


益生菌

郭本恒 主编

 化学工业出版社

益 生 菌

郭本恒 主编



化学工业出版社

·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

益生菌/郭本恒主编. —北京: 化学工业出版社,
2003. 11
ISBN 7-5025-4914-5

I. 益… II. 郭… III. 乳酸细菌-基本知识
IV. Q939. 11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 100592 号

益 生 菌

郭本恒 主编

责任编辑: 管德存

责任校对: 陈 静

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

聚鑫印刷有限责任公司印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 29½ 字数 736 千字

2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4914-5/TS·130

定 价: 68.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

内 容 提 要

本书共分八章，以益生菌在人或其他寄主胃肠道的定殖性研究为基础，对益生菌的分类、鉴定、作用机理、耐受性、菌的结合机制和评估模型、抑菌性、稳定性、作用噬菌体等进行了系统的总结与论述。同时还重点介绍了双歧菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌和其他动物益生菌的性质、功能和产品。本书理论性、系统性较强，同时具有一定的实用性。

本书可供益生菌科研人员、大专院校相关专业师生参阅。

前 言

益生菌是大自然赋予人类的宝贵财富，它广泛存在于自然界，如人体、食品、大自然等。为了对其利用，科研工作者进行了广泛的研究，并取得了大量的成果；其中部分成果已应用于医药和食品领域，产生了广泛的经济和社会效益。对前人工作进行总结，了解国内外益生菌研究的最新成果，提出其未来发展的趋势和动态，对于益生菌的产业发展和科研进步无疑是十分重要的。

人类利用益生菌尤其是乳酸菌已有相当长的历史，早期人们将发酵作为食品保藏的一种手段，如泡菜、腐乳、酸奶、干酪等的初始产品均是自然发酵的，其真正意义上商业化产品仅有一个多世纪的历史，它们是人们在自然产品的基础上应用现代科学主要是微生物学而生产的产品。从广泛意义上讲全部的无害乳酸菌均可称之为益生菌，因为这些乳酸菌作用于食品基质使其成分，如蛋白、脂肪、碳水化合物等更利于人体吸收。但目前我们所指的益生菌是针对狭义的益生菌，主要涉及那些可以在人或其他寄主体内主要是肠道能够定殖，有利于人体或寄主健康的微生物。对益生菌的认识的原动力是人们对人体或动物胃肠道菌群组成的认识，在人胃肠道可以定殖的优势菌双歧菌首先受到重视，其最早在药品和食品中得到应用；同时肠道的次优势菌嗜酸乳杆菌也被广泛研究并得到应用，二者均是嗜热菌。近年来人们除了继续研究上述菌的功能性尤其是活菌保持性外，益生菌研究的重点已转向适温益生菌，其中以干酪乳杆菌、植物乳杆菌等为代表，大有后来居上之势。对益生菌的研究以其在人或其他寄主胃肠道的定殖性为基础，研究其多种生理功能。同时对益生菌的分类、鉴定、作用机理、耐受性、菌的结合机制和评估模型、抑菌性、稳定性、作用噬菌体等科研工作者均进行了详尽的研究，并取得了许多新的成果。本书基于以上的认识和考虑，对益生菌的分类鉴定、功能、作用机理和性质进行了系统的描述；以此理论作基础，分别对双歧菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌和其他动物益生菌的性质、功能和产品，进行了详尽的论述。本书理论和实践并重，较适于研究人员、教师、研究生和生产工作者阅读和参考。

本书的第一、二、三章由吴正钧撰写，第三章的第一、二节由蒋能群完成，第四、五、六、七、八章由郭本恒撰写，并由郭本恒完成本书的统稿。

限于作者的能力和水平，书中一定存在疏漏与不足，欢迎读者批评指正。

郭本恒

2003. 10 于上海

目 录

第一章 乳酸菌的分类与生物学特性	1
第一节 乳酸菌的分类	2
一、乳酸菌的定义	2
二、乳酸菌的分类	3
三、双歧杆菌的分类	16
第二节 乳酸菌的代谢	17
一、糖的利用	17
二、丙酮酸的代谢	22
三、氮代谢：乳酸菌的蛋白水解系统	25
四、益生菌的抗菌物质	29
第三节 益生菌的分离与保存	37
一、益生菌的分离	37
二、益生菌的筛选	37
三、益生菌的保存	41
第四节 乳酸菌的分子遗传和基因工程	41
一、乳酸菌的质粒	41
二、乳酸菌的染色体遗传学	46
三、乳酸菌中的基因转移	47
四、乳酸菌的遗传重组	50
五、乳酸菌 DNA 的修复与突变	52
六、乳酸菌的基因克隆	52
参考文献	57
第二章 益生性乳酸菌的生理功能	61
第一节 人胃肠道的微生物生态学	64
一、人胃肠道微生物菌群的组成	64
二、细菌在消化过程中的存活性	68
三、乳酸菌的黏附机理	68
四、影响乳酸菌定殖的因素	69
五、益生菌在调节消化道菌群组成中的作用	71
第二节 益生菌的抗菌作用	74
一、乳酸和其他挥发性酸	74
二、过氧化氢	75
三、双乙酰	77
四、细菌素	78
五、益生菌在体内的抗菌作用	80

六、益生菌产生的活性代谢产物在体内的抗菌作用	81
第三节 益生菌的耐受性	84
一、消化道黏膜屏障在宿主防卫中的作用	84
二、口服耐受	86
三、肠道菌群在消化道防御机制中的作用	89
四、益生性乳酸菌的微生物（细菌）干扰作用	89
第四节 益生菌的生理作用	93
一、促进营养物质的吸收	93
二、减缓乳糖不耐症	94
三、改善肠道功能	94
四、降低血清胆固醇水平和血脂浓度	96
五、抗高血压作用	98
六、预防糖尿病	100
七、益生菌对免疫功能的调节作用	101
八、抗肿瘤作用	112
九、其他生理功能	125
第五节 益生菌的应用	127
一、腹泻的预防与治疗	127
二、尿布性皮炎（DD）的治疗	131
三、治疗肠道功能异常症	132
四、益生菌在食品中的应用	134
第六节 益生菌的安全性	137
一、副作用	137
二、安全性和耐受性	139
参考文献	149
第三章 益生菌的培养特性	151
第一节 肠道菌群的分析方法	151
一、肠道菌群的培养技术	151
二、分析肠道菌群组成的经典方法	152
三、对肠道菌群进行鉴定和遗传发育研究的分子生物学方法	153
四、研究特定微生物在肠道中分布和变化的最新方法	155
五、不需要培养过程的分子方法在肠道菌群组成研究中的应用	159
六、肠道菌群组成原位分析（In Situ）	160
第二节 益生菌的增殖底物	161
一、非消化性低聚糖类	162
二、多醇类化合物	164
三、益生菌和益生菌生长底物的选择标准	165
四、益生菌的安全性	165
第三节 乳酸菌的噬菌体	166
一、噬菌体的组成和形态	166

二、噬菌体的生命周期	167
三、噬菌体的来源	168
四、 <i>Lactobacilli</i> 的噬菌体	169
五、 <i>S. thermophilus</i> 的噬菌体	171
六、 <i>Leuconostoe</i> 的噬菌体	171
七、 <i>Lactococcus. lactis</i> 的噬菌体	171
八、乳酸菌对噬菌体的不敏感性机制	173
九、噬菌体的控制	175
第四节 发酵剂微生物学	176
一、组成发酵剂的微生物类群	176
二、发酵剂的作用	178
三、发酵剂的保存方法和原理	183
第五节 乳酸菌在发酵乳中的稳定性	187
一、乳酸菌在乳制品中的存活性	188
二、影响乳酸菌细胞稳定性的生物化学因素	189
参考文献	192
第四章 双歧杆菌及其制品	194
第一节 双歧杆菌的研究历史	194
一、双歧杆菌研究的第一阶段 (1899~1957 年)	194
二、双歧杆菌研究的第二阶段 (1957 年至今)	194
三、双歧杆菌的分类	195
第二节 双歧杆菌的生理生化特征	197
一、双歧杆菌的形态	197
二、双歧杆菌的生理	197
三、双歧杆菌的生物化学特征	199
四、 <i>Bifidobacterium</i> 的细胞壁特征	201
五、 <i>Bifidobacterium</i> 的脂类和磷脂构成	201
六、双歧菌 DNA 组成、抗原性和鉴定	202
第三节 底物对 <i>Bifidobacteria</i> 生长的影响	202
一、天然来源的双歧增殖因子	202
二、改性牛乳成分作为双歧杆菌培养底物	204
三、人工合成双歧菌增殖因子	205
四、双歧杆菌的生长	211
第四节 双歧菌及其制品的健康作用	213
一、双歧菌对机体的生理作用	213
二、双歧杆菌和婴儿营养	215
三、含 <i>Bifidobacteria</i> 的成人乳制品的营养价值	218
四、 <i>Bifidobacteria</i> 的临床制品、营养价值和生理作用	219
第五节 <i>Bifidobacteria</i> 的性质	222
一、 <i>Bifidobacterium</i> 在人肠道的黏着和定殖	222

二、人体内的双歧杆菌	223
三、耐酸、抗胆汁 <i>Bifidobacteria</i> 的筛选	225
四、益生菌的蛋白水解活性	227
五、微胶囊对益生菌的保护作用	229
六、喷雾干燥对 <i>Bifidobacteria</i> 存活的影响	231
七、乳中 <i>Bifidobacteria</i> 和酶的贮存稳定性	234
第六节 双歧杆菌制品的加工技术	238
一、发酵菌种和发酵剂	239
二、发酵工艺条件的确定	243
三、益生菌的加工技术	246
四、双歧杆菌酸奶产品常见的缺陷	250
五、双歧杆菌产品的开发情况	251
六、采用 <i>Bifidobacteria</i> 生产的豆乳产品	255
第七节 <i>Bifidobacteria</i> 的分离、培养和鉴定技术	262
一、 <i>Bifidobacteria</i> 分离培养的基础知识	262
二、 <i>Bifidobacteria</i> 培养、鉴定和分离所用的培养基	263
三、培养基的应用	267
四、食品中各种益生菌的鉴别	269
第八节 厌氧菌的保存方法	273
一、厌氧菌的保存方法	273
二、厌氧保存效果	277
第九节 <i>Bifidobacteria</i> 培养基的组成和配制	279
一、天然(复杂)培养基	279
二、选择性培养基	283
三、半合成和相关的培养基	284
四、完全合成培养基	285
五、商用培养基	286
六、样品和计数的稀释液	288
参考文献	288
第五章 <i>L. acidophilus</i> 及其制品	292
第一节 <i>L. acidophilus</i> 作为益生菌的科学基础	292
一、 <i>L. acidophilus</i> 的分类	292
二、 <i>L. acidophilus</i> 的遗传学	293
三、 <i>L. acidophilus</i> 的稳定性	293
四、 <i>L. acidophilus</i> 的抑菌活性	294
五、 <i>L. acidophilus</i> 的黏附	294
六、 <i>L. acidophilus</i> 和胆固醇	294
七、 <i>L. acidophilus</i> 对胃肠道的影响	295
八、 <i>L. acidophilus</i> 对乳糖不耐症的缓解作用	296
九、 <i>L. acidophilus</i> 和小肠细菌过度生长的关系	296

十、 <i>L. acidophilus</i> 的抗癌作用	297
十一、 <i>L. acidophilus</i> 对泌尿系统疾病的作用	297
十二、 <i>L. acidophilus</i> 对痢疾的治疗作用	297
第二节 <i>L. acidophilus</i> 产生的细菌素	298
一、早期研究	298
二、产生抗菌物质的菌株分离和确定	298
三、 <i>L. acidophilus</i> 细菌素的物理化学性质	299
四、发酵过程	303
第三节 乳酸菌在人胃肠道的定殖和存活情况	306
一、乳酸菌的存活研究	307
二、益生菌在肠道的定殖	308
三、乳酸菌和 <i>Bifidobacteria</i> 对 FOS 的发酵作用	313
第四节 <i>L. acidophilus</i> 对肠道酶活性及免疫功能的影响	314
一、 <i>L. acidophilus</i> 、 <i>Bifidobacterium</i> 和免疫反应	314
二、乳和 <i>Lactobacillus</i> 对人肠道微生物酶活性的影响	315
三、 <i>L. acidophilus</i> 和 <i>L. gasseri</i> 分子克隆	316
四、 <i>L. acidophilus</i> 的 16S 核糖体 DNA 终端限制片段模型	319
第五节 <i>L. acidophilus</i> 和乳糖不耐症	321
一、 <i>L. acidophilus</i> 的乳糖酶活性	321
二、各类乳制品对乳糖不耐症的改善	324
第六节 <i>L. acidophilus</i> 的益生作用	326
一、 <i>L. acidophilus</i> 对肾病患者治疗作用	326
二、 <i>L. acidophilus</i> 对血液胆固醇的影响	328
三、 <i>L. acidophilus</i> NCFM 对结肠肿瘤的预防作用	329
四、 <i>L. acidophilus</i> 在泌尿系统的存活情况	330
五、 <i>L. acidophilus</i> 对肠道和食物病原菌的抑制作用	332
第七节 用于膳食调节剂的 <i>Lactobacillus</i> 菌的选择和制备技术	333
一、 <i>Lactobacillus</i> 发酵剂浓缩物	333
二、 <i>L. acidophilus</i> 在商业化产品中的稳定性	335
三、含 <i>L. acidophilus</i> 产品对人粪便菌群组成的影响	340
参考文献	342
第六章 LGG 菌及其制品	345
第一节 概述	345
第二节 LGG 在肠道的黏着和定殖	346
一、LGG 在不同 pH 胃液中的存活	346
二、LGG 在肠黏膜的黏着和定殖	347
三、LGG 对 Caco-2 细胞的黏着和定殖	349
第三节 LGG 菌在人粪便中的检出	352
第四节 LGG 对肠道菌群的影响	354
一、LGG 对早产儿肠道微生物的影响	354

二、LGG 对新生儿及 1~3 岁婴儿胃肠道菌群的影响	356
三、LGG 对成人肠道菌群的影响	357
第五节 LGG 的抑菌性和产生的抑菌物质	357
一、LGG 产生的抑菌物质和其抑菌活性	357
二、LGG 对粪便中短链脂肪酸的影响	360
第六节 LGG 菌的生理生化特性	361
一、LGG 菌的安全性	361
二、LGG 的菌落特征和糖代谢	362
三、LGG 菌的酶体系和相关生理作用	364
四、LGG 对 <i>Salmonella</i> 在肠道定殖的抑制作用	366
五、LGG 对肠黏膜透过性的影响	367
六、LGG 与过敏反应	367
七、LGG 生理功能未来研究的重点领域和内容	368
第七节 LGG 菌对痢疾的治疗作用	369
一、LGG 菌对痢疾的预防和治疗作用	369
二、LGG 治疗痢疾的机理	371
第八节 LGG 类产品的加工技术	373
一、LGG 及相关菌的生长底物	373
二、冷藏过程中发酵乳制品的 LGG 活菌数量变化	376
参考文献	378
第七章 植物乳杆菌及其制品	381
第一节 <i>L. plantarum</i> 生理生化特征	381
一、 <i>L. plantarum</i> 生长的影响因素	381
二、 <i>L. plantarum</i> 的乳糖代谢性质	382
三、 <i>L. plantarum</i> 对 β -低聚葡萄糖和低聚木糖的发酵	384
四、亚致死性损伤对 <i>L. plantarum</i> 延滞期的影响	386
五、 <i>L. plantarum</i> 对亚油酸氧化的抑制作用	388
六、干酪中乳酸菌的蛋白质、脂肪水解活性	389
七、高压 CO ₂ 处理对 <i>L. plantarum</i> 的细胞破坏和酶失活作用	391
第二节 <i>L. plantarum</i> 的酶体系	393
一、 <i>L. plantarum</i> 分泌的蛋白质	393
二、 <i>L. plantarum</i> 分泌的脂酶	396
三、 <i>L. plantarum</i> 的磷酸酶	396
四、 <i>L. plantarum</i> 分泌的淀粉酶	398
五、 <i>L. plantarum</i> 分泌的过氧化物酶	402
六、 <i>L. plantarum</i> 分泌的乳酸脱氢酶	402
七、 <i>L. plantarum</i> 的精氨酸脱亚氨酶活性	405
第三节 <i>L. plantarum</i> 产生的细菌素	407
一、细菌素 Plantaricin ST31 的性质	408
二、细菌素 Plantaricin C19 的性质	411

三、Plantaricin LP84 的性质	413
第四节 <i>L. plantarum</i> 的生理功能	415
一、 <i>L. plantarum</i> 对肠道病原菌的影响	415
二、 <i>L. plantarum</i> 对于急性肝脏损伤的治疗作用	418
三、 <i>L. plantarum</i> 对生氰糖苷的降解作用	420
第五节 <i>L. plantarum</i> 在食品中的应用	422
一、 <i>L. plantarum</i> 在发酵调味品 (Tempoyak) 中的应用	422
二、在 Almagro 茄子发酵过程中 <i>L. plantarum</i> 的作用	423
三、乳酸菌对泡菜中胺形成的影响	424
四、大蒜的 <i>L. plantarum</i> 发酵和贮存	426
五、 <i>L. plantarum</i> 发酵燕麦饮料	427
六、 <i>L. plantarum</i> 用于干肠发酵的研究	429
七、 <i>L. plantarum</i> 对橄榄的低温发酵	430
八、 <i>L. plantarum</i> 在干酪成熟中的作用	433
参考文献	435
第八章 其他益生菌类	437
第一节 动物用乳酸菌	437
一、猪和牛的胃肠道菌	437
二、益生菌增强动物生理机能的作用方式	440
三、动物用乳酸菌	441
四、结论	444
第二节 益生性 <i>Propionibacterium</i>	444
一、乳品发酵剂	445
二、丙酸菌用作保藏剂	445
三、丙酸发酵	445
四、 <i>Propionibacteria</i> 作为益生菌的应用	445
五、 <i>Propionibacteria</i> 的安全性	447
六、蛋白酶活性	448
七、结论	448
第三节 <i>Lactobacillus reuteri</i> 作为动物益生菌的应用	448
一、 <i>L. reuteri</i> 在禽类中的应用	449
第四节 益生酵母菌	452
一、益生酵母在肠黏膜的黏着	452
二、益生酵母在乳制品中的生长和存活	454
三、 <i>Saccharomyces boulardii</i> 对痢疾病原菌的作用	456
参考文献	459

第一章 乳酸菌的分类与生物学特性

乳酸菌 (Lactic acid bacteria) 是一群形态、代谢性能和生理学特征不完全相同的革兰氏阳性菌的统称, 其总的特征是 G^+ 、不形成芽孢 (个别属除外)、不行呼吸的球菌或杆菌, 在发酵碳水化合物时主要的代谢产物为乳酸。对乳酸菌所覆盖的范围, 历来就存在争议, 从传统的角度而言, *Lactobacillus* (乳杆菌属), *Leuconostoc* (明串珠菌属), *Pediococcus* (片球菌属) 和 *Streptococcus* (链球菌属) 是组成乳酸菌的核心。近年来, 随着分子生物学技术在分类上应用的不断增加, 对上述属的进行了重新划分, 增加了许多新的属。根据新的分类和命名, 乳酸菌由以下的属组成: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* 和 *Weissella*。尽管 *Bifidobacterium* 具有乳酸菌的某些典型特征, 一直被当作乳酸菌看待, 但从系统发育的角度而言, 该属与乳酸菌相去甚远, 而且有自己独特的糖发酵方式。因此, 本章所指的乳酸菌将不包括 *Bifidobacterium*。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、所产生的乳酸的立体构象 (D-、L-或 DL-)、在高浓度 NaCl 中的生长能力, 以及对酸、碱的耐受能力等。一些化学分类指标如代谢产物中脂肪酸的组成、细胞壁组成等在乳酸菌分类中也非常有用。目前对乳酸菌的分类主要依赖于从 rRNA 序列分析所获得的系统分类结果。最近新命名的几个属可以很方便的采用从 rRNA 序列制备的寡核苷酸探针进行鉴定。乳酸菌中的大多数属从系统发育的角度可以分成不同的遗传簇, 但有些属, 特别是 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus*, 其遗传发育簇与采用表型性状分类获得的结果存在巨大的差异, 对乳酸菌进行分类和鉴定的新方法在不断完善与发展之中, 其中最有可能作为常规分析方法是各种核酸探针技术、利用聚合链 (PCR) 技术对 rRNA 进行部分序列分析以及细胞可溶性蛋白图谱法。

在乳酸菌中存在两种不同的糖发酵方式。其中, 糖裂解途径 (Embden-Meyerhof 途径) 在正常的情况下, 糖代谢的终产物几乎只有乳酸, 这种代谢方式又称为同型乳酸发酵; 糖通过 6-磷酸-葡萄糖酸/磷酸激酮酶途径代谢时, 终产物除了乳酸外, 还有大量其他产物, 如乙醇、乙酸、 CO_2 等, 这种方式又被称为异型乳酸发酵。对有些乳酸菌而言, 某些生长条件可对其代谢产物产生巨大的影响。这些变化包括糖代谢变成丙酮酸代谢和/或可以利用外来的电子受体如氧气或其他有机化合物。

乳酸菌的质子驱动力主要依赖于与位于细胞膜上的 $H^+ - ATPase$ ($H^+ - ATP$ 酶), 通过消耗 ATP 而产生。质子驱动力逆向输送离子与代谢产物进出细胞, 代谢终产物的流出以及某些化合物之间的电子转移也可能产生质子驱动力, 从而节省部分 ATP。糖向细胞内的运输主要由依赖于质子驱动力的渗透酶系统或磷酸烯醇式丙酮酸: 糖磷酸转移酶系统所介导。后者与糖代谢作用紧密关联, 其活性为糖代谢所调控。氨基酸和肽的运输则由依赖于质子驱动力系统、逆向运输或与磷酸键关联的系统来完成。

第一节 乳酸菌的分类

一、乳酸菌的定义

什么是乳酸菌？即使是专业人员，其给出的答案可能也不尽相同。出现这种情况，有其历史根源，在 20 世纪初就形成了这么一个缺乏严格定义的习惯名称。当时“Lactic acid 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生境中分离到的产乳酸细菌具有相似性以后，对这些细菌的分类开始出现长足的进步。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 Orla-Jensen 等所提出的乳酸菌系统至今在很大程度上已经被修改，但对其分类的基础几乎没有发生明显的改变。Orla-Jensen 等采用了多种性状特征作为分类的依据，包括形态（球菌还是杆菌，是否形成四联体）、葡萄糖发酵方式（同型—还是异型发酵）、在某些关键温度时（例如 10℃、45℃）的生长特性以及能利用的糖的种类等。这些性状特征，即使在现在的乳酸菌分类中，仍然是非常重要的指标。在 Orla-Jensen 等的研究结果发表后，即产生了这么一种观点，即乳酸菌是由四个核心属组成的：*Lactobacillus*，*Leuconostoc*，*Pediococcus* 和 *Streptococcus*。在后面的关于分类的章节中，还将简单地提及在历史上组成这些属的种类。在过去 10 年内，对于乳酸菌的分类提出了多个新的属，但其中相当一部分是由上述 4 属中的种重新划分而来。

Orla-Jensen 等认为乳酸菌是一个“大的自然群”，认为其中的细菌从遗传来源上是相关的，而且能与自然界中其他的类群区分开。这种观点的产生有其历史背景，因为当时只能检测表型性状，并将之作为遗传特征来处理。而现在，可以通过仔细检测细胞内生物大分子的相似性，来更准确地确定不同微生物之间的亲缘关系和遗传起源。当然，这些生物大分子主要指各种核酸。幸运的是，大自然为细菌分类提供了适用于不同水平的各种核酸。非常近的关系（同属不同种之间或同种不同亚种之间）可以通过 DNA-DNA 同源性来确定；而在确定种和属的发育位置时，核糖体 RNA (rRNA) 则更合适，因为在 rRNA 序列中同时含有高度保守区域和保守性较小的区域。迄今为止，已有能力对从细菌中获得的 rRNA 大片段进行序列分析。在刚开始时，这一工作需要逆转录酶的参与，但现在通过 PCR 的方法可以更方便地对目标基因进行序列测定。比较各种微生物的 rRNA 序列结构是目前确定其遗传关系最有效和准确的方法。有了 rRNA 技术的支持，就可以绘制出一张清晰的关于乳酸菌遗传起源的关系图，从而更准确地了解 Orla-Jensen 等的构想。此外，rRNA 测序的方法在对乳酸菌进行分类时是一种非常重要的手段，尤其是划分新属的时候。在后面关于“乳酸菌分类”一节中，将同时涉及到乳酸菌经典的分类方法及目前的遗传分类地位。

乳酸菌是导致食品或饲料酸败的主要参与者，随着对乳酸菌代谢方式、营养需求等方面的了解不断加深，通过生理学途径更容易控制乳酸菌的上述作用。尽管现代遗传技术有望解决这一问题，但除非对乳酸菌的生理过程有比较全面的了解，否则，这方面的努力会事倍功半。如果不是对 *Lactococcus lactis* 的生理学和生物化学有详细了解，就不可能通过遗传工程的方法对其代谢进行调控。此外，乳酸菌发酵的本质也具有很重要的研究意义，是用于研究能量传递、溶质运输和膜生物学的优质模型。

二、乳酸菌的分类

(一) 一般描述及所包括的属

由于并不存在一种关于乳酸菌非常明确的定义,大多数用于描述该类群细菌的性状特征适用于“标准”或“正常”情况下,但经常会遇到例外的情况。因此,对于“典型”的乳酸菌比较贴切的定义是“革兰氏阳性、不形成芽孢,触酶阴性,细胞色素缺失、生活在厌氧环境中、但对氧有一定的耐受性;营养需求苛刻、耐酸、在糖发酵时行严格的发酵方式,其终产物以乳酸为主的细菌”。乳酸菌通常生活在营养丰富的环境中,如各种食品(乳、肉、饮料和蔬菜),但其中相当一部分是组成哺乳动物口腔、肠道和阴道正常微生物菌群的成员。该定义中的绝大多数性状会随其生活环境的变化产生一定的改变,惟一无可争议的是它们为革兰氏阳性菌。例如,有些乳酸菌在特定的培养基上(见后文)可形成触酶和细胞色素,部分链球菌(如 *Streptococcus bovis*)对营养需求较低,在某些时候糖发酵时产生的乳酸非常少等。此外,现在还缺乏有力的研究证据将能形成芽孢的细菌从乳酸菌中排除,它们当中有些属(如 *Sporolactobacillus*)跟“真正”的乳酸菌非常接近,而且从遗传起源的角度也无法将它们区分开。因此,在本章中将遵从传统的定义,将形成芽孢的细菌排除在乳酸菌之外。乳酸菌的一个典型特征是不能形成卟啉环(非亚铁血红素),这是产生上述定义中多数性状的基础。由于不能形成卟啉环,而实验室所用的生长培养基中通常缺乏血色素及相关的化合物,因此,当乳酸菌在这些培养基上生长时缺失“真正”的触酶和细胞色素。在这种情况下,对于绝大多数乳酸菌而言,它们无法通过电子转移来获得生长所需的能量,只能依赖于发酵、即底物水平的磷酸化作用。在部分乳酸菌中,偶尔会出现由非亚铁血红素所形成的“假触酶”而引起的触酶活性,因此作为乳酸菌鉴定的第一步,缺失细胞色素这一特征可能比通常所进行的触酶试验更可靠。值得注意的是,如果生长培养基中加入了血色素(或血红蛋白),那么前面所讲的情况就完全不同了。在这种情况下,乳酸菌可形成真正的触酶、甚至各种细胞色素,个别时候还会出现通过电子转移链引起的呼吸作用。

根据以上典型乳酸菌的定义,最符合的属有(根据1986版伯杰氏细菌学系统手册中的分类系统): *Aerococcus* (A.), *Lactobacillus* (L.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.), 和 *Streptococcus* (S.)。部分研究者将 *Gemella* 和 *Erysipelothrix* 两个属也归入乳酸菌,但其他的研究者则不以为然。而 *Bifidobacterium* 在传统上也被认为属于乳酸菌[在1957年版的伯杰氏细菌鉴定手册(第7版)中曾被划作 *Lb. bifidum*], 尽管 *Bifidobacterium* 属的细菌的确符合上述乳酸菌的定义,它们从遗传起源的角度而言,属于革兰氏阳性菌中的放线菌群;此外,该属的细菌对糖的发酵有自己非常独特的方式,从而将它们与乳酸菌群分开。因此,在本章关于乳酸菌的一般描述中就省略了关于双歧杆菌的定义。然而,由于双歧杆菌在人和动物胃肠道中具有重要的作用,部分双歧杆菌被广泛用作改善和促进人或动物健康的益生菌(Probiotics),因此,在本章中将单独对双歧杆菌进行介绍。在1986年伯杰氏细菌学系统手册出版以后,乳酸菌中各属的分类情况又发生了重大的变动。其中以前的“*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*（葡萄酒球菌属）。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*，*Globicatella*，*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。

（二）属（Genus）水平上的分类

如前所述，对各种乳酸菌在属水平上的分类总的原则基本上还是按照 Orla-Jensen 等1919年提出的方法进行。然而，随着对新的属或种的描述的不断增多，这些经典的分类试验逐渐不再适用新属的鉴定。不过，这些表型性状仍然是进行更为复杂鉴定试验的出发点。尽管形态学特征作为细菌分类的一个关键指标受到质疑，在目前对乳酸菌属的性状描述中，仍然是一个非常重要的指标。惟一的例外，是新设立的 *Weissella* 属，这是乳酸菌中第一个从定义的角度而言，既有球菌又有杆菌的属。此外，在单一平面两个垂直方向的细胞分裂形成四聚体（以前曾被错误的描述为“在两个平面分裂”），可作为鉴别球菌的关键特征。乳酸菌中形成四聚体的属有 *Aerococcus*，*Pediococcus* 和 *Tetragenococcus*。

对乳酸菌进行属水平上分类时一个非常重要的指征是在标准条件下，即在限制氧气、不限制葡萄糖浓度和生长因子（氨基酸、维生素和核酸前提）的情况下乳酸菌对葡萄糖的发酵方式。在这种情况下，乳酸菌可以分成两种类型：同型发酵，几乎将葡萄糖定量地转化为乳酸；异型发酵，发酵葡萄糖产生乳酸、乙醇/乙酸和 CO_2 。在实际操作中，利用葡萄糖的产气试验就可以区分这两种类型的乳酸菌。明串珠菌、葡萄酒球菌和韦斯勒菌和一小部分乳杆菌属于异型发酵型，其他的乳酸菌则属于同型发酵型。

在某些温度的生长特性主要是用来区分部分球菌。“经典”的肠球菌可在 10°C 和 45°C 生长；乳球菌和漫游球菌可在 10°C 生长，但 45°C 不生长；链球菌在 10°C 通常不生长，部分种可以在 45°C 生长。对盐的耐受性（6.5% NaCl）也可以用来鉴别肠球菌、乳球菌/漫游球菌和链球菌，尽管部分链球菌对盐的耐受性可变。对盐的极端耐受性（18% NaCl）仅局限于 *Tetragenococcus*。有时，对酸-碱的耐受性也可作为一种有用的鉴别指标。气球菌、肉食杆菌、肠球菌、四联球菌和漫游球菌可在 pH 值非常高的环境中生长，尽管并不是所有的种都可以在测定时所用的 $\text{pH}=9.6$ 的条件下生长。葡萄糖发酵过程中所产生的乳酸的立体构型可以用来区分明串珠菌和异型发酵型的乳杆菌，前者只产生 D-乳酸，而后者则产生的是消旋体（DL-乳酸）。不过，部分韦斯勒菌菌株可能会干扰这一反应。

乳酸菌中各属的典型表型性状见表 1-1。利用这些表型性状无法区分肉食杆菌与乳杆菌，漫游球菌与乳球菌属，不过漫游球菌和肉食杆菌属细菌的细胞有特异的脂肪酸组成，这一点可以将它们与绝大多数其他的乳酸菌分开。通常而言，利用肉食杆菌可以在 $\text{pH}=9.0$ 生长、但不能在乙酸培养基（乳杆菌的选择性培养基）上生长的特点将其与乳杆菌分开。片球菌可能会与气球菌相混淆，因为两者的形态是一样的。不过，片球菌比气球菌更耐酸，而且在厌氧条件下生长良好，而后者则相反，在微好气时生长情况更好。韦斯勒菌很容易与明串珠菌和异型发酵的乳杆菌混淆；而通过传统的表型性状鉴定葡萄酒球菌很容易被误作明串珠菌，不过葡萄酒球菌的极端耐酸性和耐乙醇能力可以很方便地将其与后者分开。

需要注意的是，表 1-1 所列举的表型性状在不同属之间出现部分重叠的现象，而且有时会出现与表 1-1 所列一般表型性状例外的情况。例如，对于 *Enterococcus* 而言，目前对该属

表 1-1 不同乳酸菌的鉴别特征^a

性状特征	杆 菌		球 菌							
	Carno.	Lactob.	Aeroc.	Enteroc.	Lactoc.	Leucon.	Pedioc.	Striptoc.	Tetragenoc.	Weissella ^b
					Vagoc.	Oenoc.				
形成四聚体	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
从葡萄糖产 CO ₂	- ^e	±	-	-	-	+	-	-	-	+
10℃生长情况	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
45℃生长情况	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
在 6.5% NaCl 时的生长情况	ND ^f	±	+	+	-	±	±	-	+	±
在 18% NaCl 时的生长情况	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
在 pH4.4 时的生长情况	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
在 pH9.6 时的生长情况	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
产生乳酸的类型 ^d	L	D, L, DL ^g	L	L	L	D	L, DL ^g	L	L	D, DL ^g

注：a. +表示阳性，-表示阴性，±在不同种之间可变，ND未测定；

b. *Weissella* 可以是杆菌；

c. 用于测定从葡萄糖发酵的类型，+表示同型发酵，-表示异型发酵；

d. 从葡萄糖发酵所产生的乳酸的立体构型；

e. 根据培养基的不同，可以产生少量的 CO₂；

f. 尚未见能在 8% NaCl 存在时可以生长的报道；

g. 所产生乳酸的类型在不同种之间可变。

的定义只是一种限定性的描述，其中有多几个种会出现与采用经典表型性状测试所获得结果不一致的情况。目前对乳酸菌的分类越来越倚重于一些更加复杂的方法，其中 rRNA 序列分析可能是在属水平上分类最精确的方法。已知的 rRNA 序列还可以用作鉴别属的特异性工具。

(三) 种 (Species) 水平上的分类

在本章的范围内不可能叙述乳酸菌所有种的分类情况。例如，仅 *Lactobacillus* 就由 50 个已知的种组成。因此，本节将概要式的介绍在各个属内对种的分类情况以及在食品工业中一些最常见的种。

目前对乳酸菌的准确分类越来越倚重于分子生物学的方法，尽管 Orla-Jensen 所使用的部分方法仍有生命力。尤其是在同一属内不同种之间的分类更是如此，在部分情况下，只有在核酸水平的分析才能解决种的分类问题。不过，经典的表型/生物化学特性在进行初步分类时仍然是一种非常重要指标，可以增加对被研究对象的了解。表 1-1 所列的部分性状也可作为种分类时的指征，例如对盐和酸的耐受能力、生长温度特性以及所产生的乳酸的立体构型。其他可用作种分类的表型/生物化学指征有碳水化合物发酵范围、精氨酸水解、乙偶姻 (3-羟基丁酮-[2]) 的形成 (VP 试验)、胆盐耐受性、溶血类型、是否产生胞外多糖、对生