遗传起源关系方面的原因，从中划分出多个新的属，如：*Alloiococcus*，*Dolosigranulum*，*Globicatell*，*Lactosphaera* 等，由于这些新的属仅代表一些特殊的案例，以后不再详细介绍。1986 年以后乳酸菌分类的变化主要是来自化学分类和遗传学方面的数据。

由上述的乳酸细菌分类简史和表 1-1 所示，随着细菌分类研究的不断深入，也进一步明确了乳酸细菌有关属的分类位置，而且陆续发现不少新属，乳酸细菌的范围也日益扩大，按本章第一节开始提到的定义和划定其范围的方法，目前在自然界已发现的这类菌在细菌分类学上现在划分至少有 23 个属，涉及到有关属则更多，有的是其中属的少数成员。

这些属包括：乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、奇异菌属 (*Atopobium*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*)、利斯特氏菌属 (*Listeria*)、芽孢乳杆菌属 (*Sporolactobacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 中的少数种、环丝菌属 (*Brochthrix*)、丹毒丝菌属 (*Erysipelothrix*)、孪生菌属 (*Gemella*)、

糖球菌属 (*Saccharosphaera*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、酒球菌属 (*Oenococcus*)、乳球菌属 (*Lactosphaera*)、营养缺陷菌属 (*Abiotrophia*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)。乳酸细菌现在有 23 个属, 它们的简况见表 1-2。

表 1-2 乳酸菌的有关属简表

细菌类别和属名	属的建立者和年代	模式种的种名	来 源
革兰氏阳性 无芽孢杆菌			
乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>)	Beijerinck 1901	德氏乳杆菌 (<i>L. delbrueckii</i>)	来源很广泛: 人和动物口腔、肠道、人的阴道, 发酵植物、乳品、肥料和污物、污水等
肉食杆菌属 (<i>Carnobacterium</i>)	Collins 等, 1987	歧异肉食杆菌 (<i>C. divergens</i>)	病鱼、鸡和湖底层水
利斯特氏菌属 (<i>Listeria</i>)	Pirie 1940	单核细胞增生利斯特氏菌 (<i>L. monocytogenes</i>)	污水、腐烂植物、人和动物粪便、临床样品等
环丝菌属 (<i>Brochothrix</i>)	Sneath 等, 1976	热死环丝菌 (<i>B. thermosphacta</i>)	腐败肉、土壤和草
丹毒丝菌属 (<i>Erysipelothrix</i>)	Rosenbach 1909	猪丹毒丹毒丝菌 (<i>E. rhusiopathiae</i>)	通常寄生于哺乳动物、鸟类和鱼体
形成内生芽孢的杆菌			
芽孢乳杆菌属 (<i>Sporolactobacillus</i>)	Ritahara 等, 1969	菊糖芽孢乳杆菌 (<i>S. inulinus</i>)	鸡饲料、土壤和发酵引子等
芽孢杆菌属内 产乳酸的成员 <i>Lactic acid producing species of Bacillus</i>	Cohn 1872	代表性的种: 凝结芽孢乳杆菌 (<i>B. coagulans</i>)	罐头食品、乳品、土壤和堆肥等
革兰氏阳性兼 性厌氧球菌			
链球菌属 (<i>Streptococcus</i>)	Rosenbach, 1884	酿脓链球菌 (<i>S. pyogenes</i>)	人的口腔、呼吸道、人和动物粪便、乳品和临床样品等
肠球菌属 (<i>Enterococcus</i>)	Schleifer 等, 1984	粪肠球菌 (<i>E. faecalis</i>)	人和动物肠道、蔬菜和一些植物及临床样品等
乳球菌属 (<i>Lactococcus</i>)	Schleifer 等, 1985	乳酸乳球菌 (<i>L. Lactic</i>)	生牛奶、乳品和病鱼等
漫游球菌属 (<i>Vagococcus</i>)	Collins 等, 1989	河漫游球菌 (<i>V. fluvialis</i>)	粪便、河水和鲑鱼
片球菌属 (<i>Pediococcus</i>)	Balcke 1884	有害片球菌 (<i>P. damnosus</i>)	发酵植物、变质啤酒
四联球菌属 (<i>Tetragenococcus</i>)	Collins 等, 1990	嗜盐四联球菌 (<i>T. halophilus</i>)	发酵鱼沙司和鱼肝沙司
气球菌属 (<i>Aerococcus</i>)	Williams 等, 1953	绿色气球菌 (<i>A. viridans</i>)	空气、灰尘和植物、盐腌肉和临床样品
明串珠菌属 (<i>Leuconostoc</i>)	Van Tieghem, 1878	肠膜明串珠菌 (<i>L. mesenteroides</i>)	水果、蔬菜、泡菜、乳品和糖粘液

续表

细菌类别和属名	属的建立者和年代	模式种的种名	来 源
酒球菌属 (<i>Oenococcus</i>)	Dicks 等, 1995	酒类酒球菌 (<i>O. oeni</i>)	果酒
魏斯氏菌属 (<i>Weissella</i>)	Collins 等, 1993	绿色魏斯氏菌 (<i>W. viridescens</i>)	变色腌、熏肉制品和 巴氏灭菌牛奶等
乳球形菌属 (<i>Lactosphaera</i>)	Jarssen 等, 1995	巴氏乳球形菌 (<i>L. pasteurii</i>)	缺氧的消化污泥
营养缺陷菌属 (<i>Abiotrophia</i>)	Kawamura 等, 1995	欠缺营养缺陷菌 (<i>A. defectans</i>)	原链球菌属内的营养 变异菌株
孪生球菌属 (<i>Cemella</i>)	Berger 1960	溶血孪生球菌 (<i>G. haemolysans</i>)	寄生于人的口腔、肠 道和呼吸道
糖球菌属 (<i>Saccharococcus</i>)	Nystrand 1984	嗜热糖球菌 (<i>S. thermophilus</i>)	精制糖和糖液
不规则形的专性厌氧菌			
双歧杆菌属 (<i>Bifidobacterium</i>)	Orla - Jensen, 1924	两歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)	人和动物粪便、人齿、 牛瘤胃、污水和发酵 牛奶等
奇异菌属 (<i>Atopobium</i>)	Collins 等, 1992	微小奇异菌 (<i>A. minutum</i>)	会阴脓肿、人的齿龈

第二节 革兰氏阳性无芽孢杆菌

一、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)

乳酸杆菌属是乳酸菌中最大的一个属，由一系列在表现性状、生化反应和生理特性方面具有明显差异的种组成，乳杆菌属内种之间的差异也比较大。从该属内不同种的 G + Cmol% 的差异就可以反映出种与种之间的亲缘关系比较远（见图 1-1）

该属细菌 (G + C)% 的范围为 32% ~ 53%，几乎超过了作为单一属可接受范围的 2 倍。造成该属内种的数目庞大，相互之间亲缘关系迥异的原因在于其属的定义，乳酸杆菌属的基本描述是：杆状，细胞形态多样，从长的和细长状到弯曲形及短杆，也常有棒形球杆状。

一般形成链，通常不运动，运动者则具有周生鞭毛，无芽孢革兰氏染色阳性，微好氧，在固体培养基上培养时，通常厌氧条

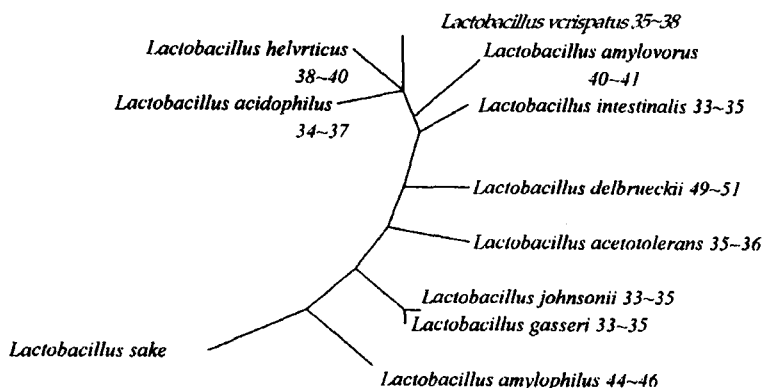


图 1-1 乳杆菌属内 *Lb. acidophilus* 组内的种与其他乳杆菌之间根据 16S rRNA 序列比较所获得的遗传亲缘关系，同时列出了其 (G + C)% (Schleifer 等, 1995)。

件或减少氧压和充有 5% ~ 10% CO₂ 可增加其表面生长物，有些菌株在分离时就是厌氧的。专性分解糖，在碳的终产物中至少一半是乳酸盐。发酵代谢，副产物可能是乙酸盐、乙醇、CO₂ 甲酸盐或琥珀酸盐。不产生多于 2 个碳原子的挥发性酸。极少见硝酸盐还原反应，只有 pH 值最终平衡在 6.0 以上时才能还原硝酸盐。不液化明胶。不分解酪素。但大多数菌株能产生少量的可溶性氮。不产吡啶和 H₂S。接触酶阴性，无细胞色素。极少数菌株以假接触酶分解过氧化物。联苯胺反应阴性。罕见产色素者，如有色素则是黄或橙色到锈红或砖红色。营养要求复杂，需要氨基酸、肽、核酸衍生物、盐类、脂肪酸或脂肪酸脂类和可发酵的碳水化合物。一般说来，每个种都有特殊的营养要求，常常有些营养仅是某些菌株所需求的。

最适温度一般是 30℃ ~ 40℃，生长温度范围 2℃ ~ 53℃。耐酸，最适 pH 通常为 5.5 ~ 6.2；一般在 pH 5.0 或更低的情况下可