

第1章

绪 论

1.1 微生物及其特性

自荷兰商人列文·虎克 (Antonie van Leeuwenhoek, 1632—1723) 用自制显微镜首次观察到微生物 (microorganisms) 以来, 人们对微生物的认识也就 300 多年的历史。作为一门独立的微生物学科, 远比动物学和植物学晚得多, 只有 100 多年的历史。虽然微生物学科诞生与发展的时间短暂且经历了艰难曲折的历程, 但微生物作为地球上最小的生命体, 在有机物的生物降解尤其是人类的生存发展和身心健康方面发挥着越来越巨大且不可替代的作用。

微生物是用肉眼难以看清的个体微小、结构简单的低等生物 (organisms too small to be seen clearly by the unaided eye) 的总称, 其范畴包括病毒 (virus)、细菌 (bacteria)、真菌 (fungi)、微藻 (microalgae) 和微型原生动物 (protozoan)。在 1969 年美国生物学家魏泰克 (R.H. Whittaker, 1924—1980) 进行的原核生物界 (monera)、原生生物界 (protista)、真菌界 (fungi)、植物界 (plantae) 和动物界 (animalia) 的生物 5 界划分中, 微生物占据了 4 界。另外, 微生物在 1977 年卡尔·沃斯 (Carl Woese) 依据 16S rRNA 序列差别提出的细菌域 (bacteria)、古生菌域 (archaea) 和真核生物域 (eukarya) 的生物 3 域中占据 2 域多。

与动物和植物相比, 微生物虽然个体微小, 但具有如下基本特性: ①个体小、比表面积大。最小的纳米细菌只有 50 nm, 最大的纳米比亚硫珍珠菌也仅有 100~750 μm 。②生长繁殖快。在条件适宜时细菌每 20 min 即可分裂一次, 生物量增加 1 倍, 在细胞生物界有无以伦比的生长繁殖速度。③代谢转化快。500 kg 公牛对食物的消化速率为 0.5 kg/h, 而 500 kg 酵母利用有机物的速率却高达 50000 kg/h, 微生物的代谢强度是高等动物的成千上万倍。④营养范围广。微生物不仅可以代谢转化蛋白质、脂肪、糖类和无机盐, 而且对于动植物难以利用的物质如纤维素、石油和塑料及有毒有害有机物也能综合利用, 变废为宝。

⑤种类多,分布广。微生物在自然界中的分布极广泛,几乎无处不在,无处不有,上至几万米高空,下至几千米深的海底,热达 100℃以上的温泉,冷至 -80℃的极地,都可以找到它们的踪迹。⑥容易培养。微生物对营养要求不高,农副产品、有机废弃物和有机废水等都可以用来培养微生物。⑦容易变异。微生物突变频率虽不高,但因繁殖快、数量多,因而在短时间内可产生大量变异的后代,扩大了其代谢范围与能力。

1.2 微生物的细胞形态和结构

病毒 (virus) 是超显微、没有细胞结构、独立于其宿主进化史的专性绝对活细胞内寄生的生物,其 DNA 或 RNA 基因组被其所编码的蛋白质壳体化。病毒在活细胞外具有一般化学大分子特征,而一旦进入宿主细胞又具有生命特征。病毒的主要特点有:①无细胞结构,专性活细胞内寄生;②没有酶或酶系统极不完全,不能进行独立的代谢活动;③个体极微小,能通过 0.22 μm 细菌滤器;④对抗生素不敏感,而对干扰素敏感。存在于细胞外的病毒毒粒主要表现为球形(20面体)、杆状和复杂形状3种主要形态(图 1-1)。能够侵染原核微生物的病毒叫噬菌体,主要表现为复杂形态,其繁殖过程可分为吸附、侵入、脱壳、核酸复制与生物大分子合成和装配与裂解释放5个阶段。

病毒是一种非细胞生命形态,是由核酸分子(DNA或RNA)与蛋白质构成的靠寄生生活的生命体。病毒的基本结构为核酸核心和蛋白衣壳,有些复杂的病毒在衣壳的外面包裹着一层由脂类和多糖组成的包膜,有的包膜上还长有刺突(图 1-2)。

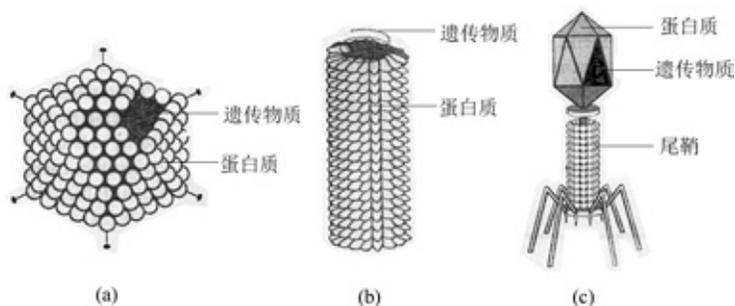


图 1-1 病毒毒粒的形态
(a) 球形 (20 面体); (b) 杆状; (c) 复杂形状

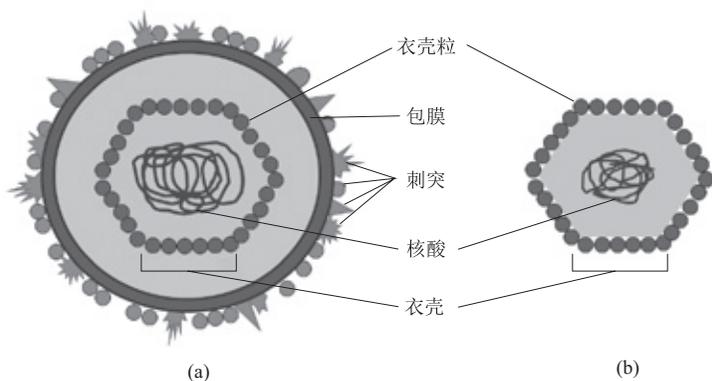


图 1-2 病毒的基本结构
(a) 包膜病毒; (b) 裸露病毒

病毒缺乏自己的独立代谢机构和酶系统，因此离开了宿主细胞，就成为没有任何生命活动且不能独立自我繁殖的化学物质。一旦进入宿主活体细胞后，病毒就可以利用细胞中的物质和能量以及复制、转录和转译等系统，按照它自己的核酸所包含的遗传信息产生和它一样的新一代病毒。

原核微生物 (prokaryotic microorganism) 是一大类细胞微小、细胞核无核膜包裹的原始单细胞生物。它与真核微生物的主要区别是：①基因组由无核膜包裹的双链环状 DNA 组成；②缺乏由单位膜分隔、包围的细胞器；③核糖体为 70 S 型。

在显微镜下观察原核微生物细胞，发现其形态主要有球形、杆状和螺旋状三种类型 (图 1-3)。原核微生物细胞的构造包括所有细胞都具有的一般构造和

部分种类才有或一般种类在特定环境下才具有的特殊构造（图 1-4）。细菌是一类细胞细短、结构简单、胞壁坚韧，多以二分裂方式繁殖和水生性较强的原核生物。根据细胞壁组成成分和等电点的不同，可以通过染色将细菌分为革兰氏阴性（ G^- ）和阳性（ G^+ ）两大类。

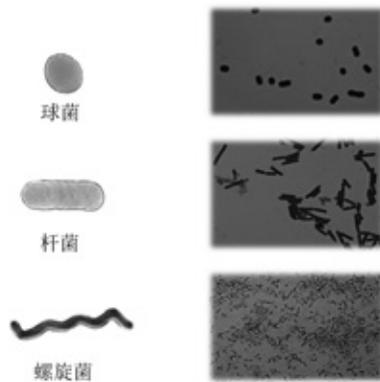


图 1-3 原核微生物的细胞形态

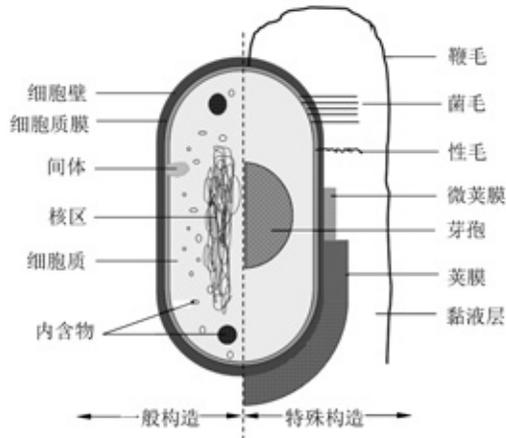


图 1-4 原核微生物细胞的构造

支原体（细胞直径 $0.2\ \mu\text{m}$ 左右）是自由生活的最小原核微生物，无细胞壁，只有细胞质膜，细胞形态多样。因支原体的细胞膜中含有一般原核生物所没有的甾醇，所以即使缺乏细胞壁，其细胞膜仍有较高的机械强度。质粒（plasmid）是独立于细菌染色体外，能够独立复制，通常以共价闭合环状的超螺旋双链

DNA 分子 (图 1-5)。每个细胞可以含有一个或多个质粒, 可编码细菌的非必需遗传信息, 赋予细菌抗药性等功能。某些细菌在其生长发育后期, 在细胞内形成一个圆形或椭圆形、厚壁、含水量极低、抗逆性极强的休眠体, 称为芽孢 (spore, 图 1-6), 是细菌的三大特殊构造 (芽孢、荚膜、鞭毛) 之一, 主要由 G^+ 杆菌形成。每个细菌细胞营养体仅能产生一个芽孢, 其萌芽后仍生成一个细胞营养体, 故芽孢无繁殖能力。芽孢是整个生物界中抗逆性最强的生命体, 具备抗热、抗化学药物、抗辐射、抗静水压等能力。有报道显示, 3000 万年前的芽孢仍然可以萌发。



图 1-5 原核微生物细胞内的质粒

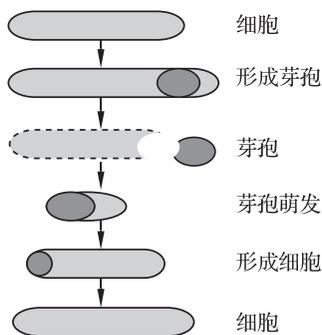


图 1-6 细菌的芽孢

真核微生物 (eukaryotic microorganism) 是细胞核由核膜包裹, 能够通过有丝分裂进行繁殖, 细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等细胞器的一系列微小生物的总称。与原核微生物相比, 虽然真核微生物在数量上并不占据优势, 但真核微生物的种类占微生物总数的 95% 以上。从个体形态、群体形态、营养吸收、代谢类型、代谢产物、遗传特性和生态分布诸方面, 真核微生物都展现出一幅多样化的画面 (图 1-7)。图 1-8 显示了酵母菌 (yeast) 的细胞构造, 它包括细胞壁、细胞膜、细胞质和细胞核及细胞器等部分。

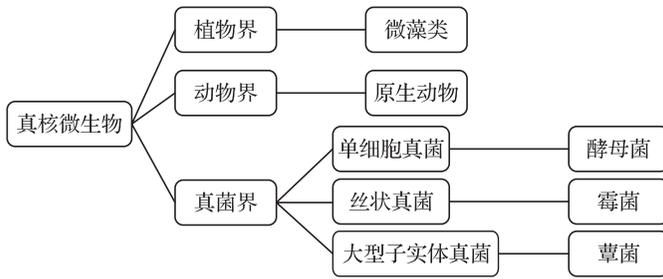


图 1-7 真核微生物的主要生物类群

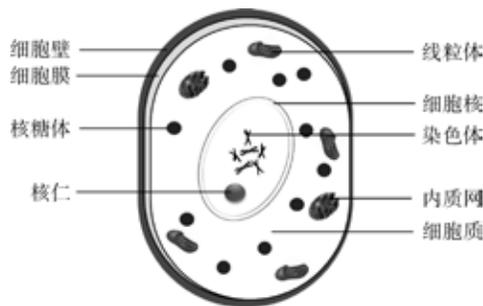


图 1-8 酵母菌的细胞构造

1.3 微生物的生态



种 (species) 是形态、结构、功能、发育特征和生态分布基本相同的一群生物，属于生物基本的分类单元。种群 (population) 是生活在同一环境中的同种个体组成的能繁殖集团。群落 (community) 为同一环境中两个以上种群由于生活繁殖上的连锁而构成的相互依赖、相互制约的生物集团。生态系统 (ecosystem) 指在一定的空间内，生物成分和非生物成分通过物质循环和能量流动相互作用、

相互依存而构成的一个生态学功能单位（图 1-9）。生态系统包含的四要素分别是：①环境条件，包括阳光、二氧化碳、水、大气、氧气、温度和 pH 等。②生产者，包括植物群落、藻类、光合细菌等。③消费者，包括草食动物、肉食动物等动物群落。④分解和转化者，包括异养微生物、原生动物和微型后生动物。生物圈是地球上所有生物及其所生活的非生命环境的总称。

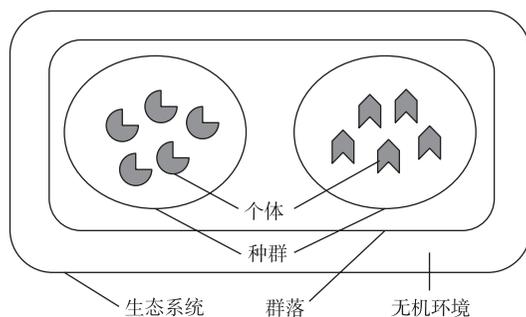


图 1-9 生态系统的组成

微生物生态学（microbial ecology）是研究微生物与其周围生物和非生物环境之间相互关系及作用机理的科学。微生物在生态系统中发挥的作用主要是分解有机物质（包括人工合成的有机物），将其还原为无机物质，完成自然界的物质循环和能量流动，故它们又被称为分解者或还原者（图 1-10），在有机污染物的生物降解方面发挥主要作用。另外，微生物是碳、氮、磷和硫等元素生物地化循环和能量流动的重要成员，是物质和能量的储存者，属于地球最早出现的先锋生物。

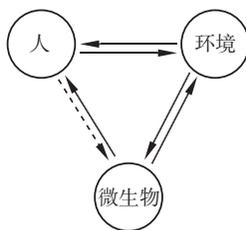


图 1-10 微生物与人类的相互关系

科学家很早就知道人体与数以万亿计的微生物和平共处，他们把这个微生物群称为“人类微生物组”（human microbiome）。人体内共有大约 2.2 万种人类

基因，而人体内微生物基因的种类是这个数字的数百倍，共有大约 800 万种。这些细菌基因制造出执行特定功能的物质，其中有些对人类宿主的机体健康和发育起着十分关键的作用。继 2012 年上半年世界顶级学术刊物《科学》推出“肠道微生物群”专辑后，该杂志又推出了“肠道微生物与健康”专辑。同年，同样作为世界顶级刊物的《自然》也推出了人类肠道微生物专辑。《细胞》杂志发表的综述文章《肠道微生物对健康的影响》被评为 2012 年度最佳论文，足见肠道微生物在保持人类身心健康与疾病治疗中的重要作用。

在人类基因组计划（Human Genome Project）圆满完成以后，美国又推出了基于新一代测序平台的“人类微生物组计划”（Human Microbiome Project），欧盟也推出了相应的“人类肠道宏基因组学”（Human Intestinal Macro Genomics）计划。另外，法国、日本、加拿大等国还单独为微生物组学研究设立了专项。目前，关于人类微生物组特别是人类肠道微生物（intestinal microflora）群落结构与健康之间关系的研究是国内外研究的热点和前沿，人类的身心健康既取决于内在基因的组成，也取决于外部环境的影响。在外部环境中，最大影响因素是人体肠道内表面及皮肤外表面的微生物群。人体附生着大量的细菌、病毒和真核微生物，它们在特定的环境中生存，其细胞数量是人体细胞数量的 10 倍以上。人体微生物与人类健康之间关系密切，它们存在于我们的皮肤上、鼻孔中和消化道内。科学家已经查明，一些特定的微生物通常生活在人体的特定部位，健康人可以让 1 万多种微生物共享自己的身体，其中许多微生物是有利于人类健康的。某些有害的细菌如导致特定感染的病原体几乎在每一个人的体内都仅有少量存在，在人体健康情况下，病原体可以与人体内的有益微生物相安无事。为什么致病菌（pathogenic bacteria）会给一些人造成伤害，而让其他人平安无事？是什么让人体内的微生物群落结构发生了变化？其实微生物并非人体的过客，它们存在于我们身体的内外表面并活跃于人体的代谢过程中。它们是人类共生体，现在我们必须认真对待它们，就像我们必须认真对待森林或水域生态系统一样。与自然生态系统一样，人类身体内的微生物组成随人体部位不同而呈现巨大差异，你的皮肤可能像一片热带雨林，而你的肠道则像海洋一样包容着形形色色的微生物。

在正常情况下，人体内微生物群的种类可以达到 1 万多种，总细胞数比人体细胞数还多 10 倍，其中细菌、真菌和寄生虫至少有 100 万亿个，病毒数量更

可以达到惊人的 1000 万亿个以上。微生物几乎无孔不入，它们遍布在人体的所有环境暴露表面，但主要还是定居于消化道内，其次是呼吸道、生殖泌尿道和体表等部位。人类肠道微生物以细菌为主，正常的肠道菌群能合成维生素，促进生长发育和物质代谢，提高免疫防御功能，因而是维持人体健康的必要因素，同时也是反映人体内环境是否稳定的一面镜子。

在妇女怀孕过程中，孕妇的身体可主动调整肠道微生物组成，以适应孕期胎儿的营养需求。一般表现为孕妇肠道细菌的多样性明显下降，变形杆菌 (*Proteus bacillus*) 和放线杆菌 (*Actinobacillus*) 成为优势细菌，因此导致血糖升高与脂肪沉积，出现类似糖尿病的早期症状，但未观察到对母体健康产生明显影响。人类胎儿在子宫内一般是无菌的，但婴儿的出生环境主宰其微生物组成，自然分娩的新生儿携带的微生物与母体阴道优势菌群如乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)、普氏菌 (*Prevotella*) 和纤毛菌 (*Leptothrix epidermitis*) 相似，而剖腹产的新生儿携带的微生物则与母体皮肤细菌如葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、棒状杆菌 (*Corynebacteria*) 和丙酸杆菌 (*Propionibacteria*) 组成一致。尽管成年人体内的微生物数量相对稳定，但每个人的微生物种类不尽相同，这与个体的饮食习惯和年龄等直接相关。老年人肠道的微生物多样性 (microbial diversity) 随年龄增长而下降，其中双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 的数量远比中年人少。人体肠道上皮层的总表面积为 200 m²，在肠道下部的回肠和结肠细菌更加密集，每立方厘米微生物数量达到万亿以上。人类肠道中已发现的细菌种类多达 1000 余种，肠道黏膜免疫系统的形成及其免疫功能的成熟与完善，有赖于免疫细胞表面蛋白对外来抗原 (antigen) 如细菌鞭毛、细胞壁脂多糖及肽聚糖的识别和博弈，肠道微生物的驻存有利于激活人体免疫系统。人体肠道通过黏膜层、上皮抗细菌蛋白和固有层浆细胞分泌的免疫球蛋白等隔离细菌或限制肠道细菌的过度生长，其结果是求得双方的“和平共处”与“互利双赢”。虽然“胖妻无瘦夫”的说法不靠谱，但肥胖确实能经由胖人特有的微生物群落“传染”给瘦人。动物模型分析表明，肥胖小鼠肠道中拟杆菌 (*Bacteroid*) 显著减少，厚壁菌 (*Firmicutes*) 显著增加。人体试验也显示出类似倾向，减肥过程中伴随有拟杆菌的增加。肥胖及糖尿病患者体内的梭菌 (*Clostridium*) 较少，但胃旁路手术可致该菌显著增加，由此降低炎症指标和缓解糖尿病。将正常人的肠道微生物移植给梭菌感染者后，只需两周就能使其体内微生物变成拟杆菌占优势，反复发作的难治性

腹泻也“不翼而飞”。用过抗生素（antibiotics）的人，其体内微生物组成就不再是“原汁原味”了。即使未主动服用过抗生素，但被动摄入抗生素如吸吮含抗生素的乳汁或食用含抗生素的禽畜产品等，也能使肠道天然微生物成为“无辜”的牺牲品。一旦微生物“原生态”遭到破坏，菌群之间原有的相互制约和拮抗关系就会发生微生态失调（ecological disruption），从而导致自身免疫及过敏性疾病如类风湿、哮喘、炎症性肠病（主要是克罗恩病）和代谢性疾病如肥胖症、胰岛素抗性和2型糖尿病等疾病发生。用抗生素处理肥胖小鼠可减少脂肪沉积，降低脂肪组织炎症，改善葡萄糖代谢，说明抗生素不可不用，但不能滥用。长期服用抗生素会“滥杀无辜”，让细菌产生抗性继而“死灰复燃”，同时真菌则可“乘虚而入”造成二次感染。采取“微生态恢复疗法”补充益生菌或饮用含益生菌的酸奶，可以避免使用抗生素。动物实验表明，15%酒精与头孢菌素一样能阻断肠道细菌感染诱发的小鼠急性滑膜炎。人体临床调查也显示，长期少量饮酒可以缓解类风湿性关节炎症状。不同的饮食习惯导致肠道微生物组成的差异显著。日本人的肠道里都有一种海洋细菌，它可以分泌独特的水解酶，用来消化日本料理“寿司”（米饭外包紫菜）中的海藻。西方高脂、高糖饮食使拟杆菌占优势，低脂、高纤维饮食（东方饮食）使普氏菌占优势。意大利萨丁岛百岁老人日常食用的是由橄榄油、鱼、新鲜蔬菜和水果组成的低脂、高纤维健康饮食，被称为“地中海饮食”。

本章要点

微生物是用肉眼难以看清的个体微小、结构简单的低等生物（organisms too small to be seen clearly by the unaided eye）的总称，其范畴包括病毒（virus）、细菌（bacteria）、真菌（fungi）、微藻（microalgae）和微型原生动物（protozoan）。与动物和植物相比，微生物虽然个体微小，但具有如下基本特性：①个体小、比表面积大；②生长繁殖快；③吸收多、转化快；④食谱营养范围广；⑤种类多，分布广；⑥容易培养；⑦容易变异。

病毒（virus）是超显微，没有细胞结构，独立于其宿主进化史的专性绝对活细胞内寄生的生物，其 DNA 或 RNA 基因组被其所编码的蛋白质壳体化。病毒在活细胞外具有一般化学大分子特征，而一旦进入宿主细胞又具有生命特征。存在于细胞外的病毒毒粒主要表现为球形（20 面体）、杆状和复杂形状 3 种主要形态。

原核微生物（prokaryotic microorganism）是一大类细胞微小、细胞核无核膜包裹的原始单细胞生物。在显微镜下观察原核微生物细胞，发现其形态主要有球形、杆状和螺旋状三种类型。

真核微生物（eukaryotic microorganism）是细胞核由核膜包裹，能够通过有丝分裂进行繁殖，细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等细胞器的一系列微小生物的总称。

生态系统（ecosystem）指在一定的空间内，生物成分和非生物成分通过物质循环和能量流动相互作用、相互依存而构成的一个生态学功能单位。它包含的 4 要素为：①环境条件；②生产者；③消费者；④分解和转化者。

科学家很早就知道人体与数以万亿计的微生物和平共处，他们把这个微生物群称为“人类微生物组”（human microbiome）。人体内共有大约 2.2 万种人类基因，而人体内微生物基因的种类是这个数字的数百倍，共有大约 800 万种。

人类的健康既取决于内在基因的组成，也取决于外部环境的影响。在外部环境中，最大影响因素是人体肠道内表面及皮肤外表面的微生物群。在正常情况下，人体内微生物群的种类可以达到 1 万多种，总细胞数比人体细胞数还多 10 倍，其中细菌、真菌和寄生虫至少有 100 万亿个，病毒数量更可以达到惊人的 1000 万亿个以上。

习题

- 1-1 什么是微生物？其主要包括哪些生物种类？
- 1-2 与其他生物相比，微生物有哪些特性？
- 1-3 什么叫病毒？
- 1-4 病毒的主要特点是什么？存在于细胞外的病毒毒粒一般有哪些形态？
- 1-5 什么是原核微生物？其主要有哪些细胞形态？
- 1-6 生态系统包括的4要素是什么？
- 1-7 什么叫微生态学？微生物在生态系统中发挥的主要作用是什么？
- 1-8 人体内大约有多少种微生物？主要分布在人体哪个部位？
- 1-9 哪个微生物种类在人类肠道占据优势？其对人体主要发挥哪些有益作用？
- 1-10 如果人类肠道微生物菌群失衡，会导致哪些主要疾病？

参考文献

- [1] BIAGI E, et al. Ageing and Gut Microbes: Perspectives for Health Maintenance and Longevity[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 11-20.
- [2] CHIANG S S, et al. Beneficial Effects of *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* NTU 101 and Its Fermented Products[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 903-916.
- [3] CHIANG S S, et al. Beneficial Effects of Phytoestrogens and Their Metabolites Produced by Intestinal Microflora on Bone Health[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(4): 1489-1500.
- [4] HSU W H, et al. *Monascus Purpureus*-Fermented Products and Oral Cancer: A Review[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 1831-1842.
- [5] LEE B H, et al. Dimerumic Acid, a Novel Antioxidant Identified from *Monascus*-Fermented Products Exerts Chemoprotective Effects: Mini Review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(1): 2-9.
- [6] REINHARDT C, BERGENTALL M, GREINER, T U et al. Tissue Factor and Par1 Promote Microbiota-Induced Intestinal Vascular Remodelling[J]. *Nature*, 2012, 483(7391): 627-631.
- [7] SERBAN D E, et al. Gastrointestinal Cancers: Influence of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics[J]. *Cancer Letters*, 2014, 345(2): 258-270.
- [8] TAGLIABUE A, et al. The Role of Gut Microbiota in Human Obesity: Recent Findings and Future Perspectives[J]. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2013, 23(3): 160-168.
- [9] THIELE I, et al. A Systems Biology Approach to Studying the Role of Microbes in Human Health[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(1): 4-12.
- [10] TSAI Y T, et al. The Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria for Improving Immune Functions and Benefits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(4): 853-862.
- [11] 沈萍, 陈向东. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [12] 李雯静, 肖运才, 等. 畜禽用益生菌的研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2013, 3(6): 37-39.
- [13] 赵东, 徐桂芳, 邹晓平. 益生菌的作用机制 [J]. *国际消化病杂志*, 2012, 32(2): 71-73.
- [14] 刘勇, 张勇, 张和平. 世界益生菌安全性评价方法 [J]. *中国食品学报*, 2011, 11(6): 141-151.

第 2 章

益生菌

2.1 益生菌概述

益生菌 (probiotics) 源于希腊语 for life (对生命有益), 中文译为“益生菌”。1965 年 Lilly 和 Stillwell 将益生菌定义为“任何可以促进肠道菌种平衡, 增加宿主健康效益的活微生物”。目前, 益生菌被定义为一类对宿主有益的活性微生物, 是定殖于人、动物肠道及生殖系统内, 能产生确切健康功效从而改善宿主微生态平衡, 发挥有益作用的活性有益微生物、代谢产物和酶的总称。益生菌存在于地球上的各个角落, 迄今为止, 科学家已发现的人用益生菌大体上可分成四大类, 分别为: ①乳杆菌类, 如嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌、詹氏乳杆菌和拉曼乳杆菌等; ②双歧杆菌类, 如长双歧杆菌、短双歧杆菌、卵形双歧杆菌、嗜热双歧杆菌、青春双歧杆菌等; ③革兰氏阳性球菌, 如粪链球菌、屎肠球菌、乳球菌、中介链球菌等; ④芽孢杆菌类, 如枯草、地衣、凝结和纳豆芽孢杆菌及一些酵母。目前, 世界上最强大的益生菌产品是由以上各类微生物组成的复合益生菌产品。

2.2 益生菌的研发历程

对于益生菌的发现, 最早应该从 17 世纪微生物奠基人法国微生物学家巴斯德 (Louis Pasteur) 发现牛奶由乳酸菌发酵变酸的过程说起。他在显微镜下观

察发现，酸牛奶中有很多微小的乳酸菌，其数量远比鲜牛奶中的多，说明牛奶变酸与乳酸菌的活动密切相关。1878年，李斯特（Lister）首次从酸败的牛奶中分离出乳酸乳球菌。1892年，德国妇产科医生 Doderlein 在研究人类阴道时提出产乳酸的微生物对宿主有益。1899年，法国巴黎儿童医院的蒂赛（Henry Tissier）率先从健康母乳喂养的婴儿粪便中分离了双歧杆菌，发现其与婴儿患腹泻的频率及营养都有关系。1900年，诺贝尔奖得主 E. Metchnikoff 发现保加利亚人比其他民族的人更健康长寿的原因应该归功于保加利亚人经常摄食含有益生菌的发酵乳制品。1905年，保加利亚科学家斯塔门·戈里戈罗夫第一次发现并从酸奶中分离了“保加利亚乳酸杆菌”。1908年，俄国科学家、诺贝尔奖获得者伊力亚·梅契尼科夫（Elie Metchnikoff）正式提出了“酸奶长寿”理论，通过对保加利亚人的饮食习惯进行研究，他发现长寿人群都有经常饮用含益生菌发酵牛奶的传统。1917年，德国 Alfred Nissle 教授从第一次世界大战士兵的粪便中发现一株大肠杆菌，利用这株菌治疗肠道感染疾病（由沙门氏菌和志贺氏菌造成）取得可观成果。1922年，Rettger 和 Cheplin 报道了嗜酸乳杆菌酸奶所具有的临床功效，特别是对消化的帮助。1930年，日本京都大学微生物学研究室首次成功分离出来自人体肠道的乳酸杆菌，取名为副干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei strain shirota*），这就是全球畅销的益生菌饮料“养乐多”的菌种。1935年，乳酸菌饮料问世，益生菌开始走向产业化。1957年，Gordon 等人提出了乳杆菌应该没有致病性，能够在肠道中定殖生长，当菌落形成单位（colony forming unit, CFU）达到 10^7 个/mL 以上时具有有益作用的标准。德国柏林自由大学的 Haenel 教授研究了厌氧菌的培养方法，提出“肠道厌氧菌占绝对优势”的理论。几乎同时日本学者光岗知足（Tomotari Mitsuoka）开始了肠内菌群的研究，建立了肠内菌群分析的经典方法。1962年，Bogdanov 从保加利亚乳杆菌中分离出了3种具有抗癌活性的糖肽，首次报道了乳酸菌的抗肿瘤作用。1965年，D. M. Lilly 和 R. H. Stillwell 在《科学》杂志上发表的论文“益生菌——由微生物产生的生长促进因素”中最先使用 probiotic 这个词来描述一种微生物对其他微生物促进生长的作用。

20世纪70年代初沃斯（Woese）等提出利用16S rRNA 寡核苷酸序列分析法对菌种进行鉴定，为益生菌的鉴定和肠内菌群分析带来极大方便。1974年，Paker 将益生菌定义为对肠道微生物平衡有利的菌物。1977年，德国人 Volker

Rush 首先提出了微生态学 (microecology) 的概念, 建立了对双歧杆菌、乳杆菌和大肠杆菌等活菌进行生态疗法的微生态研究所。Gilliland 提出了乳酸菌通过降解胆盐促进胆固醇分解代谢从而降低胆固醇的观点。1979 年中国开始进行微生态学的研究, 在中国微生物学会人畜共患病病原学专业委员会下属成立了正常菌群学组。1983 年两名美国教授 Sherwood Gorbach 和 Barry Goldin 从健康人体分离出了鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG), 并于 1985 年获得专利。LGG 菌种具有活性强、耐胃酸的特点, 能够在肠道中定殖长达两周。1988 年中华预防医学会微生态学分会成立, 《中国微生态学杂志》创刊。同年, 丹麦的汉森中心实验室生产出超浓缩的直投式酸奶发酵剂 (一系列高度浓缩和标准化的冷冻干燥发酵剂菌种), CFU 可达 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个/g, 可直接加入到热处理后的原料乳中进行发酵, 无须对其进行活化。1989 年, 英国福勒博士 (Dr. Roy Fuller) 将益生菌定义为: 益生菌是额外补充的活性微生物, 能改善肠道菌群的平衡而对宿主的健康有益, 强调了益生菌的功效和益处必须经过临床验证。20 世纪 90 年代, 中国学者张箎教授对世界长寿之乡中国广西巴马地区百岁以上老人体内的微生物群进行了系统研究, 发现长寿老人体内的双歧杆菌数量远比普通老人多。杨景云等学者开始对中国的传统中药与微生态关系进行了系统的研究, 采用益生菌发酵中药是一个重要的研究领域。1992 年, Havennar 对益生菌定义进行了扩展, 解释为单一或混合的活微生物培养物, 通过改善固有菌群的性质对寄主如人和动物产生有益的作用。1995 年吉布森 (Gibson) 把能在肠道中调整菌群的食品称为益生元。1998 年, Guarner 和 Schaafsma 给出了更通俗的益生菌定义: 益生菌是活的微生物, 当摄入足够量时, 能给予宿主健康作用。1999 年 Tannock 认为细菌是人和动物中正常居住者, 在人胃肠道中发现了超过 400 种细菌。2001 年, 世界粮农组织 (Food and Agriculture Organization, FAO) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 也对益生菌做了如下定义: 通过摄取适当的量, 对食用者的身体健康能发挥有效作用的活菌。FAO 和 WHO 的专家强烈建议用分子生物学的手段鉴定益生菌, 并推荐益生菌存放于国际性菌物保藏中心。同年法国完成第一株乳酸菌即乳酸乳球菌 IL1403 的全基因组测序。2002 年, 微生物学教授 Savage 宣布: 正常菌群是人体的第十大系统——微生态系统。2005 年, 美国北卡罗来纳州立大学 Dobrogosz 和 Versalovic 教授提出了免疫益生菌的概念 (immunoprobiotics)。2006 年, 意大利学者 M. Del

Pianoa 等认为益生菌应该定义为一定程度上能耐受胃酸、胆汁和胰脏分泌物而黏附于肠道上皮细胞并在肠道中定殖的一类活微生物，认为从粪便中分离的“益生菌”有可能多数是浮游菌，而非黏附菌。2007年，美国《科学》杂志预测：人类共生微生物的研究将可能是国际科学研究取得突破的7个重要领域之一。英、美、法和中国等科学家酝酿成立“人类微生物组国际研究联盟”（the International Human Microbiome Consortium, IHMC），开始对人类元基因组开展全面研究，其序列测定工作量至少相当于10个人类基因组计划，并有可能发现超过100万个新的基因，最终在新药研发、药物毒性控制和个体化用药等方面实现突破性进展。2012年上海交通大学赵立平教授在《科学》上发表文章，发现人类肠道微生物菌群结构与人类肥胖有着密切的关系，肥胖者肠道阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）数量普遍高，通过减少肉类食品摄入，多吃全麦类和带有苦味的蔬菜如苦瓜等调控肠道微生物菌群组成比例成功减轻了论文作者的体重。如今，许多科学家的研究和临床实验结果也证实益生菌对人体健康有着数之不尽的益处。人体需要益生菌以维持健康与活力、无瑕的容颜、状态极佳的消化机能，以及更强的抵抗力，从而降低患结肠癌和乳腺癌的风险。

2.3 益生菌种

FAO 和 WHO 认为益生菌株必须先经过表型方法和分子生物学方法准确鉴定，然后对其进行安全性和功能如耐酸耐胆盐及肠道定殖活性评价，最后做随机、双盲、安慰剂对照临床试验，以评价益生菌或其产品的功能性。FAO 和 WHO 推荐做3期临床试验，包括初步、标准和比较试验。同时规范了益生菌产品的标签，如菌株组成、种属、CFU 和保存条件等，规定发酵乳中细菌 CFU 不得

低于 10^6 个/g, 酵母 CFU 不得低于 10^4 个/g。欧洲是开展益生菌研究最早的地区, 也是益生菌研究最为密集的区域。益生菌相关产品在欧洲功能性食品市场占有率最大的比例, 功能性食品的健康声称是以各自国家的标准管理的。益生菌健康声称主要被分成 3 大领域: 与儿童健康和发育相关的声称; 新的科学证据发现的或需要保护专有权的健康声称; 降低疾病风险的健康声称。

在美国, 由食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 来管理和监督益生菌产品, 包括食品、食品添加剂、药品和膳食补充剂。益生菌进入市场前必须通过“公认安全使用物质”(generally recognized as safe, GRAS) 标准的认可。GRAS 列出了嗜酸乳杆菌、凝结芽孢杆菌、链球菌、乳杆菌和明串珠菌的无害乳酸菌属名单, 而罗伊氏乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、格氏乳杆菌和双歧杆菌都未列入名单中。益生菌种如符合“明确的科学共识”(significant scientific agreement) 标准后才能被批准。迄今为止, FDA 还未通过具有某种特定健康功效如改善过敏症状、降低胆固醇等的益生菌产品, 也未批准任何益生菌产品作为药品。对于可以饲用的益生菌种, 1989 年 FDA 和美国饲料协会 (the Association of American Feed Control Officials, AAFCO) 公布了 42 种“可直接饲喂且通常认为是安全的微生物”作为微生态制剂的菌种, 主要有细菌、酵母和真菌 3 大类。菌种有: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (仅限于用不产生抗菌素菌株)、嗜淀粉拟杆菌 (*Bacteroides amylophilus*)、多毛拟杆菌 (*Bacteroides capillosus*)、栖瘤胃拟杆菌 (*Bacteroides rumenicola*)、产琥珀酸拟杆菌 (*Bacteroides succinogenes*)、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium difidum*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、嗜热双歧杆菌 (*Bifidobacterium thermophilum*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、纤维二糖乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrückii*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermenti*)、瑞士乳杆菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、乳

酸乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*)、胚芽乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、罗氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)、啤酒片球菌 (*Pediococcus cerevisiae*)、戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)、费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)、谢氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、乳脂链球菌 (*Streptococcus lactis*)、双醋酸乳链球菌 (*Streptococcus diacetylactis*)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、中链球菌 (*Streptococcus intermedium*)、乳链球菌 (*Streptococcus lactis*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。

日本是开展益生菌研究较早的国家，1930年养乐多创始人代田教授从人体中分离出了干酪乳杆菌代田株。20世纪中叶，光岗知足教授在双歧杆菌研究方面做出了突出贡献。正是因为法律、研究和产业三者间的相互促进，才使得日本成为世界上益生菌相关产业最发达的国家。20世纪80年代，日本出现功能食品这一术语，归厚生劳动省 (Ministry of Health, Labour and Welfare) 立法监督和管理。1991年厚生劳动省出台了特定保健用食品 (foods for specific health uses, FOSHU) 规程来管理对人体生理功能有作用的食物或成分的健康声称标签。如今日本的食物健康声称包括两个范畴。第一个范畴是“食物营养素功能声称”。如果一个产品满足了营养素每天消费的最低和最高水平标准，就可以自由地使用这一标签。第二个范畴是“特定保健用食品”，包含特定膳食成分，这些成分满足有益于人体生理功能、保持和增进健康以及改善健康相关的条件，益生菌及其产品属于第二个范畴。生产商在申报益生菌产品时，必须列出发表“产品或其成分有效性”的出版物和内部报告，并提供对每篇论文或报告的总结。益生菌产品必须通过体外代谢和生化试验研究，其中体内试验必须是对日本人的随机对照试验。FOSHU提供的与益生菌相关的功能声明主要包括促进胃肠道健康、降低胆固醇/血压和减肥及缓解过敏症状。日本获得厚生劳动省批准的保健食品中的益生菌种有：鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌 BB536、德氏乳杆菌保加利亚亚种 2038、唾液链球菌嗜热亚种 113、酪乳杆菌代田株、短双歧杆菌雅哥尔得株、乳酸双歧杆菌 FK120、乳酸双歧杆菌 LKM512、嗜酸乳杆菌 CK92、酪乳杆菌 SBR1202、加氏乳杆菌、双歧杆菌 SP、酪乳杆菌 NY1301、乳杆菌 LC、双歧杆菌 Bb-12、乳杆菌、罗氏乳杆菌 1063、植物乳杆菌 229v 和詹

氏乳杆菌 LJ-1。含益生菌的食品或特定保健食品主要是酸奶、发酵乳、乳酸菌饮料和益生菌颗粒制剂等。乳酸菌在小肠起作用，双歧杆菌在大肠发挥作用。除上述菌种外，作为医药用的益生菌还有粪肠球菌、乳酸球菌、酪酸杆菌及凝结芽孢杆菌等。

加拿大益生菌及其产品是由卫生部天然健康产品部门（Natural Health Products Directorate, NHPD）立法监督和管理，益生菌产品有 3 种健康声称：非特异性的结构 / 功能声称、疾病危险降低声称和治疗声称。非特异性的健康声称是指保持和提高身体健康，比如“保持身体健康”或“免疫调节剂”。疾病危险降低声称，比如“益生菌可以降低结肠癌风险”。治疗声称中也包括对疾病的预防功能，比如“益生菌可以用于治疗和预防腹泻”。

1991 年，澳大利亚和新西兰共享一套食品法规系统，由两国食品标准审理部门（Food Standards Australia New Zealand, FSANZ）对益生菌产品进行立法和管理，将益生菌列入非传统食品范畴（non-traditional food）中的新式食品（novel food），健康声称分为一般级别和高级别。一般级别包括营养素含量声称和某些非严重性疾病相关的低风险功能性声称，比如“保持消化健康”。高级别的声称与更严重的健康状况相关，包含生物标志性指标和疾病降低声称，比如“降低胆固醇”和“降低糖尿病风险”。

中国有关益生菌的法规相对滞后，但随着益生菌市场的急剧扩张，相关的法律、法规正不断且迅速地完善。益生菌类食品在中国是以“新资源食品”的名义获准进入市场的，在管理模式上发生了重大改变。原审批具体食品产品的管理模式将改为审批食品原料或成分，审批后新资源食品将以名单形式向社会公告。《新资源食品管理办法》（以下简称《办法》）已于 2007 年 12 月 1 日起正式施行。益生菌属于食品加工过程中使用的微生物新品种范畴，新资源食品和健康声称管理是分开的。《办法》中明确规定：生产经营新资源食品，不得宣称或者暗示其具有疗效及特定保健功能。健康食品申报由国家食品药品监督管理局（China Food and Drug Administration, CFDA）管理。早期的健康食品主要是药食兼用植物制成的食品，如今益生菌也包括在内。申报前需提供来自权威实验室的报告，包括毒理学安全评价、功能有效性评价、活性成分的分析报告、产品稳定性的研究及卫生检查报告等，申报健康食品可以通过权威实验室检测评价，而进口健康食品只能由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所检测并

给予评价。只有成为健康食品才能使用健康声称，但不能使用医学声称。

自2000年以来特别是近10年，我国益生菌得到了广泛的利用，所涉产品及其生产厂家也越来越多。2001年我国卫生部公布可用于保健食品的真菌菌种有酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产阮假丝酵母 (*Candida atilis*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、卡氏酵母 *Saccharomyces carlsbergensis*、蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* Chen et Dai, sp. nov)、蝙蝠蛾被毛孢 (*Hirsutella hepiali* Chen et Shen)、灵芝 (*Ganoderma lucidum*)、紫芝 (*Ganoderma sinensis*)、松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae*)、红曲霉 (*Monascus anka*) 和紫红曲霉 (*Monascus purpureus*)。可用于保健食品的益生菌细菌有两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、婴儿双歧杆菌 (*B. infantis*)、长双歧杆菌 (*B. longum*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、干酪乳杆菌干酪亚种 (*L. casei* subsp. *casei*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。2003年又增补了罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)。2010年我国卫生部批准的可用于食品的菌种名单见表2-1，2011年又增补了肠膜明串珠菌肠膜亚种 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)。2011年我国卫生部批准的可用于婴幼儿食品的菌种名单见表2-2。据不完全统计，目前，我国仅生产益生菌乳酸饮料的厂家就已有近20家，其中活菌产品饮料的生产企业有养乐多、三元、益力多、光明、味全、蒙牛、美乐多、饮乐多、恩优多、益菌多等，杀菌性的乳酸菌饮料生产企业有娃哈哈、喜乐、悦家、雅咕噜啞、乐百氏、原太子奶等，药品有妈咪爱和整肠生等。在人类保健食品、药品及农、牧、水产、环保业的种养殖业中，都已开始使用益生菌。据研究报告数据显示，2007年全球益生菌消费市场总容量约为149亿美元，2013年全球益生菌消费市场总量达196亿美元。据估计，我国益生菌产品年消费市场总量在130亿元至150亿元人民币，每年的市场平均增量大约为10亿元人民币。

表2-1 2010年我国卫生部批准的可用于食品的菌种名单

序号	名称	拉丁学名
一	双歧杆菌属	<i>Bifidobacterium</i>
1	青春双歧杆菌	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
2	动物双歧杆菌 (乳双歧杆菌)	<i>Bifidobacterium animalis</i> (<i>Bifidobacterium lactis</i>)

续表

序号	名称	拉丁学名
3	两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
4	短双歧杆菌	<i>Bifidobacterium breve</i>
5	婴儿双歧杆菌	<i>Bifidobacterium infantis</i>
6	长双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>
二	乳杆菌属	<i>Lactobacillus</i>
1	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
2	干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus casei</i>
3	卷曲乳杆菌	<i>Lactobacillus crispatus</i>
4	德氏乳杆菌保加利亚亚种 (保加利亚乳杆菌)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)
5	德氏乳杆菌乳亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
6	发酵乳杆菌	<i>Lactobacillus fermentum</i>
7	格氏乳杆菌	<i>Lactobacillus gasserii</i>
8	瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>
9	约氏乳杆菌	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
10	副干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus paracasei</i>
11	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	罗伊氏乳杆菌	<i>Lactobacillus reuteri</i>
13	鼠李糖乳杆菌	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
14	唾液乳杆菌	<i>Lactobacillus salivarius</i>
三	链球菌属	<i>Streptococcus</i>
1	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>

表 2-2 2011 年我国卫生部批准的可用于婴幼儿食品的菌种名单

菌种名称	拉丁学名	菌株号
嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM
动物双歧杆菌	<i>Bifidobacterium animalis</i>	BB-12
乳双歧杆菌	<i>Bifidobacterium lactis</i>	HN019
		Bi-07
鼠李糖乳杆菌	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LGG
		HN001

对于动物用饲料添加剂益生菌种,我国由农业农村部进行相关规定和管理。1999年6月我国原农业部第105号文件发布的《允许使用的饲料添加剂品种目录》中共列出12种,分别是干酪乳杆菌、植物乳杆菌、粪链球菌、屎链球菌、乳酸片球菌、枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、乳链球菌、啤酒酵母菌、产朊假丝酵母和沼泽红假单胞菌。2003年原农业部第318号公告中,允许使用的微生物包括地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、屎肠

球菌、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母和沼泽红假单胞菌，共计15种。2006年我国原农业部658号公告《饲料添加剂品种目录（2006）》中规定在饲料添加剂中可用的微生物名单为：地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、两歧双歧杆菌（*Bifidobacterium bifidum*）、粪肠球菌（*Streptococcus faecalis*）、屎肠球菌（*Streptococcus faecium*）、乳酸肠球菌（*Enterococcus lactis*）、嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）、乳酸乳杆菌（*Lactobacillus lactis*）、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilacticii*）、戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）、产朊假丝酵母（*Candida utilis*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、沼泽红假单胞菌（*Rhodopseudomonas palustris*）和保加利亚乳杆菌（*Lactobacillus bulgaricus*），共计16种。2013年，我国原农业部批准使用的35种养殖动物用益生菌种包括地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、嗜热链球菌、罗伊氏乳杆菌、动物双歧杆菌、黑曲霉、米曲霉、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纤维二糖乳杆菌、发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌、产丙酸丙酸杆菌、布氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、凝结芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌和红法夫酵母。

2.4 益生菌与益生元

1995年Gibson和Robefroid首先提出益生元（prebiotics）的概念，其定义是“不消化的食物成分，可选择性刺激结肠中的一种或少数几种细菌的生长和

活性，从而对宿主健康产生有益影响”。2004年修正为：“益生元是一种可被选择性发酵而专一性地改善肠道中有益于宿主健康和幸福感的菌群组成和活性的食物配料”。作为益生元的前提是在小肠不被消化吸收而可完整地进入大肠，被大肠中的有益细菌优先利用而多数有害菌则不能利用或难以利用。至今应用比较广泛的益生元有低聚麦芽糖、低聚果糖和低聚木糖等。一般认为，益生元给益生菌提供“食物”，能够被肠道内有益细菌分解吸收，促进有益细菌生长繁殖。益生元在通过消化道时，大部分不被人体消化，而是被肠道菌群吸收。益生元的关键是只增殖对人体有益的菌群，而不是增殖对人体有潜在致病性或腐败活性的有害菌。大家所熟悉的双歧因子就是促进肠内双歧杆菌生长的益生元，通过益生元在人和动物肠道内有效培养益生菌，可以避免口服益生菌因胃酸和胆盐刺激大量死亡的现象和对外来菌群的抗拒。从动物特别是人体内增殖内源益生菌是安全有效地解决各种肠道问题的方法。

益生元与益生菌都会影响肠道菌群的平衡，但影响的方式不同（表 2-3），主要区别是：益生元作用于人和动物肠道已经存在的内源益生菌，而益生菌是外部添加的微生物，可能与内源益生菌种相同，也有可能完全不一样。益生元主要作为内源益生菌生长的有效碳源，以未经消化的形式进入肠道，促进内源益生菌的生长，间接地保护肠道健康和促进营养物质的吸收。益生菌是补给人或动物的外来微生物，作用更直接，但对不同病因和体质有较明显的针对性，如口服枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和粪肠球菌可以控制肠道有害菌以防治腹泻等疾病。一般来说，益生菌主要通过口服形式进行补给，因此需经过胃部强酸和胆盐的环境，只有部分益生菌可以活着进入肠道；而益生元不是生物，不需要活着进入肠道。另外，免疫系统对于由外部而来的益生菌有识别的过程，特殊体质的人可能会产生过敏等免疫反应，而人类对益生元基本不存在过敏等免疫反应。目前，市场上有很多合生元的产品，其实质就是把益生菌和益生元整合在一起（合生元），做到优势互补，使内源和补加的益生菌都能够在人和动物肠道发挥作用。

表 2-3 益生元与益生菌的区别

项目	益生元	益生菌
概念	给益生菌提供营养物质（培养基）	对人和动物有益的微生物
本质	低聚糖、双歧因子	外部添加的益生菌

续表

项目	益生元	益生菌
作用原理	为内源益生菌提供有效碳源，刺激其生长并控制有害菌数量	直接使人或动物通过口服补给益生菌来抑制有害微生物
过敏免疫反应	一般不会产生过敏等免疫反应	某些特质人群可能产生过敏等免疫反应
活性	非有机活体，以未经消化形式到达肠道，不存在存活率问题	有机活体，需经强酸和胆盐的考验，只有部分能够活着到达肠道
机理	促内源益生菌生长，间接发挥作用	补给益生菌直接发挥作用

2.5 益生菌存在的问题与发展趋势

尽管在国内外围绕益生菌特别是肠道微生物领域不断有新的发现，有关益生菌保健功能的研究已有许多报道，但总体而言，其研究仍然不充分，主要表现为：①益生菌株不明确。每一个微生物菌种可能根据来源地不同而包含有不同的株，如枯草芽孢杆菌有很多不同的株，但不能保证所有的枯草芽孢杆菌都是安全的并有益生效果，因此对于不同来源的益生菌种要由国家权威部门通过生理生化和分子生物学双重手段进行分类和鉴定及保存，建议国家建立统一的益生菌种库。②作用机理未完全阐明。很多情况下益生菌的功能都是推测的，缺乏充分证据。研究结论来自于不同的症状、人群、方法、菌株及剂量，缺乏多方对比验证。③未考虑益生菌的地域性。全球各地筛选的不同益生菌均具有其独一无二的生态位（ecological niche），来自于国外的益生菌种并不一定对国内人群发挥同样功效，因此具有明显优势的内源土著益生菌（native endogenous probiotics）将会发挥至关重要的作用，这一点往往被人忽视。例如，国外验证

的益生菌酸奶不一定适合中国人。美国和西欧制造的酸奶和乳酸类饮料对俄罗斯人的体质并不十分适宜,俄罗斯正致力于研制用于加工酸乳的新型乳酸菌“爱国细菌”,专门适合俄罗斯人的体质。如果俄罗斯人饮用符合自身基因特性的乳酸菌饮料,则产生的效果是进口产品的10倍。

随着人们对生活质量要求的提高,对益生菌功效、作用和重要性的理解将会更加深入。迄今为止,益生菌已被广泛应用于科学研究和工业生产中,然而要想取得突破性进展,尚需在如下几方面进行系统深入的研究与探索:①新益生菌种的筛选与功能验证。微生物是肉眼难以看清的微小生物总称,尽管人眼看不到,但其无处不在、无处不有、无处不发挥作用。虽然我们发现了以乳酸菌为代表的100多种益生菌,但只能说占据了10多万微生物种类的冰山一角,因此不断探索发现新的益生菌种和功效是未来研究与开发的重要研究方向。②单一益生菌的作用机理。对于单一益生菌的有机活体,对其发挥的作用必须从物理、化学和生物等多个方面进行综合研究与分析,需要采用物理、化学和生物等多学科研究领域的最先进仪器设备,归纳总结某种益生菌的总体作用机理。③微生物菌群的作用机理。人体摄入某种益生菌后,实际上是通过人体肠道微生物菌群的变化来发挥作用的,因此进行不同微生物菌种之间的相互作用、微生物菌群变化与功效之间的关系研究将有助于进一步揭示益生菌的作用机理。④益生菌的高效优化培养控制技术。再好的益生菌,一个细胞也不可能发挥作用,因此需要一定的益生菌量,虽然在益生菌种筛选和作用效果及机理方面开展了大量的研究,但要实现产业化必须研发益生菌的高效优化培养控制技术,以满足市场不断提高益生菌产品活菌量的需求。⑤益生菌的保护与合理应用。很多益生菌种因不能耐酸和胆盐而无法活着进入小肠发挥作用,因此在活益生菌的保护和包埋等方面需要进行一系列的研究与探索,以在肠道更好地发挥益生菌的作用,提高益生菌产品的稳定性和生存能力。

本章要点

益生菌是一类对宿主有益的活性微生物，是定植于人、动物肠道及生殖系统内，能产生确切健康功效从而改善宿主微生态平衡，发挥有益作用的活性有益微生物、代谢产物和酶的总称。

人用益生菌大体上可分为四大类，分别为：①乳杆菌类；②双歧杆菌类；③革兰氏阳性球菌；④芽孢杆菌类。目前，世界上最强大的益生菌产品是由以上各类微生物组成的复合益生菌产品。

17世纪，微生物奠基人法国微生物学家巴斯德（Louis Pasteur）在牛奶变酸过程中，通过显微镜观察，首先发现了益生菌的一个品种——乳酸菌。

益生元是一种可被选择性发酵而专一性地改善肠道中有益于宿主健康和幸福感的菌群组成和活性的食物配料。

益生菌研究仍然不充分的主要表现为：①益生菌株不明确；②作用机理未完全阐明；③未考虑益生菌的地域性。

益生菌系统深入的研究与探索方向有：①新益生菌种的筛选与功能验证；②单一益生菌的作用机理；③微生物菌群的作用机理；④益生菌的高效优化培养控制技术；⑤益生菌的保护与合理应用。

习题

2-1 什么是益生菌?

2-2 人用益生菌大体上可分成哪些类别?

2-3 市场普遍畅销的“养乐多”乳酸菌饮料菌种是什么菌? 是什么时间从何处分离的?

2-4 Probiotic 一词最早是什么时间由谁在哪个刊物首先提出的?

2-5 LGG (鼠李糖乳杆菌) 是由谁在什么时间从何处分离的? 此菌种有哪些明显优势?

2-6 中国广西巴马地区百岁以上老人体内什么菌含量多? 是谁在什么时间段发现的?

2-7 我国赵立平教授发现肥胖者肠道哪种菌含量高? 其通过哪些方式来使自己成功减肥?

2-8 日本主要有哪含益生菌的食品或特定保健食品? 乳酸菌和双歧杆菌各在人体哪个部位发挥主要作用?

2-9 根据 2004 年修正后的结果, 益生元是什么?

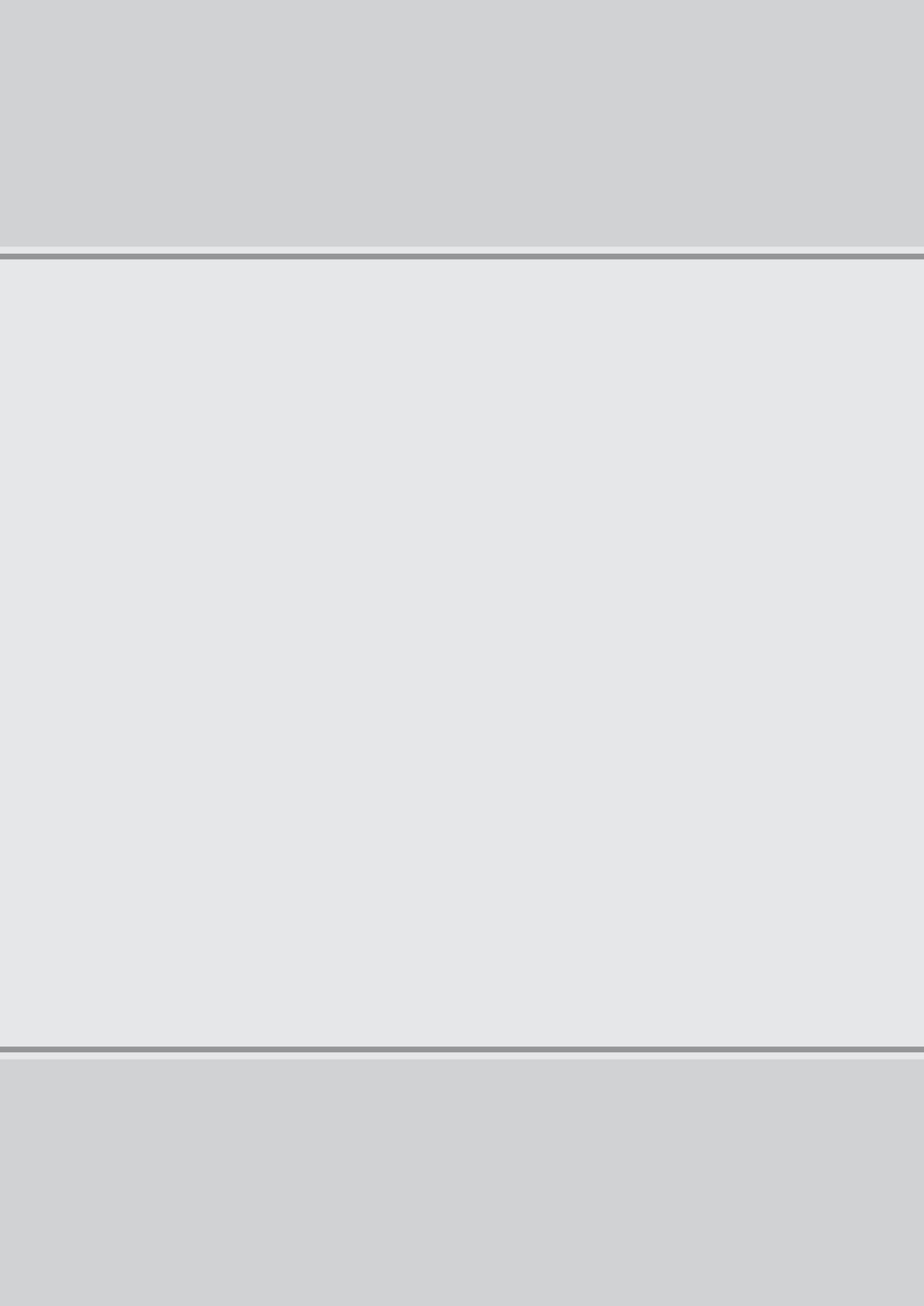
2-10 益生菌与益生元的主要区别是什么?

2-11 益生菌存在的主要问题是什么?

2-12 益生菌的发展趋势是什么?

参考文献

- [1] HEINTZ C, et al. You Are What You Host: Microbiome Modulation of the Aging Process[J]. *Cell*, 2014, 156(3): 408-411.
- [2] HSU W H, et al. A Novel PPAR γ Agonist Monascin's Potential Application in Diabetes Prevention[J]. *Food & Function*, 2014, 5(7): 1334-1340.
- [3] HSU W H, et al. Treatment of Metabolic Syndrome with Ankaflavin, a Secondary Metabolite Isolated from the Edible Fungus *Monascus Spp*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 4853-4863.
- [4] LEE B H, et al. Dimerumic Acid, a Novel Antioxidant Identified from *Monascus*-Fermented Products Exerts Chemoprotective Effects: Mini Review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(1): 2-9.
- [5] REINHARDT C, BERGENTALL M, GREINER T U, et al. Tissue Factor and Par1 Promote Microbiota-Induced Intestinal Vascular Remodelling[J]. *Nature*, 2012, 483(7391): 627-631.
- [6] SANZ Y, et al. Understanding the Role of Gut Microbes and Probiotics in Obesity: How Far Are We?[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 144-155.
- [7] SERBAN D E, et al. Gastrointestinal Cancers: Influence of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics[J]. *Cancer Letters*, 2014, 345(2): 258-170.
- [8] TAGLIABUE A, et al. The Role of Gut Microbiota in Human Obesity: Recent Findings and Future Perspectives[J]. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2013, 23(3): 160-168.
- [9] TSAI Y T, et al. Anti-Obesity Effects of Gut Microbiota Are Associated with Lactic Acid Bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 1-10.
- [10] 沈萍, 陈向东. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [11] 张善亭, 史燕, 等. 丁酸梭菌的研究应用进展 [J]. *生物技术通报*, 2013 (9): 27-33.
- [12] 袁铁铮, 姚斌. 分子水平上益生菌研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 24 (10): 27-32.
- [13] 高林, 白子金, 等. 微生物饲料添加剂研究与应用进展 [J]. *微生物学杂志*, 2014, 34(2): 1-6.
- [14] 宋元林, 白春学, 等. 细菌感染的非抗生素治疗研究进展 [J]. *微生物与感染*, 2012, 7(4): 202-207.



第 3 章

乳酸菌

3.1 乳酸菌概述

3.1.1 乳酸菌的发现

乳酸菌是一类使食物变酸的细菌，它能将乳变酸，故称为乳酸菌。乳酸菌广泛分布于植物、动物、人体和整个自然界中；它肉眼看不见，极其微小，直径 0.1~1 μm ，长度 0.5~40 μm 。乳酸菌不仅可以使食物变得美味，延长其保存期，而且作为药品和保健食品，可以提高和改善人的健康状况，延年益寿；此外，还可作为微生物学和微生态学领域研究的模式生物。人类在发现和研究利用乳酸菌方面经历了四个阶段，如表 3-1 所示。

表 3-1 乳酸菌发展简史

第 一 阶 段 : 19 世 纪 前	4000年前，古人已有饮用酸奶的历史
	2500年前，佛教教典中有关于乳酸菌分泌物的经文
	公元前200多年，古印度、古埃及和古希腊人就已经掌握了发酵乳手工制作方法
	公元1世纪，Plinius首次描述了用甘蓝制成的酸泡菜
第 二 阶 段 : 19 世 纪	1500多年前，我国南北朝时期杰出的农业科学家贾思勰在古代“四大农书”之一的《齐民要术》中，记载了制造酸奶的方法
	1500多年前，在《圣经·创世纪》中记录了有关酸奶的制作
	1008年，德国开始建厂生产酸奶
	1750年，瑞典化学家Scheele在酸奶中发现一种不纯净的棕色浆状物，把它称为乳酸（acid of milk）
	1847年，Blondeau判明乳酸是发酵过程的最终产物
	1857年，巴斯德（Louis Pasteur）在研究乳酸发酵过程中首次发现乳酸菌，从而阐明了乳酸发酵的原理
第 三 阶 段 : 19 世 纪	1878年，李斯特（Lister）首次从酸败的牛奶中分离出乳酸菌的纯培养菌株——乳链球菌（ <i>Streptococcus lactis</i> ）
	1881年，在欧洲使用乳酸菌进行工业化生产乳酸
	1884年，胡普（Hueppe）把使牛奶发酸的细菌以 <i>Bacterium acidi lactici</i> 命名，首次将“酸奶细菌”命名成“乳酸菌”
	1885年，A.L. Canteni 的细菌治疗成功
	1899年，蒂赛（Tisser）发现双歧杆菌（ <i>Bacillus bifidus</i> ）

续表

第三阶段： 20世纪	1900年，梅契尼科夫发现保加利亚乳杆菌
	1900年，奥地利医生莫罗 (E. Moro) 发现嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)
	1900年，奥拉-詹森 (Orla-Jensen) 对乳酸菌进行了首次分类
	1905年，梅契尼科夫出版《长寿说》 (<i>The Prolongtion of Life</i>) 一书
	1911年，梅契尼科夫的同事Louden Dμglas出版《长寿杆菌》 (<i>Bacillus of Long Life</i>) 一书
	1915年，美国Daviel Newmam首次利用乳酸菌治疗膀胱感染，为乳酸菌在临床方面的应用奠定了基础
	1919年后，在蒂策勒 (R.P.Tittsler)、罗高沙 (Rogosa)、沙普 (Sharpe) 及光岗知足等研究人员的不懈努力下，直到20世纪60年代，才逐渐确立了乳酸菌的分类方法
	1919年，Isaac Carasso在巴塞罗那工业化生产并销售酸奶。最初的目的是帮助治疗腹泻，因此主要在药房销售
	1928年，美国首次报道了由乳酸乳杆菌 <i>L.lactics</i> 产生抗菌肽，即乳酸菌素
	1935年，代田稔制造和销售乳酸菌饮料
	1942年，汤腾汉等从酸牛乳中分离出5株乳酸菌
	1949年，四川重庆振元化学药品厂首先在我国采用乳酸菌发酵法制造乳酸
	20世纪50年代，乳酸菌药品表飞鸣上市
第四阶段： 21世纪	2000年以来，发布了乳杆菌的30个新种和双歧杆菌3个新种
	2001年，法国的Bolotin等公布了第一个完整的乳酸菌DNA序列
	目前，全球已完成基因组DNA测序的乳酸菌有6个，正在进行测序的有23个

自1875年巴斯德 (Louis Pasteur) 发现乳酸菌以来，经过李斯特 (Lister)、蒂赛 (H.Tisser)、梅契尼科夫 (Elie Metchnikoff)、莫罗 (E.Moro)、奥拉-詹森 (Orla-Jensen)、蒂策勒 (R.P.Tittsler)、罗高沙 (Rogosa)、沙普 (Sharpe)、光岗知足及代田稔等各国的微生物学家的不懈探索和研究，至今已发现的乳酸菌包含43个属，373个种和亚种。表3-2给出43个属的模式菌种、首次命名者和来源。

表 3-2 乳酸菌的命名和模式菌株

序号	属名	种名	首次命名者	年份	模式菌株	分离来源
1	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	Cohn	1872		脊椎和非脊椎动物
2	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	乳酸乳球菌乳酸亚种 <i>L. lactis</i>	Lister	1873	ATCC 19435	生牛奶和乳品
3	明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	肠膜明串珠菌 <i>L. mesenteroides</i>	Tsenkovskii	1878	ATCC 8293	人、动物
4	纤毛菌属 <i>Leptotrichia</i>	口腔纤毛菌 <i>L. bhccalis</i>	Robin	1879	ATCC 14201	菌斑中, 女性生殖道
5	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	Rosenback	1884		食品、尘埃和水
6	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	酿脓链球菌 <i>S. Pyogenes</i>	Rosenbach	1884	ATCC 12344	
7	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	Leichmann	1896	ATCC 9649	
8	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	脆弱拟杆菌 <i>B. fragilis</i>	Veillon和Zuber	1898	ATCC 25285	
9	双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	两歧双歧杆菌 <i>B. bifidum</i>	Tisser	1899	ATCC 29521	胃肠道
10	片球菌属 <i>Pediococcus</i>	有害片球菌 <i>P. damnosus</i>	Claussen	1903	ATCC 29358	蔬菜、食品
11	肠球菌属 <i>EntPrococcus</i>	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	Andrewes和Horder	1906	ATCC 19433	
12	蜜蜂球菌属 <i>Melissococcus</i>	冥王蜜蜂球菌 <i>M. plutonius</i>	White	1912	ATCC 35311	欧洲蜜蜂乳状病
13	李斯特氏菌属 <i>Listeria</i>	单核细胞增生李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	Pirie	1940	ATCC 15313	病兔
14	瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>	生黄瘤胃球菌 <i>R. flavefaciens</i>	Sijpexteijn	1948		哺乳动物的瘤胃、大肠和盲肠
15	气球菌属 <i>Aerococcus</i>	绿色气球菌 <i>A. vzrzdans</i>	Williams Hirsch和Cowan	1953		医院、病龙虾
16	毛螺菌属 <i>Lachnospira</i>	多对毛螺菌 <i>L. multiparus</i>	Bryant和Small	1956		小牛瘤胃
17	孪生球菌属 <i>Gemella</i>	溶血孪生球菌 <i>G. haemolysant</i>	Berger	1960		人口腔、肠道、呼吸道

续表

序号	属名	种名	首次命名者	年份	模式菌株	分离来源
18	塞巴鲁德氏菌属 <i>Sebaldella</i>	白蚁塞巴鲁德氏菌 <i>S. termitidis</i>	Sebald	1962	ATCC 33386	白蚁的后肠内含物
19	芽孢乳杆菌属 <i>Sporolactobacillus</i>	菊糖芽孢乳杆菌 <i>S. inulinus</i>	Kitahara和Suzuki	1963	ATCC 15538	鸡饲料、土壤
20	巨单胞菌属 <i>Megamonas</i>	趋巨巨单胞菌 <i>M. hypermegale</i>	Harrison和Hansen	1963	ATCC 25560	人、动物和家禽的肠道
21	罗氏菌属 <i>Rothia</i>	龋齿罗氏菌 <i>R. dentocariosa</i>	Geory和Brown	1967		人的嘴和喉部
22	索丝菌属 <i>Brochothrix</i>	热杀索丝菌 <i>B. thermosphacta</i>	Sneath和Jones	1976		肉产品
23	热厌氧菌属 <i>Thermoanaerobium</i>	布氏热厌氧菌属 <i>T. brockii</i>	Zeikus	1979	ATCC 33075	温泉
24	光岗菌属 <i>Mitsuokella</i>	多酸光岗菌 <i>M. multiacida corrig</i>	Mitsuoka	1982	ATCC 27723	人、猪囊和人牙龈感染
25	糖球菌属 <i>Saccharococcus</i>	嗜热糖球菌 <i>S. thermophilus</i>	Nystrand	1984	ATCC 43125	甜菜提取物
26	微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	金橙黄微小杆菌 <i>E. rurantiacum</i>	Collins等	1984		马铃薯、加工废水
27	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i>	Castellani和Chalmers	1984		化脓口腔、肠道、垃圾
28	动弯杆菌属 <i>Mobiluncus</i>	柯氏动弯杆菌 <i>M. curtisii</i>	Spiegel和Roberts	1984		女性的阴道
29	闪烁杆菌属 <i>Feridobacterium</i>	多节闪烁杆菌 <i>F. nodosum</i>	Patel	1985	ATCC 35602	新西兰和冰岛的温泉
30	栖热袍菌属 <i>Thermotoga</i>	海栖热袍菌 <i>T. maritima</i>	Stetter和Huber	1986	ATCC 43589	地热海水沉积物或潮汐泉、油井
31	科里氏杆菌属 <i>Coriobacterium</i>	球团科里氏杆菌 <i>C. glomerans</i>	Haas和Konig	1988	ATCC 49209	红兵甲虫的肠道
32	漫游球菌属 <i>Vagococcus</i>	河流漫游菌 <i>V. fluvialis</i>	Collins	1989	ATCC 49515	河流
33	阿托波氏菌属 <i>Atopobium</i>	微小阿托波氏菌 <i>A. minutum</i>	Collins	1992		
34	四联球菌属 <i>Tetragenococcus</i>	嗜盐四联球菌 <i>T. halophilus</i>	Collins等	1993	Strain 885/78 ^T	
35	魏斯氏菌属 <i>Weissella</i>	绿色魏斯氏菌 <i>W. viridescens</i>	Collins和Samells	1994		土壤

续表

序号	属名	种名	首次命名者	年份	模式菌株	分离来源
36	酒球菌属 <i>Oenococcus</i>	酒酒球菌 <i>O. oeni</i>	Garvie	1995	ATCC 23279	
37	嗜盐菌属 <i>Halocella</i>	解纤维嗜盐菌 <i>H. cellulolytica</i>	Malmqvist	1997	ATCC 700086	
38	副乳杆菌属 <i>Paralactobacillus</i>	雪兰莪副乳杆菌 <i>P. selangorensis</i>	Leisner	2000	ATCC 23279	马来群岛红 辣椒
39	陌生细菌属 <i>Atopobacter</i>	海豹陌生细菌 <i>A. phocae</i>	Lawson	2000	ATCC BAA- 285	海豹
40	<i>Scardovia</i>	<i>S. inopinata</i>	Jia和Dang	2002		
41	<i>Parascardovia</i>	<i>P. denticoiens</i>	Jia和Dang	2002		人口腔
42	似杆状菌属 <i>Isobaculum</i>	獾似杆状菌 <i>I. meil</i>	Collins	2002	Strain M577- 94	獾的肠道
43	海乳杆菌属 <i>Marinilactacil- lus</i>	耐冷盐海乳杆菌 <i>M. psychrotolerans</i>	Ishikawa	2003	Strain M13-2	日本亚热带 海洋生物

3.1.2 乳酸菌的定义和分类方法

1. 乳酸菌的定义

乳酸菌是能使葡萄糖（或可利用的碳水化合物）发酵产生大量乳酸的一群细菌。这只是一种历史习惯叫法，并不是分类学上的名称。目前细菌分类有数百个属，很难把能否产生大量乳酸作为细菌的分类标准，但乳酸菌的习惯叫法已被大家广泛接受。这里给出乳酸菌的定义为：一类能在可利用的碳水化合物发酵过程中产生大量乳酸的细菌。

书中采用如下特征作为乳酸菌分类的基础：细胞形态，细胞染色，有无芽孢，生理需求，发酵方式，发酵代谢产物，DNA 的（G+C）含量。

2. 乳酸菌的分类方法

20 世纪 60 年代前，对乳酸菌主要按其形态、培养条件、糖的利用、代谢产物等进行分类；60 年代后，增加了乳酸菌细胞 DNA 中（G+C）含量测定；90 年代后，采用 16S rDNA 序列分析和基因探针及类脂分析等技术进行测定、分类。目前乳酸菌分类和鉴定最常用的方法是聚合酶链反应（polymerase chain

reaction, PCR) 和核酸分子探针杂交技术。

1) 乳酸菌在《伯杰氏系统细菌学手册》中的分类方法

自巴斯德发现乳酸菌以来,许多研究人员根据乳酸菌的形态学、生理生化学(生长温度、糖发酵途径、营养、代谢产物)、血清学、化学分类(胞壁组成、乳酸旋光性、醌类测定)、抑制物试验和基因型(DNA的同种与异种、(G+C)含量)等方面进行分类。根据国际公认的分类系统——伯杰氏系统,在《伯杰氏系统细菌学手册》(*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*)第2版中,乳酸菌分属于细菌界中五个门(图3-1):门B II——热孢菌门(Thermotogac),包括2个属;门BXIII——硬壁菌门(Firmicutes),包括30个属;门BXIV——放线菌门(Actinobacteria),包括7个属;门BXX——拟杆菌门(Bactero),包括2个属;门BXXI——梭杆菌门(Fusoacteria),包括2个属。

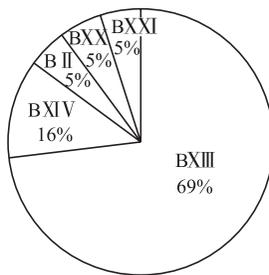


图3-1 乳酸菌在细菌界中的分布

2) 奥拉-詹森的分类方法

1943年,奥拉-詹森按糖代谢途径和产物类型对乳杆菌进行了研究,把乳杆菌属分成3个亚属。

亚属1——贝塔杆菌亚属(*Betabacterium*)对葡萄糖进行异型乳酸发酵,产CO₂,产生DL-乳酸。

亚属2——链细菌亚属(*Sireptobacterium*)对葡萄糖进行同型乳酸发酵,不产CO₂,可在15℃下生长,可发酵戊糖,能利用葡糖酸并产CO₂;产生L(+)-乳酸、D(-)-乳酸或DL-乳酸。

亚属3——热细菌亚属(*Thermobacterium*)对葡萄糖进行同型乳酸发酵,不产CO₂,可在45℃或更高的温度下生长,但不能在15℃下生长,不能发酵戊糖或利用葡糖酸并产CO₂;产生L(+)-乳酸、D(-)-乳酸或DL-乳酸。

3) Kandler 和 Weiss 的分类方法

1986 年, Kandler 和 Weiss 研究发现, 乳酸菌与乳杆菌在糖发酵过程中表现类似, 同样可分为三个代谢类群: 第 I 群为不发酵戊糖或葡萄糖酸盐的专性同型发酵; 第 II 群为发酵戊糖或葡萄糖酸盐的兼性异型发酵; 第 III 群为从葡萄糖产生等量乳酸、CO₂、乙酸和 / 或乙醇的专性异型发酵。

4) 乳酸菌的现代分类和鉴定方法

乳酸菌的现代分类和鉴定的依据是表型特征 (细胞壁组成、生理生化、蛋白印记等) 和遗传学特征 (特异 DNA 序列)。

乳酸菌的现代鉴定方法包括: ① DNA /DNA 或 DNA/rRNA 的同源性测定; ②限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP), 扩增片段长度多态性分析 (amplified fragment length polymorphism, AFLP); ③随机扩增 DNA 多态性分析 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 和 16S rRNA 全序列分析等。聚合酶链反应和核酸分子探针杂交技术是乳酸菌现代分类和鉴定最常用的方法。

3.1.3 乳酸菌的分布

乳酸菌广布于植物的果实、根茎叶和腐烂植物体, 堆肥、土壤、污水, 发酵动植物食品和饮料, 人体和动物的消化系统、呼吸系统、泌尿系统、口腔系统、皮肤系统和粪便, 乳汁和乳制品等。它们是生物界中的重要一员, 对植物、动物和人类的生存具有重要的作用。

1. 植物及其制品中的乳酸菌

乳酸菌在植物中广泛存在。乳酸菌在植物微生态系统中占有重要地位, 具有保护植物生态平衡的作用。当植物受到机械损伤, 或者在腌制过程中, 就会产生许多乳酸菌。从新鲜枝叶上可分离到乳酸菌, 为 10~1000 个 /g, 占总细菌数的 0.01%~1%; 从大多数亚热带植物中可分离得到 *L. brevis*、*L. casei*、*L. viridescens*、*L. cellobisous* 和 *L. salivarius*。从一些植物果实中可以检出乳球菌属和片球菌属; 从植物根际也能分离得到乳酸菌, 常见的是 *L. plantarum*、*L. brevis* 和 *L. fermentum*。

传统的乳酸菌发酵蔬菜, 如泡菜和腌菜中的微生物主要有肠膜明串珠菌、乳酸片球菌、植物乳杆菌、短乳杆菌、布氏乳杆菌等乳酸菌, 还有酵母菌、丁

酸菌、大肠杆菌和一些霉菌；从发酵果蔬食品还可分离到 *L. curvatus*、*L. sake* 和 *L. paracasei*、*L. bavaricus* 等，乳球菌、肠球菌、消化球菌等通常较少，只占乳酸菌总数的不到 10%；在青贮饲料的发酵中后期，可分离得到占优势的乳杆菌和其他一些乳酸菌，如 *L. casei*、*L. brevis*、*L. buchneri*、*L. fermentum*、*L. acidophilus* 和 *L. salivarium* 等；从葡萄表面和葡萄叶上可分离得到肠膜明串珠菌、酒明串珠菌等。

2. 动物及其产品中的乳酸菌

乳酸菌主要分布于动物消化道中。从猪胃、大肠，鸡嗉囊、小肠、大肠中，检出乳杆菌 10^9 个/mL、链球菌 $10^4 \sim 10^7$ 个/mL。从动物消化道中分离得到的乳杆菌有乳酸乳杆菌 (*L. lactis*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、唾液乳杆菌 (*L. salivarium*)、德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii*) 和 *L. reuteri*。

乳酸菌的生长导致了肉的酸败、发黏、变绿和产生异味。从肉中分离得到的乳酸菌主要有弯曲乳杆菌 (*L. curvatus*)、清酒乳杆菌 (*L. sake*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、香肠乳杆菌 (*L. farciminis*)、*L. alimentarium*、短乳杆菌 (*L. brevis*) 和 *L. harloferans*。

生牛乳中的乳酸菌主要是链球菌属和乳杆菌属，它们可以使生牛乳中的乳糖进行同型或异型乳酸发酵，产生乳酸等产物，使牛乳变酸。常见的链球菌有乳链球菌 (*S. lactis*)、嗜热链球菌 (*S. thermophilus*)、乳脂链球菌 (*S. cremoris*)、粪链球菌 (*S. faecalis*)、液化链球菌 (*S. liquefaciens*) 等；常见的乳杆菌有嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、嗜热乳杆菌 (*L. thermophilus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、保加利亚乳杆菌 (*L. bulgaricus*) 等。

3. 人体中的乳酸菌

乳酸菌在人体消化道和生殖道中大量存在，它们伴随着人类的生、老、病、死。婴幼儿出生后数小时，就在消化道系统中建立起正常益生菌群系统，其中乳酸菌占 50% 以上。

口腔中的乳酸菌有唾液链球菌 (*S. salivarius*)、缓症链球菌 (*S. mitis*)、血液链球菌 (*S. sanguis*)、变形链球菌 (*S. mutans*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、唾液乳杆菌 (*L. salivarius*)、埃氏双歧杆菌 (*Bifidobacterium eriksonii*)、齿双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentinum*) 等。食道中乳酸菌较少，多为过路菌。胃中的乳酸菌也仅有 10^3 个/

mL, 多为耐酸的乳杆菌和链球菌。而肠道中的乳酸菌主要是乳杆菌和肠球菌, 多达 10^5 个/g。粪便中也可分离得到乳酸菌, 为 $10^4 \sim 10^9$ 个/g, 其中有 *L. acidophilus*、*L. fermentum*、*L. salivarius*, 有时还有 *L. lactis*、*L. casei*、*L. plantarum*、*L. brevis* 和 *L. buchneri*。后 5 种菌被证明是过路菌, 不能在体内定殖。此外, “长寿菌”双歧杆菌主要栖居于人和动物的肠道内, 主要有两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)、长双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、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*) 和小链双歧杆菌 (*L. catenulatum*) 等。

妇女阴道中也存在着乳酸菌, 主要为乳杆菌属, 它是阴道正常菌群中的重要成员, 是妇女阴道中的常住菌, 在阴道排出物中的分离率为 50%~80%, 乳杆菌数量可达 8×10^7 个/mL。阴道中常见的乳杆菌有嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、短乳杆菌、德氏乳杆菌、莱氏乳杆菌、布氏乳杆菌、链状乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳杆菌和纤维二糖乳杆菌等, 共 11 种; 过路乳杆菌有双歧乳杆菌、嗜热乳杆菌、詹氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、保加利亚乳杆菌等 5 个乳杆菌种。健康的成年妇女阴道内的 pH 值通常低于 4.5, 是乳酸菌产酸所致, 可保护阴道免受有害细菌的侵害。

4. 自然环境中的乳酸菌

土壤是微生物存在的大本营, 也是乳酸菌良好的生长环境。在营养丰富的土壤中乳酸菌含量高, 但乳酸菌并不是土壤中原籍菌, 它主要来自污水、肥料、植物及根际微生物区系。污水中的乳酸菌数量可达 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL, 主要有 *L. fermentum*、*L. reuteri*、*L. brevis*、*L. plantarum* 和 *L. ruminis* 等; 有时还可以分离到双歧杆菌, 如 *B. longam*、*B. brevis*、*B. adolescentis* 等。在人畜粪便和堆肥等有机肥料中, 乳酸菌的种类和数量与污水中相近。

3.2 乳酸菌的生理特性

乳酸菌主要存在于营养丰富的有机环境中，人工培养乳酸菌仅能获得较低的生物量，这是由乳酸菌的营养、代谢等生理特性所决定的，特别是：①乳酸菌的蛋白质分解能力和氨基酸、维生素、嘌呤、嘧啶的合成能力较弱；②乳酸菌一般都是耐氧性厌氧菌、兼性厌氧菌或专性厌氧菌，只能通过糖类发酵和底物水平磷酸化方式低效率地获取少量能量，用以维持其生命活动和进行生物合成；③乳酸菌的主要代谢产物或唯一代谢产物都是对自身正常生长繁殖有抑制作用的物质，如乳酸、乙醇和乙酸等。

为了高效培养乳酸菌，必须深入了解其营养需求和代谢特性，以便寻找和设计出营养丰富、要素全面、原料易取、效果良好的培养基，在此基础上，再根据它们的代谢和生长特性，创造最适其生长和产生代谢产物的生理条件。

3.2.1 乳酸菌的营养

1. 乳酸菌的细胞组分

乳酸菌的细胞组分与真细菌相同，一般由 20 余种元素组成，主要以碳、氧、氢、氮、磷、硫、镁、钾等为主，此外还含有铜、锌、锰、钴、钼等许多微量元素。表 3-3 列出了乳酸菌细胞的各组分和元素含量。

表 3-3 乳酸菌的细胞组分

	成分	含量(干重)/%
大分子物质	蛋白质	55 (50~60)
	糖类	9 (6~15)
	脂类	7 (5~10)
	核酸	23 (15~25)

续表

	成分	含量(干重)/%
元素成分	碳	48(46~50)
	氢	12.5(10~14)
	灰分元素	6(4~10)
	磷	1.0~2.5
	硫、镁	0.3~1.0
	钾、钙	0.1~0.5
	钠、铁	0.01~0.1
	锌、锰、铜	0.001~0.01

2. 乳酸菌的营养需求

与所有的微生物一样,乳酸菌的基本营养需求也是六大营养要素——碳源、氮源、能源、生长因子、无机盐和水。乳酸菌是化能异养微生物,其碳源兼作能源。

1) 碳源

碳源是指满足微生物生长繁殖所需的碳元素类营养物质。乳酸菌细胞碳元素含量约占其干重的一半,除水分外,碳源是其需要量最大的营养物。乳酸菌的碳源谱较窄,最常用的碳源是单糖中的己糖,部分菌种能利用戊糖,只有极少数菌种还可利用淀粉。乳酸菌三个大属的主要碳源如下:

(1) 乳杆菌属(*Lactobacillus*)。葡萄糖>果糖>麦芽糖>半乳糖>蔗糖>甘露糖>核糖>乳糖>纤维二糖>蜜二糖。

(2) 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。葡萄糖>蔗糖>麦芽糖>蜜二糖>果糖、棉籽糖>半乳糖>核糖>乳糖>阿拉伯糖、淀粉>木糖。

(3) 明串珠菌属(*Leuconostoc*)。葡萄糖>果糖>蔗糖>海藻糖>麦芽糖>甘露糖>半乳糖、乳糖>核糖、木糖>阿拉伯糖、蜜二糖>棉籽糖、纤维二糖。

2) 氮源

氮源是指为微生物生长繁殖提供氮元素的营养物。由于乳酸菌蛋白质分解能力和氨基酸合成能力弱,故在人工培养时,需要添加含有多种肽类氨基酸的有机氮源,如牛肉膏、酵母膏、蛋白胨或番茄汁等。常见乳酸菌对氨基酸的需求情况见表3-4。

表 3-4 几种常见乳酸菌对氨基酸的需求

菌名	天冬氨酸	谷氨酸	精氨酸	组氨酸	赖氨酸	丙氨酸	胱氨酸	甘氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	甲硫氨酸	苯丙氨酸	脯氨酸	丝氨酸	苏氨酸	色氨酸	酪氨酸	缬氨酸	正亮氨酸	正缬氨酸	羟脯氨酸
植物乳杆菌 17-5	±	+	±	-	±	-	+	-	+	+	±	±	-	-	±	+	±	+	-	-	-
干酪乳杆菌	+	+	+	±	±	±	+	-	±	+	±	+	-	+	±	+	+	+	-	-	-
戊糖乳杆菌 124-2		+		-	-	-		-		+				-		+			-	-	-
肠膜明串珠菌 P-60	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
粪肠球菌 R	+	+	+	-	+	+	±	+	+	+	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-	-
乳酸乳球菌 L-103	-	-	+	±	±	-	-	-	+	+	+	±	-	±	-	-	-	+	-	-	-

注：+表示需要；-表示不需要；±表示不确定。

3) 生长因子

生长因子是一类调节微生物正常代谢所必需的微量有机物，通常微生物不能用简单的碳源、氮源自行合成。广义的生长因子包括碱基、卟啉及其衍生物、甾醇、胺类、维生素、C4~C6的分支或直链脂肪酸等，而狭义的生长因子一般仅指维生素。

乳酸菌对生长因子尤其是维生素依赖性很强，此外，许多乳酸菌还需要嘌呤、嘧啶或其相应的核苷或核苷酸作为生长因子。嘌呤、嘧啶的需要量一般为10~20 μg/mL，而核苷和核苷酸浓度则一般为200~2000 μg/mL。表3-5列举了常见乳酸菌对维生素的需求情况。

表 3-5 常见乳酸菌对维生素的需求

乳酸菌名称	对氨基苯甲酸	生物素	叶酸	烟酸	泛酸	核黄素	硫胺素	吡哆醇
植物乳杆菌 17-5		+	-	+	+	-	-	-
巴西乳杆菌	-	+		+	+		+	
布氏乳杆菌	-	+		+	+	+		
干酪乳杆菌	-	+			+	+	-	+

续表

乳酸菌名称	对氨基苯甲酸	生物素	叶酸	烟酸	泛酸	核黄素	硫胺素	吡哆醇
德氏乳杆菌 LD-5	-	+		+	+	+	-	+
发酵乳杆菌 36	-			+	+	-	+	
盖氏乳杆菌	-			+	+			
番茄乳杆菌	-	+		+	+	+	+	
甘露醇乳杆菌	-	+		+	+		+	
肠膜明串球菌 P-60		+	-	+	+	-	-	-
短乳杆菌	-		+	+	+		+	
戊糖乳杆菌	-	+	-	+	+	-	-	-
粪肠球菌	-	+	+	+	+	-	-	+
乳酸乳球菌	-	+	-	+	+	-	+	-

3.2.2 乳酸菌的代谢途径

1. 糖的主流分解代谢途径

糖的主流分解代谢途径是指为乳酸菌正常生长繁殖提供能源、还原力和碳架的主要生化反应途径。乳酸菌中有两条乳酸发酵途径：一条是同型乳酸发酵途径，只有一种发酵产物——乳酸；另一条是异型乳酸发酵途径，除乳酸外，还产生乙醇、乙酸和 CO₂ 等发酵产物。常见乳酸菌的发酵类型及其产生的乳酸构型见表 3-6。

表 3-6 若干乳酸菌的乳酸发酵类型和乳酸构型

乳酸菌名称	乳酸构型	乳酸菌名称	乳酸构型
同型乳酸发酵菌		专性异型乳酸发酵菌	
德氏乳杆菌	D(-), L(+)	高加索酸奶杆菌	DL
德氏乳杆菌乳亚种	D(-)	短乳杆菌	DL
德氏乳杆菌保加利亚亚种	D(-), DL	发酵乳杆菌	DL
嗜酸乳杆菌	DL	布氏乳杆菌	DL
瑞士乳杆菌	DL	路氏乳杆菌	DL
唾液乳杆菌	L(+)	巴氏乳杆菌	DL
高加索乳杆菌	D(-)	绿色魏斯氏菌	
莱氏乳杆菌	D(-)	肠膜明串球菌	D(-)
嗜热乳杆菌	L(+)	葡聚糖明串球菌	D(-)

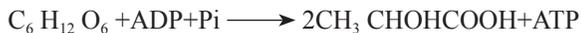
续表

乳酸菌名称	乳酸构型	乳酸菌名称	乳酸构型
詹氏乳杆菌	D (-)	兼性异型乳酸发酵菌	
约氏乳杆菌	DL		
菊糖芽孢乳杆菌	D (-)	植物乳杆菌	DL
粪肠球菌	D (-)	干酪乳杆菌	L (+), L (+), D (-)
乳酸乳球菌	D (-)	弯曲乳杆菌	DL
乳酸乳球菌乳脂亚种	D (-)	清酒乳杆菌	DL
啤酒片球菌	DL	鼠李糖乳杆菌	L (+)

1) 经 EMP 途径的同型乳酸发酵

EMP 途径又称糖酵解途径 (glycolysis), 是生物最重要的糖代谢途径。其特点是: 起始底物为葡萄糖, 它经过磷酸化后形成二磷酸果糖 (FDP 或 F-1,6-P), 再经 FDP 醛缩酶分解成磷酸二羟丙酮 (DHAP) 和 3-磷酸甘油醛 (GAP 或 GA-3-P), 然后这两种中间代谢物再经多步反应形成丙酮酸。在此过程中有两处发生底物水平磷酸化, 生成 ATP。在一般的 EMP 途径中, 本途径的终产物是丙酮酸, 而在乳酸菌的同型乳酸发酵反应中, 丙酮酸在乳酸脱氢酶的催化下, 被 $\text{NADH}+\text{H}^+$ 还原为乳酸。

凡一个葡萄糖分子经 EMP 途径降解为两个丙酮酸分子, 后者再直接作为氢受体而被还原为两个乳酸分子, 并净产两个 ATP 分子的发酵方式, 称为同型乳酸发酵 (homolactic fermentation)。此过程不需要 O_2 , 不产生任何副产物, 理论转化率应为 100%, 但实际上只能得到 90% 乳酸, 另有少部分乙酸、甲酸和甘油等产生。其总反应为:



乳酸菌通过 EMP 途径的同型乳酸发酵反应原理见图 3-2。

2) 经 HMP 途径的异型乳酸发酵

一些进行异型乳酸发酵的乳酸菌因缺乏 EMP 途径中的若干重要酶, 如醛缩酶和异构酶, 故其利用葡萄糖进行分解代谢和产能时必须依赖 HMP 途径。在异型乳酸发酵中, 葡萄糖的分解产物除乳酸外, 还有乙醇、乙酸和 CO_2 等多种产物, 产生的能量 (ATP) 也仅为同型乳酸发酵的一半。

进行异型发酵的乳酸菌, 因其途径、酶系和产物的差别, 又可分经典途径和双歧杆菌途径两种。

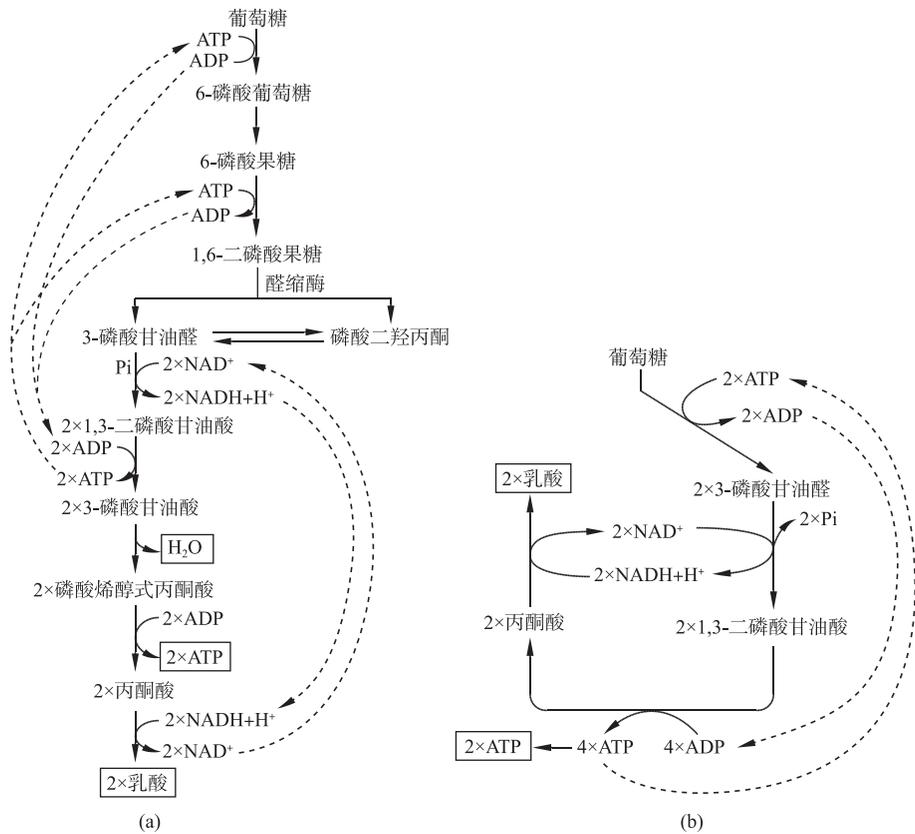


图 3-2 经 EMP 途径的同型乳酸发酵
(a) 细节; (b) 简图

(1) 异型乳酸发酵的经典途径。它又称 WD 途径、磷酸转酮酶途径 (PK 途径) 或 6-磷酸葡萄糖酸磷酸转酮酶途径 (6-PG/P 途径)。这是一条以肠膜明串珠菌 (*Leu. mesenteroides*) 为代表的异型乳酸发酵途径。

本途径因入门发酵底物的不同而有所差别, 现以葡萄糖和核糖为例, 分别在图 3-3、图 3-4 和图 3-5 中列出其代谢过程。

在上述两途径中, 关键步骤是戊糖磷酸转酮酶催化 5-磷酸木酮糖裂解为乙酰磷酸和 3-磷酸甘油醛的反应。其结果一方面使乙酰磷酸进一步反应后生成乙醇或乙酸, 另一方面使 3-磷酸甘油醛有可能再按 EMP 途径的各步骤生成丙酮酸, 最终被还原为乳酸。一分子葡萄糖经本途径发酵后, 产生一分子乳酸、一分子乙醇、一分子 CO_2 和一分子 ATP; 若以一分子核糖作底物, 则其产物为一分子

乳酸、一分子乙酸和两分子 ATP。

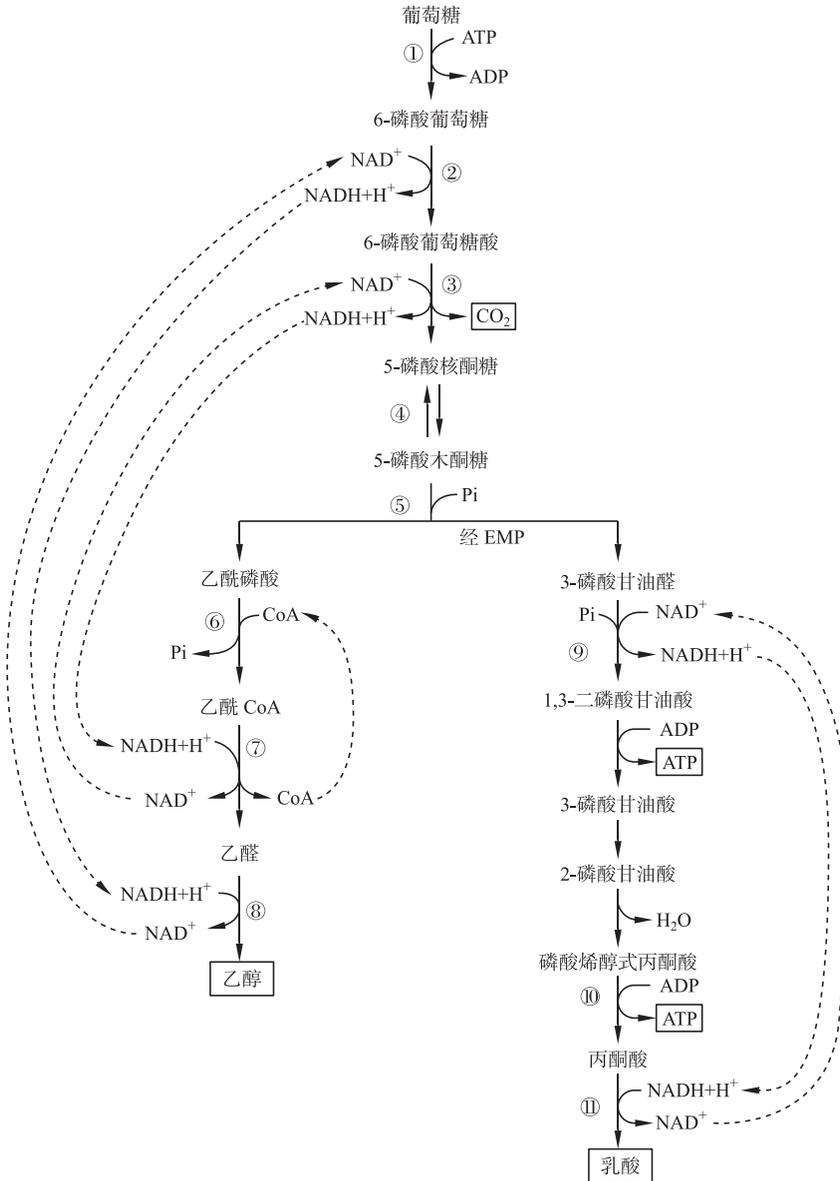


图 3-3 葡萄糖的异型乳酸发酵途径

①葡萄糖激酶；②6-磷酸葡萄糖脱氢酶；③6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶；④5-磷酸核酮糖-3-表异构酶；⑤磷酸转酮酶；⑥磷酸转乙酰酶；⑦乙醛脱氢酶；⑧醇脱氢酶；⑨3-磷酸甘油醛脱氢酶；⑩丙酮酸激酶；⑪乳酸脱氢酶

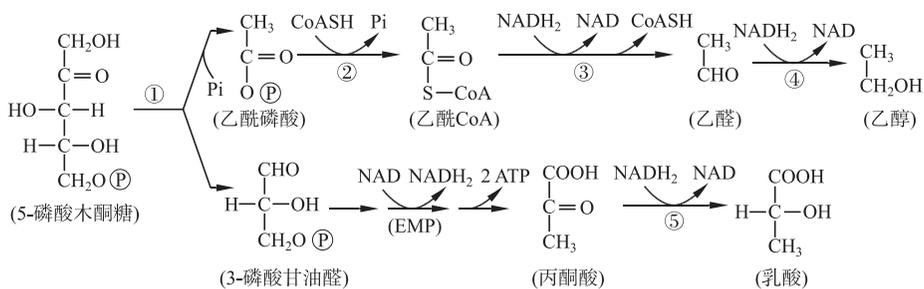


图 3-4 异型乳酸发酵途径中的部分细节

①磷酸转酮酶；②磷酸转乙酰酶；③乙醛脱氢酶；④乙醇脱氢酶；⑤乳酸脱氢酶

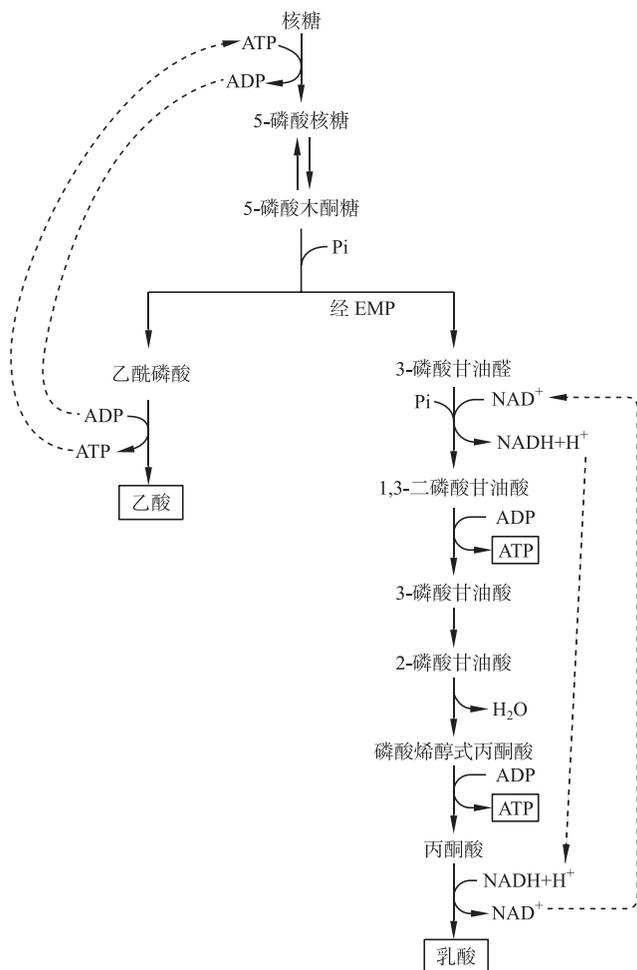


图 3-5 核糖的经典异型乳酸发酵途径

(2) 异型乳酸发酵的双歧杆菌途径。这是一条仅存在于双歧杆菌 (*Bifidobacterium* spp.) 的特殊异型乳酸发酵途径, 因本途径中存在磷酸己糖转酮酶 (hexose phosphoketolase), 故又称 HK 途径。与上述“经典”途径不同, 其特点是两分子葡萄糖可产生三分子乙酸、两分子乳酸和五分子 ATP; 同时, 在途径中存在着两种磷酸转酮酶, 其一为 6-磷酸果糖磷酸转酮酶, 催化 6-磷酸果糖生成 4-磷酸赤藓糖和乙酰磷酸, 另一为 5-磷酸木酮糖磷酸转酮酶, 催化 3-磷酸木酮糖生成 3-磷酸甘油醛和乙酰磷酸 (图 3-6)。

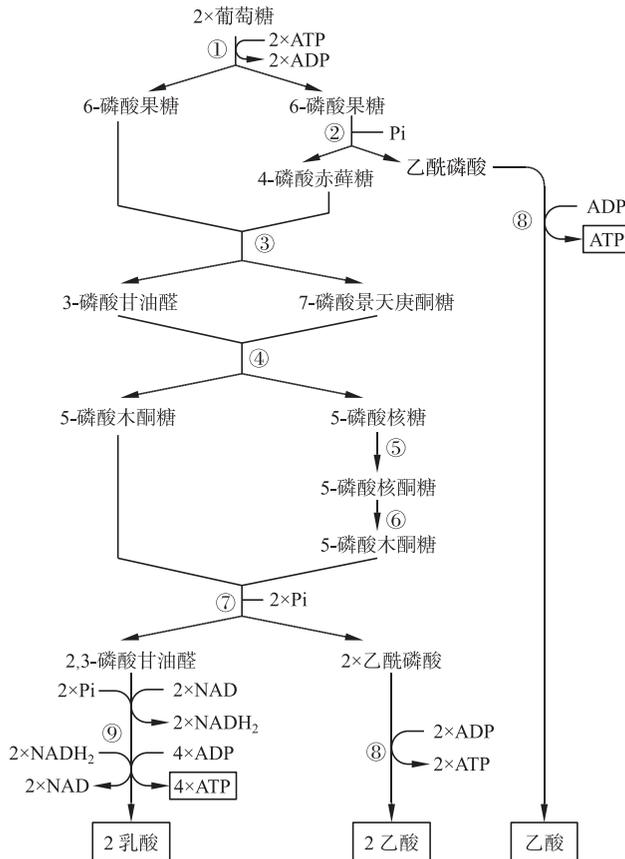


图 3-6 异型乳酸发酵的双歧杆菌途径

① 己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖异构酶; ② 6-磷酸果糖转酮酶; ③ 转醛醇酶; ④ 转羧乙醛酶 (转酮醇酶); ⑤ 5-磷酸核糖异构酶; ⑥ 5-磷酸核酮糖-3-表异构酶; ⑦ 5-磷酸木酮糖磷酸转酮酶; ⑧ 乙酰激酶; ⑨ 同 EMP 途径相应酶 (包括 3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶)

现将同型乳酸发酵和几种异型乳酸发酵所经主流代谢途径、关键酶、代谢产物和各代表菌种的比较列于表 3-7 中。

表 3-7 同型乳酸发酵和异型乳酸发酵的比较

类型	途径	1 葡萄糖生成的产物	关键酶	代表菌
同型乳酸发酵	EMP	2 乳酸	醛缩酶	德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、粪肠球菌
		2ATP		
异型乳酸发酵	HMP	1 乳酸	戊糖磷酸转酮酶	肠膜明串珠菌 发酵乳杆菌
		1 乙醇		
		1CO ₂		
		1ATP		
	HMP	1 乳酸	戊糖磷酸转酮酶	短乳杆菌
		1 乙酸		
		1CO ₂		
		2ATP		
	HMP	1 乳酸	6-磷酸果糖磷酸转酮酶	两歧双歧杆菌
		1.5 乙酸	5-磷酸木酮糖磷酸转酮酶	
		2.5ATP		

2. 各种糖在进入代谢途径前的变化

乳酸菌可利用的糖类除葡萄糖可直接进入 EMP 途径和 HMP 途径外，其他的多糖、三糖、双糖和单糖（主要是己糖和戊糖）在进入代谢途径前，都必须经过水解或相应酶的修饰使其发生磷酸化或异构化，变成 6-磷酸葡萄糖或其他可为代谢途径接纳的戊糖、丁糖、丙糖的磷酸化合物等中间代谢物形式后，才能被继续利用。

1) 半乳糖

乳酸菌对半乳糖的运送和代谢有两条独特的途径。短乳杆菌 (*L. brevis*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*) 和粪肠球菌 (*E. faecalis*) 等乳酸菌，在利用 PTS 系统运送半乳糖进入细胞后，以 6-磷酸半乳糖形式通过 6-磷酸塔格糖途径进行代谢。半乳糖的塔格糖代谢途径是由 Bissett 和 Anderson (1974) 发现的，其主要特点是在半乳糖代谢并生成乳酸过程中，其六碳糖的耗能阶段不经过 EMP 途径，直至 1,6-二磷酸塔格糖经醛缩酶分解成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮两种三碳化合物后，才进入 EMP 途径 (图 3-7)。

此外，有些缺乏 PTS 运送系统的乳酸菌还可通过细胞膜上的通透酶从细胞外环境中吸收半乳糖。这时，它们就利用一条新的 Leloir 途径，由它将进入细

胞的半乳糖转化成 6-磷酸葡萄糖，然后再进入 EMP 途径进行代谢（图 3-8）。

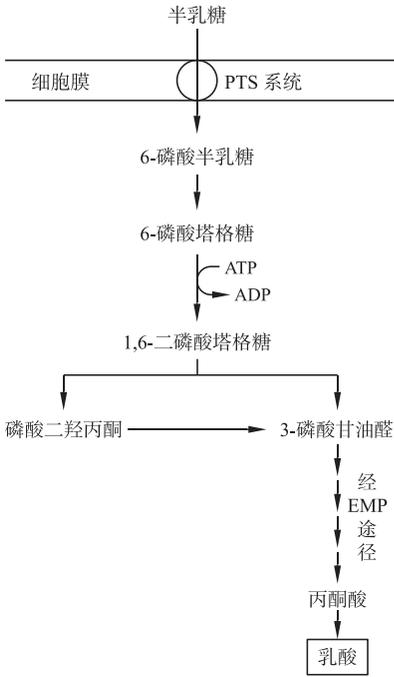


图 3-7 乳酸菌利用半乳糖的塔格糖途径

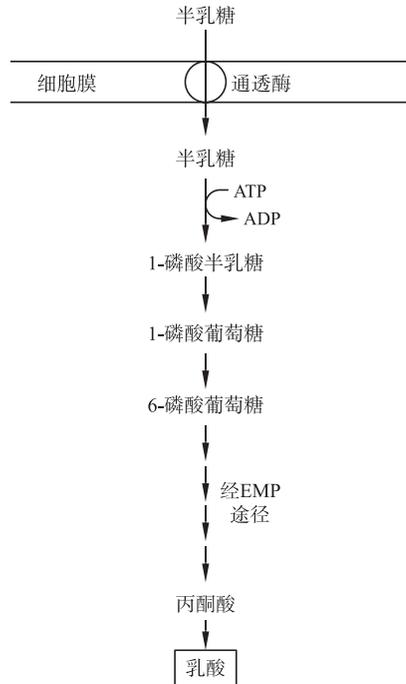


图 3-8 乳酸菌利用半乳糖的 Leloir 途径

2) 其他己糖

除上述半乳糖有其特殊发酵途径外，其他己糖（如果糖、甘露糖等）一般先进行异构化和磷酸化，待变成 6-磷酸葡萄糖后再进入糖的主流代谢途径（图 3-9）。

3) 双糖

双糖能以它的游离形态或磷酸化形态通过细胞膜。若以游离态形式进入，则进入细胞后就被特异酶水解成单糖，然后进入上述相应途径进行代谢；若以磷酸糖形式进入，例如通过 PTS 系统进入，也可借特异的磷酸水解酶将其裂解成一个游离单糖和另一磷酸化单糖分子。

(1) 乳糖。乳糖是乳酸菌利用的最常见双糖。许多乳酸菌，如乳酸乳球菌 (*Lc. lactis*) 和干酪乳杆菌 (*L. casei*) 等，都有运送乳糖的 PTS 系统。因此，凡进入细胞的都是磷酸化的乳糖，然后由磷酸-β-D-半乳糖苷酶 (P-β-gal) 把它水解成一个葡萄糖和一个 6-磷酸半乳糖分子。前者可被葡萄糖激酶磷酸化后进

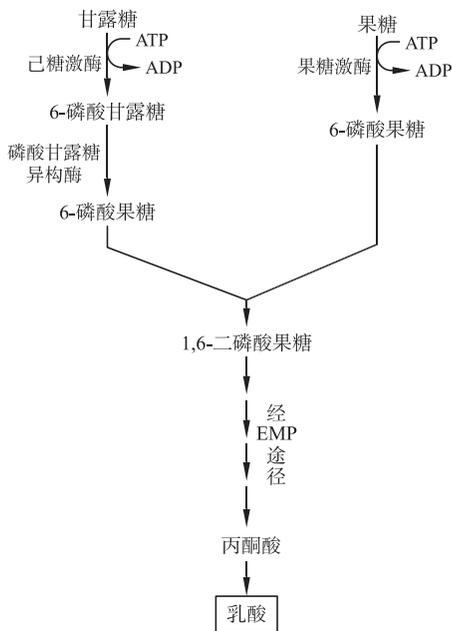


图 3-9 果糖和甘露醇在进入 EMP 途径前的变化

入 EMP 途径代谢，后者则可通过塔格糖途径进行代谢。乳糖 PTS 系统和 P-β-gal 酶通常都是诱导酶，并受葡萄糖的阻遏。

与上述半乳糖的吸收和利用相似，有些乳酸菌也可借细胞膜上的乳糖通透酶把乳糖运送入细胞，然后由 β-半乳糖苷酶 (β-gal) 水解，产生一个葡萄糖和一个半乳糖分子，以后再分别进入其主流代谢途径。研究表明，许多乳酸菌同时兼有运送乳糖的 PTS 系统和通透酶两个系统，因为在其细胞内可同时测到 P-β-gal 和 β-gal 两种糖苷酶的活性。

(2) 蔗糖。蔗糖可通过通透酶或 PTS 系统的运送而进入细胞。经通透酶

酶运入的蔗糖经蔗糖水解酶的催化，形成葡萄糖和果糖两个单糖，然后再进入主流代谢途径。在有些乳球菌 (*Lactococcus. spp.*) 中，蔗糖可被 PTS 系统运送入细胞，运入后的 6-磷酸蔗糖被特异的 6-磷酸蔗糖水解酶分解成 6-磷酸葡萄糖和果糖。蔗糖 PTS 系统和 6-磷酸蔗糖水解酶都是诱导酶，可通过培养基中的蔗糖而诱导。

(3) 麦芽糖。用乳酸乳球菌 (*Lc. lactis*) 65.1 菌株进行实验发现，其细胞膜上运送麦芽糖的通透酶是组成型的，而非诱导型的。另外，还发现吸收的麦芽糖经麦芽糖磷酸化酶水解成葡萄糖和 1-磷酸-β-葡萄糖后，仅葡萄糖可进入 EMP 途径，而另一半即 1-磷酸-β-葡萄糖则被用于合成细胞壁的前体成分。

(4) 其他双糖。关于乳酸菌对纤维二糖、蜜二糖和海藻糖等双糖的吸收利用途径至今未开展过较深入的研究，一般认为它们也是先通过细胞膜上特异运送系统运入，后经水解作用形成单糖或磷酸化单糖，再如上述单糖的步骤进入共同的主流糖代谢系统。

4) 戊糖

许多乳酸菌可发酵核糖和木糖等戊糖产生乳酸。戊糖进入细胞一般都是经细胞膜上特异性通透酶的运送，进入细胞后再进行磷酸化，并在差向异构酶或异构酶的催化下转变成 5-磷酸核酮糖或 5-磷酸木酮糖，从而进入异型乳酸发酵途径进行代谢。

5) 葡萄糖酸

某些乳酸菌，如干酪乳杆菌 (*L. casei*) 和粪肠球菌 (*E. faecalis*) 等，可利用葡萄糖酸产生乳酸。其代谢途径类似于戊糖，也是通过异型乳酸发酵途径进行的。开始时，外界环境中的葡萄糖酸被一种可诱导的葡萄糖酸 PTS 系统运送，由此产生的 6-磷酸葡萄糖酸即可进入异型乳酸发酵途径。另一些乳酸菌在一定条件下也可通过通透酶介导葡萄糖酸的运入，然后再使其磷酸化，进入异型乳酸发酵途径进行代谢。

6) 戊糖醇

少数乳酸菌如干酪乳杆菌 (*L. casei*) 等可在以戊糖醇作碳源的培养基上生长。在这些乳酸菌的细胞膜上，存在有对戊糖醇特异的 PTS 系统。被磷酸化的戊糖醇进入细胞后，在脱氢酶催化下氧化成磷酸戊糖，从而可顺利地进入异型乳酸发酵途径进行代谢。

3. 乳酸菌的蛋白质分解活性

乳酸菌普遍缺乏利用无机氮源合成氨基酸的能力，因此需要从营养丰富的培养基中吸取各种现成的小肽和氨基酸，但并非所有的乳酸菌对各种氨基酸的要求都是相同的。例如，乳酸乳球菌乳亚种 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) 的某些菌株对大多数氨基酸是可以自行合成的，而乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*) 和瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 的若干菌株却需要外界提供 13~15 种氨基酸。目前仅对参与牛奶发酵的乳酸菌如乳酸乳球菌 (*Lc. lactis*) 等的蛋白质水解能力作了较多的研究。研究发现，凡用于牛奶酸化的乳球菌，均有较强的蛋白质分解活力，这是因为它们都存在一种胞外膜锚蛋白酶 (PrpP)。若此蛋白酶基因发生缺失突变，则此突变株在牛奶中很难生长。存在于乳球菌中的 PrpP 至少有两种，它们在降解乳酪蛋白时，特异性稍有差异。在乳球菌中已发现几种具不同特异性的肽酶，但至今所发现的种类都是细胞内酶。

用乳酸乳球菌所做的研究使我们对乳酸菌水解酪蛋白的方式、寡肽的运送、

细胞内肽酶的作用等有了一些初步的认识（图 3-10）。

从图 3-10 中可以看出，在用乳酸乳球菌所做的研究中，外界环境中的酪蛋白可被固定在细胞膜上的膜锚蛋白酶（PrtP）水解成寡肽，然后才可由细胞膜上的寡肽运送系统（Opp）转运至细胞内；细胞外的二肽和三肽可被二肽、三肽运送系统（D）直接运入细胞内；而氨基酸则由氨基酸运送系统（A）运入细胞。运入细胞后的寡肽和小肽，可在细胞内的肽酶催化下全部水解成氨基酸供菌体用作合成蛋白质的原料。

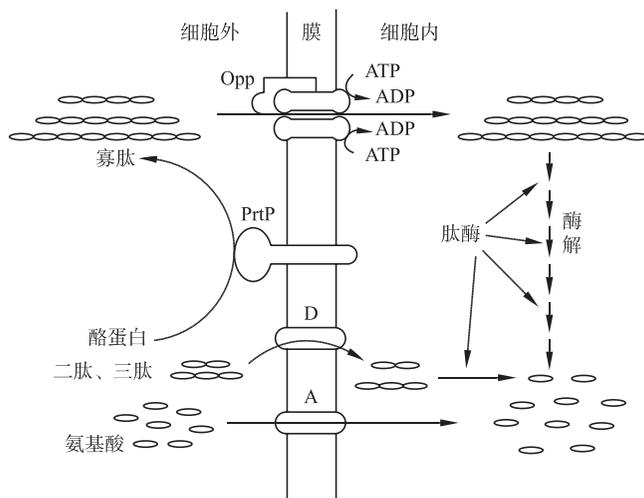


图 3-10 乳酸乳球菌对蛋白质、寡肽、小肽和氨基酸的酶解、运送作用

PrtP—膜锚蛋白酶；Opp—寡肽运送系统；D—二肽、三肽运送系统；A—氨基酸运送系统

3.2.3 影响乳酸菌生长的因素

影响乳酸菌生长的因素很多，除上述提到的各种营养因子外，此处主要介绍氧气、温度、pH 值和渗透压。

1. 氧气

氧气对微生物的生命活动影响极大，按微生物与氧气的关系可把它们分为五大类（图 3-11）：专性好氧菌、兼性厌氧菌、微好氧菌、耐氧性厌氧菌和（专性）厌氧菌。

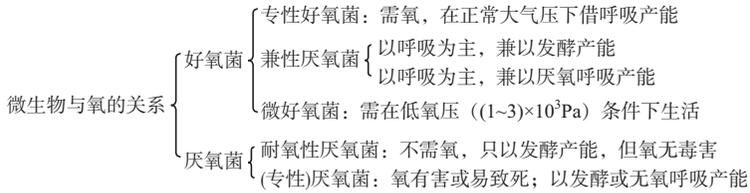


图 3-11 微生物的分类 (按照微生物与氧气的关系)

各种乳酸菌因普遍缺乏好氧的呼吸链 (或电子传递链) 酶系, 故在与游离氧的关系上, 大多数是一些耐氧性厌氧菌、微好氧菌、兼性厌氧菌或专性厌氧菌。例如, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 的菌种一般都属于耐氧性厌氧菌; 当在固体培养基上培养微好氧菌或兼性厌氧菌时, 降低氧压或充以 5%~10% (体积分数) CO_2 可促进其生长; 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 则为专性厌氧菌, 某些种在含有 10% (体积分数) CO_2 条件下, 可对大气 O_2 有耐受性; 链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和片球菌属 (*Pediococcus*) 的菌种都是兼性厌氧菌。

在各种生物包括乳酸菌等微生物的细胞内, 会因酶促或非酶促方式, 特别是由黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶或黄素蛋白脱氢酶的催化作用而形成大量的超氧阴离子自由基 (O_2^-)。它是活性氧的存在形式之一, 因含奇数电子, 故带负电荷; 它既有分子性质, 又有离子性质; 其化学性质极不稳定, 化学反应能力极强, 可破坏细胞内的各种重要生物大分子和膜结构, 还可促使其他活性氧化物的形成。故这种超氧阴离子自由基对细胞极其有害。在各种生物的长期进化历史中, 都已发展出去除超氧阴离子自由基等各种有害活性氧的分子机理: ①一切好氧生物存在超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶, 前者可把剧毒的 O_2^- 歧化成毒性稍低的 H_2O_2 , 后者又可进一步把 H_2O_2 变成无毒的 H_2O ; ②大多数的耐氧性厌氧菌中存在 SOD 和过氧化物酶 (peroxidase), 也可使 O_2^- 变成 H_2O_2 后进一步还原成无毒的 H_2O ; ③一些严格的厌氧菌因既无 SOD 又缺乏过氧化氢酶或过氧化物酶, 故细胞在有氧环境下形成的 O_2^- 极易杀死自己, 这就是厌氧菌对氧的高度敏感性或氧对它们具有毒害的主要原因 (图 3-12)。

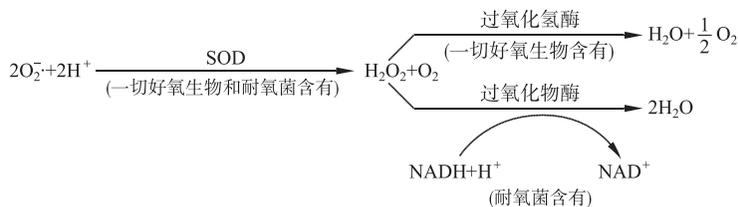


图 3-12 三种酶在消除超氧阴离子自由基中的作用

表 3-8 中示出了若干乳酸菌的 SOD 和过氧化氢酶活力的数据。

表 3-8 若干乳酸菌的 SOD 和过氧化氢酶的活力 U/mg

菌名	SOD 活力	过氧化氢酶活力	菌名	SOD 活力	过氧化氢酶活力
植物乳杆菌	0	0	牛链球菌	0.3	0
粪肠球菌	0.8	0	缓症链球菌	0.2	0
变异链球菌	0.5	0	乳酸乳球菌	1.4	0

注：酶活力单位为 U/mg，指每毫克菌体（干重）所含有的酶活力单位。

2. 温度

温度对微生物的影响一般分为三方面：低温对微生物生长繁殖的抑制作用；中温对微生物生长的促进作用；高温对微生物生长的抑制或杀死作用。不同微生物的抑制生长、促进生长和杀死作用的温度差别很大。在促生长的温度范围内，每种微生物都有其最低生长温度、最适生长温度和最高生长温度三个重要指标，即生长温度的三基点。其中的最适生长温度简称最适温度，是指某菌的生长速度最高或分裂代时（generation time）最短时的培养温度。应特别注意的是，最适生长温度并不等于生长得率最高时的培养温度，也不等于发酵速率或累积代谢产物量最高时的培养温度。

常见乳酸菌的生长温度为：乳杆菌属（*Lactobacillus*）生长温度范围为 2~53℃，最适生长温度为 30~40℃；双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）生长温度范围为 25~45℃，最适生长温度为 37~41℃；明串珠菌属（*Leuconostoc*）生长温度范围为 5~30℃，最适生长温度为 20~30℃；链球菌属（*Streptococcus*）生长温度范围为 25~45℃，最适生长温度为 37℃，部分菌种可在 10℃ 中生长；肠球菌属（*Enterococcus*）生长温度范围为 10~45℃，最适生长温度为 37℃；片球菌属（*Pediococcus*）最适生长温度为 25~40℃，一般培养温度以 30℃ 为宜；乳球菌属（*Lactococcus*）最适生长温度为 30℃。

3. pH 值

乳酸菌是一大类以乳酸为唯一或主要代谢产物的细菌，故它们对酸性环境十分适应。各种乳酸菌在其可生长的 pH 值范围内，也可分最低 pH 值、最适 pH 值和最高 pH 值三个指标。常见乳酸的生长 pH 值为：乳杆菌属在 pH 值为 4.5 时可生长，最适 pH 值为 5.5~6.2，pH 值为 9.0 时不能生长，当接种到初始 pH 值为中性或碱性的培养基中时，生长速度很低；双歧杆菌属生长 pH 值范围为 4.5~8.5，但初始生长的最适 pH 值为 6.5~7.0，在 pH 值为 4.5~5.0 或 8.0~8.5 的情况下均不生长；明串珠菌属生长 pH 值范围在 5.0 以上，pH 值低于 4.4 时停止生长；肠球菌属生长范围较广，在中性和微碱性范围生长良好，一般还可在 pH 值为 9.6 时生长；乳球菌属生长在酸性和中性范围内，在 pH 值为 9.6 时不能生长；链球菌属生长 pH 值范围较广，不少菌种还可生长在 pH 值为 9.6 时。

4. 渗透压

渗透压是某水溶液系统中一个可用压力来量度的物化指标，它表示两种不同浓度的溶液间若被一个半透性薄膜隔开时，稀溶液中的水分子会因水势的推动而透过隔膜流向浓溶液一方，直至后者所产生的机械压力足以使膜两侧水分子的出入达到平衡为止。这时由浓溶液所产生的机械压力，即为该系统的渗透压值。渗透压的大小由浓溶液中所含有的分子或离子的质点数所决定。等重的物质，其分子或离子粒越小，则质点数越多，因而产生的渗透压就越大。

不同的乳酸菌对渗透压的适应性有很大差别，例如肠球菌属 (*Enterococcus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 的菌种都可在 6.5%NaCl 环境下生长，而乳球菌属 (*Lactococcus*) 的大多数菌种只能在 4%NaCl 环境下生长。

3.2.4 乳酸菌的分离和培养

乳酸菌不同属种间既有其共性，又有各自的个性。现将乳酸菌中具有代表性的属种的菌株分离培养方法阐述如下。

1. 乳杆菌的分离和培养

乳杆菌属的细菌具有复杂的营养要求。它们生长需要碳水化合物、氨基酸、肽类、脂肪酸酯类、盐类、核酸衍生物和维生素类；它们代谢碳水化合物产生大量的乳酸和少量的其他化合物；它们生长在不同的生境，这些生境条件具有高水平的可溶性碳水化合物、蛋白质降解物、维生素和低氧压；它们耐酸和嗜酸，

不同的种有其适应的不同环境；它们产生大量乳酸，在较低 pH 值基质中生长且广泛分布。

由于这一菌属的以上特性，在分离这类菌使用培养基时需要考虑这些因素，某些种还适应生长于某些极端的环境，如严格的厌氧条件。有的培养基需补充刺激因子，所有培养基中必须含有相应的生长因子。通常培养基含有酵母提取物作为维生素来源，还有蛋白胨、乙酸盐和刺激因子（如吐温 80）等以及适宜生长的低 pH 值范围 4.5~6.2。依据乳杆菌在不同生境及其区系中是主要优势菌还是仅为其部分菌系，可选择不同组分的分离培养基，有的用作分离的培养基也可作为培养乳杆菌的培养基。

1) 半选择性培养基

当乳杆菌是复杂区系中的主要菌时，常用 MRS 琼脂作为分离用培养基。APT 培养基通常用于从肉制品中分离绿色乳杆菌和其他乳杆菌及肉食杆菌。条件要求较为苛刻的专性异型发酵乳杆菌，采用 Kleymans 等 1989 年提出的改进的同型腐酒（*homohiochii*）培养基对其生长和分离效果最佳。

2) 选择性培养基

当乳杆菌是复杂区系中的部分菌时，广泛采用 SL 培养基，这种培养基及其类似培养基主要含有高浓度的乙酸盐离子，pH 值为 5.4，并有刺激生长因子吐温 80，可抑制许多其他微生物生长，具有选择作用。SL 培养基被推荐用于分离广范围的乳杆菌，但通常使肉变质的绿色乳杆菌和其他适应非常酸性环境的种不能在其上生长；链球菌和肉食杆菌等也能被抑制，但大多数乳制品和发酵蔬菜来源的片球菌和明串珠菌，以及某些肠道来源的肠球菌、双歧杆菌和酵母可在此培养基上生长。

3) 不同生境乳杆菌分离培养基

(1) 牛乳和乳制品。SL 培养基可用于分离牛乳、干酪和发酵乳品中的乳杆菌。当对干酪中乳酸菌进行计数时，其中的乳球菌可完全被抑制，而明串珠菌和片球菌则能在其上生长，故生长的菌落需进一步鉴定。

(2) 口腔、肠道和阴道。SL 培养基最初是为分离口腔和肠道来源的乳杆菌而设计的，但某些双歧杆菌和肠球菌也可在其上生长，故需对其生长的菌落进一步鉴定。

(3) 肉与肉制品。从肉中分离绿色乳杆菌及其他乳杆菌使用 APT 培养基，

或使用添加 0.1% 的乙酸亚铊, 调节 pH 值为 5.5 的 MRS 培养基, 或使用调节 pH 值为 5.8 的 SL 培养基。使用酪蛋白水解物山梨酸培养基可以选择性地分离计数肉和肉制品中的乳杆菌; 添加 0.2% 山梨酸钾的 MRS 培养基 (pH 值为 5.7), 更适于肉制品中乳杆菌的计数。

(4) 发酵蔬菜和青贮饲料。从青贮饲料分离乳杆菌可采用 SL 培养基, 发酵蔬菜则采用 SL 和改进的同型腐酒培养基。

(5) 酸面团。分离酸面团中的乳杆菌采用添加面包酵母的改进同型腐酒培养基。

(6) 发酵饮料。发酵饮料中的乳杆菌已适应极特殊的环境, 需采用不同类型的培养基, 其中包括需要某些天然基质以提供分离菌株所必需而又未知的生长因子。番茄汁常可替代这些特殊的生长因子, 此外还需与一些抑制因子共同使用, 抑制如酵母菌、霉菌和乙酸菌等的耐酸微生物。双倍浓度的 MRS 培养基在灭菌前用啤酒调成正常浓度, 可用于培养典型的啤酒乳杆菌; 混合有过滤灭菌的麦芽汁和酵母自溶物的培养基适用于分离谷物糖化醪内的乳杆菌。

4) 培养环境和温度

多数乳杆菌在厌氧或增加 CO_2 分压的条件下生长较好, 特别是在初始分离时效果更好。将琼脂平板置于体积分数为 $90\% \text{N}_2 + 10\% \text{CO}_2$ 的一个大气压的气体中, 如培养基长出不同类型的菌落, 则表明是不同的种或生物型。

人、动物和某些乳品来源的分离株培养于 37°C , 其他生境的分离株一般在 30°C 培养, 低温来源的菌株在 22°C 培养。

2. 链球菌的分离和培养

1) 转移培养基

链球菌经常分离自许多类型的临床标本, 包括脓液、伤口、血培养物、体液和活组织检查样品等。采集的临床标本如取样后不能立即进行分离, 可放置在转移培养基中, 通常使用还原转移液 (RTF), 适用于在室温下放置临床标本或链球菌的菌系。

2) 选择性培养基

分离口腔链球菌有两种选择性培养基, 一种是酪朊水解物酵母膏胱氨酸 (TYC) 培养基, 另一种是轻型唾液 (MS) 琼脂培养基, 其中含有蔗糖, 使某些链球菌在此培养基上生成特征性的胞外多糖。分离变形链球菌有两种选

选择性培养基——MSB 培养基和 TYCSB 培养基，分别是在 MS 或 TYC 培养基中加入杆菌肽，并增加蔗糖的含量。MSB 培养基是在 MS 培养基中加入 0.2U/mL 杆菌肽，蔗糖含量 15%；TYCSB 培养基是在 TYC 琼脂中加入 0.1U/mL 杆菌肽，蔗糖含量 15%。对于 B 群链球菌的选择性培养基通常以磺胺二甲噻唑 (sulfamethoxazole)、大肠菌素和结晶紫等作为选择因子。

3) 链球菌的培养

实验室中培养链球菌常使用各种含血的琼脂培养基。添加了 5% 动物血 (羊或马血) 的培养基中，有少量或不含还原糖 (如布氏培养基、脑心浸液等)，对培养链球菌和检测溶血是极好的培养基。国外某些实验室使用销售的成品培养基有脑心浸液 (BHI)、Todd Hewitt 培养液等。

3. 肠球菌的分离和培养

肠球菌营养要求复杂，通常使用含蛋白胨或其类似物的培养基，也可培养于脑心浸液和其他具有丰富营养的培养基中。大多数盲肠肠球菌需在含 3% 以上 CO₂ 的气体中生长。

用于肠球菌分离和培养的选择性培养基约有 60 种，但这些培养基大多数也支持某些链球菌的生长。叠氮化钠是最为广泛应用的选择剂，大多数培养基含有 2~5g/L 叠氮化钠。由于肠球菌一般抗卡那霉素 (氨基糖苷抗生素)，因此分离时可将 20μg/mL 卡那霉素和叠氮化钠联合使用。卡那霉素七叶灵培养基即为这类培养基。

4. 乳球菌的分离和培养

乳球菌未在土壤和粪便中发现，仅少量见于奶牛体表和唾液。乳酸乳球菌 (*Lc. lactis*)、格氏乳球菌 (*Lc. garviae*)、植物乳球菌 (*Lc. plantarum*)、棉子糖乳球菌 (*Lc. raffinolactis*) 和乳酸乳球菌双乙酰乳亚种 (*Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*) 一般可从新鲜和冷冻的谷物、玉米长须、豆类、卷心菜、莴苣或黄瓜等植物直接分离或富集；生牛乳中含有乳酸乳球菌乳亚种 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*)、乳脂亚种 (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*) 和双乙酰乳亚种，可能是由于挤奶时从乳房外部和喂食的饲料进入的。迄今为止，乳酸乳球菌乳脂亚种除了牛乳、发酵乳、干酪和发酵剂外，尚无别的生境。

乳球菌营养要求复杂，需要复合培养基才能良好生长。乳球菌的所有菌株在合成培养基中都需要氨基酸，如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、组氨酸、甲硫

氨酸、精氨酸和脯氨酸，以及维生素类，如烟酸、泛酸钙和生物素。

(1) 富集和分离。植物是乳球菌的天然来源，青贮饲料的发酵过程有利于乳球菌、明串珠菌和片球菌的富集培养。此外，从乳制品中也可分离乳球菌。

(2) 分离培养基。通常使用的乳球菌分离培养基有两种，一种是 Elliker 培养基，广泛用于分离和计数乳球菌；另一种是添加 1.9% β -甘油磷酸二钠的 M₁₇ 培养基，用于分离乳酸乳球菌乳脂亚种、乳酸乳球菌乳亚种和乳酸乳球菌双乙酰亚种以及唾液链球菌嗜热亚种 (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*) 的所有菌株及其缺乏发酵乳糖能力的变异株。

5. 明串珠菌的分离和培养

在天然和人工的食品以及植物环境中，明串珠菌总是与其他乳酸菌在一起，作为其中的菌系之一。大多数明串珠菌的营养需求和生理性状与乳杆菌、片球菌和其他的乳酸菌相似，要选择性地采用一步操作法获得明串珠菌的纯培养物比较困难。

1) 半选择性培养基

草本植物、蔬菜和青贮饲料是明串珠菌的自然生境。明串珠菌在含有 2% 食盐的蔬菜自然发酵初期占优势，因此可在发酵早期有选择性地富集明串珠菌。通常根据这类菌的优势情况选用半选择或非选择性培养基，如 MRS 或 APT 培养基。在 MRS 琼脂培养基加入 0.2% 的山梨酸钾，调节 pH 值为 5.7，用于从肉制品中分离明串珠菌和乳杆菌；当乳杆菌在此生境中占优势时，使用乙酸铯培养基可以有选择性地从肉制品中分离明串珠菌，但肉食杆菌抗乙酸铯，能在此上生长。对于分离乳品中的明串珠菌可使用半选择性培养基，如 MRS 培养基和 SL 培养基，但乳杆菌和片球菌可在其上生长，所以菌落需进一步鉴定。

2) 选择性培养基

明串珠菌生长较慢，添加 0.05% 半胱氨酸-HCl 可刺激其生长。大多数明串珠菌可在含酵母提取物和葡萄糖的牛乳中生长，但牛乳不是其生长的适宜培养基。选择性培养基可采用 HP 培养基和蔗糖硫酸胺培养基等。

6. 双歧杆菌的分离和培养

双歧杆菌为专性厌氧菌，对其进行分离和培养时必须注重这类菌的生长特性，并采用相应的实验方法。

1) 分离培养技术

双歧杆菌为专性厌氧菌，对氧敏感，在有氧条件下不能生长于琼脂平板或

试管斜面上。采用一般兼性厌氧菌的分离培养法，不仅不能获得所需的培养物，反而使样品中混杂的兼性厌氧菌大量增殖，干扰实验结果，因此，必须采取厌氧培养技术，创造适于其生长繁殖的条件。常用的厌氧培养设备包括以下四种。

(1) 亨盖特滚管技术。1950年，亨盖特首先应用此技术研究瘤胃厌氧微生物，此后又经不断改进，使亨盖特厌氧技术日趋完善，并发展成研究严格厌氧微生物的一套完整的技术。亨盖特厌氧技术包括气体除氧系统、还原培养基的制备、滚管分离纯化等一系列厌氧操作技术。亨盖特厌氧技术的提出和发展，使严格、专性厌氧微生物的研究提高到一个崭新的阶段，进入了一个飞速发展的时期。

(2) 厌氧罐。厌氧罐使用 H_2 和 CO_2 混合气体，混合气体以 10% (体积分数) CO_2 和 90% (体积分数) H_2 的组合为适宜，如用 N_2 替代部分 H_2 ，至少也要保留 10% H_2 。使用中必须加入新鲜或活化过的催化剂以反应去掉残余氧气，广泛使用的是常温钯催化剂，每次使用后应在 160~170℃ 加热 2h 活化后再用。采用新鲜的含有还原剂的培养基或预还原培养基融化后倾入平板，然后置于厌氧罐内。如果厌氧罐内使用的气体源是 H_2 - CO_2 产气袋，可观察厌氧指示剂变化，达到所需的厌氧程度后再进行培养。如果使用无 O_2 的充气罐，罐内需充入无 O_2 的 CO_2 ， CO_2 与 H_2 ，或 CO_2 、 N_2 与 H_2 的混合气体，直至罐内达到厌氧状态为止。厌氧罐还需使用厌氧指示剂以显示达到的厌氧程度，美蓝是一种广泛用于厌氧罐的厌氧指示剂。加入到预还原培养基中的刃天青也是一种良好的指示剂，如培养基由浅红色变为无色，表明已达到所需的厌氧度。用抽气换气法排除厌氧罐内氧气时，常用“U”形水银气压计以显示其中的厌氧度。

厌氧罐有多种类型，材料包括金属、玻璃或透明塑料等。常用的有下列三种。

① 充气厌氧罐。一般由聚碳酸酯制作而成，罐盖上有双孔，并有“O”形密封环。双孔中一孔接有导管，接近罐底，通气用。由于通入的是纯净气体，避免了使用 H_2 - CO_2 产气袋和催化剂时生成的水分。罐体透明，有利于观察罐内培养物的生长情况。

② 气袋产气罐。与上一种罐不同的是其罐盖上不带入气孔和排气孔，它是为适应 H_2 - CO_2 产气袋的使用而设计的。罐盖下方往往带有放钯催化剂的装置。

③ 厌氧罐代用品。带玻璃塞开关的真空干燥器可作为厌氧罐代用品，其使

用方法基本与充气厌氧罐相似。

(3) 厌氧袋。厌氧袋是一种透明不透气的塑料袋，内装产气安瓿管和指示剂安瓿管(含美蓝或刃天青)。可放置1个或2个平板。袋的上端可用热源封闭，当打破其中的安瓿管后，半小时内可达到还原条件。

(4) 厌氧箱。厌氧箱是利用通入的氢气在箱内黑色钯粒常温催化下与氧结合生成水的反应，达到除去箱内氧的目的。

厌氧箱可分为操作室和交换室两部分。操作室是进行厌氧操作的地方。前面塑料膜上有一对套袖及胶皮手套，供操作者使用。操作室内有用钢丝网分别装着的钯粒和干燥剂，它们与电风扇组装在一起，通过钯粒催化除氧，而干燥剂的作用是吸收除氧过程中产生的水分。操作室内还备有用于接种针灭菌的电热器及接种针。有的操作室内装有培养箱，有的还可把显微镜放入其中。交换室用于操作室外物品的放入和内部物品的取出。交换室与真空泵及气体钢瓶相连。按厌氧菌的需要通入 N_2 或 CO_2 ，应及时补充 H_2 ，使其维持在5%左右。厌氧箱可用于平板划线法分离厌氧菌，操作较为简便。

2) 非选择性培养基

双歧杆菌通常采用厌氧培养，如脑心浸液琼脂、VL培养基、布氏血琼脂培养基、Eugon琼脂培养基、加富梭菌琼脂培养基、含番茄汁的蛋白胨琼脂等。使用的基质包括各种蛋白胨，脑、心、肝等动物组织浸提液，酵母提取物，葡萄糖，可溶性淀粉，番茄汁和无机盐等，以及降低培养基氧化还原电位的还原剂，如维生素C、巯基乙酸钠、半胱氨酸或半胱氨酸盐酸盐， Na_2S 、新鲜的动物器官组织(如脑、心肝的浸液)以及葡萄糖等，但现在最常用的是半胱氨酸或半胱氨酸盐酸盐。此外还有氧化还原指示剂，常用的指示剂为刃天青。TPY培养基广泛用于所有生境来源的双歧杆菌的分离和培养，但TPY培养基是非选择性的，链球菌、乳杆菌和其他类型的菌都可能在其上生长繁殖，因此分离时还要对其上生长的菌落进行进一步鉴定。

分离双歧杆菌及其他乳酸菌时，加入0.5%~1% $CaCO_3$ ，在其平皿菌落周围可形成水解透明圈，利于与非乳酸菌或不产酸的细菌进行区别。

3) 选择性培养基

双歧杆菌的选择性计数培养基较多。酸化的MRS培养基选择性好，用于发酵乳制品的选择性计数培养基；氯化铝-丙酸钠琼脂用于混合菌种发酵乳制品中

双歧杆菌的计数；使用含有硫酸新霉素和巴龙霉素的 BS 培养基，可进行双歧杆菌的分离。

为了选择性地分离双歧杆菌，培养基中除含有双歧杆菌的营养基质外，还需添加抗生素或其他抑菌剂，如硫酸卡那霉素(75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、硫酸新霉素(30~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、硫酸巴龙霉素(20~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、茶啶酸(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、氯化锂(3 mg/mL)、丙酸钠(10 g/L 或15 g/L)、山梨酸(0.4 g/L)等，这些选择性物质的作用主要是抑制大肠杆菌的生长。

在双歧杆菌固体培养基中添加 X- α -半乳糖可同时计数双歧杆菌和其他乳酸菌。其基本原理是：双歧杆菌的 α -半乳糖苷酶的活性比其他乳酸菌高，以 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -半乳糖(X- α -gal)作为底物，则 α -半乳糖苷酶可分解底物释放出吡啶，在平板上呈现蓝色。由于双歧杆菌释放的吡啶数量多于其他乳酸菌，故双歧杆菌的菌落呈蓝色，而其他乳酸菌的菌落为淡蓝色或白色。

3.2.5 乳酸菌的鉴定

乳酸菌为整体细菌类群的一个重要组成部分，其分类鉴定特征与一般细菌基本相同。目前，细菌分类鉴定一般采用多箱分类学方法，即采用多种类型的技术方法，包括表型、基因型和系统发育型的技术以获取研究对象的相关特征信息，并综合这些信息，在不同的分类水平上研究细菌分类的问题。

1. 常规鉴定方法

根据检索表(表 3-9)所述的各项鉴定方法逐条进行实验，直至各项的末端，可鉴定乳酸菌到“属”的水平，据此初步的结果，再与前面介绍的相关属种的详细特征比较，进行进一步鉴定，核查“属”鉴定结果的正确性。常规的鉴定方法包括革兰氏染色、芽孢染色(孔雀绿染色法和石炭酸复红染色法)、接触酶和氧化酶检测、厌氧生长(氧和二氧化碳的需要)检测、生长温度和耐热性检测、碳水化合物发酵试验、运动性检测、胱氨酸和半胱氨酸的需求测定、耐盐性和需盐性检测、葡萄糖发酵主要产物的测定(气相色谱和薄层色谱法)等。

表 3-9 乳酸菌的分属检索表

A. 有芽孢	
B. 接触酶阳性.....	芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)
BB. 接触酶阴性.....	芽孢乳杆菌属 (<i>Sporolactobacillus</i>)

- AA. 无芽孢
- B. 细胞呈球状
- C. 专性厌氧
- D. 以 1~3 根鞭毛运动 瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)
- DD. 不运动 阿托波氏菌属 (*Atopobium*)
- CC. 兼性厌氧、微好氧
- D. 生长需要 NaCl, 且可耐 18%NaCl 四联球菌属 (*Tetragenococcus*)
- DD. 生长不需要 NaCl
- E. 菌体 $\geq 1.0 \mu\text{m}$
- F. 68°C 为最适生长温度 糖球菌属 (*Saccharococcus*)
- FF. 68°C 不能生长
- G. 抗万古霉素 (30 μg /纸片) 片球菌属 (*Pediococcus*)
- GG. 抗万古霉素 (30 μg /纸片) 气球菌属 (*Aerococcus*)
- EE. 菌体 $\leq 1.0 \mu\text{m}$
- F. 葡萄糖发酵产气
- G. 葡萄糖发酵产气量大
- H. 能生长在 pH 4.8 和 10% 乙醇的条件下 酒球菌属 (*Oenococcus*)
- HH. 不能生长在 pH 4.8 和 10% 乙醇的条件下 明串珠菌属 (*Leuconostoc*)
- GG. 葡萄糖发酵产气量极微 魏斯氏菌属 (*Weissella*)
- FF. 葡萄糖发酵不产气
- G. 10°C 生长
- H. 45°C 生长 肠球菌属 (*Enterococcus*)
- HH. 45°C 不生长
- I. 运动 漫游球菌属 (*Vagococcus*)
- II. 不运动 乳球菌属 (*Lactococcus*)
- GG. 10°C 不生长
- H. DNA 的 (G+C) > 35% (摩尔分数) 链球菌属 (*Streptococcus*)
- HH. DNA 的 (G+C) < 35% (摩尔分数)
- I. 生长需要胱氨酸或半胱氨酸 蜜蜂球菌属 (*Melissococcus*)
- II. 生长不需要胱氨酸或半胱氨酸 孪生球菌属 (*Gemella*)
- CCC. 好氧 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)
- BB. 细胞呈杆状
- C. 厌氧
- D. 革兰氏阴性
- E. 能在 > 55°C 生长
- F. 杆状菌体外带鞘 栖热胞菌属 (*Thermotoga*)
- FF. 杆状菌体外不带鞘 闪烁杆菌属 (*Fervidobacterium*)
- EE. 不能在 > 55°C 生长

- F. 运动
 - G. 嗜盐生长.....嗜盐菌属 (*Halocella*)
 - G. 不能嗜盐生长.....动弯杆菌属 (*Mobiluncus*)
- FF. 不运动
 - G. 发酵产物只有乳酸.....纤毛菌属 (*Leptotrichia*)
 - GG. 发酵产物包括含乳酸的混合酸
 - H. 发酵产物包括乳酸和乙酸
 - I. 细胞中间膨大, 不产气.....塞巴鲁德氏菌属 (*Sebaldella*)
 - II. 细胞弯曲, 产气.....毛螺菌属 (*Lachnospira*)
 - HH. 发酵产物包括乳酸、乙酸和琥珀酸
 - I. 细胞大, 直径可达 3 μ m.....巨单胞菌属 (*Megamonas*)
 - II. 细胞直径 < 1.5 μ m
 - J. 主要发酵产物是丙酸.....拟杆菌属 (*Bateroides*)
 - JJ. 主要发酵产物不是丙酸.....光杆菌属 (*Mitsuokella*)
- DD. 革兰氏阳性
 - E. 细胞分叉
 - F. DNA 的 (G+C) \geq 55% (摩尔分数) 双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)
 - FF. DNA 的 (G+C) \leq 55% (摩尔分数) (*Scardovia parascardovia*)
 - EE. 细胞不分叉
 - F. 能在 > 55 $^{\circ}$ C 生长.....热厌氧菌属 (*Theromoanaerobrium*)
 - FF. 不能在 > 55 $^{\circ}$ C 生长
 - G. 能在 -1.8 $^{\circ}$ C 的低温下生长.....海乳杆菌属 (*Marinilactibacillus*)
 - GG. 不能在 -1.8 $^{\circ}$ C 的低温下生长.....科里氏菌属 (*Coriobacterium*)
- CC. 兼性厌氧
 - D. 接触酶阳性
 - E. 运动
 - F. 以周生鞭毛运动.....李斯特氏菌 (*Listeria*)
 - FF. 以侧毛或亚极生鞭毛运动.....罗氏菌属 (*Rothia*)
 - EE. 不运动.....索丝菌属 (*Brochothrix*)
 - DD. 接触酶阴性
 - E. 肽聚糖为 B 群^①
 - F. 细胞壁含有 A3 α -胞壁酸.....似杆状菌属 (*Isobaculum*)
 - FF. 细胞壁不含有 A3 α -胞壁酸.....乳杆菌属 (*Lactobacillus*)
 - 副乳杆菌属 (*Paralactobacillus*)
 - EE. 肽聚糖为 A 群^①.....肉杆菌属 (*Carnobacterium*)
 - EEE. 肽聚糖含赖氨酸.....微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)

①据 Schleiter 和 Kandier 划分的 A 群和 B 群 (Bacteriological Reviews., 1972,36:407-477)

2. 快速鉴定

快速鉴定也称数码鉴定，是根据鉴定对象采用不同编码鉴定系列，接种一定数目试验卡，适温培养一定时间后，将所得的结果以数字方式表达，并与数据库的数据对照，从而获得鉴定结果。快速鉴定使未知菌鉴定更加简易、微量和快速，较好地满足了临床需要。目前常用的细菌编码鉴定系统很多，如 Micro-1D、Minitek、Minibact、Bio-Test、Biolog 和 API 鉴定系统等。API 是目前国内外应用最广泛的一种鉴定方法，以鉴定菌种广泛和结果正确而著称。现介绍 API 50CHL，它由 49 种可发酵碳水化合物的简易培养基组成，常用于乳杆菌和相关菌的鉴定。将待测菌悬液接种于试验卡的每一个小管中，培养 24h 或 48h 后，由于发酵碳水化合物产酸，pH 下降，使指示剂变色，由此可以读出结果，构成菌株的生化图谱，对照数据库即可得到菌名和鉴定结果的可信度。试验卡（条）的组成如表 3-10 所示。

表 3-10 API50CHL 组成

试验卡 0~9 试管 / 底物	试验卡 10~19 试管 / 底物	试验卡 20~29 试管 / 底物	试验卡 30~39 试管 / 底物	试验卡 40~49 试管 / 底物
0 对照	10 半乳糖	20 α -甲基-甘露糖苷	30 蜜二糖	40 松二糖
1 甘油	11 葡萄糖	21 α -甲基-D-葡萄糖苷	31 蔗糖	41 水苏糖
2 赤藓醇	12 果糖	22 N-乙酰-葡萄糖胺	32 海藻糖	42 塔格糖
3 D-阿拉伯糖	13 甘露糖	23 扁桃苷	33 菊糖	43 D-岩藻糖
4 L-阿拉伯糖	14 山梨糖	24 熊果苷	34 松三糖	44 L-岩藻糖
5 核糖	15 鼠李糖	25 七叶苷	35 棉子糖	45 D-阿拉伯糖醇
6 D-木糖	16 卫矛醇	26 柳醇	36 淀粉	46 L-阿拉伯糖醇
7 L-木糖	17 肌醇	27 纤维二糖	37 糖原	47 葡萄糖酸盐
8 阿东醇	18 甘露醇	28 麦芽糖	38 木糖醇	48 2-酮基-葡萄糖酸盐
9 β -甲基-D-木糖苷	19 山梨醇	29 乳糖	39 槐牛儿糖	49 5-酮基-葡萄糖酸盐

3. 分子鉴定技术

乳酸菌的分子鉴定方法主要以聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术和核酸分子探针杂交为基础。PCR 是近年发展起来的一种体外扩增特异 DNA 片段的技术，是在模板 DNA、引物和四种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应。PCR 技术的特异性取决于引物和模

板 DNA 结合的特异性。经过 PCR 反应后, 介于两个引物之间的特异性 DNA 片段得到了大量复制, 数量可达 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 个拷贝。此法操作简便, 可在短时间内在试管中获得数百万个特异 DNA 序列的拷贝。核酸分子探针是指特定的已知核酸片段, 能与互补核酸序列退火杂交, 因此可以用于待测核酸样品中特定基因序列的检测。根据核酸分子探针的来源及其性质可以分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针及人工合成的寡核苷酸探针等几类。根据目的和要求的不同, 可以采用不同类型的核酸探针。

1) 保守生物大分子分析

核糖体 RNA (rRNA) 等保守性生物大分子广泛存在于生物细胞中, 功能稳定, 核酸序列中既有高度保守区又有可变区, 可以利用这些序列信息对细菌进行鉴定和分类学研究。

(1) 核糖体 DNA 的种、属特异性序列扩增

根据细菌核糖体 DNA (rDNA) 的高度保守区设计引物, 不同种属细菌的可变区设计其种、属特异性引物。由于不同种、属乳酸菌的可变区位置不同, 因此以此为引物扩增出的 DNA 片段的长度具有种、属特异性。根据扩增得到的特异性片段的长度来鉴定细菌。

(2) 16S rDNA 序列同源性分析

16S rDNA 是 16S rRNA 的基因, 长约 1.5kb。利用细菌的通用引物扩增 16S rRNA 基因, 序列测定后, 输入 GenBank 中对其进行同源性分析, 判定某个分类单位在系统发育上属于哪一个分类级别。通常在种这个分类等级上, 如果两个分类单位间的 16S rRNA 序列同源性大于 97.5%, 则认为它们属于同一个种。

(3) 核糖体 DNA (rDNA) 的种、属特异性核酸探针杂交

根据细菌基因组中具有种、属特异性的基因序列, 主要是核糖体 DNA 的序列, 设计核酸探针, 利用分子杂交方法对样品中的乳酸菌进行特异、准确的检测。依据操作方法的不同, 又分为 PCR-ELISA 和菌落原位杂交等。

(4) rDNA 转录间隔区序列分析

转录间隔区序列 (internally transcribed spacer sequence, ITS) 是指 rRNA 操纵子中位于 16S rRNA 和 23S rRNA、23S rRNA 和 5S rRNA 之间的序列。近年来人们发现不同菌种 16S-23S rDNA 间隔区两端 (16S rDNA 的 3' 端和 23S rDNA 的 5' 端) 均具有保守的碱基序列。不同间隔区所含 tRNA 基因数目和类

型不同,具有长度和序列上的多型性,而且较 16S rDNA 具有更强的变异性,因而可以作为菌种鉴定的一种分子指征。ITS 序列分析适用于属及以下水平的分类研究,方法上可以采用种、属特异性 ITS 片段扩增、探针杂交或 ITS 序列分析。

(5) 16S rDNA 扩增片段的碱基差异分析

利用温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、瞬时温度梯度凝胶电泳 (temporal temperature gradient gel electrophoresis, TTGE) 和变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 可以分析 DNA 片段的碱基序列差异。它们的工作原理是在变性点时 DNA 片段在琼脂糖凝胶中的迁移率下降,利用温度或化学变性剂在凝胶电泳板中形成一个变性梯度,具有不同变性点的 DNA 片段停留在凝胶的不同位置处,则可以分开长度相同但碱基序列不同的 DNA 片段。如果变性剂的梯度平缓,则这一技术的灵敏度足以将相差一个碱基的 DNA 片段分开。某些亲缘关系较近的乳酸菌,16S rDNA 序列同源性较高。为了对这些细菌进行准确鉴定,可以用 PCR 方法扩增,有助于区分鉴定它们的 16S rDNA 序列中的高度可变区,将长度相同的扩增产物作 DGGE、TGGE 和 TTGE 电泳分析,由于待鉴定乳酸菌的高度可变区的碱基序列不同,不同乳酸菌的 PCR 产物的电泳条带处于不同的位置,那么根据条带位置差异可以鉴定细菌。

2) DNA 指纹图谱技术

DNA 指纹图谱技术 (DNA-fingerprinting technique) 通常指那些以 DNA 为基础,形成指纹图谱对 DNA 进行分型、对微生物的种进行鉴别的技术。

(1) 基因组 DNA 限制性片段长度多态性分析

基因组 DNA 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析是利用同一限制性内切核酸酶的识别位点在不同细菌的基因组 DNA 中的分布具有多态性,可以形成具有种间鉴别特征的带型分布这一原理。该方法用一个或一组适宜的限制性内切核酸酶将全细胞基因组 DNA 酶切后,利用琼脂糖凝胶电泳分析限制性片段长度多态性。这种方法得到的酶切片段长度为 1000~20000bp,根据酶切片段的特征性长度对细菌进行鉴定。由于形成带型很复杂,因此对结果的分析需要依靠计算机软件辅助完成。

(2) 全基因组 DNA 的脉冲场凝胶电泳

由于普通的单方向恒定电场使 DNA 分子的泳动动力方向恒定且不发生变

化, 因此会严重影响相对分子质量较大的 DNA 片段凝胶电泳分离的效果。在这种情况下, 可以用脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 来分离这些相对分子质量大的 DNA 片段。PFGE 施加在凝胶上至少有两个电场方向, 时间与电流大小也交替改变, 使得 DNA 分子能够不断地调整泳动方向, 以适应凝胶中不规则的空隙变化, 达到分离大分子线性 DNA 的目的, 其最大分辨力为分辨 5000kb 大小的线性 DNA 分子。全基因组 DNA 脉冲场凝胶电泳被认为是 DNA 指纹图谱技术中最准确的方法。这种方法是选用切割点较少的限制性内切核酸酶消化基因组 DNA, 产生的片段为 10~800kb, 条带数目为 5~20 个, 易于对比和分析。这种方法适合细菌菌株间的鉴别。

(3) 扩增核糖体 DNA 限制性片段长度多态性分析

扩增核糖体 DNA 限制性片段长度多态性分析 (amplified ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis, ARDRA) 是 PCR 与限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 技术相结合的一种 rDNA 限制性片段长度多态性分析方法。首先 PCR 扩增乳酸菌的位于 16S rDNA、23S rDNA 或两者间隔区 (ITS) 的属或群的特异性片段, 然后选择一组限制性内切核酸酶对扩增产物进行 RFLP 分析。通常可以产生一些具有种特征性长度的片段, 根据对酶解片段的多态性分析达到鉴定样品中乳酸菌的目的。ARDRA 更适合于细菌种和亚种水平的鉴定。由于这种方法是对某一基因进行 RFLP 分析, 因此产生的电泳条带较少, 结果较易分析, 但也正是由于利用的是局部的基因信息, 有时可能导致分辨率下降。

(4) 核糖体分型

核糖体分型 (ribotyping) 是将同一属的实验菌株与该属有效描述的模式菌株提取 DNA, 限制酶消化产生 DNA 酶切片段后电泳, 然后转移到膜上与标记的 16S rDNA 或 23S rDNA 探针进行杂交, 产生 rDNA 限制性酶切图谱, 以比较分类单位间 DNA 同源性的技术。不同的限制性内切核酸酶产生的核型也不一致, 因此对于不同的细菌应选择不同的内切酶以产生高分辨率的带型。核糖体分型技术更适于种间水平的区分。用电子成像系统记录杂交带型, 用 RiboPrinter 软件分析杂交带的分子大小和亮度。

(5) 随机扩增多态性 DNA 分析

随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 分

析的原理是随机合成长为 10bp 左右的寡核苷酸引物, 在较低的退火温度下结合到与之最同源的 DNA 序列上, 引物之间的区域得到扩增, PCR 产物经电泳后形成多态性, 可作为鉴定的依据, 根据 PCR 产物的特征性长度对细菌进行鉴定。随机扩增多态性 DNA 分析技术更适合于菌株间的鉴别。因为 RAPD 方法中随机引物不是直接针对某一特定的 DNA 序列, 扩增产物的形成是由于引物与 DNA 模板之间的不完善结合, 即使退火温度的微小变化也会导致带型发生变化, 并且对于某一特定的细菌种属, 同一随机引物可产生具有不同分辨率的 DNA 带型, 因此 RAPD 的重复性较差, 并且这种方法在不同细菌、不同实验室内不易标准化。但最近, 通用随机引物 M13 (5'-GTTTCCCCAGTCACGAC-3') 普遍用于细菌的 RAPD 印迹分析中, 这为 RAPD 方法的标准化提供了一些方便。

(6) 扩增片段长度多态性分析

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析结合了 PCR 技术与 RFLP 技术, 对 DNA 的限制性酶切片段进行 PCR 扩增。这种技术适用于简单或复杂的基因组 DNA; 使用不同的 AFLP 引物可以调整产生的待分析片段的数目; 它克服了其他 DNA 印迹技术对反应条件、DNA 的质量及 PCR 温度变化较敏感的缺点, 重复性好, 分辨率高, 并且方法易于标准化控制, 结果可以输入数据库保存, 便于不同菌株间的比较。这种方法适于细菌菌株间的鉴别。

基因组 DNA 经一对限制性内切核酸酶消化后产生一系列含黏性末端的限制性片段, 这些片段在 T4 DNA 连接酶作用下与双链寡核苷酸连接, 接着用 AFLP 引物对限制性片段进行 PCR 扩增。

AFLP 反应同时使用两种限制性内切核酸酶: 一种为少切点酶, 如 EcoR I、Ase I、Hind III、Apa I 和 Pst I 等; 另一种为多切点酶, 如 Mse I 和 Taq I 等。通常选用 EcoR I /Mse I 组合, 这样产生的 AFLP 片段一端为少切点酶序列, 另一端为多切点酶序列。使用两个限制酶的原因如下: 多切点酶产生易于进行 PCR 反应的小片段 DNA, 并且片段大小正处于变性胶分离的最适范围内; 同时配用少切点酶则只允许扩增一端为少切点酶序列, 而另一端为多切点酶序列的 DNA 片段, 因此可以显著减少 AFLP 放大产物的数目。

AFLP 接头序列结构与选用的限制性内切核酸酶有关, 由核心序列和内切

酶识别序列的互补序列两部分组成。其他少切点酶接头的核心序列与 EcoR I 相同，区别之处在于连接的是不同内切酶的识别序列。而其他多切点酶的核心序列与 Mse I 相同，不同的内切酶连接不同的识别序列。

AFLP 引物由三部分组成：核心序列（Core），内切酶的特异性识别序列（ENZ）以及选择性核苷酸（EXT）。选择性核苷酸位于引物的 3' 端，数目视基因组的大小而定，从 1~4 个不等。由于选择性核苷酸与限制酶识别序列互补，因此决定了 AFLP 反应是对酶切片段的选择性扩增。如 EcoR I 引物的序列是 5'-GACTGCGTACC (Core) AATTC (ENZ) NNN (EXT) -3'，Mse I 引物的序列是 5'-GATGAGTCCTGAG (Core) TAA (ENZ) NNN (EXT) -3'。

在实际应用中， $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ bp 大小的基因组使用两个选择性核苷酸，大于 5×10^8 bp 的基因组使用三个选择性核苷酸。选择性核苷酸的种类可以随机选择，只有那些和选择性核苷酸互补的片段才能得到扩增。

3) 基因组全序列杂交

核酸是遗传物质的基础，除 RNA 病毒外，其他生物的遗传性状都是由 DNA 上核苷酸编码的。DNA 同源性分析是确定正确的分类地位、建立自然分类系统的最直接的方法，而 DNA/DNA 杂交是分析 DNA 同源性的一种有效手段。利用 DNA/DNA 杂交可以在总体水平上研究微生物间的关系，用于种水平上的分类学研究。

不同细菌间的 DNA/DNA 同源性可以用液相复性速率法测定。液相复性速率法通过比较两种细菌全基因组 DNA 间的复性速率来估计它们的 DNA 核苷酸序列互补程度，判断这两种细菌基因型之间的全部相似性，并以此推定它们的亲缘关系。通常在最适复性条件下，DNA/DNA 同源性在 70% 以上就可以判断它们属于同一个种；在 20% 以上，所实验的菌株可能属于同一个属的成员。

3.3 乳酸菌生态制剂发酵生产工艺

3.3.1 高密度培养

高密度培养是指应用一定的培养技术或装置提高菌体的生长密度，使菌体密度较普通培养有显著的提高，最终提高特定产物的比生产率（单位时间单位体积内产物的产量）。与常规培养相比，高密度培养在发酵过程中有明显的优势，如提高菌体的发酵密度或单位体积培养液中的菌体浓度，进而提高体积产率；强化下游分离提取，并在一定程度上减少废水量；缩小生物反应器的体积，缩短生产周期，减少设备投资，从而降低生产成本、提高生产效率以及产品的市场竞争力。

高密度培养的途径主要有固定化、透析培养、细胞循环培养、补料分批培养等。下面以补料分批培养为例介绍嗜酸乳杆菌的高密度发酵培养。

补料分批培养是根据菌株生长和初始培养基的特点，在分批培养过程中间断或连续地补加新鲜培养基的发酵方法。补料分批发酵过程中基质浓度能维持很低，避免快速利用碳源的阻遏效应，减缓代谢有害物的不利影响。恒速流加和指数流加属于补料分批培养中的非反馈流加补料方式，恒速流加是指以恒定的速率将培养基流入发酵罐中，流加速率可按实验要求变化；指数流加是基于微生物指数生长理论而发展起来的一种方法，是指在整个培养期间生长限制性底物的流加速率与细胞生长成比例地增加，该方法可以将比生长速率控制在不产生副产物的范围之内，使菌体稳定生长，还可以将反应器中的基质浓度控制在较低的水平，从而大大降低有害代谢物的产生。

嗜酸乳杆菌原始菌种可以自行从土壤或动物肠道等筛选得到，或直接从菌种保藏中心购买。一般生产用菌株经多次传代会出现退化现象，故必须经常进行菌种选育和纯化以提高其活性。

(1) 种子培养液的制备。从菌种保存管或单克隆平板中挑取菌落，接种到

装有 10mL MRS 培养基的螺口试管中, 35℃ 静止培养 24h, 经过 3 次继代培养后, 接种到装有 100mL MRS 培养基的 250mL 三角瓶中, 35℃ 静止培养 24h 后得到发酵种子培养液。

(2) 发酵培养基的制备。改良 MRS 培养基: 蛋白胨 10g、牛肉膏 10g、酵母膏 5g、磷酸氢二钾 1g、柠檬酸三铵 3g、无水乙酸钠 5g、麦芽糖 20g、硫酸镁 0.3g、硫酸锰 0.2g、吐温 801g、蒸馏水 1L, 初始 pH 值为 6.4, 121℃ 灭菌 20min。

(3) 补料液的制备。蔗糖 200g, 酵母膏 100g, 蛋白胨 50g, 氯化铵 10g, 蒸馏水 1L, 121℃ 灭菌 20min。

(4) 50L 发酵罐补料分批培养。补料分批培养在 50L 全自控发酵罐中进行, 培养体积为 30L, 搅拌速度为 50r/min, 培养温度为 35℃。将活化好的嗜酸乳杆菌以 1% 接种量 (10^8 CFU/mL) 接种到 30L 改良 MRS 培养基中, 培养 12h 后, 打开蠕动泵, 采用恒速流加的方式向发酵液中添加新鲜的补料液, 流加 10h 后关闭蠕动泵停止补料, 此后分批培养至 48h 结束发酵。

恒速流加: 以 100mL/h 的恒定速率将补料液加到发酵罐中。

指数流加: 指数流加补料液的流加速率由下面方程式计算得出。

$$F_i = \frac{V_0 X_0}{Y_{XS}(S_i - S)} \cdot \mu \exp(\mu t)$$

式中, F_i 为流加速度 (L/h); V_0 为补料初始发酵液的体积 (L); X_0 为补料初始发酵罐中的细胞质量浓度 (g/L); Y_{XS} 为碳源对细胞的得率系数 (g/g); S_i 为补料液中的碳源质量浓度 (g/L); S 为发酵罐中的碳源质量浓度 (g/L); μ 为比生长速率 (h^{-1}); t 为培养时间 (h)。

菌株在指数流加培养中, 补料液的蔗糖质量浓度为 200g/L, 将比生长速率设定为 0.2h^{-1} , 根据 50L 发酵罐中嗜酸乳杆菌的生长曲线, 将得率系数 (Y_{XS}) 设定为 0.2g/g, 补料 t 时刻的补料速率 F_i 根据以上方程式计算得出。由于流加速率很难严格按照指数曲线连续改变, 只能以阶梯形式增加, 尽量逼近指数流加曲线, 故可每 2h 阶段式调整一次补料速率。

菌株在补料分批培养时一般在对数末期进行补料, 故应在补料分批培养前对菌株进行静止培养, 了解菌株的生长规律, 从而确定正确的补料时间。补料液既可以采用新鲜培养基, 也可以对新鲜培养基的组分和比例进行优化, 从而筛选出更合适的补料液配方。本实验采用的是优化后的补料液配方。

3.3.2 乳酸菌粉剂的制备

乳酸菌在液态中保存其活菌数沿指数曲线下降, 常温下一个月内菌体基本上全部死亡, 4℃下一周内菌体就下降一个数量级。与液态制剂相比, 乳酸菌活菌粉剂的菌体死亡率虽然也呈指数趋势下降, 但在相同温度下的下降趋势远小于液态制剂, 而且菌粉易于包装运输, 易于储藏, 因此成为乳酸菌制剂的发展方向。目前常用的乳酸菌粉剂制备方法有真空冷冻干燥法、喷雾干燥法、远红外干燥法等。

1. 真空冷冻干燥法

真空冷冻干燥技术是目前微生物菌种保藏的主要应用技术之一, 当微生物通过冷冻过程时, 其内部的水分快速蒸发掉, 只保持最低的水分质量分数, 使其生理活动降低到低程度, 以增加微生物的寿命, 延长其保藏期。

真空冷冻干燥是先将被干燥物料中的水冻成冰, 然后使冰升华而除去水的一种干燥方法, 在冻干工艺中, 低温和水分蒸发会对乳酸细菌细胞造成很大的伤害, 甚至会导致菌体细胞死亡, 如果直接冷冻乳酸细菌菌液, 会使活菌数目大幅度下降。为了提高冻干过程中乳酸细菌的存活率, 向菌体中加入保护剂是一种非常有效的方法。保护剂使悬浮的微生物在冷冻时形成完全或近似完全玻璃化态, 从而改变微生物样品冷冻干燥时的物理、化学环境, 减轻或防止冷冻干燥或复水时对细胞的损害, 尽可能保持原有的各种生理生化特性和生物活性, 从而减少微生物在冻干及保存过程中的损害。常用的保护剂有多羟基醇、多糖、氨基酸类物质, 如乳糖、葡萄糖、海藻糖、甘露糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘油、谷氨酸、半胱氨酸、脱脂奶粉等。

嗜酸乳杆菌发酵液真空冷冻干燥法的操作方法如下。

(1) 取嗜酸乳杆菌发酵液, 4℃ 7500r/min 离心 5min, 收集菌体用生理盐水洗涤 2 次。

(2) 将预先配好并消毒处理的一定浓度的保护剂加入到收集的菌体中, 将菌体重悬并混合均匀制成菌体悬浮液。

(3) 在 -20℃ 的冰箱中预冻。

(4) 把预冻好的培养物放入超低温真空冷冻干燥机中, 等温度降至 -50~-40℃ 时, 打开真空泵抽真空度至 5mTorr (1Torr=1.33322 × 10²Pa), 干燥 12~15h 后至产品含水率为 3% 左右。

(5) 冻干的菌粉经真空包装后，置于 -20°C 冰箱中冷藏。

(6) 活性检测。称取样品 1.0g，加入 9.0mL 的无菌水，充分振荡，即成母液菌悬液。用无菌移液器分别吸取 1.0mL 上述母液菌悬液加入 9.0mL 无菌水中，按 1:10 的比例进行系列稀释，得到系列稀释度菌悬液。取 1.0mL 不同稀释度菌悬液于灭菌平板中涂平板。每一稀释度重复 3 次，同时以无菌水作空白对照， 35°C 培养 24h 后进行菌落计数。

2. 喷雾干燥法

喷雾干燥法是干燥制备粉状物料的一种技术，在工业化生产中应用较广，具有成本低廉、过程快、生产量大等优点。喷雾干燥过程是依靠压缩空气通过喷嘴产生的高速度将菌液喷出雾化，形成具有较大表面积分散微粒，分散微粒同热空气发生强烈的热交换，借热能使菌液中的水分汽化，并由气体带走所生成的蒸汽，从而迅速排除本身的水分，在 1.5s 内获得干燥的过程。为了使喷雾干燥获得的菌粉具有较强的活性，在喷雾前需在浓缩菌液中添加保护剂对菌体进行保护。常用的保护剂有蔗糖、淀粉、甘油、奶粉等。

嗜酸乳杆菌发酵液喷雾干燥法的操作方法如下。

(1) 取嗜酸乳杆菌发酵液， 4°C 7500r/min 离心 5min，收集菌体用生理盐水洗涤 2 次。

(2) 将预先配好并消毒处理的一定浓度的保护剂加入到收集的菌体中，将菌体重悬并混合均匀制成菌体悬浮液。

(3) 喷雾干燥时设置进风温度为 $170\sim 180^{\circ}\text{C}$ ，出风温度为 $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 将喷雾干燥后获得的菌粉进行真空包装。

(5) 冻干的菌粉经真空包装后，置于 -20°C 冰箱中冷藏。

(6) 活性检测。称取样品 1.0g，加入 9.0mL 的无菌水，充分振荡，即成母液菌悬液。用无菌移液器分别吸取 1.0mL 上述母液菌悬液加入 9.0mL 无菌水中，按 1:10 的比例进行系列稀释，得到系列稀释度菌悬液。取 1.0mL 不同稀释度菌悬液于灭菌平板中涂平板。每一稀释度重复 3 次，同时以无菌水作空白对照， 35°C 培养 24h 后进行菌落计数。

3.3.3 乳酸菌微胶囊的制备

乳酸菌虽然具有重要的生理作用，但多数乳酸菌在进入人和动物消化道后，

由于受到胃酸、胆盐等不利因素的影响,难以有足够数量的活菌到达肠道或定殖肠道而发挥作用。目前,微胶囊技术是提高乳酸菌存活率和利用率,保护菌体有效性最为有效和实用的方法之一。此外,微胶囊技术还具有防止噬菌体侵染、提高冷冻和干燥过程中存活率、提高储藏稳定性等优点。

1. 基于海藻酸钠的乳酸菌微胶囊的制备

海藻酸钠(sodium alginate)是从海藻中提取的一种天然多糖类化合物,无臭无味,易溶于水,不溶于乙醇、乙醚、氯仿和酸($\text{pH}<3$)。它是由古洛糖醛酸(G段)与其立体异构体甘露糖醛酸(M段)两种结构单元以3种方式(MM段、GG段与MG段)通过 α -1,4糖苷键连接而成的线性嵌段共聚物。在其水溶液中加入 Ca^{2+} 等阳离子后,G单元上的 Na^+ 与二价离子发生离子交换反应,G基团堆积而成交联网络结构,从而转变成水凝胶。

1) 乳酸菌微胶囊的制备

将嗜酸乳杆菌发酵液于 4°C 7500r/min离心10min,收集菌体。按照菌体与保护剂质量比1:3(10%的脱脂奶95%,海藻糖1.5%,甘油0.5%,山梨醇2%,麦芽糊精1%)混合均匀后制得菌悬液(菌体细胞浓度为 10^{10}CFU/mL)。继而对菌体进行三层包埋:首先加入等体积的第一层包埋材料(4%(质量/体积)大豆分离蛋白溶液),常温下,200r/min搅拌20min;然后等体积加入第二层包埋材料(4%(质量/体积)微孔淀粉溶液),200r/min搅拌20min;最后加入2倍溶液体积的第三层包埋材料(2%(质量/体积)海藻酸钠溶液),200r/min搅拌30min;将此时得到的混合液滴入2%(质量/体积) CaCl_2 溶液中,固化30min成微球;将上述制得的微球用无菌水漂洗后,放在 -70°C 的冰箱中预冻3h后,进行真空冷冻干燥(冷阱温度 -51°C ,真空度9Pa,干燥时间24h),即制得嗜酸乳杆菌微胶囊。

2) 菌体微胶囊包埋效率、包埋产率及干燥存活率的测定

包埋效率 = 湿球微胶囊表面活菌数 / 湿球微胶囊完全破壁后的活菌数 $\times 100\%$

包埋产率 = 湿球微胶囊完全破壁后的活菌数 / 加入的活菌数 $\times 100\%$

产品干燥存活率 = 干燥后的产品微胶囊完全破壁后的活菌数 / 加入的活菌数 $\times 100\%$

微胶囊表面活菌数的测定:将菌体微胶囊直接加入生理盐水中,以200r/min的速度搅拌30min,使表层及可泄漏的菌体溶出,进行活菌计数。

微胶囊完全破壁后活菌数的测定：将菌体微胶囊溶于 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 值 =7.0）中，以 200r/min 的速度处理 60min，待微胶囊完全溶解后进行活菌计数。

2. 基于空气悬浮法的乳酸菌微胶囊的制备

空气悬浮法（又称流化床法）制备微胶囊，是将固体囊心物悬浮于由流化床产生的承载气流中，呈沸腾状。囊液由喷嘴喷出，雾化形成微液滴，在囊室与悬浮的囊心物相遇，液滴在囊心物表面铺展并相互结合。由于气体的不断流动，溶解囊材的有机溶剂迅速挥发，聚合物在囊心物表面形成囊衣。被包裹的颗粒随气流在囊室循环，完成包裹与固化过程。影响空气悬浮微胶囊化效果的因素主要有雾化压力、喷液速度、空气流量、进风温度和物料处理量等。

（1）嗜酸乳杆菌发酵液，4℃ 7500r/min 离心 10min，收集菌体。

（2）将菌体与保护剂溶液混合均匀，0.2% 透明质酸与 10% 脱脂奶粉分别以 1:1 的体积比复配后，再与菌粉以 3:1 的比例混合得菌悬液，冷冻干燥得到冻干菌粉。冻干菌粉磨碎、筛分后备用。

（3）囊材液的配制。称取适量聚丙烯酸树脂 II，缓慢加入不断搅拌的 95% 乙醇溶液中，避免结块，继续搅拌至完全溶解，加入适量辅料，混匀备用。

（4）称取一次处理量的菌粉置于流化床上，调节适当的空气流量，使菌粉呈沸腾状；调节温度、流速和雾化压力，使囊液呈细小的液滴喷出。喷出的囊液与呈沸腾状的菌粉相遇，制得微胶囊。建议操作条件为：雾化压力 0.2MPa；空气流量 10~12m³/min；流化床进气温度 35~45℃；囊液流速 1mL/min；物料处理量 5~10g。

（5）微胶囊包裹产率和包裹效率的测定。产品中活菌数的测定：取微胶囊 1g，置于 50mL 人工肠液（取磷酸二氢钾 6.8g，加水 500mL。用 0.4% 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8；另取胰酶 10g，加水适量使溶解。将两液混合后，加水定容至 1L。配制好的人工肠液采用 0.2μm 无菌微孔滤膜过滤除菌）中 37℃，200r/min 振荡培养 45min，适当稀释后活菌计数。

加入的活菌数测定：取与 1g 微胶囊相当的菌粉，适当稀释后活菌计数。

微胶囊中的活菌数 = 产品中的活菌数 - 微胶囊表面的活菌数

微胶囊表面的活菌数测定：取微胶囊 1g 左右，置于 50mL、pH 值为 5.0 的磷酸盐缓冲液中，37℃，200r/min 振荡培养 45min，适当稀释后活菌计数。

包裹产率 = 微胶囊中的活菌数 / 加入的活菌数 × 100%

包裹效率 = 微胶囊中的活菌数 / 产品中的活菌数 × 100%

(6) 微胶囊稳定性实验。样品装在无菌敞口小瓶内, 小瓶置于干燥器中, 用饱和亚硝酸钠溶液调节干燥器内相对湿度为 60%~65%, 干燥器于 37℃ 恒温培养箱中储存 3 个月, 每月测定剩余活菌数, 同时以冻干菌粉进行对比实验。

3.4 乳酸菌在食品中的应用

3.4.1 乳酸菌在乳制品中的应用

乳酸菌在各种乳制品中的应用已有数千年的历史。在我国秦汉时期, 即公元前 221—前 190 年间, “酪”字已出现在许多书籍中。如在《礼记·礼运》中就有“以烹以炙, 以为醴酪”的文字记载。甚至在更早的佛经讲法中也提到“酪、酥、醍醐”等乳制品。

牛乳经微生物发酵加工而成的产品统称发酵乳制品, 包括液体发酵乳, 如酸乳饮料、酸奶酪、乳酒、马奶酒等; 半固体发酵乳品, 如酸奶、黄油; 以及各种半熟的软干酪, 如焙烤干酪、奶油干酪等。几乎所有发酵乳制品都必须经乳酸菌的发酵作用才能制成。用来发酵牛乳使其形成一定风味产品的乳酸菌的原初培养物称发酵剂。从微生物组成来看, 发酵乳制品的发酵剂大体可分四种类型: ①单菌株发酵剂, 仅由某一种微生物的某种菌株构成; ②多菌株发酵剂, 由同一种微生物的几个特定(不同)菌株组成; ③多菌种混合发酵剂, 由不同种的某些菌株构成; ④自然混合菌株发酵剂, 由全部或部分未知乳酸菌的种或菌株组成。

发酵剂除了提高牛乳营养价值外, 还具有以下四方面作用: ①产生乳酸。

牛乳中的乳糖经乳酸菌作用分解为葡萄糖和半乳糖，然后发酵形成乳酸，乳酸的积累使牛乳的 pH 值下降并导致凝乳。②分解蛋白质。各种乳酸菌发酵剂均含有一定的蛋白酶和某些肽酶，能分解乳中的大分子酪蛋白，使其降解，或者分解蛋白质形成小肽或氨基酸。③形成风味物质。各种发酵乳品都有其自身特殊的风味和香气，这是牛乳经乳酸菌发酵后所形成的。如酸乳的特殊香味主要是保加利亚乳杆菌产生的乙醛所形成的，而发酵奶油的风味则来自乳球菌代谢形成的双乙酰。糖以及脂肪代谢产生的二碳、三碳等小分子产物和某些氨基酸代谢产物也与香味有关。④产生抑菌物质。乳酸菌发酵后能延长乳品保存期。乳糖发酵产生的乳酸使乳品 pH 值下降，在抑制其他细菌生长中它起着主要作用。乳酸菌产生的其他少量物质，如过氧化氢、双乙酰、细菌素以及次级反应产物硫氰酸和次硫氰酸等对其他细菌都有一定抑制作用。特别是有些乳酸菌的细菌素，如乳链菌肽（nisin），能广谱作用于各种革兰氏阳性菌，目前已被许多国家批准为食品添加剂。

目前国内工业化生产的发酵乳制品多采用多菌种混合发酵剂，这种发酵剂的优势在于：由于存在多种微生物，有的菌能够很好地产酸，有的菌则更易产生香味物质，或者两种菌相互提供对方生长所需物质，共同促进生长和形成更具有特殊风味的产物。

1. 酸乳的种类

酸乳是指以牛乳（或奶粉加工的还原乳）为原料经乳酸菌发酵使乳中蛋白质凝聚而成的胶状物产品。依产品类别分为：①纯酸乳，指以牛乳或奶粉为原料经发酵制成的产品；②调味酸乳，指牛乳中添加食糖、调味剂等辅料后发酵制成的产品；③果料酸乳，指牛乳发酵后添加天然果料等辅料制成的产品。依酸乳的物理性状分为：①凝固型酸乳，将接种发酵剂的牛乳直接装入销售容器中静止培养，这样制作的酸乳不具备流动性，能成型；②搅拌型酸乳，将接种发酵剂的牛乳先进行保温培养，然后搅拌和分装，这样制作的酸乳有一定流动性、不成型。

目前市场上十分流行酸乳饮料，虽然其口感、风味都颇似酸乳，而且有的也是通过乳酸菌发酵制成的，但其中的乳蛋白含量远低于生乳，并非由完全的纯牛乳加工制成。有的儿童酸乳饮料乳蛋白仅含 1%，也有的是通过添加乳酸、柠檬酸等调配而成的，根本不含乳酸菌。按照国家对酸乳所规定的标准，这些只能称为酸乳饮料而不能称为酸乳。

2. 酸乳发酵的微生物菌种

酸乳发酵的微生物菌种主要有嗜酸乳杆菌 (*Lb. acidophilus*)、各种双歧杆菌 (*Bifi. dobacterium*)、瑞士乳杆菌 (*Lb. helveticus*)、德氏乳杆菌德氏亚种 (*Lb. delbrueckii*subsp *delbrueckii*)、嗜热乳杆菌 (*Lb. thermophilus*)、干酪乳杆菌 (*Lb. casei*)、乳酪链球菌 (*Lc. lacti* subsp. *lactis*)、乳脂链球菌 (*Lc. Lacti* subsp. *cremoris*) 和双乙酰乳链球菌 (*S. diacetylatis*) 等。

目前国内市场出售的各种酸乳主要由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌两种微生物发酵制成。这两种菌混合发酵不仅能产生令人愉悦的酸乳风味物质和特殊香味,而且混合培养能相互提供彼此生长所需的物质和促进产酸,有利于工业生产。保加利亚乳杆菌作用于牛乳后能很快分解乳中的蛋白质,生成小肽和氨基酸,这些物质正是嗜热链球菌生长所需;而嗜热链球菌作用于牛乳中某些物质后却能很快地产生甲酸类物质,后者又正是保加利亚乳杆菌生长所需。

3. 酸乳的制作工艺

利用牛乳制作酸乳的过程包括:原料选取、均质、加热灭菌、制备和添加发酵剂、主发酵、后熟等。

(1) 原料选取。一定要选用健康奶牛生产的优质新鲜牛乳且不含抗生素。由于乳酸菌对抗生素十分敏感,因此凡施用抗生素等药物的奶牛产生的牛乳切忌用于生产酸牛乳。新鲜牛乳通常需要过滤以除去可能存在的各种杂质,如牛乳中存在的小颗粒类物质、部分细菌、酵母细胞以及霉菌孢子等。

(2) 均质。指将乳液通过一定压力的均质泵,使乳中各种物质均匀地悬浮于乳中并形成均匀的组织状态,防止乳脂上浮而分离,同时减少乳清分离析出,提高产品的黏稠度。为了提高均质效果,均质前先将乳液预热至 50~60℃,然后经 2.5~10MPa 进行均质。

(3) 加热灭菌。一般采用 90~95℃, 15min, 也可用 130~140℃, 15~45s, 或 70~90℃, 30min。灭菌后应迅速冷却至 40~45℃。加热灭菌的作用有以下几方面:①杀死乳中存在的致病菌和其他微生物;②使乳清蛋白变性,有利于提高产品的黏稠度和组织状态;③除去乳中存在的氧,降低物料的氧化还原电势;④使部分蛋白质水解,以利于乳酸菌生长;⑤防止乳清分离。

(4) 制备和添加发酵剂。发酵剂主要有液态和粉剂两种类型。如果从液态保存物或斜面保存菌种开始,则应该经制备母发酵剂、中间发酵剂和工作发酵

剂等几个步骤,最后转入主发酵。母发酵剂的培养一般都采用石蕊牛乳培养基,中间发酵剂采用不加石蕊试剂的脱脂乳为培养基。在母发酵剂和中间发酵剂阶段,保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌两种菌可分开单独培养,37℃培养过夜。工作发酵剂是主发酵前一级的发酵剂,它的用量必须根据主发酵规模而定。工作发酵剂可用与主发酵相同的物料在不锈钢容器中进行培养,工作发酵剂凝乳后应尽快转入主发酵罐中,切不可放置太长时间。母发酵剂、中间发酵剂和工作发酵剂培养完成后都应进行酸度测定和生香物质的检测。如果主发酵规模较大,可以采取多级中间发酵逐步扩大的办法来完成。粉剂一般是经浓缩、冷冻干燥而成的,活菌含量很高(可达 10^{11} ~ 10^{12} CFU/g),因此可以直接投入主发酵罐中进行发酵或经工作发酵剂一次扩大而进入主发酵。

(5) 主发酵。接入主发酵罐后的保温培养要根据酸乳的品种而定。一般凝固型的酸乳是将工作发酵剂接入后立即搅匀并分装于小容器中,保证在1h内分装完毕,然后置于42℃下培养。一般培养2.5~4h pH值即可降至4.5~4.3,并产生凝乳。若测定酸度在70°T左右,此时就可结束主发酵。

(6) 后熟。指主发酵结束后将装乳的小容器转移至冷室中放置过夜,进行后熟。后熟过程中冷却的速度相当重要,冷却速度太快,会引起乳清分离;速度太慢,会使酸度继续升高而超过标准。一般认为在1h左右温度降至10~15℃为好。冷却放置过夜后就可作为成品供应市场。

制作果味、果料等搅拌型酸奶,在接入工作发酵剂并搅匀之后直接在发酵罐中保温,使物料维持40~45℃。当pH值降至4.3~4.5出现凝乳时,停止发酵,然后开始搅拌并降温至10℃,同时加入预先制备好的果酱、果料等物质,搅匀,再分装于小型容器中,分装好的酸乳也应继续放于低温下保存。

3.4.2 乳酸菌在肉制品中的应用

发酵肉制品主要应用的是乳酸菌,我国云南省傣族人民有食用酸肉的习惯,即将鲜肉切片放置于密闭的容器中,使之经过1~2个月的乳酸菌发酵后食用,既有肉香味,又有乳酸菌发酵的酸味。随着肉类加工技术的不断提高、微生物发酵肉制品的研究不断深入,乳酸菌在肉制品中的应用日益广泛。

乳酸菌在肉制品中的作用主要有:①降低pH值,减少腐败,改善制品的组织结构和风味。乳酸菌使糖类发酵产生乳酸,使制品的pH值降低,产生乳酸

菌素抑制腐败菌的生长,同时使部分肌肉蛋白质变性,形成胶状组织,提高制品的硬度与弹性,并赋予制品良好的风味。②促进发色。由于pH值的降低,促进亚硝酸盐的分解,产生一氧化氮,与肌红蛋白结合,形成稳定的亚硝基肌红蛋白,使制品呈亮红色。③降低亚硝酸盐残留量,减少亚硝胺的形成。由于乳酸菌发酵产酸,降低pH值,促进亚硝酸盐的还原作用,降低亚硝酸盐残留量,从而减少亚硝酸盐与二级胺反应生成致癌物质——亚硝胺。④抑制腐败菌及毒素,起到“生物防腐”的作用,从而延长货架期。乳酸菌在发酵过程中产生的抗菌物质乳酸菌素对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和肉毒杆菌等腐败微生物的生长、繁殖有抑制作用,从而阻止其毒素的产生,制品的保质期比普通肉制品增加1~2倍,使产品更安全。⑤提高制品的营养价值,促进良好风味的形成。制品在发酵过程中,由于蛋白质的分解作用,提高了游离氨基酸及功能性寡肽的含量,提高了蛋白质的消化率;同时,发酵过程中代谢产生酸类、醇类、碳水化合物、杂环化合物、游离氨基酸和核苷酸等风味物质,使制品的功能性、营养价值和风味都有了很大的提高。

1. 乳酸菌发酵香肠

乳酸菌发酵香肠是指将碎肉、动物脂肪、盐、糖、发酵剂、香辛料等混合灌入肠衣,经乳酸菌发酵、干燥成熟(或不经干燥成熟)而制成的具有稳定的微生物特性和典型的发酵香味的肉制品。依据最终加工产品的水分含量可将发酵香肠分为干香肠(失重30%以上)、半干香肠(失重10%~30%)和不干香肠(失重10%以下);也可以根据产品的发酵程度分为低酸发酵香肠和高酸发酵香肠。

(1)乳酸菌发酵香肠的生产工艺流程为:原料肉→切碎→搅拌(添加辅料和接种乳酸菌发酵剂)→灌肠→发酵→成熟→干燥成品。

(2)乳酸菌发酵香肠的主要工艺操作要点如下。

①原料肉的选择最为关键。原料肉应具有较高的持水性和蛋白质含量,脂肪必须是高熔点、低含量的不饱和脂肪酸,因此,必须选用瘦肉比例高(60%~80%)的鲜肉。

②糖的添加。制作发酵香肠时,通常都需要在原料中按一定比例添加发酵糖类(葡萄糖和蔗糖),以满足乳酸菌发酵的碳源需求。一般欧式半干烟熏香肠添加0.4%~0.8%的发酵糖;意大利香肠添加0.2%~0.3%的发酵糖;美式香肠添加2%的发酵糖。

③接种量的确定。由于原料肉未经杀菌处理,肉中的杂菌可在发酵中生长,在发酵初期接种的乳酸菌必须迅速生长,成为优势菌,从而抑制其他杂菌的生长,以保证产品质量,因此接种量的确定就显得非常重要。通常接种量为 $10^7\sim 10^8$ CFU/g。

④腌制剂的添加。发酵香肠中通常加入2.4%~3%的盐,这不仅可以抑制或延缓许多不利微生物的生长,促进乳酸菌和小球菌的繁殖,而且盐可与肌原蛋白纤维结构发生作用,溶解蛋白质在肉粒周围形成的黏膜。此外,加盐还可以增加发酵香肠的风味。

发酵香肠的制作中通常还要加入硝酸盐或亚硝酸盐,硝酸盐用于成熟期长的干香肠,而亚硝酸盐用于其他的发酵香肠。亚硝酸盐的量不能超过150mg/kg,抗坏血酸钠经常与亚硝酸盐混合使用,可加速腌制的颜色和风味,一般抗坏血酸钠添加量为300~500mg/kg,如果生产生香肠,则加入硝酸盐的量应控制在600~700mg/kg。

⑤其他香辛辅料的添加。发酵香肠的制作中可加入各种香辛料,如胡椒粉、豆蔻、茴香、肉桂、辣椒、姜、蒜等。红胡椒、芥末、豆蔻可加速乳酸的形成,原因是这些香辛料中含有锰,锰是乳酸菌各种酶活性所必需的微量元素。添加蒜、迷迭香、鼠尾草等可延长香肠的保质期,原因是这些香料中含有强抗氧化剂。

⑥发酵及成熟条件的控制。原料肉在加入绞肉机之前需冷却或冷冻,然后加入糖、腌制剂和香料。脂肪组织在冷冻条件下绞碎,然后加到混合物中。混合物填充入肠衣之前,应尽可能多地去除其中的氧,填充过程中温度不宜超过20℃。最常用的肠衣是天然动物肠衣或变性胶原和纤维素制成的肠衣。

香肠的发酵温度与时间成反比,如在20℃、相对湿度为92%的条件下,发酵3~4天,pH值即可达5.0~5.2。而高温(38℃)时,24h即可完成发酵。但如条件控制不好,杂菌生长的可能性也会增加。在干燥成熟阶段,控制湿度非常重要。最好使香肠表面水分蒸发的速度与香肠内部的水分向表面扩散的速度相等,因此,通常控制成熟室的相对湿度比香肠中的相对湿度低5%~10%,即85%~90%,空气流速约为0.4m/s。香肠的成熟时间也与温度有关,高温发酵成熟期短,几天内即可成熟,低温发酵的香肠成熟期需几周。一般成熟阶段的温度为15~18℃。成熟的香肠通常还需在12~15℃的温度下老化,老化过程中一般

使相对湿度逐渐降低,同时控制空气流速约为0.1m/s,以便于水的排出,使香肠均匀干燥。

2. 乳酸菌发酵火腿

(1) 乳酸菌发酵火腿的工艺流程为:原料肉→腌制→切割→添加配料→添加乳酸菌→成型→发酵→成熟→成品。

(2) 乳酸菌发酵火腿的操作要点:选取优质原料肉,剔除筋腱、脂肪等,切成0.25kg的肉块,添加食盐、硝酸盐等配料,在0~5℃下腌制24h;然后切成1cm³的肉丁,添加糖类、香辛料等混合均匀,再添加以每克肉含10⁶~10⁷ CFU的乳酸菌,装模成型;在乳酸菌最适宜温度下发酵12~24h;最后在(90±2)℃水中煮1.5~2h,使其中心温度达78℃左右时,冷却、脱模即为成品。

3.4.3 乳酸菌在果蔬发酵中的应用

乳酸菌在果蔬发酵中的应用最普遍的是乳酸菌发酵蔬菜。蔬菜中含有丰富的维生素、纤维素和矿物质,利用乳酸菌对蔬菜发酵不仅有利于保持蔬菜的营养成分和色泽,而且发酵蔬菜中的乳酸菌摄入消化道后,具有增强机体免疫力的作用,同时还可以促进肠胃蠕动,具有治疗便秘的作用。

1. 乳酸菌发酵泡菜

乳酸菌发酵泡菜是在洗净的蔬菜中加入配料,使乳酸菌利用蔬菜中的可溶性养分进行乳酸菌发酵。制作泡菜的原料大多选择固形物含量高的蔬菜,如白菜、萝卜或甘蓝等,其优点是耐物理冲击,且发酵时产生的废水较少。乳酸菌发酵泡菜时可加入大蒜、生姜、辣椒、洋葱等具有天然抑菌作用的辅料。

乳酸菌发酵泡菜的工艺流程如下。

(1) 分拣整修。检查蔬菜,剔除黄叶、腐烂和不亦食用的部分,整修。

(2) 切分。通常白菜是纵向两分或四分,甘蓝、萝卜等切成小块,大蒜和生姜切片,辣椒切丝。

(3) 加盐及辅料。一般加盐量为2%~2.5%,加糖量为2%~3%,搅拌均匀,同时还可适当加入一小块苹果或梨以补充乳酸菌发酵所需要的维生素。

(4) 接种。传统泡菜使用老泡菜汁进行接种,现代则使用纯菌种发酵,发酵的菌种一般有植物乳杆菌、肠膜明串珠菌或植物乳杆菌、肠膜明串珠菌与其他乳酸菌混合培养的菌种,也可接入保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合培养的菌种。

(5) 发酵。接种混匀后把菜分装在容器中，压紧，加盖严密水封，进行乳酸菌发酵。发酵温度 20~25℃，控制蔬菜发酵的 pH 值至 4.2，发酵时间约为 2 天。

(6) 保存。将发酵好的泡菜置于冷库中保存，冷链运输。

2. 乳酸菌发酵酸菜

酸菜是一种自然发酵的蔬菜，在腌制过程中，主要是黄瓜发酵乳酸菌、胚芽乳杆菌、植物乳杆菌等，若在腌制酸菜过程中人工接入适量优良的混合乳酸菌菌株，则可有效提高酸菜的风味。

3. 乳酸菌发酵果蔬汁饮料

通常情况下，乳酸菌可以发酵苹果汁、雪梨汁、橙汁、番茄汁、胡萝卜汁等各种果蔬汁。乳酸菌发酵果蔬汁的工艺流程为：果蔬汁→加糖、灭菌→冷却→接种→发酵→灭菌→成品。通常选用嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌混合菌种或植物乳酸菌、嗜酸乳杆菌和其他乳酸菌混合发酵蔬菜汁，先将菌种活化 2~3 次，用复合蔬菜汁和脱脂奶粉培养基扩大培养。以乳酸菌数为 10^8 CFU/mL 的种子液作为工作发酵剂。

将预处理好的果蔬汁装入发酵罐中，在 90~95℃ 灭菌 20min，冷却到 43℃ 接种，接种量为 3%~4%，40~43℃ 保温发酵至 pH 值为 4.0~4.5，乳酸含量为 0.85%~1% 时结束发酵。发酵结束时使发酵罐内温度迅速升温至 70℃ 以上，以杀死乳酸菌。

果蔬汁经过乳酸菌发酵后，谷氨酸、天冬氨酸以及一些风味物质，如双乙酰、乙酸乙酯、2-庚酮、2-壬酮等含量都有所增加。

3.4.4 乳酸菌在酿造工业中的应用

1. 乳酸菌在酿酒中的应用

1) 乳酸菌在葡萄酒酿造中的应用

乳酸菌在葡萄酒酿造中的应用主要是乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 等将葡萄酒中酸涩味较强的苹果酸经脱羧而生成酸味比较柔和的乳酸和二氧化碳，该过程称为苹果酸-乳酸发酵 (malolactic fermentation, MLF)。发酵过程中葡萄酒的酸度降低，pH 值上升 0.3~0.5，降低了酒的酸涩味和粗糙感，突出果香和酒香。

乳酸菌还可以利用葡萄酒中的糖和柠檬酸产生一些风味副产物，其中最重

要的是双乙酰及其衍生物，它们主要来自柠檬酸代谢；此外，其他风味物质如乙酸、琥珀酸二乙酰、乙酸乙酯和其他挥发酸、酯和高级醇等的浓度也有所增加。

乳酸菌在葡萄酒酿造中的工艺要点：发酵所用乳酸菌主要是乳杆菌、酒明串珠菌和乳球菌，发酵条件为葡萄酒 pH 值 3~4，温度 20~22℃，酒精度 <10%，原料中 SO₂ 浓度 <70mg/L。

2) 乳酸菌在啤酒酿造中的应用

乳酸菌在啤酒酿造中的应用主要是利用乳酸菌产生的乳酸来酸化麦芽和酸化麦芽汁。酸化麦芽是利用麦芽中或其他来源的乳酸菌接种于未加酒花的麦芽汁中，在适宜的条件下发酵制得乳酸菌培养液，再用培养液来浸泡绿麦芽或干麦芽后干燥，最后利用酸麦芽在糖化过程中配比使用，从而使醪液与麦芽汁的特性与组成得以改善。酸化麦芽汁则是将乳酸培养液直接加入醪液与煮沸麦芽汁中，进行酸化处理。

生物酸化技术的应用，不仅可以提高酿造用水的酸度，提高淀粉酶的活性，促进淀粉的水解，进而提高啤酒的最终发酵度，而且有利于蛋白质的酶解，改善麦芽汁的过滤性能，提高啤酒的非生物稳定性，降低啤酒色度，提高啤酒的生物稳定性。此外，经过生物酸化处理的啤酒具有较多的含氮物质和适宜的多酚。这些多酚与含量较高的还原物质共同作用使啤酒具有良好的抗氧化性能，口味柔和。

3) 乳酸菌发酵乳酒

乳酒是一种营养丰富、味道独特的新型发酵乳饮料。乳酒的菌种是保存在多糖基质中的微生物混合物，将这些微生物混合物加入到奶中进行发酵即制得发酵乳酒饮料；也可以分别接种，单独发酵。如用乳酸菌、酵母菌发酵生产牛乳酒时，二者单独发酵优于混合发酵。

乳酸菌发酵牛乳酒的工艺为：牛乳添加 8% 的糖，首先接入 8% 的酵母菌，30℃ 发酵 22h，然后再接入 5% 的乳酸菌，40℃ 发酵 2h。成品指标：酒精度 0.6%，乳酸含量 1.05%，凝乳状态良好，无脂肪及上清液析出，乳白色不透明，酸度适中，有较浓厚的醇香味，口感细腻、滑润。

2. 乳酸菌在调味品中的应用

1) 乳酸菌在酱油酿造中的作用

酱油是以蛋白质为主料、淀粉为辅料，经制曲发酵生产的调味品。耐盐乳

酸菌在酱油中起呈味作用,特别是在酸味中(主要是乳酸和其他少量的有机酸)起重要作用。乳酸菌和酵母菌在酱油酿造中协同作用产生香味和风味物质,如双乙酰、乳酸乙酯等。适当协调二者比例,乳酸菌与酵母菌的比例以 10:1 为宜,使乳酸和乙醇的含量达到平衡,可以酿造出香气浓郁、鲜美醇厚的优质酱油。

2) 乳酸菌在食醋酿造中的应用

食醋是主要以淀粉为原料,经酵母菌和醋酸菌发酵而成的酸性调味品。乳酸菌在食醋酿造中的主要作用是呈味,在液体深层发酵时,通过加入乳酸菌和酵母菌提高风味。乳酸菌代谢产生的有机酸、乳酸乙酯、双乙酰及其衍生物是食醋中主要的风味物质;此外,乳酸菌产生的低级脂肪酸、羰基化合物等的香气成分形成较复杂的食醋香味。

3.4.5 乳酸菌在谷物制品中的应用

1. 乳酸菌在黑麦酸面包中的应用

黑麦酸面包是以黑麦面粉或小麦面粉加黑麦面粉为主要原料,添加酵母菌、乳酸菌和水等调制成面团,经发酵、烘烤而成。黑麦酸面包与普通面包的生产过程基本相同,只是在发酵剂中除添加酵母菌外,还添加乳酸菌。

黑酸面包制作的工艺流程如下。

(1) 调制面团。首先将原料、辅料、发酵剂和水混合,调制成面团。原料选取蛋白质含量高的黑麦。发酵剂是酵母菌和乳酸菌,其中乳酸菌主要是乳杆菌属,常用的有植物乳杆菌、短乳杆菌和发酵乳杆菌。接种量一般为 0.5%。

(2) 发酵。多采用二次发酵法。第一次调制面团时,将约半量的原料、辅料、水和全部发酵剂混合、搅拌、调制成面团后,在 25~30℃ 的温度下经 2~4h 进行第一次发酵;然后进行第二次调制面团,即将第一次发酵好的面团和剩余的原料、辅料,加水和油脂,经搅拌制成有弹性、性能好的面团进行第二次发酵,发酵时间和温度与第一次基本相同。

(3) 烘焙。烘焙时间要根据炉温、炉型和面包坯的形状、大小而定。最终醒发的面包坯在高温作用下,不仅色泽金黄、组织蓬松,而且香气浓郁。

2. 乳酸菌在苏打饼干中的应用

苏打饼干是使用发酵面团生产的饼干,传统的制作主要靠面粉内存在的微