



华夏英才基金学术文库

张和平 主编

自然发酵乳制品中 乳酸菌生物多样性



科学出版社



华夏英才基金学术文库

自然发酵乳制品中乳酸菌 生物多样性

张和平 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书的内容由内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室十多年的研究成果和国际上乳酸菌方面最新的研究前沿技术汇编而成。全书以内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库 3388 株乳酸菌的分离、鉴定为基础数据,结合近几年微生物和分子生物学领域出现的新技术和新方法在乳酸菌研究中的应用,以新颖的研究思路和方法,系统阐述了中国少数民族地区自然发酵乳制品(酸马奶、酸牛奶、酸羊奶、酸驼奶、酸牦牛奶等)和其他自然发酵食品(酸粥、酸面团、发酵泡菜等)中乳酸菌的生物多样性。

本书的读者对象主要为乳酸菌相关产业、乳品工业、益生菌领域的本科生、研究生及广大科研工作者和研究技术人员。

图书在版编目(CIP)数据

自然发酵乳制品中乳酸菌生物多样性 / 张和平主编. —北京: 科学出版社, 2012

(华夏英才基金学术文库)

ISBN 978-7-03-032916-5

I. ①自… II. ①张… III. ①发酵食品: 乳制品—乳酸菌发酵—生物多样性—研究 IV. ①TS252.54

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 246764 号

责任编辑: 吴兆东 罗 静 / 责任校对: 林青梅

责任印制: 钱玉芬 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 1 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2012 年 1 月第一次印刷 印张: 21 3/4 插页: 8

字数: 452 000

定价: 88.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《自然发酵乳制品中乳酸菌生物多样性》

编写人员名单

主 编 张和平
参编人员 刘文俊 孙志宏 张文羿
 陈永福 包秋华

前 言

自然发酵乳制品和其他自然发酵食品的制作是经过乳酸菌和酵母菌的共同发酵过程实现的。乳酸菌是影响其风味和成品质量的关键因素。中国少数民族地区自然发酵乳制品的制作和食用已有几千年的历史,经过几千年的自然选择和驯化,一些具有优良发酵特性和益生作用的乳酸菌保留下来。但是,随着我国经济和工业文明的发展,少数民族几千年沿袭的游牧生活日渐式微,自然发酵乳制品的制作和食用在其日常生活中的地位越来越显得不十分重要。随着传统发酵乳制品制作的减少,蕴藏在其中珍贵的乳酸菌资源也必将减少,最终甚至丢失。因此,及时发掘、收集、保藏我国少数民族几千年流传下来的自然发酵乳制品中的乳酸菌资源,建立乳酸菌菌种资源库,使这一宝贵的资源得到保护,对今后我国乳酸菌资源可持续利用及提升我国乳品工业的核心技术有着重要的战略意义。

内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室从2001年开始,围绕少数民族地区自然发酵乳制品(及其他发酵食品)的制作工艺、微生物成分分析和我国乳品工业所需的核心技术,在乳酸菌菌种分离、鉴定、收集及菌种资源库的建设、乳酸菌生物多样性研究等方面取得了一批创新性研究成果。

本书以内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室近十年的乳酸菌菌种资源库建设和乳酸菌基础研究为背景,以中国自然发酵乳制品和其他发酵食品中3388株乳酸菌分离、鉴定及多样性研究数据为材料,结合近几年微生物和分子生物学领域出现的新技术和新方法在乳酸菌研究中的应用,以新颖的研究思路和方法,阐述中国自然发酵乳制品和其他发酵食品中乳酸菌的生物多样性。辅以详实的科研数据、大量的实物描述和图片展示,对中国少数民族地区自然发酵乳制品及其他发酵食品中乳酸菌的生物学种属归类、形态特征、生理生化特点以及遗传多样性做详细论述。

全书分为4章,第一章乳酸菌的分类及生理生化特性由张和平博士撰写,第二章自然发酵乳中乳酸菌的物种多样性由刘文俊博士撰写,第三章自然发酵乳中乳酸菌的遗传多样性研究方法由孙志宏博士撰写,第四章自然发酵乳(及其他发酵食品)中乳酸菌分离株目录由刘文俊博士、孙志宏博士、张文羿博士、陈永福博士和包秋华博士等撰写,全书由张和平博士统稿。

本书中的研究成果是在农业部现代农业产业技术体系建设项目(nycytx-0501)、

“973”计划前期研究专项(2010CB134502)、“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2009BADC1B01)、“863”计划(2006AA10Z345、2011AA100902)、国家自然科学基金(30560097、30760156、30800861和31025019)、教育部创新团队发展计划(IRT0967)、教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0269)、国家自然科技资源共享平台项目子项目(2005DKA21208-12)和内蒙古自治区自然科学基金重点项目(20080404ZD05)等资助下完成的,在此我们表示感谢。

除本书署名作者外,内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室的孟和毕力格教授、孙天松教授、吉日木图教授、王俊国副教授、钟智助理研究员,以及曾经在本实验室学习过的众多博士研究生和硕士研究生都参与过乳酸菌的分离鉴定及生物多样性研究,在此一并表示感谢。

编 者

2011年9月于内蒙古

目 录

前言

第一章 乳酸菌的分类及生理生化特性	1
1.1 乳酸菌的分类	1
1.1.1 乳酸菌的概述	1
1.1.2 乳酸菌的分布及种属	2
1.1.3 乳酸菌的分类	4
1.2 乳酸菌的生理生化特性	16
1.2.1 乳酸菌的基本生理生化性状	16
1.2.2 乳酸菌的糖代谢类型	17
1.2.3 乳酸菌的主要糖类发酵途径	18
参考文献	29
第二章 自然发酵乳中乳酸菌的物种多样性	34
2.1 乳源乳酸菌的种属	34
2.1.1 肠球菌属	34
2.1.2 乳杆菌属	35
2.1.3 乳球菌属	48
2.1.4 明串珠球菌属	51
2.1.5 片球菌属	55
2.1.6 链球菌属	59
2.1.7 双歧杆菌属	64
2.2 不同乳源自然发酵乳中乳酸菌多样性	70
2.2.1 自然发酵酸马奶中乳酸菌多样性	70
2.2.2 自然发酵酸驼奶中乳酸菌多样性	77
2.2.3 自然发酵酸牛奶及其制品中乳酸菌多样性	81
2.2.4 自然发酵酸羊奶中乳酸菌多样性	86
2.2.5 自然发酵酸牦牛奶中乳酸菌多样性	88
参考文献	94

第三章 自然发酵乳中乳酸菌的遗传多样性研究方法	100
3.1 基于核糖体 DNA 分析方法	101
3.1.1 16S rDNA 序列同源性分析	101
3.1.2 rRNA 转录间隔区序列分析	102
3.1.3 16S rRNA 扩增片段的碱基差异分析	103
3.2 DNA 指纹图谱技术	105
3.2.1 限制性片段长度多态性分析	105
3.2.2 扩增核糖体 DNA 限制性片段长度多态性分析	106
3.2.3 随机扩增多态性 DNA 技术	107
3.2.4 扩增片段长度多态性分析	108
3.2.5 脉冲场凝胶电泳分析	112
3.2.6 基因简单重复序列 PCR 标记	112
3.3 多位点序列分型	116
3.4 规律成簇的间隔短回文重复	118
3.5 基因网络构建系统进化树	119
参考文献	121
第四章 自然发酵乳（及其他发酵食品）中乳酸菌分离株目录	124
4.1 肠球菌属	124
4.2 乳杆菌属	134
4.3 乳球菌属	271
4.4 明串珠球菌属	292
4.5 片球菌属	314
4.6 链球菌属	315
4.7 魏斯氏菌属	335
附录 乳酸菌常用培养基及配方	337

第一章 乳酸菌的分类及生理生化特性

1.1 乳酸菌的分类

1.1.1 乳酸菌的概述

乳酸菌 (lactic acid bacteria) 是一群形态、代谢和生理特征不完全相同, 发酵多种碳水化合物生成乳酸的细菌的总称。一般来讲, 对乳酸菌的描述都是从其形态、运动性和生理生化特征等方面进行的。这类微生物共有的特征为革兰氏染色呈阳性, 过氧化氢酶呈阴性, 不形成芽孢, 不运动或很少运动, 细胞呈球形或杆状, 糖类发酵的最终产物主要为乳酸。从前, 人类在还不知道乳酸菌存在的情况下, 就已将它广泛应用于食物制作、保存和风味改善等方面, 为人类生产、生活发挥着重要作用。自从发现乳酸菌, 并逐步认识到诸多可利用的优良性状后, 人类对乳酸菌研究和利用的浓厚兴趣不亚于对任何其他新鲜事物。乳酸菌是一类分布极广的微生物, 在乳制品和其他传统发酵食品中作为优势菌群较为多见。乳酸菌从发现到广泛应用于乳制品等发酵食品和医药保健制品中已有一个多世纪的历史。

荷兰科学家 Antony Van Leeuwenhoek 于 1667 年发明了显微镜, 成为第一位观察并描述微生物的人。1857~1863 年, 法国科学家 Louis Pasteur 在关于乳酸发酵过程的研究中发现了乳酸菌的存在。随后他通过乙酸发酵和丙酸发酵等一系列的研究工作, 提出发酵是由特定微生物在“无空气的”状态下引起的现象。十年之后的 1873 年, 无菌手术的创始者英国外科医生 Joseph Lister 博士, 将酸奶经过反复稀释培养后纯化分离到了乳酸菌的第一个纯培养物 “*Bacterium lactis*”。也正是这一年, Hansen 分离获得酵母菌纯培养物。1884 年, Hueppe 首次将“酸奶细菌”命名为乳酸菌。而乳酸菌作为干酪和酸奶发酵剂的应用, 早在 1890 年就有所报道。1889 年, 巴斯德研究院的 Tissier 从人肠道中发现了 *Bacillus bifidus*, 即双歧杆菌。1900 年, 澳大利亚儿科医生 Moro 从婴儿粪便中分离到乳酸菌新种嗜酸乳杆菌 (*Bacillus acidophilus*), 后来被重新命名为 *Lb. acidophilus*。这两种肠道细菌的发现, 对后来的肠道微生物区系的研究以及微生态制剂的开发、应用产生了重要作用。特别是, 梅契尼科夫和他的同事 Louden Duglas 分别出版了乳酸菌相关的《长寿说》和《长寿杆菌》等著作, 为益生菌的认识、研究和应用奠定

了重要基础。现在双歧杆菌作为主要的益生菌，广泛应用于人类肠道菌群调整和抗病能力的增强等各个方面，创造了不可估量的价值。乳酸菌的分类学经过近半个世纪的发展和积淀，到 20 世纪 60 年代，在 Tittsler、Rogosa、Sharpe 和光冈知足等研究人员的共同努力下，才逐渐确立了乳酸菌的分类方法。从此，乳酸菌的分类、研究和应用进入了快速发展时期。

1.1.2 乳酸菌的分布及种属

乳酸菌的分布较广泛，通常存在于营养丰富的乳、肉、蔬菜等食品和植物体中，也有部分种类和一定数量的乳酸菌存在于人类和其他哺乳动物的口腔、肠道和阴道等环境中，是构成特定区域正常微生物菌群的重要成员。

人和动物体中的乳酸菌主要分布于消化系统、呼吸系统、泌尿系统、皮肤和粪便等。口腔是人体与外界相通的重要部位，有研究表明口腔中包含有 600 多种不同的细菌、病毒和真菌微生物 (Nasidze *et al.*, 2009)，这些微生物包括有好氧、兼性厌氧、专性厌氧和微需氧等类群。口腔中发现的乳酸菌有乳杆菌属、双歧杆菌属和链球菌属，其中乳杆菌属有：唾液乳杆菌 (*Lb. salivarius*)、旧金山乳杆菌 (*Lb. sanfranciscensis*)、口乳杆菌 (*Lb. oris*)、干酪乳杆菌 (*Lb. casei*)、嗜酸乳杆菌 (*Lb. acidophilus*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lb. rhamnosus*)、发酵乳杆菌 (*Lb. fermentum*)、短乳杆菌 (*Lb. brevis*)、植物乳杆菌 (*Lb. plantarum*)、纤维二糖乳杆菌 (*Lb. cellobiosus*)、齿龈乳杆菌 (*Lb. uli*) 等；双歧杆菌属乳酸菌有：*B. eriksonii*、牙双歧杆菌 (*B. dentinum*)；链球菌属乳酸菌有：唾液链球菌 (*S. salivarius*)、缓症链球菌 (*S. mitis*) 等。

从目前已发表的文献来看，人体消化道和粪便中的乳酸菌主要有乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等乳酸菌种属 (Rogosa *et al.*, 1953；张刚, 2007)。人体肠道和粪便中检测到的乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 乳酸菌有：嗜酸乳杆菌 (*Lb. acidophilus*)、发酵乳杆菌 (*Lb. fermentum*)、唾液乳杆菌 (*Lb. salivarius*)、乳乳杆菌 (*Lb. lactis*)、干酪乳杆菌 (*Lb. casei*)、植物乳杆菌 (*Lb. plantarum*)、短乳杆菌 (*Lb. brevis*)；双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 乳酸菌有：两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)、长双歧杆菌 (*B. longum*)、婴儿双歧杆菌 (*B. infantis*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、角双歧杆菌 (*B. angulatum*)、小链双歧杆菌 (*B. catenulatum*) 等。

近年来，随着研究手段的进步和乳酸菌分离源研究范围的扩大，不同的研究机构从人体消化道和粪便中发现了大量新种，其中乳杆菌 (*Lactobacillus*) 新种有：胃窦乳杆菌 (*Lb. antri*)、链状乳杆菌 (*Lb. cateniformis*)、胃乳杆菌 (*Lb. gastricus*)、

卡利克斯乳杆菌 (*Lb. kalixensis*)、罗氏乳杆菌 (*Lb. rogosa*) 等。

人体泌尿系统中乳酸菌的优势菌群是乳杆菌 (*Lactobacillus*)，主要包括：嗜酸乳杆菌 (*Lb. acidophilus*)、发酵乳杆菌 (*Lb. fermentum*)、短乳杆菌 (*Lb. brevis*)、植物乳杆菌 (*Lb. plantarum*)、干酪乳杆菌 (*Lb. casei*)、乳乳杆菌 (*Lb. lactis*)、纤维二糖乳杆菌 (*Lb. cellobiosus*)、德氏乳杆菌 (*Lb. delbrueckii*)、布氏乳杆菌 (*Lb. buchneri*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lb. rhamnosus*)、瑞士乳杆菌 (*Lb. helveticus*)、加氏乳杆菌 (*Lb. gasseri*)、詹氏乳杆菌 (*Lb. johnsonii*)、阴道乳杆菌 (*Lb. vaginalis*)、近茎轴乳杆菌 (*Lb. fornicalis*) 等。另外，还有双歧杆菌属的部分菌种。

动物体中的乳酸菌主要存在于动物的消化道、体表和粪便中。Smith (1965)、Contrepolis 和 Gouet (1973) 证实了在小牛胃和上部肠道中乳酸菌是优势菌群。从动物消化道及粪便中检测到的乳杆菌 (*Lactobacillus*) 有：乳乳杆菌 (*Lb. lactis*)、发酵乳杆菌 (*Lb. fermentum*)、嗜酸乳杆菌 (*Lb. acidophilus*)、唾液乳杆菌 (*Lb. salivarium*)、德氏乳杆菌 (*Lb. delbrueckii*)、罗伊氏乳杆菌 (*Lb. reuteri*)、动物乳杆菌 (*Lb. animalis*)、鸟乳杆菌 (*Lb. aviarius*)、鸟乳杆菌不解棉籽糖亚种 (*Lb. aviarius* subsp. *araffinosus*)、瘤胃乳杆菌 (*Lb. ruminis*) 等。近年来，从动物消化道和粪便中发现的乳杆菌 (*Lactobacillus*) 新种的描述如下：2006 年，Osawa 等从野生小鼠粪便中发现了一个新种田鼠乳杆菌 (*Lb. apodemi*)；1984 年，Fujisawa 等从小鸡肠道和粪便中分离到了另一个乳杆菌新种——鸟乳杆菌 (*Lb. aviarius*)，这个种包括两个亚种，即鸟乳杆菌鸟亚种 (*Lb. aviarius* subsp. *aviarius*) 和鸟乳杆菌不解棉籽糖亚种 (*Lb. aviarius* subsp. *araffinosus*)；2003 年，Mukai 等从小鸡肠道中分离到了新种卡氏乳杆菌 (*Lb. kitasatonis*)。此外，鲸乳杆菌 (*Lb. ceti*) 是从突吻鲸上发现的一个乳杆菌新种 (Vela et al., 2008)；马乳杆菌 (*Lb. equi*) 是从马的粪便中分离到的一个乳杆菌新种 (Morotomi et al., 2002)。 *Lb. equicursoris* 也是从马粪便中分离到的一个新种 (Morita et al., 2010)。另一个研究小组，也是从良种赛马粪便中发现了另一个乳杆菌新种——驯马乳杆菌 (*Lb. equigenersi*) (Endo et al., 2008)。1988 年，Mitsuoka 和 Fujisawa 从仓鼠肠道中分离到新种——哈氏乳杆菌 (*Lb. hamsteri*)。近十年来，人们从许多动物肠道和粪便中分离、发现了大量的乳杆菌新种，例如，贲门乳杆菌 (*Lb. ingluviei*) 分离于鸽子肠道 (Baele et al., 2003)；黏液乳杆菌 (*Lb. mucosae*) 分离于猪肠道 (Roos et al., 2000)；虎豹乳杆菌 (*Lb. pantheris*) 分离于美洲虎粪便 (Liu and Dong, 2002)；神话猪乳杆菌 (*Lb. saerimneri*) 分离于猪粪便 (Pedersen and Roos, 2004)； *Lb. sobrius* 分离于乳猪肠道 (Konstantinov et al., 2006)；耐热乳杆菌 (*Lb. thermotolerans*) 分离于小鸡粪便 (Niamsup et al., 2003)。

乳制品中的细菌种类多、数量大并且活力强,尤其是在生乳中,常见的细菌有链球菌属 (*Streptococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、假单孢杆菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、变形杆菌属 (*Proteus*) 和微球菌属 (*Micrococcus*) 等,除这些细菌外还包括有多种致病菌。对乳制品生产不利的菌种会在乳制品的制作和成熟过程中大量减少。一部分由于不同的制作工艺 (如加热杀菌) 而除掉,另一部分在发酵过程中由于乳酸菌产酸和产生的抑菌物质的抑制作用而大量减少。乳制品成熟后,留在其中的主要是对产品品质和特性有益的菌种。

1.1.3 乳酸菌的分类

1.1.3.1 一般性描述

19 世纪后期,随着巴斯德微生物体系的形成和 R. Koch 的细菌分离培养技术的建立,新的细菌不断被发现和报道。对于乳酸菌来说,由于概念外延性较大,分类和命名多从各自实用的角度出发进行,使乳酸菌的分类和命名出现了一时混乱的局面。在这种情况下,Orla-Jensen 于 1919 年发表了乳酸菌的分类鉴定结果,这是一个具有里程碑意义的事件,该论文为乳酸菌的全盘分类奠定了基础,虽然其中的一些内容经过了多次很大程度的修订,但其分类基础仍被保留了下来,对乳酸菌的分类系统有着深远的影响。在论文中,Orla-Jensen 将以下生物学特性作为分类的基础:细胞形状 (球状或杆状,是否形成四连体)、葡萄糖发酵模式 (同型或异型发酵)、在特定温度下可否生长 (如 10℃、45℃)、可利用糖的种类等 (表 1-1)。随后,在 Tittsler、越智、光冈、Rogosa、Sharpe 等许多研究者的不懈努力下,直到 1960 年乳酸菌的分类才步入了正规。《伯杰氏系统细菌学手册》(第二版) (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ed) 是一部传承 Orla-Jensen (1919 年) 以来乳酸菌历史工作的重要著作,当我们试图介绍乳酸菌的时候,这一部著作是最好的开篇。

关于什么是乳酸菌的问题,该领域内的科学家们或许能给出一个整齐划一的答案。然而,乳酸菌涵盖的具体范围目前仍存在很多争议。根据其发展历史,业内人士一致认为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠球菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 是乳酸菌的核心组成。因此,乳酸菌具有宽泛的生理学特性。根据食品生物学家的观点,乳酸菌的主要成员还包括:气球菌属 (*Aerococcus*)、肉杆菌属 (*Carnobacterium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、酒球菌属 (*Oenococcus*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 等。

对于典型的乳酸菌比较贴切的描述是“革兰氏阳性、不形成芽孢、触酶阴性、

表 1-1 乳酸菌不同属的生理生化特性描述

特性	细胞杆状			细胞球状					球状和杆状			
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i> ^a
四联体形态	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
代谢葡萄糖 产 CO ₂ ^b	- ^c	±	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
10℃ 生长	+	±	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+
45℃ 生长	-	±	-	+	+	-	-	-	±	±	-	-
6.5% NaCl 生长	ND ^d	±	+	+	-	-	±	±	±	-	+	±
18% NaCl 生长	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
pH4.4 生长	ND	-	-	+	±	±	±	±	+	-	-	±
pH9.6 生长	-	±	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
乳酸构型 ^e	L	D、L、 DL ^f	L	L	L	L	D	D	L、DL ^f	L	L	D、DL ^f

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“±”表示属内种可变；“ND”表示未测试。a: *Weissella* 属内菌种有杆状形态；b: 用于区分葡萄糖的同型发酵和异型发酵，阴性为同型发酵，阳性为异型发酵；c: 在某些培养基上产生少量 CO₂；d: 已报道在 8% NaCl 下不能生长；e: 代谢葡萄糖产生乳酸的构型；f: 属内不同种产生的乳酸构型存在差异

细胞色素缺失、生活在厌氧环境中但对氧有一定的耐受性；营养要求苛刻、耐酸；对可利用的糖类发酵有严格的发酵方式，其终产物以乳酸为主的细菌”。但其中绝大多数性状会随着生活环境的变化产生一定的改变，唯一无可争议的是它们都为革兰氏阳性菌。随着人们对乳酸菌认识的深入和生命科学研究手段的进步，乳酸菌的分类经历了四个主要的发展时期，分别是经典分类时期、化学分类时期、数值分类时期和分子分类时期。在乳酸菌的经典分类模式中，将乳酸菌分成不同属的依据主要是形态学特征、葡萄糖发酵方式、生长温度特性、所产生乳酸的立体构象（D-、L-或 DL-）、在不同浓度 NaCl 中的生长能力，以及对酸、碱的耐受能力等特性（表 1-1）。在乳酸菌的化学分类时期，一些化学分类指标如代谢产物中脂肪酸的组成、细胞壁的组成等在乳酸菌的分类中发挥了非常重要的作用。20 世纪 80 年代以后，乳酸菌的正确分类越来越依赖于分子生物学技术，从而迎来了乳酸菌的分子分类时期。

1.1.3.2 属水平的分类

从乳酸菌发现和发展的历史来看，将乳酸菌划分为不同的属，仍然延续了 Orla-Jensen 的工作。主要通过细胞学形态、生长温度、糖发酵类型，将乳酸菌分为不同的类群。20 世纪 80 年代以前，乳酸菌学术界一直认为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、明串珠球菌属（*Leuconostoc*）、片球菌属（*Pediococcus*）、链球菌属（*Streptococcus*）是乳酸菌的核心组成，后来的许多属和种都是从这 4 个基本属中划分而来的。例如，乳球菌属（*Lactococcus*）、肠球菌属（*Enterococcus*）就是从链球菌属分出来的。随着乳酸菌研究的深入和先进的分类手段的应用，属水平上的分类逐步得到修订，许多新属被建立。在《伯杰氏系统细菌学手册》（第九版）中，除描述了符合典型乳酸菌的 4 个属 [气球菌属（*Aerococcus*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）、明串珠球菌属（*Leuconostoc*）、片球菌属（*Pediococcus*）] 外，还把原来的链球菌属划分为肠球菌属（*Enterococcus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）和严格意义上的链球菌属（*Streptococcus*）。随后，某些可以运动的乳酸菌从乳球菌属中划分出来形成了漫游球菌属（*Vagococcus*）。乳杆菌属（*Lactobacillus*）中某些细胞形态为杆状的种被划分出来形成了肉杆菌属（*Carnobacterium*）。嗜盐片球菌（*P. halophilus*）被提升为属的水平，形成了四联球菌属（*Tetragenococcus*）。随着 16S rRNA 基因序列在乳酸菌系统发育亲缘关系中的应用，更为精细的分类得以实现，从而也带来了乳酸菌新的分类体系。由于乳杆菌属和明串珠球菌属中的一些异型发酵乳酸菌形成了一个能明显区分的系统发育树分支，因此建立了魏斯氏菌属（*Weissella*）。

随着乳酸菌研究手段的更新和一些新属的建立，根据张刚 2007 年的著作以及目前发表于微生物分类学杂志 *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology 上的文献报道, 乳酸菌已经有 43 个属。由于篇幅所限, 本书中主要讨论来源于乳制品的乳酸菌的种属, 主要包括: 肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠球菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)。

1.1.3.3 种水平的分类

乳酸菌分布广泛、种属繁多, 在过去相当长一段时间内它的分类多依据表型和生化特性进行。然而, 在实际的菌株鉴定工作中, 难以提供准确、充分的表型和生化特性数据将一个菌株鉴定为特定的种。在细菌分类中, 细胞学形态能否作为关键特性仍存在疑问, 但在乳酸菌的分类描述中却很重要。乳酸菌在形态上分为杆状 (乳杆菌属和肉杆菌属) 和球状 (其他属), 一个例外是建立时间不长的魏斯氏菌属, 这是乳酸菌类群中第一个既含有杆状, 又含有球状形态菌种的属。从 20 世纪 90 年代开始, 有报道采用 16S rRNA 序列建立乳酸菌的系统发育, 从而开发出广泛用于不同生境乳酸菌种, 甚至亚种水平鉴定的 DNA 探针。目前, 随着快速、自动化 DNA 测序技术的出现和日臻完善, 对 16S rRNA 基因测序和 16S-23S rRNA 间区序列分析已成为乳酸菌鉴定的一个简单、快速、有力的方法。随着分子生物学的发展, 一些基于对微生物遗传物质进行分类鉴定的分子生物学方法取得很大进展, 近些年来出现的分子标记技术, 如限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphisms, RFLP)、肠道细菌基因间重复序列分析 (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)、随机扩增多态性 DNA 技术 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (amplification fragment length polymorphism, AFLP)、单链构象多态性分析 (single-strand conformation polymorphism, SSCP), 以及变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术和管家基因序列分析手段用于乳酸菌分类和鉴定, 可以更准确地将乳酸菌鉴定到种和亚种的水平。由于这些新技术在乳酸菌分类学上的应用, 也使其产生了许多新的种。

1.1.3.4 乳酸菌的系统发育

原核生物拥有简单的形态, 没有个体发育, 缺乏个体发育的化石记录。因此, 系统发育进化关系的研究只能借助于保守序列的比较研究和同系之间广泛分布的大分子的比较来推断。目前虽然有很多分子生物学手段, 如 RFLP、RAPD、DGGE 和管家基因 (*recA*、*pheS*、*hsp60* 和 *tuf*) 等序列分析, 用于乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 近缘种的鉴定。但有关乳酸菌种系发育关系的知识主要还是来源

于 16S rRNA 序列同源性研究 (Woese, 1977)。16S rRNA 基因作为细菌分类鉴定的有效手段是基于以下几点考虑的 (Felis and Dellaglio, 2007): ①核糖体基因是非常保守的, 这是因为核糖体在蛋白质合成中发挥着根本性作用, 它是在微生物进化的早期发展而来的; ②基因水平转移现象在核糖体基因中很少发生; ③不同个体核糖体基因序列的同源性程度反映了它们基因组的变化, 基于 16S rRNA 基因序列分析可把乳酸菌分为最少 12 个主要株系的后代, 即所谓的 12 个门。其他保守大分子如 23S rRNA, 延伸因子 Tu 或 ATP 酶的 β 亚基的序列比较分析可支持 16S rRNA 的数据。rRNA 序列比对是目前确定细菌系统发育关系的最快速和常用的方法, 在该技术刚开始用于细菌分类鉴定时, 序列比对通过 DNA-rRNA 杂交或寡核苷酸法 (对 rRNA 的酶切产物进行测序) 进行。现在, 分子生物学技术的发展可以使我们对很长的 rRNA 片段测序, 可以直接对 RNA 基因序列进行 PCR 扩增并测序。已开发出来能大规模处理高通量的序列数据, 并能够建立具有很高正确性的系统发育树的软件, 对大到整个细菌界, 小到微生物种的聚类, 都可以进行处理 (Hamilton-Miller *et al.*, 1999)。

从寡核苷酸法或 rRNA 序列获得的数据, 均显示革兰氏阳性菌具有相对紧密的系统发育关系。在真细菌的 12 个主要门中, 革兰氏阳性菌聚集在其中的 2 个门内, 但这 2 个门中的某些细菌并不具有典型的革兰氏阳性菌细胞壁。这两个革兰氏阳性菌聚集的门, 根据 DNA 的 (G + C) mol%, 分为高 G + C 部分和低 G + C 部分, 理论分界点是 50%, 事实上为 53% ~ 55%。某些种, 例如, 发酵乳杆菌 (*Lb. fermentum*) 和桥乳杆菌 (*Lb. pontis*) 明显属于低 G + C 部分, 但其 DNA 的 (G + C) mol% 却大于分界点。高 G + C 部分也称为放线菌门, 包括以下几个主要的属: 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*)、细杆菌属 (*Microbacterium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) (Woese, 1987; Stackebrandt *et al.*, 1988)。低 G + C 部分也称为梭菌部分, 涵盖了全部的乳酸菌, 以及好氧或兼性厌氧的属 (如 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Listeria*)、厌氧的属 (如 *Clostridium*、*Peptococcus*、*Ruminococcus*)。利用反转录酶和 PCR 技术, Collins 及其同事对乳酸菌各属间, 乳酸菌各属与低 G + C 含量部分菌的其他属间的系统发育关系作了详细研究 (Collins *et al.*, 1990; Wallbanks *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1993; Platteeuw *et al.*, 1995; de Felipe *et al.*, 1998)。乳酸菌在系统发育上形成一个“超级簇”, 位于严格厌氧的种 (如梭菌) 和兼性或严格好氧的种 (如葡萄球菌和芽孢杆菌) 之间, 与其“处在厌氧和好氧之间的门槛上”的生活方式一致 (Kandler and Weiss, 1986), 情况大致如此, 但也存在某些例外。乳酸菌类群的系统发育树见图 1-1, 这一部分内容主要基于 Col-

lins 及其同事的研究。

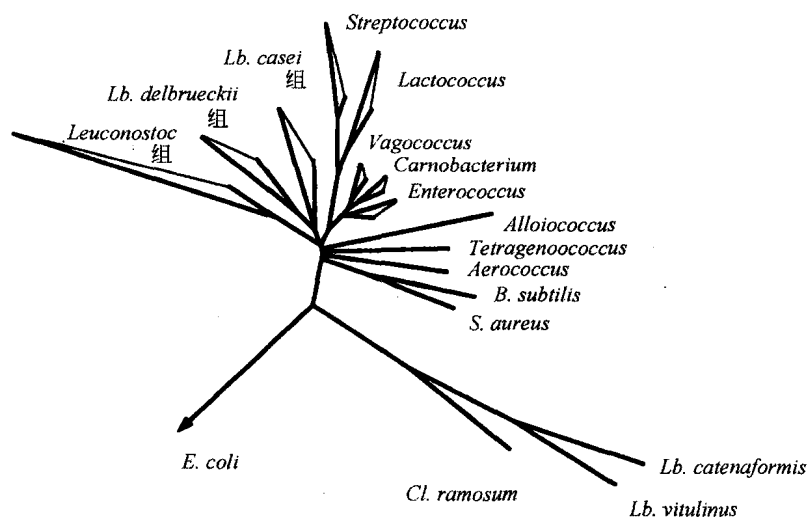


图 1-1 乳酸菌属 16S rRNA 系统发育进化树
(Wood 和 Holzapfel, 1995)

从图 1-1 可以看出, 根据系统发育亲缘关系的研究, 大多数乳酸菌的属可以得到明确的区分, 例如, 气球菌属 (*Aerococcus*)、肉杆菌属 (*Carnobacterium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、严格意义上的明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、酒球菌属 (*Oenococcus*)、严格意义上的链球菌属 (*Streptococcus*)、四联球菌属 (*Tetracoccus*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*), 每个属都形成一个内聚的系统发育单元。在这些属中, 可以看到明显的集簇, 例如, 肉杆菌属、肠球菌属、漫游球菌属形成一个彼此紧密的簇, 而同其他属的关系则较远, 气球菌和四联球菌处于该簇的外围。此外, 该簇在系统发育上更接近低 G + C 部分的好氧和兼性厌氧的某些属, 同其他乳酸菌的关系反而较远。

乳球菌属和链球菌属在系统发育上关系紧密, 但其程度不及肠球菌所在的聚类簇。“明串珠菌样”乳酸菌, 例如, 魏斯氏菌和严格意义上的明串珠菌, 系统发育关系密切。酒球菌属也处于这个分支, 但该属的进化距离很大, 可能是一个快速进化的例子 (Dicks *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1989; Martínez-Murcia *et al.*, 1990)。在系统发育和生理特性上与酒球菌属最为接近的是“明串珠菌样”乳酸菌。其他的乳球菌属、乳杆菌属和片球菌属, 形成了一个超级簇, 该超级簇分为两个亚簇, 每个亚簇大致相当于属的水平。

基于详细的 16S rRNA 数据分析, Collins 及其同事通过不同的方法 (距离矩阵法、简约性法、最大相似性法) 对乳杆菌及其近缘属的研究做出了巨大的贡