

益生菌

郭本恒 主编

 化学工业出版社

益生菌

ISBN 7-5025-4914-5



9 787502 549145 >

ISBN 7-5025-4914-5/TS·130 定价：68.00元

销售分类建议：生物/生物技术

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、益生素和益生菌生长底物的选择标准	165
四、益生素的安全性	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°C、45°C）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),那么前而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，在单一平面而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*

性状特征	杆 菌		球 菌							
	Carno.	Lactob.	Aeroc.	Enteroc.	Lactoc.	Leucon.	Pedioc.	Strptoc.	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, 其中有多多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

长因子的需求、是否存在某些特殊的酶（例如， β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛苷酶）、在牛乳中的生长特性以及血清类型。进一步的鉴别包括分子/化学分类方法，包括肽聚糖中二氨基氨基酸的类型、是否存在磷壁（酸）质及其类型、是否存在甲基萘醌（menaquinones）及其种类、DNA 分子中 G+C%、细胞脂肪酸的组成以及乳酸脱氢酶的电泳移动性等。

1. 肠球菌、乳球菌、链球菌和漫游球菌属内种的分类

Enterococcus、*Lactococcus*、*Streptococcus* 和 *Vagococcus* 以前曾经同属于 *Streptococcus* 属。

历史上，曾采用血清分型的方法将链球菌分成不同的 Lancefield 群，这一体系曾经在链球菌的分类中占有非常重要的地位。不过目前这一方法在分类中的重要性已经逐渐减弱，但对于快速鉴定链球菌中的致病菌仍非常有用。不用质疑，D 群抗原的存在与肠球菌（以前被称为 D 群链球菌或“粪链球菌群”）有关、而 N 抗原则与乳球菌相关（以前被称为“N 群链球菌”或“乳链球菌群”），但要注意的是，漫游球菌也具有 N 抗原。

尽管从传统的链球菌属中分出了许多新的属，严格意义上的链球菌属（*Streptococcus Sensu Stricto*）仍然是一个非常大的属，对其分类仍面临重重困难。该属可以大致分为三群：化脓链球菌、口腔链球菌和其他链球菌。部分曾被归入该属“厌氧链球菌”群的厌气球菌，被证明为与其他链球菌无关，被从该属剔除。在化脓链球菌群中包括许多著名的致病菌，如 *S. pyogenes* 和 *S. agalactiae*。另一种致病菌 *S. pneumoniae* 曾经也归入化脓链球菌群，后来被转移到口腔链球菌群，后者主要由人与动物口腔中的链球菌组成。某些口腔链球菌，例如 *S. mutans* 是引起龋齿的病原菌，其他则是引发感染性心肌炎的病原菌。

作为一般性的原则而言，化脓性链球菌属于 β -溶血型，而口腔链球菌则属于 α -溶血型或不溶血。大多数链球菌的 16S rRNA 的序列已经被测定，已经能清楚地表明不同种之间的亲缘关系，但还没有发展成进行种特异性鉴别的探针。一些生化反应、如碳水化合物发酵、精氨酸水解、某些特定酶的活力在进行分类时仍然会经常用到。

目前在食品工业中应用的惟一的链球菌是 *S. thermophilus*，主要用于酸奶生产。*S. thermophilus* 被 Schleifer 和 Kilpper-Bälz 等（1987 年）以及 Hardie（1986b）归入“其他链球菌”群，但现在则归入“口腔链球菌”群（Hardie 和 Whiley, 1995）。Farrow 和 Collins（1984 年）建议将 *S. thermophilus* 作为 *S. salivarius* 的一个亚种，因为两者之间的 DNA-DNA 同源性超过了 70%，因此，在一段时间内，*S. salivarius* subsp. *thermophilus* 这一名称是正确的。然而，通过对大量菌株的调查发现，部分菌株之间 DNA-DNA 同源性非常低，后来这一建议未被采纳。此外，两者之间在表型性状上存在明显的差异，也可以证明它们是不同的种。第 3 种链球菌，*S. vestibularis* 也与这两种相近的链球菌存在密切的关系。不过，*S. thermophilus* 对热的耐受性、能在 52℃ 生长以及只能发酵少数碳水化合物可以很方便地将其与其他链球菌分开。已经设计出一种能对 *S. thermophilus* 进行种特异性检测的探针。

乳球菌与乳制品存在密切的联系，在目前已知的 5 种乳球菌中，只有一种即 *Lc. lactis* 在乳品工业中应用。*Lc. lactis* 可分成 3 个亚种：*Lc. lactis* subsp. *lactis*、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 和 *Lc. lactis* subsp. *hordniae*，只有前两个亚种常用于乳品加工。在 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 中包括曾经属于 *Lc. lactis* subsp. *lactis*、*Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* 和 *Lactobacillus xylosum* 的菌株。尤其是后者（即以前的“*Lactobacillus xylosum*”），表明在乳酸菌分类过程中，形态学特征有时会引起误导。确实，有时要区分球菌和杆菌并不是一件容易

的事。*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 中包括曾经属于 *S. cremoris* 或 *S. lactis* subsp. *cremoris* 的菌株。*Lc. lactis* subsp. *lactis* 与 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 的区别在于前者不能：①在 40℃ 生长；②在 4% NaCl 中生长；③水解精氨酸；④发酵核糖。一些常用的生化反应特征（如糖利用试验）可用来区分乳球菌属内的各个种，现在也可以采用遗传学的方法。

如前所述，新设立的漫游球菌属容易与乳球菌混淆，但是，前者可以通过细胞脂肪酸组成分析很清楚的与后者分开。不是所有的漫游球菌都具有运动性。现在已设计出可对漫游球菌进行属-或种-特异性鉴定的寡聚核苷酸探针，使对这类细菌的鉴定变得可靠而且方便。

肠球菌在食品工业中不是特别重要。有些种、尤其是 *E. faecalis*（曾被命名为 *S. faecalis*），是一种条件致病菌，因此，通常不在食品中使用。然而，由 *E. faecium*（曾被命名为 *S. faecium*）和 *E. faecalis* 制成的制剂也被作为益生菌或青贮饲料的发酵剂，将这两种菌作为益生菌的意义不大，因为其自然生存环境是人和动物的肠道，在南欧部分当地类型的干酪中也存在某些种类的肠球菌。前面已经提到，采用表 1-1 所列的表型性状测试很难将某一菌株归到该属中。在对该属进行分类时，其他常用的表型性状试验包括 VP 试验和对核糖的发酵。在 VP 试验中，大多数肠球菌为阳性。如果仅采用表型性状试验，需要将该菌株鉴定到种的水平才能准确无误地知道其属于肠球菌属。利用表型性状试验对肠球菌进行分类的情况，可参阅已发表的有关综述（Devriese, 1993）。不同种之间的区分主要通过碳水化合物发酵方式、精氨酸与马尿酸水解试验、是否存在甲萘醌及其类型等试验来进行。最近有研究提出，根据肠球菌对微球菌的裂解活性，将其分成不同的“溶菌组”。这些溶菌组与不同种之间 DNA 的同源性具有一定的相关性。*E. faecalis* 和 *E. hirae*（曾被命名为 *S. faecium* 或 *S. faecalis*）在乳酸菌基础理论研究中有非常重要的价值，例如，它们可用作研究生物产能和膜生物学的模式菌株。

2. *Aerococcus*, *Pediococcus* 和 *Tetragenococcus*

气球菌、片球菌和四联球菌是形成四聚体的乳酸菌。气球菌属目前包含两个种，即 *A. viridans* 和 *A. urinae*。关于该属的分类情况，可以参考 Weiss（1991 年）发表的综述。气球菌对食品工业没有任何价值。因此，以后不再赘述。

随着最近将 *P. urinae-equi* 划归气球菌属及 *P. halophilus* 划归四联球菌属，片球菌属可以被描述为：“惟一的嗜酸、行同型发酵、在两个垂直方向分裂形成四聚体的乳酸菌”。无论从正面还是负面影响的角度而言，片球菌在食品工业中都有非常重要的地位。其中 *P. damnosus* 是啤酒酿造工业的主要腐败菌，其在啤酒发酵过程中的生长会产生双乙酰/乙偶姻，导致啤酒产生油蚝味；*P. acidilactici* 和 *P. pentosaceus* 是制酱工业的发酵剂以及青贮饲料的菌种；片球菌还是参与干酪成熟过程的非发酵剂乳酸菌的重要成员。片球菌属内不同种之间的区分主要通过糖利用范围、精氨酸水解、在不同 pH 值（7.0 至 4.5）的生长情况、所产生的乳酸的立体构型来进行。采用这些实验很难将 *P. acidilactici* 和 *P. pentosaceus* 分开，但 DNA-DNA 同源性分析证明两者是不同种的细菌。上述片球菌还有一个相似的特点是可以产生一种非血红素的“假触酶”活性。

如前所述，在四联球菌属种包括曾属于的 *P. halophilus* 菌株。目前，在该属中，仅有一个种：*T. halophilus*。但有一种肠球菌即 *E. solitarius* 从遗传上与四联球菌有非常近的亲缘关系。除了对盐的极端耐受性外（>18% NaCl），能将 *T. halophilus* 与其他乳酸菌分开的表型性状特征还有其生长需要一定浓度盐的存在，通常为 5% NaCl。*T. halophilus* 是一种用于含高盐食品如大豆酱进行乳酸发酵的重要的乳酸菌。

3. *Leuconostoc*、*Oenococcus* 和 *Weissella*

明串珠菌属曾被描述为“行异型发酵、从葡萄糖发酵只产生 D-乳酸的球形乳酸菌，而且不从精氨酸产氨”。因此，明串珠菌与其他的球形乳酸菌可通过其异型发酵方式而区分，又可以通过形态和其他一些特征与行异型发酵的乳杆菌所区分。然而，实际上明串珠菌很容易与一些行异型发酵、“球杆状”的乳杆菌相混淆。对明串珠菌属细菌的遗传分析表明，在属内不同种之间的亲缘性差异较大。在很早以前，就预料 *Ln. paramesenteroides* 与部分异型发酵乳杆菌（例如，*Lb. confuses* 和 *Lb. viridescens*）将是构成一个新属的核心种，因为它们既不同于明串珠菌，又与乳杆菌有区别。随后，从肉制品又分离到部分属于这一类群的异型发酵乳杆菌，由此提出了一个能包含这些“明串珠菌样”乳酸菌的新属即 *Weissella* (Collins, 1993)。正如前而所述，在 *Weissella* 中既有球菌也有杆菌。遗传学分析显示，曾被称为葡萄酒明串珠菌的 *Ln. oenos* 与其他明串珠菌的亲缘关系较远，该种应该独立成为一个新的属。最近，这些细菌被归入新设立的 *Oenococcus*。要注意的是，尽管从遗传亲缘关系的角度而言，需要对分类做上述变动，但并不意味着对这些“明串珠菌样”乳酸菌的实际分类鉴定工作变的比以前容易。葡萄酒球菌（目前只有 *O. oenos* 一个种）因为对酸和乙醇具有极端的耐受性，很容易与其他乳酸菌区分；但要将 *Weissella* 与严格意义的明串珠菌或行异型发酵的乳杆菌分开则仍然是一件让人头痛的事情。从方便实际工作的角度出发，最好将这些“明串珠菌样”乳酸菌看成一个群，采用一些具有判断性的试验将特定的菌株鉴定到属和种的水平。目前在判断某一特定菌株是否属于 *Weissella* 最可靠的方法是采用属—特异性的 rRNA 探针进行鉴定。

明串珠菌可以利用牛乳中的柠檬酸盐形成大量的双乙酰，部分种如 *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* 已出于这种目的在乳品工业上使用。明串珠菌在蔬菜的天然发酵、例如 sauerkraut（一种德国泡菜）过程中，也有很重要的作用，乳酸发酵的过程常由明串珠菌来启动。多种 *Weissella* 似乎与肉制品有关，并在低温下于肉制品上生长繁殖。

明串珠菌或 *Weissella* 属内不同种或亚种之间可以通过糖发酵方式、是否（从蔗糖）形成右旋糖苷、七叶灵水解、生长需求、在不同 pH 和温度的生长特性、能否分解柠檬酸/苹果酸来进行。但总的来说，分类的过程非常困难。在进行苹果酸分解试验时尤其要小心，因为其代谢会产生 L-乳酸。因此，在对（从葡萄糖）所产生的乳酸的立体构型进行鉴别时，培养基中一定不能存在苹果酸。

4. *Lactobacillus* 和 *Carnobacterium*

在乳酸菌中，乳杆菌是最大的一个属。乳杆菌属内种之间的差异也比较大，由一系列在表型性状、生化反应和生理特征方面具有明显差异的种组成。从该属内不同种的 G+C mol% 的差异就可以反映出种与种之间的亲缘关系比较远（见图 1-1）。该属细菌 G+C% 的范围为 32%~53%，几乎超过了作为单一属可接受范围的 2 倍。造成该属内种的数目庞大、相互之间亲缘关系迥异的原因在于其属的定义，乳杆菌属的基本定义为：杆形乳酸菌。这种定义很容易让人做出这样的联想，即所有其他球形的乳酸菌则属于另外一个属。然而，在球形乳酸菌中早就发现其在形态上的差异，所以被分成了几个不同的属。尽管这种情况对杆形乳酸菌要困难得多，Orla-Jensen (1919) 还是按照球形乳酸菌分类的模式将乳杆菌属其分成几个亚属：*Thermobacterium*，*Streptobacterium* 和 *Betabacterium*。尽管其命名被弃用，对不同亚群的定义也作了部分修正，但这种分群方式在某种程度上至今仍然有其合理性。表 1-2 总结了用于区别乳杆菌属内不同群之间的表型性状特征以及各群内最典型的种。在进行

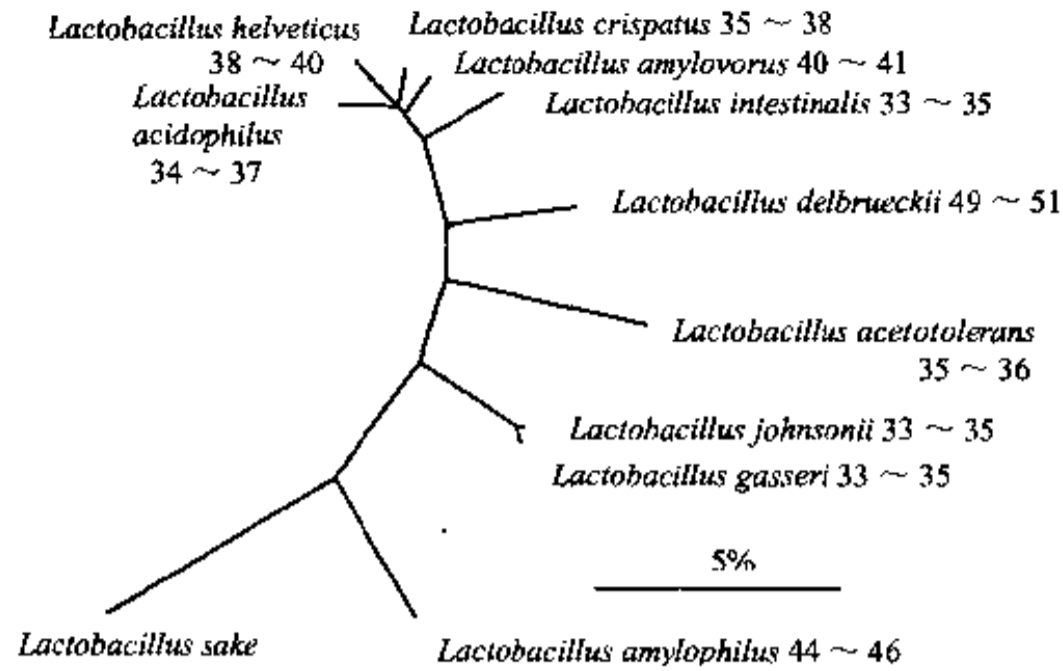


图 1-1 乳杆菌属内 *Lb. acidophilus* 组内的种与其他乳杆菌之间根据 16S rRNA 序列比较所获得的遗传亲缘关系，同时列出了其 G+C mol% (Schleifer 等, 1995)

分群时所采用的生理学试验的基础在于是否存在与糖进行同型发酵或异型发酵有关的关键性酶，即果糖 1,6-二磷酸醛缩酶和磷酸酮糖酶。在最近有关该属的描述中 (Hammes 和 Vogel, 1995)，仍然保留了采用生理学性状将其分成三个群的原则 (分别被称为 A, B, C 群)，但在每个种的后面分别加上了 a, b 或 c 等后缀，以反映它们属于何种遗传簇。例如，*Lb. acidophilus* 被归入 Aa 群，而 *Lb. salivarius* 则被归入 Ab 群，因为两者属于不同的遗传簇。需要留意的是，c 簇中所包含的部分兼型发酵乳杆菌，如 *Lb. confusus* 和 *Lb. viridescens* 已经划入 *Weissella* 属。

表 1-2 乳杆菌属内不同群的鉴别特征

表型性状	群 I 专性同型发酵	群 II 兼性异型发酵	群 III 专性异型发酵
戊糖发酵	-	+	+
从葡萄糖产 CO ₂	-	-	+
从葡萄糖酸产 CO ₂	-	+ ^a	+ ^a
FDP ^b 醛缩酶	+	+	-
磷酸酮糖酶	-	+ ^c	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. reuteri</i>

注：a. 如果发酵的话；

b. 二磷酸果糖；

c. 可被戊糖所诱导；

本表来源于 Sharpe (1981) 和 Kandler 和 Weiss (1986)。

对乳杆菌属内不同种进行鉴别时所采用的经典分类试验有碳水化合物发酵方式、所产生乳酸的构型、精氨酸水解、生长需求以及在不同温度的生长特性等，尽管这些方法在种鉴别时仍然非常有用，但对乳杆菌的准确分类还需要进行细胞壁肽聚糖分析、乳酸脱氢酶 (LDH) 电泳泳动性分析、G+C mol% 以及 DNA 同源性分析等试验。现在已经设计出针对多种乳杆菌的种特异性寡聚核苷酸探针 (根据 rRNA 序列制备)，使对乳杆菌进行日常鉴定和分类的工作变的相对容易。

乳杆菌在自然界中分布广泛，有相当多的乳杆菌应用于食品工业。它们通常是乳杆菌中

最耐酸的那些种，从而可以使一些天然性的乳酸发酵过程得以完成、如蔬菜和青贮饲料的发酵。乳杆菌也存在于人与动物的口腔、胃肠道及阴道。有一些种，如 *Lb. brevis*、*Lb. casei* 和 *Lb. plantarum* 则可以从多种生境中分离到；部分种则存在于一些特定的环境中如 *Lb. sanfrancisco* 存在于酸面团、*Ldelbrueckii* subsp. *bulgaricus* 则主要存在于酸奶中。

由于越来越多的乳杆菌被作为益生菌使用，而且随着细菌分类学的进展，经常会出现食品或药物制剂中所使用的乳杆菌出现同物异名或分类名称更替的现象。限于篇幅，在本章中仅对食品中常用作益生菌的乳杆菌的分组情况作简单介绍。

(1) *Lb. acidophilus* 组 除严格意义的 *Lb. acidophilus* 外，本组还包括另外 5 个种。从对这 6 种乳杆菌描述的时间顺序来看，只有严格意义的 *Lb. acidophilus* 为人所知的历史比较悠久（表 1-3）。该种最先由 Moro (1900) 年命名为“*Bacillus acidophilus*”，后来 Hansen 和 Moquot (1970) 将其更名为 *Lb. acidophilus*。*Lb. crispatus* 在 1953 年提出，而其余的 4 个种包括被用作益生菌的 *Lb. gasseri* 与 *Lb. johnsonii* 都只是在近几年 (1980~1992) 才被描述。这也是为什么相当多文献中所用菌株被普遍鉴定为 *Lb. acidophilus* 的主要原因，实际上，可能其中大部分都不是严格意义的 *Lb. acidophilus*。本组各个种之间的鉴别无法利用经典的鉴定方法进行，采用 DNA-DNA 同源性分析可将它们分为两个亚群（表 1-3），后来 Klein 等 (1998) 采用细胞质内可溶性蛋白指纹法证实了这种分群结果。在 *Lb. acidophilus* 组中，只有 *Lb. gasseri*、*Lb. johnsonii* 和部分 *Lb. acidophilus* 和 *Lb. crispatus* 菌株用作益生菌。

表 1-3 *Lb. acidophilus* 组内不同种的分类描述与 DNA 同源性

种	种的第一次提出	DNA 同源性组	
		Johnson et al., (1980)	Lauer et al., (1980)
<i>Lb. acidophilus sensu stricto</i>	Moro, 1900; Hansen & Moquot, 1970	A1	I a
<i>Lb. crispatus</i>	Brygoo & Aladame, 1953; Cato, 1983	A2	I b
<i>Lb. amylovorus</i>	Nakamura, 1981	A3	I c
<i>Lb. gallinarum</i>	Fujisawa et al., 1992	A4	I d
<i>Lb. gasseri</i>	Lauer & Kandler, 1980	B1	II a
<i>Lb. johnsonii</i>	Fujisawa et al., 1992	B2	II b

(2) *Lb. casei* 组 本组包括修订后的 *Lb. zaeae*、*Lb. casei*、*Lb. paracasei* 和 *Lb. rhamnosus* 四个种。后面三种乳杆菌被广泛用作人或动物的益生菌。在历史上 *Lb. casei* 组仅由 *Lb. casei* 一个种组成，分为 5 个亚种：*Lb. casei* subsp. *casei*、*alactosus*、*pseudoplantarum*、*tolerans* 和 *rhamnosus*。Collins (1989) 对 *Lb. casei* 组进行了重新分类，增加了两个新的种，即 *Lb. rhamnosus* 和 *Lb. paracasei*，而 *Lb. casei* subsp. *casei* 则变成了 *Lb. casei*，后者不再拥有亚种；另一方面，*Lb. paracasei* 拥有 2 个亚种：*paracasei* 亚种包含了曾属于 *Lb. casei* 的 *alactosus* 和 *pseudoplantarum* 两个亚种，而 *tolerans* 亚种则沿用了其在 *Lb. casei* 中的名称。

新设立的 *Lb. rhamnosus* 仅包含原属于 *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* 的菌株，然而对于这一新种的描述只是建立在为数不多的 DNA 同源性试验的数据之上，关于该种中不同菌株的表型性状的描述少得可怜。只有 *Lb. rhamnosus* 很容易被鉴定。在 *Lb. rhamnosus* 的细胞壁中含有鼠李糖，该菌也是少数能发酵鼠李糖的种之一。目前从生物化学的角度，还无法区分 *Lb. casei* 与 *Lb. paracasei*，估计后者的分类地位会在很短的时间内发生新的变动。

之所以详细描述 *Lb. casei* 组分类的历史情况，是为了说明目前关于该组分类的争议。Dicks 在 1991 第一次关于修改 *Lb. casei* 组分类的提议失败后，1996 年正式提出对 *Lb. casei* 组的组成进行修订（见表 1-4）。其中，只有 *Lb. rhamnosus* 的分类情况没有发生改变。根据 Dicks 1996 年的方案，由于 *L. casei* ATCC 334^T 在遗传上（DNA 同源性）与 *L. casei* subsp. *casei*（71%~97%）及 *L. paracasei* 菌株（71%~91%）有非常密切的亲缘关系，而且处于同一蛋白图谱簇，因此，建议将 ATCC 334^T 作为 *L. casei* subsp. *casei* 的新的模式菌株。弃用 *L. paracasei* 这名称，将其所有的菌株都转入 *Lb. casei*；第二，现有的 *Lb. casei* 的模式菌株 ATCC393 应该转入重新启用的 *Lb. zeae*。直到现在，Dicks 等人的建议仍然处于讨论状态（Dellaglio et al., 2002）。

表 1-4 Dicks (1996) 对 *Lb. casei* 组的分类建议

种 名	状态	变动情况	标准（模式）菌株	参考菌株
<i>Lb. zeae</i>	a	重新启用	ATCC 15820 ^T （曾是一种 <i>Lb. rhamnosus</i> 菌株）	纳入 ATCC 393 ^T （曾是 <i>Lb. casei</i> 的参考菌株）
<i>Lb. casei</i>	b	将 <i>L. paracasei</i> 纳入	新标准菌株 ATCC 334	纳入 DSM 5622 ^T （曾是 <i>L. paracasei paracasei</i> 的标准菌株）
<i>L. paracasei</i> subsp.	a	弃用	以 <i>Lb. casei</i> 的标准菌株为准	所有菌株都转入 <i>Lb. casei</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	b	未变	ATCC 7469 ^T	只是将菌株 ATCC 15820 ^T 转入 <i>Lb. zeae</i>

注：a. 已经被国际系统细菌学委员会（ICSB）所批准；

b. 国际系统细菌学委员会仍在讨论中。

由于在目前的分类情况下，*Lb. casei* 仅含有模式菌株和少数其他菌株，这一修订对于生产性菌株的命名会产生重大影响，所有的与 *Lb. casei* 相关的益生菌菌株，即使是那些被称为 *Lb. casei* 的菌株，在分类学上要么属于 Collins (1989) 所描述的 *L. paracasei* 或者是 Dicks (1996) 修订扩大后的 *Lb. casei*。

(3) *Lb. reuteri/fermentum* 组 1962 年，Lerche 和 Reuter 首先分离到一株特定生物型的 *Lb. fermentum* 菌株（biotype II b）。后来，菌株 F275 被指定为 *Lb. fermentum* biotype II b 的参考菌株，该菌株于 1964 年被 Reuter 保存于美国典型培养物保藏中心（ATCC 23272），随后又转存于德国微生物研究所（DSM 20016）。Kandler 于 1980 年首先将该菌株命名为 *Lb. reuteri*，根据 DNA-DNA 同源性分析。是一种新的行异型发酵的乳杆菌。

Lb. reuteri 使人感兴趣之处在于，它是一种可以产生细菌素的益生菌，被应用于动物营养以及酸奶类型的产品与医药制剂。*Lb. reuteri* 与 *Lb. fermentum* 在表型性状上非常接近。很显然，通过生化性状很难区分它们，但如果在条件受控制的情况下，测定其在不同温度的生长特性还是可以对这两个种进行区分。此外，分子生物学性状在鉴别这两个种时，作用更明显，两者肽聚糖的组成有非常显著的差异。

属 *Carnobacterium* 中的种曾属于乳杆菌群 III 中的 *Lb. divergens*、*Lb. carnis* 和 *Lb. piscicola* (Kander & Weiss 1986, Collins et al., 1987)。以后的研究显示这些细菌与乳杆菌的亲缘关系较远，应归入一个新的属（Collins et al., 1987），而且其对葡萄糖的发酵方式以异型发酵为主。一般而言，肉食杆菌能在 pH 比较高的环境中生长（例如 pH 9.5），而乳杆菌则不能。此外，肉食杆菌细胞的脂肪酸组成与乳杆菌存在区别。肉食杆菌的特征之一是主要生存于肉与肉制品，并且能在低温下生长。Montel 等提出了一种简单鉴别

C. divergens 和 *C. piscicola* 与生存于肉食的典型乳杆菌的简单方法，其可行性被 DNA-DNA 杂交所证实。此外，现在已设计出肉食杆菌属特异性的寡核苷酸探针。

(四) 乳酸菌的遗传学分类

目前认为比较 rRNA 序列是确定不同细菌真实遗传亲缘关系最佳的手段。在刚开始的时候，这种序列的比较是通过 DNA-rRNA 杂交或对寡核苷酸片段法（即测定 rRNA 裂解片段的序列）来完成的。随着分子遗传学技术的进展，已经能直接对大的 rRNA 片段进行序列分析。对 rRNA 序列的分析最初采用逆转录酶的方法，现在则可以利用 PCR 技术直接测定 rRNA 的序列。通过计算机处理，可以对获得的大量核酸序列数据进行分析比较，从而绘制能反应整个细菌界（原核生物界）的遗传发育树以及其中部分细菌之间详细的遗传进化树。

无论是从采用寡核苷酸片段比较法还是 rRNA 测序法获得的数据来看，所有的革兰氏阳性菌之间具有强烈的发育亲缘关系。在真细菌的 11 个主要的门中，所有的革兰氏阳性菌集中于其中的一个门（然而，在该门中并非所有细菌的细胞壁都是革兰氏阳性类型，Woese, 1987）。革兰氏阳性菌可以进一步分成两个群或簇，通常将它们称为高 G+C 亚门和低 G+C 亚门（G+C 是指 DNA 中的 G+C mol%）。其“分界点”通常定在 50%，但有时也将其定在 53%~55% 的范围区间，因为如果按后一数值进行比较的话，有些种（例如，*Lb. fermentum* 和 *Lb. pontis*）则显然属于低 G+C 亚门。高 G+C 亚门或放线菌亚门包括 *Bifidobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* 和 *Streptomyces* 等属；低 G+C 亚门或梭状芽孢杆菌亚门则包括 *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, 和厌氧的 *Clostridium*, *Peptococcus* 和 *Ruminococcus* 等属（Woese, 1987, Stackebrandt & Teuber, 1988）。Collins 采用逆转录酶或 PCR 测序技术对乳酸菌各属之间的遗传发育关系或与其他低 G+C 亚门其他属之间的遗传亲缘关系进行了深入研究。Kander 等认为，乳酸菌自身构成了一个“超级簇”，其遗传亲缘关系处于严格厌氧的细菌（如梭状芽孢杆菌）和兼性或严格好氧（如葡萄球菌和芽孢杆菌）之间，与其生活方式保持一致，即“处在好氧和厌氧生活的门槛上”（Kander, 1984; Kander & Weiss, 1986），但这一点并不完全正确。图 1-2 所绘的乳酸菌遗传发育树示意图以及下面对属的描述来自 Collins 及其同事的研究（Collins et al., 1991, 1993）。

在图中包含了部分低 G+C mol% 的革兰氏阳性菌，线段的长短仅表示不同属（簇）之间的进化距离的近似值。

正如前文所述，乳酸菌中大多数属的定义至今还不是非常确切，有些则是在遗传测定的基础上定义的，例如 *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc sensu stricto*, *Oenococcus*, *Streptococcus sensu stricto*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* 和 *Weissella* 等就是最好的证明，这些属自身构成了一个相对独立的遗传发育单位。在乳酸菌中，也存在不同的属成簇的现象。例如 *Carnobacterium*, *Enterococcus* 和 *Vagococcus* 就形成了一个紧密的遗传簇，它们之间的亲缘关系比与其他任何乳酸菌都近。最近新设立的 *Lactosphaera* 也属于该遗传簇（Janssen, 1995），而 *Aerococcus* 和 *Tetragenococcus* 则可以作为该遗传簇的边缘成员。此外，与其他的乳酸菌相比，本簇内各个属的乳酸菌从遗传发育的角度而言，更接近于低 G+C 亚门中的好气和兼性厌氧细菌。与跟其他乳酸菌的亲缘关系相比，*Lactococcus* 和 *Streptococcus* 之间的亲缘关系更近，尽管其程度不及肠球菌组内各属之间的亲密关系。“明串珠菌样”乳酸菌，即 *Weissella* 和 *Leuconostoc sensu stricto* 相互之间的亲缘关系较密切，而

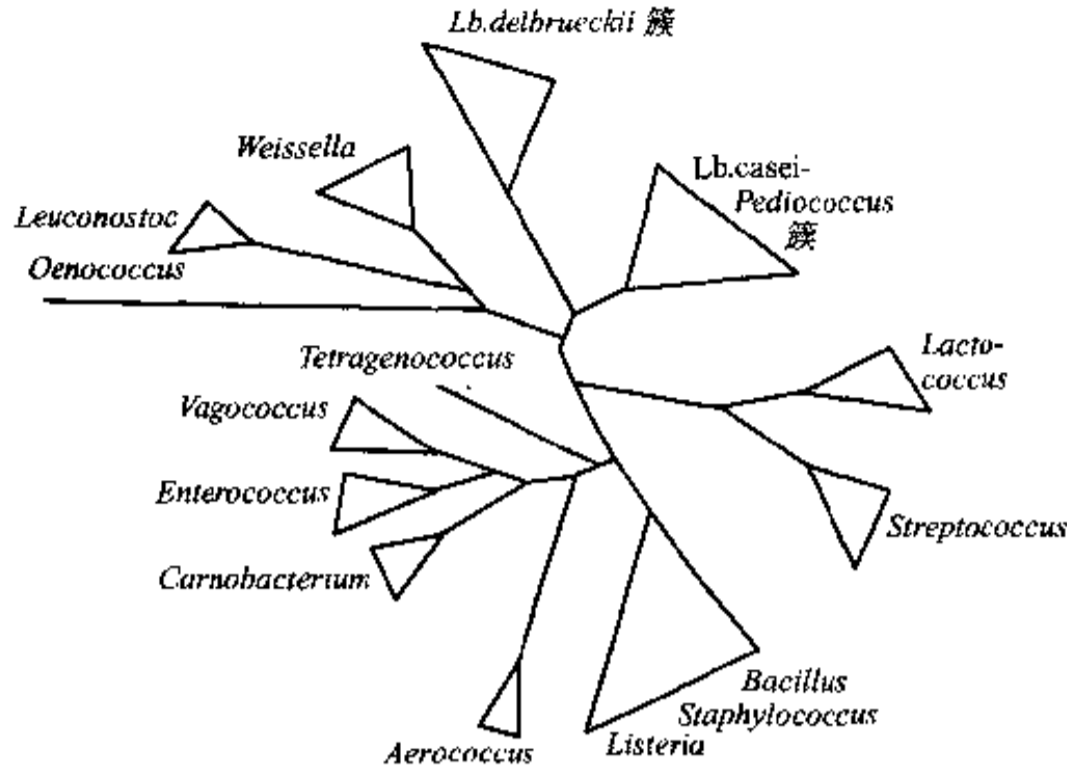


图 1-2 乳酸菌的遗传发育示意图

Oenococcus 也属于这一分支，尽管其与这两个属之间的进化发育距离较大。*Oenococcus* 能否作为一种能快速进化生物的代表曾引起广泛的讨论，无论是从遗传还是生理学性状的角度而言，*Oenococcus* 的近亲是“明串珠菌样”乳酸菌。因此，可以这么认为，为了适应非同一般的生境（葡萄酒），*Oenococcus* 的基因组发生了巨大的改变，从而导致了与其近亲的快速分化（见图 1-1）。

其余的乳酸菌属，即 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus* 构成了乳酸菌中的一个超级簇，后者可分成两个“亚簇”，每个“亚簇”大致相当于属的水平。这些簇与乳杆菌属根据生理学性状所分成的亚群之间没有关系（见表 1-2）。这两个簇是 1) *Lb. delbrueckii* 簇，包含多种（但不是所有的）专一同型发酵（群 I）的乳杆菌（如 *Lb. delbrueckii* 的各个亚种、*Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum* 和 *Lb. jensenii*）和部分兼性异型发酵（群 II）乳杆菌；2) *Lb. casei-Pediococcus* 簇，包含所有其他的乳杆菌，例如其余的专一同型发酵乳杆菌、所有的专性异型发酵和绝大部分兼性异型发酵乳杆菌（要注意的是，部分曾经被看成是异型发酵的乳杆菌现在属于 *Weissella*）。此外，从簇的名称就可以知道，该簇还包括所有的片球菌。除 *P. dextrinicus* 外，所有的片球菌在 *Lb. casei-Pediococcus* 簇内形成一个独立的、关系紧密的亚簇。

从乳酸菌遗传发育的研究中得到结论之一是：在研究不同属之间的亲缘关系远近时，形态学特征是一种作用非常差的指标，这一点从 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus* 的遗传发育树结构以及 *Weissella* 属内的细菌具有不同形态可以很清楚地证明；结论之二是：尽管在过去 20 年里根据遗传学分析、蛋白指纹图谱等方法对乳酸菌的亲缘关系以及各个属的描述做了很多的工作，仍需要对目前的乳酸菌分类系统进行修订。存在的主要问题是如何处理 *Lactobacillus* 和 *Pediococcus* 这两个属，正如 Woese (1987) 所提出的那样，最好能在菌株或种的遗传发育位置与其表型性状之间建立某种联系，其本质是如何才能找到那些能反映其真实亲缘关系的有关性状特征。在 1983 年时，曾建议将 *Pediococcus* 纳入“扩展的”*Lactobacillus*。从遗传发育的角度而言，无疑是正确的，但这种“扩展的”*Lactobacillus* 属能否得到公认就不得而知了。另一种解决方法是，将更小级别的遗传簇设立成新的属。如此一来，许多典型的乳杆菌如 *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* 和 *Lb. fermentum* 将被归入不同的属，这一点

恐怕同样难以得到认同。

乳酸菌作为一个群与低 G+C 亚门中其他的革兰氏阳性菌群并不是绝对分开的，尤其是部分乳酸菌存在与一些更好氧的属如 *Bacillus* 和 *Staphylococcus* 亲缘关系“重叠”的现象。对乳酸菌与严格厌氧菌的 rRNA 序列还没有进行过系统的比较，不过，从一些采用 rRNA 测序方法和更早的寡核苷酸片段比较法获得的部分结果来看，这两类细菌之间的进化距离还是相当大的。然而，目前还不清楚肠球菌属是与严格厌氧菌的亲缘关系远还是与 *Lb. casei*-*Pediococcus* 簇乳酸菌的亲缘关系远。因此，有关乳酸菌的遗传发育位置“根据其生活方式”处于严格厌氧菌与好氧菌之间的陈述是不正确的。从遗传发育的角度而言，乳酸菌是低 G+C 亚门中革兰氏阳性菌中好氧菌和兼性厌氧属发育位置的相互掺合体。

(五) 用于乳酸菌分类、鉴定的新技术与方法

前面提到的乳酸菌的分类主要建立在表型性状和生化特征的基础上。在实际操作时，尤其是对各种分离物的日常鉴定工作中，通过这些性状特征不足以很明确地将菌株鉴定到特定的种。实际上，在部分场合 DNA-DNA 同源性分析是解决鉴定过程所遇到难题惟一的方法。

在鉴定菌种时比 DNA 杂交法更有吸引力的方法是使用针对细胞内核酸靶序列的特异性 DNA 探针，该方法的主要优点是这种特异性 DNA 探针一旦设计出以后，在鉴定时就可以省略耗时而费事的 DNA 制备过程。不过，一种特异性 DNA 探针只能用于检测相对应的那种微生物。在采用 DNA 探针法时，需要先采用其他的鉴定方法尽量减少被鉴定菌株可能属于的种的范围。DNA 探针法在检测样本中某种特定微生物是否存在、存在的数量有多少等问题时，更容易发挥其快速而准确的优点。菌株特异性的 DNA 探针对于研究乳酸菌发酵剂菌种在未杀菌的食品或饲料中的作用有非常重要的作用。

在设计 DNA 探针时，要解决的基本问题之一是找到某种（有时甚至是特定的菌株）细菌所特有的 DNA（或 RNA）片段。解决这一问题的方法有两种。第一种是经验式的随机配对法（Trial-and-error），从某一特定种的 DNA 文库中，随机挑出各种 DNA 片段作为探针，测定其与该种 DNA 反应的特异性。利用这一方法曾设计出针对 *Lb. curvatus* (Petrick et al., 1988), *Lb. delbrueckii* (Delley et al., 1990) 和 *Lb. helveticus* (Pilloud & Mollet, 1990) 的 DNA 探针；第二种方法是根据已知的核酸序列结构设计出各种寡聚核苷酸探针，在测定其反应特异性以后，然后对具有特异性反应的寡聚核苷酸序列进行合成，由此得到针对该种（或菌株）的特异性 DNA 探针。所选择的当然是 rRNA。由于 rRNA 分子、特别是 16S 和 23S rRNA 是由各种保守性或高或低的序列所组成，因此，根据所选择的遗传簇的水平变化，可以设计出适合于从界-特异性到种-特异性的各种寡核苷酸探针。此外，采用 rRNA 还有一个很重要的优点，即它们在细胞中的拷贝数较多（可多达 10^4 拷贝）。因此，采用以 rRNA 为靶子的寡核苷酸探针法的灵敏度比以 DNA（染色体或质粒）为作用对象的探针高得多。

以 16S 或 23S rRNA 为作用靶位的寡核苷酸探针，已被用于对从不同生境来源的乳球菌、肠球菌和乳杆菌以及肉制品来源的肉食杆菌进行鉴定，而且该方法能成功地将漫游球菌与其他乳酸菌或 *S. thermophilus* 分开，甚至能成功地对 *Lc. lactis* 的两个亚种 *lactis* 和 *cremoris* 进行区分。在过去几年内，已经积累了大量关于乳酸菌 16S rRNA 序列结构的资料，设计出来的寡核苷酸探针种类越来越多。在实际应用时（如食品样品分析），有时感兴趣的只是需要知道某些特定类群的乳酸菌是否存在，属-特异性或群-特异性的寡核苷酸探针就是出于这种目的。

每个细菌 rRNA 基因通常在染色体上有 5 至 7 个拷贝, 这一特点被名为多型性限制性片段长度 (RFLP) 的分子分型方法所利用, 后者更为人所知的名称是核糖体分型 (ribotyping)。当细胞中的染色体 DNA 被限制性酶水解后, 经过琼脂糖凝胶电泳分离、印迹到各种膜上, 然后与 rRNA-特异性的探针进行杂交, 就能看到杂交带的不同排列方式。根据杂交带排列方式的复杂程度, 可以采用手工或计算机分析。与 rRNA 的真实序列一样 (与其他大多数基因相比, 具有更高的保守性), rRNA 基因在染色体上的排列方式在亲缘关系比较近的种之间有一定的保守性, 其排列方式 (及可能出现的变化) 可以从杂交带的排列方式或“指纹”反映。这种方法似乎对于部分种甚至亚种的鉴别例如乳球菌 (Rodrigues et al., 1991) 或 *Lb. plantarum* (Johansson et al., 1995) 的鉴定非常有效, 而对于其他的种如 *Lb. reuteri* (Stahl et al., 1994) 则无效。非常有趣的是, 尽管各种 *Lb. reuteri* 菌株之间的表型性状高度一致, 但其核糖体分型的结果却不一致; 而 *Lb. plantarum* 虽然表型不一致, 但其核糖体分型的同一性更高。因此, 在采用 RFLP 对种或菌株进行鉴定时, 要根据具体的情况。

PCR 技术在菌种分类中的作用越来越大。采用该技术, 可以从某一个属或种的少量细胞获得充足的 DNA, 以完成随后的 DNA 测序。DNA 扩增的靶位之一显然是 rRNA 基因, 这种方法可以替代分析细菌遗传发育关系过程中, 测定 rRNA 序列时所采用的逆转录酶技术。伴随自动测序仪的出现以及 PCR 直接测序方法的简便化, 可以在很短的时间内非常方便地完成对任何一种细菌 16S rRNA 序列 (至少是其部分序列) 的测定工作。PCR 技术还可以与寡核苷酸探针的方法合用, 与寡核苷酸探针法直接测定相比, 其检测的灵敏度要高的多。PCR 技术另一个应用领域是通过多形态 DNA 随机扩增 (RAPD) 的方法获得特定菌株 (或种) 的杂交带排列方式或指纹图谱。使随机序列的寡核苷酸引物 (8 至 10 个碱基) 与某一菌株的总 DNA 结合, 通过 PCR 技术, 一系列不同大小的 DNA 片段被扩增出来, 随后进行凝胶分离。所获得 DNA 片段的组合方式可以通过计算机处理, 与核糖体分析技术一样, RAPD 可以用来鉴别属于 *Lb. acidophilus* 群 (见“乳杆菌分群”一节) 的菌株, 该组中的 6 个种具有相似的表型特征。根据对多株 *Lb. plantarum* 的研究, RAPD 比核糖体分型 (RT) 的方法更适合于对该种进行分型。该方法相对简便, 但需要采用高度标准化的实验条件才能获得重现性较好的结果。将被鉴定菌株的细胞破碎获得总的 DNA 粗液是该方法中的关键步骤之一 (Johansson et al., 1995c)。

限制性核酸内切酶分析 (REA) 也可用于对乳酸菌进行分类。染色体 DNA 首先被一套限制性核酸内切酶切断, 获得的 DNA 片段经过琼脂糖凝胶电泳后, 观察其电泳带的排列方式。然后, 可以对不同菌株的 DNA 限制性核酸内切酶电泳带的排列方式进行多种比较。这种方法也需要采用高度标准化的实验条件, 但是具有很高的分辨率, 可以作为亚种、种和属水平的分类工具 (Johansson et al., 1995b)。

在乳酸菌分类中另一种非常有用的方法是细胞可溶性蛋白组成方式 (CSPP)。首先将全细胞蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将所获得的蛋白电泳带组成方式进行统计分析。该方法的原理并不新鲜, 但直到最近才系统地用于分析乳酸菌。采用该方法, 已经构建了针对多种乳酸菌的数字化和正常的蛋白电泳带组成方式的数据库 (Pot et al., 1994), 由蛋白组成方式相似性构建的分类簇与采用遗传学数据, 如 rRNA 序列、DNA-DNA 同源性分析构建的分类簇具有非常清晰的相关性。将某种菌株的可溶性蛋白组成方式与乳酸菌蛋白组成数据库进行比较, 可以作为将某种菌株归入特定种的直接筛选方法。与其他涉及对组成方式进行数

学统计的方法一样，在细胞可溶性蛋白组成方式分析中，采用标准化的实验条件是结果重现性较好的关键因素。与其他分析 DNA 组成方式的方法相反的是，对细菌生长条件的控制要极其严格，因为细胞中蛋白的组成会受到培养基、温度等因素的影响。因此，有时从不同实验室获得的结果很难进行比较。然而由于此方法具有简单、不需要先进仪器等特点，相当多的实验室都愿意以少数参考菌株为基础，建立自己关于乳酸菌细胞可溶性蛋白组成方式的数据库。

三、双歧杆菌的分类

双歧杆菌是一类球杆形、不运动和不形成芽孢的革兰氏阳性菌，除少数种以外，行严格的厌氧生活。细胞外形不规则，通常在细胞表面产生突起，在极端情况下细胞表面会形成一到数个驼峰状突出。但是，卵圆形和很长或短的杆状菌体也比较常见。进行革兰氏染色时，在分叉或驼峰处出现染料不均匀分布。采用不同成分的培养基培养时，可观察到 V、Y 或 X 性状的细胞。

采用经典的表型性状分类的方法很难区分双歧杆菌与其他厌氧的革兰氏阳性菌。因此，其分类地位在不断发生变化。在 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Scardovi, 1986)，根据其细胞内 G+C mol% 组成，被归入放线菌中的高 G+C 簇。除 *Bifidobacterium inopinatum* (G+C mol% 45) 外，其他双歧杆菌的 G+C mol% 在 55~67。随着新的分类和鉴定方法的应用，尤其是分子分类技术如 DNA-DNA 杂交、全细胞蛋白组成、特定蛋白 [如糖代谢双歧途径的关键酶 6-磷酸果糖-磷酸酮糖酶 (F6PPK)] 的电泳行为、16S rRNA 和 23S rRNA 序列分析、以及特定蛋白如热应急蛋白 (SHP) 基因序列的比较，双歧杆菌的发育关系趋于明朗。到目前为止，已鉴别和发表的双歧杆菌共有 34 种 (13 种来源于人、15 种来源于其他温血动物、3 种来源于蜜蜂、2 种来源于废水、1 种从乳品中分离)，其中来源于人的双歧杆菌有：*Bifidobacterium adolescentis*、*B. infantis*、*B. longum*、*B. bifidum*、*B. breve*、*B. catenulatum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. angulatum*、*B. gallicum*、*B. scardovii*、*B. inopinatum*、*B. dentium*、*B. denticolens*，至少是后 3 种主要存在于口腔中。

从双歧杆菌 DNA G+C mol% 的分布跨度而言，不同种之间的差异远远超过同一属内不同种之间的正常差异，是由一群亲缘关系比较远的种组成。Jian (2001) 等通过对双歧杆菌中一种分子量为 60kD 的热应急蛋白 (Hsp) 基因的部分序列进行比较后发现，同一种内不同菌株之间 Hsp60 基因的相似值为 99.4%~100%，亚种之间为 96%，不同种之间为 73%~96% (平均值为 85%)。但对于两组亲缘关系非常近的双歧杆菌，即 *B. animalis* 和 *B. lactis*，*B. infantis*、*B. longum* 和 *B. suis* (16S rRNA 的序列相似值 >99%)，其 Hsp60 基因的相似性为 98%。尽管采用 Hsp60 基因相似性绘制的双歧杆菌发育树的拓扑结构与采用 16S rRNA 相似性得到的结果基本相同，但前者对种的划分似乎更清晰。与 16S rRNA 相似性获得的结果相比，根据 Hsp60 基因相似性所得到遗传簇与细胞 DNA G+C mol% 分析的结果更相符。在根据 Hsp60 基因相似性所绘制的发育树中，所有细胞 DNA 高 G+C mol% (56~67) 的种构成一个簇；而 DNA 低 G+C mol% 的 *B. inopinatum* (G+C 45%) 则与双歧杆菌相近的 *Gardnerella vaginalis* 构成一个独立的簇；而由 *B. denticolens* (G+C 55%) 所构成的簇则位于这两者之间。由于 *B. inopinatum* 和 *B. denticolens* 与其他双歧杆菌之间的亲缘关系非常远，建议将其从 *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924 中移出，作为新的属归入到 *Bifidobacteriaceae* Stackebrandt et al., 1997 中 (双歧杆菌科)。此外，DNA-

DNA 杂交结果表明, *B. lactis* 和 *B. animalis* 标准菌株之间的亲缘性达到 85.5%~92.3%, 属于同种异名 (Cai et al., 2000.), 前者可能是后者适应乳环境的生理变种。

与经典的表型性状分类方法相比, 部分已发表的双歧杆菌在采用分子遗传分类方法重新测定后, 其分类地位出现了比较大的变动。Sakata 等 (2002) 采用糖发酵方式、DNA-DNA 杂交、核糖体分型 (RP) 以及多形性 DNA 随机扩增聚合酶链反应 (RAPD-PCR) 等方法对 *B. infantis*、*B. longum* 和 *B. suis* 的亲缘关系分析后发现, 被测试的 3 种双歧杆菌菌株之间的 DNA 同源性在苛严条件下 (52℃) 为 63%~85%, 而在合适条件下 (42℃) 则为 67%~81%。尽管其糖发酵方式有所差异, 根据 DNA-DNA 杂交、核糖体分型 (RP) 和 RAPD-PCR 分析的结果, *B. infantis* 和 *B. suis* 可以合并到 *B. longum* 中。合并后的 *B. longum* 分为三个生物型, 即 *longum*、*infantis* 和 *suis* 型; 此外, *B. globosum* 也被认为是 *B. pseudolongum* 的同种异名, 两者合并后, 分别作为 *B. pseudolongum* 的两个亚种, 即: *B. pseudolongum* subsp. *globosum* 和 *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*。

目前作为益生菌应用最重要的两种双歧杆菌是 *B. longum* 和 *B. animalis* (*B. lactis*), 尽管在实际应用时可能通过特殊的生化反应如松三糖 (melezitose) 发酵来鉴别常用的几种双歧杆菌, 但有时效果并不理想, 采用种特异性的 16S 和 23S rRNA 探针获得的结果更可靠。

第二节 乳酸菌的代谢

乳酸菌代谢的基本特征是与碳水化合物发酵过程偶联的底物水平磷酸化, 产生的 ATP 随后被用于进行生物合成。乳酸菌是一群对各种碳水化合物及相关物质具有强烈分解能力的微生物。一般而言, 其主要代谢终产物是乳酸 (占碳水化合物中 50% 以上的碳)。然而, 非常清楚的是, 由于乳酸菌生存于不同的环境, 其代谢方式也会发生相应的改变。由此一来, 其代谢终产物的组成会产生明显的变化。

一、糖的利用

(一) 己糖发酵

正如前面提到的一样, 乳酸菌对己糖 (例如葡萄糖) 发酵方式有两种。如图 1-3 所示。在发酵过程中可能出现的葡萄糖转移和磷酸化即游离糖的运输和依赖于 ATP 的葡萄糖激酶的磷酸化作用图中也标示出来。部分种利用磷酸烯醇式丙酮酸: 己糖磷酸转移酶系统 (PTS) 以磷酸烯醇式丙酮酸作为磷酸基团的供体, 对己糖进行磷酸化。无论是哪种情况, 都需要高能磷酸键对糖进行激活。

除明串珠菌、群 III 的乳杆菌、葡萄酒球菌和 *Weissella* 菌以外, 其余的乳酸菌都通过糖裂解途径 (Embden-Meyerhof 途径) 发酵葡萄糖, 其特征是形成 1,6-二磷酸果糖 (FDP), 后者在 FDP 醛缩酶的作用下分裂成磷酸二羟基丙酮 (DHAP) 和 3-磷酸甘油醛 (GAP)。GAP (DHAP 可以转化成 GAP) 在经过两次底物水平磷酸化的代谢步骤后转变成丙酮酸。在正常情况下, 例如糖的浓度很充分以及生存环境没有氧的存在, 丙酮酸通常是由依赖于 NAD^+ 的乳酸脱氢酶还原成乳酸, 从而使早期步骤中发生还原的 NADH 被重新氧化。由于氧化-还原过程是平衡的, 而且乳酸是惟一的代谢终产物, 因此这种代谢途径被称为同型发酵。

其他主要的发酵途径有很多不同的名称, 如戊糖磷酸途径、戊糖磷酸酮糖酶途径、己糖单磷酸旁路或者 Kandler 和 *Weissella* (1986) 在伯杰氏手册中提到的 6-磷酸葡萄糖酸途径。在本书中, 我们更倾向于采用 6-磷酸葡萄糖酸/磷酸酮糖酶途径 (6-PG/PK) 这一称谓, 因为

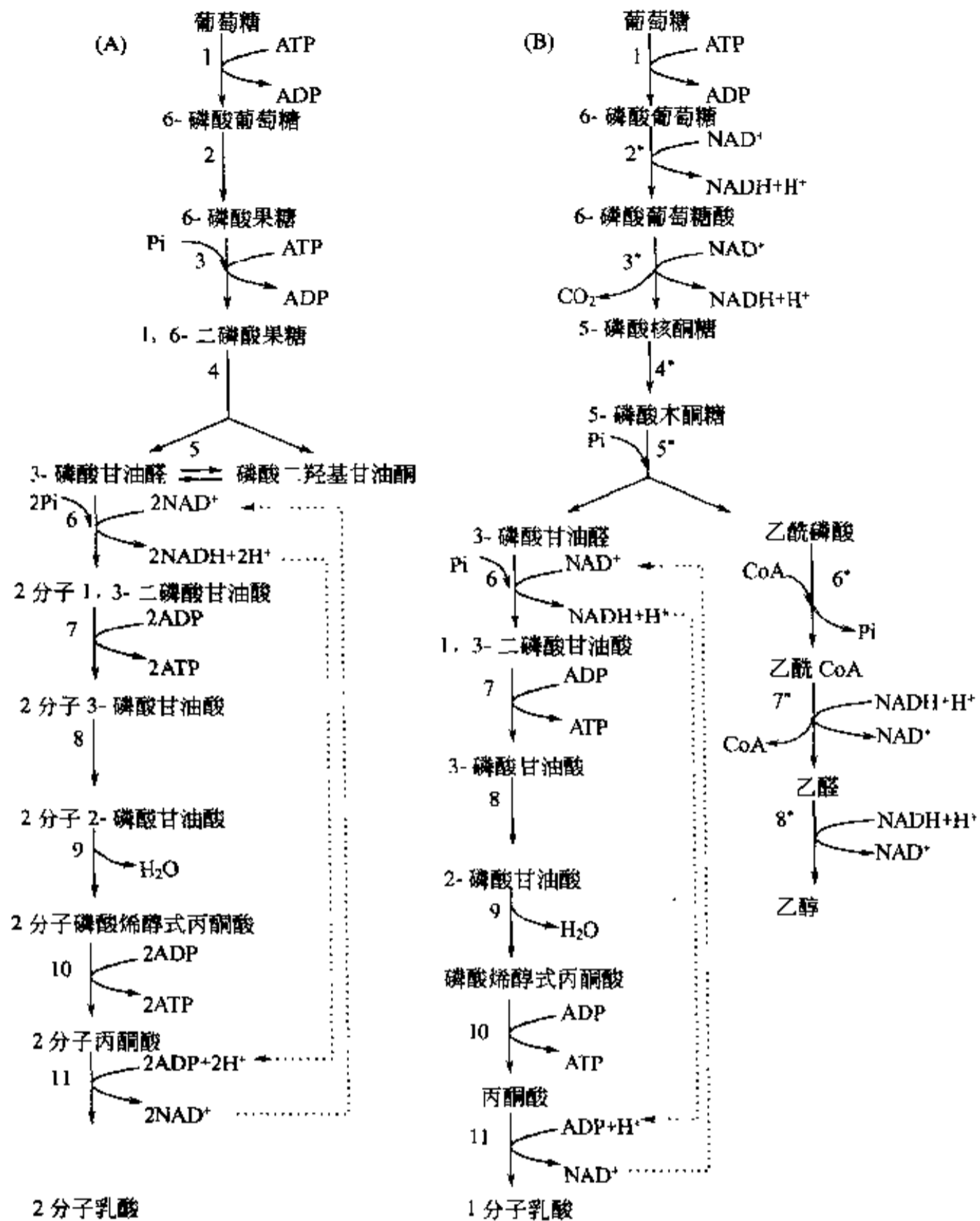


图 1-3 葡萄糖的主要发酵途径

(A) 同型乳酸发酵 (糖裂解途径或 Embden-Meyerhof 途径);

(B) 异型发酵途径 (6-磷酸葡萄糖酸/或磷酸酮糖途径)

- 1—葡萄糖激酶; 2—磷酸葡萄糖异构酶; 3—磷酸果糖激酶 (PFK); 4—醛缩酶 (FDA);
 5—磷酸丙糖异构酶; 6—3-磷酸甘油醛脱氢酶; 7—磷酸甘油酸激酶; 8—磷酸甘油酸变位酶;
 9—烯醇化酶; 10—丙酮酸激酶; 11—乳酸脱氢酶; 2*—6-磷酸-葡萄糖脱氢酶;
 3*—6-磷酸-葡萄糖酸脱氢酶; 4*—5-磷酸-核酮糖表异构酶; 5*—磷酸酮糖裂解酶;
 6*—乙酰磷酸转移酶; 7*—乙醛脱氢酶; 8*—乙醇脱氢酶

它指出了糖代谢的关键步骤 (磷酸酮糖酶裂解), 同时可以与双歧杆菌的糖代谢方式区分, 后者也涉及磷酸酮糖酶, 但不以 6-磷酸葡萄糖酸为中间产物 (见图 1-4)。6-PG/PK 的特征是在代谢过程的早期步骤中通过脱氢形成 6-磷酸葡萄糖酸, 随后进行脱羧反应。所产生的 5-磷酸戊糖在磷酸酮糖酶的作用下裂解为 GAP 和乙酰磷酸。GAP 与糖裂解途径中的代谢过程一样, 最终转化成乳酸; 在不存在额外的电子受体的情况下, 乙酰磷酸通过乙酰 CoA 和乙醛

两个中间体最终转化为乙醇。在此代谢方式中，最终产物除乳酸外，还有大量的乙醇和CO₂，所以被称为异型乳酸发酵。

这些发酵途径的名称以及以它们作为代谢方式的细菌的名称经常引起混淆，因此，有必要再强调一下。“同型发酵乳酸菌”是指那些以糖裂解途径进行葡萄糖发酵的乳酸菌；而“异型发酵乳酸菌”采用6-PG/PK途径的乳酸菌。然而，要注意的是，在某些情况下糖裂解途径可能会导致异型发酵产物的出现（除乳酸外，还有一定量的其他产物）；而且部分被认为是“同型发酵乳酸菌”的乳酸菌在对部分底物发酵时，也会采取6-PG/PK途径。

从理论上讲，在同型乳酸发酵中，每消耗1mol葡萄糖可产生2mol乳酸和净获得2mol ATP；通过6-PG/PK途径的异型乳酸发酵中，消耗1mol葡萄糖可产生1mol的乳酸、乙醇、CO₂和ATP。进行实际测定时，这些理论值很少能达到。尽管在培养基中添加足量的乳酸可能需要的生长因子（如氨基酸、核苷酸和维生素等），碳从葡萄糖转化终产物中的系数通常只有0.9，表明有部分碳被用于细胞生物物质的合成。这种复杂培养基同时有利于其他发酵过程的平衡，尤其是乙酸的产生，因为有机酸、氨基酸和糖残基可改变发酵方式。氧气的存在对代谢方式也有非常大的影响。

除葡萄糖以外，其他己糖如甘露糖、半乳糖和果糖，也可以被多种乳酸菌所利用。这些己糖经过异构化和磷酸化转变成6-磷酸葡萄糖或6-磷酸果糖进入主要的代谢途径。在乳酸菌糖代谢中一个非常重要的例外是*Lc. lactis*, *E. faecalis*和*Lb. casei*等对半乳糖的利用，半乳糖通过PTS途径形成6-磷酸半乳糖被吸收到细胞内，然后通过6-磷酸塔格糖（Tagatose-6-P）途径被分解，如图1-5（A）所示。塔格糖是果糖的一种异构体，但对塔格糖衍生物的代谢需要另外的酶。6-磷酸塔格糖（Tagatose-6-P）途径在GAP处与糖裂解途径重合，而这些乳酸菌中另外的一些菌株还可以通过细胞膜上的透过酶将半乳糖运输到细胞内，经过Leloir途径转化成6-磷酸葡萄糖加以分解。这种方式还可以被那些通过透过酶将半乳糖运输到细胞内、但体内缺乏半乳糖PTS酶体系、能发酵半乳糖的乳酸菌加以利用。

（二）双糖发酵

根据运输方式的不同，双糖可以游离糖或磷酸化糖的形式进入细胞内。以游离糖进入细胞后，在特异性水解酶的作用下分解成单糖，然后进入上述主要的代谢途径；在后一种情况下，糖的磷酸化需要特异性的糖PTS系统的参与，然后在特定的磷酸水解酶的作用下分解成一个游离单糖和一个磷酸化的单糖。

研究最系统的双糖代谢是乳酸菌对乳糖的代谢。绝大多数*Lc. lactis*，至少是那些作为乳品发酵剂的*Lc. lactis*细胞内存在乳糖PTS系统。*Lb. casei*的乳糖PTS系统也被深入的研

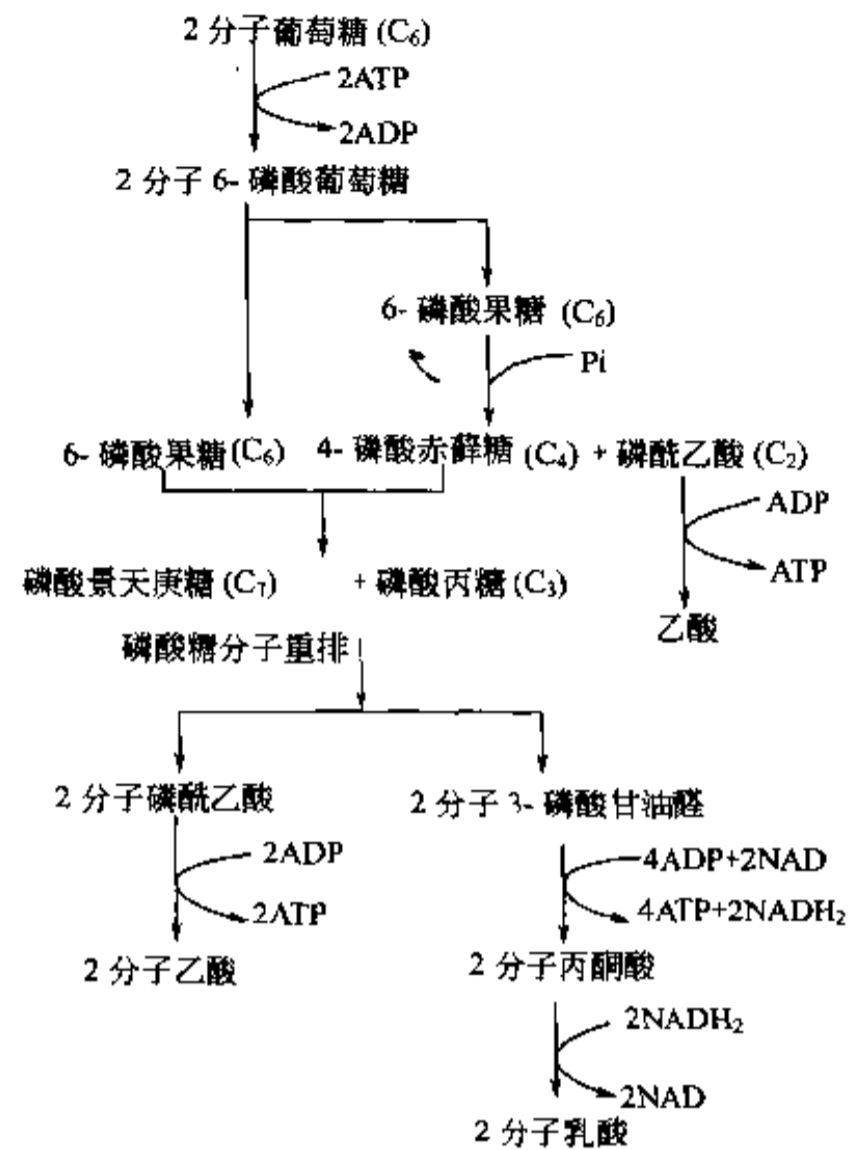


图 1-4 双歧杆菌发酵葡萄糖的代谢方式

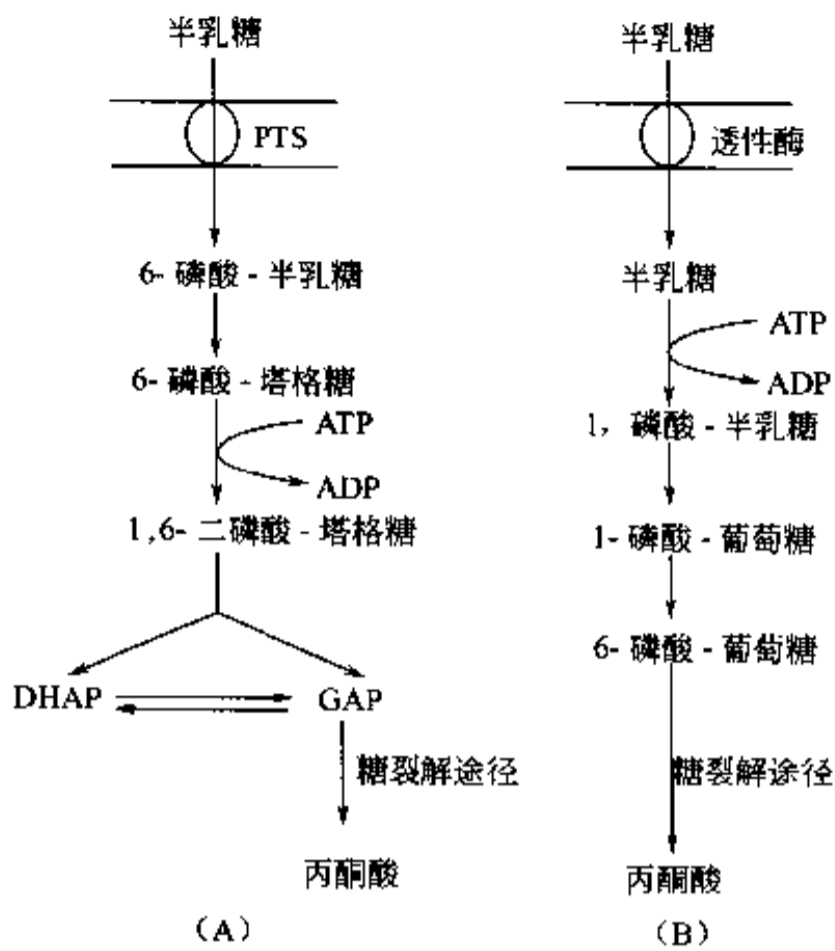


图 1-5 乳酸菌的半乳糖代谢方式
(A) 6-磷酸-塔格糖途径；(B) Leloir 途径

究过。在这些菌株中，乳糖以磷酸乳糖的形式进入细胞质，然后被磷酸-β-D-半乳糖苷酶 (P-β-gal) 分裂成葡萄糖和 6-磷酸半乳糖。葡萄糖被葡萄糖激酶磷酸化为 6-磷酸葡萄糖后通过糖裂解途径分解，而 6-磷酸半乳糖则通过 6-磷酸塔格糖 (Tagatose-6-P) 途径分解。乳糖 PTS 系统和 β-D-gal 通常具有可诱导性，其活性能被葡萄糖所抑制。

Lc. lactis 和 *Lb. casei* 对乳糖代谢是目前乳酸菌中研究最为清楚的双糖代谢作用，关于这方面的认识来自于其他微生物对糖的代谢作用，尤其是乳的发酵过程。然而，在乳酸菌中乳糖另一种常见的代谢方式是通过乳糖运载酶 (透性酶) 的作用进入细胞，随后被 β-D-半乳糖苷酶 (β-gal) 分解成葡萄糖和半乳糖，然后进入主要的代谢途径。部分研究结果表明，许多乳酸菌在代谢乳糖时，乳糖 PTS 系统和乳糖透性酶同时存在，因为从

这些菌株的细胞内能同时检测到 P-β-gal 和 β-gal 的活性。然而，在具有高 β-gal 活性的菌株中所观察到的 P-β-gal 活性较低的现象可能是一种假象，因为用来测定 P-β-gal 活性的人工底物 (磷酸化邻硝基苯基半乳糖) 可能被 β-gal 或一种磷酸水解酶所分解，所形成的产物可作为 β-gal 的作用底物 (Hickey et al., 1986; Fox et al., 1990)。

在部分“嗜热性”乳酸菌如 *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus* 中，运输到细胞内的乳糖被 β-gal 分解成葡萄糖和半乳糖以后，只利用其中的葡萄糖，而半乳糖则被分泌到基质中。在 *S. thermophilus* 中，产生这种情况是由于其半乳糖激酶活力较低的缘故，而后者正是其乳糖运载蛋白系统的一个显著特征。

对麦芽糖的发酵作用主要在乳球菌中研究的比较系统，其麦芽糖透性酶系统似乎是可操纵的。*Lc. lactis* 65.1 在代谢麦芽糖时一个非常有趣的特征是麦芽糖被麦芽糖磷酸水解酶分解成葡萄糖和 1-磷酸-β-葡萄糖以后，只通过糖裂解途径利用葡萄糖，而 1-磷酸-β-葡萄糖则可能作为细胞壁合成的前提 (Sjöberg et al., 1989)。

由蔗糖透性酶系统所介导的蔗糖发酵第一步是蔗糖在水解酶的作用下分解成葡萄糖和果糖，然后进入主要的代谢途径。在部分乳球菌中，蔗糖是通过蔗糖 PTS 系统运输到细胞内，然后由一种特异性的 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-磷酸蔗糖水解酶可被生长基质中的蔗糖所诱导。在部分乳酸菌中，蔗糖还可以作为合成胞外多糖时所需单糖的供体。在 *Ln. mesenteroides* 合成右旋糖苷时，蔗糖被与细胞壁相连的一种酶，即右旋糖苷蔗糖酶分解成葡萄糖和果糖。其中葡萄糖部分被用于右旋糖苷的合成，而果糖则以通常的方式被发酵。

乳酸菌对其他双糖，如胞二糖、蜜二糖和岩藻糖 (trehalose) 的发酵作用还没有仔细地研究。各种乳酸菌对这类双糖的发酵能力存在一定的差异。一般认为，这些双糖在特定的运

输系统和水解酶的作用下，分解成相应的单糖，随后进入主要的代谢途径。

(三) 对戊糖的发酵作用

各种戊糖可以很容易被多种乳酸菌利用。一般来说，这些戊糖在特异性透性酶的作用下进入细胞内，然后被磷酸化，在表异构酶的作用下转化为 5-磷酸核酮糖或 5-磷酸木酮糖，后者可以通过 6-PG/PK 途径被利用。这似乎意味着只有行异型发酵的乳酸菌才可以利用戊糖，其实不然，除群 I 的乳杆菌外，其他所有的乳酸菌都可以利用各种戊糖。同型发酵和异型发酵的乳酸菌利用戊糖的方式是一样的，在这些种中，磷酸酮糖酶通常可以被相应的戊糖所诱导。与葡萄糖相比，戊糖异型发酵的终产物有所不同，没有 CO₂ 产生。同时，由于不存在产生 5-磷酸木酮糖的脱氢步骤，因此将乙酰磷酸还原成乙醇的过程就变成多余的步骤。取而代之的是乙酰磷酸在醋酸激酶的作用下，通过底物水平的磷酸化产生乙酸和 ATP。因此，戊糖发酵的终产物是等摩尔的乳酸与乙酸。

尽管不属于戊糖，这里有必要提及部分乳酸菌对葡糖酸的发酵作用。与戊糖一样，即使是那些被认为是同型发酵的乳酸菌对葡糖酸的发酵也是通过 6-PG/PK 途径进行的，其终产物的组成与异型发酵相同。这种发酵作用在 *E. faecalis* 和 *Lb. casei* 中都存在。在 *E. faecalis* 中，葡糖酸在可诱导性葡糖酸 PTS 系统的作用下进入细胞内，然后所形成的 6-磷酸葡糖酸进入 6-PG/PK 途径 (London, 1990)。许多属于群 II 和 III 的乳杆菌也可以发酵葡糖酸，尽管在部分种中葡糖酸进入细胞内是由透性酶所介导的，但其方式可能 PTS 系统与 *E. faecalis* 相同。由于在磷酸酮糖酶作用之前需要经过脱氢过程，所产生的部分乙酰磷酸需要还原成乙醇，以维持细胞内氧化还原平衡。

少数乳酸菌如 *Lb. casei* 可以戊糖醇为碳源生长。这些戊糖醇被细胞膜上特异性的 PTS 系统运输到细胞内，所形成的磷酸戊糖醇在脱氢酶的作用下氧化成磷酸戊糖，随后通过 6-PG/PK 途径分解。与葡糖酸发酵一样，代谢终产物中存在部分乙醇。

(四) 乳酸菌糖发酵和代谢类型

从以上所讲的糖发酵方式可以将乳酸菌大致分成三种代谢类型。乳杆菌属不同的种分别属于这三种不同的代谢类型，这也是将其分为 3 个群的理论基础。第一种代谢类型包括群 I 的乳杆菌和部分属于其他属的专性同型发酵乳酸菌，只通过糖裂解的方式对糖进行发酵；第二种代谢类型包括行专性异型发酵的明串珠菌、群 III 的乳杆菌、葡萄酒球菌和韦斯勒菌，只通过 6-PG/PK 途径对糖进行发酵；从酶水平而言，这两种代谢类型的差异主要表现在糖裂解或 6-PG/PK 途径中的关键酶二磷酸果糖 (FDP) 醛缩酶或磷酸酮糖酶是否存在，专性同型发酵乳酸菌具有组成性的二磷酸果糖 (FDP) 醛缩酶，缺乏磷酸酮糖酶；而专性异型发酵的乳酸菌则正好相反。由此而导致其对葡萄糖发酵的代谢终产物的组成存在显著的差异，以及专性同型发酵乳酸菌不能利用戊糖 (和葡糖酸)；第三种代谢类型则包括其余的乳酸菌 (即群 II 的乳杆菌、绝大多数肠球菌、乳球菌、片球菌、链球菌、四联球菌和漫游球菌)，处于中间位置。它们与专性同型发酵乳酸菌相同的是具有组成性的二磷酸果糖 (FDP) 醛缩酶，可以通过糖裂解途径发酵己糖。正如前面提到的那样，戊糖 (以及葡糖酸和戊糖醇被发酵时) 可以诱导产生磷酸酮糖酶，因此又可以进行异型发酵。这些乳酸菌在发酵己糖时通过同型发酵方式，而对于戊糖及其他部分底物则进行异型发酵。因此，被称为兼性发酵乳酸菌。

肉食杆菌属细菌的代谢类型则不是很清楚。这些细菌因为代谢产物中有大量的气体 (CO₂) 和乙酸，最初被分类为异型发酵乳酸菌 (当时的分类名称为 *Lb. divergens*)，后来经

过更仔细的研究，发现其葡萄糖发酵的终产物几乎全部是乳酸，可能是通过糖裂解途径，而代谢产物中其他的产物则可能是其对培养基中葡萄糖以外其他成分通过糖裂解途径代谢的结果，或者是从由糖裂解途径所产生的丙酮酸衍生而来 (De Bruyn et al., 1988)。由于肉食杆菌通常都可以发酵核糖和葡萄糖。因此，将它们归入兼性发酵乳酸菌可能更合适。

最近的研究结果表明，部分被认为是专性同型发酵或专性异型发酵的乳酸菌表面上缺失进行其他糖代谢途径的关键酶（磷酸酮糖酶或二磷酸果糖醛缩酶），但实际上却拥有这些酶。一株 *Lb. brevis*（属于群 III 的乳杆菌）能以糖裂解的方式发酵果糖，其细胞内具有可被果糖诱导的 FDP 醛缩酶活性 (Saier et al., 1996)；类似的，部分 *Lb. acidophilus*（属于群 I 乳杆菌）菌株在平板上可出现能相互转变的粗糙型和光滑性两种菌落，光滑性菌落能发酵核糖，并且细胞内具有磷酸酮糖酶活性 (Biddle & Warner, 1993)。这些菌株的磷酸酮糖酶的遗传学和生化学特征已经被研究过。目前，还不清楚以上这些例子仅仅是个别情况，还是一种普遍的代表意义。无论从何种角度而言，乳酸菌的代谢类型不应该像以前那样看成固定不变，很可能大部分乳酸菌都属于兼性发酵类型。

（五）乳酸的构型

在对糖进行发酵时，不同乳酸菌所产生的乳酸不外乎是 L-乳酸、D-乳酸、两种构型的乳酸基本相等或以某一种构型为主（另一种的乳酸尽管略少，但具有一定定量）等情况。至于所产生的是哪一种构型的乳酸，则取决于其细胞内依赖于 NAD⁺ 的乳酸脱氢酶 (nLDH) 的类型极其相对活力。因此，如果代谢产物中 L-乳酸和 D-乳酸同时存在，则细胞内同时拥有 L-nLDH 和 D-nLDH。只有少数种，例如 *Lb. curvatus* 和 *Lb. sake* 能产生一种消旋酶 (racemase)，能将 L-乳酸转变成 D-乳酸。至于为何产生混合型乳酸及其对细菌本身有什么作用则不清楚。采用遗传工程的方法使一株 *Lb. plantarum* 体内的 L-nLDH 失活，并不影响其在实验性培养基上的生长以及培养过程中所产生的总乳酸的浓度。消失的 L-乳酸被增加的 D-乳酸所“弥补”，表明在糖裂解途径中丙酮酸被还原成乳酸并非限速步骤。值得一提的是 *Lb. bavaricus*，该菌似乎是一株缺失消旋酶的 *Lb. sake* 遗传变种，因此只能产生 L-乳酸 (Kagermeier-Callaway & Lauer, 1995)。在分批培养过程时，*P. pentosaceus* 和多种乳杆菌所产生的两种乳酸对映体之间的比率随培养时间所变化。一般而言，在培养早期所产生的主要是 L-乳酸，而晚期至平衡期则主要是 D-乳酸。培养基中的 pH 值以及细胞内丙酮酸的浓度被认为是影响乳酸脱氢酶活力、从而导致不同生长阶段两种乳酸对映体之间的比率不同的因素，但目前关于这方面的资料还不是很多。*Lb. casei* 和乳球菌的 L-nLDH 同功酶，可以被果糖二磷酸所激活。肠球菌和链球菌也具有 L-nLDH 同功酶。

二、丙酮酸的代谢

目前已经非常清楚，乳酸菌的代谢方式可以根据不同的条件而变化，从而使其在正常条件下对葡萄糖的发酵终产物的组成发生改变。在大多数情况下，这种改变是由对丙酮酸的不同代谢方式、或利用外来电子受体或者两者兼而有之所引起，因为这两种情况有时是联系在一起的。

大多数细菌发酵的本质是通过底物的氧化，产生具有高能量的中间产物，后者通过底物水平的磷酸化来产生 ATP。在氧化过程中，NADH 转变成 NAD⁺，后者需要再生以保持细胞能继续发酵过程。丙酮酸作为 NAD⁺ 再生过程的一种电子（或 H）受体，在多数发酵过程中占据着重要的位置（如图 1-4）。在某些情况下，乳酸菌不是将丙酮酸还原为乳酸，而是将其转变成其他的产物，如图 1-6 所示。不同的乳酸菌可能根据条件和酶活性的变化，可

能以不同的方式对丙酮酸加以利用。

(一) 双乙酰/乙偶姻途径

在乳酸菌导致双乙酰(奶油风味)和乙偶姻/2,3-丁二醇产生的双乙酰/乙偶姻途径(如图1-5)非常普遍,从食品加工的角度而言,这一点对乳发酵有非常重要的意义。然而,只有当细胞内丙酮酸的浓度大大超过所需再生的 NAD^+ 的浓度时,这条代谢途径才会明显地进行。使细胞内丙酮酸过量的方法有两种:①在生长培养基中,除被发酵的碳水化合物外,还存在可作为丙酮酸来源的其他物质;②有其他的物质可以作为电子受体,从而使碳水化合物发酵产生的丙酮酸能多余出来。前一种方法正好符合乳中的情况,由于乳中柠檬酸的浓度相当高($\approx 1.5\text{mg/ml}$),被分解后可作为丙酮酸的额外来源。关于乳酸菌在乳中对柠檬酸的代谢与双乙酰和乙偶姻产生的关系已被深入的研究,有兴趣的读者可参考有关的综述(Huggenholtz, 1993)。柠檬酸在柠檬酸透性酶的作用下,被运输到细胞内,然后被柠檬酸裂解酶分裂成草酰乙酸和乙酸。草酰乙酸在草酰乙酸脱羧酶的作用下变成 CO_2 和丙酮酸。在乳品工业中被用来产生双乙酰的种有 *Lc. lactis* subsp. *lactis* (biovar *diacetylactis*) 和 *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* (以前的分类名称为 *Ln. cremoris* 或 *Ln. citrovorum*)。这些种与柠檬酸代谢有关酶的被诱导方式和最适 pH 以及其双乙酰/乙偶姻的产量随种的不同而略有变化。一般来说,低糖浓度与低 pH 有利于双乙酰/乙偶姻的形成。对于图 1-4 中哪一条途径更重要目前还存在争论。最近的研究结果明显支持通过乙酰乳酸的途径,因为在那些能产生双乙酰并具有 α -乙酰乳酸合成酶的菌种中, α -乙酰乳酸可作为酶作用的中间体被检测到。双乙酰可从乙酰乳酸化学分解而来(非酶过程),通气和低 pH 有利于该反应的进行。在双乙酰/乙偶姻途径中,所产生的乙偶姻和/或 2,3-丁二酮的量要比双乙酰大得多,但无助于风味的产生。最近几年在这方面的研究取得了很大的进展,人们已试图通过代谢调控的方式来控制双乙酰的产量。

(二) 丙酮酸-甲酸裂解体系

如图 1-6 所示,丙酮酸代谢另一分支是丙酮酸-甲酸裂解体系。丙酮酸-甲酸裂解酶催化丙酮酸与 CoA 形成甲酸和乙酰 CoA。乙酰 CoA 既可以作为电子受体,最终导致乙醇的产生,也可以作为底物水平磷酸化的前体,或者两者兼而有之。该系统在多种乳酸菌中是可以操纵的。该体系最突出之处在于,当 *Lb. casei* 和 *Lc. lactis* 在底物受限、厌氧条件下连续培养时,使其由同型发酵转变为异型发酵。所产生的终产物有乳酸、乙酸、甲酸和乙醇。随着生长速率的降低,即在连续培养过程中降低稀释速度时,会导致大量丙酮酸-甲酸裂解体系所形成的产物的产生。部分 *Lc. lactis* 在发酵半乳糖或麦芽糖时也会出现类似的情况。

已经证明,上述菌株从同型发酵转变为异型发酵是由于糖裂解速率的降低。糖裂解中间产物浓度的降低,导致细胞内竞争丙酮酸的 nLDH 和丙酮酸-甲酸裂解酶的活性受到影响。*Lb. casei* 和 *Lc. lactis* 的 nLDHs 是一组同功酶,其活性的发挥需要糖裂解途径中关键性的中间产物果糖二磷酸的存在。一般来说,与进行同型发酵的细胞相比,进行异型发酵的 *Lc. lactis* 细胞内的果糖二磷酸的浓度较低。同样地,磷酸丙糖的浓度在进行异型发酵的 *Lc. lactis* 细胞内较低,而磷酸丙糖是丙酮酸-甲酸裂解酶的抑制剂。因此,当处于由底物浓度限制或底物自身性质引起的“半饥饿”状态时,细胞通过调节某些酶的活性以部分抑制将丙酮酸还原成乳酸的反应。相应地,细胞可以通过丙酮酸-甲酸裂解途径获得所需的能量,因为在该途径中乙酰磷酸在乙酸激酶的作用下,可以通过底物水平的磷酸化产生 ATP,从而获得比丙酮酸还原成乳酸时更多的能量(图 1-6)。

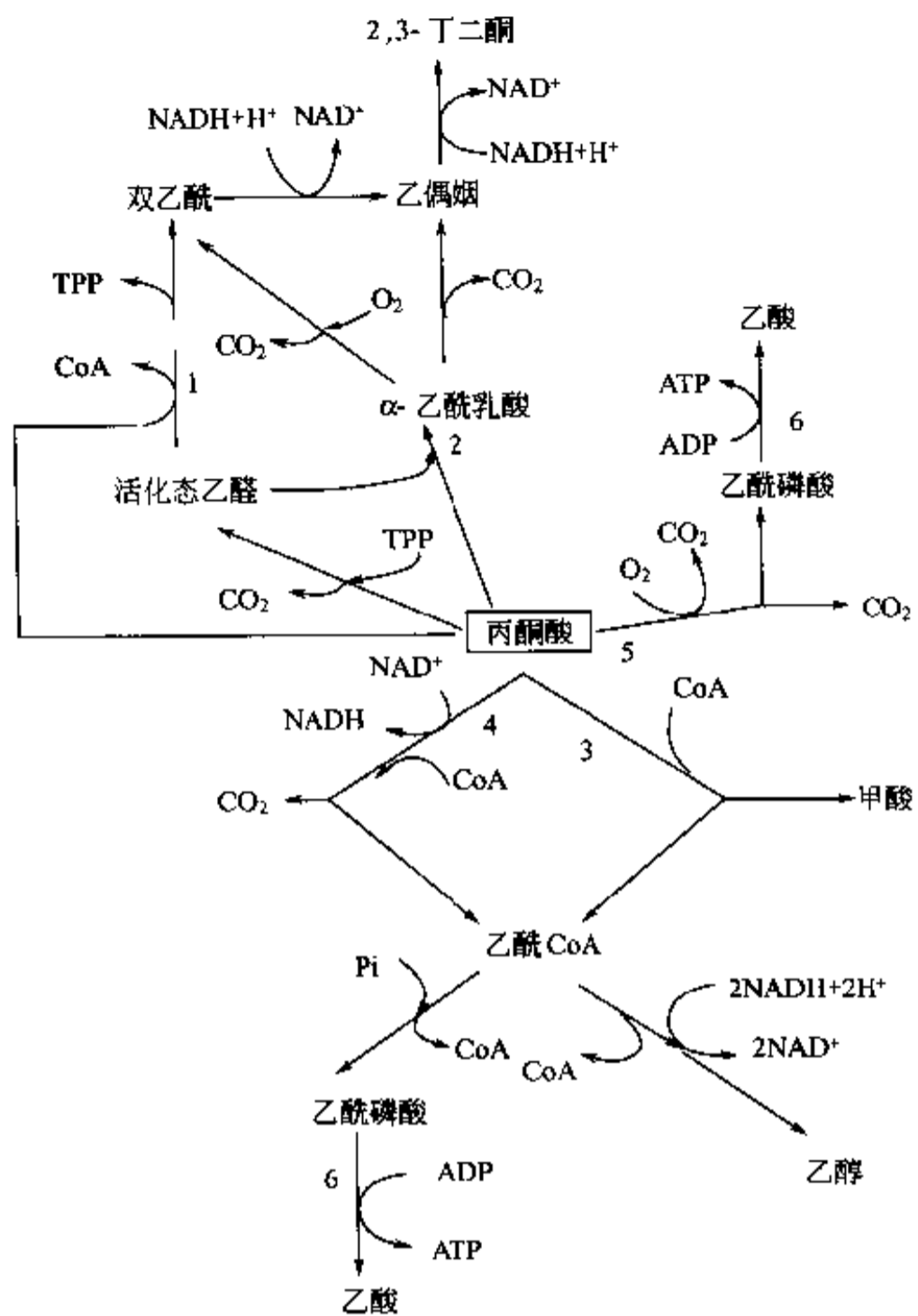


图 1-6 丙酮酸的不同代谢方式

1—双乙酰合成酶；2—乙酰乳酸合成酶；3—丙酮酸-甲酸裂解酶；
4—丙酮酸脱羧酶；5—丙酮酸氧化酶；6—乙酸激酶

丙酮酸-甲酸裂解途径仅存在于厌氧微生物中，因为该酶体系对氧极端敏感，当细胞暴露于空气中的时候很可能就会失活。

(三) 丙酮酸氧化酶途径

在乳酸菌中，氧气对丙酮酸的趋向有非常显著的影响。这种影响可以通过丙酮酸氧化酶的介导直接发挥作用，或者通过氧与 $\text{NADH} : \text{H}_2\text{O}_2$ 氧化酶及 $\text{NADH} : \text{H}_2\text{O}$ 的反应间接发挥作用。丙酮酸氧化酶在将丙酮酸转化成 CO_2 和乙酰磷酸的同时，产生 H_2O_2 。研究表明，该酶参与了 *Lb. plantarum* 的有氧代谢过程，后者在有氧状态下可以产生大量的乙酸。Sedewitz (1984) 等的研究表明，在处于生长平衡期初期的 *Lb. plantarum* 细胞内丙酮酸氧化酶的活力最高，而且在以乳糖为碳源的培养基上生长时细胞为丙酮酸氧化酶的活力通常比在葡萄糖上生长的细胞高。由于该株 *Lb. plantarum* 在乳糖上的生长速率比在葡萄糖中低得多，其细胞内丙酮酸氧化酶活力升高的一种可能的解释是糖裂解途径中间物的浓度对该酶的合成有某种调节作用。糖裂解途径中间产物对该酶的调节作用可能与其对丙酮酸-甲酸裂解酶的调节作用具有相似性。

(四) 丙酮酸脱氢酶途径

研究表明，在乳球菌中存在具有活性的丙酮酸脱氢酶复合体。该酶体系能从丙酮酸产生

乙酰 CoA, 因此, 与丙酮酸-甲酸裂解途径相似。Cogan (1989) 等的研究表明, 在好氧条件下, 丙酮酸脱氢酶的作用不是提供代谢所需的能量, 而是脂类合成所需的乙酰 CoA。在厌氧条件下, 该酶的作用可能被丙酮酸-甲酸裂解酶所替代, 后者的优势在于在该过程中不需要将 NAD⁺ 还原。当细胞暴露于空气中时, 由于丙酮酸-甲酸裂解酶被氧气钝化, 细胞必须依赖于具有功能性的丙酮酸脱氢酶来产生乙酰 CoA, 所产生的过量 NADH 可以被 NADH 氧化酶重新氧化。与丙酮酸-甲酸裂解酶相似的是, 丙酮酸脱氢酶也可以在分解代谢中发挥作用, 不过主要是在好氧条件下。当底物浓度受到限制时, 给处于非生长状态的 *Lc. lactis* 细胞培养物通气, 则 *Lc. lactis* 主要进行同型乙酸发酵。在这种情况下, 糖裂解途径所产生的丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶复合体系的作用, 最终全部转化为乙酸。此时, nLDH 的活力可能非常低, 不能有效地竞争丙酮酸。出现这种代谢方式的前提是在糖裂解途径和丙酮酸脱氢酶反应中所产生的 NADH 能被 NADH 氧化酶所氧化。

三、氮代谢: 乳酸菌的蛋白水解系统

(一) 乳酸菌的蛋白水解系统

一般认为, 乳酸菌利用无机氮源合成氨基酸的能力非常弱。因此, 它们依赖于培养基中现成的氨基酸作为氮源。需要注意的是, 不同种甚至同种内不同菌株之间对氨基酸的需求不完全相同。部分 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 菌株实际上可以自身合成大多数的氨基酸, 而 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 和 *Lb. helveticus* 则需要在培养基中添加 13~15 种氨基酸 (Chopin, 1993)。对某种特定氨基酸的需求是通过对氨基酸生物合成的酶进行定位突变和/或对有关基因或酶功能的下调所得到的结果。乳酸菌在化学合成培养基上的生长通常都比较迟缓, 表明它们通过进化出能利用现成有机氮源的有关酶系统, 已经适应了在一个营养丰富的环境中生活。目前在这一领域研究最彻底的是乳源乳酸菌、尤其是 *Lc. lactis* 的蛋白水解酶系统。这一点主要是出于乳发酵技术上的考虑, 因为蛋白水解系统对于这些乳酸菌在乳中的合理而迅速的生长具有特别重要的意义。

所有用于对乳进行酸化、乳品来源的乳球菌 (例如干酪制作所使用的菌种) 都具有蛋白水解活性。这种蛋白水解活性主要来自于一种位于细胞壁的胞外丝氨酸蛋白酶 (PrtP), 缺失编码该蛋白酶基因的突变株只能在乳中出现轻微的生长。在乳球菌至少存在两种以上的丝氨酸蛋白酶, 它们对乳酪蛋白的分解作用略有差异。在乳球菌中已经发现了多种具有不同特异性的肽水解酶, 但到目前为止, 所发现的这些肽酶全部属于胞内酶。在早期的研究中, 曾观察到在乳酸菌蛋白水解途径中出现“断链”的现象, 因为 PrtP 分解所产生的肽片段太大, 无法被当时所发现的运输系统运送到细胞内。这些运输系统包括氨基酸运输系统、两种二肽和三肽运输系统 (DtpT 和 DtpP) (Smid et al., 1989a; Foucaud et al., 1995) 以及能运输由 4 至 8 个氨基酸残基组成的寡肽的寡肽运输系统 (Opp) (Tynkkynen et al., 1993)。通过对不同突变株的研究, 有人甚至提出具有广泛特异性的 DtpT 系统是乳球菌利用酪蛋白的基本方式 (Smid et al., 1989b)。当时的问题在于, 由于酪蛋白降解的产物只能以二肽和三肽的形式被跨膜运送, 而 PrtP 仅能产生大的肽片段, 而这些片段的长度甚至远远超过 Opp 系统的运送范围, 因此在蛋白水解途径中应该还存在另外一种胞外肽水解酶。正如前所讲的一样, 这种胞外肽水解酶从来没有被发现过。随着对酪蛋白 PrtP 水解产物采用更精密的方法分析、乳球菌遗传学知识的积累以及构建突变株方法 (如通过染色体整合使有关的基因失活) 的进步, 这一问题已得到解决。首先, 已经证明 PrtP 对酪蛋白的水解程度比以前所认识到的要高得多, 其主要水解产物是片段长度小于 9 个氨基酸残基的寡肽 (Juillard

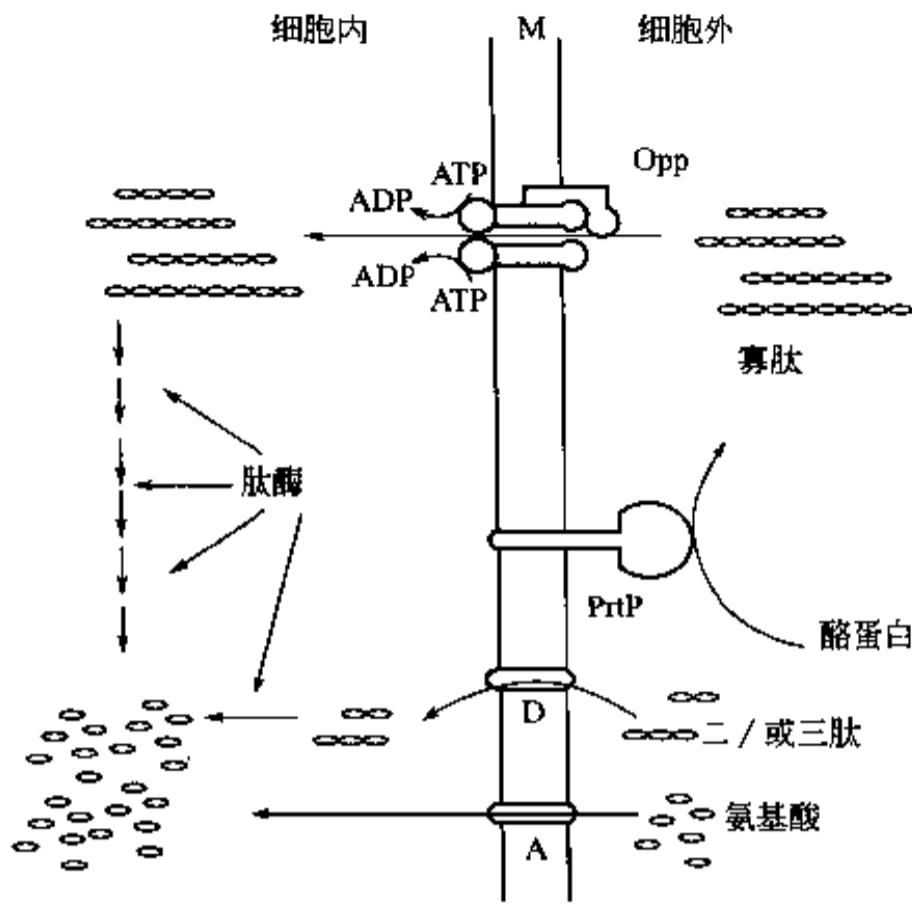


图 1-7 *Lc. lactis* 蛋白水解途径以及二肽/三肽和游离氨基酸的运输方式

et al., 1995b); 其次, 通过对功能缺失非常清楚的突变株的研究发现, Opp 系统才是这些乳球菌在乳中生长所必须的, 而不是 DtpT 系统 (Kunji et al., 1995); 第三, 通过对乳球菌生长过程中乳中肽的组成分析发现, 长度较小、能被 Opp 系统运输的小肽能满足乳球菌在乳中生长所需氮源的 98% (Juillard et al., 1995a)。现在已经能构建出完整的蛋白降解代谢途径, 如图 1-7 所示。某些特定的二肽可以调节负责编码 PrtP 的基因的功能, 该酶是催化蛋白降解途径第一步水解作用的酶, 而这些二肽则来自于细胞内的肽酶对被输送到细胞内的寡肽的水解作用。目前还不清楚, 乳球菌的这种蛋白降解途径适用于其他乳酸菌的程度有多大。尽管蛋白水解作用在乳酸菌中普遍存在, 但只对少数种的蛋白水解系统进行了系统的研究。

Lb. casei 细胞内负责编码 PrtP 一类型蛋白酶的基因已被克隆, 并测定了其核苷酸序列组成。从其核苷酸序列所推导出来的蛋白质氨基酸序列与乳球菌的 PrtP 的结构具有非常高的相似形, 表明其蛋白水解系统与乳球菌比较接近。

(二) 益生菌在发酵食品中产生的生物活性物质

1. 生物活性肽

在食源蛋白中, 乳蛋白由于其分子的复杂性, 包含着大量的生物信息, 因此能满足新生儿的生理需求。乳蛋白分子中这些生物信息可以通过外部因素如 pH、离子强度和表面张力的变化使分子“去折叠”而释放出来, 也可以通过益生性乳酸菌特定的酶的作用来完成。

Matar 等 (1996) 发现 *Lb. helveticus* 在发酵乳的过程中可以释放多种生物活性肽 (β -酪啡肽)。Yamamoto 等发现 *Lb. helveticus* 和 *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* 对乳清发酵时所产生的血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制活性高于其他乳酸菌对乳发酵时所产生的 ACE 抑制活性, 并且分离到两种在自发性高血压大鼠 (SHR) 中有明显降压作用的三肽 (IPP 和 VPP)。这两种乳酸菌比乳球菌具有更强的蛋白水解活性, 此外, 其蛋白水解能力与发酵乳中肽的浓度有着直接的关系。不同乳酸菌的蛋白酶的特异性存在显著的差异, 因此会对它们在乳中发酵时所产生的肽的组成产生重大影响。此外发酵条件对蛋白水解的程度也会产生影响, 并关系到所释放的肽的生物活性。

对蛋白进行轻微至中等程度的水解, 有时可明显提高生物活性肽的释放。Matar 等发现, 在温和水解条件下, 乳蛋白中大量肽的释放出现在水解过程的最初几分钟。Mullally 也观察到类似的现象, 在对乳清蛋白温和水解几分钟后获得的乳清蛋白水解浓缩物具有非常强的 ACE 抑制活性。这些 ACE 抑制肽出现在水解过程的最初 20 分钟, 将水解度提高到 8% 并不会增加 ACE 抑制活性。他们认为, 对于 ACE 抑制肽的释放作用是由蛋白酶的特异性决定的, 而与水解度无关。

酪蛋白的生物活性与其水解物相比要小的多。酪巨肽 (caseinmacropeptide) 水解物对胆囊激动素 (cholecystokinin) 释放的刺激作用明显高于酪蛋白。很显然, 在酶水解过程中, 被水解肽键的部位对所释放的肽的生物活性作用的类别与大小具有决定作用。

在 *Lb. helveticus* 发酵乳的过程中所释放的其他的生物活性物质中, 其水解物对小鼠抗 *Klebsiella pneumonia* 感染的保护作用, 则与蛋白的水解程度存在某种关系; 其对 *N'*-氧-4-硝基奎宁 (4NQO) 的抗畸变作用也是出现在水解过程的最初一段时间。与未经过发酵的乳相比, 酸奶中能促进中枢神经系统作用的环 (组氨酰-脯氨酸) 浓度的增加与乳酸菌的发酵作用有一定的关系, 其浓度的明显提高可能与酸奶菌种的蛋白酶和肽酶有关。

2. 胞外多糖 (EPS)

乳酸菌在乳中生长时, 其对乳糖的发酵作用除了使奶变酸, 从而使牛乳不受腐生菌污染、抑制致病菌生长外, 产生的酸 (主要是乳酸) 可以赋予发酵产品 (如酸奶、干酪) 令人愉悦的新鲜感和柔和的酸味。部分乳酸菌还可以利用乳糖合成胞外多糖 (EPS), 从而增加发酵产品的黏度、改善其质构。与其他细菌一样, 乳酸菌所产生的多糖根据其于菌体细胞的相对位置可以分为细胞外多糖 (或 EPS) 和细胞周围的黏液层即荚膜性多糖。EPS 也可以松散地黏附到菌体细胞或以黏液的形式分泌到基质中。EPS 对处于自然环境中的产生菌而言, 具有抵抗干燥、被吞噬和被原生动动物掠食、噬菌体浸染、抗生素或有毒物以及渗透压变化的作用。EPS 在细胞识别、促进产生菌黏附于不同的表面、形成生物膜从而在各种生境中定殖有重要的作用 (Looijesteijn et al., 2001)。乳酸菌产生 EPS 的生态学功能目前还不是很清楚, 似乎与产生菌细胞的黏附作用以及在不同环境中为产生菌提供保护作用有关。*Streptococcus salivarius* 和 *S. mutans* 所产生的 EPS 与其在口腔内定殖并形成牙菌斑有关, 而 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NZ4010 所产生的 EPS 则为产生菌提供对多种抗菌因子的保护作用, 如噬菌体、金属离子、nisin 和溶菌酶等。除生态学功能外, 乳酸菌所产生的 EPS 在食品工业、尤其是发酵乳制品生产中有重要意义。能产生胞外多糖的 *S. thermophilus* 和 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* “黏性” 菌株在酸奶生产中的应用非常普遍, 主要是用来改善产品的质地、避免乳清析出和增加黏度。在斯堪地纳维亚地区的部分产品, 如 viili 中, 则使用了能产生 EPS 的乳球菌。此外, 发酵乳制品尤其是由益生性乳酸菌所生产的发酵乳制品对人或动物健康的促进作用, 可能与乳酸菌细胞壁中的多种成分有关, 尤其是胞外多糖 (Kitazawa et al., 1998)。

(1) 胞外多糖的种类与组成 乳酸菌所产生的 EPS 可以分成两大类: 由一种单糖聚合而成的同型多糖和异型多糖, 异型多糖由 2-5 个单糖组成的单元聚合而成, 在重复单元中可以存在非糖分子。同型多糖可以分成四组: α -D-葡聚糖、 β -D-葡聚糖、果聚糖和其他种类的多聚糖, 如聚半乳糖。同型多糖一般分子量比较大, 但有些文献中所报道的分子量可能由于在水溶液中存在同型多糖聚合体而被高估。由 *Ln. mesenteroides* NRRL B-512F 所产生的右旋糖苷 (α -D-葡聚糖) 的分子量一般为 $(6.2 \sim 7.1) \times 10^6$ Da; 而部分 *S. mutans* 菌株所产生的 Levans [聚 β -D-Frup (2~6)] 则分子量略高, 为 $(2.7 \sim 21.6) \times 10^6$ Da。同型多糖的合成需要特定底物 (如蔗糖) 的存在, 组成多糖的单糖的装配在细菌细胞外进行。这些生物聚合大分子的产量可以非常大, 例如, *Lb. reuteri* LB121 能产生以葡聚糖或果聚糖为主的胞外多糖, 浓度可达 10 g L^{-1} (van Geel-Schutten et al., 1999)。

相当多的乳酸菌都可以产生异型多糖, 这些异型多糖通常是由 D-葡萄糖、D-半乳糖和 L-鼠李糖所构成的重复单元聚合而成, 有时在重复单元中可能还含有 N-乙酰葡糖胺 (Glc-

NAc)、N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 和葡萄糖醛酸 (GlcA), 有时在这些非糖残基中可能存在其他基团如磷酸基、乙酰基和甘油等。与同型多糖合成不同的是, 组成异型多糖的重复单位是在细胞内合成, 而且需要携带有脂的糖基化萜 (isoprenoid) 的参与。这些重复单位被跨膜运输到细胞外以后, 在胞外完成聚合。不同乳酸菌在牛乳中产生 EPS 的能力存在明显的差异, 生长条件 (如 pH、温度和培养时间) 以及培养基的组成 (碳源、氮源和其他营养物质) 则影响 EPS 的产量与糖基的组成。据报道, 各种乳酸菌产生 EPS 的能力为: *S. thermophilus* 50~350mg/L、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 60~150mg/L、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 25~600mg/L 以及 *Lb. casei* 50~60mg/L。

(2) 胞外多糖的生理功能 在 20 世纪初, 人们就发现部分细菌有益于人体健康。目前, 含有益生菌的功能食品无论是从有利于健康还是商业利润的角度而言, 其市场在不断取得飞速的扩张。目前所使用的益生菌主要是乳杆菌和双歧杆菌, 它们之中有一些可以产生 EPS。实际上, 能产生胞外多糖的益生菌菌株对人体的健康促进作用可能主要来自于这些生物大分子聚合物 (图 1-8)。这些胞外多糖既可以作为益生菌促进肠道内其他有益细菌的生长, 又与益生菌的抗肿瘤、抗瘵管、免疫调节或降胆固醇作用有关 (图 1-8) (De Vuyst & Deegst, 1999)。

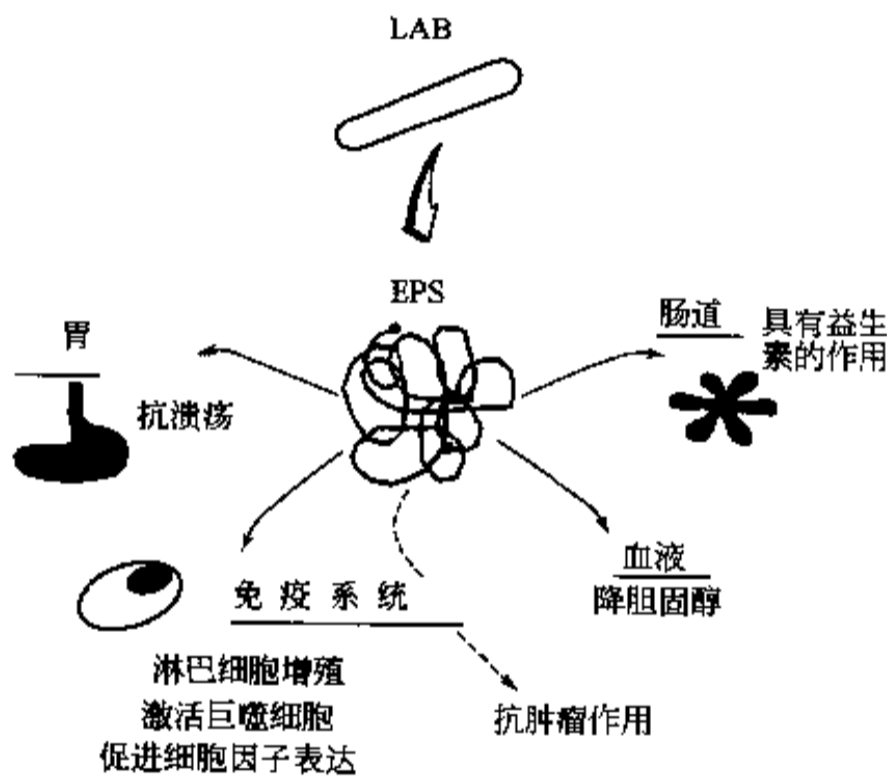


图 1-8 乳酸菌产生的胞外多糖在人体内的生理作用

多项研究结果表明, 乳酸菌和发酵乳制品具有抗癌作用, Kitazawa (1991) 将 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 的冻干细胞通过腹膜注射到小鼠体内后, 可抑制 Sarcoma-180 的生长; 但 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 的菌体细胞在体外试验中对 Sarcoma-180 不表现出“毒性”。因此, 该菌株对肿瘤生长的抑制作用主要来自于其免疫活性。研究者认为, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 所产生的黏液物质是主要的活性成分。后来的研究进一步发现, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* KVS20 所产生的黏液可以显著地增强 B 细胞-依赖性细胞分化作用 (Kitazawa et al., 1992)。Nakajima

等也发现, 腹膜注射 (i. p.) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SBT 产生的胞外多糖后, 可以提高小鼠体内特异性抗体的浓度, 表明这种多糖具有免疫佐剂的作用 (Nakajima et al., 1995)。酸奶生产所用的 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 菌株能产生一种由宿主介导的抗肿瘤作用, 将分离到的 EPS 进一步分成两个组分: 中性多糖和酸性多糖 (APS)。APS-1073 是一种磷酸多糖, 能有效地促进鼠 B-淋巴细胞的分裂, 多糖中的磷酸基团是诱导 B-细胞分裂的触发器 (Kitazawa, 1998)。乳酸菌产生的胞外多糖还可以增强其他免疫反应如 T-淋巴细胞增殖、巨噬细胞激活和诱导细胞因子的表达等。大多数关于 EPS 的生理作用都来自于体外试验或小鼠腹膜注射试验的结果, 只有少数试验是通过口服途径在体内进行的。给携瘤小鼠口服开非粒所产生的一种水溶性胞外多糖 (KGF-C) 后, 可以抑制肿瘤的生长。口服该多糖后的免疫增强作用可能来自于对 T-细胞的诱导作用, 而不是 B-细胞 (Zubillaga et al., 2001)。将 EPS 或产生 EPS 的益生性乳酸菌应用于功能食品, 其对人

体免疫的作用还需要更多的研究予以支持。

益生菌 (prebiotic) 是一类能选择性刺激大肠内少数有益细菌的生长或其活性, 从而促进人体健康的非消化性食物成分。作为益生菌的食品成分必须具备以下的条件:

- ① 在消化道上部不被水解或吸收;
- ② 仅能被大肠土著菌群中少数有益的细菌分解利用, 从而促进其生长或代谢活性;
- ③ 益生菌被利用后, 能使大肠菌群组成发生有利于人体健康的改变;
- ④ 能在肠腔或整体上有利于宿主健康。

总体而言, 非消化性碳水化合物、尤其是果聚糖 (如 inulin) 是最常见的益生菌。尽管乳酸菌所产生的 EPS 在体内具有多种功能, 但还没有将乳酸菌的 EPS 作为益生菌的报道。其中一个重要的原因是这些 EPS 容易被消化, 从而影响其作为益生菌的作用, 不过目前对 EPS 的可消化性只进行过少量的研究。*Lc. lactis* subsp. *cremoris* NZ 4010 所产生的胞外多糖对该菌通过胃肠道没有任何保护作用, 不过该实验是在模拟人消化过程的体外模型中进行的。在该试验中, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NZ 4010 在含有胃蛋白酶、各种胰酶混合物、胆酸和牛磺脱氧胆酸的溶液于 37℃ 培养 (LOOI JESTEIJN et al., 2001)。LOOI JESTEIJN 等还在大鼠体内研究了 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* B40 产生的胞外多糖的抗消化性, 给大鼠连续 14 天喂以含有 EPS 的食物, 其粪便中 EPS 的回收率几乎可以达到 100%, 表明在通过消化道的过程中, EPS 几乎没有被消化。Ruijssenaars (2000) 等也发现乳酸菌所产生的 EPS 具有很低的生物可降解性, 这种生物可降解性是在接种粪便过滤液的培养基于 37℃ 进行的。其中, *S. thermophilus* SFi39 和 SFi12 所产生的胞外多糖可以被降解, 而 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* B40、*Lb. sake* 0-1、*S. thermophilus* SFi39 和 *Lb. helveticus* Lh59 所产生的 EPS 则不被降解。他们试图找出这些胞外多糖的生物可降解性与其初级结构之间的直接联系, SFi39 和 SFi12 所产生的胞外多糖只有由单一 β -半乳糖苷残基组成的侧链, 而 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* B40 和 *Lb. sake* 0-1 所产生的 EPS 的侧链中则含有两种糖残基, 一种是带电荷 (含有磷酸基团), 另一种则不带电荷。这些发生取代的糖残基可能使分解性酶难于接近 EPS 分子。实际上, van Casteren 等 (1998) 发现多种酶制剂对 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* B40 产生的胞外多糖没有分解作用。只有从 *Trichoderma viridae* 制备的纤维素酶粗酶溶液能将经过酸水解、去掉磷酸半乳糖残基的 EPS-B40 分解。因此, 如果将乳酸菌所产生的胞外多糖用作益生菌, 还需要在可降解性、被大肠有益细菌分解的特异性以及在人体内的健康功能方面进行更多的研究。

四、益生菌的抗菌物质

益生菌产生抗菌物质的能力早就被人们用于保存食物。以发酵乳制品来保存乳的方法, 其历史可追溯到公元前 6000 年, 肉制品的发酵技术早在公元前 15 世纪的古巴比伦和中国就出现了。中国在公元前 3 世纪, 就已经出现了蔬菜的发酵工艺。从 20 世纪 30 年代开始, 乳酸菌被作为益生菌被用来改善肠道菌群。

发酵能够减少可利用碳源, 并且产生一系列具有抗菌活性的有机小分子物质, 常见的有乳酸、乙酸、丙酸 (Blomand Mortvedt, 1991)。除了这些具有抑菌作用的初级代谢产物外, 不同种类的益生菌还产生多种抗菌物质。必须记住的是, 益生菌产生这些抗菌物质不是为了人类的需要, 而是生存竞争的需要。其生物学意义在于抑制竞争者, 使自身获得生存优势。例如某些益生菌可以通过酸化、或产生对竞争者有毒的代谢产物等方式改变环境条件 (如), 从而达到抑制竞争者的目的。

(一) 有机酸

乳酸菌发酵己糖时，同型发酵可产生乳酸，异型发酵则可产生等摩尔的乳酸、乙酸/乙醇和二氧化碳 (Gottschalk, 1986)。

很早就注意到弱酸在低 pH 时具有比中性 pH 条件更强的抗菌活性 (Simon and Blackmin, 1949)。在乳酸和乙酸中，乙酸具有更强的抑菌活性，并且抑制的微生物范围更多，包括酵母、霉菌和细菌 (Blom and Mortvedt, 1991)。从乙酸的解离常数高于乳酸就可以找到部分解释。例如，在 pH 值为 4 时，乳酸仅有 11% 未离解，而乙酸有 85% 未离解 (根据 pK_a 计算，乙酸的 pK_a 为 4.75，乳酸的 pK_a 为 3.08)。然而，乙酸和乳酸的混合物对 *Salmonella typhimurium* (鼠伤寒沙门菌) 的抑制作用比任何单独一种酸的效果都好，显示了一种综合效应 (Rubin, 1978)。

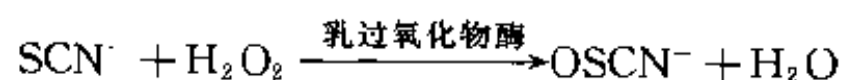
通常认为未发生解离的分子是弱酸产生抑菌作用的活性形式，尽管解离的酸分子也能抑菌 (Eklund, 1983)。由于未解离的有机酸分子是脂溶性的，因此它们可以穿透细胞膜、进行扩散 (Cramer and Prestegard, 1977; Bearsoetal, 1977)。不过，也有人认为细胞摄取某些有机酸时，需要消耗能量 (Cherrington et al., 1981)。在进入细胞以后，由于细胞质 pH 值通常接近中性，导致这些有机酸分子发生解离 (Padan et al., 1981; Slonczewski et al., 1981)。有机酸解离释放的质子使细胞质酸化，导致细胞膜内外 pH 梯度消失，这是引起生长抑制的主要原因 (Salmond 1984; Blom and Mortvedt, 1991)。另一种观点认为，有机酸对细胞生长的抑制作用并非来自质子转移，而是细胞内阴离子的积累。他们提出，阴离子可引起生物大分子合成速度的降低 (Cherrington, 1991)，并且影响其跨膜运输 (Eklund, 1980)。乳酸菌可以通过降低自身细胞质的 pH 值，从而抵消这种阴离子积累效应 (Russell, 1992)。

在实际应用中，这些有机酸通常存在于有机介质中。Gelinias 和 Goulet (1983) 观察到有机物质降低了磺化油酸的杀菌活性，Cherrington 等 (1992) 发现酵母提取物可降低乳酸和乙酸的抑菌活性，而血液和乳可增强乙酸的抑菌活性。

(二) 过氧化氢 (H_2O_2)

在氧存在时，乳酸菌通过黄素蛋白氧化酶、NADH 氧化酶和超氧化物歧化酶的作用可以产生过氧化氢 (H_2O_2)。当缺乏血红素时，乳酸菌不能产生过氧化氢酶 (触酶)。而其他分解 H_2O_2 的系统都不如产生 H_2O_2 的系统活跃，使得细胞内过氧化氢积累 (Condon, 1987)。但 Fontaine 等 (1996) 认为过氧化氢在体内并不会大量积累，因为它会被过氧化物酶、黄素蛋白酶和假触酶分解。过氧化氢的杀菌作用主要归功于其对细菌细胞的强氧化作用，细胞蛋白质和细胞膜脂的巯基均可被氧化 (Morris, 1976; Schlegel, 1985; Lindgren and Dobrogosz, 1990)。而且，过氧化氢的产生过程消耗大量氧气，造成局部的厌氧环境，使某些细菌难以生存。但也有一些学者对过氧化氢在体内是否具有显著的杀菌效果提出质疑 (Nagy, 1991; Fontaine, 1996)。

在自然条件下，过氧化氢的抗菌作用可因为乳过氧化物酶和硫氰酸离子 (SCN^-) 的存在而加强。这种糖蛋白类的乳过氧化物酶存在于唾液、眼泪和乳汁中，通过催化过氧化氢氧化硫氰酸盐，产生次硫氰酸盐 ($OSCN^-$)；当存在过量的过氧化氢时，还可以产生 O_2SCN^- 和 O_3SCN^- (Pruitt, 1986, Condon, 1987)。



细胞膜接触 OSCN^- 后会引引起结构的损坏和改变。但 OSCN^- 主要的抗菌作用要归因于对糖酵解的阻断。 OSCN^- 可引起葡萄糖转输、己糖激酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶等糖代谢酶的巯基氧化，从而使这些酶失活。特别是甘油醛-3-磷酸脱氢酶，可能是 OSCN^- 主要的作用目标。这种作用对大多数革兰氏阳性细菌、包括益生性乳酸菌而言，产生的是一种抑菌效果；而大多数革兰氏阴性菌却很快被杀死 (Condon, 1987; Lindgren and Dobrogosz, 1990; Blom and Mortvedt, 1991)。

(三) 二氧化碳

二氧化碳 (CO_2) 主要产生于己糖的异型乳酸发酵，许多其他发酵途径也可以产生二氧化碳 (Gottschalk, 1986)。 CO_2 具有双重抗菌作用， CO_2 的产生形成一种厌氧环境，同时 CO_2 自身还有抗菌活性 (Lindgren and Dobrogosz, 1990)。 CO_2 抗菌作用的准确机理还不清楚，可能与 CO_2 引起脱羧作用受到抑制以及 CO_2 在脂双层结构中的积累引起膜的通透性下降有关 (Lindgren and Dobrogosz, 1990)。低浓度的 CO_2 对某些微生物的生长有刺激作用，但高浓度的 CO_2 则阻止其生长 (Lindgren and Dobrogosz, 1990)。

(四) 双乙酰

双乙酰 (2,3-丁二酮) 是奶油中的芳香和风味物质。1927 年 Lemoigne 首先发现了双乙酰对某些芽孢杆菌的抗菌作用。乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属、链球菌属中的一些种或菌株可以产生双乙酰，其他的微生物也能产生 (Jay, 1982)。己糖代谢时，双乙酰的产生受到抑制。但柠檬酸盐代谢时可以产生双乙酰。柠檬酸盐经由丙酮酸途径成为双乙酰 (Lindgren and Dobrogosz, 1990)。

Jay (1982) 发现当 pH 低于 7 时，双乙酰的抗菌效果随 pH 值的下降而增强。当葡萄糖、乙酸盐或吐温 80 存在时，双乙酰的抗菌作用受到拮抗。双乙酰对革兰氏阴性菌、酵母和霉菌的抑制要大于对革兰氏阳性菌，而乳酸菌则最不敏感。双乙酰可能是与革兰氏阴性菌的精氨酸结合蛋白发生反应，从而阻碍了其对精氨酸的利用。

(五) 低分子量的抗菌物质

益生性乳酸菌能产生多种具有抗菌作用的低分子量物质 (Reddy, 1984; Silva, 1987)。除了分子量低以外，这些物质还有以下共同特征：①在低 pH 时活性较强；②热稳定；③抗菌谱广；④溶于丙酮 (Axelsson, 1990)。关于这些低分子量的抗菌物质更详细的资料还未报道，同时，部分实验的结果难以重复 (Spillman, 1978)。从而使人们怀疑所观察到的抗菌效果到底是这些低分子量物质还是前面已提到的那几种代谢产物在发挥作用，因此，这类物质还存在不确定性。下面仅介绍两种研究的比较清楚的低分子量抗菌物质。

1. Reuterin

Lactobacillus reuteri 是人和许多动物胃肠道中的正常微生物之一，在含有葡萄糖和甘油或甘油醛混合物的培养基上厌氧生长时，会产生一种低分子量的抗菌物质，即 Reuterin (Axelsson, 1989)。*Lb. reuteri* 通过使甘油脱水，产生 3-羟基环氧丙烷 (Reuterin)。后者在 $\text{NADH} + \text{H}^+$ -脱氢酶的作用下还原成 1,3-丙二醇 (Blom and Mortvedt, 1991; Veiga da Cunha and Foster, 1992)。对数期的细胞并不积累 Reuterin，因为产生的 Reuterin 被来自葡萄糖代谢产生的还原力所还原。当细胞进入稳定期后，开始积累 Reuterin (Axelsson, 1990)。当接触“受害者”细胞时，*Lb. reuteri* 受到刺激而开始产生 Reuterin (Chung, 1989)。在水溶液中，Reuterin 可以三种形式存在：主要是以单体和水化单体的形式存在，另有少量以环状二聚体存在。迄今为止，并不知道哪一种形式或组合方式的生物活性更强

(Talarico and Dobrogosz, 1989)。尽管其他细菌也能通过同样的途径分解甘油，但是积累和分泌 Reuterin 似乎是 *Lb. reuteri* 所特有的一种性质 (Talarico, 1991; Veiga da Cunha and Foster, 1992)。Reuterin 具有广谱的抗菌活性。它能够抗细菌、抗真菌、抗原生动物、抗病毒 (Axelssen, 1989; Chung, 1989; Dobrogosz, 1989)。目前还没有关于 Reuterin 对宿主细胞可能产生的作用的报道。益生性乳酸菌，包括 *Lb. reuteri* 在内，也对 Reuterin 敏感，不过这些乳酸菌对 Reuterin 的抗性比其他微生物高得多 (Chung, 1989; Dobrogosz, 1989)。

Reuterin 的广谱抗菌活性归因于其作用机制。Reuterin 主要作用于巯基酶，是核糖核苷还原酶底物结合亚基的抑制剂，因此能干扰 DNA 合成 (Dobrogosz, 1989)。

2. 2-焦苜蓿胺嘧啶-5-羧基酸 (PCA)

Lactobacillus casei subsp. *casei*、*Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* 和 *Streptococcus bovis* 都可以产生焦谷氨酸、即 PCA，后者对 *Bacillus subtilis*、*Enterobacter cloacae* 和 *Pseudomonas putida*，具有抑菌作用 (Chen & Russell, 1989; Huttunen et al., 1995)。

(六) 细菌素

“Bacteriocin” (细菌素) 一词是由 Jacob 等提出的 (Jacob, 1953)，是指一类分子量相对较高的蛋白质类抗生素，通过吸附到与产生菌相同或相近的目标细胞的受体上，使其生长受到拮抗。1992 年，Klaenhammer 等将乳酸菌产生的细菌素分为三类：①羊毛硫细菌素；②小分子疏水性热稳定肽 (<13000Da)；③热不稳定性大蛋白分子 (>30000Da)。一年后这个标准即被修正，增加了一类新的细菌素 (Klaenhammer, 1993。见表 1-5)，有兴趣的读者可进一步参考最近发表的关于细菌素的综述 (Jack, 1994; de Vos, 1995; Sahl, 1995; Venema, 1995; Konings and Hibers, 1996; Nes, 1996)。

表 1-5 乳酸菌产生的细菌素分类

大 类	亚 类	描 述
第 I 类		羊毛硫细菌素
第 II 类		小(<10KD)，耐中至高温(100~121℃)，不含羊毛硫氨基酸的肽，作用于细胞膜
	II a	作用于 <i>Listeria</i> (李斯特菌)的肽，氨基末端附近含-Y-G-N-G-V-X-C 的结构
	II b	由两条肽组成的细菌素
	II c	激活巯基的肽
第 III 类		大(>30KD)，不耐热的蛋白质
第 IV 类		复合体细菌素，含脂链或糖链的蛋白质

注：根据 Nes, 1996 修订。

部分细菌素可以在实际中应用，既可用于保鲜防腐 (目前仅有乳链球菌素 Nisin 进入商业应用)，也可以通过发酵剂的作用或益生菌在胃肠道内直接产生。某些细菌素可以在产品中产生 (Blom & Mortvedt, 1991; Winkowski et al., 1993; Ryan et al., 1996)，但能否在动物体内产生还不能确定。支持益生菌在体内产生细菌素的观点认为，在体内分布有多种可以产生细菌素的益生菌，产生细菌素或许是一种进化优势。自然界中约 1/3 的大肠杆菌可以产生细菌素 (Van der Wal, 1995)。另外一方面；Jiménez-Díaz 等 (1993) 发现，在他们所研究的 26 株 *Lb. plantarum* 中仅有 4 株能产生细菌素。增强益生菌对肠道黏膜的黏附性，可以提高益生菌在原位产生抗菌物质的能力。实验证明，牛初乳中含有可以使 LGG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) 对肠细胞样 Caco-2 组织培养细胞黏附作用增强 3 倍的物质 (Saarinen, manuscript)。然而，细菌素在肠道内的原位表达也存在潜在的风险，即部分肠

道正常菌群中的有益细菌也可能会受到影响 (Sanders, 1993)。

细菌素可吸附在产生菌的细胞表面, 尤其是 pH6.0 左右; 在 pH1.5~2.0 时吸附最少, 这为大量生产纯化的细菌素提供了便利的条件 (Yang, 1992)。下面将略微详细地介绍这四类细菌素 (包括产生菌、抗菌谱、分子量), 分子作用机理, 及产生菌对细菌素的免疫性。

1. 第 I 类

如表 1-5 中所讲的一样, 这类细菌素由羊毛硫细菌素组成, 这是一类含有罕见的脱水氨基酸、硫醚氨基酸 (羊毛硫氨酸和 3-甲基羊毛硫氨酸) 的小肽。这些氨基酸都是由翻译后修饰形成的。乳酸菌产生的羊毛硫细菌素见表 1-6。由乳酸菌产生的羊毛硫细菌素都属 A 型。A 型羊毛硫细菌素呈延长螺旋形, B 型主要是球型 (Sahl, 1995)。A 型还可细分为两类, A I 带弱的正或负电荷, 而 A II 带强的正或负电荷 (de Vos, 1995)。

表 1-6 乳酸菌产生的羊毛硫细菌素 (第 I 类)

羊毛硫细菌素	产生菌株	分子量	抗 菌 谱
Carnocin UI49	<i>Carnobacterium piscicola</i> UI49	4635Da	<i>Carnobacterium, Lactobacillus, Pediococcus,</i> 和 <i>Lactococcus</i>
Cytolysin L1	<i>Enterococcus faecalis</i>	4146Da	
Cytolysin L2	<i>E. faecalis</i>	2631Da	
Lacticin 481	<i>Lc. lactis</i> 481	2901Da	乳酸菌和 <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Lactocin S	<i>Lb. sake</i> 145	3769Da	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc</i>
Lactococcin	<i>Lc. lactis</i> ADRI 85L030	2300Da	<i>C. tyrobutyricum, Lb. helveticus,</i> 和 <i>Streptococcus thermophilus</i>
Mutacin	<i>Sc. mutans</i>	3245Da	
NisinA	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	3488Da	<i>Lactococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Pediococcus, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Clostridium</i> (产芽孢) 和 <i>Bacillus</i> (产芽孢)
Nisin Z	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> NIZO 22186	3453Da	同上
Salivarion A	<i>Sc. salivarius</i> 2093	2315Da	<i>Micrococcus luteus</i>
Streptococcin A-FF22	<i>Sc. pyogenes</i>	2795Da	

注: 数据来源于 Klaenhammer(1993); Jack et al. (1994); Sahl(1995)。

这里以 Nisin 为例来讨论羊毛硫细菌素的作用机制。Nisin 对革兰氏阳性菌具有广谱抗菌作用, 而大肠杆菌和其他革兰氏阴性菌仅在其细胞膜受到亚致死损害时才会受 Nisin 影响。在这种情况下 (膜损伤), 其他细菌素也可表现出对革兰氏阴性菌的抗菌活性 (Ray, 1993; Sahl, 1995; Venema, 1995)。

经过多年的研究, 已经弄清了 nisin 的各种作用机理。Nisin 主要的作用目标是细胞膜。当 nisin 与细胞膜发生作用时, 并不像其他抗菌肽一样需要膜受体。然而, nisin 的作用需要一定的膜电位 (Sahl, 1987; Bruno and Montville, 1993)。脱水氨基酸与酶的巯基发生反应可能是作用机理之一 (Gross and Morell, 1971)。Reuterin 可以干扰细胞壁的生物合成 (Linnett and Strominger, 1973; Reisinger, 1980), 还可抑制 DNA、RNA、蛋白质和多糖的生物合成。表明 nisin 可能干扰细胞的能量供给。据认为 nisin 在膜上产生小孔, 促使膜电位的消失 (Jack, 1994; de Vos, 1995; Sahl, 1995)。Nisin 对细胞裂解作用可以阳离子交换过程来解释, 因为具有强阳离子作用的羊毛硫细菌素可代替细胞自溶酶。这种酶的作用使细

胞壁变得脆弱。羊毛硫细菌素干扰细胞的能量供给，阻止细胞壁的修复。羊毛硫细菌素在膜上形成的小孔并不能使高分子量的物质通过，因此只能导致水净流入，从而引起渗透压增加和细胞裂解 (Sahl, 1995)。

产生这些细菌素的益生菌需要保护自身不受这些抗菌物质的干扰，有些靶细菌也可以对细菌素产生抗性。Klaenhammer (1993) 认为细菌中存在三类对 nisin 的抗性作用：①免疫性；②与 nisin 表达无关的非遗传抗性；③抗 nisin 的突变。

①产生菌可合成一种锚定在细胞膜外部的免疫脂蛋白 (Kuipers, 1993)，这种被称为 ABC 的外运蛋白参与羊毛硫细菌素 (前体) 的运输，同时也排斥羊毛硫细菌素使之不与细胞接触，从而使产生菌对 (Siegers and Entian, 1995; Venema, 1995)。nisin 操纵子编码的一种疏水蛋白，与大肠杆菌素 (colicin) 免疫蛋白有类似的作用机理，它可以与细菌素反应，然后关闭膜孔 (Siegers and Entian, 1995; Venema, 1995)。②许多并不产生 nisin 的革兰氏阳性菌可通过破坏 nisin 的活性，对 nisin 具有天然的抵抗力 (Harris, 1992)。Bacillus cereus 可通过还原脱水氨基酸，从而使 nisin 失活 (Jarvis and Farr, 1971; Venema, 1995)。③Nisin 抗性可由亚致死浓度的 nisin 浓度诱导而获得，产生这种抗性的机理因菌株而异 (Harris, 1992)。Klaenhammer (1993) 认为某些基因的突变是产生对 nisin 抗性的机理之一，这些基因负责编码直接或间接参与 nisin 吸附或膜穿孔的细胞组分。正如前面所讲过的那样，由于 nisin 的作用并不需要任何受体 (Sahl, 1987)，所以该假说也受到一些挑战。

2. 第Ⅱ类

从表 1-5 可以看到，第Ⅱ类包含多种细菌素，被分为三个亚类 (Klaenhammer, 1993)。他们的总定义是：小分子的热稳定性活性肽，部分第Ⅱ类细菌素的例子见表 1-7。

大多数第Ⅱ类细菌素的作用部位是细胞膜，它们可在细胞膜上形成膜孔，破坏膜的完整性。下面以乳球菌素 (lactococcin) 为例，加以详细地讨论。与 nisin 相反，乳球菌素对靶细胞的作用与细胞的能量供应无关 (Jack, 1994)。由于乳球菌素 A 仅对敏感菌株的膜泡发生作用，因此，乳球菌素 A 需要一种特异性膜受体蛋白的存在才能发挥作用 (van Belkum, 1991; 1992; Venema, 1995)。乳球菌素 A 可能形成跨膜的 α 螺旋结构，该螺旋结构具有两性特征。这些细菌素分子可像组成木桶的板一样围绕中间充满水的孔排列 (Klaenhammer, 1993; Kok, 1993; Venema, 1995)，随着细菌素浓度的不同，所形成的孔的大小也不同 (Venema, 1995)。这些孔增加了膜的通透性，使某些小分子可以流入细胞，而使吸收 UV 的物质流出细胞 (Aack, 1994)，并且使细胞膜两侧的质子驱动力消失 (Bruno and Montville, 1993)。在对其他第Ⅱ类细菌素的研究中发现，这些细菌素可抑制 RNA、DNA 和蛋白质合成；还可抑制细胞内某些必需小分子前体的运输，使这些分子渗漏到细胞外 (Venema, 1995)。

上述结果都与质子驱动力的消失有关，这是许多第Ⅱ类细菌素的共同特征 (Christensen and Hutkins, 1992; Bruno and Montville, 1993; Gonzales, 1996)。而 Lactacin B 的产生，则是受来自靶细菌的一种二聚体蛋白所诱导 (Barefoot, 1994)。如前面“小分子抗菌物质”一节中提到的那样，靶细菌的存在可刺激 *L. reuteri* 产生 reuterin。可以推想的是，其他细菌素的产生也可由靶细菌的存在而受到诱导或表达增强。与靶细菌共培养时，这些乳酸菌通过分泌细菌素，从而使自己获得竞争优势。在自然环境中可能也存在类似的情况。

表 1-7 第 II 类细菌素：乳酸菌产生的不含羊毛硫氨酸的小分子肽类细菌素

细菌素名称	产生菌株	分子量	抗菌活性
Acidocin 8912	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , and <i>Lactococcus lactis</i>
Brevicin 37	<i>Lb. brevis</i>		<i>Pediococcus dummosus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Oenococcus oenos</i>
Carnobacteriocin A	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	5100 Da	“中等”
Carnobacteriocin BM1	<i>Cb. piscicola</i> LV17B	4524.6 Da	<i>Listeria sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Carnobacterium sp.</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. parvulus</i>
Carnobacteriocin B2	<i>Cb. piscicola</i> LV17B	4969.9 Da	同上
Curvacin A	<i>Lb. curvatus</i> LTH 1174		<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i>
Gassericin A	<i>Lb. gasseri</i>		<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i>
Hiraecin S	<i>E. hirae</i> C311		<i>Listeria sp.</i>
Lactacin B	<i>Lb. acidophilus</i>	5300 Da	<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i>
Lactacin F	<i>Lb. johnsonii</i> 11088	6300 Da	<i>Lb. fermentum</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Aeromonas hydrophilia</i> (?), <i>Staphylococcus aureus</i> (?)
Lacticin 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC3147		<i>Clostridium sp.</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus sp.</i>
Lactococcin A	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> 9B4		“抗菌谱范围窄小”
Lactococcin B	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> 9B4		“抗菌谱范围窄小”
Lactococcin G	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> LMG 2018	α 1, 4376 和 β , 4109 Da	“抗菌谱范围窄小”
Lactococcin M	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> 9B4		“抗菌谱范围窄小”
Leucocin A	<i>Ln. gelidum</i>	3900 Da	“广谱抗菌作用”
Mesentericin Y105	<i>Ln. mesenteroides</i> Y105	3700 Da	“广谱抗菌作用”
Pediocin AcH(Pediocin PA-1)	<i>P. acidilactici</i> H	4629 Da	“广谱抗菌作用”
Pediocin JD	<i>P. acidilactici</i>		<i>L. monocytogenes</i>
Piscicolin 126	<i>Cb. piscicola</i>	4417 Da	
Plantaricin A	<i>Lb. plantarum</i>	>8kDa	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>E. faecalis</i>
Plantaricin C	<i>Lb. plantarum</i> 11441	3500 Da	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. sake</i>
Plantaricin S	<i>Lb. plantarum</i>	由蛋白质 α 和 β 组成	<i>Leuconostoc</i> , <i>Clostridium tyrobyticum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Propionibacterium</i>
Plantaricin T	<i>Lb. plantarum</i>	<2500 Da	<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Propionibacterium sp.</i>
Reuterin 6	<i>Lb. reuteri</i>	200 kDa	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> 和 <i>bulgaicus</i>
Sakacin A	<i>Lb. sake</i> LB 706	4308 Da	<i>Cb. piscicola</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>A. hydrophilia</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>
Sakacin P	<i>Lb. sake</i> LTH 673		<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Livanovii</i> , <i>Carnobacterium sp.</i>

与羊毛硫菌素的情况一样，第Ⅱ类细菌素产生菌可分泌免疫性蛋白保护自身不受伤害。对乳球菌素 A 的免疫性蛋白已经分离到，是一种含有两性 α 螺旋（亲水/憎水）结构、分子量为 11kDa 的蛋白质（Nissen-Meyer, 1993; Venema, 1995）。这种免疫性蛋白与乳球菌素 A 受体蛋白相作用，防止细菌素插入细胞膜（Nissen-Meyer, 1993; Venema, 1995）。Carnobacteriocin B2 的免疫性蛋白是一种分子量为 12.7kDa 的蛋白质，可干扰细菌素在细胞膜上形成具有功能的孔或阻断功能性孔的作用（Quaciri, 1995）。

3. 第Ⅲ类

第Ⅲ类细菌素是大分子热不稳定蛋白，因此，一些具有类似细菌素作用、可导致菌体裂解的胞外裂解酶（溶血素和胞壁质酸酶）也可能被包含在内（Jack, 1994）。部分第Ⅲ类细菌素例子见表 1-8。

表 1-8 第Ⅲ类细菌素：乳酸菌产生的高分子量细菌素

细菌素名称	菌株名称	分子量(kDa)	抗菌活性
Acidophilucin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		<i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. helveticus</i>
Caseicin 80	<i>Lb. casei</i> B80	40	其他 <i>Lb. casei</i> 菌株
Helveticin J	<i>Lb. helveticus</i>	37	其他 <i>Lb. helveticus</i> 菌株, <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> and <i>lactis</i>
Helveticin V-1829	<i>Lb. helveticus</i>	>10	其他 <i>Lb. helveticus</i> 菌株, <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
Lacticin A	<i>Lb. delbrueckii</i>		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>
Lacticin B	<i>Lb. delbrueckii</i>		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> 和 <i>ssp. delbrueckii</i>

Venema (1995) 把 lactacins A 和 B 归到第Ⅲ类。但它们的分子量较小，所以还是应归到第Ⅱ类。目前仅从乳杆菌属的细菌中分离到第Ⅲ类细菌素（Klaenhammer, 1993），对这些大分子细菌素的作用机理和产生菌的免疫机制还不太了解。

4. 第Ⅳ类

第Ⅳ类包含一些复合型细菌素。脂链或糖链对于细菌素生物活性的发挥是必需的。这一类细菌素并未得到广泛承认，因为其中可能包含部分经过非正常方法分离所得到的肽类细菌素（Venema, 1995; Nes, 1996）。同时，Klaenhammer (1993) 也认为在处理该类细菌素时需要非常谨慎。在验证脂链或糖链部分在该类细菌素中的作用时，必须保证所用的脂肪酶或淀粉酶未被蛋白酶污染（Klaenhammer, 1993）。表 1-9 列出了第Ⅳ类细菌素的一些例子。与第Ⅲ类一样，这类细菌素的作用机理与产生菌的免疫机制还有待进一步研究。

表 1-9 复合型细菌素：由益生乳酸菌产生的含脂肪链或糖链的细菌素（第Ⅳ类）

细菌素名称	产生菌株	特征	抗菌活性
Bacteriocin	<i>Lb. fermentus</i>	蛋白质-脂多糖复合物	其他 <i>Lb. fermentus</i> 菌株
Lactocin 27	<i>Lb. helveticus</i>	蛋白质-脂多糖复合物, MW > 300 kDa, 蛋白部分的分子量约 12400 Da	<i>Lb. acidophilus</i> 其他 <i>Lb. helveticus</i> 菌株
Leuconocin S	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	由分子量分别为 10000 和 20000 Da 的糖蛋白组成	<i>Listeria sp.</i> 其他乳酸菌
Pediocin SJ-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	糖蛋白, MW = 4000 Da	

(七) 黏附抑制剂

这类物质本身并不具有抗菌活性，但是它们可以阻止细菌对肠道内黏膜的黏附，从而减少其定殖。从这个意义上讲，黏附抑制剂也可以影响细菌的存活性（Finlay and Falkow, 1989）。

在大多数环境中，表面黏附对细菌的生存极为重要。黏附作用可以使细菌在那些否则容易被冲失的环境中生长、繁殖。在小肠中，肠液的分泌和肠自身的蠕动使小肠内容物的流动速率非常高，能达到1~2cm/s (Tannock, 1995)。因此，对肠道黏膜的黏附是细菌能在小肠定殖的前提条件。阻止细菌的黏附作用，就会大大减少它们在肠道中的生存机会。

乳杆菌 (*Lactobacillus* sp.) 和双歧杆菌的完整细胞能够阻止许多肠道病原菌和尿道病原体的黏附和入侵 (Chan, 1984; Chauviere, 1992; Bernet, 1993, 1994; Coconnier, 1993a, b)。关于乳酸菌抑制致病菌对消化道和泌尿生殖道的黏附作用在第二章中有比较详细地论述。

Chan (1984, 1985) 观察到不仅是完整的 *Lactobacillus* sp. 细胞，就连 *Lactobacillus* sp. 和白喉杆菌的细胞碎片也能在体外环境中抑制革兰氏阴性病原菌对尿道上皮细胞的黏附。脂磷壁质酸 (LTA) 在黏附中起关键作用，已经证实脂磷壁质酸是介导各种乳杆菌、双歧杆菌和部分链球菌对人上皮细胞黏附作用的黏附因子。其中，在体外和体内具有抗致病菌作用的 *Lb. johnsonii* Lal 的 LTA 位于细胞的表面。尽管由 LTA 介导的 *Lb. johnsonii* Lal 对肠细胞样 Caco-2 细胞的黏附作用与其他细菌的黏附作用一样，受到环境 pH 值的影响。但在 pH4~7 的条件下，黏附作用都可以发生 (Granato et al., 1999)。细胞碎片对尿道上皮细胞的黏附以及造成的空间障碍是黏附抑制的主要机制。

还有实验证实，*Lactobacillus fermentum* 104r 菌株可释放一种高分子量组分到上清液中，这种物质可使表达 K88ac 的 *E. coli* 对仔猪回肠黏膜的黏附作用降低 50% (Blomberg, 1993)。该组分是一种细胞壁碎片，由葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺和半乳糖组成 (Ouweland and Conway, 1996a)。这种组分对所有 K88 血清型和 *sfa* II 菌毛型 *E. coli* 的黏附具有抑制作用。其他从肠内分离到的 *Lactobacillus* sp 也产生类似的物质 (Ouweland and Conway, 1996b)。其作用机理是细胞壁碎片与黏膜糖蛋白特异性结合，产生空间立体障碍，从而阻塞致病菌的结合受体位点 (Oonway, 1996a)。

最近，Welin (1997) 发现这种细胞壁组分在体外实验中可阻止 *E. coli* 1107 菌株对大肠细胞刷状缘的黏附，减少其对回肠黏膜的穿透作用。

第三节 益生菌的分离与保存

一、益生菌的分离

各种益生菌可以通过在适当的丰富培养基或选择性培养基上反复培养的方法，从人和动物的口腔、肠道内容物和粪便中分离得到。常用的培养基如表 1-10 所示。

二、益生菌的筛选

作为益生菌的乳酸菌必须是那些被公认为安全的微生物 (GRAS 微生物)，如果使用的是不具备生物安全性有案可查的新菌种，在实际应用以前必须进行严格的毒理学和耐受性研究。作为筛选的第二个重要步骤是菌株的来源，主要是由益生菌产品的用途所决定。作为人使用的益生菌通常需要满足以下的要求：

- ① 人体来源，拥有可考证的安全和耐受记录；
- ② 能在胃酸和消化道胆汁存在的情况下存活；
- ③ 能改善肠道功能，纠正各种肠道异常症；
- ④ 产生维生素、能释放有助于食物消化、促进基本营养物资的吸收，钝化肠道内的致癌物和有毒物的各种酶；

- ⑤ 能黏附到人肠道上皮细胞、在黏膜表面定殖并能在消化道内生长繁殖；
- ⑥ 能产生抗菌物质，并且对各种人体致病菌具有广谱抗菌作用；
- ⑦ 具有能刺激免疫功能、增强宿主网状内皮细胞的防御功能。

表 1-10 益生菌的分离与培养方法

种类	通用培养基	选择性培养基	特殊添加物	培养条件
乳杆菌	MRS	SL	Cycloheximide ^a (100mg/L) 半胱氨酸 (0.05% w/v) ^b 生长因子 ^c 其他碳水化合物 ^d	10% CO ₂ + 10% H ₂ + 80% N ₂
双歧杆菌	MRS	TPY ^e	抗生素 ^f	37~40℃ 10% CO ₂ + 10% H ₂ + 80% N ₂
链球菌	链球菌基础培养基 ^g	TYC ^h	—	5% CO ₂ , 好气培养
肠球菌	心脑浸出物培养基 ⁱ	卡拉霉素七叶灵培养基 ^j	—	>3% CO ₂ , 好气培养

注：a. 抑制酵母的生长。

b. 主要是用于从肠道来源的样品分离厌氧的乳杆菌。

c. 例如肉浸出物、西红柿汁、新鲜酵母抽提物、麦芽汁、乙醇、mevalonic acid (米酒)、啤酒和啤酒汁等，主要用于增加对某些特定生活环境中乳杆菌分离的成功率。

d. 在分离异型发酵乳杆菌时，建议用麦芽糖、果糖、蔗糖或阿拉伯糖替代培养基中的葡萄糖。

e. TPY 培养基的配方：胰酪蛋白胨 (BBL), 10g; 植物胨 (BBL), 5g; 葡萄糖, 5g; 酵母抽提物 (Difco), 2.5g; Tween 80, 1ml; 盐酸半胱氨酸, 0.5g; K₂HPO₄, 2g; MgCl₂ · 6H₂O, 0.5g; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.25g; CaCl₂, 0.15g; 微量的 FeCl₃; 琼脂, 15g; 蒸馏水 1000ml。培养基经过 121℃ 灭菌 15 分钟以后，pH 值在 6.5 左右。样品稀释时，可以采用相应的液体培养基。

f. 在部分情况下，使用 Kanamycin, neomycin, paramomycin, 丙酸钠、LiCl、抗坏血酸或叠氮钠可以提高分离的选择性。

g. 链球菌基础培养基的组成：Proteose peptone, 20g; 酵母抽提物, 5g; NaCl, 5g; Na₂HPO₄, 1g; 葡萄糖, 5g; 蒸馏水 1000ml。溶解后将 pH 调至 7.6, 121℃ 灭菌 15 分钟。

h. 心脑浸出物培养基组成：小牛脑浸出物 (固体), 12.5g; 牛心浸出物 (固体), 5.0g; Proteose peptone, 10.0g; 葡萄糖, 2.0g; NaCl, 5.0g; Na₂HPO₄, 2.5g; 蒸馏水 1000ml。溶解后将 pH 调至 7.4, 121℃ 灭菌 15 分钟。

i. TYC 培养基的组成：胰酪蛋白胨, 15.0g; 酵母抽提物, 5.0g; L-半胱氨酸, 0.2g; Na₂SO₃, 0.1g; NaCl, 1.0g; NaHCO₃, 2.0g; Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.0g; 乙酸钠 (含三个结晶水分子), 20.0g; 蔗糖, 50.0g; 蒸馏水 1000ml。溶解后将 pH 调至 7.3, 121℃ 灭菌 15 分钟。

j. 卡拉霉素七叶灵培养基组成：胰蛋白胨, 20g; 酵母抽提物, 5g; NaCl, 5g; 柠檬酸钠 1g; 七叶灵 (aesculin), 1g; 柠檬酸铁铵, 0.5g; 叠氮化钠, 0.15g; 硫酸卡拉霉素, 0.02g; 蒸馏水 1000ml。煮沸使之溶解后, 121℃ 灭菌 15 分钟。

在分离和筛选人用的益生性乳酸菌时，通常遵循以下的标准：来源于人、能在胃酸和消化液（主要是胆汁的影响）中存活，能黏附到消化道黏膜、至少能暂时性的定殖于人的胃肠消化道，能产生抗菌物质、对人体病原菌具有一定的抗菌作用，在人体中使用的安全性。新的益生菌菌株的筛选流程如图 1-8 所示。绝大多数目前所使用的益生菌都是按照类似的流程筛选出来的。然而，现在有人对该筛选方式提出质疑，主要的争议在于将对消化道上皮细胞和或黏膜的黏附能力作为一项筛选指标是否合适，因为黏附作用是致病菌引发对人感染的关键步骤之一。目前使用最多的是乳杆菌和双歧杆菌，它们可以用于发酵乳、蔬菜、肉制品生产，也可以活菌的形式添加到乳、饮料或制成各种活菌制剂使用。已有多项研究结果表明，这些益生菌至少能暂时性地定殖于人的胃肠消化道。在筛选新的益生菌时，着重考虑以下几个方面：

(1) 免疫学评价 与消化道黏膜相关的淋巴组织 (GALT) 是人体内最大的免疫器官，能与进入体内的黏附性益生菌发生长时间的接触，而益生菌对黏膜的黏附是激发免疫作用的途径之一。益生菌的免疫激活功对人急性胃肠炎的发生有预防和稳定作用，而且在研究其对大肠癌或膀胱癌的治疗作用时所观察到的益生菌的功能也与其免疫调节作用有关，因此，对

于潜在的益生菌菌株，需要进一步研究其有益的免疫调节功能，并将体外试验获得的结果与人体临床试验结果进行比较。

(2) 产生抗菌物质 乳酸菌通常能产生包括细菌素、类细菌素物质、抗生素、短链脂肪酸（如乙酸、乳酸等）和 H_2O_2 等在内的一系列抗菌物质，这些物质有助于提高益生菌对胃肠道原有菌群的竞争力，增强益生菌的定殖的能力。

(3) 黏附能力 对于益生菌的部分应用领域而言，益生菌对小肠细胞的黏附作用非常重要。在新的筛选标准中，要求至少用 2 种不同的方法来研究益生菌对人肠细胞株或人回肠/肠黏膜的黏附作用。

(4) 工艺方面的要求 很显然，益生性乳酸菌在食品中的应用还需要满足某些加工工艺的要求，如能达到比较高的活菌浓度、不需要苛刻的生长条件、能形成令人愉悦的风味与滋味等，这些特点对于生产功能性食品非常重要。此外，益生性乳酸菌在连续化培养或工业生产过程中作为菌种的遗传稳定性，以及食品贮藏、运输过程中存活性能也是不容小视的问题。

(5) 新增选择标准 除其他的免疫学评估指标外，新增的一些指标主要是以周围血液淋巴细胞或吞噬细胞的活化作用来衡量益生菌对免疫功能的增强或抑制作用，估计今后在这方面出现更多新的选择标准。

(6) 安全性 这是益生性乳酸菌在临床或功能食品中应用时首先需要考虑的，一般来说，乳酸菌拥有长期安全使用的历史，到目前为止还未出现影响较大的问题。尽管关于不同

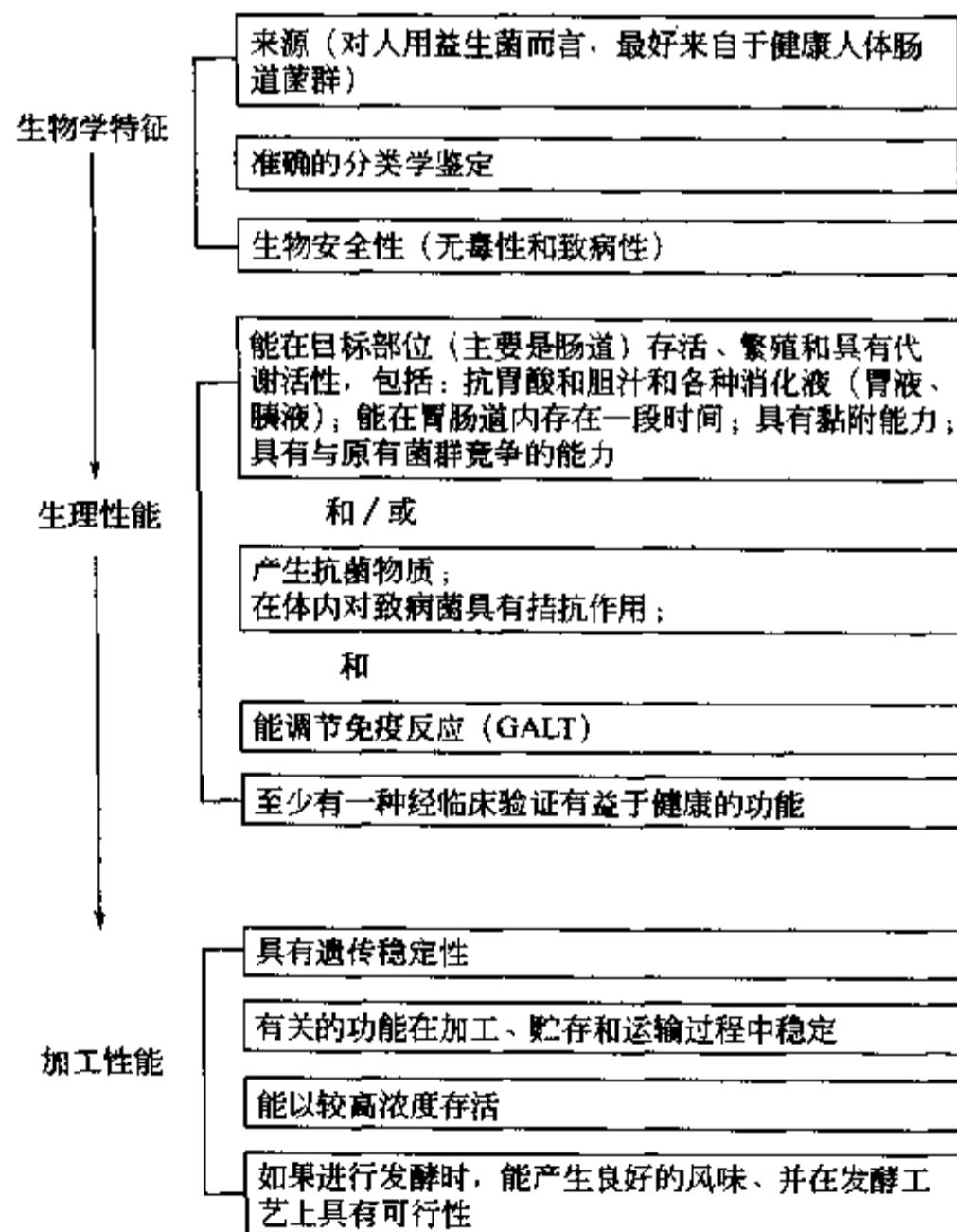


图 1-9 益生菌的筛选标准与流程

表 1-11 益生菌的保存

益生菌种类	保存的期限	培养基及方法	保存时所采用的细胞生长阶段	保存温度(°C)	冷冻保护剂	移种频率
乳杆菌	短期	MRS 琼脂穿刺培养	指数生长前期	4~7	MRS 琼脂	每周一次
	短期	MRS 琼脂斜面	指数生长前期	-20	MRS 肉汤(液体培养基)	半年一次
	长期	MRS 液体培养	指数生长后期	冷冻干燥后, 5~8 保存	脱脂奶或马血清 + 7.5% 葡萄糖	10~20 年
双歧杆菌	短期	MRS 肉汤培养基加 0.5% 琼脂, 穿刺培养	指数生长前期	3~4	MRS 肉汤培养基加 0.5% 琼脂	两周一次
<i>Bifid. thermophilum</i>	短期	MRS 琼脂斜面在补充 10% CO ₂ 的空气中培养	指数生长前期	3~4	MRS 琼脂斜面	两周一次
链球菌	短期	合适培养基的斜面或穿刺管或石蕊牛奶 + 10% CaCO ₃ + 0.3% 酵母抽提物 + 10% 葡萄糖	指数生长前期	4	培养时所用的培养基	每周一次
	长期	合适的培养基	指数生长前期	10	石蕊牛奶	每周一次
	长期	合适的培养基	指数生长后期	-80 深度冷冻或液氮保存	1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母抽提物 0.1% 葡萄糖, 0.1% 盐酸半胱氨酸或 2% 牛血清	半年一次
肠球菌	短期	石蕊牛奶 + 1% CaCO ₃	指数生长前期	冷冻干燥后, 5~8 保存	脱脂奶或血清	10~20 年
	长期	合适的培养基	指数生长前期	冷冻干燥后, -20 保存	石蕊牛奶 + 1% CaCO ₃ 营养肉汤 + 灭活马血清 + 葡萄糖	3 个月一次 2 年一次

乳酸菌发生人体浸染的报道有多例，但这些菌株几乎全部是人肠黏膜中最常见的那几种。而乳品来源的菌株具有良好的安全记录，Salminen 等 (1998) 对目前主要益生菌的安全性进行了综述。在今后对益生性乳酸菌的研究中，这必须是首要的选择标准，而且所筛选到的菌株必须符合所有的法规。

根据前而所提到的情况，Mercenier 等在 2002 年认为理想的益生菌应符合以下的要求 (图 1-9)。

三、益生菌的保存

尽管对于特定的菌株而言，可能存在特殊的保存方式和条件。但是，对于大多数的益生菌而言，通常可以按表 1-11 所列的条件与方法进行。

第四节 乳酸菌的分子遗传和基因工程

自 20 世纪 70 年代发现乳球菌 (当时被分为 N 群链球菌) 的许多基本功能与质粒有关以后，开始对乳酸菌的分子遗传学进行大规模的研究。不久即建立了在乳球菌体外和体内进行基因转移技术，研究的范围随即扩大到其他的乳酸菌。在 20 世纪八十年代，对许多具有重要工业价值的乳酸菌种的重组 DNA 技术已经出现，与乳糖代谢有关的基因和编码蛋白酶的基因被克隆和在分子水平上进行分析。

在过去十年里，在乳酸菌分子遗传学领域的研究取得了飞速的进展。乳酸菌染色体及与质粒相关的基因的结构与功能被进一步阐明，并绘制出第一张完整的基因组图谱。乳酸菌作为外源基因表达载体的作用受到广泛的重视与研究。

一、乳酸菌的质粒

1972 年，由 L. L. McKay 领导的研究小组观察到，在部分乳球菌中，会出现自发性地或由吡啶黄诱导的乳糖发酵作用的丧失，表明乳球菌对乳糖的代谢作用与质粒有关。在 Cords 等证实了乳球菌这种染色体以外 DNA 的存在 (Cords et al., 1974) 后，不久即从各种乳酸菌中分离出多种质粒并确定了其功能。在总结他人和自己研究结果的基础上，McKay (1983) 认为在大多数或部分被研究过的乳球菌中，下列表型性状是由质粒控制的：对乳糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、木糖对于部分菌株而言甚至包括葡萄糖的发酵作用；蛋白水解作用；柠檬酸作用；抗噬菌体感染作用、DNA 的限制与修饰；细菌素的表达；胞外黏液的分泌；以及对无机离子的耐受也可能由质粒控制。值得注意的是，许多由质粒控制的性状是其在乳品工业中应用所必需 (如乳糖代谢、蛋白水解) 或非常有益的。此外，乳球菌菌株细胞内通常还含有多种大小在 1 至超过 100kbp (千碱基对) 的隐秘质粒。

在随后的研究中，发现 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 和 *Streptococcus thermophilus* 中也存在各种质粒，尽管这些质粒对上述乳酸菌代谢的重要性不及它们对乳球菌作用。

(一) 与糖发酵和蛋白水解有关的质粒

1. 乳球菌中的质粒

乳球菌通过依赖于磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 的磷酸转移酶系统代谢乳糖。乳糖以 6-磷酸乳糖的形式进入细胞，随即在磷酸 β -半乳糖苷酶的作用下被分解成 6-磷酸半乳糖和葡萄糖。葡萄糖进一步通过糖裂解途径 (Embden-Meyerhof 途径) 被代谢，而 6-磷酸半乳糖则首先被转化成塔格糖二磷酸，然后被分解成两个磷酸丙糖，进入正常的糖裂解途径。

乳球菌的各种蛋白酶与细胞壁相连，彼此之间的组成与功能非常相似，它们是产生和运

送乳球菌生长所需小肽的蛋白降解途径的重要组成部分（见氮代谢一节）。

对乳球菌的乳糖发酵方式和蛋白水解体系已经在生物化学和分子生物学水平上进行了深入的研究，从分子水平上来讲，这两种特征可能是乳球菌所有生理特征中研究最彻底的。

2. 乳杆菌的质粒

尽管大多数乳球菌的乳糖代谢通过由质粒编码的 PEP-磷酸转移酶系统进行，但在乳杆菌中有所不同。除 PEP 磷酸转移酶系统外，一种乳糖透性酶体系也比较常见。在乳糖透性酶途径中，乳糖在乳糖透性酶的作用下，直接以乳糖的形式进入细胞，随后被 β -半乳糖苷酶所分解， β -半乳糖苷酶是该途径的关键酶。在乳杆菌中，乳糖代谢由质粒控制的现象不如乳球菌中普遍。然而，在部分乳杆菌中，还是观察到乳糖代谢由质粒控制的现象。

一株进行同型发酵的 *Lb. casei* 的细胞内获得了编码依赖于 PEP 的乳糖磷酸转移酶的质粒。在 *Lb. casei* 64H 中，乳糖代谢是由一个 35kb 的 pLZ64 所控制的，并且相关的基因块 (gene block) 已经在 *E. coli* 中进行了克隆。在一株 *Lb. helveticus* 中，6-磷酸- β -半乳糖苷酶由质粒 pLY101 (68.2kb) 编码，而 PEP-乳糖磷酸转移酶系统的其他酶则由染色体 DNA 所编码。（该种乳酸菌对 *N*-乙酰-D-葡萄糖胺的利用似乎也是由质粒编码，至少在部分菌株中如此）。在 *Lb. acidophilus* TK8912 中，6-磷酸- β -半乳糖苷酶的基因和塔格糖二磷酸途径的关键酶的基因分别由两个不同的质粒编码 (Kanatani et al., 1992)。

在部分 *Lb. casei* 菌株中， β -半乳糖苷酶的基因由质粒编码可作为由质粒编码的乳糖透性酶途径的代表。此外，*Lb. helveticus* C3.8 中 β -半乳糖苷酶的基因也是由质粒编码的。根据杂交试验的结果，这种特殊的基因也存在于其他 *Lb. helveticus* 菌株中 (Mayo et al., 1994)。

在乳杆菌中，蛋白酶活性由质粒控制的现象并不常见，尽管至少有一株 *Lb. helveticus* 菌株的蛋白水解活性是由一个 5.5kb 的质粒所编码。

3. 其他乳酸菌的质粒

部分明串珠菌在某些情况下，其乳糖代谢也是由质粒控制。在 *Ln. mesenteriodes* sbsp. *mesenteriodes* 中， β -半乳糖苷酶的基因由一个大小为 47.3kb 的质粒编码。经过对 *Ln. lactis* 利用乳糖的作用进行深入的分子生物学研究后，发现其 β -半乳糖苷酶的基因和乳糖透性酶的基因存在于同一质粒上。然而，它们并不组成一个操纵子。相反， β -半乳糖苷酶由两个部分重叠的基因，lacL 和 lacM 所编码。此外，其分子排列和 β -半乳糖苷酶基因的序列组成几乎与 *Lb. casei* 中由质粒编码的 β -半乳糖苷酶基因完全相同 (David, 1993)。

棉子糖（或蜜三糖）作为乳糖以外其他可发酵碳水化合物的代表，其发酵作用与相对较大的质粒 (36.2~47.3kb) 相关，至少在三株 *Pediococcus pentosaceus* 中是这样的。

(二) 与芳香物质产生相关的质粒

双乙酰是乳品中一种重要的芳香物质（“奶油味”）。作为乳品发酵剂的乳酸菌，*Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 和部分明串珠菌能从柠檬酸产生双乙酰（详情见第二节）。该途径中的关键酶是柠檬酸透性酶，后者介导柠檬酸从细胞外吸收到细胞内的过程。

在很早的时候就发现 *Lc. lactis* 的柠檬酸透性酶基因与一种小的质粒（大约 8.7kb）有关，后来在部分明串珠菌中也发现该基因是由质粒编码的。对明串珠菌和乳球菌的柠檬酸透性酶进行分子水平的分析后，发现两者之间具有高度的同源性，表明有关质粒在这两种乳酸菌之间转移的时间相对较晚。

(三) 与细菌素表达有关的质粒与宿主对细菌素的抗性

细菌素是细菌产生的抑制其他细菌生长的一些蛋白类物质或小肽。乳酸菌能产生多种抑制其他革兰氏阳性菌(其他种或菌株的乳酸菌、梭状芽孢菌、*Listeria*等),Klaenhammer(1993)将这些细菌素分成4大类。I类是羊毛硫细菌素,含有一些特殊的氨基酸(羊毛硫氨基酸与其衍生物),实际应用较多的乳球菌所产生的细菌素、包括Nisin在内都属于I类细菌素;其他的类群是热稳定性肽类细菌素(II类)、热不稳定性蛋白类细菌素(III类)和由蛋白质与其他化学基团(脂或糖)组成的复合型细菌素(IV类)。在许多乳酸菌中,细菌素的表达及细菌对细菌素的抗性都与质粒有关。

1. 乳球菌中由质粒编码的细菌素

(1) *Diplococcin*。这是最早被发现是由质粒(81kb)编码的乳球菌细菌素之一,该质粒(81kb)是一种结合性质粒。不过,后来没有对该质粒进行更深入的分子生物学研究。

(2) 羊毛硫细菌素类的细菌素。尽管早期的研究结果曾认为nisin的表达是由质粒编码的,现在非常清楚地了解到nisin的表达和宿主对其的免疫性由染色体上可转移性的基因编码。不过,与宿主另一种由质粒编码、抗nisin的作用机制有关的基因被分离到,并且这种抗性基因被成功克隆。

(3) *Lactococcins*。这是一类作用于其他乳球菌、热稳定性的非羊毛硫细菌素的肽。对两种与这类细菌素表达有关的质粒进行了详细地研究,其中大小为133-kbp的pNP2质粒来源于*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 346,另一种大小为60-kbp的来源于*Lc. lactis* subsp. *cremoris* 9B4。当由pNP2质粒编码的细菌素基因被克隆到一种高拷贝数的载体以后,所产生的细菌素的量与该基因的拷贝数呈现基因剂量效应。随着基因拷贝数的增加,重组子的拮抗作用质粒p9B4-6也相应提高;在质粒p9B4-6中,编码细菌素的基因与宿主自身的抗性基因位于两个不同的区域。其中一个区域(与低拮抗作用有关)含有该细菌素的两个阅读框架,这两种阅读框架联合起来仅能产生所谓的乳球菌素-M活性;另一个区域(与高拮抗作用有关)负责编码乳球菌素-A和乳球菌素-B,进一步研究后发现编码乳球菌素-A的基因来源于pNP2质粒。

2. 杆菌中编码细菌素的质粒

乳杆菌所产生的细菌素主要作用于其他乳酸菌,其中一部分染色体所编码,一部分则由质粒编码(Klaenhammer, 1993)。Lactocin S是*Lb. sake* 145所产生的一种羊毛硫细菌素,由一个大小为50kbp的质粒pCIM1编码;*Lb. johnsonii* VPI11088(以前的分类名称为*Lb. acidophilus* 88)所产生的lactacin F,则可作为由染色体外可转化性的遗传片段所编码的细菌素的代表。当该菌株在转化试验中作为供体时,转化结合子对lactacin F的表达与大小可变的(58~62kbp)的不稳定性质粒有关。该质粒可以通过整合到染色体上而使自身稳定。乳杆菌中其他与细菌素表达及宿主对细菌素抗性有关的质粒有:部分*Lb. acidophilus*菌株产生acdin 8912或acidin B的作用与细胞内一种大小为14kbp的质粒(分别命名为pLA103和pCV461)有关,而*Lb. sake*对sakacin A的表达则与一个60kbp的质粒有关。

3. 片球菌质粒

各种片球菌素(pediocin(s))是*Peddiococcus pentosaceus*和*P. acidilactici*所产生的一类细菌素,对包括其他乳酸菌在内的革兰氏阳性菌具有广谱抑菌作用。*P. pentosaceus*对pediocin A的表达可能是由质粒编码的,至少在部分菌株中如此。不过,更多的注意力放在了对pediocin A同一家族的细菌素PA-1, Ach和Bac的研究上。通过深入的研究,已经阐

明了 *P. acidilactici* 中细菌素表达的遗传位点、宿主对细菌素的抗性、细菌素的运输以及这些基因在质粒中的出现情况的问题。*P. acidilactici* 中另一种与质粒相关的细菌素 pediocin SJ-1 非常特别, 能被 α -淀粉酶失活, 表明该细菌素的本质为糖蛋白。

4. 其他乳酸菌中与细菌素相关的质粒

部分 *Leuconostoc* 和 *Carnobacterium* 也可以产生在食品中具有应用潜力的细菌素, leucocin A 和 mesentericin Y105 是两种分别由 *Ln. gelidum* UAL187 和 *Ln. mesenteroides* 105 所产生的结构非常相似的非羊毛硫细菌素。对 leucocin A 的表达、转位和宿主的免疫性的遗传学分析, 都是建立在对 *Ln. gelidum* UAL187 质粒 DNA 一个 8-kbp 片段克隆研究的基础上 (van Belkum and Stiles, 1995)。在对 *Ln. mesenteroides* 105 中一个与 mesentericin Y105 表达有关的 35kbp 质粒的相关基因进行克隆后, 对 mesentericin Y105 的表达系统进行了类似的遗传学研究 (Fremaux et al., 1995)。

carnobacteriocin A 和 B 是 *Carnobacterium piscicola* LV17 所产生的两种羊毛硫细菌素以外的细菌素, 其表达分别与一个 60-kbp 的质粒 Pcp40 和 74-kbp 的质粒 Pcp49 有关。尽管这两种细菌素都存在三种活性形式, 但遗传学分析表明, carnobacteriocin A 由单一基因编码, 其不同的活性形式来源于分子上甲硫氨酸残基的氧化或者翻译后的原始 carnobacteriocin A 分子受到不同的蛋白水解修饰作用所引起。

(四) 质粒介导的噬菌体抗性

在乳酸菌、尤其是乳球菌中, 某些质粒的存在可以提高宿主对噬菌体浸染的抵抗能力。乳酸菌对噬菌体的抗性有三种基本方式: 抑制噬菌体吸附、限制/修饰系统 (R/M) 以及流产感染 (使感染的噬菌体不能在细胞内繁殖)。在乳球菌中, 已经发现至少有 10 种以上的质粒与其抗噬菌体感染有关。下面仅对两种研究比较系统、能提供多重抗噬菌体感染作用的质粒加以介绍。

1. 与质粒 pNP40 相关的防御噬菌体的作用机制

Lc. lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DRC3 细胞内存在一种 65-kbp 的结合性质粒 pNP40, 该质粒可传递对 nisin 的抗性以及使宿主不被裂解性 (烈性) 噬菌体 c2 所攻击。这种保护作用来自于两个方面: ①阻止噬菌体吸附; ②至少存在两种流产感染机制 (Gavrey et al., 1995)。最近的研究结果表明, pNP40 质粒还能编码一种以前未被发现的新的抗噬菌体感染机制, 它能使噬菌体感染早期对细胞的穿刺作用被阻碍 (Gavrey et al., 1995)。

2. 由质粒 pTR2030 编码的限制-修饰 (R/M) 系统和流产感染机制

Lc. lactis subsp. *lactis* 对抗噬菌体浸染具有特别强的抵抗作用, 其细胞内有一个 46-kbp 的质粒 pTR2030, 负责编码一种限制-修饰 (R/M) 系统和流产感染机制, 质粒上编码限制-修饰 (R/M) 系统的基因为 *LlaI*, 后来被单独克隆, 从分子水平对其进行了研究。

乳酸菌其他由质粒决定的表型性状包括胞外黏质的产生、对抗生素的抗药性以及对抗紫外辐射的抵抗能力都与某些质粒的存在有关。例如, 在多株从猪体内分离到的 *Lb. reuteri* 菌株中发现了与其抗红霉素有关的质粒, 其中一株菌中负责编码抗红霉素作用的区域位于一个 11-kbp 的质粒 pLUL631, 该基因后来在 *E. coli* 和 *Lc. lactis* 中被克隆与表达。

(五) 隐秘质粒

隐秘质粒是指那些对宿主表型形状没有明显影响的质粒, 在所有的乳酸菌中都发现了隐秘质粒的存在, 这些质粒中的一部分被用来构建克隆载体 (见后文)。在 *Streptococcus thermophilus* 中存在一种大小为 6.9-kbp 的隐秘质粒 pA33, 该质粒非常特别, 它既能整合到染

染色体上，又能从染色体上被重新切除。获得该质粒的宿主的形态和生长特征在一定程度上取决于该质粒是作为染色体外物质存在还是以整合形式存在。质粒 pA33 核酸序列已经被测定出来，含有 5 个开放性的阅读框架 (ORFs)。

(六) 质粒的复制机理

质粒的复制有两种基本方式，即滚环机制和 θ 型复制。由于质粒的宿主范围、稳定性和不亲和性 (不相容性) 等与其复制方式存在直接的联系，有必要适当地加以阐述。

在滚环复制方式中 (可进一步参考 Gruss & Erlich 等的综述, 1989), 首先在所谓的复制正起始点 (+) 产生单链缺口, 复制正起始点紧靠编码复制起始蛋白的基因。复制从缺口开始, 沿着一条链进行, 而将另一条链抛在一边。经过一轮复制后, 产生一个双链的质粒, 和从复制链上切下的一个环形单链中间体。由后者取代在前一轮复制中作为模板的 DNA 链而成为新的模板链, 新一轮的复制从该单链分子的所谓复制负起始点 (-) 开始, 最终形成第二个双链的质粒 DNA 分子。该复制过程的示意图见图 1-10。从不同种和属的细菌来源的质粒, 其复制正起始点具有高度的同源性, 而复制负起始点则具有一定的属特异性。采用滚环复制的质粒通常可存在与多种宿主内, 尽管在那些不能正确识别复制起始点的宿主细胞内会造成大量单链 (质粒) DNA 分子的积累。

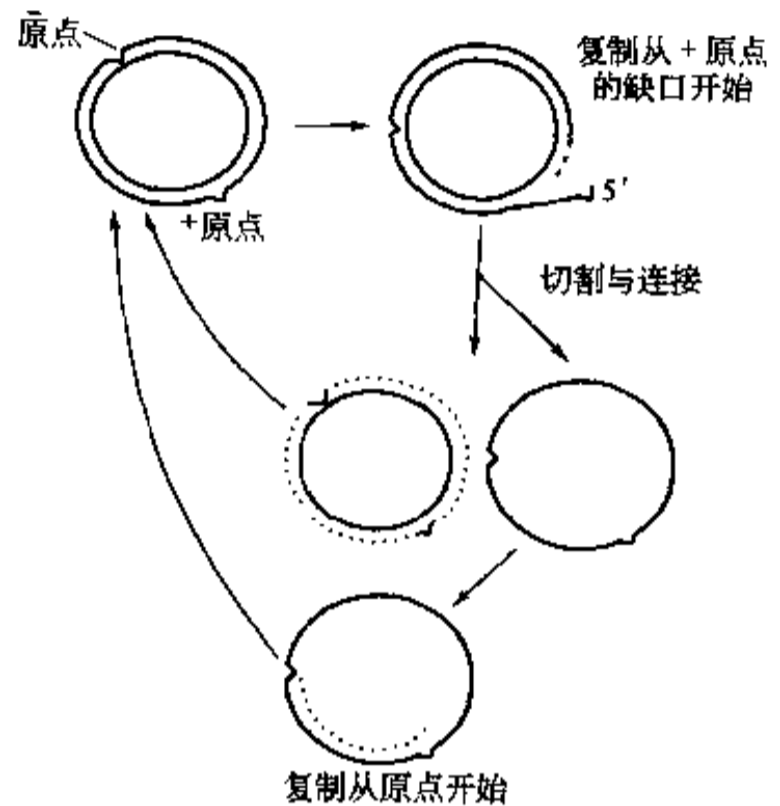


图 1-10 质粒的滚环复制方式

θ 型复制则是从复制叉开始, 同时开始两条新链的合成。复制过程既可以单向进行, 也可以双向进行, 不会出现单链延伸的情况。

1. 采用滚环方式复制的质粒

两种小的、被用来构建克隆载体的乳球菌质粒 pWV01 和 pSH71 即采用滚环方式复制, 后者的复制正起始点与葡萄球菌内编码红霉素抗性的质粒 pE194 的正起始点非常相似。这些质粒除了能在多种革兰氏阳性菌内复制外, 还可以在 *E. coli* 中复制。

尽管这些乳球菌小质粒具有相似的复制方式及其复制区域组成与葡萄球菌内负责编码红霉素抗性的小型质粒如 pE194、pC194 具有同源性, 但后两种质粒通常不能在乳球菌中复制。然而, pC194 质粒 (氯霉素抗性质粒) 复制区域的一个碱基对突变, 就可以扩大该质粒的宿主范围, 使之能在乳球菌中复制 (von Wright & Saarela, 1994.)。很显然, 该突变增大了控制复制起始基因转录的启动子的强度。

在明串株菌、乳杆菌和 *S. thermophilus* 中也发现了可以进行滚环复制的隐秘质粒。

2. θ (theta)-型复制质粒

乳酸菌中进行滚环复制的质粒主要是一些分子较小、宿主范围广的隐秘质粒。在过去几年的研究中发现, 中等至大分子的乳球菌质粒则采取 θ (theta)-型方式复制。这些质粒包括控制某些代谢途径的质粒、如分别负责编码乳糖发酵有关酶或乳糖发酵-蛋白酶的质粒 pSK11L 和 pUCL22, 柠檬酸透性酶质粒 pSL2, 噬菌体抗性质粒 pCI528 (Lucey et al., 1993) 和 pJW563 (Graven et al., 1995)。其他的例子是一些隐秘质粒及其衍生物, 如质粒

pVS40, pCI305 和 pWV02。在采取 θ (theta)-型方式复制的天然质粒中, 质粒 pWV02 的分子量显得特别小 (3.8-kbp)。与采取滚环复制的质粒相比, 采取 θ (theta)-型方式复制的质粒的宿主范围小得多。

前面所提到的质粒, 各自复制区域的序列组成彼此之间具有相当大的同源性。在复制蛋白基因 (repB) 的前方, 是一段富含 AT 复制起始点 (repA)。一个另人惊奇的特征是, 在紧邻基因 repB 的启动子前方存在 3 个完整和一个不完整的由 22 个碱基对组成的直接重复序列, 该序列的组成通常为 TATANNNN (A/T) NAAAAA (A/T) C (T/G) TC。此外, 还经常两个翻转重复序列, 其中一个位于基因 repB 的 -10 区域和起点之间, 以及在由 22 个碱基对组成的直接重复序列的上游存在 2 个富含 AT 的短重复序列 [9 至 10 个碱基对 (bp)]。

二、乳酸菌的染色体遗传学

由于在乳酸菌中多数使人感兴趣的表型性状通常都是由质粒所控制, 因此, 对质粒的研究在乳酸菌遗传学中占据了主要的地位。不过, 情况在发生变化。随着 DNA 重组技术和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术的发展, 尤其是后者可以用来分离数百个 kbp 大小的 DNA 片段, 对细菌染色体的物理结构以及遗传结构分析变得相对容易。

(一) 与重要代谢途径中相关得染色体基因

与其他所有得生物一样, 乳酸菌基本的代谢和生物合成途径由染色体编码。其中部分生理功能如糖代谢或蛋白水解作用, 可能同时牵涉到染色体和与质粒相关的基因。其他部分或完全由染色体基因控制的代谢过程如蛋白质的翻译等则不在本章叙述的范围之内。

1. 与葡萄糖代谢有关的基因

乳酸菌中多个参与乳酸合成的染色体基因已经被克隆和进行遗传学分析, 然而目前研究比较透彻的是乳球菌的有关基因 (Davidson et al., 1995)。

尽管乳球菌代谢乳糖的关键酶是由质粒编码, 但从葡萄糖 (乳糖在磷酸- β -半乳糖苷酶的作用下分解而来) 到乳酸这一过程中间的酶则由染色体编码。染色体上 3 个分别编码该代谢途径中的磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的重要基因 pfk, pyk 和 ldh 组成了一个操纵子 (operon) 体系, 乳酸合成过程中其他的一些基因, 如编码磷酸丙糖异构酶的 tpi 和编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶的 gap 基因, 则是单顺反子 (Cancilla et al., 1995)。

2. 与氨基酸合成的有关的基因

通过对相应的 *E. coli* 或 *Bacillus subtilis* 营养突变株生长过程中所需氨基酸的补充试验, 已经阐明了乳球菌中多种氨基酸的生物合成途径。通过该方法发现, 在组氨酸合成途径中存在 14 个开放性的阅读框架, 其中的 12 个构成了一个操纵子。采用同样的方法确定了亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸合成过程中的 9 个结构基因以及色氨酸生物合成过程中的 7 个基因。

(二) 染色体的物理和基因图谱

脉冲场电泳 (PFGE) 可用于大片段 DNA 的分离, 与在染色体上仅能产生少数切点的 DNA 限制酶结合, 可以用来构建整个细菌染色体 DNA 的限制酶图谱。通过探针与 DNA 限制片段的杂交, 则可以构建基因图谱。

1. 乳球菌的染色体图谱

1992 年, Le Bourgeois 构建了第一张完整的 *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 的染色体的物理与基因图谱 (图 1-11)。后来, 将该图谱与 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 的染色体

图谱进行比较后，发现在 MG1363 的染色体中存在大量的倒置序列 (Le Bourgeois et al., 1995)。总体而言，如果对这两个亚种的染色体进行比较的话，后者的染色体呈现一种镶嵌结构。

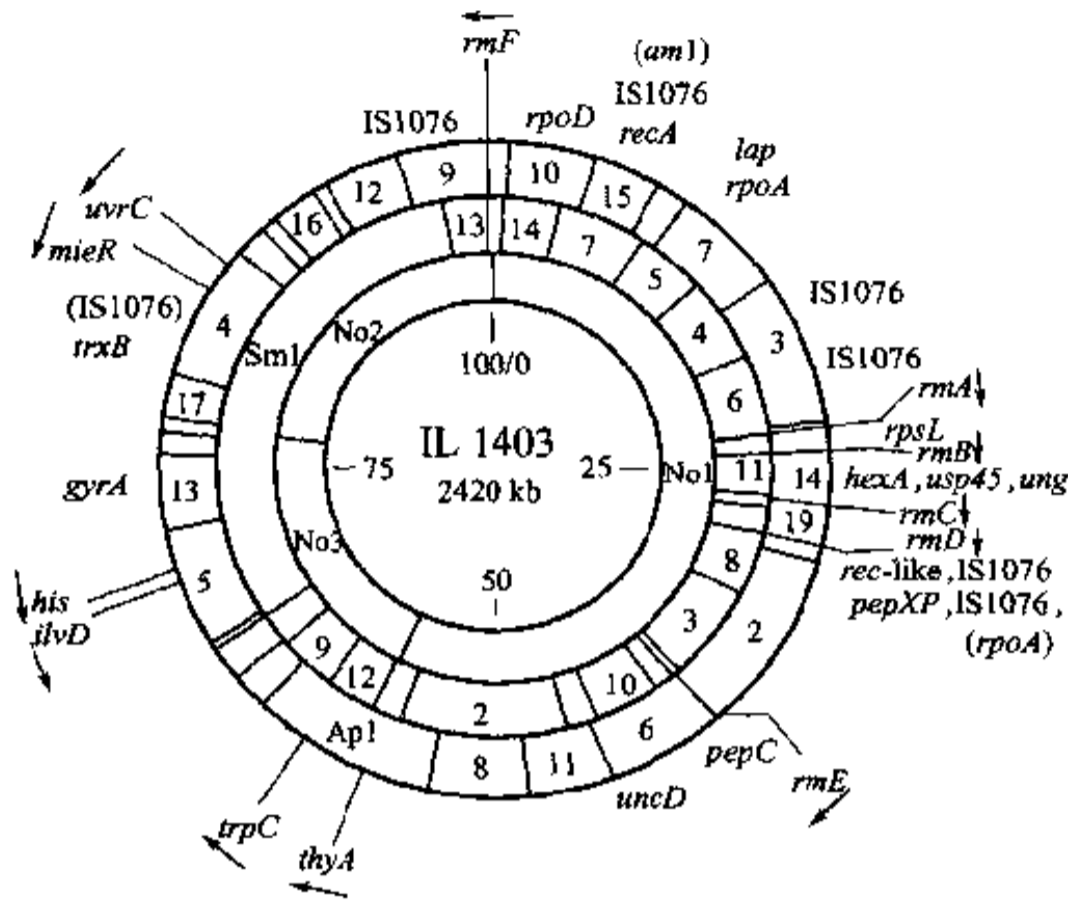


图 1-11 Le Bourgeois 构建的 *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL1403 的染色体的物理与基因图谱

2. 其他乳酸菌的染色体图谱

S. thermophilus A045 的染色体物理与基因图谱已经发表 (Roussel et al., 1994)，该染色体大小为 1824-kbp，在其环形限制酶图谱上存在 23 个基因标记。

采用 PFGE 的方法测定的 *Lb. acidophilus* 和 *Lb. gasseri* 染色体大小分别为 1850-kbp 和 2020-kbp，而 *Lb. plantarum* 的染色体显然要大一些，约为 3300~3400-kbp (Chevallier et al., 1994)。

三、乳酸菌中的基因转移

乳酸菌自发性的基因转移方式包括由噬菌体介导的遗传物质交换 (转导) 和通过细胞与细胞接触引起的遗传物质从供体细胞到受体细胞的交换 (结合) 两种方式。在生理条件下的转化、或者受体细胞对裸露 DNA 的摄取作用，在目前所研究的种或菌株中还未观察到。体外转化技术，主要有聚乙烯醇 (PEG) 介导的 DNA 对细菌原生质体的转化以及通过对原生质体或完整细胞电穿孔后进行 DNA 转化两种方式。通过体外转化方式，使重组 DNA 技术可以在乳酸菌中应用。

(一) 体内基因转移

1. 转导 (transduction)

对乳球菌的第一次转导试验采用的是一种烈性噬菌体。自从发现乳球菌中“溶原”现象普遍存在以后，温和噬菌体就成为转导试验的主要工具。这些温和噬菌体被用来转化乳球菌与乳糖代谢有关的基因，随即发现蛋白酶基因也可被转导。在转导试验中发现乳糖代谢基因和蛋白酶基因可以整合到部分转导子的受体染色体上，并成为转导子稳定的性状。

在乳球菌中，无论是染色体基因还是质粒上的基因都可以被转导。当使用大的代谢质粒进行转导时，转导的频率可显著提高，尤其是转导裂解体来自于第一代转导子时（转导子在分裂的过程中会逐渐丢失外来基因）。这主要是在转导时，为了使被转导基因能被噬菌体头部包装，噬菌体对被转导基因存在一个切短的过程。

在乳球菌以外的乳酸菌中进行成功转导试验的研究报道非常少，不过对 *S. thermophilus* (Mercenier et al., 1988) 和 *L. acidophilus/gasseri* 中质粒的转导已经成功 (Raya & Klaenhammer, 1992)。

2. 结合

在前面已经提到过在乳球菌中存在一类抗噬菌体感染的结合性质粒，结合作用在遗传分析和菌株构建中是一种非常有用的技术。下面仅以少数例子来说明该技术替代体外 DNA 重组技术在遗传分析中的应用。

(1) 乳球菌乳糖质粒转移、细胞凝集表型和性因子的作用。在多株乳球菌中以及其他乳酸菌中都可以观察到乳糖发酵质粒的结合性转移现象，目前研究最为清楚的是 *Lc. lactis* 712 和 ML3 中的这种结合转移作用。

(2) 尽管以 *Lc. lactis* 712 和 ML3 作为供体时，能利用乳糖的转导结合子出现频率非常低，但偶尔会出现部分能以非常高的频率继续转移乳糖代谢基因的转导结合子。这些转导结合子具有一种非常奇特的细胞凝集或成团的 (clumping) 表型 (Clu^+)。在 Clu^+ 的转导结合子中，乳糖发酵质粒中存在大片段质粒 DNA (当 ML3 作为原始供体时存在相同的情况) 或染色体 DNA 的倒置序列。当被转移的是 ML3 的质粒 pSK08 时，转导结合子中的质粒出现大片段 pSK08 倒置序列的原因是 pSK08 上存在一种插入成分 (插入序列)，使其与另一种小质粒 pRS01 形成共整合体，这也是导致高结合频率的主要原因。而在菌株 712 作为供体时，转化结合子质粒中出现的染色体倒置序列可能负责编码一种性因子，该性因子基因经过一种抗生素抗性基因标记后，可以被克隆和进行遗传学分析。

在乳球菌 712 菌株系列作为供体时与高频率转化有关的性因子是一种 50-kbp 的遗传片段，该片段编码的蛋白质与那些出现于 *E. coli* 和 *Agrobacterium tumefaciens* 结合过程中的性因子所编码的蛋白质具有同源性。负责编码 Clu^+ 表型的 *cluA* 基因已经被发现。这种性因子插入具有位点特异性，与同时存在于性因子及染色体上的一段 24bp 的序列有关。当性因子整合到质粒上以后，它可以使染色体基因从供体到受体发生单向结合性转移。

(3) 不同属之间的结合。链球菌质粒 pAM β 1 和 pIP501 的宿主范围很广，前者是一个 26.5-kbp 的抗红霉素质粒，后者是一个 30-kbp 的抗氯霉素与红霉素的质粒，这两种质粒已经成功地被结合到其他多种乳酸菌中。Gasson & Davies (1980) 最先证明质粒 pAM β 1 可在多株乳球菌中的进行结合性转移，而关于类似的质粒向 *Lb. casei* 转移的报道甚至更早。其他已成功作为质粒 pAM β 1 受体的乳杆菌包括：*Lb. plantarum*，*Lb. acidophilus* 和 *Lb. reuteri*。后来，Morelli 等 (1988) 证实 在无菌小鼠消化道内，质粒 pAM β 1 可以从 *Lb. reuteri* 结合转移到 *Enterococcus faecalis* 中。在乳球菌和乳杆菌之外，质粒 pAM β 1 还可以转移到明串珠菌细胞内 (Pucci et al., 1987)。尽管试图将 pAM β 1 转移到片球菌中没有成功，但以 *S. thermophilus* 和 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 作为供体时，质粒 pIP501 可以结合转移到 *Pediococcus acidilactici* 和 *P. pentosaceus* 中。

另一种具有广泛宿主范围的质粒是 pVA797，是 pIP501 的一种衍生质粒，该质粒上编码红霉素抗性的区域被一种链球菌隐秘质粒的复制起始区域所取代。该质粒除了能结合到乳

球菌菌株外，还可以在结合性移动试验 (conjugative mobilization experiment) 转移到 *S. thermophilus* 中。

利用乳酸菌自身的质粒或标记基因已成功地进行了以乳球菌为供体、片球菌为受体地属间结合试验，被转移的乳球菌遗传片段片球菌内可以作为乳糖或蔗糖发酵，以及 Nisin 产生的遗传决定子。

(4) 结合性移动。结合性质粒可以提高非结合性或结合性很低的质粒或染色体标记基因的转移频率。链球菌质粒 pAM β 1 已被用于使编码蛋白酶的质粒在不同的乳球菌菌株间移动 (Hayes et al., 1990)，在转化结合子中可以检测到由 pAM β 1 和乳球菌质粒发生共整合的新质粒，表明在结合过程中发生了多种重组作用。质粒 pVA797 易与具有同源性区域的质粒形成共整合体，所形成的移动体系可以使重组质粒携带编码基因转移到不可转化的菌株内。质粒 pVA797 拥有两个复制起始区域，一个来自于质粒 pIP501，另一个来自链球菌隐秘质粒 pVA-380-1。将具有质粒 pVA-380-1 复制起始区域的质粒 pVA838 引入具有质粒 pVA797 的菌株时，质粒 pVA838 与 pVA797 会形成一种共整合体。该整合体可以结合到其他菌株中，随后，由于复制不相容的原因，这种整合体质粒容易发生解体。除 pVA838 外，Rome-ro 等采用这种方法构建了多种适用于乳酸菌、能被 pVA797 所移动的克隆载体。

在链球菌非结合性的四环素抗性质粒 pMV158 中观察到一种非常有趣的现象，它可以与质粒 pAM β 1 或 pIP501 以共转移的方式转移到 *Lc. lactis* subsp. *lactis* IL403 中，是跨属结合。当获得质粒 pMV158 的 IL403 受体细胞作为供体与其他 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 菌株结合时，质粒 pMV158 的转移不再需要质粒 pAM β 1 或 pIP501。相反，有迹象表明，乳球菌染色体上的某种功能与 pMV158 的转移有关。

采用穿梭质粒的方法，也可以使结合性移动发生在革兰氏阴性菌 (供体) 和乳球菌 (受体) 之间，这种穿梭质粒由质粒 pAM β 1 和 pBR322 的复制起始区域以及能同时在革兰氏阳性和革兰氏阴性菌中表达的抗生素抗性标记基因所组成。这种穿梭质粒具有 P-群质粒的结合转移区域，因此，要求被移动的质粒也属于 P-群质粒。

(二) 体外基因转移技术

尽管体内基因转移的技术对遗传学研究非常有用，在对乳酸菌基因进行实际克隆时，还需要采用各种转化技术。目前所用的转化技术可以分成两类：原生质体转化和电穿孔技术 (电转化)。

1. 原生质体技术

乳球菌原生质体制备和再生的方法首先是由 Gasson (1980) 年提出的，他还证实了 PEG 可以诱导原生质体融合，以及在再生的融合子内染色体标记基因和与质粒相连的标记基因可以发生重组后来链球菌和乳球菌属通过 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 与 *B. subtilis* 之间的原生质体融合，证明多种葡萄球菌的抗药性质粒可以跨属转移到 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 内。在 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 和 *Lb. reuteri* 之间也成功地进行了原生质体融合，并且两者之间可以这种方式进行质粒传递。两株具有不同质粒组成的 *Lb. fermentum* 菌株通过细胞融合后，所得到的融合子具有两个亲本所具有的全部质粒。

实际上早在 1982 年，Kondo & McKay 就对 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 进行了原生质体转化。第一个被转化成功的是乳球菌乳糖发酵质粒，尽管转化的频率非常低。随后，不同实验室对转化方案中的原生质体再生条件、PEG 浓度和分子量、PEG 处理时间、原生质体浓度、转化缓冲液的离子组成以及在制备原生质体以前细菌的培养时间等进行了优化。在采用优化

方案和不同的抗生素抗性标记后,每微克(μg) DNA 的转化频率可达到 $10^4 \sim 10^6$,从而使采用“鸟枪法(shotgun)”在乳球菌宿主中克隆乳球菌与质粒相关和/或染色体基因成为现实(von Wright et al., 1987)。Sanders & Nicholson (1987)报道对未经过原生质体化的*Lc. lactis* subsp. *lactis*的细胞也可以获得非常高的转化效率,不过在他们的实验方案中,细胞需要进行PEG处理和等渗稳定剂。这一切似乎表明,该菌株在生长过程中已经完成了“自我原生质体化”的过程,而不需要外来酶作用于细胞壁。

2. 电转化(电穿孔)

Harlander (1987)第一次报道了对*Lc. lactis* subsp. *lactis*进行的电转化作用,通过安装在旋转的离心桶上的一根电极,她获得的转化率可与原生质体融合中的转化频率相媲美。同一年,在*Lb. casei*中也获得高效率的电转化作用。1988年,Luchansky等连续发表了对包括*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*和*Pediococcus*等属在内的革兰氏阳性菌的电转化结果。对*S. thermophilus*的电转化研究则是Somkuti & Steinberg (1988)年进行的。自此以后,对乳球菌、*S. thermophilus*和*Ln. paramesteroides* (David et al., 1989)(该种已经被纳入*Weissella*——编者注)的电转化方案进行了进一步的优化,而电转化也是在*Lb. plantarum*中进行基因转移的标准方法(Bates et al., 1989)。

四、乳酸菌的遗传重组

在前面的章节中,可以看到遗传结构的重排经常与遗传物质转移有关。遗传物质的重组有两种方式:常见的一种是染色体DNA通过结合或转导的方式从一株菌被转移到另一株菌中,这是所谓的常规重组(general recombination)。它需要参与重组的DNA分子之间具有相当程度的同源性,以及细菌特异性重组功能的参与;第二种重组方式是由可转座的遗传成分所介导,不依赖于宿主的功能,只需要非常短的靶序列(大约10个碱基对或更少)。

(一) 常规重组

乳球菌常规重组的作用机理主要来自于以各种可整合载体为模型的研究。这些质粒上的同源性序列要么来自于乳球菌的染色体DNA,要么则来自于染色体上的溶原噬菌体(prophage)。在这些试验中,当存在选择压力时(如培养基中存在质粒具有抗药性的抗生素),整合质粒的扩增是一种非常普遍的现象。

后来各种乳球菌重组缺陷突变株被陆续发现,最早的一个重组缺陷突变株是Anderson & McKay (1983)通过甲基磺酸甲酯(MMS)诱变获得的。质粒对该菌株的转移可以正常进行,但却无法引入外来染色体标记基因。控制细菌基因重组的关键基因是*recA*,该基因在不同的革兰氏阳性或者阴性菌之间具有高度的保守性。利用这一点,可以通过聚合酶链反应(PCR)技术克隆乳球菌的*recA*基因,然后通过插入失活的方法产生新的*recA*突变株(突变子)。

(二) 由转座成分介导的重组

插入序列(IS)是转座遗传成分最简单的形式,其大小一般在750~2500bp,通常只由与转座有关的基因及其两侧短的倒置重复序列组成。更复杂一些的转座子还携带有另外的遗传信息,如抗药性基因。一般情况下,这些基因的两侧是两个IS成分。乳酸菌中第一个插入序列(IS)是Shimizu-kadota (1985)在*Lb. casei*中发现的,该插入序列被命名为ISL1,可以使*Lb. casei*中一个本来可以溶原状态存在的噬菌体产生毒性(使细胞裂解),其作用机理可能是该序列通过插入使宿主抑制噬菌体的有关基因失活所引起。从此以后,在乳球菌、

S. thermophilus (Guedon et al., 1995)、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Germond et al., 1995)、*Lb. helveticus* 和 *Ln. lactis* (Vanghan & de Vos, 1995) 中发现了各种 IS 成分。下面将略微详细地介绍几种研究的比较清楚的转座成分。

1. 乳球菌转座成分

(1) 插入序列 ISS1、IS904 和 IS981 ISS1 插入序列家族是在对乳糖质粒 pSK08 和 pSR01 所形成的共整合体进行分析时发现的, ISS1 的大小为 808 碱基对 (bp), 两端各有一个 18-bp 的倒置重复序列, 编码一个由 226 个氨基酸残基组成的蛋白质。ISS1 在 pSK08 有两个拷贝, 即 ISS1S 和 ISS1T, 两者之间仅在非功能区存在 4 个碱基对的差别。ISS1 的结构与革兰氏阴性菌中的插入序列 IS26 非常接近。在其他代谢性质粒、包括乳糖代谢质粒 pUCL22 与 pSK11L (Horng et al., 1991) 以及噬菌体抗性质粒 pTR2030 (Romero & Klaenhammer, 1990) 中, 也发现了 ISS1 样 (等位 ISS 序列) 的插入序列。存在于质粒 pTR2030 上的 ISS1-样插入序列被命名为 IS946。ISS1 插入序列广泛分布于各种乳球菌, 其基因组的拷贝数通常在 1 至 20 之间, 主要取决于菌株的类型, ISS1 插入序列拷贝数中的大部分存在于质粒上。这种插入序列偶尔也出现在部分片球菌和乳球菌菌株中 (Polzin et al., 1993)。

乳糖发酵质粒 pUCL22 还含有一对其他的插入序列, 即 IS 1076L 和 IS 1076R, 这两个插入序列成分的排列方式表明其构成了一个转座子 (Huang et al., 1991)。这些插入序列成分属于 IS904 插入序列家族, 后者与 nisin-蔗糖基因块紧密相连 (详细情况见后文)。

插入失活使质粒 pGBK17 所携带的抗噬菌体感染表型形状的丧失最终导致了一个大小为 1222-bp 的染色体插入序列 IS981 被发现, IS981 在乳球菌中的分布与 ISS1 家族相似 (Polzin et al., 1993)。

(2) Nisin-蔗糖基因块 尽管早期的研究结果就表明质粒参与了 nisin 的合成, 但一直没有分离到与 nisin 表达有关的质粒。这种情况迫使研究者仔细检查染色体上与 nisin 合成有关的基因, 后来有多个研究组分离到与 nisin 合成有关的基因并测定了其序列组成。原来, 负责 nisin 合成与宿主免疫性的基因和蔗糖代谢有关的酶似乎共同存在于一个结合性的 70-kbp 的转座子上, 该转座子的两端由序列为 TTTTTG 的同向重复序列组成。在不同菌株中, 该转座子的序列会出现轻微的差异, 从而导致其拥有不同的名称 (如 Tn5301, Tn5276 等)。在部分转座子中, 在 nisin 结构基因的上游存在 IS904 或其等位的插入序列的一个拷贝, 但并非所有的转座子都是这种情况。这种情况导致在结合性转座过程中, IS904 或其等位的插入序列不能发挥作用; 一般来说, 在非结合性转座子变异中, IS904 的等位体位于 nisin 结构基因的上游, 但以倒置的方式存在, 与此相伴的是该区域还有很多不规则之处, 这一点表明插入序列可能在转座子内部基因重排中有某种作用。

2. 异源性革兰氏阳性菌转座子

链球菌转座子 Tn916 及结构相近的 Tn919 通过结合的方法可以转移到多株乳球菌、乳杆菌和明串珠菌中 (可参考 Gasson, 1990 年发表的有关综述), 这些转座子携带有一个可选择性的四环素抗性基因。这些转座子可以用来分离那些可被转座子插入而失活的基因, 机理在于可以利用那些在转座子内没有识别位点的限制酶对这些基因进行克隆, 然后选择那些具有四环素抗性的重组质粒。当抗生素不存在时, 这些重组转座子中的转座子部分可以非常高的精确性被切除, 从而恢复基因原有的结构与功能。

在乳球菌中, Tn919 通过结合方式的转移频率很低, 如果作为供体的菌株具有质粒

MG600 的话, 其转移的频率可提高到每供体细胞 10^{-4} 的水平 (原始的转移频率为 10^{-9}), 从而可以使这种配对结合在硝酸纤维素膜上进行, MG600 是乳糖发酵-蛋白酶质粒 pLP712 的一种具有高结合能力的衍生质粒。这种转座子转移频率的提高还取决于受体菌株。即使与含有 MG600 的供体进行配对, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 17S 也不接受 Tn919。令人惊讶的是, 对于 Tn919 的有效结合, 并不需要 MG600 自身的转移。MG600 既可以存在于供体, 也可以存在于受体, 而对已经提高的转座子转移不产生影响。

利用转座子进行遗传分析的例子之一是 *Lc. lactis* subsp. *.lactis* 的苹果酸-乳酸发酵以及多种其他代谢途径可以因为 Tn916 的插入而失活, 从而分析其遗传结构。

Tn917 是乳球菌内编码红霉素抗性基因的另外一种转座子。为了使染色体基因产生转位作用, 已经将含有该转座子的载体引入到乳球菌内 (Israelsen & Hansen, 1993)。采用 PFGE 方法对转位位点进行分析后, 没有发现转位的热点区域。

五、乳酸菌 DNA 的修复与突变

对乳酸菌 DNA 的修复与突变作用尚未进行深入的研究。前面曾提到的 MMS-诱导产生的乳球菌修复-缺陷突变株对 MMS 和 UV 的敏感性增强, 表明在乳球菌中存在重组性 DNA 修复途径。抗紫外质粒以及各种新构建的 *recA* 突变株将对于研究乳酸菌的 DNA 修复机理非常有用。

某些强烈的烷化剂如 MMS (甲基磺酸甲酯) 和 *N*-甲基-*N*-硝基-*N'*-亚硝基胍 (NNNG) 已被用来使乳酸菌产生突变, 到目前为止, 还没有对突变的分子机理进行研究, 也不清楚在乳酸菌中是否存在类似 *E. coli* 中可诱导的 SOS 修复机制。然而, 由于大多数乳酸菌的溶原性噬菌体可以被损伤 DNA 的试剂如 UV 和丝裂霉素 C 所诱导 (Davidson et al., 1990) 这种现象与可诱导的 SOS 突变作用有关, 因此, 在乳酸菌中很可能存在 SOS 修复机制。

六、乳酸菌的基因克隆

在过去 10~15 年内, 对该领域的研究非常活跃。乳球菌被最先作为研究对象的理由之一是在其在发酵食品、尤其是干酪生产中的作用重大, 其二是可适用于多种遗传技术。

乳杆菌是一群组成殊异的细菌, 这一点使乳杆菌的遗传和分子生物学研究进展缓慢。障碍之一是缺乏有效的转化系统, 尽管在其他细菌中这种问题早已被电转化技术所克服。对乳杆菌的研究根据其应用目的可以分为几种类型: 如对 *Lb. plantarum* 的青贮饲料发酵生物学研究、*Lb. bulgaricus* 发酵剂遗传学研究等, 肠道乳杆菌分子生物学研究则是最近才兴起、具有巨大潜力的领域 (Klaenhammer, 1995)。

(一) 克隆载体

自从 1982 年质粒转化第一次成功进行以后, 各种克隆系统的出现以指数形式增长。要使重组 DNA 技术以及相关的克隆载体切实可行, 首先必须找到各种进行基因转移的方法。在成功进行基因转移仅一年之后, 第一个克隆载体就出现了。

1. 通用克隆载体

目前最常用的载体可分成两类: 1) 以大的结合性质粒为基础构建的载体; 2) 以小的隐秘质粒为基础构建的载体。

第一类载体, 以大的结合性质粒为基础, 主要发现于多种革兰氏阳性菌中, 属于 MLS 抗性群。通过自发性或人为缺失, 从质粒 pIP501 和 pAM β 1 中获得了多种缺失性衍生质粒。这种缺失性衍生质粒丧失了结合能力, 在细胞中的拷贝数却有所增加。但是, 这些质粒保存

了母本质粒部分重要的特性，如复制能力以及抗生素抗性基因的表达能力。第一类载体的复制子不产生单链 DNA 中间体，已被证明可以增强克隆试验中遗传物质的稳定性。

第二类载体以在各种乳球菌中发现的小的隐秘质粒为主，隐秘质粒在应用时需要先加上一种可作为选择标记的基因，通常是抗生素抗性基因。这一方法被用于以 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 的隐秘质粒 pWVO1 的复制子为基础，构建 pGK12 及其衍生质粒；以及以 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 隐秘质粒 pSH71 的复制区域为基础，构建 pCK1。

另一种构建克隆载体的方法是复制子筛选法。将不同乳球菌质粒的随机片段与带有标记基因的 DNA 连接后，对乳球菌进行转化，具有稳定复制能力的连接体（质粒片段+标记基因 DNA 片段）就构成了一种有用的克隆载体。例如，利用这种方法构建的质粒 pNZ12 就携带了来源于 pSH71 的复制区域。

两种最常用的复制子 pWVO1 和 pSH71，都属于小质粒，它们具有许多相同之处。其 DNA 的序列组成几乎完全相同，存在的少数差异主要是引起它们在 *Lc. lactis* 中的拷贝数不同。其中，pWVO1 的数量较少，而 pSH71 的拷贝数较多。两者还共同具有的一种非常有用的特征是不仅能在多种不同的革兰氏阳性菌中复制，而且也可以在多株 *E. coli* 中复制。能在 *E. coli* 中复制，使许多克隆试验在该菌中进行时可以简化很多步骤。复制时具有广泛的宿主范围这一特点，可以用来对复制子功能以及基因表达进行总体水平的比较。

第二类克隆载体惟一的不足是被克隆的外源基因进行表达时，经常会碰到稳定性不好的问题。这种缺陷可能是在其复制过程中，会产生单链中间体的缘故。就目前而言，由于其稳定性较好的缘故，第一类载体的应用越来越多。

自从第一个克隆载体构建成功后，对构建方法做了许多改进。包括在克隆载体中引入多用途克隆位点以及用于筛选调节信号如启动子、终止子或蛋白分泌增强序列等特殊位点。为了有利于外源基因的表达，部分乳酸菌基因的调节区，例如启动子 P32 和 *prtP* 以及基因 *usp45* 的经过修饰的信号序列，被应用于表达型和分泌型载体中 (Venema, 1993)。另外一部分载体则可以进行转录融合，例如乳球菌的调节序列可以与 *E. coli lacZ* 基因前面的三个阅读框架进行融合。通过监控 β -半乳糖苷酶的活力，就可以研究乳球菌基因表达调控区的作用。

在构建乳杆菌克隆载体时，采用了与乳球菌中类似的方法。隐秘质粒的复制子首先被分离、分析，然后被抗生素抗性基因标记。部分隐秘质粒在自然状态下，具有广谱宿主范围。与其他的复制子，例如 *E. coli* 的复制子融合后，可用来构建具有功能性的穿梭质粒 (Cocconcelli et al., 1990)。

从乳球菌具有广泛宿主范围的复制子中获得的经验也被用于乳杆菌。pAM β 1 和 pSH71 的衍生质粒等被成功地在乳杆菌中应用，尽管在乳杆菌中碰到的被克隆基因不稳定的问题比乳球菌中更严重。

2. 结合性载体

对于某一宿主菌株而言，一旦有效的基因转移系统建立以后，就有可能将外源基因整合到其染色体上。这一点对于乳发酵剂菌种而言，特别有诱惑力。因为这些菌种许多关键性的代谢特征都是由质粒控制的，因此，容易产生稳定性不好等问题。

在整合试验中，从革兰氏阴性宿主来源的质粒如 pBR322、或革兰氏阳性细菌来源的质粒如 pE194 和 pSc101，以及复制基因不能在乳酸菌中发挥作用的质粒 pTB19 都被使用过

(Leenhouts et al., 1990)。试验证明, 质粒与染色体的整合通常是以单交叉 (Campbell 型) 机制进行的, 但是也可以通过双交叉进行。在乳杆菌中进行的整合研究与乳球菌中相似。至少在 *Lb. casei*、*Lb. plantarum* 和 *Lb. helveticus* 中成功地进行整合, 所采用的方法既有单交叉技术也有双交叉技术 (Bhowmik & Steele, 1993)。后一种技术可用来构建可以用来构建染色体仅含有所需外源基因的菌株, 该技术可用于所谓的食品级克隆。

3. 食品级载体 (Food grade vector)

在工业应用时, 被改性 (修饰) 的菌种不得含有任何不可食用的 DNA。因此, 以抗生素抗性标记为例, 就必须将载体上的抗生素抗性标记基因予以替换。在构建食品级选择系统方面, 已经投入了大量的研究力量。作为安全标记候选者之一的是菌株发酵乳糖的能力, 乳糖代谢作用已经从分子水平上得到了全面的研究。从这些研究结果可以看到, 乳糖操纵子中的基因 *lacF* 可以作为实验室研究或工业发酵的直接选择标记 (de Vos et al., 1990)。当以乳糖作为重组菌株唯一的生长碳源时, 细胞内的质粒能很稳定地保存。

另一种适合于作为食品级选择标记的是组成乳球菌蛋白水解酶系统中的一种酶, 即 X-脯氨酰二肽氨肽酶 (X-PDAP; Mayo et al., 1990)。该酶可以特异性地从倒数第二位上含有脯氨酸残基的寡肽上水解释放出一个二肽, 正是存在这种水解作用, 脯氨酸才可以被摄取到细胞内。

调节 DNA 合成的胸腺嘧啶合成酶基因 (*thyA*) 也被成功地用作乳球菌内有关载体的选择标记, 由于 *thyA* 是一种常规代谢的调节基因, 因此, 可以在多种乳酸菌内应用。

在构建食品级载体时, 乳球菌对内源性细菌素的抗性基因也曾被研究作为安全基因标记的可能性。两个不同的研究组 (von Wright et al., 1990; Froseth & McKay, 1991) 分别克隆了抗 nisin 的基因, 该基因可以有效地作为转化子的直接选择标记。

最近食品级整合技术在乳球菌和乳杆菌中的应用取得了长足的进展 (Venema, 1993; Hols et al., 1994), 与抗生素基因标记相比, 食品级选择标记通常会产生更多的背景菌落, 因此要获得比较理想的结果, 必须仔细调节培养时的各种条件。

(二) 部分被克隆的基因

对乳酸菌的基因克隆起源于对其两种最关键代谢途径的系统研究, 即乳糖利用和蛋白质水解作用。到目前为止, 对多种乳酸菌的这两种代谢途径进行了分析, 并在分子水平上进行了极端复杂的研究。对乳球菌这方面的研究目前是最先进的, 但有部分研究进展则来自于其他重要的乳酸菌, 如乳杆菌属和 *S. thermophilus*。

1. 蛋白质水解系统

(1) 蛋白酶。在早期的研究中, 发现乳球菌的蛋白质水解作用不稳定, 使研究者第一次将注意力集中 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 细胞内的质粒上。第一个成功进行的克隆实验就是利用来自于 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 的一个大的蛋白酶质粒, 首先在蛋白酶阴性的 *Bacillus subtilis* 中、随后是蛋白酶阴性的 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 中进行的。对 3 株不同菌株的蛋白酶的组成结构分析后, 发现其与各种枯草菌素 [subtilisin (s)] 具有同源性, 后者是 *Bacillus subtilis* 合成的一类丝氨酸蛋白酶 (Kok, 1990)。不过, 乳球菌蛋白酶比 subtilisins 大得多, 几乎是后者的 5 倍。这两者都是以前蛋白酶原 (Preproenzyme) 的形式合成的, 在其 N-末端具有由 33 个氨基酸组成的、典型的革兰氏阳性菌信号序列。对基因初始翻译产物 (大约为 200 kDa) 进行加工后, 才形成分子量大约为 120kDa 的成熟蛋白酶 (Pritchard & Coolbar, 1993; Kok & de Vos, 1994)。在酶的 C-末端有一段类似膜定位蛋白的序

列，由后者负责将该蛋白酶吸附到细胞壁表面。如果该膜定位蛋白序列被切除的话，蛋白酶活性就可以释放到培养基中。

在蛋白酶结构基因 (*priP*) 的上游，发现了一种完全保守的基因 *priM*。该基因对蛋白酶的成熟过程是必需的。研究表明，*priM* 的产物是一种脂蛋白，并不能完成对蛋白酶的剪切。它如何引起或介导蛋白酶的活化过程，其作用机理还不清楚。要获得具有活性的蛋白酶，除了要对蛋白酶原的 N-末端进行加工外，C-末端也需要进行加工。

从该蛋白酶的组成序列，还可以了解那些氨基酸与酶的酪蛋白水解特异性有关。此外，澄清了乳球菌细胞中实际存在的蛋白酶种类。在乳球菌中，似乎只有一种极端不稳定、分子量大的蛋白酶，在生化实验中所观察到的各种蛋白酶，只不过是其不同的降解产物。通过遗传学技术，使质粒编码的蛋白酶基因与乳球菌染色体 DNA 产生单交叉或双交叉遗传重组，整合到染色体上后，可以使其形状趋于稳定。

最先发现的乳杆菌蛋白酶来自于 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 (已被建议命名为 *Lb. casei*——编者注)，编码该蛋白酶的基因已经被克隆和进行序列测定 (Holck & Nes, 1992)。与乳球菌蛋白酶相反，该基因是由染色体编码。不过，这种乳杆菌蛋白酶与其 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 中的同伴具有高度的同源性。对嗜热性乳杆菌如 *Lb. thermophilus* 和 *Lb. helveticus* 中的蛋白酶也有研究，不过编码这些酶的基因还没有分离到。

(2) 肽的运输。与细胞壁相连的蛋白酶对酪蛋白进行初步降解后，所产生的肽需要经过细胞壁以及跨膜运输到细胞内才能被利用。关于肽所需的肽酶在细胞中的定位曾经有很多争议，不过根据目前所掌握的序列组成的资料来看，可以肯定它们存在于胞壁间。最近，发现了 3 中不同的肽运输系统 (Tynkkynen et al., 1993; Hagting et al., 1994; Foucaud et al., 1995)。其中，寡肽运输系统 (*Opp*) 能提供乳球菌在乳中生长所需的全部氨基酸，但要求其运输的肽至少由 4 个氨基酸残基组成。该系统由 2 个 ATP 结合蛋白、2 个膜整合蛋白和一个底物结合蛋白组成，与其他经过研究的细菌运输系统非常相似。

(3) 肽酶。在酪蛋白降解的最后步骤中需要一系列肽酶使之变成短肽和游离氨基酸。在干酪成熟过程中，肽酶被认为与干酪质构和风味的形成有关，因此受到广泛的重视。乳酸菌具有不同类型的肽酶，Kok & de Vos (1994) 将其分为 5 类：一般性氨肽酶、脯氨酸特异性肽酶、寡肽酶、羧肽酶和内肽酶。每一类肽酶都有其特定的肽片段水解范围。其中，脯氨酸特异性肽酶与干酪质构和风味的形成关系最密切。对乳球菌和乳杆菌中编码这些肽酶的基因的遗传分析几乎齐头并进，目前已经对其中 20 种以上的基因进行了分子水平的研究。

2. 乳糖利用系统

在乳酸菌中，乳糖的运输存在两种不同的方式，即磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 依赖性磷酸转移酶系统 (PTS) 和乳糖透性酶系统。嗜温性发酵剂菌种，如所有的乳球菌和部分嗜温性乳杆菌具有 PTS 系统；而嗜热性发酵剂菌种，至少是 *S. thermophilus* 和 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 则具有乳糖透性酶系统。对乳球菌乳糖利用途径的揭示是开始于对其细胞内大的代谢性质粒上乳糖利用片段的克隆，自此以后，在分子水平上完成了对整个 tagatose-6-P (6-磷酸塔格糖) 途径以及由 23-kbp 乳糖代谢质粒 pMG820 所编码的乳糖—PTS 系统的分析 (de Vos, 1990)。对单个基因的克隆与序列分析结果表明，这些基因组成了一个单一的操纵子，其基因排列方式也被确定。此外，这些基因产物中大多数的功能已经研究清

楚。该操纵子的转录可被乳糖所诱导。从位于该操纵子 5'-端的基因 *lacR* 开始, 以不同转录方式得到的单顺反子 (monocistron) 的作用已经阐明。*lacR* 是控制该操纵子表达的抑制物。诱导乳糖利用 (*lac*) 基因表达的诱导物被证明是 6-磷酸塔格糖, 这一结论与以前的相反 (van Rooijen et al., 1993)。尽管在一株 *Lb. casei* 中也存在 PTS 系统, 但其基因的构成以及基因表达的调控方式与 *Lc. Lactis* 相去甚远 (de Vos & Vaughan, 1994)。

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 中编码乳糖透性酶系统多个酶的基因被不同的研究者所克隆和进行序列测定, *S. thermophilus* 中的情况也一样。这些研究表明, 编码乳糖透性酶系统的基因构成了一个操纵子, 由 *lacZ* (β -半乳糖苷酶) 和 *lacS* (运输蛋白) 组成。通常情况下, 对这些乳酸菌乳糖透性酶操纵子中单个基因功能的分析在 *E. coli* 中进行, 因为后者容易进行突变试验和互补实验。

另一种类型的乳糖透性酶系统则是从 *Leuconostoc lactis* 中发现的 (David et al., 1992)。编码该菌乳糖酶的基因似乎由 2 个发生重叠的基因、即 *lacL* 和 *lacM* 构成, 更多的信息则来自于其他具有相同乳糖利用系统的嗜温性乳杆菌。明串珠菌的 β -半乳糖苷酶与其他细菌的 β -半乳糖苷酶具有相当大的同源性。以上这些研究结果主要是为实际应用服务, 这些结果已被用于构建表达载体尤其是食品级表达载体, 也可用于代谢途径调控, 例如在研制新的酸奶发酵菌种时, 可以采用遗传方法控制某些表型性状。

(三) 外源基因的表达

对外源基因在乳酸菌中表达的研究大约开始于 10 年前, 当时研究者对其实际应用抱有非常高的期望, 不过其热情现在有所降低。外源基因的表达首先需要构建表达载体, 利用经典的克隆和测序方法弄清了 *prpT* 启动子的结构和功能, 并被用来在 *Lc. lactis* subsp. *lactis* 中表达糜蛋白酶原基因。

另一种方法是利用特异性的载体探针来筛选乳球菌或噬菌体 DNA。通常是将一种来源于 *B. subtilis*、没有启动子的氯霉素乙酰转移酶基因 (*cat-86*) 与一种乳球菌载体融合, 将具有启动子活性的 DNA 片段连接到融合载体中该基因的上游后, 就会产生氯霉素抗性菌落。这种人工启动子片段的结构已经被测定, 并被进一步用来表达外源基因。采用这种方法, 已成功地对蛋清溶菌酶 (Van de Guchte, 1987) 和 β -内酰胺酶进行了表达。

利用乳杆菌的内源性表达信号, 在乳杆菌内进行了多种外源基因的表达。Ahmad & Stewart (1991) 构建了一株可以生物发光的 *Lb. casei* 菌株, 其中基因 *lux a/b* 的表达就是由这种人工 *Lb. casei* 启动序列的控制。还有部分研究试图利用非乳杆菌调节信号来表达异源蛋白, 如 α -淀粉酶基因在 *Lb. plantarum* 中的表达。在进行 α -淀粉酶基因表达时, 利用了质粒整合的特点。例如, 为改善青贮饲料发酵剂的性能, 采用相同的连接方式, 将梭状芽孢杆菌的内葡聚糖酶在 *Lb. plantarum* 中进行了表达与分泌 (Bates et al., 1989)。以上这些例子以及 β -内酰胺酶 (Sibakov et al., 1991) 和葡萄球菌脂肪酶 (Vogel et al., 1990) 在乳杆菌中的成功表达, 证明乳杆菌是一种非常有前途的蛋白表达与分泌的载体, 利用这一点可以对发酵剂菌种进行遗传改良。

外源基因在乳酸菌中表达最令人感兴趣的新领域之一是利用乳酸菌作为口服疫苗的载体, Wells 等 (1993) 探索性的研究已经证实可以将编码白喉毒素 C 片段的基因克隆到乳球菌内, 并分泌于细胞壁表面。在疫苗效果试验中, 乳酸菌表达的这种白喉毒素 C 片段具有免疫活性, 能给小鼠提供保护作用。尽管遗传工程能给乳酸菌的应用开创全新的领域, 但相当一部分研究者认为, 在食品中应用时应该慎之又慎。

(四) 遗传重组技术在益生菌性能改良中的应用举例

正如前面提到过的一样, 益生菌的部分特征如普遍存在的抗药性、所产生的乳酸可能存在于 D-乳酸等性状, 在食品中应用时需要避免或减少, 尤其是代谢过程中产生的 D-乳酸。对绝大多数人而言, 产品中微量 D-乳酸的存在不会产生任何不良影响。不过, 对于那些接受过肠切除手术的短肠综合症 (SBS) 或肠功能异常的患者而言, 摄入的 D-乳酸会在血液中积累, 引发 D-乳酸血症和肝昏迷 (Scully et al., 1989)。已经证实, 产生 D-乳酸的肠道内源性乳杆菌是引起这类疾病的主要因子。此外, 新生儿由于肝发育不成熟, 可能不能完全代谢肠道细菌所产生的 D-乳酸。因此, 一种不产生 D-乳酸的变异株无论从临床还是调节肠道菌群组成、发挥免疫调节功能都有非常重要的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Axelsson, L. T. (1990). *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Studies on antagonism, metabolism and genetics. Dissertation report 44. Uppsala, Sweden, University of Agriculture
- 2 Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J. and Lindgren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2: 131-136
- 3 Barefoot, S. F., Chen, Y.-R., Hughes, T. A., Bodine, A. B., Shearer, M. Y. and Hughes, M. D. (1994). Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 3522-3528
- 4 Bearso, S., Bearson, B. and Foster, J. W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, 147: 173-180
- 5 Bernet, M.-F., Brassart, D., Neeser, J.-R. and Servin, A. L. (1993). Adhesion of human Bifidobacterial strains to culman intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions, *Appl. Environ.* 59: 4121-4128
- 6 Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J.-R. and Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria, *Gut*, 35: 483-489
- 7 Blom, H. and Mortvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms, *Biochem. Soc. Trans.*, 19: 694-698
- 8 Blomberg, L., Henriksson, A. and Conway, P. L. (1993). Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 34-39
- 9 Bruno, M. E. C. and Montville, T. J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3003-2010
- 10 Carlsson, J., Iwami, Y. and Yamada, T. (1983). Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase thiocyanate-hydrogen peroxide, *Infect. Immun.*, 40: 70-80
- 11 Chan, R. C. Y., Bruce, A. W. and Reid, G. (1984). Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of Gram-negative uropathogens by competitive exclusion, *J. Urol.*, 131: 596-601
- 12 Chan, R. C. Y., Reid, G., Irvin, R. T., Bruce, A. W. and Costerton, J. W. (1985). Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments, *Infect. Immun.*, 47: 84-89
- 13 Chauviere, G., Coconnier, M.-H., Kerneis, S., Darfeuille-Michaud, A., Joly, B. and Servin, A. L. (1992). Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 91: 213-218
- 14 Chen, G. and Russell, J. B. (1989). Transport of glutamine by *Streptococcus bovis* and conversion of glutamine to pyroglutamic acid and ammonia *J. Bacteriol.*, 171: 2981-2985
- 15 Cherrington, C. V. and Hinton, M. (1992). The influence of temperature and organic matter on the bactericidal activity of short-chain organic acids on salmonellas, *J. Appl. Bact.*, 72: 500-503
- 16 Cherrington, C. A., Hinton, Mead, G. C. and Chopra, I. (1991). Organic acids, chemistry, antibacterial activity and practical applications, *Adv. Microbiol. Phys.*, 32: 87-108
- 17 Christensen, D. P. and Hutkins, R. W. (1992). Collaps of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by

- a bacteriocin produced by *Pediococcus acidioactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 58: 3312-3315
- 18 Chung, T. C. , Axelsson, L. T. , Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* , 2: 137-144
 - 19 Coconnier, M.-H. , Bernet, M.-F. , Chauviere, G. and Servin, A. L. (1993a). Adhering heatkilled human *Lactobacillus acidophilus* , strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria cells, *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 11: 235-242
 - 20 Coconnier, M.-H. , Bernet, M.-F. , Kerneis, S. , Chauviere, G. , Fourniat, J. and Servin, A. L. (1993b). Inhibition adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion, *FEMS Microbiol. Lett.* , 110: 299-306
 - 21 Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen, *FEMS Microbiol. Rev.* , 46: 269-280
 - 22 Cramer, J. A. and Prestegard, J. H. (1977). NMR studies of Ph-induced transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes, *Biochem. Biochem. Biophys. Res. Com.* , 75: 295-301
 - 23 de Vos, W. M. , Kuipers, O. P. , van der Meer, J. R. and Siezen, R. J. (1995). Maturation pathway of nisin and other lantibiotics : post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.* , 17: 427-437
 - 24 Dobrogosz, W. J. , Casas, I. A. , Pagano, G. A. , Talarico, T. L. , Sjoberg, B.-M. and Karlsson, M. (1989). *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota, in *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora* (R. Gruff, T. Midtvedt, and E. Norin, eds.). Stockton Press, New York, pp. 283-292
 - 25 Eklund, T. (1980). Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives, *J. Appl. Bacteriol.* , 48: 423-432
 - 26 Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels, *J. Appl. Bacteriol.* , 54: 383-389
 - 27 Eklund, T. (1985). Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *J. Fd. Microbiol.* , 2: 159-167
 - 28 Finlay, B. B. and Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity, *Microbiol. Rev.* , 53: 210-230
 - 29 Fontaine, E. A. , Claydon, E. and Tayler-Robinson, D. (1996). Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide, *Microb. Ecol. Health Dis.* , 9: 135-141
 - 30 Gelinas, P. and Goulet, J. (1983). Neutralisation of the activity of eight disinfectants by organic matter, *J. Appl. Bacteriol.* , 54: 243-247
 - 31 Gonzales, B. , Glaasker, R. , Kunji, E. R. S. , Driessen, A. J. M. Suarez, J. E. and Konings, W. N. (1996). Bactericidal mode of action of plantaricin C, *Appl. Environ. Microbiol.* , 62: 2701-2709
 - 32 Gottschalk, G. (1986). Lactate fermentation, in *Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 214-224
 - 33 Govan, J. R. W. (1986). In vivo significance of bacteriocins and bacteriocin receptors, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* , 49: 31-37
 - 34 Gross, E. and Morell, J. L. (1971). The structure of nisin, *J. Am. Chem. Soc.* , 93: 4634-4635
 - 35 Hamdan, I. Y. and Mikolajcik, E. M. (1974). Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Antibiot.* , 27: 631-636
 - 36 Harris, L. J. , Fleming, H. P. and Klaenhammer, T. R. (1992). Developments in nisin research, *Fd. Res. Int.* , 25: 57-66
 - 37 Huttunen, E. , Noro, K. and Yang, Z. (1995). Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *Int. Dairy J.* , 5: 503-513
 - 38 Jack, R. W. , Tagg, J. R. and Ray, B. (1994). Bacteriocins of Gram-positive bacteria, *Microbiol. Rev.* , 59: 171-200
 - 39 Jacob, F. , L. Woff, A. Siminovitch, A. and Wollman, E. (1953). Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie, *Ann. Inst. Pasteur*, 84: 222-224
 - 40 Jarvis, B. and Farr, J. (1971). Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*, *Biophys. Acta*, 227: 232-240
 - 41 Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl, *Appl. Environ. Microbiol.* , 44: 525-532
 - 42 Jay, J. M. (1986). *Modern food microbiology*. New York, van Nostrand Reinhold
 - 43 Jimenez-Diaz, R. , Rios-Sanchez, R. M. , Desmazeaud, M. , Ruiz-Barba, J. L. and Piard, J.-C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* , 59: 1416-1424

- 44 Jimenez-Diaz, R. , Ruiz-Barba, J. L. , Cathcart, D. P. , Holo, H. , Nes, I. F. , Sletten, K. H. and Warner, P. J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides, *Appl. Environ. Microbiol.* , 61; 4459-4463
- 45 Kamau, D. N. , Doores, S. and Pruitt, K. M. (1990). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system, *Appl. Environ. Microbiol.* , 56; 2711-2716
- 46 King, A. D. J. and Nagel, C. W. (1975). Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Fd. Sci.* , 40; 362-366
- 47 Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 12; 39-86
- 48 Klaenhammer, T. R. , Ahn, C. , Fremaux, C. and Milton, K. (1992). Molecular properties of *Lactobacillus* bacteriocins, in *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics* (R. James , C. Lazdunski, and F. Pattus, eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 37-58
- 49 Kok, J. , Holo, H. , van Belkum, M. J. , Haandrikman, A. J. and Nes, I. F. (1993). Non-nisin bacteriocins in lactococci, biochemistry, genetics and mode of action, in *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (D. Hoover and L. Steen, eds.), Academic Press, New York, pp. 121-150
- 50 Konings, R. N. H. and Hibers, C. W. (1996). Lantibiotics: a unique group of antibiotic peptides, *A. V. Leeuwenhoek*, 69
- 51 Kuipers, O. P. , Beerthuyzen, M. M. , Siezen, R. J. and de Vos, W. M. (1993). Characterization of the nisin gene cluster nis ABTCIPR of *Lactococcus lactis*, requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* , 216; 281-291
- 52 Lemoigne, M. (1927). Sur le metabolisme du diacetyle, *C. R. Soc. Biol.* , 97; 1479-1481
- 53 Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev.* , 87; 149-163
- 54 Linnett, P. E. and Strominger, J. L. (1973). Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis, *Antimicrob. Agents Chemother.* , 4; 231-236
- 55 Morris, J. G. (1976). Oxygen and the obligate anaerob, *J. Appl. Bact.* , 40; 229-224
- 56 Nagy, E. , Petterson, M. and Mardh, P. -A. (1991). Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis , *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* , 99; 739-744
- 57 Nes, I. F. , Diep, D. B. , Havarstein, L. S. , Brurberg, M. B. , Eijsink, V. and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *A. V. Leeuwenhoek*, 70; 113-128
- 58 Scully, T. B. , S. C. Kraft, W. C. Carr, and J. M. Harig. 1989. D-lactate-associated encephalopathy after massive small-bowel resection. *J. clin. Gastroenterol.* 11; 448-451
- 59 Nissen-Meyer, J. , Havarstein, L. S. , Holo, H. , Sletten, K. and Nes, I. F. (1993). Association of the lactococcin A immunity factor with the cell membrane; purification and characterization of the immunity factor, *J. Gen. Microbiol.* , 139; 1503-1509
- 60 Ouwehand, A. C. (1996). Dissertation report in vitro inhibition of adhesion of *Escherichia coli*, Goteborg University
- 61 Ouwehand, A. C. and Conway, P. L. (1996a). Purification and characterization of a component produced by *Lactobacillus fermentum* that inhibits the adhesion of K88 expressing *Escherichia coli* to porcine ileal mucus, *J. Appl. Bacteriol.* , 80; 311-318
- 62 Ouwehand, A. C. and Conway, P. L. (1996b). Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus* sp. to inhibit adhesion of enteropathogenic fimbriated *Escherichia coli* cells, *Microb. Ecol. Health Dis.* , 9; 239-246
- 63 Padan, E. , Zilberstein, D. and Schuldiner, S. (1981). pH homeostasis in bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, 650; 151-166
- 64 Pederson, C. S. (1971). *Microbiology of Food Fermentations*. AVI Westport, CT. Pruitt, K. M. , Tenovuo, J. , Mansson-Rahemtulla, B. , Harrington, P. and Baldone, D. C. (1986). Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? *Biochim. Biophys. Acta*, 870; 385-391
- 65 Quadri, L. E. Sailer, M. , Roy, K. L. Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B, *J. Biol. Chem.* , 269; 12204-12211
- 66 Quadri, L. E. N. , Sailer, M. , Terebiznik, M. R. , Roy, K. L. , Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1995). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1, *J. Bacteriol.* , 177; 1144-1151
- 67 F. Dellaglio, G. E. Felis, and S. Torriani. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916)

- Hansen and Lesel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 285-287
- 68 LM Dicks, EM Du Plessis, F Dellaglio, and E Lauer. 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 337-340
- 69 S. Sakata, M. Kitahara, M. Sakamoto, H. Hayashi, M. Fukuyama and Y. Benno. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1945-1951
- 70 Schleifer K. H. , and Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol* 13, 461-467

第二章 益生性乳酸菌的生理功能

Probiotics (益生菌) 一词来源于拉丁文, 意为“有利于生命 (for life)。”在 20 世纪 60 年代, 由于抗生素的广泛使用以及畜牧业中抗生素应用引起的副作用, 人们开始注意到一些活菌制剂在改善动物健康中的作用。Lilly 和 Stillwell 最初创造该词时, 是用来指一种原生动物的分泌物用于刺激另一种原生动物 (Protozoan) 生长的物质。1974 年 Parker 则用它来描述那些能通过促进动物肠道菌群平衡从而改善动物健康的动物饲料制剂, 包括各种生物或化学物质, 如抗生素等。1989 年, Fuller 将 Probiotics 重新定义为“一种活的微生物制剂, 它通过改善宿主动物肠道菌群的组成从而有利于动物健康”, 这一定义强调益生菌必须是由活细胞组成, 从而排除了抗生素。1992 年, Havenaar 等人将 Probiotics 定义为“由单一或多种微生物组成的活菌制剂, 当应用于人或动物后, 能通过改善宿主土著菌群的组成, 从而促进人或动物的健康”, 该定义从多方面发展了益生菌这一概念。首先, 它不再将益生菌的作用仅局限于肠道菌群, 还有可能作用于其他部位的菌群组成, 例如呼吸道、泌尿生殖道和皮肤等部位; 其次, 它首次明确地提出了益生菌在人体中应用的概念; 第三, 益生菌可以由一种以上的微生物组成。后来, 为了区分普通的酸奶菌种 (或酸奶产品) 与益生菌及其产品, Schrezenmier 等 (2001) 将 Huis in't Veld 和 Havenaar (1992) 所提出的 Probiotics 定义进行了修订, 修订后的“益生菌”的定义为: 含有足够数量活菌、组成明确的微生物制剂或产品, 能通过定殖作用改变宿主某一部位菌群组成、从而产生有利于宿主健康作用。该定义的不足之处在于仍然没有区分特定的微生物与产品的具体形式, 我们建议采用以下的定义, 通过定殖作用改变宿主某一部位菌群的组成、从而产生有利于宿主健康作用的单一或组成明确的混合微生物。采用该定义的理由如下。

① 到目前为止, 对肠道或泌尿生殖道等部位土著菌群的组成并不十分清楚, 因此相对于“改善土著菌群的组成”的定义可能更确切; “土著菌群”是指定殖于宿主特定部位、没有受到药物、试验处理或疾病影响的微生物菌群, 而益生菌在多数情况下是作用于已经发生扰乱的菌群。

② 该定义明确指出益生菌的作用是通过在特定部位的定殖而发挥其对宿主健康的有利作用。

③ 区分特定的微生物与具体的产品形式; 并明确区分常见的酸奶发酵菌种 (*S. thermophilus* 和 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 与具有特定健康促进作用的益生菌。尽管酸奶发酵所用的两种乳酸菌进入人体内后可以释放出 β -半乳糖苷酶, 可以促进乳糖吸收与利用, 缓解乳糖不耐症, 但它们不能改变特定部位菌群的组成或调节黏膜的免疫功能, 因此, 一般不认为它们属于益生菌。

④ 尽管对于某一特定的微生物而言, 要发挥其作用需要一定的数量, 但只是一种剂量效应而已, 不需要在定义中过分强调活菌数量的概念。

Probiotic (益生性或益生作用) 则是指某种微生物制剂或发酵制品通过调节宿主黏膜与系统免疫功能以及改善肠道营养与菌群平衡对宿主所产生的有益的生理作用。尽管部分乳杆菌和双歧杆菌不能以活菌状态到达肠道, 并在那里定殖, 但其细胞壁成分仍可以发挥抗瘤变

和免疫调节作用，例如热灭活的 *Lb. casei* LC9018（见“益生菌对免疫系统的调节作用”一节），达到对人体健康的促进作用。

从远古开始，乳酸菌就已经在各种发酵食品中应用。数千年来，这些传统食品对食物的保存作用以及对人类健康的促进作用即为众所周知。因此，在早期的微生物学中乳酸菌发酵扮演了重要的角色。自 1857 年 Louis Pasteur 提出发酵过程是由细菌引起的理论之后，Joseph Lister 试图证明乳酸发酵的微生物本质。他以煮沸过的牛奶为培养基，在一次偶然的机中，分离到历史上的第一株纯的细菌培养物，并将之命名为 *Bacterium lactis*。在经过几十年分离和描述新菌种的工作之后，Beijernick 于 1901 年首次提出了 *Lactobacillus*（乳杆菌属）这一分类名称，该名称至今仍在使用，包含有 50 多个种。

1907 年 Metchnikoff 根据他对“保加利亚杆菌（Bulgarian bacillus）”的研究结果，认为经常食用发酵乳有利于人体的健康，该菌与现代酸奶生长中所用的 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 非常相近。至今为止，乳杆菌仍然是应用最广泛的益生菌。目前常用作益生菌的乳杆菌有 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lb. acidophilus*、*Lb. casei*、*Lb. fermentum*、*Lb. reuteri*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. plantarum*、*Lb. lactis*、*Lb. gasseri*、*Lb. johnsonii* 等。

在人体消化道中定殖着种类繁多的微生物，其中一部分对人体健康有益，部分则有害。Tissier (1905) 从母乳喂养的婴儿消化道中分离到这样一种有益细菌，并将其命名为 *Bacillus bifidus*。将双歧杆菌用作益生菌就起源于该发现，目前作为益生菌常用的双歧杆菌有 *B. adolescentis*、*B. bifidum*、*B. longum*、*B. infantis*、*B. lactis* (*B. animalis*) 和 *B. thermophilum*，其中后两种双歧杆菌来源于人体以外的生境。将链球菌以酸奶的形式用作益生菌，则始于 Fuller (1993 年)，作为酸奶发酵剂菌种之一的 *S. thermophilus* 也是常用的益生性乳酸菌之一。

具有益生作用的乳酸菌通常都是肠道细菌，它们被认为具有改善人体胃肠消化道微生态环境的功能。益生作用的范围可以分为营养、生理作用和抗菌作用等三个方面。在这些方面研究及观察到的作用直接导致了各种含有乳酸菌的食品及饲料在人和动物中的应用，乳酸菌还具有潜在免疫辅助作用，口服乳酸菌可以激发黏膜和系统性免疫反应。益生性乳酸菌在营养及治疗方面的作用可归纳为以下几个方面（表 2-1）。

表 2-1 益生性乳酸菌所产生的健康促进作用及可能的作用机理

益生菌功能	提出的作用机理
减缓乳糖不耐症 对肠道菌群的调节作用	通过细菌性 β -半乳糖苷酶分解乳糖 乳杆菌能抑制小肠菌群过度生长； 降低或抑制其有毒代谢产物的产生； 抗菌作用
预防肠道感染	对抗体表达的增强有辅助作用； 能刺激系统性或分泌性免疫反应； 竞争性排除； 改变肠道的环境(如降低 pH 值、产生短链脂肪酸、细菌素等)，使其不利于致病菌的生存和或致病力的产生； 改变黏膜表面细菌毒素的结合位点，减少毒素的结合； 改变消化道菌群的组成； 黏附到肠道黏膜表面，阻止病原菌的黏附， 与致病菌竞争营养物质；

益生菌功能	提出的作用机理
增强免疫功能	增强机体对感染的非特异性抵抗力； 提高白血细胞的吞噬活性； 在受到减毒的 <i>Salmonella typhimurium</i> 致敏时，增加血清 IgA 的表达； 促进网状内皮组织淋巴细胞增殖； 在抗原特异性免疫反应中发挥免疫佐剂的作用； 调节 Th1/Th2 平衡，诱导细胞因子的合成；
减少炎症或过敏反应	使免疫系统回复到静息状态； 调节细胞因子的合成； 阻止抗原在血液中转位(或转移)；
抗大肠癌作用	与突变剂结合； 钝化致癌物； 改变大肠菌群的活性； 免疫反应； 影响次级胆盐的产生；
改变血脂浓度，减少心脏病发病风险	同化胆固醇； 改变肠道菌群胆盐水解酶活力； 抗氧化作用；
抗高血压作用	通过肽酶的作用，分解乳蛋白产生具有抗高血压作用的小肽(例如 IPP、VPP，均为血管紧张素转化酶抑制剂 ^①)；
预防和治疗泌尿生殖道感染	细胞壁成分对血管紧张素转化酶有抑制作用； 黏附到尿道和阴道上皮细胞表面； 竞争性排除； 产生抑菌物质(如 H ₂ O ₂ 、生物表面活性剂等)
预防和治疗由 <i>Helicobacter pylori</i> 所引起的感染	竞争性排除； 产生乳酸； 乳杆菌培养上清液中存在可以降低 <i>H. pylori</i> 脲酶的物质；
调节消化道的蠕动性(减缓便秘)	短链脂肪酸刺激肠道收缩
产生良好的心理感受	

① 除 IPP、VPP 外，已经发现益生菌分解乳蛋白后的产物中多种小肽在体外具有 ACE 抑制作用，在 SHR 中有降压作用；此外，益生菌还可以产生其他使血管扩张的代谢产物。

此外，乳酸菌作为益生菌还拥有经济方面多重优势：如利用乳糖、蛋白酶活性，抗防御噬菌体侵染的机制，以及产生细菌素等。这些益生作用中有相当一部分是由稳定性较差，能自发转移的质粒所控制。因此，在乳酸菌研究中，重点之一就是使这些具有重要工业应用价值的性能改善和稳定。近几年来，重组 DNA 技术如基因表达载体、基因转移、基因表达系统等被广泛用于发酵剂的遗传改良及定位修饰。乳酸菌现在已成功用于精细化工产品，药品以及其他有用产品的工业化生产。

最近在全球范围兴起的益生菌热潮主要是其对各种疾病的预防作用以及可以作为更多的传统药物的替代品，尽管益生菌在人和动物中的应用已有好几个世纪，但直到最近才开始在临床上研究益生菌的功能与作用。益生菌在食品中应用最普遍的形式是发酵乳产品，益生性乳酸菌的功能及对健康的促进作用还在不断地被发现。本章将概要地总结已发表的关于益生性乳酸菌在体外及体内的益生作用。

第一节 人胃肠道的微生物生态学

一、人胃肠道微生物菌群的组成

(一) 肠道微生物菌群的起源, 组成以及功能

与人体大约 2m^2 的体表相比, 消化道是人与外来环境接触更大的部位, 从图 2-1 可以看到, 小肠黏膜的表面积通过多种方式极大地获得了拓展。例如通过形成折叠表面积增加 3 倍, 通过小肠上皮细胞的折叠增加 7~10 倍, 通过小肠吸收性肠腔膜形成微绒毛使表面积进一步扩大 15~40 倍, 导致消化道最终表面积可达到 $200\sim 300\text{m}^2$, 从而为食物的消化过程以及外来微生物黏附并定殖的过程提供必要的空间。人体消化道内共有 10^{14} 个细菌, 大约是人体细胞的 10 倍, 长期以来, 这些细菌在人体中存在的作用被忽视, 大多数时候人们关注的仅仅是其中的肠道致病菌或其他一些导致消化系统紊乱的“捣乱者”。

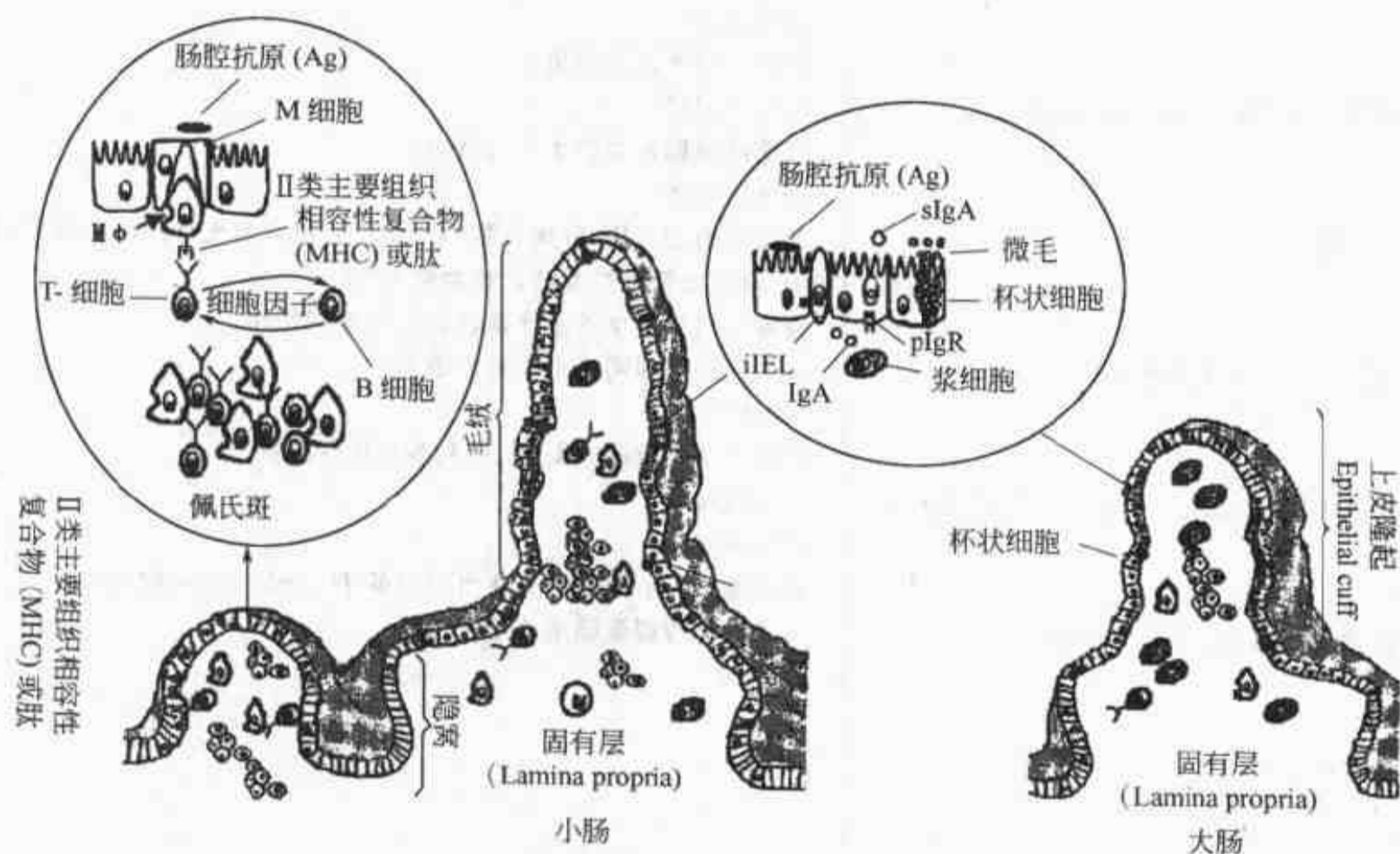


图 2-1 消化道黏膜与 GALT 的结构示意图

当完整的小肠上皮细胞被有益于人体健康的细菌占据时, 就形成了一道防止病原菌侵染以及肠腔中抗原或有害化合物被吸收的屏障。

除去屏障作用, 小肠黏膜还可有效地同化抗原 (消化), 存在于小肠绒毛上皮细胞以及 Peyer's 斑特异化的抗原运输机制是激发人体特异性免疫的基础, 在健康人体内, 这种屏障作用是稳定的, 能产生宿主保护反应, 提供正常的小肠功能以及对微生物的抵抗作用。小肠对感染性微生物的屏障保护作用由于与消化道相关淋巴组织 (GALT) 的存在而一步完善的、GALT 被认为是人体内最大的免疫器官、每米小肠存在 10^{10} 个能产生免疫球蛋白的细胞亦即人体 80% 产生免疫球蛋白的细胞都分布在这里, 肠道菌群本身对于黏膜免疫刺激 (激活) 和免疫细胞的放大有重要的作用。

(二) 人体胃肠道的微生物生态学

据估计, 在人体肠道中生存着大约 400 余种细菌, 其中的 30 到 40 种占据可培养肠道菌群的 99% 以上, 环境因子、生理作用以及饮食的种类是决定各种细菌在消化道分布区域的

主要因素。在其他因素中，饮食是调节殖居于消化道特定种类细菌出现频率及数量的主要因素。研究还显示，饮食的组成可以影响肠道菌群的代谢活性。

人体胃肠道分布着各种兼性厌气和厌气微生物，胃中的菌群主要以好气性的革兰氏阳性菌为主，浓度 $<10^3$ cfu/ml；大肠中细菌的数量最高，约为 10^{14} 个，是人体细胞总数的10倍。随着年龄的增长，人粪便中微生物菌群的组成在不断变化，断奶婴儿、儿童和成人粪便菌群的组成具有一定的相似性。但进入老龄后，组成会发生显著的改变，西方国家人粪便菌群的典型组成如下（按浓度递减排列）：① *Bacteroides*（拟杆菌）、*Eubacteria*（优杆菌）、*Peptostreptococcus*（消化链球菌）和双歧杆菌（ $10^{10} \sim 10^{11}$ /克粪便）；② 大肠菌群和链球菌（ 10^8 至 10^9 /克粪便），前者主要由 *E. coli* 构成，尽管在大肠中会出现少量的 *Klebsiella* 和 *Proteus*；③ 乳杆菌（ $10^5 \sim 10^8$ /克粪便）；④ 梭状芽孢菌和葡萄球菌（仅占健康成人粪便的极少量）。婴儿出生后，在头2天其肠道即被以 *Enterobacteria*（大肠菌群）例如 *E. coli* 和 *Enterococcus* 为主的微生物所占据。随后，在母乳喂养婴儿的粪便中，双歧杆菌的数量开始急剧增加，而乳杆菌和拟杆菌增加的幅度略小一些，与此相反，*Enterobacteria* 和 *Enterococcus* 的数量则下降。

在母乳喂养的婴儿中，双歧杆菌占粪便菌群量的80%~90%。定殖于母乳喂养婴儿肠道的双歧杆菌主要有 *Bifidobacterium bifidum*、*B. infantis*、*B. breve* 和 *B. longum*。母乳喂养或人工喂养婴儿肠道内占优势地位的双歧杆菌种类则随地理区域的不同而变化。在法国，*B. bifidum* 是母乳喂养婴儿粪便中主要的双歧杆菌，而日本婴儿粪便中主要的双歧杆菌则是 *B. breve*。

粪便菌群的变化可能与粪液的酸度有关。当年龄为1个月时，婴儿粪便中的菌群组成已趋于稳定，此时母乳喂养婴儿粪便的pH值为5.0~5.7；而人工配方喂养婴儿粪便的pH值为7.0~7.5。母乳喂养婴儿肠道的高酸性环境可以部分解释粪便菌群以双歧杆菌为主及腐败性细菌数量减少的原因；而人工配方中蛋白与磷酸盐的高含量导致其具有较高的缓冲作用，从而使肠道的pH值较高，母婴喂养婴儿大肠酸度的降低也使其他类型的细菌与双歧杆菌一道增加。

与母乳喂养婴儿不同的是，人工配方喂养婴儿粪便中肠杆菌和肠球菌的数量比较稳定，而拟杆菌和双歧杆菌的数量开始增加。经过大约2周后，其粪便菌群的组成即保持相对稳定。无论是母乳喂养还是人工喂养的婴儿，其粪便中肠杆菌、肠球菌、拟杆菌和双歧杆菌的数量基本上相似，都出现以双歧杆菌为主的趋势。不同的是，在人工喂养的婴儿中，其他细菌出现的频率和数量较母乳喂养婴儿高。

迄今为止，有多项研究结果表明，与人工喂养婴儿相比，母乳喂养婴儿粪便中双歧杆菌的浓度较高，而粪便的pH值较低。这些研究结果表明，在出生后的第4天，所有新生儿的大肠都出现了双歧杆菌定殖。大约2周后，其粪便菌群的组成变得相对稳定，保持以双歧杆菌为主的情况。

给婴儿进食固体食物似乎在母乳喂养与人工喂养婴儿之间发挥了一种平衡的作用。固体食物会引起母乳喂养婴儿的肠道菌群组成发生重大的改变。其中，肠杆菌和肠球菌的数量急剧上升，其次是拟杆菌、梭状芽孢菌和厌氧性球菌；而在人工喂养婴儿中，这一变化过程是否存在还不清楚。在引入固体食物后，婴儿肠道中厌氧菌的数量仍保持较高的水平，而非双歧杆菌的数量进一步增加。到第十二个月，母乳喂养和人工喂养婴儿大肠中厌氧细菌的数量及组成与成人基本一致，并且伴随兼性厌氧细菌数量的减少。

(三) 微生物的组成与肠道微生境

组成肠道内微生物菌群的种类和数量与一系列因素有关，既与消化道本身的一些特性有关，也与一些外来的因素如饮食、压力、药物等因素有关。从口腔接近中性的环境到胃的酸性环境 (pH2.5~3.5) 对多数微生物有破坏作用，此时每克 (或 ml) 消化道内容物中微生物的数量为 10^3 个，而且主要以 G^+ 的链球菌、乳杆菌以及酵母菌为主；进入十二指肠以后，由于消化液的增加 (例如，胆汁、胰液) 以及停留时间短，十二指肠的环境非常不利于各种微生物的生存，此时微生物的组成不稳定，仅以极低的限数存在。在 20 世纪 60 年代早期，Reuter 及其同事非常仔细地研究了人体消化道各部位微生物群落的分布 (见图 2-2)，此后的研究者主要将工作重点放在更容易研究的粪便微生物菌群上，至目前为止，还没有对粪便菌群采用最新的微生物学方式进行取样及鉴定，以获得详细的数据。

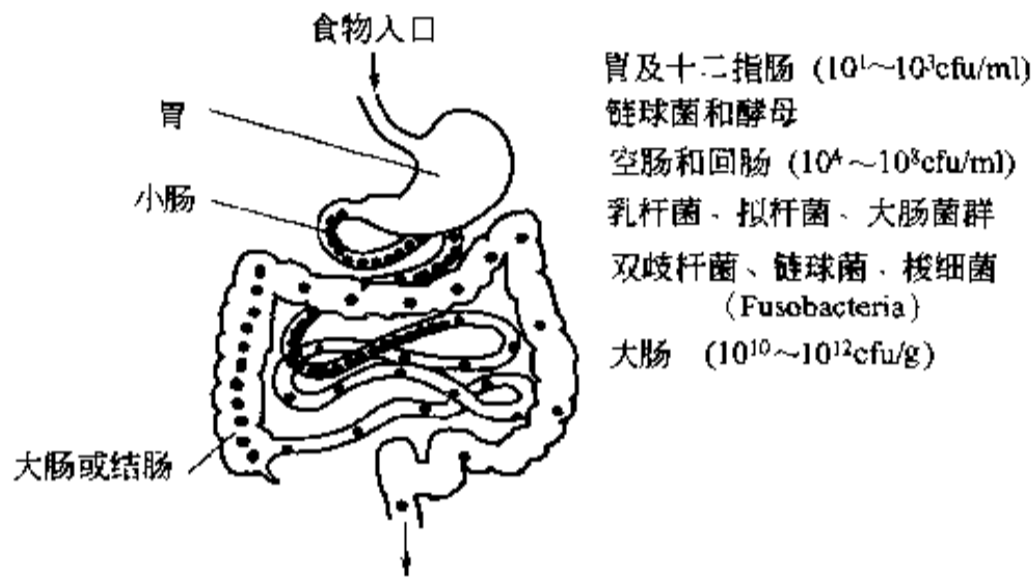


图 2-2 人体消化道各部位细菌的分布情况

现有的资料表明进入空肠和回肠后，微生物的数量开始增加 (达到 10^8 cfu/g)，而且种类也在不断增加 (空肠→回肠过程中，数量和种类在不断增加)。在小肠末梢，除了乳酸菌，尤其是双歧杆菌的数量级增长外，其他一些 G^- 兼性好气菌如大肠菌科的细菌，以及专性厌氧菌群如 *Bacterioides* 和 *Fusobacterium* 也开始出现，甚至在回肠/盲肠阀之前严格厌氧微生物已开始出现，此后 (即在盲肠之后) 严格厌氧的微生物在数量上超出兼性厌氧的微生物 100~1000 倍，此时细菌的数量可达到 10^{12} cfu/g。

通常认为健康成人大肠内分布着 300~400 种微生物，分属于 190 多个不同的属，其中有相当一部分微生物按现有技术是不可培养的。在已知的大肠微生物菌群中，仅仅有少数主要的群落能达到 $10^{10} \sim 10^{11}$ /g 的水平，它们都是严格厌氧的微生物如 *Bacteroides*、*Eubacterium*、*Bifidobacterium* and *Peptostreptococcus*；兼性好气菌属于次主要 (中间) 群落，包括大肠菌群、链球菌和乳杆菌。

与大肠菌群微生物群落相比，粪便微生物菌群在数量上进一步分化，它们可作为大肠末端菌群组成的优良指征。然而，它们不能反应肠道菌群，尤其是小肠菌群的组成，而且我们目前对菌株，种甚至属水平稳定性的了解是非常有限的。尽管从种的水平上而言，组成“正常”菌群的种类相当稳定，但构成这些菌群的菌株则常发生变化。DNA 指纹技术 (Genetic fingerprinting techniques) 显示，每个人体内 *Bifidobacterium* 及 *Lactobacillus* 菌株的组成都不完全相同，同时还表明在部分个体内这些菌株的组成比较稳定而对于另一些个体则容易发生波动。

致病菌或条件致病菌通常以很少的数目存在，又被称为残余菌群 (Residual flora)，当

宿主处于健康状态时，它们产生的有毒代谢物不足以对宿主的健康产生危害作用，Duclozeau (1989) 认为只有当这些致病菌或条件致病菌中某个种的数量超过 5×10^7 cfu/g 后才会对宿主产生显著的作用，这仅仅是针对大肠而言；在其他部位可能仅需要很低的数量就会对宿主的健康产生重大的影响（如空肠），在这些部位宿主对这些细菌代谢产物采用主动吸收的方式。

(四) 影响微生物在肠道定殖、替代和分布的因素

在分娩过程中，新生儿接触到的微生物来自两方面：母亲的生殖道以及出生时的环境，最开始是 *E. coli* 和链球菌为主，但采用母乳喂养以后，*Bifidobacterium* 数量急剧上升，伴随的则是 *E. coli* 和链球菌数量的减少。而 *Clostridium* 很少或几乎不存在；而采用人工喂养的婴儿则无此变化。其消化道菌群的组成相当复杂，其中 *Bacteroides*、*Clostridium* 和 *Streptococcus* 的数量非常高，*Bifidobacterium* 也存在，但不是优势菌群，这一点可以明确显示食物可以影响肠道菌群的构成。当母乳喂养婴儿被给予补充食品以后，*Clostridium*、*streptococcus* 和 *E. coli* 的数量开始大量增加，其消化道菌群组成接近于人工喂养婴儿。此时，*Bacteroides* 和 G^+ 球菌的数量也开始上升，并达到很高的数量；过了断奶期以后，其消化道菌落组成就开始向正常成人菌落组成方向演化。一般来讲，链球菌和 *E. coli* 数量下降，从第 2 年（即 1 周岁以后）开始，其肠道菌群的组成与成人非常接近。

肠道的生理状态以及宿主防卫机制在防止菌群过度生长以及在胃-肠消化道菌群的最终构成及分布中起着重要的作用。影响胃肠道菌群组成的主要因素见表 2-2，这些因素可能是由于生理状态的改变所引起（衰老、压力、健康状况、种族环境），也可以是食物的组成及环境因素（例如，感染致病菌、使用抗生素治疗等）。在此种情形下，如果消化道的某些因素发生改变（如 pH、底物的来源、还原电位、停留时间、肠液的流动、IgA 的分泌），最终可能导致有益细菌的减少，有害细菌数量的上升。饮食或气候的改变、衰老、治疗、疾病或感染通常会导致小肠内厌氧菌及 *E. coli* 数量的上升，以及大肠内大肠菌群的增加，与此相应的则是双歧杆菌数量的减少；组成肠道菌群的微生物之间也可通过产生 H_2O_2 、有机酸或细菌素等调节相互之间的组成。

表 2-2 影响胃肠道菌群组成与分布的因素

<p>1. 由宿主主导的因素 pH, 免疫球蛋白、胆汁、盐及酶的分泌 运动性如食物排空的速度、肠的蠕动 生理学如分隔 鳞片样脱落细胞、黏膜素、组织渗出液</p>	<p>3. 微生物之间的相互作用 协同作用 代谢合作 生长因子及维生素分泌 改变 Eh、pH、O_2 限制 拮抗/或刺激作用 短链脂肪酸、各种胺； 抗菌物质、Siderophores(铁离子载体) 营养竞争等</p>
<p>2. 微生物因素(菌学特征) 黏附性 运动性 营养需求 芽孢、粪便、酶、抗菌物质 代时(繁殖速度)</p>	<p>4. 饮食 食物的组成、非消化性纤维、药物等</p>

(五) 肠道菌群的功能

肠道菌肠可以通过多种生理功能来影响宿主的健康，因此胃肠消化道微生态平衡的破坏可能会对机体健康造成危害，组成典型肠道菌群中的细菌可以通过以下方式之一，促进机体健康。①分解某些食物成分；②产生 B 族维生素；③刺激免疫系统；④产生某些消化及保

护性酶类；⑤分解某些潜在致癌物质。此外，还能产生某些抗菌物质（如短链脂肪酸）以及对药物的疗效产生影响。这两种作用既可能有利于机体健康也可能对机体健康产生不利的影响，而且肠道黏膜的形成也依赖于肠道菌群产生的短链脂肪酸（SCFA）。道肠菌肠作为一种屏障，在阻止致病菌或条件致病菌对机体的侵染的过程中发挥了极其重要的作用。每天有大量的外来微生物通过饮食等途径进入胃肠道，它们中的绝大多数几乎没有在肠道生存的机会。

肠道土著菌群对消化道相关淋巴组织发育及其功能的调节具有重大的影响，与消化道相关的淋巴组织（GALT）是人体最大的免疫器官，不断受到外来抗原的刺激，其中消化道菌群是主要的抗原物质，在人的胃肠道内大约定殖有 10^{14} 个活的细菌，细菌的数量与组成在消化道内变化极大，根据宿主的生理条件及细菌的相互间的作用在肠道内形成了极其复杂的微生态系统，Duchmann 等 1995 年证实 GALT 对肠道的土著菌群具有耐受作用，相反，肠道菌群对 GALT 的发育及其功能具有重要的作用。

二、细菌在消化过程中的存活性

从食物或环境进入口腔的细菌随唾液一起进入胃中，绝大多数细菌在胃中会被胃酸杀死。在胃肠消化道众多防卫机制中，胃酸是防止食物来源的致病菌侵染机体一种主要的手段，胃酸对保持小肠上端细菌数量较少，也发挥了重要的作用，因为只有少数最耐酸的细菌才能在通过胃部时存活下来。而小肠则是细菌数量稀少的胃部与细菌数量庞杂的大肠部位的中间过渡地带，小肠近端的菌群数量与胃中的相似，约为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml，以好气性的革兰氏阳性菌为主，尽管大肠菌群和厌氧菌时常会以较低的浓度出现。

在小肠中，肠道的蠕动及胆汁的抑制作用是防止细菌过度生长的主要原因。在远端的回肠，革兰氏阴性菌与厌氧菌的数量开始超过好氧菌，前者包括各种 *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* 和 *Fusobacterium* 菌，从回盲阀开始，细菌的浓度急剧增加。在大肠内细菌的数量可达 $10^{11} \sim 10^{12}$ cfu/ml。在布满各种细菌的大肠环境中，不同细菌彼此竞争，从而调节着大肠微生物的种类与数量。例如，某些既能在好氧又能在厌氧条件下生长的细菌将大肠中的氧气清除后，可为某些对氧极端敏感厌氧菌的生存创造条件。

三、乳酸菌的黏附机理

为了发挥其对健康的促进作用，益生性乳酸菌在胃肠消化道中必须保持一定的数量，以防止其因为消化道的收缩而被快速排除。乳酸菌对黏膜表面的黏附能力可为其提供竞争优势，这一点对于维持消化道菌群平衡非常重要。否则，这些细菌在消化道的滞留时间将非常短。显然，对黏膜的黏附能力是细菌在消化道长期定殖并存在的必要条件。

Clements 等在研究一种乳杆菌产品的益生效果时，发现不同批次冷冻-干燥的乳酸菌产品之间的差异非常显著，而这一差异似乎与产品制备过程中，使乳酸菌的黏附能力发生改变有关。因此，作为膳食补充剂的乳酸菌菌株必须性能稳定；而且在经过冻干处理后仍能保持良好的黏附能力。

Chauviere 等报道，仅有少数乳杆菌菌株能黏附于人大肠癌-2 细胞（Caco-2）或 HT-29 细胞株。Conway 和 Kjellberg 从 *Lactobacillus fermentum* 中发现了一种可介导宿主特异性细菌黏附作用的胞外蛋白质，并且将利用这种蛋白质促进细菌黏附作用的技术申请了专利。部分研究者则对碳水化合物在乳酸菌黏附过程中的作用进行了研究，已证明乳杆菌的细胞壁组分参与了乳酸菌对人尿道上皮细胞的黏附作用。此外，乳杆菌细胞壁的碳水化合物组分可参与细菌对鸡喙囊和猪小肠鳞状上皮细胞、鼠胃鳞状上皮细胞及鸡小肠上皮细胞的黏附作

用。由于影响黏附过程的黏附因子多种多样，乳酸菌在对小肠的定殖过程中是通过细胞表面的不同结构来完成黏附作用的。由于不同动物的小肠从化学组成与可利用的营养物质不尽相同，因此，黏附作用具有宿主特异性是意料之中的事情。

Elo 等报道从冻干粉或不同乳制品中获得的 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) 对 Caco-2 细胞株具有中等至强烈结合能力。该菌在液体培养基中连续传代 3~5 年后，对 Caco-2 黏附作用才出现降低。不过，LGG 从人胃肠道消化道的经过，并不改变其对 Caco-2 的结合作用。实验已证明普通的酸奶菌种 *Lb. bulgaricus* 以及 *Lb. acidophilus* NCFD1748 不具有对 Caco-2 的黏附性，而部分 *Bifidobacterium* 菌株则表现出对真核细胞中等强度的结合作用。与非黏附菌株不同的是，LGG 在人肠道中表现出迅速繁殖和长久滞留等特点。

Bernet 等报道，*Bifidobacterium breve* 4, *B. infantis* 和三株新从人体分离的双歧杆菌菌株对 Caco-2 细胞及体外培养的 HT29—MTX 细胞所分泌的黏膜具有高度的黏附作用，且这种黏附作用不依赖于钙离子的存在。这些细菌能与完整 Caco-2 细胞表面的微毛尖端发生结合作用。这种黏附作用是由一种特异性的蛋白样促进因子所介导的，后者存在于细菌完整细胞的表面及双歧杆菌培养上清液中。他们还发现，*Lb. acidophilus* LA1 对 Caco-2 细胞及体外培养的 HT29—MTX 细胞株所分泌的黏膜有类似的黏附作用。

Greene 和 Klaenhammer 等阐明了参与人源 *Lb. acidophilus* BG2FO4 和 NCFM/N2 及 *Lb. gasseri* ADH 对人 Caco-2 小肠细胞黏附过程的黏附因子。对这三株菌而言，黏附作用具有浓度依赖性，在酸性 pH 值黏附作用更强。它们对 Caco-2 小肠细胞的黏附作用明显强于 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1489。在采用蛋白酶对细菌细胞处理后，*Lb. acidophilus* BG2FO4 及 NCFM/N2 的黏附作用降低，而 *Lb. gasseri* ADH 的黏附能力不受影响，甚至有所增加。在 *Lb. acidophilus* BG2FO4 及 NCFM/N2 中存在细胞表面蛋白这一猜想获得了证实，但该蛋白层并不参与黏附过程。采用过氧化物将细菌表面的碳水化合物氧化后，可显著降低 *Lb. gasseri* ADH 的黏附作用，而 *Lb. acidophilus* BG2FO4 的黏附作用被中等程度地降低，而 NCFM/N2 菌株则不受影响。以上结果表明，在乳杆菌对人肠道细胞的黏附过程中，涉及细菌与真核细胞表面碳水化合物与蛋白质因子不同的组合。曾认为在 *Lb. acidophilus* BG2FO4 培养上清液中存在一种作为该菌黏附作用主要介质的神秘桥蛋白，这一猜想在此实验中未获得证实。相反，培养上清液的 pH 值却对该菌株对 Caco-2 的黏附作用有显著的影响。

部分暂时性的肠道细菌在对机体施加有益作用时，并不需要黏附到小肠黏膜上。这一点似乎仅是个别的例子，如酸奶菌种在体内帮助乳糖消化时正是如此。在停止食用微生物制剂以后的数天甚至数周后，仍然可以从摄食者的粪便中分离到这些乳酸菌。由此可以看出，尽管它们不可能永久性的存在于体内，但其滞留时间足以保证它们在体内发挥相应的功能。因此，可以设想如果连续服用这些益生菌，这些由食物而来的外源微生物就可以降低肠道 pH、产生抗菌物质、中和毒素、促进营养物质吸收与利用，或者进行其他生化活动，从而达到调节胃肠道生态平衡的作用。

四、影响乳酸菌定殖的因素

(一) 促生长因子

一个世纪以前，在比较母乳喂养婴儿与人工喂养婴儿粪便菌群组成时，Tisser 等发现前者粪便中主要的微生物是 *Bifidobacterium bifidum*。后来的研究进一步证明，含有氨基糖

残基的寡聚糖可作为 *B. bifidum* 的生长因子。值得注意的是，目前从母乳中已发现了 130 多种由乳糖衍生出来的寡聚糖。在这些寡聚糖中，有一部分如 Lacto-N-Tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) 和 Lacto-N-Fucopentaose (Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) I 和 II 在母乳中浓度可高达 1 至 2g/L。由于母乳中各种寡聚糖的总浓度在 3~6 g/L，因此，可以认为这些成分是母乳中寡聚糖的主要组分。更让人吃惊的是，人母乳中的寡聚糖对双歧杆菌对上皮细胞的黏附作用具有强烈的抑制作用，而细菌对上皮细胞的黏附作用是致病菌侵染人体的早期过程。因此，在人母乳喂养的婴儿体内，母乳中的寡聚糖可作为上皮细胞表面参与非免疫性防御系统受体的可溶性类似物，因而人乳具有引发并维持双歧杆菌在婴儿大肠中占据优势地位的独特功能。有证据表明，除其他的保护性因子外，母乳的这种功能可能对宿主抵御肠道感染发挥有益的影响，并促进机体对其他乳成分的利用。

Ashoor 和 Monte 等利用等渗 (isocratic) 高效液相色谱的方法从母乳中分离到两种 *B. bifidum* 的促生长因子。Petschow 和 Talbott 等研究了人乳、奶牛乳以及人乳或奶牛乳中乳清及酪蛋白组分对 5 株从人婴儿粪便中分离的双歧杆菌菌株的促生长作用。当以相同蛋白质浓度为基础进行比较时，人乳对 *B. bifidum* serovar *pennsylvanicus* 及 *B. longum* 促生长作用大于奶牛乳，而对于 *B. bifidum*、*B. infantis* 和 *B. breve* 而言，两者的促生长作用相似。将人乳或母乳进行巴氏消毒处理后，其对 *B. bifidum* serovar *pennsylvanicus* 及 *B. bifidum* 的促生长作用增强，而对 *B. infantis* 的作用下降，对 *B. breve* 和 *B. longum* 的作用则不受影响。人乳乳清组分对四株双歧杆菌的促生长作用略高于人乳酪蛋白组分。当以牛乳作为底物时，*B. bifidum* serovar *pennsylvanicus*、*B. bifidum*、*B. infantis* 及 *B. longum* 完全不生长。然而，奶牛乳乳清组分双歧杆菌的促生长作用类似于人乳乳清。

以奶牛乳为基料的婴儿配方奶对双歧杆菌的作用与奶牛乳相似，以乳清成分为主的婴儿配方奶对 *B. bifidum* serovar *pennsylvanicus*、*B. infantis*、*B. bifidum* 和 *B. longum* 的促生长作用大于以酪蛋白为主的婴儿配方乳。以上的结果表明，人乳、奶牛乳以及以奶牛乳为基料的婴儿配方乳中乳清特异性因子的浓度与其对双歧杆菌的促生长作用存在直接的关系。在随后的另一项研究中，Petschow 和 Talbott 采用超滤的方法将乳样品分成蛋白氮和非蛋白氮两部分，人乳对双歧杆菌的促生长作用主要存在于非蛋白氮部分，而奶牛乳清中促进双歧杆菌生长的成分同时存在于蛋白氮和非蛋白氮部分。对经过纯化的牛乳清蛋白研究后发现， α -乳白蛋白和乳铁蛋白是两种非常有效的促生长因子，其对 *B. infantis* 和 *B. breve* 的促生长作用大于对两株 *B. bifidum* 的作用。相反，N-乙酰葡萄糖胺和纯化后的胃黏膜素对 *B. bifidum* 有高度地促生长作用，但对其余的四株双歧杆菌无效。

Romond 等检测了无菌小鼠粪便中对 *B. bifidum* 有促生长作用的因子。绝大多数促生长因子集中于经过水溶液抽提、透析后的不可透析部分。电泳和凝胶过滤试验结果表明，多种糖基化成分具有促双歧生长作用。*B. bifidum* 在这种无菌小鼠体内的定殖过程涉及对这些小肠中促生长因子的利用，直至其完全消失。

Poch 和 Bezkorovainy 在含有充足无机盐、维生素、氮源及碳源的合成培养基上对各种生物材料对多种双歧杆菌的促生长作用进行了筛选。结果表明，只有 *B. adolescentis* 和 *B. longum* 能在合成培养基上生长，而其余的双歧杆菌则需要添加促生长因子才能生长。其中，牛酪蛋白消化物与酵母抽提物是效果最好的促生长因子。其他的促生长因子包括人与牛乳清、马胃黏膜素，牛血清白蛋白消化物则仅对某些特定的双歧杆菌有促生长作用。据报道，天然的橡胶浆液对多种微生物，包括数种双歧杆菌，也有促生长

作用。

许多其他肠道细菌，如 *Bacteroides*、*Enterobacter* 和 *Enterococcus* 等也能分泌促双歧生长因子，它们可能对调节双歧杆菌在大肠菌群中的数量有重要的作用。将 *Propionibacterium freudenreichii* 7025 的培养物采用过滤法分成菌体和培养液两部分，在除去细胞的滤液及细胞甲醇抽提物发现了一种促双歧生长因子。Mori 等则通过硅胶柱层析、Sephadex LH-20 柱层析和制备性 HPLC 的方法，从 *P. freudenreichii* 细胞中分离到一种促双歧生长因子。经过高分辨率的质谱仪分析，这种促双歧生长因子的分子量为 217.037 ($C_{11}H_7NO_4$)。通过多种实验分析后发现，该双歧杆菌促生长因子的化学结构为 2-氨基-3-羰基-1,4-萘醌。

Hara 等在 8 只年龄为 30 天的仔猪中研究了茶多酚对猪粪便菌群组成与代谢活性的影响，他们将这些仔猪分为两组：一组给予基础饮食（对照组），另一组在基础饮食中补充 0.2% 的茶多酚，持续 20 天。在给予茶多酚 7 天和 14 天时，与对照组相比，试验组仔猪粪便中乳酸菌的浓度显著增高，而细菌总数及拟杆菌的浓度则降低。在给予茶多酚期间，凝集酶阳性的梭状芽孢菌，包括 *Clostridium perfringens* 检出的频率下降。其他细菌的浓度无明显变化。仔猪在摄入茶多酚以后，粪便的 pH 值出现轻微的降低。有趣的是，摄入茶多酚后，仔猪粪便的气味明显减少。

多种过渡金属离子和二价阳离子对 *B. bifidum* serovar. *pennsylvanicus* 具有抑制生长作用。当 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Au^{3+} 、 Pt^{4+} 、 La^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cd^{2+} 存在时，添加 0.5 至 1.0 mmol Fe^{3+} 可以完全或部分逆转这种生长抑制作用；但当 Ag^+ 、 Hg^{2+} 或 VO^{2+} 存在时，添加 Fe^{3+} 则没有任何作用。此外，2 至少 4 mmol Ca^{2+} 几乎可以完全中和由 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 La^{3+} 引起的双歧杆菌生长抑制作用，或部分中和 Cd^{2+} 引起的抑制作用。 Mg^{2+} 不能中和由 Cd^{2+} 引起的抑制作用，但是 Ba^{2+} 或 Sr^{2+} 可部分替代 Ca^{2+} 的作用。钙代谢拮抗剂 Verapamil（异搏定，一种冠状动脉扩张药）、钌红（ruthenium red）、2-氯代腺嘌呤、拉沙里菌素（lasalocid）、 Ca^{2+} -离子载体 A-23187，以及钙调节蛋白抑制剂 W-5 和 W-7 可抑制双歧杆菌的生长，这种抑制作用可以完全或部分被 0.5~1.0 mmol Fe^{3+} 所中和； Mg^{2+} 可以中和由 lasalocid、 Ca^{2+} 离子载体 A-23187 和 Verapamil 所引起的抑制作用；而 Ca^{2+} 则仅对由 Ca^{2+} 离子载体 A-23187 所引起的抑制作用有效。因此，Ca 和 Mg 离子流在调节双歧杆菌的生理学方面有重要作用，而多种金属生长抑制剂则会干扰铁离子的代谢。

（二）益生菌（Prebiotics）

益生菌是一类不消化性的食物成分，能选择性地刺激大肠中一种或几种有益于宿主健康的细菌的生长繁殖和/或代谢活性，从而有利于宿主健康。摄入益生菌可通过增加大肠菌群中特定细菌的数量，从而改变大肠微生态组成。益生菌通常是一些不消化性的寡聚糖，尤其是寡聚果糖。研究表明，益生菌可以刺激肠道内源性双歧杆菌的生长，通过短时间的摄食后，使双歧杆菌成为大肠中的优势菌群。而且，这些益生菌可调节脂肪代谢，很可能通过发酵过程。通过益生菌与益生菌的合理搭配，可以显著地改善人消化道的菌群平衡，从而促进人体健康，其作用机理在于抑制有害细菌的生长（或其代谢活力），或选择性地刺激有利于宿主健康的细菌的生长。

五、益生菌在调节消化道菌群组成中的作用

（一）益生菌对小肠菌群的组成和代谢的影响

小肠菌群的组成是相当稳定的，尽管就不同的个体而言，小肠菌群的组成会存在相当大的差异。不过给新生儿或成人服用益生菌确实能改成其粪便中微生物的组成及其代谢功能，

尽管有时这种变化很细微，多数情况下是提高了粪便中双歧杆菌和乳杆菌的数量，降低了粪便的 pH 以及那些可能诱发肠癌的细菌酶的活性。

大肠 (colon) 是一种相当稳定而且各种菌群组成相当恒定的微生态系统，大约由 $1 \times 10^{11} \sim 10^{12}$ 个微生物组成；相对而言，小肠的微生态系统则稳定性要差一些，更容易受到外来因素的影响，外来的益生菌在影响肠道菌群的组成受到的阻力要小得多。

外来益生菌对各种腹泻的影响是最能说明它们在消化道存活及影响肠道菌群组成的明证。腹泻是致病菌或病毒在小肠或大肠内过度繁殖所引起，如 *Cl. difficile* 引起成人腹泻、轮病毒引起婴儿腹泻等，导致腹泻的机理有多种，最终的结果都是引起肠液的积累和排出，最终导致身体脱水和脱电解质。腹泻的部分起因、致病菌的作用机制以及益生菌能治疗的见表 2-3。

表 2-3 腹泻的主要类型与致病机理

病原菌	作用位点	致病机理	能有效预防或治疗的益生菌
轮病毒	小肠	破坏纤毛细胞(Villus cell)	<i>B. bifidum</i> 和 <i>Strept. thermophilus</i>
<i>Cl. difficile</i>	大肠	肠道致病菌和细胞毒素	LGG
<i>E. coli</i> (旅行者腹泻)	小肠	吸附和内毒素	<i>B. bifidum</i>
沙门氏菌	小肠	侵染	LGG
志贺氏菌	小肠和大肠	侵染、产生毒素	LGG

新生儿肠道菌群的组成可通过包括婴儿配方食品在内的途径施予益生菌而达到，研究发现采用母乳喂养的婴儿其肠道菌群主要由双歧杆菌组成，他们比那些人工喂养婴儿对感染性疾病的抵抗力更高，这一现象激发了人们试图使人工喂养婴儿体内双歧杆菌占优的愿望，在一项为期 7 天的试验中，对采用人工配方食品喂养，人工配方食品（添加 *B. bifidum*）喂养以及母乳喂养婴儿粪便中微生物组成的分析表明；采用母乳或添加 *B. bifidum* 的人工配方食品喂养婴儿粪便中存在双歧杆菌，两者粪便的 pH 值也几乎相同，分别为 5.30 和 5.38，而采用人工配方食品（未添加双歧杆菌），喂养婴儿粪便中则找不到双歧杆菌的存在，其粪便的 pH 则高达 6.83。在 Langhendries 等 (1995) 进行的另一项为期 2 个月的实验中，给予人工喂养婴儿补充 *B. bifidum* 也获得相似的结果。当试验进行一个月后，采用添加 *B. bifidum* 喂养的婴儿体内双歧杆菌的定殖情况明显高于未添加双歧杆菌的人工喂养婴儿与母乳喂养婴儿双歧杆菌的是定殖情况无明显差异。

在成人体内也获得类似的结果，在对平均所龄为 31.5 岁的志愿者的试验中，与对照组相比，口服 *B. longum*（以菌片形式）志愿者粪便中双歧杆菌数量高、梭菌少，粪便 pH 值低，粪便内氨浓度低。对 64 名（平均年龄 24 岁）的女性研究后发现，服用 LGG 后能在其粪便中分离到 LGG，而且粪便中 β -葡糖醛酸苷酶、硝酸盐还原酶、甘胆酸水解酶活性降低，尿液中对甲酚，一种肠道 *Bacteroides fragilis* 的代谢产物也减少了。在其他的试验中发现，服用 *Lb. acidophilus* 后可以降低粪便中 β -葡糖醛酸苷酶、叠氮还原酶的活力。给小肠内不存在乳杆菌的小鼠饲喂 *Lb. acidophilus* 后可以获得相似的结果。

益生菌对人体肠道内微生物代谢功能的影响可通过测量成人志愿呼出的氢气的量加以评估，与预计的一样；口服 *B. longum* 的志愿者比服用安慰剂的志愿者呼出的氢气更多。内源性双歧杆菌是采用母乳喂养婴儿体内大肠菌群中的主导者，其在肠道菌群代谢中的作用可以通过测定粪便菌群对 ^{13}C 标记的葡萄糖 (C_3 被标记) 的代谢作用而确定，双歧杆菌将通过其特有的葡萄糖分解代谢途径产生 $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ ；与预想的一样，绝大多数产生的乙酸都是

这种类型，但目前这一方法尚未应用体内试验，而且 LGG，当加入到酸奶中时，能非常有效地治疗由红霉素治疗引起的腹泻。

益生菌对一些由于细菌过度繁殖引起的肠功能紊乱也有非常好的治疗和预防效果，慢性肾病患者，经常会出现小肠细菌过度繁殖，从而导致血液中二甲基胺和亚硝基二甲基胺水平偏高，而那些采取口服 2 株 *Lb. acidophilus* 治疗的患者体内这两种有毒物的浓度明显下降，从而极大地改善其生存质量。*C. jejuni* 是一种常见的引起食物中毒的致病菌容易在用于烧烤的小鸡中传播，但给这些鸡服用 *Lb. acidophilus* 后，鸡群中的 *C. jejuni* 就基本消失了。

不过目前有关这些作用的机理的研究尚未受到重视，例如 LGG 能缩短轮状病毒导致的腹泻的病程，其机理可能是激发了局部免疫作用。

(二) 抗消化道感染

益生菌可通过三种方式抑制病原菌引起的消化道感染：

- ① 阻碍特异性的吸附素，从而抑制病原菌在消化道内的定殖和转位；
- ② 促进免疫反应；
- ③ 干扰致病菌的吸附、生长和扩散。

益生菌能阻碍致病菌由特异性吸附素介导的对消化道上皮细胞的吸附，如 I 型和 P 型纤毛对消化道上皮细胞甘露糖的吸附，它们能通过竞争性结合到这些黏附素上从而阻碍病原菌的吸附。

益生菌的另外一种优点是其能在消化道内繁殖，从而通过抗黏附及其他机理（如细菌素、有机酸、生物表面活性剂、过氧化氢等）从而干扰致病菌的繁殖。然而，益生菌通常不易整合到消化道菌群形成的生物膜中，需要反复摄食才能获得理想的效果。部分原因是在胃中有 $10^3 \sim 10^5$ /g、小肠的前端有 10^8 cfu/g 及大肠内有 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g 细菌，这些细菌组成的微生态系统具有相对的稳定性，不易被益生菌所替代。益生性乳酸菌可以通过产生免疫耐受或在婴儿出生时整合进入这些微生态系统，以及介导宿主产生阻碍致病菌定殖的黏膜从而克服上述不利因素的影响。研究表明，当致病菌存在时，益生性乳杆菌可促进免疫反应，从而有利于将致病菌从消化道排除。然而，在其免疫调节作用与产生有害于机体的炎症反应之间仅存在细微的差异。乳杆菌对健康成人免疫功能的影响还有待进一步研究，某种益生菌用作食品时，这一点尤其重要。

治疗感染的另一途径是利用益生菌吸收或减少致病菌产生的有害代谢物如肠毒素等。目前已发现益生菌通过调整肠道菌群的组成，调节其酶的活性，从而减少肠道内致癌化合物的产生或缩短腹泻的病程。

(三) 益生菌的筛选标准

作为益生菌的乳酸菌必须是那些被公认为安全的微生物（GRAS 微生物），如果使用的是不具备生物安全性有案可查的新的菌种，在实际生产以前必须进行严格的毒理学和耐受性研究。作为筛选的第二个重要步骤是菌株的来源，主要是由益生菌产品的用途所决定。作为人使用的益生菌通常需要满足以下的要求：

- ① 人体来源，拥有可考证的安全和耐受记录；
- ② 能在胃酸和消化道胆汁存在的情况下存活；
- ③ 能改善肠道功能，纠正各种肠道异常症；
- ④ 产生维生素、能释放有助于食物消化、促进基本营养物资的吸收，钝化肠道内的致癌物和有毒物的各种酶；

- ⑤ 能黏附到人肠道上皮细胞、在黏膜表面定殖并能在消化道内生长繁殖；
- ⑥ 能产生抗菌物质，并且对各种人体致病菌具有广谱抗菌作用；
- ⑦ 具有能刺激免疫功能、增强宿主网状内皮细胞的防御功能。

(四) 益生菌的现状

以冻干粉或发酵食品形式出现的益生菌制剂或产品有多种，其中某些 *Lb. acidophilus* 菌株及 *Lb. casei* Shirota 由于其对人体健康的促进作用，可能是应用历史最悠久的两种益生菌。在已商业化生产的益生菌中，目前对乳杆菌的研究最系统，其次是双歧杆菌再次是其他一些乳酸菌及少数非乳酸菌（表 2-4）。

表 2-4 已应用于商业化生产的益生菌

乳 杆 菌	双 歧 杆 菌	其他乳酸菌	非 乳 酸 菌
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^a	<i>Bacillus cereus</i> ^{a,d}
<i>Lb. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i> ^a	<i>E. coli</i> ^d
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ^c	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. gallinarum</i> ^a	<i>B. breve</i>	<i>Ped. acidilactici</i> ^f	<i>freudenreichii</i> ^{a,d}
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i> ^d
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ^b	<i>Strept. thermophilus</i>	
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>Lb. reuteri</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>			

- 注：a. 主要用于动物；
 b. 与 *B. animalis* 同物异名；
 c. 作为益生菌的特性的研究尚不多；
 d. 主要用作药品生产。

第二节 益生菌的抗菌作用

研究表明，益生菌对肠道及食物中的致病菌具有拮抗作用，它们能阻碍特定的肠道致病菌的黏附、定居、繁殖作用以及病原菌的致病途径，益生菌可通过以下方式之一产生对肠道病原微生物产生拮抗作用：

- ① 通过产生挥发性短链脂肪酸（SCFA）如乙酸、乳酸、丙酸等降低肠腔 pH 值；
- ② 营养竞争，使致病菌缺乏生长所需的某种营养；
- ③ 降低肠腔的氧化还原电位；
- ④ 在厌氧环境下产生 H_2O_2 ；
- ⑤ 产生特殊的抗菌物质，如细菌素等。

一、乳酸和其他挥发性酸

(一) 短链脂肪酸

益生菌发酵的代谢终产物之一是乳酸，它们在代谢糖时，通过乳酸脱氢酶将糖代谢过程中产生的丙酮酸转化为乳酸。乳酸的积累以及随之而来的肠道 pH 值下降可对许多 G^+ 及 G^- 细菌产生广泛的抑制作用。环境 pH 值、解离常数（pK 值）和其摩尔浓度是决定乳酸或乙酸在肠道中抑菌作用的主要因素。其中乙酸的 pK 值为 4.76，乳酸的 pK 值为 3.86，因此如果肠道 pH 值为 5.8 的话，则肠道中 8.4% 的乙酸和 1.1% 的乳酸以未解离形式存在。由于双歧杆菌在发酵的过程中，产生的乙酸：乳酸 = 3：2，因此在双歧杆菌产生的乙酸和乳酸中，未解离形式的乙酸的浓度将达到未解离态乳酸的 11 倍。这一点非常重要，因为未解离

态有机酸是产生对潜在肠道致病菌和腐败菌拮抗作用的主要成分。未解离脂肪酸，如乙酸和乳酸可以穿过细菌细胞膜，当遇到细胞内较高的 pH 环境时，将解离出 H^+ ，从而干扰细菌的基本代谢过程，如底物转化和氧化磷酸化过程。

乳酸和乙酸可抑制 *Staphylococcus aureus*，不过仅限于该菌处于生长阶段早期的细胞。Geopfert 和 Hicks 证明，当 $pH < 4.4$ 时，乳酸可产生对 *S. aureus* 的抑制作用；而当 $pH < 5.4$ 时，乙酸可抑制 *Staphylococcus aureus* 的生长。因此，乳酸菌在肠道中产生的微量乙酸可产生强烈的抗菌作用。Adams 和 Hall 等报道乳酸和乙酸对 *E. coli* 或 *S. aureus* 的抑制作用有协同效应，这是由于乳酸易发生解离，其酸性较强，从而增加了未解离态乙酸的摩尔分数。Wong 和 Chen 报告，当乳酸菌存在时，由于其产生乙酸的缘故，*Bacillus cereus* 在 $pH 6.0$ 时生长被中止；当环境 pH 值为 4.4、4.3 或 4.2 时，其孢子的萌发可分别被甲酸、乳酸和乙酸所抑制，且抑制作用秩序减弱。

Midolo 等研究了 pH 值和有机酸在体外对胃致病菌 *Helicobacter pylori* 的作用，他们研究了 *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus*, *Pediococcus pentosaceus* 和 *Bifidobacterium bifidum* 在体外培养条件下乳酸的产生情况、生长环境 pH 值变化，以及对 *H. pylori* 的抑制作用。在体外，乳酸、乙酸和盐酸对 *H. pylori* 的抑制作用，与酸的浓度呈现剂量效应，而乳酸的抑制作用最强，这种抑制作用是溶液 pH 值和酸浓度的综合体现。在被测试的菌株中有 6 株 *Lb. acidophilus*、一株 *Lb. rhamnosus*，可抑制 *H. pylori*，而 *Lb. bulgaricus* 则无此作用，上述乳酸菌产生的乳酸浓度从 50mmol/L 到 156mmol/L 不等。

双歧杆菌不产生 H_2O_2 或细菌素，不过它们能产生乳酸和乙酸，这些有机酸的产生降低了肠道 pH 值，因此，可抑制了多种潜在致病菌或腐生菌的生长。此外，通过调节肠道的 pH 值，双歧杆菌还能抑制其他肠道菌群产生酚、 NH_3 、甾体代谢物、细菌毒素以及引起血管收缩的胺、酪胺、尸胺和胍基丁胺 (agmatine)。

控制肠道 pH 值还可影响肠道菌群对芳香族氨基酸的降解作用，苯酚和对-甲酚是酪氨酸的腐败产物，而吲哚和粪臭素 (skatole) 则是色氨酸被肠道腐生菌分解的产物。这些化合物需要经过肝脏的解毒作用，在肝脏内与酸结合，例如葡萄糖醛酸 (Glucuronic) 或磺酸，然后分泌到尿中排除体外。这些肠道腐败菌的代谢产物可引起腹泻、肝功能失调及循环系统的紊乱。其中，像 NH_3 这类代谢产物，通常是通过肝来解毒的。然而在部分情况下 (例如肝硬化)，体内 NH_3 的浓度可能会升高，从而干扰周围及中枢神经系统，双歧杆菌可抑制分解脲的微生物生长，从而阻止 NH_3 的产生，因而在临床上对继发性肝昏迷的治疗似乎有一定优势。

(二) CO_2

CO_2 是异型发酵乳酸菌发酵己糖的主要终产物之一，相当一部分乳酸菌能从苹果酸和柠檬酸产 CO_2 或者在代谢精氨酸时通过精氨酸脱氨酶途径产生，最后氨基酸 (His, Tyr) 的脱羧作用也可导致 CO_2 的产生。

CO_2 的产生也可增加乳酸菌的抗菌作用， CO_2 通过替代环境中的 O_2 形成厌氧环境，引起胞外或胞内 pH 值下降，以及对细胞膜的破坏作用，使其对相当多的微生物具有潜在的抑菌作用。 CO_2 的这种保护作用非常重要，尤其是在蔬菜和青贮饲料的发酵过程中，防止霉菌的生长。

二、过氧化氢

在有氧存在的情况下，益生菌 (LAB) 在黄素酶 (辅酶 Q) 的作用下，通过电子转移可产生 H_2O_2 ，当存在 H_2O_2 时，超氧化阴离子形成破坏性氢氧游离基 ($OH\cdot$)，这一过程可

引起细胞膜上脂类的氧化，从而增加细胞膜的通透性，这类超氧游离基对细菌的杀菌作用来自于对细菌细胞壁的强氧化作用，及对核酸及细胞内蛋白质的破坏作用。此外， H_2O_2 还可与其他细胞性或细胞内的组分形成其他的抑制性物质。

多年来，乳酸菌所产生的 H_2O_2 对各类微生物的作用已经过广泛而深入的研究。在有氧条件下，乳酸菌能在以葡萄糖为主的复杂培养基上产生 H_2O_2 。这些细菌在消耗氧气、积累 H_2O_2 的同时，伴随的是 NADH 氧化酶、丙酮酸氧化酶和 NADH 过氧化物酶活性的增强。在体外， H_2O_2 并不是 NADH 氧化酶的产物，而是在丙酮酸氧化过程中，从氧产生的一种主要产物。上述三种酶可被氧 O_2 和 H_2O_2 所诱导，当氧气浓度较低（而不是 H_2O_2 ）时，被诱导的主要是 NADH 氧化酶，而不是丙酮酸氧化酶或 NADH 过氧化物酶。

Nunez de Kairuz 等报道乳酸菌对 H_2O_2 的产生依赖于脂肪酸的存在，当 *Lactobacillus leichmanii* 在添加癸酸的复杂培养基上生长时能在培养基中积累高浓度的 H_2O_2 。其 H_2O_2 产生系统可被 C4~C16 的饱和脂肪酸及油酸中的一种所特异性的诱导。在无细胞的抽提物内，这种诱导作用与一种依赖于脂酰-CoA 的 H_2O_2 产生酶系统有关，这种酶系统在原核微生物中还是第一次发现。

产生 H_2O_2 的乳酸菌存在于大多数正常女性的阴道中，却不存在于患细菌性阴道炎的女性阴道内。能产生 H_2O_2 的乳酸菌大量存在时，可对 *Gardnerella Vaginalis*（阴道加德纳菌，患细菌性阴道炎时阴道内的优势菌群）产生毒性作用。通常认为乳杆菌在阴道菌群中占优势地位是正常的，当女性患细菌性阴道炎时阴道内乳杆菌数量下降，而 *G. Vaginalis* 逐渐占据优势地位，其他厌氧菌的数量也会增加。由于部分乳杆菌能产生 H_2O_2 ，后者会对那些不产生与 H_2O_2 清除相关的酶（例如过氧化氢酶）或者清除 H_2O_2 的酶活性低下的微生物产生毒害作用。当缺乏这些产生 H_2O_2 的乳酸菌时，就会导致那些过氧化氢酶（触酶）阴性的细菌过度生长，正如那些细菌性阴道炎患者的情况一样。Eschenbach 等进行临床研究表明，在 28 名健康女性中，可以从其中 27 人（占 96%）的阴道内分离到产 H_2O_2 的兼性厌氧乳杆菌；而在 67 名细菌性阴道炎患者中，仅能从其中 4 人（占 6%）的阴道内分离到产 H_2O_2 的兼性厌氧乳酸菌（ $P < 0.001$ ）；从 67 名患者中的 24 人（占 36%）或 28 名正常女性中的 1 人（占 4%）阴道内分离到专性厌氧的乳杆菌（不产 H_2O_2 ）（ $P < 0.001$ ）。乳杆菌在阴道内产生 H_2O_2 可能是正常阴道微生态系统的非特异性防御措施，可保护阴道不受病原菌的侵染与定殖。

Hiller 等研究了 H_2O_2 对 275 名怀孕 3~6 个月女性生殖道内微生物菌群的影响。采集的阴道样本被用来检测产 H_2O_2 、不产 H_2O_2 的乳酸菌和其他生殖道菌群的存在，与那些阴道内以不产 H_2O_2 乳酸菌为主的孕妇相比，阴道内以产 H_2O_2 乳酸菌为主的孕妇不易患细菌性阴道炎，表现性念珠菌病，并且其阴道不易被 *G. vaginalis*，拟杆菌、消化球菌、*Mycoplasma hominis*（人形支原体）、*Ureaplasma urealyticum*（解脲尿原体）和化脓性链球菌所感染（对每一种比较形状而言， $P < 0.05$ ）。除上述微生物之外，与那些阴道内存在产 H_2O_2 乳酸菌的女性相比，那些阴道内不存在乳酸菌的女性更容易被 *Chlamydia trachomatis* 所感染，且不易被肠球菌或凝血酶阴性的葡萄球菌所定殖。然而，B 群链球菌和 *E. coli* 在阴道内的定殖与产 H_2O_2 乳杆菌的存在无关。这一结果表明，产 H_2O_2 乳酸菌的存在与孕妇生殖道是否易被致病菌所感染成反比。

在随后的另一次研究中，Hiller 对 171 名临产期孕妇阴道菌群的组成进行了研究，他将被研究者的菌群情况根据阴道涂片获得的结果分为正常（乳杆菌为主）、中间，及细菌性阴

道炎 (BV)。结果发现 39 名 (23%) 孕妇患 BV, 50% 的被研究者阴道菌群属于正常, 其余 27% 属于中间类型, 从患 BV 的女性、中间类型和正常类型孕妇阴道样本中分离到产 H_2O_2 乳酸菌的比例分别为 5%、37% 和 61%, 而分离到不产 H_2O_2 乳杆菌的比例在三个组内非常接近, 为 57%~65%, 从患 BV 孕妇阴道内分离的细菌中最常见的种类是 (*G. vaginalis*, *Prevotella bivia/disiens*, *Bacteriodes ureolyticu*, *Prevotella corporis*/*Bacteriodes levii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Mobiluncus species*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Pepto. tetra - dius*, *Pepto anaerobius*, 化脓性链球菌, *Ureaplasma urealytieum* 和 *Mycoplasma hominis*) ($P < 0.05$, 对每一个比较项目而言)。除 *B. ureolyticus*, *F. nucleatum* 和 *P. prevotii* 等三种细菌外, 其定殖情况与阴道内是否存在产 H_2O_2 乳酸菌的数量成反比。其他细菌在阴道中的分布情况在患 BV 的女性几乎没有区别。该研究结论的结论是, 该人群中某些特殊类型厌氧菌的存在与细菌性阴道炎 (BV) 相关, 而且那些与 BV 相关的类群和被产 H_2O_2 乳酸菌所抑制的类群之间存在非常高的关联性。

在另一项研究中, 兼性厌氧乳酸菌可从 63 名健康、未怀孕育龄女性中的 61 人 (96.8%) 的阴道中分离到, 其主要类型为 *Lactobacillus jensenii*, *Lb. acidophilus* 和 *Lb. casei*。在这些女性中, 能从 74.6% 的女性阴道内分离到产 H_2O_2 乳酸杆菌、22.2% 可分离到不产 H_2O_2 的乳酸杆菌, 其余 3.2% 不能分离到任何乳酸杆菌。在所分离到的 68 株乳酸杆菌中, 全部不具有触酶活性。其中 68.2% 的菌株能被 $\leq 1\%$ (wt/vol) 的 nonoxynol-9 所抑制 (在被抑制的菌株中 73.3% 被杀灭, 26.7% 生长被抑制), 其余 31.8% 菌株 (分离物) 能在浓度高达 25% (wt/vol) 的 nonoxynol-9 中生长。所有对 nonoxynol-9 敏感的分离菌株都能产生 H_2O_2 , 而其余 21 株抗 nonoxynol-9 的乳杆菌中仅有 3 株能产生 H_2O_2 , 被分离菌株对 nonoxynol-9 的抗性与其产生 H_2O_2 之间存在显著的关联性。因此, 使用 nonoxynol-9 作为杀精虫剂可能导致女性阴道内产 H_2O_2 乳酸菌的缺失, 从而增加泌尿生殖道被感染的危险。

过氧化物酶、 H_2O_2 和卤化物可以在吞噬细胞和组织液中构成强有力的抗菌系统, 而某些乳酸菌可以作为该系统中 H_2O_2 的来源, 产生 H_2O_2 的 *Lb. acidophilus* (LB+) 存在于大多数正常的女性阴道内, 而且从她们的阴道液中能检测到过氧化物酶的活性。当 LB+ 浓度较高时, 对 HIV-1 具有杀病毒作用。当这种乳杆菌浓度不足以单独发挥作用时, 人为添加过氧化物酶 (myeloperoxidase 骨髓过氧化物酶 或 eosinophil 嗜嗜红过氧化物酶) 及某种卤化物 (氯化物、碘化物、溴化物或硫氰酸), 可以恢复这种杀病毒作用。要保持这种杀病毒作用, LB+ 可以被 H_2O_2 所替代, 但不能被其他不产 H_2O_2 乳杆菌所替代, 而叠氮化物和触酶则可抑制这种杀病毒作用。HIV 在女性生殖道内的生存以及由此而引起的性传播疾病的可能性能被阴道内的 LB+—过氧化物酶—卤化物体系的活力所左右。此外, 产 H_2O_2 的乳杆菌, 尤其是 *Lb. acidophilus* 还能减少其他常见尿道致病菌如 *Gardnerella Vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albican* 对泌尿生殖道的感染。

三、双乙酰

双乙酰 (2,3-丁二酮) 是能利用柠檬酸的乳酸菌代谢丙酮酸的最终产物, 双乙酰能激发对各种致病菌及腐生菌强烈的抗菌作用。双乙酰对 G-菌酵母和霉菌的作用比对 G+ 强。双乙酰通过与 G-细菌精氨酸结合蛋白的反应, 干扰其对精氨酸的利用。对大多数微生物而言, 双乙酰要达到抗菌作用, 需要较高浓度 (0.4mg/ml)。然而即使对于浓度非常低的双乙酰, *E. coli* 也非常敏感。根据剂量与抑制作用之间的关系, 双乙酰对酵母/G-细菌和不产乳

酸 G⁺ 菌的抑菌作用浓度分别为 0.2mg/ml 和 0.3mg/ml。Motlagh 等报告, 当双乙酰浓度达到 344ppm 时, 双乙酰对 *Yersinia enterocolitica*、*Aeromonas hydrophila*、*E. coli* 和 *Salmonella anatum* 等细菌具有杀菌作用, 但对于李斯特菌则无此作用。

乙醛是行异型发酵的乳酸菌糖发酵的产物, 在 NAD-依赖行乙醇脱氢酶的作用下, 可以重新还原成乙醇。乙醛赋予酸奶部分典型的风味, 在 $10 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6}$ 范围内, 对多种食物致病菌, 如 *E. coli*、*Salmonella typhimurium* 和 *S. aureus* 具有抗菌作用。

四、细菌素

在胃肠内存在许多具有抗菌作用的蛋白质, 如大肠素 (colicins)、防卫素 (defensins)。它们是低分子量、阳离子型的两性分子, 通常易发生聚集, 但对其产生菌有利。乳酸菌还含产生一系列具有拮抗作用的物质, 包括代谢产物、类抗生素物质、细菌致死性蛋白, 通常将它们通称为细菌素。这些细菌在抗菌谱、作用方式、分子量、遗传来源及生化特性方面存在千差万别。细菌素既可自发产生, 也可诱发产生, 除少数特例外, 大多数细菌素的编码基因组都位于质粒上, 这些细菌素的释放需要三个条件: ①细菌素的表达; ②细菌素释放蛋白的存在; ③该乳酸菌细胞外层膜上具有抗去污剂的磷酸脂酶 A 的存在。细菌素的作用具有特异性, 其对敏感细胞的致死作用是吸附到细胞表面特异性的受体上, 随后引起敏感细胞在代谢、生物学和形态上的改变, 最终导致细胞死亡。而且越来越多的证据表明, 尽管归属于不同的属, 绝大多数细菌产生的细菌素也有与此相同的特点。

已经从各种乳酸菌的产物中分离到上百种细菌素。而且新的发现层出不穷。根据其特点, 可以分为以下四大类: (I) 羊毛硫类抗生素; (II) 热稳定性小分子肽; (III) 热不稳定性大分子蛋白质; (IV) 蛋白复合体, 其作用的挥发需要与特定的碳水化合物或脂类结合 (见第一章“乳酸菌产生的抗菌物质”)。大多数新发现的细菌素均属于 II 类, 具有分子量小 (30~100 氨基酸残基)、热稳定、通常不经过转录后修饰等特点。尽管大部分产生细菌素的细菌仅产生一种细菌素, 相当多的乳酸菌能产生数种细菌素。根据其共同特征, 部分 II 类细菌素又可分为片球菌素类组 (具有强烈的抗李斯特菌作用)、双肽细菌素组、次级信号依赖性细菌素组。

最近几年, 对乳酸菌产生的那些具有杀菌作用的细菌素的研究进一步增强, 主要是它们可作为潜在的食物保存剂。在这类肽中, 相当一部分含有羊毛硫氨基酸或其他转录后修饰的氨基酸, 这些含有羊毛硫氨基酸的分子 (羊毛硫抗生素) 似乎存在两种相反的连接方式, 即类型 A 和 B。近年来, 分离到一大批属于类型 A 的羊毛硫抗生素部分, 最近分离到的 A 类羊毛硫抗生素所具有的新的结构特点是: ①发现新的修饰基团, 如 D-Ala 和 2-羧酸丙酰基, 二者都来源于丝氨酸; ②不同类型的前羊毛硫抗生素引导信号; ③在合成活性 A 类羊毛硫细菌素所需基因的数量及类型不同; ④细胞裂解素 (cytolysin) 可同时发挥溶血素 (hemolysin) 和细菌素的作用; ⑤最近分离的一种羊毛硫细菌素 (Lactocin S) 在中性 pH 条件下, 不带净电荷; 迄今为止, Carnocin UI49 是已知的羊毛硫细菌素中分子量最大的一种, 而细胞裂解素 (cytolysin) 的杀菌作用则依赖于组成其分子结构的两条肽链之间的相互作用。

体外实验表明, 乳酸菌产生的细菌素的抗菌谱非常广, 包括多种革兰氏阳性及阴性菌 (见表 2-5), 研究最系统的细菌素是 Nisin, 是由 *Lactococcus lactis* 产生的。Gibson 曾报道 *Lb. reuteri* 产生的细菌素 reuterin 能作用于 G⁻ 菌 (沙门氏菌和志贺氏菌) 及 G⁺ 菌 (梭状芽

孢菌和李斯特菌)。

表 2-5 乳酸菌产生的细菌素对非乳酸菌类细菌的抗菌谱^①

敏感菌株	能抑制该菌的乳酸菌细菌素
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sakacin A
<i>Bacillus cereus</i>	Lactocin-S, Lactostreptin-5, Nisin, Pediocin-A, Pediocin-AcH, Sakacin-A
<i>Bacillus coagulans</i>	Nisin
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nisin
<i>Bacillus pumilis</i>	Thermophilin
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nisin
<i>Bacillus subtilis</i>	Lactacin-481, Nisin, Thermophilin
<i>Bronchothrix thermospacta</i>	Curvacin-A, Pediocin-AcH, Sakacin-A, Sakacin-P
<i>Clostridium bi fermentans</i>	Nisin
<i>Clostridium botulinum</i>	Nisin, Pediocin-A, Reuterin, Sakacin-A
<i>Clostridium butyricum</i>	Nisin, Reuterin
<i>Clostridium perfringens</i>	Nisin, Pediocin-A, Pediocin-AcH, Pediocin-VTT, Reuterin, Thermophilin
<i>Clostridium sporogenes</i>	Nisin, Pediocin-A
<i>Clostridium tyrobutricum</i>	Lactacin-481, Lactocin-S, Pediocin-AcH
<i>Escherichia coli</i>	Reuterin, Thermophilin
<i>Listeria innocua</i>	Lactacin-481, Lactocin-S, Pediocin-A, Pediocin-AcH
<i>Listeria ivanovii</i>	Pediocin-A, Pediocin-AcH, Pediocin-PAC10
<i>Listeria monocytogenes</i>	Carnobacteriocin A&B, Curvacin-A, Enterocin-1146, Lactacin-B, Lactacin-481, Leucocin-A, Nisin, Pediocin-A, Pediocin-AcH, Pediocin-JD, Pediocin PA-1, Pediocin-PAC10, Pediocin-VTT, Piscicolin-61, Reuterin, Sakacin-A, Sakacin-P
<i>Listeria seeligeri</i>	Pediocin-A
<i>Listeria welchii</i>	Lactacin-481, Pediocin-A
<i>Proteus mirabilis</i>	Nisin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thermophilin
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Thermophilin
<i>Salmonella enteritidis</i>	Reuterin, Thermophilin
<i>Salmonella infantis</i>	Pediocin-VTT, Reuterin,
<i>Salmonella typhimurium</i>	Reuterin, Thermophilin
<i>Shigella sp.</i>	Reuterin, Thermophilin
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nisin, Lactacin-481, Pediocin-A, Pediocin-AcH, Plantaricin-SIK83, Sakacin-A, Thermophilin
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Curvacin, Lactacin-481, Lactocin-S, Pediocin-AcH
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Nisin
<i>Staphylococcus simulans</i>	Nisin
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nisin
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Thermophilin

① 乳酸菌产生的细菌素可抑制与产生菌相近的种、其他乳酸菌和革兰氏阳性菌，一般对革兰氏阴性菌的无作用或作用较弱。

Wolf 等证实 *Lb. reuteri* 非常安全，成年男性对该菌具有良好的耐受性，该菌能产生细菌素 reuterin。在另一项研究中，给 12~36 个月的儿童服用 *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus* 和 *B. infantis* 的混合物，4~14 周未发现副作用，而这一年龄层次的儿童很容易患病毒性腹泻。Speck 等认为 *Lb. reuteri* 是一种适用于食品生产的乳杆菌，被食用后尚未发现任何副作用。然而 reuterin 在预防腹泻中的潜在作用及对消化道菌群的影响，还需要进一步研究。

五、益生菌在体内的抗菌作用

(一) 抗细菌作用

Savage 研究了乳酸菌在啮齿动物体内与酵母菌之间的相互作用。Ducluzeau 则报道一株乳杆菌对鼠消化道内的 *Ristella sp.* 具有拮抗作用。

Sato 研究了 10 种乳酸菌在小鼠体内的抗李斯特菌活性，发现 *Lb. casei* 对 *Listeria monocytogenes* 的抑制作用最强烈。而且，这种抑制作用与所注射的 *Lb. casei* 的数量有关。他认为小鼠对 *L. monocytogenes* 感染抵抗力的增强主要来自于口服 *Lb. casei* 后所引起的巨噬细胞从血液向网状内皮组织的转移。向小鼠体内注射 *Lb. casei* 13 天后，所获得的肝脏巨噬细胞对李斯特菌的杀灭作用增强；但在注射的第二天时，巨噬细胞的这一功能受到抑制。注射 *Lb. casei* 13 天后所收集腹腔巨噬细胞在体外的抗李斯特菌作用增强，但注射后第 2 天所获得的腹腔巨噬细胞的这一作用受到抑制。

在 *Lb. casei* 诱导的肝脏巨噬细胞中，由多发性肌炎抗原 (PMA) 引发的呼吸爆发力度要高于原有的巨噬细胞。在注射了 *Lb. casei* 后，肝脏巨噬细胞的碱性磷酸二酯酶活力下降，这种情况同样发生在腹腔巨噬细胞，这些结果表明 *Lb. casei* 可以增强肝脏和腹腔巨噬细胞的细胞免疫功能。

Itoh 和 Freter 应用无菌鼠和一种连续培养系统研究了 *E. coli* 和梭菌（悬浮于经过氯仿处理的普通小鼠盲肠悬浮液中）或三株从普通小鼠分离的乳酸菌之间的相互作用。在无菌鼠体内，乳酸菌可以抑制 *E. coli* 在胃及小肠内的繁殖，但对 *E. coli* 在大肠内的繁殖无明显可见的影响；相反，梭菌对控制 *E. coli* 在大肠内生长的作用最明显。当乳酸菌和梭菌同时存在时，*E. coli* 在无菌鼠消化道内各部位的生长基本与普通小鼠相同。在无菌鼠内，*E. coli* 在各部位的分布情况与 pH 值或小肠的蠕动性无关。而在体外，要出现前述的体内微生物之间的作用，则需要经过二段式连续流动培养，并将第一段（相）的流出液作为第二段（相）的流入液。在第 I 段连续流体培养中接种的是乳酸菌。而第 II 段连续流体培养中接种的是 *E. coli* 或 *E. coli* 与梭菌的混合物。在以上的这两种情况下，在第 II 段连续液体培养中，*E. coli* 的数量基本上与无菌鼠大肠内所获得的菌群的数量一致。

Fichera 等在发生严重实验性 *Salmonella enteritidis* 感染的小鼠体内，研究 *Lb. acidophilus* 和 *B. bifidum* 对感染的控制作用。小鼠灌喂双歧杆菌和嗜酸乳杆菌后，对这种致死性沙门氏菌感染的抵抗力显著提高。De Simone 等研究了在食物中添加含有 *Lb. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 活菌的酸奶后，纯种小鼠对 *Salmonella typhimurium* 感染的反应，从肝脏和脾脏内的细菌计数结果与 *S. typhimurium* 感染后的致死率来看，含有活菌的酸奶在被小鼠摄入后，可以调节小鼠的免疫反应，增强了小鼠的免疫功能。此外，由 *Lb. casei* 和 *Lb. acidophilus* 制备的混合发酵乳也可以抑制 *S. typhimurium* 对小鼠的感染。在通过口腔途径使小鼠发生 *S. typhimurium* 感染前，先给小鼠灌喂含有这两种乳杆菌的发酵乳，可以使小鼠在发生感染后的存活率达到 100%。在灌喂含有两种乳酸菌的发酵乳的小鼠血清和肠液中，抗沙门氏菌抗体浓度增高；如果小鼠先发生 *S. typhimurium* 感染，然后再灌喂含有这两种乳酸菌的发酵乳，则不能阻止这种致病菌在小鼠体内的定殖。研究者认为小鼠对沙门氏菌感染抵抗力的增强来自于这两种乳酸菌诱发的黏膜组织抗沙门氏菌保护性免疫反应。Perdigon 等则进一步证实 *Lb. casei* 防止肠道致病菌 *S. typhimurium* 和 *E. coli* 的致病作用在于增加肠道分泌物中 IgA 的浓度，肠液中 β -葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶活力以及组织学标本表明，小肠内炎性反应显著增强。这些结果表明 *Lb. casei* 在防止肠道感染中具有重要作用，即使在比较低的剂量也能促

进小肠肠腔内 IgA 的分泌, 从而防止肠道感染。因此, 它能为肠道黏膜提供充分的防御机能。由 *Lb. casei* 和 *Lb. acidophilus* 共同发酵的发酵乳对 *Shigella sonnei* 的感染也有相似作用。饮用这种混合发酵乳的小鼠在发生 *Shigella sonnei* 感染时的存活率为 100%, 在其血清和肠液中存在高滴度的抗志贺氏菌抗体, 证明这种免疫保护作用是由黏膜介导的。

在通过口腔途径感染 *S. typhimurium* C5 的小鼠中, Hudault 等研究了 *Lb. rhamnosus* GG 对肠道致病菌的拮抗作用。在无菌鼠体内, 当发生沙门氏菌感染时, *Lb. rhamnosus* GG 在消化道内的定殖可以显著地延长小鼠出现 100% 死亡的时间, *S. typhimurium* C5 在小鼠盲肠定殖的数量以及向肠淋巴结, 脾脏以及肝脏转位的比率显著降低。

含有 *Lb. acidophilus* (10^5 个/ml) 的发酵混合物能抑制 *Shigella dysenteriae*、*S. typhimurium* 和 *E. coli* 等潜在肠道致病菌的生长。在制备这种发酵食品混合物的过程中, 由于 *Lb. acidophilus* 的发酵作用, 食品的 pH 显著下降, 而与之相应的是滴定酸度的上升, 该发酵混合物能防止 *E. coli* 在小鼠体内诱发腹泻。

Kabir 则报道了 *Lb. salivarius* 能抑制 *Helicobacter pylori* 对黏膜的吸附和 IL-8 的释放, 而 *H. pylori* 是引发胃炎性疾病的致病因子。在发生 *Lb. salivarius* 侵染的无菌 BALB/c 品系小鼠内, *H. pylori* 不能在其胃部定殖, 而在无菌小鼠内, *H. pylori* 会在其胃内大量定殖, 并最终引发胃炎。此外, 在 *H. pylori* 已定殖的情况下, 口服 *Lb. salivarius* 可以使这种消化道病原菌不再继续定殖, 这些研究结果表明, 益生性乳杆菌在治疗 *H. pylori* 引起的胃炎中的应用潜力。

(二) 抗真菌作用

Alak 等在腹腔内接种 LP-BM5 白血病病毒后免疫功能受到抑制的雌性 C57BL/6 小鼠中, 研究了 *Lb. reuteri* 作为一种益生菌对 *Cryptosporidium parvum* 感染的抑制作用。在接种 LP-BM5 白血病病毒 4 个月以后, 这些小鼠产生淋巴疾病 (lymphadenopathy) 和肝脏肿大 (splenomegally), 对 *C. parvum* 感染非常敏感。试验组小鼠连续 10 天进行预喂 *Lb. reuteri* (10^8 cfu/天) 处理后, 被灌喂 6.5×10^6 *C. parvum* 的孢子, 并在整个实验过程中保持对小鼠喂食 *Lb. reuteri*。在接受 *Lb. reuteri* 处理和 *C. parvum* 的试验组小鼠中, 小鼠可以完全清除消化道上皮组织中的 *C. parvum*; 而未接受 *Lb. reuteri* 处理的小鼠则感染了顽固性的似隐胞菌症, 而且在其排出的粪便中含有大量 *C. parvum* 的孢子。给小鼠喂食 *Lb. reuteri* 后, 促进了该菌在消化道的定殖, 而且小鼠粪便中 *C. parvum* 的孢子数量与 *Lb. reuteri* 的定殖程度成反比。以上结果表明, *Lb. reuteri* 有助于防止免疫缺陷的个体被 *C. parvum* 感染。

Wagner 测定了 *Lb. acidophilus*、*Lb. reuteri*、*Lb. rhamnosus* GG 或 *B. animalis* 对无胸腺及真胸腺小鼠发生黏膜及周身性念珠菌病的保护作用。与消化道中仅有 *C. albicans* 定殖的同类小鼠相比, 消化道中上述益生菌的存在可以延长成年及新生无胸腺小鼠的生存期。这 4 种益生菌中的任何一种都可以显著地降低无胸腺小鼠发生周身性念珠菌病的几率, 而在真胸腺小鼠内, *Lb. rhamnosus* GG 或 *B. animalis* 可以显著地减少消化道内 *C. albicans* 的数量。上述四种益生菌中没有一种能完全阻止黏膜念珠菌病的感染, 但 *B. animalis* 可降低其发病几率及危害性。这些益生菌还能调节针对 *C. albicans* 的抗体及细胞介导的免疫反应, 益生菌对小鼠存活的延长作用, 降低黏膜和周身性念珠菌病的严重性、调节免疫反应、减少消化道部位 *C. albicans* 的数量, 减少消化道感染等方面的作用表明益生菌不仅能作为预防和治疗这种真菌病的潜在生物治疗方法, 而且益生菌还可以通过免疫 (细胞与液体免疫) 和非免疫机制在小鼠发生念珠菌感染时, 为小鼠提供保护作用。

六、益生菌产生的活性代谢产物在体内的抗菌作用

(一) 抗细菌作用

Yakult 中央微生物研究所已启动多项针对热灭活 *Lb. casei* LC9018 抗感染作用的研究,

在这些研究中,已经从这种乳酸菌的细胞抽提物中发现和鉴别了多种具有免疫调节作用的益生性生物活性物质。

Miake 等发现,在对小鼠进行腹腔注射 *P. aeruginosa* 使其发生感染前,如果预先给小鼠口服热灭活的 *Lb. casei* LC9018 可以延长小鼠发生感染后的存活时间;如果引起感染的是 *Corynebacterium parvum*, 采取相似的处理措施则无效。*Lb. casei* LC9018 的这种保护作用在身体受到辐射的小鼠内也可以观察到,但如果在辐射前给小鼠同时喂食卡拉胶和 LC9018,这种保护作用就消失了。以上结果表明,LC9018 是通过激活巨噬细胞来增强小鼠对 *P. aeruginosa* 感染的抵抗力,LC9018 或 *Lb. fermentum* YIY0159 细胞壁中的磷壁酸 (Lipoteichoic acid) 也可增强 C57BL/b 小鼠对 *P. aeruginosa* 侵染的抵抗力。

在感染 *Listeria monocytogenes* 的实验小鼠中,也观察到 LC9018 对巨噬细胞激活作用。由 LC9018 诱导的腹膜细胞主要由吞噬活性增强巨噬细胞和多形态核细胞组成,并且具有明显的杀灭细胞内 *L. monocytogenes* 的能力。接受 LC9018 预处理后,小鼠体内的 Kupffer 细胞能产生高浓度的氧自由基。服用 LC9018 后,小鼠体内这种抗李斯特菌的作用可以持续三周。Sato 则分别测试了 *Lb. casei*、*Lb. plantarum* 和 *Lb. acidophilus* 的细胞壁、细胞质、多糖和肽聚糖组分在小鼠内增强小鼠对 *L. monocytogenes* 感染抵抗力的作用。腹膜注射 *Lb. casei* 的细胞组分后,可在小鼠腹腔中诱导产生致炎性细胞,其中以肽聚糖的效力最强。在肽聚糖注射以后的小鼠腹腔渗出液中,巨噬细胞所占的比例上升;*Lb. casei* 细胞壁组分诱导的巨噬细胞具有强烈的由 PMA (乙酸肉豆蔻佛波醇) 引发的呼吸爆发作用。由 *Lb. casei* 或 *Lb. acidophilus* 细胞壁诱导的巨噬细胞在受到 PMA 刺激时能产生大量的氧自由基,而 *L. plantarum* 细胞壁成分则没有这种作用;*Lb. casei* 细胞壁组分在体外也可能性可以增强小鼠腹膜巨噬细胞对李斯特菌的杀菌作用,但在 *Lb. acidophilus* 中则没有观察到相似的作用;如果在 *L. monocytogenes* 侵染前给小鼠连续静脉注射 *Lb. casei* 细胞组分 7 天或者 13 天,*Lb. casei* 细胞壁成分在小鼠体内引发最强烈的保护作用,*Lb. casei* 细胞壁中肽聚糖成分对小鼠也有微弱的保护作用。*Lb. casei* 在小鼠内防止 *L. monocytogenes* 侵染的这种保护作用可能主要是由细胞壁成分提供的,部分作用可能与其中的肽聚糖有关。

关于热灭活的 LC9018 在防止小鼠被 *Mycobacterium fortuitum* 或 *M. chelonae* 感染所具有的保护和治疗作用也有研究。LC9018 能降低小鼠旋转病 (spinning disease) 的发病率,从总体上减少肾的损伤以及促进这两种病原菌从被感染部位排除。在注射 LC9018 后,鼠腹膜巨噬细胞的吞噬功能及产生氧自由基的能力明显增强。此外,当宿主受到 *M. fortuitum* 侵染后,LC9018 能激活宿主的巨噬细胞功能,尤其是与杀菌作用有关的巨噬细胞功能,从而为宿主提供保护和治疗作用。

给年龄为 24~48 小时的吮乳小鼠口服 *E. coli* B41 (10^2 至 10^5 cfu/鼠),在三天内,小鼠的死亡率可达到 80%~100%。Fourniat 比较了口服热灭活的 *Lb. acidophilus* 的细胞冻干粉与无菌水对新生小鼠死亡率的影响,结果发现,给受 *E. coli* B41 侵染的幼鼠口服热灭活的 *Lb. acidophilus*,可以延长其生存期。在口腔途径感染 *S. dublin* 的小鼠中,研究了口服灭活的双歧杆菌、乳杆菌、拟杆菌和 *Fusobacteria* (梭细菌) 对提高小鼠抗沙门氏菌感染的作用。双歧杆菌和乳杆菌死细胞对小鼠的免疫调节作用呈现剂量效应,口服灭活的双歧杆菌或乳杆菌可增强小鼠对沙门氏菌侵染的抵抗力,而拟杆菌和 *Fusobacteria* 则没有这种作用。

在体外培养时, *Streptococcus mutans* 的生长可以被肠道来源的乳酸菌细胞水溶性抽提物成分所完全抑制,这些乳酸菌包括 *S. faecium* (后被重新分类为 *Enterococcus faecium*)、

Streptococcus equines、*Lb. fermentum* 和 *Lb. salivarius*。这种细胞水溶性抽提物对 *S. mutans* 生长的抑制作用与其浓度相关。与此相反，这些抽提物对那些人肠道中常见的乳酸菌在体外的生长不具有抑制作用。Coconnier 报道，人体来源的 *Lb. acidophilus* LB 的培养上清液对多种 G⁺ 和 G⁻ 致病菌具有抗菌作用。它能降低 *Staphylococcus aureus*、*L. monocytogenes*、*S. typhimurium*、*Shigella flexner*、*E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*P. aeruginosa* 和某种肠球菌在体外的存活性，而不能抑制乳杆菌和双歧杆菌。这种抗菌作用具有热稳定性，对酶处理较敏感，而且产生于酸性条件下，不过这种抗菌作用与乳酸无关。*Lb. acidophilus* LB 的培养上清液对感染体外培养的 Caco-2 细胞的 *S. typhimurium* SLB44 也具有抗菌作用。给 C3H/He/oujco 小鼠灌喂该培养上清液后，小鼠对 *S. typhimurium* C5 的感染具有抵抗力。

(二) 抗病毒作用

热灭活的 LC9018 能提高成年小鼠对 1 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 的抵抗力。如果给小鼠同时注射热灭活的 LC9018 和灭活的 HSV-1 抗原，LC9018 对小鼠抗 HSV-1 感染的能力、以及对中和该病毒抗体的表达都显著提高。在同时给予热灭活的 LC9018 和灭活的 HSV-1 抗原的情况下，14 天后其对小鼠保护作用达到最高峰。这种对 HSV-1 的免疫作用可以从以前单独采用热灭活的 LC9018 处理、采用热灭活 LC9018 与灭活的 HSV-1 抗原同时处理或采用热灭活 LC9018 与巯基乙酸同时处理的小鼠的腹膜渗出物细胞转移到同种小鼠体内。相反地，经过巯基乙酸单独处理诱导的腹膜及脾渗出物细胞、或采用热灭活 LC9018 与巯基乙酸同时处理诱导的脾渗出物细胞则不能在同种小鼠间传递这种免疫作用。以上结果表明，由采用热灭活 LC9018 与灭活的 HSV-1 抗原同时处理诱导的小鼠腹膜巨噬细胞可能在宿主抗 HSV-1 感染的保护反应中有非常重要的作用。后来，Watanabe 和 Yamori 的研究表明，小鼠对腹膜 HSV-1 感染的免疫保护反应可能主要来自于 LC9018 抗原和所产生的干扰素共同对腹膜巨噬细胞的激活作用。

Ohashi 等研究了热灭活的 *Lb. casei* 在增强小鼠对鼠巨细胞病毒 (MCMV) 感染抵抗力方面的作用，这种保护作用可以从导致 50% 小鼠死亡 (LC₅₀) 所需的噬菌斑形成单位 (PFU) 升高以及靶器官内具有侵染性的病毒拷贝数的减少、从靶器官、尤其是肝脏组织病理损伤的严重程度可以得到证实。*Lb. casei* 既不能使 MCMV 失活，也不能抑制该病毒在鼠胚胎纤维原细胞 (MEF) 中的复制。将 MEF 与 MCMV 共培养时，从采用热灭活 *Lb. casei* 处理小鼠来源的脾细胞能抑制 MCMV 在 MEF 中的复制。*Lb. casei* 对脾自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活力的提高，在小鼠受到致死性的 MCMV 感染后，可以延长其存活时间。在发生 MCMV 感染后，腹膜细胞的细胞毒作用以及血清中干扰素的水平都出现上升，但与小鼠的存活时间及是否受到 *Lb. casei* 处理无关。研究者认为，*Lb. casei* 在小鼠中诱导的对 MCMV 感染的保护作用可能与其增强鼠自然杀伤细胞的活力有关。后来，从 *Lb. casei* 细胞壁中分离的一种糖蛋白 (GP) 被认为是诱导这种抵抗力的主要成分。*Lb. casei* 细胞和这种糖蛋白诱导小鼠对 MCMV 感染抵抗力的活性指数分别为 80 和 28，其中，GP 诱导小鼠抵抗力的证据在于它能减少靶器官中侵染性病毒的拷贝数。不但是 *Lb. casei*、还有 GP 都能增强未被感染或已被 MCMV 感染小鼠体内自然杀伤细胞的活力，尽管 GP 的作用相对较小。*Lb. casei* 及 GP 对自然杀伤细胞活力的增强作用与其诱导小鼠对 MCMV 感染的活性指数具有相关性。在发生 MCMV 感染后，给小鼠注射 GP 并不能改变其体内干扰素的表达水平。因此，*Lb. casei* 细胞中的 GP 可能是赋予小鼠对 MCMV 感染抵抗力的主要活性成分。有关益生菌

以及益生菌来源的生物活性物质在体内对各种致病菌的作用如表 2-6。

表 2-6 益生菌/益生菌活性物质对致病菌的抗菌作用

敏感致病菌	抗菌物质	作用方式
<i>Ristella sp.</i>	多种乳酸菌	在消化道内拮抗作用
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Lb. casei</i> LC9018	免疫激活
<i>M. fortuitum</i>	热灭活 LC9018	激活巨噬细胞杀菌作用
<i>M. chelonae</i>	热灭活 LC9018	激活巨噬细胞杀菌作用
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lb. casei</i> 热灭活 LC9018 细胞壁组分(<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. plantarum</i> / <i>Lb. acidophilus</i>)	巨噬细胞介导的免疫反应 增强宿主免疫反应 提高巨噬细胞的杀菌作用
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	热灭活 LC9018 LC9018 细胞壁的磷壁酸脂 热灭活 LC9018	诱导活化巨噬细胞 增强小鼠的抵抗力 免疫刺激作用
<i>Streptococcus mutans</i>	细胞水溶性抽提物(<i>E. faecium</i> / <i>S. equines</i> / <i>Lb. fermentum</i> / <i>Lb. acidophilus</i>)	抑制细菌生长
<i>Escherichia coli</i>	乳酸菌混合菌 <i>Lb. casei</i>	抑制细菌繁殖 提高肠腔内 IgA 的分泌
肠毒性 <i>E. coli</i>	热灭活 <i>Lb. acidophilus</i>	增强小鼠的抵抗力
尿道致病性 <i>E. coli</i>	<i>Lb. fermentum</i> CRL1058	致炎性免疫反应
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Lb. fermentum</i> / <i>B. bifidum</i>	增强对致死作用的抵抗力
<i>S. typhimurium</i>	<i>Lb. bulgaricus</i> / <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. casei</i> / <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> GG	提高防御机理 预防肠道感染 抑制致病过程
<i>S. Dublin</i>	乳酸菌灭活菌体	免疫刺激
<i>S. typhi</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	抑制细菌繁殖
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	抑制细菌繁殖
<i>S. sonnei</i>	<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. acidophilus</i>	黏膜保护性免疫反应
<i>S. flexneri</i>	<i>Lb. acidophilus</i> 培养上清液	抑制细菌生长
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Lb. acidophilus</i> 培养上清液	抑制细菌生长
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Lb. acidophilus</i> 培养上清液	抑制细菌生长
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lb. acidophilus</i> 培养上清液	抑制细菌生长
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Lb. salivarius</i>	吸附抑制 抑制 IL-8 释放
<i>Candida albicans</i>	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. casei</i> GG/ <i>B. animalis</i>	调节细胞免疫
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Lb. reuteri</i>	逆转免疫抑制
1-型单纯疱疹病毒	热灭活 LC9018	诱导腹膜巨噬细胞 促进巨噬细胞表达 IFN-8 免疫刺激
鼠巨细胞病毒	热灭活 LC9018	宿主介导的抗病毒作用 增强 NK 细胞活力

第三节 益生菌的耐受性

一、消化道黏膜屏障在宿主防卫中的作用

消化道的主要功能是消化和吸收各种营养成分以满足正常的代谢需要和机体正常生长发育的需要。此外，在不断接触肠腔中的食物中的抗原以及微生物的过程中，肠道黏膜为宿主提供一种保护性防御机能，对于可能遇到的有害物质，消化道黏膜通过以下的方式来保障对

宿主的作用，包括唾液、胃酸、蠕动、肠内蛋白水解作用。小肠菌群以及存在各种细胞间连接复合体的上皮细胞膜。

在出生时，婴儿的消化道从处理离子型流汁转变消化母乳会导致消化道屏障功能的突然改变，在消化食物的过程中开始释放消化性激素并激活分泌、运动和吸收等功能。在出生后的发育过程中，消化道防御屏障会进一步成熟和出现一系列适应机制，包括出现黏膜蛋白和消化性酶，以及形成肠道菌群、胃中的酸性环境抵御外来微生物侵染等重要方式。在出生后的头几个月内胃黏膜已形成分泌 HCl 的功能，覆盖胃肠道上皮表面的杯状细胞黏膜是一种重要的物理屏障，它可以干扰肠腔中抗原对肠的吸附，肠道正常菌群的建立可以防止潜在的致病菌在消化道内的过度繁殖。在成熟过程中的这些改变同样影响着上皮细胞膜，这是一种存在于肠腔内容物与宿主内部环循之间的机械界面，在实验动物内已证实，在出生后的小肠刷缘膜的成熟与结合食物蛋白能力的增加是同步进行的。抗原结合到上皮细胞的能力与抗原转移的速度、途经有关，研究已证实其能影响黏膜免疫反应的强度。

(一) 与消化道相关的淋巴组织 (GALT)

黏膜表面被一种具有局部适应性的免疫系统所保护，与消化道相关的淋巴组织是从体内最大的免疫器官，是宿主免疫系统一个非常重要的组成部分。肠道免疫反应发生在不同的生理区间内，聚合成小叶状和 Peyer's 斑，并且分布于黏膜内，小肠道上皮组织和分泌位点在上皮内的 T 淋巴细胞主要作为一种抑制器和细胞毒素表型，而固有层细胞则呈现辅助和诱导功能，在固有层 (lamina propria) 中充满的是属于 B 细胞系列的淋巴细胞，免疫球蛋白 A (IgA) 抗体的表达在黏膜表面非常丰富，与血清中 IgA 不同的是，分泌型 IgA (sIgA) 主要以二聚和多聚体形式存在。sIgA 是一种保护黏膜表面而且不激活补体或致炎反应的免疫球蛋白，这一点使 sIgA 成为一种保护黏膜表面非常理想的免疫球蛋白。产生免疫球蛋白的细胞在人的上消化道和下消化道的分布是有区别的，在小肠中主要分布的是 IgA₁ 免疫细胞，在大肠则主要是产生 IgA₂ 的免疫细胞，后者对细菌蛋白酶更有抵抗力。消化道中的 sIgA 是正常黏膜免疫系统的一部分，该系统包括呼吸道、泪腺唾液腺和乳腺等，当 GALT 中出现某一种免疫反应时会影响其他黏膜表面的免疫反应。淋巴细胞的成熟过程包括抗原运送穿过 Peyer's 斑，然后将该抗原定位于辅助与诱导 T 淋巴细胞。T 淋巴细胞繁殖并诱导 B 细胞产生相应的反应。在接触到抗原 2~4 小时后，周围血液中开始出现分泌特定抗体的淋巴细胞，在 6~8 小时后浓度达到最高值，并在血液中停留 2~3 周，研究证明这些细胞可寄居于消化道淋巴细胞表面的定位受体在与内皮细胞的腺体作用后，指导这些淋巴细胞迁移到有关的组织。在口腔抗原介入 1~2 天后，会出现周身抗原特异性免疫抑制，而作为整体性应答的口腔耐受会在 5~7 天内建立。

有资料表明淋巴细胞与肠道上皮组织之间的相互作用可能比目前已认识到的要重要得多。淋巴细胞尤其是 B 细胞系的淋巴细胞，能诱导肠细胞形成样细胞，M 层是一种奇特的上皮组织，由柱状上皮细胞，极少量杯状细胞 (goblet cell) 和刻化的抗原识别细胞组成，M 层在 Peyer's 斑中很常见。

这些细胞能极有效地将颗粒和微生物从消化道腔转送到腔体下面的小囊中，益生菌对定位于消化道的 B 细胞具有诱导作用，在影响黏膜免疫功能时，除促进 IgA 的分泌外，可能还有其他的作用。

(二) 消化道对抗原吸收的调控

小肠在消化的过程中接触到的抗原的量非常巨大，而且这些抗原的组成在不断地快速改

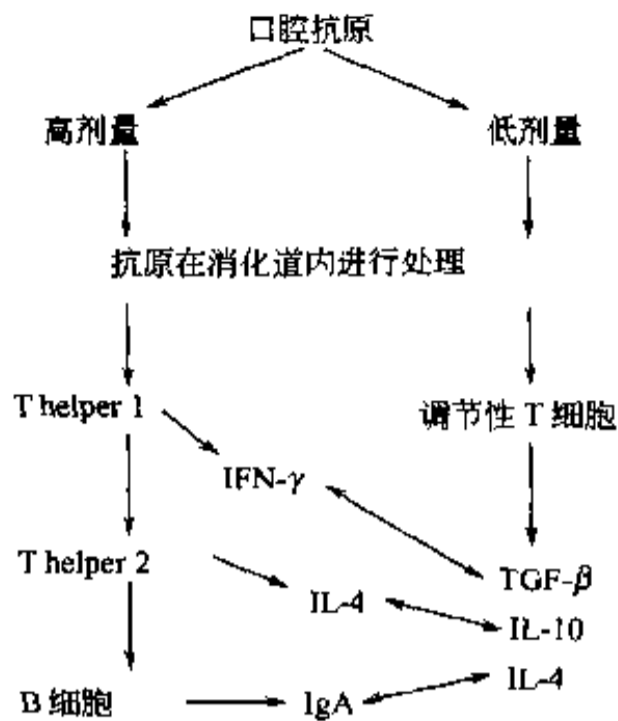


图 2-3 在不同剂量抗原存在时，口腔耐受的形成机理
IL—白介素；IFN—干扰素；Ig—免疫球蛋白；TGF—转形生长因子

变。绝大多数抗原可被消化道作用正常的黏膜屏障所排除，免疫外排，在纤毛上皮细胞中存在特殊的抗原运输机制，穿过上皮组织层的抗原是通过转胞机制 (transcytosis) 吸收，在这一过程中，主要的降解途径使溶酶体对抗原进行了一系列的处理。消化道防御的第一道防线是免疫外排 (immune exclusion)，第二道防线是免疫消除 (immune eliminataion)，其目标是将穿透黏膜的抗原移去，一种次要的途径允许将未经处理的抗原进行运输。

Peyer's 斑的表面被 M 层所覆盖，当抗原存在时，Peyer's 斑是决定随后免疫反应的关键因素。总体而言，穿透这种上皮组织的抗原运输特点是摄取迅速、但降解缓慢，抗原被运送至下层的 T 细胞，这些 T 细胞分化成不同的效应细胞，由后者介导主动的免疫抑制以及促进分泌 IgA 的 B 细胞的分化。这种透过肠道黏膜吸收的结果是，膳食中的抗原转变成一种可以耐受的形式 (见图 2-

3)，其结果是对抗原、主要是食物蛋白的低反应性，口服耐受是肠道免疫系统的典型标记。

二、口服耐受

(一) 口服耐受 (OT) 与免疫

口服耐受 (oral tolerance) 是口腔在初次接受某种抗原后出现的一种特异性的抗原不应性状态。Wells 等在 1911 年首次描述了口服耐受现象，他们发现预先给豚鼠口服鸡蛋白可防止后来对该蛋白的全身性过敏反应。针对自身抗原的免疫无反应状态称为自然耐受 (Natural tolerance/ Self tolerance)，针对外源性抗原的免疫无反应状态称为获得性耐受 (Acquired tolerance)。口服免疫耐受，简称口服耐受是指通过消化系统摄入外源性抗原后，诱导外周免疫系统产生的抗原特异性无反应状态。口服耐受是多种因素参与的综合效应。

口服抗原达到小肠时大部分已被降解，但是，某些抗原仍可保持完整的结构且可被小肠吸收进入全身血液循环。吸收或被机体部分消化的抗原都可诱导耐受，具体的机理尚不清楚。可能是抗原经过胃肠消化后，使蛋白结构内隐蔽的抑制性决定簇暴露，同时去除致敏性决定簇。

(二) 口服耐受的产生机制

诱导口服耐受的主要机制包括主动抑制 (active suppression)、克隆消除 (clonal deletion) 和克隆无能 (clonal anergy)，其中口服抗原的剂量是决定其通过何种机制诱导免疫耐受的关键因素。低剂量易于诱导主动抑制，而高剂量则倾向于诱导克隆消除和克隆无能。主动抑制是指在 GALT 内诱导抗原特异性调节性 T 细胞的分化，后者进入全身免疫系统发挥免疫下调作用。试验证明，抗原诱导的主动抑制主要是通过分泌抑制性细胞因子，如转化生长因子-β (TGF-β)、白介素-4 和白介素-10 而实现。

口服特异性抗原后，初期虽然有短暂的 1 型辅助 T 细胞 (Th1) 的激活反应，但 GALT 的独特性在于重点诱导 Th2 细胞和分泌 TGF-β 的 T 细胞的产生。口服耐受产生后，抗原特异性迟发型超敏反应 (delayed-type hypersensitivity, DTH) 通常降低。DTH 是 Th1 细胞反应，其反应的降低是由分泌 IL-4 的 Th2 细胞所介导；TGF-β 是由 GALT 相关的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞所分泌，是口服耐受主动抑制反应中重要的调节因子。TGF-β 在胃肠道的局

部功能中起着重要的作用，是一种很强的免疫抑制剂和抗发炎物质；而且能促进肠道中保护性 IgA 的产生，TGF- β 基因缺失的小鼠常伴随多种器官的炎症反应，因此，TGF- β 在维持免疫系统的稳定性方面具有重要作用。

使用 IL-4，已从碱性磷脂蛋白 T 细胞受体转基因小鼠中克隆了分泌 TGF- β 的 CD4⁺ T 细胞。以 IL-4 作为分化增殖因子，这些细胞不分泌 IL-2、IL-4、TGF- β 和 IL-10。IL-4、TGF- β 和 IL-10 本身都具有促进分泌 TGF- β 型 T 细胞生长的能力，又有下调 Th1 和其他免疫细胞功能的特殊 T 细胞亚群，有人称之为 Th3 细胞。与 Th1 和 Th2 不同，这类细胞可协助 IgA 的产生和早期 TGF- β 的分泌。多发性硬化患者口服磷脂蛋白后，可观察到分泌 TGF- β 的 MBP（髓磷脂碱性蛋白）特异性 Th3 细胞。与 Th1 和 Th2 相比，Th3 细胞增殖缓慢。因此，口服高剂量抗原后，Th3 细胞不容易出现凋亡。

通过肠道和 GALT 使外来抗原进入周围免疫系统是导致口服耐受的主要原因，从其定义可知 OT 是一种由抗原驱动的口服免疫耐受状态。这种免疫耐受功能不能遗传而是在出生后成长的过程中后天获得的，有必要记住的是，与胸腺一样，消化道的上皮组织也是从内皮层演化而来，其在周围免疫耐受的形成过程中也可能发挥了重要的作用。免疫应答的产生，通常是黏膜致病菌抗原引发的反应，以及由此产生的介导宿主免疫防御的免疫效应因子，是黏膜免疫系统的一种例外情况。黏膜免疫反应更常见的特征是产生耐受反应，即引发这种反应的抗原通常是一些常见的黏膜抗原，而这些黏膜抗原来自于肠道土著菌群或进入消化道食流中蛋白质有关；黏膜在第二次接触这类抗原时，黏膜免疫系统会出现部分或完全沉默。导致周围免疫耐受的免疫学途径有三种：①抗原驱动的免疫抑制；②克隆无能；③克隆消失。这三种机制在口腔耐受中的相对作用主要由与所接触抗原的剂量决定。抗原由口腔摄入后，在 GALT 中发生的调节性事件包括抗原通过黏膜、被 GALT（包括肠细胞）进行抗原处理并被 1 类抗原簇或 2 类抗原簇标示。在大多数情况下是被 1 类抗原簇标示，从而导致特异性 CD8⁺ T 抑制细胞被激活；偶尔也会被 2 类抗原簇分子标示，将激活 CD4⁺ T 细胞，并最终形成免疫记忆。

因此，口腔耐受可能有两途径，低剂量抗原引起抗原修饰细胞的产生。这些细胞产生后将由与消化道相关标示细胞对抗原进行标示。这种标示诱导调节细胞（Th3 细胞）的产生。Th3 细胞在体内识别该抗原后会分泌抑制性细胞因子 TGF- β （变形生长因子）和 Th2（IL4/IL10）。这些抗原特异性调节细胞迁移到淋巴器官后，通过抑制效应细胞的产生来抑制免疫反应或迁移到目标器官后通过抗原非特异性细胞因子的释放（旁路抑制）来抑制疾病的产生；而高剂量抗原则通过克隆无能细胞繁殖和/或克隆消失诱导 Th1 细胞不产生反应。

两种引起口服耐受的作用机理已得到广泛研究，即通过黏膜衍生的抑制性 T 细胞引起 OT 和由克隆无能/克隆消失引起的 OT。研究表明介导口服耐受的抑制性 T-细胞主要是 CD8⁺ T 细胞，尽管在少数涉及细胞转移技术的研究中发现，诱导 OT 产生的是 CD4⁺ T 细胞而不是 CD8⁺ T 细胞。这种抑制性细胞是一种抗原特异性细胞，以前曾认为抗原的特异性在于 T 细胞反应的诱导期和效应期。最近的研究表明，口服抗原诱导的抑制性 T 细胞确实具有抗原特异性，不过这种特异性仅存在于 T 细胞的诱导期而不存于 T 细胞应答的效应期，后者是由抗原非特异性抑制因子介导的。证据是口腔抗原诱导的抑制性 T 细胞具有旁路抑制功能，即它能抑制那些与诱导其产生的抗原完全不相关抗原免疫反应的产生。

导致口腔耐受的另一条机理是由抑制性 T 细胞介导的，后者是一类与携带有 $\gamma\delta$ TcR

(T 细胞受体) 的 CD8⁺ 抑制性 T 细胞相关的抑制性 T 细胞。研究表明, 在口服耐受实验动物模型中 CD8⁺ T 细胞是主要的抑制性 T 细胞, 并对随后通过肠道途径给予的抗原产生不应性 (Chen & Weiner, 1996)。这类 CD8⁺ T 几乎全部是 $\gamma\delta$ T 细胞, 携带 $\gamma\delta$ TCR 的 T 细胞可以诱导口服耐受 (McGhee, et al., 1999)。口服抗原诱导抑制性 T 细胞的机制还可以通过分泌一些具有抑制性的细胞因子、例如 TGF- β 发挥非特异性免疫抑制作用, 而这些抑制性的细胞因子由 Th3 细胞分泌。这些抑制性 T 细胞一旦被诱导后, 可以迁移到其他组织。

抗原的类型, 抗原进入的途径以及抗原的剂量是决定所引起的 T 细胞反应的关键, 对口腔途径摄入抗原的耐受性的建立还取决于宿主的年龄和接触这些抗原时间的长短, 在接触抗原后, 免疫系统会释放一系列细胞因子, 由后者指导随后的免疫反应。由 Th1 和 Th2 样细胞产生的极化细胞因子种类可大致了解某一抗原引起的免疫反应的类型。免疫激活早期的事件就是促进这些细胞因子的产生, IL-4 专一性地促进 Th2 细胞的产生, 后者可导致 IgE 表达增强、嗜曙红细胞过多和遗传性过敏的产生。Th1 在健康个体内, 指导保护性黏膜免疫反应包括针对致病菌抗原的强烈反应和对一些广泛存在的抗原 (如食物) 的不应答, 在针对有害抗原 (如致病菌) 的免疫应答与对常规抗原不应答之间必须达成并维持某种平衡。口服耐受就是一种对肠道途径所接触抗原的一种不应答状态。对实验动物的研究表明, 某种食物抗原的剂量和接触的频率可影响获得性耐受的进程。高剂量通常引起克隆消失或无能, 低剂量的抗原通常引起主动性抑制, 并诱导 Peyer's 斑中调节性 T 细胞的产生 (图 2-3)。这些调节性 T 淋巴细胞通过表达抑制性细胞因子, 包括 IL-4、IL-10 和 β -TGF 来发挥其功能。克隆消失或无能是通过局部产生 IL-12、 γ -INF (可以随后抑制 IL-4 和 β -TGF 的产生) 进行的, 并且涉及 Th1 细胞的凋亡。因此, 通常认为 GALT 保持免疫静息状态的主要机制之一是通过局部细胞因子的调节, 尤其是与 β -TGF 相关的低剂量耐受。

并非肠腔内所有的抗原都可以诱导口服耐受。肠腔内的致病菌抗原可诱导 GALT 特异性的免疫应答。这一点可以解释如下: 肠腔内的致病菌抗原可以结合到上皮细胞上, 从而允许抗原经过肠细胞进入并避免在 Peyer's 斑中诱导耐受作用。GALT 中这种能进行细微调节的免疫应答过程可能有利于控制代谢活性与消化道菌群平衡。不同的抗原对上皮细胞的黏附能力存在差异, 并根据该特点对现有的益生菌进行了分类。对上皮细胞具有强烈黏附能力的抗原通常与引发 GALT 强烈的免疫应答。另一方面, Duchmann 等 (1995) 认为健康的个体对自身的菌群具有耐受性, 而在发炎性肠道疾病的患者中这种耐受性不复存在。采用益生菌治疗的方法, 改变肠道菌群的组成可以部分恢复因发炎性肠道疾病所引起的免疫功能紊乱。这些结果似乎表明益生菌在免疫调节中扮演着一种双重角色: 在增强消化道免疫功能的同时促进口服耐受。肠道抗原这种自相矛盾的免疫调节作用在 GALT 中在不断被发现, 口服耐受是免疫排除 (immune exclusion) 和系统性免疫功能抑制的伴生效果, 这一点可能要归功于免疫抑制性细胞因子 β -TGF 的双重功能。

(三) 口服耐受与致敏

在年幼婴儿中, 许多免疫调节异常情况更容易引起致敏, 而不是口服耐受。在出生后的一段时间内, 小肠对抗原的排除、消除功能及免疫调节机制发育尚未完全, 容易导致对抗原的异常吸收。免疫保护功能不成熟的表现之一是对能表达 IgA 的细胞的产生能力不足。同时, T 细胞的功能也出现异常。因此, 婴儿和成人免疫细胞所分泌的免疫调节性细胞因子的组成存在非常显著的差异。在新生儿体内, 细胞因子的组成发生严重极化, 偏离细胞介导的免疫而转向体液免疫, 在某一段特定的时间内, 分泌 IL-4 的细胞的大量存在将使免疫记忆

性 T 细胞转变成 Th2 的表型, 后者将导致 IgE 表达增强, 从而引发典型的致敏反应。

消化道屏障发育不成熟有可能导致异常的抗原转移和免疫应答, 这一点可以解释为何低龄人群的口服耐受容易被扰乱。通常认为新生儿淋巴细胞不能产生足量的抗炎性细胞因子 β -TGF, 是容易导致对低剂量肠道抗原致敏的主要原因。在幼年时, 这种抗原多数来自于食物, 因此, 对食物的过敏反应非常普遍。

发生炎症反应时, 由于 GALT 接触抗原的速度、途径和方式发生变化, 可能引起口服耐受的消失。病毒、细菌或食物抗原诱导的肠道黏膜炎症反应会进一步提高小肠的通透性, 因此, 大量的抗原可穿过黏膜屏障, 并且使抗原的运输途径发生改变。由发育不完全、感染或超敏性引起的肠道黏膜异常使抗原的正常处理方式受到损害, 并由此激发异常的免疫应答和导致过敏。这些结果表明, 对食物抗原的过敏反应是由于与消化道相关的淋巴组织无法达到或保持口服耐受状态而引起的。

三、肠道菌群在消化道防御机制中的作用

肠道菌群是肠道防御屏障的重要组成部分, 当肠道菌群缺失时, 抗原通过消化道黏膜的运输明显增加。肠道菌群可以诱导局部或系统性免疫应答进一步证明了这一结论。而且, 在实验动物模型中, 肠道菌群可以诱导和维持口服耐受状态。这些肠道菌群可以使机体对某种抗原保持不应答状态, 以及缩短由 *E. coli* 毒素所引起的不应答状态消失的时间。

除参与诱导免疫耐受外, 肠道菌群还可以作为刺激 GALT 发育成熟的重要抗原来源。在接触肠道抗原刺激的过程中, 尤其是肠道菌群的建立过程, 与消化道相关的淋巴组织 (GALT) 产生分泌 IgA 细胞的能力逐渐提高。实验证明, 这些微生物在定殖以后可以转位到肠膜淋巴结, 但在特异性的 IgA 开始分泌以后, 转位细菌的数量开始减少, 反应出肠免疫防御机制的不断成熟。

在无菌鼠内研究了肠道菌群在诱导口服耐受过程中对 IgE 的反应, 与对照组小鼠相反, 口服卵白蛋白的无菌鼠能维持一种 Th2 型的免疫反应, 即产生 IgE 抗体。口服耐受的丧失是因为没有肠道菌群的存在。无菌鼠这种异常的 IgE 反应可以通过在小鼠出生时, 使其恢复肠道菌群的组成而得到纠正, 但在其他的阶段这种纠正作用则无效。这一结果表明, 肠道菌群对 GALT 发育的影响主要是宿主的初生阶段, 它们对诱导 Th2 细胞群产生起着十分关键的作用, 而后者对口服耐受的诱导至关重要。

阴道分娩的婴儿和采取剖腹产方式分娩、但产妇采取预防性抗生素治疗的婴儿粪便中可培养微生物的组成存在非常明显的差异, 在婴儿生长到 6 个月后, 仍可观察到两者之间的差异, 即大部分剖腹产婴儿肠道还没有出现拟杆菌 (*Bacteroides*) 定殖。肠道菌群的定殖过程似乎与体液免疫机制的发育有关。有趣的是, *B. fragilis* 对体液免疫机制的发育非常重要, 其次是双歧杆菌, 因为在那些获得这两类细菌的婴儿体内体液免疫系统中分泌 IgA 和 IgM 的淋巴细胞更多。以上的结果表明, 肠道菌群对个体非常重要, 其组成的不同可能会影响免疫静息状态。当肠道免疫系统对抗原的应答方式固定以后, 肠道菌群对消化道免疫防御机制发育的影响就达到了顶峰。

四、益生性乳酸菌的微生物 (细菌) 干扰作用

益生性乳酸菌可用于治疗肠道菌群失调, 及消化道的通透性增加等症状, 而后者是许多肠功能失调的主要特征, 如急性轮病毒腹泻, 食物过敏, 大肠功能失调, 在骨盆放射治疗过程中肠代谢功能改变, 以及大肠癌发病过程中消化道代谢作用的改变等, 在上述所有情况下, 都会引起肠道菌群组成的改变, 损害消化道屏障功能以及各种类型的肠道炎症等。具有

功效性的益生菌能在胃环境中存活，以及通过黏附小肠上皮细胞，至少能暂时性在小肠内定殖。这类益生菌可作为治疗消化道异常及消化道黏膜屏障功能失调等临床症状潜在候选者。

到目前为止，对乳酸菌的黏附作用、乳酸菌调节肠道和泌尿生殖道微生态方面的作用、宿主与微生物因素对细菌之间相互作用的影响以及对疾病控制的影响进行了广泛的研究。尽管目前所获得的结果的说服力还不够充分，但 *Lb. acidophilus* 似乎可对致病菌在消化道的定殖过程发挥有益的干扰作用，其作用机理涉及竞争性排除以及可在体内产生包括细菌素在内的抑菌物质。益生性乳酸菌必须具备广谱抗菌作用、耐酸和胆汁、能分泌各种抗菌物质、可黏附到不同类型的黏膜细胞上等特点才能发挥其潜在的功能，具有以上特性以及在体外试验中表现出强黏附能力的乳杆菌菌株在临床上被用来研究其对膀胱炎的治疗作用。在阴道内采用乳杆菌灌洗的方法能减少女性尿道下部非复杂性感染的复发率，部分使用 Nonoxynol-9（一种杀精虫剂、对尿道正常保护性菌群具有一定的杀灭作用）作为避孕手段的女性容易感染复发性的膀胱炎，选择对 Nonoxynol-9 具有抗性的乳杆菌可能是有效治疗此类膀胱炎的潜在措施。在兽医学研究中，给动物服用益生菌，发挥其细菌干涉（扰）作用有利于预防动物疾病。经过仔细挑选的乳酸菌混合制剂能与动物消化道菌群共同作用，从而提高动物对疾病的抵抗能力，改善其生理功能。乳酸菌的细菌干扰作用作为一种预防疾病的保护性措施，其长期使用的实际效果还需要更多的人体及动物实验加以证实。

（一）益生菌对人口腔病原菌的作用

Wilcox 等报道口腔乳杆菌可与链球菌或放射线菌发生共凝集作用。在 7 种被研究的乳杆菌中仅有两种能发生共凝集作用，而且共凝集的对象局限于链球菌。其中，*Lb. salivarius* 可与 *Streptococcus salivarius*、*S. gordonii*、*S. crista* 及丛生菌毛的 *S. sanguis* II 发生共凝集；*Lb. fermentum* 则能与 *S. gordonii* 或 *S. sanguis* 发生共凝集。*Lb. salivarius* 与 *S. salivarius*、*S. gordonii*、*S. sanguis* II 之间的共凝集是由乳杆菌细胞表面的一种蛋白质所介导，这种共凝集作用不被乳糖所抑制；而 *Lb. fermentum* 与链球菌之间的共凝集则是由链球菌细胞表面的蛋白质所介导，共凝集作用可被乳糖所抑制。

（二）益生菌对人泌尿生殖道病原菌的作用

感染泌尿生殖道的细菌主要来自于肠道，它们通过阴道和会阴溯行进入相关的部位。因此，要防止感染的发生必须阻止这种溯行过程或将侵入的病原体消灭在膀胱内，细菌通过性交可从阴道进入膀胱或以其他的方式沿着尿道黏膜表面逐渐吸附从而进入膀胱。

Chan 等发现，将多株从人体正常菌群分离到的乳酸菌菌株在体外与入尿道上皮细胞预培养以后，多种革兰氏阴性致病菌对尿道上皮细胞的黏附作用被完全或部分抑制。不同乳杆菌菌株对致病菌对尿道上皮细胞定殖的干扰作用不完全相同。Reid 等测试了 34 株从人泌尿生殖道、乳品或鸡体内分离到的乳杆菌对尿道上皮细胞的黏附能力，另外一株乳杆菌则是从市售菌剂中分离所得。在 34 株乳杆菌分离物中，其黏附能力差异极大，从每个尿道上皮细胞黏附 8 个细菌细胞至 76 个细菌细胞；而从市售菌剂分离的乳杆菌的黏附能力较差，平均仅为每个上皮细胞黏附 15 个乳杆菌细胞。选择其中的 11 株乳杆菌进行形态大小测量时，发现其长度和宽度各不相同，这些菌株可竞争性地排除 6 株已黏附在尿道上皮细胞的病原菌，其排除效率在不同乳杆菌之间存在差异。

在琼脂覆盖抑制试验中，这 34 株乳杆菌分离物对 11 株尿道病原菌生长的抑制作用差异非常显著。对上述 11 株乳杆菌根据其细胞大小，黏附能力、对病原菌排除作用及对致病菌生长抑制作用综合评分后发现，*Lactobacillus casei* GR-1 获得最高分，而市售菌剂中的乳

杆菌得分最低。该研究结果表明，在研究细菌干扰作用对预防尿道或其他感染的功效时，细菌大小、黏附能力、竞争性排除能力以及对尿道病原菌的抑制作用等4个指标可作为筛选目的乳酸菌菌株的标准。Reid等还研究了 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GR-1（根据新的分类标准，应为 *Lb. rhamnosus* GR-1 ——编者注）对两株尿道致病性 *E. coli* Hu734 和 ATCC25922 生长的抑制作用。结果表明，这种生长抑制作用不是由噬菌体感染或 H_2O_2 所引起，而是 GR-1 菌株的细胞与 *E. coli* ATCC25922 在尿中发生共凝集作用，共凝集发生在 37℃ 共培养 4 小时后，被测试的 9 株乳杆菌都可以与 2 种至 13 种尿道病原菌发生共凝集。泌尿生殖道上皮细胞被能产生抑菌物质的乳酸菌所占据以及它们与尿道病原菌的密切相互作用为宿主抗感染提供了重要的防御机制。

在与生物医学材料相关的感染的病理学上，微生物对表面的黏附作用是一种非常严重的危害因素（见第三章）。细菌在纤维性材料表面的黏附并形成生物膜是诱发多种疾病的早期关键步骤，如毒性休克综合症。Hawthorn 和 Reid 等报道，在聚合体材料表面预先包埋某些乳酸菌可明显减少尿道病原性凝血酶阴性葡萄球菌和 *E. coli* 在生物医学材料表面的黏附作用。乳杆菌容易从表面张力低的聚合体材料表面解附，而再吸附到表面张力高的聚合体材料表面。因此，预包埋在具有高表面张力的亲水性材料，如玻璃和磺酸化聚苯乙烯表面的乳杆菌对尿道病原菌具有非常强的排除作用。

表面预包埋乳杆菌后，可使 *Staphylococcus aureus* 的黏附能力的 26%~97% 被抑制；对于 *Candida albicans*，这一数值为 0~67%。当黏附在聚合体材料表面的致病菌遇到乳杆菌 (*Lb. acidophilus*) 时，*S. aureus* 的被替代率可达 99%，而 *C. albicans* 的被替代率可达 91%。在通过预包埋进行细菌干扰时，在 5 株被研究的乳杆菌中，憎水性的 *Lb. acidophilus* 76 和 T-13 是作用最强的两株乳杆菌，而具有中等亲水性的 *Lb. rhamnosus* GR-1 对 *C. albicans* 的替代作用最强。以尿道上皮细胞为试验材料时，也可观察到乳杆菌对这两种致病菌对尿道上皮细胞黏附作用受到明显地干扰。以上的研究结果表明，这两种致病菌对纤维材料及尿道上皮细胞黏附的速度，以及女性泌尿生殖道中正常菌群的数量是影响致病菌感染能力的重要因素。

Vepraeds 等在平行板流量室（详情可参阅第三章关于平行板流量室的介绍）中，研究了 *Lb. rhamnosus* 36 和 ATCC7469，*Lb. fermentum* B54 以及 *Lb. acidophilus* RC14 所分泌的生物表面活性剂对尿道病原菌 *Enterococcus faecalis* 1131 对玻璃早期黏附的抑制作用。*E. faecalis* 1131 对吸附了一层由 *Lb. acidophilus* RC14 或 *Lb. fermentum* B54 所分泌的表面活性剂的玻璃的初始沉积速率被显著地降低，降低幅度达 70%，而经过 4 小时的黏附过程后，发生黏附作用的肠球菌数量减少了 77%。经过透析（截流分子量 6 至 8KD）和冻干处理后，这些生物表面活性剂的表面活性及对 *E. faecalis* 1131 初始黏附作用的抑制活性不受影响。Fourier 变换红外光谱和 X-射线光电谱显示，由 *L. acidophilus* RC14 和 *Lb. fermentum* B54 所产生的表面活性剂富含蛋白质，而 *Lb. rhamnosus* 36 和 ATCC7469 所产生的表面活性剂则多糖和磷酸基团的含量较高。

Velraeds 等在平行板流量室中，以磷酸盐缓冲的生理盐水或收集到的人尿为悬浮介质，进一步研究了 *Lb. acidophilus* RC14 所产生的生物表面活性剂“Surlactin”对 *E. faecalis* 1131 对一种亲水性基质和一种疏水性基质初始黏附作用的抑制作用。多株乳杆菌分离物都可分泌这种名为“Surlactin”的生物表面活性剂，后者作为一种具有抗黏附作用的生物包埋材料在输液材料的研究中意义非同一般。需要注意的是，以上的结果只是一种初步的实验结

论, 生物表面活性剂抗黏附作用的效果可能不仅受到基质憎水性的影响, 还可能与涉及的致病菌种类有关。

(三) 益生菌对人肠道病原菌的作用

E. coli B41 能以扩散的方式黏附到 Hela-229 细胞上。热灭活的 *Lb. acidophilus* (Lactol 菌株) 可以一种具有剂量效应的方式抑制这种黏附作用。*Lb. acidophilus* 细胞裂解后, 其抑制作用消失, 表明 *Lb. acidophilus* 对 *E. coli* B41 黏附的抑制作用机理在于使 Hela-229 细胞上的 *E. coli* 的黏附位点产生空间障碍, 而不是与 *E. coli* 竞争普通的结合位点。*Lb. acidophilus* 对 Hela 细胞的黏附作用是由 *Lb. acidophilus* 分泌到培养基中的一种热稳定因子所介导, 后者也能阻碍 *E. coli* 对 Hela 细胞的黏附。

携带 CFA/I 或 CFA/II 黏附因子的肠毒性 *E. coli* (ETEC) 能特异性地黏附到体外培养人小肠上皮 Caco-2 细胞的刷缘上。热灭活的 *Lb. acidophilus* LB 能以一种剂量效应的方式抑制 ETEC 对 Caco-2 细胞的黏附, 其作用机理似乎与热灭活的 *Lb. acidophilus* LB 细胞造成人肠细胞上 ETEC 受体的空间障碍有关。在体外, *Salmonella typhimurium* 和 ETEC 能吸附到分化的人小肠上皮 Caco-2 细胞的刷状缘上, 而 *Yersinia pseudotuberculosis* 和 *Listeria monocytogenes* 则可结合到未分化的 Caco-2 细胞的周围。所有这些肠毒性菌株都能侵入 Caco-2 细胞。无论是活的还是热灭活的 *Lb. acidophilus*, 都能强烈地黏附到分化和未分化的 Caco-2 细胞上, 它们能以剂量效应方式抑制上述肠毒性菌株对 Caco-2 细胞的接触与侵入。其抑制作用似乎与完整的 *Lb. acidophilus* LB 细胞造成人肠细胞表面致病菌特异性受体的空间障碍有关, 而不是对位点的特异性障碍。Bernet 等测试了 4 株人源 *Lb. acidophilus* 在体外对人肠细胞样 Caco-2 细胞的黏附作用, 其中 LA1 菌株的黏附作用不需要 Ca^{2+} 的存在, 但需要一种类似蛋白质的黏附促进因子, 后者存在于细菌培养上清液中。LA1 菌株也可以强烈地吸附到经同步化培养的人酒杯状细胞株 HT29-MTX 所分泌的黏膜上。多种能导致血样性腹泻的致病菌对 Caco-2 细胞的黏附与入侵可以被 LA1 菌株以剂量效应的方式所抑制, 被抑制的病原菌包括: ①肠毒性、以扩散方式黏附的肠道病原菌 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 对 Caco-2 细胞的接触; ②肠病原性 *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* 和 *S. typhimurium* 对 Caco-2 细胞的侵入。在肠毒性 *E. coli* 感染 Caco-2 细胞前, 将 LA1 与 Caco-2 细胞共培养或将 LA1、*E. coli* 及 Caco-2 细胞共同培养时, LA1 对 *E. coli* 黏附与侵入的抑制作用比将 LA1 与已发生 *E. coli* 感染的 Caco-2 细胞共培养的效果好得多。热灭活的 *Lb. acidophilus* LB 细胞对可分泌黏膜的 HT-29-MTX 和人小肠 Caco-2 细胞也有类似的作用。

Helicobacter pylori 是引发各种胃炎、导致消化道瘻管的病原菌。由于内源性乳杆菌是普通小鼠胃内的优势菌群, 对其口腔接种 *H. pylori* 仅引起后者在胃内暂时性定殖, 但不会造成感染。Kabir 等研究了乳杆菌在体外对 *H. pylori* 对小鼠和人胃上皮细胞黏附的抑制作用, 以及这两种细胞在体外由 *H. pylori* 介导的干扰素-8 (IL-8) 的释放作用。在该研究中, 被 *Lb. salivarius* 感染的 BALB/c 无菌小鼠 (实验组) 以及无菌鼠 (对照组) 都采用口腔接种方式接种 *H. pylori*。在体外, *Lb. salivarius* 能抑制 *H. pylori* 对胃上皮细胞的吸附与 IL-8 的释放。*H. pylori* 不能在感染 *Lb. salivarius* 的鼠胃内定殖; 但在无菌鼠 (对照组) 胃内, *H. pylori* 大量定殖, 并引发活动性胃炎。此外, 给移植 *H. pylori* 的小鼠口服 *Lb. salivarius* 后可消除 *H. pylori* 的定殖。以上的结果表明, 乳酸菌可作为一种能有效预防 *H. pylori* 感染的益生菌。

(四) 益生菌对猪肠道病原菌的作用

肠致病性的 *E. coli* (EPEC) 能定殖于仔猪的回肠内, 并通过 K88 纤毛性附属物黏附到肠黏膜上。内源性的乳杆菌似乎能抑制 EPEC 对回肠黏膜的潜在定殖作用。从这些乳杆菌的培养液中可检测到一种能阻碍 K88 纤毛与回肠黏膜发生作用的活性成分。将黏膜用这些乳杆菌培养上清液透析截流物或凝胶过滤残留物 (分子量 > 250kDa 的部分) 预处理后, EPEC 对黏膜的黏附作用即受到抑制。从猪体内分离到的三株乳杆菌可使 *E. coli* K88 的黏附作用减少近 50%。

(五) 益生菌对禽肠道病原菌的作用

在回肠上皮细胞 (IEC) 放射性分析实验中, Jin 等检测了从禽来源的 *Lb. acidophilus* 和 *Lb. fermentum* 对鸡肠道致病菌—沙门氏菌的细菌干扰作用。他们通过①在加入沙门氏菌以前, 将乳酸菌与 IEC 共培养; ②LAB、IEC 和沙门氏菌同时培养; ③在加入乳酸菌以前, 先将沙门氏菌与 IEC 共培养等三个试验分别研究了乳酸菌对沙门氏菌的排除、竞争与替代作用。结果表明, 在排除和竞争试验中 *Lb. acidophilus* 可显著减少 *S. pullorum* 对 IEC 的吸附, 但在替代试验中这种作用不明显; *Lb. fermentum* 在排除试验 ($P < 0.08$) 和竞争试验 ($P < 0.09$) 中对 *S. typhimurium* 对 IEC 的吸附有一定的降低作用, 但在替代试验中, 这种作用不明显。不过, 无论在哪种情况下, 这两种乳酸菌都不能影响 *S. enteritidis* 对 IEC 的黏附作用。

第四节 益生菌的生理作用

益生菌的代谢产物从简单的短链脂肪酸到一些人体必需, 结构较复杂的有机酸如叶酸、乳酸等, 这些化合物能使消化道的 pH 降低, 形成一种酸性环境, 并且对宿主一系列的生理过程进行调节, 从而产生有利于机体健康的作用。乳酸菌在肠腔内释放的各种酶可以对消化过程起协同作用, 并减缓部分肠道吸收不良的症状, 此外乳酸菌在降低血清胆固醇水平, 改善糖尿病症状, 以及预防骨质疏松症等方面的作用已受到广泛关注。

一、促进营养物质的吸收

人的大肠内定居着种类繁多、代谢途径迥异的各种微生物, 其主要功能是从消化道上部未消化的碳水化合物中捞取能量、它们主要是通过发酵, 吸收利用糖类在小肠中的主要产物短链脂肪酸, 而短链脂肪酸所蕴含的能量占碳水化合物全部能量的 40%~50%。这些主要的短链脂肪酸主要有乙酸, 丙酸和丁酸, 它们分别是碳水化合物被肠道上皮细胞 (丁酸)、肝 (丙酸) 和肌肉代谢所产生, 肠道内的乳酸菌还能合成 B 族、K 族维生素, 并且在代谢胆酸、其他甾体化合物及其他难生物降解物质的代谢中有重要作用。肠道菌群的组成还与宿主的饮食有关。当存在可发酵的碳水化合物时, 例如非淀粉类的多聚糖、难分解性淀粉和寡聚糖, 细菌可以生长并活跃地合成蛋白质。大肠内蛋白质的合成量及转化效率难于估算, 但在形成的每 15g 粪便性生物物质中, 就含有 1g 菌体性氮。由细菌合成的氨基酸能否在大肠内被吸收目前还不清楚。最后, 肠道菌群中不同的类群如硫还原细菌、双歧杆菌和梭菌, 它们可选择性地利用饮食中的不同成分, 从而可能对人体健康具有非常重要的作用。

短链脂肪酸 (如乳酸、丙酸和丁酸) 是乳酸菌代谢的副产物, 其积累具有显著的生物学效应。未被小肠利用的蛋白质和脂肪在进入大肠后, 会被进一步发酵, 这一过程是大肠内短链脂肪酸, 尤其是支链脂肪酸的重要来源。大肠黏膜可很方便地吸收腔肠中的短链脂肪酸, 尤其是乙酸和丙酸可为宿主提供可利用能量贮备。此外, 某些短链脂肪酸可能对防止肠道黏

膜发生病变具有重要的作用。例如，丁酸在体外可以防止哺乳动物细胞发生瘤变作用。

Tukushima 研究了 26 名非绞死性肠梗塞患者肠液中短链脂肪酸含量及肠道细菌的组成。在所有的样本中短链脂肪酸的浓度为 16~905mg/L，以乙酸、丙酸和乳酸为主。在大多数情况下，短链脂肪酸的积累在进行手术前达到顶峰，然后其浓度逐渐降低；在采用保守疗法（不进行手术）的病例中，随着临床症状的改善，短链脂肪酸的浓度也逐渐降低。对这些肠道样本培养后发现其中含有 10 个（4~11 个）cfu/ml 产生短链脂肪酸的细菌。短链脂肪酸可能是抑制水与电解质吸收的因素之一，并由此引起肠道肿胀。

短链脂肪酸的浓度是决定肠腔 pH 值的重要因素之一。由于许多细菌酶的表达受到介质中 pH 值的影响，肠道内所产生的短链脂肪酸数量的变化对消化道内外来物质及致癌物的代谢有重要影响。

二、减缓乳糖不耐症

在全球近 70% 的人群中，存在着乳糖消化不良的问题。在婴儿中，原发性的乳糖不耐受症几乎不存在。然而，在腹泻、急性胃肠炎和复发性腹绞痛等发病期间，小肠内的双糖酶活性会受到严重影响，而且小肠吸收单糖的能力也会明显降低。这些情况会导致小肠的渗透压增加。在正常情况下，小肠和大肠中 65%~85% 的单糖与双糖可转化成容易被人体吸收的短链脂肪酸。如果肠道的正常菌群被扰乱，如前述的各种疾病发病期间，那么肠道对碳水化合物化合物的吸收不良问题就会凸现出来。

Lb. bulgaricus 和其他常用于乳品加工的乳杆菌具有充足的活性 β -半乳糖苷酶，它们能明显降低产品中乳糖的浓度。Kilara 和 Shahani 等认为，对于因内源性乳糖酶不足的人而言，食用含有 *Lb. bulgaricus* 与 *S. thermophilus* 活菌的酸奶可改善其乳糖不耐受症状。这一研究结论被 Gilliland 和 Kim、Kolars、Marteau 等人的研究所进一步证实。

Lin 等则指出，挑选具有高 β -半乳糖苷酶活力的菌种，对于生产适合于乳糖不耐症人群的产品具有至关重要的作用。Martini 等研究后认为，对于内源性乳糖酶缺失的人群而言，酸奶产品中的乳糖更容易消化，部分原因是由于产品中乳酸菌 β -半乳糖苷酶的存在。他们在研究中所使用的酸奶含有 *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* 和 *S. thermophilus*。在对 14 名 4~16 岁乳糖吸收不良儿童的研究中，Shermak 等检测了饮用酸奶或牛乳对乳糖吸收的影响。与饮用牛乳的儿童相比，那些饮用含有 *S. thermophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 活菌酸奶的儿童出现乳糖消化不良症状的人数少得多。

Jiang 等研究了在牛乳中添加从不同培养基（含乳糖或乳糖 + 葡萄糖）培养的 *B. longum*，对乳糖被人体吸收的影响。结果表明，在仅含有乳糖作为碳源的培养基上培养的 *B. longum* 添加到牛乳中以后，可以减缓乳糖不耐受的症状。

不过，Hove 等发现，对于那些接受回肠切口手术的患者而言，服用 *Lb. acidophilus* 和 *B. bifidum* 无助于改善其乳糖吸收不良症。

三、改善肠道功能

（一）提高小肠的运动性

乳酸菌对便秘及小肠运动性的改善作用也受到广泛的研究，那些体内乳糖酶缺失的个体在摄食牛乳以后，由于不能水解和吸收其中的乳糖，因此会产生腹胀、腹痛和腹泻等不适。引起腹泻的原因可能是乳糖本身引起的渗透压变化，或乳糖被发酵后的酸性代谢产物吸收不良，还可能由于肠道较低的 pH 值所引起的对钠及水吸收改变的共同结果。乳果糖（1,4- β -半乳糖苷果糖）的助泻作用可以有效减轻慢性便秘的症状，乳果糖在体内不被小肠二糖酶

水解或被肠道吸收，而是在大肠内被各种细菌包括嗜酸乳杆菌分解成乳酸和乙酸，除了增加渗透压以外，这些有机酸会使大肠近端 pH 值急剧下降，当产生的有机酸数量较多时，还可以使粪便的 pH 降低。乳酸菌在大肠中对乳糖的代谢作用造成消化道变酸和 pH 值下降会刺激肠道的蠕动，从而缓解便秘。

由于肠道运动性减少，大部分人院治疗的老年人都会产生便秘的经历，Seki 给 18 位患便秘的高龄老年患者服用含双歧杆菌的牛奶后，这些患者小肠的运动性及肠功能都出现明显的改进。在研究嗜酸杆菌乳对 42 名因便秘而住院治疗的老年患者的作用时，Alm 等发现这些患者大多数都存在中等至严重的肠运动障碍。他们发现，如果患者每天饮用 200~300ml 嗜酸杆菌乳，可以明显减少对助泻剂的需要。

Motta 等研究了口服乳酸菌对 60 名老年肠道疾病患者在组织学方面可发生的有益变化，以及十二指肠与大肠运动性改善方面的作用。受试者在接受为期 7 天的清肠处理后，每天服用 6 粒含有 *Lb. acidophilus* 冻干活细胞的胶囊，胶囊中 *Lb. acidophilus* 的活菌数为 10^9 cfu/ml。其临床进程在 50 患者中进行了观察，而其余 10 名患者则继续住院观察，在抽取十二指肠分泌液的前后进行食道-胃-十二指肠镜检和大肠镜检，并分别抽取十二指肠和大肠黏膜的标本。组织学检查表明由淋巴细胞和浆细胞引起的炎性浸润区域而积减少，体内消化腺分泌的黏液活性增强，从临床结果而言，在所有 60 名患者中，小肠的运动性都有显著提高。

(二) 减少食物过敏反应

食物中所含的外源性蛋白，如果注入人体，会引起过敏性疾病、但口服很少发生。其原因如下。①紧密相连的肠道黏膜上皮细胞及其外覆的一层多糖蛋白复合物形成物理屏障以阻挡抗原物质穿过细胞间隙进入体内。婴儿患腹泻病时，肠道黏膜上皮受损，牛奶抗原可由细胞部间隙进入体内，发生继发过敏。②肠黏膜表面可通过表达分泌性 IgA，封闭某些抗原。研究表明，与正常婴儿相比，血液中 IgA 浓度较低的婴儿其血液中抗牛乳蛋白的抗体滴度较高；③消化道相关的淋巴组织 (gut-associated lymphoid tissue)，其生物学效应主要是抑制机体对正常肠道内容物所产生的免疫反应——产生口服耐受 (Oral tolerance)。然而在某些少数个体却能产生食道过敏性消化道疾病，其机理有 3 类：①IgE 介导的超敏反应。抗原与特异性 IgE 抗体结合作用于肥大细胞和嗜碱性细胞，使后两种细胞释放出组胺、白三烯等生物活性介质，导致平滑肌痉挛、黏膜水肿、毛细血管通透性增加等速发超敏反应。②非 IgE 介导、主要是细胞介导的免疫反应。肠道内过敏原除被肠道上皮细胞提呈外，还可直接通过散在肠道黏膜中的 M 细胞 (无微绒毛、其表面也无多糖蛋白复合物覆盖)，产生 T 细胞介导的迟发型超敏反应。③混合性免疫反应。

近几年来，关于食物过敏的产生与婴儿出生后最初一段时间内对微生物的接触有关的理论仍然受到重视。在胎儿阶段，受胎盘对胎-父抗原 (feto-paternal antigens) 免疫调节的影响，婴儿出生时的免疫应答偏向于以 Th2 为主，这种 Th2 型免疫反应 (过敏促进型) 可以通过出生后接触含有微生物的制品而下调。新生儿早期肠道菌群的组成性发育对于消化道正常屏障功能的发育至关重要，并且可能对婴儿正常的免疫调节有重要的作用。在生长的初期阶段，肠道菌群通过影响与消化道相关淋巴组织的发育来指导黏膜免疫应答的调节。因此，使用适当的微生物制剂来有效地改变肠道菌群的组成，对降低遗传性过敏症有一定的帮助。对那些具有遗传性过敏症高发病风险的儿童，在其出生前或出生后实施益生菌干涉的研究结果表明，与那些接受安慰剂的新生儿相比，益生菌可以显著降低新生儿由遗传性过敏所引起的皮炎的流行。然而，在该临床试验中没有观察到益生菌对婴儿总 IgE、特异性 IgE

和皮肤试验的正面影响。这一结果表明，可能存在另一种调节 Th1 和 Th2 平衡的机制，因此，益生菌的作用可能不仅仅局限于调节细胞因子的表达。到目前为止，还无法确定益生菌是否对各种类型的过敏都有效。在 Helin 等 (2002) 进行的一项设有安慰剂组的随机双盲试验中，没有观察到口服 *Lactobacillus rhamnosus* GG 对白桦花粉过敏的治疗效果。

四、降低血清胆固醇水平和血脂浓度

Lb. acidophilus 被认为具有多种健康促进作用，包括抗瘤变，降胆固醇血症以及对小肠和食品中的致病菌具有拮抗作用。*Lb. acidophilus* 能在不良的环境中存活并且能在胃肠道复杂的微生态环境中定居，繁殖。因此，摄食 *Lb. acidophilus* 比那些不能在消化道定殖的乳酸菌对人体健康的促进作用可能更加持久。*Lb. acidophilus* 降胆固醇血症的作用可能来源于：①对 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶的抑制作用，该酶是体内胆固醇生物合成的限速酶；②通过胆盐水解酶的作用，将小肠内的胆盐水解，水解后的胆盐能与食物中胆固醇发生共沉淀作用，从而促进食源的胆固醇向粪便中转移；③菌体对胆固醇的同化作用。其中可能有一种至多种机理同时作用。

在选择 *Lb. acidophilus* 作为一种降胆固醇血症食品添加剂应用于人时，必须要考虑到多种因素。在 12 株人源的 *Lb. acidophilus* 中发现不同菌株之间在对胆汁的耐受性以及同化胆固醇能力方面具有显著的差异；这些菌株在添加和不添加 0.3% 牛胆汁的 MRS 肉汤中的生长速率完全不同。因此，无法根据其在添加 0.3% 牛胆汁的 MRS 肉汤中生长的速率来预测在添加 0.3% 牛胆汁的 MRS 肉汤中生长情况，而且在胆汁耐受性与胆固醇同化能力之间也不存在直接的联系。即使在那些同化胆固醇能力强的菌株之间，其对胆汁的耐受性也存在显著的差异。此外，这些菌株产生细菌素的能力也存在显著的差异。那些来源于人、能同化胆固醇、在胆汁存在时生长良好，而且产生细菌素的 *Lb. acidophilus* 菌株，可被选择用作膳食添加剂来降低血清胆固醇。最近的研究表明，*Lb. acidophilus* ATCC43121 对胆固醇的同化作用不是对其进行了降解，这些胆固醇可以从菌体细胞中找到，因此，仅是一种菌体吸附作用。

与那些在肠道内不能定殖和同化胆固醇的菌株相比，具有上述特点的 *Lb. acidophilus* 菌株拥有显著的优势。根据近来对 *Lb. acidophilus* 研究的结果，单一的 *Lb. acidophilus* 菌株不可能在所有上述作用（对胆汁的耐受性、同化胆固醇能力、产细菌素等）方面都能达到最佳的浓度，因此，仔细地挑选具有不同优势的菌株予以组合，并选择正确地加工过程是保证这些细菌能到达体内、最大限度地发挥其作用的必要前提。Brigidi 克隆了多种 G⁺ 细菌的胆固醇氧化酶基因，包括小肠来源的 *Lb. reuteri*。只有获得了重组质粒 pCHOA 的 *E. coli* 转化子细胞能较好地表达该酶活性，而在 G⁺ 细菌的转化子中，尽管 pCHOA 能稳定地保存，但却不进行表达。

(一) 动物试验

某些 *Lb. acidophilus* 菌株能在消化道内直接作用于胆固醇，因此可能对降低血清胆固醇水平具有促进作用。Gilliland 发现，给猪喂食一株体外条件下能在胆盐存在时进行生长、具有同化胆固醇能力的 *Lb. acidophilus* RP32 后，尽管给猪的饮食中富含胆固醇，但 *Lb. acidophilus* 能显著地抑制猪血清胆固醇水平的上升 ($P < 0.05$)，而如果给猪喂食另一株 *Lb. acidophilus* P47 却没有发现类似的作用，该菌尽管也能耐受胆汁进行生长，但却不能除去培养基中的胆固醇。

Danielson 研究了含有 *Lb. acidophilus* 的酸奶在成年公猪体内的降胆固醇血症作用。在

该研究中，以添加了含有 *Lb. acidophilus* 活菌的酸奶作为猪饲料的一种添加剂，该 *Lb. acidophilus* 菌株具有高降胆固醇血症能力并且具有抗菌活性。18 头公猪每天按 2.268 公斤/头的剂量喂食富含胆固醇的饲料，以达到胆固醇的摄入量为 6.661 克/头/天，以这种方式饲养 56 天后，其中 9 头公猪每天被给予 1.81 公斤/头第二种配方饲料和 0.45 公斤/头含嗜酸乳杆菌的酸奶，其余的 9 头则仍给予原配方的饲料。在两种饲养方案中，公猪每日摄入的胆固醇的量是相同的。每周从肘关节部位抽取血样，分析其中脂类的含量。结果表明，嗜酸乳杆菌酸奶能显著降低血清胆固醇水平面 ($P < 0.01$) 以及低密度脂蛋白的浓度 (LDL, $P < 0.08$)，但对血清甘油三酯 ($P > 0.23$) 或高密度脂蛋白 ($P > 0.11$) 无作用。

Zacconi 等则发现乳酸菌在小鼠内具有降血清胆固醇的作用。给小鼠灌喂 *Enterococcus faecium* CX 后，雄性及雌性小鼠血液中胆固醇的浓度分别下降 7.8% 和 16.9%；如果喂食的是 *Lb. acidophilus* N5，则胆固醇浓度的降低幅度要小的多，在那些被正常菌群感染的小鼠体内则看不出降胆固醇的作用。这两株菌都具有在胆汁存在时进行生长的能力，能在消化道定殖、能耐受胃酸环境而存活，并且都具有同化胆固醇的作用 (*E. faecium* 的能力高于 *Lb. acidophilus*)。

在饮食诱发高甘油三酯血症的大鼠体内，Oda 等研究了脱脂奶及其嗜酸乳杆菌发酵产物对血浆与肝脏内甘油三酯及胆固醇水平的影响。年龄为 4 周的大鼠每日给予能诱发高甘油三酯血症的饮食，该食物含 20% 可可油、17.5% 果糖、17.5% 蔗糖，连续 14 天。在试验组大鼠的食物中补充 20% 脱脂粉或 20% 经过 *Lb. acidophilus* SBT 2062 发酵的脱脂乳粉，结果，在对照组中出现高甘油三酯血症，但血浆胆固醇水平未出现上升。脱脂奶能抑制血浆中甘油三酯浓度的上升，但发酵脱脂粉则没有显著的作用，这两种含乳饲料组都能阻止肝脏内甘油三酯和胆固醇水平的升高，但对血浆胆固醇水平则没有作用。

Fukushima 和 Nakano 的研究表明，由 *Lb. acidophilus* 和 *E. faecalis* 组成的益生菌混合物可以降低大鼠肝脏内胆固醇的合成水平，促进甾体化合物从小肠排出；而 De Rodas 则发现对于饮食中富含胆固醇的猪而言，*Lb. acidophilus* 或钙都能促进猪体内血清胆固醇水平的降低，其作用机理可能是改变胆酸在肝内的循环过程。

Akalin 等则研究了酸奶和嗜酸乳杆菌酸奶对小鼠体重增长、血清胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL)、甘油三酯以及粪便中乳杆菌及大肠菌群数量的影响，给予酸奶或嗜酸乳杆菌酸奶的小鼠体重增长高于对照组，而给予嗜酸乳杆菌酸奶的小鼠血清胆固醇浓度和低密度脂蛋白胆固醇浓度的平均值则显著降低。酸奶或嗜酸乳杆菌酸奶对高密度脂蛋白胆固醇或甘油三酯的浓度没有影响。在所有试验的小鼠中，给予嗜酸乳杆菌酸奶的小鼠粪便中乳杆菌的数量最多。

De Smet 研究了给猪喂食具有胆盐水解酶 (BSH) 活力的 *Lactobacillus reuteri* 细胞对猪血清胆固醇的作用，*Lb. reuteri* 可以暂时性地改变肠道内源性乳杆菌的组成，但不能在体内永久定殖。与对照组相比，这种益生菌能显著地降低实验组猪体内的总胆固醇水平和低密度脂蛋白胆固醇水平 ($P \leq 0.05$)，而未观察到对高密度脂蛋白胆固醇水平的影响。尽管从这两组猪粪便中排出的中性甾醇和胆盐的数据波动较大，然而，仍然可以看出喂食 *Lb. reuteri* 的猪其粪便中中性甾醇和胆盐的排出量较大。虽然在喂食 *Lb. reuteri* 三周后，两组猪体内血液中胆固醇水平都出现上升的情况，但喂食 *Lb. reuteri* 的猪体内血清胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇水平与对照组相比，明显偏低。在最后恢复正常饮食的三周中，两组猪体内胆固醇浓度均显著降低，两组之间在总胆固醇浓度和 LDL 胆固醇水平之间的差异基本消

失。最近, Du Toit 等报道, 在给猪喂食这种益生菌三周以后, 血清胆固醇水平出现降低, 同时伴随的是猪粪便中湿度与乳杆菌数量增加, 甘油三酯、pH 和粪便中乳酸菌的数量不受到明显影响。

(二) 临床试验

采用人工配方喂养的婴儿到出生第 5 天时, 其总的血清胆固醇浓度为 147mg/100ml, 其粪便中 *E. coli* 的数量要高于乳杆菌。在这些婴儿的饮食中添加碳酸盐或者乳酸菌可以使这两种细菌的比例逆转, 与此相连的是在随后的三天内, 血清胆固醇降低, 平均值为 119mg/100, 当血清胆固醇水平较低时, 粪便中乳酸菌占优势地位, 它们可能在胆固醇代谢中扮演着重要角色。

Harrison 对一种含有 *Lb. acidophilus* 和 *Lb. bulgaricus* (Lactinex®) 的市售乳酸菌片剂对人血清脂蛋白水平的作用进行了一项双盲调查。总共 354 名非固定、未告知的试验者参与了试验, 每人每次服用一片含两种乳酸菌 ($>2 \times 10^6$ cfu/片) 的片剂或安慰剂, 每天四次, 采用 Wilcoxon 配对秩检验的方法对配对的数据进行分析。结果表明, 在接受安慰剂或乳酸菌片剂的试验人群中, 血清脂蛋白浓度的变化不存在显著差异, 两组试验者 LDL 胆固醇水平之间的差异无统计学显著变化。两组受试人群在两个试验阶段内, HDL 胆固醇的水平都增加了 1.8~3.0mg/L。对安慰剂受试者而言, 根据 Wilcoxon 配对秩检验的结果, 在第一阶段该人群总胆固醇水平出现显著增加 (从 208.0 升至 215.0mg/L, $P < 0.001$), 但如果采用两样本学生 *t* 试验进行分析, 则不存在上述差异; 对接受乳酸菌的试验组而言, 在两个试验阶段中, 总胆固醇水平未出现显著的变化。心脏风险因素 (总胆固醇/HDL 胆固醇之比) 在试验过程中未发生改变。在不给予乳酸菌或安慰剂的情况下, 与剧烈运动后休息 15 分钟以后的脂蛋白水平相比, 剧烈运动后的脂蛋白水平立即上升。对控制样本进行分析和再分析获得的结果相同 (变异系数为 1.6%), 因此, 有关的分析结果 (胆固醇水平、脂蛋白浓度) 是非常可靠的。基于以上分析, 一天四次服用市售含 2×10^6 cfu/片 *Lb. acidophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 的乳酸菌片剂对改变血清脂蛋白浓度没有任何作用。

在一项公开标签、固定剂量的临床研究中, Mohan 研究了口服 *Lactobacillus sporogenes* (已归入 *Bacillus coagulans*) (3.6×10^8 孢子/天/人) 对 17 名 (男性 15 名, 女性 2 名, 平均年龄 45.6 岁) II 型高脂血症患者短期的降血脂作用。在为期三个月的实验中, 患者总胆固醇 (从 330 ± 55 mg/100ml 降至 226 ± 46 mg/100ml, $P < 0.001$) 和低密度脂蛋白胆固醇 (267 ± 58 mg/100ml 降至 173 ± 54 mg/100ml, $P < 0.001$) 水平显著降低, 而高密度脂蛋白胆固醇水平则明显提高 (43.6 ± 7 mg/100ml 上升至 46.8 mg/100ml, $P < 0.05$), 血清甘油三酯的浓度则没有变化。在接受上述治疗方案后, 总胆固醇/HDL 胆固醇及 LDL 胆固醇/HDL 胆固醇比例显著地降低 ($P < 0.001$), 未观察到副作用。在接受治疗过程中, 尽管患者血清脂类浓度的变化情况与总胆固醇及 LDL 胆固醇的变化保持一致, 但血清甘油三酯和 HDL 胆固醇则不存在这种关系。

五、抗高血压作用

(一) 动物实验

到目前为止, 对益生菌抗高血压作用的研究主要来自于两方面: 一是少数特定的菌株如 *Lb. casei*, *Lb. helveticus* CP790 等在以乳为基质的环境中生长时, 通过胞外蛋白酶的作用将乳蛋白中特定的组分分解 (主要是 β -酪蛋白), 产生多种对血管紧张素 I-转化酶 (ACE) 具有抑制作用的小肽和寡肽。在这些 ACE 抑制肽中, 以 *Lb. helveticus* 和 *Saccharomyces cerevisiae*

共同发酵产生的两种三肽，即 Val-Pro-Pro 和 Ile-Pro-Pro 在体内的抗高血压作用最为显著；二是部分特定益生菌成分，主要是细胞壁中的肽聚糖成分，如 *Lb. casei shirota* 的细胞自溶后获得的细胞裂解物 (LEX) 对于 SHR (自发性高血压大鼠) 的收缩压有显著的降低作用，而且这种降压作用表现出来剂量效应 (表 2-7)。

表 2-7 *Lb. casei shirota* 细胞裂解物 (LEX) 单次饲喂对 SHR 收缩 (SBP) 的作用

LEX 的剂量	SBP(mmHg)			
	饲喂前	饲喂后 6 小时	12h	24h
0(对照组)	180±1	181±1	180±1	179±1
1mg/kg	179±1	180±2	176±2	179±1
10mg/kg	182±1	168±1 * (P<0.05)	167±32 * * (P<0.01)	172±2 * * (P<0.01)

注：SBP 的变化采用可调式血压计采用尾环法测量。

Sawada 等对 *Lb. casei* 细胞壁成分进一步分离纯化后，发现其对 SHR 的降压作用来自于细胞壁中的多糖-糖肽聚合物 (SG-1)。这种多糖-糖肽聚合物 (SG-1) 对 SHR 和 RHR (肾性高血压大鼠) 具有明显的降压作用，其对 SHR 和 RHR 收缩压降压的幅度 (10~20mmHg) 与单次口服 SG-1 的剂量有关，而且，在单次口服 SG-1 6~12 小时后，SHR 和 RHR 收缩压的可下降 10~20mmHg，这种降压作用呈现出一定的剂量效应 (表 2-8)。这种降压作用在饲喂载灌服 24 小时后逐渐消失，SHR 或 RHR 的 SBP 恢复到原有水平。口服 SG-1 对小鼠的心率无影响，也没有发现对正常血压大鼠 (NTR) 产生降压作用。

表 2-8 *Lb. casei* 细胞壁成分 (SG-1) 对 SHR 和 RHR 收缩压的影响

SHR-1 饲喂剂量	SBP 的变化 (mmHg)			
	饲喂前	饲喂后 6 小时	12 小时	24 小时
SHR				
0(对照)	182±2	178±2	179±1	179±2
1mg/kg	188±1	170±1 ^c	170±3 ^b	179±2
10 mg/kg	181±1	167±2 ^c	166±2 ^c	172±2 ^a
RHR				
0(对照)	200±7	196±7	193±7	199±8
1mg/kg	201±6	186±7 ^a	183±5 ^a	195±7
10mg/kg	196±11	182±10 ^a	178±8 ^b	184±9

注：a. 显著性变化， $P<0.05$ ；

b. 显著性变化， $P<0.01$ ；

c. 显著性变化， $P<0.001$ 。

Yamamoto 等发现 *Lactobacillus helveticus* CP790 的胞外蛋白酶水解 α_1 -酪蛋白和 β -酪蛋白后产生多种对 ACE 具有强烈抑制作用的寡肽，其 IC_{50} 从 $4\mu M$ 至 $1000\mu M$ ，给 SHR 按 75mg 肽/kg 体重的剂量一次性口服这种水解物 4、6、8、10 小时后，SHR 的收缩压显著下降，分别为 29.8 ± 8.9 、 27.6 ± 4.8 、 25.2 ± 8.3 、 21.4 ± 12.3 mm Hg 柱，而对照组 (酪蛋白组) 及酪蛋白胰蛋白酶水解组则无此作用；利用 *Lactobacillus helveticus* CP790 发酵的方法也得到类似的抗高血压作用，而利用胞外蛋白酶缺失的突变株 *L. helveticus* CP791 制备的发酵乳则没有降压效果。因此，*Lactobacillus helveticus* CP790 的降压作用与其胞外蛋白酶有关。值得注意的是，在所获得的 ACE 抑制肽中，抑制效果最强的一种氨基酸残基数达 27 的小肽 ($IC_{50}=4\mu M$)，是非常罕见的。

(二) 临床试验

Hata 等在一项设有安慰剂对照组的人体试验中，研究了 Calpis 酸奶对 30 名老龄高血压

患者的降压作用，他们中的大部分都需用药物治疗，该发酵乳是由 *Lactobacillus helveticus* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 发酵的，这些患者被随机地分为两组，一组每天饮用上述发酵乳 95ml，另一组则饮用相同体积的人工调配酸化奶作为安慰剂，连续八周。在酸奶组中，经过 4 周及 8 周以后，血管收缩压显著降低，降低幅度为 $9.4 \pm 3.6 \text{mgHg}$ (平均值 ± 方差, $P < 0.05$) 和 $14.1 \pm 3.1 \text{mmHg}$ ($P < 0.01$)；到第八周时，酸奶组的舒张压同样显著地降低，降低幅度为 $6.9 \pm 2.2 \text{mgHg}$ ($P < 0.01$)，在安慰剂组中则没有观察到血压的显著变化，酸奶组的收缩压和舒压的下降要明显比安慰剂组大。这两种试验组之间的差异主要在于酸奶组中含有 Ile-Pro-Pro 和 Val-Pro-Pro，这两种三肽在体外具有较强烈的 ACE 抑制作用及 SHR (自发性高血压大鼠中) 具有明显的抗高血压作用。其他的一些指标，如心率、体重和部分血清指标在两组之间无明显的差异。

Kawase 等利用 *Lactobacillus casei* TMC0409 和 *Streptococcus thermophilus* TMC1543 制备的发酵乳给健康男性食用 4 周后，不仅能显著降低其收缩压，而且能降低血液中总胆固醇水平、增加高密度脂蛋白水平 ($P < 0.05$)；而以发酵的底物为安慰剂的对照组则不表现上述变化。此外，部分乳酸菌的菌体成分，如 *Lb. casei* YIP9018 的细胞壁组分亦具有抗高血压作用，在设有安慰剂对照组的情况下，对 28 位高血压患者口服 *Lb. casei* YIP9018 的细胞抽提物干粉 (非活菌制剂)，然后测定受试者收缩压、舒张压及心跳频率的变化，虽然变化幅度不大，试验组三项被测指标均有显著降低。

在另一项抗高血压的临床早期研究中，Seppo 等采用双盲法研究了 *Lb. helveticus* LBK-16H 发酵酸奶对中等高血压人群的降压作用。17 名中等血压患者被随机分为两组，无人服用抗高血压药物。这些人群的分组及主要指标如表 2-9 中示，实验组每人每日饮用 150ml 由 *Lb. helveticus* LBK-16H 的酸奶 (其中 IPP 含量 $10 \sim 15 \text{mg/L}$, VPP $20 \sim 25 \text{mg/L}$)，而安慰剂组则给予 150ml 调酸乳 (不含 IPP 及 VPP)。试验分三个阶段，适应期 (4 周)、治疗期 (8 周) 和跟踪期 (4 周)，经过 8 周的治疗后，实验组收缩压的下降幅度要明显大于对照组 ($-10.1 \pm 2\% \text{ Vs } -2.8 \pm 2.9\%$)，两组之间的差异为 -7.3% (95% 置信区间, $-14.6 \sim 0.02 \text{mmHg}$, $P = 0.05$)；实验组舒张压的降低幅度也大于安慰剂组 ($-9.4 \pm 2.3\% \text{ Vs } -2.1 \pm 2.4\%$)，两组之间的差异为 -7.3% ($-14.6 \sim 0.03$, $P < 0.05$)。如果以血压绝对值 (mmHg) 来统计以上的变化，得出的结论是一样的。在经过 8 周治疗后，实验组心率 (74 ± 4) 与安慰剂组 (70 ± 4) 无显著差异；而体重指数 (BMI) 在整个治疗过程中几乎保持不变，而安慰剂组 BMI 下降了 0.7kg/m^2 ；经过四个星期的跟踪期以后，实验组的血压水平逐渐恢复到试验前的水平，到跟踪期末，两组的血压变为一样。Seppo 等得到的结论是 *Lb. helveticus* LBK-16H 发酵乳可作为高血压治疗一种潜在的有效途径。

表 2-8 实验组与安慰剂组高血压患者的主要指标 (平均值 ± 方差)

	实验组 (n=10)	对照组 (n=7)		实验组 (n=10)	对照组 (n=7)
性别 M/F	3/7	2/5	收缩压/(SBP, mmHg)	148 ± 4	148 ± 5
年龄/岁	49 ± 2	46 ± 5	舒张压/(DBP, mmHg)	94 ± 2	93 ± 1
体重指数/(BMI, kg/m^2)	27.3 ± 0.7	27.0 ± 2			

在益生菌对人体健康众多的调节作用中，仅有抗高血压作用是与其菌体成分和 (或) 其代谢产物相关，并不要求菌体以活细胞到达体内，这一点尤其令人感兴趣。

六、预防糖尿病

糖尿病依据其发病的机理，可大致分为胰岛素依赖型和非胰岛素依赖型的两种类型。

Lb. casei LC9018 在小鼠体内对两种类型的糖尿病均有预防发生的作用。

最近, Matsuzakai 等研究了 *Lb. casei* LC9018 对一种非胰岛素依赖型糖尿病模型 KK-A_Y 小鼠体内的抗糖尿病作用。给 4 周大的 KK-A_Y 雄性小鼠口服 LC9018 或采用含有 0.05% LC9018 的饲料进行饲养, 在喂养到鼠龄为 8~10 周时, 与对照组相比, 实验组小鼠血浆葡萄糖浓度显著降低, 尽管两组小鼠每日的进食量几乎相同, 但采用 LC9018 饲养的小鼠体重较轻。对脾细胞膜表面标记进行表型分析时发现, 到第 12 周时, 由于口服 LC9018, CD4⁺T 细胞数量的增长被显著地抑制, 细胞因子的表达, 尤其是 γ -INF τ 和 IL-2 的表达, 在口服 LC9018 的小鼠中也被抑制。口服 LC9018 的实验组小鼠血浆胰岛素浓度低于对照组, 而且其对红细胞的结合能力要高于对照组体内的胰岛素。此外, Matsuzaki 还研究了 LC9018 对四氧嘧啶在 7 周大的 BALB/c 品系小鼠诱发糖尿病的影响。在小鼠的饮食中添加 0.1% 或 0.05% 的 LC9018 或灌喂 LC9018 可显著地减少由于静脉注射四氧嘧啶而引起的糖尿病致病几率, 在给予 LC9018 的小鼠血浆中葡萄糖的浓度略低于对照组。

病理分析显示, 由四氧嘧啶诱发的兰氏 (Langerhans) 小岛中分泌胰岛素的 β -细胞的消失作用被强烈地抑制。该研究同时表明, 在给予 LC9018 的小鼠体内, 血清 NO 的浓度维持在正常水平, 而在对照组内, 由于四氧嘧啶的作用导致血清 NO 的浓度上升。此外, LC9018 对胰岛素依赖型糖尿病的作用也在另一种非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠得到研究。从鼠龄 4 周开始, 雌性 NOD 小鼠被喂以标准实验食物 ($n=12$) 或在标准实验食物中添加 0.05% 经过热灭活的 LC9018 菌体 ($n=12$), 然后观察糖尿病的发病情况; 结果表明, 对照组糖尿病的发病率 (10/12) 要远远高于给予 LC9018 的实验组 (3/12) ($P<0.01$) (表 2-10)。以上结果表明给小鼠口服 LC9018 可降低其血浆葡萄糖水平及调节宿主的免疫反应。

表 2-10 *Lb. casei* LC9018 在动物体内对糖尿病的预防作用

实验模型	发病率 ^①	血浆葡萄糖水平 ^② /mg/L	血浆胰岛素 ^③ / μ U/ml
KK-A _Y ^④			
对照		566 \pm 70	106 \pm 25
LC9018		260 \pm 105	24 \pm 4
NOD ^⑤			
对照	83	463 \pm 254	ND
LC9018	25	116 \pm 4	ND
Alloxan ^⑥			
对照	100	532 \pm 81	ND
LC9018	40	366 \pm 84	ND

① 糖尿病症状的诊断以尿糖存在为依据;

② 血浆葡萄糖水平和胰岛素水平在 12 周 (KK-A_Y) 或 30 周 (NOD) 或 Alloxan 处理 15 天以后测量;

③ 纯种的无特定致病菌 (SPF) 雄性 KK-A_Y 小鼠是一种非胰岛素依赖型糖尿病模型, 从其 5 周开始, 每周口服 5 次 (每次 2mg/鼠) *Lb. casei* LC9018 的菌体, 连续 8 周;

④ 纯种的无特定致病菌 (SPF) 雌性 NOD 小鼠是一种胰岛素依赖型糖尿病模型, 从第 5 周开始试验组给予含有 0.05% 热灭活的 *Lb. casei* LC9018 的标准饮食;

⑤ 年龄为 7 周纯种的 SPF 雄性 BALB/c 小鼠给予 70mg/kg Alloxan 静脉注射后, 试验组连续 15 天给予含有 0.05% 热灭活的 *Lb. casei* LC9018 的标准食物。

七、益生菌对免疫功能的调节作用

人体受到外来抗原刺激后, 会产生级联放大的免疫反应, 包括启动抑制致病菌的保护性反应和抑制抗原活性或微生物的繁殖。不适当的免疫反应会造成对健康的严重危害, 过敏或炎症反应即是最明显的例证, 衰老、某些疾病或可造成免疫抑制的治疗均可引起机体免疫力

下降。由于多数益生食品是针对免疫力正常的健康人群，其功效如何还不确切，值得进一步研究。

由口腔-胃-肠组成的消化道是外来抗原（致病菌、无害细菌或食物中其他抗原）与黏膜表面作用的主要部位，正常成人消化道黏膜的表面积可达 300m^2 ，是人体与环境接触面积最大的部位，与消化道相关的淋巴组织（GALT）将消化道变为人体内最大的免疫器官。据估计，每米小肠内存在 10^{10} 个可产生免疫球蛋白的细胞，约占人体所有产生免疫球蛋白细胞的 80%。因而消化道不同部位的免疫细胞可激发多种免疫反应，益生菌对免疫功能的调节作用正是通过此种机理而实现的，尽管部分乳杆菌和双歧杆菌属细菌在不同程度上被认为是免疫刺激剂或“生物反应调节剂”，有关益生菌对人体免疫功能的调节作用可参阅相关的综述。对部分采用体外试验或非口腔途径获得的有关结论需谨慎对待，而动物试验及人体试验可提供有关由益生菌引起的免疫反应的类型及程度的基本认识（表 2-11）。从这些研究可看出，益生菌通过激活巨噬细胞可提高非特异性及特异性免疫反应、自然杀伤细胞活力，增强细胞因子（cytokine）表达水平，促进免疫球蛋白特别是分泌性的 IgA 的表达。而且益生菌的活细胞、死细胞或其发酵产物均具有调节免疫功能的作用，重要的是益生菌在表现出对免疫功能有正调节作用的同时，尚未发现有有害的炎症反应。

表 2-11 益生菌产品或酸奶在免疫功能低下人群中引发的免疫作用

经试验的产品	观察到的效果
由 <i>Lactobacillus johnsonii</i> La-1 发酵制成的发酵乳 (10^8 /天或 10^9 /天)	吞噬活性增强及周围淋巴细胞间歇式增高, 剂量为 10^8 /天时, 效果未观察到
酸奶(ST 和 LB 各 10^{11} /天); 对照组: 牛奶	酸奶组骨髓细胞 2'-5' 腺核苷酸合成酶(是一种稳定的 IFN 指征)活性增强, 对 INF- γ , IL- β , 或 TNF- α 的表达没有影响
含 <i>Lactobacillus</i> GG 的胶囊(剂量未注明); 安慰剂: 蔗糖	血清中 IgA 与 <i>Salmonella typhi</i> 脂多糖疫苗的反应增强(辅助免疫)
含 <i>Lactobacillus</i> GG 的粉状胶囊 (5×10^{10}); 安慰剂: 微晶纤维素	针对旋病毒疫苗的分泌 IgM 的免疫细胞数增高
发酵乳(其中 <i>Lactobacillus casei</i> Shirota 10^{11} /天); 对照组: 牛奶	对 NK 细胞活性、吞噬作用或细胞激动素的表达没有影响
由 <i>L. johnsonii</i> La1 (7×10^{10}) 或 <i>B. bifidum</i> Bb12 (10^{10}) 制成的发酵乳, 未设安慰剂对照组	对淋巴细胞的分化没有影响, 但与未摄食发酵乳前相比, 对 <i>E. coli</i> 的吞噬活性增强
含 <i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>coagulans</i> 的片剂, 活菌或经热处理杀死; 试验剂量: 1, 5, 3 或 6×10^{10} /天	3 或 6×10^{10} /天活菌试验组 α INF 表达增强
酸奶(ST 和 LB 各 10^{11} /天); 对照组: 牛奶	骨髓细胞 2'-5' 腺苷酸合成酶活性增强
由 <i>L. johnsonii</i> La1 和 <i>Bifidobacterium</i> 制成的发酵乳(试验剂量: $4 \times 10^9 \sim 10^{10}$ /天); 对照组: 不含发酵制品的食品	血清中 IgA 与 <i>Salmonella typhi</i> 脂多糖疫苗的反应增强(免疫辅助)
酸奶(试验剂量, ST+LB 3×10^{12} /天)	血清 INF- γ 表达增强, B 淋巴细胞及 NK 细胞分化增强
<i>Lactobacillus</i> GG ($2 \times 10^{10} \sim 11$)	被旋病毒感染婴儿体内分泌针对旋病毒的特异性 IgA 的细胞数增加
<i>Lactobacillus</i> GG 制剂(试验剂量: 2×10^{10} /天)	分泌 IgA 的淋巴细胞数增加, 对 Crohn 氏综合症临床患者无作用
<i>Bifidobacterium lactis</i> 制剂	IgA 表达增强

有关口服某些来自于肠道菌群的微生物制剂后能预防疾病或促进免疫系统功能的研究报道越来越多。这些益生菌所提供的保护作用可能主要归功于益生菌所引起的“定殖障碍”(CR)，定殖障碍原来用于描述消化道菌群的多样性以及由这种多样性引发的对外来微生物在消化道中定居、繁殖的阻碍作用。定殖障碍现在更多地用于描述某种(些)细菌抑制其他

种类细菌定殖的作用或过程，如营养和吸附位点的竞争、改变环境的 pH 值、产生细菌素或其他抗菌肽等。这种定殖障碍构成了一种强烈的黏膜屏障作用，从而阻止致病菌的吸附和入侵。因此，通过摄食益生菌提高消化道的定殖障碍功能是一种预防和治疗感染性疾病的潜在方法。例如，在体外模型中，*Lb. acidophilus* LA1 可以抑制肠道致病菌如肠毒性 *E. coli*，肠道致病性 *E. coli* (EPEC) 或 *S. typhimurium* 对上皮细胞或黏膜的吸附，以及 EPEC、*S. typhimurium* 或 *Yersinia pseudotuberculosis* 对上皮细胞的侵染，*Lb. rhamnosus* GG 等也有相似的作用。在乳杆菌培养物的无细胞上清液中，由于乳杆菌代谢终产物的存在也能抑制致病菌的黏附或入侵。双歧杆菌在体外能抑制多种致病菌的生长，很显然这些机理在体内也可能发挥作用。在免疫缺陷的小鼠中，单次给予具有益生作用的 *Lb. rhamnosus* 或 *B. animalis* 就可以部分抑制 *Candida albicans* 在这种免疫缺陷的小鼠肠道内定殖，从而预防系统性真菌感染的发生。具有益生作用的乳杆菌还能减少小鼠体内沙门氏菌的数量，防止 *H. pylori* 感染的发生。发生腹泻时，肠道菌群的组成出现明显的改变，尤其突出的是，双歧杆菌、乳杆菌和拟杆菌的数量减少，而大肠菌群的数量上升。因此向肠道菌群补充益生菌可促进腹泻的愈合，例如，目前研究较系统的 LGG，该菌是从人粪便中分离的，可以促进多种腹泻的康复，包括抗生素治疗或轮转病毒引起的腹泻。益生菌对腹泻的预防或治疗作用主要来自于其能改变肠道菌群的组成，对于小猪而言，如果从其出生开始每日喂食乳杆菌可减少其粪便中大肠菌群的数量，在其粪便中乳杆菌/大肠菌群 1280 : 1；在没有喂食乳杆菌的小猪中，这上比例为 2 : 1 其结果是乳杆菌/大肠菌群之比提高后小猪的痢疾发病率降低，不易受肠道致病性 *E. coli* 的侵染。

除了障碍致病菌定殖，益生菌还能强化上皮组织的屏障功能，从而防止致病菌在上皮组织内的转位。疾病和创伤，包括轮转病毒感染、发炎性肠道疾病 (IBD) 或放射治疗会增加小肠的通透性，从而增强食物或黏膜抗原的转位，导致上皮组织屏障作用的降低。在正常情况下，抗原通过上皮组织的转移过程要么是经过溶酶体途径，其结果是产生一些低抗原性的小肽，要么是上皮组织内或上皮组织间完整蛋白质分子的转位。这一途径比较少见但可以引发特异性免疫反应。因此，当由于疾病或创伤增加了小肠的通透性以后，具有免疫原性的蛋白质分子通过在上皮组织的转位，可引发局部发炎反应，甚至是自我免疫性的 IBD。益生菌可促进上皮组织的修复。例如，口服 *Lb. acidophilus* 可缓解正在进行骨盆放射治疗患者的腹泻症状，其原因可能是防止辐射对肠上皮组织损伤。在吮乳的大鼠中，如果在乳中添加 *Lb. rhamnosus* GG 的话，由牛乳蛋白引导的肠通透性增强以及由此产生的完整蛋白质分子转位的问题可以得到纠正（即减少由牛乳蛋白引起的过敏症）。

有关人或动物口服益生菌后，益生菌对人或动物产生的直接免疫刺激报道目前还有争议，焦点之一是尽管有关益生菌刺激免疫功能的研究成果以通讯或会议摘要形式公布的有很多，但很少在顶级刊物上发表，而这些刊物通常只发表在临床试验中益生菌作用比较稳定、统一的研究成果；而且大多数目前被认为是由益生菌直接通过免疫调节或定殖障碍作用产生的保护作用的研究结论要么来自于有争议的动物试验（例如益生菌采用腹腔注射），要么来自于体外实验。

（一）益生菌对非特异免疫功能的促进作用

在小鼠腹腔注射乳杆菌可增强巨噬细胞激活，提高自然杀伤细胞活力。部分乳杆菌和双歧杆菌菌株还能增强小鼠外周血液中单核细胞以及组织培养巨噬细胞对 TNF- α ，IL-4 和 IL-10 的表达，然而，区分发炎和免疫作用非常重要，发炎的特征是局部白细胞、体液和血浆

蛋白的聚集，而免疫作用则通过免疫记忆能阻止某种感染的发生，两者有天壤之别，使介导发炎的因子强化并不是益生菌的必要特征。

例如单核细胞增生对血液中 G^+ 细菌存在时产生的发炎性细胞因子可能引起致命感染休克；在剂量较低时， G^+ 细菌的细胞壁可诱导自发性关节炎。而且，因为土著菌群通常而言，不存在于体内血液循环系统或腔腹中，因而这种采用腹腔注射方法所获得的结果是在一种非正常生理条件下取得的将其作为由益生菌介导的对免疫功能的促进作用尤其需要慎重。

不过，有关益生菌对免疫系统间接促进作用的研究确实取得了令人鼓舞的结果，尤其是口服 *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* 或 *B. bifidum* Bb-12 后能增强巨噬细胞的吞噬作用，而且在口服 *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* 或 *L. delbrueckii* supsp. *bulgaricus* 后巨噬细胞对溶解性酶类的表达增强。此外，食用含有益生菌的酸奶可提高自然杀伤细胞的活力。

益生菌对上皮细胞的防御功能也有促进作用。在培养人源肠上皮细胞 H-29 时，如果使之接触 *Lb. johnsonii* LJ1 或 *Lb. acidophilus* LA10 可诱导 H-29 产生多种细胞表面标记分子，包括与淋巴细胞黏膜有关的分子 (CD54)，细胞程序死亡因子 (CD95) 和抗原决定簇 (MHC 族 II)，但仅有在共同培养时，才产生 IFN- γ 。将 H-29 与 *Lb. johnsonii* LJ1 或 *Lb. acidophilus* LA10 共同培养时，无论 IFN- γ 是否存在并不改变 H-29 对产生原发性因子 IL-8、TNF- α 、GM-CSF 或 MCP-1 的 mRNA 的表达，尽管一株非致病性 *E. coli* 菌株确实能使产生上述原发性因子的 mRNA 的表达增强。在上述研究中 IFN- γ 的存在之所以重要，因为在体外实验中发现部分益生菌结合到淋巴细胞后可促进细胞因子的释放；而体内试验表明，部分病人在口服大剂量的 ($>10^{12}$ cfu/d) *Lb. bulgaricus* 与 *S. thermophilus* 后可表现出血清 IFN- γ 的表达。B 细胞和 NK 细胞数临时性升高的现象。尽管尚未证实乳杆菌能降低上皮细胞表达 IL-8，不过 *Lactobacillus salivarius* 黏附到胃上皮细胞后确实能阻碍胃上皮细胞因 *H. pylori* 感染而诱导的 IL-8 的表达，其原因可能是 *Lb. salivarius* 能阻止 *H. pylori* 与上皮细胞的结合。

已经证实益生菌同样能刺激与获得性免疫相关的功能，包括激活淋巴细胞与刺激抗体产生，益生菌促进免疫功能的主要机理之一是充当免疫辅剂的角色。免疫辅剂与特异性抗原同时使用时能提高机体的免疫反应，例如当喂以牛乳蛋白时，*Lb. rhamnosus* 能增加 Crohn's 综合症患者体内针对 β -乳白蛋白和酪蛋白的特异性 IgA 的表达，以及增加吮乳期大鼠体内针对 β -乳白蛋白的抗体浓度。当人发生轮病毒侵染时，LGG 还能提高血清中针对轮病毒的 IgA 的滴度，在那些口服经过高温灭菌的 LGG 的患者体内则无此作用。当小鼠被羊红细胞 (SRBC) 致敏时，*Lb. casei* 或 *Lb. acidophilus* 能增加小鼠体内 IgM 的浓度。最后，小鼠被减毒的 *Salmonella typhi* 感染后，如果食用含有 *Lb. acidophilus* La1 和 *B. bifidum* Bb12 发酵乳时，小鼠体内针对 *S. typhi* 的血清总 IgA (分泌型) 水平均升高。

益生菌能发挥免疫佐剂的原因之一可能是其细胞壁成分在发挥作用，细菌的细胞壁成分经常被加入到抗原中用来增强机体对疫苗的反应原性。弗氏完全佐剂的主要活性成分之一是胞壁酰二肽 (MDP)，这种 MDP 不仅仅存在于分枝杆菌的细胞壁，还存在于其他多种细菌细胞壁的肽聚糖之中，口服来自于 *B. longum* 的 MDP 或其经过溶菌酶处理的细胞碎片可增加豚鼠体内抗体的滴度。而且，给豚鼠口服能分解细胞壁肽聚糖的酶，如溶菌酶或蛋白酶能增加小鼠血清中针对 B 型肝炎病毒表面抗原的抗体滴度以及 DTH 反应。由于在宿主的胃肠道中存在内源性溶菌酶的分泌，因此在本节前而提及的小鼠单次接触益生菌后可促进其免疫功能的发育，在一定程度上可能来自于这些细菌被裂解后的碎片引起的免疫辅助作用。

给小鼠喂食乳酸菌能促进其体内淋巴细胞的增殖。研究表明,给小鼠同时感染 *C. albicans* 和 LGG 或 *B. animalis* 后,其体内针对 *C. albicans* 的 T-细胞增殖反应要远比小鼠单独感染 *C. albicans* 时强烈。不过,人类志愿者在食用含有 *Lb. acidophilus* La1 或 *B. bifidum* Bb12 的发酵乳以后,尽管体内巨噬细胞对 *E. coli* 的吞噬作用增强了,但淋巴细胞的组成却不发生改变。

(二) 益生性乳酸菌的免疫调节功能

机体的免疫系统由多种器官和不同类型的细胞组成,这些细胞在受到抗原的刺激后,被激活的免疫细胞会产生一系列细胞性免疫反应和由抗体所介导的体液免疫反应,细胞性免疫反应可被黏附性分子所增强,被激活的淋巴细胞会释放多种细胞因子,这种复杂的细胞免疫反应诱导了系统免疫反应。如果抗原是通过口腔途径进入体内,那么机体还会产生由分泌型 IgA (sIgA) 所介导的分泌型免疫反应。T 细胞和 B 细胞数量的多少、细胞因子的定性或定量测量、抗体浓度以及免疫细胞功能的变化(例如吞噬功能)是用来估评机体免疫状态常用的指标,益生菌,尤其是益生性乳杆菌和双歧杆菌对系统免疫反应以及分泌型免疫反应的作用最近几年受到广泛的研究,其对机体的免疫调节作用包括:防止肠道感染,作为口服免疫佐剂,在营养不良人群中作为免疫激活剂以及预防由化学物质引起的肿瘤等,乳酸菌对宿主免疫系统的各种调节作用见表 2-12。

表 2-12 益生性乳酸菌在体内对免疫的调节作用

功 能	乳 酸 菌	参 考 文 献
由多型核白细胞(PMNLs)和单核细胞诱导的粒细胞肿	<i>Lb. plantarum/Lb. brevis</i>	Bloksma, et al., 1979
诱导腹腔渗出物的自然杀伤细胞活性	<i>Lb. plantarum</i>	Bloksma, et al., 1981
促进鼠淋巴细胞分裂	<i>Lb. casei</i>	Shimizu, et al., 1981
诱导腹腔渗出物的(瘤)细胞抑制活性	<i>Lb. casei</i> LC9018	Kato, et al., 1983
增强体液免疫中抗体的表达	<i>Lb. casei</i>	Saito, et al., 1983b
延缓型超敏反应	<i>Lb. casei</i>	Saito, et al., 1983b
增强自然杀伤细胞活性	<i>Lb. casei</i> LC9018	Kato, et al., 1984
促进腹腔巨噬细胞(MP)/Kupffer 细胞产生氧游离基	<i>Lb. casei</i> LC9018	Hashimoro, et al., 1984
促进肝内固化的巨噬细胞产生氧游离基	<i>Lb. casei</i> LC9018	Hashimoro, et al., 1984
诱导 MP 从血液向网状内皮系统转移	<i>Lb. casei</i>	Sato, et al., 1983
诱导活化的 MP 产生杀瘤细胞活性	<i>Lb. casei</i> LC9018	Kato, et al., 1985
激活 T 细胞,诱导细胞毒 T 细胞的产生	<i>Lb. casei</i> LC9018	Kato, et al., 1985
诱导肿瘤特异性体液和细胞免疫	<i>Lb. casei</i> LC9018	Yasutake, et al., 1985
诱导 Kupffer 细胞产生细胞毒因子	<i>Lb. casei</i> LC9018	Hashimoro, et al., 1985
增强鼠的造血机能	<i>Lb. casei</i> LC9018	Yokokura, et al., 1986
在 M-CFC(巨噬细胞-集落形成细胞)增殖过程中调节髓细胞的分化	<i>Lb. casei</i> LC9018	Nanno, et al., 1986
激活鼠淋巴细胞	<i>Lb. casei/Lb. bulgaricus</i>	Perdigon, et al., 1986
提高单核细胞的吞噬活性	<i>Lb. casei/Lb. Lb. plantarum</i>	Zaitseva, et al., 1986
增强腹腔 MP 的酶活/吞噬活性	<i>Lb. acidophilus/S. thermophilus</i>	Perdigon, et al., 1987
提高网状内皮系统的吞噬功能	<i>Lb. acidophilus/S. thermophilus</i>	Perdigon, et al., 1987
激活肝和腹腔巨噬细胞	<i>Lb. casei</i>	Sato, et al., 1988a
增加血清中集落刺激因子(CSF)的表达	<i>Lb. casei</i> LC9018	Nanno, et al., 1988
激活肠道黏膜免疫功能	<i>Lb. casei/Lb. acidophilus</i>	Perdigon, et al., 1988a
体液免疫/延迟型超敏反应	<i>Lb. casei/Lb. acidophilus</i>	Perdigon, et al., 1988b
	<i>Lb. bulgaricus/S. thermophilus</i>	

续表

功 能	乳 酸 菌	参 考 文 献
增强小鼠对 γ -干扰素的表达	<i>Lb. casei</i> LC9018	Suzuki et al. ,1988
	<i>Lb. bulgaricus</i> / <i>S. thermophilus</i>	Pereyra et al. ,1991
	<i>Lb. acidophilus</i>	Kitazawa et al. ,1992
促进细胞毒巨噬细胞原细胞的增殖	<i>Lb. casei</i> LC9018	Nanno, et al. ,1989
增加肠腔中分泌性 IgA 的表达	<i>Lb. casei</i>	Perdigon, et al. ,1991
致敏/引发内源性 α -TNF(肿瘤坏死因子)	<i>Lb. bulgaricus</i> LB51	Davidakova, et al. ,1992
活化单核细胞的吞噬/分泌功能	<i>Lb. bulgaricus</i> LB51	Popova, et al. ,1993
增强鼠腹膜 MP 的吞噬活性	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>B. longum</i>	Hatcher et al. ,1993
有效的口服免疫佐剂	<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	Pouwels, et al. ,1996
加速粒细胞的恢复	LC9018	Furusa, et al. ,1997
刺激 MP 表达 IL-1 和 α -TNF	<i>Lb. acidophilus</i> LA1	Rangavajjala et al. ,1997
抑制抗原诱导、IgE 介导的过敏反应	<i>Lb. casei</i>	Shida et al. ,1998

1. 在动物模型中的免疫调节作用

Bloksma 等研究了乳酸菌的免疫调节作用。当植物乳杆菌作为抗原对同一部位进行注射时, 10^8 个细胞可诱导出最佳的免疫反应。其中, 活的 *Lb. plantarum* 细胞可激发延迟性超敏反应, 而被热灭活的细胞则对抗体的产生具有免疫佐剂的作用。活的 *Lb. plantarum* 细胞或热灭活程度较低的细胞可诱发肝—脾肿大反应, 表明这些细胞能介导由网状内皮细胞所引发免疫辅佐作用。皮下注射活的 *Lb. plantarum* 细胞后, 可观察到单核细胞浸润所形成肿块; 而如果注射的是热灭活的细胞, 则所诱导的肿块中粒细胞和单核细胞的数量中几乎相同。Bloksma 进一步发现, 如果给小鼠腹腔注射 (i. p.) 低剂量 (10^5 个细胞) 的 *Lb. plantarum* 活细胞或热灭活的细胞, 4 天后在其腹腔渗出物中则会引起自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活性的大幅度增加。提高注射的剂量则会使 NK 细胞活性的增加出现剂量效应, *Lb. plantarum* 活细胞或热灭活程度较低的细胞还可以使小鼠腋下淋巴结中的淋巴细胞出现增殖作用。

给 C57BL/6 小鼠腹腔注射 *Lb. casei* LC9018 后, 与正常的腹膜巨噬细胞相比, 注射 *Lb. casei* LC9018 小鼠腹膜巨噬细胞的酸性磷酸酶活力及吞噬活力显著提高, 其腹腔渗出物细胞 (PEC) 对 EL4 细胞的抑制作用也增强了。这些实验结果证明 *Lb. casei* LC9018 可以激活鼠巨噬细胞。此外, 注射 LC9018 (i. v. 或 i. p.) 可以增强近交系的 BALB/c、雄性 C3H/He、CBA/N 和 C57BL/6 小鼠脾细胞的 NK 细胞活力, 这些小鼠的脾细胞对 P815 细胞系不具有细胞裂解作用, 后者对 NK 细胞不敏感。在体外, 如果对这些受到 LC9018 作用的脾细胞进行抗-asialo GM1 抗体及补体处理, 则由 LC9018 所引起的鼠 NK 细胞活性的增强作用完全消失。从注射 LC9018 3 天后的小鼠取出的脾细胞在体外经过抗-Thy1.2 单克隆抗体加补体处理后, 其 NK 细胞活力降至仅受补体处理的脾细胞的 NK 活性的 1/2, 表明在受到 LC9018 处理的小鼠脾脏中存在两群不同的 NK 细胞: 其中一群为 asialo GM1 阳性和 Thy 1 阴性 (asialo GM1⁺ Thy 1⁻); 另一群为 asialo GM1 阳性和 Thy1 阳性 (asialo GM1⁺ Thy 1⁺)。Kato 等也报道 LC9018 可诱导 Ia 阳性的巨噬细胞, 该巨噬细胞群在腹腔中可识别肿瘤抗原, 在体内诱导肿瘤特异性 T 细胞介导的抗肿瘤免疫中起着重要的作用。

在 BALB/c 小鼠中, 腹膜注射 LC9018 (i. p.) 途径还可增强腹膜巨噬细胞产生氧自由基 (OR) 的能力, 抑制其对前列腺素 E2 的表达, 还能观察到小鼠肝内葡萄糖-6-磷酸脱氢

酶活力提高 10 至 20 倍。在体外, 预先与 *Corynebacterium parvum* (CP) 或 LC9018 细胞共培养的 Kupffer 细胞对细胞毒因子 (CTF) 的表达比脾细胞、胸腔巨噬细胞或腹膜巨噬细胞高。通过 i. v. 或 i. p. 途径注射 CP 或 LC9018 可以显著地增强 Kupffer 细胞或腹膜巨噬细胞对氧自由基 (OR) 的产生能力。无论是预先与 CP 或 LC9018 处理, 均未观察到 Kupffer 细胞或腹膜巨噬细胞产生 OR 的能力与其产生 CTF 能力之间存在显著的相关性。因此, 被激活的 Kupffer 细胞可能是血清中 CTF 表达的一个重要来源, 而产生 CTF 的巨噬细胞可能与产生 OR 的巨噬细胞属于不同的细胞群。

Nanno 等研究了 LC9018 在 BALB/c 小鼠中对巨噬细胞集落形成细胞 (M-CFC) 和血清集落刺激活力 (CSA) 的诱导作用。LC9018 能增加足部及脾脏的 M-CFC 活力, 对 M-CFC 和 CSA 的最大促进作用分别在 i. v. 方式注射 LC9018 几天或一周后出现。LC9018 还可以促进 C3H/HeJ, 以及 C3H/HeN 小鼠脾脏 M-CFC 的提高, 与脂多糖 (LPS) 不同的是, 后者在 C3H/HeJ 小鼠体内不具有此种作用。与 LPS 相似的是, LC9018 可诱导血清粒细胞-巨噬细胞 CSA 活性的升高, 以上结果表明, 在调节髓细胞分化时, 至少是在 M-CFC 增殖阶段, LC9018 是以不同于 LPS 的方式进行的。当给正常的小鼠静脉注射热灭活的 LC9018 时, 在脾脏中可诱导 Mac-1⁺ 和 Mac-2⁺ 细胞数量的增加, 而 Mac-3⁺ 细胞数量则不变, 数量增加的两群巨噬细胞随时间变化的曲线是一致的, 都是在注射 LC9018 后第 14 天数量达到最大值。LC9018 可以刺激 M-CFC 的增殖, 但对 GM-CFC 和 CFU-S 的增殖无促进作用。由 LC9018 诱导产生的 M-CFC 与正常的 M-CFC 在对巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 的依赖性及浮力密度方面是一致的。由 M-CFC 衍生的巨噬细胞与 M-CSF 共培养时可表达 Mac-1 和 Mac-2, 但不表达 Mac-3。它们通过直接接触, 对同种来源的肿瘤细胞 Meth A 具有细胞毒作用。这些结果表明 LC9018 能刺激骨髓中细胞毒巨噬细胞的前 (原) 细胞的增殖并诱导它们在脾脏中的分化。

Matsuzaki 等研究了 LC9018 在携带 Meth A 纤维瘤 (Meth A-) 的 BALB/c 小鼠体内的抗肿瘤以及促进细胞因子表达的作用。LC9018 的作用在受到抗 CD-3 或抗 CD-8 抗体处理的小鼠体内被部分抑制, 而在受到抗 CD-4 抗体处理的小鼠体内不受影响。相反, LC9018 对携瘤 Meth A 的 SCID 鼠或裸鼠几乎没有作用。这一结果表明, CD8⁺ T 细胞参与了携瘤小鼠生存期延长的作用。对胸膜注射 LC9018 的 BALB/c 小鼠的细胞因子表达情况进行检查后发现, 小鼠胸腔渗出物中 IFN- γ 和 IL-6 的表达显著增加, 表明胸膜注射 LC9018 可以诱导那些具有激活胸腺巨噬细胞能力或促进胸腺淋巴细胞分化成细胞毒 T 细胞的细胞因子的表达。以上结果表明, 胸膜注射 LC9018 对携瘤小鼠生存期的延长作用依赖于 CD8⁺ T 细胞, 而且可以在胸膜携带 Meth A 瘤的小鼠体内诱导多种细胞因子的表达, 这些细胞可参与随后的免疫应答。细胞流量分析显示, 给经过辐射处理的小鼠注射热灭活的 LC9018 细胞, 可促进外周血液、脾脏以及前肢骨髓中粒细胞群的恢复; 但不产生对淋巴细胞群的恢复促进作用, 与此同时, B 淋巴细胞的恢复作用被抑制, 组织学分析同样显示 LC9018 处理可显著地促进被辐射小鼠脾脏及骨髓内的粒细胞分化。采用相同的 LC9018 处理可以显著提高受到致死剂量全身辐射的无胸腺裸鼠 30 天生存期的比例。受辐射的无胸腺裸鼠在接受 LC9018 处理后, 其外周血液中粒细胞群的恢复过程同样可以加快。这一结果表明, LC9018 对受到致死剂量辐射处理的小鼠的作用在于促进粒细胞而不是淋巴细胞的分化, 从而使小鼠免于骨髓死亡; 同时表明, 被激活的 T 淋巴细胞对于粒细胞分化的促进作用比较小。

口服益生菌对免疫的调节作用受到广泛的研究。在 C57B1 小鼠以及纯种 CDF/F344/Crl

大鼠中，研究了口服或腹膜注射 *Lb. casei* ssp. *casei*、*Lb. plantarum* 和 *Lb. fermentum* 后腹腔渗出物细胞的吞噬功能。吞噬作用通过测定其吸收和外排¹⁴C 标记的伤寒疫苗的能力予评估。在给实验动物施用抗原（伤寒疫苗）4 天前，腹膜注射上述乳杆菌的混合物可使腹胸渗出物细胞吸收和消化伤寒杆菌的能力增加 2 倍；而如果同时注射这些乳杆菌和伤寒疫苗，则腹腔渗出物细胞的吞噬功能降低。连续口服乳杆菌 6 天或 18 天，则腹腔渗出物细胞对被标记伤寒疫苗的吸收和消化作用分别提高了 1.5 倍和 3 倍，而且口服方式使实验动物体内针对抗原的抗体浓度的增加速度更快。

Perdigon 等研究了 *Lb. casei* 和 *Lb. bulgaricus* 在体内对鼠巨噬细胞的激活作用。与对照组小鼠相比，接受乳杆菌处理（i. p. 途径）的小鼠的巨噬细胞的吞噬作用显著地增强，未发现活菌与死细胞之间存在显著的差异。采用碳清除试验所测得的网状内皮系统吞噬功能显示，*Lb. casei* 和 *Lb. bulgaricus* 可以促进小鼠体内的吞噬作用。给瑞士小鼠喂饲 *Lb. acidophilus* 和 *S. thermophilus* 活菌的试验表明，这两种乳酸菌能明显地改变小鼠的免疫功能。这两种乳酸菌都能显著地提高腹膜巨噬细胞的酶及吞噬活力，并增强网状内皮系统的吞噬功能。这两种乳酸菌还可以增强淋巴细胞活力，而且无论是采用口服或腹膜注射方式，所引发的免疫增强作用是相似的。Perdigon 还研究了由 *Lb. casei*、*Lb. acidophilus* 或两者的混合物所制备的发酵乳对瑞士小鼠特异性及非特异性宿主防御机制影响，给小鼠连续喂食发酵乳 8 天后（100 μ g/d）。小鼠体内吞噬细胞及淋巴细胞的活性都出现增高，在喂食后第 3 天观察到这种免疫激活的作用，第 5 天达到高峰，到第 8 天时出现轻微的下降。给小鼠喂食发酵乳，未观察到肝肿大或脾肿大的现象。研究者认为，*Lb. casei* 和 *Lb. acidophilus* 在吸附到小肠黏膜后，可以活化和刺激免疫系统。此外，口服或皮下注射 *Lb. casei*、*Lb. acidophilus*、*Lb. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 对体液中抗体的表达以及对羊红血细胞（SRBC）的延迟超敏反应也被研究。当使用的剂量为 6×10^9 细胞时，实验动物体内初级细胞性以及体液免疫应答作用达到最大。如果给被 SRBC 致敏的小鼠喂以 *Lb. casei*、*Lb. acidophilus* 或 *Lb. delbrueckii* 后，作为 T-细胞反应增强的一种表现是小鼠体内抗 SRBC 的迟发性超敏反应提高（DTHR）。当小鼠受到淋巴细胞分裂素的刺激后，口服以活菌状态存在的（而非死亡的）*S. thermophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 后可增强小鼠脾细胞对 IFN- α 和 IFN- γ 的表达，尽管在老龄小鼠中由 T 细胞衍生出来的淋巴因子浓度较幼年小鼠低，这种作用同样存在于老龄小鼠体内。对应于乳杆菌和 *S. thermophilus* 数量增加，Peyer's Patches 下面 M 层淋巴细胞数目也增加。因此，益生菌对免疫功能的刺激作用可能还在于其能直接刺激 Peyer's 斑上的淋巴细胞。研究者认为采用口服乳酸菌的方式，其免疫辅助作用更显著，对宿主免疫反应的促进作用更强。

Grettise 等研制了一种用于研究胃肠道土著乳杆菌的转化体系，通过测定血清中特异性抗体的滴度来观察口服三硝基苯基化（TNP）乳杆菌对免疫记忆的诱导作用。从血清中特异性抗-TNP IgG 抗体的滴度来看，产生免疫记忆的程度与口服致敏所用的乳酸菌被 TNP 取代的比例存在直接的关联。通过口服致敏在血清中所产生的特异性抗-TNP IgG 抗体的滴度等于甚至高于通过腹膜注射（i. p.）致敏所产生的抗体滴度。这些结果表明，乳杆菌可以作为一种有效的口服疫苗载体。Pouwels（1996）等研究了多种乳杆菌通过口服途径和腹膜注射方式时的免疫佐剂功能，在注射 TNP 化鸡 γ -球蛋白后，*Lb. casei* 和 *Lb. plantarum* 可引发高强度的延迟型超敏反应（DHT），而 *Lb. fermentum* 和 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 则较低。在不同的实验模型体系内，*Lb. casei* 和 *Lb. plantarum* 均可表现出显

著的免疫调节作用,含有 *Lb. casei* L-ldb 基因强启动子或 *Lb. amylovorus amy* 基因可调控性启动子的各种表达或表达-分泌载体,被用来在细胞内、细胞外或细胞表面表达与 *E. coli* β -葡糖醛酸苷酶融合的流感病毒抗原决定簇。进行胞内表达时,这种融合蛋白可占据细胞内可溶性蛋白的 1%~2%。在皮下致敏后,口服能在细胞内合成该融合蛋白的乳杆菌就可以激发口服免疫应答。

Pereyra 等研究了 *Lb. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* (5×10^7 细胞溶于 0.5ml 生理盐水,腹膜注射)在瑞士小鼠体内对干扰素产生的影响,在注射这两种乳酸菌 6 小时后,小鼠血清中 α/β 干扰素的活力达到最大值,为 300U/ml,这种刺激作用似乎需要完整的乳酸菌细胞的存在。经过热灭活的细胞几乎不产生任何刺激作用,而经过辐射处理的乳杆菌的效果则更加显著,含高浓度干扰素的小鼠血清中同时含有 300U/ml 的 TNF (肿瘤坏死因子)。单独注射 *S. thermophilus* 则对小鼠血清中干扰素浓度的影响几乎检测不出,不过其腹膜细胞中腺嘌呤合成酶的活力有所增加,表明仍然有少量干扰素的产生。注射 *S. thermophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 混合物对小鼠血清中干扰素产生的影响基本上与单独注射 *Lb. bulgaricus* 时相同。这些结果表明非致病的细菌、如食品加工中常用的乳酸菌,可以在小鼠体内刺激干扰素的产生。部分研究结果显示,细菌对小鼠体内干扰素产生的刺激作用至少有一部分是来自于其细胞壁。Kitazawa 等发现, *Lb. acidophilus* 能诱导体外培养的鼠腹膜巨噬细胞 (M phi) 产生干扰素。在体外培养的鼠腹膜巨噬细胞中, *Lb. acidophilus* 的菌株 JCM1034、1132T、1229 和 2125 都可以诱导干扰素的产生 (12~34 IU/ml)。经过与不同的抗干扰素抗体反应后发现,1132T 和 2125 诱导产生是 α/β 干扰素。Rangavajjala 等研究了 *Lb. acidophilus* LA1 对 IL-1 α 和 TNF- α 的诱导作用,鼠巨噬细胞株 RAW264.7 分别与 4 株 *Lb. acidophilus* 或 *B. bifidum* 的活菌体或热灭活的细胞进行培养,而 *E. coli* 则被作用 LPS 的来源来诱导上述细胞因子的表达,与其他的乳杆菌或双歧杆菌相比, *Lb. acidophilus* LA1 能诱导更高浓度的 IL-1 α 及 TNF- α 。这些细胞因子的产生与 LPS 无关,因为当仅存在 LPS 时,即使其浓度等子或者比 LA1 诱导时所用的 LPS 的浓度高 100 倍,也仅能诱导可忽略不计的 IL-1 α 及 TNF- α 。

最近,Shida 等研究了 *Lb. casei* 在小鼠体内对 IgE 表达的抑制作用。从采用卵白蛋白致敏的 BALB/c 小鼠中获得的脾细胞在体外培养时,在热灭活的 *Lb. casei* 细胞存在的情况下,接受相同抗原(卵白蛋白)的刺激。*Lb. casei* 可以诱导脾细胞对 IFN- γ 的表达,但抑制其 IL-4 和 IL-5 的分泌,并且能明显地抑制总 IgE 及抗原特异性 IgE 的分泌。在加入能中和 IFN- γ 的抗体以后, *Lb. casei* 对脾细胞分泌 IgE, IL-4, IL-5 的抑制作用被部分解除。在上述脾细胞的培养物中, *Lb. casei* 还可以促进 IL-12 的表达;加入抗 IL-12 的单克隆抗体以后,脾细胞对 IgE、IL-4 及 IL-5 的表达作用完全恢复到对照组的水平。*Lb. casei* 对 IF-12 表达的增强作用依赖于巨噬细胞的存在。对 Th 细胞发育的分析结果显示, *Lb. casei* 可以优先促进 Th1 细胞的发育,这一作用也可被抗 IL-12 抗体的加入所完全阻断。Matsuzaki 等也发现,口服 *Lb. casei shirota* 可以有效地抑制小鼠血清中 IgE 的表达。而且,该菌株能明显地抑制小鼠受到卵白蛋白刺激后对 IgE 的表达。从喂食 *Lb. casei shirota* 的小鼠获得的脾细胞在体外培养时,即使再次受到卵白蛋白刺激,其对 IgE 的表达也被抑制。以上的研究结果表明,乳酸菌可以抑制由抗原诱导的 IgE 的表达,因此,可以作为一种预防由 IgE 介导的过敏反应的潜在方法。

2. 具有免疫调节功能的益生菌活性成分

从 *Lb. bulgaricus* 制备的肽聚糖可以将小鼠原 T 细胞 (Pre-T 细胞) 转化成 θ^+ 细胞, 并激活补体。这一作用取决于血清中肽聚糖的浓度以及被激活的补体与 Pre-T 细胞的作用时间, 其中肽聚糖所发挥的作用可以被一种 C3a 的补体成分所替代。Fichera 等测试了 *Lb. casei* 及其细胞壁肽聚糖成分在体外通过初级细胞毒作用对不同鼠肿瘤细胞株以及人肿瘤细胞株 (K562 和 KB) 的生长抑制作用, 将这些肿瘤细胞株采用不同剂量的 *Lb. casei* 或其肽聚糖处理不同的时间后, 可使瘤细胞株的存活性降低 25%~30%。

Nomoto 等对热灭活的 *Lb. casei* 细胞采用 N-乙酰胞壁酰氨酶处理后, 获得一种水溶性的多糖—肽聚糖复合物 (PSPG), 其分子量 >30KDa, 多糖部分由鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖胺和半乳糖胺所组成。给小鼠预先采用 PSPG 处理后 (i. p. 途径), 即使让小鼠感染致死剂量的 *L. monocytogenes* 或 *P. aeruginosa*, 小鼠也可以存活。在接受 PSPG 处理的小鼠中, 感染的细菌 (*L. monocytogenes*、*P. aeruginosa*、*Salmonella typhimurium* 或 *E. coli*) 在腹腔或肝脏部位的生长受到明显地抑制。PSPG 的这种抗感染作用来自于其对巨噬细胞的激活作用, 如果给小鼠注射卡拉胶 (一种巨噬细胞选择性抑制剂), 则 PSPG 的抗感染作用明显地降低。

Davidkova 等研究了口服从 *Lb. bulgaricus* LB51 细胞壁中获得一种成分 Deodan, 在正常小鼠体内对内源性肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的诱导作用。Deodan 对小鼠的致敏和引发作用是与 LPS 或活的 BCG 疫苗联合进行的, Deodan 的使用剂量为 150mg/kg 体重, 采用多种处理方案。按 150mg/kg 体重的剂量连续口服 1、3、10 或 20 天仅在实验组小鼠体内引起 TNF- α 浓度轻微的升高, 而 TNF- α 浓度增加的最大值是在最后一次口服后 6 小时出现的。在采用静脉注射 (i. v.) LPS 而引发的小鼠体内, Deodan 可以有效地诱导 TNF- α 的表达, 在 BCG 致敏的小鼠体内, Deodan 可以引发 TNF- α 表达。PoPova 等研究了 Deodan 对单核细胞/巨噬细胞功能以及宿主对实验性感染抵抗力的影响, 口服 Deodan 可提高鼠腹膜渗出物中巨噬细胞的扩散能力与吞噬活性, 以及增强巨噬细胞的活化作用。在体外, 将 Deodan 与人血单核细胞共培养可诱导其对与细胞膜相连及胞质中 IL-1 及 TNF- α 的表达。对于实验性感染 *Klebsiella pneumoniae* 和 *Listeria monocytogenes* 的小鼠, 口服 Deodan 可降低其死亡率。

乳酸菌全细胞抽提物也可以改变巨噬细胞的功能, 这种作用随菌株的不同而呈现出不同的改变。将鼠巨噬细胞样的细胞株 J744 与 *Lb. acidophilus* 或 *B. longum* 全细胞抽提物共同培养时, 后者对巨噬细胞功能的作用可通过测定巨噬细胞对特定酶的合成作用以及其对聚苯丙烯酰胺 (acrylamide) 颗粒或 *Salmonella typhimurium* 活细胞的摄食作用进行评估。其中, *B. longum* 全细胞抽提物对 J744 细胞株的溶菌酶活力有显著地降低作用, 而 *Lb. acidophilus* 的全细胞抽提则无此作用; 而这两种菌的抽提物都诱导 J744 细胞的形态改变以及显著地提高其对惰性颗粒以及 *S. typhimurium* 活细胞的吞噬作用。

Kitazawa 等检测了 *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL 1037R-1 及 NCFB2483 所产生的胞外多糖对鼠淋巴细胞的分裂作用。通过离子交换法, 菌株 OLL 1037R-1 所产生的胞外多糖被分为中性及酸性多糖两部分, 而 NCFB2483 的胞外多糖则全部为中性多糖。酸性多糖可刺激鼠脾细胞及 Peyer's 斑的分裂反应, 但对胸腺细胞无作用, 其达到最大刺激作用的最适浓度为 160 μ g/ml。通过高效液相色谱 (HPLC) 纯化的酸性多糖也有具有明显促细胞分裂作用。其分子量经测定为 1200KDa, 这种酸性多糖是一种由葡萄糖, 半乳糖和磷酸基团组成的磷酸多糖。采用氢氟酸降解、去磷酸化后, 这种酸性多糖对淋巴细胞的促分裂作用降

低。*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 1073 R-1 所产生的磷酸多糖是一种潜在的依赖 B 细胞的细胞分裂素，其中的磷酸基团是诱导细胞分裂的活性中心。

目前，有关益生菌对免疫系统的促进作用似乎还存在矛盾之处，在比较采用活菌或死菌细胞获得的结果时，这点尤其明显，正如前文所述，死细胞（或其细胞壁碎片）也可以调节宿主的免疫系统，另外一些研究结果则认为只有活的细胞才能促进宿主的免疫系统，引起这种歧义的原因尚不明朗。不过，越来越多的证据表明，从总体而言能促进吞噬细胞的功能对于某些特殊的抗原，也可发挥免疫佐剂的作用，益生菌能直接治疗和预防多种疾病。所有这些研究结果表明，益生菌确实能针对性某些疾病为宿主提供保护作用，并且昭示出肠道菌群，对于宿主防御机能的建立有非常重要的作用。

3. 人体临床研究

增加胃肠道益生菌的数量，可提高巨噬细胞与粒细胞的吞噬作用从而增强机体非特异性的细胞免疫功能。Kaila 等在正处于发病期的患者中进行了一项益生菌对抗体分泌细胞诱导作用的研究，主要是观察 *Lactobacillus* GG 对 39 名急性腹泻儿童的影响。试验组 ($n=22$) 一日两次饮用含有 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu LGG 的发酵乳制品，每次 125g；对照组 ($n=17$) 饮用相同剂量发酵后采用巴氏消毒、活菌少于 10^3 cfu 的发酵乳。服用益生菌的试验组患者腹泻的病程明显地缩短 (1.1 ± 0.6 Vs 2.5 ± 1.4 天)。试验组患者第一天暂时性的非特异性免疫应答强度几乎为安慰剂组的 2 倍，在第三周时两组之间未观察到明显的差异。然而，在第三周时，试验组 90% 的患者都产生了针对轮病毒的特异性免疫反应，而对照组中这一比例仅有 46%。

Majamaa 等 1995 年发表了一项利用多种乳酸菌对急性腹泻治疗研究的结果，被研究人群是 49 名患急性腹泻的儿童。在采取补液治疗后，受试者每天被给予与其年龄相适应的饮食，并分成四组，其中三组接受乳酸菌制剂。组 I ($n=16$)：*Lactobacillus* GG 冻干粉；组 II ($n=14$)：*Lb. rhamnosus*；组 III ($n=19$)：*S. thermophilus*、*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 和 *Lb. rhamnosus* 的混合物；组 IV（对照组）不接受任何处理。在接受乳酸菌制剂的 3 个试验组中，患者体内分泌免疫球蛋白的细胞总数基本相当，尽管特异性的免疫反应存在区别。这一结果表明不同乳酸菌菌株的作用可能有所区别，其中接受 LGG 的试验组（组 I）体内针对轮病毒的特异性 IgA 的水平增高，以及在康复阶段血清中抗轮病毒的 IgA 水平升高。

Isolauri 等在评估 *Lb. rhamnosus* GG (LGG) 活细胞作为免疫佐剂增强口服轮病毒疫苗免疫原性时，研究了 LGG 对免疫应答的作用。2~5 个月的婴儿被分为两组，其中 LGG 组 ($n=28$) 在接受疫苗的同时，接受 LGG 活菌，而安慰剂组则仅接受轮病毒疫苗。两组之间在症状上无明显的差异，然而，在同时接受疫苗与 LGG 的婴儿中，观察到其体内 IgA 和 IgM 抗体的浓度有增高的趋势。

研究还表明，当乳杆菌与双歧杆菌同时使用时，可促进宿主的免疫功能。De Simone 等认为老年人经常服用益生菌可调节局部及系统免疫功能，在一项设有对照组的研究中，15 名成人连续 28 天服用 *B. bifidum* 和 *Lb. acidophilus* 的胶囊，而另外 10 名成人则仅接受安慰剂。与对照组相比，试验组 S 结肠 (Sigmoid colon) 内炎症反应降低，大肠黏膜中免疫活性细胞的数量减少 ($P < 0.02$)。在服用乳酸菌胶囊后，外周血液中 B 细胞的数量增加 ($P < 0.01$)。尽管两组之间大肠黏膜中 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞的相对数量无明显地改变，研究者认为，*B. bifidum* 和 *Lb. acidophilus* 对肠道致病菌及其致炎性代谢产物具有屏

障作用。

在另一项设有对照组的 研究中，Link-Amster 等让健康的成人志愿者口服含有 *Lb. acidophilus* 和双歧杆菌的发酵乳，然后使其接触经过减毒处理的 *Salmonella typhi*。接受发酵乳的受试者血清中抗 *S. typhi* 的特异性 IgA 以及血清总 IgA 水平都出现增高，未观察到对血液化学及血液学指标的不良影响。

Schiffirin 等认为摄取乳酸菌可增强人体非特异性抗感染免疫作用，健康的成人志愿者被分成两组，除正常的饮食外，受试者还接受含有乳酸菌的发酵乳。其中一组接受含有 *Lb. acidophilus* 的发酵乳，另一组则接受含有 *B. bifidum* 的发酵乳。在食用上述发酵乳后，通过血液学试验来评估血液中淋巴细胞 II 群以及吞噬活性的变化，同时检测粪便中微生物的变化。在两组中均观察到总吞噬活性显著地提高 ($P < 0.0001$)，在食用发酵乳 6 星期后，两组受试者血液中总吞噬活性都出现下降，但与试验开始时相比，其水平仍要高得多。

因此，益生菌似乎可以同时促进非特异性与特异性免疫作用。对特异性免疫功能的刺激作用可能来自于局部或黏膜水平的消化道免疫反应，后者再进一步从系统免疫水平促进免疫功能。Peyer's 斑是参与促进免疫功能的肠道淋巴细胞，Peyer's 斑中的 M 细胞可从消化腔中吸收或感知抗原诱导免疫应答所需的各种细胞，包括原 T 和原 B 细胞，都存在于 Peyer's 斑中，与抗原的接触引起这些前体细胞的增殖与分化。这些分化后的细胞迁移到循环系统中，然后在 Lamina Propria 和其他黏膜部位聚集。益生菌似乎可增强 Peyer's 斑对抗原的摄取。

B 细胞分化成浆细胞并分泌免疫球蛋白，其中 IgA 对外来物质形成了一种免疫屏障，包括致病菌，过敏原和致癌物。益生菌似乎也能促进 IgA 的表达，母乳喂养的婴儿从母乳中获得 IgA，从而获得被动性免疫保护功能，乳酸菌对 IgA 表达的促进作用可能给非母乳喂养的婴儿提供类似的保护作用。

八、抗肿瘤作用

越来越多的研究表明，实用发酵乳制品或部分乳酸菌制剂可以激发体内的抗肿瘤作用。益生性乳酸菌的抗肿瘤作用在于：①抗畸变作用；②减少体内可导致致癌物、畸变剂和致瘤剂产生的酶活力；③抑制肿瘤；④改变可能导致肿瘤高发病率的饮食结构。临床结果表明，部分乳酸菌可改变粪便中某些引发大肠癌的酶的活力，如 β -葡糖醛酸苷酶、叠氮还原酶和硝酸盐还原酶。

(一) 抗畸变作用

益生菌抗突变的机理之一是乳酸菌能直接与这些致突变化合物结合。在总结膳食性乳酸菌的治疗作用时，Fernandes 等认为乳酸菌细胞对亚硝酸盐的吸收可以减少亚硝胺的形成。在体外评估这些乳酸菌，尤其是 *Lb. casei* 及 *Bifidobacterium longum* 与 *L. gasseri* 混合物的抗突变作用时发现，这些乳酸菌能显著减少由致突剂诱导的染色体异常与微核 (micronuclei) 的产生。在一项针对健康成人的研究中，受试者饮用含有 *Lb. acidophilus* ($10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/人) 的发酵乳，连续 3 天后，其尿液和粪便中的致突活性显著降低。

体外研究证明，LAB 能吸收烧煮熟食中的致突剂。在摄食含有 *Lb. acidophilus* 的发酵乳以后，大肠癌患者肠道中乳杆菌的数量以及对钙的吸收显著增加，而粪便中可溶性胆酸的浓度和细菌酶的活性有下降的趋势，而这两种物质是导致大肠癌的危害因子。最近在临床研究发现，摄食 *Lb. acidophilus* 可显著减少消费烧烤肉制品后粪便中致突剂的排出量。乳酸菌可以通过多种途径产生抗突变作用，因此，部分特定的乳杆菌能降低人大肠癌的发

风险。

Hosono 在体外以链霉素依赖性沙门氏菌为对象,研究了由 *Lb. bulgaricus* 或 *S. thermophilus* 制备的发酵乳的抗突变作用。被测试的致突变剂包括 2-(2-咪唑)-3-(5-硝基-2-咪唑)苯乙烯酰胺(FNFA)、1-氧-4-硝基-喹啉(4-NQO)以及从猫、猴、狗或其他哺乳动物粪便中提取的致突变物质,两种发酵乳对所有被测试的致突变物都有抗突变作用。随着与致突变剂共培育时间的延长,发酵乳对 FNFA 及 4-NQO 的抗突变作用提高,而且,这种作用具有热敏感性。Bodana 和 Rao 以 *Salmonella typhimurium* (TA98 或 TA100) 为研究对象,在体外研究了由 *Lb. bulgaricus* 或 *S. thermophilus* 或两菌混合发酵制成的发酵乳的抗突变作用,被测试的致突变剂是 4-NQO 和 2-氨基芴(2-aminofluorene, AF)。在被测试的两株菌中,所有发酵乳的抽提物都能显著抑制由 4-NQO 或 AF 所引起的突变回复子的数量 ($P < 0.05$),而且这种抑制作用呈现剂量效应,而非发酵乳的抽提物则无抑制作用。*Lb. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 混合发酵乳抽提物的抗突变活性要高于单一 *S. thermophilus* 发酵乳。当 4-NQO 作为突变原时,抽提所用的溶剂(丙酮/正丁酸)不对测试结果产生影响;然而,当 AF 作为突变原时,采用丙酮作为溶剂的抽提物具有更强的抗突变活性 ($P < 0.05$)。该结果有力地证明在 *Lb. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 的发酵产物中存在具有抗突变作用的物质。在以 *S. typhimurium* TA1538 为指示菌的 Ames 实验中, Renner 等以牛肉或添加亚硝酸盐进行腌制的牛肉的抽提物作为突变原,测定了乳酸菌的抗突变作用。其中, *Lb. casei* 对腌制牛肉抽提物引起的突变具有最强的抑制作用,而 omniflora[®] (由乳杆菌和 *E. coli* 组成的冻干粉) 和其无细胞培养上清液则仅对由牛肉抽提物引起的突变具有抑制作用。在采用活体动物作为实验对象时, LAB 的抗突变作用更一致。当以二甲磺酸丁酯(一种治疗骨髓性白血病的药物)作为突变原,在染色体异常实验(对中国大颅鼠骨髓细胞)和微核实验(对中国大颅鼠或小鼠骨髓细胞)中,让这些动物同时口服突变原与 *Lb. casei*、omniflora[®] 或酸奶(含双歧杆菌活菌),这些乳酸菌具有强烈的抗突变作用。如果采用腹腔注射的方式,乳杆菌也具有抗突变作用;而这些乳酸菌的无细胞上清液仅有微弱或不具有抗突变的作用。这些乳酸菌可以将突变原诱导的染色体异常数以及微核细胞数减少 80% 以上。Hosoda 以 *S. typhimurium* TA100 为指示菌,测定了采用分别属于乳杆菌、链球菌、乳球菌或双歧杆菌属的 71 种乳酸菌制备的发酵乳对 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-3)的抗突变作用,每一种发酵乳都表现出独特的抗突变效果。在所有被测试的乳酸菌中, *Lb. acidophilus* LA106 (LA2) 发酵乳对 N-3 的抗突变活性最强,其对突变的抑制率达到 77%。Nadathur 分别用 *L. helveticus* CH65, *Lb. acidophilus* BG2FO4, *S. thermophilus* CH3, *L. bulgaricus* 191R 以及后两种菌的混合菌发酵还原脱脂奶,发酵产物冻干后用丙酮进行抽提,抽提物用二甲亚砷(DMS)溶解后在 Ames 试验(*S. typhimurium* TA100 为指示菌)中,测定其对 N-3 以及 3,2'-二甲基-4-氨基联苯(DABP)的抗突变作用。所有的抽提物都表现出显著的抗突变作用,其强度与剂量有关。其中,与未发酵乳相比,发酵乳对 N-3 或 DABP 的最大突变抑制作用,分别高 2 或 2.7 倍;而 *L. bulgaricus* 191R 发酵乳中存在对这两种致突变剂具有抗突变作用的活性物质,其在水中的溶解性低于在二甲亚砷中的溶解性。如果在冻干以前将 *L. bulgaricus* 191R 发酵乳的 pH 值分别调节至 3、7.6 或 13,则其丙酮抽提物对 DABP 的抗突变作用不受影响,向未发酵乳中加入 2% L-乳酸并不改变其仅具有微弱抗突变作用的特点;相反,发酵乳中对 N-3 具有抗突变活性的成分在 pH 7.6 时不容易被抽提出来,加入 2% L-乳酸并不能改变未发酵仅对 N-3 具有微弱抗突变作用的特点。

Lankaputhra 等 (1998) 测试了 6 株 *Lb. acidophilus*、9 株双歧杆菌活细胞与热灭活细胞以及乳酸菌代谢产物中常见的有机酸对 8 种强突变剂或原突变剂的抗突变作用, 所用的突变剂或原突变剂包括: N-3、2-硝基萘、4-NQO (4-硝基-喹啉-N-氧)、4-硝基-O-苯乙烯二胺、黄曲霉毒素 B₁、2-氨基-3-甲基-3H-咪唑并喹啉、2-氨基-1-甲基-6-苯基-咪唑并 [4,5-b] 吡啶和 2-氨基-3-甲基-9H-吡啶 [3,3-b] 并吡啶。这些乳酸菌的活细胞表现出更高的抗突变活性, 它们对突变剂的抑制效率高于热灭活的细胞。活细胞可以永久性地结合或抑制突变剂, 而热灭活的细胞在采用二甲亚砜抽提以后, 即释放所结合的突变剂。在被研究的有机酸中, 丁酸的抗突变作用最高, 其次是乙酸, 乳酸和丙酮酸的抗突变作用则明显偏低。

为了证实发酵乳在人体肠道内的抗突变作用, Hosoda 等 (1996) 测定了 6 名健康受试者饮用 *Lb. acidophilus* LA-2 发酵乳前以及试验过程中粪便的致突变性与细菌的组成。结果表明, 饮用发酵乳可以显著降低粪便的致突变性 (平均降幅为 71.9%, 下降范围从 19.4% 至 90.6%), 所有受试者粪便中乳杆菌和双歧杆菌的数量都出现增加。对粪便致突变性的抑制作用似乎与肠道中 *Lb. acidophilus* LA-2 的存在而改变粪便菌群的组成有关。在肾功能衰竭晚期患者中会出现小肠细菌过度生长 (SBBO), 产生血尿毒素, 并导致患者营养失衡。Simenhoff 等 (1996) 在 8 名进行血透析的患者中进行了一项口服 *Lb. acidophilus* 的临床治疗试验, 口服 *Lb. acidophilus* 可有效降低患者体内两种有毒物的产生。其中, 血清中二甲基胺 (DMA) 的浓度从 224 ± 47 降低至乳酸菌治疗结束时的 $154 \pm 47 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.001$); 亚硝基二甲基胺 (一种致癌物) 的浓度从未治疗时的 178 ± 67 降低至乳酸菌治疗结束时的 $83 \pm 49 \mu\text{g/L}$ 。以血清白蛋白、体重、热量摄取、胳膊中部的肌肉区 (MAMA) 为指标得出的患者的营养状态及食欲出现中等程度的改善, 但未出现显著提高。*Lb. acidophilus* 通过改变 SBBO 的代谢活性, 从而改变了小肠内致病菌的生物学特性, 减少体内两种毒素或致癌物的产生, 并改善了患者的营养状况, 未观察到不良的副作用。

从青贮饲料发酵接种物中分离到一株 *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, 该菌可以抑制 *Aspergillus flavus* subsp. *parasiticus* NRRI 2999 合成黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁。这种抑制活性存在于该菌的培养上清液中, 对胰蛋白酶和 α -糜凝乳酶敏感, 但对胃蛋白酶不敏感。在 Lab-Lemco™ 胰蛋白酶肉汤培养基中添加 20% 该乳杆菌培养上清液经过透析的蛋白浓缩物后, 可以完全抑制黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 在该培养基上的生物合成。如果在 100℃ 处理 10 分钟, 则 *Lb. casei* 培养上清液这种抑制作用消失。在以 *Salmonella* 为指示菌的突变实验 (Ames 实验), 在 *Lb. casei* 培养上清液中生长的 *Aspergillus flavus* 不产生致突变作用。

(二) 抑制原致癌物活化酶的产生

益生菌通过调节肠道细菌使原致癌物活化的酶的活力, 可减少癌的发生率, 这些酶包括 β -葡糖醛酸苷酶、叠氮还原酶、硝酸盐还原酶、7- α -去羟基酶和 7- α -脱氢酶, 这些酶能将原致癌物转变成致癌物。在一些特定的乳酸菌如乳杆菌和双歧杆菌中, 这些酶的活力最低。

乳酸菌对肠道内这类酶活力的降低作用已被广泛研究, 此类酶活力的降低可减少小肠内游离胆酸的浓度, 已知游离胆酸是一种致癌物或辅突变物 (comutagens)。Ling 等研究了口服 LGG 发酵的乳清饮料对养老院老人粪便中细菌性酶活力的影响, 与那些服用安慰剂的受试者相比, 接受发酵乳清饮料的受试者粪便中 β -葡糖醛酸苷酶和脲酶活力降低。Goldin 等发现在杂食性志愿者的饮食中补充活的 *Lb. acidophilus* 细胞可以显著地降低其粪便内 β -半乳糖醛酸苷酶和硝酸盐还原酶活力。

(三) 与致癌物结合

乳酸菌对人体健康的保护作用之一是能使致癌物失活, 在分析某些肿瘤的高发病率与饮食习惯的相关性时, 最主要的目的就是要找出潜在的基因毒性 (Genotoxic) 致癌物以及能抑制这些致癌物作用的营养因素。Pool-Zobel 发明了一种能分析胃肠消化道肿瘤靶组织细胞内 DNA 损伤的方法, 他利用这种分析方法研究了 *Lb. acidophilus* (来源于一种市售酸奶)、*L. gasseri* P79、*Lactobacillus confusus* DSM20196、*S. thermophilus* NCIM50083、*Bifidobacterium breve* 和 *B. longum* (来源于婴儿粪便) 等乳酸菌在预防 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG, 7.5mg/kg 体重) 对大鼠大肠细胞内 DNA 损伤的抑制作用。从 *Lb. acidophilus* 制备的多种细胞组分如细胞质、细胞壁骨架和细胞壁都不具有抗基因毒性的作用, 而肽聚糖和冻干细胞则具有抗基因毒性的作用; Pool-Zobel 测试的第二种致癌物是 1,2-二甲基胍 (DMH), 在研究 DMH 对大鼠消化道不同部位的作用时, 首次采用了剂量与时间效应来评估 DMH 的致癌作用。如果使 15 或 25mg/kg 体重的 DMH 在大鼠体内接触 16 小时, 则引起远端大肠内细胞 DNA 的损伤, 而未观察到细胞毒作用。如果在进行 DMH 灌喂 (在最后一次口服 LAB 后 8 小时进行) 前连续四天早晨让大鼠口服上述乳酸菌, 结果表明 *Lb. acidophilus*、*Lb. confuses*、*Lb. gasseri*、*B. longum* 和 *B. breve* 能抑制 DMH 的基因毒作用; 被测试的四株 *S. thermophilus* 中的一株以及三株 *Lb. bulgaricus* 中的一株也有类似的保护作用, 而经过加热处理的 *Lb. acidophilus* 则不能抑制 DMH 诱导的基因毒作用。在采取上述乳酸菌和 DMH 处理后, 抽取少量的大肠细胞, 进行免疫组织化学处理, 检查其中是否存在“增殖细胞核抗原 (PCNA)”, PCNA 是反细胞增殖能力的标志。DMH 处理并不增加 PCNA, LAB 处理对大肠细胞的 PCNA 也没有调节作用。因此, 这些乳酸菌对细胞的保护作用来自于其与致癌物的结合。以上结果表明, 绝大多数 (但并不是所有的) 被测试乳酸菌菌株都能强烈地抑制大鼠消化道内的基因毒作用, 而且只有活菌才能在体内发挥这种作用。

Zhang 等对 *Streptococcus cremoris* Z-25 的冻干细胞在人胃液或蒸馏水中结合具有突变性的高温裂解物的 (pyrolysate) 能力进行了比较。当胃液的 pH 在 1.2~7.8 之间时, *S. cremoris* Z-25 冻干细胞在胃液中对突变剂的吸附作用对 pH 值具有依赖性, 并且受到溶液中 Na^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等离子浓度的影响。在 pH1.2~2.1 时, 对 Trp-P-2 的吸附作用低于 pH4.0~8.0, 该菌株能同时吸附 Trp-P-1、Trp-P-2 和 Glu-P-1。对 Trp-P-2 的最大吸附量是 47.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 细胞。将冻干细胞在 120 $^{\circ}\text{C}$ 处理 15 分钟或 80 $^{\circ}\text{C}$ 处理 3 小时可提高细胞对 Trp-P-2 的吸附能力, 以非加热方式灭活的 *S. cremoris* Z-25 细胞 (在 pH1.5 的胃液中被灭活) 与活的细胞具有相同的吸附 Trp-P-2 的能力; 在 pH1.5 的胃液中, 以非受热方式被杀灭的 *Lb. acidophilus* IFO 13951 和 *B. bifidum* IFO 14252 细胞对 Trp-P-2 具有更强的吸附能力。Vorobeve 等报道, 当培养液存在时, *Propionibacterium shermanii*、*P. pentosaceum*、*P. thoenii*、*P. coccoides*、*P. acnes*、*Lb. delbrueckii*、*S. thermophilus*、*E. faecalis*、*B. bifidum* 和 *E. coli* AB 1157 细胞可降低 1-氧-4-硝基喹啉 (4-NQO) 对 *S. typhimurium* TA100 的致突变作用, 具有最高抗突变作用的是上述乳酸菌对数生长期的培养物, 随着培养时间的延长, 这些乳酸菌液体培养物的抗突变作用降低。当这些乳酸菌在添加有 4-PQO 的液体培养基中培养时, 所获得的菌体细胞比对照组具有更高的抗突变作用, 而这种抗突变作用的增强并不是由细胞突变而引起。在幼龄培养物中, 丙酸菌和 *E. faecalis* 可释放巯基化合物到培养基中, 而培养 10~24 小时的 *P. shermanii*, 随着菌体进入快速生长阶段, 硫

基化合物的积累也不断增加。当培养到 24 小时后, 巯基化合物浓度达到最高值, 此时培养物对 4-NQO 的抗突变作用也达到最大。研究者认为, 这些细菌对 4-NQO 的抗突变作用与它们能产生使突变剂的亲电基团失活的还原性化合物(巯基化合物)有关。*E. faecalis* 细胞抽提物的抗突变作用来自于两方面: 一种是能与 α -硝基苊(α -Nitrofluorene) 发生作用的细胞外因子, 另一种是在细胞内干扰 α -硝基苊进行生物转化及诱导突变的因子。已初步确定 *E. faecalis* 具有体内抗突变作用的因子是一种分子量小于 12KDa 的热稳定性物质或肽类物质。

高温烹调的肉食含有致癌性的杂环胺类化合物, 并可能增加人尿道恶性病变的危险。Hayatsu 等在 6 名不吸烟健康成人志愿者中进行了为期三周口服 *Lb. casei* 的试验, 以检验 *Lb. casei* 对受试者食用烤牛肉粉可能引起的尿道突变的作用; 口服 *Lb. casei* 使尿道的突变性减少(6%~67%, 平均 47.5%)。Thyagaraja 等测定了从一种非乳发酵制品 *idly* 中分离到的乳酸菌在体外对食源性突变剂的结合能力、同时观察了菌体细胞经过高压、高温处理后, 这些菌株结合突变剂能力的变化。所有被测试的乳酸菌菌株对氨基酸的高温裂解物如 3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-*b*]吲哚和 3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-*b*]吲哚具有非常强的结合能力, 而对 2-氨基-6-甲基-二吡啶并-[1,2-3',2'-*d*]咪唑具有中等强度的结合作用; 而对其他的一些突变剂如黄曲霉毒素, 则未观察到明显的结合作用。细胞经过高温和高压处理, 并不会显著地改变这些乳酸菌对突变剂的结合作用。Orrhage 等采用 HPLC 的方法, 研究了八株从人肠道分离的乳酸菌菌株对蛋白类食品烹调过程中产生的突变性杂环胺如 Trp-P-2、PhIP、IQ 和 MeIQx 等的结合作用, 这 8 株乳酸菌结合此类突变剂的能力仅存在微小的差异, 但同一菌株对不同突变剂的吸附效率却存在明显的差异。其中 Trp-P-2 几乎可被完全结合, 而且这种结合几乎是不可逆的; 对 PhIP 的结合则可达 50%, 这一作用非常重要, 因为 PhIP 是西方人饮食中一种主要的突变剂, 而对 IQ 和 MeIQX 则仅有轻微的结合作用。环境的 pH 值对乳酸菌吸附突变剂似乎有重要的影响。此外, 当这些杂环胺经过与乳酸菌菌体接触后其致突变性也相应地降低。以上结果表明, 食品烹调过程中产生的致突化合物, 尤其是西方富含食肉类的饮食中常见的致突化合物, 在体外可被正常的肠道菌群所吸附。Weirich-Schwaiger 等研究了乳杆菌对受损 DNA 修复的促进作用, 他们观察到 *L. gasseri* 的细胞自溶物在体外能促进受损 DNA 链的修复。

Terahara 等研究了杂环胺与乳酸菌之间的相互作用。*Lb. bulgaricus* 2038 和 *S. thermophilus* 1131 都能结合 3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-*b*]吲哚(Trp-P-1)和 2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-*f*]喹啉(MeIQx), *S. thermophilus* 1131 细胞对 Trp-P-1 的最大结合作用在 pH 4~8, 而 *Lb. bulgaricus* 2308 仅在 pH=7 时对 Trp-P-1 和 MeIQx 有轻微的结合作用。同时, 他们采用原位环技术(*in Situ* loop technique)研究了当这两种乳酸菌存在时, F344 大鼠小肠对此类杂环胺的吸收作用。结果表明, 当 *S. thermophilus* 1131 存在时, 小肠对杂环胺的吸收明显减少, 而 *Lb. bulgaricus* 2308 的存在则对 Trp-P-1 的吸收没有影响。因此, 在小肠 pH 环境下(pH 6~7), *S. thermophilus* 1131 对 Trp-P-1 的吸附可能是使其被小肠吸收减少的原因。

(四) 肿瘤抑制

膳食中乳酸菌的抗肿瘤生物学基础及抑制肿瘤作用已被广泛地研究。乳酸菌对肿瘤的抑制作用可能来自于遏制与瘤变相关的酶的活力或对宿主产生免疫调节作用。例如, 将从 *B. infantis* 分离的一种肽聚糖注射到小鼠发生瘤变的部位后, 可使肿瘤的消退率达到 70%。

对小鼠腹膜渗出细胞的进一步分析表明,这种细胞壁肽聚糖成分在携瘤小鼠体内作为生物反应调节信号激活了嗜中性粒细胞和巨噬细胞。因此,某些特定的乳酸菌在人和动物小肠中可发挥免疫调节作用,因而对维持机体的健康十分重要。

Mizutani 和 Mitsuoka 观察到某些肠道菌群如 *E. coli*、*Enterococcus faecalis* 和 *Clostridium paraputrificum* 可促使雄性无菌 C3H/He 小鼠肝脏发生瘤变,这种对瘤变的促进作用可以被部分肠道菌群所抑制,如 *Bifidobacterium longum*、*Lb. acidophilus* 和 *Eubacterium rectale*。乳酸菌抗肿瘤的作用机理近来受到广泛的重视, Bogdanov 从 *Lb. bulgaricus* 细胞壁中分离到一种以肽聚糖为主的胚溶素 (blastolysin), Blastolysin 对小鼠 Sarcoma S-180、白血病 P-388、plasmacytoma (浆细胞瘤) MOPC-315、adenocarcinoma (腺癌) AKATOL, 黑色素瘤 B-16、carcinoma LIC 和自发性瘤具有特异性抗肿瘤作用, Blastolysin 具有毒性低、不影响造血功能等特点,其对肿瘤组织的作用迥异于其他抗肿瘤化疗药物。Ketlinskii 等采用凝胶过滤的方法,从 *Lb. bulgaricus* 51 经溶菌酶裂解的产物中分离到一种胚溶素,对 S-180 的增殖具有强烈地抑制作用。给小鼠反复服用该组分后发现,这种胚溶素可使 15% 小鼠的肿瘤完全消退,并且对肿瘤的生长具有更长的抑制作用。该组分对小鼠艾氏腹水瘤的生长有类似的抑制作用,而且不影响小鼠的造血功能,组织学研究表明该组分可导致肿瘤细胞坏死。在由 *N*-丁基-*N* (4-羟丁基)-亚硝胺 (BBN) 诱导的大鼠膀胱癌实验模型中, *Lb. casei* 对浅表膀胱癌的具有抑制作用。与未接受 *Lb. casei* 处理的对照组相比,试验组大鼠无论是膀胱的重量还是单个膀胱的体积都显著降低 ($P < 0.05$); 与未接受 *Lb. casei* 处理的对照组相比,那些被给予 BBN、同时接受 *Lb. casei* 处理的大鼠体内诱发的肿瘤的恶性病变程度显著降低 ($P < 0.05$)。Sekine 等在小鼠体内研究了一种双歧杆菌 (*B. infantis*) 细胞壁组分 (WPG) 对延长小鼠生存期、提高治愈率以及持续的抗肿瘤中和作用。结果显示,与仅接受肿瘤疫苗的小鼠相比,那些被肿瘤疫苗和 WPG 致敏的小鼠能同时改善其存活时间和治愈率。

体内及体外试验表明,乳酸菌对大肠癌具有抗肿瘤作用。部分流行病学调查结果显示,经常饮用发酵乳制品的女性,乳腺癌的发病率较低。Biffi 等 (1997) 研究了由 5 株不同的乳酸菌 (*B. infantis*、*B. bifidum*、*B. animalis*、*Lb. acidophilus*、*Lb. casei*) 制备的发酵乳在体外对 MCF7 乳腺癌细胞株生长的抑制作用。所有的发酵乳都能抑制 MCF7 乳腺癌细胞的生长,而 *B. infantis* 和 *Lb. acidophilus* 的效果最明显 (培养 9 天后生长抑制率达 85%)。这种抗增殖作用与发酵乳中细菌的存在无关,也与全乳 (生乳或 UHT 乳) 或乳中主要的组分 (乳白蛋白或 β -乳球蛋白) 无关。这些发酵乳对 MCF7 乳腺癌细胞生长的抑制作用可能来自于发酵过程中乳酸菌从头合成 (*ex novo*) 的一种可溶性成分,或者是乳酸菌将某种乳成分转化成具有生物活性的物质。

(五) 乳酸菌对肿瘤营养流行病学的影响

流行病学研究表明,大肠癌的发生受各种环境因素的影响,尤其是饮食的组成。西方国家高牛肉、高脂肪和低纤维的饮食习惯与肠癌的高发病率存在一定的联系。肠道菌群将大肠肠腔中的原致癌物通过代谢方式激活,可能与肠癌的诱发有一定的关系,饮食习惯与大肠癌之间的联系可以部分地由西式饮食引起的粪便中细菌性酶的改变来加以解释。例如,粪便中细菌产生的 β -葡萄糖醛苷酶、硝基还原酶、叠氮还原酶以及甾醇 7- α -羟基酶活性在大量食用牛肉的人和动物体内明显增高,这些酶活性可以通过食用添加有 *Lb. acidophilus* 的谷物类饮食和服用少量抗生素予以降低。在实验动物中,这三种降低肠道菌群酶活力的措施 (增加谷

物类膳食、口服 *Lb. acidophilus* 或少量抗生素) 同样能减少大鼠体内由化学致癌剂二甲基胍 (DMH) 引起的肿瘤数。至于改变大肠内菌群的代谢方式能否减少人大肠癌的发病风险则还需要更多地研究。

Shackelford 等研究了 *S. thermophilus* 或 *Lb. bulgaricus* 发酵的脱脂奶在大鼠中对化学致癌剂诱发大肠癌发病率的影响, 断乳后的 F344 大鼠被分别喂以固形食物+脱脂奶、固形食物+*S. thermophilus* 发酵的脱脂奶、固形食物+*Lb. bulgaricus* 发酵的脱脂奶或固形食物+水, 一直喂养到第 36 周杀死 (或在此之前病死)。大肠癌的诱导采用在第 3 周至 22 周皮下注射盐酸 1,2-二甲基胍, 与对照组 (固形食物+水) 相比, 实验组的存活时间显著地增加, 而且前者耳导管肿瘤的发病率明显高于后者。在三个试验组中大肠癌的发病率差异不明显。喂食发酵乳的大鼠小肠肿瘤的发病率明显高于喂食非发酵乳的大鼠。在三个试验组中, 接受 *S. thermophilus* 发酵乳的大鼠恶性大肠癌发病率最低, 该研究结果表明, 喂食发酵乳改变了 1,2-二甲基胍的代谢方式, 使其靶器官由 earduct (耳导管) 转向了小肠。此外, 在接受发酵乳的大鼠中, 大肠肿瘤的分布似乎转向了肛门。

与非素食者相比, 素食者的典型特征是大肠癌和乳腺癌发病风险较低。根据 133 名已确认患有乳腺癌女性和 548 名非乳腺癌女性对其前 12 个月饮习的回忆, Van't Veer 等认为食用发酵乳可预防乳腺癌的发生, 人类肿瘤很大一部分与饮食习惯有关。一种可改善营养方式影响的办法是增加对具有保护作用成分的摄入, 如 DNA 损伤抑制剂和其他类型的抗致癌剂。由某些特定的乳酸菌生产的发酵乳在抗突变和抗癌变方面非常有潜力, Pool-Zobel 等研究了 10 株对人体健康具有促进作用的乳酸菌的抗突变性能, 他们还同时研究了四种不同类型发酵乳的保护作用, 在以 *S. typhimurium* 为指示菌的突变试验中, 他们研究了这些菌株对硝酸盐腌制的牛肉抽提物对 *S. typhimurium* 回复子产生的影响, 10 株乳酸菌中的 8 株在抑制 his⁺ 回复子产生方面的作用几乎与对照组 (不加硝酸盐牛肉抽提物) 一致, 含有不同类型活菌的新鲜发酵乳 (*L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 或 *Lb. acidophilus* 与双歧杆菌) 呈现出保护作用, 对回复子产生的抑制程度 (即抗突变作用) 与发酵乳中脂肪含量无关。相反, 经过热处理的酸奶品种则不具有抑制回复子产生的作用。在该研究中, 其他类型的发酵乳 (如酪乳、Kefir 和 Dickmilch) 不具有抗突变作用。该研究结果表明, 乳品加工中所用的某些菌株具有抗突变潜力, 而且这种作用具有菌株特异性。

(六) *Lb. casei* LC9018 在体外和体内抗肿瘤作用

在过去的 20 年内, *Lb. casei* LC9018 的抗肿瘤作用得到了广泛的研究 (表 2-13)。Mutai 及其同事在多种实验性肿瘤动物模型体内阐明了 *Lb. casei* LC9018 的抗肿瘤作用, 而 Kato 等则研究了 LC9018 在小鼠体内对异种或同种移植瘤生长的抑制作用。给移植 S-180 或白血病 L1210 的 ICR 小鼠腹腔注射 (i. p.) LC9018 可延长小鼠的存活期, 而采用静脉注射时, LC9018 可显著地抑制皮下移植的 S-180 的生长。在 BALB/c 小鼠内, LC9018 对由甲基胆蒽诱导、同种移植的 MCA K-1 肿瘤同样具有抑制作用。LC9018 经过卡拉胶处理或在 T 细胞缺失的无胸腺裸鼠内的抗肿瘤作用降低, 由于卡拉胶具有抑制巨噬细胞活性的作用, 表明 LC9018 的抗肿瘤效果与巨噬细胞的作用相关。Kato 等更进一步证明, 腹腔注射 LC9018 可以提高腹腔巨噬细胞的酸性磷酸酶活力及其吞噬活性, 在注射 LC9018 2~3 天后, 吞噬活性达到最高, 这些乳酸菌对 ICR 小鼠网状内皮系统吞噬功能的促进作用可以采用碳清除试验进行测定。LC9018 注射还可增强膜膜渗出细胞 (PEC) 胞抑作用 (Cytostatic), 这些结果表明 LC9018 在小鼠体内可激活巨噬细胞。此外, LC9018 还能增强 BALB/c 小鼠脾细胞的

表 2-13 *Lactobacillus casei* LC9018 在体外和体内的抗肿瘤作用

肿瘤类型(实验动物)	效 果
S-180 (ICR 小鼠)	明显延长生存期
白血病 L1210 (BDF1 小鼠)	明显延长生存期
Sarcoma-180 (ICR 小鼠)	增加 RES 的吞噬活性
Meth-A sarcoma (BALB/c 小鼠)	增强 NK 细胞活性
K234 肿瘤(BALB/3T3 小鼠)	对肿瘤移植产生特异性免疫作用
Meth-A 纤维瘤(鼠)	抑制自由基或 PGE2 的产生
Lewis 肺癌 (C57BL/6 小鼠)	抑制肿瘤向肺部转移
肝癌-10 瘤细胞株(豚鼠)	诱导系统性抗肿瘤免疫功能
MBT-2 膀胱瘤(鼠)	减少肿瘤向肺部转移
Lewis 肺癌 (C57BL/6 小鼠)	增强肿瘤转移
经过预处理的瘤细胞株(鼠)	刺激巨噬细胞释放细胞毒因子
B16 黑素瘤(C57BL/6 小鼠)	增强后小泡巨噬细胞的细胞毒性
Meth-A 瘤(BALB/c 小鼠)	增加胸腺泌出细胞数量
纤维瘤(BALB/c 小鼠)	诱导 T-细胞介导的免疫功能
B16 黑素瘤(c57BL/6 小鼠)	抑制转移
宫颈癌(临床实验)	可作为有效的化疗辅剂
恶性胸膜炎 (BALB/c 小鼠)	增强胸膜的硬化作用
Lewis 肺癌(C57BL/6 小鼠)	增加肿瘤转移
T-细胞型白血病瘤细胞(人)	抑制蛋白质合成与瘤细胞生长
淋巴母细胞型白血病瘤细胞(人)	抑制蛋白质合成与瘤细胞生长
原单核细胞型白血病瘤细胞(人)	抑制蛋白质合成与瘤细胞生长
浅表膀胱癌(临床实验)	防止复发
宫颈癌(临床实验)	可作为一种有效的化疗辅剂
Colon 26 瘤 (BALB/c 小鼠)	增强系统免疫功能
BBN-诱发的膀胱癌(大鼠)	所诱导的肿瘤恶变性能降低
Yac-1 和 P815 瘤细胞株(鼠)	通过细胞毒作用抑制瘤细胞的存活性
艾氏腹水瘤(鼠)	通过细胞毒作用抑制瘤细胞的存活性
乳头瘤(鼠)	通过细胞毒作用抑制瘤细胞的存活性
K562 和 KB 瘤细胞株(人)	通过细胞毒作用抑制瘤细胞的存活性
膀胱瘤(临床实验)	防止复发
胸腺淋巴瘤 (AKR 小鼠)	抑制鼠白血病病毒
纤维瘤(BALB/c 小鼠)	诱导胸腔中细胞因子的表达

自然杀伤细胞的活力。BALB/c 小鼠脾细胞对 P815 不具有细胞裂解活性，后者是一种对自然杀伤细胞 (NK) 不敏感的细胞株。在按 250 μ g/鼠的剂量注射 LC9018 后，BALB/c 小鼠脾细胞的胞溶 (细胞裂解) 活性逐渐增强，到第 3 天时，达到最高峰，以后逐渐衰减。在正常及携带 Meth A 瘤体 BALB/c 的小鼠体内，也可以观察到 LC9018 对小鼠脾细胞的自然杀伤细胞活性的促进作用。在体外采用抗-asialo GM1 抗体加补体处理后，LC9018 对 BALB/c 小鼠脾细胞的自然杀伤细胞活力的增强作用会完全消失。在 LC9018 注射 3 天后，在体外试验中，如果对脾细胞给予抗胸腺单克隆抗体加补体处理 (浓度为补体单独处理时的一半)，可以使其 NK 细胞活力降低。根据以上的结果，研究者认为在接受 LC9018 处理后的小鼠脾细胞悬浮液中存在两群 NK 细胞，一群为 asialo GM1+Thy1⁻，而另一群则为 asialo GM1⁻Thy1⁺。

Yasutake 等在 BALB/c 小鼠内，以两种同种移植瘤为对象，研究了 LC9018 的抗肿瘤作用。其中一种是甲基胆蒽诱发的肿瘤 (Meth A 纤维瘤)，另一种是 Kirstein 小鼠肉瘤病毒转化引起的 BALB/3T3 肿瘤 (K234 肿瘤)。如果将 LC9018 和 Meth A 肿瘤细胞的混合物对小

鼠进行注射，则肿瘤的生长被完全抑制；而如果将 LC9018 和 Meth A 肿瘤细胞在小鼠的不同部位同时进行注射时，则 LC9018 对 Meth A 瘤无任何作用。将 LC9018 和 Meth A 混合物注射后，会诱导小鼠对同种肿瘤产生移植免疫性，即如果给接受 LC9018 和 Meth A 混合物注射处理的小鼠进行 Meth A 瘤移植，则小鼠会对 Meth A 瘤产生特异地排斥反应。LC9018 和 K234 的混合物在 BALB/c 小鼠体内具有相似地抑制肿瘤生长和诱导特异性抗肿瘤免疫功能。中和试验表明，T 淋巴细胞具有肿瘤细胞毒作用，而体液免疫的血清则不具备这种作用，从而证明 LC9018 对肿瘤生长的抑制作用是通过激发具有抗肿瘤免疫功能的 T 细胞完成的。在携瘤小鼠的病灶部位或静脉注射 LC9018 会引起病变部位局部暂时性的肿胀或肝脾肿大，但未发现其他损伤作用。与那些肿瘤进一步恶化的小鼠相比，在体内肿瘤由注射 LC9018 或其他免疫强化剂而消退的小鼠中，脾细胞对植物血凝素 P (pHA-P) 的反应性减弱。靠近肿瘤病变部位的胫部淋巴细胞的 pHA-P 反应比脾细胞的 pHA-P 反应低，而肿瘤消退和恶化的小鼠的淋巴细胞之间不存在差异。LC9018 在诱导肿瘤免疫方面的辅助作用可以通过给小鼠同时注射 LC9018 和 Meth A 瘤细胞来观察。在 LC9018 的细胞壁组分中存在一种具有抗肿瘤活性的因子。当采用内切 N-乙酰胞壁酰胺酶 (endo-N acetylmuramidase) 将 LC9018 的细胞壁去除后，LC9018 的抗肿瘤作用就消失了。

Kato 研究了由 LC9018 所介导的对 Ia+巨噬细胞的诱导作用。这种 Ia+细胞群在腹腔中能与肿瘤抗原性发生作用，因此在体内具有非常重要的作用。那些具有抗肿瘤作用的免疫调节剂如 LC9018 或 *C. parvum*，在采用腹膜注射到 BALB/c 小鼠体内后，Ia 抗原的腹膜巨噬细胞浓度达到最大。在注射 LC9018 7 天后，给小鼠注射经过丝裂霉素 C 处理的 Meth-A 纤维瘤细胞 (MMC-Meth A) 进行免疫，小鼠在接受 MMC-Meth A 处理 14 天后，对采用腹腔注射移植的 Meth A 的生长具有抑制作用。而如果缩短 LC9018 处理与 MMC-Meth A 处理之间的间隔时间则对 i. p. 移植的 Meth A 的生长不具有抑制作用。这些结果表明，腹腔内具有 Ia 抗原的巨噬细胞数的增加的时间与 LC9018 诱导的抗肿瘤作用的有效时间间隔正合是重合的。由注射 LC9018 和 MMC-Meth A 诱导的抗肿瘤作用并不影响 RL 雄性白血病瘤细胞在 BALB/c 小鼠体内的生长。中和试验 (Winn type) 显示腹膜 T 淋巴细胞具有肿瘤细胞毒作用，如果在进行 MMC-Meth A 注射的同时或前一天，采用抗 I-Ad 单克隆抗体注射处理的话，腹膜 T 淋巴细胞的这种抗肿瘤作用将减弱。Kato 等携瘤的小鼠内，研究了口服 Biolactis® 粉末 (一种含 LC9018 活菌的制剂) 对肿瘤生长的影响以及脾细胞的分裂反应等。在 BALB/c 小鼠内，通过切除生长 5 天的 Colon 26 瘤体组织 (初级肿瘤) 对小鼠进行不充分的肿瘤预免疫。随后，在小鼠后肢足部注射 Colon 26 瘤细胞 (次级肿瘤)。在对照组小鼠中，次级肿瘤不断增长，而在那些每天服用 Biolactis® 粉末 100mg/kg 体重或 200mg/kg 体重的试验组小鼠中，次级肿瘤的生长受到显著地抑制，这种抑制作用具有初级肿瘤特异性。仅有活的 LC9018 细胞具有抑制次级肿瘤生长的作用，而采用热灭活的 LC9018 则无此作用。携带次级肿瘤小鼠的脾细胞对 T-细胞分裂素 (伴刀豆球蛋白 A 和植物血凝素) 以及细胞因子 (IU-1 和 IU-2) 的淋巴增殖反应比正常小鼠低。这种携瘤状引起的细胞分裂抑制作用可通过口服 Biolactis® 粉予以消除。研究者认为，口服 Biolactis® 可以调节携瘤小鼠的 T 细胞功能，并激活全身的免疫反应。

Hashimoto 等报道，腹膜注射 LC9018 可以增加氧游离基的产生、抑制腹膜巨噬细胞对前列腺素 E2 (PGE2) 的表达。腹膜注射的 Meth A 纤维瘤的生长也可以通过腹膜注射 LC9018 得到抑制。通过静脉途径注射 LC9018 可以刺激已固化的巨噬细胞产生氧游离基，

并抑制 *Listeria monocytogenes* 在肝内的生长。而且, 在 i. v. 注射 LC9018 后, 肝脏内 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性显著地提高 (提高 10~20 倍), 而且 i. v. 注射 LC9018 对氧游离基产生的增强作用更加明显, 时间更持久。Hashimoto 等在体外及体内研究了由 LC9018、*Corynebacterium parvum* 或蛋白胨诱导的腹膜巨噬细胞对肿瘤细胞的影响, 以及作为免疫刺激剂在释放细胞抑制因子 (CF) 方面的作用。研究者认为, 被激活的腹膜巨噬细胞对细胞抑制因子 (CF) 的释放是受到某些肿瘤细胞、糖或细菌免疫刺激剂的作用, 肿瘤或细菌细胞表面的 D-甘露糖和 L-鼠李糖在促进被激活的巨噬细胞释放细胞抑制因子的过程中可能有重要作用。

Nanno 等研究了给小鼠注射 LC9018 对巨噬细胞集落形成细胞 (M-CFC) 数量以及血清集落刺激活性 (CSA) 的影响, LC9018 能增加正常 BLAB/C 小鼠股骨以及脾脏 M-CFC 的数量, 其最大值分别在注射 LC9018 几天或者一周后出现。LC9018 还能增加 C3H/HeJ 小鼠以及 C3H/HeN 小鼠体内 M-CFC 的浓度; 而 LPS 则不同, 它在 C3H/HeJ 小鼠体内无此作用。在携带 Meth A 瘤的 BLAB/C 小鼠体内, LC9018 能抑制肿瘤细胞的生长, 提高股骨以及脾脏 M-CFC 的数量。与 LPS 相似, LC9018 也能诱导血清粒细胞的巨噬细胞 CSA 活性。将注射 LPS 后所获得的血清转移到正常小鼠体内后, 能增强股骨以及脾脏 M-CFC 的数量; 然而, 注射 LC9018 所获得的血清则不具有这种作用。这些结果显示, LC9018 对骨髓细胞分化 (myelopoiesis) 的调节作用至少在 M-CFC 增殖阶段是与 LPS 以不同方式进行的, 而这种区别可能与 LC9018 的抗肿瘤作用相关。

Shimizu 等发现 23 株乳杆菌 (13 个种、23 个不同菌株) 在抗肿瘤活性方面以及通过静脉途径注射后增强小鼠血清 CSA 活性方面存在广泛的差异, 而且这两种作用之间存在极好的相关性。对 LC9018 促进 CSA 产生的机理以及 CSA 在 LC9018 抗肿瘤活性中所起的作用也有研究。腹膜注射 3 至 24 小时后, 小鼠腹腔冲洗液中 CSA 活性增高, 而且在 LC9018 注射 6~12 小时后小鼠血清中 CSA 活性也出现上升。受到 LC9018 刺激后, 负责 CSA 产生的细胞似乎与注射部位原有的巨噬细胞有关, 因为在 LC9018 腹膜注射 1 小时后, 从腹膜部位冲洗下来的巨噬细胞在体外可释放出 CSA 活性, 而且正常小鼠腹膜固有的巨噬细胞在体外与 LC9018 一起培养时也可释放 CSA。在无胸腺的裸鼠内也可得到类似的结果, LC9018 对 CSA 的诱导作用在那些接受卡拉胶预处理的小鼠内消失, 而后者对成熟的巨噬细胞具有选择毒性。将骨髓细胞与 LC9018 诱导产生的 CSA 共培养 7 天后, 骨髓细胞可成熟为巨噬细胞和多型核细胞。这些成熟的巨噬细胞在体外及体内具有强烈地抗肿瘤作用。以上结果表明 CSA 在 LC9018 的抗肿瘤作用中扮演着重要的角色。

Matsuzaki 及其同事阐明了 LC9018 抑制肿瘤转移的分子机理。他们发现, C57BL/6 小鼠在皮下接种 Lewis 肺癌 (3LL) 后, 如果给小鼠静脉注射 LC9018, 则可以有效地抑制肿瘤向肺部转移。在 3LL 携瘤小鼠的病灶部位注射 LC9018 同样可以有效地延长小鼠的存活时间及抑制肿瘤向肺部转移。在手术切除初级肿瘤前或后, 如果同时采用病灶部位和静脉注射 LC9018 的措施可以显著地抑制再次接种的肿瘤向肺部转移。在皮下接种肝癌-10 瘤细胞株并形成肿瘤的豚鼠内 (品系 2), 通过向病灶部位注射 LC9018 可使肿瘤发生消退, 并诱导系统性抗肿瘤免疫。给小鼠胸膜注射 LC9018 可诱导胸部渗出细胞 (TEC) 数量的增加, 早期的 TEC 细胞中以多核型白细胞为主, 而晚期则主要以巨噬细胞为主。此外, 胸膜注射 LC9018 可以增强 TEC 在体外对 3LL 瘤细胞的裂解作用以及自然杀伤细胞活力。这些结果表明, 在携带 3LL 的小鼠中, 由胸膜注射 LC9018 诱导产生的 TEC 在抑制肿瘤的转移方面

有重要作用。

Asano 等也指出,无论是通过口服或静脉注射 LC9018 (活菌/热灭活细胞),都可强烈地抑制可移植性鼠膀胱瘤的生长,并减少向肺部的转移。对于一株具有高转移性的 B16 黑色素瘤变异株 B16-BL6 而言,在手术摘除 C57BL/6 小鼠体内 B16-BL6 所形成的初级瘤体以前,LC9018 对 B16 黑色素瘤向腋下淋巴结转移,在手术摘除初级肿瘤后,采用静脉注射 LC9018 可抑制肿瘤向腋淋巴结及肺转移。同时采取病灶或静脉注射 LC9018 的方法也显著地抑制肿瘤向腋淋巴结及肺部的转移。给小鼠前足注射 LC9018 可增强腋淋巴结的自然杀伤细胞活性,与此同时腋淋巴结的胞溶作用也明显增强,然而,将由塑性黏附细胞组成的淋巴结消除后,这种胞溶作用即消失了。此外,静脉注射 LC9018 还可促进肺泡巨噬细胞介导的细胞毒作用。给 BALB/小鼠胸腔接种 Meth A 瘤细胞后会引起肿瘤细胞大量增殖,并最终导致小鼠死于肿瘤所引起的胸液积累。在胸膜接种 Meth A 瘤细胞后给小鼠服用 LC9018 可有效地延长小鼠的生存时间,预先给小鼠进行 LC9018 处理可达到相同的效果。对小鼠采取 LC9018 处理能增加胸膜渗出物细胞 (TEC) 的数量,并增强胸膜巨噬细胞裂解细胞的活力以及 TEC 的自然杀伤细胞活力。此外,胸膜注射 LC9018 还可以提高胸膜巨噬细胞对羊血红细胞的吞噬活力以及 TEC 细胞中 Ia 抗原阳性的细胞数。LC9018 以及淋巴结细胞在抑制 C57BL/6 小鼠体内 B16-BL6 瘤转移中的作用也受到研究,如前所述,B16-BL6 是 B16 黑色素瘤的一种高转移变异株。向小鼠左腹股沟或左腋下区域皮下注射 LC9018 可抑制 B16-BL6 手术切除后向腋淋巴结或肺部转移。向小鼠左腹股沟区域注射 LC9018 可增强左腹股沟淋巴结细胞以及左腋下淋巴结细胞在体外对 B16-BL6 细胞的裂解活性,以上研究结果表明,由注射 LC9018 而被激活的淋巴结细胞在抑制肿瘤转移中有重要的作用,同时 LC9018 处理还可增强宿主的免疫反应。向 3LL 携瘤小鼠的病灶部位注射 LC9018 后,可同时抑制瘤体的生长及向肺部的转移。在进行肿瘤移植前,对小鼠皮下注射 LC9018,效果更加明显。在 LC9018 致敏的小鼠中,如果在致敏之后进行腹膜 LC9018 注射会诱导腹腔中产生高浓度的 IL- α 和 IFN- γ 。与此同时,如果将 LC9018 致敏小鼠脾细胞群中的 T 细胞在体外与 LC9018 (作为抗原) 共培养时,T 细胞会增殖并表达 IL- α 。细胞流量计 (Flow cytometry) 显示这些 T 细胞的表型为 L3T4 和 Ly-2, 2-T。这些结果表明,在 LC9018 致敏以及随后的接触过程中,宿主体内被诱导出一种针对 LC9018 的辅助 T (Th) 细胞,被 LC9018 激活的特异性辅助 T 细胞则产生 IL- α 和 IFN- γ ,后者增强宿主的免疫反应,从而产生抗肿瘤作用。Matsuzaki 等还提出,在经过抗 CD3 或抗 CD8 抗体处理的小鼠中,LC9018 的抗肿瘤作用会被部分抑制;但在经过抗 CD4 抗体处理的小鼠中则不受影响。与此相反,LC9018 对携带 Meth A 瘤的 SCID 或裸鼠几乎不产生任何抗肿瘤作用。以上结果表明,在 Meth A 携瘤小鼠中,CD8+T 细胞参与了长小鼠生存期的延。此外,当检查所产生的细胞因子时发现,在胸膜注射 LC9018 的 BALB/c 小鼠中,INF- γ 和 IL-6 在胸腔渗出液中表达的增加尤为明显。这些结果表明,胸膜注射 LC9018 诱导产生的活性细胞因子使胸膜巨噬细胞活化或使胸膜淋巴细胞转变成细胞毒 T 细胞。因此,胸膜注射 LC9018 对小鼠存活的延长作用依赖于 CD8+T 细胞,而且对 Meth A 携瘤小鼠胸膜注射 LC9018 后可诱导出多种细胞因子,参与随后的免疫反应。

在胸膜移植 Meth A 瘤的 BALB/c 小鼠内研究了 LC9018 和 Adriamycin (阿霉素,ADR) 对恶性胸膜炎的共同作用。对照组的小鼠在胸腔瘤体大量生长以前即死于由胸膜渗出液引发的呼吸困难。在第 1 天和第 5 天胸膜注射 LC9018 (20~200 μ g/鼠) 可减少胸膜渗

出液的量，并且以剂量效应方式诱导对胸膜的黏附。当 LC9018 剂量为 200 μ g/鼠时，观察到小鼠存活时间的明显延长，延长幅度为 15% 至 39%。在第一天胸膜注射 ADR (2~4mg/kg 体重) 也可有效地延长小鼠的存活时间，且不表现出严重的毒性 (ILS 值为 100%~122%)，与单独使用 ADR 相比，同时使用 LC9018 与 ADR 则可诱导高频率的胸膜黏附、延缓胸膜渗出液的积累，而且对小鼠存活时间的延长更为明显 (ILS 值为 133% 至 178%)。在联合治疗组中，可观察胸膜显著而连续的渗出嗜中性粒细胞、巨噬细胞与淋巴细胞，而胸膜瘤细胞的数量则明显减少。研究者认为使用 (胸膜注射) LC9018 增强了 ADR 的疗效，可能是通过宿主介导的杀肿瘤作用以及胸硬化的方式来完成。Watanabe 等报道，8 周的雌性 AKR/J 小鼠如腹膜 (i. p.) 注射热灭活的 *Lb. casei* 细胞，每周两次、连续 8 周后，雌性 AKR/J 小鼠的平均生存时间显著地延长，胸腺增大的现象被明显地抑制；而亲嗜性 (Ecotrophic) 和重组型鼠白血病病毒 (MuLV) 的增殖则被显著地抑制；与此相反的是，在 20 周大的雌性 AKR/J 小鼠中，则观察不到热灭活 *Lb. casei* 的这种作用。腹膜注射热灭活的 *Lb. casei* 细胞可以明显地降低成年雌性 AKR/J 小鼠胸腺无细胞抽提物对新生雌性 AKR/J 小鼠白细胞的分裂作用。热灭活的 *Lb. casei* 细胞对 8 周和 20 周雌性 AKR/J 小鼠免疫辅佐效果的区别在于不同年龄的小鼠受到 *Lb. casei* 作用后，细胞免疫功能的增强产生了差异，结果使亲嗜性和重组型 MuLV 在胸腺中的增殖产生分化，随后引起胸腺淋巴瘤。

Lb. casei 细胞成分在体外对各种人源肿瘤细胞株生长的影响也得到研究。*Lb. casei* 可抑制来源于成人 T-细胞白血病的瘤细胞株 MT-2、MF-4 以及来源于淋巴母细胞白血病的瘤细胞株 Molt-4 和来源于原单核细胞白血病 (Promonocytic) 的瘤细胞株 U-937 的生长，这种作用与长春碱 (Vinbrastin) 的细胞毒作用有明显的区别，后者是一种抗癌药物。采用 Brd U-抗 Brd U 抗体的细胞流量试验表明，经过 *Lb. casei* 处理后，处于 G1+G0 期 (即 DNA 合成前期) 细胞的数量增加，表明 *Lb. casei* 可作为一种低级别的蛋白合成抑制剂。*Lb. casei* 及其细胞壁肽聚糖在体外通过初级细胞毒作用对各种鼠源瘤细胞株 (K562、KB) 存活性具有一定的抑制作用，对这些瘤细胞株采用不同剂量的 *Lb. casei* 或其细胞壁肽聚糖组分处理不同时间后，瘤细胞株在体外的存活性降低 25%~30%。从被处理瘤细胞的琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性、⁵¹Cr 释放能力、ATP 分析和形态学变化可以显示出这种细胞毒作用，免疫学分析可以显示肽聚糖与艾氏腹水瘤细胞或 YAC-1 瘤细胞膜结合的精确比例。*Lb. casei* 及其细胞壁肽聚糖成分在正常的细胞内显示出刺激作用，而对肿瘤细胞则表现出抑制作用。

T 细胞作为一种效应细胞在抗肿瘤免疫中扮演着很重要的角色，LC9018 (*Lb. casei* YIT 9018) 可诱导肿瘤特异性和 T 细胞依赖性的抗肿瘤免疫反应。当 LC 和瘤细胞混合物被注射入小鼠体内后，体内开始产生系统性的抗肿瘤免疫反应，这种抗肿瘤免疫反应是一种细胞性而非体液性或肿瘤特异性免疫反应，效应细胞在其表面表达 Thy1 抗原。为阐明 LC9018 诱导的抗肿瘤作用对 T-细胞的依赖性，Hayashi 等采用抗 CD4 和抗 CD8 的抗体的方法在体内消除了 T 细胞亚群的分化。采用静脉注射抗体消除脾脏 T 细胞以后，然后研究 LC9018 在 T 细胞消除的小鼠内对 Meth A 瘤的抑制作用。当 CD4⁺ T 细胞被消除后，LC 的抗肿瘤作用降低；而当 CD8⁺ T 细胞被消除时则无此现象。CD4⁺ T 细胞在宿主免疫反应中承担着辅助者/诱导者的角色，或许 LC9018 的抗肿瘤作用是通过调节 CD4⁺ T 细胞的功能使之表达细胞因子或诱导杀伤性细胞而完成。

由 LC9018 诱导的 T-细胞依赖性抗肿瘤作用与巨噬细胞激活之间存在联系。在实验动物

中，T-细胞依赖性抗肿瘤反应是通过采用失活瘤细胞进行免疫来诱导的。当被丝裂霉素处理的 Meth-A 瘤细胞 (MME-MethA) 被灌喂到腹腔后，腹腔内出现携带有 Thy1 的抗肿瘤活性 T 细胞。另一方面，主要组织相容性抗原 II (MHC 抗原 II) (在小鼠内为 Ia 抗原) 对于抗原决定细胞与 T 细胞之间的相互作用是必需的。拥有 Ia 抗原的细胞在诱导抗原特异性 T 细胞中扮演着辅助细胞的角色。在注射 LC9018 后，腹腔内出现能表达 Ia 抗原的巨噬细胞。这一诱导现象在注射 LC9018 后第七天，无论是量还是质均达到最高峰，而这一诱导过程正好与由 T 细胞介绍的抗肿瘤免疫反应吻合；如果向体内注射抗 Ia 抗体，则这种抗肿瘤作用消失，这一结果表明，LC9018 对巨噬细胞的激活是产生 T-细胞介导的抗肿瘤免疫非常重要的一步。可以这么推断，在 LC9018 的抗肿瘤作用中，T 细胞促使肿瘤特异性抗肿瘤活性的形成，而 LC 对巨噬细胞的激活则直接起到杀伤肿瘤细胞和诱导 T 细胞介导的抗肿瘤作用的产生。

(七) 肿瘤的生物疗法

在一项由 68 名患白血病或实体瘤的儿童参与的随机临床试验中研究了 co-trimoxazole 和乳杆菌联合治疗对预防肠道污染的效果。在 33 例嗜中性白细胞减少的病例中使用 co-trimoxazole，而另外 35 名儿童患者则给予抗生素与乳杆菌。结果发现，两组患者在病理生物学、嗜中性白细胞减少的严重性以及感染的发病率之间具有可比性。在嗜中性白血细胞减少期间，两组之间感染的发病率没有显著的差异，嗜中性白血细胞减少症恢复所需时间的平均值及范围也没有区别。co-trimoxazole 和乳杆菌联合治疗方案可被患者很好地耐受，未出现恶心和呕吐、拒绝药物治疗，剂量减少或更换治疗方案的情况。研究者认为采用 co-trimoxazole 和乳杆菌联合治疗可改善患者在嗜中性白细胞减少期间的生存质量。

24 名患恶性妇科肿瘤、准备进行骨盆部位内部及外部放射治疗 (骨盆剂量 5000-cGy) 的女性患者被选择参加一项评估 *Lb. acidophilus* 活菌对减少放射治疗所引起的肠道副作用的研究，患者被随机地分成两组，两组患者在放射治疗期间均接受由医生推荐的低脂与低残留物的饮食。其中对照组仅接受推荐饮食，而试验组除推荐饮食之外，另外接受 150ml 含有 2×10^9 (cfu) *Lb. acidophilus* 活菌与 6.5% 乳果糖 (乳酸菌的发酵底物) 的发酵乳试制品。结果表明这种发酵乳试制品似乎能预防由放疗引起的腹泻，不过，试验组患者的胀气现象增加了，可能是由于乳果糖摄入的缘故。

对 III 期宫颈癌采用单独放射治疗的失败率非常高，因此通常会采用一些其他形式的治疗作为放射治疗的辅助手段。在 61 名 IIB 或 III 期宫颈癌的患者中进行的一项随机，设有对照组的研究评估了经热灭活的 LC9018 与放射治疗联合使用的临床效果。在采用累积剂量为 15GY 和 30GY 外部照射时与仅采用放射相比，采用 LC9018 的联合治疗措施在促使肿瘤消退方面有明显的效果 ($P < 0.05$) 组织学检查也证实 LC9018 确实提高了放射治疗的效果。LC9018 似乎可以防止患者在放疗过程中出现白血球减少。该研究初步证明 LC9018 与放射治疗联合使用时，LC9018 是一种有效的免疫治疗剂。在 okawa 等进行的另一项随机，没有对照组，比较性临床试验中，在 228 IIB 期宫颈癌患者中研究了热灭的 LC9018 的生物反应调节作用。当外部照射剂量达到 30GY 及外部放射治疗结束时，LC9018 可促进肿瘤的消退 ($P < 0.1$)。与仅采用放射治疗的患者相比，采用 LC9018 与放射联合治疗的患者的存活时间更长，无复发的间隔也更长 ($P < 0.05$) 对存活时间采用考克斯比例风险模型 (Cox proportional hazard model) 分析表明，使用 LC9018 是一种使存活时间延长的显著性因子。而且，与单独采用放射治疗的患者相比，在采用 LC9018 联合治疗的患者中由辐射

引起的白血球减少的严重程度明显降低，这一结果表明 LC9018 在放射治疗过程中可阻止白血球减少。该研究的结论是，LC9018 是一种可与放射治疗联合使用的有效的免疫治疗剂。

Aso 和 Akazan 在浅表膀胱癌患者中进行了一项随机、设有对照组的临床试验，用于评估 Biolactis[®] 粉（一种口服 *Lb. casei* 制剂，3g/d）的安全性以及在跨尿道切除膀胱癌（TUR-Bt）后防止肿瘤复发的作用，总共有 58 名患者参与了该试验，其中 33 人被分到 Biolactis[®] 组，另外 25 人为对照组。从总体而言，两组患者的治疗效果不存在显著性差异。采用 Kaplan-Meire 方法对无病持续周期分析表明，与对照组相比，在 TUR-Bt 后采用 Biolactis[®] 治疗的患者 50% 不出现肿瘤复发的时间延长了 1.8 倍（Biolactis[®] 组 380 天 Vs 对照组 195 天），经过时序检验（Log-rank test）发现两组之间存在显著的差异（ $P=0.03$ ），未发现到不良副反应。这一结果表明口服 Biolactis[®] 可有效地防止浅表膀胱癌复发。

Aso 等在 138 名膀胱癌患者中进行了一项双盲试验，来评估 Biolactis[®] 对膀胱癌复发的预防作用。患者首先根据病情被分为三个组：（I）原发性多瘤体组；（II）复发性单瘤体组；（III）复发性多瘤体组。每个组内的患者被随机指定接受 Biolactis[®] 或安慰剂。在组 I 和 II 中，Biolactis[®] 比安慰剂具有更好的预防复发的作用，而在 III 组中则不存在显著地差异。Cox 多变量分析表明，由 Biolactis[®] 产生的作用要明显优于安慰剂（ $P=0.01$ ）。在所有试验组中，无论是接受 Biolactis[®] 还是安慰剂，患者均出现轻微可耐受的副作用，该研究表明，口服 Biolactis[®] 粉是安全的，而且可以有效地防止浅表膀胱癌的复发。

九、其他生理功能

（一）对骨质疏松症的改善作用

与牛奶一样，酸奶对于低血钙大鼠而言，是一种优良的钙的来源，在牛奶中钙与酪蛋白形成复合物，而酸奶中钙主要与乳酸形成复合物。已有研究表明，酸奶有助于治疗老年性骨质疏松。然而，关于这种健康作用的机理还不清楚，主要是由于钙摄入与骨质疏松之间的关系还没有弄清楚。在断乳后的大鼠体内，乳糖可以通过非选择性地促进二价离子（包括 Ca^{2+} ）的被动扩散而增加小肠远端黏膜的通透性。然而，其他的研究表明，在人体内乳糖对钙吸收的促进作用是一种更加复杂的现象。在乳糖不耐受患者体内，乳糖会降低肠道对钙的吸收；而对于乳糖耐受（正常）的人群，乳糖对钙的吸收具有促进作用。然而，Smith 等（1985）发现体内乳糖酶活力低下人群对酸奶和牛奶中的钙能良好吸收。很显然，要解释这些相互冲突的结论需要更深入的研究，引人瞩目的是，在骨质疏松患者中乳糖酶缺失的个体占多数。

（二）营养强化作用

食品经过乳酸菌发酵以后，食物中营养成分的质量、可生物利用和消化性都会提高，与牛奶一样，发酵乳是蛋白质、核黄素、叶酸和钙的优良来源。这一结论的依据是直接测量发酵乳制品中维生素的合成情况以及这些发酵产品饲喂动物后饲料转化率增高，研究表明，乳酸菌的发酵作用可增加多种产品，如酸、双歧杆菌发酵乳、开菲乳中叶酸的含量。此外，还有研究表明发酵作用可增加酸奶中烟酰胺、核黄素、在农家干酪中 B_{12} ，在契达干酪中 B_6 、泛酸的浓度。此外由乳酸菌生产的发酵制品中硫胺素和核黄素的含量也会增加。

（三）合成维生素

在发酵乳制品中，多种乳酸菌能合成某些 B 族维生素增加的情况，Reddy 等研究了影响发酵型酸奶中 B 族维生素合成的因素，并对发酵型酸奶与调配型酸奶中 B 族维生素的含

量进行了比较。接种酸奶菌种以后，在 42℃ 培养 3 小时，维生素的合成达到最大值，同时出现的是最佳风味和质构。与发酵型酸奶相比，调配型酸奶中某些 B 族维生素的含量略高，无论是调配型酸奶还是发酵酸奶都具有良好的保存性能，能在 5℃ 保存 16 天而不发生污染。然而，在保存过程中，在调配型酸奶和发酵型酸奶中，叶酸和 VB₁₂ 的含量分别下降 48% 和 54% 或 29% 和 60%。

Leim 等发现在市售的 Tempeh（一种发酵豆制品）中，VB₁₂ 主要来源于在该产品发酵过程中与霉菌共生的一种乳酸菌。将该乳酸菌纯化后，重新接种到去壳、浸泡与杀菌后的大豆以后，结果大豆中 VB₁₂ 的浓度增高，类似地，在一种印尼发酵食品 Ontjom 中，VB₁₂ 的浓度比发酵基料中的浓度要显著增加。

Lb. casei 和 *E. faecalis* 可积累叶酸，并将其代谢成聚-γ-谷氨酸，其聚合度可分别高达 11 或 5。在 *Lb. casei* 的代谢产物中，以八聚一或九聚谷氨酸为主；而在 *E. faecalis* 中则以四聚谷氨酸为主，对 *Lb. casei* 或 *E. faecalis* 的叶酰聚-γ-谷氨酸合成酶（folylpolyglutamate）最有效的单体谷氨酸底物分别是亚甲基四氢叶酸或甲酰四氢叶酸。

Nair 和 Noronha 在体外研究了从 *Lactobacillus leichmanni* 来源的叶酰聚谷氨酸合成酶对叶酰聚谷氨酸的合成作用以及酶作用的最佳条件。ATP 是叶酰聚谷氨酸合成过程中的限速因素，而同型半胱氨酸则可以促进合成作用，*Lb. leichmanni* 在合成聚谷氨酸时聚合度最高可达到 4，而肠道正常菌群发育所必需的乳清酸，在发酵乳中的浓度会减少 18% 到 48%，这种降低可能对机体健康有利，已发现乳清酸可引起大鼠脂肪肝。

（四）营养竞争

非土著微生物从消化道被排出主要是由于营养竞争而引起的，这一假设的依据来源于在一系列研究所观察到的现象。这些现象表明，肠道对肠道菌群的控制过程与恒化器理论非常相似。营养物质的缺失与还原势能的降低将导致竞争性的拮抗作用。在农家干酪的表层涂上一层含有 *Lc. lactis* ssp. *lactis* var *diacetylactis* 的奶油可以延长产品的货架期，其原因在于该菌的生长可竞争性地抑制其他腐败菌的生长。在生产农家干酪会经常采用这一措施，以最大限度地延长产品保质期。Iandolo 等观察到通过营养物质消除，*Lc. lactis* subsp. *lactis* var *diacetylactis* 能抑制 *Staphylococcus aureus*；而 Haines 和 Harmon 则发现乳酸菌对其他细菌生长的抑制作用来自于它们对生长所必需的某些维生素，如烟酰胺和生物素的竞争。体外试验结果表明，肠道微生物在体外对单体性葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺和唾液酸（Sialic Acid）等存在于肠内容物中的营养成分的竞争能力比 *Clostridium difficile* 等致病菌要高的多。当同时存在于牛肉熏香肠中时，*Pediococcus acidolactici* LB42 可以使 *Listeria monocytogenes* 生长所需的营养成分缺失而抑制后者的生长。

当 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 同时存在时，*Bifidobacterium breve* 更倾向于运输以亚铁形式存在的铁离子，其对 Fe²⁺ 的运输可采用一种与浓度依赖性（相关）直至饱和的方式进行。铁离子运输的最适 pH 为 6.0，对温度具有高度敏感性。在 *B. breve* 中存在两种铁离子运输体系，其表观 K_m 分别为 86±27 和 35±20μM，一种作用于高铁离子浓度，而另一种则在低铁离子浓度时发挥作用。铁离子螯合剂、一种蛋白质离子载体、与 ATPase 抑制剂可以抑制铁的吸收，而钾离子载体则可促进铁的吸收。已经分别在 *B. breve* 发酵后所分离的菌体部分以及发酵上清液中分离到一种 Fe³⁺ 还原酶，双歧杆菌对铁离子的摄取与营养免疫现象有关，有可能导致环境中铁离子受限，从而抑制肠道中多种细菌的生长。

第五节 益生菌的应用

一、腹泻的预防与治疗

对腹泻的治疗是目前益生菌研究得最深入、也可能是应用最广泛的领域。Elmer 总结了自 1966 年到 1995 年间关于摄食乳酸菌在预防和治疗成人肠道感染方面的作用,重点讨论乳酸菌对这类疾病危害性及病程的影响。Saavedra 也总结了在设有安慰剂组的研究中关于使用益生菌在降低二次腹泻性疾病方面的安全性与功效性。现有的研究结果表明,采用某些特定的乳酸菌来治疗和预防部分肠道疾病、甚至是生殖道感染是非常有效的。为了有效地降低对抗生素的依赖性,充分发挥益生菌在临床治疗作用已受到广泛重视。

有少数益生菌对微生物或非微生物病因引起的胃肠疾病的预防和治疗作用已在临床上被广泛研究。其中尤其以对 *Lactobacillus rhamnosus* GG 的研究最为全面(见表 2-14)。

表 2-14 *Lactobacillus rhamnosus* GG 在临床上对消化道功能的作用

效 果	参 考 文 献
对多种肠道致病菌产生广谱抗菌作用	Silva 等,1987
预防旅行者腹泻、降低发病率	Okasanen 等,1990
防止抗生素(红霉素)-诱导的腹泻	Siitonen 等,1990
减少急性腹泻的病程	Isolauri 等,1991
降低甘胆酸水解酶和胰酶活性	Ling 等,1992
能在人消化道存活/暂时性定殖	Goldin 等,1992
在轮病毒腹泻中增加循环系统中抗体分泌细胞的数量	Laila 等,1992
不影响体内具有重要营养价值的短链脂肪酸的产生	Stansbridge 等,1993
逆转牛乳所引起的肠通透性增高(减缓牛乳过敏)	Isolauri 等,1993
降低大肠内水解和还原性酶的活力	Ling 等,1994
为内毒素血症或乙醇诱发的肝损伤提供一种无毒的治疗措施 ¹	Nanji 等,1994
调整肠道菌群平衡	Isolauri 等,1994
刺激轮病毒特异性 IgA 的分泌,防止病毒复发感染	Kaila 等,1995
在轮病毒口服疫苗中产生免疫刺激作用	Isolauri 等,1995
促进非血样性腹泻的康复	Raza 等,1995
有效治疗轮病毒引起的急性胃肠炎	Majamaa 等,1995
能在婴儿体内有效定殖并被婴儿耐受	Sheen 等,1995
不分解黏膜糖蛋白	Biller 等,1995
干扰 DMH 诱发的肠肿瘤的发生与恶化 ^a	Goldin 等,1996
在 Crohn 综合症患者中促进 IgA 介导的免疫反应	Malin 等,1996
下调由牛酪蛋白所引起的抗-CD3 抗体诱导的 IL-4 的表达	Sutas 等,1996
降低青少年慢性关节炎患者粪便中胰酶活性	Malin 等,1996
产生对淋巴细胞增殖具有抑制作用的物质 ^b	Sutas 等,1996
对 <i>Salmonella typhimurium</i> C5 感染产生拮抗作用 ^c	Hudault 等,1997
减缓肠道炎症,防止特异性皮炎和食物过敏	Majamaa & Isolauri,1997
与口腔补液(OR)联合治疗,缩短水样性腹泻的病程	Shornikova 等,1997
可作为治疗 <i>Candida albicans</i> 感染引发疾病的潜在生物治疗剂 ^a	Wagner 等,1997
儿童温和性腹泻时,减少病程与病毒分泌	Guarino 等,1997
与培养基中的黄曲霉毒素 B1 结合,并将其从培养基中移除 ^c	El-Nezami 等,1998

注: a. 从实验动物模型获得的数据;

b. 在体外细胞培养系统中获得的数据;

c. 在体外实验室培养基中获得的数据。

(一) 婴儿腹泻

1989 年,在智利进行了一项关于酸化婴儿配方对腹泻和细菌规避效果评估的研究,参

与试验的 82 名婴儿在 6 个月内每天被喂食一种名为 Pelargon® 的婴儿配方产品，这是一种采用 *L. helveticus* 和 *S. thermophilus* 进行发酵后的婴儿配方牛乳粉，对照组的 104 名婴儿则每天喂食相同配方但未发酵的产品。所有的婴儿在开始参与试验时年龄都小于 1 周岁，而且在身高和体重方面超过全国健康统计中心 (NCHS) 平均值的 80%，在实验开始前 2 周内不曾接受抗生素治疗、身体健康。在实验过程中尽管有些儿童不喜欢这种发酵配方产品的口味，但两组儿童的营养状况还是令人满意的，未观察到明显的副作用。该研究的重要之处在于，在年龄小于 12 个月的婴儿人群中证实了这种乳杆菌发酵制品的安全性与耐受性。

非特异性慢性腹泻是引起婴儿长期腹泻最常见的原因之一。其病理学特征是婴儿每天肠运动频率增加，排出的粪便属半成形的；它与营养吸收不良或肠道感染没有关系，而更像是由于饮食不平衡及肠道菌群的改变所引起。Roggero 在一项设有对照组的随机单盲人体试验中，测试了市售晶形乳果糖和乳糖酶在恢复肠道菌群中的作用，共有 24 名（平均年龄 21.76 月）非特异性慢性腹泻儿童参加了该试验。受试者分成不同的年龄段，然后随机分成两组，每组 12 人，第 I 组接受乳果糖 (Laevolac Crystals, BBR) 治疗，第 II 组接受冻干的 Lactipan®，连续 15 天。在试验结束时，所有患者的肠功能紊乱症状完全消退。当治疗结束时，接受乳果糖的儿童其粪便成型性更好。只有第 I 组儿童在接受治疗后，其粪便 pH 值显著地降低；而第 II 组儿童在治疗过程中 H₂ 的呼出基本消失，这可能也是由于大肠 pH 值降低的结果。根据以上结果，研究者认为两种治疗方案都有效。

1990 年，世界卫生组织在阿尔及利亚进行一项饮用发酵乳对儿童顽固性腹泻治疗作用的研究。3~36 个月的儿童在为期 5 天的试验中随机地接受婴儿配方乳或发酵乳。发酵乳是以婴儿配方乳为基料，添加含有 *S. thermophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 的冻干菌种发酵。所有的儿童同时还进食补水液和复合米粉，然后观察上述临床治疗方案的失败情况，对失败治疗方案的界定为：在 24 小时内体重损失 5%、在 3 天内体重不增长或经过 5 天治疗后仍出现水样性粪便，在接受婴儿配方乳或酸奶的试验组中，治疗方案的失败率分别为 42% 和 14%，两者差异显著 ($P < 0.05$)。

在 1992 年发表的一项研究成果中，Kaila 报道 *Lb. rhamnosus* GG 对 7~37 月（平均 16 个月）儿童急性腹泻的治疗效果。所有的儿童在入院后均保持良好的营养供给，在接受补水治疗后，这些婴儿将接受两种饲喂方案中的一种。方案 I 是一种含有 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu *Lb. rhamnosus* GG 活菌的发酵乳，方案 II 则是对上述含有 LGG 的发酵乳经过巴氏消毒，其中乳酸菌的活菌数少于 10^3 cfu。结果在这两种治疗方案之间未观察到在生长，耐受性以及腹泻复发率之间的显著差异。

Touhami 在一项随机的临床试验中评估了以酸奶替代牛乳作为惟一治疗手段在治疗婴儿顽固性腹泻方面的临床功效。78 名 3~36 个月患有顽固性腹泻 ($15 < \text{病程} < 30$ 天，便血试验阳性) 的婴儿被随机分为牛乳组 (婴儿配方) 和发酵酸奶组 (采用 *S. thermophilus* 和 *Lb. bulgaricus* 对婴儿配方进行发酵而成)。在接受酸奶的婴儿中，临床治疗失败率 ($15\% \pm 6\%$) 要明显低于牛乳组 ($45\% \pm 8\%$)，接受酸奶的婴儿在试验开始后 48 小时以内， $67\% \pm 8\%$ 的婴儿的临床症状有明显好转。因此，Touhami 等认为，在顽固性腹泻的早期治疗中，酸奶可能是一种比较好的选择。

Millar 等则研究了采用流汁方式喂食乳杆菌对早产婴儿的影响。该研究是在 20 名平均体重为 1500 克的早产婴儿中以随机、双盲的方式进行，婴儿被随机地分为接受含有 LGG 牛乳组及不含 LGG 牛乳组。临床评估的指标包括体重，饲喂的不耐受性、肛周皮疹以及粪便

式样, 在所有这些指标中, 两组婴儿之间不存在显著性的差异。尽管研究者并未提到饲喂 LGG 对婴儿健康的改善作用, 但有一点很重要, 它证实了 LGG 在早产婴儿中是安全的。

1994 年, Saavedra 在一项临床试验中, 估评了补充益生菌的婴儿配方在预防腹泻与规避轮病毒方面的作用, 受试者包括 5~24 个月长期接受入院护理的婴儿, 受试者随机分为两个饲喂组: I 组接受以酪蛋白为主的婴儿成长配方粉, 其中补充 *B. animals* 和 *S. thermophilus* (10^8 cfu/g) ($n=29$); 另一组的婴儿成长配方粉中不添加这两种乳酸菌 ($n=26$)。研究者最后的结论是在整个试验过程中, 这两组婴儿都保持或改善了其营养状况, 测试结果表明两组婴儿均生长良好。

Tojyo 给 133 名被 *Campylobacter enteritis* 感染的儿童患者服用 *Bifidobacteria breve* 制剂后 (3×10^6 个细胞/克), 这种益生菌能有效地排除体内的 *C. jejuni*, 使肠道菌群恢复正常。这一临床研究结果表明, 含有 *B. breve* 的酸奶对感染性腹泻可能有一定的治疗效果。

Langhendries 对一种含有益生菌的发酵婴儿配方产品进行了临床研究, 该发酵婴儿配方是采用能适应低磷酸盐乳清的 *L. helveticus* 和 *S. thermophilus* 发酵后, 添加活的双歧杆菌 (10^6 cfu/g) 制成。在双盲试验中, 一组婴儿采用补充有益生菌的配方喂养 ($n=20$), 一组婴儿采用未经过发酵、但添加有 *L. helveticus* 和 *S. thermophilus* 的配方喂养 ($n=20$), 另一组婴儿仅采用母乳喂养 ($n=14$), 然后, 比较其生长情况。研究者得到的结果是含有益生菌的配方更易被婴儿接受, 耐受性更好, 人体数据表明三组婴儿的生长情况都表现正常。

Majamaa 则研究了多种乳酸菌对急性腹泻的治疗作用。受试人群由 49 名年龄 4 至 35 个月入院治疗的儿童 (平均年龄 18 ± 9 月) 组成, 在经过标准的口服补水 (rehydration) 治疗、恢复与年龄相适的正常饮食后, 这些儿童在随后为期 5 天的试验中随机接受三种乳酸菌制剂中的一种 (一日两次): I 组 ($n=16$) 给予 LGG 冻干粉 (5×10^9 cfu/人); II 组 ($n=14$) 给予 *Lb. rhamnosus* (研究结果发表时的名称, 应为 *Lb. rhamnosus*) (2.2×10^8 cfu/人); III 组 ($n=19$) 给予 *S. thermophilus*、*Lb. bulgaricus* 和 *Lb. casei* ssp *rhamnosus* 的混合物 (2.8×10^9 cfu/人)。结果表明, 在婴儿的饮食中添加上述乳酸菌是安全的, 而且能被婴儿很好地耐受。同时, 从该试验的结果来看, 在不同的菌株之间, 对急性腹泻的治疗效果存在差异。

Raza 等在因腹泻入院治疗的儿童中进行了一项设有安慰剂组、以三盲方式进行的临床试验, 以确定 LGG 对儿童急性腹泻的影响。40 名 (平均年龄 13 个月) 受试儿童在进行补水治疗后, 在正常的饮食之外, 口服 LGG ($n=21$) 或安慰剂 ($n=19$), 连续两天。在采取上述治疗方案后, 观察腹泻的临床进程。在接受 LGG 的儿童中, 呕吐及腹泻的频率较安慰剂组低。非血样性急性腹泻受试者 ($n=32$) 经过治疗 48 小时后, 在接受乳杆菌的儿童中出现顽固性水样腹泻的比例要明显低于安慰剂组 (30% vs 75%, $P < 0.01$), 而对于那些便血性腹泻患者, 到 48 小时后未观察到显著的差异。

在泰国也进行了一项设有安慰剂组, 以三盲方式进行的小范围临床试验, 以确定 LGG 对急性婴儿腹泻恢复过程的影响。39 名 (平均年龄 8 个月) 入院的婴儿在接受补水治疗后, 要么一日两次口服 LGG 的冻干粉 ($n=20$), 要么口服安慰剂 ($n=19$), 连续 2 天。两组的临床表现基本相似, 两组所观察到的临床反应无显著性的差异。如果仅考虑那些未便血急性腹泻 ($n=26$) 患者的话, 则接受 LGG 的患者腹泻的平均持续时间 (1.9 天) 要明显低于安慰剂组 (3.3 天) ($P < 0.055$)。在第 2 天接受 LGG 的受试者排便的频率明显低于安慰剂组 ($P < 0.05$)。该研究表明, LGG 可促进婴儿急性水样性腹泻的恢复。

(二) 旅行者腹泻

对那些去发展中国家的旅行者而言, 腹泻是其遇到的主要的健康问题之一, 尽管其病症局限于个人, 而且在大多数情况下, 无需采用任何特殊形式的治疗措施即可恢复, 但由于发病率很高, 仍然需要寻找安全而有效地预防和治疗措施。抗生素是一种有效的预防措施, 但一般不建议大量使用, 而益生菌则是一种廉价而安全的替代措施。利用益生菌来治疗旅行者腹泻的临床研究已进行多次, 部分利用乳杆菌的试验获得了负结果, 而在另外 4 项利用其他乳酸菌的研究中则取得了肯定性的结论 (表 2-15)。Black 等将 94 名到埃及旅行 2 周的丹麦旅游者随机分为两组, 一组给予 *Lb. acidophilus*、*Lb. bulgaricus*、双歧杆菌和 *S. thermophilus* 的混合物, 对照组则给予安慰剂。结果发现, 接受乳酸菌的旅行者患腹泻的比率明显低于安慰剂组 (43% vs 71%) ($P < 0.001$)。在另一项随机双盲试验中, Oksanen (1990) 发现 LGG 可减少到土耳其旅游的西方旅行者腹泻的发病率, 不过仅对到其中一个城市的旅行者有显著的作用。在另外一项使用该菌株对 400 名美国旅行者的试验中, 有 155 旅行者因为拒绝服用该乳杆菌制剂被排除, 在旅游期间, 那些接受 LGG 胶囊的旅行者中每天发生腹泻的几率为 3.9%, 而不接受 LGG 的旅行者则为 7.4% ($P = 0.05$)。

表 2-15 益生菌对旅行者腹泻的预防与治疗作用

益生菌制剂的组成	治疗效果(试验组对安慰剂组腹泻发病率)	样本数(N)	参考文献
<i>Lb. acidophilus</i> + <i>Lb. bulgaricus</i>	35% vs 29%(无意义, NS)	50	Pozo-Olano et al., 1978
乳杆菌	55% vs 51%(NS)	212	Kollaritsch et al., 1983
<i>Lb. fermentum</i> KLD	23.8% vs 23.8%(NS)	282	Katellaris et al., 1995
<i>Lb. acidophilus</i> (未指明菌株)	25.7% vs 23.8%(NS)	282	Katellaris et al., 1995
乳杆菌+双歧杆菌+链球菌	43% vs 71%($P < 0.001$)	81	Black et al., 1989
<i>Saccharomyces boulardii</i> ^①	28.7% vs 39.1%($P < 0.05$)	1016	Kollaritsch et al., 1993
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	41.0% vs 46.5%($P = 0.065$)	756	Oksanen et al., 1990
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	3.9%/天 vs 7.4%/天($P = 0.05$)	245	Hilton et al., 1997

① *Saccharomyces boulardii* 是一种非乳酸菌类的益生菌, 对旅行者腹泻、抗生素诱导的腹泻等肠道异常症有一定的作用。

(三) 抗生素治疗诱导的腹泻 (AAD)

在采用抗生素治疗时, 会扰乱肠道菌群的正常组成。因此, 腹泻是抗生素治疗中一种非常普遍的副反应。在住院治疗的患者中有 29% 以上的人会出现 AAD, 其后果是住院时间延长、医疗费增加、其他医院性感染疾病的发病危险增加 5 倍, 且这些疾病的死亡率提高 3 倍。尽管所有的抗生素治疗都可能引起腹泻, 但在导致腹泻方面作用最强的是青霉素、克林可霉素 (Clindamycin), 头孢霉素和氨苄西林 (ampicillin)。对于氨苄西林而言, 其导致腹泻的部分原因是由于它对大肠菌群和 *Bacteriodes fragilis* 具有更强烈的抑制作用。腹泻的症状从比较温和、能自愈的腹泻到非常严重的假膜性肠炎 (PMC) 不等, 后者是由 *C. difficile* 引起的。AAD 的病理学原因是抗生素治疗引起正常菌群紊乱、导致其丧失“定殖排斥” (CR) 能力, 在肿瘤化疗的过程中, 化疗也会引起假膜性肠炎 (PMC)。

并非所有 AAD 引起的腹泻都与 *C. difficile* 有关, 由 *C. difficile* 引起的腹泻仅占 AAD 所有病例中的 15%~25%, 但几乎所有 PMC 病例 (99%) 都由 *C. difficile* 引起。除了感染的原因外, 部分 AAD 可能与菌群变化后对碳水化合物的代谢方式发生改变有关。Clausen (1991) 在对 7 名 AAD 患者研究后发现, 这些患者粪便中短链脂肪酸的浓度和产生速率都降低了。由于这些脂肪酸是刺激肠道内电解质和水吸收的成分之一, 其浓度的降低可能引起腹泻。因此, 渗透压性腹泻可能是另外的一种作用机理。

Gotz 等研究了一种乳杆菌制剂 Lactinex[®] 在成人患者中氨苄西林诱导的腹泻的预防作用。98 名患者采取双盲法随机地分为两组，在氨苄西林治疗的最初 15 天内，每次服用一包 Lactinex[®] 或安慰剂，一日四次。对于发生腹泻的病例逐一观察，并根据病理学情况进行归类，最后获得了 79 名患者完整的资料（43 名服用安慰剂，36 人服用 Lactinex[®]）。在安慰剂组中有 9 人出现腹泻（21%），而在接受 Lactinex[®] 的患者中仅有 3 人出现腹泻（8.3%）。两者之间的差异不显著（ $P=0.21$, Fisher's Exact test）。当将那些不是由氨苄西林治疗引起的腹泻病例（占总腹泻病例的 50%）剔除后，则在安慰组中氨苄西林引起的腹泻患者的比例（14%）明显高于接受 Lactinex[®] 组（0%）（ $P=0.03$, Fisher's exact test），研究者认为，如果预先服用该乳杆菌制剂可以有效地预防由氨苄西林引起的腹泻。

Siitonen 等研究了 LGG 酸奶对红霉素引起的腹泻的预防作用，16 名健康成年志愿者每天被给予 400mg 红霉素，连续一周。在红霉素治疗过程中，这些志愿者被随机地分为两组，一组每天服用 125ml 由 LGG 发酵的酸奶二次，另一组则服用相同量经过巴氏消毒的普通酸奶两次作为安慰剂。那些接受 LGG 酸奶和红霉素的受试者发生腹泻的比例比饮用巴氏消毒酸奶的受试者低。与巴氏消毒酸奶组相比，红霉素治疗的其他副反应，如腹部不适、胃痛以及胀气等在服用 LGG 酸奶的受试者中较少见。即使在接受红霉素治疗期间，接受 LGG 酸奶的受试者体内也出现了 LGG 定殖，这一点从受试者粪便中 LGG 菌落数可以得到证实，饮用巴氏消毒酸奶的受试者粪便中则检测不到 LGG 的存在。

Amoxycillin（阿莫西林）是一种目前广泛应用于儿童的抗生素，与其他抗菌治疗手段一样，这种抗生素可引起肠道生态系统组成的改变。在一项设有安慰剂的随机临床研究中，评估了各种市售的发酵乳对已经连续口服阿莫西林（平均 10 天）婴儿的影响，40 名婴儿被随机分为两组。组 I 接受抗生素治疗及乳杆菌，组 II 仅接受阿莫西林。试验结束时，组 I 的婴儿排便的频率较低，粪便成形性较好；而组 II 的婴儿患者出现胃肠不适的频率增高，该研究的结果表明，让婴儿口服乳杆菌可以有效地预防由阿莫西林治疗引起的腹泻。

二、尿布性皮炎（DD）的治疗

尿布性皮炎是皮肤受到尿布环境中物理、化学、酶学或微生物学等因素影响出现的一种阶段性疾病，尿布性皮炎在婴儿及低龄儿童中会经常碰到。尽管 DD 的致病过程还不十分清楚，但已找到多种可导致该病的影响因素，如部分个体容易出现过敏性皮炎（atopic dermatitis）或脂溢性皮炎、尿布引起的透气不良与摩擦、细菌与酵母的大量生长等。DD 的发病原因可能是由于皮肤长时间与湿气及细菌接触引起的，在尿布性皮炎中常见的一种致病菌是 *Candida albicans*，而且在病程不超过 3 天的 DD 中都可以发现该菌的存在，在 4 至 15 个月的婴儿中，60% 以上的婴儿每 2 个月会出现一次尿布湿疹。

采用母乳喂养婴儿的粪便 pH 明显低于配方奶喂养的婴儿，研究发现其尿布性皮炎的发病率较低。总体而言，这些婴儿被认为对感染的抵抗力更高，尤其是对致病菌在胃肠道的定殖，其原因是由于乳酸菌产生的各种抗菌物质，如细菌素、乳酸和 H_2O_2 等，粪便的高酸性以及存在对致病菌如 *C. albicans* 的抗菌物质使尿布性皮炎的发病率与流行性降低。

微生物在纤维材料表面的吸附并形成菌膜是引发尿布性皮炎非常重要的一步。Reid 等在体外试验中证实 *S. aureus* 和 *C. albicans* 对市售尿布的纤维具有高度的黏附性。如果在尿布纤维的表面预包埋一层乳杆菌，则 *S. aureus* 的吸附被抑制 26%~97%，*C. albicans* 的吸附被抑制 0~67%。如果用乳杆菌来替代已吸附到纤维上致病菌的话，则 *S. aureus* 的被替代率达到 99%，而 *C. albicans* 的被替代率达 91%。在 5 株被用于预包埋的乳酸菌中，两株憎

水性的 *Lb. acidophilus* 76 和 T-13 对致病菌吸附的抑制最有效，而具有中等亲水性的 *Lb. rhamnosus* GR-1 在替代 *C. albicans* 方面最有效。采用尿道上皮细胞的试验表明，乳杆菌可以显著地干扰这两种致病菌 (*S. aureus* 和 *C. albicans*) 对尿道上皮细胞的吸附，这些实验结果表明，胃肠道和女性泌尿生殖道来源的乳酸菌在干扰尿片性皮肤的形成中可能具有一定的作用。

三、治疗肠道功能异常症

(一) 减少食物过敏

初步的研究表明，益生菌对过敏反应具有缓解作用。某些过敏反应是由于肠道黏膜屏障作用被打乱，导致抗原过度接触而引起。部分益生菌通过提高肠道黏膜的屏障功能而缓解过敏反应，这一作用机理已得到证实。Pelto 等研究了 8 位成人牛乳过敏者（非乳糖不耐受症患者）饮用牛乳或添加 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) 的牛乳后，由受体介导的吞噬作用的变化情况。饮用添加 LGG 的牛乳后，受体表达无明显增加，而饮用纯牛乳后受试者体内受体表达明显增加，表明 LGG 可以抑制由牛乳引起的过敏反应，遗憾的是研究者未对过敏症状的减缓程度进行评估。在 Trapp 等进行的一项为期 12 个月的研究中，采用部分盲测的方法对大学学生及更高年龄人群进行了酸奶及巴氏消毒酸奶的试验，与饮用巴氏消毒酸奶及未饮用酸奶的人相比，在饮用具有活菌酸奶（菌的特性及名称未指出）的人群中，过敏反应的临床症状明显下降；但是在另外一项 15 位痉挛患者饮用酸奶及添加 *Lactobacillus acidophilus* 酸奶的交叉试验中，患者的临床症状没有明显的变化。因此，益生菌对过敏反应的缓解作用还需要进一步证实。

(二) 过敏性肠综合症 (IBS)

IBS 在胃肠炎患者或因肠功能失调而采用抗生素治疗的患者中非常普遍，其主要症状为腹痛、胃肠胀气、腹胀和各种肠功能异常（如便秘、结构性腹泻）甚至消化不良。除心理-生理（心因性）原因外，肠运动失调和大肠内异常发酵也是常见的病因，后者则与大肠菌群组成异常（兼性厌氧的细菌如 *Klebsiella* sp. 和肠球菌数量增加，而乳杆菌和双歧杆菌数量减少）有关。

过敏性肠道综合症 (IBS) 是一种胃肠功能失调症，伴随长期或反复出现的腹痛以及由原因不明的肠结构或生化功能异常引起的排便次数减少与不畅。据估计，在工业化国家 IBS 在人群中的比例可达 15%~20%；而在医院的胃肠疾病护理室内，IBS 在所有患者中的比例可达 20%~50%，一种心因性的 (Psychosomatic) 大肠运动异常与收缩增强了腹痛的程度，尽管如此，引起 IBS 的病源性因素还不清楚。据认为嗜酸杆菌乳可通过恢复肠道菌群平衡而对 IBS 患者有所帮助、而且由于能在体内为乳糖酶患者提供细菌性乳糖酶，因此能被患者较好地耐受。

对恶性骨盆瘤变的化学治疗经常会导致肠功能紊乱，尤其是大肠的下端和直肠，主要的问题是造成由乳糖不耐受、胆盐吸收以及脂肪吸收不良引起的腹泻，在这些异常症中，经常可发现细菌性污染。Henriksson 等在 40 名因骨盆恶性肿瘤接受化疗而导致肠环境慢性改变的患者中，测试了以发酵乳形式存在的乳酸菌对这些肠道异常的作用。结果表明，食用发酵乳产品可以降低慢性肠道不适。在 Salminen 等 (1988) 进行的一项随机、设有对照组的临床试验中，接受骨盆放射治疗的女性服用 *Lb. acidophilus* NDCO 1748 后，可显著地减少因放射治疗引起的腹泻。

Loguercio 将 40 名肝硬化、但未出现肝昏迷的患者随机分为两组，一组每次口服 2 粒

Enterococcus sp. SF60 的胶囊，每日三次；另一组每次口服 30ml 乳果糖 (lactulose)，每天四次。对患者的观察分为 10 天治疗期和 10 天后治疗期。*Enterococcus sp.* SF68 被证明在降低血液中氨的浓度，改善患者精神状态以及提高心理表现等方面与乳果糖一样有效。与乳果糖不同的是，在治疗措施取消后，*Enterococcus sp.* SF68 的作用更持续更久。有部分患者反映在接受乳果糖治疗过程中出现了腹泻和腹痛，乳果糖是目前治疗肝昏迷的标准治疗方法，而 Loguercio 等的研究结果表明，*Enterococcus sp.* SF68 在治疗这类患者时比乳糖更有优势。

(三) 过敏性肠炎 (IBD)

刺激性肠炎是一类病因不明性的肠道疾病，其特征是慢性或复发性肠道发炎，包括溃疡性肠炎、Crohn 综合症、消化道脓袋 (pouchitis) 等，这些炎症的起源和发生过程还不明显。关于其发病机理最基本的观点认为，迁延性肠炎是由于宿主对肠道菌群中的某些成员发生异常反应或黏膜屏障功能缺陷所引起。目前对这类炎症的治疗非常困难，需要寻找新的减少其发病和复发率的方案。

在已进行的多项研究中，益生菌在动物体内对这类炎症表现出良好的治疗效果。给乙酸诱发肠炎的大鼠肠内灌输 *Lb. reuteri* R2LC 可明显减少其炎症反应，而 *Lb. reuteri* HLC 则无此作用；给氨甲蝶呤诱发肠炎的大鼠口服 *Lb. reuteri* R2LC 和 *Lb. plantarum* DSM 9843 后，与体内产生肠炎但未接受乳酸菌处理的对照组大鼠相比，试验组大鼠肠的通透性、细菌移位以及血浆中细菌所产生的内毒素的浓度都显著降低。在临床上也研究了益生菌对迁延性肠炎的治疗作用，在 Mao 等 (1996) 进行的一项公开试验中，给 14 名患有活动性或潜伏性 Crohn 综合症的儿童口服 *Lb. rhamnosus* GG 后，受试者体内针对 β -乳球蛋白和酪蛋白的免疫球蛋白 A (IgA) 分泌细胞的数量增加，表明益生菌与局部免疫组织 (肠黏膜) 发生了作用。该乳杆菌并不影响 Crohn 综合症的活性，不过，由于受试者人数太少、试验时间过短，因此无法准确判断其临床效果。

(四) 健胃功能

Helicobacter pylori (幽门螺杆菌) 是引起慢性胃炎、消化道溃疡、甚至胃癌的主要病因之一，益生菌具有抑制 *H. pylori* 繁殖及其活力的作用。普通的小鼠 (胃内菌群主要是乳杆菌) 对 *H. pylori* 的侵染具有抵抗性，而无菌鼠则无此作用。动物及人体试验表明，部分益生菌或其代谢产物具有抑制 *H. pylori* 侵染的作用。

Lactobacillus salivarius WB 1004 (唾液乳杆菌) 在体外具有抑制 *H. pylori* 在人及鼠胃上皮细胞中繁殖的作用，在无菌鼠体内亦有此功能，而 *S. aureus* 或 *Enterococcus faecalis* 均不具备防止 *H. pylori* 侵染的作用。当发生 *H. pylori* 感染后，摄食 *Lb. salivarius* 亦能抑制 *H. pylori* 的繁殖。Aiba 也发现 *Lb. salivarius* 能抑制 *H. pylori* 在鼠体内的繁殖，而 *Lb. casei* 及 *Lb. acidophilus* 则无此作用。Midolo 认为益生菌产生的乳酸是抑制 *H. pylori* 的主要原因，在体外其作用比乙酸或盐酸更明显。

在 Michetti 用 *Lb. johnsonii* La-1 发酵乳清蛋白的上清液，采用双盲法、未设对照组的临床试验中，通过¹³C 标记的尿素呼吸试验、内窥镜检查 and 胃切片检查对 *L. johnsonii* La-1 抑制 *H. pylori* 侵染的作用进行了研究。在¹³C 标记的尿素呼吸试验中，受试者食用此种益生菌产品后，呼出的¹³CO₂ 减少，表明上清液具有抑制 *H. pylori* 感染的作用。在停止食用 4 周后，这种抑制作用仍然存在，尽管胃切片检查表明 *H. pylori* 仍可繁殖，体外试验表明，这种抑制作用并非仅由乳酸引起，而且具有菌株特异性。这些研究表明，益生菌及其代谢产物对 *H. pylori* 的侵染及活力具有抑制作用，但还需要更多、设计更严密的试验加以证实。

四、益生菌在食品中的应用

最近几年,生物活性酸奶,及其他益生菌产品的销售在欧洲、北美及其他发达国家的市场持续迅猛增长,这些产品的生产通常采用单一的菌种或与其他乳酸菌混合使用。目前还无法准确分析导致益生菌产品市场迅速扩张的原因,但肯定与消费者认为益生菌具有治疗和预防某些疾病、从而促进人体健康方面留下的印象有关。估据算,从1998年全球益生菌产品的销售额为150亿美元。2001~2005年期间,益生菌产品的市场销售年增长率将达20%,在益生菌产品中主要以发酵乳制品为主。

(一) 益生菌在发酵食品中的应用

发酵食品具有长期安全食用的历史。在发酵的过程中,通过微生物或酶的作用使食品发生预期中的生化改变。生产和食用发酵食品的历史可以追溯到几千年以前,即使是现在,发酵在许多国家仍继续作为一种可以家庭作坊的形式进行生产和保存食品的方式。在许多国家随着现代加工技术的进步,发酵食品的生产可以通过精确地控制发酵过程中所使用的微生物与酶而大规模进行。将大麦(barley)发酵成啤酒以及葡萄发酵成葡萄酒的酒精发酵工艺已有超过5000年以上的历史,在中东和南亚大陆,乳被发酵制成酸奶和其他产品,在中东和欧洲,采用各种乳酸菌生产的干酪超过1000种,几千年来泡菜一直是东亚国家的传统食品。

通常认为益生菌最早是Élie Metchnikoff发现的,他注意到高加索地区居民长寿与其经常食用发酵乳存在某种联系,认为发酵乳产品中产酸的细菌可以防止大肠“结垢”,从而延长了当地居民的寿命。尽管Metchnikoff的观点明确无误地指出发酵乳对人体健康的作用与发酵乳中的乳酸菌有关,但其他研究者还是迅速将注意力转移到肠道来源的乳酸菌。其中之一是Henneberg,他首先建议使用肠道来源*Lb. acidophilus*生产一种被他称为*Acidophilus-Milch*的改性酸奶。后来,这种以“yogurt mild(温和酸奶)”名称上市发酵乳产品在德国和其他西欧市场上取得成功。不过,当时这种酸奶之所以获得消费者认同的主要原因并不是其对健康的促进作用,而是能利用这种菌生产发酵乳类似酸奶但酸味降低、不如普通酸奶酸味过于强烈的缘故。以致于在后来相当长的一段时间内,在筛选用于发酵的益生性乳杆菌时主要是从其工艺特性的角度考虑,而较少考虑其健康功能。目前进行商业化生产的益生菌主要来自于乳杆菌属和双歧杆菌属,常用的乳杆菌有*Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*;常用的双歧杆菌有*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*和*B. infantis*(见表2-16)。

表 2-16 部分已在实际生产中使用的益生性乳酸菌

益生菌菌株	使用的厂家
<i>Bifidobacterium breve</i> strain	Yakult Yakult(Japan)
<i>B. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Inc. (Denmark)
<i>B. lactis</i> FK120	Fukuchan milk(Japan)
<i>B. lactis</i> HN019	(DR10)New Zealand Dairy Board. (N. -Z.)
<i>B. lactis</i> LKM512	Fukuchan milk(Japan)
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co. ,Ltd. (Japan)
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products Co. ,Ltd. (Japan)
<i>B. species</i> 420	Danlac(Canada)
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Cerbios Pharma(Switzerland)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CK120	Matsutani Chemical Product(Japan)
<i>Lb. acidophilus</i> NCFB 1748	Arla(Sweden)
<i>Lb. acidophilus</i> 145	Danlac(Canada)

续表

益生菌菌株	使用的厂家
<i>Lb. acidophilus</i> 74-2	Danlac(Canada)
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc. (USA)
<i>Lb. acidophilus</i> LA-1	Chr. Hansen, Inc. (USA)
<i>Lb. acidophilus</i> LB	Lacteol Laboratory(France)
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM®	Rhodia, Inc. (USA)
<i>Lb. acidophilus</i> R0011	Institut Rosell(Montreal, Canada)
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Japan)
<i>Lb. bulgaricus</i> 1261	Danlac(Canada)
<i>Lb. casei</i> 01	Chr. Hansen(Denmark)
<i>Lb. casei</i> 744	Nutricia(The Netherlands)
<i>Lb. casei</i> CRL431	Chr. Hansen(Denmark)
<i>Lb. casei</i> Imunitass (Defensis, DN114, DN-014001)	Danone(France)
<i>Lb. casei</i> Shirota (YIT 0918)	Yakult(Japan)
<i>Lb. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> (Lactophilus)	Laboratoires Lyocentre(France)
<i>Lb. crispatus</i> CTV05	Gynelogix, Colorado(USA)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	Meiji(Japan)
<i>Lb. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech(Canada)
<i>Lb. helveticus</i> CK60	Matsutani Chemical Product(Japan)
<i>Lb. johnsonii</i> La-1(Lj1)	Nestec Ltd. (Switzerland)
<i>Lb. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Inc. (Denmark)
<i>Lb. paracasei</i> F19	Arla Dairy(Sweden)
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probi AB(Sweden)
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	MicroBioLogics(MBL), USA
<i>Lb. plantarum</i> L2-1	Danlac(Canada)
<i>Lb. reuteri</i> MM53	BioGaia(Sweden)
<i>Lb. reuteri</i> SD2112(MM2)	Biogaia(USA)
<i>Lb. rhamnosus</i> 1091	Danlac(Canada)
<i>Lb. rhamnosus</i> 271	Probi AB(Sweden)
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	MicroBioLogics(MBL)(USA)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG(ATCC 53103)	Valio Dairy(Finland)
<i>Lb. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech(Canada)
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Essum AB(Sweden)
<i>Lb. rhamnosus</i> LC9018-705	Danlac(Canada)
<i>Lb. rhamnosus</i> R0052	Institut Rosell(Canada)
<i>Lb. rhamnosus</i> VTT E-97800, Research strain	VTT, Finland
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College Cork(Ireland)
<i>Lactococcus. lactis</i> L1A	Essum AB(Sweden)
<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	Kenko-dontokoi(Japan)
<i>St. thermophilus</i> F2	Danlac(Canada)

前面简单地回顾益生菌的起源是为了说明为什么乳制品、尤其是类似酸奶的发酵乳产品占益生菌产品绝大部分市场的历史原因，这种历史渊源与消费者印象的综合结果是：

- (1) 发酵乳制品如酸奶作为一种健康食品历史悠久；
- (2) 消费者容易接受发酵食品中含有活菌这一事实；
- (3) 作为发酵菌种的益生菌同时具有益生菌和发酵菌种双重作用；
- (4) 酸奶类产品是一种健康食品这一印象有助于益生菌日推荐摄入量的推广。

此外，乳制品作为益生菌最佳载体还有非常重要的工艺方面的原因，相当多发酵乳制品经过优化后的发酵工艺有利于发酵菌种的存活，此外现有的冷藏运输、销售和贮存条件与方式都可以在最大程度上保证加入到产品中的益生菌的存活，在部分传统发酵乳制品中，本身就有一些常被用作益生菌的乳酸菌参与整个发酵过程。例如在 Kefir 发酵过程中，就有大量

乳酸菌参与，并且有从中分离出多种益生菌（见图 2-4）。此外，从生产角度而言，益生菌能非常方便地融入现有生产工艺。以 *Lb. acidophilus* 甜性乳和发酵乳为例，分别与保鲜奶或酸奶的发酵工艺非常接近（图 2-5）。

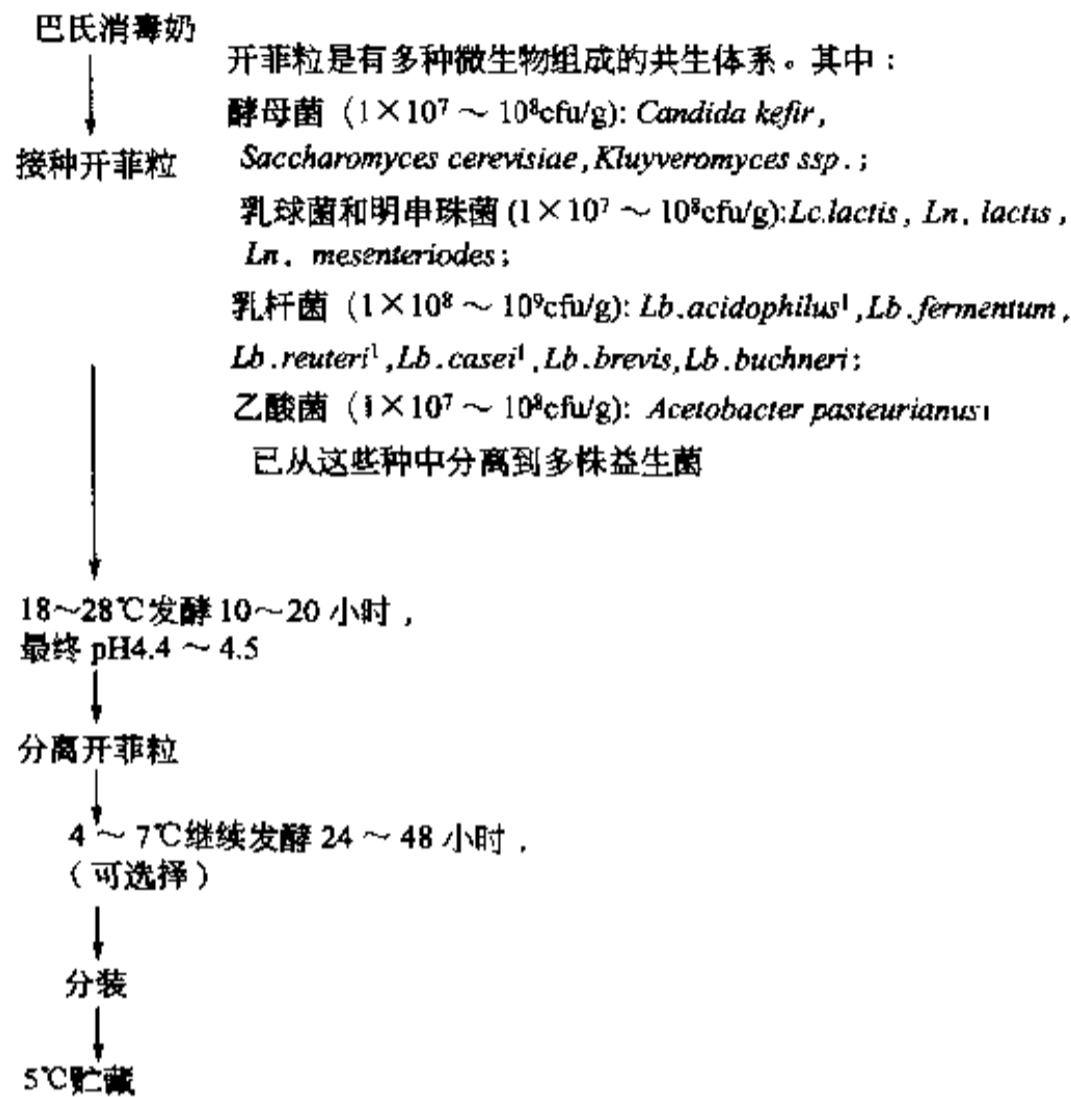


图 2-4 开菲乳 (Kefir) 的生产工艺
(cfu: 菌落形成单位)

需要指出的是，其他发酵食品（如发酵酱、泡菜等）也可以作为益生菌的载体，少数产品已经上市。

(二) 益生菌在强化食品中的应用

用于生产益生菌产品的乳酸菌的种类有 *Lb. bulgaricus*、*Lb. acidophilus*、*Lb. lactis*、

Lb. salivarius、*Lb. plantarum*、*S. thermophilus* 和 *Bifidobacterium* spp. 等（见表 2-16）。

最近几年双歧杆菌在益生菌食品中的应用受到重视，尤其是日本和欧洲。Hughes & Hoover (1992) 对双歧杆菌在益生菌食品中的应用情况进行了总结。在 20 世纪 40 年代，双歧杆菌乳被用作治疗婴儿营养不良的手段。在日本，最早的双歧杆菌产品是 1971 年森永乳业生产的含有 *B. longum* 和 *Lb. acidophilus* 的低脂乳。自 1977 年该公司开展送奶上门的业务后，几乎所有的产品都被双歧杆菌所占据。到 1984 年，日本市场上总共有 53 种双歧杆菌产品。到目前为止，包括酸奶在内的许多产品的配方都重新调整过，以便加

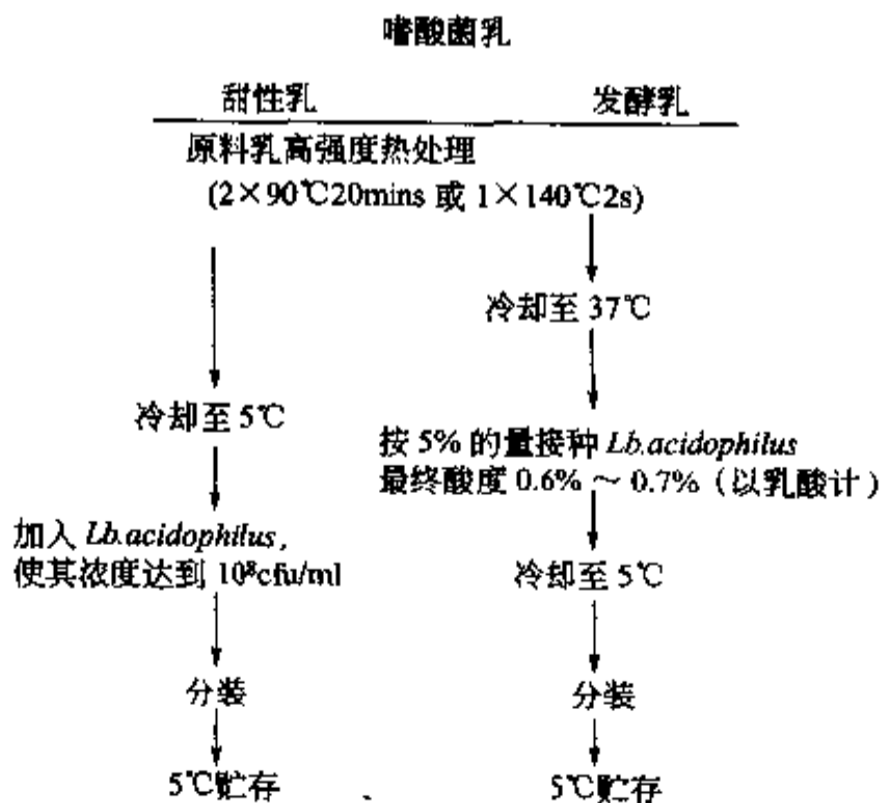


图 2-5 甜性和发酵嗜酸菌乳的生产过程

人双歧杆菌。从 20 世纪 80 年代到 90 年代，日本酸奶的总销售量几乎翻了一倍。

含有益生性乳酸菌的产品现在几乎随处可见，益生菌制剂可以不同的形式生产（片剂、粉、胶囊），也可以添加到不同种类的食品中（如牛奶、口香糖、膳食纤维制剂、甜食、糕点、啤酒和豆奶）。

（三）益生菌在药用产品中的应用

在许多国家，部分益生菌被制成冻干活菌片剂出售。这些产品的主要目的是治疗各种肠道功能异常（例如，抗生素治疗的后续治疗、调节消化道菌群平衡、多种肝病、长期便秘、慢性十二指肠肠炎、儿童消化道溃疡以及放射治疗的后续治疗），使这些细菌能长久地定殖于消化道。

由牛乳和双歧杆菌活菌制成的药用产品有 Bifider[®]（日本），Bifidogène[®]（法国），Lio-Bif[®]（前南斯拉夫）。德国市场上的两种益生菌产品为：含有植物蛋白、乳糖、乳果糖和 30 种矿物质的无脂肪和甜味剂（glutan-free）的 Eugalan Töpfer Forte[®] 和添加 Vc、含脂肪的 Euga-Lein Töpfer Forte[®]；Ominflora[®] 也是一种德国产品，其中含有 *Lb. acidophilus*、*B. longum* 和一株腐生性的 *E. coli*。

乳杆菌是成人肠道内的优势菌群之一，乳杆菌制剂生产工艺相对简单、菌种耐氧性好，效果较显著，被广泛用于生产药用的胶囊、片剂等，常用的乳杆菌有 *Lb. acidophilus*、*Lb. casei*、*Lb. rhamnosus* GG、*Lb. plantarum* 和 *Lb. breve* 等，产品的种类相对比较繁多。

第六节 益生菌的安全性

一、副作用

乳酸菌广泛分布于各种自然环境中，是哺乳动物体内土著菌群常见的成员，除皮肤外，存在于身体所有的无菌部位。口腔、消化道和泌尿生殖道被各种球形和杆状的乳酸菌所占据。通常认为这些乳酸菌属于腐生菌群，自古以来就广泛应用于各种食品生产，到目前为止，还没有发现其对人体产生比较明显的副作用。这种长期观察结果无疑是正确的，然而，随着某些乳酸菌与部分临床感染有关的报告的不断增加，需要对食品安全性的有关规定进行重新审视。应该强调的是，乳酸菌具有被长期广泛食用的历史，到目前为止，还没有证据表明用于食品发酵的乳酸菌可能存在任何危害。有必要指出的是：

（1）目前公布的部分临床感染牵涉到乳酸菌的病例都来自于处于患病状态的人群，尤其是那些心瓣膜功能异常的内心肌炎患者，或者是那些免疫力受损的人群；

（2）与前面所讲的相反，在健康人群或孕妇中还没有观察到乳酸菌与临床感染有关的病例；

（3）与正常人群相比，还没有在那些长期接触高剂量乳酸菌的人群中观察到更多的与乳酸菌相关的感染情况；

（4）还没有发现食用发酵食品、益生菌或含乳酸菌的药物导致由乳酸菌引起感染的病例。

（一）毒力（virulence）

Aguirre 和 Collins 对现有与乳酸菌有关的临床病例进行了分析，所有这些由乳酸菌引起的感染病例都来自于处于患病或其他非正常状态而导致免疫力受损的人群，如心脏病、龋齿/牙科手术、癌症或糖尿病。在健康人群中还没有发现由乳酸菌引起感染的临床病例。在绝大

多数乳酸菌引起的临床感染病例中，造成感染的乳酸菌似乎都来自于患者体内自有的菌群。

第一例乳杆菌感染引起的内心肌炎病例发现于1938年，在随后的55年内，总共发现了53例乳杆菌内心肌炎病例，因此，其发病率是非常低的。口腔手术或尿道感染是引起非致病性乳杆菌对心瓣膜功能异常的心脏感染的主要因素。这一结果非常清楚地表明，感染的源头来自于患者体内的土著菌群。而且，大多数情况下，无论是否伴有血流性感染，由乳酸菌引起的局部脓（菌）血症通常出现在容易发生大面积感染的部位。许多涉及明串珠菌或片球菌的感染病例通常是多种微生物感染的结果，表明其传播的途径来自于医院。尽管乳杆菌作为人体共生菌群而广泛存在，与另一类共生菌群 *Streptococcus/Staphylococcus* 相比，在内心肌炎病例中出现乳杆菌血症的比例是非常低的（0.05% vs 79.3%）。

从临床病例中分离到的乳杆菌主要是 *Lb. rhamnosus*、*Lb. casei*（或 *Lb. paracasei*）和 *Lb. plantarum*，这几种乳杆菌同时也是人体土著菌群最常见的成员。对纤维坏死蛋白（fibrinogen）的结合能力、对血小板的凝集性和细胞内酶的组成都可能与内心肌炎相关的乳酸菌菌株致病力有关，还需要进一步研究哪一种因素能作为决定这些乳酸菌毒力的真正标记。

在临床样本中，偶尔也会分离到 *Lactococcus* 和 *Leuconostoc* 属的菌株，通常是作为其他细菌的伴生菌株被分离到，其在感染中所发挥的主要作用还不清楚。肠球菌是正常的人体共生菌群，已适应了在人身体内存在微生物的环境中生活，是人粪便中占优势的革兰氏阳性球菌（ $10^5 \sim 10^7$ cfu/g）。然而，*E. faecalis* 和 *E. faecium* 经常与各种感染有关，而且抗万古霉素的抗药菌株越来越多。肠球菌可从大多数食品生产线上分离，曾经在相当长的一段时间内可以在市场上找到各种含有这两种肠球菌的食品和益生菌产品。因此，如果要使用肠球菌作为益生菌，除非对该菌株的生物学特性有清晰地了解，并且该菌株具有非常明显的健康促进作用，否则还是谨慎为妙。

（二）毒性（Toxicity）

到目前为止，还没有证据表明乳酸菌可以合成任何能造成食物中毒的毒素或有毒物质。对乳酸菌进行传统性毒理学研究的资料少得可怜，Ishihara 等（1985）进行的研究表明，热灭活的 *Streptococcus faecium*（应为 *E. faecium*）、*Streptococcus equinus*、*Lb. fermentum* 和 *Lb. salivarius* 细胞不具有急性毒性。不过，在过去20年内，利用各种人细胞株或肿瘤细胞株在体外对乳酸菌进行过无数次试验，还没有发现活的或热灭活的乳酸菌细胞表现出任何毒性。

（三）过敏性

双歧杆菌和肠道来源的乳酸菌对人体健康的促进作用之一是调节免疫功能，使免疫细胞保持在合适的水平上，以预防和抵御入侵的致病菌或肿瘤。这种免疫刺激作用保持在引发不良过敏反应的阈值之下，乳酸菌和双歧杆菌对免疫功能的增强作用随菌株而变化。而致病菌，如 *Clostridium perfringens* 则可以抑制免疫功能。

因此，国际微生物学会（IUMS）双歧杆菌、乳杆菌和相关微生物专业委员会1993年9月得出的结论是，认为乳酸菌及其相关微生物存在危险（侵染性、毒性）的观点缺乏来自食用或临床方面的资料支持。然而，由于在生产新的益生菌制剂时将双歧杆菌、肠球菌、丙酸菌、有时甚至是啤酒酵母菌（*Saccharomyces*）也包括在内，因此，证实这些菌株的安全性就显得格外重要。安全性评估应该包括对人体的侵染性、毒性（包括在肠道内产生有害的代谢产物、降解肠黏膜等）以及提供流行病学/临床方面有关益生菌安全的资料和证据。将某种新的益生菌菌株大范围地引入各种食品中时，必须监视其对不同人群的影响，尤其是那些

免疫力受损（低下）的人群和消化功能受到损伤的人群。在监视过程中，必须考虑下列因素：

- (1) 由益生菌侵染而导致菌血症、内心肌炎或局部感染的风险性；
- (2) 由益生菌产生有害代谢活动引起的风险（如过度代谢胆盐、代谢药物或形成致癌性中间产物等）；
- (3) 产生辅助性副作用的风险；
- (4) 向体内土著菌群进行遗传物质传递的风险，尤其是当所使用的益生菌是经过基因工程修饰的微生物时要更加小心。

二、安全性和耐受性

(一) 对益生菌安全性的忧虑

大多数益生菌产品是作为食品或药品形式出现的，因此对安全性的考虑是最重要的。

经过临床试验的益生菌的功效、安全性和耐受性见表 2-18。

由于目前使用的益生菌主要是乳杆菌和双歧杆菌，通常认为它们是安全的（GRAS）。之所以认定益生性乳酸菌符合 GRAS 地位，主要来自以下四个方面的证据：

(1) 人体试验 在 1961 年至 1998 年所进行的 143 项人体临床试验中，口服益生性乳酸菌能被很好地耐受，而且证明是安全的（表 2-18）。在 7526 名参与这些试验的受试者中，没有发生不良副作用或后果。

(2) 动物模型 在各种实验动物如小鼠、大鼠、豚鼠中进行的体内实验表明，口服或注射益生性乳酸菌未出现化脓、急性毒性或菌血症（表 2-17，表 2-18）。相反，益生性乳酸菌似乎可以延长这些动物的存活时间。

表 2-17 部分目前应用较多的益生菌菌株的安全性与其已报道的功能

益生菌菌株	已报道的功能	安全性研究		
		体外	动物实验	临床试验
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCOO 1748	治疗便秘、减轻化疗引起的腹泻、降低粪便中细菌性酶的活力	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	平衡肠道菌群、预防肠道功能失调、治疗浅表膀胱癌	+	+	+
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	治疗婴儿急性病毒和细菌性腹泻、预防由抗生素治疗相关的腹泻、增强免疫功能、稳定小肠的渗透性	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (johnsonii) LC90181	增强免疫功能、疫苗佐剂、平衡肠道菌群	+	+	+
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	预防轮病毒腹泻	+	+	+

(3) 体外实验 采用各种分化的人肠上皮细胞（用于微生物黏附试验）和人淋巴瘤细胞株（用于检测免疫调节作用）所进行的体外实验表明，益生性乳酸菌在与真核细胞相互作用的过程中，对后者没有侵染性。

(4) 对益生菌产品的市场调查 消费者都希望能找到使自己保持舒适和健康的方法，多种因素决定了益生性乳酸菌和其他功能食品市场的快速扩张。以下几点对于经过精心设计的益生菌产品的快速扩张起决定作用：人们更倾向于防病而不是治病；对营养与健康之间的联系有更清晰的了解；希望能抵消由污染、致病菌和空气、水及食物中各种化学物质所引起的环境危害，在相当部分人的想象中，这种危害是在不断增加的；医疗费用的增长促使人们寻找能保持身体健康的廉价替代途径；设计严谨的研究能提供关于益生菌促进健康的更令人信

表 2-18 经过临床试验的益生菌——功效、安全性与耐受性

受试人群	样本数(n=)	益生菌种类(剂量)	临床试验目的	效 果	副作用	参 考 文 献
成人患者	59	<i>Lb. acidophilus</i>	治疗腹泻	(+)	无	Beck and Necheles, 1961
儿童患者	45	<i>Lb. bulgaricus</i> / <i>S. thermophilus</i>	治疗婴儿腹泻	(+)	无	Niv et al., 1963
成人患者	40	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	治疗口腔溃疡	++++	无	Rapoport and Levine, 1965
儿童患者	150	<i>B. bifidum</i>	治疗 <i>E. coli</i> 引起的腹泻	(+)	无	Schneegans et al., 1966
成人患者	18	<i>Bifidobacterium sp.</i>	治疗慢性肝病		无	Muting et al., 1968
儿童患者	2	<i>Bifidobacterium sp.</i>	治疗慢性肝病		无	Muting et al., 1968
成人患者	80	<i>Lb. acidophilus</i>	治疗口腔溃疡	0	无	Gertenrich and Hart, 1970
儿童患者	94	<i>S. thermophilus</i> / <i>Lb. acidophilus</i>	治疗腹泻	0	无	Pearce and Hamilton 1974
		<i>Lb. bulgaricus</i>				
健康成人	24	乳酸菌培养物	降胆固醇血症	(+)	无	Mann, 1974
成人患者	17	乳酸菌培养物(Lactovagil)	治疗阴道炎	(+)	无	Vazquez and Rivera, 1976
成人患者	5	<i>Lactobacillus sp.</i>	治疗嗜中性白血球减少症		无	Hensgens and Klasterski, 1976
健康成人	50	<i>Lactobacillus sp.</i> ($3 \sim 6 \times 10^8$)	预防旅游者腹泻	0	无	Pozo-Olano et al., 1978
健康成人	54	乳酸菌培养物	降胆固醇血症	(+)	无	Hepner et al., 1979
成人患者	88	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	预防抗生素治疗引起的腹泻	++	无	Gotz et al., 1979
成人患者	150	<i>Lb. sporogenes</i> (6×10^7)	治疗口腔溃疡	+++	无	Sharma et al., 1980
成人患者	50	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>B. bifidum</i>	治疗结肠炎		无	Satte et al., 1980
健康成人	7	<i>Lb. acidophilus</i> (10^{10} cfu/ml)	清除原致癌物	(+)	无	Goldin et al., 1980
婴儿	104	<i>S. faecium</i> SF68* / <i>Lc. lactis</i>	治疗婴儿腹泻	+++	无	Bellomo et al., 1980
		<i>Lb. bulgaricus</i> / <i>Lb. acidophilus</i>				
		<i>Lactobacillus sp.</i>				
儿童患者	68	乳酸菌培养物	治疗嗜中性白血球减少症		无	Ekert et al., 1980
健康成人	32	乳酸菌培养物	降胆固醇血症	0	无	Rossouw et al., 1981
成人患者	49	<i>S. faecium</i> SF68*	治疗肠炎	(+)	无	Bruno & Grigerio, 1981
健康成人	11	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	耐受性研究	0	无	Robins-Browne and Levine, 1981
健康成人	23	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	预防肠毒性大肠杆菌(ETEC)引起的腹泻	0	无	Clements et al., 1981
健康成人	48	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	预防 ETEC 引起的腹泻	0	无	Clements et al., 1981
健康成人	68	乳酸菌培养物	降胆固醇血症	0	无	Thompson et al., 1982
成人患者	100	<i>Lb. bulgaricus</i> LB51	抗肿瘤活性		无	Bogdanov, 1982
成人患者	12	<i>Lb. acidophilus</i>	减缓乳糖不耐症	0	无	Kim and Gilliland, 1983
健康成人	23	<i>Lb. acidophilus</i> / <i>Lb. bulgaricus</i>	预防 ETEC 引起的腹泻	(+)	无	Clements et al., 1983

续表

受试人群	样本数(n=)	益生菌种类(剂量)	临床试验目的	效果	副作用	参考文献
成人患者	36	<i>Lb. acidophilus/Lb. bulgaricus</i>	治疗 ETEC 引起的腹泻		无	Clements et al., 1983
健康成人	16	<i>B. breve</i>	预防作用	(+)	无	Tanaka et al., 1983
健康成人	21	乳酸菌培养物	降胆固醇血症	0	无	Bazzare et al., 1983
成人患者	61	<i>Lb. acidophilus</i> (4×10^8 /ml)	治疗神经性肠综合症(IBS)	0	无	Newcomer et al., 1983
成人患者	18	<i>Lb. acidophilus</i> (4×10^8 /ml)	治疗乳糖酶缺失	0	无	Newcomer et al., 1983
健康成人	10	<i>Lb. acidophilus</i> (4×10^8 /ml)	对照组	0	无	Newcomer et al., 1983
健康成人	10	<i>Lb. bulgaricus/S. thermophilus</i>	降胆固醇血症	0	无	Jaspers et al., 1984
成人患者	10	乳酸菌制剂	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Kolars et al., 1984
成人患者	9	<i>Lb. acidophilus</i>	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Savalano et al., 1984
健康成人	21	<i>Lb. acidophilus</i> (10^9 cfu/d)	清除原致瘤物	(+)	无	Goldin and Gorbach, 1984
婴儿	30	<i>Lb. acidophilus</i> (5×10^{10})	预防作用研究	0	无	Reunman et al., 1986
健康成人	6	<i>Lb. acidophilus</i> (4×10^8 cfu/ml)	耐受性研究	(+)	无	Prajapati et al., 1986
儿童患者	15	<i>B. breve/Lb. casei</i> (10^9 /g)	治疗难治愈性腹泻	(+)	无	Hotta et al., 1987
儿童患者	50	乳酸菌制剂	治疗腹泻	(+)	无	Tojyo et al., 1987
儿童患者	133	<i>B. breve</i>	治疗弯曲杆菌引起的肠炎	(+)	无	Dewit et al., 1987
儿童患者	9	乳酸菌制剂	治疗腹泻	(+)	无	Gorbach et al., 1987
成人患者	5	<i>Lb. casei</i> GG ⁺ (10^{10})	治疗 <i>C. difficile</i> 引起的肠炎	(+)	无	Gorbach et al., 1987
健康成人	10	添加到酸奶中的 <i>B. longum</i>	预防由抗生素治疗引起的腹泻	(+)	无	Colombel et al., 1987
成人患者	40	<i>Streptococcus faecium</i> SF68*	治疗肝昏迷	(+)	无	Loguercio et al., 1987
成人患者	14	<i>Lb. acidophilus</i>	减缓乳糖不耐症	(+)	无	McDonough et al., 1987
成人患者	24	<i>Lb. acidophilus</i> (2×10^9)	治疗由放射治疗引起的消化道功能失调	(+)	无	Salminen et al., 1988
成人患者	8	乳酸菌制剂	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Wytock and DiPalma, 1988
健康成人	94	<i>Lb. acidophilus/B. bifidum</i>	预防旅游者腹泻	(+)	无	Black et al., 1989
成人患者	45	<i>Lb. bulgaricus/S. thermophilus</i>	治疗抗生素诱导的腹泻	++	无	Wunderlich et al., 1989
成人患者	78	<i>Streptococcus faecium</i> SF68*	治疗急性腹泻	0	无	Wunderlich et al., 1989
健康成人	334	<i>Streptococcus faecium</i> SF68*	降胆固醇血症		无	Lin et al., 1989
癌症患者	61	<i>Lb. casei</i>	预防白细胞减少症	(+)	无	Okawa et al., 1989
儿童	82	<i>Lb. helveticus/S. thermophilus</i>	预防婴儿腹泻	++	无	Brunser et al., 1989
健康成人	16	<i>Lb. casei</i> GG ⁺	预防抗生素诱导的腹泻	++	无	Suonen et al., 1990
成人患者	183	<i>Streptococcus faecium</i> SF68*	治疗由 ETEC 和霍乱弧菌引起的肠道感染	0	无	Mitra & Rabbani, 1990

受试人群	样本数(n=)	益生菌种类(剂量)	临床试验目的	效果	副作用	参考文献
健康成人	820	<i>Lb. casei</i> GG*	预防旅游者腹泻	+	无	Oksanen et al., 1990
婴儿	24	乳酸菌制剂	治疗某种特定的腹泻	(+)	无	Roggero et al., 1990
婴儿	54	乳酸菌制剂	治疗婴儿腹泻	(+)	无	Beau et al., 1990
儿童	245	热灭活乳酸菌混合物	预防龋齿	(+)	无	Bayona-G et al., 1990
儿童患者	52	<i>S. thermophilus/Lb. bulgaricus</i>	治疗顽固性腹泻	0	无	Boudraa et al., 1990
儿童	60	<i>Lb. acidophilus/Lb. bulgaricus</i>	预防抗生素诱导的腹泻	(+)	无	Tankanow et al., 1990
健康成人	9	<i>Lb. acidophilus</i> (10^7 cfu/g)	清除原致癌物	(+)	无	Marteau et al., 1990
儿童患者	71	<i>B. bifidum</i> (10^8 cfu/g)	治疗轮病毒腹泻	(+)	无	Isolaure et al., 1991
健康成人	12	<i>Lb. casei</i> GG* (10^{10-11} cfu)	耐受性研究	0	无	Berrada, 1991
健康成人	10	<i>Bifidobacterium</i> sp.	耐受性研究	0	无	Tomoda et al., 1991
健康成人	20	<i>Lb. acidophilus/B. bifidum</i>	预防抗生素诱导的腹泻	(+)	无	Black et al., 1991
健康成人	24	多种乳酸菌菌株	降胆固醇血症	0	无	Halpem et al., 1991
成人患者	10	<i>Lb. acidophilus</i> (10^8 cfu/g)	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Lin et al., 1991
成人患者	21	<i>Lb. acidophilus/Lb. bulgaricus</i>	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Martini et al., 1991a
成人患者	22	多种乳酸菌菌株	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Martini et al., 1991b
婴儿	40	单一乳酸菌菌株	治疗抗生素诱导的腹泻	0	无	Contardi, 1991
婴儿	78	<i>Lb. bulgaricus/S. thermophilus</i>	治疗婴儿腹泻	(+)	无	Touhami et al., 1992
成人患者	24	<i>Lb. acidophilus/B. bifidum</i>	治疗便秘	(+)	无	Alm et al., 1992
健康成人	11	<i>Lb. acidophilus</i>	减少突变剂分泌	(+)	无	Lidbeck et al., 1992
健康成人	12	<i>Lb. casei</i> GG*	改善肠道功能	0	无	Ling et al., 1992
婴儿	11	<i>B. longum/B. breve</i>	作为抗生素治疗的辅助剂	0	无	Bennet et al., 1992
健康成人	5	<i>Lb. acidophilus</i>	改善粪便菌群组成	(+)	无	Benno and Mitsuka, 1992
健康成人	76	<i>B. longum</i> ($2\sim 5 \times 10^9$ cfu/g)	耐受性研究	0	无	Goldin et al., 1992
成人患者	30	<i>Lb. casei</i> GG*	预防噬中性粒细胞减少症患者发生感染	0	无	Ellegaard et al., 1992
儿童患者	40	<i>Lb. acidophilus/Bifidobacterium</i>	治疗腹泻	++	无	Balli et al., 1992
儿童患者	39	<i>Lb. casei</i> GG* (10^{10-11} cfu)	治疗急性腹泻	++	无	Kaila et al., 1992
癌症患者	58	<i>Lactobacillus</i> sp. (Biolactis)	预防浅表膀胱癌复发	+++	无	Aso and Akazan, 1992
成人患者	33	<i>Lb. acidophilus</i>	预防念珠菌阴道炎	(+)	无	Hilton et al., 1992
健康成人	15	<i>Lb. acidophilus/B. bifidum</i>	调节免疫功能	(+)	无	De Simone et al., 1992
健康成人	98	乳酸菌制剂	降低过敏反症状	(+)	无	Trpp et al., 1993

续表

受试人群	样本数(n=)	益生菌种类(剂量)	临床试验目的	效果	副作用	参考文献
婴儿	20	<i>Lb. casei</i> GG* (2×10 ⁸ cfu/d)	预防肠道致病菌	0	无	Millar et al., 1993
健康成人	44	<i>Lb. casei</i> GG*	剂量反应研究	0	无	Saxelin et al., 1993
癌症患者	228	<i>Lb. casei</i> LC9018	免疫辅助治疗		无	Okawa et al., 1993
健康成人	6	<i>Lb. casei</i>	抗突变作用		无	Hayatsu & Hayatsu, 1993
婴儿	20	<i>Lb. casei</i> GG*	耐受性研究	0	无	Stansbridge et al., 1993
成人患者	9	乳酸菌制剂(4.2×10 ¹⁰ 个细胞)	减缓乳糖吸收不良	0	无	Hove et al., 1994
健康成人	6	乳酸菌制剂	改善氯/电解质的迁移性	+++	无	Mahe et al., 1994
儿童患者	51	乳酸菌制剂	治疗顽固性腹泻	+++	无	Bhutta et al., 1994
成人患者	64	<i>Lb. casei</i> GG*	调节肠道内细菌性酶的活性	++	无	Ling et al., 1994
健康成人	60	<i>Lb. casei</i> GG* (10 ¹¹ cfu/L)	减少还原性酶的活力	(+)	无	Ling et al., 1994
成人患者	47	<i>Lb. casei subsp. rhamnosus</i>	降低膀胱炎复发感染的频率		无	Baerheim et al., 1994
儿童患者	42	<i>Lb. casei</i> GG* (10 ¹¹ cfu/d)	治疗轮状病毒腹泻	+++	无	Isolauri et al., 1994
健康成人	30	<i>Lb. acidophilus</i> /B. <i>bifidum</i>	调节免疫功能	+++	无	Link-Amster et al., 1994
婴儿	55	B. <i>bifidum</i> /Lb. <i>gasseri</i>	预防轮状病毒腹泻	(+)	无	Saavedra et al., 1994
健康成人	28	<i>Lb. acidophilus</i> /B. <i>bifidum</i>	调节免疫功能	+++	无	Schiffirin et al., 1995
成人患者	10	<i>S. thermophilus</i> /Lb. <i>gasseri</i>	改善肠道微生态	(+)	无	Pedrosa et al., 1995
健康成人	23	<i>Lb. bulgaricus</i>	改善肠道微生态	(+)	无	Pedrosa et al., 1995
健康成人	282	<i>Lb. fermentum</i> (10 ¹¹ cfu)	预防旅行者腹泻	0	无	Katellaris et al., 1995
儿童	24	<i>Lb. acidophilus</i> (10 ¹¹ cfu)	耐受性研究	(+)	无	Sheen et al., 1995
儿童患者	23	<i>S. thermophilus</i> /Lb. <i>bulgaricus</i> (1.6×10 ⁸ cfu/g)	减缓乳糖吸收不良	(+)	无	Shermak et al., 1995
儿童患者	20	<i>Lb. acidophilus</i> (10 ¹⁰ 细胞)或 <i>L. lactis</i> / <i>S. thermophilus</i>	减缓乳糖吸收不良	+++	无	Montes, et al., 1995
婴儿	20	B. <i>bifidum</i>	耐受性研究	(+)	无	Langhendries et al., 1995
儿童患者	12	<i>Lb. casei</i> GG* (活菌)	治疗轮状病毒腹泻	+++	无	Kaili et al., 1995
儿童患者	13	<i>Lb. casei</i> GG* (热灭活)	治疗轮状病毒腹泻	+	无	Kaili et al., 1995
婴儿	40	<i>Lb. casei</i> GG*	治疗婴儿腹泻	+++	无	Raza et al., 1995
健康成人	30	<i>Lb. reuteri</i> (10 ¹¹ cfu/d)	耐受性研究	0	无	Wolf et al., 1995
成人患者	138	<i>Lb. casei</i> LC9018	预防浅表膀胱癌复发		无	Aso et al., 1995
成人患者	30	<i>Lb. acidophilus</i>	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Gaon et al., 1995

受试人群	样本数(n=)	益生菌种类(剂量)	临床试验目的	效果	副作用	参考文献
健康成人	20	<i>Lb. casei</i> GG*	耐受性研究	0	无	Saxelin et al., 1995
儿童患者	16	<i>Lb. casei</i> GG* (5×10 ⁹)	治疗急性腹泻	(+)	无	Mejamaa et al., 1995
儿童患者	14	<i>Lb. casei/Lb. rhamnosus</i> (2×10 ⁸)	治疗急性腹泻	(+)	无	Mejamaa et al., 1995
儿童患者	19	<i>S. thermophilus/Lb. delbrueckii</i>	治疗急性腹泻	(+)	无	Mejamaa et al., 1995
婴儿	55	<i>Lb. casei</i> (2.8×10 ⁹)	口服疫苗的免疫刺激作用	++++	无	Isolaure et al., 1995
婴儿	28	<i>Lb. casei</i> GG*	调节免疫反应	++++	无	Isolaure et al., 1995
婴儿	17	<i>Bifidobacterium sp.</i> (10 ⁶ cfu/g)	耐受性研究	0	无	Kok et al., 1996
儿童	72	<i>Lb. reuteri/Lb. acidophilus</i>	预防作用	0	无	Ruiz-Palacios et al., 1996
婴儿	39	<i>B. infantis</i>	治疗婴儿腹泻	0	无	Pant et al., 1996
成人患者	32	<i>Lb. casei</i> GG*	治疗 <i>Cl. difficile</i> 引起的腹泻	++++	无	Bennet et al., 1996
儿童患者	63	<i>Lb. acidophilus</i>	治疗急性腹泻	无	无	Michielutti et al., 1996
成人患者	32	<i>Lb. acidophilus</i>	治疗细菌性阴道炎	无	无	Parent et al., 1996
成人患者	6	<i>Lb. acidophilus</i>	抗畸变作用	无	无	Simenhoff et al., 1996
健康成人	6	<i>Lb. acidophilus</i> LA-2	抗畸变作用	无	无	Hosoda et al., 1996
成人患者	15	<i>B. longum</i>	减缓乳糖不耐症	(+)	无	Jiang et al., 1996
儿童患者	30	<i>Lb. casei</i> GG*	免疫调节作用	(+)	无	Malin et al., 1996
成人患者	14	<i>Lb. casei</i> GG*	减少食物过敏	(+)	无	Sutas et al., 1996
成人患者	28	<i>Lb. casei</i> GG*	改善青少年关节炎	(+)	无	Malin et al., 1996
婴儿	27	<i>Lb. casei</i> GG*	减少食物过敏	(+)	无	Mejamaa and Isolaure, 1997
婴儿	40	<i>Lb. reuteri</i> (10 ¹¹ cfu/d)	治疗急性病毒性腹泻	++++	无	Shornikova et al., 1997
儿童患者	100	<i>Lb. casei</i> GG*	治疗急性病毒性腹泻	(+)	无	Guarino et al., 1997
婴儿	39	<i>Lb. casei</i>	耐受性研究	(+)	无	Guerin-Danan et al., 1998
儿童	71	<i>Lb. plantarum</i> 299v	预防腹泻类疾病	++	无	Ribeiro Jr. & Vanderhoof, 1998
儿童患者	3	<i>Lb. casei</i> GG*	治疗 <i>Cl. difficile</i> 引起的肠炎	++++	无	Lozet de Mola et al., 1998
儿童患者	24	<i>Lb. casei</i> GG*	治疗胰腺纤维性囊肿	(+)	无	Di Benedetto et al., 1998
婴儿	90	<i>B. bifidum</i>	预防婴儿腹泻	(+)	无	Chourraqui et al., 1998
儿童患者	287	<i>Lb. casei</i> GG*	以口服补液形式对急性腹泻的治疗作用	0	无	Guandalini et al., 1998

注: 1. 功效评分标准: 0=无效; (+)=效果不确定; ++=26%~50%有效; +++=51%~75%有效; ++++=75%~>75%有效。

2. * 文献发表时所用的分类名称, 根据目前的分类标准, 可能出现较明显的变动。

3. 所有分类名称引用文献发表时采用的名称, 并不代表最新的分类结果。

服的证据。

与乳杆菌一样，明串珠菌和片球菌等在历史上也被广泛用于食品加工，人类食用含有上述微生物的活菌、死细胞或代谢产物的食品已有数千年的历史。到目前为止，还没有发现这些乳酸菌对人体的不良作用。因此，这些乳酸菌通常被认为是安全的（GRAS）。从生态学的角度来看，双歧杆菌在母乳喂养婴儿肠道内所占的地位对婴儿健康具有重要作用。到目前为止，这些细菌的安全性尚未受到质疑，有关其有害作用的报道很少见。不过，最近几年，从不同类型临床感染的病灶部位分离到属于 *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Enterococcus* 和 *Bifidobacterium* 的细菌，根据 Gasser 等的研究结果，*L. rhamnosus*、*Lb. acidophilus*、*Lb. plantarum*、*Lb. casei*、*L. paracasei*、*Lb. salivarius*、*Lactobacillus lactis* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 可从部分细菌性内心肌炎标本中分离到；*Lb. acidophilus*、*Lb. plantarum*、*Ln. mesenteroides*、*Pediococcus acidilactici*、*Bifidobacterium eriksonii* 和 *B. adolescentis* 已从部分血液感染的病例及局部感染的病灶中分离到。而 *Enterococcus* 和 *Streptococcus* 中本来就存于多种致病菌，Gasser 将它们排除在考虑之外。*B. eriksonii* 最近被重新分类为 *B. dentium*，从某些感染性病例中分离到的 *B. adolescentis*，利用遗传技术，可能被归为 *B. dentium*。Aguirre 和 Collins 等也报道从感染部位分离到 *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Enterococcus* 和 *Lactococcus* 等；Brook 则从脚部感染的部位分离到双歧杆菌（*B. dentium* 和 *B. adolescentis*）以及多种乳杆菌，而且从英格兰和威尔士患者中分离到乳杆菌的几率在不断增长，这些分离物对 ofloxacin（吡啶羧酶）具有抗药性，而在肠球菌中则发现了多种致病因子。从不同感染部位分离到的乳酸菌种类见表 2-19。

表 2-19 从内心肌炎、菌血症、血液及局部感染病例中分离到的乳酸菌及双歧杆菌种类

属	种
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i> 、 <i>plantarum</i> 、 <i>casei</i> 、 <i>paracasei</i> 、 <i>salivarius</i> 、 <i>acidophilus</i> 、 <i>gasseri</i> 、 <i>leichmanii</i> 、 <i>jensenii</i> 、 <i>confusus</i> 、 <i>lactis</i> 、 <i>fermentum</i> 、 <i>minutus</i> 和 <i>catena forme</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i> 、 <i>paramenteroides</i> 、 <i>citrovum</i> 、 <i>pseudomesenteroides</i> 和 <i>lactis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i> 和 <i>pentosacus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>dentium(erkisonii)</i> 、 <i>adolescentis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i> 、 <i>faecium</i> 、 <i>avium</i> 及其他

这些研究结果引起人们对益生菌安全性的广泛关注，在最近欧盟一次研讨会对已发表的有关乳酸菌安全性的结果进行了讨论。其结论是，除 *Enterococcus* 外，乳酸菌引发感染的风险从总体而言，是非常低的，然而，会议认为对 *Lb. rhamnosus* 需要进一步监控。考虑到几乎所有目前所使用的益生菌都已从不同的感染部位被分离到，因此，进行工业化应用时，必须验证益生菌的安全性。

（二）益生菌的安全性

在评估益生菌的安全性时，必须考虑以下的因素：致病性、侵染性、毒力因子（包括毒性）、代谢活力及益生菌的生物学特征等。

Donohue 和 Salmine 等认为可采用体外试验、动物试验和临床试验等方法来评估益生菌的安全性，根据这几项指标，少数目前应用的益生菌能满足安全性标准，Marteau 则建议研究益生菌的本质特征。药代动力学、与宿主的相互作用等作为评估其安全性依据。

1. 致病性和感染性

不存在致病性和感染性是益生菌安全性的前提之一。最近几年乳酸菌不断从临床感染病例被分离到，引发了对其安全性以及是否具有感染性的争议。然而，尽管长期被认为不具有感染性的这些乳酸菌和双歧杆菌，却不断从临床感染病例中被分离到。它们不太可能具有广泛的感染性，这些从临床分离到的菌株更像是一些偶然性感染的结果。最近从临床分离频率的提高可能是人们对其引起的偶发感染更为重视的结果。尽管乳酸菌和双歧杆菌可通过转位或其他方式侵入宿主机体，引起菌血症。但是，从内心肌炎或其他感染到败血症的系统性感染的感染过程需要细菌和宿主双方因素的共同参与。然而，要评估这种相互作用太困难了。因此，在评估益生菌的安全性时，考虑如下的问题可能更切实可行，即对宿主的人侵是否引起感染、感染是否引发严重后果以及入侵后对宿主产生的作用等。

益生菌是否具有感染性还难以证明，尤其是厌氧菌，通常认为它们不具有感染性，尽管采取口服方式，这些细菌通常不会引起健康动物感染；对于那些具有轻微感染性的益生性细菌，这一点尤为明显；即使那些具有强感染性的细菌，如果采用单一的种也不容易使动物发生感染，需要采用多种技术（方法），例如对试验体系采取各种预处理或使用混合感染的方式，才能使感染建立。通过急性及慢性毒性试验可获得某种细菌毒性的资料。例如，对 *B. longum* BB536 而言，其对小鼠的急性（单次口服）半数致死剂量（LD₅₀）>50 克/千克（或 5×10^{13} /kg）。从技术上而言，已达到口服方式的极限；如采用腹腔注射，其 LD₅₀ 为 5×10^{11} cfu/kg；而口服的话，即使按 2.5×10^{11} kg/d 的方式持续口服 1 年，也不表现出毒性；对 *Lb. rhamnosus* 而言，腹腔注射对小鼠的半数致死剂量 LD₅₀ 为 $1.7 \sim 3.6 \times 10^{11}$ /鼠。尽管最近有关 *Streptococcus*、*Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 急性毒性的研究报道比较多，但由于实验方法的差异，数据缺乏可比性。

前面讲过，从临床病例分离到乳酸菌或双歧杆菌是偶发感染的结果。导致偶发感染的原因包括：皮肤创伤、慢性病、癌症以及由药物治疗引起的异常等，由上述原因或其他因素引起的细菌转位（translocation）在乳酸菌和双歧杆菌的偶发感染中发挥了重要的作用。细菌转位是肠道屏障消失引起的细菌（或细菌成分、产物）穿透黏膜和上皮组织的一种现象，细菌随后从膜囊运输至肠淋巴结（MLN）和其他器官。其后果是菌血症，并可能逐渐演变成多器官衰竭和败血症。在免疫力低下的人群中，由肠道细菌转位引起的内源性感染是形成乳酸菌偶发感染的原因之一。

有多种因素可能促使肠道细菌发生转位，如肠道黏膜损伤、宿主免疫缺陷、肠道菌群异常（菌群生长过度）等。细菌转位的途径被认为是通过 MLN 或回输静脉，但观察到的细菌转位往往开始于 MLN。在健康动物内，从小肠产生的转位很难诱发。因此，往往需要采取人工技术加以诱发如抗生素处理、口服免疫抑制剂或两者兼而有之；另一种方法则采用无菌动物（GF）。尽管在无特定致病菌（SPF）的健康动物体内细菌转位不常见，但转位作用很容易在无菌小鼠体内发生，而且持续时间相当长，这种情况是无菌动物体内肠道屏障功能不成熟及淋巴细胞免疫功能未发育造成的。Berg 和 Garlington 注意到单次接触 *E. coli* 或 *Lb. acidophilus* 后，无菌鼠体内发生从肠至肠淋巴结、脾和肝的细菌转位。给无菌鼠灌喂从普通小鼠体内分离的含有 *E. coli*、*E. faecalis* 和 *Bacteroides sp* 的细菌混合物后，可观察到细菌向多种器官转位。在肠道细菌中，*E. coli*、*Klebsiella sp.* 等比较容易发生转位，其后依次是 *Enterococcus*、*Staphylococcus* 和 *Lactobacillus*。

许多益生菌栖息于肠道，并通过与肠道内其他细菌的竞争影响肠道微生态系统组成。通过观察细菌在肠道内的转位以及随后对宿主的影响，已逐渐发展成为一种评估细菌感染性或

致病性的方法。Salminen 和 Marteau 建议采用转位和定殖过程药代动力学研究作为评估益生菌安全的方法。当将一株对抗生素具有抗药性的 *E. coli* C25 灌喂小鼠后, *E. coli* C25 会在小鼠体内转位并对其系统免疫功能产生伤害; 同样如果对无特定致病菌 (SPF) 小鼠采取口腔经肠营养方式, 可诱导细菌转位并对其系统免疫功能产生伤害。另一种极端的例子是, 如果无菌动物服用致病性的 *E. coli* O111 或 O157, 细菌会在动物的小肠内繁殖、转位并引起动物死亡。其中, O157 导致无菌动物死亡的原因是引发了肾炎 (hephritis)。由于小肠菌群可影响宿主全身的免疫系统, 让无菌动物单次接触某一菌株, 然后观察其在该动物内的定殖方式及其转位对免疫系统的影响引起研究者的广泛兴趣。

Yamazaki 等研究了无菌鼠单次接触 *B. longum* BB536 后, *B. longum* BB536 在无菌鼠内定殖、细菌转位及其对小鼠免疫系统的影响。当无菌鼠口服 *B. longum* BB536 后, 该菌在小鼠小肠内生长繁殖, 2~3 天后 *B. longum* BB536 在肠内容物中的浓度可达到 $10^9 \sim 10^{10}/g$ 。在接触后的 1~2 周时可观察到定殖于小肠的 *B. longum* 发生向 MLN (肠淋巴结)、肝和肾等部位转位。不过, 转位的 *B. longum* 没有引起小鼠的感染或其他有害的后果, 而且四周以后, 转位现象消失了, 这一结果非常清楚地表明小鼠体内具有抑制转位的功能; 在裸鼠体内, 则不存在抑制 *B. longum* 转位的作用, 不引起裸鼠感染或其他后果的转位现象仍然存在。小鼠内单次接触 *B. longum* 后观察到的这种抑制转位的作用被认为与 T-淋巴细胞介导的免疫作用有关, 其出现的时间正好与小鼠体内细胞免疫表达的时间相吻合 (表 2-20)。*B. longum* 单次接触小鼠后, 引起小鼠总 IgA 浓度及抗 *B. longum* 的 IgA 浓度的上升。

表 2-20 小鼠单次接触 *B. longum* 后产生的免疫反应

项 目	单次接触后的时间(周)						
	1	2	4	6	8	12	18
<i>B. longum</i> 转位	+	+	-	-	-	-	-
血清 IgA	-	-	-	-	±	+	+
IgA 分布							
血清	-	-	-	-	-	-	-
胆汁	-	-	-	+	+	+	+
盲肠内容物	-	-	-	-	+	+	+
回肠壁	-	-	-	+	+	+	+
细胞免疫							
足部反应(footpad Reaction)	-	-	+	+	+	+	+
巨噬细胞迁移抑制	ND	-	+	ND	ND	ND	ND

注: ND: 未测定。

有趣的是, 单次接触 *B. longum* 的小鼠在受到 *E. coli* O111 或 O157 感染时, *E. coli* O111 或 O157 对小鼠的毒性降低; 当给无菌鼠口服 *E. coli* O111 或 O157 时, 小鼠体内多种器官会发生细菌转位, 小鼠最终会由于细菌内毒素引起的休克及器官衰竭, 最终导致死亡。

如果口服的是 *E. coli* O157, 小鼠会产生肾炎并在 5 周内死亡; 而如果单次接触 *B. longum* 后的小鼠口服 *E. coli* O157 时, 小鼠肠内 *E. coli* O157 的数量较低, 而且在 5 周内未发生小鼠死亡的情况。小鼠单次接触 *B. longum* 后, 即使给予致死剂量的 *E. coli* O111, 小鼠也不发生死亡。而且, 如果给予单次接触 *B. longum* 的小鼠以致死剂量的 *E. coli* O111, 最初确实可观察到细菌转位的现象, 但 7 天后就完全消失了; 相反在无菌鼠内 (未接触过 *B. longum*) 如果给予 *E. coli* O111, 即使 12 周以后仍可观察到细菌转位的现象。尽管还需要更多的试验予以支持, 上述结果表明单次接触 *B. longum* 对无菌鼠免疫功能具有增强

作用。

要判断某种细菌的致病性和感染性，不能仅依靠研究无菌鼠对其单次接触后细菌在体内的转位以及随之而来的其他变化来决定。不过，上述的结果表明，单次接触 *B. longum* BB536，不仅不会对无菌鼠产生感染或其他有害的作用，反而能增强其免疫，因此，这一试验模型可作为评估益生菌安全性及其功能的有效方法之一。

2. 代谢活性（与有毒化合物产生相关的酶的活力）

对益生菌的另一条要求是在其代谢过程中不能产生有害的物质。方法之一是检测这些细菌是否会将食物成分或宿主的分泌物转化成不利于宿主的次级有害物。例如，某些肠道细菌在分解食物蛋白时会产生 NH_3 、吲哚、酚及胺等有害物质；尽管尚无有关双歧杆菌或乳杆菌产生毒性极强化合物的报道，但其能产生和利用 NH_3 仍然引起人们的关注。

Hraya-Kojima 等测定了人源双歧杆菌与氨的产生和利用有关的酶的活性，与其他的肠道菌群相比，双歧杆菌分解氨基酸产生氨的脱氨酶活性较弱，但同化 NH_3 的能力较强；二次胆盐是肠道菌群产生的另一类重要的有害物质，它们能作用于黏液分泌细胞，促进其增殖，因而可具有致癌性或者是一种致癌促进剂。许多肠道细菌，包括双歧杆菌和乳杆菌，能分解结合胆酸盐，然而，对多种双歧杆菌（10种），乳杆菌（5种）、*Leuconostoc lactis* subsp. *lactis* 及 *S. thermophilus* 研究后发现，它们缺乏 7α -脱羟基酶活性，而后者正与二次胆盐的产生有关。对于肠球菌而言，已发现它们能产生多种裂解细胞物质及其他毒性因子。

3. 血小板凝聚活力与黏膜降解活性

在考虑益生菌安全性时，对血小板的凝集活力是必须检测的项目之一，由细菌引起的血小板凝聚被认为是引发感染性心肌炎的主要病因。Harry 等测定了从感染性心肌炎样本分离的 *Lb. rhamnosus* 和 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*（可能归入 *Lb. casei*）及其实验室保存菌株、*Lb. acidophilus*、*Lb. fermentum*、*Lb. oris*、*Lb. plantarum* 和 *Lb. salivarius* 的血小板凝聚活力。结果发现，不同的菌株之间对血小板凝集活性差异非常大。实验室保存的 16 株 *Lb. rhamnosus* 中的 8 株以及所有从临床感染性心肌炎样本分离到的 5 株 *Lb. rhamnosus* 都具有血小板凝聚活性，这种凝聚作用与其细胞表面存在的某些蛋白质有关，并测定了这种细胞表面成分的憎水性、吸附羟基磷灰石能力及唾液凝集性。与实验室保存菌株相比，从临床感染性心肌炎分离的 *Lb. rhamnosus* 菌株的凝聚活性更高。同时还测定了 *L. paracasei* subsp. *paracasei* 及其他菌株可能产生的其他毒性因子，如糖甙酶活性及蛋白酶活性（胺化酶），这两种酶分别降解人体内的糖蛋白和阻碍人体内凝血纤维素的合成并引起其溶解。结果发现，部分菌株可产生这些酶，表明它们具有潜在的侵染性，可能引起心肌炎。

4. 黏膜降解活力

Ruseler 等对多株乳杆菌及双歧杆菌降解肠道黏膜糖蛋白的酶的活力进行了测定，结果未发现这些菌株具有此类活性。不过在研究益生菌安全性时，仍需要更深入地研究前面所提及的细胞表面成分及酶的作用。无论这种主要由表面蛋白、糖蛋白和凝聚素组成的细胞表面结构是否与其感染性有关，还是前面所提及的糖甙酶、蛋白酶（胺化酶）及其他能降解人肠道黏膜的酶是否与其感染性有关仍有待进一步阐明。如果这种联系被证明确实存在，那么目前被认为是益生菌必要特征的对人肠细胞的黏附性，就需要慎重考虑了。

5. 益生菌的抗药性

抗药性乳酸菌已不断被分离到并引起严重关注，尤其是对于肠球菌，许多肠球菌菌株包

括那些从感染部位分离的菌株,已被证实具有多重抗药性,这种抗药性可能是通过与药物的接触而产生,也可能通过被其他抗药菌株转化而产生,已报道双歧杆菌和乳杆菌可通过与药物的接触产生抗药性。为了防止向体内土著菌群传递或转移其抗药性;除某些特定目的外,所使用的益生菌原则上不应携带超出其自然获得的抗药谱以外的抗药性。

参 考 文 献

- 1 Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., and Yokokura, T. 1997. Antidiabetic effects of an Oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-A^y mice. *Endocr. J.* 44, 357-365, 1997
- 2 Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., Uchida, K., Kato, I., Hashimoto, S., and Yokokura, T. 1997. Prevention of onset in an Insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei* (Nonobese diabetic). *APMIS* 105, 634-649
- 3 Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't veld, J. H. J., 1992 In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics, The Scientific Basis*, Chapman & Hall, London, PP. 209-224
- 4 A. Mercenier, S. Pavan and B. Pot. 2002. Probiotics as Biotherapeutic Agents, Present Knowledge and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110
- 5 Kirjavainen, P. V., Tuomola, E. M., Crittenden, R. G., Ouwenhand, A. C., Harty, D. W. S., Morris, L. F., Rautelin, H., Playne, M. J., Donohue, D. C., and Salminen, S. J. 1999. In vitro adhesion and platelet aggregation properties of Bacteremia-associated lactobacilli. *Infect. Immun.* 67, 2653-2655
- 6 C. short 1999. The probiotic century; historical and current perspectives. *Trends in Food Sci & Technol*
- 7 L. Seppo, O. Keröjoki, T. Suomalaian and R. Korpela, 2002 The effects of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension—a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 57 (3), 124-127
- 8 J. Schrezenmeier and M. der Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl); 361S-364S
- 9 Wells, H. G., Osborne, T. B. 1911. The biological reaction of the proteins. I. Anaphylaxis. *J. Infect Dis.* 1911, 9, 147-171
- 10 Lider, O., Santos, LMB, Lee CSY. et al. 1989. Suppression of autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic proteins by antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 142, 748-752
- 11 Tada, Y., Ho, A., Koh, D-R., and TW, Mak et al. 1996. Collagen-induced arthritis in CD 4 or CD8⁻ deficient mice: CD8⁺ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 156, 4520-4526
- 12 Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. 2001. *Lancet*, 357, 1076-1079
- 13 Helin, T., Haahtela, S., Haahtela, T. 2002. *Allergy* 3, 243-246
- 14 P. R. Marteau, M. de Vrese, C. J. Cellier, and J. Schrezenmeier. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl); 430S-436S
- 15 Brassart, D., and schiffrin, E. J., 1997 The use of probiotics to reinforce mucosal defense mechanisms. *Trends Food Sci Technol.* 8, 321-326
- 16 Pouwels, P. H., Leer, R. J., Boersma, W. J. A., 1996. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization; Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J. Biotechnol.* 44, 183-192
- 17 Pouwels, P. H., Leer, R. J. Shaw, M., et al. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purpose. *Int. J. Food Technol* 41, 155-167
- 18 Clausen M. R., H., Tvede, M., and Mortensen, P. B. (1991). Colonic Fermentation to Short-chain Fatty Acids is decreased in antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology* 101, 1497-1504
- 19 A. Mercenier, * S. Pavan and B. Pot. 2002. Probiotics as Biotherapeutic Agents, Present Knowledge and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110
- 20 Knut J Heller. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods; product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl.), 374S-379S
- 21 Langhendries J. P., Detry, J., and Van Hees, J. 1995. Effects of a fermented infants formula containing viable bifidobacteria on the fecal composition and pH of healthy full-term infants. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 21, 177-181

- 22 Anatoly Bezkorovainy. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut *Am J clin Nutr.* 73 (suppl), 399S~405S
- 23 Fuller, R. and Perdigon, G. Probiotics 3, Immunomodulation by the gut microflora and probiotics. 2000. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherland
- 24 Fuller, R. Probiotics 2: Applications and practical aspects. 1997. Chapman & Hall, London
- 25 Fuller, R. Probiotics; the scientific basis. 1992. Chapman & Hall, London
- 26 Gary W. Elmer, Lynne V. McFarland and Christina M. Surawicz. Biotherapeutic agents and infectious diseases. 1999. Humana Press. Totowa, New Jersey
- 27 Tannock, G. W. 1999. Probiotics: a Critical Reviews. Horizon Scientific Press. Norfolk
- 28 Bozoglu, F. T. and Ray, B. 1996. Lactic acid bacteria: Current Advances in metabolism, Genetics and applications. Springer -Verlag Berlin
- 29 Juntunen, M., Kirjavainen, Ouwenhand, A. C., Salminen, Salminen, S. J. and Isolauri, E. 2001. Adherence of Probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8, 293-296
- 30 Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of Lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 13-126
- 31 Alander, M., Satokari, R., Korpela, R. Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., and von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 351-354
- 32 Hudault, S. Lievin, V., Bernet-Camard, M. F., and Alain L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 513-518
- 33 Finlay, B. B., and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Bio. Rew.* 61, 136-139
- 34 G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte, and Gerhard Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic acid bacteria. *Intl. J. Food Microbiol.* 41, 103-125

第三章 益生菌的培养特性

第一节 肠道菌群的分析方法

尽管在人肠道微生物生态学方面的研究取得了长足的进步,但是,到目前为止对组成肠道菌群的微生物的研究仍然处于起步的阶段。人体的肠道生境是自然界最复杂的微生态体系之一,集中了组成繁杂的各种微生物。此外个体的不同以及年龄或生理阶段的变化增加了该系统的复杂性。由于缺乏合适的分析方法,人们对组成肠道菌群的范围以及某一种微生物在肠道中的作用还无法全面了解。最近在分子生物学方面所取得的进展极大地提高了人们对肠道菌群的分析能力,这些方法的进一步完善和扩展将使人们对这些微生物在肠道生境中作用的认识变得丰富而全面。

一、肠道菌群的培养技术

迄今为止,人们对肠道菌群的全部知识基本上来自于将粪便或肠道标本来源的微生物分离、培养及分析所得到的结果,这种技术现在仍然是研究人肠道微生态系统的主要方法。然而,采用培养的手段作为分析自然生境中菌群组成的方法存在非常明显的缺陷,因为很多存在于这些生境中的微生物在标准培养方法的条件下无法培养出来。尽管存在这些不足之处,培养方法仍然是用来了解肠道微生态系统菌群组成与作用最重要的方法。为了全面了解这些微生态系统,需要采用培养技术与非培养技术的分子生物学技术相结合的方法。

(一) 非选择性培养方法

培养技术的本质是将新鲜粪便或肠组织中的微生物在选择性或非选择性培养基上进行平板分离、37℃培养。样本首先需要在无菌液体中(如0.1%蛋白胨水)进行匀浆。非选择性培养基通常用于获得样本中好氧与厌氧微生物的总数,常用的非选择性培养基有肠液-葡萄糖-纤维二糖培养基(RGCA)、改良10号培养基、标准平板计数琼脂、添加0.5%羊血、1mg/ml维生素K₁和5mg/ml血晶素的布鲁氏血琼脂以及心脑浸出液培养基(BHI)等。需要强调的是,尽管这些培养基中没有添加特定的选择性物质,但这些培养基对人体肠道的部分微生物具有天然的选择性,尤其是那些具有特殊营养需要或者那些在生理状态下能在这些培养基上生长、但不能直接从粪便或肠组织培养的微生物。

(二) 选择性培养方法

对某一类特定细菌的计数通常是在特定的培养基上进行的。从数量上来讲,*Bacteroides*(拟杆菌)是肠道中最主要的细菌,因此,培养基中不需要添加选择性物质就能分离到它们。然而在实际操作中,经常使用一些选择性物质,如胆盐、七叶灵或抗生素等使*Bacteroides*被选择性富集。由于上述选择性物质对肠道细菌具有一定的抑制作用,因此在它们存在时所获得的肠道*Bacteroides*的数量可能比实际值偏低。采用在非选择性培养基上培养后再通过特定的方法进行鉴定后所获得的结果更准确。双歧杆菌是肠道中另一种主要的细菌,到目前已设计出多种选择性培养基,常用来分析人肠道中双歧杆菌数量组成的选择性培养基有YN-6、含有丙酮酸和萘啶酮酸(naladixic acid)Pentuey's选择性培养基(PSM)、BSI、BIM-25和Beerens培养基。在这些培养基中所用的双歧杆菌选择性试剂主要包括抗生素

(卡拉霉素、萘啶酮酸、paramycin 和多黏菌素-B) 和/或丙酸。然而,对常用的双歧杆菌选择性培养基进行分析后发现,没有一种培养基对双歧杆菌具有完全的选择性,它们通常都含有对部分双歧杆菌具有毒性的物质。肠道另外一些常见的细菌如乳杆菌(是小肠内主要的细菌)则通常可以采用 Rogosa (Difco)、酸性 Man Rogosa Sharpe (MRS; Difco) 或 LAMV-AB 培养基从新鲜的粪便或肠组织标本中分离到。梭状芽孢杆菌则可以利用新生霉素 (Novobiocin) 黏菌素 (Colistin) 琼脂 (NCA) 或 Colistin 结晶紫琼脂 (CCA) 从粪便中分离到,该菌在老年人体内尤其明显;肠球菌和粪链球菌则可以采用 Stanetz-Bartley (SB) 培养基、后者又称为 *Bacto m* 肠球菌琼脂,或恶喹酸 (oxolinic acid)-七叶灵-叠氮化物 (OAA) 培养基分离;而大肠菌科的细菌则可以采用麦康凯琼脂 (MarConkey agar, Difco) 分离。所有这些选择性培养基对于分析肠道菌群的组成非常有用,然而,它们都存在不具备绝对的选择性或对同一属(或种)内部分菌株具有毒性等内在性不足。此外,所有的培养基都不能将那些在生理状态下存活、但不能生长的细菌培养出来,即有部分肠道细菌是处于“不可培养”状态。

二、分析肠道菌群组成的经典方法

用来分析肠道菌群的经典方法包括依赖于培养过程和不依赖于培养过程的技术。这两种途径对于了解肠道菌群的性质都具有重大的意义,但都存在准确性差以及分析过程烦琐等缺点,从而限制了利用它们来分析大量细菌存在时的效率。

(一) 依赖于培养过程的经典技术

前面所讲的培养方法可以用来从粪便或肠道样品中分离那些可培养的细菌。在获得相关的菌落后,首先需要将其鉴定到属,然后鉴定到种(或菌株)的水平。这一鉴定过程需要采用一系列形态学和生物化学试验,其中所涉及的绝大多数试验都可以依照《伯杰氏系统细菌学手册》上所列出的方法进行。对所获得种的鉴定结果的可靠性与所进行的试验的多少有关,因此,在经典的鉴定方法中最大的缺陷在于即使进行了完整的各种鉴定试验,也可能导致对所分离的菌株鉴定结果的不确定性。该方法也无法对从不同个体体内所获得的亲缘关系接近的种进行比较。这一点非常重要,因为某一特定的菌株今后能否作为益生菌使用,取决于该菌在不同个体肠道内的稳定性。如果要从进化的角度研究这些肠道菌群,则需要采用比形态学和生化鉴定试验更准确的分析方法。

(二) 不需要培养过程的鉴定方法

在分析某种生态系统的微生物组成时,如果完全依赖于培养方法,由于无法了解所使用的培养方法对其中大量微生物的有效性,从而使所获得的结果极不可靠。幸运的是,在传统方法有很多技术可以对粪便中微生物菌群的真实数量提供直接的依据。但是,这些技术对微生物菌群组成的了解无法提供更多的帮助。

1. 直接显微分析

光学显微镜是直接分析粪便中细菌数量的一种非常有效的工具,据报道,每克湿的粪便中大约含有 $10^{11} \sim 10^{12}$ 个细菌。然而显微计数方法也存在缺陷,所获得的结果可能严重低于实际值。由于这些方法通常涉及加热固定和染色等过程,因此很有可能出现部分细胞脱落,尤其是在水洗过程中。而且,很可能出现不是所有的细胞都着色的情况。尽管存在这些不足,显微直接计数还是为粪便中细菌总数提供了非常好的指征,而且对于评估某种培养方法的有效性非常有帮助。

2. 酶/代谢产物分析

测定粪便样品中某种特定酶或代谢产物的含量可以间接反应其中某一类微生物的数量,或者更准确地讲,可以反应其中某一类微生物的代谢活性。这些间接方法非常快捷,因此,可以同时分析大量的不同样品。此外,这些方法对于了解粪便菌群的代谢活性具有重要的作用。短链脂肪酸,尤其是乙酸、丙酸和丁酸是厌氧细菌发酵的主要代谢产物,测定粪便中这些短链脂肪酸的含量可以反映肠道中某些特定细菌的代谢活性。肠道中短链脂肪酸含量增加被认为是一种有益的指标,而这些脂肪酸含量的增加主要与乳酸菌代谢活性的增强相关。例如,给发生肠道感染的儿童患者服用 *Lactobacillus rhamnosus* GG 以后,其肠道中短链脂肪酸的浓度显著增加。某一类特定短链脂肪酸浓度的增加意味着肠道中某一特定类群细菌代谢活性的增强。例如,在受试者的饮食中补充双歧杆菌以后,其粪便中乙酸的浓度显著增加。

粪便中某种酶活性的升高或降低同样也可以指示某一类细菌代谢活性的改变。例如,受试者在服用 *Lactobacillus rhamnosus* GG 后,粪便中 β -葡糖醛苷酶的活性明显降低,而后者被认为与大肠的癌变有关;同样,粪便中 β -半乳糖苷酶活性与大肠内双歧杆菌的数量之间也存在非常显著的关系。不过,到目前为止,通常还难于将某种特定的酶活性与肠道中某一类特定的微生物类群联系在一起。粪便中多种酶,例如叠氮还原酶和硝酸盐还原酶,可以在肠道中产生有毒的代谢产物,而 *Bacteriodes*、*Eubacterium* 和 *Clostridium* 属中的部分种可能与肠道中这些酶的产生有关,但还需要进行更多的研究以便在某种特定的酶活性与肠道中某一类特定的微生物类群之间建立对应关系。最近, Wolin 等 (1998) 建立了一种利用核磁共振 (NMR) 的方法,检测在婴儿粪便悬浮液中 $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ 从 $3\text{-}^{13}\text{C}$ 标记的葡萄糖的产生情况。由于双歧杆菌发酵葡萄糖时产生乙酸是其特征之一,因此,该方法可能成为一种非常有用而且准确指示肠道中双歧杆菌代谢活性的指标。此外,还需要进行更多的研究,找到能够指示肠道中其他微生物菌群代谢活性的代谢产物。

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

利用传统的培养技术从人肠道样本中分离各种细菌是肠道菌群的唯一来源。利用传统方法对所分离到的菌株进行鉴定和描述存在多种缺陷,尤其是缺乏准确性和过程烦琐。分子生物学技术的出现极大地提高了对分离物鉴定的准确性,并且可以比较不同菌株之间的亲缘关系。主要建立在 DNA 基础上的指纹技术可以用于细菌的鉴定,但是该方法受限于特定指纹数据库的广泛性(需要建立庞大的特定指纹数据库)。随着不同指纹数据库的扩张,该方法的用途会逐渐提高。利用指纹技术来进行微生物鉴定的优势是其快捷性,因而能用于大量未知分离物的分析,其缺点在于受到特定指纹技术灵敏性的制约。尽管不同指纹方法之间的灵敏性差异比较大,许多常用方法的灵敏性却不足以区分不同的菌株,或者是在部分场合下不能区分亲缘关系相近的菌株。这些指纹技术的低灵敏性也限制了它们在研究不同分离菌株之间遗传发育关系方面的应用。然而,这类指纹技术是一种监控已知菌株非常有效的工具,因此可以用来监控一种已知菌株在肠道菌群中的变化情况。

(一) 16S rRNA 序列分析

对某种未知分离物的准确鉴定现在可以通过对 16 S rRNA 进行序列分析来完成,利用该方法来进行分类和比较不同细菌之间的进化亲缘关系是 Woses 及其同事 (1987) 首先提出的。现在关于各种细菌 rRNA 序列组成的数据库已经非常庞大,从而允许对未知分离物的遗传发育地位进行非常详细的研究。这种分子遗传发育研究技术使微生物生态学发生了巨大的变革,并且使所获得的被研究自然生境中各种微生物之间的遗传发育关系具有实际意义。从技术上而言,该方法也具有良好的可行性,因为可以利用聚合酶链反应 (PCR) 的方

法，采用针对 16 S rRNA 基因两端通用保守区的引物直接从所分离到的菌株进行该菌株 16 S rRNA 基因的扩增。然后测定整个 PCR 复制子（大小约为 1.5-kb）的序列组成，将之与 rRNA 数据库进行比较（图 3-1）。

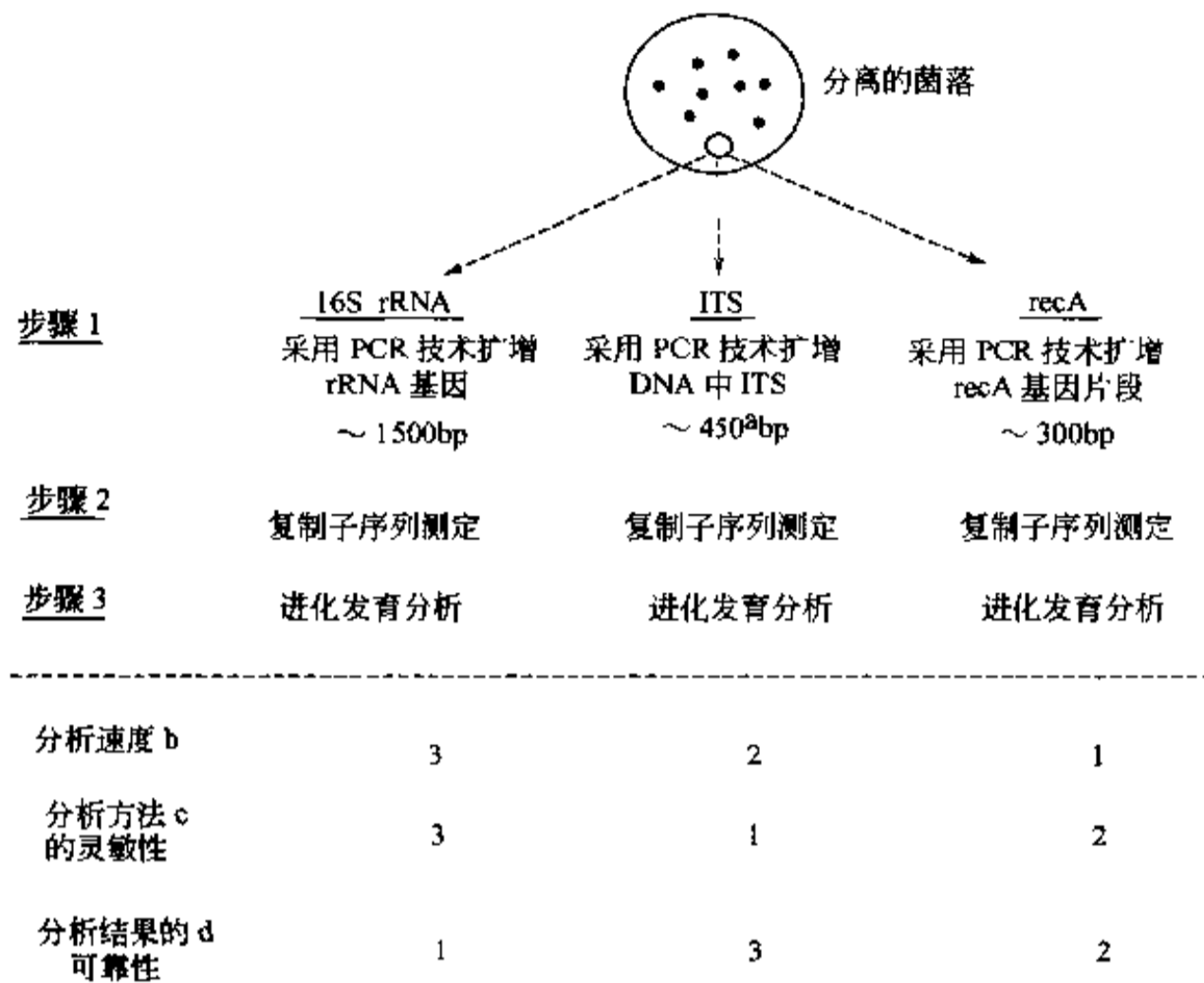


图 3-1 三种以测序为基础的微生物分类与进化发育研究方法的比较
注：a. 29 株双歧杆菌 ITS 长度的平均值（Leblond-Bourget 等，1995）；b. 不同的数值代表分析过程的快慢，“1”表示最快；c. 表示这些方法在分辨不同分离物时的灵敏性，“1”表示最灵敏；d. 表示被分析的序列在用于研究不同分离物之间进化发育关系时，从理论和实验值的角度而言，所获得结果的可靠性，“1”表示最可靠

该技术极大地增加了人们对组成肠道菌群的主要类群之间进化发育亲缘关系的了解。*Bacteriodes* 和 *Bifidobacterium* 是组成肠道菌群的两个主要的属，每一属内不同种之间的亲缘关系相差比较大，采用 16 S rRNA 序列分析对了解这两个属内不同种之间的亲缘关系发挥了巨大的作用。了解不同双歧杆菌之间的遗传发育关系尤其重要，因为双歧杆菌属有多个种被作为潜在的益生菌已用于食品生产。在没有完成对这些双歧杆菌与人体内主要类型的双歧杆菌进行比较前，选择某种特定的双歧杆菌菌株用作益生菌是缺乏科学依据的。

（二）ITS 序列分析

在双歧杆菌属内，rRNA 序列具有极端的保守性，因此 16S rRNA 序列分析的灵敏性可能不足以用来挑选有价值的益生菌后选菌株。一种理想的情况是在挑选后选菌株时采用 16S rRNA 序列分析结合全面的表型性状分析相结合的方法，这种方法确实是一种了解不同微生物之间真实遗传发育关系最有效的工具，并且在最近受到重视。然而，该方法过于烦琐，根本不可能完成对肠道大量菌株的比较。为了 16S rRNA 序列分析的一种补充，就需要分析细胞内另一种 rRNA 分子即 23S rRNA 的序列，尽管后者的保守性不如 16S rRNA，但仍然是一种非常有意义的进化发育标记。被作为进化发育标记的分子必须满足两个条件，即必须存在于所有的细菌中以及具有高度保守的序列，后者表明其组成的变化不易受环境改变的影

响。16S rRNA 和 23S rRNA 基因之间的区域，被称为内部刻录间隔区 (ITS) 已被用于更深入地研究双歧杆菌之间的进化发育关系。这种分子广泛存在于各种细菌中，但是其序列具有非常低的保守性，从而限制了其作为一种进化发育标记的准确性。此外，在同一菌株内 ITS 区域也表现出一定的异质性。然而，从技术上来讲，该分子很容易获得，因为利用 PCR 技术直接从所分离到的菌株进行该分子的标记，引物则采用针对将 16S rRNA 和 23S rRNA 基因分开通用保守区的序列。然而，由于 ITS 具有高度的异质性，无法依赖这种分子进行有意义的进化发育研究，尤其是在进行大规模肠道来源的双歧杆菌分析时。

(三) *recA* 基因序列分析

最近的研究表明，*recA* 基因的一个小的片段有望成为一种灵敏性高、能用于种间进化发育亲缘关系研究的标记分子，并且适用于对自然生境、如人的肠道的微生物组成进行大规模分析，它同时满足广泛存在以及组成具有高度的保守性这两点要求。*recA* 基因负责编码 *recA* 蛋白质，后者在 DNA 重组、DNA 修复与 SOS 应急反应中具有至关重要的作用。研究结果已经证实，分析 *recA* 蛋白质的序列组成可以获得有意义的细菌进化发育的亲缘关系，这些研究同时还高度评价了 *recA* 基因的某一片段作为标记分子在分析某一属内进化发育亲缘关系时的作用。Kullen 等 (1997) 首先将这种方法引入对双歧杆菌属的研究，这种分子可以通过 PCR 技术从双歧杆菌典型菌株和肠道分析物直接获得，引物是针对 *recA* 基因内特定区域的寡核苷酸，该区域在细菌内具有通用保守性。在该方法中形成的片段长度约为 300-kb，该片段采用从任何一端开始的单链序列反应可以被快速测定其序列组成。通过对 *recA* 基因这种短片段序列分析所获得的进化发育亲缘关系，与采用完整 rRNA 分子序列分析所获得的结果具有良好的吻合性。如果将从 *recA* 基因短片段获得相关序列组成的快捷性考虑在内的话，结合其理论上作为一种进化发育标记分子的可行性和试验结果支持，这种 *recA* 基因有望成为一种对人体肠道双歧杆菌分离物进行比较性进化发育研究的有力工具。

四、研究特定微生物在肠道中分布和变化的最新方法

无论是哪一种方法，在分析肠道菌群的组成时都需要对培养所获得的大量分离物进行快速鉴别。幸运的是，目前已开发了多种能满足这一要求的快速检测或指纹技术，它们能提供关于肠道菌群中不同类型细菌的分布情况有效信息。其中，部分指纹技术还可以用于分析不同分离物相互之间的进化发育关系。尽管这些比较分析方法的灵敏性通常不如以序列分析为基础的分析方法，但是在进行更烦琐的序列分析以前，先采用这些快速方法将分离物分成不同的类群还是非常有意义的。

(一) 表型形状指纹法

指纹法针对的性状既可以是表型性状，也可以是基因型性状。尽管可以比较方便地获得不同分离物的表型形状指纹，但是表型形状指纹法的灵敏性一般比较低，因而有时当两株分离物的指纹谱出现少量变化时，并不意味着它们是不同的菌株，而更有可能是某种特定表型性状的表达发生改变所引起。常用的表型形状指纹法有细胞可溶性蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳、脂肪酸组成分析、噬菌体分型和抗血清分型等，其中最快捷和有用的方法是抗血清分型，因为可以采用对某属、种或菌株具有特异性的单克隆抗体直接对所获得的菌落进行分型，而不需要进一步培养。已采用这种方法对不同个体来源的两种拟杆菌 (*Bacteriodes*) 进行了分析。

(二) 基因性状指纹法

最近，在探索人肠道微生态组成中的所取得的最大进展就是研制出一系列多基因性状指

纹分析法。尽管每一种方法都存在一定的局限性，但都可以增进人们对组成不同个体肠道菌群的微生物广泛性的了解。最先发展的一种分子检测方法是针对 DNA 特定序列的寡核苷酸探针法，在这种最基本指纹法的基础上，设计出了各种更复杂的分子性状指纹法。下面将进一步讨论可用于分析人体肠道菌群组成的指纹法，其相互之间的比较见表 3-1。

表 3-1 部分分子指纹法的比较

项 目	PFGE RFLP	RP	16S rRNA	Multiplex PCR	AP-PCR	TAP-PCR
需要培养	是	是	否	否	否	否
分析过程的快捷性 ^①	否	否	是	是	是	是
分辨率	非常高	中等	低	高	非常高	非常高
重复性	非常好	非常好	非常好	好	低	好
分析过程的繁杂性	是	是	否	否	否	否
分析对象是否整个染色体	是	否	否	否	是	是
分析过程是否已自动化	否	是	否	否	否	否
每个样品的分析成本	高	高	低	低	低	低
是否需要限制性酶	是	是	是	否	否	否
能否适用于大多数细菌分离物	是	是	否	否	否	是
是否需要了解该细菌的染色体序列组成	否	否	否	是	否	否

① 主要用来表明整个分析过程能否在 1 天以内完成；PFGE 和核糖体核酸分型都需要几天的时间才能完成；不过，自动化核糖体核酸分型过程可以在一天之内完成。

1. 核酸探针杂交法

核酸探针是一种经过标记（例如同位素）、能与其互补序列杂交（结合）的单链核酸分子，因此核酸探针的靶位是染色体上特定的序列。所选择的靶序列通常是某一属、种或菌株所特有的核酸序列，从技术上而言，这种分析方法的过程非常快，只需要将菌落裂解，使细胞内 DNA 暴露以后，就可以直接采用探针与该菌落进行原位杂交。对探针采用同位素、酶或者荧光素标记后，可以使其容易被检测。该分析方法的关键是探针的选择，特异性差的探针容易引起交叉反应，从而导致结果不明确。探针的获得可以通过鸟枪法或者定位法进行，鸟枪法是通过随机的方式，从 DNA 片段中获得某一片段，然后检查其与被分离菌株库的反应能力。该方法已经被用来制备对双歧杆菌具有菌株-或种-特异性的核酸探针，以及对 *Bacteroides vulgatus* 具有种特异性的探针。然而，这些探针的作用还需要在对大量人肠道分离物的研究中加以进一步的验证。

探针的定位选择方法的偶然性较小，因为其目标是选择针对某一种或某一类特定微生物所特有的靶序列的探针。其策略之一是首先找出属于被研究微生物所独有的酶，然后设计出针对该酶基因内不同靶序列的核酸探针。可作为例证之一的是双歧杆菌中的 6-磷酸果糖磷酸酮糖酶（F6PPK），该属内的细菌利用这种酶将糖以特殊的方式进行代谢，其代谢方式又称为 6-磷酸果糖旁路。由于 F6PPK 仅存在于双歧杆菌内（*Gardnerella* 属的细菌可能例外），因此组成该酶的基因序列可能是用来制备该属—特异性探针的优良来源，从而为跟踪这些细菌在消化道内的转移情况提供有效的手段。然而，F6PPK 的基因序列还没有被分析出来。

制备针对 rRNA 特定区域的寡核苷酸（~20bp）探针是用来制备属—或者种特异性探针最常用的方法，该方法的可行性在于 rRNA 分子内存在短的可变区，后者可用来在属或种的水平上区分不同的细菌。在探针的设计过程中，在计算机模型的帮助下，可以检测不同的探针与各种菌株 rRNA 数据库的反应性。在寡核苷酸探针序列合适的情况下，其发生交

叉反应的情况将比较少。利用这种策略,已经设计出具有属特异性的寡核苷酸探针,并且被用来对人粪便样品中所含有的 *Bacteroides* 和 *Bifidobacterium* 进行检测。此外,针对双歧杆菌、拟杆菌或乳杆菌的种特异性探针也已经设计出来。

2. 脉冲场凝胶电泳 (PFGE)

PFGE 的基本原理是利用电脉冲系统使非常大的 DNA 片段在琼脂糖凝胶中进行移动。在将某种分离物的 DNA 消化成少数 (5~50) 长度相对比较大的片段以后,可以应用该技术对这种分离物进行指纹图谱分析。某种分离物的 DNA 片段可以通过酶切位点比较罕见的限制性酶对分离物的 DNA 进行消化而制备,这类限制性酶通常需要 8-bp 的识别位点,或者需要比较罕见的 6-bp 识别位点。由于所获得的 DNA 片段非常大,整个操作不能在水溶液中进行,否则这些片段会受到机械作用被进一步剪切。因此,所有的操作,包括 DNA 分离和限制性酶切过程,都是在被包埋在琼脂糖凝胶团的细胞中进行。然后,将含有限制性酶切 DNA 片段的琼脂糖凝胶团放入琼脂糖凝胶的加样孔中,在 PFGE 中根据片段的大小被分离。所获得的 DNA 片段的组成方式被称为限制性片段长度的多型性 (RFLP),对某种细菌而言具有高度的特异性。需要注意的是,所获得的指纹图谱代表的是整个染色体组成,而且还可以用来分析某种菌株随着时间的变化其染色体 DNA 上所发生的特殊变化 (如 DNA 缺失、插入或重排)。该特点使这种指纹技术成为目前最具分辨力 (如果不是最高的话) 的方法,此外,该方法具有高度的重复性。其缺点是需要对菌落进行培养,以获得足够的细胞,而且操作过程的技术要求高、过程烦琐。McCartney (1996) 和 Kimura (1997) 等已经证实了该方法在监控人粪便样品中乳杆菌和双歧杆菌数量变化中的作用。

3. 核糖体核酸分型 (RP)

从本质而言,某种菌株的核糖体核酸分型就是其含有 rRNA 基因的 RFLP 组成方式。为了获得某种生物的核糖体核酸分型,首先需要对该菌株进行培养,以获得足量可供分析的细胞;然后分离总的 DNA,利用一种限制性酶切位点比较常见的限制酶将其限制性酶切成多个片段,使其片段的长度从小于 1kb 到大于 20kb,这类限制性酶的识别位点通常为 6-bp。获得的限制性片段在采用琼脂糖凝胶电泳分离后,与针对 16S rRNA、5S rRNA 或 23S rRNA 的探针进行杂交。在实际操作中应用最多的是针对 16S rRNA 的探针。杂交过程可以采用凝胶杂交技术在胶体中直接进行或通过 Southern blotting 技术将胶中的 DNA 转移到尼龙或硝酸纤维素膜上以后再行杂交。经过探针检测以后,含有 rRNA 基因的片段被成像,其电泳带的排列方式就是一种具有特征性的指纹图谱。该方法的机理是细菌的染色体上各种 rRNA 基因具有多份拷贝 (可达到 8 份甚至更多),因此在限制性酶切时可以获得多种长度的限制性片段 (RFLP)。然而,在部分细菌中,其染色体上 rRNA 基因的拷贝数可能仅有 1 份,从而限制了利用这种方法对这类细菌进行核糖体核酸分型的效果。那些 rRNA 基因操纵子只有单一拷贝的细菌通常是那些生长缓慢的细菌,如 *Coxiella burnetti*、*Bradyrhizobium japonicum* 和 *Mycobacterium paratuberculosis*。核糖体核酸分型的优点在于只需要单一的 rRNA 基因探针就可以所有的细菌进行检测。该方法具有高度的重复性,而且在分析人肠道菌群组成的过程中已经证实了其有效性。这种指纹法的缺点在于分辨率不如 PFGE,需要对所鉴定的细菌进行培养,而且分析过程比较烦琐。然而,随着自动核糖体核酸分型仪的出现 (Dupont, Wilmington, DE),极大地提高了该方法对大量分离物分析的用途。

与该方法类似的另一种指纹法是采用针对染色体 DNA 特定区域的探针,例如某种特定生物所独有的毒性基因或负责编码其他性状的基因。由于靶序列在染色体上仅有单一的拷

贝，其分辨性低，但对于鉴别具有某一特征的微生物群体非常有效。也可以采用针对其他在染色体上具有多份拷贝的探针，例如插入序列（IS），从而获得具有特征性的 RFLP。这种技术已经用于对细菌进行指纹分析，但还没有应用于分析人肠道生态系统的组成。然而，考虑到 IS 在乳酸菌中非常普遍，这种方法应该具有一定的可行性。

4. 对 16S rRNA 基因的限制性片段长度多型性（RFLP）分析

这是一种快速分析方法，整个分析过程涉及以针对 16S rRNA 基因内通用保守序列的寡聚核苷酸为引物，利用 PCR 技术对 16S rRNA 基因进行扩增，所获得的复制子用适当的限制酶酶切以后，产生的限制性片段根据其大小可以采用琼脂糖凝胶分离，从而产生具有特征性的指纹谱。所选择的限制性酶取决于被分析的微生物的类型，而且需要经过试验来决定。Kullen（1997）等采用这种方法对从人体内分离的各种双歧杆菌分离物进行了鉴别，使用的限制性酶为 HaeIII，该酶的识别位点为 GGCC，利用该酶对各种双歧杆菌 16S rRNA 基因的扩增产物进行酶切后可产生具有特征性的指纹谱。由于这是一类以 PCR 技术为基础的分析方法，只需要几个细胞就可以完成整个分析，因此可以省略培养过程，这也是所有以 PCR 技术为基础的指纹法所共同具有的优点。由于 16S rRNA 基因具有保守性，因此，这种指纹法的分辨率比较低。然而，这种指纹法可能是所有以 PCR 技术为基础的指纹法中重复性最好的一种。

5. 多重扩增 PCR（Multiplex-PCR）

聚合酶链反应（PCR）技术是 1993 年诺贝尔奖得主 Kary Mullis 发明的，是目前用途最广的分子生物学技术之一。该技术最简单的应用方式是在一种热稳定的 DNA 聚合酶（通常采用的是 *Taq* DNA 聚合酶）作用下，采用与被扩增基因两端互补的寡核苷酸作引物，以脱氧核苷酸（dNTP）为底物，可以将该基因的单拷贝扩增 100 万倍。其扩增过程是通过 PCR 的多次循环而完成的，通常需要 30~40 次循环。在每次 PCR 循环中，装有各种反应物质的试管首先加热至 ~94℃，使作为模板的双链 DNA 解链；然后将温度降至 <55℃（通常情况下如此），使引物与其配对的序列退火；随后将温度升高到 72℃，使 *Taq* 聚合酶将两种引物延长，从而使两引物之间 DNA 序列的拷贝数增加一倍。尽管现在已经能进行大片段的扩增，但在通常情况下，被扩增片段的长度都 <5-kb。由于每一个被扩增的双链拷贝都可以作为下一次 PCR 循环的模板，扩增过程呈指数方式增加，对单拷贝而言，其扩增形式为 2^N （ N =循环次数）。因此，在通常情况下（PCR 循环次数为 35 次），从单拷贝可以产生 $\sim 3.4 \times 10^{10}$ 拷贝。

在多重扩增 PCR 中，采用了多套引物，从而使被目标 DNA 序列的不同区域被同时扩增。目标基因被扩增的部位越多，该方法的可靠性越高。该方法的缺点是必须预先对被扩增基因的序列组成有所了解，而且从技术上而言，要找出最适反应条件的难度比较大。

6. 随机引物 PCR（AP-PCR）

与普通的 PCR 反应相比，在 AP-PCR 技术中只使用了一种短的引物（通常 10~12 个碱基），其序列是随机选择的。为了使引物能与模板 DNA 退火，退火时的反应条件被降低，以便引物能与最接近的 DNA 序列配对。当这些引物在模板 DNA 的两条链上同时结合、而且两者之间的距离为几千个碱基对时，引物之间的 DNA 序列就可以被扩增。被扩增的产物越多，该方法的分辨率越高。这种指纹技术最初是于 1990 年发明的，被称为 AP-PCR 或 RAPD。由于这种快速分析方法的分辨率非常好，而且不需要了解被分析微生物的染色体 DNA 的序列组成情况，因此该方法被广泛应用于对各种细菌的分析。该方法的主要缺点是

反应条件发生轻微改变后,就可能影响引物与模板的结合方式,从而降低了其重复性。

7. 三种退火温度随机引物 PCR (TAP-PCR)

AP-PCR 指纹法的低重复性是分析过程中反应条件的不经意改变所引起的,通过有目的的改变反应过程中的某些条件,而保持其他条件不变,就可以找出那些容易受条件变化影响的复制子。这就是 TAP-PCR 指纹法的理论基础,该方法最近由 Daniel J. O'Sullivan 等提出,他们将 AP-PCR 分析过程中的退火反应在 3 种不同的温度 (38°C、40°C 和 42°C) 下平行进行,退火反应结束以后,将退火反应物用琼脂糖凝胶电泳分离,然后比较在不同温度下引物与模板的结合方式。能出现在两种以上退火温度的结合方式可以看成是对温度的轻微改变不敏感,可以用于进行指纹分析。该方法具有对种和菌株水平的分辨性,既保持了 AP-PCR 指纹法的优点,同时提高了 AP-PCR 指纹谱的可信性 (见表 3-1)。

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

不需要培养过程的分子方法从多方面使微生物生态学的研究取得了质的飞跃,然而,到目前为止,这些方法还没有在研究人体肠道菌群组成的研究中大规模的应用。这些方法在研究肠道微生态系统组成中缺乏相应的影响的一种可能的解释是,传统的培养技术在鉴定大部分肠道菌群时更成功。最近,这些分子方法开始被应用于分析肠道菌群的组成,并且将更多地揭示组成肠道菌群的秘密。迄今为止,大多数应用与肠道微生态分析的分子方法都依赖于采用 PCR 技术对粪便来源的 16S rRNA 进行扩增。一般来讲,粪便样品首先经过差异离心的方法使其中的细菌细胞富集,然后直接进行 PCR 扩增;或者先抽提出总 DNA 或 RNA。在该分析过程中,可以以 DNA 或细胞为模板,采用标准的 PCR 过程获得粪便样品中的 rRNA 基因。由于粪便样品中 rRNA 通常比 rRNA 基因丰富上千倍,如果使用逆转录酶的话,rRNA 也可以作为扩增的模板。由于逆转录酶在第一循环中合成的是单链 rRNA 的互补链,它们之间就形成了一种可继续在 PCR 中使用的双链模板。以 rRNA 作为扩增目标,使混合菌群中代谢活力高的细菌更容易被鉴别出来,因为生长快的细菌一般产生比较多的 rRNA。

在评估自然生境中微生物种类分布的广泛性时,这些以 rRNA 为基础、不需要培养过程的分子方法也存在部分局限。局限之一是,在不同细菌中 rRNA 操纵子的数量是不一样的。很显然,与细胞内 rRNA 基因含有 8 个甚至更多拷贝的细菌相比,混合菌群中细胞内 rRNA 基因仅有一个拷贝的细菌的数量通常会被低估。如果是 rRNA 作为 PCR 的模板,不同细菌细胞内 rRNA 操纵子数量的不均匀性会被进一步放大。另一种局限来自于在扩增 rRNA 基因时,所使用的引物是通用引物。由于这些引物对不同细菌的 rRNA 基因的同源性不完全相同,因此,在这些技术中对不同 rRNA 基因扩增的效率会存在差异。其后果是,在所使用的引物的前提下,会增加那些容易被 PCR 所扩增细菌被检测到的频率,使其在混合菌群中所占的比例高于实际值。为了减少上述局限性,可以使用多种针对 rRNA 基因内不同通用保守区的引物。

将扩增后的 rRNA 基因混合物分离以后,目前有 3 种方式来分析人肠道菌群的组成 (图 3-2): 克隆和

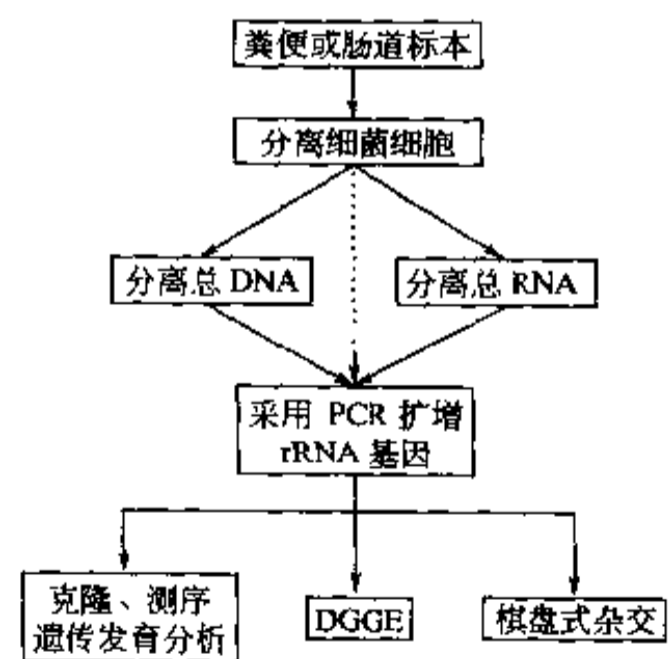


图 3-2 用于分析人肠道菌群组成的不依赖于培养过程的分子方法示意图
当需要以 RNA 作为 PCR 反应中的模板时,需要采用逆转录酶从 rRNA 产生其互补链,这种方法又称为 RT-PCR

测定单个 rRNA 基因的序列；采用变性梯度凝胶电泳将扩增后的 rRNA 基因混合物中的各种 rRNA 基因分离；采用特定探针进行棋盘式杂交（探针芯片杂交）。

（一）单一 rRNA 基因测序

对粪便样本中的 16S rRNA 基因进行扩增后，所获得的是存在于复制子上的各种 16S rRNA 基因的混合物。将这些复制子克隆到一个标准测序载体以后，将形成由不同 rRNA 基因克隆组成的 rRNA 基因文库。然后，可以对这些克隆进行测序和进行进化发育分析。这种方法是导致许多新的菌种被发现的基础，也是目前将自然界所有的生物分成真细菌、古细菌和真细菌等三个“域”（Domain）的理论基础。最近，该方法被用来分析人肠道菌群的组成，初步的结果表明，许多被鉴定的序列来自于一些新的微生物。这一点非常有价值，因为它表明传统的培养技术在分析肠道菌群组成时其作用并不如通常所认为的那样大。利用这种分子技术来分析肠道菌群组成的广泛性将对益生菌研究领域产生重大影响，因为就目前所掌握的情况来看，了解肠道内各种菌群如何保持平衡比了解特定菌群在肠道健康中的作用更重要。

（二）变性梯度凝胶电泳（DGGE）

该方法可以将单个 rRNA 基因从扩增后的混合物中分离出来。尽管含有不同 rRNA 基因的复制子的长度是一样的，但是在电泳过程中随着凝胶中变性剂浓度的线性增加，含有不同序列的复制子将被分开。其原理在于 DNA 序列不同，其变性点也不同。因此，每一种序列在遇到相应的变性点时，双链结构发生解链。解链使 DNA 分子的构象发生改变，从而使其在胶中的迁移速度减慢。脲和甲酰胺是用来配制变性胶常用的两种变性剂，也可以采用逐渐升高温度的方式。在后一种情况下，该方法被称为温度梯度凝胶电泳（TGGE）。当单一的 rRNA 基因发生解链时，其迁移速度变慢，它将与 PCR 复制体系分开。该基因在变性梯度凝胶中的进一步迁移将从双链 DNA 分子变为单链 DNA，为了防止在此过程中形成 GC 夹，在对 rRNA 基因进行扩增时，在其中一种引物的 5' 端加上 30~50 个由 G 或 C 组成的寡聚核苷酸尾，由于 DNA 分子中富含 G/C 的区域不容易发生解链，引物上所加的尾巴可以保证双链 rRNA 基因分子在电泳过程中的完整性。

（三）棋盘式杂交法（探针芯片杂交）

能快速检测某些微生物在不同个体肠道菌群中存在的方法非常有用，尤其是在调查某种微生物在大量人群中的分布情况时更是如此。方法之一是利用能与 16S rRNA 基因结合的种特异性探针，然后将粪便样品中这种 16S rRNA 基因进行直接扩增，该方法已经被用来分析一种益生性双歧杆菌菌株在婴儿粪便中的分布情况。另一种灵敏度可能更高的替代方法利用 rRNA 基因通用引物，将粪便样品中的 rRNA 复制子进行扩增，随后采用种特异性寡核苷酸探针对扩增后的 rRNA 复制子进行检测。采用多种特定探针进行的棋盘式杂交（探针芯片杂交）法可以一次性地完成对多个样品的检测。该方法可以在短时间内同时检测来自不同个体的大量样品中是否存在某种特定细菌。该方法的有效性取决于所使用的探针特异性的高低。此外，该技术依赖于所使用的探针具有相似的解链温度（变性温度），因为要保证杂交过程在相同的条件下进行。到目前为止，符合所期望的特异性及解链条件的探针还非常少。不过，随着更多具有菌株特异性探针的出现，该方法对同时分析不同个体样品中是否存在某种细菌将具有非同一般的作用。

六、肠道菌群组成原位分析（In Situ）

能直接获得某种细菌在粪便或肠道样本中分布情况的方法非常具有诱惑力。这一想法随

着敏感性极高的荧光标记的出现已变为现实, 经过荧光标记的探针可以用荧光显微镜观察。对特定菌株单细胞水平的原位观察可以通过原核细胞原位 PCR (PI-PCR) 或荧光素原位杂交法 (FISH)。

(一) PI-PCR

原位 PCR 技术是采用带有荧光标志的引物在完整细胞内直接进行特定基因的扩增。该方法大多数情况下用在真核细胞中, 不过最近开始在原核细胞中应用。Hodson 等 (1995) 发明 PI-PCR 技术的目的最初是为了原位观察某一种细菌的细胞在自然环境中的分布情况, 在此方法中, 引物是根据被研究细菌细胞内特定的基因而设计的, 经过荧光素标记的引物被加入到载玻片上含有被研究细菌细胞的 PCR 系统中。经过扩增以后, 含有目标基因的细胞可以在荧光显微镜下观察到。最近, Tani (1998) 等采用一种经过改进的荧光标记后, 证明这种方法对于从单细胞水平上观察特定细菌在自然环境中的分布非常有效。这种方法还没有应用于原位观察人肠道菌群, 不过它提供了巨大的可能性, 尤其是用来研究某种细菌是否进行特定基因的表达。

(二) FISH

作为原位 PCR 扩增的一种替代方法是使用经过荧光素标记的寡核苷酸探针与固定在载玻片上的细胞进行杂交。细胞经过固定以后, 允许短的探针进入细胞, 接触细胞内的核酸。整个杂交过程可以在载玻片上进行, 与荧光素标记的寡核苷酸探针发生杂交的细胞可以在荧光显微镜下观察到。Langendijk (1995) 等已经采用该技术来研究双歧杆菌在粪便样品中的分布情况, 此外, 对该技术在检测特定 mRNA 中的作用也进行了研究。该技术与 PI-PCR 的发明, 将有助于最终揭示微生物菌群在人体肠道内究竟表达的是哪些特定的基因。

第二节 益生菌的增殖底物

近年来 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 被广泛用于婴幼儿和成人食品中, 其在动物饲料方面的应用也很广泛。对于人肠道的 *Bifidobacteria* 而言, 膳食中的糖源是能够影响其生长的主要因素, 一些非消化性的低聚糖如棉子糖、寡聚果糖 (FOS)、低聚半乳糖、异构化麦芽糖能导致内源性 *Bifidobacteria* 的增殖, 也会引起其他乳酸菌数量的变化。具有特定健康促进功能、用于乳制品发酵的乳酸菌一般称之为益生菌 (Probiotics), 近年来为了描述膳食性非葡聚糖类型碳水化合物对肠道菌群生长的选择性刺激作用, Gibson 等 (1995) 引入益生素 (Prebiotics) 的概念, 后又引入益生菌和益生素的结合体; 将其称之为合生元 (Synbiotic)。益生素被定义为通过选择性刺激结肠内一种或有限量菌的生长和或活性, 而对宿主产生有益影响的非消化食品配料。益生素是属于最常见的“结肠食品”, 它进入结肠后可以作为结肠原有细菌的生长底物, 直接为宿主提供能量、代谢底物和必需的微量营养素。在每克粪便中特定细菌数量变化和益生素类的低聚糖剂量间的关系尚不清楚, 事实上益生素摄入前粪便中菌的起始数量是决定繁殖因素和其绝对增长的关键常数。

作为益生素的食品配料具有以下特点: ①在胃肠道的前半部分既不能水解也不能吸收; ②选择性刺激结肠内特定益生菌的生长; ③益生素可能具有抑制病原菌和病毒的作用, 诱导对机体健康有利的微生物生态系统的产生。

为了增强肠道乳酸菌, 尤其是 *Bifidobacteria* 的作用, 在膳食中需要添加益生素, 所有 *Bifidobacteria* 的生长均需益生素类碳水化合物作为底物, 故在此分别介绍各类益生素对乳酸菌代谢的影响。

一、非消化性低聚糖类

(一) 棉子糖

棉子糖是一种可以从多种植物体纯化得到的低聚糖，尤其是甜菜中含量较为丰富。由于棉子糖在人肠道的非消化性，在其高量摄入时，可能在肠道后段高浓度存在；许多肠道菌如 *Bifidobacteria* 和 *Bacteroides* 可利用它生长。在 Benno 等进行的一项为期 4 周、棉子糖日摄入量 15g 的人体实验中，口服棉子糖可以大大增加粪便中双歧杆菌的数量，同时 *Clostridium* 和 *Bacteroidaceae* 的数量下降；粪便的 pH 也在棉子糖摄入过程中下降，它对便秘和其他肠道紊乱病症具有改善作用。

(二) 大豆低聚糖

大豆低聚糖包括水苏糖、棉子糖和蔗糖，水苏糖由半乳糖与蔗糖连接形成。这些低聚糖从大豆或大豆乳清中提取和纯化，和其他低聚糖不同，大豆低聚糖是一类非人工合成的低聚糖，具有热、酸稳定性。

Bifidobacteria 能够利用水苏糖和棉子糖，每天摄入 10g 大豆低聚糖会引起人粪便中 *Bifidobacteria* 的大量增加，同时肠道有害菌的数量下降。

(三) 低聚果糖

低聚果糖是非 α -葡糖苷型的非消化性寡糖，它由葡萄糖—(果糖)_{n-1}—果糖 (GF_n) 和 (果糖)_{m-1}—果糖 (F_m) 构成，它们靠 β -1,2 糖苷键连接，*n*、*m* 代表聚合度。

菊粉 (GF_n) 和菊粉水解物 (GF_n 和 F_m) 在天然植物中存在，如洋葱、香蕉、小麦、石刁柏等，它也作为能量形式贮存于菊苣根中，在西方人群中它的平均日摄入为几克。菊粉在工业上通过热水浸提菊苣根部获得。GF_n 类型的低聚果糖，聚合度 DP=2~60，平均为 10；它的部分酶水解产生较小寡聚糖 GF_n (63%) 和 F_m (37%) 混合物，DP=2~8，平均 DP 为 4.8。菊粉水解物称之为寡聚果糖 (Oligofructose)。菊粉和寡聚果糖在西方国家被认为是天然食品配料，被归类于膳食纤维，可用作食品主料，糖代替品，菊粉也用作脂肪替代品。

通过酶法将果糖基转至蔗糖的方法可人工合成低聚果糖，它们属 GF_n 类，DP=2~5，平均 DP3.6，三种主成分为 GF₂、GF₃ 和 GF₄。

低聚果糖是非消化性糖，故属结肠食品，它能够被 *Bifidobacteria* 的许多菌株选择性发酵，故也称之为益生菌。事实上每天摄入 4~20g 的低聚果糖，能选择性地刺激 *Bifidobacteria* 的生长 (见表 3-2)。菊粉水解物能刺激 *Bifidobacteria* 的生长，同时导致粪便中 *bacteroides* 和 *clostridia* 的下降，而且低聚果糖的结肠发酵导致排便量增加，最终使粪便重量增加；结肠发酵产生短链酸如乙酸、丙酸和丁酸，也产生乳酸，引起粪便 pH 值的下降。

表 3-2 不同寡糖对肠道菌群尤其是 *Bifidobacteria* 的影响

碳水化合物底物	刺激菌	参 考
半乳糖基寡糖	<i>Bifidobacteria</i>	Kohmoto 等, 1988
4'-半乳糖基乳糖	<i>Bifidobacteria</i>	Ohtsuka 等, 1989
异构化乳糖	<i>Bifidobacteria</i>	Homma, 1988
低聚半乳糖	<i>Bifidobacteria</i>	Ito 等, 1990
Oligomate 50	<i>Lactobacilli</i>	
低聚半乳糖	<i>Bifidobacteria</i>	Minami 等, 1983
大豆低聚糖	<i>Bifidobacteria, some Lactobacilli</i>	Hayakawa 等, 1990; Kobayashi 等, 1984; Saito 等, 1992

续表

碳水化合物底物	刺激菌	参 考
低聚木糖	<i>Bifidobacteria</i>	Okazaki 等,1990
柏拉金糖	<i>Bifidobacteria</i>	Kashimura 等,1989
乳糖醇	<i>Lactic acid bacteria and Bifidobacteria</i>	Ballongue 等,1997; Salminen 等,1997; Felix1990; Salminen 等,1986
木糖醇	<i>Lactic acid bacteria</i>	Salminen 等,1985
乳果糖	<i>Bifidobacteria and lactic acid bacteria</i>	Ballongue 等,1997; Salminen 等,1997; Harju, 1991; Terada 等,1992
FOS	<i>Bifidobacteria</i>	
合生元	<i>Bifidobacteria</i>	Hidaka 等,1986; Williams 等,1994; Buddington 等,1990
菊粉水解物	<i>Bifidobacteria</i>	Gibson 等,1995; Roberfroid 等,1996; Roberfroid 等,1997
菊粉	<i>Bifidobacteria</i>	Yamazaki 等,1990; Gibson 等,1995; Roberfroid 等,1997; Kleesen 等,1997

粪便 *Bifidobacteria* 量的增加有利于人体健康, 如有利于治疗便秘、免疫刺激、预防肠道感染和预防癌变等。近年来研究发现膳食性寡聚果糖可以通过降低肝脂肪合成酶的产生来调节肝脂肪的生成, 这可能伴随着胰岛素的敏感性增加。

(四) 低聚半乳糖

低聚半乳糖 (GOS) 能刺激双歧杆菌增殖, 它存在于人乳、牛乳中, 并被广泛应用于酸奶生产。以乳糖为原料、应用 *Aspergillus oryzae* 和 *S. thermophilus* 产生的 β -D-半乳糖苷酶可合成低聚半乳糖, 它的摄入对粪便微生物有重要影响, 在 GOS 和粪便 *Bifidobacteria* 间存在着线性的剂量~增殖关系, 其摄入导致粪便中 *Lactobacilli* 量增加。其日摄入量推荐为 10g/天, 在其摄入过程中便重和排便次数不变化。

(五) 半乳糖基乳糖

半乳糖基乳糖 (Galactosyllactose, GL) 是人乳中发现的一种三糖, 在日本已被工业化生产, 将其添加于婴幼儿食品促进婴幼儿肠道 *Bifidobacteriar* 生长, 这表明 GL 可改变婴幼儿粪便的性质, 使其向母乳喂养方向转化。GL 喂养婴幼儿粪便中有机酸和母乳喂养、配方产品喂养的情况比较如表 3-3 所示。

表 3-3 不同喂养方式对婴幼儿粪便中有机酸, pH 值的影响

有机酸	粪便中的有机酸/%		
	母乳喂养婴儿	人工喂养婴儿	摄入 GL 的婴儿
乙酸	53.3	24.8	39.2
乳酸	20.0	11.1	19.4
丙酸	4.3	12.8	11.6
琥珀酸	6.2	19.7	14.4
柠檬酸	4.8	7.9	5.5
丙酮酸	10.7	7.9	5.5
pH 值	5.59	6.66	5.74

GL 适合于婴幼儿配方产品和其他乳制品, 其主要用途是增加人体粪便中 *Bifidobacteria* 的量, GL 摄入已证明是安全的。

(六) 柏拉金糖 (Palatinose)

柏拉金糖在食品可作为防龋齿型营养甜味剂应用, 它是由葡萄糖果糖残基组成的复相寡聚糖, 它呈可消化性, 其摄入可增加人粪便中 *Bifidobacteria* 的数量。

二、多醇类化合物

乳果糖、乳糖醇、木糖醇、山梨醇和甘露醇常用作寡糖的代替物, 它们均能够缓慢吸收, 可在结肠内作为乳酸菌的发酵底物。乳糖醇、乳果糖和木糖醇对肠道微生物有最好的正面影响, 山梨醇和甘露醇能促进革兰氏阴性菌的生长。它们的大剂量摄入会引起痢疾, 但人体很快对大剂量的摄入呈耐受性。

WHO 对多元醇类食品添加剂进行了评估, 其 ADI 为无限制, 表明它们是安全的。乳果糖几十年来一直被作为药物应用, 未发现它的副作用, 其急性中毒为 23~26g/kg 体重, 和蔗糖的急性中毒量相当。

(一) 乳糖醇

乳糖醇是乳糖或乳果糖脱氢还原产生的, 它也用作其他寡聚糖的原材料。自 1912 年发现乳糖醇始, 在 1974 年实现了工业化生产, 1988 年以后才引起人们对其性质的关注。乳糖醇的甜度低, 它不能用作甜味剂。

乳糖醇以及大部分多元醇化合物多用于糖尿病人食用的特殊食品; 由于其低甜度, 在用作甜味剂时受到限制, 但它可作为甜的基料或作为质构物质, 这缘于它的低热值。用乳糖醇加工的产品有非常好的可接受性, 无不愉快的后味; 它在医药工业上也有广泛应用, 它替代乳果糖应用于各种食品中。它具有增加人结肠中 *Bifidobacteria* 的能力, 肠道 β -半乳糖苷酶不能水解乳糖醇, 故它可作为结肠内乳酸菌和 *Bifidobacteria* 的底物。已有实验证实它可以增加肠道内乳酸菌和 *Bifidobacteria* 的量 (Ballongue 等 1997)。

对乳糖醇的毒理实验表明: 大剂量乳糖醇摄入除引起痢疾外无其他副作用产生。由于乳糖醇是近年才商业化应用, 故许多国家未将其作为食品添加剂允许应用, FAO/WHO 推荐的 ADI 为无限制, 说明了它食用的安全性。

(二) 乳果糖

乳果糖是乳糖的合成衍生物, 它不能被肠道 β -半乳糖苷酶水解, 故不能在小肠吸收, 除乳酸菌和 *Bifidobacteria* 外其余菌无法对其利用, 因此它用于改善肠道生态组成。乳果糖甜度较低, 在多种食品中呈稳定性。

乳果糖应用于婴幼儿食品和配方食品以促进肠道 *B. bifidum* 的生长, 它对结肠微生物作为非吸收底物, 但它可导致乳酸菌的 *Bifidobacteria* 的增加。在膳食中强化乳果糖 (38g/天, 2 周) 可极大地增加人粪便中 *Bifidobacteria* 的量, 使粪便 pH 值下降, 水分增加; 同时显著降低粪便中 β -葡糖醛苷酶、硝酸还原酶和叠氮还原酶活性。此外, 乳果糖还有治疗便秘, 防止肠道感染等作用。

(三) 木糖醇

木糖醇是五碳糖醇, 它的摄入能改变人和动物肠道微生物的组成, 导致粪便 pH 值下降和粪便中革兰氏阳性菌增加, 并且抑制有害菌在肠道内定殖。木糖醇可能是乳酸菌和双歧菌的生长底物, 但还需要实验进一步证实。业已证明木糖醇是一种安全的食品配料, 无任何毒副作用。

(四) 山梨醇

山梨醇主要用作糖尿病人的甜味剂。WHO 的 ADI 为无限制说明它食用安全, 山梨醇

可被人体缓慢吸收，故适合于糖尿病人的食用。大量摄入山梨醇会引起气胀、腹泻和腹胀等不良反应，对其食用量的逐渐增加可提高人对其的耐受性。

三、益生菌和益生菌生长底物的选择标准

选择和确认能使人肠道 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 增殖的底物和益生菌是困难的，以前人研究和经验为基础，在选择益生菌时应考虑以下几点：

- (1) 吸收缓慢或不吸收的天然产物或其衍生物；
- (2) 对于大多数乳酸菌而言非还原糖不可利用；
- (3) *Bifidobacteria* 通常能利用含半乳糖的双、三糖；
- (4) FOS、乳果糖、乳糖醇通常能被 *Bifidobacteria* 和乳酸菌利用，促进其生长；
- (5) 由半乳糖、葡萄糖和/或果糖构成的糖能被双歧菌利用；
- (6) 菊粉衍生物能被多数 *Bifidobacteria* 利用；
- (7) 多元醇的轻微致泻作用需要引起重视；

(8) 引起粪便中 pH 下降通常是对任何底物的期望，这可以促进肠道改善和平衡肠道菌群；

(9) 有利于促进 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的生长；

(10) 益生菌对病原菌和病毒的影响需进行评估；

(11) 膳食中的益生菌可用于选择性地改善人肠道的结肠生态组成，也称之为结肠食品，它可以影响肠道微生物的组成与代谢功能。

四、益生菌的安全性

益生菌是膳食常见的组分之一，但目前对作为乳酸菌和 *Bifidobacteria* 生长底物的低聚糖的安全性研究较少。除多元醇类（木糖醇、山梨醇、甘露醇和乳糖醇）外，未进行广泛的毒理性实验；对于多元醇类物质具有广泛的评估数据，其 ADI 和 E 值均已确立；而寡聚糖类物质未进行系统地安全性评估，由于它们是天然存在的或由天然物质加工而成，故认为它们对人体没有危害；由于没有国际化的标准可供利用，各个国家对其的规定存在较大差异性。

许多吸收缓慢的糖类至少会引起暂时性的肠道和腹部问题，对于多元醇类物质存在较大剂量逐步适应的问题，但也经常发生腹胀、腹痛以及气胀和积气等现象，有时也发生暂时性的腹泻。虽然有关低聚糖的不利影响报道较少，但其仍有表 3-4 中潜在的副作用。

表 3-4 大剂量多元醇和乳糖衍生物潜在的副作用

糖替代物	暂时性痢疾	气 胀	腹 痛	积 气
乳果糖	+(mild)	+	+	+
木糖醇	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	+
乳糖醇	+	+	+	+
低聚半乳糖	+	+	+	+
FOS	?	+	+	+
大豆低聚糖	?	?	?	?

菊粉和低聚果糖是包括蔬菜和水果在内的普通食品中的天然成分，在许多西欧国家被分类为天然食品配料。以乳糖为基础的低聚糖在母乳中存在，也存在于发酵乳和乳糖水解产品中。在人和动物食品中作为天然食品配料已被使用多年，它们在正常膳食中平均摄入量为每

天几克的水平。

对低聚果糖的潜在毒性已进行了人体和动物实验，未发现重要的副作用，仅有的副作用是摄入大量 FOS 后发生气胀和软便现象。事实上，非消化性低聚糖的过量摄食会引起诸如气胀、结肠绞痛、肠鸣或腹泻等生理问题，这种影响和其他膳食纤维的影响相似。益生菌的应用量实际上远低于引起不良反应的剂量，一般它们每天分几次摄入 2~3g，对于多醇类为 2~20g/d。对于菊粉和低聚果糖的研究也证明了它们的安全性。当采用基因改良微生物或植物生产这些物质时，应严格采用相应的法规即 EU 新食品法则 (EU Novel Food Regulations) 来评估其安全性。

第三节 乳酸菌的噬菌体

食品发酵依赖于活性乳酸菌的生长，这种乳酸菌源于发酵剂培养物或环境中乳酸菌。乳酸菌的发酵作用可被多种物质抑制，如细菌素、抗生素、消毒剂、乳过氧化物酶—SCN⁻-H₂O₂ 体系，但在工业化生产中遇到的主要问题是噬菌体污染。

在食品发酵领域，噬菌体污染一直是乳品领域长期存在并引起极大关注的问题，在发酵过程中噬菌体侵染乳酸菌后导致产品的乳酸含量降低，并由于蛋白水解作用减少产生难以接受的产品异味。因此乳酸菌被噬菌体侵染以后，其作为发酵剂的活性将受到严重影响。在严重情况下，可导致发酵菌生长的完全失败。由于噬菌体对工业生产的严重危害性，噬菌体的控制是发酵剂培养、产品加工过程中主要工作之一。

一、噬菌体的组成和形态

所有感染乳酸菌的噬菌体均含有线形双链 DNA，它位于噬菌体的头部。噬菌体基因组的 G+C 含量和其宿主染色体的 G+C 含量相似，反映了噬菌体宿主间的亲密关系，如 *L. lactis* 噬菌体的 G+C 含量为 37%，而 *L. casei* 噬菌体的 G+C 含量可达 48%。噬菌体头部所包含的噬菌体 DNA 的数量是由其头部大小决定的。噬菌体基因组的大小通常为 18~56kb，但也测定到许多 *Lactococci* 噬菌体的 DNA 达 134kb。在一些小的噬菌体基因组中，基因的排列非常紧密，基因的重叠情况较为常见。

采用 DNA/DNA 杂交，可以对不同的噬菌体进行更详细的分类。在乳品工业生产中对于噬菌体的监控，采用点印迹技术 (dot blot technique) 等方法直接测定乳清样品中噬菌体 DNA 含量被证明是一种非常有效的方法，点印迹技术的检出极限为 10⁵ PFU/每点 (PFU，噬菌斑形成单位)；也可以通过聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 进行测定，其检出极限为 10³ PFU/ml 乳清。

目前已知的乳酸菌噬菌体都具有尾丝，噬菌体的尾丝和基盘是其结构的重要特征。噬菌体颗粒的结构蛋白质可在 SDS-PAGE 上进行分离，其蛋白质组成方式对于噬菌体的区分十分重要。采用 SDS-PAGE 方法通常检测到 2~4 种主要结构蛋白 (来自于噬菌体头部和尾丝) 和一组次要结构蛋白。噬菌体结构蛋白能激发免疫反应，因此可用于制备多克隆和单克隆抗体。从噬菌体制备的抗血清是一种重要的噬菌体分类工具，蛋白印迹分析 (Western blot analysis)，免疫电子显微镜和 ELISA 均是常用的方法。采用上述方法，可以在几小时内快速、直接地检测乳品工厂发酵乳或乳清样品中噬菌体的含量。

根据 Bradley 的分类体系，乳酸菌噬菌体可分为三个主要类型，即形态 A (有收缩尾)、形态 B (长、无收缩尾) 和 C (短，无收缩尾)，这三类可进一步细分为：小等边体、扁长椭圆等边体或长等边体头部 (分别编码为 1、2 和 3)。在现代噬菌体形态学中，三个主要类型

A-C 分别代表噬菌体簇 *Myoviridae*、*Siphoviridae* 和 *Podoviridae*。

二、噬菌体的生命周期

像典型的病毒一样，噬菌体必须感染合适的宿主细胞才能繁殖。噬菌体不能“跨”种感染，但通常容易在宿主菌的亚种之间发生传播，例如感染 *Lactococcus lactis* 的噬菌体可以在该种内不同亚种之间传播（*subsp. cremoris*, *lactis* 以及 *lactis* biovar *diacetylactis*），在 *Lactobacillus bulgaricus* 中也存在相同的情况。首先噬菌体吸附于宿主细胞，在通常情况下，刚开始的吸附作用呈可逆状态，接下来的吸附呈不可逆性。研究发现，噬菌体对 *Lactococci* 发现有两种不同的吸附方式，即许多噬菌体在整个细胞表面均匀吸附和少数噬菌体以成簇的形式在细胞表面特定的受体部位吸附，表明在细胞表面存在不同类型的噬菌体受体。

Lactococcus lactis 和 *L. casei* 细胞壁的碳水化合物成分是噬菌体最初吸附的受体，鼠李糖是必需成分，在吸附部位附近的其他碳水化合物片段，如半乳糖、葡萄糖或它们的乙酰基形式也参与了吸附作用。研究表明一些竞争性抑制剂可以抑制噬菌体对宿主细胞的吸附，例如在培养基中添加鼠李糖可导致相关的噬菌体对 *L. lactis* 或 *L. casei* 吸附的作用显著下降；采用特定的凝集素也可以有效地抑制噬菌体的吸附，从而更进一步证明噬菌体的受体是碳水化合物。在噬菌体 C₂ 首先可逆性地吸附于 *L. lactis* C₂ 的细胞壁上以后，噬菌体随后不可逆地吸附于细胞膜上由染色体编码的蛋白质（PIP，噬菌体侵染蛋白）。尽管噬菌体与 PIP 相互作用过程呈现温度依赖性，但对于其后的噬菌体 DNA 注入 C₂ 细胞和跨膜转移而言，30℃ 非常有效，4℃ 时则无效；另外一种分子量为 32KDa 的膜蛋白也可能参与了噬菌体对 C₂ 细胞的吸附过程。

噬菌体 pL-1 将其基因组注入 *L. casei* ATCC 27092 细胞的过程要求从完整的宿主细菌获得能量，此外这一过程还依赖于宿主的蛋白合成机制。对于许多感染乳酸菌的噬菌体而言，Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 是必不可少的，但也有些噬菌体在 Ca²⁺、Mg²⁺ 等二价离子缺乏的情况下进行繁殖。对于感染 *L. lactis* 的噬菌体 LL-H 而言，在噬菌体 DNA 跨膜转移过程中阳离子起平衡离子的作用。Kakita 等（1996）最近的研究结果表明，*L. casei* 噬菌体 pL-1 DNA 的跨膜转移过程需要一种由受体控制的 Ca²⁺ 通道参与。Ca²⁺ 通道阻断剂对噬菌体 pL-1 的 DNA 对 C₂ 细胞原生质体感染的抑制作用表明，C₂ 细胞表面噬菌体 pL-1 吸附的受体的结构可能类似于哺乳动物细胞中的 β-肾上腺激素受体。

（一）噬菌体的裂解循环

在噬菌体感染后，它进入裂解循环时会很快分解宿主的染色体。对于感染 *L. lactis* C₆ 的扁长桶头部的噬菌体 c6A 而言，在其感染宿主 6min 后就开始降解宿主染色体，降解的产物最终被用于合成噬菌体 c6A 后代的 DNA。因此，由于细胞被杀死，宿主的生长在发生噬菌体感染 10min 内即受到抑制。在被噬菌体感染的 *Lactococci* 细胞内可以看到下列现象：①后代噬菌体 DNA 的合成；②噬菌体结构蛋白质的合成。当 *L. lactis* NCK 20S 被噬菌体 φ31 感染后，5min 即可检测到噬菌体 DNA 的存在；在噬菌体 C₆A 感染 *L. lactis* C₆ 6min 以后，即开始合成高分子量的子代噬菌体 DNA。

在裂解循环结束时，噬菌体的后代从宿主细胞中释放出来，噬菌体对细胞的裂解通常需要两种具有不同活性的酶的参与，即裂解酶（lysin，降解宿主的细胞壁）和穿孔酶（holin，介导宿主细胞膜非特异性的破裂）。为了保证穿孔酶发挥作用，接近细胞壁的裂解酶需要具备一种胞壁质酶或糖酰酶的作用。许多感染 *Lactococci* 和 *Lactobacilli* 的烈性和温和噬菌体都可以产生胞壁质酶活性，而糖酰胺酶活性则仅在一些 *Lactococci* 的噬菌体中被发现。对于

Lactococci 的噬菌体而言, 发生感染后子代噬菌体的释放量从小于 10 个至大于 300 均有, 其潜伏期为 10~140min。

(二) 溶原性循环

噬菌体的溶原性循环是噬菌体繁殖的另一途径, 事实上大多数 *Lactococci* 是溶原性的, 溶原性在乳杆菌噬菌体中也普遍存在。当进行溶原性循环时, 噬菌体的 DNA 以原噬菌体的形式通过在特定的位点的单交叉重组作用, 整合到宿主的染色体 DNA 上。这就要求在噬菌体 DNA 和宿主染色体间存在一小段同源性区域, 对于噬菌体而言, 该区域为吸附位点 (*attP*), 染色体 DNA 上相应的区域则为 *attB* 位点, 正如 *Lactococci* 的温和噬菌体 ϕ LC3、Tuc2009、*rlt*、BK5-T 和 TP901-1 所发现的那样。上述 5 种噬菌体种的前 4 种噬菌体的吸附位点具有相同的核心序列 (5'-TTCTTCATG-3'), 它与噬菌体 TP901-1 的 *attP* 的核心序列 [5'-TCAAT (T/C) AAGG TAA-3'] 有所不同, 表明后者含有另一种整合系统。感染 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 的温和噬菌体 mv4 的 *attP* 的 17-bp 核心序列与宿主细胞染色体上 *tRNA^{Ser}* 基因的 3' 末端重叠, *Lactococci* 的温和噬菌体也可以在某些功能还不明确基因的开放性阅读框 (ORF) 内进行整合。

溶原性状态由少数噬菌体编码的基因所控制, 例如噬菌体的整合酶基因, 以及几种与整合有原噬菌体的染色体 DNA 遗传功能转换的调节蛋白。在 *Lactococci* 温和噬菌体 *rlt*、BK5-T 和 TUC2001 基因组上假定的抑制子区域的上游的排列情况和已知噬菌体 λ 和 P22 的对应区域相似, 包括两个双向的启动子、假定抑制子结合位点和一种与噬菌体 λ Cro-蛋白功能相似的假定的调节蛋白基因。

在受到温和 UV 辐射或丝裂霉素 C 处理以后, 通常会诱导温和噬菌体从宿主染色体 DNA 上发生解离, 尽管噬菌体自发性的释放现象也非常普遍, 许多 *Lactococci* 细胞内含有一个以上的温和噬菌体, 故呈现多重溶原性。溶原性状态从表型而言, 可以提高宿主对噬菌体的不敏感性, 因为在发生溶原性以后, 宿主可以不再受与原噬菌体类似的噬菌体的感染。在乳酸菌中原噬菌体的存在也可以产生其他的溶原性转化, 例如改变溶原性宿主的菌落形态等。

(三) 假溶原性

需要引起重视的是, 不能将真正意义上的溶原性与假溶原性混淆。假溶原性是烈性噬菌体对发酵剂 (通常是组成不确定的发酵剂) 的永久性感染, 有时也称之为噬菌体携带状态 (pHase Carrier State) 由于这些噬菌体能在发酵剂中的为数不多的敏感细胞中繁殖, 因此, 这种噬菌体在发酵剂中能以较低的浓度永久性地存在。

三、噬菌体的来源

许多食品发酵不是在无菌条件下完成的。在乳品加工厂中, 噬菌体能耐受干酪加工过程中对原料乳的热处理而存活下来。此外, 生乳也常用于多种传统干酪的生产, 在法国、意大利、瑞典这种情况很普遍。尽管噬菌体污染的部分来源已经被研究得非常透彻, 如生奶中噬菌体的繁殖和溶原性发酵剂所造成的污染等, 但有关乳品厂噬菌体污染的主要来源问题一直存在争议。

Kadota 等 (1983) 的研究表明, *L. casei* 的温和噬菌体 ϕ FSW 能够在 Yakult 生产过程突变成一种烈性噬菌体 (ϕ FSV)。采用将原噬菌体剔除的衍生发酵剂替代含有原噬菌体的野生型菌株可以有效地抑制这类噬菌体的感染途径。这种从温和型转向烈性噬菌体的转变是由于烈性噬菌体获得了一种 1.3-kb 插入序列 (ISL1), 因而导致最初的溶原性宿主被感染。

生乳中噬菌体在非发酵剂敏感性细菌中的低水平的繁殖是噬菌体的一种重要来源,故在原料乳样品中可直接分离到噬菌体。研究表明,近年来在乳品领域出现了新型的 *Lactococci* 噬菌体。部分经过特殊处理、在其细胞内引入特定噬菌体抗性质粒的噬菌体不敏感性菌株在长时间使用后,出现新的被感染情况,现已引起广泛的关注。最著名的是 Hill 等 (1991) 发现的噬菌体 $\phi 50$,它能够克服由噬菌体不敏感性质粒 pTR2030 决定的噬菌体抗性机制(例如,一种限制/修饰系统和流产感染系统 AbiA),噬菌体 $\phi 50$ 从 pTR2030 获得了包括负责编码甲基化酶的 *M. LlaI* 基因在内的 55% 功能基因。Moinean 等 (1994) 发现了一种来自噬菌体 u136 的新型 *Lactococci* 噬菌体 u137,该噬菌体是 u136 获得宿主染色体上的原噬菌体以后所衍生的一种新的噬菌体。与噬菌体 u136 不同的是,噬菌体 u137 能够克服使 u136 产生流产感染的系统 (Abic),表现出不同的形态(例如,具有更长的尾部)和不同的复制原点。这些新的(噬菌体 $\phi 50$ 和 u137)都属于 *Lactococci* 噬菌体 P335 组,该组包括烈性和温和噬菌体,都是在最近 10 年内才出现于乳品工业中。最新的研究结果表明,这组噬菌体呈现高度“杂合”性,它允许不同数量的原噬菌体或温和噬菌体 DNA 进入烈性噬菌体的基因组。

噬菌体可能通过与其他裂性噬菌体的 DNA 交换演化而来,同源性 DNA 序列的存在允许感染相同宿主的的不同噬菌体间出现同源性重组。这种 DNA 重组也可以引起烈性噬菌体和温和噬菌体间的 DNA 互换,如 *L. bulgaricus* 和 *L. Latis* 的温和噬菌体和烈性噬菌体之间在溶原性宿主被烈性噬菌体再次感染情况下就会出现这种情况。

四、*Lactobacilli* 的噬菌体

Lactobacilli 的噬菌体在 1950 年左右得到首次确认,对这些噬菌体的研究不像 *Lactococci* 噬菌体那样广泛和深入,可能是因为它们较少导致工业发酵生产的失败。*Lactobacillus* 噬菌体主要可以从乳和肉发酵产品中分离,已发现多种裂解和温和型噬菌体。

(一) *Lactobacilli* 噬菌体的分类

Lactobacilli 的噬菌体一般属于 Siphoviridae 类,属于具有无收缩尾、等体积头部的噬菌体,目前已分离到的仅有少数具有扁长椭球型头部的噬菌体。*L. helveticus* 噬菌体属于 Myoviridae 类,它有一个短的 (160nm) 或长的收缩尾 (260nm); 短尾的 *L. helveticus* 噬菌体在法国分布最广泛,包括烈性和温和噬菌体。*L. plantarum* 的噬菌体 fri 也属于 Myoviridae 类。

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 和 *lactis* 的烈性和温和噬菌体被分为 a、b、c 和 d 四个 DNA 同源性组, a 组的数量最多,包括烈性和温和型噬菌体; a 组或 b 组的噬菌体与 *L. helveticus* 噬菌体没有表现出任何同源性。以及分离到部分能同时感染 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 和 subsp. *lactis* 的噬菌体。*L. plantarum* 噬菌体至少可分为两个 (ϕ LP1 和 ϕ LP2) DNA 同源性组。

一般而言, *Lactobacillus* 烈性与温和噬菌体间 DNA 的同源性要明显高于 *Lactococci* 噬菌体,表明它们是相关的。*Lactobacillus* 噬菌体很容易产生溶原性,且具有较广的感染范围,因此,如果使用那些出现溶原性的发酵剂,可能会由于噬菌体的释放导致产酸或发酵迟缓的情况。

(二) *Lactobacilli* 噬菌体的特征

1. *L. delbrueckii* 的噬菌体

在 *L. delbrueckii* 噬菌体中,被研究最彻底的是具等边体头部的噬菌体,如

L. delbrueckii subsp. *lactis* 的烈性噬菌体 LL-H 和 *L. bulgaricus* subsp. *bulgaricus* 的温和噬菌体 mv4。LLH 的基因组为 34.7kb，呈环形超螺旋折叠，其核苷酸序列最近已经被测定。噬菌体 DNA 的顺序转录分为两个阶段，其早期基因约占噬菌体基因组的 17%，从同一条链转录的其余部分可作为晚期基因。在主要的编码链上已经鉴定出 48 个完整的开放性阅读框架 (ORFs)，而在相应的互补链上仅发现 4 个短的 ORFs，此外还有一个内旋酶基因的部分序列，该基因的 90% 序列发生缺失。在其基因组上已经确定了一个假定性的复制原点、编码 6 个结构蛋白的基因、编码噬菌体裂解素 (*mur*)、转录末端酶大、小亚基以及单链结合蛋白 (SBP) 基因的位置。

噬菌体 mv4 的基因组限制性图谱已被构建，它呈环形超螺旋排列。该噬菌体基因组上的 *attP*、整合酶 (integrase) 基因和一种内裂解酶基因的序列已经被测定，其性质也经过仔细的研究。Mv4 在遗传学上和噬菌体 LLH 密切相关，对两种噬菌体编码结构蛋白的基因簇进行分子水平的比较时，可以看到它们在结构和基因排列方面具有惊人的相似性，表明编码噬菌体结构蛋白质的基因具有高度的保存性。

Lb. delbrueckii subsp. *lactis* 的噬菌体 JCL1032 有一个小的延伸型扁长椭头部，具有长的，易变的无收缩性尾，这是一种非常罕见的形态，其 45.8kb 的基因组限制谱图也被构建。三种噬菌体 LLH、mv4 和 JCL1032 具有共同的宿主，即 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LKT。在它们的基因组上含有多个同源性 DNA 片段，因此，容易发生同源性重组。

2. *L. gasseri*

L. gasseri ADH 的噬菌体 ϕ_{adh} 是一种具有黏性末端、分子大小为 43kb 的温和噬菌体，*L. gasseri* ADH 过去曾被命名为 *L. acidophilus* ADH。 ϕ_{adh} 基因组上 *attB* 位点的序列已经被测定，其核心序列为 5'-TACACTTCTTAGGAGG-3'，其整合酶的性质已经过仔细地研究，可用于构建在特异位点进行整合的载体。噬菌体 ϕ_{adh} 能调节质粒对 *L. gasseri* ADH 的转导，当采用含有噬菌体 ϕ_{adh} 片段的重组性对 *L. gasseri* ADH 进行转导时，转导的频率可上升 $10^2 \sim 10^5$ 倍。 ϕ_{adh} 基因组的裂解区 (含有裂解酶和穿孔酶基因) 已经被克隆和序列测定。 ϕ_{adh} 的裂解酶和来自其他 *Lactobacilli* 和 *Lactococci* 温和噬菌体的胞壁质裂解酶 (mureinolytic enzyme) 具有同源性 (例如 *L. bulgaricus* subsp. *bulgaricus* 的温和噬菌体 mv4 以及乳球菌噬菌体 ϕ_{LC3})， ϕ_{adh} 的裂解酶和穿孔酶 (lysin 和 holin) 基因在 *E. coli* 内也能发挥其功能，它能与 λ 噬菌体和 *Bacillus subtilis* 的噬菌体 ϕ_{29} 的相关基因进行相互交换。

3. *L. casei*

日本学者广泛研究了 *L. casei* 的噬菌体，其最典型的代表是噬菌体 PL-1 和温和噬菌体 ϕ_{FSW} ，近年来又开始对噬菌体 393-A₂ 的研究。所有三种噬菌体均属于 Siphoviridae 科，但它们的尾长度在 156~290nm 间变化，仅 pL-1 具有尾丝。噬菌体 PL-1 最初作为一种烈性噬菌体被分离，但后来发现它能使部分 *L. casei* 菌株溶原化。其黏性末端的序列为 5'GAGGC-CGACCGTTC-3'。

Shimizu 等 (1983) 从溶原菌株 *L. casei* S-1 中分离得到温和噬菌体 ϕ_{FSW} 和异常发酵乳中分离到三株独立的烈性突变体 ϕ_{FSW-A} 、 ϕ_{FSW-B} 和 ϕ_{FSW-C} ， ϕ_{FSW} 的 DNA 呈超螺旋排列。限制分析、DNA-DNA 杂交、异源双链试验和核苷酸序列分析表明这三个烈性突变体中的两个含有 1.3-kb 插入片段，该片段被命名为 ISL1。研究表明，ISL1 插入 ϕ_{FSW} 的基因组可能是使后者获得毒性的主要原因。

4. *L. plantarum*

L. plantarum 的烈性噬菌体可以从生产玉米青贮饲料、干酪和肉制品的发酵剂中分离得到。噬菌体 ϕ LP1 和 B2 从其基因组的大小而言,是属于非典型的 *Siphoviridae* 噬菌体,其基因组的大小为 76~80kb,而噬菌体 ϕ LP1 和 fri 的基因组的大小分别为 47 和 133 kb。 ϕ LP1、 ϕ LP2 和 fri 均不存在黏性末端,由丝裂霉素 C 诱导的温和噬菌体从宿主染色体缺失的几率较低 (13%),而且这些噬菌体非常不稳定。

五、*S. thermophilus* 的噬菌体

目前已知的 *S. thermophilus* 毒性噬菌体均有相同的形态,具有等边体的头和长的无收缩性尾,它们都属于 *Siphoviridae* 中具有 B1 形态的噬菌体 (见图 4-6),其中的烈性噬菌体属于一个 DNA 同源性组,基因组大小为 37~44kb。根据蛋白质种类和同源性程度,不同来源的噬菌体被分为两或三个亚组。

和 *Lactococci* 和 *Lactobacilli* 相反, *S. thermophilus* 很少发生溶原现象,温和噬菌体和烈性噬菌体具有相当高的 DNA 同源性。Fayard 等 (1993) 的研究表明,对于在指示菌上裂解生长的温和噬菌体而言,其宿主范围可以发生显著地延伸。这些指示菌的大多数本身具有溶原现象,因此,侵染的噬菌体克服了原噬菌体的存在所赋予的对再次感染免疫的机制。在进行裂解繁殖后,这些噬菌体表现出不同的限制酶模式,表明在感染 (温和) 噬菌体和指示菌中原有的原噬菌体之间发生了基因重组。两个温和噬菌体 ϕ sfi21 和 TP-J34 被详细研究,它们具有不同的基因组大小 (38kb vs 47kb) 和基因组结构 (*cos* 位点 vs *pac* 位点); ϕ Sfi21 含有一个 2.2kb 的 DNA 保守片段,该片段也存在于多种的烈性噬菌体中,但噬菌体 TP-J34 中无此片段。

噬菌体 ϕ sfi21 在遗传学上非常不稳定,在 *S. thermophilus* 指示菌连续的传代过程中会出现位点特异性的自发缺失情况,其缺失的范围为 0.75~2.7kb;这些缺失发生于基因组上对裂解循环并不是十分重要的三个区域。那些在溶原性模块发生缺失 (使整合酶基因缩短或使 *attP* 位点缺失) 的噬菌体突变体不再具有使 *S. thermophilus* 重新溶原化的能力,噬菌体完整的溶原性模块至少包括其基因组的 6.6kb。

六、*Leuconostoe* 的噬菌体

已经从乳品工业常用的明串珠菌 (例如 *Leucomostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 或 *Lc. lactis*) 中分离到多种噬菌体,从另一个侧面反映出为什么这些生长较慢的嗜温型发酵菌一般仅作为混合发酵剂中次要成分的原因。在通常情况下,发酵剂中的主要菌为 *Lactococci*。明串珠菌的噬菌体呈烈性,形态较为常见,具有等边体头,无收缩尾和明显的基盘结构。以其形态学为基础,结构蛋白模式、DNA 同源性分析表明,从咖啡和乳品中分离的 *L. mesenteroides* 噬菌体可分为没有明显 DNA 同源性的六组,基因组的体积在 24~70kb 之间。

对 *Leuconostoc* 烈性噬菌体的研究不多,但在葡萄酒的发酵过程中常出现噬菌体感染 *L. oenus* (根据新的分类体系,其名称应为 *O. oenus*) 的情况,在葡萄酒发酵时,作为发酵剂加入的 *O. oenus* 出现生长失败的现象往往与其被烈性 *L. oenus* 噬菌体污染有关。

七、*Lactococcus. lactis* 的噬菌体

(一) 乳球菌噬菌体的分类

乳球菌噬菌体在过去根据宿主范围、血清学和形态学特征分为 12 个种,每个代表一个类型的噬菌体。目前其噬菌体的种数减至 10 个,大多数属于 *Siphoviridae* 科,仅有 2 个属

于 Podoviridae。具有等边体头、无收缩尾的噬菌体属于 B₁ 群，它被分为 7 个噬菌体种。种 P335 与温和噬菌体 rlt 和 ϕ LC3、TP901-1、Tuc2009 表现出高度的 DNA 同源性，种 P107、P087、1358、BK5-T 和 949 属于单一的或仅包括几个噬菌体；噬菌体 1483 和 T187 已丧失了种的地位，被重新分类为 P335。噬菌体 P107 和 P008 具有相似的形态，但 P107 和任何其他噬菌体缺乏 DNA 的同源性。噬菌体 P087 和 1358 都具有小等边体头部，但尾部形态不同。扁长椭球噬菌体有三种形态 B₂（扁长椭球头部、长尾、不收缩）、C₂（扁长椭球头部，尾非常短）和 C₃（延伸型扁长椭球头部，尾非常短），它们被分为种 C₂、P034 和 KSY1，种 C₂ 属于 Siphoviridae 类，P034 和 KSY1 属于 Podoviridae。KSY1 具有特殊形态，仅从 Viili 中分离出来（Viili 是芬兰一种黏稠性浓缩酸乳）。仅在种 P335 中同时含有裂解和温和噬菌体，其他种仅包含烈性噬菌体。属于 936 种、具有等边体头部的噬菌体主要是一些从世界主要乳品厂分离的烈性噬菌体，然而，从加拿大乳品厂分离的噬菌体主要是那些具有扁长椭球头部、属于种 C₂ 的噬菌体。最近烈性 P335 噬菌体也出现于美国、丹麦的乳品厂；在欧洲比新西兰、美国等发现更多的不同种类的噬菌体，可能归因于它们干酪生产的较大差异性。

（二）乳球菌烈性噬菌体的特征

具有小的等边体头部的噬菌体宿主范围很窄，而具有扁长椭球头部的噬菌体的宿主范围相对比较广，这一点可以解释为什么噬菌体对异源菌株吸附的专一性存在差异性，以及扁长椭球噬菌体能较好地克服宿主抗噬菌体感染机制的原因。

烈性噬菌体的释放量通常在 100~200 个噬菌体范围，其感染后的潜伏期为 30~60min，有时也会出现一个被侵染细胞释放的子代噬菌体数量（释放量）低于 10 个或高于 250 个的情况。

乳球菌烈性噬菌体基因组的大小在 18~55kb，具有小的等边体头部的噬菌体基因组通常为 30~40kb，而具有扁长椭球头部的 C₂ 噬菌体的大小为 18~22kb。烈性噬菌体大多具有黏着性末端，表明噬菌体 DNA 在包裹到其头部的过程中，末端酶识别并切割了 Cos 位。噬菌体 ϕ 50 的 DNA 具有冗余末端，它包含一个包装起始位点，表明该噬菌体 DNA 向头部的包装机制与乳球菌中其他烈性噬菌体的包装机制相似。已经构建了多种乳球菌噬菌体 DNA 的限制图谱，既包括具有小的、等边体头部的噬菌体：P008、uc1001、uc1002、sk1、hp、F4-1，也包括具有扁长椭球头部的噬菌体：P001、c2、c6A、c6B、c6D、c101、c10W、drcl 和 643。

（三）温和 *Lactococci* 噬菌体的特征

1949 年 Reiter 发现 *Lc. lactis* 可以产生溶原性以后，后来的研究表明溶原现象在这些菌株中普遍存在。*Lc. lactis* 的温和噬菌体可以自发释放或被 UV、丝裂霉素处理诱导产生，不过要找到合适的指示菌非常困难。许多研究者认为从发酵剂中释放的噬菌体是干酪工厂烈性噬菌体的主要来源。Javis (1984) 在烈性和温和性噬菌体间没有发现任何的 DNA 同源性，表明后者不是乳品厂毒性噬菌体的主要来源。近来的研究发现在乳球菌的烈性噬菌体和温和噬菌体间存在 DNA 同源性；Dinsmore 等 (1997) 发现 *Lactococci* 的烈性噬菌体 ϕ 31、温和噬菌体 LC₃ 和 BK5-T 的 1.7-kb 区域的序列存在显著的相似性，但 P335 烈性噬菌体在乳品厂出现的情况不多。另外，原噬菌体可以通过和烈性噬菌体重组的方式引起烈性噬菌体产生变异。

随着分子研究技术的发展，温和噬菌体已引起人们的关注，它是分离强启动子和构建位

点特异性整合系统的优良来源，后者可用作遗传分析工具。已经发现了两种不同类型的整合系统，其中最常见的一种是由属于 Int 族位点特异性重组酶的整合酶所介导；另一种则与噬菌体 TP901-1 中的情况相似，是一种由特定解离酶 (Resolvase) 介导的整合系统。表 3-5 列举了 *Lactococci* 温和噬菌体的特征。

表 3-5 *Lactococci* 温和噬菌体的特征

噬菌体	从 <i>L. lactis</i> 中诱导	<i>L. lactis</i> 指示菌(株)	基因组大小	ORF 数	Pac 或 cos 位点	核心序列
Tuc2009	UC9	UC526	38.347bp	57	pac	5'-TTCTTCATG-3'
rit	R1		33.350bp	50	cos	5'-TTCTTCATG-3'
TP901-1	901-1	3107; Wg2	38.4kb		pac	5'-caat(t/c)AAGGTAA-3'
BK5-T	BK5	H2	40kb	32(*)	cos	5'-TTCTTCATG-3'
φLC3	IMN-C3	IMN-C18	33kb		cos	5'-TTCTTCATG-3'

八、乳酸菌对噬菌体的不敏感性机制

乳酸菌用于食品发酵已有数千年的历史，在此过程中乳酸菌在不断地接触噬菌体。噬菌体和宿主之间这种亲密的接触，必然导致宿主产生全方位的对噬菌体不敏感机制，这种作用在乳球菌中研究得最为彻底。根据前面提到的噬菌体的生命循环，宿主对噬菌体的不敏感性可出现于四个不同的阶段：吸附抑制、阻碍噬菌体 DNA 注入、限定/修饰、感染流产性抑制。对 *Lactococci* 而言，多种噬菌体不敏感作用机制是由质粒编码的，也有少数作用机制不是由质粒编码，正如在 *Streptococcus thermophilus* 中所观察到的那样。

(一) 吸附抑制

噬菌体不能吸附于宿主细胞由两种原因引起，要么是宿主细胞表面缺乏合适的受体或这些受体被物理性的掩蔽。在 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 菌株 SK110 和 UC503 中，后一种抑制噬菌体吸附的机制分别是由质粒 pSK112 和 pCI1528 编码的。菌株 SK110 所产生的掩蔽性成分是一种含半乳糖苷的脂磷壁(酸)质，而菌株 UC503 所产生的则是含半乳糖和鼠李糖的多聚物，在这两株菌中，受体障碍物都可以通过温和的碱处理很容易地去除，恢复细胞被噬菌体吸附的能力。

Harrington 等 (1992) 从接触噬菌体 φD1 的 *Lc. lactis* subsp. *lactis* DPC220 中分离到一株自发的噬菌体不敏感性突变菌株 BIM，在这种无吸附噬菌体能力的突变株中，发生了两种隐性质粒的精确整合，其机制目前还不十分清楚。整合过程激活了融合质粒所编码的吸附抑制系统，同时使 R/M 系统被激活。

(二) DNA 注入障碍

对 *L. lactis* C2 而言，噬菌体 φc2 先可逆地吸附于 C2 的细胞壁，而后不可逆地吸附于细胞膜上的噬菌体感染蛋白质 (PIP)。菌株 C2 的一种噬菌体抗性突变体仍然可以吸附噬菌体，但缺乏噬菌体感染蛋白。因此，φc2 能被从菌株 C2 分离的细胞膜失活，但不能被从缺失 PIP 的突变菌株中分离的纯化膜成分失活，噬菌体感染蛋白 (PIP) 由菌株 C2 的染色体基因编码。因噬菌体注入障碍所引起的噬菌体抗性也可以由编码质粒，如从 *Lc. lactis* DRC3 中分离的 pNP40。*Lactobacillus casei* 对噬菌体 PL-1 的抗性也可能是由于阻碍后者 DNA 的注入所致。

(三) 限制/修正体系

质粒编码的限制和修正 (R/M) 体系在乳酸菌中普遍存在，尤其是 *Lactococci* 菌中。不

过,到目前为止只有少数乳酸菌的 R/M 体系被克隆和研究。对部分 *Lactococci* 和 *S. thermophilus* 中存在的限制/修正体系的类型 II 限制性核酸内切酶的识别和酶切部位已经做了详细的研究,在 *Lactococci* 中,这些酶包括来自 *Lc. cremoris* UC503 的 *ScrFI*,其识别位点为 5'-CCNGG-3';来自 *Lc. cremoris* w9 的 *LlaAI*,其识别位点为 5'-GATC-3';来自 *Lc. cremoris* W56 的 *LlaB1* (识别位点为 5'-CTRYAG-3', Y 代表 C 或 T, R 代表 A 或 G)和来自 *L. lactis* NCDO 497 的 *LlaI* (识别位点为 5'-CCWGG-3', W 代表 A 或 T)。最近,在 *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* 中发现了三种新的核酸内切酶 (*LlaCI*、*LlaDI* 和 *LlaEI*),尽管其识别位点的序列还不清楚。在 *S. thermophilus* 中也发现了这些限制核酸内切酶的同功酶 (分别为 *Ssh117I*, *SsII* 和 *Sth455I*),但是,在 *S. thermophilus* 中这些酶不是由质粒编码的。

在乳球菌中,部分编码类型 II R/M 限制体系酶的基因的序列已经被测定。*ScrFI* 体系非常独特,因为编码该体系酶的基因与染色体上编码两种腺嘌呤甲基化酶和一种限制性核酸内切酶的区域重叠,编码这两种甲基化酶的基因位于编码该限制性核酸内切酶的基因的两侧 (*M/ScrFIA* 和 *ScrFIB* 并不是同一基因的简单拷贝,两者之间仅有非常低的同源性)。在 *LlaAI* 体系中,有 3 种酶是由质粒编码的,即两种腺嘌呤甲基化酶和一种限制性核酸内切酶。

限制性核酸内切酶通常由单一基因编码,但在结合性质粒 pTR2030 中则完全是另一回事。在该质粒上,编码限制性核酸内切酶的基因所涉及的 3 个开放性阅读框架 (ORFs) (分别为 *ilaI.1*、*ilaI.2* 和 *ilaI.3*) 是一个 7-kb 操纵子的一部分,该操纵子还含有第 4 个 ORF 和编码甲基化酶的基因 *ilaI.M*,后者与流产感染机制中的 *abiA* 基因的位置非常近。

(四) 噬菌体流产感染机制

当噬菌体吸附于宿主细胞,并成功地将自己的基因组注入宿主细胞内,在没有受到 R/M 体系的作用而被分解成不同碎片的情况下,噬菌体随后在宿主细胞内的发展过程 (例如, DNA 复制、转录、翻译、DNA 包装、子代噬菌体的装配) 是宿主抵御噬菌体侵染最后的关键步骤。然而,由于噬菌体在宿主细胞的成熟过程中引起宿主染色体的降解,必然会引起部分细胞死亡,因此,有一部分噬菌体就会被包埋于死亡的细胞内而不被释放到环境中。由这种作用引起的噬菌体不敏感作用被称为流产感染体系 (或 *abi*),它可以通过检测不到噬菌斑的存在或噬菌斑数量的大量减少来测定。

目前已经知道在 *Lactococci* 中至少存在 10 种不同的流产感染系统,它们被分类为 *AbiA*、*AbiB*、*AbiC*、*AbiD*、*AbiD1*、*AbiE*、*AbiF*、*AbiG*、*AbiH* 和 *AbiK*。在两种不同的质粒 pTR2030 和 pCI829 上已经发现了相同的 *AbiA* 基因。仅 *AbiD*、*AbiD1* 和 *AbiF* 系统的蛋白质之间存在明显的同源性,表明在乳球菌中存在不同的流产感染机制,而且排除了乳球菌细胞内 *Abi* 蛋白存在共同“祖先”的可能。所有编码 *Abi* 系统的基因拥有相同的特点,即它们的 G+C 含量非常低 (26%~29%),这和 *Lactococci* 其他已知基因的 G+C 含量 (G+C 平均含量为 37%) 有显著差异。除 *AbiE* 和 *AbiG* 的表现型需要 2 个开放性阅读框架外,所有其他 *Abi* 系统仅存在单一的 ORF。

不同的 *Abi* 体系对噬菌体 DNA 有不同的作用机制和靶位。*Lactococcus lactis* subsp. *lactid* ME2 中质粒 pTR2030 编码的 *AbiA* 系统防止噬菌体 DNA 在宿主细胞内复制;其他 *Abi* 系统作用于噬菌体 DNA 复制前或复制阶段,如 *AbiF* 和 *AbiK*。在获得质粒 pAJ2074 的 *Lactococcus* 菌体细胞内,也观察到噬菌体 DNA 的复制受到抑制的现象,该质粒可以编

码一种目前尚未被明确分类的 abi 体系。

噬菌体 DNA 复制不受其他 Abi 系统的影响。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Bu2 细胞中 AbiB 的质粒 pBU1-8 所编码的一种 Abi 系统则可以通过阻碍噬菌体 DNA 的转录而阻止噬菌体的生长,而在 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 被噬菌体 bIL170 感染 10~15min 后,宿主细胞的 AbiB 系统可以通过加速噬菌体 DNA 转录产物的降解而抑制噬菌体的生长。试验表明,该噬菌体的某种早期产物可以诱导或者是促进 AbiB⁺ 型宿主细胞内一种核酸酶 (RNase) 的产生。采用以噬菌体 u136 主要的壳体蛋白制备的单克隆抗体所进行的 ELISA 试验表明,在拥有 AbiC 系统的乳球菌宿主内,噬菌体的这种结构蛋白的表达减少了 50% 以上,由于噬菌体 DNA 的复制没有被完全抑制,AbiE 和 AbiG 系统可以在噬菌体发生的后期阶段发挥作用。

能够克服流产感染机制的噬菌体诱变体,常用于确定 Abi 系统在噬菌体基因组上的作用靶位。

九、噬菌体的控制

由于作为发酵底物的原料乳一般采用巴氏消毒而不是高温灭菌,绝大多数乳品发酵过程并不是在无菌条件下进行的。然而,噬菌体能够耐受巴氏消毒的温度条件不存活下来;而且,未经任何热处理的原料乳也常用于一些传统干酪的生产。乳品加工厂一旦被噬菌体污染以后,噬菌体就很容易扩散,尤其是通过空气途径和干酪乳清残留物的传播。因此,从控制噬菌体传播的角度而言,对乳清的处理就非常关键。为了达到规模效益,乳品发酵通常采取连续放大、短时间发酵的工艺,发酵罐每天都要使用一次以上,从而增加了噬菌体感染发酵剂中乳酸菌的机会。在此不介绍传统的噬菌体的控制方法,而是通过近年来噬菌体遗传学和抗性机制的发展,介绍一些现代的控制噬菌体的方法。

(一) 通过结合或转化的方法转移噬菌体抗性基因

Lactococci 具有由不同质粒编码的噬菌体抗性系统,这已变成一种改进发酵菌株噬菌体抗性的有效方法。许多质粒具有结合性,因此通过结合的方法可以避免在受体菌中以抗生素抗性标记为基础来选择转移结合子。Harrington 等 (1991) 以 Nisin 抗性为标记物,通过结合的方法转移噬菌体不敏感性质粒 pNp40。细菌素抗性也是一种和噬菌体不敏感决定物质连锁、由质粒编码适合于作为选择标记的天然特性。对于缺乏以细菌素抗性作为天然选择标记的质粒 pTR2030 而言,则发展一种其他的使 pTR2030 进入不同乳球菌发酵菌株的方法。将一种天然缺乏乳糖质粒的供体菌种和乳糖阳性受体菌株结合,通过在烈性噬菌体存在条件下就可以在乳糖琼脂上选择产酸、具有噬菌体抗性的转移结合子。由于噬菌体抗性的受体突变体也能够在该培养基上生长,通过与针对由质粒携带的流产感染系统的 DNA 探针进行杂交,可以进一步确定那些获得了质粒 pTR2030 的转化子。

另一种经常应用的方法 (通常是一种非食品级转化方法) 是共转移法,即通过乳糖代谢质粒和噬菌体抗性质粒共同转移到乳糖代谢阴性的受体菌株中,通过筛选同时具有乳糖发酵能力与噬菌体抗性的转移结合子来达到筛选抗噬菌体发酵菌种的目的,采用这种方法可以使发酵剂菌种对一系列相关的噬菌体产生抗性。

(二) 反义 RNA 方法

乳品发酵菌种的噬菌体不敏感性可以采用传统的方法,通过引入天然噬菌体抗性基因的方法加以改进。此外,研究表明,噬菌体本身也能被用于噬菌体的控制。一种新的抗噬菌体的方法是以反义 RNA 为基础,在乳球菌强启动子的作用下,以 *Lactococci* 噬菌体 ϕ 7-9 的基

因 gp51c 为模板，通过克隆的方式，获得一段长度为 1.6kb 的反义片段。将该片段引入受体乳球菌以后，受体细胞对噬菌体的不敏感性显著提高。相反，如果采用截短的 gp51c 进行转化所获得的转化子对噬菌体的抗性明显不如上述转化子。针对噬菌体 ϕ 7-9 其他基因 (gp18c、gp24c) 或另一种噬菌体 ϕ F4-1 主要壳蛋白基因的反义 RNA 也被构建，但其所引发的对噬菌体抗性要低得多，表明在采用该技术时需要选择那些对噬菌体繁殖至关重要、而且转录水平较低的基因。

第四节 发酵剂微生物学

发酵剂是制造干酪、奶油及发酵乳制品所用的特定的微生物培养材料。此培养材料一般为液体或固体粉末。用于制造目的发酵剂称为工作发酵剂，为了制备生产用发酵剂预先制备的发酵剂称为母发酵剂或种子发酵剂。工作发酵剂按照使用目的的不同称为干酪发酵剂、奶油发酵剂和酸奶发酵剂等。

发酵剂由特定的微生物出发，制造发酵剂的原始培养物称为发酵剂菌种。在本章中，发酵剂通指用于工业生产的由单一或多种微生物混合培养物，而菌种则是指由单一微生物组成的纯培养物。发酵剂与乳制品的关系如图 3-3。

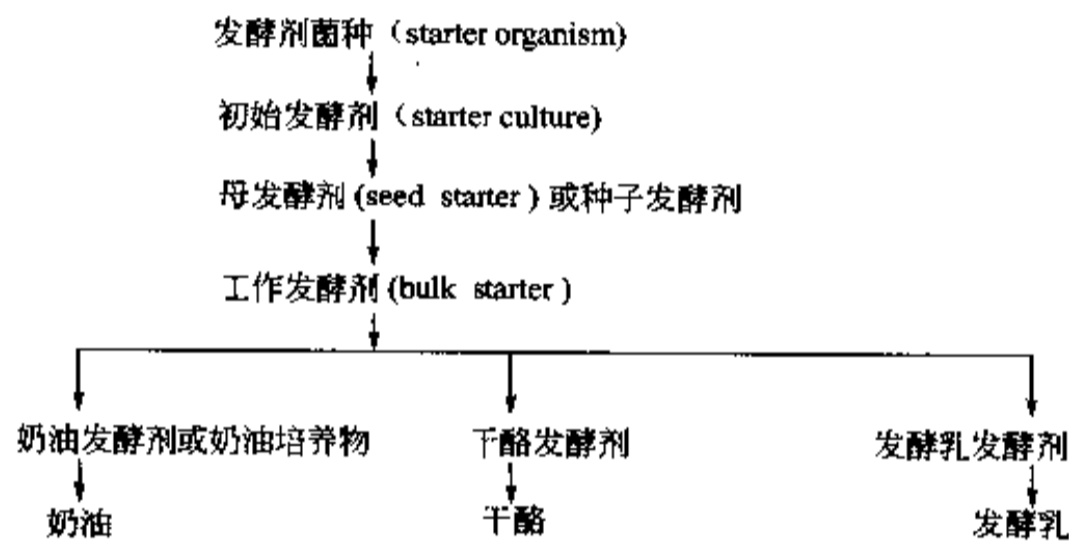


图 3-3 发酵剂与乳制品的关系

如上所述发酵剂是以微生物为母体，但随着对发酵剂作用的进一步了解，出现了所谓的人工发酵剂或化学发酵剂。特别是添加作为奶油培养物替代品的合成风味物质，意味着今后可能改变发酵剂的概念，但 Andesen 指出，这类发酵剂尚存在很多问题。

一、组成发酵剂的微生物类群

(一) 发酵剂菌种的生物学特征

乳制品中应用的微生物以单一或混合的形式使用，乳酸菌是乳品工业中应用最广泛的菌种之一，它常用于干酪、发酵乳（酸奶、*L. acidophilus* 乳、Ymer、Skyr、Filmjolk 和发酵酪乳等）、发酵稀奶油和酸奶油及 Kefir 乳和 Kumiss 等产品的生产。发酵过程是发酵剂和乳中微生物（细菌、霉菌和酵母）共同作用的结果。发酵剂有两种基本类型：即最适生长温度在 45℃ 左右的嗜热发酵剂和最适生长温度在 30℃ 左右的嗜温发酵剂，两种类型的发酵剂中含有不同的乳酸菌。

嗜热发酵剂几乎都含有 *Streptococcus thermophilus* 和一种或多种乳杆菌，乳杆菌的种类随加工产品的不同而不同，如酸奶应用的是 *L. bulgaricus*，瑞士干酪用的是 *L. helveticus* 或 *L. lactis*；许多嗜热发酵剂，如应用于 Beaufort 和 Grana 等干酪生产的发酵剂，仅含有乳杆菌。产风味和芳香物质的微生物则常在嗜温发酵剂中使用，如 *Str. diacetylactis* 和 *Leu-*

conostoc. spp., 其主要作用是代谢柠檬酸产生二乙酰、醋酸和二氧化碳, 它们对乳制品的风味有重要影响。尚不能完全确定是何种 *Leuconostoc* 对风味物质的产生具有重要作用, 有可能是 *Leuc. cremoris* 和 *Leuc. lactis*。由于 *Str. lactis*、*Lactococcus lactis subsp. cremoris* 和 *Str. diacetylactis* 具有相同的组织抗原, 故简单称之为 N 组或乳酸链球菌组; *Str. lactis* 和 *Str. diacetylactis* 的主要区别在于后者具有与柠檬酸传递有关的质粒, 这也是 *Str. diacetylactis* 现在被认为是 *Str. lactis* 的一种生物变种的主要原因。部分用于生产发酵乳的嗜热发酵剂还含有 *L. acidophilus*、*L. casei* 和 *Bifidobacteria*, 用此发酵剂生产的发酵乳被认为具有生理保健作用。组成发酵剂的各种乳酸菌的部分分类、鉴定特征见表 3-6。

表 3-6 发酵剂中乳酸菌的部分分类、鉴定特征

旧分类名称	新分类名称	形状	凝乳前 石蕊还 原能力	乳中产 乳酸含 量%	乳酸 类型	柠檬酸 代谢	精氨 酸产 NH ₃	生长情况			糖发酵		
								10℃	40℃	45℃	葡萄糖	半乳糖	乳糖
<i>Streptococcus thermophilus</i>	未变	C	-	0.6	L	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	未变	R	-	2.0	DL	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lac. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	R	-	1.8	D	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lac. delbrueckii subsp. lactis</i>	R	-	1.8	D	-	+/-	-	+	+	+	+/-	+
<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	C	-	0.8	L	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	C	-	0.8	L	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis</i>	C	+	0.8	L	-	+/-	+	+/-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc lactis</i>	未变	C	-	小于 0.5	D	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc cremoris</i>	<i>L. mesenteroides subsp. cremoris</i>	C	-	0.2	D	+	-	+	-	-	+	+	+

注: C: 球状; R: 杆状。

嗜热和嗜温发酵剂可被细分为菌株组成已知的特定发酵剂 (defined cultures) 和菌株组成不详的混合发酵剂 (mixed cultures)。嗜温特定发酵剂是纯培养物, 在多数情况下主要由 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 组成, 以单一、二种或多种菌株构成。这种发酵剂最初在 1930 年出现于新西兰, 当时采用混合发酵剂生产干酪时, 由于混合发酵剂中的产风味菌种能分解柠檬酸盐产生二氧化碳, 导致干酪的质地松软。后来, 将其中不产香的菌种分离出来后, 作为单一菌种发酵剂应用于干酪生产, 由此产生了早期的特定发酵剂。用此种发酵剂生产的干酪具有缜密结构, 但应用于工业化生产时, 经常会遇到噬菌体污染, 引起菌体细胞裂解, 从而导致发酵时产酸缓慢的现象, 这一问题通过每隔 4 天采用由两种噬菌体敏感类型不同的菌株对组成的发酵剂进行轮换使用而获得解决, 其原因在于到第 5 天时, 干酪槽中的噬菌体数量大为减少, 当第一组菌株重新使用时, 发酵剂的生长和产酸能力基本不受影响。采用此种方式, 可以有效减少加工厂内噬菌体的滋生。

混合型嗜温发酵剂依据其是否含有 *Leuconostoc spp.*、*Str. diacetylactis* 或二者兼有之, 可分为 B (B 为 *Betacoccus* 的缩写, *Leuconostoc* 的旧称)、D (D 是 *diacetylactis* 的缩写) 或 BD 培养物。不含产风味菌株的发酵剂称为 O 型发酵剂 (O-type cultures), 它们在北欧尤其是荷兰被广泛使用。这类发酵剂大多数不加轮换地长期使用或未采取防止空气中噬菌体污染地措施, 因而被称为 P 型发酵剂 (Practice cultures, 实用型发酵剂), 它有别于 L 型培

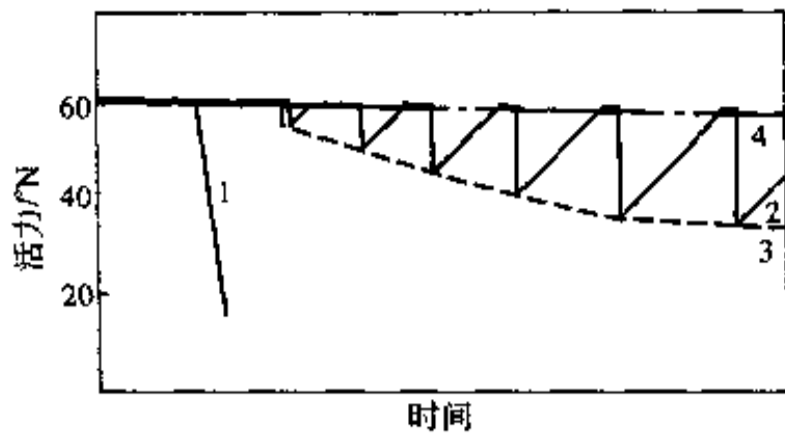


图 3-4 P 型发酵剂和 L 型发酵剂引入工厂后的活力波动曲线

- 1—一次性引入的 L 型发酵剂；2—一次性引入的 P 型发酵剂；3—日常应用的 P 型发酵剂；4—日常应用且培养时采取严格预防噬菌体污染措施的 P 型发酵剂

养物 (Laboratory cultures, 实验室培养物), 后者是 O 型发酵剂在实验室采用严格无菌操作进行多次传代培养后的培养物。P 型发酵剂与其环境中的噬菌体处于平衡状态, 含有大量的噬菌体 ($\geq 10^8$ cfu/ml), 这种噬菌体被称为“自身”噬菌体, 它不影响 P 型发酵剂的产酸能力; 当一种新的噬菌体在工厂中产生时, 被称为“干扰”噬菌体 (Disturbing phage), 它导致 P 型发酵剂中多数对该噬菌体敏感的菌株破坏, 但因其含大量抗噬菌体感染的菌株 ($\geq 10^8$ cfu/ml), 故 P 型发酵剂的活力很快恢复。与其相反, L 型培养物若一株或二株菌被噬菌体污染则其呈噬菌体敏感性,

结果不能抵御干扰噬菌体的攻击而产酸能力锐减, 即噬菌体污染常会引起 P 型培养物活力的波动, 但会导致 L 型发酵剂活力的不可逆下降, 见图 3-4。

传统上嗜热型发酵剂也是一种混合发酵剂, 常含有 *Str. thermophilus* 的多种菌株和一至数种乳杆菌。在现代干酪和酸奶加工厂, 发酵剂通常含有单一或多种菌株, 并轮换使用。

(二) 发酵剂培养物的分类

乳品发酵剂培养物的分类如图 3-5 所示。

(三) 乳品发酵剂常用的微生物

发酵剂使用的主要菌种及其性质如表 3-7 所示。

发酵剂按其用途可分为干酪发酵剂、奶油发酵剂、酸牛乳发酵剂等, 按使用的形态可分为液状发酵剂、粉末发酵剂等。液状发酵剂是以全脂乳、脱脂乳、酪乳、乳清等作为培养基的液状发酵剂。粉末发酵剂是将液状发酵剂经低温干燥、喷雾干燥或冷冻干燥所获得的粉末状发酵剂, 包括以淀粉繁殖的霉菌发酵剂。

用单一菌种, 或两种以上菌种混合使用的发酵剂, 称为单一发酵剂或混合发酵剂。乳酸菌混合使用时, 乳酸链球菌或嗜热链球菌与干酪乳杆菌或保加利亚乳杆菌混用的较多。这些组合的目的, 因制品的种类而异。两者取长补短, 利用菌种间的共生作用, 并且从防止噬菌体污染的角度而言, 也比单一菌株有效。

二、发酵剂的作用

(一) 乳酸发酵

应用乳酸菌使牛乳中的乳糖变成乳酸, 是使用发酵剂最重要的目的。由于乳酸发酵导致牛乳的变化, 如 pH 下降、产生凝固及酸味。pH 下降可防止杂菌的污染。由发酵和凝乳酶的共同作用产生凝固和酸味, 是发酵制品或加工处理中凝块生成的必要条件。

1. 制造干酪的乳酸发酵

乳酸发酵的目的如下:

- (1) 促进凝乳形成;
- (2) 使凝块收缩和乳清容易排除;
- (3) 防止加工和成熟时有害微生物的污染;
- (4) 使制品的质地和组织状态良好;
- (5) 给成熟过程中酶发挥作用提供合适的 pH 环境。

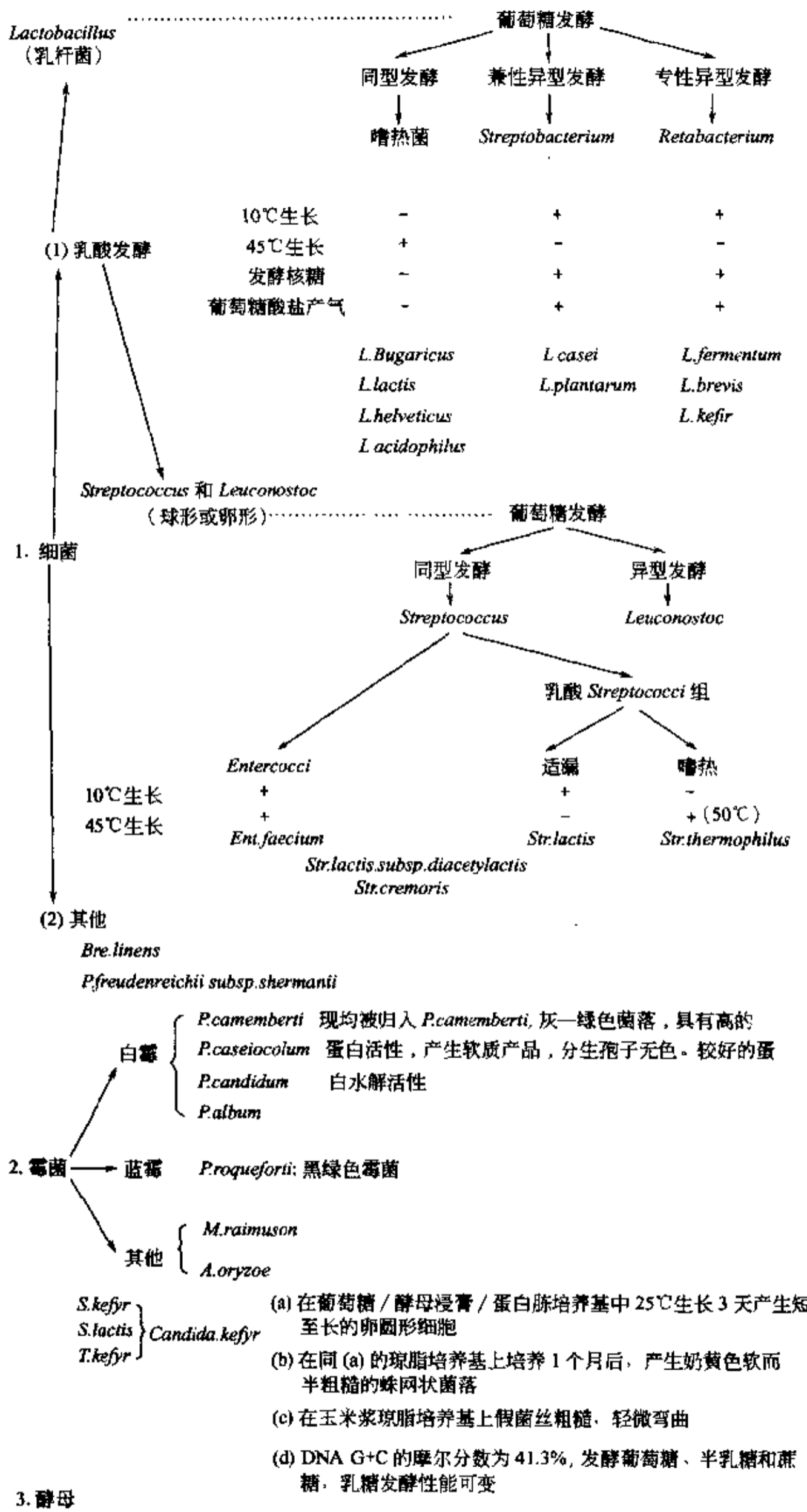


图 3-5 乳品发酵剂培养物的分类
注：“+”表示具有该项能力，“-”表示不具有

表 3-7 组成发酵剂的主要菌种及其性质

发酵剂用微生物		由使用目的看菌的性质									使用制品	
菌种名	乳酸发酵	产生丁二酮	产气	蛋白分解	脂肪分解	丙酸发酵	酒精发酵	产生抗生物质	乳酸的氧化分解	抗氧化作用		
一般菌	嗜热链球菌 <i>Str. thermophilus</i>	○									各种干酪、酸牛乳	
	粪肠球菌 <i>Ent. faecalis</i>	○	△								切达干酪、菠萝伏洛干酪	
	液化链球菌 <i>Str. liquefaciens</i>	○			○						罗马诺干酪	
	产酶链球菌 <i>Str. zymogenes</i>	○									罗马诺干酪	
	坚忍链球菌 <i>Str. durans</i>	○									切达干酪	
	乳酸链球菌 <i>Str. lactis</i>	○	△		○				△		各种干酪、奶油发酵乳	
	乳酪链球菌 <i>Str. cremoris</i>	○	△						△		各种干酪、奶油发酵乳	
	丁二酮乳链球菌 <i>Str. diacetylactis</i>	○	○								奶油	
	蚀橙明串珠菌 <i>Leuc. citrouerum</i>				○	○					奶油、酪乳	
	戊糖明串球菌 <i>Leuc. dextranicum</i>				○	○					奶油、酪乳	
	乳酸杆菌	乳酸乳杆菌 <i>L. lactis</i>	○									菠萝伏洛干酪、瑞士干酪
		嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	○						△			嗜酸乳杆菌乳
		保加利亚乳杆菌 <i>L. bulgaricus</i>	○	△		△						酸牛乳、保加利亚干酪
		嗜热乳杆菌 <i>L. thermophilus</i>	○									干酪
干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>		○	△		○	△					各种干酪	
胚芽乳杆菌 <i>L. plantarum</i>		○							△		切达干酪	
丙酸菌		傅氏丙酸杆菌 <i>Prop. freudenreichii</i>			○			○				瑞士干酪
	薛氏丙酸杆菌 <i>Prop. shermanii</i>			○			○				瑞士干酪	
	贝氏丙酸杆菌 <i>Prop. petersonii</i>			○			○				瑞士干酪	
	微球菌	费氏微球菌 <i>M. caseolyticus</i>					△					砖状干酪、切达干酪
溶乳酪微球菌 <i>M. caseolyticus</i>					○						砖状干酪	
短杆菌	亚麻短杆菌 <i>Brevib. linens</i>				○						砖状干酪、林堡干酪	
酵母	脆壁酵母 <i>Sacchar. fragilis</i>			○			○				酸牛乳酒、酸马奶酒	

发酵剂用微生物		由使用目的看菌的性质									使用制品	
		乳酸发酵	产生丁二酮	产气	蛋白分解	脂肪分解	丙酸发酵	酒精发酵	产生抗生物物质	乳酸的氧化分解		抗氧化作用
酵母	乳酸酵母 <i>Sacchar. lactis</i>			○				○				酸牛乳酒、酸马奶酒
	拟热带假丝酵母 <i>C. pseudotropicalis</i>			○				○	○			酸牛乳酒、酸马奶酒及乙醇
	解脂假丝酵母 <i>C. lipolytica</i>			○		○			○			青霉干酪
	克柔氏假丝酵母 <i>C. krusei</i>			○					○			瑞士干酪
	次要隐球酵母 <i>Crypto. minor</i>									○		奶油
	浅黄隐球酵母 <i>Crypto. flavescens</i>									○		奶油
	米曲霉 <i>Asp. oryzae</i>				○	△						
霉菌	娄地青霉 <i>Pen. roqueforti</i>				○							罗奎福特干酪
	沙门柏干酪青霉 <i>Pen. camemberti</i>				○	△						卡门培尔干酪
	沙西干酪青霉 <i>Pen. caseicolum</i>				○	△						柱状干酪、卡门培尔干酪
	常见青霉 <i>Pen. frequentans</i>				○							甘梅洛斯特干酪
	白地霉 <i>Geotr. candidum</i>			○		○				○		瑞士干酪

注：○为菌种的共同性质；△为部分菌株的性质。

2. 奶油加工的乳酸发酵

乳酸发酵的目的在于使 pH 下降，促进风味菌（明串珠菌）的发育及促进风味物质的产生，同时赋予奶油制品以发酵风味。

3. 发酵乳的乳酸发酵

乳酸发酵的目的在于形成均匀一致的凝块，并产生特定的风味。

(二) 风味的产生

添加发酵剂的目的之一是赋予乳制品良好的风味。产生的风味物质，包括由于蛋白质及脂肪分解所产生的低级代谢产物。

风味物质产生的有关重要代谢反应为柠檬酸分解。与此有关的微生物虽以明串珠菌为主，但链球菌和乳杆菌也有一部分作用。风味菌使柠檬酸分解产生丁二酮、3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二醇等四碳化合物和微量挥发酸、醇、醛等。对产生风味起重要作用的是丁二酮，特殊风味的形成受菌株和培养条件的影响很大。但矢野、小泽的研究表明，培养基中添加柠檬酸及通风对风味物质的产生起促进作用，中和培养基则起抑制作用。

明串珠菌、进行异型发酵的乳酸菌均产生挥发性酸、醇、醛等，这些代谢产物也是重要的风味物质。已知乳酸链球菌产生许多羰基化合物，与发酵剂的风味有关。奶油的风味成分为乙醛、甲基甲酮、多种伯醇和仲醇、直链脂肪酸的甲基或乙基酯以及硫化物等。

另外一部分发酵剂通过使氨基酸脱氨基产生脂肪酸，或将脂肪酸脱去羧基产生甲基酮，

这些产物均是重要的风味物质。

(三) 蛋白分解

分解蛋白质的发酵剂，在干酪成熟上起重要作用。由酪蛋白分解产生的肽和氨基酸，是成熟干酪的重要风味成分。对蛋白质的分解作用主要与加入的发酵剂及成熟过程中部分外源微生物的蛋白质分解活性有关，这些酶系虽然因菌种而异，但其蛋白水解作用的最适 pH 一般为中性或偏酸性。发酵剂在进行乳酸发酵的同时能促进酶的作用，此外，凝乳酶有促进干酪发酵剂中乳酸菌分解蛋白质的作用。

某些特殊的蛋白质分解作用，需要考虑使用部分特殊的菌种，如用亚麻短杆菌发酵砖状干酪及林堡干酪使之成熟。为使这种干酪产生特有的表面皮膜及特异风味，也可考虑与乳酸菌发酵剂混合使用。

(四) 脂肪分解

脂肪分解能促进干酪成熟，特别适于霉菌干酪成熟，如娄地青霉就是利用其蛋白质分解作用而用于干酪发酵剂；解脂假丝酵母也被用作脂解发酵剂。

部分乳酸菌（乳酸链球菌，干酪乳杆菌）也有脂肪分解能力，可用于契达干酪的成熟。实际上使用发酵剂时，并非单纯以脂肪分解为添加目的，而是使用兼备乳酸发酵和蛋白质分解的发酵剂。

(五) 丙酸发酵

瑞士干酪发酵剂是以丙酸发酵为目的。丙酸菌可将乳酸菌产生的乳酸再分解为丙酸、醋酸、CO₂ 及水。这些发酵产物与瑞士干酪特有的风味及干酪气孔形成有关。与丙酸发酵相关的丙酸菌一般不作为发酵剂添加，而是利用成熟室中的丙酸菌进行成熟，也有预先和乳酸菌发酵剂混合在一起使用的。

(六) 酒精发酵

如开菲尔（Kefir）乳那样的酒精发酵乳，是使用将乳糖发酵为酒精的酵母。酵母适合于在酸性条件下生长，所以一般与乳酸菌混合使用，乳酸菌使培养基的 pH 下降，既可以形成有利于酵母生长发育的环境，又可以防止杂菌的污染。

(七) 抗菌物质的产生

乳酸乳球菌和乳酪链球菌的部分菌株，可分别产生乳酸乳球菌素（Nisin）及双球菌素（Diplococcin）。这两种乳酸菌除作为乳酸发酵剂外，产生抗菌物质是其另一目的。防止杂菌、特别是能防止梭菌的污染，是干酪发酵剂使用的另一作用。但由于乳酸链球菌素对大肠菌无效，如在干酪制造过程中污染了大肠菌则会引起干酪早期膨胀；长期成熟干酪又由于乳酸链球菌素失活，梭状芽孢杆菌孢子萌发亦会使干酪产生缺陷，要求在生产上精心管理。

(八) 混合发酵剂中菌种的共生与拮抗

发酵剂多使用两种或两种以上的混合菌。使用混合发酵剂的目的，在于取不同菌种的长处，以制造质量优良的发酵剂；还有一个重要的目的，是利用菌种间的共生作用。

此外乳酸链球菌也与嗜酸乳杆菌共生，且霉菌发酵剂与乳酸菌发酵剂混用，乳酸菌能使培养基的 pH 下降，促进霉菌的酶作用。酒精酵母与乳酸菌混用，乳酸菌使 pH 下降也可促进酵母的发育。此外，研究表明荧光假单胞菌的培养滤液，能促进发酵剂的发育。另一方面如果混合发酵剂的组合不当，菌种间发生拮抗作用，部分菌的活性则受到抑制。关于微生物之间的拮抗，有许多关于发酵剂中不同微生物之间或发酵剂与污染菌之间产生拮抗的报告。特别是乳酸链球菌与保加利亚乳杆菌或与干酪乳杆菌之间的拮抗作用，导致混合发酵剂的功能出现异常。所以在制备混合发酵剂时，对菌株的选择要小心谨慎。

制造瑞士干酪用的丙酸菌也受部分乳酸菌的抑制，但乳酸菌对有害杂菌的抑制作用，从乳制品的保存性这点来看，反而有利。

(九) 酵母的抗氧化作用

最近奶油发酵剂中试验使用次要隐球酵母和浅黄隐球酵母等无子囊孢子酵母，这些酵母能发酵糖，产生还原物质以防止脂肪氧化，有抑制好气性霉菌的作用。为了提高奶油保存性能而使用酵母发酵剂，俄罗斯和捷克正在进行这方面的研究，是一种值得关注的动向。

三、发酵剂的保存方法和原理

在乳或生长介质中无任何抑制物质，如抗菌素或噬菌体时，发酵乳制品的发酵过程完全依赖于发酵剂的纯度和活力。虽然繁殖过程比较费事，要求训练有素的人员操作，而且可能出现噬菌体污染，但这种方法仍被广泛使用。噬菌体污染是乳品工业面临的主要问题之一，大量的研究工作已找到多种避免此类问题的途径；另一方面对发酵剂的保存和浓缩技术进行了深入的研究，以期找到使用期长、菌种活力高的发酵剂。

发酵剂必须最大限度地含有高数量的活菌，必须在生产情况下具有高活力，且无噬菌体和其他污染；如果接种是在无菌条件下进行，且在无菌介质中生长，Foster 建议为保持有活力的发酵剂，必须采取以下措施：

- ① 减少或控制发酵剂中微生物的代谢活动。
- ② 从废弃的产品中分离作为发酵剂的菌种。

前一条措施可通过冷藏或冷冻来实现，后面的措施主要在发酵剂的浓缩或保存过程中应用，亦即在用子罐直投式接种 (DVI) 的高活性浓缩发酵剂的生产过程中，从连续式或批料式加工后的废料中直接制取。

为保持有足够可利用的储备菌种，对组成发酵剂的菌种或发酵剂进行保存是十分必要的，这在工作发酵剂失败的情况下更为必要。而且连续的传代培养可能导致菌株变异，从而改变发酵剂的整体性能和组成菌株的一般特征，故选择适宜方式对发酵剂及其组成菌株进行保存是必须的。用于制备发酵剂的菌种可来自科研单位、高校、菌种保存组织或菌种供应商，发酵剂可采用下列形式之一进行保存：

① 液态发酵剂

- ② 干燥发酵剂
- 喷雾干燥(未经浓缩)发酵剂
 - 冷冻干燥(未经浓缩)发酵剂
 - 浓缩冷冻干燥发酵剂

- ③ 冷冻发酵剂
- 在 -20°C 冷冻保存的发酵剂
 - 在 -40°C 下深度冷冻的发酵剂
 - 于液氮中 (-196°C) 超低温冷冻的发酵剂

(一) 液态发酵剂

液态发酵剂是乳品工业应用最广泛的一种发酵剂，发酵剂通常以小量形式保存，如果乳品生产过程中需要的发酵剂的量比较大时，则需对其进行繁殖扩大：

纯培养物 → 母发酵剂 → 中间发酵剂 → 工作发酵剂

例如以 2% 的接种量每天加工 10000L 原料乳生产干酪，则发酵剂的扩大培养过程可按以下方式进行

纯培养物 $\xrightarrow{1\%}$ 母发酵剂 $\xrightarrow{1\%}$ 中间发酵剂 $\xrightarrow{2\%}$ 生产发酵剂
0.4ml 40ml 4L 200L

上述扩大培养过程中所用的纯培养物（菌种）保存在灭菌的无抗菌素脱脂乳中（10%~12%无脂乳固体），每天或每周传代培养一次。干酪发酵剂（*Str. lactis*、*Lactococcus lactis subsp. cremoris*、*L. cremoris*）可在灭菌介质中以1%接种，于22℃或30℃分别培养18h或6h进行传代培养，即使繁殖50次以后也无变异之忧。对于酸奶发酵剂而言（*Str. thermophilus*和*L. bulgaricus*），既要防止菌种性能发生突变，又要保持球菌与杆菌间1:1的比例。酸奶发酵剂传代培养的方式为按1%的接种量，30℃培养16~18h或2%的接种量42℃，培养3~4h。

发酵剂的活性受培养后的冷却速度、培养终点酸度和储存温度、时间的影响，冷却对于控制发酵剂的代谢活动非常重要。在实际生产中，新培养、未经冷却的嗜温发酵剂有时也直接应用于干酪、酸奶等产品的生产。

用于保藏的纯培养物（菌种）能以液态形式保存，表3-8列出了一种适合于多种乳酸菌保存的培养基。需保存的菌种或发酵剂接种到该培养基以后，经过短时间的培养，可在通常的冷藏条件下储存仅需每3个月活化一次。

表 3-8 用于液态发酵剂或菌种保存的培养基

脱脂乳	10%~12%SNF(无脂乳固体)	CaCO ₃	CaCO ₃ 须覆盖整个试管底部
5%石蕊溶液	2%	Panmede(调节 pH 为 7)	0.25%
酵母浸膏	0.3%	卵磷脂(调节 pH 为 7)	1.0%
葡萄糖/乳糖	1.0%		

注：培养基于0.07MPa灭菌10min，在使用前，于30℃培养1周检查灭菌效果。

(二) 干燥发酵剂

干燥技术是常用的一种发酵剂的保存方法。干燥发酵剂的出现，是为了克服液态发酵剂保存方法中工作量大的不足，同时使菌种易于通过邮递运输而没有任何活性损失。在1950年以前真空干燥是生产干燥发酵剂的主要方法，这个过程包括将液态发酵剂和乳糖混合，然后用CaCO₃中和过量的酸，通过分离或去除乳清被部分浓缩成颗粒状，后者在真空条件下干燥。干燥发酵剂仅含1%~2%的活菌，在使用前需要经过多次传代培养才能恢复其最大活性。

较高存活率的干燥发酵剂可通过喷雾干燥法获得，这种方法最早出现于荷兰，具体方法如图3-6所示，此种干燥发酵剂与保存24h后的液态发酵剂具有同等活力。虽然这种方法在技术上已证明是可行的，但并未获得商业化的发展。其原因是干燥发酵剂的存活率仍然偏低，对大多数的嗜温菌而言，存活率仅10%；对*Lac. lactis* biovar. *diacetylactis*存活率为44%。向发酵剂生长的培养基中添加谷氨酸钠和维生素C，可在某种程度上保护菌体细胞，采用此种方式培养的发酶剂经喷雾干燥后在21℃储存6个月，仍能保持其活性。瑞士的一项专利表明，当酸奶发酵剂在强化赖氨酸、胱氨酸和氰钴素的浓缩脱脂乳（总乳固体含量

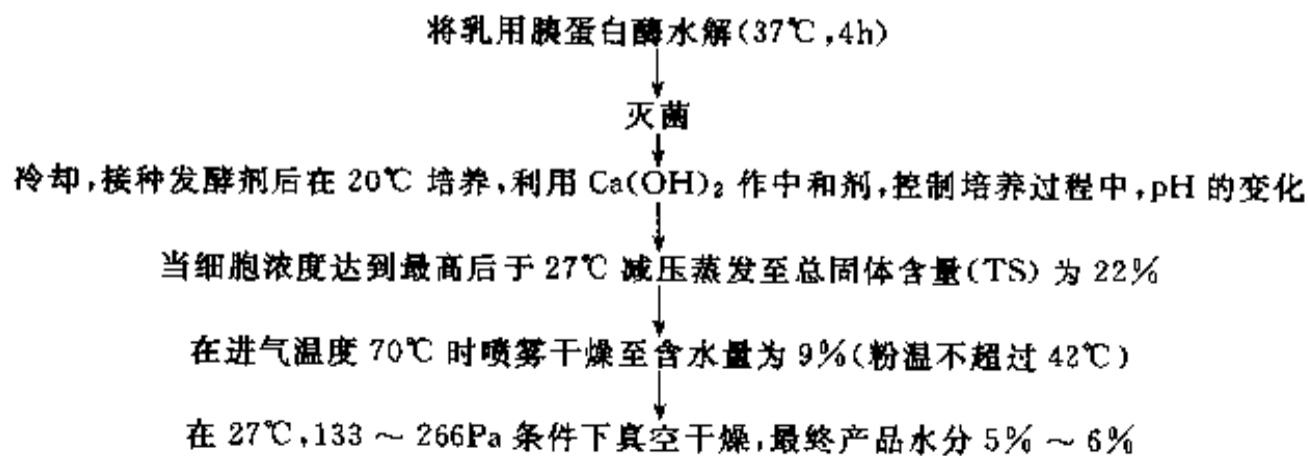


图 3-6 荷兰喷雾干燥发酵剂的生产工艺

18%~24%) 中培养后, 经喷雾干燥能获得球菌与杆菌比率为 40:60~60:40 的酸奶发酵剂, 即使干燥温度高达 75~80℃, 亦不会引起菌体的任何破坏, 尽管有上述多种益处, 此保存方法并未获得广泛应用。

当发酵剂在冷冻状态下进行干燥时产生的是冷冻干燥发酵剂。这种方法提高了干燥发酵剂中菌的存活率, 效果比喷雾干燥好。冷冻和干燥过程会破坏细胞膜, 但在冷冻干燥前添加一定量的冷冻保护剂能使这种破坏降至最小; 这些保护剂是氢结合或离子化基团, 它通过在冷冻过程中稳定细胞膜组分而防止细胞的破坏。

许多不同的培养基、添加剂或技术被研究, 以期找到生产冷冻干燥发酵剂最合适的条件。影响冷冻干燥乳品发酵剂的因素可概括如下。

① 除 *L. bulgaricus* 较难以外, 绝大多数乳酸菌均可通过冷冻干燥法保存, 而 *L. bulgaricus* 和 *L. helveticus* 对冷冻和干燥过程较敏感。

② 利用添加酵母浸膏和蛋白水解物的乳来培养发酵剂时, 可提高菌的存活率; 并可使菌体细胞浓度提高 ($>10^{10}$ cfu/ml), 从而能增加干燥培养物中的活菌数。

③ 对数生长阶段后期收获的菌体细胞, 对冷冻和干燥敏感性较低。而 *L. bulgaricus* 和 *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 则应收集平衡生长期早期的细胞。

④ 当培养基 pH 为 5~6 时, 细胞的存活率高。因此, 对培养过程中的培养基和用于菌体细胞悬浮的介质必须进行中和。

⑤ 用于提高发酵剂存活率的悬浮培养基随微生物的不同而变化; 如脱脂乳加苹果酸钠对 *Str. thermophilus* 合适、乳糖和盐酸精氨酸盐的溶液对 *L. bulgaricus* 有较高的保护作用, 而谷氨酸对 *Leuconostoc. spp* 有保护作用。

⑥ 干燥发酵剂中的水分含量必须小于 3%。

⑦ 干燥发酵剂需要长时间贮存时, 与室温相比, 贮存在 5~10℃ 表现出更高的存活率。

⑧ 由于发酵剂在保存过程中对氧敏感, 故建议对干燥发酵剂采用真空包装。

⑨ 干燥发酵剂最常用的包装形式有血清瓶 (安瓿瓶多用于纯种保存)、迭层铝箔袋, 尼龙袋因其透氧性对菌的存活有影响, 不建议使用。

⑩ 采用在 -20~-30℃ 冷冻, 在 -10~30℃ 干燥得到的干燥发酵剂有高的活性。

⑪ 丙酮酸盐和二乙酰等羧基化合物, 能与细胞内的氨基反应, 从而加速细胞的死亡, 故建议将它们和菌细胞分离。对于长期保存的冷冻干燥发酵剂, 悬浮培养基必须添加非还原糖、氨基酸和氨基脲。

⑫ 使用冷冻干燥发酵剂时, 水化温度会影响胞内核苷酸从受到损坏的细胞中的渗漏程度, 尽管 *Str. thermophilus*、*Str. lactis subsp. lactis* 和 *Str. lactis subsp. cremoris* 等对不同的水化温度反应不敏感, 但无论是嗜热还是嗜温乳酸菌的冻干菌粉, 水化温度最好采用 20℃。

冷冻干燥发酵剂在接种后, 大多需要经过较长的延滞期。因此, 主要用于制备母发酵剂。如果直接从冷冻干燥发酵剂制备工作发酵剂, 不仅成本高, 而且需要较长的培养时间。近来开发成功的浓缩冷冻干燥发酵剂 (CFDC) 可直接用于工作发酵剂的制备, 或作为罐直投式接种 (DVI) 发酵剂直接用于干酪和其他发酵乳制品的生产。

(三) 冷冻发酵剂

液态发酵剂在冷冻 (-20~-40℃) 条件下可保存数月, 这种方法一般在实验室采用。当需要时, 冷冻发酵剂被分发至乳品厂直接作为生产发酵剂的接种物。在 -40℃ 下长期冷冻和保存将导致发酵剂活性损失, 造成对部分乳杆菌的破坏。但使用含 10% 脱脂乳、5%

蔗糖、稀奶油、0.9% NaCl (或 1% 明胶) 的培养基能改善菌的存在情况。此外浓缩细胞 ($10^{10} \sim 10^{12}$ cfu/ml) 在 -30°C 下冷冻时, 添加某些低温保护剂 (柠檬酸钠、甘油或 β -磷酸甘油钠) 对部分嗜温发酵剂、乳杆菌或丙酸发酵剂具有保护作用。

虽然采用在 -40°C 下进行冷冻保藏是一种成功的保存发酵剂的手段, 但在 -196°C 液氮中的冷冻是最好的冷冻保存方法。Gilliland 等人的研究证实冷冻和解冻过程仍然是关系到冷冻发酵剂应用成功与否的重要因素, *L. bulgaricus* 是对冷冻敏感的微生物之一, 但 Tween80 和油酸钠存在的情况下, 能改善冷冻对其细胞的破坏。

利用液氮保存冷冻发酵剂使干酪和酸奶加工中采用罐直投式接种 (DVI), 或直接制备工作发酵剂成为可能, 这种方法的好处如下: 方便, 发酵剂性能更可靠, 减少了日常工作量, 使生产具有较大的灵活性, 能更好地控制噬菌体污染及对产品质量有改善作用。但也存在以下缺点: 提供液氮设备困难, 成本高, 对发酵剂供应商的依赖性较大等。

(四) 菌体细胞的浓缩

保存菌种的存活率取决于加工情况, 如生产介质、低温保护剂的添加情况及采用的冷冻和干燥方法等, 同时也依赖于菌体细胞浓缩的方法。细胞浓缩常用的方法如下。

① 机械方法。通过 Sharples 离心机在 5500g 和高速离心 ($15000 \sim 20000\text{g}$) 将菌体细胞浓缩, 不过这会引引起菌细胞的物理性破坏。

② 在发酵剂制备过程中采取连续中和的方法使培养基的 pH 保持在 6.0 左右, 从而获得高浓度的菌体细胞。由于在发酵剂制备的过程中, 乳酸的产生对菌的生长有抑制作用, 及时中和产生的乳酸, 可以提高培养物中细胞的浓度。如果采用分批或连续式培养方法, 亦可用于获得高浓度的细胞。

③ 应用扩散培养技术, 通过从生长介质中不断去除乳酸, 最终能获得 10^{11} cfu/ml 的菌细胞。

(五) 霉菌和 Kefir 粒的保存

对蓝霉和白霉通常采用冷冻干燥保存, 或如 Hylmar 和 Teply 报道的对 *P. roqueforti* 用流化床干燥器 (Fluid-bed drier) 保存。此种干燥发酵剂重新悬浮在灭菌或煮沸的水中, 得到的制备物称之为“工作培养物” (working culture)。此种水化后的霉菌孢子在 5°C 存放一周, 仍能保持活性。在乳品工业上这些霉菌的应用依赖于最终产品, Galloway 认为白霉的“工作培养物”在 Camembert 干酪和 Brie 干酪加工过程中能按下列方法之一应用:

- ① 在添加凝乳酶前, 和乳酸菌发酵剂一起直接接种到原料乳中;
- ② 在加盐前于干酪凝块上喷洒上述霉菌孢子溶液;
- ③ 用盐和霉菌孢子制成的混合物涂布于干酪表面。

蓝霉的具体应用如下:

- ① 采用同上述白霉的应用①、③中相同的方法;
- ② 在干酪凝块装模后立即添加霉菌培养物于凝块;

③ 霉菌采用棕色面包屑培养后, 将其菌丝体制成上球状, 用棉布包起来, 在添加乳酸菌发酵剂后, 用于将上述小球碾碎, 分散于乳中。

Ottogalli 和 Rondinini 报道了在 Gorgonzola 干酪生产中所用的霉菌和乳酸菌的保存技术, 其方法为: 在 pH5.5~6.5 的乳中培养至 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml, 再于 -18°C 冷冻, 其中各种微生物的存活率分别为: *Str. thermophilus* 为 18%, *Str. lactis* 为 38%, *L. cremoris* 为 80%, *L. bulgaricus* 为 47%, *Torula sp.* 为 50% 和 *P. roqueforti* 为 100%, 据此可知蓝霉用冷冻方法保存不会导致活性的损失。

Kefir 粒以干燥或湿润状态保存。一种简单的方法是用水洗去多余的粒子，在室温下干燥。但保存不当可能造成干燥 Kefir 粒的污染，使 Kefir 粒中共生菌群的组成发生改变。冷冻干燥方法是一种较好的保存 Kefir 粒的手段，Kefir 粒中的微生物是以粉或小晶体的形式被存在，经过 2~3 次传代培养以后，Kefir 粒开始在其生长的培养基中形成。利用冷冻干燥技术保存 Kefir 粒的方法由 Lagoda 等人（俄罗斯）申请了专利。另一种保存 Kefir 粒的方法是将洗涤后的 Kefir 粒悬浮于灭菌培养基中，在普通冷藏温度下没有任何活性损失地保存数月，Kefir 粒仍能保持正常的形状和活力。

第五节 乳酸菌在发酵乳中的稳定性

乳酸菌能够将糖发酵成为乳酸。发酵乳中常用的乳酸菌见表 3-9。越来越多的证据表明，有某些乳酸菌，如乳杆菌和双歧杆菌，在充足的剂量时对人体和动物的某些疾病或失调有预防或者治疗作用 (Mitsuoka, 1990; Robinson, 1991; Sandine, 1972)。一般对人体有效的剂量是每天摄入 10^6 到 10^9 个菌体 (Gilliland, 1989; Sellars, 1991; Hawley, 1959)。益生的乳杆菌和双歧杆菌已经商业化，产品形式有酸奶、发酵乳饮料、非发酵的酸乳，还有冻干粉。在冻干粉中，由于水的活度低于 0.25，所以室温下细胞活性可保持达 12 月之久 (Sellars, 1991)。其他基于液态奶的产品形式则仅有很短的货架期，一般在冷藏柜中可放置 2~4 周。从经济的角度来讲，货架期很耗费资源。因此，研究影响基于液态奶形式的益生菌的稳定性因素，可以帮助人们改进产品，改进菌种，从而延长货架期，获取更大的经济利益。

表 3-9 某些常用于发酵乳制品的乳酸菌

菌 株	产 品	特 征
嗜热同型发酵乳杆菌		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	酸奶、瑞士和意大利干酪、保加利亚酪乳、酸奶饮品、Koumiss	产生乙醛
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>		
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	acidophilus 乳、酸奶饮品	
<i>Lb. acidophilus</i>	Miru-miru, kefir, koumiss	治疗作用
<i>Lb. helveticus</i>	Kefir, 酸奶饮品	
<i>Lb. helveticus</i> ssp. <i>juguri</i>	酸奶	
<i>Lb. fermentum</i>		
嗜温发酵乳杆菌		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i>	Yakult, 酸奶饮品, miru-miru, kefir	治疗作用
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i>		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>		
<i>Lb. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. brevis</i>	Kefir	
<i>Lb. kefir</i>	Kefir	
嗜温乳球菌		
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	斯塔维亚发酵乳、发酵酪乳、发酵奶油, Kefir	Nisin
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	斯塔维亚发酵乳、发酵酪乳、发酵奶油, Kefir	diplococci
<i>Lc. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	发酵酪乳、发酵奶油, Kefir	二乙酰
嗜热链球菌		
<i>Str. thermophilus</i>	酸奶	
其他		
<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	Kefir	
<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	Kefir	

一、乳酸菌在乳制品中的存活性

(一) 细胞死亡动力学

一般说来, 乳制品中的乳酸菌一旦停止生长 (过了稳定期), 其活菌数就会迅速下降。活菌死亡动力学遵循对数规律 (Pirt, 1975):

$$X_t = X_0 \exp(-kt)$$

式中 X_t ——时间 t 时的活菌浓度;

X_0 ——初始活菌浓度;

k ——死亡速率。

死亡速率由于乳酸菌的种不同而不同, 同时也受其所处理化环境的影响。

(二) 贮存温度的影响

从表 3-10 可以看出, 室温 25℃ 贮存时, *Lactobacillus casei* 的半衰期大约 2 周, 与之相比, *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus acidophilus* 和 *Bifidobacterium bifidum* 死亡速率高得多。但如果贮存于 5℃, 这些菌的半衰期大大延长; 贮存于 5℃ 还有一个好处: 后酸的产生受到抑制, 产品不会变得过酸。在碳源存在时乳酸的产生是与菌体的生长部分联系的 (Aborhey 等, 1977; Hanson 等, 1972; Leudeking 等, 1959)。因此较低的贮藏温度可以减少产酸。考虑到温度对死亡速率的影响, Casolari (1980) 提出了下面的公式:

$$\lg X_0 = (1 + Mt) \lg X_t$$

其中 M 代表细胞与能量足以导致细胞死亡 (E_d) 的水分子的碰撞频率, 从 Maxwellian 分布函数可知:

$$M = \exp(103.7293) - (2E_d/RT)$$

对于细菌的营养体细胞而言, E_d 的值从 130kJ/mol 到 160kJ/mol 不等。运用这个公式预测 25℃ 和 5℃ 时的死亡速率, 就会发现在较高的贮藏温度时细胞死亡速率快得多。

表 3-10 温度对于发酵乳中活菌数量半衰期的影响

细 菌	产品 pH	贮存温度/℃	初始活菌数 (cells/ml)	半衰期/天
<i>Lactobacillus casei</i>	3.5	25	5×10^9	13
<i>Lb. casei</i> YIT9018(yakult strain)	3.8	5	1×10^9	>30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.4	25	3×10^9	4
<i>Lb. plantarum</i> MDI133(Malaysia Dairy strain)	3.8	5	2×10^9	>30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.0	25	3×10^9	3
<i>Lb. acidophilus</i> CH5(Chr. Hansen strain)	3.6	5	1×10^9	15
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4.3	25	3×10^9	4
<i>B. bifidum</i> BB12(Chr. Hansen strain)	4.3	5	2×10^9	15

(三) 产品 pH 值的影响

产品最终 pH 值对发酵乳中益生乳酸菌稳定性的影响很重要。较高的 pH 值对 *Lactobacillus acidophilus* 的保存较为有利 (Sellars, 1991; Gilliland, 1989)。当产品最终 pH 值维持在接近中性时, 在 25℃ 时, 产品中的活菌数可稳定地保持超过一个月 (见表 3-11)。

表 3-11 产品 pH 值对发酵乳中菌体半衰期的影响

细 菌	产品 pH	贮存温度/℃	初始细胞数 (cells/ml)	半衰期/天
<i>Lactobacillus casei</i>	3.8	25	5×10^8	13
<i>Lb. casei</i> YIT9018(yakult strain)	6.5	25	1×10^9	>30
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.4	25	3×10^8	4
<i>Lb. plantarum</i> MDI133(Malaysia Dairy strain)	6.5	25	3×10^8	>30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.0	25	3×10^8	3
<i>Lb. acidophilus</i> CH5(Chr. Hansen strain)	6.6	25	1×10^8	>30
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4.3	25	3×10^8	4
<i>B. bifidum</i> BB12(Chr. Hansen strain)	6.6	25	1×10^8	>15

(四) 添加剂的影响

某些乳酸菌, 如 *Lactobacillus acidophilus*, 尽管有很好的益生治疗作用, 但是却不产生乙醛之类的风味物质 (普通酸奶因为含有乙醛故有黄油香味) (Sellars, 1991)。所以发酵出来的酸乳是单纯的酸味。为了改善这类酸奶的风味, 人们常常添加不同比例的果汁。常用的有温带水果如草莓、苹果、橘子、葡萄, 热带水果如菠萝和芒果。终产品的包装是透明或半透明的, 以便消费者能够看清楚所加果汁的颜色和种类。已有实验证明, 添加草莓汁的发酵乳中 *Lactobacillus acidophilus* 活菌数衰减得比添加其他果汁的都要快。

从表 3-12 可以看出, 添加草莓汁仅 3%, 就使发酵乳的半衰期降至 5 天, 而不含果汁或含其他果汁 (达 10% 体积比) 的发酵乳的半衰期则长得多。实验还观察到, 草莓汁引起的 *Lactobacillus acidophilus* 的快速衰减仅在产品暴露于光线中时才会发生。如果将产品置于暗室中, 则不会发生快速衰减。这可能是添加草莓汁的发酵乳中发生了某种光化学反应, 反应产物对细菌细胞有毒性。改进产品包装就可延长这种产品的保质期。

表 3-12 添加果汁种类对发酵乳中 *Lactobacillus acidophilus* (CH5, Chr, Hansen strain) 半衰期的影响

发酵乳	产品 pH	贮存温度/℃	初始菌数/(cells/ml)	半衰期/天
牛乳	3.8	5	1×10^9	15
牛乳+3%草莓汁	3.8	5	1×10^9	5
牛乳+3%~10%橙汁	3.8	5	8×10^8	15
牛乳+3%~10%葡萄汁	3.8	5	1×10^9	15
牛乳+3%~10%苹果汁	3.8	5	9×10^8	15
牛乳+3%~10%芒果汁	3.8	5	1×10^9	15
牛乳+3%~10%菠萝汁	3.8	5	9×10^8	15

二、影响乳酸菌细胞稳定性的生物化学因素

(一) 能量供应

Reers 和 Pirt (1979) 在实验中观察到, 将不生长的 *Lactobacillus delbrueckii* 细胞置于仅含葡萄糖的磷酸盐缓冲液中培养时, 细胞可以获得短暂的稳定性。他们认为活跃的糖酵解和能量产生是保持 *Lactobacillus* 细胞组分和稳定胞内蛋白质的前提。另一方面, 过量的 ATP 产生会导致 *Lactobacillus* 细胞不稳定。Thomas 和 Batt (1969) 观察到, 当葡萄糖存在时, 休眠的 *Streptococcus lactic* 细胞内糖酵解活性衰减得很快; 而当精氨酸存在时 (从精氨酸产生 ATP 的速度比葡萄糖慢 7.5 倍), 系统具有更强的稳定性。这种情况说明 ATP 水平越高, 细胞死亡越快 (Strange, 1976)。

(二) Mg^{2+}

如果没有葡萄糖存在, 单独的 Mg^{2+} 对 *Lactobacillus delbrueckii* 的稳定性没有影响; 但当葡萄糖存在时 Mg^{2+} 能够显著地稳定糖酵解 (Reers 和 Pirt, 1979)。这种稳定作用的机制还不清楚, 但糖酵解过程中所有的激酶都需要 Mg^{2+} 的参与, 并且 *Lactobacillus delbrueckii* 对 Mg^{2+} 的需求不能以 Mn^{2+} 代替 (Reers 和 Pirt, 1979)。

(三) 氧对乳酸菌的毒性

Gilliland 和 Speck (1977) 以及 Hull (1984) 都在实验中发现, 添加到酸奶中的 *Lactobacillus acidophilus* 会因为酸奶发酵剂产生的 H_2O_2 而不稳定。他们发现经过 *Lactobacillus bulgaricus* 发酵的牛乳对 *Lactobacillus acidophilus* 细胞有拮抗作用, 引起后者的迅速死亡, 但如果加入过氧化氢酶即可阻止这种衰亡。*Lactobacillus acidophilus* 的接种物也可产生过氧化氢, 例如, 将 *Lactobacillus acidophilus* 的接种物暴露于空气中时, 由于 NADH 氧化酶的作用, 可导致 H_2O_2 的累积 (Collins 等, 1980; Seeley 等, 1951)。在这种情况下, *Lactobacillus acidophilus* 细胞的稳定性随接种量的增加而减少, 因为氢过氧化物的产生与细胞浓度是一致的 (Seeley 等, 1951)。随着细胞生长和 NADH 过氧化物酶的产生, H_2O_2 逐渐被清除 (Anders, 1970)。其他研究者发现, 若添加某些还原剂, 如半胱氨酸, 硫乙二醇盐等, 可大大增强休眠的 *Lactobacillus delbrueckii* 细胞内的糖酵解作用的稳定性 (Rees 等, 1979)。这些还原剂的保护作用与其氧化还原电势有关, 因此, 氧对乳酸菌的毒性是通过与关键代谢酶的巯基相互作用表现出来的。

目前的研究表明, Mg^{2+} 可激发糖酵解活性, 增强休止细胞的稳定性; 保持轻微的还原性和稳定的能量供给也有同样的作用——即保持细胞的稳定性。这些条件都比较容易做到, 例如, 甜的酸乳和 Nu-Trish 都采用相似的包装材料。在这些产品中, 把 *Lactobacillus acidophilus* 活菌加入牛奶或巴氏消毒奶中, 然后立刻贮存于低温, 防止后发酵。

在发酵乳制品中, 在乳中所有的碳源和能源都耗尽之前乳酸菌就停止生长了。经过发酵后, 乳糖含量通常下降 30%~50% (Alm, 1991)。添加的蔗糖和乳脂肪等能源并不影响 *Lactobacillus acidophilus* 在贮存中的发酵动力学和细胞稳定性 (Hull, 1984)。实验还发现, 向牛乳中添加 2% (W/V) 的乳酸盐既不阻碍 *Lactobacillus acidophilus* 的生长, 也不影响其在产品中的最终浓度。因此, 培养基的酸化是最终导致 *Lactobacillus acidophilus* 生长停止的主要原因。

(四) 决定细胞酸稳定性的分子机制

许多微生物能够适应较为广泛的环境 pH 范围, 但其细胞内的 pH 范围却很狭窄。事实上, 几乎所有微生物, 包括极端嗜酸菌, 其胞内的 pH 都是接近中性的 (Din, 1967; Iwatsuka, 1962; Suzuki, 1965)。人们发现, 乳杆菌和双歧杆菌在低温低 pH 下保存得较好 (见表 3-11), 似乎说明在酸性环境中细胞保持 pH 和稳定性的机制并不是来自能量驱动的质子外排作用 (Yamazaki, 1973)。

乳酸益生菌可通过同型发酵、异型发酵或双歧途径发酵碳水化合物, 既可产生单一产物, 又可产生乳酸、乙酸、乙醇和 CO_2 的混合产物 (Gottschalk, 1979)。发酵所产生的所有弱酸几乎都排到细胞外, 发酵乳中乳酸的最终浓度在 0.5 到 1.5% (W/V) 之间 (相应的 pH 值分别为 4.5 和 3.5), 具体的浓度取决于菌株和发酵时间。在发酵乳饮料配方中, 通常希望产品的终点 pH 为 3.8, 主要有两个理由, 一是远低于蛋白质的等电点 4.6; 二是低 pH 可防止在贮运过程中的污染和病原菌生长。按照公认的米氏假说, 能量产生由质子驱动, 细

胞膜和线粒体膜的主要功能是维持质子和电位梯度。为了达到这个目标，细胞膜必须对质子和带电荷的分子具有非常低的穿透性 (Forage, 1985)，例如在接近中性 pH 值时离子化的弱有机酸分子。因此，乳酸菌产生的有机酸实际上被限制在胞外。但是，在低 pH (接近有机酸 pK 值) 时，很大一部分有机酸以未离解的形式存在。这些未离解的乳酸是导致发酵过程终止的主要原因 (Blanch, 1984; Viniegra-Gonzalez 和 Gomez, 1984)。未离解的有机酸不带电荷，具有亲脂性，所以能够以扩散方式通过细胞膜。一旦进入细胞内，由于细胞内 pH 值较高，这些有机酸离解能产生离子和质子。为了维持细胞内中性 pH，ATP 由质子驱动的 ATP 酶水解，以排出质子。其后果是，其他必要的生命活动缺乏 ATP，细胞稳定性难以维持。细胞中某些关键酶和关键组分的失活也可使细胞死亡。例如，有时有机酸扩散进入细胞的速率超过了质子排出的速率，使胞内的 pH 值下降，就会使细胞死亡。未离解的有机酸扩散进入细胞的速率取决于扩散常数，扩散常数由温度决定。所以，在较高温度下 (如 25℃)，有机酸进入细胞的速率加快 (表 3-11)。对照 4℃ 时，酸扩散进入细胞慢一些，细胞活性保持的时间也更长一些。

很明显，乳酸菌的亲酸性和酸稳定性取决于其细胞膜的功能和对未离解弱酸的穿透性。这种观点被以后的研究进一步证实，Haes 在 1972 年阐述了 *Staphylococcus aureus* 细胞膜的磷脂组成，它能够耐受培养基 pH 值的变化；Brock 1972 年阐明了耐酸的氧化硫细菌的细胞壁中缺乏肽聚糖。对乳酸菌的细胞膜进行的生化分析表明它们具有不同程度不同的耐酸性，这能够解释乳酸菌在发酵乳中稳定的机制。有趣的是，某些乳杆菌能够代谢较为广泛的糖类，如 *Lactobacillus casei*，它们在发酵乳中存活的时间比那些仅能代谢少数糖类的乳杆菌要长，如 *Lactobacillus acidophilus*。

(五) 菌种改良的策略

决定乳酸菌酸稳定性的成分还没搞清，因此以分子克隆的手段来改良菌种目前还行不通。但是，菌种耐酸的性能是反应其酸稳定性的一种指征，因此人们可以筛选在酸性环境中生存时间较长的菌种。一个简单的策略是：定期分离培养突变的乳酸菌种，或应用流式细胞培养系统 (Dykhuisen 等, 1983)，以便筛选更耐酸的菌株。当筛选耐酸的 *Lactobacillus acidophilus* 菌株时，却总是得到不产酸的菌株，这是因为在分离过程中产酸并未作为筛选条件。菌种稳定性的增加是以牺牲产酸能力为代价的，这样才能维持适合细胞生存的 pH 值。Lawrence 1976 年筛选抗噬菌体的突变菌株时，也得到相似的结果：几乎没得到什么有用的菌株，因为抗噬菌体的菌株产酸能力下降。这些实验可以旁证：乳酸菌的乳糖发酵能力是通过质粒介导 (Anderson 等, 1977; Efstathiou 等, 1976)，丢失这些质粒就会改变这种特性。

Lee 和 Wong (1992) 提出了一种将产酸作为筛选条件的耐酸乳杆菌的筛选方法，这种方法筛选同时具有产酸和耐酸特性的乳杆菌，基于如下两个前提：

- (1) 随着乳糖发酵，培养基 pH 下降；
- (2) 在低 pH 时，仅耐酸的菌株继续生长。

将准备突变体细胞杂交 (原生质融合) 的乳杆菌接入搅拌型发酵罐中。以 pH 指示器监测其 pH 值变化，当 pH 低于某设定值 (如 4.0) 时，蠕动泵启动，把鲜牛奶培养基打入培养物。发酵产生乳酸使培养物的 pH 值下降，加入中性牛奶又使 pH 回升。

发酵罐中培养物的体积由两个水位探头控制，一个固定于高水位，一个固定于低水位。高水位探头的信号放大后可以启动排水泵，当低水位探头的信号放大时排水泵停止工作。

乳杆菌发酵产生乳酸,使 pH 下降,添加新鲜培养基,又使 pH 回升,所以可以通过添加的新鲜培养基的体积来监测乳杆菌的生长,当然前提是活细胞产酸是匀速的。

筛选的原理是:耐酸的乳杆菌生长时,需要添加更多的培养基。稀释速率取决于系统总的生长速率,培养物的总体积随细胞生长而增加。当培养物液位到达高水位时,排水泵开始工作。到抽到低水位时,排水泵停止工作。由此另一个筛选循环开始了,一边细胞在生长,一边在添加新鲜培养基,所以发酵罐中的细胞浓度相对恒定。

当培养物 pH 值低于某个关键点时,生长速率减慢。因此生长速率快意味着耐酸性高。生长速率越高,添加新鲜培养基越快,稀释率越高。因此筛选过程是自动的。选择的频率和压力取决于培养物的内部属性,这些因素在高突变小种群的筛选中非常重要。

有几株产酸菌,如 *L. acidophilus*, *L. casei*, 以及 *L. plantarum*, 它们的货架期长达 40 天以上,都是通过这种方法筛选出来的。

参 考 文 献

- 1 Alander, M., R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm, and A. von Wright. 1997. *Appl. Microbiol.* 24: 361-364
- 2 Amann, R. I. 1995. *Mol. Ecol.* 4: 543-553
- 3 Audicana, A., I. Perales, and J., J. Borrego. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4178-4183
- 4 Barry, T., G. Collieran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2418-2419
- 5 Beerens, H. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2418-2419
- 6 N, R Krieg and J. G. Holt, eds. Vol. 1. P. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD
- 7 Corthier, G., M. C. Muller, and R. L'Haridon. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 735-738
- 8 de Vos, W. M., e. Poelwijk, A. Sessitsch, E. Zoetendal, L. van Overbeek, and A. Akkermans. 1997. Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT), Finland
- 9 Dore, J., A. Sghir, G. Hannequartgramet, G. Corthier and P. Pochart. 1998. *Appl. Microbiol.* 21: 65-71
- 10 Eisen, J. A. 1995. *J. Mol. Evol.* 41: 1105-1123
- 11 Englekirk, P. G., J. Duben-Englekirk, and V. R. Dowell. 1992. Processing anaerobic isolates, p. 125-147. In S. Hoffman (ed.), *Clinical anaerobic bacteriology*. Star Publishing Company, Belmont, CA, U. S. A
- 12 Favier, C., C. Nent, C. Mizon, A. Cortot, J. F. Colombel, and J. Mizon. 1997. *Digest Dis. Sci.* 42: 817-822
- 13 Fischer, S. G. and L. S. Lerman. 1979. *Cell* 16: 191-200
- 14 Fujisawa, T. K., Namba, K. Hirayama, W. K. Lee, and T. Mitsuoka. 1995. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 481-486
- 15 Garcia-Martinez, J., A. Martinez-Murcia, A. I. Anton, F. Rodriguez-Valera. 1996. *J. Bacteriol.* 178: 6374-6377
- 16 Goldin, B. R. and S. L. Corbach. 1984. *J. Clin. Nutr.* 39: 756-761
- 17 Hartemink, R. V. R. Domenech and F. M. Rombouts. 1997. *J. Microbiol. Meth.* 29: 77-84
- 18 Hodson, R. E., W. A. Dustman, R. P. Garg, and M. A. Moran. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4074-4082
- 19 Holdeman, L. V., E. P. Cato and W. E. C. Moore. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA
- 20 Holdeman, L. V., I. J. Good, and W. E. Moore. 1976. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 359-375
- 21 Ito, M., T. Ohno and R. Tanaka. 1992. *Microbial Ecol. Health Dis.* 5: 185-192
- 22 Jiang, T. and D. A. Savaiano. 1997. *Digest. Dis. Sci.* 42: 2370-2377
- 23 Karlin, S., G. M. Weinstock, and V. Brendel. 1995. *J. Bacteriol.* 177: 6881-6893
- 24 Kaufmann, P., A. Pfeifferkorn, M. Teuber, and L. Meile. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1268-1273
- 25 Kimura, K., A. L. McCartney, M. A. McConnell, and G. W. Tannock. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3394-3398
- 26 Kok, R. G., A. Dewaal, F. Schut, G. W. Welling, G. Weenk, and K., J. Hellingwerf. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3668-3672
- 27 Kreader, C. A. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1171-1179
- 28 Kullen, M. J., L., J. Brady, and D., J. O'Sullivan. 1997. *FEMS Microbiol. Letts.* 154: 377-383
- 29 Kullen, M. J., M. M. Amann, M., J. O'Shaughnessy, D., J. O'Sullivan, F. F. Busta, L. J. Busta, and L. J. Brady.

1997. *J. Nutr.* 127: 89-94
- 30 Kuritza, A. P. and A. A. Salyers. 1985. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 958-964
- 31 Langendijk, P. S. , F. Schut, G. , J. Jansen, G. C. Raangs, G. R. Kamphuis, M. H. Wilkinson, and G. W. Welling. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3069-3075
- 32 Leblond-Bourget, N. , H. Philippe, I. Mangin, and B. Decaris. 1996. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 56: 102-111
- 33 Ling, W. H. , R. Korpela, H. Mykkanen, S. Saiminen, and O. Hanninen. 1994. *J. Nutr.* 124: 18-23
- 34 Long, A. A. and P. Komminoth. 1997. *Meth. Mol. Biol.* 71: 141-161
- 35 Mangin, I. , N. Bourget, J. M. Simonet, and B. Decaris. 1995. *Res. Microbiol.* 146: 59-71
- 36 Mangin, I. , N. Bourget, Y. Bouhnik, N. Bisetti, J. M. Simonet, and B. Decaris. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1451-1458
- 37 McCartney, A. L. , W. Wenzhi, and G. W. Tannock, 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4608-4613
- 38 Moore, W. E. C. and L. V. Holdeman. 1974. *Appl. Microbiol.* 27: 961-979
- 39 Mullis, K. B. 1990. *Scientific American* , April; 36-43
- 40 Munoa, F. , J. and R. Pares. 1988. *Appl Environ. Microbiol.* 54: 1715-1718
- 41 Olsen, G. , J. , C. R. Woese, and R. Overbeek. 1994. *J. Bacteriol.* 176: 1-6
- 42 Palleroni, N. J. 1997. *Anton van Leeuwenhoek* 72: 3-19
- 43 Polzin, K. M. , D. Romero, M. Shimizu-Kadota, T. R. Klaenhammer, and L. L. McKay. 1993. *J. Dairy Sci.* 76: 1243-1252
- 44 Ramare, F. , I. Hautefort, F. Verhe, P. Raibaud, and J. Iovanna. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1434-1436
- 45 Resnick, I. G. and M. A. Levin, 1981. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 427-432
- 46 Roca, A. I. and M. M. Cox. 1997. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 56: 129-223
- 47 Romling, U. , D. Grothues, T. Heucr, and B. Tummeler. 1992. *Electrophoresis* 13: 626-631
- 48 Schleifer, K.-H. , M. Ehrmann, C. Beimfohr, E. Brockmann, W. Ludwig, and R. Amann 1995. *Int. Dairy J.* 5: 1081-1094
- 49 Shah, H. N. and M. D. Collins. 1989. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 85-87
- 50 Sligur, U. , E. Tamm, S. Torm, I. Lutsar, S. Salminen, and T. Midtvedt. 1996. *Microbial Ecol. Health and Dis.* 9: 271-277
- 51 Siivi, S. , C. J. Rumney, and I. R. Rowland. 1996. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 561-564
- 52 Socransky, S. S. , C. Smith, L. Martin, B. J. Paster, F. E. Dewhirst, and A. E. Levin. 1994. *Biotechniques.* 17: 788-792
- 53 Soldati, L. and J. C. Piffaretti. 1991. *Res. Microbiol.* 142: 489-498
- 54 Tanaka, R. and M. Mutai. 1980. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 866-899
- 55 Tani, K. , K. Kurokawa, and M. Nasu. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1536-1540
- 56 Ward, D. M. , R. Weller, and M. M. Bateson. 1990. *Nature* 345: 63-65
- 57 Welsh, J. and M. McClelland. 1990. *Nuc. Acids Res.* 18: 7213-7218
- 58 Williams, J. G. , A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. *Nuc. Acids Res.* 18: 6531-6535
- 59 Wilson, K. H. and R. B. Blitchington. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2273-2278
- 60 Woese, C. R. 1987. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271
- 61 Wolin, M. J. , Y. C. Zhang, S. Bank, S. Yerry, and T. L. Miller. 1998. *J. Nutr.* 128: 91-96
- 62 Yamamoto, T. , M. Morotomi, and R. Tanaka. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 4076-4079

第四章 双歧杆菌及其制品

第一节 双歧杆菌的研究历史

一、双歧杆菌研究的第一阶段（1899~1957年）

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 最初是由法国巴斯德研究所的 Henry Tissier (1899) 从母乳喂养婴儿粪便中分离得到的, 他将其命名作 *Bacillus bifidus communis*。他发现这种革兰氏阳性、厌氧、弯曲的杆菌是母乳喂养婴儿肠道的主要微生物。1900年 Moro 也从母乳喂养婴儿粪便中分离到了这种菌, 他将其命名作 *Bacillus acidophilus*。此后关于双歧杆菌的生长促进因子, 培养基的筛选, 双歧杆菌与婴儿营养、健康的关系等方面均被系统研究。

在母乳喂养婴儿粪便中双歧菌占优势是由于母乳的双歧增殖性质, 牛奶中的碳水化合物、蛋白、脂肪、维生素和矿物元素的成分被调整模拟人乳, 以达到促进肠道双歧杆菌生长的目的, 虽然这种配方改善了食用代乳品婴儿的营养, 但它们不能诱导肠道菌群和母乳喂养婴儿相似。1950年确认了双歧杆菌的专一性生长因子, 乳果糖 (Lactulose) 具有双歧增殖效果, 含 *N*-乙酰葡萄糖胺的糖对 *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* 具有增殖作用。Tissier (1900) 认为 *Bifidobacterium* 仅存于母乳喂养婴儿肠道的观点在很长一段时间内被广泛接受, 但后来这种菌在成人和食用代乳品婴儿肠道也被发现, 只是他们肠道中 *Bifidobacterium* 的数量相对较少, 在青年人中 *Bifidobacterium* 构成整个粪便菌群的 40%, 其数量随年龄增加迅速下降。

双歧杆菌在婴儿和营养方面的益生作用被过分夸大了, 这种菌的繁殖被看成是肠道自净的过程, 在胃肠道发生的正常消化过程与肠道双歧杆菌的占优密切相关, 也和腐败菌的抑制有关; 母乳喂养婴儿较食用代乳品婴儿对感染性胃肠炎有更强的抵抗力, 这一临床结果进一步证实了这种看法。但在此阶段母乳中的这种特殊成分还是不清楚, 在代乳品加工过程中产品的微生物污染也未受到足够的重视。

Tissier (1906) 用 *B. bifidum* 培养物治疗婴儿痢疾, Mayer (1948) 应用含双歧促进因子的双歧奶喂养出现营养紊乱的婴儿。在研究的第一阶段 *Bifidobacterium* 被包含在 *Lactobacillus* 属中, 许多研究者如 Weiss 等 (1934) 认为它是 *L. acidophilus* 的变种。

在这一阶段缺乏对 *Bifidobacterium* 进行纯种培养的有效方法, 如 Blaurock (1934) 应用半胱氨酸-乳糖-肝琼脂作培养基没有达到令人满意的效果。Norris 和其合作者 (1950) 建议应用含有许多双歧菌促进因子的半合成选择性介质培养基, 这种培养基除 *Enterococci* 外对其他肠道微生物都具有抑制作用, 在 Norris 介质中添加脱脂乳是有效双歧菌培养基, 这在后来的研究中被广泛应用。

二、双歧杆菌研究的第二阶段（1957年至今）

双歧杆菌的研究的第二阶段 (1957年至今), 由于技术的进步, 对双歧杆菌的研究和应用都取得了长足的进展, 生理生化研究揭示了双歧杆菌的细胞壁组成、DNA 组成、碳水化合物代谢、细胞磷脂成分等方面的情况。

Dehnert (1957) 从人肠道中分离的双歧菌分为 5 组 (种), 其他种由动物消化道和蜜

蜂中获得。对不同年龄组的男女，双歧菌在肠道的数量应用现代技术进行了定量，有关种和表现型也据不同年龄组进行了描述，并把它们和宿主的生理和环境因素综合起来进行考虑。

有关肠道菌的研究取得了大的进展，它们的分布和相互关系、代谢活性和在健康、疾病中的重要性均作了系统研究，在宿主和它的微生物间的相互作用研究代表着理解肠道菌群生理作用的新方法。

有关双歧增殖因子的研究也得到进一步的深入，双歧因子 II，即泛酰巯基乙胺、胞壁质酶、糖苷肽等被确认为双歧增殖因子，除这些专一性因子外入乳的组成和性质也对大肠中微生物生长起重要作用。

在这一时期，双歧菌在新生婴儿健康中的作用尚未完全确定，不过近年来这方面的研究取得重大进展。

双歧菌和它们的生长促进因子被用于婴儿食品和药品加工，以及发酵乳制品的生产，添加双歧增殖因子的婴儿食品已实现工业化生产，含 *B. bifidum* (或和 *L. acidophilus*) 的冷冻干燥物被用于治疗胃肠紊乱，含双歧菌的乳或酸奶或其他发酵制品已有市场化产品问世，双歧增殖因子-功能性低聚糖已成功开发十种以上，形成了较大的市场和产业，这种技术尤以日本最为先进，我国目前也有多种该类产品问世。

三、双歧杆菌的分类

自 Eggerth (1935) 始对双歧杆菌属的分类进行了广泛的研究，Mitsuok (1969) 等根据糖代谢和血清实验结果将双歧杆菌划分为 16 个种。在伯杰氏细菌鉴定手册第八版 (1974 年) 中国际分类命名委员会建议双歧杆菌设 11 个种，即 *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. thermophilum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. suis*, *B. coryneforme*, *B. asteroides* 和 *B. indicum*。1982 年 Biavati 等又对新分离的 13 个种进行了分类，86 年版伯杰氏系统细菌学手册中双歧杆菌种已达 24 个，新增加了 *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. dentium*, *B. globosum*, *B. cuniculi*, *B. choerinum*, *B. animalis*, *B. boum*, *B. magnum*, *B. pullorum*, *B. mininum* 和 *B. subtile* 13 个种。1990 年 Laner 从人体中分离出一个新种：*B. gallicum*。到目前为止，已鉴别和发表的双歧杆菌共有 34 种 (13 种来源于人、15 种来源于其他温血动物、3 种来源于蜜蜂、2 种来源于废水、1 种从乳品中分离)，其中来源于人的双歧杆菌有：*Bifidobacterium adolescentis*、*B. infantis*、*B. longum*、*B. bifidum*、*B. breve*、*B. catenulatum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. angulatum*、*B. gallicum*、*B. scardovii*、*B. inopinatum*、*B. dentium*、*B. denticolens*，至少是后 3 种主要存在于口腔中 (Hoyles et al., 2002; Matsuki et al., 1999)。双歧杆菌的分类时间如表 4-1 所示，*Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 种的情况如表 4-2。

表 4-1 双歧杆菌的分类时间表

研究者	双歧杆菌名称	时 间
Tissier	<i>Bacillus bifidus communis</i>	1919
Castellani & Chalmers	<i>Bacteroides bifidus</i>	1919
伯杰氏细菌学鉴定手册(第一~第四版)	<i>Lactobacillus bifidus</i>	1923~1934
Holland	<i>Lactobacillus bifidus</i>	1920
Orla-Jensen	<i>Bifidobacterium bifida</i>	1924

续表

研究者	双歧杆菌名称	时间
Lehmann-Neumann	<i>Bacterium bifida</i>	1924
Pribram	<i>Tissicria bifida</i>	1929
Vuillemin	<i>Nocardia bifida</i>	1931
Nannizzi	<i>Actinomyces bifidus</i>	1934
Puntoni	<i>Actinobacterium bifidum</i>	1937
Weiss & Rettger	<i>L. bifidus, L. parabifidus</i>	1938
Prebot	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1938
伯杰氏细菌学鉴定手册(第五版)	<i>Lactocacillus bifidus</i>	1939
Negrone & Fischer	<i>Cohnistreptothrix bifidus</i>	1944
Olsen	<i>Corynebacterium bifidum</i>	1950
Norries 等	<i>L. bifidus</i> (分叉型) <i>L. parabifidus</i> (不分叉型)	1950
Gyorgy	<i>L. bifidus</i> var. <i>pennsylvanicus</i>	1953
Dehnert	5种生物型(I-V)	1957
Reuter	从人肠道分离的许多种进行描述	1963
Mitsuoka	从动物肠道发现新的种	1969
Scardovi 等	从蜜蜂和温血动物发现新的种	1969
Holdeman & Moore	发现新的种	1972
伯杰氏细菌学鉴定手册(第八版)	设立双歧杆菌属下11种	1974
伯杰氏细菌学鉴定手册	双歧杆菌属24种	1986
现在	34个种	2002

表 4-2 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 属的分类

<i>Lactobacillus</i>		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>		<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. jensenii</i> ^a	<i>B. adolescentis</i> ^a	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rhamnosus</i> ^a	<i>B. infantis</i> ^a
<i>L. acidophilus</i> ^a	<i>L. Johnsonii</i>	<i>B. angulatum</i> ^a	<i>L. farciminis</i>	<i>L. ruminis</i>	<i>B. lactis</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. Kandleri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>L. fermentum</i> ^a	<i>L. sake</i>	<i>B. longum</i> ^a
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. Kefir</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>L. fructivorans</i>	<i>L. salivarius</i> ^a	<i>B. magnum</i>
<i>Lamylophilus</i>	<i>L. Kefirano faciens</i>	<i>B. bifidum</i> ^a	<i>L. fructosus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>B. merycicum</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. male fermentans</i>	<i>B. boum</i>	<i>L. gallinarum</i>	<i>L. sharpeae</i>	<i>B. minimum</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. mali</i>	<i>B. breva</i> ^a	<i>L. gasseri</i> ^a	<i>L. suebicus</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i> ^a
<i>L. bifermens</i>	<i>L. minor</i>	<i>B. catenulatum</i> ^a	<i>L. graminis</i>	<i>L. vaccinostrercus</i>	<i>B. psudolongum</i>
<i>L. brevis</i> ^a	<i>L. murinus</i>	<i>B. choerinum</i>	<i>L. halotolerans</i>	<i>L. vaginalis</i> ^a	<i>B. pullorum</i>
<i>L. buchneri</i> ^a	<i>L. oris</i> ^a	<i>B. coryneforme</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. viridescens</i>	<i>B. ruminantium</i>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ^a	<i>L. parabuchneria</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>B. saeculare</i>	
<i>L. collinoides</i>	<i>L. paracasei</i> ^a	<i>B. dentium</i> ^a	<i>L. hilgardii</i>	<i>B. subtile</i>	
<i>L. confusus</i>	<i>L. pentosus</i> ^a	<i>B. gallicum</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>B. suis</i>	
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. pontis</i>	<i>B. gallinarum</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>B. thermophilum</i>	
<i>L. crispatus</i> ^a	<i>L. plantarum</i> ^a	<i>B. globosum</i> ^a			
<i>L. curvatus</i>	<i>L. reuteri</i> ^a	<i>B. indicum</i>			

^a从人体分离到的种。

第二节 双歧杆菌的生理生化特征

一、双歧杆菌的形态

双歧杆菌是不运动、无芽胞、具有不同形态的革兰氏阳性杆菌，新分离菌株多呈双歧 Y 和 V 型、刀状或棒状，经继代培养后常呈直或曲棒状，也可呈断枝状；若培养基不适合，它常呈枝状和多形状。双歧杆菌呈枝状和多形状的原因目前尚不十分清楚，Glick 等证实 *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* 的奇异形态缘于 N-乙酰氨基糖的缺乏，该糖是双歧杆菌生长和细胞壁合成必需的物质之一；该菌的形态学研究表明在痕量 N-乙酰氨基糖存在时菌呈球形，在高含量该糖存在时经过隆凸形至简单棒形。

在许多情况下 N-乙酰氨基糖并不能抑制双歧杆菌产生枝结状或其他多样性，表明有其他因素影响菌的形态，Kojima 等证实 Ca^{2+} 在双歧菌形态多样性抑制和其细胞分裂调整方面有重要作用；Husain 等证实 *B. bifidum* 在基础培养基中生长多呈枝状，若添加一定量的氨基酸（丙氨基、天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸），它变为棒形。在琼脂介质中的表面菌落生长，在厌氧情况下菌落的形态，大小依据营养情况和菌特性而不同。双歧菌属于革兰氏阳性菌，有时整个细胞内含颗粒可被甲基兰染色，细胞的其余部分可能不被染色。

二、双歧杆菌的生理

(一) 生长的气体环境

虽然双歧杆菌是严格厌氧的，但在二氧化碳存在的情况下仍有氧的耐受性，菌株不同对氧的敏感性也不同。对氧不敏感的双歧菌株可能具有弱的过氧化物酶活性（过氧化物酶能除去痕量 H_2O_2 ），或这些菌株的 NADH 氧化酶不能形成 H_2O_2 ，这些菌株仅能在一定氧化还原电位以下生长。对氧中等敏感的双歧菌株， H_2O_2 积累是其厌氧的主要原因，因为 H_2O_2 会使 6-磷酸果糖-磷酸酮糖酶失活，该酶是双歧菌发酵途径的关键酶。对氧非常敏感的菌株，由于生长和发酵时要求低的氧化还原电位，故不积累 H_2O_2 ，氧可能通过产生太高的氧化还原电位来抑制菌生长。

(二) 最适生长温度和 pH

双歧杆菌常见形态、培养温度和生理特征如表 4-3 所示。

表 4-3 部分人和动物双歧杆菌的特征

菌种	特征
<i>B. bifidum</i>	外表呈高度变化的棒状，在固体培养基上厌氧培养时菌落呈圆形、凸面或晶状体，具有白色、不透明光滑黏液样表面。仅在介质表面生长；Gram 阳性，但随着发酵物时间变化也可能出现异常；甲基兰可染色细胞内含颗粒但不是整个细胞，要求有机氮作氮源，最适生长温度为 36~38℃，≤20℃或≥45℃不生长，最适 pH 6~7，pH≤5.5 生长缓慢或不生长
<i>B. adolescentis</i>	呈短、弯曲棒状，有时双歧棒状。最适温度 35~37℃，≤20℃或≥46.5℃不生长
<i>B. infantis</i>	呈小、细棒状，有时呈球形或泡状，常有中心颗粒，不呈双歧状。≤20℃或≥46.5℃不生长
<i>B. breve</i>	呈短、细或厚的棒状，也常呈球棒形，菌落凸面枕状，直径 2~3mm，光滑或起伏状表面，≤20℃或≥46.5℃不生长
<i>B. longum</i>	呈长、弯曲、隆起球棒状，革兰氏染色性质可变，菌落光滑或起伏状，直径 2~5mm，发光或黏液外表。≤20℃或≥46.5℃不生长

菌种	特征
<i>B. pseudolongum</i>	新鲜细胞有棒形外表,呈短、球形小粒弯曲状,菌落光滑凸起,奶油色~白色,以氨基酸作氮源,最适生长温度 39~40℃,≤20℃不生长。45℃生长,最适 pH6.5~7.0, pH≥8.0 不生长, pH≤6.0 生长抑制
<i>B. thermophilum</i>	呈球棒状、稍弯曲,很少有歧,在 46.5℃生长,最适 pH 6.5~7.0,在 pH<5.0 和 pH>8.0 不生长

人源双歧菌生长的最适温度是 36~38℃, 动物双歧杆菌有较高的最适生长温度, 有的可在 46.5℃生长, *B. bifidum* 生长的最适 pH 为 6~7, pH<5.5 停止生长。

(三) 双歧杆菌的营养需求

双歧杆菌具有复杂的营养需求, 许多菌株可以铵盐作氮源, 其他菌株则应用有机氮作为氮源, 乳杆菌要求含有多种氨基酸、维生素、相关增殖因子的复杂培养基, 也包括可发酵的糖类; 另一方面 *Bifidobacterium* 能在半合成的培养基中生长, 它含三种氨基酸、多种维生素和矿物元素、乳糖和核苷酸; 许多菌株能生长在含铵盐和胱氨酸(或半胱氨酸)的简单培养基中, 而其他营养素的含量很低。*B. bifidum* var. *pennsylvanicus* 的生长需要泛酸酰巯基乙胺和含 N-乙酰葡萄糖胺的糖类。

自 1953 年 Gyorgy 从婴儿中分离到细胞壁合成缺陷型(需 N-乙酰葡萄糖胺)的 *Lactobacillus bifidus* var *pennsylvanicus* 后, 人奶对该菌株的生长促进作用就成了许多营养学家的目标, 这些研究的目的是试图阐明人奶中存在的双歧杆菌因子的化学本质, 并设法寻找其替代物。这方面的报道较多, 但由于采用的是人肠道中很少存在的 Gyorgy 菌株以及一些未分类地位不明确的菌株来进行这方面的研究, 因此这些研究结果对了解双歧杆菌属的营养需求帮助不大。从双歧杆菌 12 个种对维生素的需要情况看, 菌种间差异很大, 而且对维生素的需要似乎也与种的生态分布没有直接的相关(见表 4-4)。

表 4-4 双歧杆菌属 12 个种对维生素的需要情况

种	核黄素	泛酸	烟酸	吡哆醇	硫胺素	叶酸	对氨基苯甲酸	生物素
1 <i>B. bifidum</i>	+	-	+	-	-	-	+	-
2 <i>B. infantis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
3 <i>B. adolescentis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
4 <i>B. angulatum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
5 <i>B. catenulatum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
6 <i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
7 <i>B. dentium</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
8 <i>B. globosum</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
9 <i>B. thermophilum</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
10 <i>B. pullorum</i>	-	-	+	+	+	+	+	-
11 <i>B. suis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
12 <i>B. asteroides</i>	+	+	+	-	-	-	-	+

注: “+”需要, “-”不需要。1~10 的数据来自 Trovatelli&Biavati (1980), 各种取 10 个菌株。*B. suis* 数据取自 Matteuzzi 等 (1971)。*B. asteroides* 数据取自 Scardovi&Trovatelli (1969)。

研究还发现, 那些可在无有机氮存在条件下生长的双歧杆菌, 生长过程中还能将相当数量的氨基酸分泌入培养基, 例如 *B. bifidum* 就能产生多达 150mg/L 的苏氨酸。*B. thermophilum*、*B. adolescentis*、*B. dentium*、*B. animalis* 和 *B. infantis* 也能合成氨基

酸，分泌较多的丙氨酸，缬氨酸和天门冬氨酸。

三、双歧杆菌的生物化学特征

(一) 糖代谢

双歧杆菌是糖分解微生物，它能代谢葡萄糖、半乳糖和果糖，不同的种和表现型在其他碳水化合物和酒精发酵时有差异。双歧杆菌发酵代谢采用了特殊的双歧支路方法，和同型发酵、异型发酵菌发酵均有不同，葡萄糖经 6-磷酸果糖-磷酸酮糖酶发酵为乙酸和 L. (+) -乳酸，其分子比为 3 : 2，同时产生少量的甲酸、乙醇和琥珀酸，不产生 CO₂、丁酸和丙酸，但 B. adolescentis 和从蜜蜂中分离的菌株发酵葡萄糖酸盐时产生 CO₂。

双歧杆菌的己糖发酵途径如图 4-1 所示。

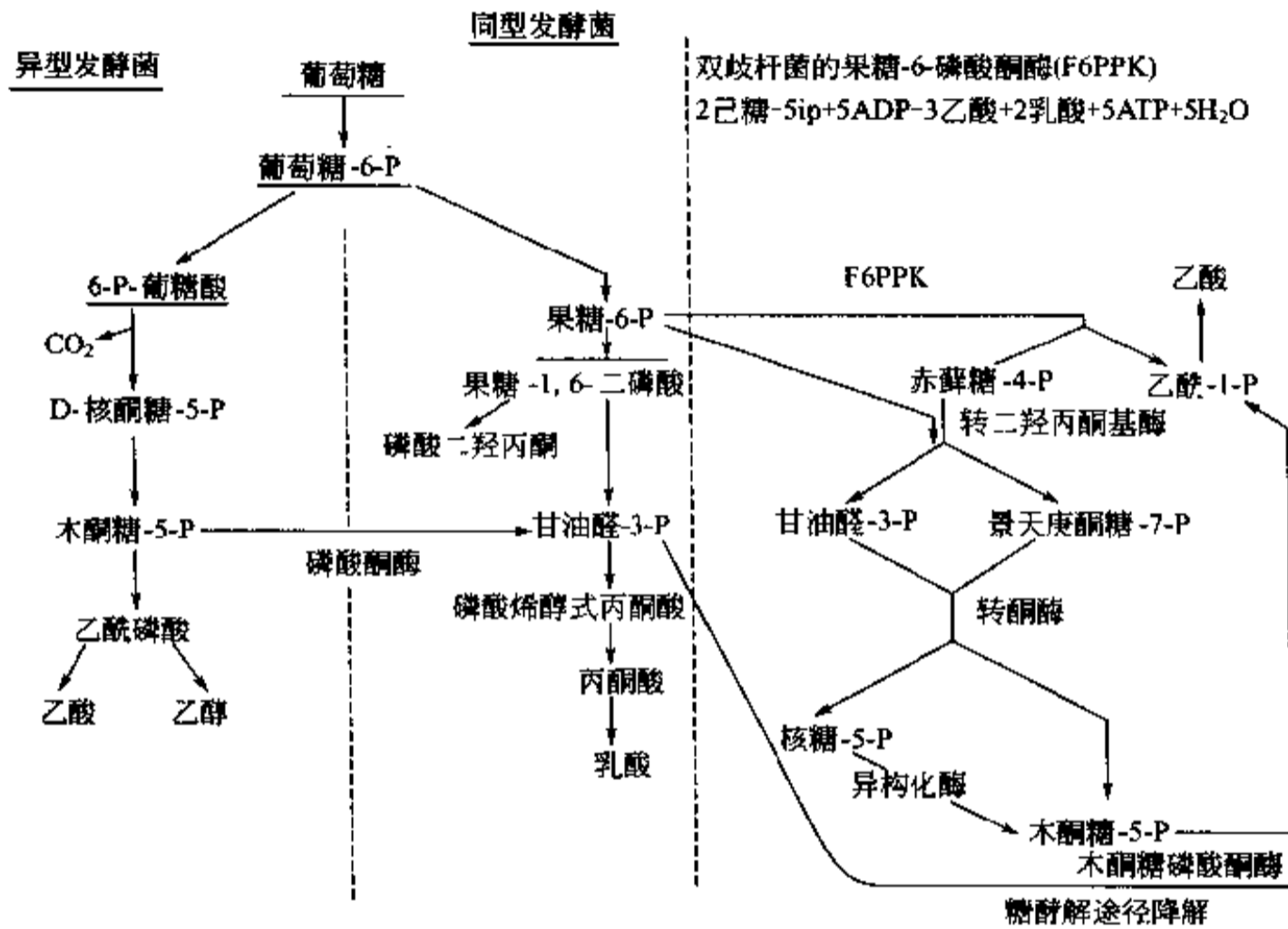
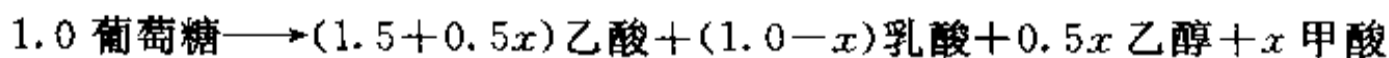


图 4-1 同型、异型发酵乳酸菌和双歧杆菌代谢途径

果糖-6-磷酸经由 F6PPK 的作用分解成乙酰磷酸和赤藓糖-4-磷酸。再经由转二羟丙酮基酶 (EC2.2.1.2)、转羟乙醛酶 (EC2.2.1.1)、木酮糖-5-磷酸酶 (EC4.1.2.9) 的顺序作用及 3-磷酸-甘油醛的糖酵解途径转化形成终产物。双歧杆菌分解己糖形成乙酸、乳酸，两者摩尔比在理论上应为 3 : 2。但在双歧杆菌实际培养中两种酸的数量很少符合这一理论比率。Desjardins (1990) 等报道双歧杆菌在牛奶中培养时，产生的乙酸和乳酸之比为 0.4 : 1 ~ 3 : 1。其原因可能是：部分丙酮酸发生磷酸裂解，形成甲酸和乙酰磷酸，乙酰磷酸还原形成乙醇，使总的反应向有利于乙酸、甲酸、乙醇形成的方向移动。若假设 x 是反应形成的甲酸数量，总的反应式可以写成：



一般认为双歧杆菌 (尤其是来源于人体的双歧杆菌) 不具葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和醛缩酶，因此就不能进行糖酵解和己糖单磷酸途径 (HMP)。但 Scardovi (1974) 发现一些双歧杆菌种中存在这两种酶，但活性很低。

半乳糖代谢 Leloir 途径酶 (半乳糖激酶 EC2.7.1.6, 己糖-1-磷酸尿苷转移酶

EC2.7.7.12 和 UDP-半乳糖-4-差向异构酶 EC5.1.3.2) 是以葡萄糖为碳源培养的双歧杆菌细胞的组成性酶, 而在其他微生物中, 这几种酶需由半乳糖和岩藻糖诱导产生 (Lee 等 1980)。UDP 半乳糖焦磷酸化酶的存在表明, 至少在双歧杆菌属一些来源于人体菌种中, 存在半乳糖代谢的新途径。

Chiappini (1966) 将自人类和蜜蜂分离的双歧杆菌细胞中将磷酸烯醇式丙酮酸羟化形成草酰乙酸的酶, 与牛型放线菌和衣氏放线菌的相应酶进行比较, 发现双歧杆菌中该酶活性与磷酸受体无关, 并且酶反应不可逆; 而在放线菌中, 酶活性则与次黄嘌呤核苷和鸟苷二磷酸有关。

Bifidobacterium 的碳水化合物发酵反应如表 4-5 所示。

表 4-5 *Bifidobacterium* 的糖发酵反应

菌种	阿拉伯糖	木糖	鼠李糖	葡萄糖酸	纤维二糖	乳糖	甘露糖	松三糖	水杨苷	淀粉	海藻糖
1. <i>B. bifidum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2. <i>B. adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	V	V	+	V	V
3. <i>B. infantis</i>	-	-	+	-	V	+	-	-	V	V	V
<i>B. liberorum</i>	-	+	+	-	V	+	-	V	V	V	V
<i>B. lactentis</i>	-	+	+	-	V	+	+	-	-	V	V
4. <i>B. breve</i>	-	-	+	-	+	+	+	V	V	V	V
<i>B. parvulorum</i>	-	-	+	-	V	+	+	-	-	+	-
5. <i>B. longum</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	V	V
<i>B. longum subsp. animalis</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	V	V	V
6. <i>B. pseudolongum</i>	+	+	+	-	V	V	-	V	V	+	-
7. <i>B. thermophilum</i>	-	-	-	-	V	V	-	V	V	+	V
8. <i>B. suis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. <i>B. asteroides</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
10. <i>B. indicum</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
11. <i>B. coryneforme</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-

注: “+”——正, 阳性, “-”——负, 阴性, “V”——可变化。

(二) 其他特征

双歧杆菌的其他生物化学特征可归纳如下。

(1) 除 *B. indicum* 外, 其他 *Bifidobacterium* 均呈过氧化物酶阴性。

(2) 双歧菌呈硝酸盐还原、吲哚形成、明胶液化阴性。

(3) 所有 *B. infantis* 的菌株产生尿激酶, *B. bifidum* 呈该酶阳性, 其他种呈尿激酶阴性。

(4) 许多 *Bifidobacterium* 菌株表现为弱的乳蛋白水解活性, 但 *B. bifidum* 在 37°C 培养 60~90hr 时产生大量氨基酸。

(5) *B. thermophilum* 产生 L-异亮氨酸, 若用诱变剂对其处理, 在 1.5% DL- α -氨基丁酸存在下能产生 5mg/ml L-异亮氨酸。

(6) 许多双歧菌可产生胞外酶, 最常见的酶是葡聚糖和 α -1-6 葡萄糖苷酶。

(7) 许多双歧菌可产生不同性质和组成的多糖 (如表 4-6)。

表 4-6 黏型 *Bifidobacteria* 产生的细胞外多糖

多糖	化学组成	性质
荚膜	葡萄糖、木糖、糖醛酸、戊糖、己糖	黏型菌落在固态培养基上培养呈吸湿性,暴露于空气变得潮解
非荚膜	D-葡萄糖、D-半乳糖、6-脱氧-L 塔罗糖、D-半乳糖醛酸	高度聚合的多糖,暴露于空气随黏度下降经历降解

四、*Bifidobacterium* 的细胞壁特征

双歧菌的细胞壁含有肽聚糖 (peptidoglycan), 它由胞壁酸、葡萄糖胺、丙氨酸、谷氨酸、鸟氨酸或赖氨酸组成, 具有 1 或 2 个甘氨酸、丝氨酸、天门冬氨酸和苏氨酸, 胞壁多糖由葡萄糖、半乳糖和鼠李糖构成。

许多菌株的氨基酸成分可以是相同的, 但氨基酸的序列, 在四肽中氨基酸组成和交联的类型是不同的, 在不同菌株间在鸟氨酸和赖氨酸间氨基酸的组成不同, 交联的类型可以是单一氨基酸、二肽或三肽。细胞壁多糖的构成存在差异, 尤其是鼠李糖和葡萄糖的含量差异较大, 表 4-7 是 *Bifidobacterium* 不同种的细胞壁组成表。

表 4-7 不同菌株 *Bifidobacterium* 的细胞组成

种	分离源	肽糖苷	多 糖		
			葡萄糖	半乳糖	鼠李糖
<i>B. bifidum</i>	成人粪便	Orn-Ser-Asp	+	+	+
<i>B. infantis</i>	婴儿粪便	Lys-Gly	-	+	+
<i>B. breve</i>	婴儿粪便	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. liberrorum</i>	婴儿粪便	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. parvulorum</i>	婴儿粪便	Lys-Gly	+	+	+
<i>B. asteroides</i>	蜜蜂	Lys-Gly	+	+	-
<i>B. suis</i>	猪	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+	+	(+)
<i>B. longum</i>	成人粪便	Orn(Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	+	+	+
<i>B. thermophilum</i>	猪	Orn(Lys)-Glu	+	+	+
<i>B. adolescentis</i>	成人粪便	Lys(orn)-Asp	+	+	-
<i>B. indicum</i>	蜜蜂	Lys-Asp	-	+	+
<i>B. pseudolongum</i>	猪	Orn(lys)-Ala	+	+	+

细胞壁肽聚糖含有葡萄糖胺、胞壁酸和四肽, 四肽由 L-丙氨酸、D-谷氨酸酰胺、L-鸟氨酸和 D-丙氨酸组成, 在相邻四肽鸟氨酸的 5-氨基酸基团和 D-丙氨酸的羧基间的交联二肽桥由 L-丝氨酸和 L-天门冬氨酸构成。*B. adolescentis* 在四肽中有赖氨酸或鸟氨酸, 通过天门冬氨酸或三肽交联, 三肽由 L-丝氨酸~L-丙氨酸~L-丙氨酸组成。

B. infantis, *B. liberorum*, *B. parvulorum* 和 *B. breve* 在四肽中含有赖氨酸, 通过单一的甘氨酸残基交联; *B. longum* 四肽中含鸟氨酸, 交联肽是 L-ser~L-Ala~L-Thr~L-Ala; *B. pseudolongum* 和 *B. thermophilum*, 四肽中含有鸟氨酸, 但它们的交联不同; *B. suis* 和 *B. asteroides* 分别和 *B. longum*, *B. infantis* 有相同的肽糖苷。

五、*Bifidobacterium* 的脂类和磷脂构成

Bifidobacterium 的主要脂肪酸是 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$, 培养基脂肪组成和生长温度的变化大大影响双歧菌细胞壁的脂肪酸类型。

Bifidobacterium 的磷脂组成和 *Lactobacillus* 明显不同，在双歧菌和 *Lactobacillus* 中存在二磷脂酰甘油和磷脂酰甘油，聚甘油磷脂和它的溶解性衍生物、丙氨酰磷脂甘油和二磷脂酰甘油的溶解衍生物仅存在于 *Bifidobacterium* 中，故细胞的磷脂成分是 *Bifidobacterium* 的特征。

对 *B. bifidum var pennsylvanicus* 的大量研究表明：若从其生长培养基中去除人乳成分会引起脂肪、磷脂和菌形态的较大变化，具体变化如下：

- (1) 在细胞残留物和细胞膜中脂类的比例增高；
- (2) 细胞、膜中碳水化合物和胞质脂类的下降；
- (3) 脂肪酸组成向短链和不饱和方向转移；
- (4) 细胞和细胞膜中脂类半乳糖成分的下降；
- (5) 细胞中总的脂类磷成分明显上升和二磷脂酰甘油、磷脂酰甘油相对量的大量上升，以及磷酸半乳糖脂类的下降；
- (6) 在单半乳糖二甘油酯、磷脂酰甘油和两种主要磷酸半乳糖脂类的脂肪酸组成中存在着明显的差异。

六、双歧菌 DNA 组成、抗原性和鉴定

DNA 是染色体的主要成分，它存在于细胞核中。DNA 在分类学中具有重要意义，DNA 的 G+C 组成，即 DNA 中鸟嘌呤和胞嘧啶所占的摩尔百分比 (guanine + cytosine, G+C) 在不同的菌种间存在明显区别，*Bifidobacterium* G+C 的平均值为 60.1%，在 57.2%~64.5% 的范围内，而 *Lactobacillus* 的 G+C 少于 50%。

Bifidobacterium 种间 DNA 组成的差异性小，故其不能用于种间的分辨，但 DNA 同源性是一个可靠的标准，DNA~DNA 同源性研究表明 *Bifidobacterium* 属由几个不同的 DNA 簇组成，所有被研究的种均存在遗传差异性。

Bifidobacterium 具有抗原性，它的抗原性组成是复相物质，具有相同生物化学特征的双歧菌可能有不同的血清学性质，其差异仅表现在沉淀和免疫荧光抗体性质方面。

从肠道或其他物质中分离的双歧菌可能是推测或已确定，对可疑的 *Bifidobacterium* 以其外观和菌落类型、生物学测试为基础进行鉴定。其最终鉴定还可以应用气相色谱对葡萄糖发酵产物进行分析，再辅以前面表中相关的形态学、生理和生物化学特征来判断是否是双歧杆菌。葡萄糖发酵的主要产物是醋酸和乳酸，厌氧培养是其典型特性，过氧化物酶阴性、硝酸盐还原、吲哚形成、由葡萄糖产 CO₂ 和明胶液化是其另外特征，不从鼠李糖、山梨糖、核糖醇、半乳糖醇、赤藓醇和甘油中产酸。属内种的鉴定主要依据糖发酵实验 (见表 4-5)。

第三节 底物对 *Bifidobacteria* 生长的影响

一、天然来源的双歧增殖因子

(一) 双歧因子 I (含 N-乙酰葡萄糖胺的糖类)

在研究双歧杆菌生长因子时，最初采用的是 Gyorgy 所分离的 *B. bifidum var pennsylvanicus* 菌株，因此很早就发现含 N-乙酰葡萄糖胺的糖类是其必需的生长因子，该菌细胞壁的合成必须有这种糖的参与。人奶尤其是初乳含较多的生长因子 I，牛乳中含量则很低。人乳中含 N-乙酰葡萄糖胺的糖类主要是：Lacto-N-tetraose、Lacto-N-neotetraose、Lacto-N-fucopentose I，II 等，表 4-8 列出了已发现的含氨基糖的双歧因子 I。

表 4-8 含氨基糖的双歧因子 I

双 歧 因 子	资 料 来 源
β -ethyl-Nacetyl-Dglucosamine	Lambert & zillikin, 1965
N-carboethoxy-D-glucosamine	Lambert & zillikin, 1965, Rasic 1983
N-acetylglucosamines	Rasic 1983
Lacto-N-difuodecaose(人奶)	Kawase 等 1983
N-acetylgalactosamine	Zillikin 等 1954
N-acetyl-lactosamine(猪胃黏膜)	Jao, 1974
N-acetyl mannosamine	Rasic 1983
N-N-diacetylchitobiose(几丁质)	Jao 等 1978
N-acetyl neuraminic acid	

不同品种乳和人分泌物中双歧因子 I 的含量如表 4-9 所示。

表 4-9 不同分泌物中双歧因子 I 的含量

种 类	活性单位/ml	平均干重 mg 数	人乳的百分活性	种 类	活性单位/ml	平均干重 mg 数	人乳的百分活性
人初乳	0.02	1.8	300	马乳	—	50	
人乳	0.06	5.5	100	胎粪	—	3.0	
牛初乳	0.15	28		精液	0.07	—	
牛乳	2.5	250	2	唾液	0.5	3.0	12
山羊初乳	0.8	85		胃液	0.5	—	12
山羊乳	1.3	130		泪	1.0	—	6
羊乳	2.3	250		羊膜液	0.6~1.0	10.0	8

注：双歧因子 I 的活性单位定义为相当于 0.06ml 平均人乳双歧促进作用的物质质量（相当于 5~6mg 干重和人乳）。

Jao 等 (1978) 将 N-乙酰葡萄糖胺于 121℃ 进行 15 分钟、30 分钟、45 分钟加热处理后，发现双歧生长促进作用降低，降低程度与经热处理程度有关。Gyorgy 等 (1974) 研究则发现人乳中的双歧因子包括可透析两部分，总活性的 40%~60% 存在于不可透析组分中。N-乙酰半乳糖胺和 N-乙酰甘露糖胺对 *B. bifidum* var *pennsylvanicus* 生长也具促进作用，但活性较 N-乙酰葡萄糖胺弱。

除人乳外，人体其他分泌物如唾液、泪液、羊水、血型类黏蛋白中也存在双歧因子 I 活性。Gyorgy (1954) 规定一个双歧因子 I 活性单位是相当于 0.06ml 混合人奶样生长促进作用的物质的量。

(二) 双歧因子 II

一些双歧杆菌的生长需要蛋白经酶水解或酸水解所形成的肽，这些物质被称为双歧因子 II，酪蛋白酶水解产物、肝浸液、酵母提取物或自溶物都是其良好来源。Ziajka (1974) 报道向牛奶中添加 20% 经胃蛋白酶降解处理的牛奶，可明显促进 *B. bifidum* 的生长和产酸。

双歧因子 II 的天然来源是稀少的，它的最好来源是蛋白质的酶水解，表 4-10 列出的是不同产品中双歧因子 II 的含量情况。

表 4-10 不同产品中双歧因子 II (BF₂) 的含量

物 质	单位/g(A)	物 质	单位/g(A)
人乳	1~20 ^①	<i>Aspergillus oryzae</i>	500~1000 ^①
冷冻干燥人乳	20~100	肝提取物	20~660
商品化胃蛋白酶	1250	肝木瓜蛋白酶消化物	2500
商品化胰蛋白酶	85	黏蛋白	100
木瓜蛋白酶	1000	酪蛋白酶水解物	50~15000

①—其数值单位为单位/mg, Raynavd (1959)。

A—单位/g, BF₂ 活性单位是指在一定的生长情况下给出相当于 1ml 0.1mol 酸 (单价酸) 总数酸度的 BF₂ 的最小量。

(三) 泛酰巯基乙胺 (pantethine)

某些双歧杆菌包括 *B. bifidum* var *pennsylvanicus* 生长时需要泛酰巯基乙胺, 因为它们不能直接利用泛酸。蛋白胨和胡萝卜是泛酰巯基乙胺的良好来源。100mg 的蛋白胨能提供 1mg 泛酰巯基乙胺。每天在 2~4 岁婴儿膳食中添加 30mg 泛酰巯基乙胺 3 周, 其粪便中 (28 人中有 5 人) *Bifidobacteria* 的量明显增加。

(四) 糖蛋白和糖肽

从人初乳和乳中提取的糖肽被证明有 *B. bifidum* var *pennsylvanicus* 和 *B. bifidum* 的增殖作用, Hirano 从人初乳中分离出 5 种糖肽, 它们均具双歧菌的增殖活性, Nichols 等从人初乳乳清中分离出 M-1 糖肽的 7 种成分和由初乳中分离出 2 种糖肽成分, 从人初乳乳清分离的全部成分均有明显的 *B. bifidum* var *pennsylvanicus* 的增殖活性。

从人乳乳清和人乳酪蛋白的胰消化液中分离出具有双歧增殖效果的糖聚肽, 这些成分的性质是相似的, 含有包括半乳糖、葡萄糖胺、半乳糖胺、岩藻糖和唾液酸在内碳水化合物类物质约 60%~70%, 研究者认为酪蛋白在母乳喂养婴儿胃肠道消化过程中提供缓慢释放的增长促进因子。

(五) 从植物来源的双歧杆菌增殖因子

在胡萝卜提取液中存在的辅酶 A 前体-泛酰巯基乙胺被证明有双歧增殖作用, 此外有的研究表明在胡萝卜提取物中存在新的增殖因子, 它呈水溶性, 可渗析且具有热抗性, 胡萝卜提取液已用于婴儿的痢疾治疗。

马铃薯提取液用于牛奶中 *Bifidobacterium* 的增殖作用; 玉米提取液可促进牛奶中 *Bifidobacterium* 的产酸和生长, 如在灭菌乳中添加 0.5%~1.0% 玉米提取液双歧菌的繁殖速度会增加 2~3 倍 (37°C、16~20h 培养), 添加 0.5%~1.0% 玉米提取液于培养基中在 37°C 培养 *Bifidobacteria* 16h, 则培养基 pH 为 4.5~4.6, 控制组为 pH=5.4。

(六) 胞壁质酶

胞壁质酶 (溶菌酶) 人乳中含量 40mg/100ml, 牛乳中仅含 13mcg/100ml, 故食用母乳婴儿粪便中有较高的胞壁质酶活性。

用两种方法添加禽溶菌酶于应用体系中: 以 130mg/100g 的量直接将其添加于婴儿配方食品中, 或用它 (50mg/L、40°C、2~3h, 或 100mg/L、30°C、3h) 和改性牛奶一起培养, 并杀菌使其失活, 在培养过程中糖蛋白多糖被水解, 水解产物具有双歧增殖作用。

二、改性牛乳成分作为双歧杆菌培养底物

(一) 乳糖及其衍生物

Sittler (1908) 第一个宣称在牛奶中添加乳糖喂养婴儿可促进肠道双歧菌的生长, 后来的研究表明于在婴儿代用品中添加 10%~12% 的乳糖可增加其粪便中 Gram 阳性菌的量, 但研究结果有时不一致, 因此可能还包含其他因素。口服乳糖对降低人工喂养婴儿粪便 pH 方面仅有部分和临时性作用, 这是因为乳糖没有足够量的达到大肠而促进双歧菌的生长。在婴儿回盲肠中 2% 乳糖或葡萄糖胺能促进双歧菌增殖, 过量的蛋白对双歧菌生长有抑制作用。

两种乳糖衍生物即女性乳糖 (gynolactose) 和异乳糖 (alolactose) 对双歧菌有增殖作用, 这两种糖在人乳中是不存在的, 它们来自双歧杆菌或牛消化酶对乳糖的转化。

β -乳糖的双歧增殖结果已被许多学者研究, 后来的许多研究未确认这一结果。

(二) 其他乳成分

高含量乳糖和低缓冲容量的人乳会使粪便中的 pH 下降, 后来的研究表明高蛋白、高磷酸钙的牛乳会抑制 *Bifidobacteria* 的生长, 人乳蛋白的高胱氨酸可促进 *Bifidobacterium* 的增殖, 依据上述观点改变牛奶成分作为 *Bifidobacterium* 底物时, 倾向于减少酪蛋白和磷酸钙, 强化乳糖和胱氨酸。

牛乳脂肪酸抑制双歧菌生长, 但这种效果能被乳蛋白抵消, 月桂酸和豆蔻酸是主要的双歧菌抑制脂肪酸。另一方面有的脂肪酸存在强的双歧菌增殖作用, 按效果的大小顺序为: 丙酸、丁酸、棕榈酸和硬脂酸, 相反高度不饱和脂肪酸如油酸、亚油酸仅有轻微的双歧增殖效果。

三、人工合成双歧菌增殖因子

除天然存在的双歧杆菌增殖因子外, 近年来人们致力于开发人工合成的双歧增殖因子, 现已取得突破性进展, 目前已有 12 种低聚糖类双歧因子产品推向市场, 取得了良好的经济效益和社会效益。

(一) 低聚果糖的生产技术

1. 低聚果糖概述

在蔗糖分子 (GF) 上结合 1~3 个呋喃果糖分子, 则形成 GF₂、GF₃、GF₄ (G-葡萄糖, F-果糖) 型的复果糖, 习惯上称为低聚果糖。低聚果糖可以利用微生物方法合成, 天然植物中也含有一定量的低聚果糖 (如表 4-11 所示) 洋葱、牛蒡中均有较丰富的低聚果糖。

表 4-11 蔬菜、水果中的低聚果糖含量

名 称	低 聚 果 糖			水 分	糖 质
	可食部分	干物中	糖质中		
洋葱	2.8	25.0	29.7	89.0	9.3
葱	0.2	1.9	3.6	91.5	4.4
蒜	1.0	2.2	3.9	57.1	24.3
牛蒡	3.6	16.7	22.0	78.5	16.4
黑麦	0.7	0.7	0.9	11.5	69.5
香蕉	0.3	1.3	1.6	75.5	19.2

2. 低聚果糖的生产方法

低聚果糖在日本已实现了工业化生产, 其加工时采用微生物酶法生产, 工业上多采用黑曲霉, 它能产生 β -果糖苷酶, 此酶在转移果糖时, 受体中必须含有羟基, 故制取低聚果糖的原料多选用蔗糖, 此外棉子糖、甘露糖、半乳糖等糖类, 山梨醇、甘露醇等糖醇类, 甲醇、乙醇、丙醇等一元醇也用作转移果糖的受体。

明治公司生产的低聚果糖产品的种类和规格如表 4-12 所示。

黑曲霉产生的酶, 在基质物蔗糖浓度为 0.5% 时, 几乎全部倾向于水解变为果糖和葡萄糖, 基质浓度达 5% 时, 水解反应和转移反应同时进行, 当基质浓度达 50% 时, 只发生转移反应, 故黑曲霉产生的酶很有工业生产价值, 可作用于高浓度介质, 生产高浓度低聚果糖 (如表 4-13)。黑曲霉在 28℃ 含 5%~10% 蔗糖培养基中振荡 4 天, 所获得的菌体具有果糖转移活性。这些菌体可以直接使用, 也可将酶固定化应用, 55%~60% 的蔗糖溶液中每克基质加入 2~5 单位的果糖转移酶, 60℃ 反应 24h, 反应后的糖组成为: 葡萄糖 36%~38%, 蔗糖 10%~12%, GF₃ 21%~28%, GF₄ 21%~24%, GF₅ 3%~6%, 低聚果糖含量在 55%~60% 之间。

表 4-12 低聚果糖产品的种类和规格

	明治低聚糖 P	明治低聚糖 P(液)	明治低聚糖 P(粉末)	明治低聚糖 P(颗粒)
形态	水样液	水样液	粉末	粉末
浓度(Bx)	75	75	—	—
固形物组成				
单糖和二糖	<45%(二糖<12%)	<5%	<5%	<5%
低聚果糖	>55%	>95%	>95%	95%
GF ₂	25%	35%	35%	35%
GF ₃	25	50	50	50
GF ₄	11	11	11	11
和 8%二糖等价甜度	60	30	30	30
pH	5~6	5~6	5~6	5~6
Pb(ppm)	<5	<5	<5	<5
As ₂ O ₃	无	无	无	无
包装	18L 净重 25kg	18L 净重 25kg	木箱内装 10kg, 1kg×10	箱装 10kg 1kg×10

表 4-13 具有果糖转移能力的代表性微生物、植物酶

	酵 母			霉 菌		
	酿酒酵母 ^①	酵母	孢子 ^②	麦角菌	出芽短杆菌	黑曲霉
最适 pH	3.5~5.5		4.5	6.0	5.0	5.0~6.0
稳定 pH	6.0~9.0	4.0~6.0	—	—	4.0~7.0	4.5~10.0
最适温度/℃	—	—	—	—	50	55
Km(M)(基质) ^③	0.025(S)	—	0.0044(S)	0.148(S)	0.62(S)	0.29(S)
分子量	135000	—	295000 ^④	—	360000	340000
糖含量/%	3	—	37	—	69	20
Ftase 活性	(-)	(-)	(-,+)	(++)	(+++)	(+++)
基质,浓度 ^⑤	S ₁ 4%	S ₁ 48%	S ₁ 2%	S ₁ 2%	S ₁ 50%	S ₁ 50%
生成寡糖	—	三糖	—	三糖四糖	三糖四糖五糖	三糖四糖五糖
作用特异性 ^⑥	H ₂ O	H ₂ O, 6 ^G - 1 ^F -6 ^F -	H ₂ O	H ₂ O 6 ^G -, 1 ^F -	H ₂ O, 1 ^F - (6 ^G -, 6 ^F -)	H ₂ O 1 ^F -
酶分类	FFase ^⑤	FFase	FFase	FFase	FFase	FFase
	细 菌		植 物			
	枯草杆菌	香蕉	芦 笋			
			SST	6 ^G -FT	1 ^F -FT	
最适 pH	5.8~6.0	4.0	5.0	5.5	5.0	
稳定 pH	—	—	4.0~8.0	5.0~6.0	5.0~5.5	
最适温度	—	—	30℃	20~37℃	30~45℃	
Km(M)(基质) ^③	0.09(S)	0.0044(S)	0.01(S)	—	—	
分子量	39000~40000	—	65000	69000	64000	
糖含量%	—	—	—	—	—	
Ftase 活性	(100%)	(++)	100%	100%	100%	
基质,浓度 ^⑤	S ₁ 4%	S ₁ 20%	S ₁ 3%	S ₁ 5%	S ₁ 5%	
生成寡糖	二糖、果聚糖	二糖三糖	1-蔗果三糖	新蔗果三糖	果寡糖	
作用特异性 ^⑥	b ^F -	H ₂ O	1 ^F -	6 ^G -	1 ^F - ^⑥	
酶分类	Lsase ^⑤	FFase	Ftase ^⑤	Ftase	Ftase	

①胞内酶；②菌丝型；③S₁：蔗糖，K₁：GF₂；④单体 108000；⑤FFase 为果糖苷酶，Lsase 为果聚糖蔗糖酶，Ftase 为果糖转移酶；⑥1^F-果糖部 C-1 (011) 位。

(二) 低聚果糖对微生物的增殖和抑制作用

摄取低聚果糖后肠道菌群的变化如图 4-2, 连续摄取低聚果糖 2 周, 肠道中双歧菌的百分比显著增加, 若停止摄取, 双歧菌量随之减少, 有恢复肠道原有菌群组成的趋势。

低聚糖对肠道菌群的选择性如表 4-14 所示, 结果发现低聚果糖最易被双歧菌利用, 拟杆菌和肠球菌也能利用低聚果糖, 大肠菌和产气荚膜梭菌对低聚果糖不能利用, 故低聚果糖可称为有益菌的专一性增殖因子。

(三) *Bifidobacteria* 对 Fos 的代谢

Marx 等 (2000) 进行不同 *Bifidobacteria* 菌株代谢 Fos (低聚果糖) 的研究, 以 β -(2, 6)-Fos 为惟一碳源进行的 *Bifidobacteria* 代谢结果如图 4-3 所示。 *B. adolescentis*、 *B. breve*、 *B. longum* 和 *B. pseudocateriulatum* 的生长速率分别为 $0.2h^{-1}$ 、 $0.13h^{-1}$ 、 $0.83h^{-1}$ 和 $0.25h^{-1}$, 在无 Fos 的培养基上 *Bifidobacterium* 没有生长, 在高分子的果聚糖作为底物时 *Bifidobacteria* 也不能生长。

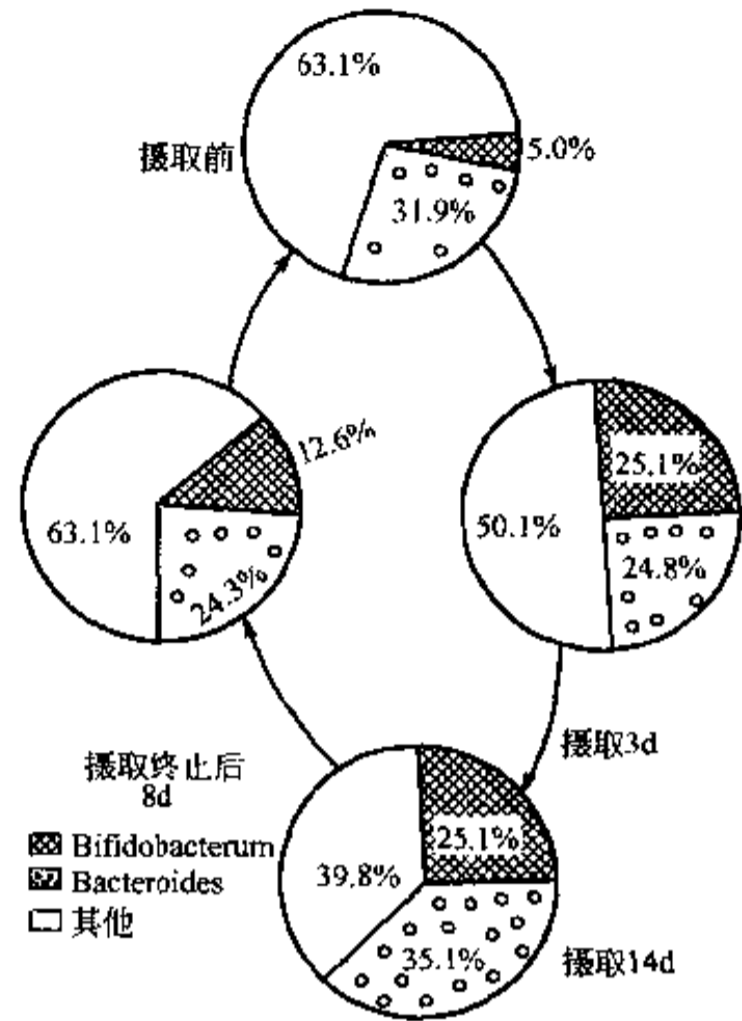


图 4-2 摄取低聚果糖肠道菌群的变化情况

表 4-14 肠道菌对功能性低聚糖的选择性

菌种	低聚果糖	异构化乳糖	分枝低聚糖	棉子糖	水苏糖	4'低聚半乳糖	6'低聚半乳糖	葡萄糖
<i>Bifidobacterium</i>								
<i>B. adolescentis</i>	++	++	++	+-	++	++	++	++
<i>B. bifidum</i>	-	++	-	±	±	++	++	++
<i>B. infantis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>B. longum</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>B. breve</i>	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>Lactobacillus</i>								
<i>L. acidophilus</i>	+	++	±	±	±	+	-	++
<i>L. casei</i>	-	++	-	-	-	-	-	++
<i>L. fermentum</i>	-	+	-	+	+	-	+	++
<i>L. salivarius</i>	+	++	-	+	++	-	+	++
<i>Enbacterium</i>								
<i>E. letum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. limosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Propionibacterium</i>								
<i>P. aenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>Bacteroides</i>								
<i>B. distasonis</i>	++	++	+	++	+	++	-	++
<i>B. fragilis</i>	++	++	++	++	+	++	-	++
<i>B. melaninogenicus</i>	++	-	++	-	-	-	-	++
<i>B. ovatus</i>	++	++	±	+	-	-	-	++
<i>B. thetaiotaomioron</i>	++	++	++	++	+	-	+	++
<i>B. vulgalus</i>	++	++	++	+	-	++	+	++
<i>Clostridium</i>								
<i>C. butyricum</i>	++	++	-	++	-	-	-	++
<i>C. difficile</i>	-	-	-	-	-	-	-	++
<i>C. paraputricum</i>	-	+	-	-	-	-	-	++
<i>C. perfringens</i>	-	++	±	-	-	-	+	++
<i>C. ramosum</i>	+	++	±	-	-	-	+	++
<i>C. sporogens</i>	-	++	-	-	-	-	±	++
<i>Escherichia</i>								

续表

菌种	低聚果糖	异构化乳糖	分枝低聚糖	棉子糖	水苏糖	4'低聚半乳糖	6'低聚半乳糖	葡萄糖
<i>E. coli</i>	-	++	-	-	-	-	+	++
<i>Klebsiella</i>								
<i>K. pneumoniae</i>	++	-	±	++				++
<i>Streptococcus</i>								
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-			+	++
<i>Peptococcus</i>								
<i>P. prevotii</i>	-	-	-	-				++
<i>Veillonella</i>								
<i>V. alcalescens</i>	-	-	-	-	-	-		-
<i>Megasphaera</i>								
<i>M. elsdenii</i>	-	-						-

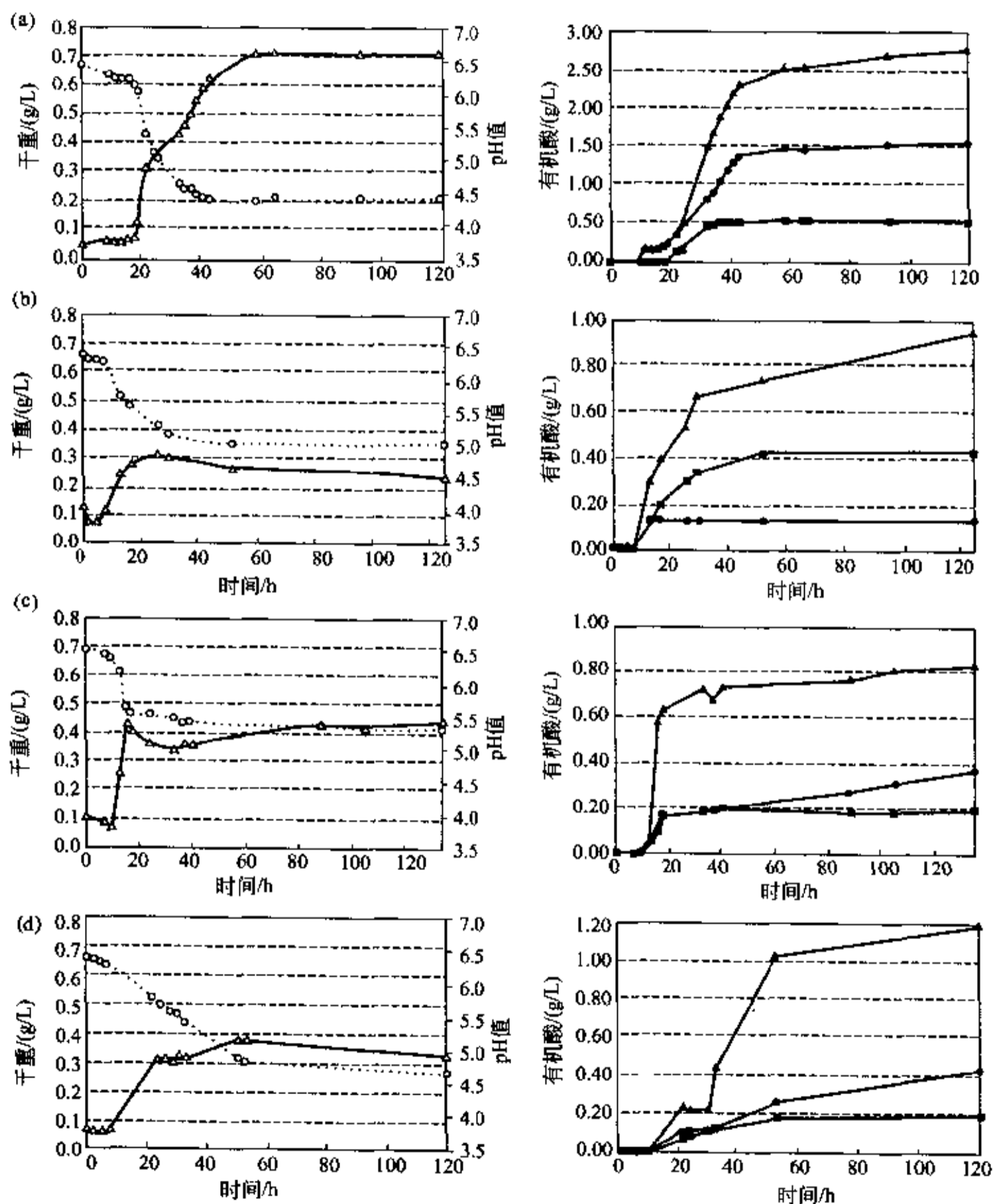


图 4-3 不同 *Bifidobacterium* 种生长、酸化和 SCFA 的产生情况 [以 $\beta(2, 6)$ -Fos 为底物]

(a) *B. adolescentis*; (b) *B. breve*; (c) *B. longum*; (d) *B. pseudocatenulatum*

△—干重, ○—pH 值, ▲—醋酸, ■—甲酸, ●—乳酸

在所有的测试菌中, *B. adolescentis* 有最好的生长, 达到干重量 0.7g/L 以上, 相当于其他 *Bifidobacteria* 的 2 倍。*B. adolescentis* 和 *B. pseudocatenulatum* 在发酵 60h 以后达到最大的生物量; 相反地 *B. breve* 和 *B. longum* 在发酵 20~25h 后生长停止。HPAEC 分析表明每个菌株具有不同的分解 $\beta(2,6)$ -Fos 的能力, 所有菌株能在 18h 培养后分解短链低聚糖, 但 *B. adolescentis* 是惟一能水解长链低聚糖的菌株, 在 138h 培养后 *B. adolescentis* 的培养基中 $\beta(2,6)$ -Fos 几乎完全消失。

在生长的过程中介质的 pH 下降, 这主要是由于有机酸、醋酸、乳酸和甲酸盐的生成所致; 酸化和 $\beta(2,6)$ -Fos 的分解密切相关, *B. adolescentis* 有最低的 pH 值, 这源于它有最高的 Fos 分解能力。*B. pseudocatenulatum* 的生长不同于其他菌株, 在第一阶段 (0~20h) 它以生物量转化和低酸化特征, 第二阶段 (37~50h) 则是低生长速率和强酸化过程。

在各菌株间乙酸对乳酸的摩尔比明显不同, 它依赖于底物、浓度和 *Bifidobacterium* 的菌株三种因素。短链脂肪酸 (SCFA) 的总量较以果糖作为碳源的对照组高, 但用 $\beta(2,6)$ -Fos 进行的全部发酵中和对照组比较, 醋酸对乳酸的比率明显上升 (见表 4-15)。

表 4-15 在发酵过程中 *Bifidobacterium* 产生的 SCFA 的量

		$\beta(2,6)$ -Fos		果 糖	
		mol	A : L	mol	A : L
<i>B. adolescentis</i>	乙酸	4.91		7.61	
	乳酸	1.86	2.6 : 1	4.51	1.7 : 1
	甲酸	1.27		0	
<i>B. longum</i>	乙酸	1.38		9.82	
	乳酸	0.34	4.1 : 1	4.08	2.4 : 1
	甲酸	0.44		0.33	
<i>B. breve</i>	乙酸	3.81		10.1	
	乳酸	0.05	76 : 1	0.88	11.5 : 1
	甲酸	1.78		4.37	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	乙酸	2.16		5.68	
	乳酸	0.52	4.2 : 1	2.08	2.7 : 1
	甲酸	0.47		0.21	

综上所述可以看出 *Bifidobacterium* 在发酵过程中产生 SCFA 的数量和比例由多种因素决定, 底物的利用率和类型有至关重要的作用; *B. breve*、*B. longum* 和 *B. pseudocatenulatum* 在 $\beta(2,6)$ -Fos 上生长, 仅有少量 Fos 被利用, 主要产生乙酸和甲酸。相反地, *B. adolescentis* 能够分解长链 $\beta(2,6)$ -Fos, 产生乳酸和乙酸。对于 *B. longum* 在阿拉伯半乳糖聚体培养基中发酵也有类似的生理模式, 这主要可通过碳利用来加以说明。在碳源限制情况下, *Bifidobacteria* 能通过分解丙酮酸盐为甲酸和用乙酸辅酶 A 来合成超量 ATP, 这也部分用于 ATP 合成。但当碳水化合物不是一个限制因素时, ATP 可以自由被利用, 此时丙酮酸盐被还原为乙酸盐。

不同 *Bifidobacteria* 菌株在人体外代谢 Fos 的能力不同, 这可能归因于水解 Fos 酶活性的差异。Fos 的分解包括不同的酶体系, 如外切和内切水解酶, 但来自 *Bifidobacteria* 水解酶的性能没有被很好地表征。Muller 等首先对乳酸菌产生的多聚果糖水解脱酶进行了纯化, 但此酶尚没有在 *Bifidobacteria* 中得到确认。目前多聚果糖- β 果糖酶 (EC3.2.1.80) 在 *Bifidobacteria* 中得到确认, 它能从菊粉中释放出果糖, 故对低聚糖包括 Fos 进行水解酶体系的确认和表征, 是 *Bifidobacteria* 未来工作的重要部分。

在 Fos 作为惟一碳源情况下不同的 *Bifidobacterium* 菌株具有代谢 β -(2,6)-Fos 的能力。对于菊粉型 Fos, β -(2,6)-Fos 的代谢呈菌株依赖性, *B. adolescentis* 在其中有最好的生长, 并成为生长能力最强的菌株, 它是测试菌株中惟一能代谢短、长链 Fos 的菌株, 其他菌株仅能代谢短链寡聚糖, 目前关于 β -(2,6)-Fos 的发酵仅有少量的研究报道。高分子量的果聚糖有学者认为不适于作为 *Bifidobacteria* 的发酵底物, 如有的研究认为 *Bifidobacterium* 菌株在人体外不能发酵果聚糖, 这和 Marx 等 (2000) 研究结果的差异可能源于应用果聚糖分子量的差异, Marx 等应用相对低分子量的果聚糖 (3200Da, DP20), 但由于 Yamamoto 等应用的果聚糖分子量达 6000 (DP37), 研究结果表明分子量大于 4500 的菊粉类多聚物不能被 *B. infantis* 利用, 故认为 *Bifidobacterium* 菌株能否水解多聚果糖其决定因素是分子量, 而不是它的交联类型。长链 Fos 的水解可以通过在水解酶活性位上的位阻效应来加以阻止。

(四) *Bifidobacterium* 对低聚半乳糖的发酵和利用

低聚半乳糖是一种人乳中含有的糖类, 它的存在被认为影响新生儿肠道 *Bifidobacterium* 的定值, Gyorgy (1973) 认为低聚半乳糖促进了 *Bifidobacterium* 的生长, 这种作用不仅对于母乳喂养婴儿, 也包括摄入强化低聚半乳糖产品的婴儿。

Gopal 等 (2001) 研究了 *B. lactis* DR10、*L. rhamnosus* DR20 和 *L. acidophilus* HN017 利用低聚半乳糖的情况。研究表明 *B. lactis* DR10 和 *L. rhamnosus* DR20 能够利用低聚半乳糖作为碳源, 但两种菌对寡糖的类型表现出不同的倾向性, *B. lactis* DR10 更倾向于利用三糖和四糖, *L. rhamnosus* DR20 更愿意利用单糖和二糖。经 12h 培养后菌株 DR10 利用了低聚半乳糖中全部的四糖, 利用了三糖的大部分, 二糖仅有一些利用, 而单糖无任何变化; 菌株 DR20 利用了全部单糖、大部分二糖, 而低聚糖利用极微。*L. acidophilus* 仅以单糖为碳源, 表现出不同于 *Bifidobacterium* 和 *L. rhamnosus* 的性质。当长时间培养时 DR10 和 DR20 能够利用所有类型的低聚半乳糖。

Gopal 等 (2001) 进一步研究了低聚半乳糖中不同单糖类型对菌的影响情况。图 4-4 是 *B. lactis* DR10 的生长和纯化三糖利用间的关系曲线, 这曲线实际上反映了三糖能够支持 DR10 生长, DR10 能在 18h 内利用大部分的三糖。类似的结果也在二糖和四糖利用的方面而发生, 但对二糖的利用速度较慢。图 4-5 是 *L. rhamnosus* DR20 对纯化二糖的利用, 说明二糖能够支持 DR20 的生长, DR20 能够有效利用二糖。

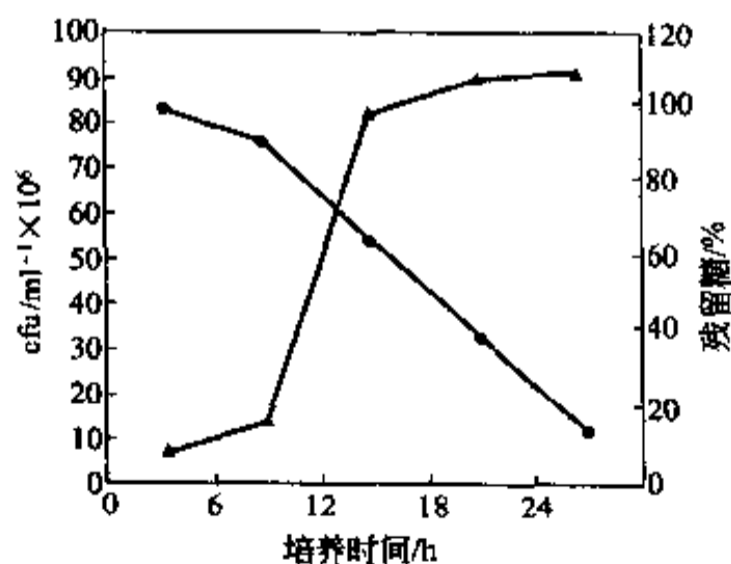


图 4-4 *B. lactis* DR10 对三糖的利用

●—三糖消耗速率 (从介质中)
▲—每 ml DR10 的生长细胞数

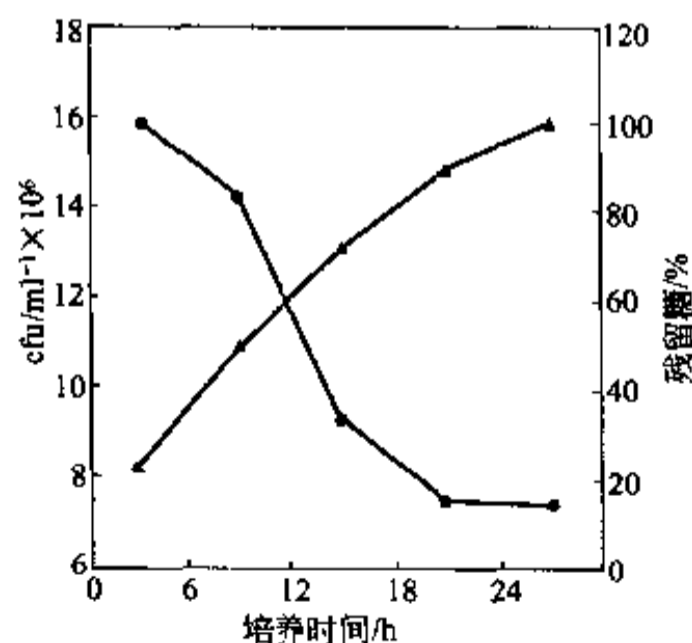


图 4-5 *L. rhamnosus* DR20 对纯化二糖的利用

▲—*L. rhamnosus* DR20 (每 ml) 的细胞数
●—介质中二糖的消耗速率

对 45 株菌的测试结果表明：在菌对低聚半乳糖利用和菌产生 β -半乳糖苷酶活性间存在清晰的相关性。测试的 20 个 *Lactococci* 菌株均不能利用低聚半乳糖，它们也不能产生 β -半乳糖苷酶，在低聚半乳糖培养基中能够生长的 4 株 *Pediococci* 和 4 株 *Bifidobacteria* 均含有 β -半乳糖苷酶，同样 21 个乳杆菌菌株中因为相同原因仅有 9 个能够在此培养基中生长，据此可以认定只有含有 β -半乳糖苷酶的菌株才能有效利用低聚半乳糖。

包括低聚半乳糖在内低聚糖被称之为 *Bifidobacterium* 的增殖因子，Goral 等 (2001) 的研究表明，多数 *Bifidobacterium* 的菌株能够利用低聚糖，并且表明出对低聚糖（三糖、四糖）利用率高于单糖、二糖的情况。菌对糖的利用性和菌产生的酶密切相关，只有菌能够产生可以降解该类低聚糖的酶类，此菌才可利用该类低聚糖；许多研究者利用菌产酶类型的差异性，而研究出某类菌的特效增殖因子，低聚糖类如低聚半乳糖、Fos 等是 *Bifidobacterium* 的专一性增殖因子。

四、双歧杆菌的生长

(一) 底物对双歧杆菌生长的影响

Bifidobacterium 能够在半合成的培养基中生长，这种培养基仅含乳糖、三种游离氨基酸（胱氨酸、甘氨酸和色氨酸）、几种维生素和多种矿物质；许多菌株也可以在仅有乳糖、缓冲液、矿物质、铵盐、胱氨酸和生物素及泛酸钙的简单介质中生长。*B. bifidum* var. *pennsylvanicus*（一个诱变菌株）要求培养基中含泛酸盐和 *N*-乙酰葡萄糖胺以利于它细胞壁的生长和合成。在乳杆菌和许多 *Bifidobacterium* 间的明显不同在于 *Bifidobacterium* 能够生长在含有铵形式氮源的培养基中。*Bifidobacterium* 的生长呈介质依赖性，故所有新种的产生需要广泛研究它最少的营养需求。

Bifidobacterium 在乳中的生长较为缓慢，故考虑人工合成介质作为它的培养基。由于乳除了氨基酸和小肽外含有 *Bifidobacterium* 所需的全部营养成分，故乳是 *Bifidobacterium* 生长的一个较好的基础培养基。对不同动物乳如牛乳、羊乳作为 *Bifidobacterium* 培养基的研究表明：单乳中高含量的蛋白和维生素尚不足以支持 *B. lactis* 对它们的高需求，且高含量的脂肪酸可能导致 *L. acidophilus* 的缓慢生长。

一般地 *Bifidobacterium* 在合成培养基中能较好生长，如 TPY 和 MRS 培养基肉汁较乳为好，但这种培养基成分复杂，因为成本的原因不适于大规模扩繁，而且除非从这种介质中获得的细胞被反复清洗，否则它将给加入它的产品带来不良的风味。为了加工高质量的产品，要求产品有好的质地和高含量 *Bifidobacterium* 活体细胞；由于乳中乳蛋白含量高于合成培养基中要求的蛋白质含量，乳基介质常用于 *Bifidobacterium* 培养的基础介质。研究表明：在乳中添加不同的菌早期生长可利用的氮源或添加低氧化还原电势物质，对不同菌株的 *Bifidobacterium* 生长具有改善作用；质地良好、无不良气味和中等酸度菌株对于含 *Bifidobacterium* 产品的成功生产是至关重要的。

(二) 双歧增殖因子和生长因子

增殖因子和生长因子的内涵和外涵有着明显的差异。双歧增殖因子 (Bifidogenic factors) 是一类可供宿主直接代谢，并能达到大肠或盲肠的化合物，通常为碳水化合物，它在大肠和盲肠被 *Bifidobacterium* 专一性的利用作为能量而达到双歧菌的增殖目的；双歧增殖因子通过选择性地刺激菌的生长或活性或限制结肠中菌的数量来影响宿主健康，它常定义为非消化性食品原料。相反地生长因子 (Growth factors) 是体外刺激 *Bifidobacterium* 生长的化合物，它不能到达大肠或盲肠选择性的刺激和促进 *Bifidobacterium* 的繁殖。表 4-16 列

出已确定的双歧菌的增殖因子和生长因子情况。

低聚果糖 (Fos) 是结肠微生物生长的主要碳源, 它可以通过膳食等以外源性的形式摄入。利用非消化性低聚糖专一性地增加肠道内 *Bifidobacteria* 的相对量, 已是肠道双歧杆菌增殖的最有效方法之一, Fos 在体外有明显的双歧菌增殖效果, Fos 中聚合度为 4 的 Fos 双歧的增殖效果最好; 如 Fos 以 15g/天的比例添加于膳食消费, 在大肠内 *Bifidobacteria* 上升 10 倍, 这和增加挥发性脂肪酸的释放、pH 下降和 Enterobacteriaceae 由 1×10^8 降至 4×10^7 cfu/g 密切相关。低聚木糖、异构化乳糖等非消化性低聚糖也有 *Bifidobacteria* 的增殖作用。其他一些双歧菌的增殖和生长因子情况见表 4-16。

表 4-16 *Bifidobacterium* 的增殖因子和生长因子

名称	来源	研究的菌株	作用	文献
双歧增殖因子类物质				
酪蛋白双歧因子	牛乳酪蛋白的酸或酶水解物	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	生长促进, 和酸 CBF 一起效果最好, CBF 提供生长必须的肽和碳水化合物	Zbikowskie 等
人乳 k-酪蛋白和糖巨肽	人乳 k-酪蛋白, 用凝乳酶和胃蛋白酶水解	<i>B. infantis</i> s12	k 酪蛋白的生长刺激活性改进了酶的水解	Azuma 等
k-酪蛋白酶消化物	人乳酪蛋白的胰蛋白酶水解	<i>Bifidobacterium</i> spp. (<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>)	在完全合成介质中具有生长促进活性, 和二硫/硫疏(胱氨酸)残基、肽有关	Poch 等
酪蛋白巨肽(CMP)	牛乳	<i>Bifidobacterium</i> spp.	生长促进活性	Salam 等
N-乙酰神经氨酸, 它含另外的其他成分如乳糖、糖巨肽等	牛乳	<i>Bifidobacterium</i> spp. 和 lactobacilli	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> 和 <i>B. infantis</i> 的生长促进	Idota 等
半乳糖基半乳糖 半乳糖基葡萄糖	转半乳糖基酶反应(对乳糖)	<i>Bifidobacterium</i> spp.	肠道 <i>Bifidobacteria</i> 占总菌数的比例由 28% 上升至 51%, 毒性短链脂肪酸、粪便 pH 和胺下降	Zto 等
Fructans	菜蓟块茎中提取的无盐白色粉末	<i>B. infantis</i> ATCC 15697, <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703, <i>B. longum</i> ATCC 15707	生长促进活性	Yamazaki 等
低聚木糖	植物果实提取	<i>Bifidobacterium</i> spp.	食用 1-2g/天可增加肠道双歧杆菌的数量	Okazaki 等
低聚果糖 异构化乳糖		<i>Bifidobacterium</i> spp.	生长和酸促进活性, 好的碳源和能源	Gibson 等
2-氨基-3-羧基-1,4-奈酚醌	Propionibacterium frudenreichii 7025 无细过滤液和乙醇萃取部分	<i>B. longum</i> 6001	在肠道 0.1mg/ml 具有生长刺激活性	Anjana 等 Miztol 等 Mori 等
生长因子				
解聚藻酸盐	海藻酸钠通过微生物海藻酸钠溶解酶解聚	<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	在脱脂乳中有生长促进作用	Akiyama 等
酪蛋白水解物	碱性酶、凝乳酶、胰蛋白酶水解酪蛋白、后经 MW30KDa 膜过滤	<i>B. bifidum</i> var. pennsylvanicus <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>	在合成培养基中 <i>B. infantis</i> 和 <i>B. breve</i> 的生长刺激。商品化水解物较 UF 水解物能更好刺激所有菌的生长	Proulx 等
酪蛋白水解物	水解同上, 经二步超滤	<i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>	在合成培养基上 2% 胰蛋白酶水解肽部分能促进菌的最好生长	Proulx 等
二酶水解溶液	大豆和剑豆 (sword Jackbean)	用于饮料生产的 <i>Bifidobacterium</i>	生长刺激和凝乳时间减少	Yang 等
乳的水解物	UHT 乳的蛋白酶和中性酶水解物	<i>B. lactis</i> 和 <i>L. acidophilus</i>	24h 的蛋白酶水解物 (5%) 能促进牛乳、羊乳中 <i>B. lactis</i> 的最好生长	Gomes 等

第四节 双歧菌及其制品的健康作用

一、双歧菌对机体的生理作用

Bifidobacteria 在婴儿和成人肠道菌群的平衡方面发挥重要作用，它产生抑制非有益菌的有机酸，刺激肠道蠕动，它的消耗也影响肠道菌群的代谢，许多报告建议它在婴儿营养方面具有重要作用。

(一) 保持肠道正常微生物菌群平衡

双歧杆菌通过细胞壁胞酸与肠黏膜上皮细胞的相互作用，紧密结合，与其他厌氧菌一起共同占据肠黏膜表面形成一个生物学屏障，构成微生物肠道定殖的阻力，从而阻止致病菌、条件致病菌的入侵和定植（郝德善，1989）。

此外，双歧杆菌还产生细胞外糖苷酶，降解肠黏膜上皮细胞的复杂多糖，这些糖可作为致病菌和细菌毒素的受体，所以通过这些酶的作用，就可以阻止潜在致病菌及其毒素对肠黏膜上皮细胞的黏附（Hoskins, 1981）。

双歧杆菌和乳杆菌抗微生物作用有几个方面的差异。乳杆菌具有抗微生物作用主要是由于能产生乳酸、 H_2O_2 和菌体合成的天然抗生物质（Fernandes 等，1987）。双歧杆菌不产生 H_2O_2 ，但产生乙酸和乳酸。这些酸的产生使肠道 pH 降低，从而抑制了许多病原菌和腐败菌的生长。通过对肠道 pH 的控制就有可能减少酚类、氨、类固醇代谢物、细菌毒素以及血管收缩胺（如组胺、酪胺、尸胺、鲱精胺）的产生（Hidaka & Eida, 1988）。

乙酸的抗微生物作用比乳酸强（Rasic & Kurmann, 1983），但其原因尚不清楚，这可能既与酸的类型又与未解离酸的数量有关。乙酸的 pK 为 4.756 而乳酸的 pK 为 3.860，肠道 pH 5.8 条件下，乙酸中的 8.4% 和乳酸中的 1.1% 以未解离形式存在。双歧杆菌以 3:2 的比例产生乙酸和乳酸，这样未解离乙酸数量将是未解离乳酸的 11 倍。在考虑未解离酸对潜在病原菌和腐败菌拮抗作用时，这是一个应该考虑的重要因素，在控制婴儿肠道 G^- 菌方面，乙酸的存在比 pH 更重要（Gilliland, 1989）。

对肠道 pH 的控制也能影响芳香氨基酸的降解过程（Mitsuoka, 1984）。苯酚和对甲酚是酪氨酸的腐败性产物，而吲哚和甲基吲哚则是由色氨酸产生的。正常情况下这些物质在肝脏中与酸类（如葡萄糖醛酸或硫酸）反应而脱毒，由尿排出体外（Hidaka 等，1986），肠道腐败产物能引起腹泻，肝脏疾病和循环系统功能障碍（Mitsuoka, 1982）。正常情况下氨由肝脏脱毒，但在肝功能障碍时（如肝硬变、年老）血氨浓度就可能上升，并影响神经系统功能，双歧杆菌可通过对尿素分解菌的抑制，减少氨的产生，因此双歧杆菌及其生长因子可用于肝病和肝性脑病的辅助治疗（Bircher 等，1966，Muting 等，1969）。

双歧杆菌对其他肠道微生物代谢活性的调节究竟能达到什么程度呢？Tohyama 等（1982）研究发现当给大鼠饲喂 *B. breve* 和转半乳糖基寡糖时，亚硝酸还原酶，尿素酰胺水解酶（EC3.5.1.5）和 L-赖氨酸脱羧酶活性明显降低。此外肠道中产生的吲哚、尸胺也减少，尿中尿蓝母、吲哚-3-乙酸、对甲酚、六氢吡啶和尸胺含量也明显降低。*B. breve* 的最小有效剂量为 10^9 /天，服用 *B. breve* 时，正常肝脏功能得到维持，这可能是由于对 G^- 细菌抑制及腐败性代谢产物形成的减少所引起的。这些代谢产物形成的减少表明双歧杆菌使肠道菌中与腐败性物质形成有关的酶活性降低了。有关肠道菌产生的对人体直接或间接有害物质及其与这些物质产生有关的酶类如表 4-17 所示。

实验证实，双歧杆菌在体内和体外对沙门氏菌、志贺氏菌、梭状芽孢杆菌、蜡样芽孢杆

菌、Candida albican 和 Campylobacter jejuni 等病原菌都具有抑制作用 (Anand 等, 1985, Tomoda 等, 1988, Tojo 等, 1987)。尚未弄清除乙酸, 乳酸外, 是否还有其他抗菌物质参与这一过程 (Anand 等, 1985; Mantere-Alhonen 等, 1989)。

表 4-17 肠道菌产生的有害物质与有关酶类

酶活性	产物	酶活性	产物
色氨酸酶	吲哚	硝化作用	仲胺
脱羧酶	胺类	N-硝基还原酶	雌激素
脱氨酶	H ₂ S	N-脱羟作用	中性甾醇
脲酶	H ₂ S	脱共轭	酸性甾醇
偶氮还原酶	N-亚硝基化合物	脱羟基作用	
N-硝基化	亚硝基化合物	β-葡糖苷酸酶	
硝酸盐还原酶	激素物质	β-葡萄糖苷酶	

(二) 抗肿瘤作用

双歧杆菌对肿瘤发生的抑制已由大量的实验证实。抑制机理可由激活机体免疫功能直接或间接除去致癌物(前体)两方面进行解释 (Fernandes & Shahani, 1990)。

双歧杆菌产生的乙酸和乳酸使肠道 pH 降低, 抑制了腐败菌的增殖, 使结肠中 N-亚硝基化合物、酚类、胆甾醇代谢产物及其他潜在致癌物的形成数量减少 (Mizutoni & Mitsuoka, 1980, Hashimoto, 1985; Mizota 等, 1987)。Rowland 和 Grasso (1975) 的研究还发现双歧杆菌除了能减少肠道中由仲胺和亚硝酸盐合成的亚硝胺的数量外, 还能部分降解 N, N-二苯基亚硝胺和 N-亚硝基吡咯烷。Mitsuoka (1989) 实验也发现 B. breve 对肉烧焦时产生的致癌物具有很强的吸收能力。给小鼠服用 B. breve 4006 和 FOS 后, 致癌物数量和有害菌的致癌原产生酶活性都降低了 (Tanaka 等, 1983)。

双歧杆菌除了能减少致癌物形成, 抑制肿瘤发生外, 还可通过激活机体免疫系统, 抑制肿瘤发生。康白 (1987) 报告青春双歧杆菌 DM8504 对小鼠 H22 肿瘤具有抑制作用。对小鼠艾氏腹水癌具有抗癌作用。将 H22 瘤细胞接种小鼠, 2 天后经尾静脉注射一定量青春双歧杆菌 DM8504 活菌, 每天 1 次, 连续 5 天, 对照组注射生理盐水。自接种瘤细胞后 16 天处死, 实验组与对照组平均瘤重有极显著差异。王跃等 (1989) 也报道, 婴儿双歧杆菌 (Bif. 189-3) 皮下注射对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 具有明显的抑制作用。病理检查发现实验组肿瘤坏死明显, 肿瘤周围有大量炎症细胞浸润, 提示该菌可能非特异性地增强了对肿瘤的局部免疫反应。

有证据表明, 双歧杆菌的抗肿瘤活性与其细胞壁组分有关 (Ogasa 等, 1983, Yoshiyuki 等 1983; Bol, 1984), Sekine (1985) 报道, 加热杀死的婴儿双歧杆菌的细胞壁具有抗肿瘤作用, 作用的强弱与细胞壁完整性有关。抗肿瘤的机理主要是通过激活吞噬活性, 而并非直接的细胞毒作用。Toida 等 (1990) 的实验结果也与之相似。

(三) 增强机体的非特异性和特异性免疫反应

双歧杆菌能激活机体吞噬细胞的吞噬活性, 提高抗感染能力, 康白 (1987) 给小鼠分别注射青春双歧杆菌 DM8504 活菌液、死菌液和死的大肠杆菌对照液, 每天 1 次连续 3 天。5 天后测定吞噬细胞对鸡红细胞吞噬率、吞噬指数和脾脏指数, 结果表明双歧杆菌活菌对巨噬细胞具有明显的激活作用。双歧杆菌在肠道有定殖, 相当于自然自动免疫, 可诱发机体的特异免疫反应。将长双歧杆菌分别与无菌的 BALB/C 小鼠 (nu/+) 和裸鼠 (nu/nu) 肠联后, 从两种菌的肠系膜淋巴结、肝、肾中均能分离出双歧杆菌, 这种易位现象到第 4 周

时在 nu/+ 小鼠中被终止。利用巨噬细胞移动抑制试验证实 nu/+ 小鼠此时已建立了对双歧杆菌的细胞免疫，这种免疫的建立，对 *E. coli* 感染易位也有抵抗作用 (Yamazaki 等, 1985)。

(四) 营养作用

肠道中的双歧杆菌能合成 V_{B1} 、 V_{B2} 、 V_{B6} 、 V_K 等多种维生素，机体对这些维生素的吸收作用利用情况尚不清楚 (Rasic & Kurmann, 1983)。但双歧杆菌发酵制品可以作为 B 族维生素的良好来源 (Mutai, 1978)，双歧杆菌也能合成各种氨基酸，供肠道吸收 (Matteuzzi 等, 1978)。双歧杆菌的生长造成肠道 pH、Eh 下降，有利于 Fe^{2+} 、 V_D 及钙的吸收。

双歧杆菌发酵乳制品生产过程中蛋白凝固并发生轻微蛋白水解，有利于蛋白的吸收 (Renner, 1983)。通过双歧杆菌 β -半乳糖苷酶的作用，将部分乳糖水解，最终形成乳酸和乙酸。 β -半乳糖苷酶是胞内酶，能耐过胃内消化到达肠道，胆汁的存在能增加菌体渗透性，加快酶对乳糖的水解，在肠道中生长的双歧杆菌则能更持久的发挥乳糖水解作用，因此双歧杆菌能明显地改善乳糖不耐症者对乳糖的消化吸收性。

乳制品发酵剂中嗜酸乳杆菌所产生的是 DL-乳酸，保加利亚乳杆菌所产生的则全都是 D(-) 乳酸。幼年个体对 D(-) 乳酸基本不能利用，摄取过多易引起酸中毒；而双歧杆菌所产生的则全都是机体易于利用的 L(+) 乳酸。从这一点上说，双歧杆菌也比其他乳制品发酵剂更具有优越性。

(五) 控制内毒素血症的作用

Kopuyhob 等 (1980) 报道小白鼠因放射性照射引起肠道菌群失调，表现为双歧杆菌减少，肠道杆菌显著增多，并从被照射动物血液和组织中检出了细菌脂多糖，这种内毒素血症是由于双歧杆菌减少，屏障作用减弱，导致肠道杆菌在肠黏膜大量定植，释放内毒素进入血流的结果。康白 (1987) 以大肠杆菌、克雷伯氏肺炎杆菌和绿脓杆菌、普通变形杆菌混合菌液灌喂大白鼠，鲎试验证实已诱发内毒素血症，再用双歧杆菌 DM8504 活菌灌胃治疗，鲎试验转为阴性，双歧杆菌数量增加，肠道 G^- 杆菌也降至正常水平。而未治疗动物鲎试验仍保持阳性。双歧杆菌控制内毒素血症的机理是使过量增殖的 G^- 杆菌减少至正常水平，以减少内毒素释放量。

(六) 降低血清胆固醇水平

有关发酵乳制品降低血清胆固醇作用已有较多的报道。一般认为这与乳酸菌所产生的羟甲基戊二酸、乳酸对胆固醇合成的抑制作用有关。Homma 等 (1988) 研究发现双歧杆菌对已激活的人 T 细胞 LDL 受体的形成具有抑制作用。大鼠实验表明，口服双歧杆菌能降低血清胆固醇水平，作用机理可能与双歧杆菌对 HMG-CoA 还原酶的抑制作用有关。Devecerski 等 (1981) 给高胆固醇血症患者服用双歧杆菌片 (每片含 3×10^8 个活双歧杆菌，每日 3 次，每次 2 片) 持续 6 周病人血清胆固醇和三酰甘油水平明显降低。Rasic 等 (1992) 的体外实验证明，双歧杆菌能有效地同化胆固醇 ($138 \sim 174 \mu\text{g}$ 胆固醇/ml 双歧杆菌培养物)，他还建议在选择双歧杆菌发酵剂菌株时，应对胆固醇同化能力的大小加以考虑。

二、双歧杆菌和婴儿营养

(一) 双歧杆菌和婴儿间的关系

前面已详细讨论了双歧杆菌和肠道菌群间的关系，本部分主要就以前讨论内容以外的情况，讨论双歧菌和婴儿间的关系。

1. 婴儿氮的截留和增加体重

对有无乳果糖代乳品喂养婴儿的比较实验表明，有乳果糖的膳食喂养婴儿其氮的获得量更高 (Stenger 和 Wolf, 1962), Horecny (1964) 用类似的实验证实含乳果糖的膳食婴儿有最好的氮截留量，同时也增加最多的体重。

Mayer 认为 *Bifidobacteria* 可能影响宿主氨基酸的代谢，用³²P 和³⁵S 标记蛋氨酸的 *B. bifidum* 细胞喂养兔发现标记磷的 61% 留在兔的体内，即留在兔的肝、胃、肌肉和血液中，甚至更多的标记蛋氨酸留在白兔的肝和血液中，但未进行人体实验。

2. 维生素的获得

我们已知 *Bifidobacteria* 能合成维生素，包括 B₁、B₂、B₆、V_K 等，但它们在人的结肠吸收较为缓慢，它们对婴儿营养的贡献也不清楚，且许多肠道微生物需要维生素以供其生长。

对婴儿代谢的研究发现含乳果糖的膳食喂养婴儿尿液中 V_{B6} 的排泄减少，为 1~2 月婴儿口服 *B. bifidum* 若摄入量超过 10⁹ cfu/天，能产生较高含 V_{B1} 的尿液和血液。

3. 硝酸盐还原的抑制

Bifidobacteria 和乳杆菌不能还原硝酸盐为亚硝酸盐，因为它可产生有机酸以抑制肠道内硝酸盐还原菌的生长。

Bifidobacteria 可完全或部分抑制硝酸盐的还原，这主要通过肠道其他微生物来实现的，亚硝酸氧化血红蛋白 Fe²⁺ 为 Fe³⁺，最终产物脱氧红蛋白无结合氧的能力，故发生硝酸盐的还原反应对人体健康是十分不利的。婴儿对脱氧红蛋白较儿童和成人更为敏感，由于婴儿胃液 pH>4 更易使硝酸盐还原为亚硝酸盐，食用较高含量硝酸盐膳食婴儿常患脱氧红蛋白症 (Methaenoglobinaemia)。

(二) 双歧杆菌和婴儿膳食辅剂

1. 婴儿配方食品和 *B. bifidum* 发酵物

B. bifidum 发酵物添加于人工婴儿膳食以改善肠道菌群的情况。Levesque 等 (1959) 添加冷冻干燥的 *B. bifidum* 发酵物 (10⁷ cfu/天) 于婴儿代乳品中，2~3 天后发现婴儿粪便中双歧杆菌数量相当于母乳喂养婴儿的 70%，在服用终止后仍能保持。Schneegans 等 (1966) 通过对健康和疾病婴儿作实验发现，*B. bifidum* 冷冻干燥发酵物添加于膳食有效率达 75%，但对母乳喂养婴儿低于这一水平。

许多研究者研究了 *B. bifidum* 发酵物对婴儿肠道感染的预防作用，发现口服组和控制组患肠道感染的几率为 1:8。目前商业化 *Bifidobacteria* 的婴儿食品包括：①含乳果糖和 *B. bifidum* 的干燥配方 Lactana-B；②含 *B. bifidum*，*L. acidophilus* 和 *Pediococcus acidilactici* 的干基乳粉，它由 *B. bifidum*，*L. acidophilus* 和 *Pediococcus acidilactici* 混合发酵剂发酵浓缩乳 (20%~25% TS) 为原料，菌混合比为 1:0.1:1，发酵温度 31℃，达到期望的酸度后冷却加其他配料后喷雾干燥而得成品。*S. lactis* 也用于干基婴儿食品的加工，也有用 *L. acidophilus* 单独发酵生产的代乳品，其 *L. acidophilus* 达 10⁸~10⁹ cfu/ml，酸度 0.45%~0.72% 乳酸度 (50~80°T)。

2. *B. bifidum* 的预防和治疗作用

B. bifidum 可用于抗生素治疗后的菌群平衡，如含 *B. bifidum* LACTANA-B 的婴儿喂养可防止青霉素治疗后 *Candida albicans* 的过度增长，*B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 有助于抗生素治疗后消化不良的预防，这些菌在服用停止 7 天后，仍有 50% 患者的粪便中可测得该类菌存在。患败血症的早产儿紊乱的肠道微生物也用 *Bifidobacteria* 发酵物得以平衡。

B. bifidum 可用于肠道病原菌感染急性痢疾的辅助治疗（在第一章已详细介绍）。

B. bifidum 对婴儿的菌性小肠结肠炎有治疗作用，*B. bifidum* 冷冻干燥发酵物可在 60% 的情况下消灭肠道病原性 *E. coli*，若和乳果糖一起服用，有效率达 80% 以上。许多肠感染和不良发生在小肠，此处乳杆菌的数量远高于 *Bifidobacteria*，用 *B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 可有效地校正这种情况。

3. 婴儿和儿童混合喂养的发酵乳制品

出生 4~6 个月的婴儿喂养包括母乳喂养或人工喂养，代乳品要求有接近人乳的化学组成。

人乳和牛奶蛋白质的差异性如图 4-6 所示。从图中可以看到这种差异很大，除蛋白质外，脂肪及脂肪酸、碳水化合物、矿物元素和维生素均有明显的差异，我们将在有关章节中详细讨论。

除食用和母乳组成相近的改性牛奶外，4~6 个月婴儿喂食发酵乳也是一种较好的方法，由于发酵乳中营养素较牛奶本身更易吸收；若 *B. bifidum* 和酸奶发酵剂相结合，发酵物中蛋白水解比例更高，变化的程度依赖于 *B. bifidum* 的比例，故这种发酵物对婴儿更有益。

Bifidobacteria 除产醋酸外，还产生 L-(+)-乳酸，*L. acidophilus* 产 DL 乳酸，*L. bulgaricus* 产 D(-)-乳酸（如表 4-18 所示）。L-(+)-乳酸被婴儿在呼吸过程或葡萄糖（或葡糖苷）合成时完全代谢，D(-)-乳酸仅有慢速部分代谢，故在尿液中被排泄，对婴儿尤其出生第一周婴儿应用仅含 L-(+)-乳酸的发酵乳是十分重要的，这是为了防止婴儿无能力运送大量的 D(-)-乳酸而引起代谢的酸中毒。

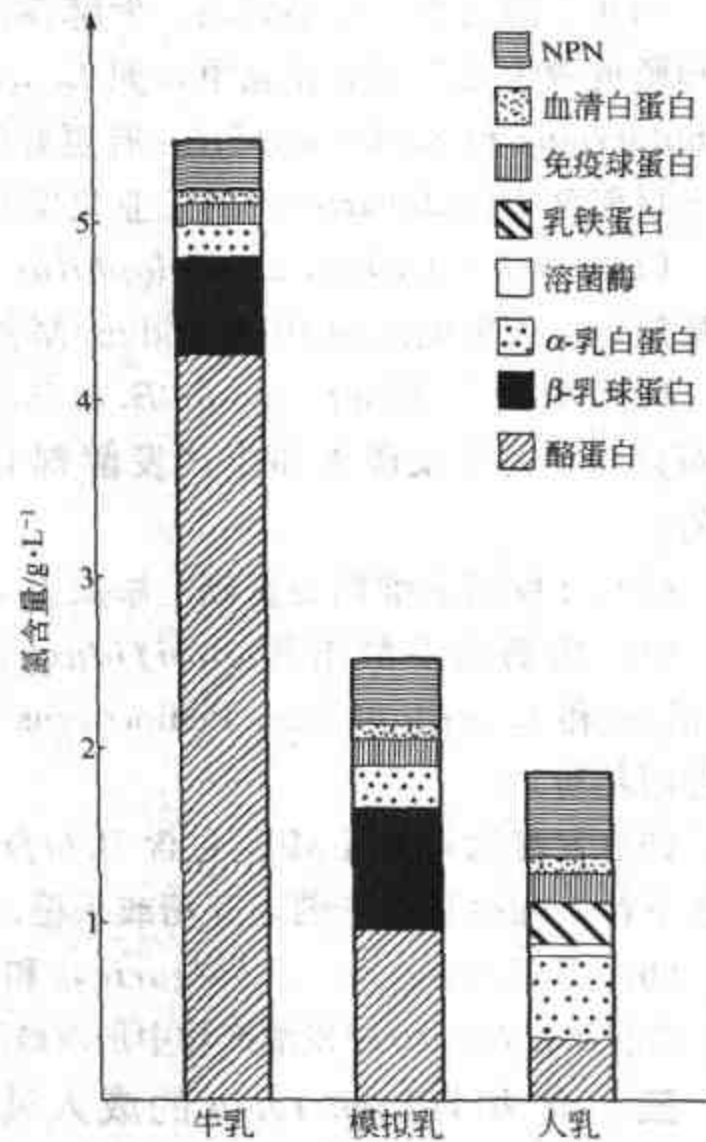


图 4-6 牛乳、模拟乳和人乳的蛋白组成

表 4-18 发酵食品加工中应用的乳酸菌和双歧菌

发 酵 剂	最适生长温度	产生乳酸	发酵类型	产 品
<i>Bifidobacterium</i>				
<i>Bifidum, longum</i>	36~38℃	L(+)	—	发酵乳制品
<i>L. acidophilus</i>	35~38℃	DL	同型	酪乳、嗜酸杆菌乳
<i>L. casei</i>	37℃	L(+)	同型	Yakult
<i>Lc. lactis</i>	40~43℃	D(-)	同型	Kefir 乳
<i>L. bulgaricus</i>	40~45℃	D(-)	同型	酸奶、酪乳(Koumiss)
<i>L. brevis</i>	30℃	DL	异型	Kefir
<i>L. plantarum</i>	30~35℃	DL	同型	发酵乳制品
<i>S. cremoris</i>	30℃	L(+)	同型	酪乳, Kefir
<i>S. laetis</i>	30℃	L(+)	同型	酪乳, Kefir
<i>Leuconostoc cremoris</i>	18~25℃	D(-)	同型	酪乳, Kefir
<i>L. dextranicum</i>	20~30℃	D(-)	异型	酪乳, Kefir
<i>Pediococcus acidilactici</i>	40	DL	同型	发酵乳制品
<i>Streptococcus thermophilus</i>	40~45℃	L(+)	同型	酸奶, 发酵乳制品

钙在发酵乳中吸收率较高，发酵菌是可以诱导抗体形成；许多发酵菌可以胃肠道存活，并和肠道微生物形成有益竞争，如 *L. acidophilus*、*B. bifidum*、*L. casei* 和 *L. fermentum* 较 *L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 有更好的胃肠道存活性。

目前含 *Bifidobacteria* 的工业化发酵乳制品如下。

(1) 用 *B. bifidum*、*L. acidophilus* 和 *S. thermophilus* 发酵的发酵乳，*B. bifidum* 的母发酵剂是由灭菌乳接种 10% *Bifidum* 制备的。

(2) 发酵乳-Biograde，由 *B. bifidum*、*L. acidophilus* 和 *S. thermophilus* 发酵而成。*B. bifidum* 的母发酵剂和生产发酵剂是含有酵母提取物作生长刺激物质的热处理乳制备的。

(3) 在酸奶发酵剂的基础上添加 *L. acidophilus* 和 *B. bifidum*，生产特制酸奶。

(4) 用奶油发酵剂和 *B. bifidum* 发酵（比例 1:1）生产儿童食用的鲜干酪甜食。*B. bifidum* 和 *L. acidophilus*、*Pediococcus acidilactici*（比例 45:10:45）发酵生产婴儿和儿童食用乳粉。

(5) 发酵饮料 Mil-Mil，包含 *B. bifidum*、*B. breve* 和 *L. acidophilus* 混合菌，该产品含胡萝卜汁，加少量甜味剂麦芽糖或果糖。

(6) 用 *B. longum*、*L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 生产的发酵乳。

(7) *Bifidobacteria* 发酵产物中加双歧因子低聚糖及其他矿物元素、维生素的复合性食品。

三、含 *Bifidobacteria* 的成人乳制品的营养价值

(一) 双歧杆菌发酵乳的营养价值

乳和乳制品在西方混合膳食中能提供 74.6% 的钙、35% 的磷，22.1% 的蛋白、21.7% 的镁、39.3% 的核黄素、20.1% 的 $V_{B_{12}}$ 、13.3% 的 V_A 以及其他重要的化学成分；*Bifidobacteria* 发酵乳制品除具有乳的特点外，还兼有酸奶和其他特定的营养价值和生理功能。

乳糖不耐症患者可食用发酵乳制品；不同发酵剂产生不同类型的酸使产品具有特定的感官质量和较长保质期，每种发酵乳如酸奶、酪乳、*Acidophilus* 乳、Kefir 和 Koumiss 均具有特定的风味。用 *B. bifidum* 或其他 *Bifidobacteria* 发酵的产品具有清爽、中酸且具轻微醋酸味，现常用添加香精或水果果料的方法来改善 *Bifidobacteria* 发酵制品的风味。

发酵乳制品的维生素和原乳比有较大变化，一则是来自加热、发酵过程中维生素的损失，二则是发酵菌种对维生素的合成作用，如用酸奶发酵剂（*S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus*）和 *Streptococcal* 发酵剂生产的产品叶酸含量大大增加，而用 *L. acidophilus*

或 *B. bifidum* 生产的酸奶叶酸含量下降。应用 *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 发酵的乳 $V_{B_{12}}$ 和叶酸最高，其次为链球菌发酵乳，*L. acidophilus* 和 *B. bifidum* 发酵乳含量最低。

在老年人中常发生缺钙和铁的问题，临床研究表明钙的摄入能减弱随着年龄变化钙的损失（见图 4-7）；每天至少 1000mg 钙被摄入以保持正常骨密度，乳、乳制品尤其是发酵乳制品消费是补充钙的

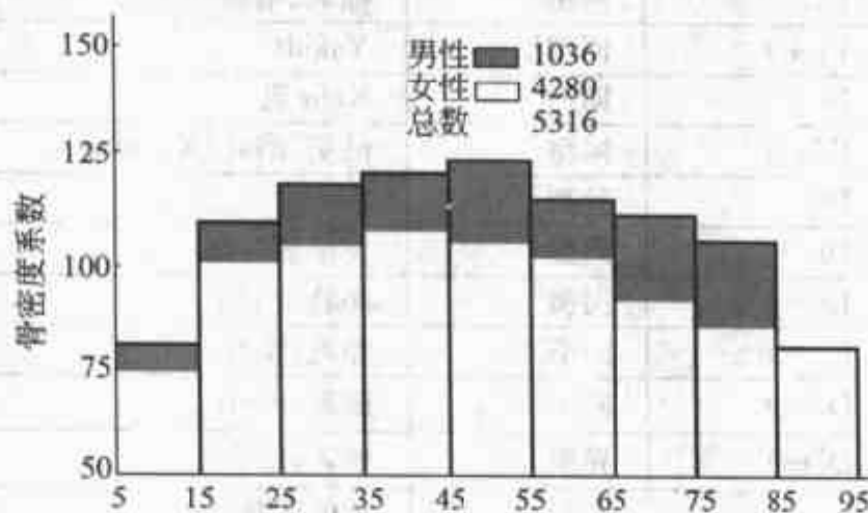


图 4-7 正常健康人年龄对骨密度的影响 (Alanese 等, 1978)

最好方法之一。强化铁的发酵乳被建议供孕妇和恢复期病人饮用。

(二) 对肠道菌群的影响

健康人体的肠道菌群呈稳定性, 研究表明乳杆菌和 *Bifidobacteria* 等肠道菌的膳食强化不能替代其他肠道菌, 但它可以帮助建立肠道菌的合理平衡, 这些微生物具有一定的生物学特征使它们在许多时间能存活, 可能在粪便分泌前在肠道繁殖, 含有这些微生物的发酵乳的正常消费确保它们能连续的通过肠道。

Orla-Jensen 等对老年人进行 *Bifidobacteria* 发酵乳实验发现, 在服用前粪便中无双歧菌, 服用后双歧菌量明显增加, 停止服用后双歧菌在粪便中很快消失。肠道菌群的代谢性质可通过乳杆菌和 *Bifidobacteria* 发酵膳食的正常消耗来改变, 不同的乳杆菌菌株呈不同的宿主专一性, 人体分离的 *L. acidophilus* 不能在鸡的肠道内定殖, 仅有对特殊动物的专一性表现型能在它的肠道内定殖。不同来源的 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacteria* 均表现出不同的生物化学特征, 从人、猪、禽的 *L. acidophilus* 中, 人分离的 *L. acidophilus* DNA 鸟嘌呤和胞嘧啶 (G+C) 的比率较猪或禽低。在成人和婴儿 *Bifidobacteria* 的表现型亦有差异, 如成人肠道中存在 *B. bifidum* 表现型 a 和 *B. longum* 表现型 a 等, 故建议用此类表现型加工该年龄段人食用的双歧制品, 以使生理功能更加吻合和匹配。

Bifidobacteria 和乳杆菌发酵产品的食用可能会对肠道菌群组成的变化产生重要影响, 如食用 *L. acidophilus* 膳食的断奶猪仔胺的分泌减少, *Bifidobacteria* 也能防止肠道胺的形成。*L. acidophilus* 制品可减少人体粪便微生物酶、偶氮还原酶和硝酸盐还原酶的活性, 从而防止偶氮、硝酸盐还原产生致癌物质。

四、*Bifidobacteria* 的临床制品、营养价值和生理作用

(一) 胃肠道紊乱的治疗

L. acidophilus 的液态或冷冻干燥发酵物用于抗生素、放射引起病人副作用的治疗, *B. bifidum* 也用相同的治疗, 二者合用效果更好。因为肠道紊乱发生在小肠, 此处乳杆菌较 *Bifidobacteria* 多, 应用这种菌可达到治疗效果。

(二) 肝病治疗

1. 肠道菌群和门脉脑病

肠道菌产生大量的有毒物质: 如氨酚、药物活性胺和吲哚, 它们在被排泄于尿和粪便前在肝脱毒, 在肝病情况下肝不能对毒物脱毒使其进入系统循环, 到达脑部, 在后期的肝硬化过程中中枢神经系统的紊乱由轻微的精神迷乱向昏迷变化, 这是门静脉系统脑病的症状之一。它可能发生在门静脉系统吻合后, 在这里氨和其他有毒产物逃离肝和脱毒作用, 进入循环系统。

肠道产生的氨是引起肝昏迷的主因, 它的主要来源是尿素的水解, 少部分来自氨基酸的脱氨化。肠道微生物如 *Enterobacteria*、*Peptostreptococci*、*Clostridia* 和 *Eubacteria* 产生尿激酶, 该酶能水解尿素为氨和二氧化碳, 每天产生尿素的 20%~25% 被分解。在肠道形成的氨经门静脉血系统进入肝, 在这里它被能转化为非必需氨基酸或通过尿素再合成脱毒, 有疾病的肝尤其是硬化肝不能完成这种转化, 氨进入静脉系统引起高氨尿和中毒, 由乳蛋白氨基酸脱氨产生的氨量少于肉中血液蛋白和肉蛋白产生的氨量。

2. 乳果糖和双歧菌乳用于慢性肝病的治疗

门静脉脑病的控制要求减少肠道氨的产生和吸收, 以及减少其他潜在性有毒的含氮物质, 下列方式和方法对于防止此类疾病的发生是十分重要的: ①膳食蛋白的禁食和控制; ②

应用灌肠剂和泻药进行肠的清理；③广谱性抗生素——新霉素的服用；④服用乳果糖双歧菌奶。

膳食蛋白禁食的目的是减少肠道氨和其他含氮物的产生，但患者对蛋白摄入的减少是非常敏感的，对高氨尿患者蛋白摄入临时性减为 30g/天。肠清理用于肠出血情况下从肠中迅速清理出血，新霉素的口服用于肝脑病的急性恶化时减少肠道内尿解微生物的量，但广谱抗生素的长期服用会引起肠道菌群紊乱和下痢。

乳果糖由于它无毒性可长期服用，乳果糖在处理有或无门静脉脑病的肝硬化是有效的，由于它不被小肠黏膜的 β -半乳糖苷酶水解，故在小肠的吸收很差，它到达结肠经过微生物分解，*Bifidobacteria*、乳杆菌和 *Enterococci* 发酵它为乳酸和醋酸，从而降低了结肠的 pH，由于低 pH 时氨是以 NH_4^+ 形式存在，通过扩散它不像氨一样被吸收， NH_3 和 NH_4^+ 平衡的改变可以影响氨由血液转至结肠，从而减少血液氨的水平，在结肠中产生的有机酸促进肠道蠕动，诱导软便产生，故可防止便秘。

口服乳果糖可帮助肠道重建正常菌群，Gram 阳性菌如 *Bifidobacteria*、乳杆菌和 *Enterococci* 的菌数增加，其他菌如 *Enterobacteria*、*Clostridia* 和 *Staphylococci* 减少。这种疗法的另一好处是可增加患者的蛋白摄入 (70g/天)，不用像其他治疗方法要减少蛋白摄入。

乳果糖在餐后口服 50% (W/W) 的糖浆，剂量以每天 2 次软便为宜，粪便 pH 为 5~6 或更低，以小剂量 $3 \times 10\text{g}/\text{天}$ ，逐步 $3 \times 100\text{g}/\text{天}$ 或最好 $5 \times 60\text{g}/\text{天}$ 过渡。*Bifidobacteria* 乳在肝硬化时对蛋白代谢有益，以含蛋白 10%、含碳水化合物 84% (包括乳果糖)、含 3% 矿物质和双歧杆菌的制品给 33 个肝硬化患者服用，起始时 $3 \times 10\text{g}/\text{天}$ ，后来 $3 \times 100\text{g}/\text{天}$ ，结果表明患者的肝硬化得到明显改善，血液中氨、游离酚和尿蓝母的量减少，粪便 pH 值下降和 *Bifidobacteria* 量增加。

乳果糖对肝硬化患者肠道菌群和毒性含氮物质的影响如图 4-8 所示。用 *Bifidobacteria* 制备处理肝硬化患者的结果如图 4-9。双歧菌制品对肝硬化患者血液氨和尿蓝母的影响如图 4-10 所示。

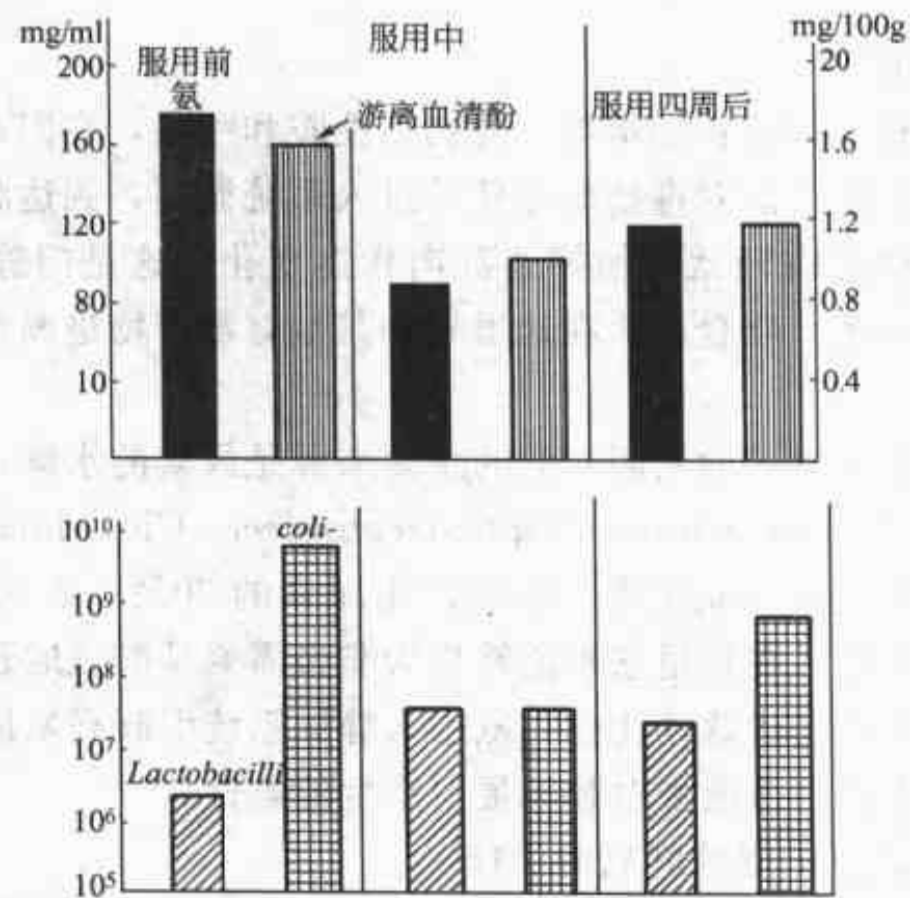


图 4-8 肝硬化时乳果糖对肠道菌和毒性含氮物质的影响

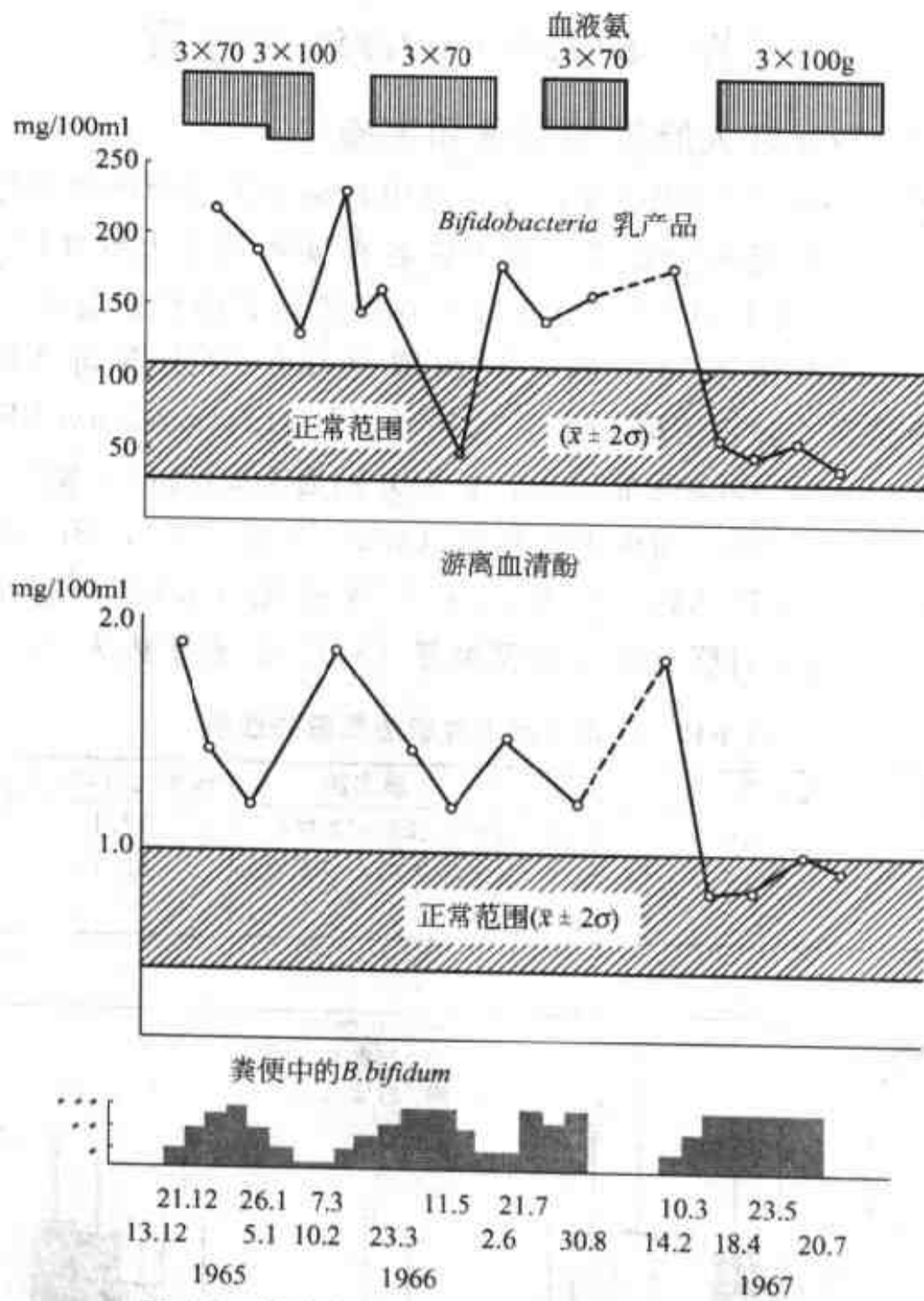


图 4-9 *Bifidobacteria* 乳制品处理肝硬化结果

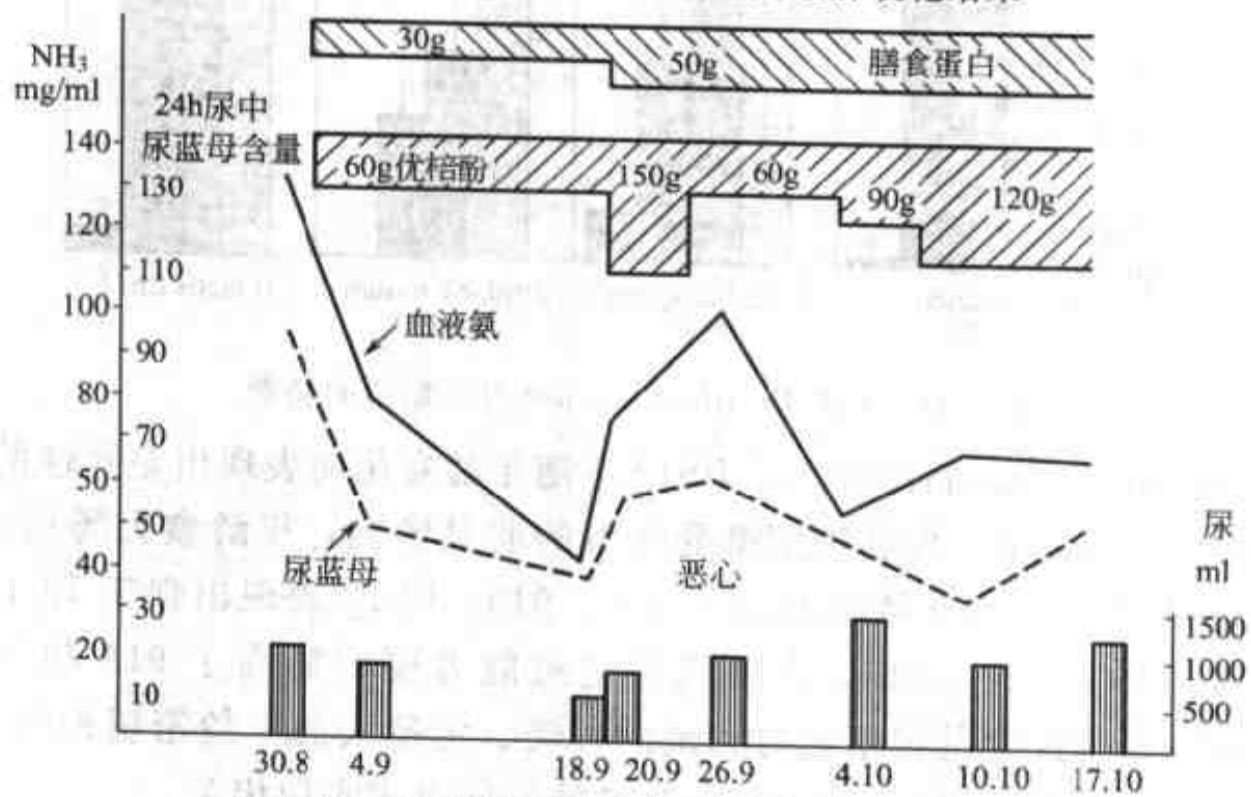


图 4-10 双歧杆菌乳对血液氨、尿蓝母的影响

注：柱体表示粪便中双歧杆菌的量，且与图中血液氨、尿蓝母曲线相对应

许多研究者建议乳果糖和 *Bifidobacteria* 奶结合治疗肝硬化，在 *Bifidobacteria* 奶加工中应用不产尿激酶 *B. bifidum* 是非常重要的，*Bifidobacteria* 奶的易消化性使患者可不减少其蛋白摄入。

第五节 *Bifidobacteria* 的性质

一、*Bifidobacterium* 在人肠道的黏着和定殖

菌对肠道黏膜的黏着是其定殖的必要前提，这也是益生菌选择的重要标准之一。许多益生菌能结合于 Caco-2 组织细胞和肠黏膜，这种黏着在某种程度上受年龄影响，Ouwehand 等 (1999) 研究了不同年龄的人 *Bifidobacterium* 在肠道黏膜的黏膜情况。

Ouwehand 等的研究发现不同年龄人群肠道黏膜的构成不同 (如表 4-19)。4 株 *Bifidobacterium* 在肠黏膜的黏着情况如图 4-11 所示。*Bifidobacterium* BF1100 对成人肠道黏膜黏着较 *Bifidobacterium* Bb12 明显地少，它们分别为 4.2% 和 11.3%。所有菌在老年人肠道黏膜的黏着 (0.1%~1.6%) 均少于年轻组 (4.2%~12.3%)，*Bifidobacterium* 913 在 2 月婴儿肠道黏膜的黏着 (11.5%) 明显高于 6 月婴儿 (8.6%) 和成年人 (5.9%)。*Bifidobacterium* BF1100 在 2 月婴儿肠道黏膜黏着 (8.1%) 高于成人 (4.2%)。

表 4-19 不同年龄人群肠道黏膜的性质

膜来源	碳水化合物/%	蛋白质/%	膜/%	膜来源	碳水化合物/%	蛋白质/%	膜/%
新生儿	29.1	30.0	66.9	成人(25~52岁)	17.1	30.4	72.2
2月婴儿	15.3	49.4	71.6	老年人(74~93岁)	40.1	13.3	63.8
6月婴儿	31.3	37.2	73.1				

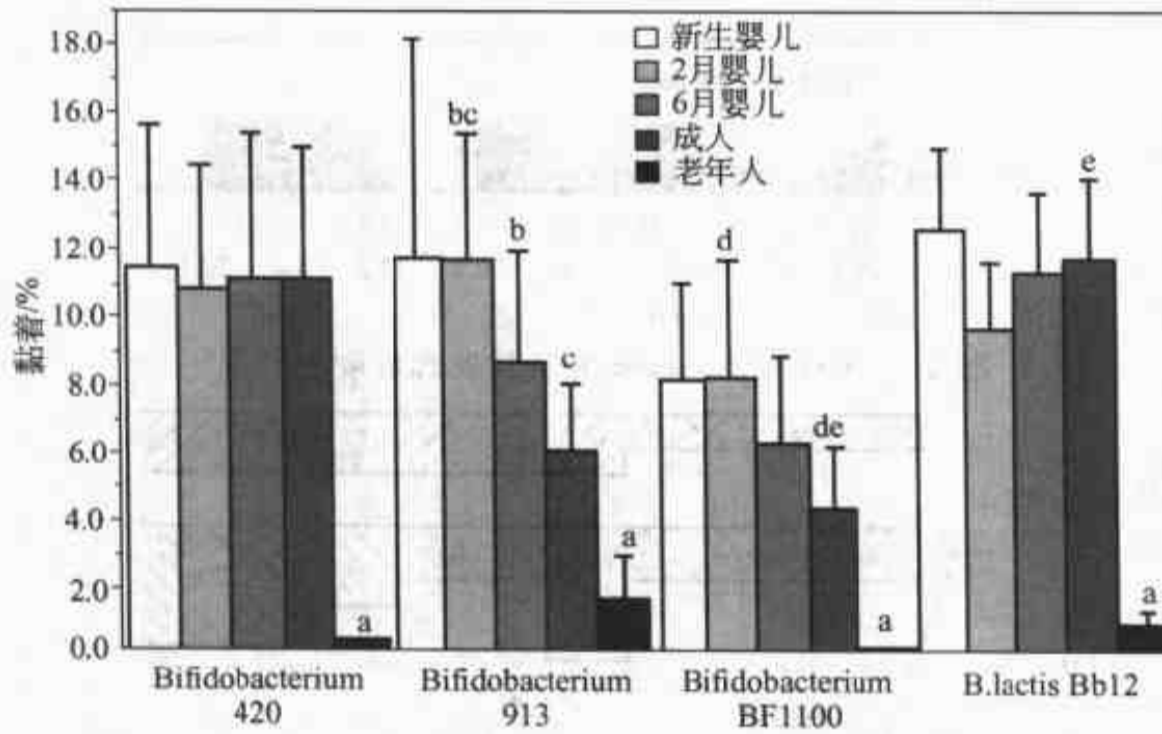


图 4-11 4 株 *Bifidobacterium* 对肠黏膜的黏着

综上所述可以看出 *Bifidobacterium* 420、Bb12 不随年龄变化而表现出差异性的黏着和定殖。*Bifidobacterium* 913、BF1100 的肠道定植受年龄的明显影响，年龄愈大肠道定殖的几率愈低，913 表现的更为明显。对于婴幼儿而言 420、913、Bb12 表现出强于 BF1100 的定殖能力，对于成人和老年人 420、Bb12 在肠道的定殖能力要明显高于 913 和 BF1100。总之 *Bifidobacterium* 在肠道黏膜的定殖能力和菌的种类、定殖人的年龄密切相关，同一菌株在不同年龄组的定殖差异性和不同年龄人肠道黏膜的不同组成密切相关。

He 等 (2001) 从健康和过敏性婴儿粪便中分离了 50 株 *Bifidobacterium*，经分离鉴定 (表 4-20、表 4-21) 发现过敏性婴儿粪便中 *B. adolescentis* (24 个分离物中的 20 个) 占优势，健康婴儿粪便中则以 *B. bifidum* (26 个中的 15 个) 为主。对人粪便黏膜的黏着性实验表明：它们的特征黏着范围在 0.9%~14.6% 之间，健康婴儿粪便中的

Bifidobacterium 黏着性 (9.3%) 明显高于过敏性婴儿 *Bifidobacterium* 的黏着 (3.9%)。 *B. infantis* 是仅有的在两组婴儿粪便中均存在的 *Bifidobacterium*，在两组间 *B. infantis* 的黏着没有显著性差异。 *B. adolescentis* 是最少的黏着菌种类 (3.5%)。其他分离菌的黏着间没有明显差异，益生菌 *Lactobacillus* GG 和 *B. lactis* Bb12 有相对高的黏着率，分别为 38.5% 和 19.0%。

表 4-20 健康婴儿分离 *Bifidobacterium* 和其在肠道黏膜定殖

菌 株	黏着(平均±SD)/%	菌 株	黏着(平均±SD)/%
<i>B. infantis</i> H-1(1)	5.3±5.1	<i>B. bifidum</i> H-2-4	14.6±4.8
<i>B. infantis</i> H-1(2)	10.4±6.1	<i>B. bifidum</i> H-2-5	9.4±5.2
<i>B. breve</i> H-1(3)	12.8±1.4	<i>B. bifidum</i> H-2-6	11.0±3.0
<i>B. breve</i> H-1(4)	8.7±5.6	<i>B. bifidum</i> H-3-1	9.6±6.3
<i>B. breve</i> H-1(5)	11.3±4.5	<i>B. bifidum</i> H-3-4	11.7±14.1
<i>B. breve</i> H-1(6)	5.6±7.5	<i>B. bifidum</i> H-3-5	5.6±4.6
<i>B. infantis</i> H-1(7)	8.0±4.1	<i>B. bifidum</i> H-3-6	2.6±2.2
<i>B. breve</i> H-1(8)	14.3±6.0	<i>B. bifidum</i> H-3-7	5.6±2.6
<i>B. infantis</i> H1-(9)	7.0±8.4	<i>B. bifidum</i> H-3-8	9.1±3.0
<i>B. breve</i> H1-(10)	13.6±3.9	<i>B. bifidum</i> H-3-9	8.1±5.8
<i>B. bifidum</i> H-2-1	9.2±4.9	<i>B. bifidum</i> H-3-10	10.7±9.9
<i>B. bifidum</i> H-2-2	13.3±8.4	<i>B. bifidum</i> H-3-11	9.7±3.3
<i>B. bifidum</i> H-2-3	8.1±5.1	<i>B. breve</i> H-3-12	5.6±4.8

表 4-21 过敏性婴儿分离的 *Bifidobacterium* 和其在肠道黏膜的定殖

菌 株	黏着(平均±SD)/%	菌 株	黏着(平均±SD)/%
<i>B. infantis</i> 12(1)	9.2±1.3	<i>B. adolescentis</i> a IS-8(7)	6.6±4.9
<i>B. infantis</i> 12(2)	3.6±4.1	<i>B. adolescentis</i> a IS-8(8)	5.4±3.8
<i>B. infantis</i> 12(3)	9.3±6.3	<i>B. adolescentis</i> c 66(1)	3.7±3.4
<i>B. infantis</i> 12(4)	2.9±1.3	<i>B. adolescentis</i> c 66(5)	4.5±3.9
<i>B. adolescentis</i> b 12(5)	6.6±2.2	<i>B. adolescentis</i> c 66(6)	4.2±2.3
<i>B. adolescentis</i> b 28(1)	2.6±1.9	<i>B. adolescentis</i> c 66(7)	2.3±0.6
<i>B. adolescentis</i> b 28(2)	2.9±3.7	<i>B. adolescentis</i> c 66(8)	2.1±1.2
<i>B. adolescentis</i> a IS-8(1)	6.1±1.4	<i>B. adolescentis</i> c 66(9)	2.0±0.8
<i>B. adolescentis</i> a IS-8(2)	1.9±1.4	<i>B. adolescentis</i> c 66(10)	0.3±0.2
<i>B. adolescentis</i> a IS-8(4)	4.7±2.5	<i>B. adolescentis</i> c 66(12)	5.5±8.7
<i>B. adolescentis</i> a IS-8(5)	0.9±0.2	<i>B. adolescentis</i> c 66(13)	3.5±2.4
<i>B. adolescentis</i> a IS-8(6)	2.8±1.9	<i>B. adolescentis</i> c 66(17)	1.3±0.7

许多研究表明：生理紊乱、感染疾病和肠道菌群的失衡有关，这以人肠道菌群 *Bifidobacterium* 和乳杆菌的降低为特征，健康婴儿和过敏性婴儿粪便中 *Bifidobacterium* 种类的不同也从一个侧面说明它和健康的相关性，健康婴儿粪便中以 *B. bifidum*、*B. breve*、*B. infantis* 为主；过敏性婴儿粪便主要定殖 *B. adolescentis* 和部分 *B. infantis*，其组成更接近成人粪便中 *Bifidobacterium* 的组成。

二、人体内的双歧杆菌

(一) 人体肠道内的双歧杆菌

Bifidobacterium 是健康人体粪便菌群的主要菌，也是母乳喂养婴儿粪便中的主要菌。在产前婴儿处于无菌环境，但婴儿在出生时被母亲阴道中的菌群污染，后者又受皮肤、环境和食品中菌的影响，这导致微生物的迅速定殖，它主要由 Coliforms、Enterococci、乳杆菌和

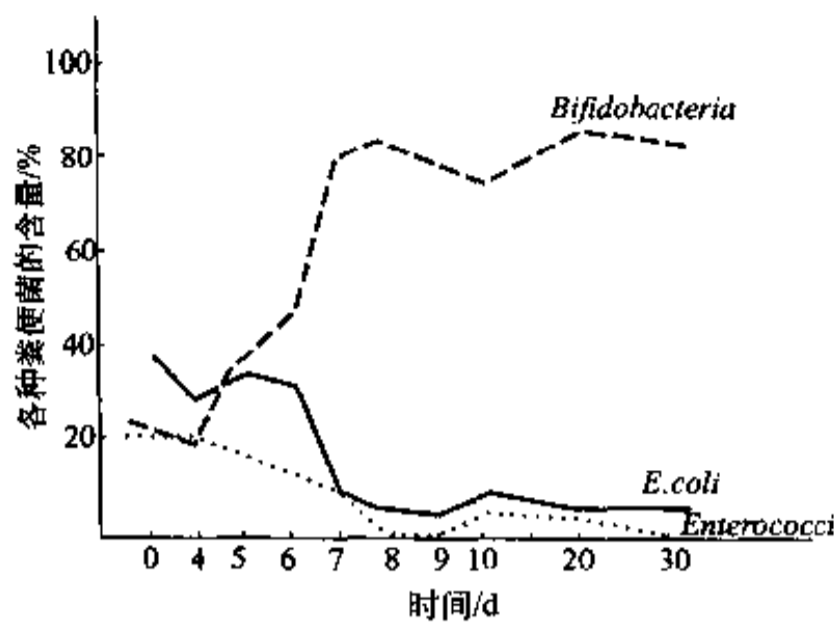


图 4-12 母乳喂养新生儿粪便菌群随时间的变化

Clostridia 组成，在母乳喂养的婴儿粪便中在 2~5 天出现 *Bifidobacterium*，且在 7 天内结肠建立相对稳定的微生物菌群。在第一周末，*Bifidobacterium* 变为粪便优势菌，它上升为占粪便微生物的 85%~99%，其他菌则迅速减少（见图 4-12），Coliforms、乳杆菌和 *Enterococci* 仅占粪便的 1% 左右。*Bacteroides*、*Clostridia* 和其他腐败菌迅速减少甚至消失，粪便的 pH 由 5.0 变为 5.5。在早产儿中 *Bifidobacterium* 较足月儿中繁殖缓慢，它在 15 天以后才变为其粪便的优势菌，为 $10^9 \sim 10^{11}$ cfu/g。

婴儿断奶引起粪便中菌群的逐渐变化，*Bifidobacterium* 的数量常下降 1 个对数单位，*Bacteroides*、*Peptostreptococci*、*Enbacteria*、*Fusobacteria* 大大增加。pH 也增加。食用代乳品的婴儿粪便中 *Bifidobacterium* 的量也下降 1~2 对数单位。

双歧杆菌的不同表现型在不同年龄组人体中的分布情况如表 4-22 所示。

表 4-22 *Bifidobacterium* 的不同表现型在人体中的分布

大肠部分	主要的 <i>Bifidobacteria</i>
母乳喂养婴儿	<i>B. infantis</i> 或 <i>B. breve</i>
母乳喂养和食用代乳品婴儿	<i>B. adolescentis</i> 和 <i>B. longum</i>
婴儿	<i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> 表现型 b, <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
成人	<i>B. adolescentis</i> 表现型 a-b, <i>B. longum</i>
老人	<i>B. adolescentis</i> 表现型 b, <i>B. longum</i>

(二) 双歧杆菌对胆汁酸和胃酸的耐受性

胆汁酸在肝中由胆固醇合成，包括胆酸和鹅（脱氧）胆酸，这两种酸上附有氨基酸——甘氨酸和牛磺酸（3:1），它们通过脂肪球和胶体形成在肠道内的分散来改善消化。胆汁酸被储于胆囊中进入十二指肠对食物作出反应，最终约 80% 的胆汁盐在小肠被重新吸收，被回复到肝脏中，其他则到达结肠，被细菌作用分解。

Bifidobacteria 和 *Bacteroides* 对没有复合的胆汁盐和释放的胆汁酸及鹅（脱氧）胆汁酸被分别脱羟基化形成脱氧胆汁酸和石胆酸，脱氧胆汁酸的大部分和全部石胆酸经粪便被排泄，脱氧胆汁酸的小部分在结肠被再吸收回复到肝脏中。粪便中胆汁酸量受膳食中脂肪量的影响。脂肪酸可增加粪便中胆汁酸的量，最终增加了对双歧杆菌的抑制作用。膳食性质也间接影响肠道双歧杆菌的活力，进而影响生理情况。

胃酸对于口服双歧制品菌是重要的，胃液中由于存在游离盐酸故有杀菌作用，在 pH < 4.0 时，*Bifidobacteria* 的 99.9% 在 30min 内可被杀死，正常情况下胃中呈无菌状态或含 < 10³ cfu/ml 的微生物。耐酸性微生物如乳杆菌、酵母和 *Bifidobacteria* 可在胃液中一定程度地存活而到达小肠，若口服大量 *Bifidobacteria*，可能会增加它们的存活量。不同的 *Bifidobacteria* 在耐酸性方面亦有不同。由于易消化的发酵乳通过胃过渡时间较普通食品短，故口服的双歧杆菌可在粪便中出现相同的菌株。

三、耐酸、抗胆汁 *Bifidobacteria* 的筛选

Bifidobacteria 的耐酸、耐胆汁性质是其能否成为人体应用益生菌的前提；如其具有耐胃酸、抗胆汁的特性，这就意味着它能够通过口服的方法以活体细胞的形式达到肠道，若其在肠道中能够定殖就会产生益生作用。Berrada 等 (1991)、Clark 等 (1993, 1994)、Ibrahim 等 (1993) 和 Chung 等 (1999) 分别研究不同 *Bifidobacteria* 菌株的抗酸、胆汁能力，并建立了一套较完善筛选耐酸、胆汁 *Bifidobacteria* 的方法。

Chung 等分别对 *Bifidobacterium*HJ31、SI31 和 *B. adolescentis* 进行了耐酸、胆汁的实验，对耐酸性菌株 HJ31、SI31 和 *Bifidobacterium*IN33、JS34 和 SH35 及 *B. adolescentis* ATCC15703 两个商业菌株进行了对比，其结果如表 4-23、表 4-24 所示。研究表明菌株 HJ31、SI31 彼此间糖发酵和糖酵解酶的类型相似，但和参照菌间这两方面的性质均有不同。表 4-25 是三种浓度胆汁存在情况下 *Bifidobacterium* 细胞的生长情况，在无胆汁酸情况下对于所有菌株 48h 期间的生长是类似的，在 0.15%胆汁酸存在情况下细胞生长的情况各菌株间明显不同，48h 发酵以后 HJ30 和 SI31 表现出强于其他菌株的生长能力。*Bifidobacterium* 在 0.5%和 1%胆汁酸中 12h 后存活率是十分相似的，SI31 和 HJ30 对胆汁盐有最高的耐受性。

表 4-23 抗酸、胆汁 *Bifidobacterium*HJ30 和 SI31 的酶模型

测试菌	应用底物	菌株		
		HJ30	SI31	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703
α -Glucosidase	PNP α -D-glucopyranoside	+	-	+
β -Glucosidase	PNP β -D-glucopyranoside	+	+	+
α -Galactosidase	PNP α -D-galactopyranoside	+	+	+
β -Galactosidase	PNP β -D-galactopyranoside	+	+	+
β -Xylosidase	PNP β -D-xylopyranoside	+	-	+
α -Arabinofuranosidase	PNP α -D-arabinofuranoside	+	+	+
α -Fucosidase	PNP α -D-fucopyranoside	-	-	-
β -Glucuronidase	PNP β -D-glucuronide	-	-	-
β -Rhamnosidase	PNP α -D-rhamnopyranoside	-	-	-
N-Acetyl- β -glucosaminidase	PNPN-acetyl- β -D-glucosaminide	-	-	-

表 4-24 抗酸、胆汁 *Bifidobacterium* 菌的特征

特征	菌株			特征	菌株		
	HJ30	SI31	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703		HJ30	SI31	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703
芽孢形成	-	-	-	乳糖	+	+	+
革兰氏反应	+	+	+	麦芽糖	+	+	+
形态	棒状, 双歧形式	棒状, 双歧形式	棒状, 双歧形式	甘露醇	-	-	-
厌氧生长	-	-	-	甘露糖	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	松三糖	-	-	-
F6PPK	+	+	+	蜜二糖	+	+	+
过氧化物酶	-	-	-	棉子糖	+	+	+
运动生长	-	-	-	鼠李糖	-	-	-
产乳酸和乙酸	+	+	+	核糖	+	+	+
发酵				水杨苷	+	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	+	山梨醇	-	-	-
葡萄糖苷	-	-	-	淀粉	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	蔗糖	+	+	+
果糖	+	+	+	海藻糖	-	-	-
半乳糖	+	+	+	木糖	+	+	+
葡萄糖	+	+	+				

表 4-25 不同胆汁酸浓度下 *Bifidobacterium* 的生长

浓度/(% W/V)	时间/h	HJ30	SI31	BL2	BI420	IN33	JS34	SH35	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703
0.0	12	1.25±0.03	1.37±0.19	1.27±0.06	1.19±0.07	1.33±0.17	1.25±0.09	0.95±0.06	1.13±0.15
	24	1.47±0.05	1.48±0.08	1.43±0.08	1.40±0.06	1.50±0.07	1.49±0.07	1.33±0.05	1.23±0.05
	36	1.43±0.09	1.43±0.09	1.57±0.09	1.50±0.08	1.53±0.01	1.48±0.05	1.50±0.09	1.50±0.03
	48	1.47±0.05	1.43±0.09	1.50±0.14	1.48±0.05	1.50±0.03	1.45±0.06	1.50±0.06	1.50±0.10
0.06	12	0.88±0.12	0.70±0.06	0.12±0.06	0.08±0.04	0.05±0.02	0.14±0.05	0.07±0.06	0.06±0.04
	24	1.07±0.05	0.98±0.02	0.13±0.05	0.10±0.08	0.23±0.05	0.72±0.05	0.04±0.05	0.26±0.05
	36	1.12±0.02	0.97±0.05	0.14±0.05	0.12±0.05	0.32±0.03	0.84±0.05	0.07±0.04	0.57±0.15
	48	1.23±0.05	1.08±0.06	0.18±0.05	0.14±0.06	0.43±0.04	0.70±0.05	0.15±0.06	0.72±0.19
0.15	12	0.60±0.14	0.40±0.01	0.04±0.04	0.05±0.03	0.07±0.02	0.07±0.03	0.07±0.03	0.03±0.02
	24	0.68±0.09	0.60±0.03	0.08±0.02	0.07±0.03	0.10±0.02	0.05±0.01	0.08±0.02	0.08±0.02
	36	0.67±0.03	0.59±0.08	0.07±0.05	0.07±0.04	0.08±0.04	0.04±0.05	0.13±0.02	0.11±0.03
	48	0.70±0.07	0.69±0.07	0.05±0.01	0.06±0.04	0.06±0.05	0.06±0.01	0.11±0.02	0.09±0.02

Chung 等 (1999) 也研究了 MRS 介质中不同 pH 时 (4.0、5.0 和 7.0) *Bifidobacterium* 的生长情况, 在 pH=5.0、pH=7.0 对于不同菌株细胞生长情况具有可比较性, pH=4.0 时所有菌株均不能生长。图 4-13 是 pH2 和 pH3 情况下菌暴露 2h 后的存活率, pH=2.0 时活性细胞的下降速度高于 pH=3.0, SI31 和 HJ30 表现出最高的存活率, 在 pH=2 下 1h 后它们分别下降 100 倍和 1000 倍, pH=3.0 时 2h 后 SI31 和 HJ30 仅有 10 倍的下降。图 4-14 是发酵乳中 *Bifidobacterium* 活性细胞的变化情况, 所有菌株培养 24h 以后生长情况是类似的, 但细胞的死亡速度是不同的, 抗性菌株 SI31 在 72h 培养后细胞死亡最少, 它产生发酵脱脂乳的凝乳, 72h 达到 pH=4.1。

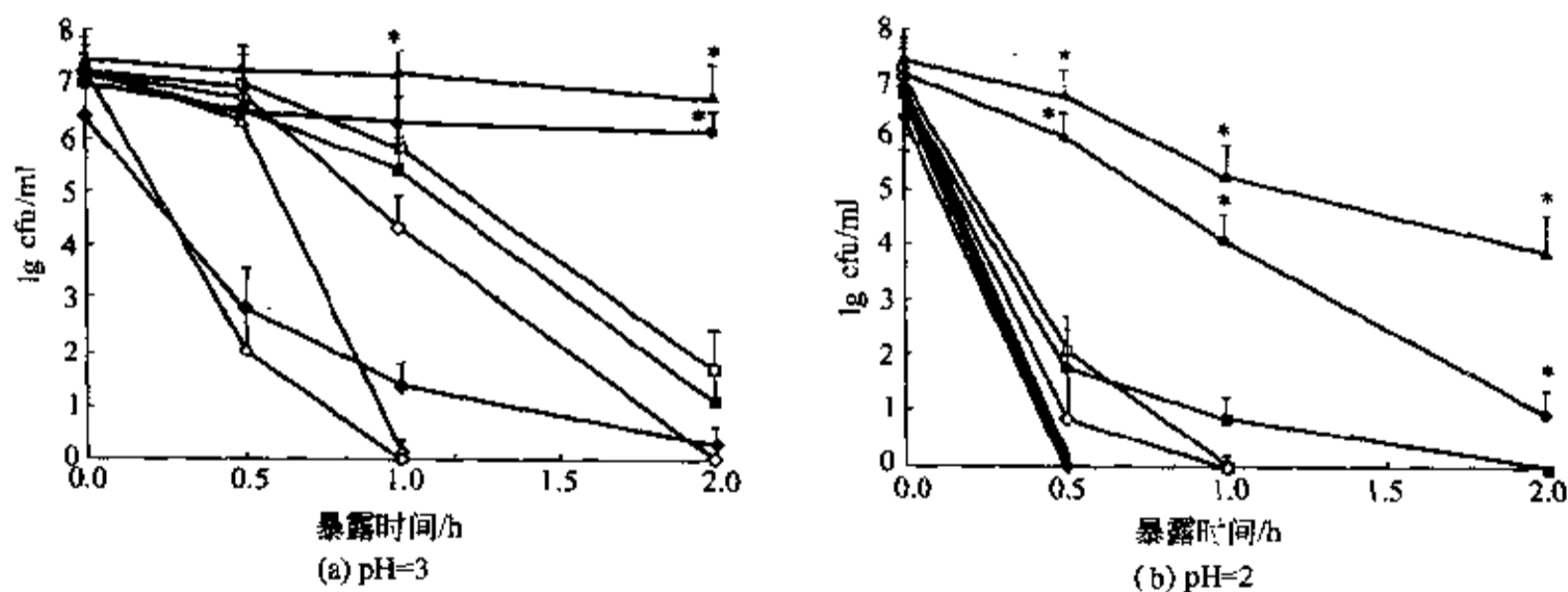


图 4-13 抗酸、胆汁 *Bifidobacterium* 在 pH3.0 (a) 和 pH2.0 (b) 情况下的存活 (标记同上图)

—●— HJ 30; —▲— SI 31; —□— BL 2; —△— IN 33; —◇— JS 34; —○— SH35;
—●— *B. adolescentis* ATCC15703; —■— BI420

益生菌欲在乳品工业上广泛应用, 耐酸、胆汁 *Bifidobacterium* 的筛选是十分重要的, 这有利于它在人肠道的定殖。Ibrahim 等 (1993) 报道 *B. infantis* 对胆汁有最强的耐受性, 次之为 *B. bifidum*、*B. breve* 和 *B. longum* (胆汁酸浓度 0~3g/L)。和他们的研究结果不同, Clark 等 (1994) 研究认为在 2.0%~4.0%胆汁中 *B. longum* 的抗性最强, 后依次为 *B. bifidum*、*B. infantis*, 这种相反的结果可能反映了菌种对胆汁耐受的专一性。

总之抗酸、胆汁菌株 HJ30 和 SI31 是 *Bifidobacterium* 在低 pH 和高胆汁浓度时的耐受性菌株, 这种方法可用于抗酸、胆汁菌株的筛选, 并为实际的工业应用提供了技术上的保证和可能。

四、益生菌的蛋白水解活性

由于蛋白水解活性的缺乏, 许多益生菌如 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacteria* 在乳中的生长速度较慢, 通常的做法是添加酸奶菌种 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 以减少发酵时间, *L. bulgaricus* 由于它的蛋白水解能力能产生许多必需氨基酸, 故在 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 间建立起很好的共生关系, 后者为前者的生长产生了其必需的氨基酸。乳酸菌的生长需要像肽和氨基酸等必需生长因子, 但乳中不含有足够量的游离氨基酸和肽来供给乳酸菌生长; 由于乳酸菌具有复杂的蛋白酶和肽酶体系, 它可以应用乳中酪蛋白作为氨基酸源和氮源。酪蛋白首先通过蛋白酶水解为寡肽, 再通过肽酶进一步水解为能通过细胞壁而被乳酸菌利用的小肽和氨基酸。

从酸奶的发酵菌种 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B14 和 *S. thermophilus* CNRZ160 中分离纯化得到几种肽链内切酶, 氨基酸肽酶在发酵乳制品被认为对风味产生至关重要的作用, 这是由于它能够通过细胞外蛋白酶水解寡肽得到游离氨基酸, 从 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 中分离得到了具有广谱性的金属离子依赖性氨基酸肽酶。*Bifidobacterium* 含有氨基酸肽酶活性, 这包括二肽酶、三肽酶和亚氨基酸酶等, 从 *B. breve* 的无细胞提取物中分离得到了氨基酸肽酶和亚氨基酸肽酶, *B. infantis*、*B. longum* 和 *B. adolescentis* 具有氨基酸肽酶、二肽酶、三肽酶和羧基肽酶的活性。

Shihata 等 (2000) 详细研究了酸奶和益生菌的蛋白酶情况。酸奶中的 *L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 蛋白水解活性如图 4-15 所示, 12 株 *L. acidophilus* 和 3 株 *Bifidobacterium* 的蛋白水解活性如图 4-16 所示。研究表明蛋白的水解程度呈菌株专一性, *S. thermophilus*、*L. bulgaricus* 和 *L. acidophilus* 具有比 *Bifidobacterium* 高的蛋白酶水解活性, Klaver 等 (1993) 的研究结果也证实了这一点。他们测试菌株中有 3 株 *S. thermophilus*、1 株 *L. bulgaricus*、2 株 *L. acidophilus* 和 10 株 *Bifidobacterium* 不具有蛋白酶活性, 故在图中未表示出来。在所有测试菌中 *S. thermophilus* 具有最高的游离氨基酸释放能力 (52.6 u mol/L), 其余 3 株 T-1、T-4 和 Y-1 不具蛋白酶活性, 在所有 *L. bulgaricus* 菌株中 *L. bulgaricus* 2515 具有最高的游离氨基酸水解活性 (25 u mol/L), 菌株间蛋白酶的水解活性存在着较大差异。在乳酸菌中 *L. acidophilus* 一般较 *Bifidobacterium* 具有更强的蛋白水解活性, 在 *Bifidobacteria* 中 *B. thermophilus* 20210 能释放少量的游离氨基酸 (30 u mol/L); 其余菌株不释放任何的游离氨基酸, 这些菌株被归为无蛋白水解活性类, 这也是 *Bifidobacteria* 在乳中生长缓慢的原因之一。一般认为 *Bifidobacteria* 在培养的早期要利用游离氨基酸, 在后期可直接利用肽, 故在培养物中添加酪蛋白水解物, 即含有肽和氨基酸的物质将有利于 *Bifidobacterium* 的生长。

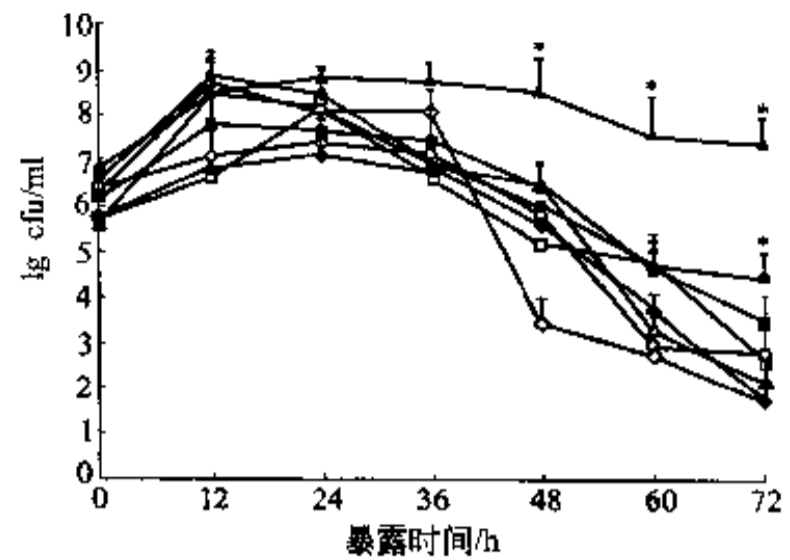


图 4-14 发酵乳中 *Bifidobacterium* 细胞的生长情况变化

—●— HJ30; —▲— SI31; —□— BI2;
—△— IN33; —◇— JS34; —○— SH35;
—◆— *B. adolescentis* ATCC15703; —■— B1420

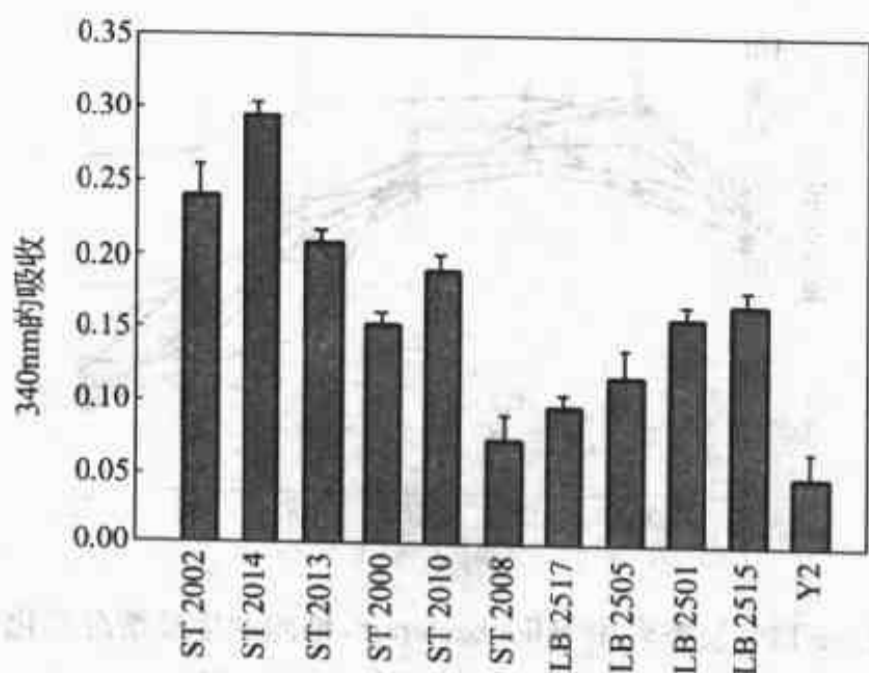


图 4-15 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 的蛋白酶活性

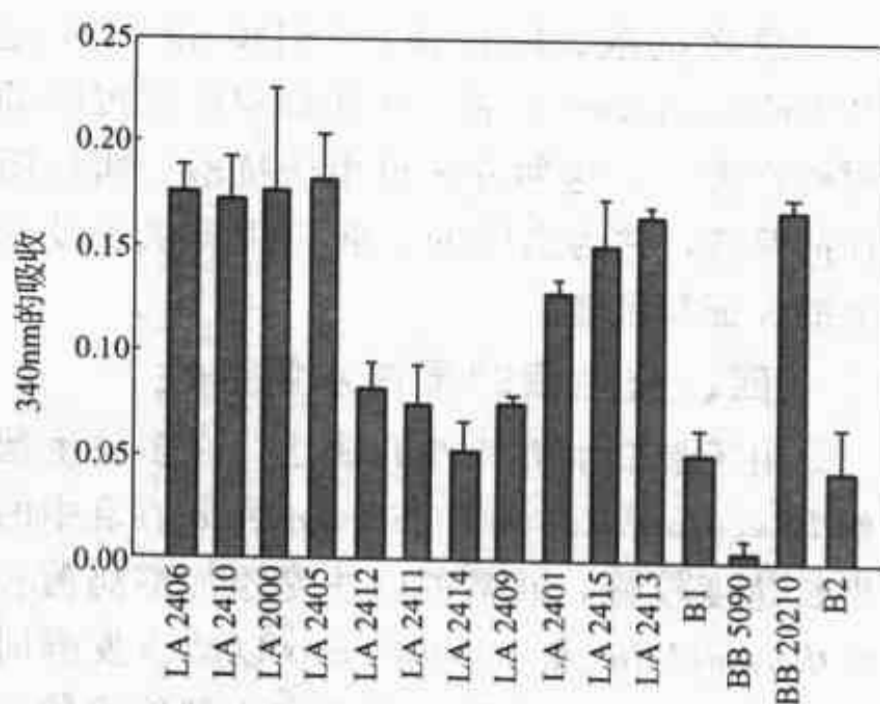


图 4-16 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacteria* 的蛋白酶活性

Shihata 等 (2000) 进一步研究了乳酸菌中各类蛋白酶的活性。对氨基酸肽酶的活性研究表明 (表 4-26): 在所有菌株包括 *S. thermophilus*、*L. bulgaricus*、*Bifidobacterium*、*L. acidophilus* 均有氨基酸肽酶活性, 胞内酶和胞外酶均存在。*L. bulgaricus* 含有最高量的胞内氨基酸肽酶, *Bifidobacteria* 次之, *S. thermophilus*、*L. acidophilus*、*S. thermophilus* 2515 不能水解底物 L-精氨酸钠。胞外氨基酸肽酶的水平 *L. bulgaricus* 2515 较 *L. bulgaricus* Y-2 菌株高, 但对胞内酶而言情况恰恰相反。*L. acidophilus* 胞内氨基酸肽酶活性高于胞外, 有趣的是 *L. acidophilus* 2405 胞外酶较胞内酶表现出更大的 L-精氨酸钠底物的专一性。*Bifidobacterium* 具有高的胞内蛋白酶活性, 但蛋白水解活性较低。*B. thermophilum* 20210 在胞内、胞外酶的活性方面均高于商业分离的 *Bifidobacterium* B-2 菌株。

表 4-26 四类菌的蛋白肽酶活性

菌 株	底 物				
	Ala-Met	Leu-Tyr	Pro-Ile	Leu-Gly	Ala-His
<i>L. thermophilus</i> 2014					
E ₁	1100 ± 6.41	992.73 ± 6.88	948.48 ± 13.21	7.86 ± 0.73	576.00 ± 11.56
E ₂	94.22 ± 1.63	120.44 ± 9.77	14.81 ± 0.53	3.94 ± 0.29	11.79 ± 0.78
<i>S. thermophilus</i> BT-1					
E ₁	28.40 ± 1.90	26.93 ± 1.68	61.93 ± 2.99	17.02 ± 1.02	13.83 ± 2.24
E ₂	60.00 ± 3.13	56.90 ± 3.25	10.97 ± 0.99	13.83 ± 2.24	33.95 ± 0.63
<i>S. thermophilus</i> BT-4					
E ₁	30.73 ± 1.85	35.90 ± 0.46	86.53 ± 0.83	18.84 ± 0.55	22.89 ± 0.97
E ₂	91.77 ± 5.03	97.10 ± 4.83	13.10 ± 0.20	22.89 ± 0.97	37.78 ± 2.74
<i>S. thermophilus</i> BY-1					
E ₁	20.57 ± 0.23	30.23 ± 1.98	47.57 ± 4.42	15.97 ± 0.76	11.25 ± 0.44
E ₂	24.20 ± 1.84	59.90 ± 0.55	5.37 ± 0.52	11.25 ± 0.44	12.34 ± 0.16
<i>L. bulgaricus</i> 2515					
E ₁	173.73 ± 5.59	154.27 ± 8.75	182.40 ± 5.31	1.40 ± 0.09	97.72 ± 2.23
E ₂	1270.48 ± 8.66	884.76 ± 11.38	135.71 ± 1.65	2.43 ± 0.09	438.29 ± 0.41
<i>L. bulgaricus</i> ABY-1					
E ₁	8.96 ± 0.42	8.57 ± 1.24	8.99 ± 0.96	6.49 ± 0.55	58.46 ± 0.99
E ₂	9.30 ± 0.43	8.88 ± 0.81	38.06 ± 0.88	38.06 ± 0.88	63.97 ± 1.70

续表

菌 株	底 物				
	Ala-Met	Leu-Tyr	Pro-Ile	Leu-Gly	Ala-His
<i>L. acidophilus</i> 2405					
E ₁	46.37±1.82	43.63±1.50	49.80±0.98	0.46±0.03	30.05±0.95
E ₂	126.67±8.24	105.76±2.81	22.88±0.66	0.82±0.03	106.11±1.19
<i>L. acidophilus</i> ABT-1					
F ₁	18.57±1.40	17.33±1.43	39.30±0.46	7.60±0.33	23.58±1.00
E ₂	36.83±7.53	84.73±0.32	15.27±1.57	23.58±1.00	26.19±1.09
<i>Bifidobacterium</i> SPP. 20210					
E ₁	41.10±10.11	40.59±0.91	37.95±3.25	0.48±0.04	20.60±1.96
E ₂	1304.00±8.33	1074.00±9.45	90.00±4.16	2.67±0.14	141.20±6.80
<i>Bifidobacterium</i> SPP. ABT-1					
E ₁	12.57±0.09	11.67±0.52	25.63±0.23	5.08±0.27	13.04±0.31
E ₂	28.40±2.20	37.73±3.93	9.87±0.53	13.04±0.31	12.79±0.30

对于二肽酶而言, *S. thermophilus* 2014 对于 5 个底物均有较高的胞外二肽酶活性, 其他菌株对底物表现出不同的专一性。 *L. bulgaricus* 和 Y-2 比较除对底物 Leu-Gly 外均有较高的二肽酶活性, 乳杆菌在 5 个底物的 4 个中表现出较高的胞内酶活性。 Leu-Glu 被 *S. thermophilus* T-4 的胞外酶水解, 而 *L. bulgaricus* 则相反以胞内酶水解底物的程度为高。 *B. thermophilum* 20210 对相同底物以胞内酶表现出最高的活性。 *L. acidophilus* 2405 和商业菌株 *L. acidophilus* 比较时具有相似的活性。

所有的菌株均能水解大的生物活性肽, 表明这些菌株存在肽内切酶, 所有菌株的胞外和胞内酶均具有这种活性。对三肽底物也有类似的水解效果, 但对于具有苯丙氨酸 C 端的底物 Gly-Leu-Phe、Gly-Gly-Phe 水解仅发生在胞内酶的情况, 这表明所有菌株中均存在着三肽酶 (见表 4-27)。

表 4-27 菌的三肽酶和肽内切酶活性

底 物	水 解		底 物	水 解	
	CWE	IE		CWE	IE
三肽			内切肽		
Glu-Ala-Tyr	+	+	Aradykinin	+	+
Glu-Leu-Phe	-	+	Ala-Ala-Ala-Ala-Ala	+	+
Glu-Gly-Phe	-	+			

综上所述可以看出酸奶菌株 *S. thermophilus*、*L. bulgaricus* 和其他益生菌比较有更高的蛋白水解活性, 它们释放更高量的游离氨基酸, 即具有较高的氨基酸肽酶和二肽酶活性。因此酸奶菌株能在乳中更好地生长; 益生菌的生长相对缓慢 (由于蛋白的水解能力差), 为了益生菌的较好生长, 外源性肽和氨基酸的强化是必须的, 尤其是在和酸奶菌种 *L. bulgaricus*、*S. thermophilus* 一起发酵时, 这种强化更显必要。

五、微胶囊对益生菌的保护作用

在消费产品中保持一定量的活性益生菌, 对于它们发挥益生作用是至关重要的, IDF 推荐益生菌产品的最小的活菌限量为 10^7 cfu/g, 但大量研究表明乳制品中这些菌的量很难达到这一值。为此人们通过添加菌的生长刺激因子, 用乳清蛋白混合物对酸奶体系缓冲, 改善包装等方法均未达到良好的效果; Sultana 等 (2000) 应用微胶囊技术包埋益生菌的方法, 为改善益生菌的存活提供了新方法, 并获得到了良好的效果。

玉米 (Hi-Maize) 淀粉用于益生菌的微胶囊化, 它以 2% 浓度添加于海藻酸钙中使得益生菌回收率的上升 (每 100ml 海藻酸钙), *Lactobacillus casei* 得到较高的回收率, 由 0 淀粉 4×10^8 cfu/g 变为 2% 淀粉 3.1×10^{11} cfu/g; 但继续增加淀粉浓度至 4% 则无助于益生菌回收率的再提高 (表 4-28)。在有无淀粉的情况下, Sultana 等 (2000) 研究了 -20°C 时甘油对益生菌存活情况的影响。在胶囊化情况相同时, 冷冻前后菌的变化情况如表 4-29 所示。早期已有文献报道了脱脂乳、甘油和核糖醇对菌的保护, Sultana 等研究发现在胶囊化前甘油添加于海藻酸盐混合物较单独用海藻酸盐或海藻酸盐淀粉混合物胶囊化, 可增加菌的存活 100 倍以上。

表 4-28 不同浓度淀粉对 *L. casei* 回收率的影响

淀粉重量百分比	100ml 海藻酸盐中胶囊的克数	cfu/g 湿胶囊
0	38 ± 2.0	$4.0 \pm 2.6 \times 10^8$
1	54 ± 3.6	$9.1 \pm 3.0 \times 10^{11}$
2	60 ± 2.6	$4.5 \pm 3.1 \times 10^{11}$
4	52 ± 4.0	$2.9 \pm 1.5 \times 10^9$

表 4-29 甘油和淀粉对 -20°C 冷冻海藻酸盐胶囊化 *L. casei* 菌存活的影响

胶囊情况	cfu/g	
	预冷冻	后冷冻
2% 海藻酸钠	$1.2 \pm 2.0 \times 10^8$	$1.6 \pm 2.0 \times 10^6$
2% 海藻酸钠 + 2% 淀粉	$1.0 \pm 3.5 \times 10^{10}$	$4.0 \pm 2.6 \times 10^6$
2% 海藻酸钠 + 2% 淀粉 + 15% 甘油	$1.2 \pm 4.7 \times 10^{12}$	$2.0 \pm 2.0 \times 10^8$
2% 海藻酸钠 + 2% 淀粉 + 20% 甘油	$2.3 \pm 3.6 \times 10^{12}$	$4.0 \pm 3.0 \times 10^{10}$
2% 海藻酸钠 + 2% 淀粉 + 30% 甘油	$2.5 \pm 4.3 \times 10^{12}$	$31.4 \pm 2.8 \times 10^{12}$

对胶囊化和非胶囊化益生菌进行的酸化动力学实验表明: 对于起始接种物 ($\geq 10^7$ cfu/ml), 经 48h 培养后菌数 $\geq 10^{11}$ cfu/ml (见图 4-17)。对酸化速率而言胶囊化产品

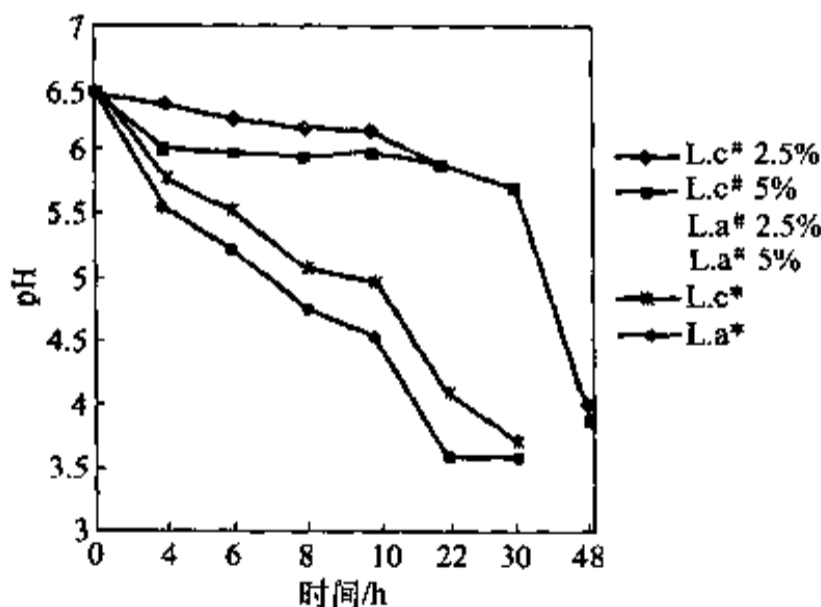


图 4-17 菌的酸化动力学

#—胶囊化菌; *—非胶囊化菌

要慢于非胶囊化产品, 即到达相同 pH 胶囊化产品要花更长的时间, 如 pH 到达 5 非胶囊化产品仅需 6h, 而胶囊化产品则需 30h, 这是由于胶囊化外壳使营养素的吸收和代谢物的释放均放慢了。Larisch 等 (1994) 也发现类似的结果, 他们发现海藻酸盐/聚-L-赖氨酸胶囊化细胞, 欲用 Lactococci 发酵使乳 pH 下降至 5.5 花费的时间较非胶囊化 Lactococci 要长 17%。这说明胶囊化影响了物质的传递速度和菌的活性。

对胶囊化菌的耐酸、胆汁实验表明 (见表 4-30、表 4-31): 酸性环境中 *L. acidophilus* 在 NGYC pH=4 和 pH=3 情况下有类似的下降。在 pH=4 和 pH=3 培养 3h 约下降 2 个对数周期, pH=2 时则有 5 个对数周期的下降。*B. infantis* 在 pH=2 培养 3h 后下降 3 个对数

周期, 在 $\text{pH} = 4$ 和 $\text{pH} = 2$ 情况下仅有很少的菌数下降。这说明 *L. acidophilus* 较 *B. infantis* 对酸敏感, 在低 pH 情况下无胶囊化菌也有类似的菌数下降情况, 即说明胶囊化不能在高酸度的情况下有效地保护菌。*L. acidophilus*、*B. infantis* 和 *L. casei* 在 1% 和 2% 胆汁中存活实验表明: 三菌均有类似的活菌下降现象, 和起始比 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 有 2 个对数周期的活菌下降, *B. infantis* 活菌下降极微。

用 *L. acidophilus*2401、*B. infantis*1912 和商业化 *S. thermophilus* 作为发酵剂, 对非胶囊化菌发酵, 分别胶囊化后合并菌发酵及将三株菌共同胶囊化后发酵, 菌在 8 周贮存菌数变化如表 4-32 所示。8 周贮存后 *L. acidophilus* 和 *B. infantis* 非胶囊化菌下降 1 个对数周期(分别胶囊化), 共同胶囊化菌 *B. infantis* 和 *L. acidophilus* 也有一个对数周期的下降。淀粉和甘油添加于海藻酸盐中对菌保护有利影响。

表 4-30 胶囊化 *L. acidophilus*2409 (cfu/ml)、*B. infantis*1912 (cfu/ml) 于低 pH 介质中 3h 后的存活情况

pH	培养时间(h)			
	0	1	2	3
<i>L. acidophilus</i> 2409(cfu/ml)				
2.0	$3.8 \pm 3.0 \times 10^{11}$	$5.3 \pm 5.0 \times 10^{11}$	$6.0 \pm 2.0 \times 10^{11}$	$3.2 \pm 4.0 \times 10^6$
3.0	$4.3 \pm 2.5 \times 10^{12}$	$5.0 \pm 3.0 \times 10^{12}$	$1.2 \pm 2.0 \times 10^{10}$	$1.5 \pm 2.0 \times 10^{10}$
4.0	$1.0 \pm 2.0 \times 10^{12}$	$5.2 \pm 4.3 \times 10^{12}$	$2.4 \pm 5.0 \times 10^{12}$	$2.5 \pm 4.0 \times 10^{10}$
<i>B. infantis</i> 1912(cfu/ml)				
2.0	$3.6 \pm 1.3 \times 10^{11}$	$1.1 \pm 1.5 \times 10^{11}$	$7.1 \pm 1.0 \times 10^8$	$2.8 \pm 6.5 \times 10^8$
3.0	$4.4 \pm 4.2 \times 10^{11}$	$5.5 \pm 4.0 \times 10^{11}$	$2.3 \pm 4.0 \times 10^{11}$	$1.0 \pm 7.0 \times 10^{11}$
4.0	$4.0 \pm 2.0 \times 10^{11}$	$4.9 \pm 2.5 \times 10^{11}$	$4.0 \pm 11 \times 10^{11}$	$2.9 \pm 2.6 \times 10^{11}$

表 4-31 胶囊化 *L. acidophilus*2409、*B. infantis*1912 和 *L. casei*2603 (cfu/ml) 6h 于胆汁溶液中菌的存活

菌株	胆汁浓度(%)	培养时间(h)			
		0	2	4	6
<i>L. acidophilus</i> 2409	1	$3.4 \pm 2.6 \times 10^7$	$3.4 \pm 5.1 \times 10^7$	$1.7 \pm 1.5 \times 10^6$	$1.1 \pm 2.0 \times 10^6$
	2	$3.5 \pm 6.1 \times 10^7$	$1.2 \pm 3.6 \times 10^7$	$5.1 \pm 5.3 \times 10^6$	$9.0 \pm 5.6 \times 10^5$
<i>B. infantis</i> 1912	1	$3.5 \pm 3.7 \times 10^6$	$3.1 \pm 2.6 \times 10^6$	$1.5 \pm 4.0 \times 10^6$	$2.3 \pm 2.9 \times 10^6$
	2	$2.0 \pm 3.2 \times 10^6$	$7.2 \pm 2.3 \times 10^6$	$1.4 \pm 1.5 \times 10^6$	$1.6 \pm 3.0 \times 10^6$
<i>L. casei</i> 2603	1	$1.7 \pm 8.1 \times 10^{10}$	$1.8 \pm 3.6 \times 10^{10}$	$1.7 \pm 2.6 \times 10^{10}$	$6.8 \pm 5.5 \times 10^9$
	2	$9.2 \pm 11.7 \times 10^9$	$4.8 \pm 5.0 \times 10^{10}$	$1.1 \pm 1.0 \times 10^{10}$	$3.2 \pm 2.0 \times 10^7$

表 4-32 在胶囊化和非胶囊化情况下 *L. acidophilus*2401 和 *B. infantis* 1912 生产酸奶菌的存活情况

不同状态的益生菌	贮存期(周)				
	0	2	4	6	8
游离 A	$4.1 \pm 2.1 \times 10^7$	$1.9 \pm 0.5 \times 10^7$	$7.4 \pm 0.5 \times 10^6$	$1.3 \pm 0.3 \times 10^6$	$2.7 \pm 0.6 \times 10^6$
游离 B	$4.9 \pm 0.9 \times 10^7$	$3.7 \pm 1.0 \times 10^7$	$7.2 \pm 0.4 \times 10^8$	$6.0 \pm 0.5 \times 10^8$	$5.9 \pm 2.4 \times 10^8$
胶囊 A	$1.2 \pm 0.1 \times 10^6$	$1.2 \pm 0.4 \times 10^6$	$3.2 \pm 0.8 \times 10^5$	$5.2 \pm 0.2 \times 10^5$	$4.8 \pm 3.7 \times 10^5$
胶囊 B	$1.4 \pm 0.6 \times 10^6$	$1.1 \pm 0.6 \times 10^6$	$2.1 \pm 1.9 \times 10^5$	$1.2 \pm 1.0 \times 10^6$	$3.9 \pm 1.9 \times 10^5$
非胶囊 A	$1.1 \pm 0.9 \times 10^7$	$5.4 \pm 2.4 \times 10^6$	$7.0 \pm 3.2 \times 10^6$	$1.7 \pm 0.5 \times 10^6$	$1.2 \pm 1.2 \times 10^6$
非胶囊 B	$1.4 \pm 1.0 \times 10^7$	$3.2 \pm 0.5 \times 10^7$	$1.0 \pm 0.8 \times 10^7$	$4.1 \pm 2.7 \times 10^6$	$1.1 \pm 1.1 \times 10^6$

六、喷雾干燥对 *Bifidobacteria* 存活的影响

喷雾干燥方法是生产干燥、稳定、小体积食品的常用方法, 它也常用于微生物的浓缩和

保存,近年来有许多报道用喷雾干燥方法制备发酵产品应用的发酵剂。但由于喷雾干燥过程中加热和脱水会对微生物产生破坏作用,因此在喷雾干燥中菌的存活情况值得特别关注。Lian等(2002)比较和研究了不同载体介质经喷雾干燥后菌的存活情况,同时他们也研究载体浓度、排风温度对菌存活的影响。

Liau等(2002)以来自婴儿的三株 *B. longum* 和二株 *B. infantis* 为实验对象,研究发现:菌的生长阶段影响菌的抗热性,在静态生长期菌对热最敏感。Hurst等(1974)和Teixeira等(1994)的研究均证实这一点。Teixeira的研究还表明 *L. bulgaricus* 在静态生长期喷雾干燥得到了较高数量的菌细胞,故Lian等(2002)对静态生长期菌进行测试,其结果如表4-33所示。细胞产量为0.62~0.84g/100ml MRSC肉汁,含 10^{11} cfu/g的活菌,水分含量74.6%~75.6%。表4-34是含有10%不同载体喷雾干燥 *Bifidobacteria* 的存活情况,进风和排风温度分别是100℃和50℃,对于同一载体而言经喷雾干燥后 *B. infantis* 较 *B. longum* 有更高的存活率,在所有菌株中 *B. longum* B6的存活率最高,这和是何种载体无关。经喷雾干燥后细胞数量减少主要是由于热失活,因此 *B. longum* B6的高存活率归因于它较其他菌株有更强的抗热性。在所有情况下喷雾干燥引起 *Bifidobacteria* 活体细胞的减少,测试情况下减少为1.0~2.0lg/g干重。无论菌株和载体如何,经喷雾干燥后的粉末中含有 10^9 ~ 10^{10} cfu/g干重的活菌,达到了益生菌应用产品的活菌数量。图4-18是喷雾干燥后获得粉末的扫描电镜(SEM)图,无论应用何种载体,颗粒呈球形且体积大小不同。这和Charpeutier等(1998)的结果相似,阿拉伯胶、明胶和可溶性淀粉微粒在球体表面产生影响,如被脱水一样。另一方面以脱脂乳为载体时,脱脂乳微粒的表面具有可见裂缝,这些裂缝使热的散失变的容易因而减少了热对菌的破坏,故以脱脂乳为载体的粉中 *Bifidobacteria* 较其他载体有更高存活率。

表 4-33 *Bifidobacteria* 细胞的重量、密度和水分含量

微生物	细胞浆(肉汁)/g/100-ml	细胞密度(cfu/g)	水分(%)
<i>B. infantis</i> CCRC 14633	0.82±0.02ab ¹	2.2±0.027×10 ¹¹	74.8±1.00
<i>B. infantis</i> CCRC 14661	0.79±0.01b	2.2±0.026×10 ¹¹	75.6±1.45
<i>B. longum</i> ATCC 15708	0.62±0.02d	1.9±0.071×10 ¹¹	75.0±1.47
<i>B. longum</i> CCRC 14634	0.84±0.01a	1.7±0.070×10 ¹¹	75.5±0.96
<i>B. longum</i> B6	0.69±0.02c	2.1±0.081×10 ¹¹	74.6±1.01

表 4-34 不同载体情况下喷雾干燥菌的存活情况

	存活率(%)			
	阿拉伯胶(10%)	明胶(10%)	可溶性淀粉(10%)	脱脂乳(10%)
<i>B. infantis</i> CCRC 14633	B2.15±0.37d	C1.30±0.15d	D0.92±0.07d	A15.99±0.23b
<i>B. infantis</i> CCRC 14661	A3.47±0.69d	B0.15±0.04e	C0.08±0.04e	—
<i>B. longum</i> ATCC 15708	B26.19±1.16c	A54.33±3.08b	C16.56±1.86b	—
<i>B. longum</i> CCRC 14634	B30.95±4.57b	A39.40±2.80c	C10.79±0.54c	—
<i>B. longum</i> B6	C41.16±0.29a	B63.74±4.56a	D29.06±0.91a	A82.59±0.52a

脱脂乳是蛋白、碳水化合物等的混合物,阿拉伯胶和可溶性淀粉是碳水化合物,明胶是变性蛋白质,除它们的化学特征不同外,它的热传导、热扩散等物理化学性质也不同,因此这些载体对微生物的保护作用不同,故导致喷雾干燥时菌的存活率不同。对于 *B. infantis* 而言阿拉伯胶效果最好,后依次为明胶和可溶性淀粉;而 *B. longum* 以明胶为载体存活率最高。当用脱脂乳为载体时 *B. infantis* CCRC 14633 和 *B. longum* B6 的存活率分别为16.0%

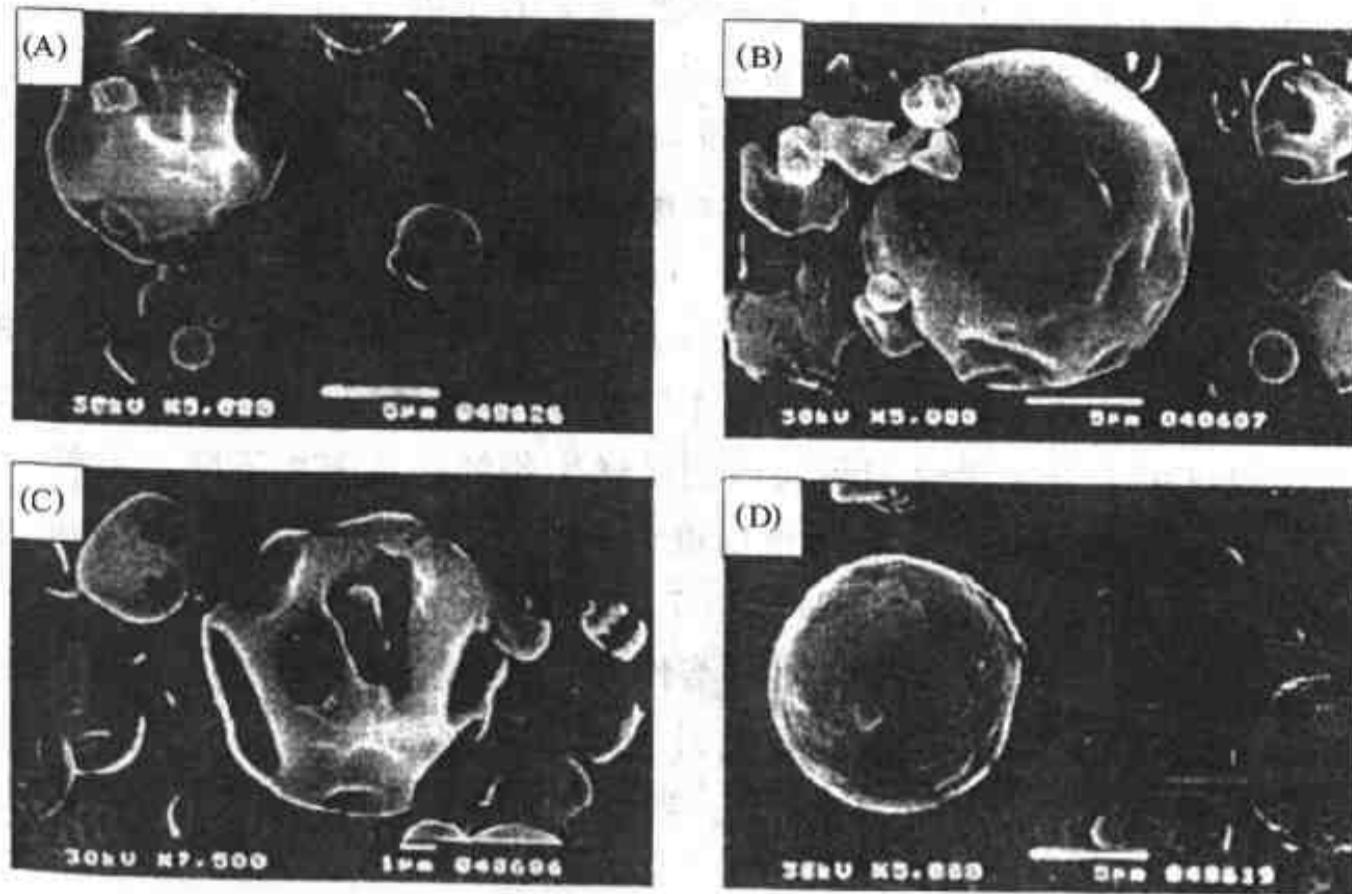


图 4-18 含 *B. longum* B6 喷雾干燥后 SEM 图

(A) 含 10%阿拉伯胶; (B) 明胶 (10%); (C) 可溶性淀粉 (10%); (D) 脱脂乳 (10%)

和 82.6%。这些结果表明 *Bifidobacteria* 的存活率呈载体和菌株依赖性。

Espina 等 (1979) 报道喷雾干燥后 *L. acidophilus* 的存活率用 25%脱脂乳较 40%脱脂乳高。Lian 等 (2002) 比较了载体浓度对 *B. longum* B6 和 *B. infantis* CCRC 14633 的影响, 用 10%阿拉伯胶或可溶性淀粉 *B. longum* B6 的存活率分别为 41.2%和 29.1%, 在不同的载体浓度中表现为最高值。随着阿拉伯胶或可溶性淀粉浓度升高 *B. longum* B6 的存活率下降。当明胶为载体时, 其浓度由 2%上升至 10%, *B. longum* B6 的存活率由 58.85%上升至 63.74%, 但浓度进一步上升, 引起 *B. longum* B6 活菌数的下降。类似的影响也发生在 *B. infantis* CCRC 14633 喷雾干燥的情况, 用 10%阿拉伯胶、可溶性淀粉和明胶, 表现出最高的菌存活率 2.15%、0.92%和 1.30% (见表 4-35)。

表 4-35 不同载体浓度喷雾干燥后 *Bifidobacteria* 的存活率

浓度/%	存活率/%			浓度/%	存活率/%		
	明胶	阿拉伯胶	可溶性淀粉		明胶	阿拉伯胶	可溶性淀粉
<i>B. longum</i> B6				<i>B. infantis</i> CCRC 14633			
2	58.85±0.05a	—	—	2	1.03±0.10a	—	—
10	63.74±4.56a	41.16±0.29a	29.06±0.91a	10	1.30±0.15a	2.15±0.37a	0.92±0.0524a
20	2.07±0.03b	6.51±0.13b	1.56±0.13b	20	0.52±0.04b	0.65±0.10b	0.09±0.0061b
30	—	3.16±0.51c	0.24±0.01c	30	—	0.04±0.01c	0.01±0.0001c

增加明胶、阿拉伯胶或可溶性淀粉含量由 10%至 20%或更多, 将减少干燥后测试微生物的存活率, 这和 Espina 等 (1979) 对 *L. acidophilus* 的实验结果是一致的。研究表明几种因素在喷雾干燥过程中对菌的存活起作用; ①随着喷雾干燥过程中微粒表面水分活性的下降, 湿球体温度上升, 可能达到了微生物的致死温度 (Elizondo 等 1974); 但也有报道在中等水分活度时微生物对热不敏感 (Karel, 1995); ②固形物含量愈高导致微粒的体积的增大, 这样的微粒比较小体积微粒造成更大的破坏, 包埋在大颗粒中的微生物也会遭受更大程度的热破坏。上述两个原因造成测试微生物存活率的下降。

在喷雾干燥过程中菌的热致死是菌活体细胞减少的主因 (To 和 Etzel 1997), 不同的研究者报道增加排风温度减少了喷雾干燥后微生物的存活。Espina 等 (1979) 用再制脱脂粉进行的 *L. acidophilus* 包埋实验表明: 随着排风温度上升菌的存活迅速下降, 在排风温度为 75°C 时 *L. acidophilus* 的活菌数由 7.0×10^8 cfu/g 固体下降为 2.6×10^7 cfu/g 固体, 80°C 和 85°C 则分别下降为 3.6×10^6 和 1.8×10^6 ; To 和 Etzel (1997) 由浓缩脱脂乳喷雾干燥 *B. linens*, 表明排风温度每上升 5°C, *B. linens* 的活体细菌数则下降 50%。表 4-36 是不同排风温度下 *Bifidobacteria* 的存活率情况, 表 4-37 则是不同排风温度下粉末颗粒和水分含量情况。随着排风温度的上升, 无论何种载体测试微生物的存活率均下降, 颗粒中的水分含量亦下降; 如用 10% 的明胶干燥, 随着排风温度由 50°C 上升至 60°C, *B. longum* B6 的存活百分比由 63.7% 下降至 8.20%, 水分含量则由 7.76% 下降为 5.72%。由温度上升引起存活率下降的幅度呈载体依赖性, 一般地当应用可溶性淀粉作载体时排风温度的影响最为明显, 如用 10% 可溶性作载体时排风温度由 50°C 上升至 55°C, *B. longum* B6 和 *B. infantis* CCRC 14633 的存活率分别下降了 90.8 和 30.7 倍。当用其他物质为载体时, 排风温度的上升引起相对较小的菌存活率下降。

表 4-36 应用不同载体喷雾干燥后排风温度对菌存活率影响

温度/°C	存活率/%			
	明胶(10%)	阿拉伯胶(10%)	脱脂乳(10%)	可溶性淀粉(10%)
<i>B. longum</i> B6				
50	B63.74±4.56a	C41.16±0.29a	A82.59±0.52a	D29.06±0.91a
55	C9.64±0.20b	B32.79±1.89b	A71.19±3.45b	D0.32±0.04b
60	C8.20±0.02b	B23.38±2.30c	A63.21±2.38c	D0.08±0.00c
<i>B. infantis</i> CCRC 14633				
50	C1.30±0.15a	B2.15±0.37a	A15.99±0.23a	D0.92±0.07a
55	C0.41±0.04b	B0.65±0.08b	A8.81±0.16c	D0.03±0.01b
60	C0.01±0.00c	B0.06±0.09c	A1.64±0.30c	C0.01±0.00c

表 4-37 喷雾干燥后不同载体排风温度对颗粒水分的影响

温度/°C	水分/%			
	明胶	阿拉伯胶	脱脂乳	可溶性淀粉
<i>B. longum</i> B6				
50	C7.76±0.09a	A10.20±0.23a	B8.93±0.06a	D6.41±0.03a
55	C6.13±0.04b	A9.99±0.17b	B7.63±0.57b	D5.03±0.05b
60	C5.72±0.07b	A8.64±0.35c	B6.93±0.26c	D4.22±0.03c
<i>B. infantis</i> CCRC 14633				
50	A9.96±0.03a	A10.31±0.26a	B8.70±0.14a	C7.91±0.07a
55	B8.54±0.06b	A9.97±0.13b	B7.91±0.59b	C6.24±0.04b
60	B7.72±0.07c	A8.61±0.36c	C6.99±0.21c	D5.91±0.08c

七、乳中 *Bifidobacteria* 和酶的贮存稳定性

对于 *Bifidobacteria* 的研究人们多关注肠道定殖、抗癌等生物活性, 而对其产酶改善人体乳糖不耐症情况的研究较小, Hughes 等 (1995) 通过对 *Bifidobacteria* 产 β -半乳糖苷酶性质研究, 以期将 *Bifidobacteria* 作为能改善人体乳糖不耐症的有益菌。

Hugles 等 (1995) 的研究表明: 在 MRSL 培养基中所有的 *Bifidobacteria* 菌株均能很好地生长 (见图 4-19)。当脱脂乳被用作培养介质时其生长模型发生很大变化 (见图 4-20), 在约 14h 以后其在脱脂乳中的生长达到其静态期, 这主要包括 *B. breve* 2258、*B. bifidum* 2715 和 *B. longum* 15707; *B. angulatum* 和 *L. acidophilus* 直至 24h 后才达到其生长的静态

期。和脱脂乳介质相比 MRSL 培养基对于 *B. breve* 2258、*B. bifidum* 2715 和 *B. longum* 15707 三株菌，在生长 8h 以后更能有效地增加菌生长密度，但对于 *B. angulatum* 和 *L. acidophilus* 两种介质间无明显差异，多年以来许多研究者认为在介质中添加氨基糖、牛乳酪蛋白水解物和酵母提取物有利于 *Bifidobacteria* 的生长。

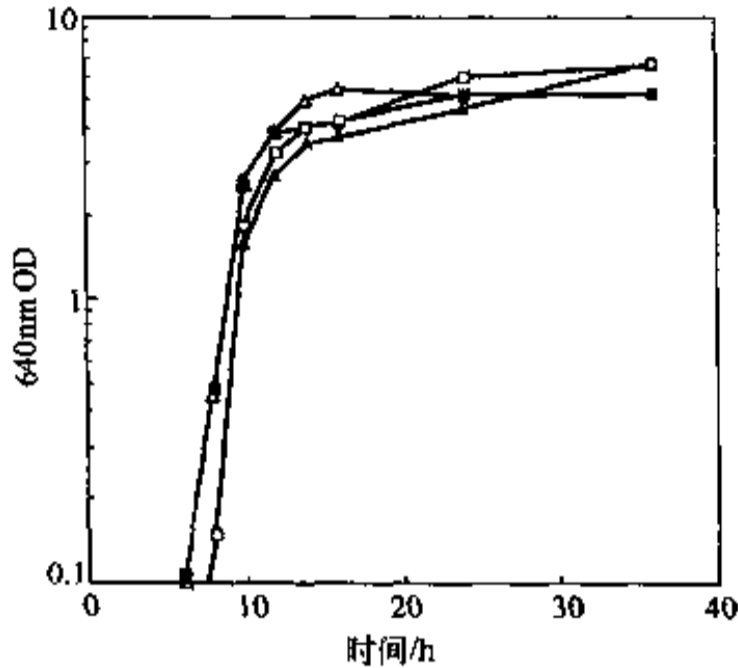


图 4-19 MRSL 肉汁中菌的生长
(MRS 肉汁加 5% 乳糖)

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258;
●—*B. longum* ATCC 15707; ▲—*B. angulatum*
ATCC 27535; □—*L. acidophilus* N₂, OD—光密度

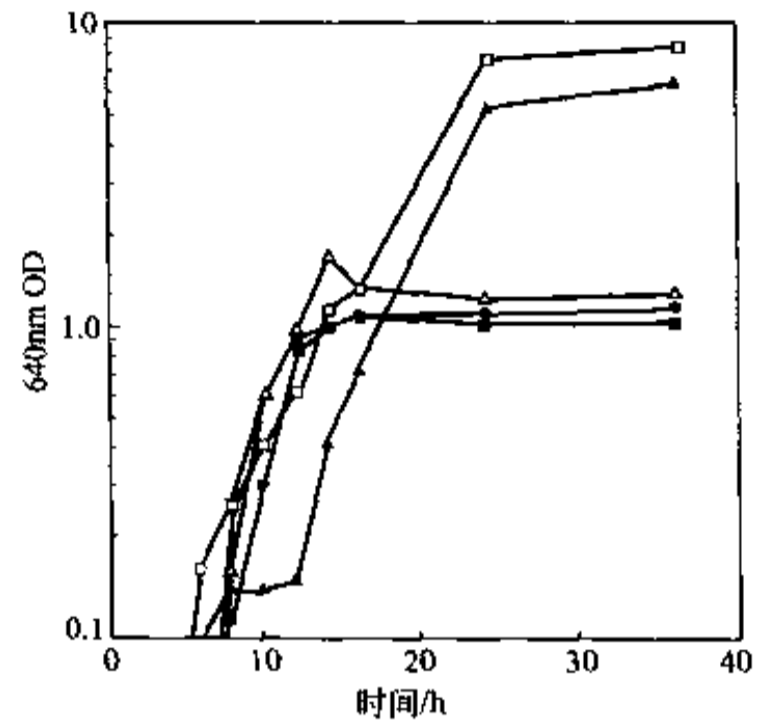


图 4-20 10% 再制 NDM 介质中菌的生长

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258;
●—*B. longum* ATCC 15707; ▲—*B. angulatum*
ATCC 15707; □—*L. acidophilus* N₂, OD—光密度

无论在何种介质中培养，16h 以后 *B. bifidum* 2715、*B. breve* 2258 和 *B. longum* 15707 三株菌的滴定酸度是相似的；但对于具有高密度细胞的 *B. angulatum* 27535 只有较低的滴定酸度（见图 4-21）。在脱脂乳培养基中 *B. angulatum* 27535 的细胞密度高于其他所有菌株，其产酸量较低，即说明此菌株产酸的能力弱于其他菌株。在达到最大生长密度后两种介质中均发现所有菌株仍有产酸现象发生。

非发酵乳冷藏情况下贮存 15 天发现 *Bifidobacteria* 的活菌数未有明显的变化，发酵产品 15 天的贮存后下降 1~2 个对数周期，酸度敏感性是冷藏发酵产品活菌数下降的主因。非发酵产品起始 pH6.3，滴定酸度 0.18%；发酵产品 pH5.0 时滴定酸度 0.50%，在 4℃ 贮存 15 天滴定酸度和 pH 基本不变。尽管在发酵产品中出现活菌数下降的情况，但在此 pH 的非厌氧情况下仍有较高量的活菌存在，可达到人体健康需要菌数的下限值。在菌的培养时介质要新鲜制备，产品的氧化还原电势要低，且要低温贮存和菌细胞悬浮，以及保持贮存过程中 pH 的不变化，这均有利于改善乳中益生菌的存活性。

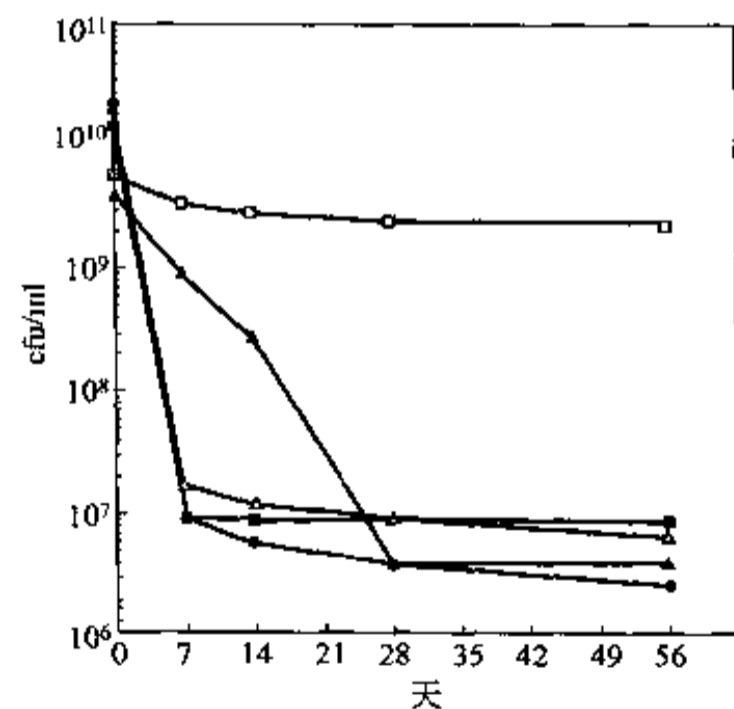


图 4-21 10% 再制 NDM 和 MRSL 介质中菌生长的滴定酸度

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258;
●—*B. longum* ATCC 15707; ▲—*B. angulatum*
ATCC 27535; □—*L. acidophilus* N₂

在 28 天—60℃ 的贮存时 *Bifidobacteria* (1.3×10^{10} cfu/ml) 下降了 3 个对数周期，在贮存第

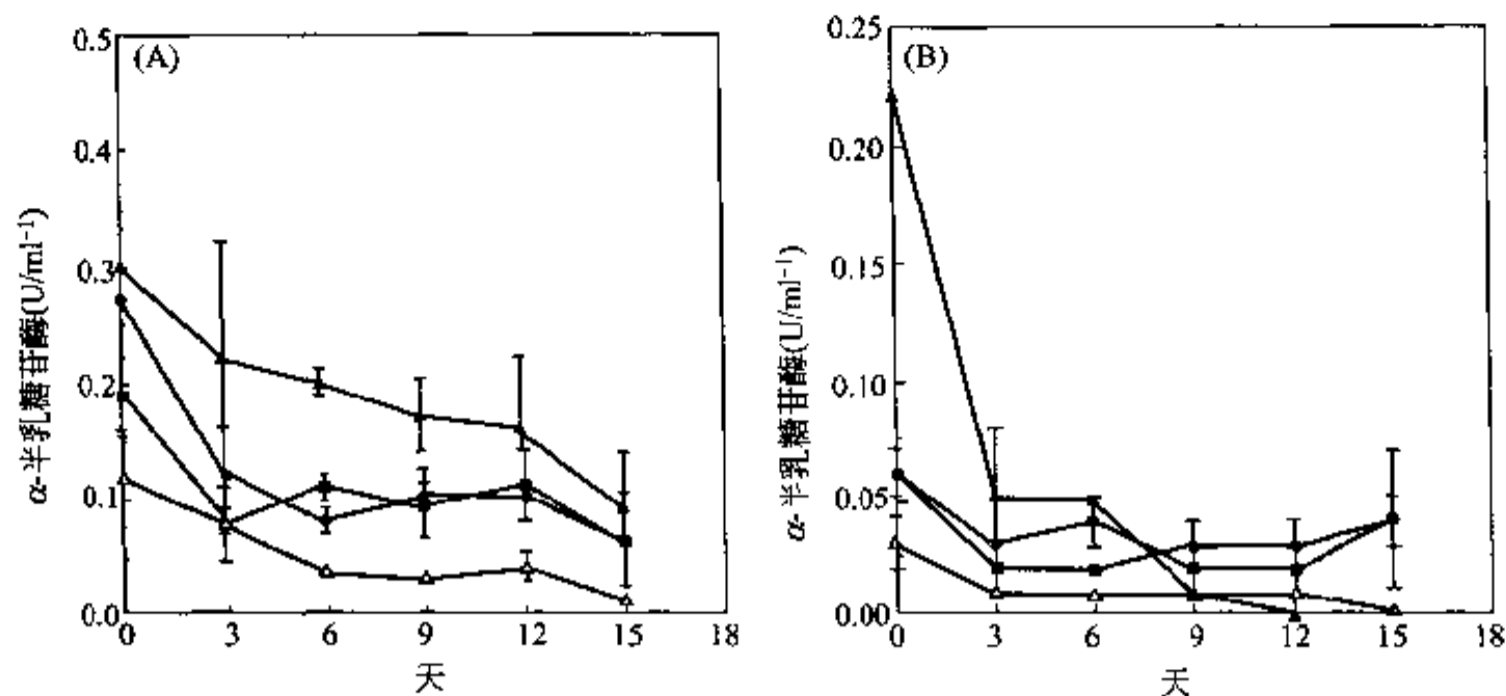


图 4-22 -60°C 贮存浓缩发酵制备物总菌数

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258; ●—*B. longum* ATCC 15707;
▲—*B. angulatum* ATCC 27535

一周 *B. bifidum* 2715、*B. breve* 2258、*B. longum* 15707 有最大的活性损失；*B. angulatum* 15707 在 28 天内活性损失较少，*L. acidophilus* 低温贮存 56 天后活性稍有下降。*Bifidobacteria* 贮存 28 天以后继续贮存活性损失甚小（见图 4-22）。

表 4-38 发酵和非发酵产品中（NDM 介质） α 和 β -半乳糖苷酶活性

菌 株	发 酵				非 发 酵			
	β -gal		α -gal		β -gal		α -gal	
	(pU/cfu)							
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
<i>Bifidobacterium Bifidum</i> 2715	276	27	24	4	296	54	22	5
<i>Bifidobacterium Breve</i> 2258	70	16	7	3	81	22	11	4
<i>Bifidobacterium Longum</i> 15707	270	27	56	17	318	106	55	6
<i>Bifidobacterium Angulatum</i> 27535	6643	499	2054	249	5930	559	1718	270
<i>Lactobacillus Acidophilus</i> N ₂	748	74	0		350	48	0	

β -半乳糖苷酶和 α -半乳糖苷酶活性在不同的 *Bifidobacteria* 菌株间存在较大差异，*B. angulatum* 27535 和其他菌株间的差异如表 4-38 所示。像 *B. angulatum* 的低产酸性质一样，它的酶活性也表现出不同于其他菌株的性质。 α -半乳糖苷酶在所有 *Bifidobacteria* 菌株中均能检测到，但 *L. acidophilus* 不具产此酶活性。*B. angulatum* 27535 菌株产 α 、 β -半乳糖苷酶的活性均高于其他 *Bifidobacteria* 菌株。非发酵乳的冷藏未明显降低 β -半乳糖苷酶的活性，但发酵产品在 15 天贮存酶活性有所下降，主要发生在 4°C 贮存的前 9 天（见图 4-23）。 α -半乳糖苷酶活性无论发酵乳还是非发酵乳均随时间延长呈活性下降趋势（见图 4-24）。-60°C 贮存除 *B. angulatum* 27535 外，其他菌株 β -半乳糖苷酶

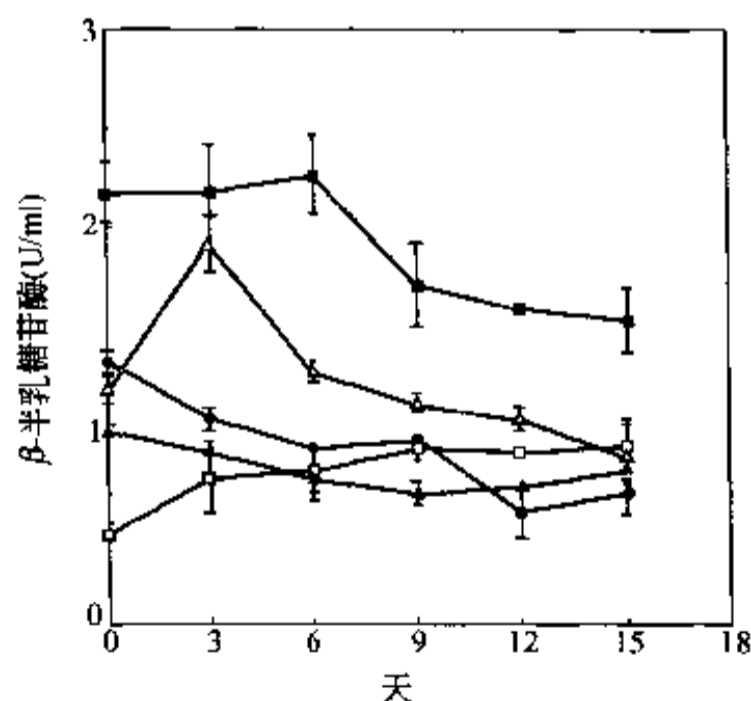


图 4-23 4°C 贮存 NDM 介质中发酵乳 β -半乳糖苷酶活性 (U/ml)

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258;
●—*B. longum* ATCC 15707; ▲—*B. angulatum* ATCC 27535; □—*L. acidophilus* N₂

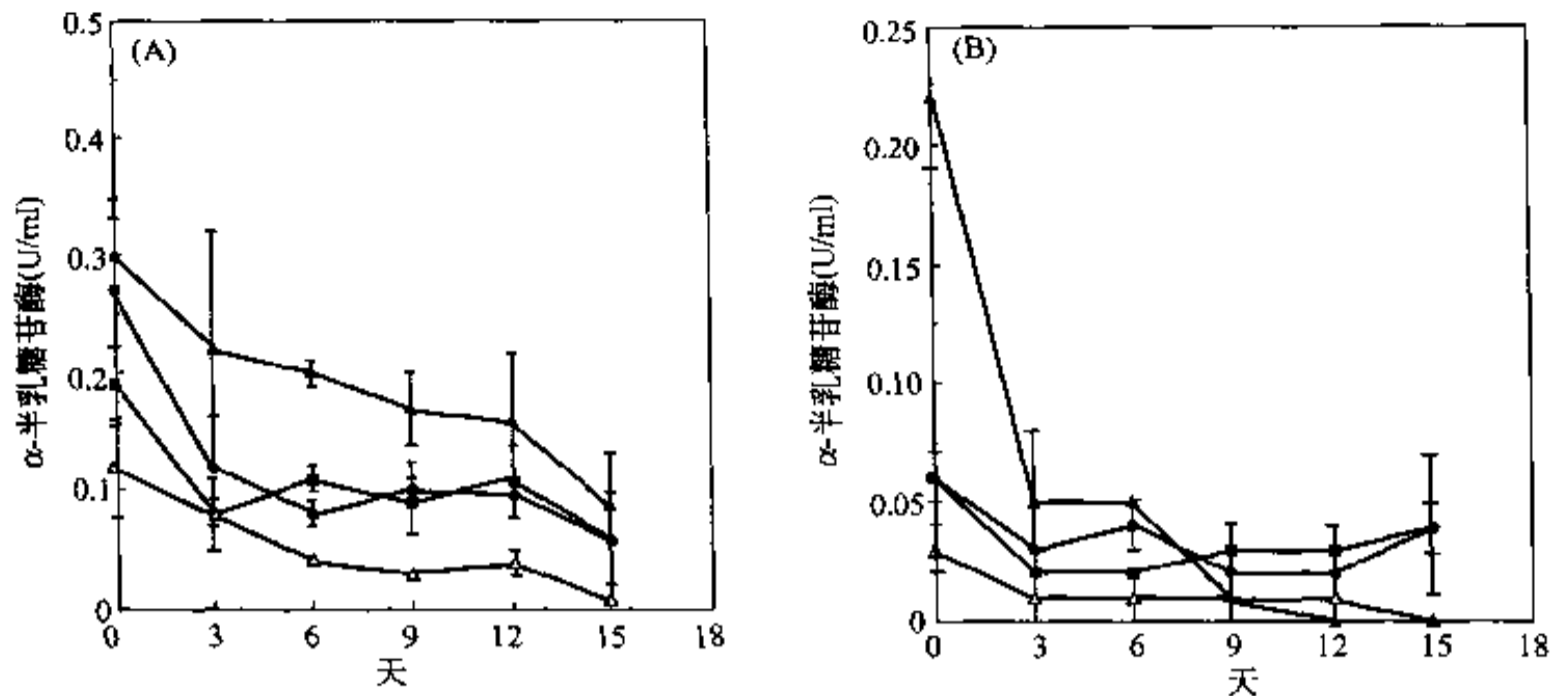


图 4-24 4°C 贮存 NDM 介质中发酵乳 α -半乳糖苷酶活性 (U/ml)

A. 发酵乳; B 非发酵乳

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258; ●—*B. longum* ATCC 15707;
▼—*B. angulatum* ATCC 27535

活性没有实质性下降, -60°C 56 天贮存后除 *B. angulatum* 外其余菌株该酶活性 $>5\text{U/ml}$, 而 *B. angulatum* 的该酶活性由 18U/ml 下降至 13U/ml 。和细胞数的损失相反, β -乳糖酶活性基本不受贮存 (-60°C) 影响, 这是非常重要的性质, 由于在贮存过程中保留了 *Bifidobacteria* 的 β -半乳糖苷酶活性, 故用 *Bifidobacteria* 产品改善人体的乳糖不耐症成为可能。 -60°C 贮存 α -半乳糖苷酶在 14~28 天时活性降至很低 (见图 4-25), 这种下降的模式和其菌体细胞数的损失一致, 故认为 α -半乳糖苷酶活性和菌体细胞数相关, 而 β -半乳糖苷酶则呈和菌体细胞数无关的性质。

在 β -半乳糖苷酶活性和菌株细胞数量变化间存在着尖锐对抗的矛盾。细胞数 1 个对数周期的下降在 β -半乳糖苷酶活性降低方面没有类似的反应。经贮存后发酵产品随着贮存时间延长, *B. bifidum* 2715、*B. longum* 15707、*B. breve* 2258 cfu 中半乳糖苷酶 (包括 α 、 β) 活性明显增加, *B. angulatum* 和 *L. acidophilus* 相对起始活性有较小程度增加 (见图 4-26)。非发酵乳中除

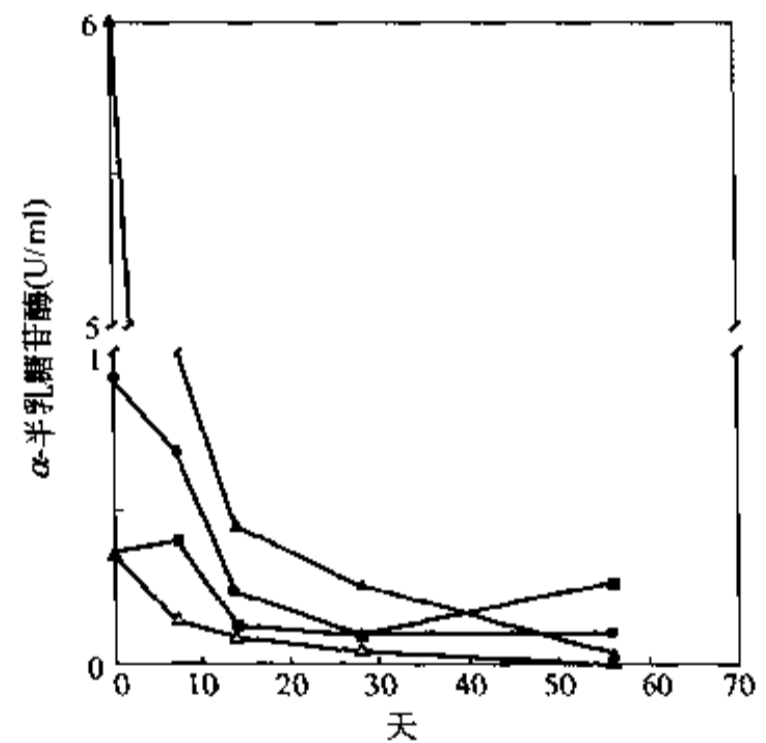


图 4-25 -60°C 贮存 β -半乳糖苷酶活性 (U/ml) 变化

■—*B. bifidum* NCFB 2715; ▲—*B. breve* NCFB 2258;
●—*B. longum* ATCC 15707; ▼—*B. angulatum* ATCC 27535

B. angulatum 27535 外, α 、 β -半乳糖苷酶的活性基本保持不变, 这些菌株在 15 天贮存过程中菌体细胞下降, α -半乳糖苷酶活性没有变化。这些数据表明相对于贮存过程中菌体细胞的量半乳糖苷酶的活性增加, *B. longum* 15707 的实验结果如图 4-27 所示, Gilliland 等均获得过类似结果。

随着菌体细胞数的下降 β -半乳糖苷酶活性保留, 可以说明随着贮存酶活性迅速增加的原因。为了评估酶的稳定性, 样品经表面活性剂处理 (Tritonx-100 烷基酚聚氧乙烯醚),

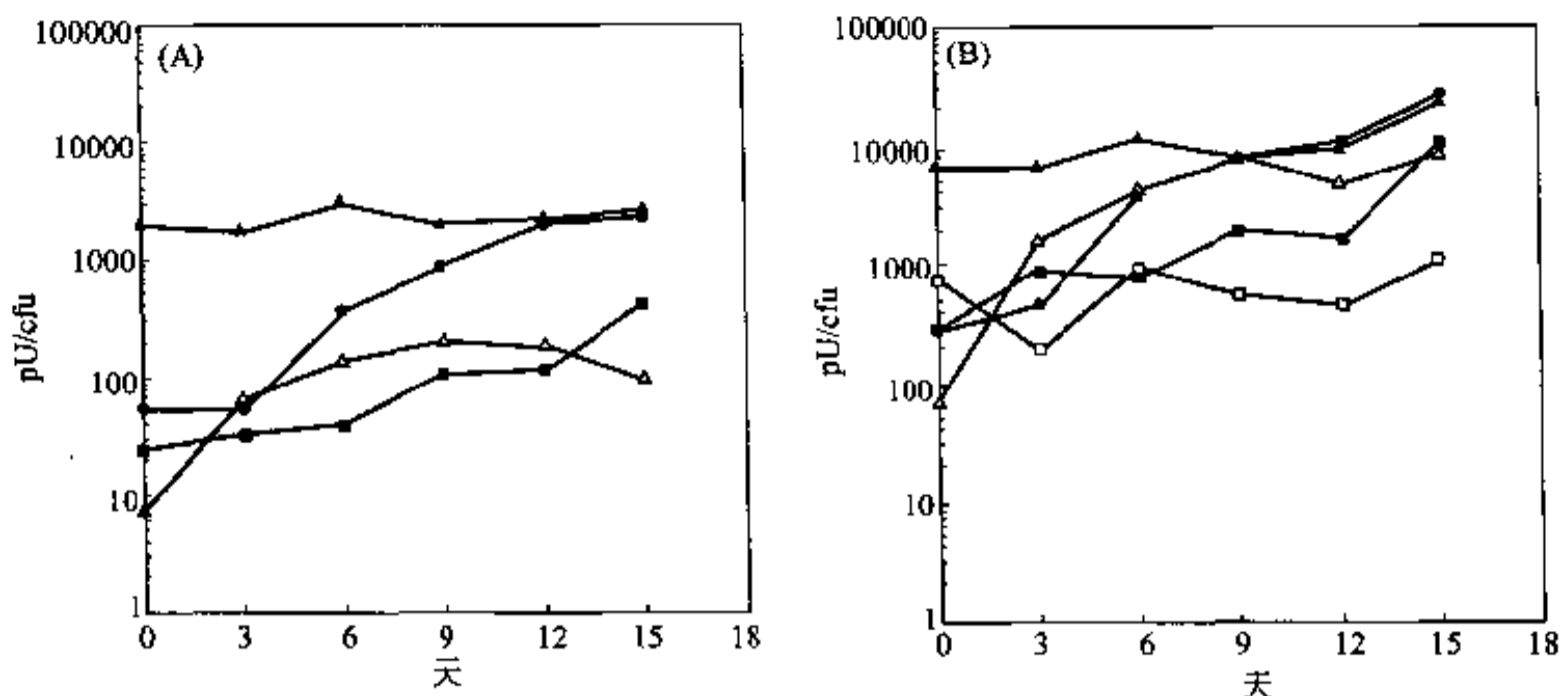


图 4-26 发酵物 4°C 贮存每个 cfu 上酶活性变化

(A) α -半乳糖苷酶; (B) β -半乳糖苷酶

这种表面活性剂能迅速透过细胞膜, 处理 4 天后继续 4°C 贮存, 约 10^9 cfu/ml 的菌被破坏,

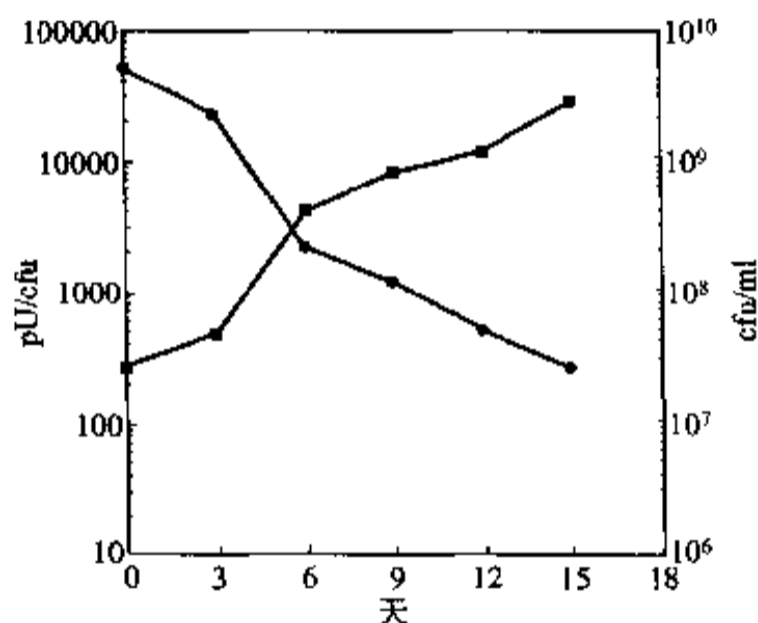


图 4-27 4°C 贮存酶活性和菌体细胞变化

●—cfu 上 β -半乳糖苷酶; ○—MRS 培养基上菌落数 *B. longum* ATCC 15707 实验结果

在此情况下 β -半乳糖苷酶的活性仍保持不变。 β -半乳糖苷酶是和细胞膜相连的, *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 的此酶均有此性质, *Bifidobacteria* 的 β -半乳糖苷酶也是如此, 故说明尽管菌体细胞减少, 但整个酶活性保持稳定。用 tritonx-100 处理的样品中任何菌经 2 天贮存后均无法测到 α -半乳糖苷酶的存在, 也没有证据表明 α -半乳糖苷酶是和细胞膜相连的。

对于食品应用的 *Bifidobacteria*, 几个特征是非常重要的, 在低 pH、有氧存在时, 一般温度下具有高 β -半乳糖苷酶活性和菌细胞稳定性, 应是其最重要的几个性质。

第六节 双歧杆菌制品的加工技术

Mayer (1949) 应用 *Bifidobacteria* 进行婴儿食品的生产, Malyoth 等 (1969) 将 *Bifidobacteria* 应用于发酵乳制品。双歧菌发酵乳具有以下营养和技术特征: ①较轻的酸味; ②后发酵的能力有限, 包括在后期的冷链贮运消费过程也是如此; ③和其他发酵乳制品比较少发生苦味; ④ *Bifidobacteria* 可用于加工乳制品和药品; ⑤形成具有生理活性的 L (+) 乳酸; ⑥双歧菌特别适用于加工发酵乳饮料; ⑦双歧菌可生产兼具营养和生理功能的发酵乳制品。

含双歧杆菌酸奶和普通酸奶比较存在以下的问题和差异: ①双歧菌在正常情况下于乳中的培养较为困难; ②接种量大, 故母发酵剂的量也大; ③存在变化的温爽口味; ④产酸慢、产品凝结差、黏度低; ⑤在低 pH 贮存过程中双歧菌快速死亡; ⑥包括缓冲容量在内的原料乳 TS 量增加; ⑦因长的培养时间和慢速产酸要有较好的灭菌工作。

双歧酸奶除发酵剂、发酵条件不同于一般酸奶外, 原料要求、净乳、标准化、均质、杀

菌均和一般酸奶相同，故在此就不再讨论了。

一、发酵菌种和发酵剂

(一) 纯双歧菌种的检验和选择标准

最常用的双歧菌种是 *B. bifidum*，在许多情况下也应用 *B. longum*。

1. 按技术标准进行 *Bifidobacteria* 的检验和选择

(1) 产酸能力

产酸速度（乳酸和醋酸）是 *Bifidobacteria* 的重要特征之一，在产酸方面不同菌株间存在较大的差异，其情况如图 4-28 所示。

不同菌株的产酸能力检查应用绘制酸度曲线的方式进行，在发酵过程中不同的时间间隔测定发酵剂的滴定酸度，按滴定酸度和发酵时间进行作图，以此来决定产酸的速度。

(2) 后发酵

后发酵是指在冷却和冷藏过程中酸奶的继续产酸情况，下列因素影响菌种的后发酵：

① 酸奶的最终 pH 依赖应用菌种的差异而明显不同，如最终 pH 可为 pH4.0~3.7，pH3.5 和 pH3.3，为防止酸奶在进一步冷却和长时间贮存过程中过度酸化，选择菌株和最终 pH 不低于 4.3；

② 按 S. Malyoth 等的观点选用 *Bifidobacteria* 在 <15℃ 时应无任何代谢活性。

(3) 口味和芳香味

乳中发酵的双歧菌酸奶具有特征性的口味和风味，以温和、芳香、稍辣和不同于普通酸奶风味为特征，一般认为其风味较普通酸奶差，在加工发酵物时的应用双歧菌不产生二乙酰、乙醛和 3-羟基丁酮，产生 HAc 和乳酸，为了淘汰不期望的菌株进行感官质量测试是必要的。

(4) 生长介质的要求

期望这种 *Bifidobacteria* 菌株在牛奶中没有添加其他物质的情况下能够繁殖，对测定菌株在牛奶中是否有其他物质存在情况下比较培养，可筛选出期望菌株。

(5) 对氧的敏感性

Bifidobacteria 对氧的敏感性据菌种的不同而不同，从对氧不非常敏感到严格厌氧的菌株都有，新分离的 *B. bifidum* 可能是厌氧的，但在乳中传几代以后，表现为一定氧的耐受性，期望选择没有特定厌氧培养就能生长的菌株。

(6) 黏性菌株

许多 *Bifidobacteria* 的菌株能产生改善最终产品黏度和均匀性的黏性物质，这种物质多为细胞间多糖，希望双歧菌酸奶的发酵菌株具有一定产黏性。

(7) 生物技术特征

选择的菌株可以由下列特征检查来确定：最小、最适、最大生长温度，最低、最适、最高生长 pH，加工中最小的接种量，在不同温度和 pH 情况下不同时间间隔干燥过程中存活

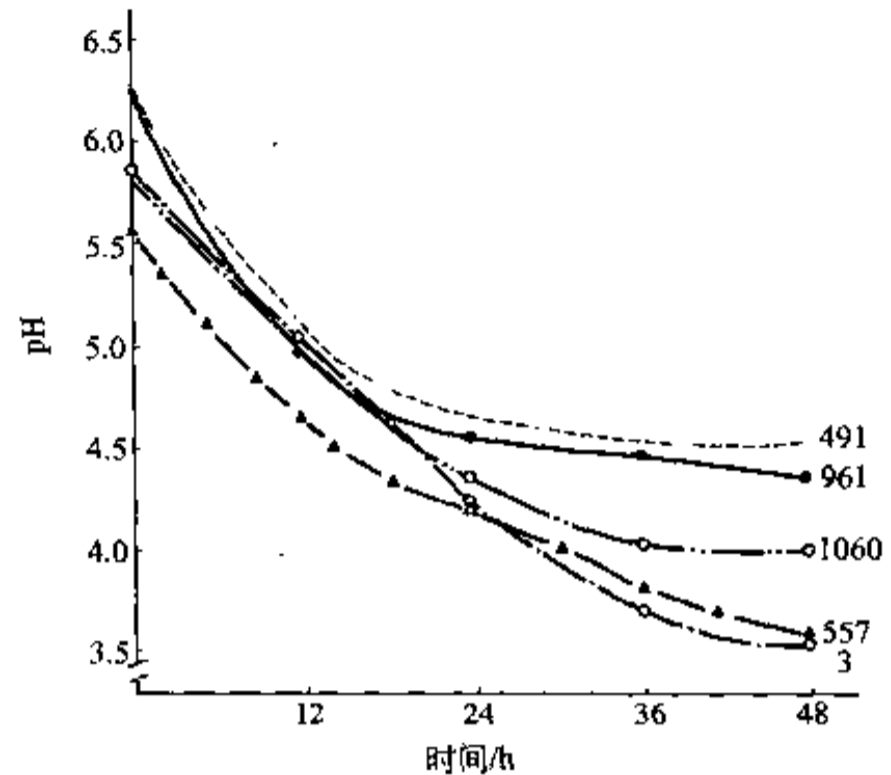


图 4-28 37℃ 培养 48h (接种量 10%) 不同 *B. bifidum* 于灭菌牛奶中 pH 的改变

注：491、961、1060、557、3 为 *B. bifidum* 编号

(Kiszsa 和 Ziajka 1973)

的速度，在缓冲溶液和脱脂粉中对于不同时间间隔，以不同温度和 pH 值进行热死亡时间十倍减少实验，测定挥发性脂肪酸。

这些结果（至少三次测试的平均值）代表我们所称的生物技术特征，据此来判定是否选用它作为加工菌种。

2. 按膳食和治疗标准选择和检验菌株

(1) 选择的微生物学参数

从健康母乳喂养婴儿或儿童粪便中分离的 *Bifidobacteria* 是最重要的选择标准之一，能够应用于乳品工业。从人体中分离的商业化双歧菌株已有数家公司拥有，如丹麦的汉森公司、日本的森永公司等。

(2) 体内检验

用于治疗目的的双歧菌产品，应对分离菌株进行体内检验以确定它在人或动物体内的生理功能。

(3) 胃液中 pH 的抵抗性

Gianella 等 (1972) 描述了不同 pH 值不同时间间隔 (>120min) 测定菌对胃液抵抗性的方法，后来由 Lipinska (1978) 对其应用 (见表 4-39)，结果表明 pH4.0 对双歧菌有影响，pH2.0 有强抑制效果。

表 4-39 在不同 pH 缓冲液中 *Bifidobacteria* 的存活

双歧菌	作用时间/分钟	在该 pH 下每 ml 缓冲溶液存活菌的数量和百分比					
		6.5		4.0		2.0	
		数量 × 10 ⁷	质量分数 %	数量 × 10 ⁷	质量分数 %	数量	质量分数 %
J	0	5.3	100.0	5.3	100.0	5.3 · 10 ⁷	100.0
	15	5.2	98.0	3.3	62.7	1.4 · 10 ⁷	27.0
	30	5.3	100.0	2.9	54.1	1.2 · 10 ⁴	
	60	5.4	101.8	2.5	46.4	2.3 · 10 ²	
	120	5.3	100.0	2.2	40.9	2.0 · 10 ¹	
62	0	4.6	100.0	4.6	100.0	4.6 · 10 ⁷	100.0
	15	4.3	93.5	2.9	62.5	5.5 · 10 ⁶	12.0
	30	4.1	89.1	3.3	70.8	0	
	60	4.5	97.8	2.8	60.9	0	
	120	4.5	97.8	2.9	63.4	0	
6459	0	3.8	100.0	3.8	100.0	3.8 · 10 ⁷	100.0
	15	3.5	92.1	2.7	70.3	1.2 · 10 ⁶	3.1
	30	3.8	100.0	2.6	68.0	7.6 · 10 ³	
	60	3.7	97.4	3.0	80.1	0	
	120	3.0	79.0	3.1	82.1	0	
567	0	1.8	100.0	1.8	100.0	1.8 · 10 ⁷	100.0
	15	1.9	105.6	1.3	70.2	3.4 · 10 ⁵	1.9
	30	1.8	100.0	1.3	69.2	3.0 · 10 ¹	
	60	1.8	100.0	1.7	94.4	1.8 · 10 ¹	
	120	2.0	111.1	1.4	80.0	10 ¹	
混合菌	0	5.0	100.0	5.0	100.0	5.0 · 10 ⁷	100.0
	15	5.1	102.0	3.6	70.9	7.5 · 10 ⁶	15.0
	30	4.9	98.0	3.6	71.4	5.0 · 10 ¹	
	60	5.0	100.0	3.6	71.4	0	
	120	5.1	102.0	3.4	68.0		

注：菌种来源：567 和 6459；Pasteur Institute Paris；J；Institute of Immunology and Virology, Belgrade；62；Institute of Food and Nutrition, Warsaw；混合菌种：上述四种菌的混合物。

Yakult Honsha Co ltd (1971) 应用简单的方法进行胃液中 pH 的抵抗性实验, 即在人工模拟体胃液中 pH3.0、37℃保温进行测试菌种的 pH 耐受性实验。

(4) 胆汁盐的抵抗性

在 0.05%、0.2% 和 0.3% 脱氧胆酸钠中 Catteau (1971) 进行 *Bifidobacteria* 存活率的测定, Lipinska (1978) 用这种方法检验了不同 *Bifidobacteria* 的菌株。脱氧胆酸钠 (0.2% 和 0.3%) 对研究的 *Bifidobacteria* 有抑制作用, 在正常盲肠中脱氧胆酸盐的浓度介于 0.2%~0.5% 之间。

(5) 抗生素的敏感性

Bifidobacteria 不同菌株对抗生素的敏感性也不同, Lipinska (1978) 应用 Serum and Vaccine Institute Warsaw 的方法测试了 *Bifidobacteria* 对治疗抗生素的敏感性。

(6) 和其他菌的互作性

Rehm (1970) 发表了一种保持 *B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 竞争性的接种、培养的专利方法, 方法包括在含有活或死的病原菌培养基中培养 *L. acidophilus* 和 *B. bifidum*。

(7) 尿激酶的产生

存在着尿激酶阳性和阴性两种 *B. bifidum* 菌, 应用于治疗目的 *B. bifidum* 或其他目的的 *Bifidobacteria* 应是尿激酶阴性菌。

(二) 含有双歧菌的混合和互补菌的选择

1. 含 *Bifidobacteria* 的混合菌种

和其他肠道菌如 *L. acidophilus* 一起培养 *Bifidobacteria* 是有益的, *S. thermophilus* 或 *P. acidilactici* 被加入混合菌中以帮助酸化。现在含 *Bifidobacteria* 的不同类型的发酵物, 最为典型的是 *Bifidobacteria*、*L. acidophilus* 和 *S. thermophilus* 混合发酵剂, 其应用最为广泛, 我们称之为 BAT。

2. 补充菌 (没有 *Bifidobacterium*)

S. thermophilus 黏性菌株被添加混合发酵剂中以改善含 *Bifidobacteria* 发酵乳的质地, 上面已提及应用 *Bifidobacteria* 的黏性菌株也是可能的。有时黄油发酵菌株 (*S. cremoris* 和 *Ln. lactis*) 被添加于混合菌株以改善风味, 或添加少量酸奶菌种 (0.01% 对 0.1%) 以增加产酸能力。

(三) 菌种和母发酵剂的提供和保存

不同菌株的 *Bifidobacteria* 可以按下列标准进行混合: ① Mutai 等 (1978) 混合专一性厌氧菌和耐氧菌, 其比例从 1:1 到 3:1, 这样可能使它变为氧敏感性菌株; ② 不同表现型的 *Bifidobacteria* 混合。

1. 生长的培养基

正常成分乳加热 90~95℃、15~30min, 冷却至培养温度, 添加生长促进物质添加以促进 *Bifidobacteria* 的生长和产酸, 在工作发酵剂制备过程中不被 *Bifidobacteria* 利用的生长促进物质转移至生产乳中。

最常用的生长促进因子是酵母提取物和酵母自溶物, 但它们不总是具有期望的生长促进作用, 添加量在 0.1%~0.5% 之间, 对发酵乳风味无不良影响, 1%~5% 的葡萄糖和酵母提取物一起添加可进一步缩短凝固的时间, 添加 20% 胰蛋白酶消化乳可促进从婴儿粪便中分离的 *Bifidobacteria* 的繁殖。

2. *Bifidobacteria* 的培养

获得大量的菌体细胞和好的产酸速度对发酵剂制备是十分重要的, 为了防止菌体细胞和

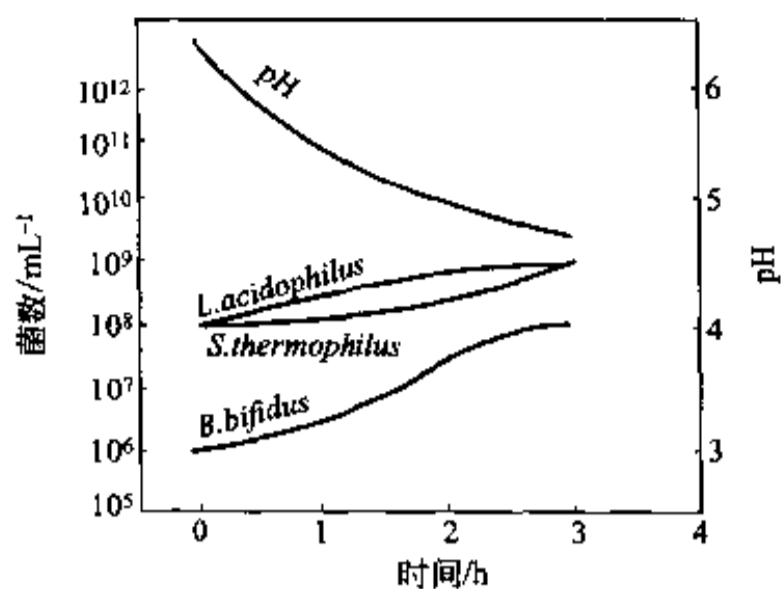


图 4-29 在发酵乳加工时 *B. bifidum*、*S. thermophilus* 和 *L. acidophilus* 的生长 (接种量 6%~10%, 42°C、2~3h 培养 pH4.6~4.9, 培养后 *Bifidobacteria* 为 $10^6 \sim 10^9$ cfu/ml)

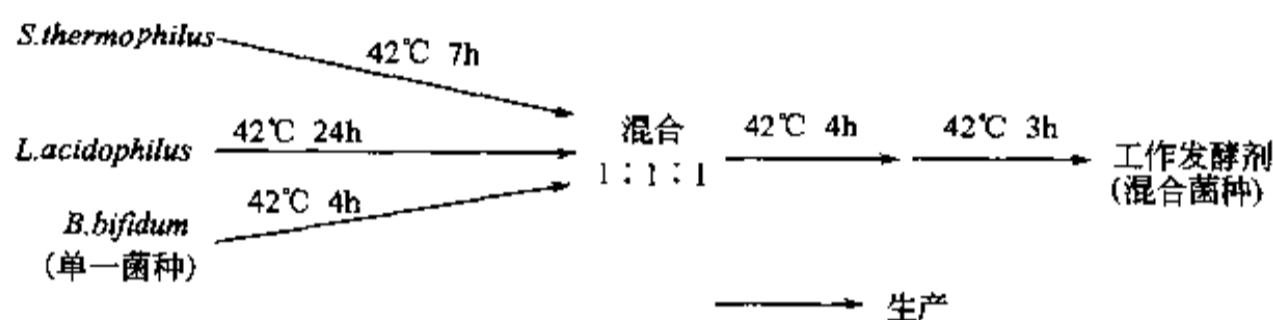


图 4-30 应用浓缩深冻混合发酵剂 BTA 直接培养制备工作发酵剂的情况

纯 *Bifidobacteria* 菌种多由高校和研究所提供, 或从适合物质中提取分离。*Bifidobacteria* 繁殖的培养介质, 可用 110~115°C、15min 灭菌再制脱脂乳作为 *Bifidobacteria* 传代培养基, 酵母提取物或其他生长促进物质以 0.5% 的比例添加以促进 *Bifidobacteria* 生长 (详细情况见后)。

发酵剂应灭菌传代, Mayer (1948) 建议每三天传代一次, 冷冻干燥发酵剂至少在使用前传代一次, 图 4-31 表示这些发酵剂的产酸情况。从图中可以看出二者间有较大差别, 直接接种 2.5g/500ml 乳, 42°C、6h 后 pH 达 4.6, 而传代后接种 10%, 42°C、6h 后 pH 达 4.03。(培养介质是脱脂乳, TS11% 经 95°C、40min 灭菌, 添加 1.5% Bios2000——一种生长促进物质混合物)。

(四) 工作发酵剂 (Bulk Starter)

工作发酵剂的灭菌加工设备如图 4-32 所示, 研究者建议在发酵剂制备过程中应避免非常低的 pH 出现。

表 4-40 工作发酵剂生产的工艺参数

时间表	推荐加工参数	产 品	期望生产参数
0h 7~8h	培养乳 脱脂乳+2%无脂乳粉+1%~1.5%Bios2000 杀菌 90~95°C, 保温 30~45min, 冷却至 42~44 °C 用 70mlMSK FERMOVAC ^① 培养温度 42~44 °C 培养完成 冷却至 4 °C	培养乳 工作发酵剂 工作发酵剂	pH=6.6~6.8 pH=6.6~7.0 无抗生素 pH=4.5~4.8 pH=4.4~4.6

注: ① MSK FERMOVAC, 每 500ml 脱脂乳 (TS 11%) 70g。FERMOVAC, 添加 1.5% 生长促进物质 Bios2000。

产酸能力的破坏, pH 将不能低于 4.7~5.0, 菌数至少达 10^8 /ml。

3. BAT 工作发酵剂

含 *Bifidobacteria* 混合发酵剂 BAT 酸度和菌数变化如图 4-29 所示, 在培养 4h 以后, *B. bifidum* 和 *S. thermophilus*、*L. acidophilus* 比较其浓度最低。

由于不同菌株繁殖速度不同, *Bifidobacteria* 生长抑制是混合发酵剂中培养的最大问题。为了确保双歧菌的存在可采用两种方法:

(1) 应用单一菌种发酵;

(2) 应用浓缩深冻发酵剂, 它可直接应用于 500~1000L 工作发酵剂的加工制备 (见图 4-30)。

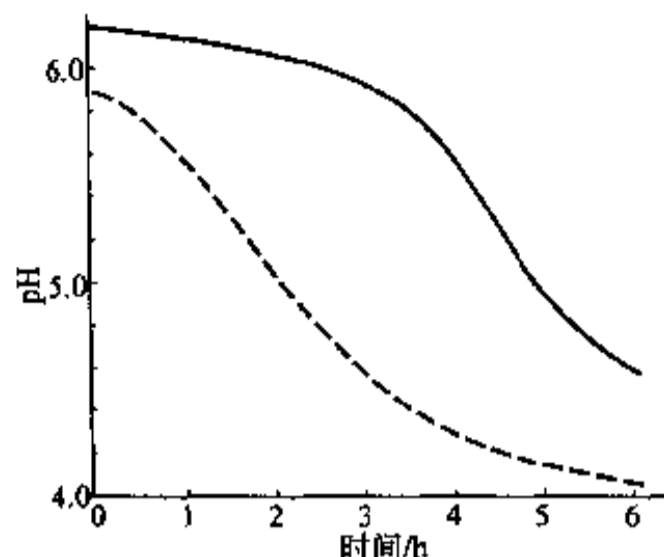


图 4-31 冷冻干燥发酵剂直接接种和传代接种后工作发酵剂 *B. bifidum* 的产酸情况

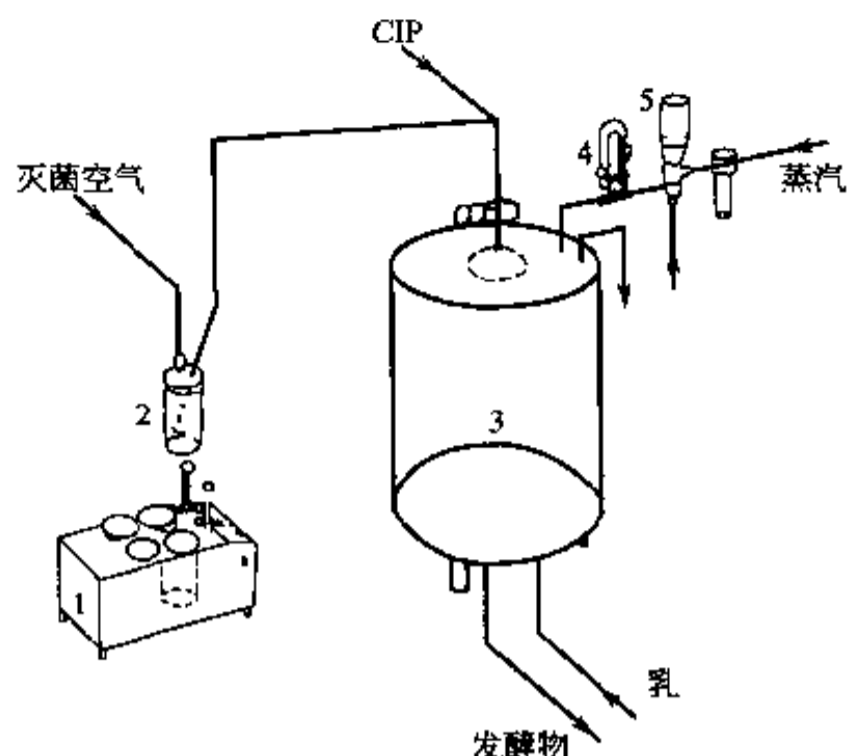


图 4-32 发酵剂生产灭菌加工的设备 and 简单流程图

1—恒温箱；2—培养容器；3—工作发酵剂罐；
4—灭菌空气过滤；5—空气/CIP 阀

二、发酵工艺条件的确定

(一) 发酵剂接种量的选择

纯 *Bifidus* 发酵乳的生产采用 10% 的大接种量来进行，应用大接种量的技术重要性（有时达 20%）如下：①产酸速度的改变；②和酸奶菌种比约含小 10 倍的 *Bifidobacteria* 量；③非常快地度过对数期；④酶较大量转移；⑤有一个期望的短发酵时间。

表 4-41 是不同发酵剂接种量对降低产品 pH 的影响。10% 接种量产品原料的 pH 下降为 6.0~6.35，对 *Bifidobacteria* 的起始繁殖没有重要影响，应快速搅拌已接种的接种物以防止可能的质地缺陷（不均匀性）。研究表明 *Bifidobacteria* 的大量接种可能导致菌浓度和加工酸奶（约 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ cfu/ml）相似，较大接种量 8%~10% 也用于 BTA 型发酵乳，*B. bifidum*、*L. acidophilus* 和 *S. thermophilus* 间的比例可能是不同的。在应用浓缩深冻发酵剂的直接接种时，500L 乳可添加 70g 发酵剂，直接接种有以下好处：①无母发酵剂或中间发酵剂的制备；②不需要实验室进行母发酵剂的传代和保持；③防止在混合发酵剂中其他菌的生长；④发酵剂可免受污染；⑤有利于防止噬菌体的滋长和危害；⑥发酵剂的活性高。

表 4-41 不同接种量、不同酸度发酵剂对产品 pH 降低的影响

接种量	在不同 pH 的生产乳接种发酵剂后的变化			接种量	在不同 pH 的生产乳接种发酵剂后的变化		
	4.71	4.32	3.76		4.71	4.32	3.76
5%	6.48	6.43	6.22	15%	6.23	6.12	5.72
10%	6.35	6.28	5.94	20%	6.14	6.02	5.50

(二) 发酵条件的选择

接种时菌浓度为 10^8 cfu/ml，pH 为 4.7。

1. 接种温度

接种温度的选择依赖下列因素：(1) *Bifidobacteria* 生长的最适温度；②发酵的期望时间；③发酵物的终止酸度；④繁殖的速度；⑤应用的冷却设备；⑥混合发酵剂中不同菌生长的偏好温度。双歧菌的接种温度介于 36~42℃，对于 BTA 混合发酵剂接种温度是

38~42℃。

2. 培养时间

培养时间的选择依赖下列因素：①接种量；②在牛奶中菌的繁殖能力；③发酵酸化的速度和密度；④接种温度；⑤对数周期和传代时间，要求在培养时间内至少获得 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml 的菌数；⑥为防止污染物生长应缩短培养时间。

(1) 快速产酸方法

对于快速产酸的纯 *Bifidobacteria* 发酵乳，培养时间 6~8h，应用混合发酵剂是 2.5~4h。

(2) 慢速产酸方法

慢速产酸是指培养时间 ≥ 12 h 的情况，常应用下列情况：①利用夜间发酵罐的能力；②利用一天开始时包装机的能力；③在混合发酵剂中存在重要生理价值的非快速产酸菌。只有以上特殊情况下，才应用慢速产酸方法生产酸奶产品。

3. 培养过程中发酵菌的繁殖

在酸奶加工过程中菌数达 10^9 cfu/ml，应用纯 *Bifidobacteria* 或 BAT 混合发酵剂，发酵乳中 *Bifidobacteria* 的量可达 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ml。相对少量量的双歧菌是由于：①其生长速度慢；②发酵乳的条件不处于 *Bifidobacteria* 生长的最适情况；③对该类发酵剂培养时间相对短；④在混合发酵剂中缺乏同酸奶发酵剂菌的共生关系。

Sasaki 等报道混合发酵剂中 *B. bifidum* 的生长情况如下：① *S. faecalis* 的生长速度不受 *L. acidophilus* 存在影响，但后者生长被抑制；② *L. acidophilus* 的生长不受 *B. bifidum* 的影响，但除非起始 *B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 的比率为 $10^4 : 10^3$ ，否则 *L. acidophilus* 抑制 *B. bifidum* 的生长；③ *B. bifidum* 存在时 *S. faecalis* 大量生长，但 *B. bifidum* 生长不理想，只有在二者比为 $10^6 : 10^1$ 时 *B. bifidum* 能较好生长。

(三) 产品形成的动力学

1. 纯 Bifidum 发酵乳和 BAT 发酵乳

(1) 纯 Bifidum 发酵乳

表 4-42 是不同培养时间后 *Bifidobacteria* 的量和产酸量变化情况。产品的最终酸度较高，因为 *Bifidobacteria* 在 pH4.6 以下迅速死亡。

表 4-42 培养时间和 *Bifidobacteria* 菌数、产酸量的关系^①

培养时间/h	0		17		24		41	
	酸度	菌数	酸度	菌数	酸度	菌数	酸度	菌数
测定菌株	°SH	cfu/ml	°SH	cfu/ml	°SH	cfu/ml	°SH	cfu/ml
YIT4002 ^②	14.0	4.2×10^7	57.6	4.9×10^9	84.4	4.8×10^9	108.8	7.3×10^8
YIT4006	13.6	7.0×10^7	40.0	2.3×10^9	54.0	8.9×10^8	68.0	5.8×10^8
YIT4005	14.0	4.5×10^7	55.6	5.0×10^9	78.4	4.6×10^9	100.4	3.1×10^9
<i>B. longum</i>	14.4	3.7×10^7	20.8	6.2×10^7	26.6	5.4×10^7	25.2	1.0×10^7
<i>B. breve</i>	14.4	4.0×10^7	26.8	5.1×10^7	31.2	3.6×10^7	36.8	1.1×10^7
<i>B. adoles</i>	13.6	3.4×10^7	17.6	1.8×10^7	18.4	1.2×10^7	20.4	6.4×10^6
<i>B. infantis</i>	14.0	6.0×10^7	18.0	4.6×10^6	19.2	1.2×10^6	21.2	1.0×10^5
<i>B. bifidum</i>	13.6	4.0×10^7	23.6	6.0×10^7	26.4	3.9×10^7	30.0	2.4×10^7

① 再制乳粉 (16%TS)，接种量 2%，培养温度 37℃。

② YIT—抗氧性诱变 *Bifidobacteria*。

(2) BAT 发酵乳

发酵乳中双歧菌较其他两种菌的含量低，但其递增速度较快。

2. 双歧发酵乳的冷却

下列因素影响双歧发酵乳的冷却：①Bifidus 乳产酸慢于酸奶产酸，发生过度酸化的几率较少；②如选择合适的菌株（pH 最小值 4.3），不会发生过度产酸现象；③冷却设备若简单可节省能耗，如搅拌型酸奶可灌装后直接冷却。

凝乳处理和包装同一般搅拌、凝固型酸奶。

3. *Bifidobacteria* 酸奶的贮存

Bifidus 酸奶贮存品质是应用发酵剂、贮存温度、污染程度、污染菌的生长速度和包装质量的函数。概括起来有以下方面。

(1) 卫生状况和 Bifidus 酸奶的贮存、保质密切相关。

(2) 产品的后发酵和最终产品 pH 很重要，纯 Bifidum 发酵后发酵较弱，混合发酵剂 BAT 酸奶也由于高 pH，处于酶活性最小的温度，仅有弱的后发酵（见图 4-33）。

(3) 贮存过程中 *Bifidobacteria* 的生长速度依赖于不同因素，其生长速度和活菌数量按应用情况变化，若发酵乳作为普通酸奶食用，菌数变化无特殊重要性，但若其应用于膳食治疗，大量 *Bifidobacteria* 存在是十分重要的。

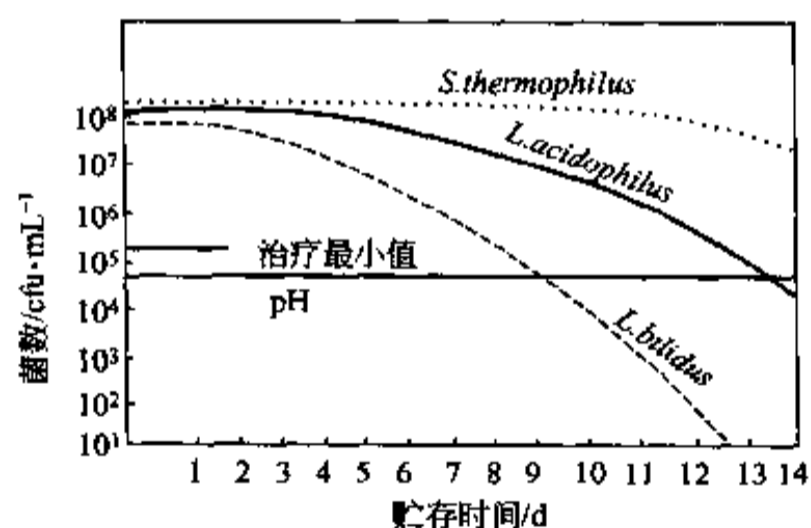


图 4-34 BTA 发酵乳中菌数的贮存下降 (pH4.5, 14 天)

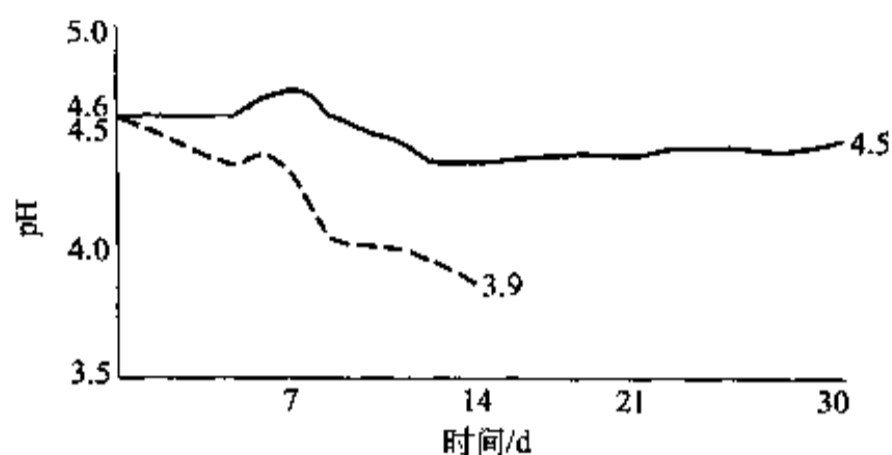


图 4-33 含 *Bifidobacteria* 脱脂酸奶贮存后发酵情况 (20~22℃、10~12℃)，产品应用混合发酵剂 MSK (*B.bifidum*, *L.acidophilus* 和 *S.thermophilus*) 和添加 0.1~0.5% 酸奶发酵剂发酵而成

按 Reuter 的观点，治疗产品服用应高剂量、高菌数以确保其迅速通过胃而有足够高的活菌数，最大剂量 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/d，一般剂量是 $10^8 \sim 10^9$ cfu/d，有时 $10^6 \sim 10^7$ cfu/d。

在 pH4.3 ~ 4.7 的发酵乳中，*Bifidobacteria* 在 1~2 周的贮存可减少 2 个对数周期，即经 0.5~1 周的贮存菌数下降 10 倍，具体情况如表 4-43、表 4-44 及图 4-34 所示。

表 4-43 发酵乳中 *Bifidobacteria* 对数减少时间

pH	贮存起始 Bifidus 数	降低 10 倍时间(D 值)	4~6℃ 达到此最小值的贮存时间(计算值)	
			10^5 /ml	10^6 /ml
4.70	10^8 /ml	1 周	3 周	2 周
4.70	10^7 /ml	1 周	2 周	1 周
4.30	10^8 /ml	0.5 周	1.5 周	1 周
4.30	10^7 /ml	0.5 周	1 周	0.5 周

表 4-44 溶液中不同的 Bifidus 贮存时随 pH 的变化 (5°C, 10 天)

pH 值		贮存天数				
		0	3	5	7	10
6.6	V	4.7×10^8	3.8×10^8	3.7×10^8	4.0×10^8	3.0×10^8
	S	4.5×10^8	3.1×10^8	6.8×10^7	4.2×10^7	2.1×10^7
5.6	V	5.0×10^8	3.8×10^8	2.4×10^8	3.0×10^8	2.3×10^8
	S	4.9×10^8	3.1×10^8	5.5×10^7	1.9×10^7	2.1×10^6
4.6	V	4.2×10^8	5.1×10^8	4.2×10^8	2.0×10^8	9.3×10^7
	S	4.5×10^8	1.0×10^8	3.6×10^5	4.0×10^3	$<10^2$
4.3	V	4.6×10^8	4.0×10^8	2.1×10^8	6.9×10^7	3.0×10^7
	S	4.2×10^8	3.9×10^8	2.1×10^4	$<10^2$	$<10^2$
4.1	V	4.7×10^6	9.5×10^8	3.4×10^7	5.6×10^6	4.3×10^5
	S	4.5×10^6	4.1×10^8	1.0×10^8	$<10^2$	$<10^2$
4.0	V	5.0×10^8	7.0×10^8	8.0×10^5	2.8×10^5	2.9×10^4
	S	4.9×10^8	1.2×10^8	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

注: V-*B. bifidum* YIT 4005, pH=4.0 耐酸, S-*B. bifidum*, 标准菌株。

从表中可以看出若要达到一定的菌数必须食用一定量的产品 (100~180 克/天), 如食用 100g 含 Bifidus 10^6 cfu/ml 的发酵乳, 相当于 10^8 Bifidus 被摄入, 但若含 Bifidus 是 10^5 cfu/ml, 则相当于 10^7 Bifidum 被使用, 若以食用 100g 产品计, Bifidus 的含量最小值为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml (见表 4-45)。

表 4-45 Bifidus 含量、食用量和摄入菌量的关系

产品菌数 (cfu/ml)	摄入产品后相当的食用菌数			产品菌数 (cfu/ml)	摄入产品后相当的食用菌数		
	100g	120g	180g		100g	120g	180g
1×10^2	1×10^4	1.2×10^4	1.8×10^4	1×10^{5①}	1×10^7	1.2×10^7	1.8×10^7
1×10^3	1×10^5	1.2×10^5	1.8×10^5	1×10^6	1×10^8	1.2×10^8	1.8×10^8
1×10^4	1×10^6	1.2×10^6	1.8×10^6	1×10^9	1×10^{11}	1.2×10^{11}	1.8×10^{11}

注: ① 有治疗作用的最小菌含量 (以食用 100g 计)。

三、益生菌的加工技术

(一) 冷冻和冷冻干燥发酵剂的生产

1. 接种物的制备

所有纯菌发酵物生产的基础设备是发酵机罐。原始纯菌株的储存必须被保证, 据此菌株被保存在深冷的液氮中 (-196°C) 或 -80°C 的深冷冰柜中, 也可冷冻干燥保存。种子菌生产必须在灭菌情况下进行以防止任何可能的污染, 此菌作为母发酵剂 (Stock culture) 的种子, 在种子菌和母发酵剂间仅需一些繁殖过程即可完成。汉森公司储存菌的数量足以用 50~100 年, 工业应用的母发酵剂也可应用 3~5 年。有必要强调种子菌正常和充分编码的重要性, 在使用的每一个阶段正确登记, 以使很容易找到发酵物的源头。

2. 发酵剂发酵物的生产加工

对于表 4-46 所示的 6 株乳杆菌、1 株 *Bifidobacterium* 和 1 株 *Lactococcus*, 发酵时选用校准的 MRS 头肉汁培养基 (乳杆菌), 或选用强化 0.05% 胱氨酸盐酸盐的 MRS 培养基 (*Bifidobacterium*), 对于 *Lactococci* 则选用 5% 葡萄糖替代乳糖的 M17 肉汁培养基。氨盐添加以保持 pH 的恒定, 生产的规模为 10~40L。当氨盐的消耗放缓时停止发酵, 冷却后发酵物被离心或过滤浓缩, 后添加冷冻保护剂, 在液氮中冷冻发酵剂浓缩物或进行冷冻干燥。所有菌株经过相同校准加工程序, 最后对冷冻或冷冻干燥发酵物进行质量鉴定和分析。

表 4-46 制备发酵物所用菌株

菌种	菌株	菌种	菌株
<i>L. salivarius</i>	UCC118	<i>L. crispatus</i>	M247
<i>L. paracasei</i>	F19	<i>L. crispatus</i>	MU5
<i>L. rhamnosus</i>	GG(商业菌株)	<i>B. lactis</i>	BB12(商业菌株)
<i>L. johnsonii</i>	Lal(商业菌株)	<i>Lactococcus lactis</i>	TC-165.5

乳杆菌在 MRS 琼脂上计数, *Bifidobacteria* 则在 MRS+0.05% 胱氨酸盐酸盐上厌氧情况下 37°C 培养了 3 天进行计数, *Lactococci* 在 M17 琼脂上有氧 30°C 培养 2 天进行测定。在 -35°C 和 -45°C 冷冻发酵物的活体细胞须每两个月分析一次, -18°C 储存时 1~2 月后就要进行测定。冷冻干燥发酵物在 -18°C 和 5°C 储存情况下, 一年内要每两个月进行一次分析, 25°C 储存时要在 6 个月内进行相同间隔的分析。

(二) 益生菌的乳发酵性质

1. 发酵剂发酵物

表 4-46 中所列的所有菌株均用于乳制品的生产, 益生菌单独应用或和其他支持菌株结合使用, 支持发酵菌添加剂加快乳的酸化过程。常用的支持发酵菌株是 *S. thermophilus* (St-20), 也有应用酸奶常用菌 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 结合作为支持发酵物的, 所有支持发酵菌以冷冻形式添加。

益生菌在 RMS 肉汁培养基中 37°C 培养 16~18h, 离心浓缩, 以 $4 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^7$ cfu/ml 的浓度用于乳的发酵, 当和酸奶菌种 YC280 (*S. thermophilus*+*L. bulgaricus*) 一起应用时, 益生菌均以冷冻干燥形式添加。

2. 益生菌活体细胞的选择性分析

在 MRS 琼脂上 pH=5.4 时对 *L. bulgaricus* 进行微生物计数, *S. thermophilus* 则应在 M17 琼脂进行测定, *L. paracasei*F19 以菌落形态学为基础可和 *L. bulgaricus* 进行区分。对于其他益生菌的选择性计数, 基本采用如下方法: ①对于 *L. salivarius* UCC118 应用含 250 μ g/ml 利福平的 MRS 培养基进行计数; ②*Lactobacillus rhamnosus* GG 应用含 50 μ g/ml 万古霉素的 MRS 培养基; ③*Bifidobacterium* BB12 应用含 0.5 μ g/ml 双氯青霉素、1mg/ml LiCl 和 0.5mg/ml 胱氨酸盐酸盐的 MRS 培养基; ④*L. johnsonii* Lal 用含 0.5% 水杨苷的最小营养琼脂 (Minimal Nutrient Agar, MNA) 为培养基; ⑤*L. crispatus* MU5 和 M247 应用含有 0.3% 牛胆汁的 MRS 做培养基。

对于被 Enterbacteriaeae 组微生物污染的益生菌, 采用 NMKL 方法生产当日进行发酵产品中益生菌的分析, 对于酵母和霉菌污染的产品在保质期内按周次进行分析。

3. 发酵乳制品的生产和评估

在乳或强化生长促进因子乳中已进行了实验室规模的生长试验, 在所有试验中含 1.5% 脂肪的乳在 95°C 杀菌 5min。为了对益生菌为惟一发酵菌生长进行刺激, 在培养基中进行了强化葡萄糖 (2% V/V)、酵母浸膏 (0.038% W/V) 的实验。发酵通常在 42°C 进行, 除了 YC280 外可以在 38°C 进行发酵, 发酵过程直至 pH4.5 或发酵 20h 后停止。对于中等规模生产, 须在热处理前添加 1.5% 脱脂乳粉于乳中, 发酵温度时 38°C, 接下来是连续的酸化过程。

应用 Brookfield 设备进行黏度分析, 测定从 150ml 产品中分离的乳清分离物, 按 5 分方法进行产品评定。

(三) 发酵剂培养物的生产和存活

1. 发酵剂产量和生产过程中菌的存活

所有菌株在发酵的情况下能很好地进行重复生产，活菌数达到 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/ml (见图 4-35)。在液氮中浓缩物的活菌储存过程中呈稳定性，但冷冻干燥的浓缩物菌在储存过程中存活情况明显不同，菌株 *L. paracasci* F19、*L. rhammosus* GG、*Bifidobacterium* BB12、*L. crispatus* M247、*Lactococcus Latis* TC-165.5 在冷冻干燥情况下能很好地存活，活体细胞达 10^{11} cfu/g 以上，诱变菌 *L. crispatus* MU5 的冷冻干燥比 LM24 有低的活体细胞数，而 *L. johnsoni* Lal、*L. salivaricus* UCC118 不能耐受冷冻干燥，活体细胞在冷冻干燥过程中损失明显。对于多种菌株需要特定的发酵介质和测试最适发酵条件，加工条件的改变有利于菌的存活。

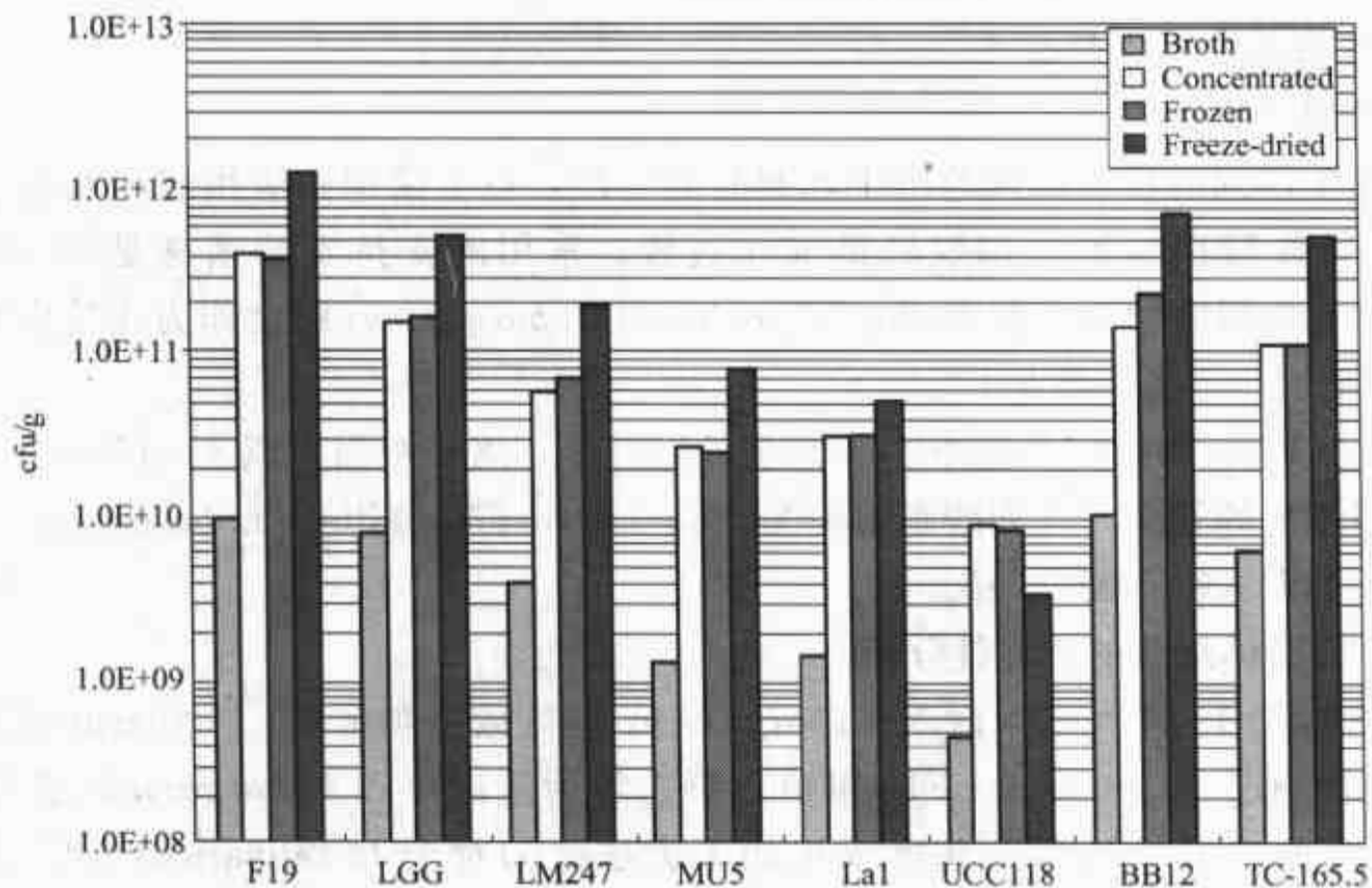


图 4-35 发酵物的产量和在冷冻、冷冻干燥过程中浓缩发酵物的存活

2. 发酵剂的存储稳定性

(1) 冷冻发酵剂菌的存活

冷冻发酵剂一般应用于干冰运输，其在使用前不允许融化。冷冻发酵剂在 -180°C 存储时多数菌株活体细胞下降 0~1 个对数周期。诱变菌株 *L. crispatus* MU5 在 -45°C 储存 12 个月活体细胞损失超过 1 个对数周期，和菌株 LM247 比较发生了细胞结构的改变。不易生长的菌株在一年存储后仍有 10^9 cfu/g 以上的活体细胞。上述结果正是为了保持冷冻发酵物在 12 个月存储后仍有高的活菌数，要求存储温度在 -35°C 以下。

(2) 冷冻干燥发酵剂菌的存活

在 25°C 冷冻干燥发酵剂的存储实验表明：所有的菌株能耐受 2 周的运输传送，他们中的大多数能在 25°C 时很好地存活一年以上。所有的冷冻干燥发酵剂 -18°C 均能存储一年以上，大多数在 5°C 存储一年以上没有大的活体细胞损失。*L. salivaricus* UCC118 的低活菌数 ($<10^{10}$ cfu/g) 是因为在冷冻干燥过程中他不易存活，所有在加工过程中存活下来的菌体细胞在存储过程中均能很好地保持。研究表明冷冻干燥是一种有效的保存益生菌发酵剂的方法，但加工的最佳条件也是影响活菌数的最重要因素之一，对于特殊菌种最适的发酵条件导致冷冻干燥物中存在较高的活体细胞。

(四) 乳发酵性质

1. 益生菌作为惟一发酵剂的情况

当益生菌作为惟一发酵菌进行乳制品时，在 42℃ 发酵 20h 乳的 pH 仍在 5.4 以上，仅有的两个例外是以 *Bifidobacterium lactis* BB12 和 *L. johnsonii* La1 作为发酵剂，20h 发酵后 pH ≤ 4.5，这表明单独应用益生菌作为发酵剂发酵乳是困难的，但这依赖于菌株的类型和发酵剂中活菌数。2% 葡萄糖添加于乳中有助于 *L. rhammosus* GG 和 *L. paracasei* F19 的生长和乳的酸化，酵母提取物改善了大多数菌的生长，二者结合对 LGG 的生长促进比葡萄糖单独使用效果要好。一种或多种乳蛋白生长促进剂明显加速了 F19、M247、MV5 的酸化过程，对 UCC118 和 BB12 无效，但 BB12 的生长明确地被乳蛋白成分所促进。相反地 La1 的细胞数较低，但其 pH < 4.5。诱变菌株 *L. crispatus* MV5 和 *L. salvarius* UCC118 在任何情况下培养 20h 仍不能酸化至 pH 4.5 以下。LGG、F19、BB12 在乳中或强化乳中活菌数增加，菌株能很好地存活 14 天。

2. 和支持菌共同发酵

当益生菌和支持菌 St-20、YC280 和 YC380 一起发酵时，支持菌决定了酸化的时间。许多情况下益生菌和支持菌结合促进了酸化的速率，如 St-20 和 F19、LGG 或 La1 结合的结果是如此（见表 4-47）。酸奶菌种 YC280 发酵 5.5~6.0h pH 降至 4.5 以下，除 F19 和 LGG 以外的全部益生菌通过支持菌的加入缩短发酵时间 30min 以上。

单一益生菌发酵或和支持菌结合发酵，益生菌在 14 天的存储过程中保持稳定（图 4-36），菌下降的范围在 0.5 个对数周期内；许多情况下在存储期活菌数增加，这可能是由于

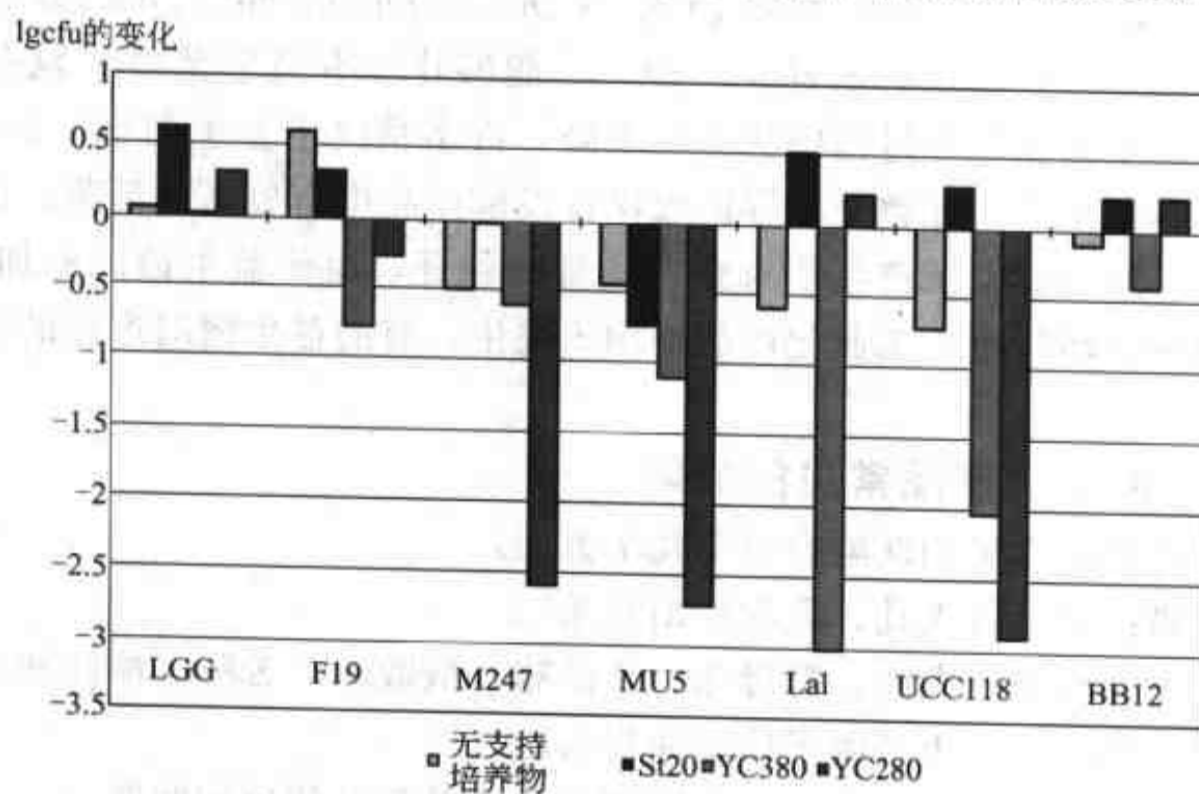


图 4-36 不同发酵剂发酵乳制品的菌存活情况
(+4℃、14天) -无支持菌, St-20

菌由链状分裂为单细胞。为了使达到 pH 4.5 的生产时间标准化，应用 St-20 进行了不同的培养速率实验，结果表明益生菌的存活仅有很小的不同。

表 4-47 *L. paracasei* F19 不同发酵情况下酸的形成

发酵剂	至 pH=5.5 的时间	至 pH=4.5 的时间	20h 后的 pH
F19	18	>20	5.1
St-20(1:10)	8.5	>20	4.7
F19+St-20(1:10)	5.5	10.5	n. d.
St-20(1:100)	10	>20	4.7
F19+St-20(1:100)	7	14.5	n. d.

益生菌 LGG、F19 和 BB12 在和酸奶发酵剂结合发酵后菌体细胞几乎保持不变，*L. jojosonii* 也呈稳定性。其他的 3 株非商业化的乳杆菌菌株在 2 周贮存损失了 0.5~3.0lgcfu，表明选择和益生菌一起发酵的支持菌是十分重要的。

(五) 发酵乳制品的性质

当益生菌和 YC280 一起发酵时对产品黏度产生重要影响，共同发酵产品的黏度低于用 YC280 单独发酵的产品。仅有的例外是 *L. paracasei* F19 菌株，共同发酵产品相似。益生菌对 *S. thermophilus* St-20 发酵乳的黏度没有重要影响。

用 St-20 发酵的产品没有后发酵现象，但 St-20 的接种量低于推荐量 1/50 时则有后酸化情况发生。当 YC280 用于中式实验时 pH 两周内由 4.5~4.6 下降为 4.2~4.3。乳清析出在 0.1%~0.9% 之间，对于 YC280 发生最高的脱水收缩现象，大多数益生菌会加剧脱水现象，但 *L. crispatus* M247 和 YC280 比较降低了乳清析出。

从感官方面看，单独发酵和组合发酵间没有明显的不同，所有产品在感官质量方面均可接受，无异味产品出现。

综合可以看出：冷冻和冷冻干燥发酵剂用于生产益生菌产品是成功的，*L. salivarius* 是一例外，它需要定制培养基和实验最适工艺以改善加工稳定性。冷冻干燥形式的发酵剂贮存稳定，-45℃ 12 个月贮存仍是可接受的产品。许多益生菌在乳中生长缓慢，LGG 不发酵乳糖，*L. johnsonii* Lal 需要 4 种氨基酸、4 种核苷酸和铁源才能很好地生长。葡萄糖、酵母浸膏的添加改善了大多数菌的生长，据此确定单独益生菌生产产品的最适工艺参数。但应用益生菌发酵产品较好的方法是和酸奶菌种 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus*，也可以和 *S. thermophilus* 结合进行发酵，*S. thermophilus* 能够让所有益生菌很好地存活。当和酸奶发酵剂结合时，益生菌在贮存过程中活菌数下降，许多情况下益生菌也存在不下降的情况。故说明对于每一种益生菌，在整个贮存期内保持发酵产品中有较高的活菌，选择适宜的支持菌是十分重要的。所有益生菌产品均有感官质量的保证，由于益生菌的添加 YC280 酸奶黏度下降，后发酵和乳清析出在工业化产品中均未发生，有的益生菌对产品的质地还具有改善作用。

四、双歧杆菌酸奶产品常见的缺陷

双歧杆菌酸奶产品常见的缺陷有以下几个方面。

(1) 外观缺陷：表面有气孔、乳清析出现象。

(2) 风味缺陷：太酸或太淡、酵母味、干酪味、酸败味、苦味、醋味和芳香味不足是其常见的风味缺陷。风味也受生长因子的添加影响。

(3) 质构缺陷：乳清析出、汤状，沙感或黏液状是常见的质构问题。

(4) 卫生缺陷：大量污染物如 Coliforms、酵母、霉菌的生长。

随着双歧乳制品种类、数量的不断增加，对有关双歧菌制品的许多问题应该法规化、程序化，对双歧菌的摄取量、菌数水平、菌数测定方法目前尚无标准可遵循，日本的企业间自行制定的“发酵乳、乳酸菌饮料公平竞争法规”上规定双歧菌的含量不得少于 10^7 /ml，但由于没有规定双歧菌的测定方法，许多制品达不到此标准，另有许多打着双歧菌制品幌子的制品根本不含双歧菌，造成这一局面最根本的原因在于没有法定双歧菌测定方法，目前找出一种对全部双歧菌适用，且对含有其他乳酸菌的混合发酵制品中双歧菌测定也适用的简单方法，是十分困难的。双歧菌的测定分为非选择培养基和选择培养基两种方法，厌氧培养时一般选用钢丝棉法和气体填充法，一般应用非选择性培养基，用钢丝法进行厌氧培养，在相同

培养基上同时进行非厌氧培养，然后观察菌落性状、形态、好氧性发育情况，记录双歧菌的数量，此法称为光冈法，为了更好的开发研制新型双歧菌制品和保证现有双歧菌制品的质量，尽快建立双歧菌通用的测定方法是十分必要的。

五、双歧杆菌产品的开发情况

由于认识到双歧杆菌对人体有益作用，人们很早就开始从事双歧杆菌制品的开发和研究，德国早在 20 世纪 40 年代即已将双歧杆菌制剂用于婴儿消化道疾病的防治，日本的第一个双歧制品是由森永乳业公司于 1971 年开发的，现今日本已成为世界上最大的双歧杆菌制品生产国，已生产的约有 70 多个品种，其中 50 种以上是乳制品，包括酸奶、乳饮料、干酪、奶粉、酪乳、酸性稀奶油等，在法国、美国、印度、英国等许多国家双歧杆菌制品生产的增长都很快。前苏联还将双歧杆菌制成保健食品，供长期从事空间飞行的宇航员使用，除乳制品外，双歧杆菌还被应用于发酵肉制品、蔬菜汁的制造。除食品和保健药品外，双歧杆菌还被应用于畜牧兽医领域，制成饲料添加剂用于小猪、犊牛、犬腹泻的预防和治疗（见表 4-48~表 4-50）。

表 4-48 双歧制品（食品类）一览表

名称	特点	生产国
婴儿食品	乳基婴儿食品	日本
Bifidus 炼乳	乳酸菌浓缩物(含双歧菌)添加于热处理甜炼乳中 含 <i>B. longum</i> 和 <i>L. acidophilus</i> 的甜乳,由森永公司生产 含 <i>Bifidobacteria</i> 的冷冻干燥粉添加灭菌乳中(2%)	美国 日本 Mutai 等
发酵乳制备物	生产含 <i>bifidobacteria</i> 的发酵乳,也有少量 BAT 发酵乳生产 强化蛋白、乳糖酶的发醇乳,用 <i>S. Lactis</i> subsp. <i>diacetylatis</i> , <i>S. crepauoris</i> , <i>L. acidophilus</i> 和 <i>B. bifidum</i> 发酵,称为 PROGURT 含 <i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>pediococcus</i> 和 <i>Acidilactici</i> 的发醇乳,也生产婴儿食用的干基乳制品 BAT 发醇乳,也生产含 <i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> 和酸奶发醇菌种的发醇乳(酸奶菌种添加量 0.01%~0.1%) 生产含 <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> 和 <i>L. bulgaricus</i> 的发醇乳 利用 <i>B. longum</i> , <i>S. thermophilus</i> 和 <i>L. bulgaricus</i> 菌生产发醇乳,也生产含 <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> 和 <i>L. acidophilus</i> 的发醇乳(Mil-Mil, Yakult 公司) 生产 <i>Bifidobacteria</i> 和酸奶菌种混合的发醇乳 生产强化乳糖酶的含 Bifidus 发醇乳,实行三段发醇: <i>S. Lactis</i> 和 <i>L. citrovorum</i> 一段发醇, <i>L. bulgaricus</i> 和 <i>S. thermophilus</i> 二段发醇, <i>L. acidophilus</i> 和 <i>B. bifidum</i> 三段发醇 生产含 <i>Bifidobacteria</i> 发醇如 BAT 发醇乳	加拿大 智利 南联盟 德国 意大利 日本 波兰 美国 独联体、阿根廷、法国、澳大利亚、瑞典
不同的乳制品和食品	用于酸奶、Kefir 乳,酪乳,干酪、新鲜干酪、酸奶油、Quark creme、冰淇淋、农家干酪和 tvarog 的生产	
成人应用的治疗性双歧菌制品	Infloran Berna 产品:1977 年上市和出口,是含 10^9 <i>L. acidophilus</i> 和 10^9 <i>B. infantis</i> 的冷冻干燥物,用于非母乳喂养婴儿消化不良、抗生素治疗后的胃肠炎和慢性便秘治疗 Euga-Lein,从 1973 年开始生产含 <i>Bifidobacteria</i> 不同菌株的混合物,其化学组成如下:脂肪 1.80g、蛋白质 15.10g、碳水化合物 71.10g、矿物质 3.10g、纤维 1.80g、Vc0.20g、热量 1432kJ(每 400g 粉) Eugalan Topfer Forte,100g 粉中含乳蛋白 9.40g、植物蛋白 0.70g、乳糖 62.60g、乳果糖 5.90g、盐 3.00g、无脂、无面粉、热值 1498kJ,含双歧菌 Lactopriv,含双歧菌,100g 粉中植物蛋白 17.35g、植物脂肪 12.30g、碳水化合物 64.00g、无乳糖、盐 4.00g、纤维 1.19g 糖精 6.70mg、强化 VA、V _{B3} 、VC 和 Fe,热值 1850kJ	瑞典 德国 德国

续表

名称	特点	生产国
成人应用的治疗性双歧菌制品	Milk Sugar Topfer: 250 克粉含 <i>B. bifidum</i> 和 $V_{B_{12}}$, 乳糖 97.10g、脂肪 0.05g、蛋白 1.90g、矿物质 2.40g、热值 1683kJ	德国
	Omniflora: 含 <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> 和 <i>E. coli</i> . Indication, 用肠道菌群紊乱的治疗	德国
	Synerlac: 含 <i>B. bifidum</i> , <i>L. acidophilus</i> 和 <i>L. bulgaricus</i> 的冷冻干燥产品, 用于急慢性肠炎, 痢疾和肠道感染治疗	法国
	J: 含 <i>Bifidum</i> 的冷冻干燥产品, 具有高的产酸活性和轻的醋酸味, 在胃 pH 存活率高, 用于婴儿肠炎处理	南斯拉夫
	Lyobifidus: 含 10^8 /g 最少 10^6 /g 的活菌, 治疗痢疾	法国

表 4-49 商品化的益生菌产品

产品名称	存在益生菌	产品性质描述
Kyo-Dophilus 胶囊 (waku-naga 益生菌)	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. longum</i>	含有来自人体菌株, 每个胶囊含 15 亿活菌细胞
Kyo-Dophilus (wakunaga 益生菌)	<i>L. acidophilus</i>	稳定制备物, 不需冷冻, 完全素食化的乳制品, 无糖。能咀嚼, 方便携带
Acidophilus (wakkunaga 益生菌)	<i>L. acidophilus</i> 脂酶、蛋白酶、乳糖酶	由于酶的存在可分解脂、蛋白和碳水化合物, 并可分解乳糖, 防止乳糖不耐症
Flora Grow (Arise 和 Shine)	<i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. bifidum</i>	产生 pH 介于 6.5 ~ 7.0 之间而不是像 <i>L. acidophilus</i> 产品一样 pH 为 4.5, pH4.5 会导致人肠道有益菌的死亡
Bifa15 (Eden 食品)	<i>B. longum</i>	含 <i>B. longum</i> 的微胶囊, 它通过胃酸达到结肠, 产生抑制 HIV 的环境, 同时对 <i>Candida</i> 和其他肠道感染形成抑制
TH1 益生菌 (Jarrow Formulas)	<i>B. longum</i> <i>Saccharomyces boulardi</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i>	含 10 亿 <i>B. longum</i> , 5 亿 <i>saccharomyces boulardi</i> , <i>L. casei</i> 和 <i>L. plantarum</i> , 被热处理以利严重免疫缺损的漏肠病人的安全应用
Replenish (Inner cleanse 2000)	<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. bifidus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> <i>L. brevis</i> , Fos	有益短链脂肪酸的增加, 血脂、血压的减少, 改善肝脏功能, 排除有害化合物, Fos 帮助促进有益菌生长, 同时减少了有害菌的定殖
Flora Bac (PDI labs)	稳定的 <i>Bifidobacteria</i> 和 <i>Acidophilus</i> <i>L. sporogenes</i> <i>Bacillus laterosporus</i> BOD, 产酶菌	
VSL#3 (CSL)	5×10^{11} cfu/g 的菌, 包括 3 株 <i>Bifidobacteria</i> , 4 株乳杆菌和 1 株 <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	在肠道定殖, 帮助对 5-氨基水杨酸过敏或不耐受的患者减轻肠炎症状
Subalin	再结合的益生菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
Colinfant, Mutaflor	非肠道病原菌 <i>Escherichia coli</i>	活性口服剂, 定殖在婴幼儿肠道, 形成肠道寄宿菌。刺激定殖婴儿肠道、唾液和血清中抗体的产生, 降低病原微生物在肠道及其他黏膜表面的定殖

续表

产品名称	存在益生菌	产品性质描述
Symbiotik 胶囊 (Le Sante)	<i>L. sporogenes</i> 抗生素羟苄氨青霉素和邻氯青霉素	每个胶囊含 250mg 羟苄氨青霉素, 250mg 邻氯青霉素和 6000 万 <i>L. sporogenes</i> 活菌, 用于呼吸道感染、ENT 感染、皮肤和软组织感染、尿路感染
Primal Defense 胶囊	含 HSO, 包括 <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lc. lactis</i> 和 <i>L. bulgaricus</i> , 每个胶囊含 250mg HSO, 160mg 有机绿草汁, 80mg 植物苜蓿醇/苜蓿醇混合物	食品强化剂, HSO 被胶囊化, 产品无需冷冻有 3 年保质期; 它具有抗病毒、免疫调节作用, 对过敏反应、病毒、纤维瘤、肿瘤等有一定疗效, 它也具有降血脂作用
Symbiotic-p 片剂 (Le sante)	<i>L. sporogenes</i> 抗生素羟苄氨青霉素和邻氯青霉素	每个片剂含 125mg 羟苄氨青霉素, 125mg 邻氯青霉素和 30mg <i>L. sporogenes</i> 芽孢, 应用于呼吸道感染、ENT 感染、皮肤和软组织感染、尿路感染等

表 4-50 *Bifidobacterium* spp. 和 *L. acidophilus* 在医药和功能食品中的潜在应用

菌株	实验参数	观察结果	作用	参考文献
固有微生物 <i>L. acidophilus</i> RP32 <i>L. acidophilus</i> P47	细胞分析, 在含牛胆汁的 1% RMS 培养基中批次培养	厌氧条件下在牛胆汁存在时具有胆固醇去除作用。牛胆汁存在引起肉汁中胆固醇下降, 菌细菌下降更多。RP32 和 P47 具有胆汁抗性, 但仅 RP32 在牛胆汁盐中可分解胆固醇	降胆固醇作用	Gilliland
<i>L. acidophilus</i> Rp32 <i>L. acidophilus</i> MUH41 <i>L. acidophilus</i> MUH79 <i>L. acidophilus</i> MUH117 <i>L. acidophilus</i> CH1 <i>B. bifidum</i> MUH80	细胞分析, 在含牛胆汁酸的 1% RMS 培养基中批次培养	RP32 在低 pH 时对于胆固醇和胆汁盐的沉淀有效。在上清液中或后培养细胞中无胆汁酸存在	降胆固醇作用(在解离胆汁酸和低 pH 情况下胆固醇共沉淀)	Klaver 和 Vander mer
<i>B. longum</i> BB536 <i>B. breve</i> ATCC15700 <i>B. animalis</i> ATCC25507	在含牛胆汁酸 TPY 介质中进行剩余细胞实验分析	通过沉淀和同化作用去除胆固醇, <i>B. longum</i> BB536 在解离胆汁酸方面最有效	降血脂作用	Tahri 等
<i>L. acidophilus</i> TK8912	由 <i>L. acidophilus</i> 产生的细菌素 scidocin8912 的作用模式研究	通过质子驱动力和孔的形成, 抑菌作用引起目标菌胞质膜透过性的增加	抑菌活性	Tahara 等
<i>L. acidophilus</i> 301	<i>L. acidophilus</i> 对不同病原菌的抑制作用	经 8h 培养后病原菌的数量迅速下降, 这是由于 <i>L. acidophilus</i> 产生酸和细菌素的作用	抑菌活性	Gupta 等
<i>B. longum</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>	Caco-2 分泌的 HT29-MTX 细胞的黏着性研究	对人上皮细胞的黏着、肠道内菌的定殖和对肠病原菌的抑制	肠黏膜障碍的稳定剂、免疫促进物	Bernet 等
<i>Bifidobacterium</i> ssp	6 株菌进行诱变性亚硝酸盐、亚硝胺的测试	在 $< 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 亚硝酸盐和 $< 200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 亚硝胺情况下没有生长抑制。亚硝酸盐通过非酶机理, 可能是通过菌的产酸被去除。 <i>B. longum</i> 通过细胞内机理代谢亚硝胺	抗癌作用	Grill 等
<i>B. infantis</i> (NCFB2205) <i>Bifidobacterium</i> ssp	和 <i>E. coli</i> , <i>C. perfringens</i> 一起培养	抑菌作用可能和产酸、产生的抑菌物质有关	抑菌活性 (可能对胃肠有保护作用)	Gibson 和 wang

续表

菌株	实验参数	观察结果	作用	参考文献
L. acidophilus ATCC 4356 B. thermophilus ATCC 25866 B. breve ATCC 14917	在改进的 TPY 培养基上进行细胞生长,在 pH5.0 和 6.0 的两种介质中进行 Fe ²⁺ 积累,研究葡萄糖作为能源的影响	通过假定的细胞铁氧化酶 Fe ²⁺ 进入细胞部分氧化为 Fe ³⁺ ,酶利用 O ₂ 作为底物促进 Fe ²⁺ 氧化,葡萄糖有辅助作用。通过 H ₂ O ₂ 的释放 L. acidophilus 实现细胞内氧化, Fe ²⁺ 不再被病原菌利用	营养免疫 (抑菌活性)	Kot 等
B. longum SBT2928 和其他 Bifidobacterium spp.	Bifidobacterium spp. 和 E. coli Pb176 在 GA1 上的竞争结合	Bifidobacterium spp. 对 E. coli Pb176 在 GA1 上的结合呈竞争排斥状态, B. longum 产生的结合抑制剂是蛋白质分子, E. coli 在肠道表面的结合受到抑制	抑菌活性	Eujiwara 等
B. longum SBT2928 (BL2928)	研究了它对葡萄糖代谢、IL-1 产生、吞噬细胞的细胞毒性的影响, BL2928 有高的促有丝分裂活性	葡萄糖的吸收和细胞毒性促进 IL-1 的产生。IL-1 的刺激活性和有丝分裂活性相关	免疫促进剂	Kado-oka 等
B. adolescentis M101-4	在鼠脾细胞和 peyer 细胞测试中具有促有丝分裂活性。多聚糖的性质 (SHF), 水溶性部分的分离、纯化和特征通过半乳糖吡喃糖残基来表征	B. adolescentis 有促有丝分裂活性。SHF 可以促进鼠脾细胞生长	免疫促进剂	Hoson 等
膳食辅助剂 L. acidophilus S. thermophilus	以乳猪为对象,进行 4 周实验,分析其胆固醇、三甘油酯和脂蛋白变化	用 30% 酸奶喂食 15 天,三甘油酯和血脂胆固醇下降	降胆固醇作用	Jones 等
L. acidophilus LA2	用 LA2 的发酵乳对人体实验,比较摄入前后的诱变性	摄入后诱变性受到抑制,所有人粪便中 Lactobacillus spp. 和 Bifidobacterium spp. 的数量增加	人肠道的抗诱变作用	Hosoda 等
B. longum L. acidophilus	16 个女性和 8 个男性年龄介于 19~59 岁之间进行一周实验,对空肠抽取物和粪便样品进行微生物评估	在摄入期间粪便中厌氧菌比例下降	肠道定殖	Nielsen 等
B. longum	12 人进行为期 3 周实验,应用 10 ⁹ cfu/L 的酸奶 500g 外加 5g/L 的异构化乳糖或不加此糖	增加了肠道 Bifidobacteria 的量,对粪便微生物有稳定和改善作用	肠道菌的定殖,对肠癌的潜在作用	Bartram 等
L. acidophilus LA1 B. bifidum Bb12	健康人群摄入 2 株菌中含某一株的产品,对血液样品测试,摄入时间为 3 周	在摄入后粪便中有 6 周菌的定殖。增加了 E. coli 的吞噬作用,无专一性的抗感染机制得到提高	免疫促进	Schiffrin 等
B. longum (添加异构化乳糖)	测试 61 只鼠,13 周喂食后,结肠 ACF 和结肠黏膜、肾上谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的活性	异构化乳糖和 B. longum 结合,或 B. longum 单独喂食均减少了 ACF 和异常滤胞的总数,结肠黏膜 GST 水平在较高 pH 和 ACF 数量间呈高度的正相关	抗肿瘤作用	Anjana 等

双歧杆菌对氧敏感,营养要求特殊,不耐酸给双歧杆菌发酵乳制品的生产贮存都带来很大的问题,为了提高双歧杆菌发酵制品贮存稳定性,人们正在研究用微胶囊技术对双歧杆菌进行包埋,以减少 O₂、酸对它的损害。此外低酸、冷冻乳制品也使将双歧杆菌带入人体的良好载体。

六、采用 *Bifidobacteria* 生产的豆乳产品

Karnaly (1998) 进行了 *Bifidobacteria* 的豆乳产品研究, *Bifidobacteria* 在再制脱脂乳 (RSM)、豆乳和修改的 MRS 肉之中的竞争生长情况如表 4-51 所示。*B. longum* 和 *B. bifidum* 的生长情况如图 4-37 和 4-38 所示。*Bifidobacteria* 在 RMS 中有较高的生长速率, 豆乳次之, MRS 中 *B. longum* 和 *B. bifidum* 的专一性生长速率为 $k=0.40\text{h}^{-1}$ (相当于 104min 的一代时间) 和 0.48h^{-1} (相当于 87min 一代时间), 在豆乳中的对应值是 0.30 和 0.39h^{-1} (相当于 139 和 107min 一代), MRS 中则为 0.45 和 0.54h^{-1} (相当于 92 和 77min 一代)。在豆乳中 *B. longum* 和 *B. bifidum* 的活菌数增加了 1.8 和 2.4 级数, 相应地在 RMS 中为 2.5 和 2.7, MRS 中为 2.8 和 3.0, 值得注意的是在 RSM 中两株菌表现出可比性的 pH 变化, 在 1.01 和 1.30 单位之间。对于许多乳酸菌以豆乳作为合适培养基均发现类似的结果, 如 *S. thermophilus*、*L. delbrueckii*、*L. pentosus*、*Ln. mesenteroides*、*L. acidophilus*、*Lc. lactis*、*Ln. lactis*、*L. casei* 和 *L. helveticus*。*Bifidobacteria* 在豆乳中的生长和酸化过程不受单糖和寡糖存在的限制, 因为它具有 α -半乳糖苷酶活性, 能水解 α -D-半乳糖苷键, 且有实验表明口服豆乳中含有的棉子糖河水苏糖增加了人体粪便中 *Bifidobacteria* 的量。

表 4-51 在不同培养基上 *Bifidobacteria* 的生长和酸化情况

发酵菌	介质	lgcfu/ml		K/h ⁻¹	pH	
		开始	最终		开始	最终
<i>B. longum</i>	RSM	6.0	8.5	0.40	6.50	5.32
	豆乳	5.9	7.7	0.30	6.99	5.69
	MRS 肉汁	6.1	8.9	0.45	6.40	4.50
	RSM	5.9	8.6	0.48	6.45	4.86
<i>B. bifidum</i>	豆乳	5.7	8.1	0.39	7.00	5.99
	MRS 肉汁	6.0	9.1	0.54	6.42	4.40

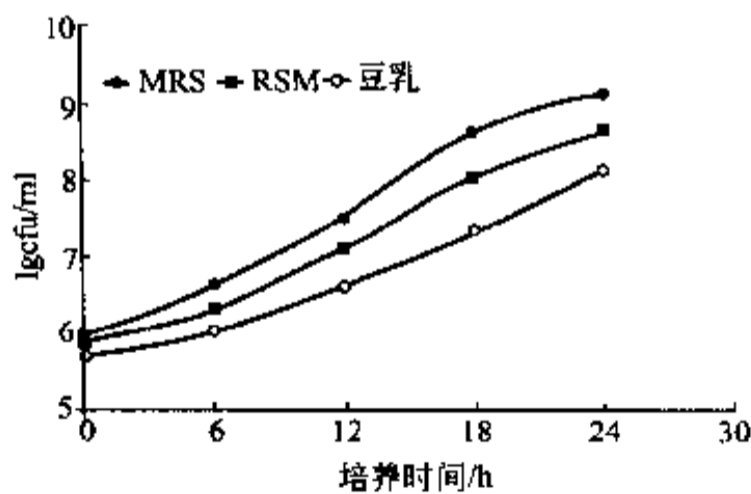


图 4-37 *B. longum* 在不同培养基上的生长

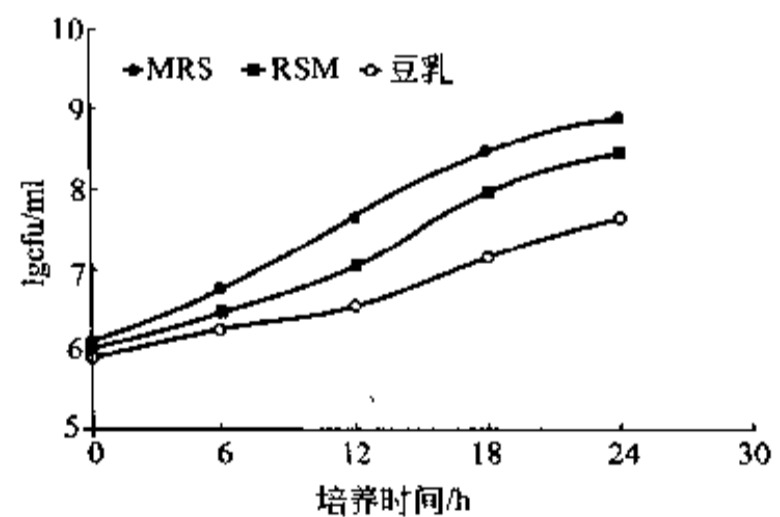


图 4-38 在不同培养基上 *B. bifidum* 的细胞生长

通过测定在不同培养基中释放氨基酸的量可评估在不同介质 *Bifidobacteria* 产生蛋白酶的活性, 具体情况如表 4-52 所示。由于在 *B. longum* 和 *B. bifidum* 生长过程中通过 α -氨基基团的释放为指示的蛋白质和肽的水解呈上升趋势, 此情况在豆乳中较 RSM 更为明显。这种释放游离氨基酸水平的不同可能反映了在豆乳和 RSM 氮源底物不可利用性的差异。在豆乳中这些微生物较高的蛋白水解活性可能反应了这些菌具有代谢寡聚糖、棉子糖和水苏糖的能力, 故达到较高的细胞密度。

表 4-52 *Bifidobacteria* 的蛋白水解活性

发酵菌	介质	游离氨基酸培养时间/天					
		0	1	2	4	8	12
<i>B. longum</i>	RSM	0.80	0.92	1.39	3.40	3.24	1.52
	豆乳	0.82	0.83	1.29	3.72	3.50	1.95
<i>B. bifidum</i>	RSM	0.76	0.86	1.18	2.99	3.14	1.58
	豆乳	0.80	1.02	3.50	5.20	5.00	3.10

用 CO₂、蛋白水解物强化豆乳和单独豆乳发酵, *B. longum* 和 *B. bifidum* 生长的 pH 变化和活体细胞情况如表 4-53 所示。*B. bifidum* 的生长用 CO₂ 或蛋白水解物强化培养基有类似的结果, 但 *B. bifidum* 的生长不受 CO₂ 或蛋白水解物强化的影响; 用蛋白水解物处理豆乳 pH 的变化较大 (在 2.09 和 2.46 单位之间), 同样用 CO₂ 处理 pH 变化也较大 (在 2.32 和 2.36 之间), 均较单独豆乳发酵大 (1.01 单位); 对于 *B. longum* 用 CO₂ 强化培养基 pH 变化和单独豆乳发酵相似, 相反地蛋白水解物强化不影响酸化情况。Angels 等发现许多氮源 (乳清、肽) 添加于豆乳中对许多菌的生长不产生有益的影响, 如 *Lc. lactis*、*Ln. lactis*、*L. diacetylactis* 和 *L. delbrueckii*。相反地用葡萄糖或乳糖强化豆乳促进了链球菌和乳杆菌中多种菌的生长和产酸, 也包括 *L. acidophilus* 的 4 株菌在内。他们研究的一个有趣结果是没有任何物质对 *B. bifidum* 和 *B. longum* 菌数增长产生刺激作用, 相对而言对产酸产生促进作用; 菌生长和产酸间的不相关现象, 对于乳酸菌在多种不同介质中实验均有类似报道, 如 Roy 等 (1990) 报道强化酵母浸膏乳促进了酸化, 但没有 *B. infantis* 的细胞增长情况被发现, 但 Kim 等 (1995) 发现强化酵母浸膏的酸奶中 *B. infantis* 增长和酸化加快同时发生。

表 4-53 强化 CO₂、蛋白水解物豆乳细胞生长和 pH 变化情况 (37℃ 培养 24h)

添加剂	发 酵 菌			
	<i>B. longum</i>		<i>B. bifidum</i>	
	lgcfu/ml	pH	lgcfu/ml	pH
豆乳(对照)	8.50	5.69	8.60	5.99
添加酵母浸膏豆乳	7.17	5.98	8.20	4.54
蛋白胨	7.34	6.42	8.87	4.91
Casitone	7.07	6.40	8.82	4.88
多肽	7.38	6.64	8.60	4.74
植物蛋白胨	7.54	6.20	8.39	4.61
葡萄糖	7.03	5.61	8.49	4.67
半乳糖	6.88	5.43	8.50	4.68
乳糖	7.16	5.70	8.44	4.64

在氨基酸存在情况下, 尤其是含硫氨基酸胱氨酸和蛋氨酸存在情况下, *B. bifidum* 生长和酸化情况如表 4-54 所示。由于豆乳中缺乏含硫氨基酸, L-胱氨酸是惟一的 *Bifidobacteria* 生长限制性含硫氨基酸。*B. longum* 被单独氨基酸促进的生长和酸化顺序为: 胱氨酸 > 甘氨酸和精氨酸 > 蛋氨酸 > 天门冬氨酸; *B. bifidum* 的顺序为: 胱氨酸 > 蛋氨酸 > 精氨酸 > 谷氨酸 > 甘氨酸 > 丙氨酸 > 苏氨酸。*B. longum* 和 *B. bifidum* 在胱氨酸强化豆乳中的数量是未强化豆乳的 5 倍 (9.2、9.50lgcfu/ml 对应 8.5、8.6lgcfu/ml)。两种氨基酸胱氨酸和苏氨酸结合使用对菌的生长和产酸具有很明显的增效作用, 在强化这两种氨基酸的豆乳中 *B. longum* 和 *B. bifidum* 的菌数是未强化豆乳的 10 倍。Cheng 等 (1983)、Collins 等

(1984) 和 Roy 等 (1990) 均证实有这种结果, 他们发现胱氨酸对 *Bifidobacteria* 的生长和酸化有促进作用; Murad 等 (1997) 用单一氨基酸强化水牛乳促进了 *B. bifidum* 的生长和酸化, 它们应用的氨基酸为 3mmol/L 赖氨酸、甘氨酸、胱氨酸和谷氨酸。以上结果说明 *Bifidobacteria* 的生长主要依赖于混合氨基酸的平衡, 至少依赖于含硫氨基酸的平衡。

表 4-54 在强化氨基酸的豆乳中 *Bifidobacteria* 的生长和酸化情况 (37 °C 培养 24h)

添 加 剂	发 酵 剂			
	<i>B. longum</i>		<i>B. bifidum</i>	
	lgcfu/ml	pH	lgcfu/ml	pH
豆乳(对照)	8.50	5.69	8.60	5.99
豆乳中添加				
胱氨酸	9.20	5.10	9.50	5.00
蛋氨酸	8.60	5.50	9.00	5.20
丙氨酸	8.40	5.93	8.50	5.90
甘氨酸	8.70	5.50	8.69	5.10
谷氨酸	8.60	5.52	8.84	5.10
天门冬氨酸	8.55	5.52	8.60	5.40
组氨酸	8.70	5.47	8.88	5.20
苏氨酸	8.42	5.90	8.40	5.85
胱氨酸+丙氨酸	9.10	4.75	9.44	4.49
胱氨酸+甘氨酸	9.00	4.90	9.60	4.93
胱氨酸+苏氨酸	9.50	4.60	9.70	4.45

用不同浓度豆乳强化的 RMS 培养基上菌的生长情况如表 4-55 所示。豆乳添加引起起始 pH 的增加, 这种增加随豆乳浓度增加而增加; 随着豆乳浓度的变化 *B. longum* 和 *B. bifidum* 的生长没有明显的不同, 在 RMS 培养基中对 *B. longum* 和 *B. bifidum* pH 下降的最大区间分别是 1.15 和 1.43。Angels 等报道杀菌豆乳的凝固发生在 pH5.7, 强化 20% 豆乳的 RMS 培养基形成脆性、软凝乳, 成豆腥味, 含有大量 *Bifidobacteria* 活菌, 故需加增稠剂改善质地和掩盖风味, 用于改善的各种物质和效果如表 4-56 所示。0.2%k-卡拉胶和混合氨基酸(胱氨酸和苏氨酸)明显改善最终产品质量, 尤其是异味掩盖。强化氨基酸(0.1~1.0g/L)的牛乳和脱脂豆蛋白混合物能用 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 生产出类酸奶产品, 通常强化的单一氨基酸为: 丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸和胱氨酸, 业已表明游离氨基酸的添加能有效地去除豆腥味。Sharshall 等 (1982) 应用强化乳清蛋白和苏氨酸 (0.1%) 的乳, 以 *Bifidobacteria* 的单一菌株 *B. longum* 或 *B. infantis* 或 *B. bifidum* 或 *B. adolescentis* 发酵, 获得具有典型酸奶滋气味和酸度的产品。

表 4-55 RSM 培养基用不同浓度豆乳强化后菌的生长情况

	发 酵 菌					
	<i>B. longum</i>			<i>B. bifidum</i>		
	lgcfu/ml	pH	%T. A.	lgcfu/ml	pH	%T. A.
对照	8.27	5.32	0.44	8.74	4.86	0.47
RSM 强化豆乳(%)						
20	8.38	5.40	0.40	8.73	5.07	0.41
40	8.60	5.67	0.33	8.73	5.48	0.35
60	8.71	5.69	0.23	8.68	5.65	0.29
80	8.88	5.73	0.21	8.69	5.79	0.20
100	8.68	5.78	0.20	8.70	5.99	0.19

表 4-56 用豆乳 (20%) 强化 RMS 中添加剂对产品质量的影响 (37°C 24h)

处 理	颜 色	风 味	质 地
含 <i>Bifidobacteria</i> 的 RSM	白	典型酸味	软滑凝乳, 轻微乳清析出
强化 20% 豆乳的含 <i>Bifidobacteria</i> 的 RSM	浅褐到灰色	酸味和轻微豆腥味	软、胶状、脆性凝乳, 乳清析出
含 <i>Bifidobacteria</i> 的强化豆乳 (20%) + 稳定剂 + 氨基酸混合物		典型的愉快酸味	硬、滑凝乳, 无乳清析出

用 *Bifidobacteria* 加工类酸奶产品的 pH 变化、乙醛含量和活体细胞的情况如表 4-57 所示。RSM 制造的类酸奶产品, 强化 20% 豆乳产品 *B. longum* 和 *B. bifidum* pH 的变化较未强化产品低, 分别为 0.21 和 2.14 单位对应 0.42 和 0.46 个单位。pH 的下降对于未强化组 *Bifidobacteria* 下降了 2 个数量级, 但强化豆乳产品仅下降了 0.5 个对数周期。*Bifidobacteria* 在含豆乳和氨基酸混合物的 RSM 培养基中的稳定性和胱氨酸的存在有关, 胱氨酸作为一种贡献因子减少了发酵乳的氧化还原电势, Marshall 等 (1982) 和 Martin (1992) 均有相似的实验结果。在冷冻贮存过程中含 *Bifidobacteria* 发酵乳的 pH 基本没有变化, 其活体细胞数明显变化, 这种变化呈菌株/种的依赖性。

表 4-57 含 *Bifidobacteria* 发酵乳 (7°C ± 1°C, 15 天) 贮存 pH、乙醛和活体细胞变化

发酵菌	发酵乳类型	贮存(天)	pH	乙醛	lgcfu/ml
<i>B. longum</i>	RSM	1	5.30	21.5	8.10
		7	5.29	22.4	7.33
		15	4.88	22.0	6.10
	RSM 强化 20% 豆乳 - 稳定剂 + 氨基酸	1	4.90	32.0	8.38
		7	4.72	32.3	7.48
		15	4.69	35.2	7.88
<i>B. bifidum</i>	RSM	1	4.86	23.4	8.70
		7	4.44	24.0	8.06
		15	4.40	24.6	6.54
	RSM 强化 20% 豆乳 + 稳定剂 + 氨基酸	1	4.74	38.6	8.72
		7	4.70	39.0	8.57
		15	4.60	40.2	8.34

用豆乳强化 RSM 的乙醛含量是对照组的 1.6 倍, 在贮存过程中呈一致性的增加, 这种结果表明强化氨基酸的 RSM 促进了氨基酸向乙醛的生物转换, 这种现象也在用不同氨基酸如苏氨酸、蛋氨酸和甘氨酸强化培养基的乳酸菌发酵实验上得以证实, 且苏氨酸的相互转化导致含 *Bifidobacteria* 酸奶中乙醛的释放。

Kamaly 的研究证实豆乳可以用作 *Bifidobacteria* 培养的排他性底物, 在豆乳中强化碳水化合物、蛋白水解物和氨基酸能促进 *Bifidobacteria* 的生长和酸化, 适宜的稳定剂、氨基酸混合物 (胱氨酸 - 苏氨酸) 和豆乳强化的 RSM 能够生产出以 *Bifidobacteria* 为惟一发酵菌种、质地优良的一类酸奶产品。

Chou 等 (2000) 将豆乳强化物质的范围进一步拓展, 强化 1.0% 不同碳水化合物的豆乳中 *B. longum* 活菌数变化情况如表 4-58 所示。在不同的测试碳源中豆乳强化葡萄糖在 48h 发酵后产生最高量的 *B. infantis* 和最低的 pH, *B. longum* 的较高值则是 bifitose、葡萄糖、乳糖、果糖或半乳糖强化的豆乳产品。*B. longum* 发酵豆乳 pH 变化较大的是 bifitose、乳糖、半乳糖或果糖强化产品, 在发酵结束时葡萄糖强化产品 pH 变化和对照组基本相同。表

4-59 是强化不同氮源 *Bifidobacteria* 生长和 pH 变化情况, 经 48h 发酵后在所有培养基中 *B. infantis* 的活体细胞达到 $8.3 \lg \text{cfu/ml}$ 水平, 仅有的一个例外是强化 N-Z-AmineA 的豆乳。强化酵母浸膏、蛋白胨、胰蛋白胨、casitone 或 N-Z-case 的豆乳中, *B. infantis* 生长较快, 在 24h 发酵后达到最大值, 所有培养介质的 pH 均较对照组小。另一方面在酵母或麦芽提取物强化豆乳中, 用 *B. longum* 发酵产生较对照组更高的活菌数和更低的 pH (24h 发酵), 但 48h 后在强化产品和对照产品中活菌数和 pH 是相似的。酵母浸膏和蛋白水解物在豆乳中对 *B. infantis* 生长的促进作用, Kehagias (1977)、poch 等 (1988) 和 Ibrahim 等 (1994) 均有类似报道。Chou 等发现 *Bifidobacteria* 对碳源和氮源的利用呈菌种和介质依赖性。

表 4-58 强化不同碳源豆乳的 pH 变化和 *Bifidobacteria* 生长

碳源强化	发酵 24h 后		发酵 48h 后	
	lgcfu/ml	pH	lgcfu/ml	pH
<i>B. infantis</i>				
对照	7.06 ± 0.20	6.33	8.52 ± 0.11	4.63
Bifitose (异构化麦芽低聚糖, 75%)	7.46 ± 0.07	6.25	8.68 ± 0.09	4.15
葡萄糖	7.57 ± 0.28	6.30	8.81 ± 0.13	3.86
乳糖	7.27 ± 0.09	6.31	8.73 ± 0.05	4.05
麦芽糖	7.44 ± 0.49	6.36	8.56 ± 0.31	4.2
半乳糖	6.62 ± 0.52	6.36	8.74 ± 0.08	4.24
海藻糖	7.02 ± 0.13	6.35	8.33 ± 0.18	4.56
棉籽糖	7.00 ± 0.07	6.41	8.51 ± 0.12	4.40
山梨醇	6.89 ± 0.12	6.42	8.34 ± 0.13	4.94
蔗糖	6.84 ± 0.14	6.31	8.54 ± 0.11	4.27
果糖	6.72 ± 0.19	6.40	8.50 ± 0.07	4.39
木糖	6.69 ± 0.05	6.42	8.32 ± 0.18	4.54
<i>B. longum</i>				
对照	6.54 ± 0.19	6.13	6.88 ± 0.52	6.10
Bifitose (异构化麦芽低聚糖, 75%)	6.51 ± 0.11	5.94	7.59 ± 0.13	4.64
葡萄糖	5.96 ± 0.11	6.26	7.62 ± 0.03	6.14
乳糖	6.39 ± 0.12	5.82	8.35 ± 0.03	3.75
麦芽糖	6.52 ± 0.17	6.15	7.11 ± 0.22	5.86
半乳糖	6.86 ± 0.10	5.97	8.08 ± 0.03	3.85
海藻糖	6.70 ± 0.09	6.06	6.71 ± 0.23	6.03
棉籽糖	6.54 ± 0.12	6.11	6.94 ± 0.07	6.01
山梨醇	6.56 ± 0.33	6.09	6.79 ± 0.10	6.03
蔗糖	6.42 ± 0.16	6.18	6.55 ± 0.21	6.17
果糖	6.85 ± 0.07	6.00	7.93 ± 0.10	4.07

B. longum 和 *B. infantis* 的生长和 pH 变化情况如图 4-39、图 4-40 所示。*B. longum* 在葡萄糖和酵母浸膏强化豆乳中有较高的生长速率, 在发酵的前 24h 尤为明显; 在含酵母浸膏的豆乳中 *B. infantis* 在前 24h 发酵过程中迅速生长, 达到 $9.02 \lg \text{cfu/ml}$ 的活菌数, 而后活菌数不再增加; 对照组仅在 8h 发酵后才开始增加, 24h 后达到 $7.0 \lg \text{cfu/ml}$ 。*B. longum* 在所有强化碳源的培养基中 32h 发酵后菌体生长进入静态阶段, 强化半乳糖和麦芽糖提取物的豆乳有最高的活菌含量 $8.34 \lg \text{cfu/ml}$, 不强化豆乳活菌数最低, 仅为 $7.02 \lg \text{cfu/ml}$ 。没有强化碳源的豆乳用 *B. longum* 发酵, 在整个发酵阶段仅有轻微的 pH 值下

降，相反地强化豆乳 pH 下降在 24h 内非常迅速，强化半乳糖豆乳的 pH 值下降为 3.8，而对照组仅为 6.10。

表 4-59 不同氮源强化豆乳中 *Bifidobacteria* 生长和 pH 变化

氮源强化	发酵 24h 后		发酵 48h 后	
	lgcfu/ml	pH	lgcfu/ml	pH
<i>B. infantis</i> CCRC 14633				
对照	7.27±0.05	6.33	8.37±0.27	4.59
酵母浸膏	8.84±0.03	4.80	8.79±0.11	4.73
麦芽提取物	7.68±0.30	6.00	8.62±0.14	4.15
胨	8.81±0.10	5.05	8.73±0.19	4.85
植物蛋白胨	8.71±0.04	5.00	8.68±0.15	4.86
Casitone	8.72±0.03	4.85	8.20±0.18	4.82
N-Z-Case plus	8.77±0.04	4.83	8.19±0.15	4.80
N-Z-Amine A	8.74±0.10	4.85	7.60±0.01	4.81
<i>B. longum</i>				
对照	6.71±0.06	6.08	7.20±0.06	6.02
酵母浸膏	6.99±0.10	6.01	7.44±0.19	6.01
麦芽提取物	7.09±0.17	5.95	7.48±0.17	4.98
胨	5.85±0.16	6.27	7.39±0.21	6.03
植物蛋白胨	6.20±0.30	6.15	7.10±0.11	6.11
Casitone	6.35±0.06	6.36	7.16±0.14	6.18
N-Z-Case plus	6.50±0.09	6.29	7.33±0.15	6.07
N-Z-Amine A	6.31±0.14	6.39	7.07±0.17	6.13

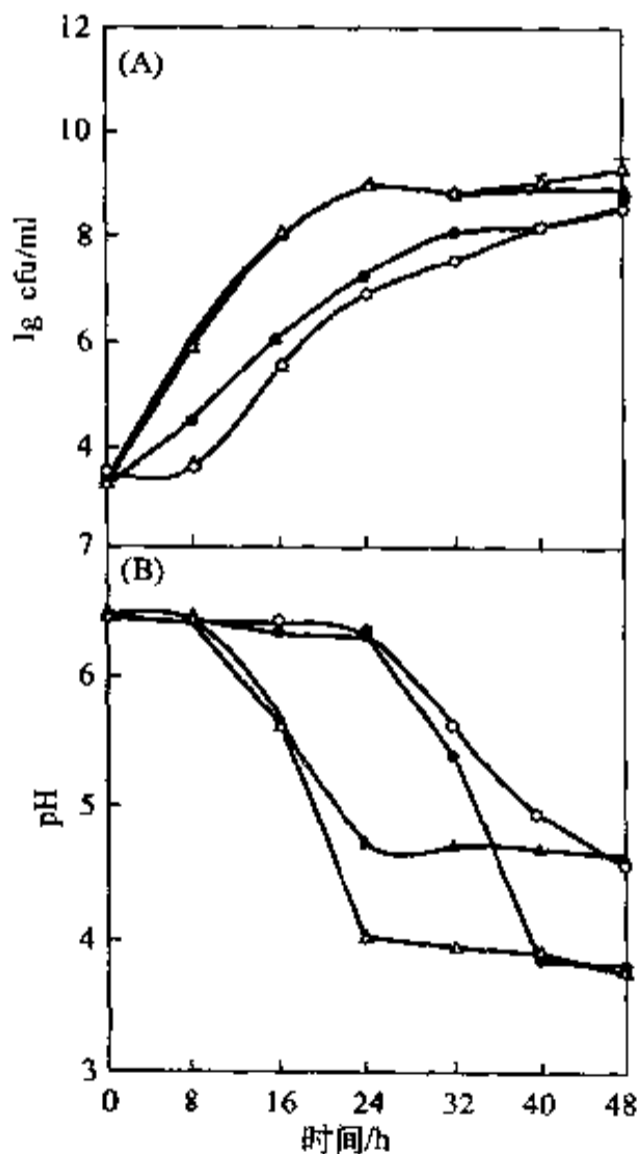


图 4-39 *B. infantis* CCRC 14633 的生长 (A) 和 pH 变化 (B)

○—豆乳；◆—强化葡萄糖豆乳；
▲—强化酵母浸膏豆乳；△—强化葡萄糖和酵母浸膏豆乳

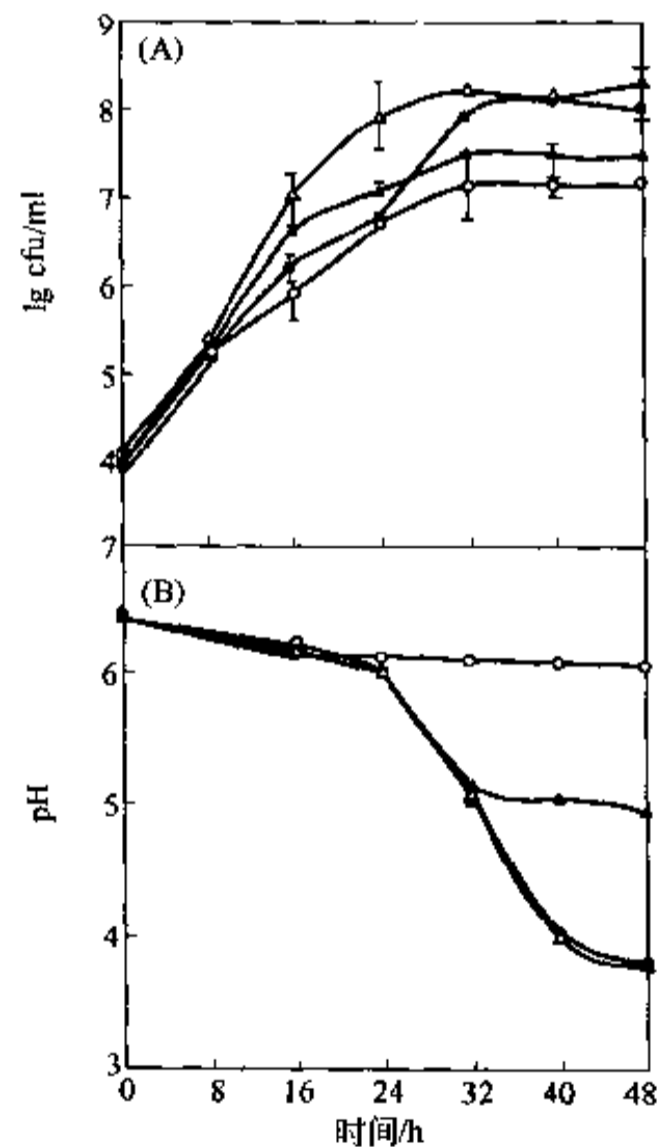


图 4-40 *B. longum* B6 的生长 (A) 和 pH 变化 (B)

○—豆乳；◆—强化半乳糖豆乳；
▲—强化麦芽提取物豆乳；△—强化半乳糖和麦芽提取物的豆乳

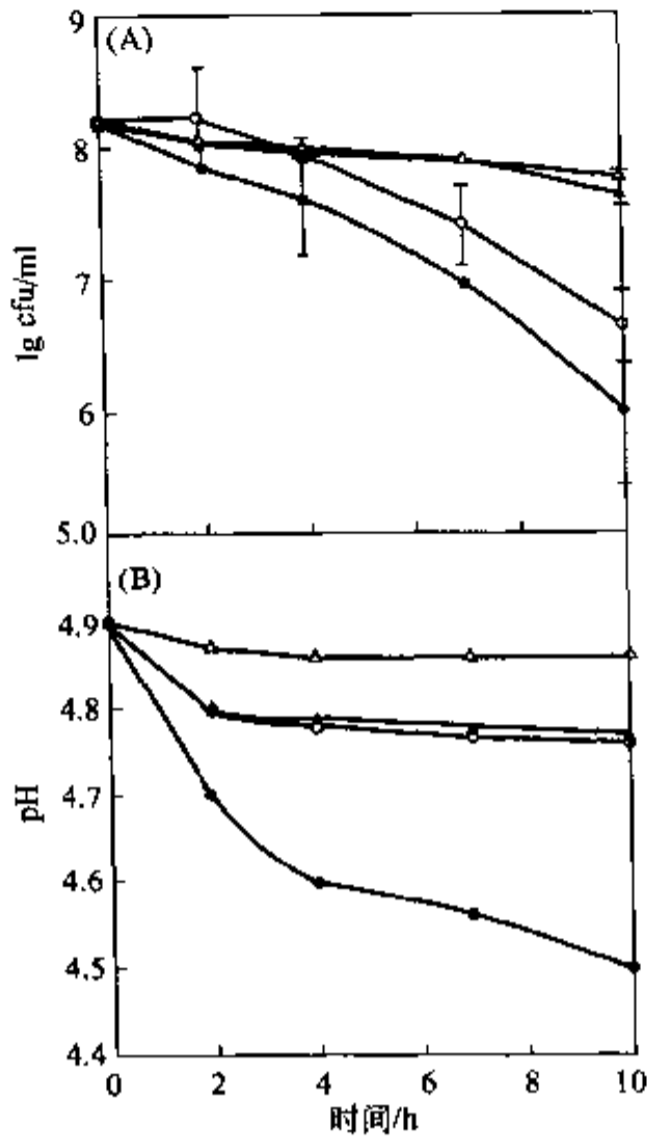


图 4-41 *B. infantis* CCRC14633 在贮存过程中存活 (A) 和产品 pH 变化 (B)
 ○和●在 25℃ 贮存; ▲和△在 5℃ 贮存;
 实心点表示添加糖的产品; 空心点表示未添加糖产品

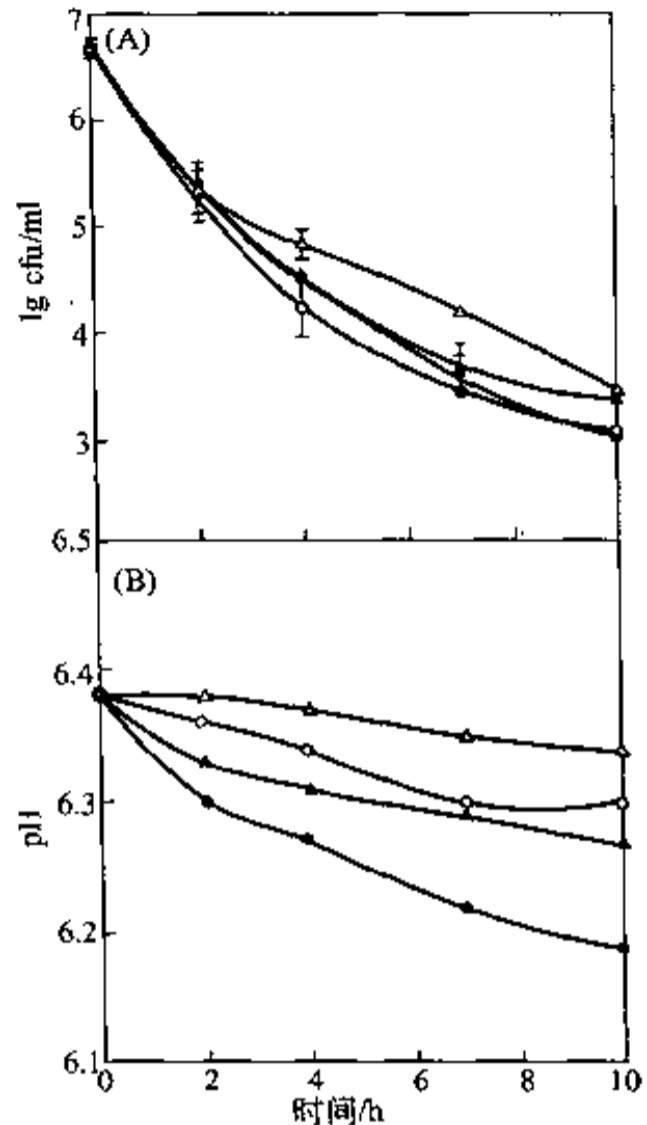


图 4-42 *B. longum* B6 在贮存过程中的存活 (A) 和产品 pH 变化 (B)
 ○和●在 25℃ 贮存; ▲和△在 5℃ 贮存;
 实心点表示添加糖的产品; 空心点表示未添加糖产品

Chou 等 (2000) 还进行了发酵豆饮料在贮存过程中 *Bifidobacteria* 活菌的变化情况研究 (如图 4-41、图 4-42)。*B. infantis* 在贮存过程中活菌数下降, pH 也呈下降趋势, 当 25℃ 贮存时 *B. infantis* 下降较 5℃ 贮存更多; 经 10 天贮存后 *B. infantis* 最多减少了 2 个对数周期, pH 下降了 2.4 个单位, 这发生在添加蔗糖的豆乳在 25℃ 贮存的情况; 这主要归因于 *B. infantis* 的后酸化结果, 在 25℃ 时 *B. infantis* 较 5℃ 有更高的代谢活性。在贮存期间 *B. longum* 较 *B. infantis* 活菌数有更大的下降, 这和贮存温度无关; 如在强化蔗糖的发酵豆乳中, *B. longum* 下降 3.6lgcfu/ml, 而 *B. infantis* 的下降仅为 2.0lgcfu/ml (25℃、10 天贮存)。在 5℃ 时前者下降 3.3lgcfu/ml, 后者 0.6lgcfu/ml 的下降。另一方面用 *B. longum* 发酵的强化蔗糖豆乳在 25℃、10 天贮存后 pH 仅下降 0.2 个单位, 相对 *B. infantis* 产品下降 0.4 个单位。这说明贮存情况下 *B. longum* 较 *B. bifidum* 有较小的代谢活性。

B. longum 有最适的 pH=6.0~7.0, 在 pH=4.2~4.5 以下很快死亡, 在贮存过程中 pH 为 6.38~6.19, 故说明有 pH 以外其他因素对菌的死亡起作用。综上可以得出如下结论: 豆乳能够支持 *Bifidobacteria* 生长, *B. infantis* 在豆乳中生长和贮存时的活菌数变化和 *B. longum* 不同; 酵母浸膏添加于豆乳使 *B. infantis* 的产酸阶段从静态向指数期转移, 此外 *Bifidobacteria* 能够在冷藏情况下存活较长的时间。

第七节 *Bifidobacteria* 的分离、培养和鉴定技术

对于双歧菌培养两个条件是重要的：适宜的培养介质和厌氧情况。本节主要讨论双歧菌的样品收集、选择制备技术，尤以双歧菌培养最为关键的培养基选择和鉴定作为重点。

一、*Bifidobacteria* 分离培养的基础知识

Tissier 将 1% 葡萄糖琼脂应用于婴儿粪便中双歧菌的培养和分离，揭开了真正意义上双歧菌分离培养技术的序幕 (Tissier 1900 ~ 1905)，他在显微镜下研究多倍稀释物的 *B. bifidum* 的形态，接着他通过转移相同类型的菌落于葡萄糖琼脂以获得纯 *Bifidobacteria* 培养物，后来的研究者试图改善这一技术，但没有获得期望的进展；相反地由于培养时应用了不充分的厌氧技术引起许多缺陷，即 *B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 间鉴定的混淆，在肝胱氨酸-乳糖-琼脂培养基引入前，Weinberg 等 (1937) 认为对 *Bifidobacteria* 不存在简单、快速和可靠的培养方法，故对 1937 年的应用培养基不应作为双歧菌培养的适合选择。

(一) 样品的收集

获得未经任何修正的样品对 *Bifidobacteria* 样品收集是十分重要的，具体方法如下。

(1) 应用灭菌技术获得没有被其他生物污染的菌种，同时也避免清洗剂和消毒剂残留的污染。

(2) 在研究范围内最具代表性的研究是样品的定量研究，即哺乳动物肠道菌群的定量研究。

(3) 若菌是敏感性微生物，所有样品必须完全防止它暴露于空气或氧气。

(4) 在所有情况下，最好的取样方法是在研究马上要开始时进行，样品在收集后应尽快培养和分离菌种。

(5) 当研究不能马上开始时，从动物体内体外取出的样品应尽快冷却，-75℃ 的冷冻应用于瘤胃样品的保存，这种方法已证明对人粪便和肠道内容物样品保存是令人满意的。

(6) 在收集后应快运送样品至实验室。

(7) 不应用强化或传代培养基，直接从样本进行培养分离，这样可尽可能少引起兼性菌和非厌氧菌的过度生长，详情请见 MANUAL (Holdmen 等 1977)，它中有样品较详细完整的收集，分离，培养技术。

(二) 样品的处理和稀释

按规则取 1g 研究样品如粪便、泪、唾液、人乳等，悬浮于 100ml 稀释溶液中；Haenel (1960) 用双倍量的稀释剂稀释粪便样品 (2ml 至 18ml 稀释液中)，有时 0.1ml 样品接种于 1ml。

1. 简单的厌氧技术

较严格的厌氧技术如下：在应用前将立即制备还原介质中的稀释物，至少应在沸水浴中保温 20min，以除去其任何氧。样品在盐溶液（缓冲或无缓冲）中没有破坏的稀释，盐溶液中应含还原物质，多选择磷酸盐缓冲溶液，含 0.3% 半胱氨酸盐溶液或含 0.05% 半胱氨酸盐的盐溶液。

2. 传统技术

传统技术的应用无任何值得注意的地方，含 0.1% 酵母浸膏或玉米脂液溶液，在发酵乳中产生有效数量的 *Bifidobacteria*，它优于作为样品系列稀释液的生理盐水。

二、*Bifidobacteria* 培养、鉴定和分离所用的培养基

Bifidobacteria 的培养基可分为复杂型(天然)、选择型、半合成型、合成型以及预制干燥培养基等五大类。

(一) 一般原则

Bifidobacteria 培养基应能满足菌营养素、缓冲容量和 pH 的需求。

表 4-60 在 *Bifidobacteria* 培养基中低氧化还原电位添加剂类型和含量

1. Vc 和其盐		应 用
0.005%	L-抗坏血酸	在抗坏血酸-氨基酸-乳糖琼脂中(Plotho, 1947)
0.1%	抗坏血酸	番茄汁-酵母溶解物-琼脂培养基(Orla-Jensen, 1943)
1.0%	抗坏血酸	M. R. S 肉汁培养基(Koch 等 1970)
1.0%	抗坏血酸钠	<i>Bifidobacteria</i> 培养基(见后)
1.0%	抗坏血酸钠	Gyllenberg 和 Niemela 培养基(1959)
2. 半胱氨酸和半胱氨酸盐		
0.02%	半胱氨酸	番茄汁-酪蛋白胨-酵母溶解物-琼脂培养基(Orla-Jensen 1943)
	半胱氨酸盐酸盐	M. R. S. 肉汁培养基(Koch 等)
0.03%	半胱氨酸	M. R. S. 肉汁培养基(Catteau 等 1973)
0.05%	半胱氨酸盐酸盐	双歧菌琼脂培养基(见后)
		NPNL-琼脂培养基(Teraguchi 等 1978)
		选择性琼脂培养基(Haenel 等 1970)
0.2%	半胱氨酸	番茄汁琼脂培养基(Varie 等 1967)
3. CaSO ₄		Delbove 添加于 <i>Bifidobacteria</i> 培养基
4. 新鲜组织器官		
	脑:	在 Rosenow 培养基中有小牛和羊脑、小牛脑浸液和心、脑浸液
	心:	牛心浸液和脑心浸液, 在 BBL, Difco 和 Oxoid 培养基中
	肾:	在葡萄糖或乳糖汁中的兔肾(Cruikshank, 1925)
	肝:	在肝-半胱氨酸-乳糖琼脂培养基中存在牛肝(Blaurock 1937) 在 NPNL-琼脂培养基中有肝提取液
5. 葡萄糖		
1%	<i>Bifidobacteria</i> 琼脂培养基	
2%	番茄汁-酪蛋白胨-酵母溶解物-琼脂培养基(Orla-Jensen, 1943)	
6. 谷胱甘肽		
0.02%	LBS 琼脂培养基(Mutai 等 1977)	
7. 丙酮酸		
1ml/L	LBS 琼脂培养基(Mutai 等 1976)	
8. Na ₂ SO ₄ (Delboue 1932)		
9. 巯基乙二醇钠(Sodium thioglycollate)		
0.03%	作缓冲液, 巯基乙二醇盐介质用于 Difco 培养基;	
0.1%	巯基乙二醇盐介质 Brewer 改善 EBL 培养基;	
0.11%	巯基乙二醇作为 Oxoid 培养基的成分;	
0.5%	VL(肉-酵母-琼脂培养基)(catteal 等 1971)	

1. 营养和生长物质

在以前我们已详细介绍了 *Bifidobacteria* 所需的营养物质及 *Bifidobacteria* 生长促进因子, 其培养基的配制依据这些原理进行, 含有许多成分的培养基可添加非离子表面活性剂吐

温-80 (Tween80) 以改善特殊组分的乳化性。

2. 低氧化还原电位

在 *Bifidobacteria* 培养基中需添加还原性物质以降低其氧化还原电位，低氧化还原电位的物质如表 4-60 所示。这些低氧化还原电位的物质包括 Vc、CaSO₄、半胱氨酸、Na₂SO₄、内部器官新鲜碎片、葡萄糖、谷胱甘肽、丙酮酸、巯基乙二醇钠等，它们的添加使厌氧工作和技术具有可能性，即深度琼脂 (deep agar) 或液态培养基而使表面培养变为可能。Orba-Jensen 认为 Vc 较半胱氨酸呈较少的还原作用，Vc 经过滤无菌添加于已灭菌的培养基中，制备的培养基可保存一周。含半胱氨酸的培养基应很快应用，因为半胱氨酸很快氧化为胱氨酸；半胱氨酸经过滤无菌添加于已灭菌的培养基中。由于肝含有半胱氨酸和双歧生长物质，故肝或肝提取物成功地用于双歧菌的培养。葡萄糖在碱性 pH 下加热大大增加它的还原能力，但发酵过程中产生的气体有抑制 *Bifidobacteria* 生长作用；0.1% 巯基乙二醇钠最终可能显示抑制剂的作用，在液态培养基或深度培养基的 0.5% 琼脂培养基中应防止空气的自由循环，帮助保持厌氧的环境。

3. 在生长过程中 pH 的控制和缓冲容量

对于产酸微生物在生长过程中保持一定的 pH 是非常重要的，这不包括耐酸性 *Bifidobacteria*。酸对菌的破坏作用可用下列方法避免。①应用非发酵型底物；②应用特殊的培养基如没有添加葡萄糖的巯基乙醇培养基或应用选择琼脂培养基 (Haenel 等 1970)；③在培养基加入非常少的糖；④用 CaCO₃ 的添加中和产生的酸，若在培养基中不期望存在固态物质，也可添加 Na₂CO₃，如 KL-G 培养基。添加酸中和物质对于混合发酵物是重要的，对含高浓度碳水化合物的培养基和应用于 *Bifidobacteria* 传代的培养基也是必要的。Marble——一种天然碳酸钙也可添加到培养介质中；⑤培养介质的缓冲能力会对介质自身的 pH 有一定的稳定作用，如无机磷酸盐经常添加于 *Bifidobacteria* 的培养基和稀释剂中。当双歧菌的代谢活性确定后如产酸和最终 pH，应考虑底物的缓冲能力和添加不同类型的酸中和物质以避免酸对其的破坏。

4. 制备培养基的最终 pH

在发酵培养基灭菌以前，培养基的 pH 将被调整至 pH6.6~7.2 (有时是 pH7.5)，若在培养基灭菌后添加 pH 调整物质，要测定其最终的 pH。山梨酸添加可降低培养基 pH 至 5.0，此时表现出 *Bifidobacteria* 的生长抑制作用。

(二) 最适生长培养基

一般认为 *Bifidobacteria* 有复杂的生长需求，为此应应用含丰富营养素的培养基。自备培养基经常有复杂的组成和许多添加物如新鲜肝、人乳等，但有时自备培养基的可利用性差。在最适培养基中 *Bifidobacteria* 的成功生长主要依赖于下列因素：①如果培养基没有选择作用，其他菌的生长可能超过 *Bifidobacteria* 的生长；②双歧杆菌的镜检可通过不同染色剂应用变得容易；③ *Bifidobacteria* 的最适生长依赖于培养基配料的新鲜程度；④培养基的合理选择能够使不同表现型 *Bifidobacteria* 的生长变为可能。

应用 *Bifidobacteria* 的最适培养基列于表 4-61 中，脱水培养基促进了包括 *Bifidobacteria* 在内的不同菌的生长。

(三) *Bifidobacteria* 的选择鉴定培养基

菌落的选择性鉴定通过下面步骤使 *Bifidobacteria* 较好地区别于其他微生物。

表 4-61 应用于培养 *Bifidobacteria* 的最适培养基

最适培养基	发明人
1. 新鲜制备培养基 肝-胱氨酸-乳糖-琼脂/pH7.4 番茄-酪蛋白胨-酵母溶解物-琼脂/pH6.4~6.5 具有葡萄糖的碱性血液琼脂/pH7.5 VL-琼脂(肉-酵母-琼脂)/pH7.4~7.5 BL-琼脂(葡萄糖-血液-肝-琼脂)/pH7.2 半合成培养基/pH6.8	Blaurock(1937) Orla-Jensen(1943) Bierkowski 等 1956 Beerens 等 1963 Ochi 等(1964) Tomarrelli 等(1949)
2. 脱水商用培养基 脑心溶解物琼脂/pH7.4 Eugon 琼脂/pH7.0 M. S. R 肉汁(含半胱氨酸)/pH6.2 Trypticase-大豆-肉汁-琼脂/pH7.3	

1. 菌落的色泽鉴定

表 4-62 是不同培养基中 *Bifidobacteria* 菌落的颜色差异。

表 4-62 生长在不同指示剂培养基中菌落的颜色

指示剂	培养基	<i>Bifidobacteria</i> 菌落的颜色
苯胺蓝(Anilin blue)(棉花蓝,水溶性,0.1%)	R. C. M 琼脂培养基(Bullen 等 1973)	青蓝,第一次分离
苯胺蓝 3ml0.1%溶液/1L	碱性血液琼脂(Bierkowski1956)	棕色
溴甲基酚绿和中性红	选择琼脂 I(Haenel 等 1970)	无数据
中国蓝(Chinese blue),即铁氰化钾 0.03% 0.40%	中国蓝-乳糖-琼脂(Chenneberg,1934) R. C. M 琼脂(Korstanje 等 1970) 肝-胱氨酸-乳糖-琼脂(Boventer,1949)	黑蓝 棕色,第一次分离 深蓝色
氯化四苯钾(TTC)0.01%	合成琼脂(Gyllenberg 等 1959)	在菌落表面有红色沉淀

2. *Bifidus* 细胞分类学

在显微镜下通过 *Bifidobacteria* 典型细胞分类学特征来区分 *Bifidobacteria* 是十分重要的。Kalz 建议 0.0325IU/ml 青霉素 G 的添加不影响 *Bifidobacteria* 的生长,但促进了典型细胞分类学的出现。

当 *Bifidobacteria* 在一种含过量专一性生长因子的培养基中生长,细胞结构变得相当有规则,枝形、膨胀棒状是 *Bifidobacteria* 的特征形状,这可能反映出正常应用于 *Bifidobacteria* 培养的介质中必然的胞壁质前体的缺乏。

(四) 双歧菌分离培养基

当时 *Bifidobacteria* 被其他厌氧菌明显超过时,双歧菌的选择分离问题尚未完全得到解决。

对 *Bifidobacteria* 从粪便中的分离, Mitsuoka 等开发了 BS-琼脂培养基 I 和 II; Haenel 等研制成功选择性琼脂 I。NPKL-琼脂(Shimada 等)和改性的选择性 Rogosa 琼脂培养基均用于乳制品 *Bifidobacteria* 的选择性分离。

选择性物质被添加于不同的脱水商用培养基中,表 4-63 是添加于不同培养基的选择性物质一览表。这些物质主要抑制 *E. coli* 的生长,对于应用的特殊培养基,浓度选择性影响知道的很少。

选择性物质的作用依赖于下列因素：①对于主要菌而言，其作用因分离鉴定方法的不同而变化；②*Bifidobacteria* 的数量；③应用的选择性物质的种类和浓度以及选择性物质混合的另外影响；④接种技术，是否好氧菌的生长受到抑制以便仅有兼性菌和厌氧菌可以生长；⑤培养基的种类（最适的培养基，最不适培养基）。

表 4-63 添加于不同培养基的不同选择性物质

选择性物质和它的影响	培养基	参考文献
1. 抗菌素 卡那霉素硫酸盐 75 μ g/ml, 选择性差 新霉素硫酸盐(NBC) 200 μ g/ml 200 μ g/ml 100 μ g/ml 100 μ g/ml 30 μ g/ml 100 μ g/ml 200 μ g/ml 巴龙霉素硫酸盐 200 μ g/ml 和 50 μ g/ml 50 μ g/ml 20 μ g/ml 50 μ g/ml	标准血液琼脂 BS 琼脂 I 和 II EG 琼脂 Columbia-琼脂 NpNL-琼脂 NpNL-琼脂 LBS-琼脂 Rogosa 琼脂 NpNL-琼脂 BS-琼脂 I BS-琼脂 II Rogosa 琼脂	Finegold(1971) Mitsuoka 等(1965) Ochi 等(1964) Sykes 等(1973) Teraguchi 等(1978) Teraguchi 等(1978) Branca 等(1979) Shimada 等 Teraguchi 等 Mitsuoka 等 Mitsuoka 等 Shimada 等
2. 其他抑菌剂 LiCl 3mg/ml 3mg/ml 3mg/ml 萘啶酮酸 80 μ g/ml 15 μ g/ml NaN ₃ 0.01% 丙酸钠 40%溶液的 1.50% 1.00% 1.50% 山梨酸 0.04% 0.04%	BS-琼脂 I 和 II NpNL-琼脂 Rogosa 琼脂 Rosenow NpNL-琼脂 番茄琼脂 Orla-Jensen BS-琼脂 I BS-琼脂 II Rogosa 琼脂 山梨酸培养基 I、II 和 III 番茄-琼脂 Orla-Jensen	Mitsuoka 等 Teraguchi 等 Shimada 等 Beerens 等 Teraguchi 等 Frisell Mitsuoka 等 Mitsuoka 等 Shimada 等 Haenal 等 Haenal 等
3. 混合物 LiCl(3mg/ml) 萘啶酮酸(15mg/ml) 新霉素硫酸盐(100 μ g/ml) 巴龙霉素硫酸盐(200 μ g/ml) 卡那霉素和新霉素(每种 100 μ g/ml) 丙酸钠(0.015g/ml) 巴龙霉素硫酸盐(0.05mg/ml) 新霉素(0.20mg/ml) LiCl(0.003g/ml)	NpNL-琼脂	Teraguchi 等 Finegold Shimada 等

(五) 不同表现型 *Bifidobacteria* 选择性生长的培养基

培养基可表现出对 *Bifidobacteria* 的选择性影响, 应用的培养基应适于 *Bifidobacteria* 的发现和分离以及它们的培养。通过培养基使原菌种诱变菌的筛选成为可能, 这主要通过“最小营养需求”法来实现。

具有最小需求的表现型可生长于 Hassinen 等完全合成的培养基, *Bifidobacteria* A 型可以生长在 Petuely 的完全合成培养基中, 它们在母乳喂养的婴儿粪便中占优势, *Bifidobacteria* 亚型 B₁ 能生长于 Gyllenberg 等改性的培养基, 它通常存在于成人粪便中。

不同的半合成和非常复杂的相关培养基被开发应用于生理研究和 *Bifidobacteria* 的鉴别, Norris 等、Gyorgy 等、Tomarell 等以 Teply 等半合成培养基为基础开发出各自的培养基。

三、培养基的应用

现将培养基的选择及菌种检验、培养和贮存时, 所用培养基的制备分述如下:

(一) *Bifidobacteria* 的培养基

1. *Bifidobacteria* 分离、计数培养基的选择和制备

对于 *Bifidobacteria* 分离和计数培养基的选择应特别注意, 尤其是 *Bifidobacteria* 不是优势菌的材料中分离和计数的情况, 上面已提及对不同的检验材料无最适的选择性培养基。不同 *Bifidobacteria* 表现型的营养需要也应予以考虑, 有关 *Bifidobacteria* 检验培养基的详细情况见有关章节。

2. 接种培养基的制备

Bifidobacteria 在培养基中的生长情况可应用适当的技术加以改进。

(1) 简单的厌氧技术

倾注平皿在 52℃ 干燥 1.25h, 要在板式流动室中进行 0.5h。平板要在 H₂ : CO₂ (90 : 10) 情况下至少贮存过夜以便进行预还原, 这种工作要于一冷却含催化剂厌氧罐中进行, 此容器去除了最后残留的任何氧气, 指示带 (BBL Cat NO 70504) 被应用于检验厌氧情况, 管中液态或液化琼脂将在水浴中至少保温 20min 以除去氧气, 冷却后立即接种。

(2) 传统技术

传统技术中无任何特别处理以除去氧气, 也不认为应用前贮存平板厌氧环境是十分必要的。

3. 培养技术

接种后立即在厌氧的室中培养平板, 室中含 H₂ + CO₂ (90 : 10), 并存有催化剂, 所有样品在 35℃ 或 37℃ 培养, 培养时间 48h 或更长直至观察到生长完成。

许多制备培养基应在新鲜状态应用, 贮存不长于一周。

(二) 菌落计数和显微镜检查

1. 在固态培养基上菌落的外观

Bifidobacteria 的菌落培养基和其他微生物的菌落区别开来, 这是不易做到的。在进行 *Bifidobacteria* 此方面的工作时, 除丰富经验外, 下列因素可能影响观测的结果。①培养基正确的制备、接种、培养以获得 *Bifidobacteria* 好的生长, 在培养过程中去除氧气有预选择作用, 好氧菌的生长被抑制。②依赖于典型菌落的外观差异 (大小、颜色、厚度) 和有关其他菌落特征的系统知识, 这情况很大程度上依赖检验材料 (粪便、发酵乳、唾液等) 以及存在于较低和较高稀释物中 *Bifidobacteria* 的数量。许多 *Bifidobacteria* 可以呈“改进生

长”（“护理生长”）状态，如在血液琼脂培养基上和 Coli 菌一起生长的情况（Kludas, 1959）。每 12h 检查平板一次直至菌落生长，当生长一出现，应立即在 10×立体现显微镜下检验，标记不同类型的分离菌落以便挑出。③许多菌落（至少每个平板 10~15 个）能在一个显微镜下检验，这是以菌的颜色和分类学为特征。在观察细胞的典型分枝时遇到许多困难，这种倾向在初期分离较后期阶段更易碰到。

2. 显微镜检验

Bifidobacteria 的显微镜镜检技术对 *Bifidobacteria* 表现型的鉴别和研究十分重要。

(1) 计数涂片

进行涂片后，记录存在的全部形态菌落，和每种菌的相对数，由于在培养检验和显微镜制备间存在一定的对应一致关系，Gram 染色检验材料样品可能属于培养检验。许多生长在一定琼脂培养基中的 *Bifidobacteria* 菌落可以按 Gram 染色进行计数，获得 Gram 阳性和阴性杆菌 (rods) 和球菌 (cocci) 的比例分布，这些百分数一定和原始涂片 Gram 染色后直接镜检数相一致。

(2) 染色方法

Gram 染色是一个常用方法，Schuler-Malyoth 建议对发酵乳制品进行下列染色程序：①制备一个薄、平的涂片；②空气干燥和热固定；③用 Loeffler 甲基兰染色 5min；④小心用水清洗，在滤纸间干燥；⑤在 96% 的乙醇中浸渍直至制备呈弱蓝色；⑥在滤纸间仔细干燥，乙醇分化作用导致乳蛋白脱色。*Bifidobacteria* 由于弱的颜色密度而呈非常柔弱的蓝色，streptococci 和乳杆菌呈黑蓝色，由于这种性质和其分类学特征，*Bifidobacteria* 相对容易和乳杆菌进行区分，通过仔细分析也可建立 bifidobacteria 细胞异染色反应的模式（红紫色）。

(三) *Bifidobacterium* 种的鉴定

按 Buchanan 和 Gibbons 观点，*Bifidobacteria* 属于 Actinomycetaceae（放线菌科），Actinomycetaceae 含有下列属：*Actinomyces*、*Arachnia*、*Bifidobacterium*、*Bacterionema* 和 *Rothia*，表 4-64 列出了 *Bifidobacterium* 属内不同种的特征。

表 4-64 *Bifidobacterium* 属与相关属的不同特征

特 征	Bifido-Bacterium	Acti-nomyces	Propioni-bacterium	Eubac-terium	Bacto-bacillus
主要发酵产品	AL	S	P	B, AF, 无其他	L
好氧生长	-	+	V	-	V
从葡萄糖生成气体	-	-	-	V	V
过氧化物酶产生	-	V	+ ⁻	-	-
硝酸盐还原	-	+ ⁻	+ ⁻	V	-
吡啶产生	-	-	V	-	-
明胶液化	-	- ⁺	+ ⁻	V	-
从下列物质产酸					
鼠李糖	-	V	- ⁺	- ⁺	V
山梨糖	-	V	V	- ⁺	- ⁺
甘油	-	-	+ ⁻	- ⁺	- ⁺
赤藓醇	-	-	+ ⁻	- ⁺	- ⁺
核糖醇	-	-	V	- ⁺	- ⁺
半乳糖醇	-	-	- ⁺	- ⁺	- ⁺

注：+—阳性，——阴性，V—不同变化，+⁻—主要呈阳性，-⁺—主要呈阴性，A—醋酸，B—丁酸，F—甲酸，L—乳酸，P—丙酸，S—琥珀酸（Mitsulka 等 1977）。

对肠道或其他材料中 *Bifidobacteria* 的鉴定以菌落形态和显微镜检查为基础，虽然 *Lactobacillus*、*Actinomyces*、*Propionibacterium* 和 *Eubacterium* 在显微镜下的形态彼此相似，但可靠的鉴定仅能依靠表 4-64 中的生化鉴定。对 *Bifidobacteria* 而含发酵产物（醋酸和乳酸）的分析是最重要的特征测试，对于几乎全部的生化测试 *Bifidobacteria* 均呈阴性。

在 *Bifidobacteria* 中种的鉴定主要依据碳水化合物的发酵，不同培养基被用于碳水化合物的检验：①Dehnert 应用 Tomarelli 培养基；②Mitsuoka 描述了从动物分离 *Bifidobacteria* 碳水化合物发酵检验的基础培养基；③Barnes 用添加或不添加血液的几种平板进行测试。Catteau 等对 *Lactobacillus* 的 API 鉴定系统 (Vixotab38, La Balme-les-Grotte, 法国) 进行修改而进行 *Bifidobacteria* 种的鉴定，样品在 48h、37°C 厌氧培养 (BBL Gaspack)。

四、食品中各种益生菌的鉴别

传统的表型性状鉴别方法可用于在一个属内不同种、生物型和特殊菌株的确认。分子方法用于种的确认和特殊菌株的确认，这种方法主要包括菌株的细胞壁成分、应用 SDS-PAGE 进行的全细胞全部可溶性蛋白质的指纹技术所构成，同时也包括特殊菌株确认的 RAPD-PCR 和 PEGE 技术，以及在种水平上具有基因探针的点印迹杂交技术 (dot blot hybridisation-technique)。随着益生菌如 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium* 在食品中的广泛使用，正确的认识和鉴别这些益生菌非常必要，主要关注的益生菌为：*L. acidophilus*、*L. casei* 和 *L. reuteri/fermentum*，他们被认为是 *Lactobacillus* 的代表 (如表 4-65)。*Bifidobacterium* 主要指：*B. longum/animalis/Lactis* 以及 *B. breve* 和 *B. infantis*。

表 4-65 在人体微生态系统中存在的各种乳杆菌 (Reuter 1997)

同型发酵	" <i>L. acidophilus</i> "	同型发酵	subsp. <i>salicinius</i>
	<i>L. acidophilus sensu stricto</i>		" <i>L. casei</i> "
	<i>L. gasseri</i>		<i>L. casei/paracasei</i>
	<i>L. crispatus</i>		<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. johnsonii</i>		
	" <i>L. salivarius</i> "	异型发酵	" <i>L. reuteri</i> " (以前 <i>L. fermentum</i> II)
	<i>L. salivarius</i>		包括 <i>L. oris</i> & <i>L. vaginalis</i>
	subsp. <i>salivarius</i>		

(一) *L. acidophilus* 组内益生菌的鉴别

在以前的 *L. acidophilus* 中包括不同的生物型，人和动物及其他来源的 *L. acidophilus* 共计有 14 个类型。应用 DNA-DNA 杂交，将 *L. acidophilus* 组可分为 6 个不同的种，4 个种来自人体。在食品中应用经典方法鉴别 *L. acidophilus* 是困难的，除许多生态学的特征外，表 4-66 列出了几乎全部的表现型性质。发酵反应用于表征这四株菌，在每种情况下这种差异化系统不再进行种的确认，特别是不再应用于发酵乳制品菌种的确认，如 *L. acidophilus* 和 *L. johnsonii*。这些种大多数能发酵海藻糖和蜜二糖，仅有一个菌株不能发酵蜜二糖。最近一种新的方法即在液态培养基中通过对不同 NaCl 浓度的耐受性实验来鉴别确认食品中的 *L. acidophilus*，但 Reuter 等尚未证实这一结果，因此目前广泛采用的是对分离物全细胞可溶性蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳，来分析鉴别益生菌 (表 4-67)。采用此方法分辨 *L. acidophilus* 和 *L. johnsonii* 是可能的，新的菌株 Lal 也通过此方法进行了正确的形态学确认，结果显示 *L. gasseri* 和 *L. johnsonii* 之间较和 *L. acidophilus* 之间存在更密切的关系。这种方法是可靠的，但要求许多基础数据。

表 4-66 有关 *L. acidophilus* 种的标准 (Reuter 1964, 1965 ; MitsuoRa 1969, 1992 ; Holzapfel 等 1997, 1998; Du Toit 等 1997; Klein 等 1998)

种	以前生物型(Reuter, 1964)	宿主	人体分布			生长			碳水化合物代谢			
			口	肠	阴道	石蕊乳	含 NaCl(%)的液体肉汁			海藻糖	松三糖	棉子糖
							3.5	4.5	5.5			
<i>L. acidophilus</i>	II, III, IV	人, 鼠	(+)	(+)	(+)	-/d*	-	-	-	+	+/-	+
<i>L. salivarius</i>	I	人	(+)	?	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>L. gasseri</i>	I	人, 牛	?	++	+	-	+	+	+/-	+	-	-
<i>L. johnsonii</i>	II, III	人, 猪	(+)	?	?	-/d*	+	+	+	+	-/+	+

表 4-67 属于 *L. acidophilus* 乳产品分离物的蛋白质指纹图谱和生物型结构

菌株	来源	生物型 Reuter(1964)	蛋白质指纹 Pack et al. (1996)	
			全部	部分
<i>L. gasseri</i> DSM 20243 ^T		I	I	Ia
<i>L. johnsonii</i> LMG 9436 ^T		III	I	Ib
SB542(L-2a)	酸奶, D	III	I	Ib
CNCMI-1225		II	I	Ib
SB558	LC1 天然, F	II	I	Ib
SB559	LC1 vanille, F	II	I	Ib
SB560	LC1 sucre, F	II	I	Ib
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 ^T		III	II	-
SB536(L 114)	凝乳, NL	III	II	-
SB537(L115)	凝乳, NL	III	II	-
SB538(L 118)	酸奶, D	III	II	-
SB567	酸奶, E	III	II	-

在 *L. acidophilus* 组内对不同的种进行鉴别是必要的, 同时对从相同原始菌种衍生出来、但从不同食品中分离的菌株进行鉴定也十分必要。特定菌株的鉴别可以通过 RAPD-PCR 方法或 PAGE 方法得以实现, 两种方法呈高灵敏度, 但 PAPPS-PCR 易受反应情况干扰。这两种情况下成本和工作量均会大大增加。最近 *L. acidophilus* 组内种的确认应用点印迹杂交技术来完成, 为此生物技术信息国家中心和 Michigan 州立大学 (National Center for Biotechnology Information 和 Michigan State University) 应用核苷酸和计算机程序发展了 16S rRNA 基因探针进行了菌的确认工作。他们应用的基因探针对于 *L. acidophilus* 和 *L. johnsonii* 具有专一性, 但在 *L. gasseri* 和 *L. johnsonii* 菌株间存在交叉反应, 这个问题可以通过与两种不同的探针杂交来解决 (表 4-68)。

表 4-68 具有三种不同探针 *L. acidophilus* 组菌株的点印迹杂交

Species	菌株数(n)	和指示探针的点印迹反应			菌株类型
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. johnsonii</i>	
<i>L. acidophilus</i>	13	+	-	-	<i>L. acidophilus</i> S-S-Lacid-2519-a A-20
<i>L. gasseri</i>	19	-	+	-	<i>L. gasseri</i> S-S-Lgass-2592-a-A-108
<i>L. johnsonii</i>	8	-	+	+	<i>L. johnsonii</i> S-S-Ljohn-1580-a-A-27
<i>L. crispatus</i>	2	-	-	-	

(二) 对 *L. casei* 组内益生菌的鉴别

L. casei 组内形态学的变化见表 4-69。

在最近 10 年, 采用表型性状的方法对 *L. casei* 进行分类出现了自相矛盾的局面, 所以必须考虑许多其他的分类方法。以前 *L. casei* 中的部分菌株被描述为 *L. paracasei*, 其中的一个亚种 (*L. casei* subsp. *rhamnosus*) 被独立为一个新种 *L. rhamnosus*, 仅有原 *L. casei* 中非常少的菌株仍保留在新的 *L. casei* 内, 但这种系统似乎没有实际用途。

表 4-69 *L. casei* 组内形态学的变化 (Collins 等 1989)

至 1989 年	<i>L. casei</i> 组	菌株类型	至 1989 年	<i>L. casei</i> 组	菌株类型
<i>L. casei</i>			<i>L. pseudophantarum</i>		
<i>L. casei</i>		<i>L. casei</i>	<i>L. tolerans</i>		<i>L. paracasei</i>
<i>L. alactosus</i>		<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>		ssp. <i>tolerans</i> <i>L. rhamnosus</i>

表 4-70 *L. casei* 分类地位的变化 (Dick 等 1996)

种	地 位	变 化	标 准 菌 株
<i>L. zeae</i>	*	该种名重新启用	* ATCC 393 ^T (原 <i>L. casei</i> 的标准菌株)
<i>L. casei</i>	**	包括 <i>L. paracasei</i>	ATCC 334 ^T (现在 <i>L. casei</i>)
<i>L. paracasei</i>	**	弃用	所有的菌株都转入 <i>L. casei</i>
<i>L. rhamnosus</i>	*	无	ATCC 7469 ^T

在发酵乳中确认 *L. casei* 菌株一般不存在大的问题, 以参考菌株为基础应用经典表现型方法很容易鉴定 *L. rhamnosus* 菌株, 鼠李糖的快速发酵和 45℃ 能够生长是其决定性指标 (表 4-71), *L. casei* GG 也被归入 *L. rhamnosus*, 尽管它不能发酵乳糖。许多确认依靠 *L. casei*/*L. paracasei* 菌株不清楚的形态学特征似乎是必要的。Klein 等 (1998) 应用 SDS-PAGE 和 PFGE 很好地确认了 *L. casei*/*L. paracasei* 菌株。Goldberg 等 (2000) 应用基因探针进行乳制品中 *L. casei* 的鉴别, 这是一种很方便的方法 (表 4-74), 其结果证实了有关 *L. casei* 组是由一些混合种组成, 这也是 Collin 等 (1989) 和 Dick 等 (1996) 建议对 *L. casei* 进行重新分类的主要依据。按照杂交结果, 在 *L. rhamnosus* 中存在两个变种, 第一个主要是从乳制品分离的菌株, 第二个由人体临床结果获得, 9 株是从瑞典 (CCUG)、1 株是从柏林医院分离获得。

表 4-71 *L. fermentum*/*L. reuter* 组菌种的标准 (Reuter 1965, Holzapfel 等 1997, 1998)

	碳水化合物酸化								生长			
	ara	cel	mal	man	miz	mel	raf	rha	tre	15℃	20℃	45℃
<i>L. casei</i>	-	+	(+)	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>L. rhamnosus</i>	(-)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i>	(-)	-	+	(+)	-	(+)	(+)	-	±	-	+	(+)
<i>L. reuteri</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+

表 4-72 应用三种不同核酸探针和 *L. casei* 组菌株的点印迹杂交

测定菌株数 (Σ=28)	和探针的点印迹反应			探 针 名 称	
	<i>L. zeae</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. zeae</i>	1	+	+	-	<i>L. zeae</i> ; S-S-Lzeae-1587-a-A-18
<i>L. casei</i> I	1	+	+	-	
<i>L. casei</i> II	2	-	+	-	
<i>L. paracasei</i>	4	-	+	-	<i>L. paracasei</i> ; S-S-Lpara-1597-va - a-A-19 <i>L. rhamnosus</i> ; S-S-Lrham-1586-a-A-23
<i>L. rhamnosus</i> I	10	-	-	+	
<i>L. rhamnosus</i> II	10	-	(+)+	+	

(三) *Bifidobacterium* 属内不同种的鉴别

Bifidobacteria 作为益生菌在商业化乳制品中应用时,常出现如下问题:产品中应用的是什么双歧杆菌?错误的发布情况经常发生。经常应用的 *B. bifidum* 不能很好地适于乳制品的强化。一般地 4 个菌株被报道用于乳制品中; *B. longum*、*B. infantis*、*B. breve* 和 *B. bifidum*; 由于 *B. animalis* 对于酸不敏感 ($\text{pH} < 4.2$), 在发酵乳制品中通常用它替代 *B. longum* 进行乳制品发酵。过去通过一个发酵反应可以很好地区分 *Bifidobacterium* 的种, 即蜜三糖的发酵实验 (*B. longum* 反应阳性, *B. animalis* 反应阴性)。但采用该试验对于一些从乳制品中分离的菌株的鉴别效果不明显, 因此需要进行另外的鉴别试验。一种实验证明对于菌种的区分是适用的: 即在 31 个 *B. animalis* 菌株中发现 β -D-木糖酶, 但在 14 株 *B. longum* 中不存在。此外 DNA-DNA 杂交常用于最终确认, 尤其是新命名的菌种如 *B. lactis*, 它可能是和 *B. animalis* 是同物异名 (Kagermeier-callawacs 2000)。

(四) 食品中常用乳杆菌的鉴别

在对乳酸菌分类和命名的研究过程中,经常发生异物同名或同物异名的现象。在商业生产中作为益生菌应用的乳杆菌主要有: *L. casei* Shirota (Yakult 1999)、*L. rhamnosus* GG 菌株 (Gorbach 等)、*L. acidophilus* Lal 等。早在 1969 年,就发现自 1930 年始命名为 *L. acidophilus* 的 Shirota 菌株,实际上是 *L. casei* 菌株。在美国和芬兰临床和营养食品广泛应用的 GG 菌株在 1987 年被认为是 *L. acidophilus*, 后来证明它是 *L. rhamnosus*。最近分子分类的结果表明 Lal 菌株属于 *L. johnsonii* (表 4-73)。

表 4-73 食品中应用的益生乳杆菌的命名变化

Yakult 菌株	1930; <i>L. acidophilus</i> -1935 Yakult 产品-1970 <i>L. casei</i>
GG 菌株 (Gorbach & Goidin)	1987; <i>L. acidophilus</i> (ATCC53103)-1988 Valio(SF)(乳制品)-ca. 1995 <i>L. rhamnosus</i>
Lal 菌株	1995; <i>L. acidophilus</i> 1-1995 LC1-产品-ca. 1998 <i>L. johnsonii</i>

进行必要的工作和配置必要的设备对于菌株的鉴定是十分必要的,生产者和作为监督的权威部门均须进行这方面的工作,以便掌握在日常实验室应用什么方法,以及权威部门采用什么标准对于菌株的鉴定是有效的。表 4-74 给出了实验的成本因素以及食品中益生菌确认方法的准确度,选择某一种方法取决于研究的目的,是需要鉴定一个种内特定的菌株,还是在种间或种的水平上鉴别某一个种。

表 4-74 适于益生菌乳杆菌确认的方法标准

方 法	操作情况			精 确 度		
	成 本	材 料	时 间	属	种	菌 株
表现型						
形态						
生理	±	±	±	++	+	±
生物化学						
SDS-PAGE	+	+	+	++	++	+
基因型						
RAPO-PCR	+	+	++	x	+	++
基粘测定	*	*	*	*	±	+
限制酶分析	±	±	±	+	+	+
凝胶电泳	++	++	++	+	+	++
DNA-DNA 杂交	+	+	±/+	++	++	*

如果有从事菌种鉴定的专业人员,从食品中进行益生菌的正确辨认是可能的,在第一阶段应用经典方法对分离物进行鉴定,主要是进行产品的日常测试。在有疑问的情况下或欲进

行菌株确认，尤其是和权威部门相矛盾的情况时，采用基因杂交技术可能是一种即快又非常有效的方法。这种方法对于菌株不需要进行预先培养，即对存在于食品中的菌株以 DNA 为基础进行直接测定。

第八节 厌氧菌的保存方法

厌氧菌不具有细胞色素酶系，因此，不能利用分子态氧作为最终电子受体来取得能量。

厌氧菌的发育决定于培养基的氧化还原电势，只有在低的氧化还原电势下才能进行发育。氧化还原电势表示溶液的氧化力或还原力的大小，还原力越大，电势越低，进一步会变成阴性。氧化还原电势随这个系统的 pH 的变化而改变，测定电极电势就能决定。培养厌氧性菌时，需用某种方法从培养环境中除去分子态氧，或者使用含有还原剂的培养基以使氧化还原电势降低。

在厌氧菌中，曝露在氧气下就会迅速死亡的菌种不少，与需氧菌相比，不易保存的菌种居多。但是，遗憾的是，现在就厌氧菌特别是无芽孢厌氧菌的保存方法还没有做出多少研究成果，一般地说，有芽孢厌氧菌如梭状芽孢杆菌属比无芽孢厌氧菌容易保存，并且保存期限也长。

冷冻干燥是最好的保存法，大部分的厌氧菌用这种方法可以长期保存。但一般的研究室不可能把多数菌株都用冷冻干燥法保存。只要加入适当的保护剂，在 $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ 的冰箱里保存，也能保持相当长的时间。保存期限因菌种和菌株不同而异，通常是6个月到10年。特别是多数从临床材料分离出来的厌氧菌，如拟杆菌属 (*Bacteroides*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、真细菌属 (*Eubacterium*)、费氏球菌属 (*Veillonella*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、双叉杆菌属 (*Bifidobacterium*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、蛛网菌属 (*Arachnia*)、梭状芽孢杆菌属等能够保存1~2年。既不能利用冷冻干燥保存法，又不能利用冰箱保存法时，可用传代培养法进行保存。但利用传代培养法时，要充分注意传代中杂菌的混入和菌株的变异。就梭状芽孢杆菌来说，往往发生芽孢形成能力、耐热性、毒素产生能力、生物化学性质、菌落形态和抗原结构等的变异。无芽孢厌氧菌往往也同样地发生生物化学性质、致病性、菌落形态、菌体形态、色素产生能力和抗原结构等变异。因此，用传代培养法进行保存时，有必要不时检验保存菌株的各种性状。

一、厌氧菌的保存方法

(一) 传代培养保存法

用于传代培养保存法的培养基因菌种而异，通常使用下列培养基：

庖肉培养基 (Cooked meat medium)、庖肉大豆胨培养基 (Cooked meat phytone medium)、加碳酸钙硫代乙醇酸盐培养基 (Thioglycollate medium, with CaCO_3)、肝浸汤培养基 (Liver broth)、CTA 培养基 (CTA medium)、GAM 半固体培养基 (GAM semi-solid medium)、GAM 发酵半固体培养基 (GAM fermentation semi-solid medium)、BGP 培养基 (BGP medium)、放线菌肉汤 (Actinomyces broth)、脑肝心半固体培养基 (Brain liver heart semi-solid medium)、E 培养基 (E medium for anaerobes)、番茄汁培养基 (Tomato-juice broth) 等。这些培养基多数是为了降低氧化还原电势而加入了还原剂，因此，具有在有氧环境下培养厌氧菌的优点。由于碳水化合物的发酵而产生酸的菌株，保存时要在培养基中加少量 (0.1g/20ml) 碳酸钙 (CaCO_3) 或大理石小片。使用无糖培养基或糖含量少的培

培养基亦可。

进行菌株的传代培养时，每隔 3~4 周，要用无菌毛细吸管（巴氏吸管）吸取菌液 0.2 毫升左右，移植到传代培养基管底。注意不要向培养基里带气泡。进行厌氧菌的传代培养时，如果按照需氧菌的惯例，使用白金环进行接种，往往会使菌株死亡，必须用毛细管进行移植。维持培养基要在室温暗处保存，不宜在冰箱里保存。因为，在低温下氧气进入培养基的量会增加。培养基的塞子，如用玻璃塞来代替棉塞，就能防止培养基水分的蒸发。如用橡皮塞更好一些，但厌氧菌之中产气株较多，要注意橡皮塞的脱落。使用疱肉培养基时，最好在培养基里加 20% 甘油，这样，即使用棉塞也能防止培养液的蒸发，可以长期保存。

（二）液体石蜡覆盖保存法

用巴氏吸管把被保存株移植到与培养保存法相同的培养基中，再用无菌液体石蜡覆盖 1 厘米左右。培养后在室温暗处或 0~5℃ 下保存。

（三）PRAS (Pre-Reduced Anaerobically Sterilized, 预先还原无氧灭菌的) 培养基的传代培养法

利用本培养基进行传代培养，是个良好的保存方法，但由于操作繁杂，在日本只有特殊研究室才能使用。PRAS 培养基的制备法是从培养基的配制到分装的一系列操作，都是用通过加热的还原铜炉而完全除掉的二氧化碳 (CO₂) 和氮 (N₂) 的喷射下进行，而后再经灭菌的，也就是在无氧环境下配制的培养基。PRAS 培养基的基础培养基因研究者而异，著者用 GAM 半固体培养基（关于培养基的组成和配制，请参阅 144 页）作为基础培养基。进行菌的移植时，也在不含氧的 CO₂ 喷射下进行操作。因此，需要特殊装置和 CO₂ 以及 N₂ 的贮藏瓶。

PRAS 培养基有液体培养基、碎肉培养基、半流动培养基和斜面培养基等。当保存糖分解能力强的菌株或在代谢中产生醋酸或乳酸、从而使培养基的 pH 显著下降的菌株如乳杆菌、双叉杆菌等时，除斜面培养基外，应加碳酸钙或大理石小片作为缓冲剂。这种培养法，在日本被称为气体喷射法，主要为兽医学领域或正常菌丛的研究者们使用。有不少厌氧菌，只有用这种培养法才能发育，特别是构成动物体或人体肠管内正常菌丛的厌氧菌尤为如此。

用 PRAS 培养基保存厌氧菌时，存活期限虽因菌种、菌株而异，但一般为 3 个月至半年左右。

研究者使用以 GAM 半固体培养基为基础培养基，加入大理石小片的 PRAS 培养基保存多种无芽孢厌氧菌，据其结果，保存 6 个月至 1 年是没有问题的。特别是产黑素拟杆菌 (*Bacteroides melaninogenicus*) 的多数菌株，只有用这种培养基才能传代。

（四）冷冻保存法

厌氧菌的保存，用冷冻保存法操作最简单，只要具备冰箱即可。容易死亡的无芽孢厌氧菌，用冷冻法保存时大多数菌株能够活存几年。

作为分散剂（保护剂），通常使用去纤维羊血、20% 脱脂乳、含 7.5% 葡萄糖血清和干燥剂 (Mist. desiccans) 等，现在多用去纤维羊血和 20% 脱脂乳。

1. 去纤维羊血保存法

CDC (Center for Disease Control, Atlanta 亚特兰大疾病控制中心) 常用这种方法。无芽孢厌氧菌通常使用固体培养基进行厌氧培养。脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 等普通的厌氧菌，培养 48 小时真细菌属 (*Enbacterium*) 这种发育缓慢的菌株，培养 72 小时以上就能使它发育良好，在固体培养基上加无菌去纤维羊血 0.35 毫升，制备浓厚菌悬浮血液，

用无菌巴氏吸管把这种菌悬浮血液移入小试管，用火焰熔封小试管口。立即放入 95% 干冰-酒精中使之冻结，置于 -42°C 冰箱中保存。按照 CDC 的方法制备菌悬浮血液比较麻烦，可用下列方法：将被保存菌株浓厚地涂抹在 GAM 琼脂平板培养基上，进行厌氧培养 48 小时。另一方面，把无菌羊去纤维血液分装小试管各 1 毫升左右，用白金环刮取平板培养菌放入备注血液中，制备浓厚菌液，立即放入冰箱进行冷冻保存。从厌氧培养装置取出被保存菌株的 GAM 琼脂培养物，要尽快与血液混合，制备菌液使之冷冻。厌氧菌中有些菌株曝露在空气（氧）中，就会很快死亡的菌株较多。

有芽孢厌氧 *Clostridium*，用脑贮藏培养基（参阅培养基的组成和配制法，144 页）进行培养，制备染色样品确认有无芽孢形成，证实芽孢后，立即把培养基放入 -20°C 或 -42°C 的冰箱中进行冷冻保存。如果培养 5 天仍然没有芽孢形成，要把培养 5 天的培养基放入 -20°C 或 -42°C 的冰箱中进行冷冻保存。与无芽孢厌氧菌的情况同样，要用火焰熔封试管。如不用火焰熔封试管，代之以异丁橡胶塞亦可。

2. 脱脂乳保存法

这是 Sutter 等和著者等常用的方法。把 20% 脱脂乳分装于 4 毫升螺旋管形瓶（日电理化学公司制品）各 0.5 毫升，在 110°C 下进行高压灭菌 15 分钟。温度高于 110°C 时，脱脂乳容易凝固，应注意。这种螺旋管形瓶具有硅的衬料，能耐受高压灭菌和 -80°C 以下的低温。装有无菌脱脂乳的管形可多准备一些放入普通冰箱里保存。用 GAM 半流动深层培养基或硫代乙醇酸培养基培养被保存菌株 48 小时，必要时用巴氏吸管吸取培养菌的浓厚发育部位，分装于装有脱脂乳的螺旋管形瓶每 0.5 毫升左右（与脱脂乳等量），立即放入 -80°C 的冰箱里进行冷冻保存。如果不具备 -80°C 的冰箱，使用 -20°C 的冰箱也能达到目的。市场上出售能装这种 4 毫升螺旋管形瓶 60 支的冷冻用容器（日电理化学公司制品），使用这种容器比较方便。如用这种冷冻保存法，除若干特殊菌种外，几乎所有的厌氧菌和无芽孢厌氧菌，都能保存 2~3 年。费氏球菌属（*Veillonella*）甚至能够存活 10 年。据著者的经验，比较容易死亡的梭杆菌 *Fusobacterium nucleatum*、产黑素拟杆菌等的菌株也能保存 2 年。作为冷冻干燥的分散剂，除脱脂乳之外，还可以用 7.5% 葡萄糖马血清。

埃氏巨球形菌（*Megasphaera elsdenii*）在 4°C 下保存时容易死亡。但用液氮进行冷冻干燥就能存活。用 0.5%~1% 葡萄糖培养基培养的口腔纤毛菌（*Leptotrichia buccalis*），在 4°C 或 -20°C 下保存时容易死亡。但培养基的葡萄糖含量为 0.2% 以下时，在同一温度条件下，却能存活较长时间。尽管葡萄糖含量为 0.5%~1%，如在 -70°C 下进行冷冻保存，也能够存活 6 个月以上。进行冷冻保存时，不宜用对数期的培养菌，宜用静止期的培养菌。年幼的培养菌在低温操作下容易死亡。

使冷冻保存中的厌氧菌再生时，从冰箱里取出保存菌株，迅速放入 30°C 左右的温水中，使之完全融化，立即用巴氏吸管吸取，移植到 GAM 半固体深层培养基底部。这时，为了使冷冻保存菌株融化时，不要用力振荡装有菌液的容器。振荡容器，容易使空气中的氧渗入菌液中，从而引起厌氧菌死亡。在 CDC，经冷冻保存的无芽孢厌氧菌融化后，用巴氏吸管移植到新鲜的碎肉葡萄糖培养基（BBL）或硫代乙醇酸培养基（参阅培养基的组成和配制法，144 页）的底部，有芽孢厌氧菌，则在移植到新鲜的碎肉培养基的底部，把培养基放入无氧瓶内进行培养。据著者的经验，不必使用 CDC 所使用的培养基，而移植到上述 GAM 半固体深层培养基，在有氧条件下进行培养即可。就培养日数来说，有的菌株，只用 1 天就能发育，发育缓慢的要 2~3 天。这种 GAM 半固体深层培养基能够使厌氧菌在有氧条件下发

育良好，因此不需要在无氧瓶内进行培养。

(五) 冷冻干燥保存法

对一切厌氧菌的长期保存来说，冷冻干燥法是最好的方法。厌氧菌的冷冻干燥和需氧菌的冷冻干燥，操作是一样的。首先要确认被检菌株是S型菌，而且没有杂菌混入，然后移植到稍厚的GAM琼脂培养基上（在分装量多的培养基上，菌的发育良好），在无氧条件下培养48小时。从无氧培养装置取出的平板培养基，要使菌苔尽可能迅速地悬浮于分散剂中，制备浓厚菌液。或者用液体培养基在无氧条件下培养24~48小时后，进行离心分离，将保护剂尽快加于菌体，制备浓厚菌液。用无菌巴氏吸管把这些菌液分装于无菌安瓿（1毫升安瓿分装0.25毫升左右），立即放在-70℃（干冰-乙醇）下使之冷冻，这时旋转安瓿使安瓿内壁形成菌液薄层。冷冻安瓿装进冷冻干燥机之前，要放在-20℃以下的冰箱里保存。保护剂在使用前要在100℃的沸水中煮沸15分钟左右，去气后放入冷水中急冷，以便除掉保护剂中的氧。因此，保护剂应尽量随用随配，不宜预先制备，因为厌氧菌在氧气下曝露很短时间也容易死亡。作为保护剂，通常使用10%脱脂乳、7.5%葡萄糖血清、含0.1%谷氨酸钠的10%乳糖溶液、干燥剂（Mist . desiccans）等。CDC使用10%脱脂乳，著者等常用含0.1%谷氨酸钠的10%乳糖溶液。有人报道，7.5%葡萄糖血清是最好的保护剂。

厌氧菌的冷冻干燥，除此以外的操作也与需氧菌的这种操作大致相同。冷冻干燥的安瓿置于阴凉处或冰箱里保存。

保存期限因菌种、菌株而异。据著者的经验，几乎所有的厌氧菌都能保存5年以上。

(六) 明胶片干燥保存法

采取与需氧菌同样的方法，制备厌氧菌的明胶片，放入装有干燥剂的试管中保存。Bacteroides fragilis在与需氧菌同样的有氧条件下存活了2年以上。著者虽然只有保存B. fragilis的经验，但不难设想，其他厌氧菌也能保存一年以上。

(七) 厌氧菌保存培养基的组成和配制

1. GAM半固体培养基（日水，GAM semi-solid medium）

豚	10g	NaCl	3g
大豆豚	3g	L-胱氨酸盐酸盐	0.3g
豚	10g	巯基乙酸钠	0.3g
豚化鲸血清(Peptonized whale serum)	13.5g	葡萄糖	2g
酵母浸膏	5g	琼脂	1.5g
牛肉浸膏	2.2g	蒸馏水	1000ml
肝脏浸膏	1.2g	pH	7.3
KH ₂ PO ₄	2.5g		

2. 硫醇培养基

豚 No. 3	10g	琼脂	1g
酵母浸膏	5g	对氨基安息香酸	0.05g
葡萄糖	1g	蒸馏水	1000ml
NaCl	5g	pH	7.2
硫醇络合物	8g		

3. 番茄培养基

番茄汁(400毫升)	20g	蒸馏水	1000ml
豚	10g	pH	6.1
豚化牛乳(Peptonized milk)	10克		

1 和 2 用于 *B. adolescentis* 的保存, 1 和 3 用于 *B. longum* 的保存, 而 *B. breve*, *B. infantis* 和 *B. longum* 的保存培养基和 *B. adolescentis*, *B. bifidum* 的相同, 若用冷冻干燥方法保存其存活时间可达 5 年以上。

二、厌氧保存效果

冷冻干燥法保存时厌氧菌的存活时间如表 4-75 所示

表 4-75 利用冷冻干燥法保存时厌氧菌的存活年数

菌 种	被检菌株数	存活期限	菌 种	被检菌株数	存活期限
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	2	5 年	<i>C. perfringens</i> type D	3	18 年
<i>Actinomyces bovis</i>	9	5 年	<i>C. perfringens</i> type E	1	10 年
<i>A israelii</i>	5	5 年	<i>C. perfringens</i> type F	1	10 年
<i>A viscosus</i>	1	5 年	<i>C. putrefaciens</i>	1	10 年
Anaerobic cocci	17	10 年	<i>C. putrificum</i>	1	10 年
<i>Bacteroides capillosus</i>	6	5 年	<i>C. septicum</i>	11	10 年
<i>B fragilis</i>	18	10 年	<i>C. sphenoides</i>	1	10 年
<i>B hypermegas</i>	4	10 年	<i>C. sporogenes</i>	6	18 年
<i>B melaninogenicus</i>	19	5 年	<i>C. tertium</i>	2	18 年
<i>B oralis</i>	5	5 年	<i>C. tetani</i>	29	10 年
<i>B ruminicola</i> ss <i>brevis</i>	9	5 年	<i>C. tetanomorphum</i>	4	10 年
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> var A	8	5 年	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	2	5 年
<i>B adolescentis</i> var B	10	5 年	<i>E. alactolyticum</i>	11	5 年
<i>B bifidum</i>	18	5 年	<i>C. lentum</i>	3	5 年
<i>B breve</i>	2	5 年	<i>C. limosum</i>	1	5 年
<i>B eriksonii</i>	2	10 年	<i>E. moniliforme</i>	1	5 年
<i>Clostridium aerofaciens</i>	1	5 年	<i>E. rectale</i>	4	5 年
<i>C. akatologenes</i>	1	10 年	<i>E. tortuosum</i>	1	5 年
<i>C. bifermentans</i>	10	10 年	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	26	10 年
<i>C. botulinum</i> type A	8	18 年	<i>F. nucleatum</i>	15	10 年
<i>C. botulinum</i> type B	4	5 年	<i>F. prausnitzii</i>	7	5 年
<i>C. botulinum</i> type C	3	15 年	<i>F. russii</i>	8	5 年
<i>C. botulinum</i> type D	1	15 年	<i>F. varium</i>	30	10 年
<i>C. botulinum</i> type E	2	15 年	<i>Megasphaera elsdenii</i>	2	5 年
<i>C. botulinum</i>	2	10 年	<i>Piptococcus asaccharolyticus</i>	6	5 年
<i>C. chauvoei</i>	3	10 年	<i>P. prevotii</i>	18	5 年
<i>C. fallax</i>	1	10 年	<i>P. variabilis</i>	10	5 年
<i>C. histolyticum</i>	4	10 年	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	16	5 年
<i>C. oedematiens</i> type A	7	10 年	<i>P. magnus</i>	8	5 年
<i>C. oedematiens</i> type B	3	10 年	<i>P. micros</i>	7	5 年
<i>C. oedematiens</i> type C	4	10 年	<i>P. saccharolyticus</i>	8	5 年
<i>C. oedematiens</i> type D	4	10 年	<i>Propionibacterium acnes</i>	36	10 年
<i>C. perfringens</i> type A	25	10 年	<i>P. granulosum</i>	8	10 年
<i>C. perfringens</i> type B	4	10 年	<i>Veillonella alcalescens</i>	3	8 年
<i>C. perfringens</i> type C	5	10 年			

利用冷冻或冷冻保存厌氧菌的方法如表 4-76 所示。

分散剂: 冷冻干燥时, 在含 0.1% 谷氨酸钠 10% 乳糖溶液或者 10% 脱脂乳中加等量的浓厚菌液。冷冻时, 在 20% 脱脂乳中加等量的浓厚菌液。

厌氧菌的保存, 所有的菌种都用同样的方法。

表 4-76 冷冻和冷冻干燥保存厌氧菌的方法

菌 种	维持培养基(培养基的号码和名称见 264 页)	菌 种	维持培养基(培养基的号码和名称见 264 页)
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>C. indolis</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
	2 <i>Acidaminococcus</i> 琼脂培养基	<i>C. kluuyveri</i>	15 <i>Clostridium kluuyveri</i> 培养基
<i>Actinomyces israelii</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>C. lactoacetophilum</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
	3 <i>Actinomyces</i> 肉汤培养基	<i>C. oedematiens</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
	4 碎肉培养基	<i>C. pasteurianum</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
	5 疮肉培养基	<i>C. pectinovorum</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
<i>A. viscosus</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>C. perfringens</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
	6 脑心浸液琼脂培养基	<i>C. putrefaciens</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
	7 酪蛋白胰酶消化物大豆琼脂	<i>C. putrificum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
<i>Arachnia propionica</i>	与 <i>Actinomyces israelii</i> 同	<i>C. rubrum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
<i>Bacteroides clostridiiformis</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>C. scaetologenes</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
	3 <i>Actinomyces</i> 肉汤培养基	<i>C. septicum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
	4 碎肉培养基	<i>C. sphenoides</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
	5 疮肉培养基	<i>C. sordellii</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
	8 PRAS, PYG 琼脂 [®]	<i>C. sporogenes</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
<i>B. corrodens</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同	<i>C. sticklandii</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同
<i>B. fragilis</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同	<i>Clostridium subterminale</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
<i>B. furcosus</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同	<i>C. tertium</i>	与 <i>aerofoetidum</i> 同
<i>B. hypermegas</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同	<i>C. tetanomorphum</i>	5 疮肉培养基
<i>B. melaninogenicus</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同		14 肝肉汤培养基
<i>B. oralis</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同		16 <i>Clostridium tetanomorphum</i> 培养基
<i>B. praecutis</i>	与 <i>B. clostridiiformis</i> 同	<i>C. thermoaceticum</i>	17 <i>Clostridium thermoaceticum</i> 培养基
<i>B. ruminicola</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>C. thermosaccharolyticum</i>	18 <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> 培养基
	8 PRAS, PYS 琼脂 [®]		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>Eubacterium aerofaciens</i>	1 GAM 半固体培养基
	9 硫醇培养基		19 E 培养基
<i>B. bifidum</i>	1 GAM 半固体培养基	<i>E. alactolyticum</i>	1 GAM 培养基
	10 番茄汁培养基		4 碎肉培养基
<i>B. breve</i>	与 <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> 同		14 肝肉汤培养基
<i>B. infantis</i>	与 <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> 同	<i>E. combesii</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>B. tongum</i>	与 <i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> 同	<i>E. contortum</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>Clostridium acetium</i>	11 醋酸梭状芽孢杆菌培养基	<i>E. lentum</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>C. acetobutylicum</i>	12 玉米糊	<i>E. lmosum</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>C. acid-urice</i>	13 尿酸培养基	<i>E. moniliforme</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>C. aerofoetidum</i>	4 碎肉培养基	<i>E. multiforme</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
	5 疮肉培养基	<i>E. tenue</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
	14 肝肉汤培养基	<i>E. tortuosum</i>	与 <i>E. alactolyticum</i> 同
<i>C. beijerinckii</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>Fusobacterium aquatile</i>	1 GAM 半固体培养基
<i>C. bifermentans</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同		3 放射菌属肉汤培养基
<i>C. botulinum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同		4 碎肉培养基
<i>C. butylicum</i>	12 玉米浆		5 疮肉培养基
<i>C. butylicum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同		20 脑心浸液半固体培养基
<i>C. caloritolerans</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. mortiferum</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. caubonci</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. necrogenes</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. chauvoei</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. necrophorum</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. cochlearium</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. nucleatum</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. cylindrosporum</i>	13 尿酸培养基	<i>F. prausnitzii</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. fallax</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. russii</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. felsineum</i>	12 玉米浆	<i>F. symliosum</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同
<i>C. histolyticum</i>	与 <i>C. aerofoetidum</i> 同	<i>F. varium</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同

续表

菌种	维持培养基(培养基的号码和名称见 264 页)	菌种	维持培养基(培养基的号码和名称见 264 页)
<i>Leptotrichia buccalis</i>	与 <i>F. aquatile</i> 同		14 肝肉汤培养基
<i>Megasphaera elsdenii</i>	1 GAM 半固体培养基 21 <i>Megasphaera</i> 培养基	<i>P. saccharolyticus</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
<i>Peptococcus aerogenes</i>	1 GAM 半固体培养基 8 豚酵母浸膏谷氨酸盐培养基 22 含 1% 谷氨酸钠硫醇培养基	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
<i>P. anaerobius</i>	1 GAM 半固体培养基 4 碎肉培养基 5 庖肉培养基 14 肝肉汤培养基	<i>P. micros</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
<i>P. asaccharolyticus</i>	与 <i>P. Anaerobius</i> 同	<i>P. productus</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
<i>P. glycinophilus</i>	1 GAM 半固体培养基 23 胰脏甘氨酸培养基 24 <i>Peptococcus glycinophilus</i> 培养基	<i>Propionibacterium acnes</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
<i>P. prevotii</i>	1 GAM 半固体培养基 4 碎肉培养基 5 庖肉培养基	<i>P. parvum</i>	与 <i>P. prevotii</i> 同
		<i>Ruminococcus bronii</i> ^①	1 GAM 半固体培养基 8 PRAS, PYG 培养基 ^② 25 TYG 培养基 与 <i>R. Bronii</i> 同
		<i>R. flavefaciens</i> ^①	与 <i>R. Bronii</i> 同
		<i>Veillonella alcalescens</i>	1 GAM 半固体培养基 9 硫醇培养基 26 <i>Veillonella</i> 培养基 27 V17 培养基 与 <i>V. alcalescens</i> 同
		<i>V. parvula</i>	

① 只能用冷冻干燥法保存, 如用冷冻法保存, 很快死亡;

② 关于 PRAS (Pre-reduced anaerobically sterilized) 培养基。

第九节 *Bifidobacteria* 培养基的组成和配制

一、天然 (复杂) 培养基

(一) Blaurock 肝-胱氨酸-乳糖琼脂培养基 (1937)

Borenter 指出上述培养基最适于 *Bifidobacteria* 生长, 它也可适于液态 (没有琼脂) 培养基。

1. 配方

琼脂	20.0g/L	肝浸液(鲜)	1000ml/L
胱氨酸	0.1g/L	NaCl	5.0g/L
豚(Difco)	10.0g/L	pH	7.4
乳糖	10.0g/L		

2. 制备

500g 牛肝和 100ml 水煮沸 2h, 过滤稀释至 1000ml, 在 108~109℃ 灭菌 30min, 保质期 7~10 天。

3. 调整 pH

添加 1.2% 山梨酸中和至 pH6.4, 过滤的灭菌物改善了选择性, 使 *Bifidobacteria* 从儿童和粪便中分离成为可能。对于 *Bifidobacteria* 从婴儿粪便中的分离, 胱氨酸成分减至 2.5~10mg/L, 这会引起 *Bifidobacteria* 的较好生长。

4. 菌落的颜色

锐边、瓷白、环形光滑菌落, 具有奶油色中心 (具有 1~2mm 直径), 这需在 Blaurock 培养基上培养 24~48h, 除光滑菌落外也有较少机会出现粗糙菌落, 显微镜观察发现 *Bifidobacteria* 呈明显的多形性, 呈细棒、棒和抹刀状, 棒状占优势, 枝形很少出现。Gram 阳性棒是 2~5 微米长, 0.5~0.7 微米宽。Raynavd 研究表明从婴儿粪便中分离的

bifidobacteria 呈具有黑色中心的不规则形状。

(二) 番茄-酪蛋白胨-酵母抽提物琼脂 (oral-Jensen 1943)

1. 配方 (每升)

琼脂	15.0g	葡萄糖(2%)	20g
酪蛋白胨溶液(1%)	100.0ml	水	800g
胨(Difco)	5.0g	酵母溶解溶液(1%)	
番茄汁	50~60g	pH	6.4~6.5
Vc(0.1%)或半胱氨酸(2%)	1g		

2. 制备

(1) 酪蛋白胨的制备

酪蛋白粉 80g, 胰蛋白酶 (1:900) 2g, 水 700g 和浓盐酸 10g 混合, 于 38°C 保温培养 12 天, 每日摇动, 此后过滤, Na_3PO_4 4g/L, MgSO_4 2g/L 添加于过滤液, pH 调整至 6.7, 灭菌 (115°C、15min)。

(2) 酵母溶解物的制备

3 升蒸馏水冷却至 60°C, 4kg 干酵母被磨碎于水中形成均相混合物, 它被放于灭菌容器水浴加热至 49~50°C, 在培养箱中培养 4 天, 形成的溶液被加热至 105°C 灭菌 30min 后过滤, 滤纸和内容物和 0.5L 水混合, 再加热至 60°C 过滤, 两种过滤液混合, 其中约含 1% 的氮, pH 调至 6.0, 混合物于 115°C 灭菌 15min。

(3) 肽溶于水, 和酵母溶解物, 酪蛋白和番茄汁仔细搅拌混合, 混合物煮沸, 约 15g 琼脂溶于其余水中添加于混合物里。混合物冷却至 40°C, 一个蛋清悬浮于约 50ml 水中, 加入其中, 要求 pH < 7.0, 因为许多氨基酸和 V_B 的一部分在碱性环境中加热被破坏。混合物于 115°C 灭菌 10min 过滤直至培养基澄清, 测定该物质量, 调整 pH 至 6.9, 葡萄糖、Vc 和 NaN_3 被添加, Vc 被溶于一些水调整 pH 至 6.0 (半胱氨酸盐酸盐可替代 Vc 的一部分), 溶液倒入 10ml 试管, 于 120°C、8min 灭菌, 很快冷却, 最终 pH 6.4~6.5。

(4) 培养基的质量依赖于其组分的新鲜程度和培养基自身, 其贮存期为 7~10 天。

3. 配方和制备的修改

在 Frisell 研究中, NaN_3 (0.01% = 0.1g) 添加于原始制备物以防止 *E. coli* 的生长, *E. coli* 能发酵培养基, 使菌落读数困难或不可能。此浓度的 NaN_3 不影响 *B. bifidum* 的生长。

4. 菌落外观

B. bifidum 形成晶状体形、白色菌落, 不同于 *L. acidophilus*, 呈光滑边缘。

(三) 含有葡萄糖和中国兰的碱性血液琼脂培养基

Kludas 将这种链球菌鉴定的培养基应用于 *Bifidobacteria* 的鉴定, 应用指示染料它能较好的区分, *Bifidobacteria* 和其他微生物。

1. 配方 (每升)

琼脂	20.0g	马肉浸出物	1000.00
葡萄糖	10.0g	NaCl	5.0g
胨(粉)	10.0g	羯羊血	7.5g
或 50% 溶液	40.0ml	pH	7.5
Bluish 1% 溶液	30.0ml		

2. 制备

(1) 马肉溶解物的制备：马肉（可能无脂）切碎、研磨，二倍水加入马肉中，在 4~6℃ 过夜贮存，后加热至 40~50℃ 几小时，煮 30min，冷却过滤，在滤布上挤压马肉，添加水调整至 1000ml，该制备物质要立即应用或在高压灭菌锅中灭菌。

(2) 胨溶液的制备：50g 胨溶于 100ml 蒸馏水中，胨溶液（1~2L）应贮于水中直至高压锅中 15min 灭菌，胨溶液贮存时间较长，颜色效果较好。

(3) 水蓝溶液制备：1% 的水蓝溶液被过滤，于高压中灭菌 15min，冷却贮于暗处。

(4) 琼脂混合物的制备：5g NaCl 10g 胨和 20g 琼脂添加于 1000ml 马肉溶解物中，应用 10% 苏打溶液调整 pH 至 7.5，灭菌、过滤。1g 葡萄糖、4ml 胨和 3ml 1% 水蓝溶液加入到 100ml 混合物中，灭菌 20min，冷却至 5℃，灭菌阔羊血温热至 37℃，添加上述 100ml 琼脂介质中注入平皿，获得正常血液琼脂培养基。

3. 菌落外观

E. coli 呈灰色，*B. bifidum* 呈棕色菌落。

(四) VL-琼脂（肉-酵母-琼脂）培养基

这种培养基用于 Tissier 菌种的传代。

1. 配方（每升）

琼脂	18.0g	葡萄糖	2.0g
蒸馏水	1000.0ml	胰蛋白胨	10.0g
肉提取物	3.0g	酵母浸膏	6.0g
NaCl	5.0g	pH	7.4~7.5
半胱氨酸盐酸盐	0.3g		

2. 配方的修改

- (1) 没有添加葡萄糖和琼脂的基础培养基较容易修改；
- (2) 经常加入 10% 马或羊血；
- (3) 具有葡萄糖和 glycocholate 的修改 VL-培养基应用于胆汁盐解离研究；
- (4) VL-琼脂添加 5% 血液或阔羊血或肝和粪提取物（5%）；
- (5) 含有 1% 葡萄糖的液态 VL-培养基用于代谢挥发性产品的测定；
- (6) 添加 0.5% 的阔羊血；
- (7) 添加卡那霉素抑制 enterobacteria；

(8) 配方修改为 (g/L)：胰蛋白胨 10g，NaCl 5g，牛肉提取物 3g，酵母浸膏 5g，半胱氨酸盐酸盐 0.4g，葡萄糖 2.5g，琼脂 0.6g，pH 7.2~7.4，对于固态培养基，添加 12g/L 的琼脂。

(五) BL-琼脂（葡萄糖-血-肝-琼脂）培养基

BL-琼脂培养基是 *Bifidobacteria* 鉴定的最适培养基之一。

1. 配方（每升）

琼脂(Difco)	15.0g	肉提取物	3.0g
葡萄糖	10.0g	植物蛋白胨(BBL)	3.0g
肝提取物溶液	150.0ml	溶液 A	10.0g
胨 3(Difco)	10.0g	淀粉溶解物	0.5g
溶液 B	5.0ml	trypticase (BBL)	5.0g
Tweeer80	1.0g	酵母浸膏	5.0g
蒸馏水	815.0ml	pH	7.2
L-半胱氨酸盐酸盐	0.5g		

溶液 A: KH_2PO_4 25.0g + K_2HPO_4 25.0g 溶于 250ml 蒸馏水中。

溶液 B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0g + $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.337g + NaCl 0.5g 溶于 225ml 蒸馏水。

2. 制备

(1) 肝提取物制备: 10.0g 肝粉在 170ml 蒸馏水中于 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 浸提 1 小时, 煮沸 10min 后过滤。

(2) 除 L-半胱氨酸盐酸盐外的所有成分溶于水, 调整 pH 为 7.2, 于 120°C , 10min 灭菌, 冷却至 50°C , 添加半胱氨酸盐酸盐于 5% 灭菌溶液中。

Ochi 建议在灭菌冷却至 50°C 后添加 50ml/L 马血以修改配方。

3. 菌的外观

在 BL-琼脂培养基上, *Bifidobacteria* 通过菌落的形态、颜色和气味很容易地和其他菌区别开来。

(六) *Bifidobacteria* 培养基 (Lauer 和 Kandler)

其液态培养基用于 *Bifidobacteria* 的传代, 固态培养基用于发酵乳制品 *Bifidobacteria* 的计数, 在这种培养基上所有 *Bifidobacteria* 种均能很好生长。

1. 配方 (每升)

Vc(钠盐)1%	10.0g	酪蛋白胨、胰蛋白消化物	10.0g
半胱氨酸盐酸盐	0.05%	葡萄糖	10.0g
肉提取物	5.0g	K_2HPO_4	3.0g
水	1000.0ml	Tween80	5.0ml
酵母浸膏	5.0g	pH	6.70
琼脂	15.0g		

2. 制备

灭菌后小心加入 Vc 钠盐和半胱氨酸盐酸盐不要污染, 不是新制备的电解质加入前应在蒸汽中加热 10min 灭菌。

(七) 改良的 Rogosa 琼脂培养基

它用于发酵乳中 *Bifidobacteria* 的细胞计数。

1. 配方 (每升)

琼脂	15.0g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35.0mg
L-半胱氨酸盐酸盐	0.3g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	575.0mg
乳糖	10g	KH_2PO_4	3.0g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	120mg	Trypticase	10.0g
K_2HPO_4	3.0g	Tweeer80	1.0g
Tryptose	3.0g	酵母提取物	5.0g
蒸馏水	1000ml	pH	7.0~7.2
柠檬酸铵 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0g		

2. 制备

在灭菌后, 无菌添加半胱氨酸盐酸盐溶液于琼脂中以确保对其无污染。

(八) 碎肉培养基 (ATCC, 1980)

1. 碎肉培养基 (ATCC, 1980)

它是用于 *B. adolescentis* 和 *B. breve* 繁殖的基础培养基。

无脂碎牛肉	500.0g	mol/L NaOH	25.0ml
-------	--------	------------	--------

蒸馏水 1000.0ml

应用瘦牛肉或马肉，在磨碎前去脂和连蹄组织，混合肉、水和 NaOH，边搅拌边煮沸，冷至室温，去除表层脂肪，过滤，保存碎肉片和滤液，添加足够蒸馏水使过滤液体积达 1000.0ml，过滤液中添加：

豚	30.0g/L	酵母浸膏	5.0g/L
K ₂ HPO ₄	5.0g/L	0.025% resazurin 溶液	4.0ml

煮沸、冷却，添加 0.5g，L-半胱氨酸盐酸盐，调整 pH 至 7.0，在无氧的氮气和 3% H₂ 中，每一试管中分送 7ml 至 1 份肉颗粒上，加 4~5 份的液体，在 N₂ 和 H₂ 下用橡胶塞封口，在快速排气下，压力灭菌 15min。

(九) *Bifidobacterium* 培养基 (ATCC, 1980)

该培养基用于繁殖 *B. infantis* (ATCC, 1980)

1. 配方 (每升)

casitone	10.0g	葡萄糖	20.0g
豚	10.0g	番茄汁稀释液	1000.0ml
胰蛋白胍	10.0g	Tween80	2.0ml
酵母提取物	10.0g	pH	6.80

2. 制备

制备稀释的番茄汁：结合一份 Libby 番茄汁和 2 份蒸馏水，煮沸，过滤，在 110℃ 灭菌 30min。

(十) Trypticase-植物蛋白胍-葡萄糖培养基 (ATCC, 1980)

该培养基应用于许多双歧菌种的培养基繁殖，如 *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. indicum*, *B. infantis*, *B. pseudoiongum*, *B. thermophilum*, *B. ruminale*, *B. suis*。

1. 配方 (每升)

琼脂	8.0g	半胱氨酸	0.5g
FeCl ₃	微量	葡萄糖	15.0g
MgCl ₂	0.5g	植物蛋白胍(BBL)	10.0g
K ₂ HPO ₄	2.0g	Trypticase(BBL)	10.0g
酵母浸膏	2.5g	蒸馏水	1000.0ml
ZnSO ₄	0.25g		

2. 制备和修改

分别溶解 FeCl₃ 和 ZnSO₄ 于水中，添加于培养基的基质中。在 *B. magnum* 和 *B. pullorum* 的培养中添加 Tween80 (2ml/L)。

番茄汁琼脂培养基 (ATCC, 1980) 用于 *B. bifidum* 的培养繁殖。

二、选择性培养基

(一) 选择性培养基 I (Haenel 等 1970)

该选择性培养基用于来自婴儿成人肠道 *B. bifidum* 培养和平板计数的测定，它是 NH-琼脂培养基 (Haenel 等 1970) 的修改。

1. 配方 (每升)

琼脂	10.0g	人血	30ml
碳水化合物	15.0g	中性红溶液	0.1ml
胱氨酸	500.0mg	NaN ₃	100mg

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	2.0g	肉浸提物	0.3g
Tween80	1.0ml	盐溶液	2.5ml
溴甲酚绿溶液	2.5ml	NaCl	3.0g
半胱氨酸盐酸盐	500mg	蒸馏水	
胨	10.0g	酵母浸膏	

2. 制备

(1) 溴甲酚蓝溶液：0.2g 溶于 40ml 水，加 4 滴 40%KOH 溶液；

(2) 中性红溶液：0.05g 溶于 20ml 96%乙醇；

(3) 盐溶液：250ml 溶液中含 10mg MgSO₄ · 7H₂O, 0.5gFeSO₄ · 7H₂O 和 0.337gMnSO₄ · 2H₂O；

(4) 在溶解配料后加半胱氨酸盐酸盐，它要在灭菌前立即加，血液应在灭菌后加入；

(5) 碳水化合物：分别添加下列物质于液态培养于液态培养基中，葡萄糖、乳糖、阿拉伯糖，木糖，纤维二糖，山梨醇，松三糖和水杨苷，于 100℃ 杀菌 15min。

3. 菌落外观

B. bifidum (从婴儿肠道来) 被计数，进行它的分类和染色反应，应用碳水化合物发酵进行类型鉴定，相同型的 *B. bifidum* 在佩特里皿 (petri dish) 中总是表明为相同的菌落形态，这和应用的碳水化合物的种类无关，不同类型的 *B. bifidum* 在相同的佩特里皿中生长表明为不同的菌落形态和指示剂还原性。

(二) 乳制品中 *Bifidobacteria* 计数的选择性培养基 (Teraguchi 等 1980)

这是一种用于含有 *Bifidobacteria*、乳杆菌和 Streptococi 乳制品 *Bifidobacteria* 计数的选择培养基，它又称 NPNL 培养基，是不含下列物质的 BL-琼脂培养基：含血新霉素硫酸盐、巴龙霉素硫酸盐、萘啶铜酸和 LiCl。

无血和具有 NPNL-选择性溶液的 BL-琼脂培养基 (每升)：

LiCl (3mg/ml)	3.0g	萘啶铜酸 (15μg/ml)	15mg
新霉素硫酸盐 (100μg/ml)	100mg	巴龙霉素硫酸盐 (200μg/ml)	200mg

制备方法见 BL-琼脂培养基，NPNL 选择性溶液和半胱氨酸盐酸盐一起在培养基灭菌冷却至 50℃ 时添加。

(三) 改良的选择性 Rogosa 琼脂培养基

该选择性琼脂培养基含有 1000ml 修改的 Rogosa 琼脂，还添加 50ml 下列溶液以抑制发酵乳中乳酸菌的生长。100ml 选择性溶液的制备：30g 丙酸钠溶于 90ml 蒸馏水，那时 100mg 巴龙霉素硫酸盐 400mg 新霉素硫酸盐和 6g LiCl 被添加，在溶解这些物质后，溶液用蒸馏水稀释至 100ml。

(四) 选择性 BL-培养基

同选择性 BL-琼脂培养基有相同的组成，包括添加选择性溶液 (同选择性修改的 Rogsa 培养基)。

三、半合成和相关的培养基

(一) Tomarelli 培养基

1. 配方 (每升)

具有双倍强度的实验培养基

腺嘌呤	0.020g	酪蛋白酶解物	10.0g
Vc	2.0g	葡萄糖	40.0g

K ₂ HPO ₄	5.0g	胱氨酸	0.40g
NaAc	50.0g	鸟嘌呤	0.020g
尿嘧啶	0.020g	B 盐	10.0ml
P-氨基-苯甲酸	0.020mg	色氨酸	0.40g
泛酸钙	0.80mg	黄嘌呤	0.020g
V _{B6} 盐酸盐	2.40mg	生物素	0.008mg
V _{B1} 盐酸盐	0.40mg	叶酸	0.020mg
丙氨酸	0.40g	V _{B2}	0.40mg
天冬酰胺	0.20g	pH	6.8

B 盐: FeSO₄ · 7H₂O 0.50g, MgSO₄ · 7H₂O 10.0g

MgSO₄ · 2H₂O 0.337g, NaCl 0.50g

溶于 250ml 蒸馏水中得 B 盐液。

10mg 灭菌 Vc 在灭菌后添加于 10ml 单一强度培养基中。

许多研究者应用 Tomarelli 溶液进行了 *B. bifidum* 代谢的研究。

(二) Norris 培养基

配方 (双倍强度、每升)

Vc	1.0g	B ₁₂	0.010mg
叶酸 (较高含量)	0.20mg	胰酶制剂	0.20g
Tween 80	2ml	pH	6.8

修改后的培养基我们称之为 Gyorgy 培养基, Gyorgy 添加脱脂人乳于相似的培养基配方中。从 Tomarell 等培养基的修改要添加 10g/100ml 人乳, 脱脂或单一强度介质中加 2%, 该培养基用于 *B. bifidum* Var. *pennsy-Ivanicus* 的培养繁殖 (称之为 *Lactobacillus bifidus* 培养基)。

四、完全合成培养基

(一) 基础营养培养基 (Hassinen 等, 1951)

这是第一个用于 *Bifidobacteria* 的具有最小营养需求的完全合成培养基。

1. 配方 (双倍强度, 每升)

NH ₄ Ac	4.0g	生物素	0.008mg
泛酸钙	0.80mg	胱氨酸	0.40g
乳糖	70.0g	K ₂ HPO ₄	5.0g
NaAc	50.0g	B 溶液	10ml
蒸馏水	1000.0ml	pH	6.8

B 盐液同 Tomarell 培养基中的 B 盐液。

2. 制备

在灭菌后 10mg 灭菌 Vc 添加于每 10ml 单一强度的培养基中。

(二) 用于 *Bifidobacteria* 亚种 B1 计数的改良培养基

这种选择性培养基含有 V_{B2}、双泛酰硫乙胺、阿拉伯二糖 (不含乳糖) 以满足 *Bifidobacteria* 亚种 B2 的营养需求 (Dehnert, 1975)

1. 配方 (每升)

水洗琼脂	20.0g	Pantethine	0.50mg
L (+)-阿拉伯二糖	10.0g	V _{B2}	0.250mg
半胱氨酸盐酸盐	0.40g	NaCl	0.010mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20g	蒸馏水	1000ml

(NH ₄) ₂ SO ₄	4.0g	K ₂ HPO ₄	5.0g
生物素	0.005g	抗坏血酸钠	10.0g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.010g	Tween 80	1.0g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.007g	pH	6.8~7.0

2. 制备

该培养基分两部分制备，一部分含有除二倍强度阿拉伯二糖、Vc 外全部的成分，对其灭菌。另一部分溶解 1g Vc 于蒸馏水中，用 1mol/L NaOH 调整 pH6.8~7.0，1g 阿拉伯二糖溶于抗坏血酸钠盐中，定容至 50ml，溶液过滤灭菌，等体积的抗坏血酸盐~阿拉伯二糖溶液加热至 55~60℃，与冷却 55~60℃ 融溶琼脂混合，混合物注皿、固化，要防止抗坏血酸盐~阿拉伯二糖溶液过热引起 Vc 的氧化。

五、商用培养基

生产 *Bifidobacteria* 培养基的生产商如下：

BBL 公司，Difco 公司，Merck 公司，Oxoid 公司，Pasteur 研究所，Production 公司

1. Actinomyces 肉汁 (BBL No. 10919/pH6.9)

Actinomyces 培养和保存的基本培养基，应用于 *Bifidobacterium adolescentis* 的繁殖。

2. 厌氧培养基 (BBL No. 10925/pH7.2) 和 Bacto Brewer 厌氧培养基 (Difco No. B279/pH7.2) 用于 *Bifidobacteria* 的培养。

3. Bacto Elliker 肉汁 (Difco No. O974/pH6.8)

用于培养乳制品中链球菌和乳杆菌，用于 *B. bifidum* Var. *Pennsylvanicus* 的计数和繁殖，液态培养基，用于细胞制备和生长实验。

4. 脑心溶提物琼脂培养基 (BBL No. 11064/pH7.4)

Bacto 脑心溶提物琼脂培养基 (Difco B1418/pH7.2)

脑心溶提物琼脂培养基 (Oxoid No. CM375/pH7.4)

用于 *Bifidobacteria* 的鉴定。

5. Columbia 琼脂基 (BBL No. 11123/pH7.3)

Bacto Columbia 血液琼脂基 (Difco No. 0792/pH7.3)

Columbia 琼脂基 (Oxoid No. CM331/pH7.3)

用于 *Bifidobacteria* 的分离，常用 Columbia 琼脂 (Oxoid) 含 7% 马血和新霉素硫酸盐 (100μg/ml) 作培养基。

6. 旺盛生长的肉汁和琼脂培养基 (BBL No. 11234 和 11229/pH7.0)

其应用如下：① 羊血添加于该培养基用于 *Bifidobacteria* 培养；② 用于人口腔 *Bifidobacteria* 的鉴定；③ 强化 0.2% 酵母膏和 5mg/L naemin，用于 *Bifidobacteria* 抗生素敏感性测试；④ 用于 *B. bifidum* Tissier 和它的变种 *Pennsylvanicus* 的轮流传代；⑤ 用于 *B. longum* subsp. *animals*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilus* 的繁殖培养。

7. L 琼脂培养基 (BBL No. 11324/pH7.0)

Bacto L 琼脂培养基 (Difco No. 0594)。

8. Loeffler 培养基 (BBL No. 11353/pH7.6)

Loeffler 血清培养基 (Oxoid No. PM200)

Loeffler 培养基用于：① 促进 *Bifidobacteria* 的生长；② *Bifidobacteria* 的鉴定；③ Loeffler 白喉培养基用于 *Bifidobacteria* 的培养。

9. M. R. S 肉汁培养基 (Oxoid No. CM361/pH6.2)

其应用如下：①添加 1% Vc 和 0.02% 半胱氨酸盐酸盐，用于 *Bifidobacteria* 的鉴定；②含半胱氨酸盐酸盐的 M. R. S 培养基是 *Bifidobacteria* 生长的最适液态培养基；③添加 0.3g/pH6.5 半胱氨酸 M. R. S 培养基用于 *Bifidobacteria* 不同种的传代；④Difco *Lactobacillus* M. R. S 肉汁培养基应用于 *B. coryneforme* 的繁殖。

10. 酪化乳培养基 (BBL No. 11903)

酪化乳培养基 (Oxoid No. 132)

用于 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacteria* 的研究。

11. 强化 Clostridial 琼脂培养基 (BBL No. 11563/pH6.8)

强化 Clostridial 琼脂培养基 (Oxoid No. CM151/pH6.8)

二者的应用情况如下：①Oxoid 的培养基用于酸奶中 *Bifidobacteria* 的鉴定，也可用于发酵乳中 *Bifidobacteria* 鉴定；②添加 2% 琼脂的培养基用于鉴定；③用于 *B. bifidum* 冷冻干燥物的厌氧培养；④对它修改用于 *Bifidobacteria* 的分离。

12. LBS 琼脂培养基 (BBL No. 11326/pH5.5)

Bacto Rogosa SL 琼脂培养基 (Difco No. 0480)

Rogosa 琼脂培养基 (Oxoid No. PM221/pH5.8)

应用如下：①LBS 培养基用于成人口腔 *Bifidobacteria* 的分离；②添加 1% 肉浸提物和 1.5% NaAc 的 LBS 琼脂培养基，在冷却至 50℃ 加入 0.37% (V/V) HAc，注于 Petri 皿，用于双歧菌的研究；③添加 100μg/ml 新霉素用于 *B. bifidum* 的鉴定。

13. 具有半胱氨酸的培养基 Rosenow (Pasteur Production No. P5.568/pH7.2)

液态培养基主要用于厌氧菌的培养，它的应用：①添加 80μg/ml 萘啶酮酸用于厌氧菌培养；②不同 *Bifidobacteria* 的传代和培养。

14. 硫羟乙酸盐培养基 (BBL No. 11715/pH7.2)

Bacto 液态硫羟乙酸盐培养基 (Difco No. 0256)

硫羟乙酸盐培养基 (Oxoid No. CM 23/pH7.2)

应用情况：①应用修改的硫羟乙酸盐培养基，分离从婴儿粪便和阴道分泌物中来源的 *Bifidobacteria*；②对阴道分泌物 *Bifidobacteria* 的培养；③用其修改培养基进行继代培养。

15. Bacto 硫醇肉汤培养基 (Difco No. 0307)

①用于 *B. breve* 的厌氧生长；②用于 *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* 和 *B. longum* 的繁殖。

16. 番茄汁琼脂培养基 (BBL No. 11738/pH6.1)

Bacto 番茄汁琼脂培养基 (special) (Difco No. 0389/pH5.0)

番茄汁琼脂培养基 (Oxoid No. CM113/pH6.1)

①成人粪便中 *Bifidobacteria* 的分离；②用于 *B. bifidum* 的培养；③用于 *Bifidobacteria* 的鉴定 (Difco 公司)；④ *B. bifidum* 可保存于含 2% 葡萄糖和 0.2% 半胱氨酸 Oxoid 番茄汁琼脂培养基中。

17. Trypticase 大豆培养基 (BBL No. 11767/pH7.3)

Bacto-胰蛋白酶大豆汁培养基 (Difco No. 0370/pH7.3)

胰蛋白酶大豆汁培养基 (Oxoid No. CM129/pH7.3)

它们是 *Bifidobacteria* 最好的液体生长培养基。

18. VF-琼脂培养基 (Pasteur Production pH7.4~7.6)

它主要应用于：①粪便中 *Bifidobacteria* 的分离；②VF 经很少修改，如无葡萄糖的该培养基是用于双歧菌发酵和测试的基本培养基；③用于 *B. bifidum* 的平板计数；④用于 *B. bifidum* 的繁殖。

六、样品和计数的稀释液

1. Haenel 的缓冲溶液

琼脂	1.0g/L	KH ₂ PO ₄	4.5g/L
Na ₂ HPO ₄	6.0g/L	硫羟基乙酸(97%)	0.3ml/L
蒸馏水	1000ml	pH	6.6

2. Ochi 等缓冲溶液

琼脂	1.0g/L	Na ₂ HPO ₄	6.0g/L
KH ₂ PO ₄	4.5g/L	蒸馏水	1000ml
Tween80	1.0g/L	pH	6.8
半胱氨酸盐酸盐	0.5g/L		

3. 其他稀释剂

(1) 0.1%玉米水解液和1%酵母浸膏溶液。

(2) RCM、LV 和具有0.05%半胱氨酸盐酸盐溶液。

参 考 文 献

- 1 Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. *Bifidobacteria* and their role, 1983 Birkhauser Verlag, Basel
- 2 Mitsuoka et al., A profile of intestinal bacteria, 1989, Yakult Honsha Co. Ltd, Tokyo
- 3 Rogosa, M. *Bifidobacterium*, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, P669, 1974
- 4 Scardovi, V. *Bifidobacterium* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th, Ed, P1418, 1986. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore, MD
- 5 Desjardins, M. And D. Roy, J. Dairy Sci., 73: 299, 1990
- 6 De Vries, IV. et al., J. Bacteriol, 96: 472, 1968
- 7 Hosono, A., New Food Industry, 32 (10): 51, 1990
- 8 郭本恒, 保健与功能食品, 黑龙江科技出版社, P254-298, 1995
- 9 郭本恒, 汪河, 食品工业, 1: 24-26, 1998
- 10 Weiss, J. E. and Kettger, L. F., J. Bact., 28: 501-518, 1934
- 11 Weiss, J. E. and Rettger, L. F. J. Bact., 27: 39, 1934
- 12 Blaurock, G., Zur Physiologie der Bifidusbakterien. Mschr. Kinderheilk. 68: 304-309, 1937
- 13 Norris, R. F. et al., J. Bact., 60: 681-696, 1950
- 14 Mitsuoka, T., DSA 31: 517, 1969
- 15 Laner, E. Inter. J. Syst. Bacteriol., 40: 100, 1990
- 16 Glick, M. C., et al., Biochem. Biophys. Acta, 37 (2): 361-363, 1960
- 17 Kojima, M., et al., J. Bact. 102: 217-220, 1970
- 18 Husain, I. et al., J. Bact., 111: 841-844, 1973
- 19 Gyorgy, P., Pediatrics, 11: 98, 1953
- 20 Gyorgy, P. and C. S. Rose, J. Bacteriol., 69: 483, 1955
- 21 Scardovi, V. and L. D. Trovattelli, Inter. J. Syst. Bacteriol., 24: 21, 1974
- 22 Chiappini, M. G., Ann. Microbiol. Enzymol., 16: 25, 1966
- 23 Jao, Y. C. et al., J. Food Sci., 43: 1257, 1978

- 24 Gyorgy, P. et al. , Eur. J. Biocheml, 43: 29, 1974
- 25 Ziajka, S. et al. , DSA, 37: 35, 1975
- 26 Ibikoski, Z. and Zikjka, S. , Indian J. Dairy Sci. , 39, 77, 1986
- 27 Hirano, S. et al. , J. Biochem. , 64 (4): 563-565, 1968
- 28 Niclrols, J. H. et al. , J. Biochem. , 64 (4): 563-565, 1968
- 29 Lambert, R. and Zilliken, F. , Arch. Biochem. Biophys. , 110: 544, 1965
- 30 Kawase, K. et al. , Bifidobact. Microflora, 2: 25, 1983
- 31 Zilliken, F. et al. , Arch. Biochem. Biophys. . 48: 225, 1954
- 32 陈瑞娟, 1993, 食品与发酵工业, 2: 82
- 33 H. Tomomastu, 1994. Food Technol. , 10: 61
- 34 編集部 1994. 食品と开发 28 (12): 16
- 35 Duxbury, D. D. and Swientek, K. J. 1992 Food Proc. 5: 22
- 36 施正学. 东北农业大学博士论文 (1993). 双歧杆菌和双歧杆菌增殖因子的特性及应用研究
- 37 modler, H. W. et al. , 1990 Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23: 29
- 38 Kanbe, M. 1988. New Food Ind. (Jpn) 30 (1): 77
- 39 Wilkins, T. D. and Van Tassel, R. L. 1983. Production of intestinal mutagens. Chpt. 12 in Hentges P265-272
- 40 Koizumi, T. et al. , Sogo Kinsho (Jpn) 1980, 29: 2473
- 41 Cummings, J. H. 1983. Fermentation in the human large intestine. Evidence and implications for health. Lancet. 1206-1208
- 42 Kato, Y. et al. , 1992. The effects of soybean oligosaccharides on intestinal metabolic activity. Tokyo
- 43 Mutai, M. H. Y. , et al. , German Pat. 2813733 (30/3/78), 1978
- 44 Saito, Y. et al. , 1992. Microbial Ecol. Health Dis. 5: 105
- 45 Goldin, B. K. and Gorbach, G. L. 1976. J. Natl. Cancer Inst. 57: 371
- 46 Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1984. J. Natl. Cancer Inst. 73: 689
- 47 Mitsnoka, T. 1990 J. Ind. Microbiol. 6: 263
- 48 Benno. Y and Mitsuokd, T. 1986. *Bifidobacteria* Microflora 5: 13
- 49 Kanbe, M. 1988. New Food Ind. 30 (1): 77
- 50 Komai, M. 1990. New Food Ind. 32 (12): 39
- 51 Hidaka, H. et al. , 1986 *Bifidobacteria* Microflora 5 (1), 37
- 52 Wada, K. et al. , 1991. Bifidus 4: 135
- 53 Masai, T. et al. , 1987. Japan J. Bacteriol. , 42 (1): 313
- 54 Rasic, J. and Kurmann, J. 1983. *Bifidobacteria* and Their Role Basel, Switzerland. P81-101
- 55 Chung, K. C and Goepfert, J. M. 1970. J. Food Sci. , 35: 326
- 56 Tamura, Z. 1983. *Bifidobacteria* Microflora 2 (1): 3
- 57 Anand, S. K. et al. Cultured Dairy Products J. 11: 6
- 58 Anand, S. K. et al. Cultured Dairy Products J. 2: 21
- 59 Nakaya, K. 1984. *Bifidobacteria* Microflora 3: 3
- 60 Mutai, M. , 1978. New Food Ind. 20 (8): 17
- 61 Saito, Y. et al. , Microbiol. Ecol. Health Dis. , 5: 105
- 62 Hotta, M. et al. 1987. Keio J. Med. 1987: 298
- 63 Renner, H. W. and Munzer, R. 1991 Mutagen Res. , 262: 239
- 64 Kurmann, J. A. and Rasic J. L. 1991 Therapeutic Properties of Fermented Milk, ed P. K. Rohinson, Elsevier Applied Science, Publishing Co. Inc. New York P117
- 65 Roberts, A. K. et al. , 1985. Composition and Physiological Pr4operties of Human Milk, ed. J. Schaub, P259-269
- 66 Hosono, A. 1990. New Food Ind. 32 (10): 51
- 67 Takasoye, M. et al. , Clinics and Research 67: 304 (In Japanese)
- 68 Hidakd, H. 1985. Microbe (Jpn) 1: 32
- 69 Hepner, G. et al. , Am. J. Clin. Nutr. 32: 19
- 70 Mann, G. V. and Spoerry, A. 1974 Am. J. Clin. Nutr. 27: 464
- 71 Gilliland , S. E. and Walker, K. K. 1990. J. Dairy Sce. , 73: 905
- 72 Suzuki, Y. et al. , Animal Sci. Technol. (Jpn) 62 (6): 565
- 73 Muting, D. et al. , 1968. Am. J. Proctol. , 19: 336
- 74 Hata, Y. et al. , 1983. Geriatr. Med 21: 156

- 75 Kanbe, M. Cancer control and fermented milk chapt. 17 Nakazawa and Hosono. P377
- 76 Fujiwara, S. et al. , J. Japan. Soc. Nutr. Food Sci. , 43 (5); 327
- 77 Taketomo, T. et al. , 1983. Japanese patent publication, 58203913
- 78 Hughes, J. B. and Hoover, D. G. 1991 Food Technol. 54 (4); 74, 76, 78-80, 83
- 79 滝澤登志雄 .1994. 食品と开发 28 (12); 21
- 80 太田篤扎等 .1993. 日本营养食粮学会志 .46; 123
- 81 yamashita, K. K, et al. Nutr. Res. , 4; 961
- 82 佐野隆志, 第 3 回ネホシユカ研究会报告 11 (1986)
- 83 Hata, Y. et al. 1989. J. Japan. Soc. Clin. Nutr. 11 (1); 42
- 84 Spiogel, J. E. 1994. Food Technol. 48 (1); 85
- 85 Tokunage, T. et al. , 1986. J. Nutr. Sci. , 32; 111
- 86 1987 日本农艺科学会志 161 (8); 915
- 87 Dong. M. W. and J. L. Dicesare. 1983. Food Technol. , 37 (1), 58
- 88 Richmond, M. L. D. et al. 1982. J. Dairy Sci. , 65; 1394
- 89 Tweeten, T. N. and C. B. Euston. 1980. Food Technol. , 34 (12); 29
- 90 I. J. Jeon and V. R. Mantha. 1985. J. Dairy Sci. , 68; 581
- 91 H. S. Kwak and I. J. Jeon. 1986. J. Dairy Sci. 69; 2785
- 92 M. Mitsutomi. 1991. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 38 (8); 722
- 93 R. Beach and I. Menzies. 1986. J. Dairy Res. , 53; 293
- 94 Menzie, I. S. 1973. J. Chromatography. 81; 109
- 95 根井外喜男编, 金连缘译, 微生物保存法, 上海科学技术出版社, P257-282
- 96 郝德善, 中国微生物学杂志, 1; 116, 1989
- 97 Hoskins, L. C. , Dig. Dis. Sci. , 26; 769, 1981
- 98 Fernandes, C. F. et al. FEMS Microbiol. Revs. 46; 343, 1987
- 99 Gilliland, S. E. J. Dairy Sci. , 72; 2483, 1989
- 100 Hidaka, H. and Eida, 食品工业, 31; 52, 1988
- 101 Mitsuoka, J. Bifidobact. Microflora, 3; 11, 1984
- 102 Stenger, K. and Wolf, H. DSA, 25; 422, 1963
- 103 Horecny, K. , DSA. 29; 671, 1967
- 104 Mayer, J. B. et al. , DSA. 28; 312, 1966
- 105 Ievesgue, J. et al. , DSA 24; 141, 1962
- 106 Orla-Jensen, S. et al. , The lactic acid bacteria, Vol. 1 Copenhagen, Denmark, 1943
- 107 Maryer, J. B. Bacterium bifidum, Mschr. Kunderheilk. 97; 420, 1949
- 108 Kizza. J. and Ziajka, S. Milchwissenschaft 28; 696-699, 1973
- 109 Gianella, R. A. et al. , Gut 13; 251-256, 1972
- 110 Lipinska, E. et al. , XX internat. Dairy Congr. Vol. E, 528-529, 1978
- 111 Yakult Honsha co. , ltd. The Summury of reports Yakult, Tokyo, Japan, 1971
- 112 Catteau, M. et al. , Bifidobacterium. Ann. inst. Pasteur lille, 22; 201-205, 1971
- 113 Rehm, E. , Brit. pat. 1208599. 1970
- 114 K. M. Kamaly, Food Research inter. 1997, 30, 675-683
- 115 J. W. Hou et al. , Food Res. inter. 2000, 33, 393-397
- 116 M. Saxelin et al. , Trends in Food Sci. Tech. , 1999, 10, 387-392
- 117 I. P. Kanr et al. , Eur. U. Pharm. Sci. 2002, 15, 1-9
- 118 J. Sako et al. , Intr. Daity J. 1999, 9, 69-80
- 119 W. C. Lian et al. , Inter. J. Food Mocro. 2002, 74, 79-86
- 120 C. C. Vinderola, et al. , Food Res. Inter. 2000, 33, 97-102
- 121 C. C. Chou and J. W. Hou, Inter. J. Food Micro. 2000, 56, 113-121
- 122 G. Reuter, et al. , Food Res. Inter. 2002, 35, 117-124
- 123 S. P. Marx, et al. , FEMS Micro. Letters, 2002, 182, 163-169
- 124 J. Prasad, et al. , Int. Dairy J. 1998, 8, 993-1002
- 125 K. Sultana, et al. , Int. 5. Food Mocro. 2000, 62, 47-55
- 126 G. Klein, et al. , Int. 5. Food Micro. 1998, 41, 103-125

- 127 H. S. Chung, et al. , Int. J. Food Micro. 1999, 47, 25-32
- 128 F. He, et al. , FEMS Immonu. Med. Micro. 1999, 47, 25-32
- 129 A. C. Ouweland, et al. , FEMS Micro. Letters 1999, 172, 61-64
- 130 A. M. P. Gomes and F. X. Malcata, Trends in Food Sci. Tech. 1999, 10, 139-157
- 131 P. K. Gopal, et al. , Inter. Dairy J. 2001, 11, 19-25
- 132 A. Shihata and N. P. Shah, Inter. Dairy J. 2000, 10, 401-408

第五章 *L. acidophilus* 及其制品

第一节 *L. acidophilus* 作为益生菌的科学基础

益生菌的作用依赖于宿主口服菌体活性细胞而产生的有益健康效果。表 5-1 列出了商业上常用的多种 *Lactobacilli* 和 *bifidobacteria* 类益生菌。

表 5-1 人体常用的乳杆菌类益生菌

同型发酵	异型发酵	同型发酵	异型发酵
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. amylovarus</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>		

人们对益生菌作用的机理提出了多种推断和假设，并进行了大量的临床实验；但由于迄今为止的研究大多集中于动物实验、生物标记和少量人群，故评估益生菌的健康功能是十分困难的，为了较好地研究其性质、进行更广泛的流行病学评估是必要的。由于这类实验的成本高，在其应用前应对菌株进行很好的研究。

L. acidophilus NCFM 是一株已被广泛应用的商业化菌株，它由北卡罗纳州立大学的食物微生物研究实验分离鉴定，其主要发明人为 M. Speck、S. Gilliland 和 T. Klaenhammer。自 70 年代从人体中分离以后，先后经大学、研究所研究，现在法国由 Rhodia 公司上市销售了 26 年，它被广泛应用于液态奶、酸奶、固态液化食品、婴幼儿食品和果汁，本节将着重介绍 *L. acidophilus* 类菌的研究情况，并常以研究深入的 *L. acidophilus* NCFM 为例证。

一、*L. acidophilus* 的分类

L. acidophilus 的分类经历了重要的变更，从中产生了几个新的种 (Klaenhammer 和 Russell, 1999; Klein 等, 1998)。经过重新分类后的 *L. acidophilus* 具备多个表现型和基因型，采用和特异性寡核苷酸探针杂交的实验进一步表明 NCFM 属于 A₁ 类 *L. acidophilus* (L. Sanders 等, 1996)，该特异性寡核苷酸探针的序列为 5' TCTTTCGATGCATCCACA 3' (pot 等, 1993)。NCFM 的 16S 核糖体 RNA 基因的顺序被证实是和 *L. acidophilus* 相同的 (Kullen 等, 2000)，NCFM 的发酵和生长特性和 *L. acidophilus* 菌株 ATCC4356 是相同的，其结果见表 5-2 (Gilliland 等, 1976)。

表 5-2 NCFM 和 *L. acidophilus* 菌株发酵和生长特比较 (“+”表示生长，“-”表示不生长)

特 征	NCFM	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	特 征	NCFM	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	特 征	NCFM	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356
生长(15℃)	-	-	半乳糖	+	+	水杨苷	+	+
生长(45℃)	+	+	乳糖	+	+	山梨醇	-	-
来自精氨酸的胺	-	-	麦芽糖	+	+	蔗糖	+	+
七叶苷	+	+	鼠李糖	-	-	海藻糖	+	+
纤维二糖	+	+	甘露醇	-	-			

它是革兰氏阳性、同型发酵和过氧化物酶阴性的棒状菌，其 DNA 含 38.4%G+C，发酵产生 34%的 D 型乳酸和 66%的 L 型乳酸，NCFM 和其他益生 *Lactobacilli* 菌发酵 L 型和 D 型乳酸比例见表 5-3 (Girgir 等, 2000)。

表 5-3 NCFM 和其他益生菌发酵 D、L 型乳酸比例

菌种	菌株	D-乳酸(%)	L-乳酸(%)	菌种	菌株	D-乳酸(%)	L-乳酸(%)
<i>L. acidophilus</i>	NCFM	33.8	66.2	<i>L. delbrueckii</i>	ATCC 4797	99.5	0.5
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	21.5	78.5	<i>L. gallinarum</i>	ATCC 33199	39.0	61.0
<i>L. amylovorus</i>	ATCC 3620	56.3	43.7	<i>L. gasseri</i>	ATCC 33323	40.5	59.5
<i>L. casei</i>	ATCC 393	2.6	97.4	<i>L. johnsonii</i>	ATCC 33200	54.6	45.4
<i>L. crispatus</i>	ATCC 33820	56.4	43.6				

二、*L. acidophilus* 的遗传学

通过将单一或多个外源基因引入商业化 *L. acidophilus* 中，已经成为一种行之有效的对 *L. acidophilus* 菌种性能改良的实验技术，包括对各种重要商业菌遗传特性的改进和研究。外源 DNA 对 *Lactobacilli* 的转移比较困难，尤其是细胞的转化方面。*L. acidophilus* NCFM 通过 Luchansky 等 (1989, 1991) 和 Walker 等 (1996) 开发的原生质体和媒介技术实现了细胞转化，但对其新的标准菌株 *L. acidophilus* ATCC 4356 进行细胞转化实验时，仅产生较少或没有产生转化体。Walker 等 (1996) 让外源 DNA 引入到 NCFM 和其他 *L. acidophilus* 的菌株中，其频率为 2×10^4 氯霉素抗性细胞转化体/ μg PGK12 DNA。NCFM 的生理特性是否会产生更高效的细胞转化效率目前尚不清楚，但 NCFM 较其他 *L. acidophilus* 菌株更适合于遗传分析。

遗传研究为更具健康意义的 NDVM 菌的改进开辟了道路，Kullen 等 (1999) 的研究表明 NCFM 中存在酸诱导的操纵子，在其他菌中这种系统对较低 pH 情况下菌的耐酸性负责。对这种操纵自调节作用的理解能更进一步揭示发酵食品中益生菌的潜在功能，并改善酸性环境中菌的存活情况。其他遗传学研究多集中于益生菌细菌素的产生机理。

三、*L. acidophilus* 的稳定性

商用益生菌的稳定性对于保证益生菌产品中菌活细胞的数量是十分重要的。Sanders 等 (1996) 测试了 NCFM 冷冻干燥浓缩物在冷冻贮存情况下的稳定性，结果表明在 -20°C 的情况下冷冻贮存 6 周以上 NCFM 浓缩发酵剂的活性仅损失大约四分之一对数周期。Crowell (1998) 于室温下进行的干燥物实验表明 8 周贮存后活细胞数将稳定地下降至 10^8 cfu/g，目前尚无室温下商品化 NCFM 产品地菌稳定性情况的报道。

NCFM 在乳基产品中表现出较高的稳定性，如在乳中接种 10^7 cfu/ml 的 NCFM，于 4°C 或 10°C 贮存 21 天，其活菌数没有太大的变化 (Sanders, 1996)。Iturriria 等 (1999) 报道 NCFM 在商业化的发酵产品中也呈稳定性，在 4°C 贮存 52 天的情况下草莓酸奶中 NCFM 的活菌数由 1.2×10^7 cfu/g 下降为 8.7×10^6 cfu/g，普通酸奶则由 2.4×10^7 cfu/g 下降为 1.5×10^7 cfu/g，表明活菌数的下降较少，但在 MRS 琼脂上进行的有或无 0.15% 胆汁情况下的实验表明普通酸奶在 52 天的贮存后活菌数 50% 受到伤害。在 Cottage 干酪中， 4°C 贮存 37 天，NCFM 的活体细胞由 6×10^4 cfu/g 下降至 3×10^4 cfu/g，也有 50% 的下降。上述实验均表明 NCFM 在商业化产品中有适宜的稳定性。

菌的稳定性依据依赖于多种因素，包括生长情况和贮存情况 (相对湿度、乳含量、稳定剂和温度)。现已建立了 NCFM 稳定冷冻干燥物的生产模式，包括钙存在情况下 NCFM 生

长情况均已有成形的参数 (Klaemhammer 等, 1981; Wright 等, 1981)。

四、*L. acidophilus* 的抑菌活性

益生菌的抑菌活性被认为是其排斥或抑制肠道有害菌或病原菌活性的重要方法。益生菌产生的抑菌物质包括有机酸 (乳酸和乙酸)、二乙酰、 β -羟基丙醛 (由 *L. reuteri* 产生), 或抑菌肽和蛋白质。许多实验表明: 粪便中 pH 的下降和短链脂肪酸的上升和其中高含量的 *Lactobacilli* 和 *bifidobacteria* 相关。细菌素是一种菌体自身产生并对其他细菌产生抑制作用的蛋白质, *Lactobacillus* 属中的细菌素大多数都可以产生抑制与自身相似细菌的细菌素, *Lactobacillus* 菌的细菌素在体内的作用和活性尚待进一步研究。

NCFM 产生的细菌素对食品致病菌有较强的抑制作用, 这些病原菌包括 *Staphylococcus aureus*、*Salmonella typhimurium*、*Escherichia coli* 和 *Clostridium perfringens* 等, 实验室条件下肉汁培养基中它能抑制 80%~90% 的这些病原菌, 这种作用来源于有机酸, H_2O_2 , 也可能和其他抑菌物质有关。*L. acidophilus* NCFM 产生细菌素 Lactacin B, 其生物化学和遗传特征已被详细表征, 体外实验表明其抑制作用仅对其他 *L. acidophilus* 菌株和 *Enterococcus faecalis*, 对病原菌无抑制作用。这种细菌素分子量为 6500, 对蛋白酶 K 敏感, 在 120°C、3min (pH=5), -20°C 和化学试剂 β -巯基乙醇 (8ml/L 尿素, 1% sps) 等条件下呈稳定性。

五、*L. acidophilus* 的黏附

菌的生长和定殖性质对于其功能十分重要, 这种作用依赖于益生菌和肠黏膜上皮细胞的结合, 没有这种结合益生菌也许不能显著影响多种生理参数。不幸的是许多体外实验并不能代表体内的情况, 这缘于体外和体内情况的巨大差异; 而且从人体分离的菌株对于消费者而言是原生菌, 这样就不能期望它发挥原生菌的作用。Tannock (1999) 认为菌在胃肠道的定殖是成熟的, 在婴幼儿期即呈稳定性。益生菌喂食实验表明外源性菌株即使体外定殖能力很强且摄入很高剂量, 一般也不能在体内定殖。虽然许多黏附可能发生, 但不会有高效定殖或增殖性定殖, 当摄入停止后, 粪便中益生菌的数量将降至不能检出的水平。

在组织培养物中对肠道细胞的黏附能力通常用于评估益生菌的定殖能力, NCFM 的定殖评估也是采用这种方法。NCFM 被证明能黏附于人的肠道细胞和 Caco-2 细胞, 黏附水平在钙离子存在条件下更高。分泌黏液的肠道细胞系 HT-29 最接近体内情况, 这对非分泌肠道细胞系组成的实验体系是一种有效的改善。许多实验证明 NCFM 通过蛋白媒介机理黏附和定殖, 其他 *Lactobacilli* 的黏附可能通过糖基片段来进行。

Greene 等 (1994) 证实在 pH6~8 的生理 pH 情况下, NCFM 较其他 *Lactobacilli* 有更高的定殖率且定殖相对稳定。Hood 等 (1987) 应用扫描电镜证明 NCFM 没有外部的多糖层, 这种结构可能对于细胞表面结合能力是重要的。NCFM 和其他 *Lactobacilli* 菌的黏附情况见表 5-4。这些结果表明 NCFM 在体外能黏附于人体细胞, 体内情况尚不清楚。

六、*L. acidophilus* 和胆固醇

血清中总胆固醇和低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇的减少被认为能减少心血管疾病。虽然尚有许多争论, 但益生菌产品仍被建议作为血脂降低的重要手段之一。研究表明 *L. acidophilus* NCFM 具有从生长培养基中去除胆固醇的能力, NCFM 在胆汁存在及厌氧情况下具有去除胆固醇作用, 而这两种情况均是肠道所具备的, 这也从另一个侧面说明 NCFM 在体内具有降血脂作用; 对其他 *L. acidophilus* 菌株的研究表明其对胆固醇的作用呈菌株依赖性, 但体外实验尚不足以证明 NCFM 具有人体的降血脂作用。

表 5-4 NCFM 和其他 *Lactobacilli* 菌黏附情况比较 (“+”表示黏附,
“-”表示没有黏附, HT29 是指 HT29 或 HT29-MTX 细胞)

<i>L. acidophilus</i> 菌株	在黏附实验应用的细胞			黏附影响因素	参考文献
	HITHS0074	Caco-2	HT29		
<i>L. acidophilus</i> NCFM	+	+	+	蛋白	Greene 和 Klaenhammer, 1994
<i>L. acidophilus</i> LA	+	+	+	蛋白	Chauviere 等
<i>L. acidophilus</i> LB		+	+	分泌蛋白	1992; Coconnier 等, 1992
<i>L. acidophilus</i> LA1	+	+	+	分泌蛋白	
<i>L. crispatus</i> BG2FO4	+	+	+	蛋白和碳水化合物	Greene 和 Klaenhammer, 1994
<i>L. gasseri</i> ADH	+	+	+	碳水化合物	Mack 等, 1999
<i>L. rhamnosus</i> GG		+	+		
<i>L. plantarum</i> 299&299v			+	甘露糖连接物	Adlerberth 等, 1996
<i>L. delbrueckii</i> 1489	+	+			Klaenhammer, 1994

Thompson 等 (1982) 对 12 个健康人进行了为期 9 周的甜 *L. acidophilus* 乳喂养实验, 进一步证实不同乳制品对血脂的影响。甜 *L. acidophilus* 乳是北卡罗纳乳品公司的产品, 是一种活菌数为 2×10^8 cfu/g 的低脂牛乳, 食用这类食品 3 周的结果表明该产品、酸奶和酪乳对血脂均无重要影响, 这个实验没有报道 *L. acidophilus* NCFM 的量, 但确认在此研究中每天摄入的 *L. acidophilus* 活体细胞达 2×10^8 cfu, 这是否意味着人体需要更高活菌量的 *L. acidophilus* NCFM, 才能达到相应的疗效, 还有待更进一步证实。

七、*L. acidophilus* 对胃肠道的影响

菌的益生作用很重要的一部分归因于它在肠道的存活和增殖, 肠道益生菌有机会影响肠道其他菌的数量和活性, 因此益生菌在肠道存活并影响肠道微生物的状况是益生菌的重要特征。

Gilliland 等 (1976) 证实食用含 NCFM 的非发酵乳, 人体粪便中的 *L. acidophilus* 将有显著增加。Crowell (1998) 研究了健康和有疾病两组人群摄入 2×10^{10} cfu/日后的生理变化, 发现 NCFM 存在于健康人的粪便、空肠; 为了在体内原有 *L. acidophilus* 中分辨 NCFM, 对 *L. acidophilus* 基因限制酶切后进行电泳, 找出 NCFM 特有的 DNA 片段。在停止摄入 NCFM 两周后, NCFM 在 5 个人地粪便均不能检出, 这表明欲获得益生菌的生理功能, 必须重复地、有规律性地摄入 NCFM。这些研究结果和 (Alander 等 1990, Bouhnik 等, 1992) 进行的其他益生菌研究的结果是一致的, 但对于大多数益生菌长期的生理作用影响目前还不清楚。

Kaplan 等开发了研究粪便微生物变化的方法, 基础数据证实 PCR 技术和限制酶图谱, 对于表征粪便中益生菌诱导的微生物变化是有效的。对喂养 NCFM 后鼠粪便中微生物组成的检测, 可为 NCFM 在胃肠道的存活特性提供依据。喂养 NCFM 鼠粪便中存在 *L. acidophilus* DNA, 喂养前的对照组则不存在, 证实了这种技术对于研究 NCFM 非常有效; 这种技术用于寄主中 *L. acidophilus* 不是作为有时土著乳酸菌的研究是适用的。Conway 等 (1987) 研究了 NCFM 在低 pH 的磷酸盐缓冲液中以及人胃液中的存活情况, 表明 NCFM 和其他 *L. acidophilus* (*L. gasseri* ADH 和 *L. bulgaricus*) 的活菌数均迅速下降, NCFM 在 pH=1 经 1 小时的缓冲盐溶液下降 7 个半衰期, 所有的实验菌在 pH3~5 均表现出较高的稳定性。在 pH 为 1 的胃液中经 30 分钟下降 3 个半衰期, 但在 pH=2.5 的胃液或以脱脂乳缓冲液 pH=3 的介质中 NCFM 有较长的存活时间。这些结果均表明胃的高酸性环

境严重影响了益生 *L. acidophilus* 菌的存活，故建议这类益生菌的食品以乳品为载体进行消费，以保证益生菌在胃肠道有较高的存活比例；Simenhoff 等（1996）建议用包埋技术保护益生菌以使其能有效地通过胃到达肠道。

八、*L. acidophilus* 对乳糖不耐症的缓解作用

有些人由于食用乳糖后小肠不能消化而导致其异常发酵，引起胃肠不适的现象称为乳糖不耐症（Lactose intolerance），Shah（1993）研究证实发酵乳制品较非发酵乳制品和单一乳糖更能缓解乳糖不耐受症状，这部分归因于乳酸菌分泌的乳糖酶在小肠作为酶源对乳糖进行分解，从而帮助乳糖酶缺乏病人进行乳糖的消化；另一方面发酵乳中乳糖部分转化为有机酸从而也部分导致乳糖不耐受症状的降低。研究表明酸奶发酵菌 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 较 *Lactobacilli* 类菌能更好地降低乳糖不耐症；许多研究表明益生的 *Lactobacilli* 能改善乳糖酶缺乏人群的乳糖消化和缓解乳糖不耐受症状。

Mustapha 等（1997）研究证明：人体内总的菌细胞乳糖酶水平并不总是代表着益生菌帮助乳糖消化的水平，这是因为在小肠内菌株使乳糖酶被利用的水平存在差异，即乳糖酶的稳定性和乳糖传递和乳糖酶释放的能力不同；或是由于细胞溶解和乳糖酶活性不同。胆汁敏感性和酸耐受性在体内对于乳糖酶的利用是十分重要的（Mustapha 等，1997）。

现已有多个关于 NCFM 体外乳糖酶水平的评估报告。乳糖酶以 cfu（colony forming unit）以基准测定的结果为每分钟 4.73×10^{-7} δ -硝基酚/cfu（Sanders 等，1996），这一水平在所有测试的益生 *L. acidobacilli* 中是最高的；其他益生 *Lactobacilli* 乳糖酶为每分钟 $<0.01 \sim 4.73 \times 10^{-7}$ mg δ -硝基酚。但所有的 *S. thermophilus* 菌株其乳糖酶水平达每分钟 $11.8 \sim 189 \times 10^{-7}$ μ g δ -硝基酚，这高于益生 *Lactobacilli* 产生乳糖酶的水平。Hughes 和 Hoover（1995）比较了 NCFM 和 *bifidobacteria* 菌株产生乳糖酶的情况，表明它和 *B. bifidum*、*B. breve* 和 *B. longum* 产生乳糖酶的能力相当。

Gilliand（1992）对 NCFM 乳糖酶的纯化和表达进行了大量的基础工作，对酶大小、最适活性条件和冷藏稳定性均进行了研究，数据表明在 NCFM 中确实存在活性乳糖酶。

对鼠进行喂食含 NCFM 非发酵乳，并以水平作为对照的实验证明：乳糖酶活性作用在胃、小肠、盲肠和结肠中没有变化，但以酸奶强化的膳食喂养小肠乳糖酶的水平有所提高（Rao 等，1991）；这表明乳不是改善乳糖消化的理想基料，活菌数为 10^8 cfu/g 的酸奶较活菌数为 2×10^6 cfu/g 的非发酵乳对乳糖消化具有更好的效果。

以人群为标本已进行多种含 NCFM 乳制品对乳糖耐受性影响的实验。Newcomer 等（1983）测试了 NCFM 以 2×10^6 cfu/ml 添加于乳中帮助乳糖酸缺乏人群消化乳糖的情况，表明其没有改善作用，McDonough 等（1987）和 Payhe 等（1981）也得出相同的结论；但另一方面含有高数量级 NCFM 的乳能降低儿童的乳糖不耐症。综上所述可以看出 NCFM 或其他 *L. acidophilus* 是否具有帮助乳糖消化作用，关键取决于 *L. acidophilus* 的含量高低，高含量的 *L. acidophilus* 具有降低乳糖不耐受性作用，低含量的 *L. acidophilus* 不改善乳糖消化。

九、*L. acidophilus* 和小肠细菌过度生长的关系

Simenhoff 等（1996）研究慢性肾病透析患者摄入 NCFM 后对胃肠道微生物的影响。由于患有肾病，这些患者均产生小肠环境紊乱，导致其体内微生物菌群的过度生长，现已确认在小肠中存在菌群过度生长的情况。小肠正常情况下会寄宿一定数量的微生物，回肠的定殖反映了盲肠定殖状况。小肠菌的过度生长可通过小肠样本的微生物技术直接了解；或通过测定乳糖消化 45 分钟后呼吸氢的量增加，来间接表明小肠内菌的发酵情况。菌的过度生长伴

有毒素的产生（亚硝基二甲基胺和二甲基胺），这些化合物在患者的血液中均可检测到。

Dunn 等（1998a, 1998b）可证实摄入冷冻干燥的 NCFM 可降低患者血液中亚硝基二甲基胺和二甲基胺的水平，另外可改善患者的营养水平，包括增加能量消耗和增加体重，现未有 NCFM 副作用的报道。这些结果表明 NCFM 具有抵制产亚硝基二甲基胺和二甲基胺菌能力，有利于小肠有益菌的定殖。

十、*L. acidophilus* 的抗癌作用

现已进行大量关于人体和动物实验，用于评估肠道微生物的致病作用。大量的动物实验用于不能在人体直接进行由致癌和癌变的研究，微生物酶的活性被认为在致癌过程中具有重要作用，它的活性一般通过测定其在粪便中的活性而获得，这些酶包括 β -葡萄糖苷酶、硝基还原酶和偶氮还原酶。Goldin 等（1980）研究证明以含 NCFM 的肉基强化食物喂食小鼠 20 周可降低其结肠癌的发病率，据此推断 NCFM 增长了结肠癌的潜伏期；他们也证实了 NCFM 能减少人粪便致癌酶活性 2~4 倍，可大大降低鼠粪便中游离胺的产生。

Rao（1999）研究了 NCFM 对诱变结肠癌异常损伤的影响，发现喂食 NCFM 2% 和 4% 的食物鼠的异常结肠腺抑制率达 29% 和 39%。这些结果均支持 NCFM 具有减少肠道有害菌活性的研究结果。

益生菌可以通过改善膜和系统免疫反应的方法来影响抗病原菌和抗癌活性。Wagenet 等（1994）证明 NCFM 对免疫缺陷鼠具有 *Candida albicans* 诱导产生抗体和细胞反应的功能，这间接说明 NCFM 在减少念珠菌病的危害性方面具有较好作用。有趣的是在这些研究中 *Bifidobacterium* 菌株能增加无胸腺和部分免疫损伤鼠的血清 IgG、IgA、IgM 水平，但用 *L. reuteri* 喂养无胸腺鼠导致其全部的较早死亡，在这实验中表明存在着专一性的菌株反应。Tejada-simon 等（1999）测定了含 NCFM、*S. thermophilus*、*L. bulgaricus* 和 *Bifidobacterium* 的酸奶，对霍乱毒素免疫鼠膜和系统 IgA、IgG 水平的影响；喂养这种酸奶较单独喂食脱脂奶或仅含 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 酸奶，鼠肠道和血清中 IgA 和 IgG 的水平较高。这说明含 NCFM 的发酵产品增加了对口服抗原的免疫反应，但这一研究中没有测定对 NCFM 的专一性作用。

十一、*L. acidophilus* 对泌尿系统疾病的作用

女性泌尿系统的疾病患者较多，这种感染常由 *Enterococcus faecalis*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Escherichia coli* 引起，一般人为这些细菌来源于肠道菌群。多位学者研究了益生菌对这类感染的抑制作用，Reid（2000）的研究表明 NCFM 具有防止尿路和阴道感染的作用。NCFM 被认为能产生“生物消毒剂”，它能抑制 >90% 的 *Enterococcus faecalis* 1131 对聚苯乙烯的黏附，NCFM 也被证实能黏附于尿道和阴道上皮细胞上；NCFM 与上皮细胞予培养，而后接种三种尿道病原菌 *E. coli* Hu734、*K. pneumoniae* 和 *P. aeruginosa* AK，结果表明 NCFM 对抑制这些病原菌黏附于上皮细胞的作用可分别达到 30%、11% 和 30%。由于 H_2O_2 的产生在尿道病原菌的抑制方面具有重要作用，故对 NCFM 产生 H_2O_2 的情况进行了研究。NCFM 能产生 H_2O_2 ，但对其他菌比较其水平较低（图 5-1）。NCFM 的上述特征表明它具有治疗和预防尿路感染疾病的潜在作用，真正意义上的临床应用尚待进一步研究。

十二、*L. acidophilus* 对痢疾的治疗作用

L. acidophilus 单一菌株对痢疾的治疗作用目前尚未研究，但 NCFM 作为益生菌的一部分在墨西哥被广泛应用于儿童的痢疾治疗。Ruiz-Palacios 等（1996）将 72 个 12~36 个月的

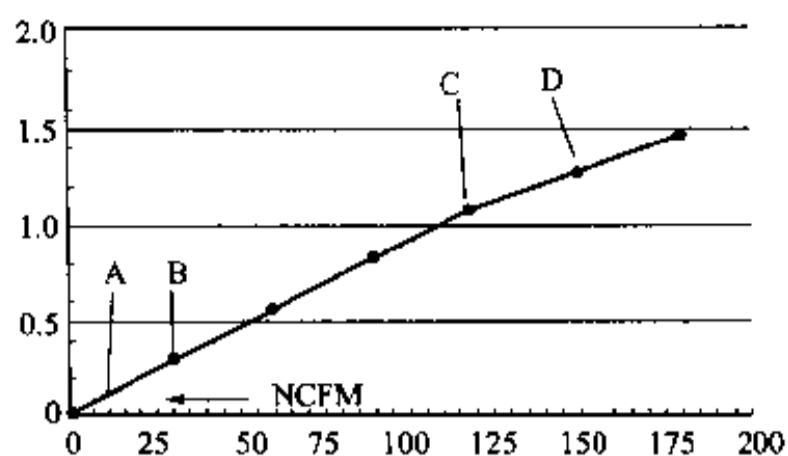


图 5-1 不同代表性 *Lactobacillus* 菌株产生 H₂O₂ 的情况

A—*L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*;
 B—*L. gallinarum*; C—*L. Johnsonii*;
 D—*L. delbrueckii*, (Pick, 1986)

婴幼儿分成四组，对混合益生菌 NCFM/*L. reuteri*、*B. infantis* BBI 进行耐受性实验，分别摄入 0、10⁶、10⁸ 和 10¹⁰ cfu 的益生菌混合物，三周的喂养没有发现有副作用。进而他们进行了益生菌治疗痢疾的实验，这些 12~36 个月的婴幼儿被任意分成两组，一组接受 10¹⁰ cfu/日的益生菌混合物摄入（计 119 人），另 120 人作为对照组；*L. acidophilus* 菌以 10¹⁰ cfu/日食物形式提供，其中 *Bifidobacterium* 的量约为 10⁹ cfu/日。他们研究了耐受性、摄入量、粪便形态和粪便 *Lactobacilli* 的量，结果表明益生菌组对痢疾具有一定的预防作用（痢疾症状缓解或治愈情况益生菌组 90/119，对照组 70/120），但患痢疾婴幼儿

间的严重程度无明显差异。Guerrero 等（1996）研究了不同益生菌制剂对痢疾的影响，第一组 130 个婴幼儿喂食含 NCFM、*B. infantis* BBI 和 *L. reuteri* 的饮料，第二组 133 个婴幼儿摄入含 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacterium* 的饮料，并以 132 个婴幼儿作为对照组（第三组），结果第一组大大降低了婴幼儿痢疾的患病率，第二组没有显著影响，两组服用益生菌的婴幼儿患痢疾时间均被缩短。上述结果表明高剂量的 NCFM 婴幼儿对其有耐受性，但 NCFM 单一菌株对婴幼儿痢疾的治疗作用不能确认，目前只能证明含 NCFM 的混合益生菌对婴幼儿痢疾的治疗和预防具有明显疗效。

第二节 *L. acidophilus* 产生的细菌素

一、早期研究

在 1983 年 Lactacin B 发现前已有多个报道认为 *L. acidophilus* 产生抗菌物质（很可能是蛋白质），它抑制肠道有害菌的生长（Vincent 等 1959, Vakik 等 1965, Gilliland 等 1977, Shahani 等 1980），Vincent 等认为这种物质类似于细菌素，具有广谱抗菌效果，称之为 Lactocidin，采用调整 pH<5.0 或 pH>7.8 的方法，粗制 Lactocidin 能够从发酵物中提取。粗 Lactocidin 不像乳酸和过氧化氢能够透析，对过氧化物酶不敏感，在 pH7.0 对革兰氏阳性菌、阴性菌具有抑制作用，也包括部分病原菌，如 *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Staphylococcus aureus*。但 Lactocidin 进一步纯化后在 pH7.0 时的抗菌活性消失，后来对于 Lactocidin 的研究处于停滞状态，Barefoot 等（1983）针对 *L. acidophilus* 产生抑菌物质的不确定和抑菌谱的矛盾状况，开展了 *L. acidophilus* 产生抗菌物质的系统研究。

二、产生抗菌物质的菌株分离和确定

L. acidophilus 和其他的 *Lactobacilli* 能够产生有机酸（Kandler 等 1986）、H₂O₂（Price 等 1969, Collins 等 1980）和二乙酰（cardenas 等 1985），因此 Barefoot 和 klaenhammer 特别重视这些包括细菌素在内的作用。对于细菌素的鉴定他们应用直接方法，即将产细菌素的发酵剂加入含有指示菌的固体培养基，为了去除 H₂O₂ 的抑菌作用，他们将可能产细菌素的菌在 MRS 培养基上厌氧培养 24h（37℃），（MRS 培养基含 1.5% 的琼脂）。琼脂提取物通过 0.45μm 的滤膜去除菌体细胞，调整 pH7.0，多数样品对 pH7.0 的磷酸钠缓冲液（0.3m

mol/L) 渗析; 为了去除非扩散物质的影响, 通过 Tagg 和 McGiven 的琼脂扩散方法检验了提取物的活性。过氧化物酶 (69 μ g/ml) 被添加于多种琼脂提取物和相应的实验介质, 应用上述方法他们对 9 个相关和不相关的 *Lactobacilli* 指示菌和 20 个其他革兰氏阴性和阳性菌, 检测了 52 *L. acidophilus* 株菌的拮抗活性, 其中 33 株包括 *L. acidophilus* N₂ 表现为过氧化物酶不敏感和不透析, 在 pH7.0 时对 4 个 *Lactobacilli* 指示菌即 *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* ATCC4797、*L. delbrueckii* subsp. *lactis* NCDO970、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCDO1489 和 *L. helveticus* NCDO87 表现为扩散活性。33 株 *L. acidophilus* 菌中的 18 株菌可以抑制菌株 *L. acidophilus* ATCC 6032。高浓度的 Lactacin B (512AU/ml) 抑制它的产生菌株和 *L. acidophilus* ATCC 6032; 低浓度的 Lactacin B (8 AU/ml) 对二者均无抑制作用。由于这些发酵微生物的抑制呈 Lactacin B 浓度的依赖性, 其他细菌素可能与 *L. acidophilus* ATCC 6032 的活性被抑制无关。18 株 *L. acidophilus* 中的 4 株 (MS01、11088、11089、11759) 对 *Enterococcus faecalis* 和 *L. fermentum* 有抑制活性。*L. acidophilus* 也产生 Lactacin F 类细菌素 (VPI 11088), 它由 Muriana 等 (1987, 1991) 确认和证实。除了对 *E. faecalis* 具有抑制活性外, Baerfoot 等 (1983) 在 *L. acidophilus* 菌株中没有发现其他具有广谱作用的细菌素, 除此外也没有发现所产生细菌素菌能够抑制任何非 *Lactobacilli* 类指示菌。这些结果和以前的在 *L. acidophilus* 中存在广谱抑制菌物质的报道是矛盾的, 两株菌 NCDO1697 或 ATCC4357 产生 Lactocidin (Vincent 等 1959), 但去除了两株 H₂O₂ 和乳酸的抑制作用后, 也就去除了两株和其他 *L. acidophilus* 对 *P. aeruginosa*、*S. typhimurium*、*E. coli*、*S. aureus*、其他革兰氏阴性阳性病原菌的抑制作用, 故说明以前报告的 *L. acidophilus* 具有的细菌素具有广谱抑制作用的报道是不正确的。

三、*L. acidophilus* 细菌素的物理化学性质

(一) 特性

由于 *L. acidophilus* N₂ 的 MRS 肉汁培养基中不含有 Lactacin B, 故 Barefoot 等开始测定发酵物提取液中细菌素的产生情况, 对纯化 Lactacin B 的测定结果表明了它的特征和性质 (Barefoot 等 1984, Nettles 1992)。像许多从乳酸菌中获得的细菌素一样, Lactacin B 对 pronase 和蛋白酶呈敏感性, 其具体情况如表 5-5 所示。此外它能够被胞内蛋白酶 Arg-c 水解, 这是含有精氨酸残基蛋白质的一个特征。像 Lactacin F、Nisin 和 pediocin AcH 一样, Lactacin B 呈热稳定性, 在 100 $^{\circ}$ C 加热 60min (不存在 SDS, pH5.0) 或 100 $^{\circ}$ C 加热 3min (存在 1.0% SDS 和 1% α -巯基乙醇, pH8.6) 不影响其活性, Lactacin B 对其他处理的稳定性见表 5-5。

表 5-5 Lactacin B 对不同处理的稳定性

处 理 情 况	对 Lactacin B 的影响	处 理 情 况	对 Lactacin B 的影响
pH=5.0, 100 $^{\circ}$ C, 60min	无	蛋白酶 K, 500 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 1h	97% 减少
pH=5.0 或 8.6, 100 $^{\circ}$ C, 1.0% SDS, 1.0% 2-巯基乙醇, 3min 过氧化物酶, 68 μ g/ml	无	NaCl (0~0.5mol/ml) 0 $^{\circ}$ C, 1h	无
<i>Streptomyces griseus</i> 蛋白酶 500 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 60min	去除	8.0M 尿素, 21 $^{\circ}$ C, 3h	50% 减少
		丙酮, 50% (V/V) 0 $^{\circ}$ C, 2h	无
		甲醇或乙醇, 25% (V/V), 0 $^{\circ}$ C, 2h	无

(二) 分离和纯化

当 *L. acidophilus* N₂ 在 MRS 肉汁培养基中于 pH6 培养生长, 则产生 Lactacin B

(Barefoot 等 1984)。但 MRS 是一种含有牛肉提取物和其他复杂蛋白质的营养介质，来自 MRS 的物质很难和 Lactacin B 分离，故 Barefoot 等 (1984) 应用 Harvey 和 collins (1963) 半合成培养基，并应用 Moustapha 和 collins 方法进行改进后用于细菌素的生产。

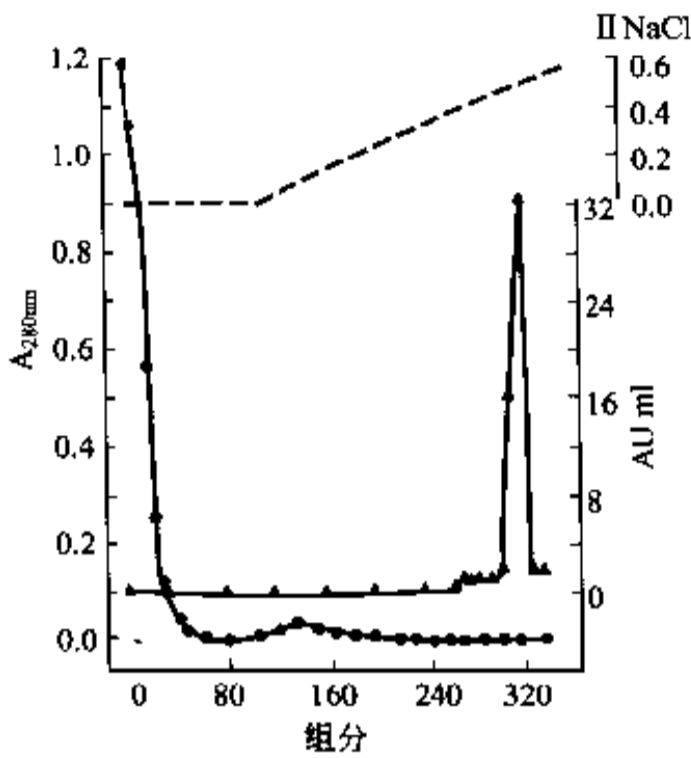


图 5-2 Lactacin B 在羧甲基 sephadex 上的洗脱曲线

·—在 280nm 吸附值；▲—Lactacin B 活性；-----NaCl 洗脱液的浓度曲线

为了制备纯化的 Lactacin B，在 20L pH=6.0 的半合成培养基中对细菌素产生菌培养 12h，然后用盐酸调整 pH 至 5.0，离心以后，通过 0.45 μ m 孔径的滤膜去除菌体细胞，得到粗制的 Lactacin B。

Lactacin B 在 pH=5.0 时稳定，在 pH \leq 6.0 吸附于阳离子交换树脂，在 pH>6.0 时吸附于阴离子交换树脂 (Barefoot 1985)，因此在 pH=5.0 时，可以在羧甲基 sephadexTM 上色谱分离 Lactacin B，其离子交换的洗脱曲线如图 5-2 所示。Lactacin B 在 0.4~0.5mol/L NaCl 的洗脱时呈单峰结构，即通过该方法得到初步纯化的 Lactacin B。通过离子交换色谱浓度发酵物上清液中的 Lactacin B，Lactacin B 吸附于羧甲基 sephadexTM，通过 HAc 缓冲液 (pH=5.0) 进行梯度洗脱，达到和其他物质的分离目的；在醋酸盐的缓冲液中起始含有 0.25mol/L 的 NaCl，最终洗脱液中 NaCl 的浓度达到 0.8mol/L。在离子交换过程中

Lactacin B 活性的 97% 损失了，但可获得 154 倍的纯品 (见表 5-6)。它在醋酸盐缓冲液中形成沉淀，但在 8mol/L 的尿素液中溶解并呈活性。

表 5-6 Lactacin B 的纯化

纯化阶段	体积 /ml	Lactacin B 活性/(A μ /ml)	总 Lactacin B 活性/A μ	蛋白质量/(mg/ml)	ee 活性/(A μ /mg)	活性回收/%	纯化倍数
发酵物上清液	10000	128	1280000	15.4	9	100	1
甲基 Sephadex 洗膜液, 未浓缩	5	8192	40960	5.9	1390d	3	154
XM50 膜(8mol/L 尿素)	5	8192	40960	0.6	13700	3	1522
在 SephadexG75 上的尿素色谱	8.4	3580	30100	ND	ND	2.4	ND
在 Sephacryl S-200 上的 SDS 色谱	10.6	520	5568	0.02	29000	0.4	3222

注: A μ —活性单位, ND—未测得。

超滤不仅从其他物质中分离了尿素溶解性 Lactacin B，且导致 Lactacin B 比活性增加 20 倍，其他物质被去除。Lactacin B 在尿素色谱 (sephadex) 上形成单峰 (图 5-3)。

在 Sephacryl S-200TM 上应用 SDS 色谱也可以对 Lactacin B 进行纯化 (图 5-4)。伴随每一个纯化步骤活性分别损失 20% 和 83%。在 Sephacryl S-200TM 上的 SDS 色谱结果分析确定 Lactacin B 的分子量 6500Da，Lactacin B 的 SDS-PAGE 分析产生了 Lactacin B 不稳定的扩散区，它稍微移向牛胰蛋白抑制剂 (6200Da) 的蛋白带。

和 Barefoot 等 (1984) 复杂的蛋白分离方法相反，Nettles (1992) 设计了一种 Lactacin B 分离的简单方法，在介质中产生的 Lactacin B 呈低浓度 (5mg/ml)，培养物的上清液被喷雾干燥以浓缩细菌素，干燥物于 pH=5.0 的 6mol/L 尿素中重新溶解 (表 5-7)。尿素溶解 Lactacin B 通过 50000 分子量的超滤膜，在 3000 分子量 YM3 膜浓缩，Lactacin B 的比活性上升 43%，Nettles (1992) 通过等电点聚焦 (IEF) 法进一步纯化了 Lactacin B。超滤浓缩

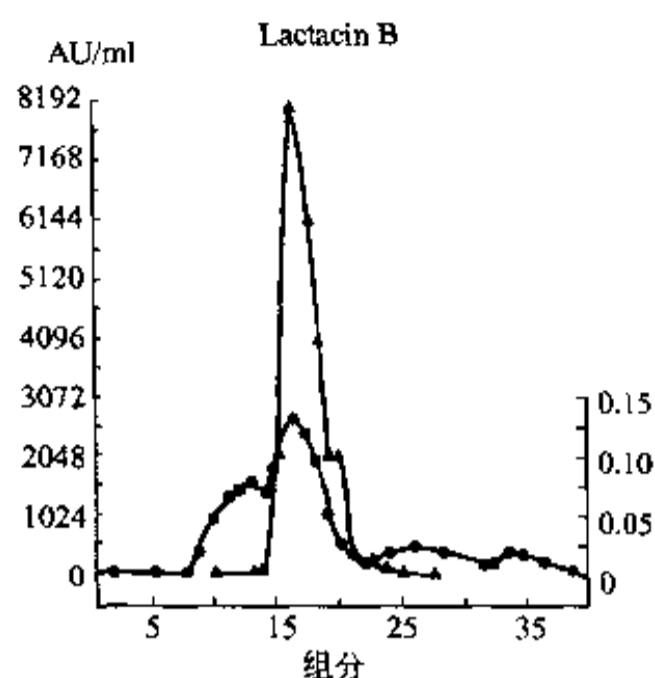


图 5-3 在 8mol/L 尿素存在 F sephadexG-25 上 Lactacin B 的色谱图

●—280nm 吸收峰；▲—Lactacin B 活性

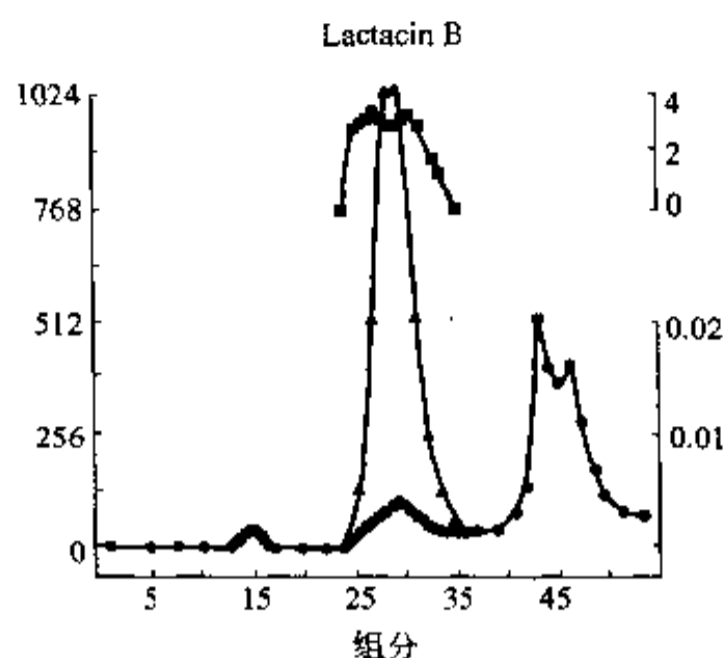


图 5-4 0.1% SDS 存在下 Sephacryls-200 上 Lactacin B 的色谱图

●—280nm 处吸收峰；▲—Lactacin B；■—比活性

物（一般为 5ml）重新溶解于 4mol/L 的尿素（47.5ml），在 pH=6.0~10.0 的范围内对 IEF 部分进行 Lactacin B 活性测定，确定 Lactacin B 的等电点 (PI) 为 6.0，沉淀部分 Lactacin B 的活性占 86%，溶液中仍有 14% 的活性，说明 Lactacin B 有较宽的等电点 (PI) 范围。SDS-PAGE 分析表明沉淀部分的 Lactacin B 呈单一带，不含有任何其他蛋白质。

表 5-7 Lactacin B 的纯化

组 份	体积 (ml)	活性 (AU/ml)	蛋白质 (mg/ml)	总蛋白 /mg	总活性	比活性 (AU/mg)	活性回收 /%	纯化 倍数
发酵物上清液	8000	800	0.20	1600	6.4×10^6	4000	100	1.0
干燥物重新悬浮	1000	6400	0.25	250	6.4×10^6	25600	100	6.4
上清液 50KVF(过滤液)	980	1600	0.175	175.5	1.57×10^6	9142.9	24.5	2.29
3K UF 截留液	480	6400	0.175	84	3.07×10^6	36571	48	9.14
3K UF(浓缩液和透析液)	50	12800	0.500	25	6.4×10^5	25600		6.4
等电点聚焦前样品	5	12800	0.500	2.5	6.4×10^4	25600	10	
等电点聚焦剩余液	12	766.7	0.100	1.2	9.2×10^3	7667	14	1.92
等电点聚焦组分(R17)	2.0	1600	0.100	0.20	3.2×10^3	16000	5	4.0

(三) 分子量

Barefoot 等 (1983) 通过具有连续小分子排除限制的系列超滤膜得到了 Lactacin B 的分子量。在超滤过程中 85% Lactacin B 活性损失，但残留物 92.3% 可用分子量 3×10^5 Da 膜截留，7.7% 可用 1×10^5 Da 的膜截留。早期的研究认为该细菌素是一个分子量大于 10^5 Da 的大分子或类似于其他的疏水蛋白质 (Muriana 等 1991)，它自身或和其他介质蛋白形成凝集。在纯化过程中 SDS-PAGE 分析表明其单体分子量约为 6000Da (Barefoot 等 1984)，但 Nettles (1992) 也通过 SDS-PAGE 方法得到 Lactacin B 的分子量为 8100Da，在用考马斯亮蓝固定和染色后仍保留活性。分子量评估的差异性可归因为下列几个因素：在 Barefoot 等的早期研究中 Lactacin B 的运动和迁移计算是单独以活性为基础的，在非固定凝胶中生物活性细菌素扩散后对它进行测定；另外他们应用分子量 1200Da 的细菌素作为 SDS 凝胶色谱的最低标准，Sephacryls-200™ 较低组分限制是 1×10^4 Da (Anen 1982)，细菌素作为标准应用导致 Lactacin B 分子量的低估。在用考马斯亮蓝染色后单带的细菌素生物活性提供了

Lactacin B 已被纯化为单体的更好证据, 故认为 Lactacin B 的分子量为 8100Da 更为正确。

能够凝集是 *Lactobacilli* 类菌产生细菌素产生的普遍性质, 像 Lactacin B 一样, 细菌素 Lactacin27、helveticinJ、LactacinF 等分子量大于 1×10^5 的大分子, 在纯化过程中分解为低分子量的单体分子。

(四) 结构

Nettles (1992) 用 HCl 水解纯的 Lactacin B, 通过逆相 HPLC 分析其氨基酸组成 (见表 5-8), 数据表明 Lactacin B 含有 79 个残基, 分子量 8000~9000Da, Lactacin B 含有丰富的丙氨酸 (alanine 30 个) 和缬氨酸 (28 个), 无不常见的氨基酸 (lanthienine 羊毛硫氨酸)。高比例的丙氨酸和缬氨酸表明 Lactacin B 具有高的疏水性, Stoffel 等 (1992) 研究表明在疏水细菌素纯化过程中疏水相互作用色谱和逆相 HPLC 技术用于它们的分离能使它们的活性损失降至最低, 其具体技术参数有待进一步研究。

表 5-8 Lactacin B 的氨基酸组成

氨基酸	ASP	Glu	Arg	Val	Phe	Leu	Lys	Ala	Trp
残基数	5	5	1	28	3	3	3	30	1

(五) 分子生物学性质

1. 抑菌谱

Lactacin B 对许多菌表现出抑制活性, 目前已发表的 Lactacin B 抑菌情况如表 5-9 所示。

表 5-9 Lactacin B 的抑菌谱

抑制微生物	资料来源
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Barefoot
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> NCDO 970	Barefoot 等(1989,1984)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCDO 1489	
<i>L. helveticus</i> NCDO 87	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lewus 等 1991

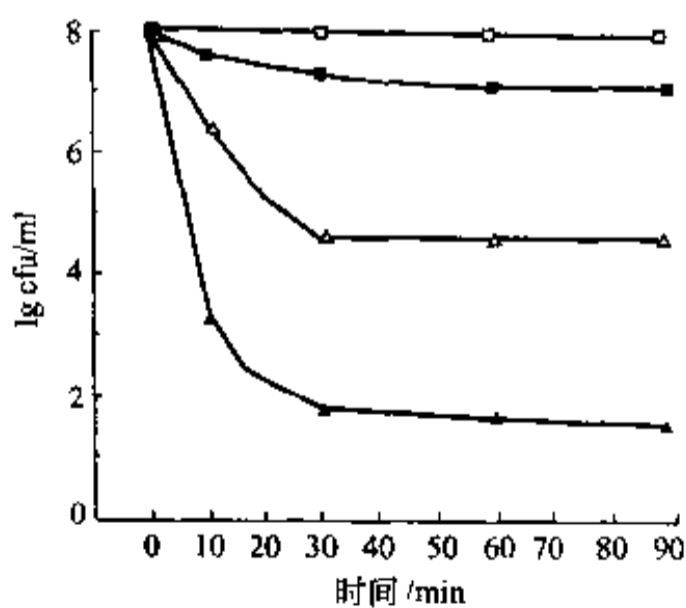


图 5-5 Lactacin B 对 *L. delbrueckii* Subsp. *lactis* ATCC 4797. *lactis* ATCC 4797 的抑菌活性

□—粗制 Lactacin B 的浓度为 0;
 ■—4 $\mu\text{g/ml}$; Δ —12 $\mu\text{g/ml}$;
 ▲—52 $\mu\text{g/ml}$ (Barefoot 等 1983)

Lewus 等 (1991) 总结了来自蛋白酶敏感性细菌素的抑菌作用, Lactacin B 对蛋白酶敏感, 但用蛋白酶 K 处理 Lactacin B 后不影响其对 *L. monocytogenes* 的活性。和 lewus 等 (1991) 的结果相反, Harris 等 (1989) 发现无菌体细胞、无乳酸的 Lactacin B 对 *L. monocytogenes* 无抑制, Barefoot 等的研究也证实 Lactacin B 的中性或透析制备物对 *L. innocua*、*L. ivanovii*、*L. monocytogenes* ScottA 等没有抑制作用, 这种仅在菌体细胞存在条件 Lactacin B 的抑菌作用说明存在着除 Lactacin B 以外的其他抑菌物质。

2. 抑菌作用模式

纯化和粗制 Lactacin B 对敏感细胞具有抑制性, 其作用曲线如图 5-5 所示。

Lactacin B 添加于 9.6×10^7 cfu/ml *L. delbrueckii* Subsp. *lactis* ATCC 4797 的细胞中引起其菌体的迅速

死亡, 添加 4、12 和 52 $A\mu/ml$ Lactacin B 在 30min 内分别使菌体细胞下降 0.7、3.5、6.1 个半衰期。Lactacin B 添加后没有细胞溶解发生, 这表明 Lactacin B 是通过抑菌模式而非菌体溶解抑制目标菌, 这也是细菌素作用于受抑制菌的通用模式 (Tagg 等 1976)。

与革兰氏阳性菌产生的细菌素 Lactocin 27 和其他细菌素一样, Lactacin B 非专一性的吸附敏感菌和非敏感菌见表 5-10。Lactacin B 是一种高度疏水肽, 疏水肽对多种表面的吸附已被很好地表述, 对产生菌的细胞 *L. acidophilus* VPI 6032 (类似于 Lactacin B 的产生菌) 没有吸附作用说明 Lactacin B 作用呈专一性, 但 Lactacin B 吸附和作用的专一性尚未完全确定, 它的疏水特征表明 Lactacin B 可能在细胞膜上起决定性的致死作用, 其他疏水类细菌素 Nisin、Rediocin ACH 和 Lactacin F 也是通过和敏感菌细胞膜相互作用而达到抑菌作用的, 由于 Nisin 作用于细胞膜, 导致细胞电势的极化现象消失并减少了细胞的 pH 梯度, 从而达到抑菌作用。

表 5-10 Lactacin B 对 Lactokacilli 的吸附

Lactokacilli 测试物	对 Lactacin B 敏感性	Lactacin B/($A\mu/ml$)	
		开始	剩余
<i>L. acidophilus</i> N ₂	否	4	4
<i>L. acidophilus</i> VPI 6032 VPIb 6032	否	4	4
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> NCDO 1489	是	4	1
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NCDO 970	是	4	1
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i> ATCC 4797	是	4	0
<i>L. helveticus</i> NCDO 87	是	4	0
<i>L. casei</i> ATCC 7469	否	4	0
<i>L. fermentum</i> NCDO 1750	否	4	1
<i>L. plantarum</i> NCDO 1752	否	4	1
<i>L. viridescens</i> ATCC 12706	否	4	0
None		4	4
<i>L. acidophilus</i> N ₂	否	0	0
<i>L. acidophilus</i> VPI 6032	否	0	0

3. 生物鉴定

Lactacin B 的活性是通过 Mayr—Harting 等 (1972) 的关键稀释技术 (critical dilution technique) 的改进方法测定的, 即 MRS 琼脂皿上覆盖含有 *L. delbrueckii* Subsp. *Lactis* ATCC 4797 指示菌的软 MRS 琼脂 (0.75%), 指示菌的浓度为 10^5 cfu/ml, 细菌素制稀释物点刺在培养基表面, 在 37°C 厌氧培养 14~16 小时, 测定抑制情况, 点刺的量为 10 μ l, 影响 Lactacin B 实验的因素包括指示细胞数量, 培养时间和加入培养基表面细菌素的体积, 若保持上述三因素的稳定, 则可得到重复性的结果。

有关 Lactacin B 的遗传信息了解不多, Lactacin B 的信息可以通过 *L. acidophilus* N₂ 中基因组测定因素反映出来, 对 *L. acidophilus* 的基因组测定结果表明 Lactacin B 基因位于染色体的特定位置。用亚硝基鸟嘌呤处理产生菌发酵物后产生的突变体中, 对敏感菌不产生 Lactacin B 活性, 这些突变体对全部 4 种指示菌缺乏活性的结果表明是单一物质对抑制发生作用, 其他有关 Lactacin B 遗传信息的研究尚无。

四、发酵过程

(一) 影响细菌素产生的因素

为了促进 *L. acidophilus* N₂ 产生 Lactacin B 的条件最优化, Barefoot 等 (1984) 测定了

MRS培养基中 pH 对 Lactacin B 产生的影响，在培养前将 MRS 培养基调整 pH 至 5.1、5.5、5.9、6.5 和 7.0，仅仅在 $\text{pH} \geq 5.9$ 的培养基提取物中含有 Lactacin B， $\text{pH} = 5.9$ 时 Lactacin B 为 $1\text{A}\mu/\text{ml}$ ， $\text{pH} = 6.5$ 时 $32\text{A}\mu/\text{ml}$ ， $\text{pH} = 7.0$ 时达到 $64\text{A}\mu/\text{ml}$ 。虽然在 MRS 培养基上几种 pH 情况下均能很好生长，但 $\text{pH} < 5.9$ 时无法测得 Lactacin B 的存在。据此认为 *L. acidophilus* N₂ 产生 Lactacin B 的活性呈 pH 依赖性，Barefoot 等 (1984) 在 37°C pH 为 6.6、6.0、5.4、5.0 和 4.7 下进行的实验表明， $\text{pH} = 6.0$ 时 *L. acidophilus* N₂ 具有最适的产 Lactacin B 的活性 (见图 5-6)，在其他 pH 仅有少量或无 Lactacin B 产生，在发酵剂中和无菌体细胞上清液中 Lactacin B 活性迅速下降 ($\text{pH} = 6.0$)，可能是由于产生菌释放的蛋白酶作用的结果，但将 pH 降至 5.0，Lactacin B 的活性呈稳定性。

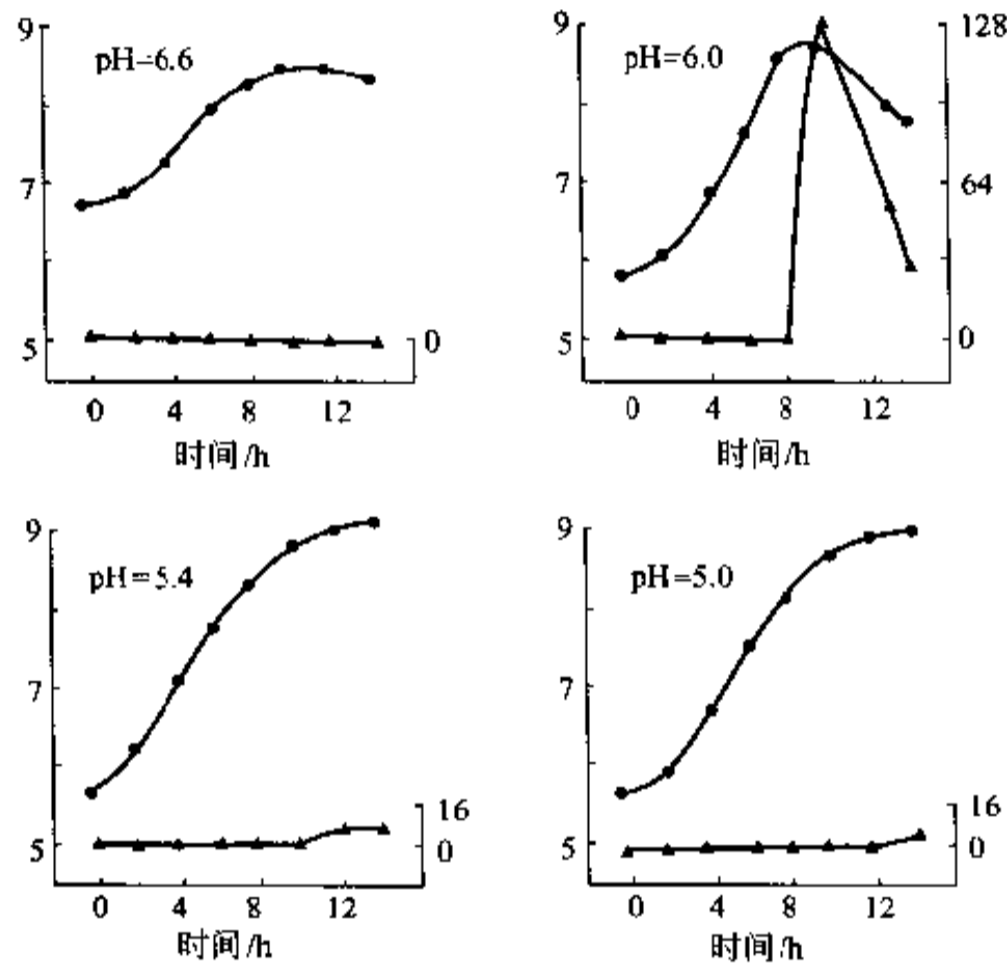


图 5-6 在控制 pH 下 *L. acidophilus* N₂ 的生长和 Lactacin B 的产生
●—cfu/ml; ▲—Lactacin B 的活性 (Barefoot 等, 1984)

(二) 协同发酵对细菌素产生促进作用

细菌素的产生为其产生菌提供与其相关菌竞争方面的优势，这种来自环境刺激所产生的保护性反应已被广泛认知。Hughes (1990) 认为 Lactacin B 的产生可能源于环境刺激，可能是来自敏感细胞的一个信息；Hughes 和 Barefoot 协同培养 Lactacin B 的产生菌，即在发酵系统中将 *L. acidophilus* N₂ 和敏感指示菌 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797 一起培养，然后测定培养物中细菌素活性和 pH (见图 5-7)。

在早期的对数生长期 (5 小时内) 测定协同发酵物中 Lactacin B 活性，它在 6h 达到最大值；如果纯 *L. acidophilus* N₂ 的 pH 不被控制，将无法测得 Lactacin B 的活性。起始时协同发酵物的 pH 高于纯 *L. acidophilus* N₂ 0.2 单位，在 6 小时内等速下降，然后纯 *L. acidophilus* N₂ 发酵物 pH 下降更快，在协同发酵情况下 Lactacin B 的活性和 pH 变化相关。

为了去除 pH 影响，Hughes (1990) 在 pH 6.0 培养纯 *L. acidophilus* 和协同发酵物，活性测定表明二者均产生最大的 Lactacin B 活性 ($25600\text{A}\mu/\text{ml}$) (见图 5-8)，但协同发酵剂

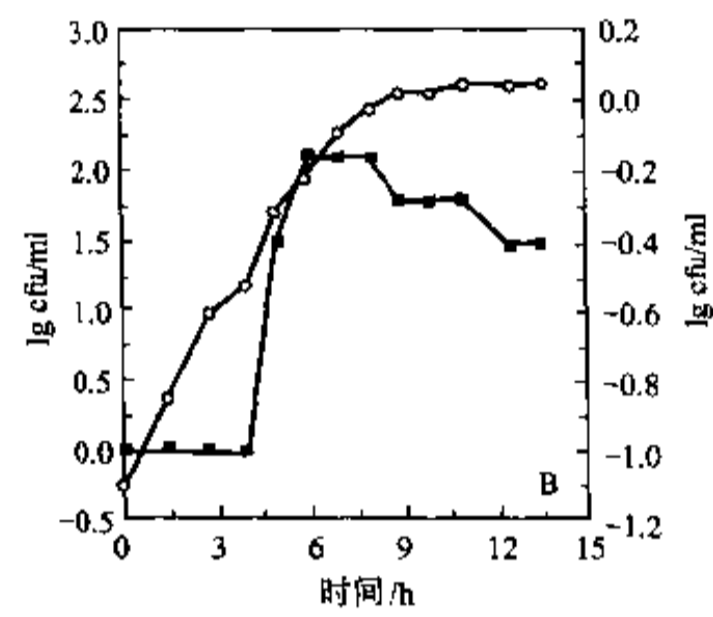
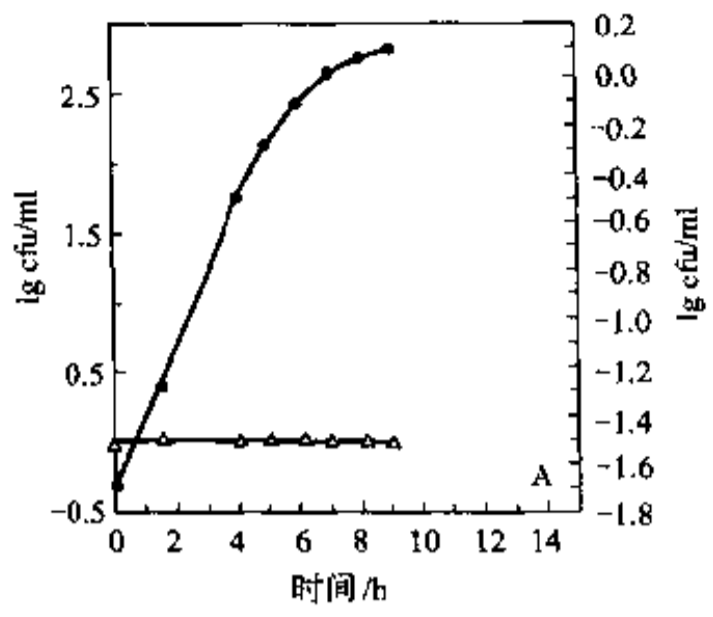


图 5-7 在不控制 pH 的情况下单菌发酵和协同发酵物中 Lactacin B 产生的情况
 ●—600nm 发酵物浓度；△—Lactacin B 活性；
 ○—600nm 发酵物浓度；■—Lactacin B 活性

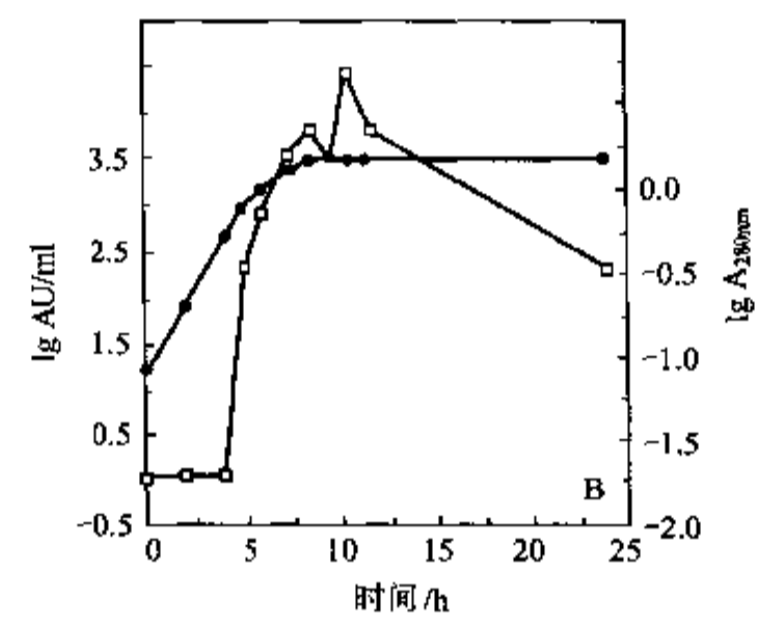
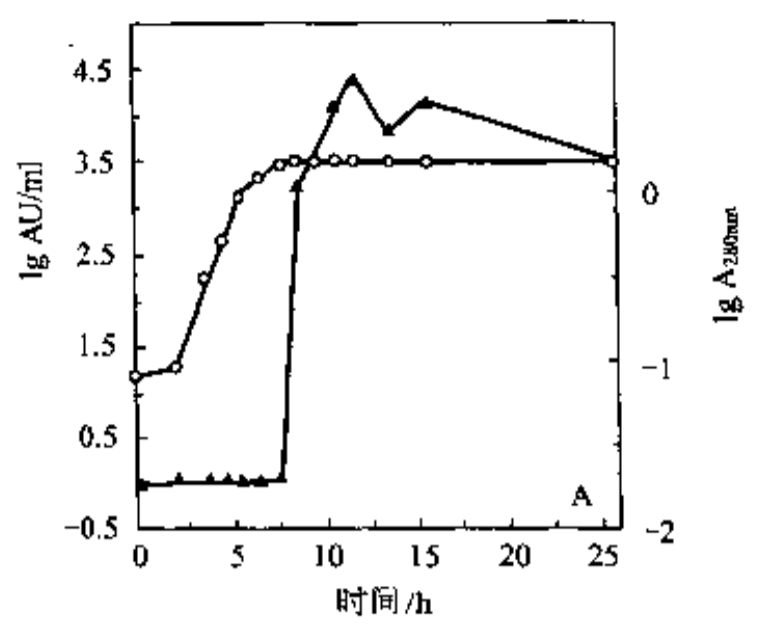


图 5-8 纯的和协同发酵物在恒定 pH6.0 情况下产生 Lactacin B 的情况
 ○—单独 *L. acidophilus* N₂ 的浓度；
 ▲—单独 *L. acidophilus* N₂ 的 Lactacin B 活性；
 ●—协同发酵的浓度；□—协同发酵 Lactacin B 的活性

中较早地产生 Lactacin B, 9 小时后才在纯发酵物中发现 Lactacin B 的存在, 这些结果表明在协同发酵中 Lactacin B 的产生不受 pH 的影响。单菌发酵和协同发酵过程中培养物 pH 的变化见图 5-9。

Chen 等 (1992) 应用其他方法进行 Lactacin B 产量提高的改进实验, 共研究了 8 种其他 *Lactobacilli*、5 种 Lactacin B 抗性革兰氏阳性菌和 5 种革兰氏阴性菌。Lactacin B 革兰氏阳性抗性菌在 MRS 培养基中和 *L. acidophilus* N₂ 一起培养 (起始 pH6.5, 37°C, 14~16 小时) 后, 发现和 *L. acidophilus* N₂ 一起培养的革兰氏阴性菌不产生抗菌素 (见表 5-11), 除 *L. acidophilus* VP2 6032 外, 其他添加革兰氏阳性菌的培养物产生 Lactacin B 的活性提高。研究表明革兰氏阳性菌是最常用的 Lactacin B 产生促进剂, 其他物质如 N-2 酰葡萄糖酸、N-2 酰唾液酸对 MRS 培养基中产生 Lactacin B 没有影响, 说明大分子对于促进 Lactacin B 的产生没有作用。

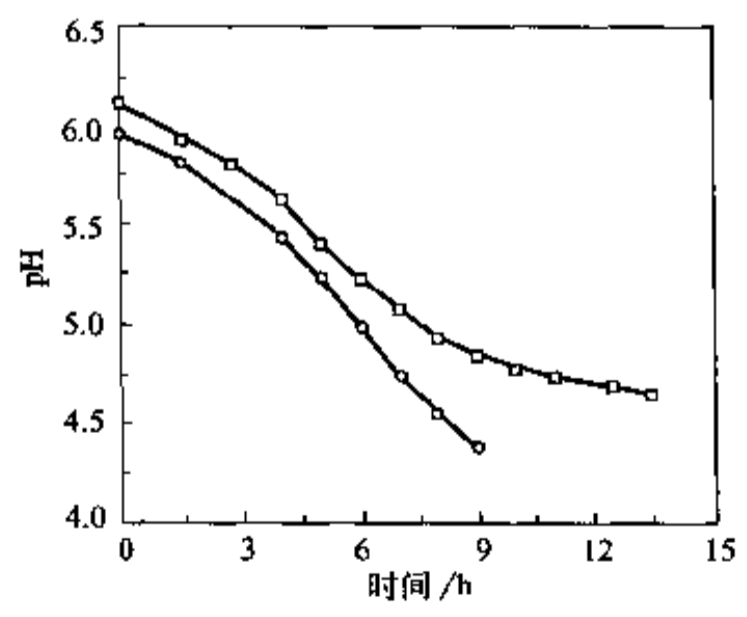


图 5-9 单菌发酵和协同发酵过程中培养物 pH 的变化
 ○—纯 *L. acidophilus*;
 □—协同发酵物 (Hughes, 1990)

表 5-11 协同发酵改善 Lactacin B 产生活性的情况

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	革兰氏反应	对 Lactacin 的敏感性	对活性的促进效果
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCDO 1489	+	敏感	+
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO 1438	+	敏感	+
<i>L. delbrueckii</i> NCDO 9649	+	敏感	+
<i>L. helveticus</i> NCDO 1750	+	敏感	+
<i>L. casei</i> ATCC 393	+	不敏感	+
<i>L. fermentum</i> NCDO 1750	+	不敏感	+
<i>L. plantarum</i> NCDO 1752	+	不敏感	+
<i>L. viridescens</i> ATCC 19615	+	不敏感	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	+	不敏感	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	不敏感	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	+	不敏感	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 232	+	不敏感	+
<i>Listeria monocytogenes</i> V-6	+	不敏感	+
<i>L. acidophilus</i> ATCC 6032	+	不敏感	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	不敏感	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	不敏感	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	-	不敏感	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	不敏感	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 3624	-	不敏感	-

人们试图进一步研究影响 Lactacin B 产生的因素。*L. delbrueckii* subsp. *Lactis* ATCC 4797 的菌体细胞或死细胞能促进 Lactacin B 的生成 (见表 5-12), 但去细胞上清液没有作用, 说明 Lactacin B 生成的促进作用是和菌体细胞密切相关的。这种促进作用用蛋白酶 (1mg/ml) 处理 60 分钟 (37°C) 其促进作用将被破坏。这种促进剂的作用原理是否源于它为 Lactacin B 产生提供了良好的环境或像自力霉素 C 一样为 CaseinC80 和 ColicinS 的产生起诱导作用, 尚无法确定。Barefoot 等 (1999) 为此进行研究证实, 这种促进剂源于 Lactacin B 的敏感指示菌 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, 它被确认为一种分子 58000Da 的蛋白质, 增加指示菌细胞或增加促进蛋白质, *L. acidophilus* N₂ 明显增加了类似 Lactacin B 抑制剂的产量, 其量从无法测得到高达 6400Aμ/ml。像 Lactacin B 一样, 由 *L. acidophilus* N₂ 产生的抑制剂对热呈稳定性, 对许多菌种呈活性, 这些性质和 Lactacin B 一样, 据此确认这种类似 Lactacin B 的抑制剂就是 Lactacin B。

表 5-12 不同添加剂对 Lactacin B 产生的影响

添加在产生菌培养基种物质	Lactacin B 的产生	添加在产生菌培养基种物质	Lactacin B 的产生
无	-	55°C 保温 10 天杀菌的指示菌细胞 (1ml)	+
指示菌发酵物	+	透析指示菌发酵物 (0.5%)	-
洗涤指示发酵物 (0.5%)	+	死的指示菌细胞中提取的无菌体细胞上清液	-
无菌体细胞指示发酵物 (ml)	-		

第三节 乳酸菌在人胃肠道的定殖和存活情况

益生乳酸菌常用作人和动物胃肠道紊乱的调节剂, 如用于痢疾治疗、便秘治疗、胃肠紊乱调整, 抗肿瘤性质也被广泛研究。乳酸菌能否在胃肠道存活是其能否发挥生理作用的关键, Csiro 等 (1987) 对多种有益乳酸菌在体内和体外的存活情况进行了研究, 这为各种益

生菌生理作用的发挥提供了一定的理论依据。

一、乳酸菌的存活研究

Csiro 等 (1987) 进行的 pH 对乳酸菌影响实验表明: *L. acidophilus*、*L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 在 pH=1.0 时活菌数均迅速下降, pH=3 和 pH=5 时均非常缓慢地下降 (见表 5-13)。 *L. acidophilus* ADH 较其他菌株能更好地存活, *L. acidophilus* N₂ 次之, 再次为 *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* 在酸性环境中的存活能力最差。同时他们也进行了抽吸胃液中菌株的稳定性实验, 其结果如表 5-14 所示。在 -20℃ 贮存 20 天新鲜抽吸胃液的 pH 没有变化, 用脱脂乳, NaOH, 3% mylanta 和 6% mylanta 分别调整胃液至 pH3.6、2.5 和 4.5, 体外实验表明菌数的变化和生理盐水 pH 下的情况相似, 即存活情况 *L. acidophilus* ADH > *L. acidophilus* N₂ > *L. bulgaricus* > *S. thermophilus*。

表 5-13 在磷酸盐缓冲液中 pH 对菌存活的影响

时 间/h	pH	活 细 胞 lgcfu/ml						
		0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH	1	7.3	4.0	<1	<1	<1	<1	<1
	3	7.5	5.8	5.0	4.9	4.5	3.3	2.0
	5	7.8	7.7	5.0	4.1	4.3	4.5	4.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂	1	7.0	3.7	<1	<1	<1	<1	<1
	3	7.6	5.8	5.5	5.9	6.2	4.4	3.8
	5	7.9	7.8	6.1	5.6	5.0	5.4	5.2
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1	8.3	2.0	<2	<1	<1	<1	<1
	3	8.5	6.3	3.5	<2	<1	<1	<1
	5	9.8	9.8	8.1	8.2	7.7	7.6	7.5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1	4.9	<2	<1	<1	<1	<1	<1
	3	5.9	<3	3.0	<2	<1	<1	<1
	5	5.9	5.7	4.2	4.0	3.9	3.6	4.3

表 5-14 不同人胃液中的细菌体在外存活情况

时 间/h	pH	脱脂乳	活 细 胞 lgcfu/ml					
			0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH	1	-	7.0	5.9	<3	<3	<3	<3
	2.5	-	9.6	9.5	9.1	7.5	7.3	7.0
	3	+	7.8	7.8	7.1	6.3	5.0	2.6
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂	1	-	6.2	<3	<3	<3	<2	<2
	2.5	-	9.5	8.8	6.8	<4	<4	<4
	3	+	6.6	5.9	6.1	2.9	3.3	2.0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1	-	9.1	5.8	3.5	<1	<1	<1
	2.5	-	9.9	8.3	<5	<5	<5	<5
	3	+	9.1	6.5	6.4	3.6	3.4	<2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1	-	5.3	5.6	<3	<1	<1	<1
	2.5	-	5.9	<3	3.0	<2	<1	<1
	3	+	5.9	5.7	4.2	4.0	3.9	3.6

脱脂乳的存在提高了 pH, 增加了所有菌的存活概率。胃液的体内菌感实验表明: 存活时间呈 pH 依赖性 (表 5-15 所示), 它也能通过乳的添加增加活菌数 (表 5-16)。 *L. acidophilus* ADH 没有乳添加情况下存活 40~60min, 添加乳后存活 2h; *L. acidophilus*

N₂ 至少存活 40min 以上，在 240min 后仍有相当数量的 *L. acidophilus* N₂ 存活。但在发酵物添加前 *Lactobacilli* 的基线值对于本研究是十分重要的，来自口腔的 *Lactobacilli* 的数量在 2.3~3.3 lg cfu/ml 的区间内（发生在 Subject C），Subject E 也有类似情况。在 90min 以上 *Lactobacilli* 活菌数的下降是和胃液 pH 的变化相一致的。*L. acidophilus* N₂ 通过脱脂乳添加其存活时间能延长至 1h 以上，但这种作用可能由于 pH 的迅速下降而减弱。*L. bulgaricus* 的存活非常困难，乳的添加延长其存活时间至 40min 以上。

表 5-15 不同的 *Lactobacillus acidophilus* 菌株在模拟人胃液中的存活情况

时间	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH		<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂				<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂		<i>Lactobacillus bulgaricus</i>					
	A		B		C		D		E		F		G	
	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)
BL	2.8	0	1.3	0	2.9	2.3	3.6	1.0	2.5	3.2	2.6	1.5	6.3	2.1
0	4.5	6.9	2.0	5.4	1.9	6.6	2.3	7.1	3.0	6.9	2.3	2.0	3.2	8.8
20	3.2	6.2	1.5	<4	2.2	4.4	1.8	1.7	2.2	5.3	2.4	<1	1.8	<1
40	3.0	4.2	2.0	<3	2.4	4.0	1.7	<1	1.7	3.2	2.2	<1	1.7	<1
60	2.2	2.0	1.8	<2	1.8	3.5	1.6	<1	1.7	<1	1.7	<1	1.5	<1
90	1.5	<1	2.0	<1	1.7	3.4	1.6	<1	2.2	<1	1.7	<1	1.6	<1
120	1.5	<1	2.0	<1	1.5	2.7	1.6	<1	3.7	4.0	1.5	<1	1.8	<1
240	1.0	<1	1.0	<1	1.6	3.3	1.6	<1	7.0	3.2	1.6	<1	2.1	<1

表 5-16 人胃液中菌的体内存活情况

时间	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH		<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂				<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂		<i>Lactobacillus bulgaricus</i>					
	A		B		C		D		E		F		G	
	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)	pH	(cfu/ml)
BBM	1.0	<1	1.0	<1	1.6	3.3	1.6	<1	7.0	4.0	1.6	<1	2.1	<1
BAM	5.0	2.5	6.0	<1	6.2	3.6	6.3	7.0	6.5	3.2	6.2	<1	6.0	<1
0	5.0	8.7	6.0	8.7	6.2	7.7	6.3	5.9	6.1	7.7	6.1	7.1	5.9	7.6
20	4.0	7.9	5.5	8.8	2.4	6.6	2.4	<3	5.8	5.1	4.0	5.6	5.3	6.4
40	4.0	7.8	4.5	7.5	1.5	<3	1.5	<1	4.0	2.7	2.0	4.0	2.3	<1
60	2.5	7.6	3.0	7.2	1.4	1.3	1.4	<1	2.2	1.6	2.0	<1	2.0	<1
90	2.0	7.1	2.0	5.5	1.4	3.2	1.6	<1	2.0	<1	1.8	<1	1.7	<1
120	1.5	4.3	2.0	1.8	1.6	2.8	1.9	<1	1.8	<1	1.6	<1	1.7	<1
180	1.0	1.0	2.0	<1	1.6	3.4	2.3	<1	1.9	<1	1.7	<1	1.7	<1

Csiro 等 (1987) 对菌的细胞壁稳定情况研究表明：*L. acidophilus* ADH 不能被溶菌酶和 tritonX-100 完全溶解，但 *L. acidophilus* N₂ 和溶菌酶 37℃ 培养 10min 后呈完全溶解状态，细胞壁的溶解困难说明 *L. acidophilus* ADH 存在更多的抗溶体细胞壁，这也可能和其在胃液中有更长的存活时间有关。

二、益生菌在肠道的定殖

(一) 益生菌的一般定殖性质

肠道 *Lactobacilli* 的抑菌活性可以提高菌的竞争活性以达到胃肠道定殖的目的，但为了实现菌在胃肠道的定殖，这些菌也必须黏着于肠黏膜的表面。选择性黏着是构成肠道正常菌和病原菌的普遍性质，它们的黏着能力归因于它们的致病性机理。*Lactobacilli* 的表面吸附呈高度菌

种专一性，它通过菌的酸性多糖黏着于上皮细胞而发生定殖。体内肠道表面菌层的形成受营养和生理因素的影响呈高度专一化，这些因素影响固有微生物的繁殖能力要强于菌对上皮细胞的专一吸附能力。毫无疑问菌在肠道的吸附和繁殖是肠道微生物定殖的主要机理。

Savage 等研究了影响 *Lactobacillus* 定殖和在胃肠特定部位定殖的环境因素。在环境适合定殖的情况下乳杆菌对肠道的定殖依赖于自身性质，但科学家认为人肠道内 *L. acidophilus* 定殖面临的问题是：①黏着于人肠道表面的 *L. acidophilus* 菌株的选择；②这种黏着能力的保持、确认。在体外进行多个肠道菌在人肠细胞上的黏着实验，如 Klaenhammer 进行了 *L. acidophilus* 在人肠道细胞的黏着实验，在钙存在情况下，所有被测试的 *Lactobacilli* 能够黏着。EDTA 实验表明在带负电荷的菌体细胞和上皮细胞间形成了一个非专一性的离子桥，仅有 4 个菌在钙缺乏的情况下可对这些细胞有强黏着。这个系统是否是体内黏着的精确指示尚不清楚，但证实了在这种情况下不是全部的 *L. acidophilus* 具有黏着能力。在选择膳食用 *L. acidophilus* 时，其在人肠道的定殖能力必须被评估。

L. acidophilus 膳食制品的主要目的就是使这种微生物在肠道定殖，*L. acidophilus* 在肠道的成功定殖依赖于菌相容性的生理状态，故要通过环境来选择 *L. acidophilus*。Curran 等发现 73% 的 *Lactobacillus* 菌株（从粪便中分离）呈粗糙的菌落形态，Bergey 手册也将 *Lactobacillus* 描述为具有纤维状细胞结构的粗糙菌落；但体外产生粗糙菌落的 *L. acidophilus* 细胞呈纤维状生长，可通过限制环境来加以诱导，研究表明从肠道分离 *L. acidophilus* 与实验室保存菌株的生长情况存在差异。

从粪便分离 *L. acidophilus* 后，*L. acidophilus* 在实验室培养经常是粗糙和光滑菌落的混合物，光滑菌落产生复合 *L. acidophilus* 培养物，反映了这些细胞能够适应实验室的环境；短棒状细胞构成的光滑菌落是我们期望的，它的浓缩发酵剂利于生长和贮存。虽然光滑菌落在体外呈稳定性，但在体内的表现还不清楚，也可能是和肠道环境不相容的。

（二）益生菌在免疫缺陷鼠肠道的定殖情况

1. 益生菌在鼠胃肠道的定殖

Wagner 等 (1997) 研究了益生菌在免疫缺陷鼠肠道内的定殖情况，研究表明益生菌能够在鼠的胃、小肠、十二指肠、结肠和粪便中定殖，具体情况如表 5-17 所示。益生菌的定殖范围在 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/g，在整个 12 周的研究过程中均保持定殖，鼠胃肠道菌株没有排除四株益生菌中的任何一株。已定殖益生菌的母鼠所分娩的幼鼠出生 7 天后胃肠道也有 $10^6 \sim 10^7$ cfu/g 的益生菌，12 天以后它们肠道益生菌达 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/g，达到成年鼠益生菌的水平。定殖益生菌鼠和对照鼠在胃的 pH 和肠道内容物方面没有明显差异，定殖益生菌鼠胃的 pH 为 5.1 ± 0.7 ，对照鼠为 5.1 ± 0.1 ；肠道的 pH 也是相似的，在小肠为 pH 6.6 ± 0.6 ，十二指肠 6.9 ± 0.3 。

L. acidophilus 和 *B. animalis* 在胃上皮细胞的黏着率分别达 86% 和 82%，而 *L. reuteri* 和 *L. casei* GG 在上皮细胞的吸附仅分别为 2% 和 5%。

2. 益生菌在鼠体内的移位

益生菌由胃肠道移位至其他器官的能力不同。*L. reuteri* 没有显著的位移现象发生（见表 5-18），*L. acidophilus* 和 *B. animalis* 在内部器官的位移分别为 50% 和 55%，*L. casei* GG 的内部器官移位率在 26%~27% 之间。*B. animalis* 定殖鼠在内部器官中益生菌的量为 3.3lg cfu/g，*L. acidophilus* 的量为 6.5lg cfu/g。*L. acidophilus* 或 *B. animalis* 在公鼠内部器官中的存在量远较母鼠为高，*L. casei* GG 的存在量在公鼠和母鼠间没有明显差别。

表 5-17 在鼠的胃肠道中益生菌的定殖情况

益生菌	鼠的基因型	lgcfu of viable bacteria/g(dry wt) of tissues in:				
		胃	小肠	十二指肠	结肠	粪便
<i>L. acidophilus</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	8.2±0.5	9.0±0.6	9.1±0.2	8.1±0.7	9.5±0.2
	<i>bg/bg-nu/+</i>	8.4±0.6	8.8±0.2	9.3±0.4	8.9±0.2	9.9±0.5
<i>L. reuteri</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	8.8±0.1	8.7±0.1	9.5±0.2	9.1±0.1	9.3±0.1
	<i>bg/bg-nu/+</i>	8.9±0.1	8.9±0.1	9.2±0.2	8.8±0.2	9.6±0.1
<i>L. casei</i> GG	<i>bg/bg-nu/nu</i>	9.2±0.1	9.0±0.1	9.9±0.1	9.7±0.1	10.0±0.1
	<i>bg/bg-nu/+</i>	9.5±0.1	9.0±0.1	9.9±0.1	9.7±0.1	10.1±0.1
<i>B. animalis</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	8.9±0.3	9.1±0.1	9.5±0.1	9.5±0.1	10.2±0.1
	<i>bg/bg-nu/+</i>	9.1±0.3	9.3±0.1	9.8±0.1	9.7±0.1	9.9±0.1

表 5-18 益生菌在鼠体内的移位

益生菌	鼠的基因型	黏着率 /%	器官中的 菌含量	益生菌	鼠的基因型	黏着率 /%	器官中的 菌含量
无(GF)	<i>bg/bg-nu/nu</i>	0	无	<i>L. reuteri</i>	<i>bg/bg-nu/+</i>	0	无
	<i>bg/bg-nu/+</i>	0	无	<i>L. casei</i> GG	<i>bg/bg-nu/nu</i>	27	4.1±0.4
<i>L. acidophilus</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	52	6.5±0.8		<i>bg/bg-nu/+</i>	26	4.1±0.3
	<i>bg/bg-nu/+</i>	30	4.9±0.7	<i>B. animalis</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	55	4.4±1.2
<i>L. reuteri</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	0	无		<i>bg/bg-nu/+</i>	31	3.3±0.2

3. 益生菌定殖鼠的组织学评估和存活性

限菌鼠的胃组织部分革兰氏染色实验表明, *L. acidophilus* 和 *B. animalis* 较 *L. reuteri* 和 *L. casei* 更易黏着于角质化上皮上, 在胃的分泌上皮上未发现益生菌的存在。组织分析也表明定殖益生菌鼠的胃和肠道存在脓肿的情况, *L. reuteri* 为 29%, *L. casei* GG 为 29%, *B. animalis* 为 11%, 这种脓肿存在于组织的黏膜和黏膜下, 对 7~12 天 *L. casei* GG 和 *B. animalis* 定殖鼠的检查表明在胃肠道或内部组织上不存在病原性变化。

4~12 周定殖 *L. acidophilus*、*L. reuteri*、*L. casei* GG 或 *B. animalis* 鼠的存活情况如表 5-19 所示。定殖 *L. acidophilus* 或 *B. animalis* 的幼鼠均能生存 12 周以上; 定殖 *L. casei* GG 鼠的幼子也能存活 12 周以上, 但定殖 *L. casei* GG 的公幼鼠在 4 周时死亡率达 36%。所有定殖 *L. reuteri* 的母幼鼠存活下来, 21% 公幼鼠死亡。

表 5-19 益生菌定殖鼠的存活

鼠和益生菌	存活比/%				鼠和益生菌	存活比/%			
	公鼠		母鼠			公鼠		母鼠	
	4 周	8~12 周	4 周	8~12 周		4 周	8~12 周	4 周	8~12 周
成年鼠					新生鼠				
无(GF)	100(36)	100(36)	100(36)	100(36)	无(GF)	100(24)	100(24)	100(24)	100(24)
<i>L. acidophilus</i>	100(12)	100(12)	100(12)	100(7)	<i>L. acidophilus</i>	100(11)	100(11)	100(7)	100(7)
<i>L. reuteri</i>	100(11)	100(7)	100(9)	100(5)	<i>L. reuteri</i>	79(28)	100(11)	100(27)	100(20)
<i>L. casei</i> GG	100(12)	100(5)	100(12)	100(12)	<i>L. casei</i> GG	64(53)	100(23)	100(56)	100(39)
<i>B. animalis</i>	100(10)	100(7)	100(14)	100(14)	<i>B. animalis</i>	100(14)	100(11)	100(22)	100(16)

4. 益生菌对免疫反应的诱导作用

在 *L. casei* GG 和 *B. animalis* 定殖公鼠血清中 IgM 和 IgG 的量上升, 但 *L. acidophilus* 或 *L. reuteri* 没有此作用 (表 5-20 所示); 母鼠血清中的 IgM 和 IgG 可被 *L. acidophilus*、*L. casei* GG 和 *B. animalis* 诱导产生, 但 *L. reuteri* 没有作用。没有益生菌能诱导公鼠血清中 IgA 的增加, 这和此鼠缺乏成熟胸腺 T 细胞相一致, IgA 可通过 *L. casei* GG 和 *B. animalis* 定殖诱导母鼠血清中产生。

表 5-20 定殖益生菌鼠血清的 IgS

益生 菌	鼠的基因型	鼠血清中 Ig 的量 ($\mu\text{g/ml}$)		
		IgG	IgA	IgM
无(GF)	<i>bg/bg-nu/nu</i>	293 \pm 51	<200	28 \pm 2
	<i>bg/bg-nu/+</i>	301 \pm 123	<200	26 \pm 9
<i>L. acidophilus</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	281 \pm 38	<200	105 \pm 8
	<i>bg/bg-nu/+</i>	729 \pm 88	210 \pm 10	114 \pm 20
<i>L. reuteri</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	68 \pm 27	<200	7 \pm 4
	<i>bg/bg-nu/+</i>	313 \pm 59	<200	38 \pm 11
<i>L. casei</i> GG	<i>bg/bg-nu/nu</i>	540 \pm 120	373 \pm 122	414 \pm 256
	<i>bg/bg-nu/+</i>	702 \pm 96	503 \pm 113	84 \pm 18
<i>B. animalis</i>	<i>bg/bg-nu/nu</i>	2.431 \pm 1.651	299 \pm 99	399 \pm 255
	<i>bg/bg-nu/+</i>	1.792 \pm 830	407 \pm 56	281 \pm 95

L. casei GG 或 *B. animalis* 定殖母鼠血清中 IgS 对从菌株制备的抗原呈专一性反应, 且和其他益生菌制备的抗原呈交叉反应; 但 *L. reuteri* 的定殖不能产生专一性的抗体, 也不能发生类似的交联反应。

(三) *Lactobacilli* 在人 Caco-2 细胞的定殖

通过病原微生物对肠道定殖、引发动物实验性感染的方法, 能确认多种黏着和不同菌株的侵入基因, 这些在微生物感染起重要作用的基因通过分子遗传方法结合体外模型被广泛测定和检测。相反对于形成定殖的肠道益生菌的机理研究较少, 有关这方面信息的缺乏归因于肠道系统的复杂性, 及缺乏合适的诱变菌株。

Lactobacilli 能从人胃肠道所有部分分离到, 它构成人体正常微生物的主要部分, 通过它定殖于肠道机理的研究能提供正常肠道是如何保持菌群组成稳定, 以及益生菌选择标准的重要信息。Greene 等 (1994) 研究了影响 *Lactobacilli* 对 Caco-2 细胞黏着的因素。除了 *L. acidophilus* BG₂FO₄ 外, 其他菌 *L. acidophilus* NCFM/N₂、*L. gasseri* ADH 和 *L. bulgaricus* 1489, 均随定殖菌 cfu 的增加而稳定增加, 在 5×10^8 的情况趋于饱和。三种人体分离的 *L. acidophilus* BG₂FO₄、NCFM/N₂ 和 *L. gasseri* ADH 均较乳制品分离的 *L. bulgaricus* 1489 有更高的黏着和结合。在 pH 从 6 降至 3 的范围内四株菌的黏着均稳定上升, 在 pH 6~8 时所有菌的黏着水平是一致的。*L. acidophilus* BG₂FO₄ 和 NCFM/N₂ 的黏着由于蛋白酶处理菌体而下降, 而 *L. gasseri* ADH 的黏着不被蛋白酶的处理影响, 蛋白酶也不能增加其黏着作用。在 *L. acidophilus* BG₂FO₄ 和 NCFM/N₂ 细胞表面确实存在表面蛋白层, 但和黏着没有关系。菌体细胞表面的碳水化合物被高碘酸盐氧化后大大降低了 *L. gasseri* ADH 的黏着, 中度减少了 *L. acidophilus* BG₂FO₄ 的定殖, 对 *L. acidophilus* NCFM/N₂ 没有影响。这些结果表明 *Lactobacillus* 对人肠道细胞的黏着是由菌体细胞表面糖基蛋白的不同成分决定的, Coconnier 等研究表明的 *L. acidophilus* BG₂FO₄ 黏着的主要媒介是分泌型的跨膜蛋白, 但 Greene 的研究未证实这一结论。

(四) *Lactobacillus* 在人肠道细胞的黏着

Kleeman 等测试了 32 株 *Lactobacilli* 在人肠道细胞上的黏着情况, 27 个人 *L. acidophilus* 分离物在 HF₁ 上仅有 4 个能够结合, *L. acidophilus* 能够黏着于 HF₁ 细胞, 其他 3 株菌 *L. acidophilus* MSO1、MSO2 和 MSO4 明显地少于 BG₂FO₄, 但能测定出黏着情况的存在。

由于 NCFM 是一个商业化菌株, 采用不同的方法测定了 NCFM 的黏着情况, 结果表

明, 含有 EDTA 的洗脱液能有效地从 HF₁ 单层上去除 NCFM 的黏着细胞, EDTA 的洗脱不影响 BG₂FO₄ 的黏着。钙的添加对所有菌包括 *L. bulgaricus* 1489、*L. acidophilus* Q、*L. casei* ATCC7469、*L. jugurti* 1244 的黏着均有增强作用; 在这些菌中仅有 *L. acidophilus* BG₂FO₄、MSO1、MSO2、MSO3 呈非钙依赖性黏着。

应用 *Lactobacilli* 和 HF₁ 系统, 两种黏着机理被发现。一个是离子调整的黏着体系是非专一性的, 人、动物、肠道和非肠道 *Lactobacilli* 都适用于这个系统, 它们利用了悬浮介质中的 Ca²⁺, EDTA 能将阳离子螯合因此它对这种黏着有去除作用; 钙可以提供菌负电荷表面和上皮细胞间的离子桥而发挥黏着作用, 二价和三价阳离子在这个体系中起作用, 这种阳离子的影响是一种物理结合力或化学键, 呈黏着的非专一性。在测定的 *L. acidophilus* 菌株中仅有 4 个在没有 Ca²⁺ 参与下结合于 HF₁ 细胞, 黏着不受体外转移、分类变化、发酵剂浓度、冷冻贮存或冷冻干燥影响, 故认为这种黏着的决定因素是非常稳定的, 但它不广泛存在于所有 *L. acidophilus* 菌株中。

(五) 对乳酸菌的黏着性质研究

乳酸菌在回肠细胞的黏着实验表明: *L. acidophilus* ADH 较 *L. acidophilus* N₂ 和 *L. bulgaricus* 能更好地黏着于人的回肠细胞, *S. thermophilus* 基本不能黏着于人的回肠细胞(表 5-21 所示)。数据表达为每回肠细胞(假定 10⁵ 回肠胞)上的菌数, 虽然这是一个近似值, 但同时应用于研究的是相同回肠细胞悬浮物, 其结果应是真实可信的。对猪回肠细胞的黏着实验结果如表 5-22 所示, 人和猪回肠细胞黏着效果可从实验 A 和实验 B 中获得, 所有菌在猪回肠细胞上均较人回肠细胞有更高的黏着性; 缓冲液的应用能提高和改善菌的黏着性, 当猪回肠细胞悬浮于 PBS 中时较悬浮于缓冲液中黏着和结合明显减少。

表 5-21 菌对人回肠细胞悬浮物的黏着情况

菌	实 验				
	A	B	C	X	SD
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH	195	120	205	173	46
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂	51	69	55	58	9
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	31	66	101	66	35
<i>Streptococcus thermophilus</i>	14	3	10	9	5.5

表 5-22 菌对猪回肠细胞悬浮液的黏着情况

菌	菌的稀释	每个回肠细胞结合菌细胞数					
		A		B		C	
		X	SD	X	SD	X	SD
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ADH	1	170	53	375	67	191	170
	2	86	8	208	21	86	63
<i>Lactobacillus acidophilus</i> N ₂	1	115	7	226	111	111	8
	2	20	4	68	21	8	3
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1	56	47	114	20	39	9
	2	20		35	6	20	7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1	10	9	37	17	14	4
	2	2	1	9	4	9	4

甘露糖和乳也会对菌的回肠细胞黏着产生影响。当甘露糖添加后 4 株菌的黏着无明显减少, 在添加 1% 脱脂乳后所有四株菌对回肠细胞的结合均明显增加。所有的 *Lactobacilli* (3 株) 均较 *S. thermophilus* 能更好的黏着于猪盲肠或结肠上皮细胞。

乳酸菌的选择主要着眼于两个方面：一是能够在胃液中存活，另外也能在消化道定殖。对4株菌的研究表明：影响菌在胃液存活的关键因素是pH，某些成分如脱脂乳对菌的存活有帮助作用，体内体外实验均有类似结果；*L. acidophilus*能较好的黏着于回肠、盲肠和结肠细胞，脱脂乳的存在有助于黏着作用的加强。这两个方面说明*L. acidophilus*较*L. bulgaricus*和*S. thermophilus*在人体和动物体内更能发挥益生作用。

三、乳酸菌和 *Bifidobacteria* 对 FOS 的发酵作用

低聚糖作为益生菌的辅助因子（增殖因子）受到越来越广泛的关注，FOS（低聚果糖）就是其中最具代表性的低聚糖之一，它们能够从天然材料中获得，也可通过酶法合成。FOS含有一个单体葡萄糖，通过 α -1,2或 β -2,1连接两个或多个果糖基，形成GF₂，GF₃，GF₄类低聚糖。

Kaplan等（2000）研究了乳酸菌和*Bifidobacteria*代谢FOS的情况，他们共计评估了28株益生菌（见表5-23）。每株菌开始于MRS肉汁培养基中生长，然后稀释到MRS-FOS培养基形成25~50个菌落。

表 5-23 乳酸菌和 *Bifidobacteria* 对 FOS 的利用

微生物	来源	MRS-FOS 上成长	OD	pH
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> B734	NRRL	-	0.5	6.3
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CR5	USU	-	0.5	6.4
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CR14	USU	+	2.6	4.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 33200	ATCC	+	1.4	4.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 837	ATCC	+	1.8	4.1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1	NC	+	1.5	4.4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	NCSU	+	1.6	4.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4008	ATCC	+	2.8	4.5
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1195	NRRL	+	1.9	4.0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 12006	IFO	+	2.4	4.4
<i>Lactobacillus plantarum</i> MR240	Rhodia	+	2.4	4.6
<i>Lactobacillus lactis</i> 448	USU	-	0.8	5.6
<i>Lactobacillus casei</i> 685	UNL	+	1.9	4.9
<i>Lactobacillus casei</i> MR191	Rhodia	+	2.4	4.0
<i>Lactobacillus strain</i> GG	ATCC	-	0.5	5.9
<i>Streptococcus thermophilus</i> 19987	ATCC	-	0.6	5.4
<i>Streptococcus thermophilus</i> 14485	ATCC	-	0.7	5.7
<i>Streptococcus thermophilus</i> 19258	ATCC	-	0.6	5.5
<i>Streptococcus thermophilus</i> MTC321	Rhodia	-	0.7	5.9
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 15705	ATCC	+	1.3	4.6
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 15706	ATCC	+	1.3	4.5
<i>Bifidobacterium breve</i> 15698	ATCC	+	1.8	4.4
<i>Bifidobacterium breve</i> 15700	ATCC	+	1.6	4.6
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 15696	ATCC	-	0.8	5.0
<i>Bifidobacterium infantis</i> 17930	ATCC	+	1.7	4.4
<i>Bifidobacterium infantis</i> 25962	ATCC	+	1.8	4.4
<i>Bifidobacterium longum</i> 15708	ATCC	+	1.4	4.6

虽然基础MRS培养基的营养足以促进这28株菌的菌落形成，但仅19株菌发酵FOS。*L. acidophilus*的所有菌株均能发酵利用FOS，Sghir等也报道了类似结果，在这些酶发酵FOS

的 *L. acidophilus* 中 DDS-1 和 NCFM 被用作益生菌，其他三株商业化的菌株 *L. plantarum* MR240、*L. casei* MR191 和 *L. casei* 685 也能发酵 FOS，已被广泛研究的 *Lactobacillus* GG 不能发酵 FOS，酸奶的常用发酵菌种 *L. bulgaricus*、*S. thermophilus* 也不能利用 FOS。

所有菌株甚至是不能利用 FOS 的菌株在 MRS-FOS 肉汁中的生长，明显依赖于基础 MRS 肉汁中已存在的碳水化合物水平，或有限程度上依赖于商业化 FOS 含有的其他糖类（见表 5-23），但发酵 FOS *Bifidobacterium infantis* 17930 和 *L. acidophilus* NCFM 的最终细胞密度是非发酵 FOS 菌种 *Lactobacillus* GG 的两倍；同时也观察到先在 MRS 肉汁中生长后转至 MRS-FOS 培养基中生长的 *L. acidophilus* NCFM 有较短的对数周期；另外利用 FOS 和葡萄糖生长速度是相同的。这说明 FOS 的利用不需要诱导期，在支持菌株生长方面是和葡萄糖是相同效果的底物。

发酵 FOS 的菌株也可通过 HPLC 分析得以证实，即通过底物中菌生长前后 FOS 的变化来说明菌是否利用了 FOS，测定的所有菌株均能利用 GF₄。

第四节 *L. acidophilus* 对肠道酶活性及免疫功能的影响

一、*L. acidophilus*、*Bifidobacterium* 和免疫反应

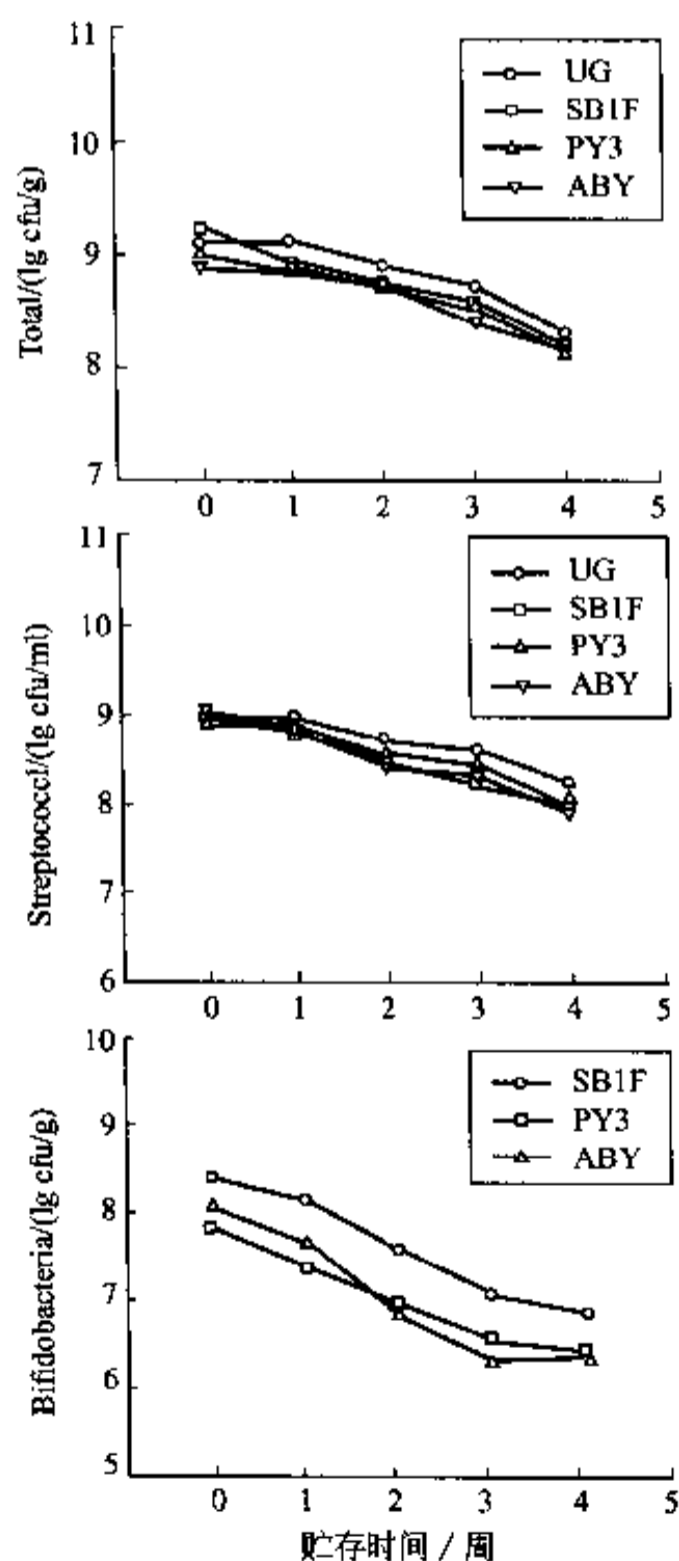


图 5-10 酸奶中菌的变化情况

乳酸菌被证明在痢疾、其他疾病和改善免疫反应方面具有作用，这些作用源于这些菌对正常肠道菌完整性的保护、定殖抗性、黏着性和其产生的抑菌物质，也有证据表明 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacterium* 在人和动物的胃肠道免疫调节方面发挥着重要作用，胃肠道系统具有专一性物质对来自膳食的抗原进行反应，因而引起免疫反应，这些物质构成了肠道免疫系统，他们是含有免疫反应诱导必须的免疫细胞的淋巴组织，即 B-细胞、T-细胞-巨噬细胞和附属细胞。代表胃肠免疫系统的组织是 Peyer 结 (Patches)、肠系膜淋巴结、lamina propria 和淋巴细胞。能刺激肠道和系统的潜在抗原是霍乱毒素 (CT)，它能诱导肠道分泌 IgA 的反应，也诱导 IgA 对其他抗原反应，CT 增强血清 IgG 抗体反应。霍乱毒素已知是作为许多普通蛋白质、病毒或细菌多糖的肠道辅助因子，因此能增强 IgA 记忆反应。

Simon 等 (1999) 以酸奶消化对鼠胃肠道免疫系统的影响为依据，应用 CT 免疫作为模型评估这种影响。他们应用菌的情况如图 5-10 所示，酸奶均含有商业用酸奶菌的常规浓度。在 3 周的实验中鼠的下痢情况、体重和对照组无明显差异。为了测定肠道的免疫反应，收集鼠的粪便，将提取物用 ELISA 对抗 CT 专一性 IgA 进行测试，在鼠接受第一次 CT 剂量时，无论实验组还是对照组，抗 CT IgA 的水平稍有增加，在两组间没有重要差别，4 个实验组在第二周 IgA 的水平下降，对照组稍有上升。在第二个 CT 剂量实施后一周，含有强化

L. acidophilus 和 *Bifidobacterium* 的酸奶喂食组中 IgA 的量明显高于对照组，而仅含传统菌的酸奶喂食组的比对照组 IgA 的水平下降。

CT 免疫鼠免疫反应程度也可用血清中专一性抗体 IgA 的水平来表示。除了不含 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacterium* 的酸奶喂养组外，酸奶喂养组抗 CT IgA 的浓度高于对照组；鼠也有强的抗 CT IgG 反应，但 IgG 的滴度要低于 IgA，除了传统酸奶外，对照组和酸奶喂食组间没有显著性差异（见表 5-24）。这些结果表明口服免疫抗原在引起 CT 抗体反应方面是有效的，即强化 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacterium* 的酸奶能改善和提高肠道系统的 IgA 反应。

表 5-24 喂食 3 周后专一性抗 CT Ig 的密度评估

酸奶喂食	IgA 抗 CT				IgG 抗 CT	
	粪 便		血 清		X	SE
	($\mu\text{g/g}$)		($\mu\text{g/ml}$)			
	X	SE	X	SE		
对照样	2.4	0.1	28.8	0.2	1.1	0.1
UltraGro	1.6	0.0	25.1	1.0	0.4	0.0
Sbifidus	4.5	0.5	53.3	6.1	0.8	0.2
PY-3 Redi	7.0	0.7	71.8	19.5	1.2	0.2
ABY-2C	3.1	0.8	48.0	2.4	0.8	0.3

二、乳和 *Lactobacillus* 对人肠道微生物酶活性的影响

Goldin 等 (1984) 进行了 *L. acidophilus* N₂ 和 NCFM 对肠道微生物酶活性的影响实验，获得了较好的实验结果。

(一) 对 β -葡糖醛苷酶的影响

喂食乳和 *Lactobacillus* 观察人的粪便中 β -葡糖醛苷酶的活性情况如图 5-11 所示，人粪便中这种酶的活性在 1.74 到 2.14 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质的水平。在食用乳的 30 天内对此酶活性没有影响，在食用乳 + *Lactobacillus* 期间 21 人粪便中 β -葡糖醛苷酶的活性均有较大幅度下降，最低值发生在消费此类混合物 30 天的时候，达到 1.12 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质。在停止食用乳 + *Lactobacillus* 的强化物后， β -葡糖醛苷酶活性呈上升趋势，30 天以后达到未食用强化物前的水平，据此认为摄入 *Lactobacillus* 产品至少 10 天才能发挥作用，在产品摄入停止后其作用至少延迟 10 天。

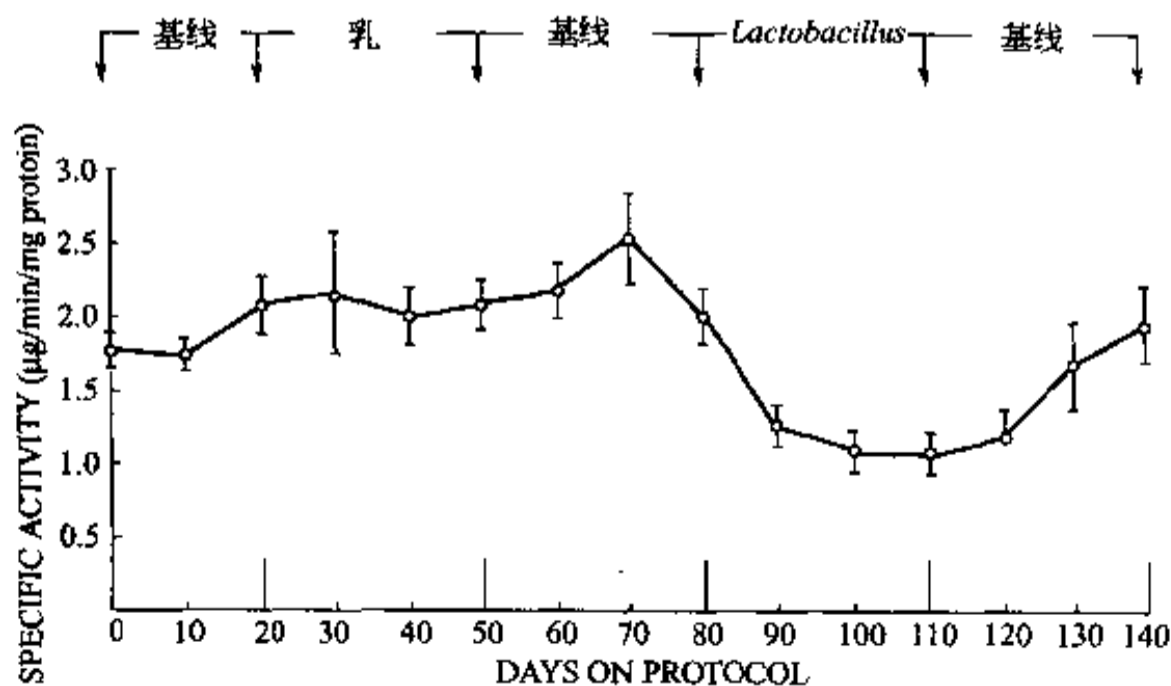


图 5-11 口服 *L. acidophilus* 对 β -葡糖醛苷酶活性的影响

(二) 对硝酸还原酶的影响

摄入乳和 *Lactobacillus* 对入粪便中硝酸还原酶的影响情况如图 5-12 所示。正常人粪便中硝酸还原酶的活性介于 $4.3 \sim 6.0 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质之间，乳的摄入对其没有任何影响，但乳 + *Lactobacillus* 的摄入大大降低了粪便中硝酸还原酶的活性，摄入此混合物 10 天后酶的活性下降，在摄入 20~30 天后达到酶活性的最低值 $1.2 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质。停止摄入后 10 天内酶活性上升，4 周后达到未摄入前酶活性水平。

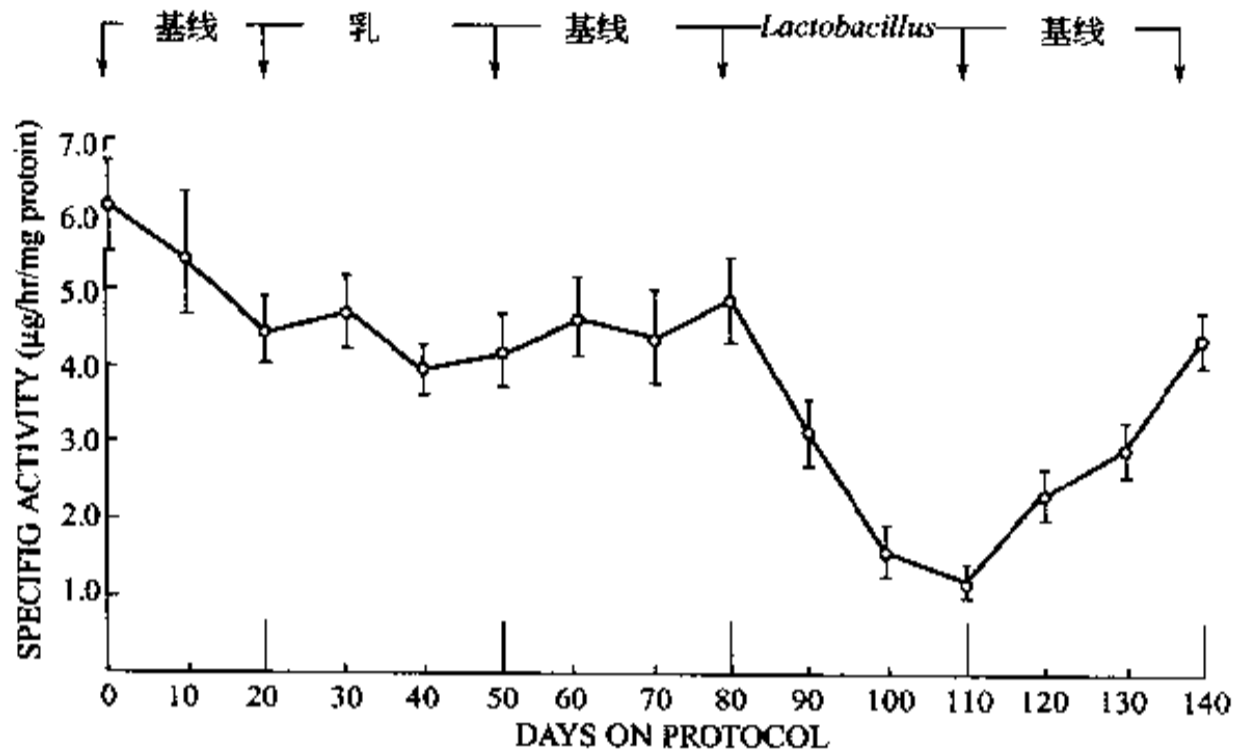


图 5-12 口服 *L. acidophilus* 对粪便中硝酸还原酶活性的影响

(三) 对叠氮还原酶的影响

入粪便中叠氮还原酶的正常值介于 $3.9 \sim 5.1 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质，乳的摄入同样对酶活性无影响，当摄入含有 *Lactobacillus* 的乳产品时，10 天内此酶的活性没有显著下降，但 20~30 天后酶活性下降明显，摄入 4 周后达酶活性最低值 $1.2 \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质；当停止摄入含有 *Lactobacillus* 的乳后，酶活性持续上升，直至 4 周结束后酶活性仍无法达到摄入前的水平，同 β -葡萄糖苷酶、硝酸还原酶一样，均是摄入含 *Lactobacillus* 的乳产品后叠氮还原酶活性下降，20~30 天达活性最低值，停止摄入后酶活性上升，4 周左右基本恢复至原水平。

这些研究表明口服含有 *L. acidophilus* 的制剂能够引起健康人群肠道微生物代谢活性的改变，乳单独摄入没有这种作用。此研究应用的 *L. acidophilus* 浓度为 $10^6 \text{cfu}/\text{ml}$ ，此剂量据此可证实是人体达到益生作用的有效剂量。由于这三种酶活性和人体的癌症发病率相关，这三种酶活性的抑制作用从另一个侧面说明了 *L. acidophilus* 对预防癌症有一定的作用。

三、*L. acidophilus* 和 *L. gasseri* 分子克隆

L. acidophilus 具有复杂的基因型组成，它们的许多菌株单靠表面型来区分是十分困难的，如 *L. gasseri* 菌株由于通过经典方法和 *L. acidophilus* 无法分辨而被归类在 *L. acidophilus* 一类中。许多方法用于确认和对 *Lactobacilli* 分类，如对抗菌剂的敏感性、质粒指纹和血清等检验、DNA 杂交分析和发酵测试等，这些方法存在着诸多的可靠性限制，Luchansky 等对 *L. acidophilus* 和 *L. gasseri* 进行了分子克隆和脱氧核糖核酸的多型性研究，其应用的菌和质粒如表 5-25 所示。DNA 被克隆于 PGK12 的 *ermC* 基因的 $\text{Bc}\pi$ 位，从 *Lactobacillus* 菌株 ADH 提取的全 DNA 的噬菌体 ϕ_{adh} DNA 用 $\text{Bc}\pi$ 消化，连接于消化 $\text{Bc}\pi$ 的 PGK12 上，这种连接物被转至菌株 ADH 上，选择对 $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素有抗性的菌株。如

表 5-26 所示。控制 DNA 的 Cm^r 转移物 (未切 PGK12) 以 $5.6 \times 10^5 / \mu g$ 的几率被回收, 这 PGK12:: ϕadh 和 PGK12::Chr 结合物以每 mg 媒介产生 1.5×10^3 和 2.0×10^4 PGK 的几率产生 Cm^r 转移体, 从 PGK12:: ϕadh 和 PGK12::Chr 克隆物得到的转移体可回收 6% (14/240) 和 22% (10/46), 它对红霉素 (Em^r) 呈敏感性。限制性核酸内切酶的杂交分析证明由 Cm^r , Em^r 转移体内含的 DNA 以染色体 (PGK12::Chr) 或 ϕadh (PGK12:: ϕadh) 为模板。

表 5-25 菌株的质粒

菌 株		相关特征
<i>Lactobacillus strain ADH</i>		
NCK101		ϕadh^+ , <i>str-10 spc-11</i> , (pTRK15)
NCK102		ϕadh^- , (pTRK15)
NCK110		ϕadh^+ , <i>gnt-12 rif-13</i> , (pTRK15)
NCK111		ϕadh^+ , <i>str-10 spc-11</i> , (pTRK15)(pGK12)
NCK220		ϕadh^+ , <i>str-10 spc-11</i> , (pTRK15)(pGK120)
NCK221		ϕadh^+ , <i>str-10 spc-11</i> , (pTRK15)(pGK121)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
NCFM/N2		RI.8K 光滑菌落分离物
ATCC 4356		Neotype <i>L. acidophilus</i> , DSM 20079
VPI No.	均相组	
6032	A-1	ATCC 4356
11084	A-1	NCTC 1899
7635	A-2	
11083	A-2	NCTC 2949
1754	A-3	
1756	A-3	
1830	A-3	
1793	A-4	
6033	B-1	ATCC 19992
11089	B-1	ATCC 9857
11092	B-1	ATCC 29601
12601	B-1	YIT-0164
11088	B-2	ATCC 11506, NCK88
11694	B-2	NCTC 1406
11696	B-2	NCTC 1407
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
ATCC 33323		63AM Gasser, DSM 20243
Enterococcus faecalis 19433		
Escherichia coli DH5 α		
<i>Lactobacillus helveticus</i> 481		
Lactococcus lactis MG1363		无质粒
Staphylococcus aureus NCTC 8325		JBL71
质粒		
pGK12		Cm^r , Em^r , 4.4 kb
pTRLK15		cryptic plasmid in AL, 26.5 kb
pTRK120		Cm^r , Em^r , 5.7 kb
pTRK121		Cm^r , Em^r , 5.9 kb

表 5-26 经转移的 *Lactobacillus* 菌株 ADH 的克隆

连接混合物	每 mg DNA 转移量	Cm^r	Em^r / %	Cm^r	Em^r / %
pGK12(uncut)	5.6×10^5	100		0	
pGK12::Chr	2.0×10^4	78		22	
pGK12:: ϕadh	1.5×10^3	94		6	

结合物质粒 pTRK120 和 pTRK121 可作为基因探针对 *Lactobacillus* 菌株的专一性评估, 如表 5-27 所示探针和菌株 ADH 和 *L. gasseri* VPI 6033 杂交, 但从菌株 *L. acidophilus* ATCC 4356 来看 pTRK120 和 pTRK121 均无法和整个 DNA 杂交, 数据表明 *L. gasseri* 的 pTRK120 和 pTRK121 较 *L. acidophilus* 特异性更强。为了证实上述结果, 从不同 *L. acidophilus* 和 *L. gasseri* 菌株中提取的全 DNA 分别和³²P 标记 pTRK120、pTRK121 及自身的隐藏质粒杂交, pTRK120 探针强烈杂交于对照 DNA (NCK102 和 NCK110) 和 VPI 菌株 6033、11089、11092 和 1260 (见表 5-28); 在 *L. gasseri* 和菌株 ATCC33323 中探测到一个较弱的信号。质粒 pTRK15 强杂交于菌株 ADH 的整个 DNA、菌株 VPI 6033 和 VPI 11083。质粒 pTRK121 (含有 ϕ_{adh} DNA) 具有除 *L. gasseri* 菌株外其余全部 B-1 组菌株的同源性。质粒 pTRK121 也能强杂交于菌株 VPI 11694 和 VPI 11696 的全 DNA, 并表现出和 VPI 11083 弱的同源性。

表 5-27 pTRK120 和 pTRK121 作为 *Lactobacillus* 的基因探针评估

DNA 来源	和谁杂交		DNA 来源	和谁杂交	
	pTRK120	pTRK121		pTRK120	pTRK121
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 19992	+++	+++	<i>Lactobacillus lactis</i> MG1363	-	-
<i>Lactobacillus strain</i> ADH	+++	+++	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433	-	-			

表 5-28 pTRK15、pTRK120 和 pTRK121 作为基因探针的评估

均相组	标 记	和谁杂交			均相组	标 记	和谁杂交		
		pTRK15	pTRK120	pTRK121			pTRK15	pTRK120	pTRK121
ND	ADH(NCK102)	+++	+++	-	A-4	1793	-	-	-
ND	ADH(NCK110)	+++	+++	+++	B-1	63AM(ATCC 33323)	ND	+	-
ND	NCFM/N2	-	-	-		6033(ATCC 19992)	+++	+++	+++
A-1	6032	-	-	-		11089(ATCC 9857)	ND	+++	+++
	11084	-	-	-		11092	-	+++	+++
A-2	11083	+++	-	+		12601	-	+++	+++
	7635	-	-	-	B-2	11088(ATCC 11506)	ND	++	-
A-3	1754	-	-	-		11694	-	-	+++
	1756	-	-	-		11696	-	-	+++
	1830	-	+++	-					

为了更进一步确定在菌株 ADH 和其他 *Lactobacillus* 菌间的基因表现型的相关性, 质粒 pTRK120 和 pTRK121 被用作 B-1 和 B-2 同源组中的代表性核酸内切酶全 DNA 的杂交探针, 除 NCK102 外质粒 pTRK121 具有和全测试菌提取 DNA 的同源性。³²P 标记 pTRK121 对 EcoRI 消化染色体 DNA (从 VPI 11694 和 VPI 11696 中得到) 的杂交证实在每株菌中有相似大小的相同片段, 即约长 2.5kb, 在 VPI 11092 pTRK121 探针和两片段 (约 2.8kb 和 3.8kb) 杂交。同样从另一测试组菌株 VPI 6033 (*L. gasseri* ATCC 19992) 得到的 EcoRI 消化全 DNA 和 pTRK121 杂交, 得到 3.8kb 和 4.0kb 两个片段。更重要的是在 VPI 6033 和 pTRK121 杂交的 EcoRI 消化染色体顺序, 像和 pTRK121 杂交的 ADH 的 EcoRI 消化片段一样占据相同的相对位置。

应用质粒 pTRK120 作为探针获得了相似的结果, 大约长度 4.4kb 的单一 EcoRI 消化片

段在 ADH 的衍生物和 VPI 6033 中可以测定到；一个较小的 EcoRI 消化片段（约 2.8kb）在另外 B-1 组菌 VPI 11092 和 VPI 12601 中和 pTRK120 杂交。从染色体 DNA（pTRK120）制备的 ADH 衍生菌探针对 B-1 同类菌没有同源性，这是因为探针也具有和大 EcoRI 消化片段如 VPI 1830、A-3 组菌一致同源性。另外来自 ADH 和 VPI 6033 消化 EcoRI 消化全 DNA 和 ^{32}P 标记 pTRK15 杂交实验证明：在所有三菌株之间存在相同的杂交模型。

四、*L. acidophilus* 的 16S 核糖体 DNA 终端限制片段模型

对人胃肠道微生物的研究主要集中于大肠和粪便，但由于粪便微生物的高菌落数和种类的异常繁多，因此这是一项十分困难的工作。一个能很快适应于复杂微生物的方法是终端限制片段（TRF）模型分析，它能对微生物量变化动力学提供快速的可重复性的结果。Kaplan 等（2001）分析了 *L. acidophilus* 的 TRF 模型，并提出了特异性检测 *L. acidophilus* 的方法。

TRF 模型的流程：底物荧光标记，DNA 内切酶消化，PCR 扩增含标记片段，最后进行 DNA 测序。当 PCR 扩增 16S 核糖 DNA（rDNA）时，TRF 模型反映了样品中菌的分类学差异性，这种方法用于比较不同环境的菌群情况，比较不同时间 TRF 模型也能监测菌群结构的即时变化。TRF 模型分析允许在时间和空间上对环境快速监测过程时，产生新的问题。TRF 模型精确描述复杂微生物群的能力由于保存的 16S rDNA 顺序常由于 PCR 初始位置的变化而复杂化。由于样品中菌 16S rDNA 序列的一部分被放大，初始选择会大大改变在 TRF 模型中已存在的图谱。Kaplan 等选择的初始状态已证明能够和 1500 个菌的 16S rDNA 顺序的 90%（46f）和 99%（536r）很好地杂交。除了 PCR 底物提供的覆盖度外，也要考虑 TRF 的长度一致性，当用一种核酸内切酶消化时不同的菌会产生不同长度的 TRF，但当用不同酶消化时也产生相同长度 TRF，因此多酶消化 TRF 模型分析将提供一个较复杂的菌

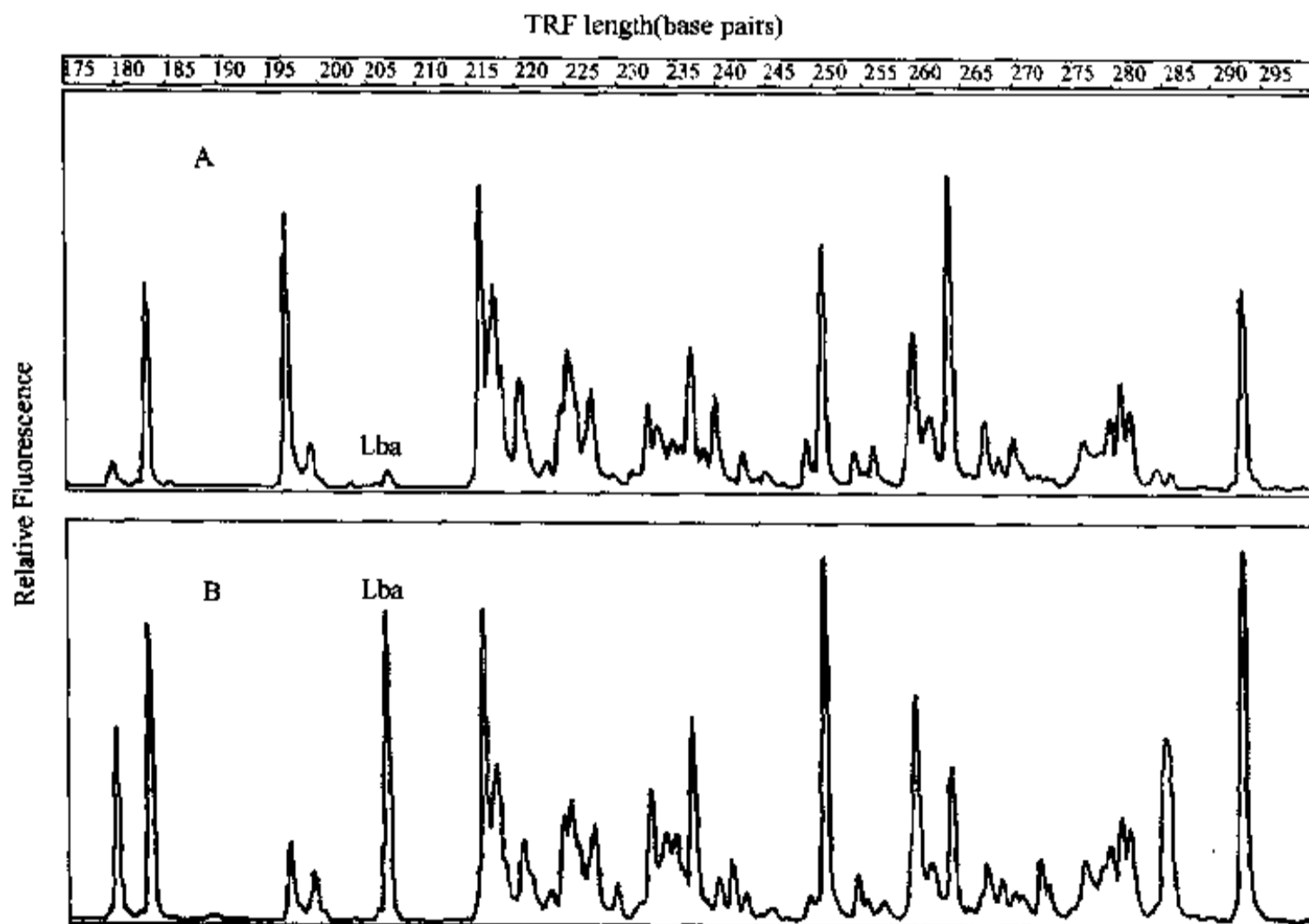


图 5-13 TRF 模型图谱

A 未喂食 NCFM 鼠粪便 TRF 模型；B 喂食 2% NCFM 鼠粪便的 TRF 模型

群图谱。

所有的鼠喂食 NCFM 的 TRF 模型包括一个小的 TRF 峰 (2 至 3bp) (见表 5-29), 像粪便模型一样 NCFM 的纯发酵物产生相同大小的 TRF 峰。TRF 模型表明从喂食 NCFM 菌鼠粪便中含有一个和 NCFM 菌有关的大峰 (见图 5-13 所示), 在未喂食 NCFM 菌鼠粪便中很少有菌具有相同的 TRF 峰 (见表 5-30)。TRF 模型能监测粪便中 NCFM DNA 相对量的能力表明 TRF 能够应用于复杂体系中许多菌的相对定量。事实上 Clement 和 Kitts 报道在添加于粪样品 NCFM 细胞的比例和代表 *L. acidophilus* 的 TRF 峰的总面积间, 存在着——对应的关系, 这种对应受 *L. acidophilus* 中 PCR 底物特异性和 16S rDNA 拷贝数的影响, 许多研究者认为平均每个菌群的一个基因组有 3.81bs rDNA 的拷贝, *L. acidophilus* 则有 4 个拷贝。

表 5-29 从 RDP 得到的和微生物匹配的 TRF 峰

TRF 峰和菌	TRF 匹配长度		
	<i>Msp</i> I	<i>Dpn</i> II	<i>Hae</i> III
<i>L. acidophilus</i> 菌落群的 TRF 峰	141	156	207
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	144	158	209
<i>Lactobacillus crispatus</i>	143	157	208
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	141	155	206
<i>L. Johnsonii</i> 菌落群的 TRF 峰	149	287	293
<i>Lactobacillus acidophilus</i> spp. <i>johnsonii</i>	151	288	294
<i>Lactobacillus gasseri</i>	151	288	294
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	151	288	294
<i>R. flavefaciens</i> 菌落群的 TRF 峰	243	233	264
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (5 strains)	244	234	264
Unidentified rumen bacterium(3 clones)	244	234	264
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (1 strain)	246	236	266
Unidentified rumen bacterium(1 clones)	246	236	266

表 5-30 对应每个 TRF 峰的每个粪便样品的峰面积

粪样品	平均峰面积								
	<i>L. acidophilus</i> TRF 峰			<i>L. Johnsonii</i> TRF 峰			<i>R. flavefaciens</i> TRF 峰		
	<i>Msp</i> 141	<i>Dpn</i> 156	<i>Hae</i> 207	<i>Msp</i> 149	<i>Dpn</i> 287	<i>Hae</i> 293	<i>Msp</i> 243	<i>Dpn</i> 233	<i>Hae</i> 264
YR 0%	0.1(0.0)	0.0(0.0)	0.4(0.4)	1.8(1.0)	2.1(0.4)	3.0(0.4)	5.1(1.5)	4.3(0.7)	4.4(1.4)
YR 2%	9.5(1.2)	9.7(4.1)	6.1(2.6)	6.2(1.9)	6.7(0.1)	6.4(0.3)	1.8(0.9)	2.9(0.9)	2.9(1.0)
YR 4%	13.5(3.3)	15.3(1)	15.2(10.8)	1.8(0.8)	3.2(0.6)	2.5(0.3)	0.5(0.2)	1.2(0.1)	0.8(0.4)
YR 0%	0.0(0.0)	0.0(0.0)	0.2(0.2)	0.9(0.1)	1.7(0.4)	2.0(0.7)	4.3(0.4)	7.2(0.4)	9.6(0.4)
YR 2%	4.6(1.3)	8.5(3.9)	6.1(1.3)	1.1(0.2)	2.2(0.4)	1.9(0.5)	3.4(0.4)	6.1(0.7)	6.5(1.7)
YR 4%	8.7(4.1)	11.6(1)	9.6(2.7)	0.3(0.01)	1.9(1.8)	0.5(0.2)	3.6(2.1)	7.1(1.0)	7.0(0.5)

Kaplin 等对喂食 NCFM 的鼠样品在去除 NCFM 专一峰后进行分析, 这是为了防止仅以主要 NCFM 峰为基础的主要成分分析 (PCA), PCA 是每一个主成分表现的总和, 即描述的是每一样品主成分差异集合。这允许对这些可变因素聚焦, 即对样品间主成分差异部分进行分析。大的 TRF 峰和相关主要微生物数量所表现的 TRF 长度相对应。第一主成分 (PC₁) 能以鼠的年龄为基础分辨样品 (图 5-14), 第二个主成分 (PC₂) 能通过 NCFM 的量 (0%对 2%和 4%) 分辨样品, 这表明依赖鼠的年龄和膳食其粪便中许多菌的数量存在差异。对于每一个样品 TRF 从三个酶消化得到的数据被应用于寻找和预测基线 TRF 相匹配部分长度, 从染色体基线项目 (RDP) 7.1 中获得的 16S rDNA 序列被应用于创造一个含有 6358

个微生物的 TRF 峰的基线。为了确认在样品中的微生物，每种微生物和来自三种不同酶消化的 TRF 峰进行比较，通常被观察的 TRF 长度间存在不同，这可通过序列分析预测。为了对误差进行补偿，观测的 TRF 允许在预测 TRF 长度的 +1 至 -4 之间。具有大小一致 TRF 峰有助于确认随鼠年龄变化的细菌种类。而粪 TRF 峰很明显适用这种标准，因此对其进行了更进一步研究，以 TRF 峰和其匹配的基础数据来命名菌，现已可以用两个 TRF 峰来表示不同的菌变化动力学。

在年幼的鼠中 *L. Johnsonii* 的峰面积 (1.8% ~ 6.7%) 远较年长鼠 (0.3% ~ 2.2%) 大，随着鼠年龄增长 NCFM 峰面积也呈类似的变化。对于 7 周鼠 *R. flavefacien* 在对照组中约占总峰面积的 5%，而 NCFM 喂食组则其占总峰面积的 1.7%；对于 16 周鼠其峰面积对于 NCFM 和对照组分别上升为 6% 和 7%。和 *L. Johnsonii* 相反，*R. flavefacien* 受早期阶段 NCFM 存在的影响，但当 NCFM 存在时后期阶段与其对照组相类似，这可能因为 NCFM 改变了盲肠环境导致在年幼鼠中 *R. flavefacien* 受到抑制，在年长鼠中 *R. flavefacien* 的上升，说明这种抑制的暂时性，这种抑制作用的减弱可能是因为 NCFM 量的减少而引起。喂食 NCFM 菌会导致粪便中 β -葡萄糖苷酶活性下降，我们有理由相信能够产 β -葡萄糖苷酶的菌对应的 TRF 峰面积也会因 NCFM 存在而改变，如 *Ruminococcus* 类菌。

TRF 模型是监测益生菌对微生物菌群结构影响的有效工具，TRF 模型分析有能力清楚测定由于益生菌引入而导致的菌群结构变化情况，这种方法可推广到 NCFM 以外其他益生菌影响菌群结构的监测。

第五节 *L. acidophilus* 和乳糖不耐症

一、*L. acidophilus* 的乳糖酶活性

许多人消化乳糖的能力不足，是由于肠道中乳糖酶的活性不足，这一问题在亚洲和非洲人群中普遍存在，欧美人群中也有相当的比例，这种现象称为乳糖不耐症。在小肠没有被消化的乳糖进入结肠，结肠中的微生物将其分解为乳酸、气体和其他物质，这导致正常渗透压平衡度被改变和液体积聚 (Kleyn 等, 1972)，进而引进腹胀、痉挛和腹泻，故使许多人不能摄入乳制品，从而切断了重要的营养素如优质蛋白和钙的来源。

消除乳糖不耐症的方法之一就是减少乳中乳糖含量，其方法有三种，即在冷藏情况下于乳中加入乳糖酶 12~18 小时，或以乳糖酶作用的最适温度下酸解一定时间，第三种食用乳糖已部分水解的酸奶及基本不含乳糖的奶酪。含 *L. acidophilus* 的乳能改善乳糖的利用，这源于 *L. acidophilus* 具有产乳糖酶活性。

Nielsen 等 (1992) 研究了三株 *L. acidophilus* NCFM、LA1 和 RAM-1 的产乳糖酶活性，前两株由人体粪便分离，后一种分离于商品化非发酵 *L. acidophilus* 乳。

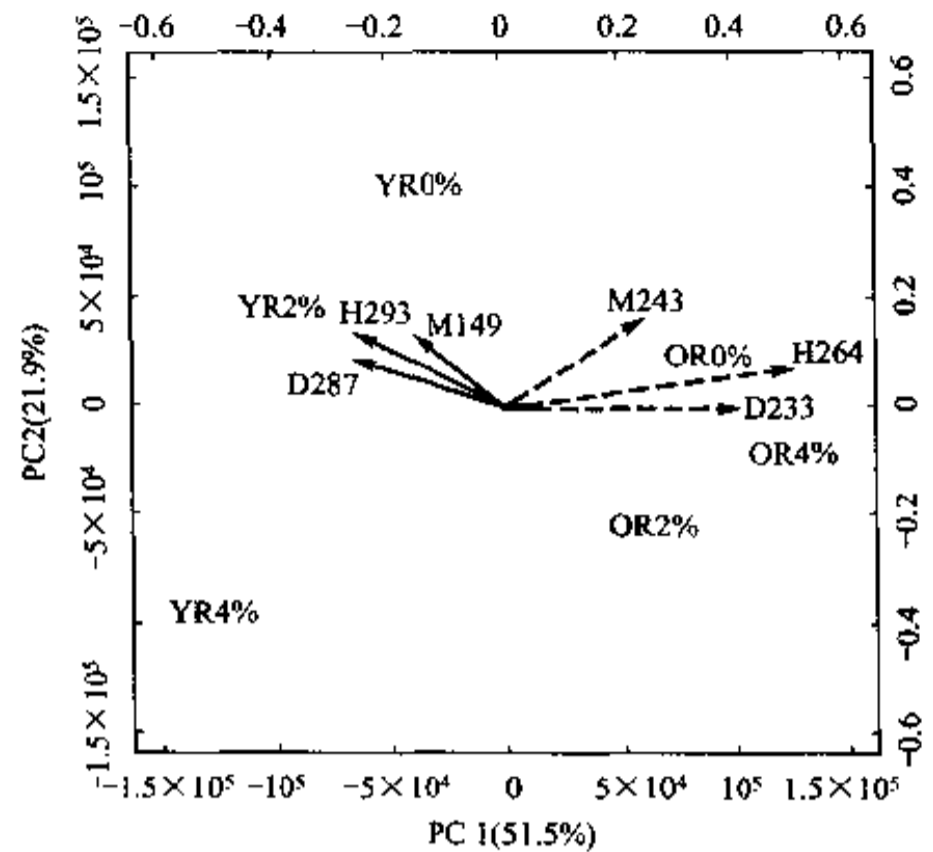


图 5-14 对每一样品的三个结合 TRF 模型的 PCA

(一) *L. acidophilus* 中乳糖酶存在情况

(1) 应用 ONPG 作底物进行的酶实验表明：在所有三株菌中均有 β -半乳糖苷酶。应用 ONPG-6-P 作底物经一小时的培养后其测定数量没有变化，说明培养物中不存在 β -半乳糖苷酶的活性。

和粗糙酶比较链霉素硫酸盐沉淀使酶活性增加（见表 5-31），由硫酸铵沉淀获得酶活性的增加是十分有限的，但在每一种纯化程序后活性总量均急剧下降。通过 DEAE Sephadex 和 Sephadex 200 分离获得的酶活性大大增强了。

表 5-31 从 *L. acidophilus* NCFM 获得的 β -半乳糖苷酶的纯化数据

组 分	体积/ml	总蛋白/mg	总单位活性	含量/%	比活性/(U/mg)	纯度
粗提液	92	488	156	100	0.32	1.0
上清液	97	273	156	100	0.57	1.8
硫酸铵沉淀物	8.7	134	87	56	0.65	2.0
DEAE Sephadex	5	19.7	53	34	2.7	8.4
Sephadex G200	15	9	29	19	3.2	10.0

从 *L. acidophilus* NCFM 中得到的 β -半乳糖苷酶的分子量，通过凝胶柱层析和 5 个大分子量蛋白比较，测得为 570000Da（见图 5-15）。

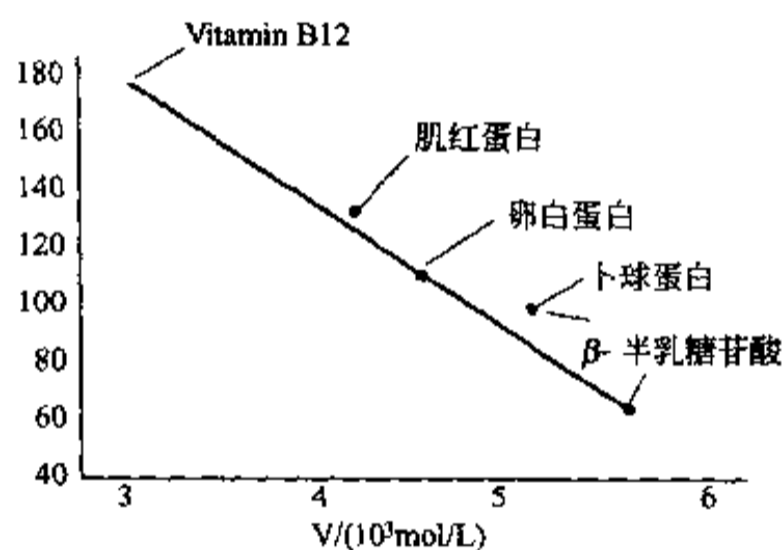


图 5-15 凝胶柱层析测得 β -半乳糖苷酶的分子量

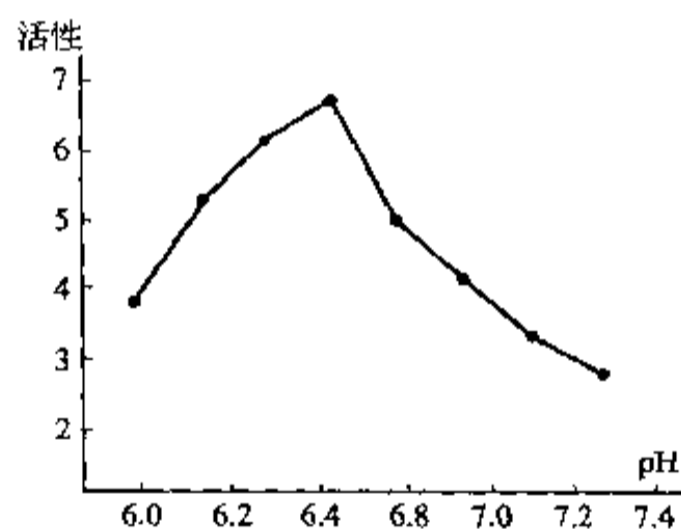


图 5-16 pH 对 β -半乳糖苷酶活性的影响（5 组平均值）

β -半乳糖苷酶活性受 pH 影响的情况如图 5-16 所示，该酶在 pH = 6.6 时有较高的活性。

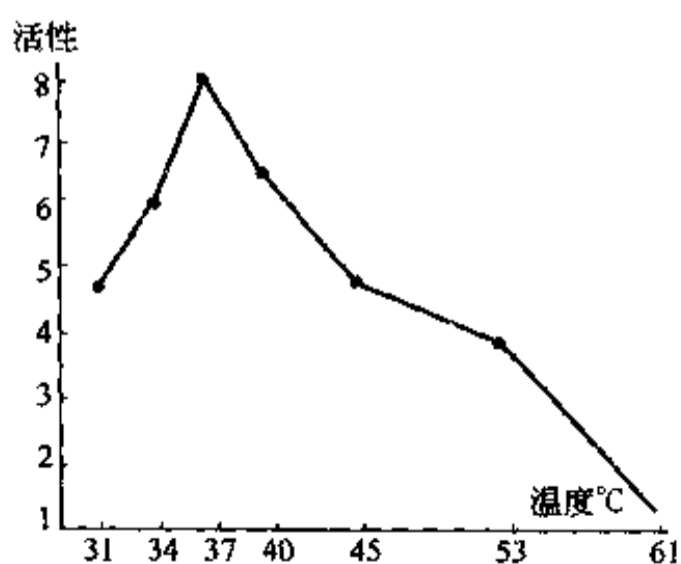


图 5-17 温度对 β -半乳糖苷酶活性的影响（5 组数据平均值）

β -半乳糖苷酶活性受温度影响如图 5-17 所示；酶在 37℃ 时活性最高，在低于 37℃ 或高于 40℃ 时酶活性均明显降低，在 66℃ 时酶几乎失活，表明酶在该温度下不稳定，呈变性状态。

L. acidophilus NCFM 在含单一糖的液态中， β -半乳糖苷酶活性的变化如表 5-32。虽然乳糖和半乳糖能诱导较高的酶活性，但以半乳糖诱导酶的活性最高，葡萄糖没有乳糖的诱导效应。

图 5-18 为 β -半乳糖苷酶的反应动力学曲线，由此计算的 $K_m = 2.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $V_{max} = 1.3 \times 10^{-2} \text{ mmol/mg 蛋白质} \cdot \text{min}$ 。当 β -半乳糖苷酶对高浓度的 EDTA

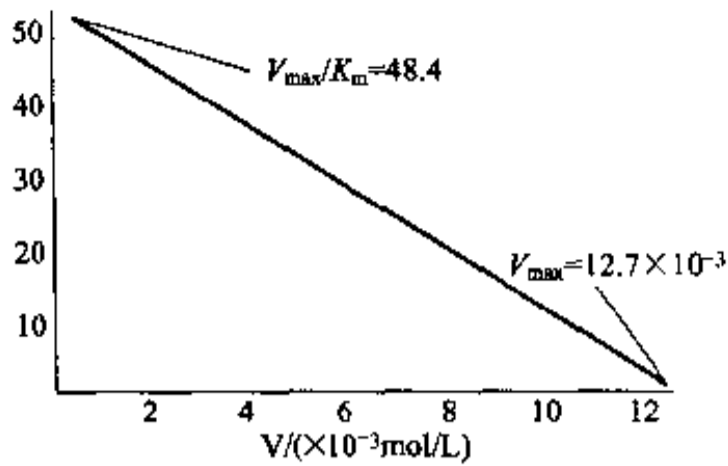


图 5-18 底物浓度对速度的影响曲线
(β -半乳糖苷酶)



图 5-19 贮存温度对 β -半乳糖
苷酶活性的影响

($1.3 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 渗析后, 无法测到酶的活性; 对 0.05 mg/ml 的 EDTA 渗析后酶活性下降约 60%, 但对低浓度的 EDTA ($1.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 渗析影响较小。

在 5°C 贮存 4 天 β -半乳糖苷酶活性基本没有变化 (见图 5-19)。活性在第 6 天无明显下降 ($P < 0.05$), 12 天以后 β -半乳糖苷酶活性仍保持 50% 以上。

三种 *L. acidophilus* 的培养物上清液中, β -半乳糖苷酶活性如表 5-33 所示。*L. acidophilus* RAM-1 具有高于 *L. acidophilus* LA-1 或 *L. acidophilus* NCFM 的产酶活性 ($P < 0.05$), LA-1 和 NCFM 的产 β -半乳糖苷酶活性相当。

表 5-32 含单一糖源的培养基对 NCFM 产生
 β -半乳糖苷酶活性的影响

糖类	比活性 ^①
葡萄糖	0.00 ^②
半乳糖	1.59 ^②
乳糖	1.16 ^②

① α -硝基酚- β -D-半乳糖-吡啶每 mg 蛋白质每分钟的水解量 (ONPG); ② $P < 0.05$ 。

表 5-33 三株 *L. acidophilus* 产 β -半乳
糖苷酶活性比较

菌株	活性 ^①
<i>L. acidophilus</i> LA-1	1.17 ^②
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1.16 ^②
<i>L. acidophilus</i> RAM-1	1.86 ^②

① 水解 ONPG 的量/(mg 蛋白质·分); ② RAM-1 的活性高于 LA-1 和 NCFM。

(二) 喂食乳制品鼠胃肠道乳糖酶活性变化

含各类活菌的乳制品具有改善乳糖不耐症的作用, Kolars 等 (1984) 和 Gilliland 等 (1984) 证实酸奶是很好的外源性乳糖酶的来源, 它可以帮助乳糖不耐症患者消化乳糖, 从而达到缓解乳糖不耐症的效果。不同乳制品改善乳糖不耐症的效率取决于总的微生物乳糖酶活性, 且和肠胃乳糖酶活性的保留密切相关; Rao 等 (1991) 对乳糖酶在鼠胃肠道变化的情况进行了研究, 这也从一个侧面反映了乳糖酶在人胃肠道的变化情况。

Rao 等 (1991) 将喂养不同乳制品得到的鼠增重情况如表 5-34 所示, 在喂养乳制品的量和营养素上存在明显性差异, 鼠摄入的营养素情况如表 5-35 所示。

差异化分析表明, 膳食的种类、喂食的时间间隔等均影响乳糖酶活性。在胃中随着时间推移, 膳食会增加乳糖酶活性, 但膳食不同引起乳糖酶活性的显著差异。小肠中乳糖酶活性和膳食间存在密切关系, 切片/膳食/时间三者相互作用表明在小肠内不同膳食对乳糖酶活性的影响不同。在盲肠所有喂养组乳糖酶的活性上升, 即在盲肠膳食喂养对乳糖酶活性的影响是不显著的。在结肠虽然酸奶组表现出最高的乳糖酶活性, 但因膳食喂养时间不同引起的乳糖酶活性变化是不明显的。乳糖酶活性/ mg 干物质的计算方式不影响乳糖酶活性的变化趋势。

表 5-34 鼠的喂食和重量变化^① (g/鼠/天)

喂食间隔 (天)	日产品消费			Chow 摄入			重 量			
	酸奶 组	全脂 奶组	甜 <i>L. acidophilus</i> 组	酸奶 组	全脂 奶组	甜 <i>L. acidophilus</i> 组	酸奶 组	全脂 奶组	甜 <i>L. acidophilus</i> 组	水组
3	32.3	50.4	59.0	6.1	6.4	6.5	11.1	6.6	5.1	7.9
6	51.2	49.6	50.4	7.5	8.2	7.9	6.2	6.2	4.3	8.4
9	53.6	52.5	53.8	7.3	7.4	7.6	6.9	5.5	4.8	8.4
12	58.7	48.5	55.6	7.9	7.7	7.6	6.5	5.3	5.3	7.5
15	60.9	48.8	63.7	8.2	7.2	7.6	6.9	6.7	5.9	6.4
18	60.4	52.8	58.8	7.4	7.0	7.3	5.3	5.4	5.2	5.7
X	52.9	50.4	56.9	7.4	7.3	7.4	7.2	6.0	5.1	7.4
Sx(pooled)	54			7.2			46			

① 三个鼠的三天平均值。

表 5-35 鼠平均从乳制品中获得的营养素摄入^① (单位: 鼠/天)

营养素	酸奶	全奶	甜 <i>L. acidophilus</i> 奶	营养素	酸奶	全奶	甜 <i>L. acidophilus</i> 奶
蛋白质/g	2.30	1.76	2.00	碳水化合物/g ^②	3.68	2.42	2.75
脂肪/g	0.92	1.76	1.00	钙/mg	82.20	51.40	64.40
能量/kJ	135.56	138.07	117.99				

① 计算值；

② 乳糖含量所有产品相同，含量 4.7%，约 2.5g 乳糖/鼠/天。

二、各类乳制品对乳糖不耐症的改善

Donna 等 (1981) 以通过测定氢呼出时间，研究了 4 类乳制品对乳糖不耐症的影响 (见图 5-20)。

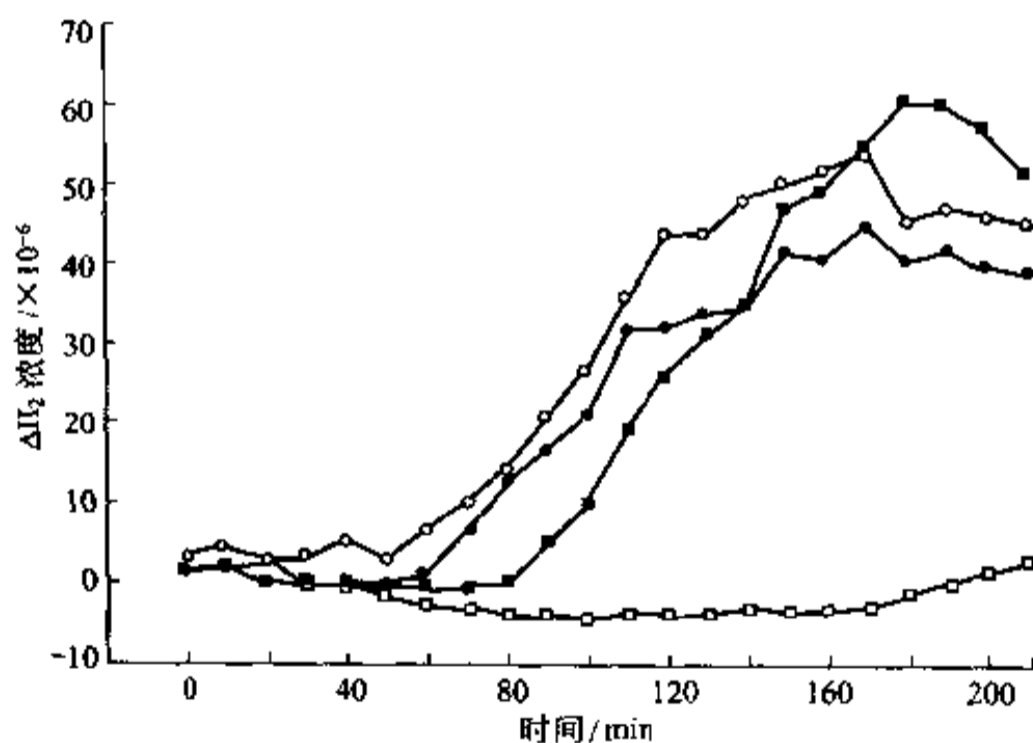


图 5-20 饮用乳制品的平均呼吸氢对时间曲线

●—*L. acidophilus* 乳；■—普通乳；□—乳糖酶处理乳；○—*L. acidophilus* (第八天)

结果表明乳糖酶处理乳对乳糖不耐症病人有明显效果，普通奶组和 *L. acidophilus* 乳组均有相当严重的乳糖不耐症状。

Albert 等 (1983) 进行了过敏性肠道综合症和乳糖酶缺乏患者食用非发酵 *L. acidophilus* 情况的研究，研究表明在 4℃ 贮存一周 *L. acidophilus* 乳变化很小，它和常乳间几乎无法分辨。健康人群能够饮用 *L. acidophilus* 乳而无任何异常症状，当然应用常乳就更无任何问题了；患过敏性肠道综合症但乳糖酶充足的患者，通过氢呼吸实验证实其症状不

能缓解或加重，这是每天食用含 *L. acidophilus* 30 亿/ml 的乳 720ml 得到的实验结果；乳糖不耐症患者对 *L. acidophilus* 乳表现出同常乳一样的不耐受结果。但如果大剂量的摄入 *L. acidophilus*，摄入时间 2 周以上或摄入不同菌株的 *L. acidophilus* 将对乳糖不耐症产生一定的缓解。对于乳糖酶缺乏患者合理摄入 *L. acidophilus* 乳将有助于小肠腔内乳糖酶活性的提高，Goodenough 和 Kley 报道鼠摄入酸奶，发酵剂的菌体在小肠内存留 3 小时以上，小肠内乳糖酶的活性增加，乳糖水解变得更容易。Gallagher 等研究表明乳糖酶缺乏患者能够更好地耐受含有和常乳相同数量乳糖的酸奶，这源于酸奶微生物具有乳糖酶活性。Nichol 等让 6 个乳糖不耐症患者每天按 5mg/kg 摄入含 $(2\sim4)\times 10^8$ *L. acidophilus*/ml 的乳，6 天观察发现 *L. acidophilus* 不能促进乳糖水解，乳糖不耐受症状和常乳相同；但 Gilliland 和 Kim 让患者摄含 *L. acidophilus* 量是前面实验 100 倍的 *L. acidophilus* 乳，发现食用该乳的患者呼吸氢的量有明显减少，表现 *L. acidophilus* 乳较常乳有更强的乳糖水解能力。上述许多研究的结果有的不充分，甚至相互矛盾，我们认为有两个基本点可以确认，*L. acidophilus* 的不同菌株具有不同的产乳糖酶活性，如 *L. acidophilus* NCFM 具有较高产乳糖酶活性；*L. acidophilus* 在乳中的含量对是否缓解乳糖不耐受症状具有关键性作用，或 *L. acidophilus* 的含量低于某一临界值，其产生的乳糖酶活性极低，临床表明为 *L. acidophilus* 乳不具缓解乳糖不耐受的作用。

目前尚无食用 *L. acidophilus* 乳产生不良反应的报道，仅有的不良反应是轻微的腹泻，及发现一个短肠综合症患者的 D-乳酸中毒；*L. acidophilus* 能够产生 L-乳糖和 D-乳糖，L-乳糖能够在人体代谢，D-乳酸不能代谢产生积累，导致神经中毒症状。这种情况可通过间歇性食用 *L. acidophilus* 乳来加以控制。

Dennis 等也进行和 Donna 等相类似的实验，他们分别进行了酸奶、杀菌奶、甜 *L. acidophilus* 乳和发酵乳对乳糖不耐受的影响实验，其结果如图 5-21 所示。研究结果显示在食用 3~6 小时出现呼吸氢的峰值，甜 *L. acidophilus* 乳表现出较高的呼吸氢的峰值，酸奶的呼吸氢仅为 14×10^{-6} 。所有患者食用产品 8 小时以后即恢复为正常量。他们分别对产品中乳糖酶的活性进行了测定，其情况如表 5-36 所示，产品中乳糖含量相似，杀菌酸奶菌体细胞较酸奶减少 100 倍，乳糖酶活性下降 10 倍；结果证实未杀菌酸奶改善了乳糖不耐受患者的症状；这源于酸奶本身的乳糖酶活性；杀菌酸奶对乳糖酶活性造成破坏，故其和未杀菌酸奶比较乳糖不耐受症状增加，甜 *L. acidophilus* 乳和发酵乳不改善患者的乳糖不耐受情况。

Frank 等的研究证实酸奶具有缓解乳糖不耐症作用，但他们发现一个奇特现象是甜 *L. acidophilus* 乳含有高的乳糖酶活性，但不具有改善患者乳糖不耐症状作用，据此他们推断由于甜 *L. acidophilus* 乳含有细胞内乳糖酶，这种类型的乳糖酶在消化过程中不能被人体利用，故不能达到缓解乳糖不耐症的作用。但 Lin 等和 Montes 等研究分别证实含 *L. acidophilus* 乳具有缓解乳糖不耐症的作用，因此具有产乳糖酶的活性。

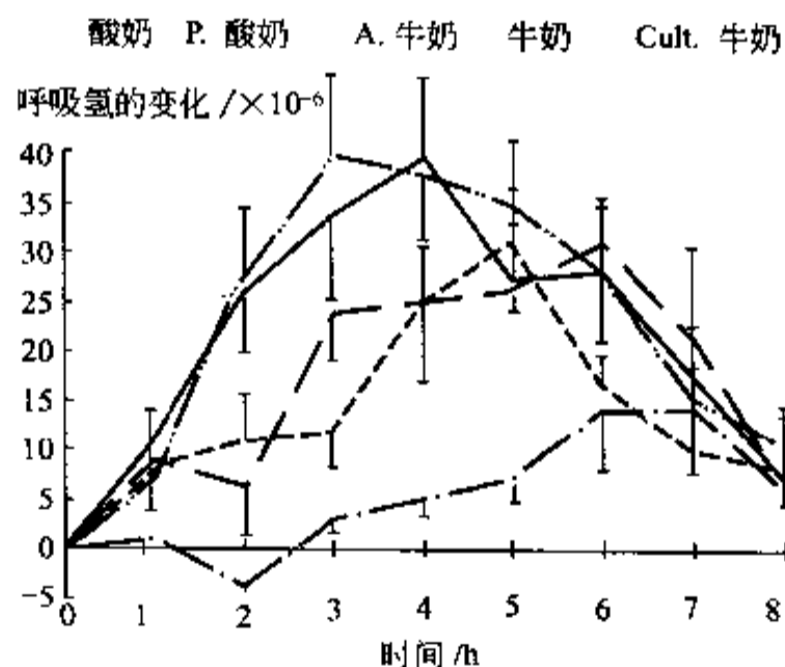


图 5-21 食用产品后呼吸氢的变化
(每餐乳糖 20g, 为 9 个乳糖酶患者平均值)

表 5-36 实验产品得基本数据

乳产品	乳糖 /%	菌数/g 产品	乳糖酶活性产品 $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	乳产品	乳糖 /%	菌数/g 产品	乳糖酶活性产品 $\text{mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
酸奶	4.0	3.0×10^8	0.64	甜 <i>L. acidophilus</i> 乳	4.8	1.1×10^7	0
杀菌酸奶	4.0	3.4×10^6	0.07	杀菌乳	4.9		0
发酵乳	4.3	2.8×10^6	0.02				

根据以上的研究成果，可以得出以下结论。

(1) *L. acidophilus* 具有产乳糖酶的活性，不同菌株的 *L. acidophilus* 产乳糖酶的活性不同。

(2) 不同的甜 *L. acidophilus* 乳，有的实验表明具有改善乳糖不耐症的作用，有的则无任何效果。这关键取决于以下因素：*L. acidophilus* 菌株类型，是否是产高活性的菌株类型；同时也取决于它产生的乳糖酶是胞外酶还是胞内酶，有的学者认为胞内酶不能被人体利用，故不具乳糖不耐症改善效果。除 *L. acidophilus* 的类型外，*L. acidophilus* 的含量对是否改善乳糖不耐症也具有重要作用，若 *L. acidophilus* 低于某一临界值，其产生的乳糖酶活性低，就不能达到改善乳糖不耐症作用，如杀菌的 *L. acidophilus* 产品和含活菌较少的 *L. acidophilus* 产品。

第六节 *L. acidophilus* 的益生作用

一、*L. acidophilus* 对肾病患者治疗作用

对于晚期肾病患者常见的症状之一就是小肠内微生物的过度生长（简称 SBBO），当肾功能降低至 20%，发生上述情况，并随着肾功能的进一步下降而情况变得愈坏；当肾功能仅为约 5% 的情况时，患者开始透析以去除代谢毒素等，这时 SBBO 情况形成且不能通过简单透析的方法实现可逆变化。

Dunn 等（1998）对 19 个慢性肾衰竭（CRF）透析患者进行了研究，在口服 *L. acidophilus* 胶囊（LBA）67 天以后，血清二甲胺（DMA）平均下降 42%；在对照组平均下降了 13%，在实验前后血清 DMA 值有明显下降（ 282 ± 92 对 $163 \pm 82 \mu\text{gdl}^{-1}$ ），对照组在实验过程中没有显著性差异（ 242 ± 55 对 $266 \pm 49 \mu\text{gdl}^{-1}$ ），具体情况如图 5-22 所示。

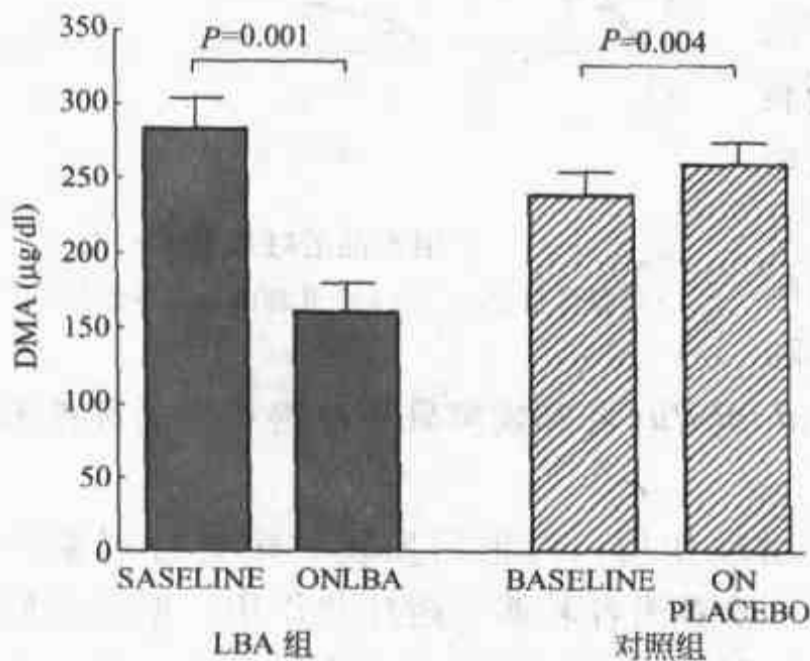


图 5-22 血清 DMA 水平测定

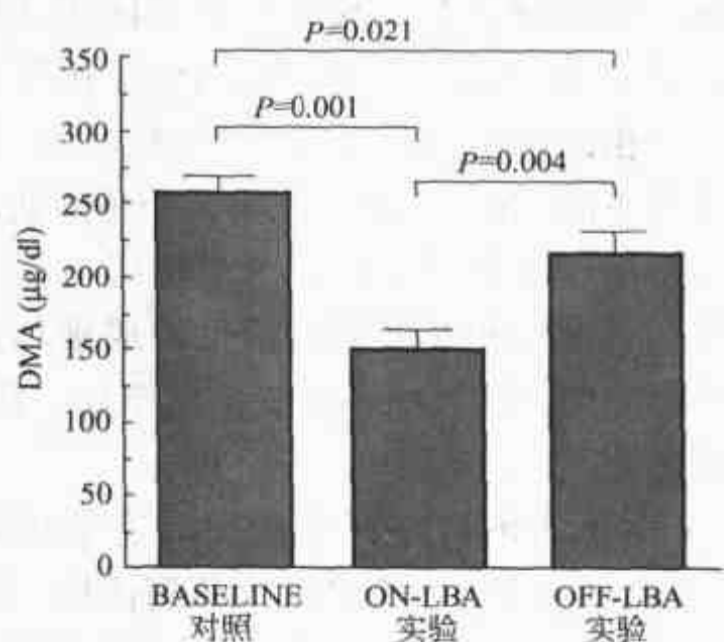


图 5-23 间断服用 LBA 对血清 DMA 的影响

为了测试血液胺水平的恢复情况，Dunn 等对 19 个患者中的 15 个进行了间断性 LBA 的

口服实验，差异性分析表明平均血清中 DMA 的水平在三个阶段有重要不同，其极限是 $257 \pm 45 \mu\text{g dl}^{-1}$ ，口服 LBA 后为 $150 \pm 49 \mu\text{g dl}^{-1}$ ，停止服用后 $214 \pm 72 \mu\text{g dl}^{-1}$ （见图 5-23）。在 15 个人中 7 人被认为允许饮用酒精以抑制消化道产生的硝基二甲胺 (NDMA) 被去除，保证血清中 5 分钟内可测到的 NDMA 的存在。在血液中挥发性亚硝基胺仅以 NDMA 形式存在，LBA 食用组饮酒后 NCMA 的水平平均下降 4%，其基线较 LBA 摄入后高 (236 ± 69 对 $118 \pm 38 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)，其具体情况见图 5-24。

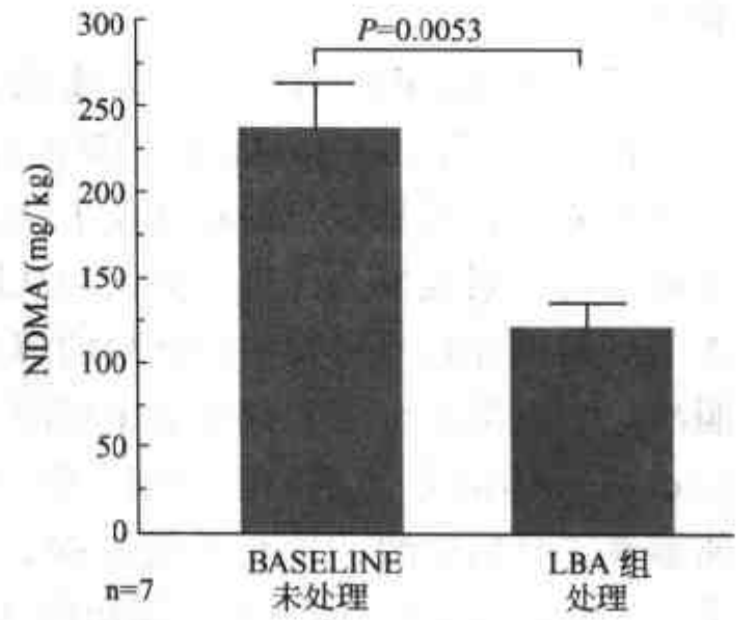


图 5-24 血清 NDMA 水平测定

19 个患者中 13 人摄入 *L. acidophilus* NCFM™，6 人摄入 *L. acidophilus* BG2F04。当比较服用 *L. acidophilus* 前后 DMA 的变化时发现显著性差异，NCFM 组 DMA 水平平均下降 40%，BG2F04 组下降 50%；间歇服用 *L. acidophilus* 的实验表明：停药 NCFM 后 DMA 恢复为基线 $94\% \pm 26\%$ ，而 BG2F04 组仅恢复至 $67\% \pm 14\%$ 的水平（见图 5-25）。

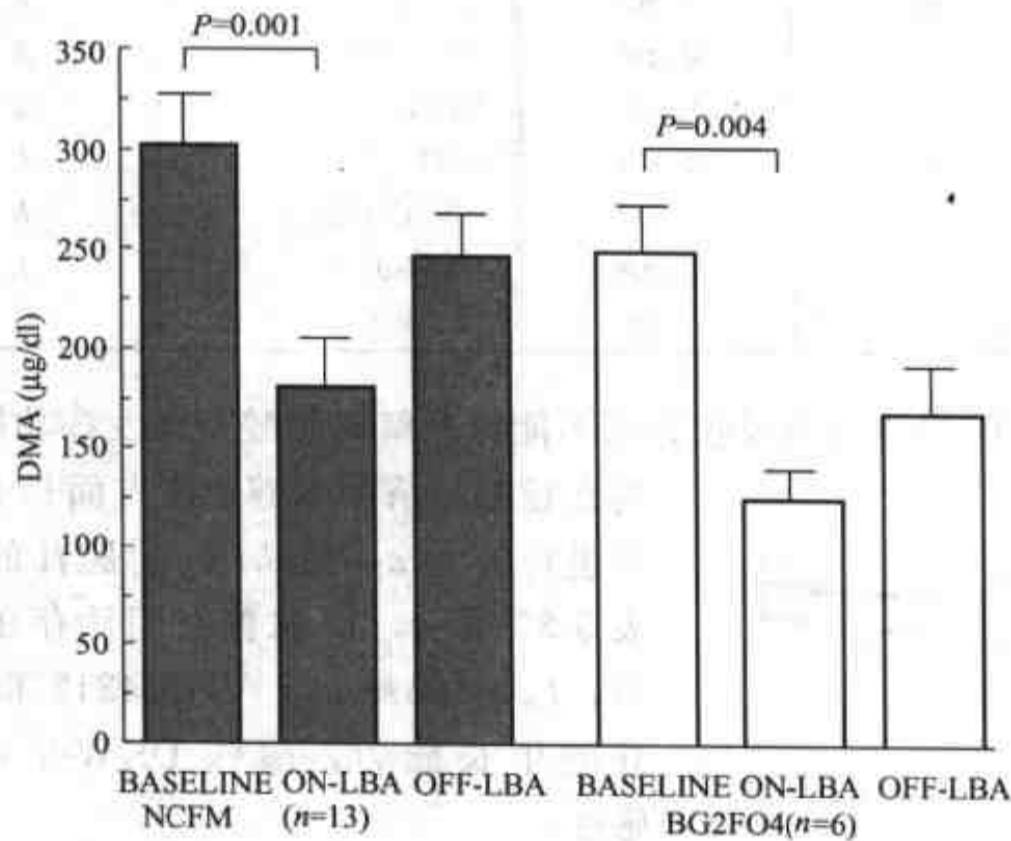


图 5-25 两种 *L. acidophilus* 菌对 DMA 水平影响比较

随着血清胺水平的下降患者的尿毒症得以缓解，Dunn 等自 1993 年始收集的 143 个不同稳定透析患者的情况，发现在每周 3 次透析后 DMA 的水平一般比健康人群高 5~10 倍，即透析方法仍不能完全解决血清中 DMA 过高的问题。肾病患者的小肠微生物过度生长问题的原因目前尚不清楚，许多学者认为免疫系统效率下降是过度生长的部分原因；另外有学者认为毒素产生和滞留干扰了健康肠道的功能，故导致肠道内微生物的过度繁殖。对于肾衰竭病人有三种方法治疗：①口服非吸收性抗生素；②换肾；③透析。研究表明抗生素能减少 DMA 和 NDMA，且短期内改善肠道微生态；此外通过在小肠内引进竞争性益生菌和 *L. acidophilus* 导致产胺微生物下降，也是治疗肾病患者的有效方法。给患者足够数量的 *L. acidophilus* 活体细胞是疗效的关键，含 *L. acidophilus* 的乳和酸奶均是较好的载体，但由于肾透析患者要求限制流食，故此类患者需食用含有高浓度活体细胞的 *L. acidophilus* 的

胶囊产品 (10^{11} cfu/g)。

二、*L. acidophilus* 对血液胆固醇的影响

许多含有 *L. acidophilus* 的乳制品表现出降低血清胆固醇的作用，在 *L. acidophilus* 生长过程中胆汁和厌氧情况的存在使 *L. acidophilus* 能够吸收胆固醇，这种对胆固醇的吸收作用导致从消化系统摄入的膳食胆固醇从肠道进入血液的量减少，故产生降血脂作用。在正常人体的肝肠循环过程中发生胆汁酸的解离现象，在人体的主要胆汁酸形式是胆酸和鹅（脱氧）胆酸，它们都结合了甘氨酸或牛磺酸，肠道的固有菌具有解离胆汁酸的作用。Aries 等报道 *L. acidophilus* 不能解离胆汁酸，但 Floch 等研究表明人体内一种不能确认的 *L. acidophilus* 能够解离甘氨酸胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、甘氨酸鹅（脱氧）胆酸，Gilliand 等也证实在厌氧条件下，*L. acidophilus* 能解离牛磺胆酸和甘氨酸胆酸。

表 5-37 *L. acidophilus* 对胆汁的耐受性

菌	来源	吸收的变化	菌	来源	吸收的变化
251	猪	0.526	RP42	猪	0.201
ATCC 43121	猪	0.429	NCFM-L	人	0.174
RP43	猪	0.308	5	人	0.172
GP1B	猪	0.303	2	人	0.151
HM2	人	0.292	15	人	0.150
P16	猪	0.247	RP34	猪	0.139
14	人	0.234	14F1	人	0.136
NCFM-F	人	0.217	ATCC 4356	人	0.084
GP4A	猪	0.208	DKW-9	人	0.032
12	人	0.204			

由于解离胆酸在脂肪的溶解吸收方面不能像非解离胆酸一样发挥功能作用，故胆酸的解离在控制血清胆固醇浓度方面是十分重要的。Walker

等进行的 *L. acidophilus* 对胆汁的耐受性实验结果如表 5-37 所示，19 株菌在胆汁存在情况下均有生长能力，*L. acidophilus* ATCC4312 和 251 较其他菌有更好的生长能力，菌株 DKW-9 对胆汁有最强的敏感性。

ATCC4356、ATCC43121 和 NCFM-L 有最快的胆汁酸解离速度，这和每株菌在胆汁中有最快的生长速度是一致的（见图 5-26）。菌株 ATCC 4356 在 36h 的培养中分解胆汁酸的能力为 ATCC43121 和 NCFM-L 的 2 倍，释放出最大量的游离胆汁酸，但 ATCC4356 不像 ATCC43121 一样快地生长，所有三株菌在约 10h 的培养后达到最大的胆汁酸解离，在每个情况下它都和早期静态生长周期相对应。虽然 ATCC43121 较其他菌株生长快和达到更高的细胞密度，但三株菌最终释放的游离胆汁酸量没有大的不同。

有关 *L. acidophilus* 对胆汁酸的解离和胆固醇降

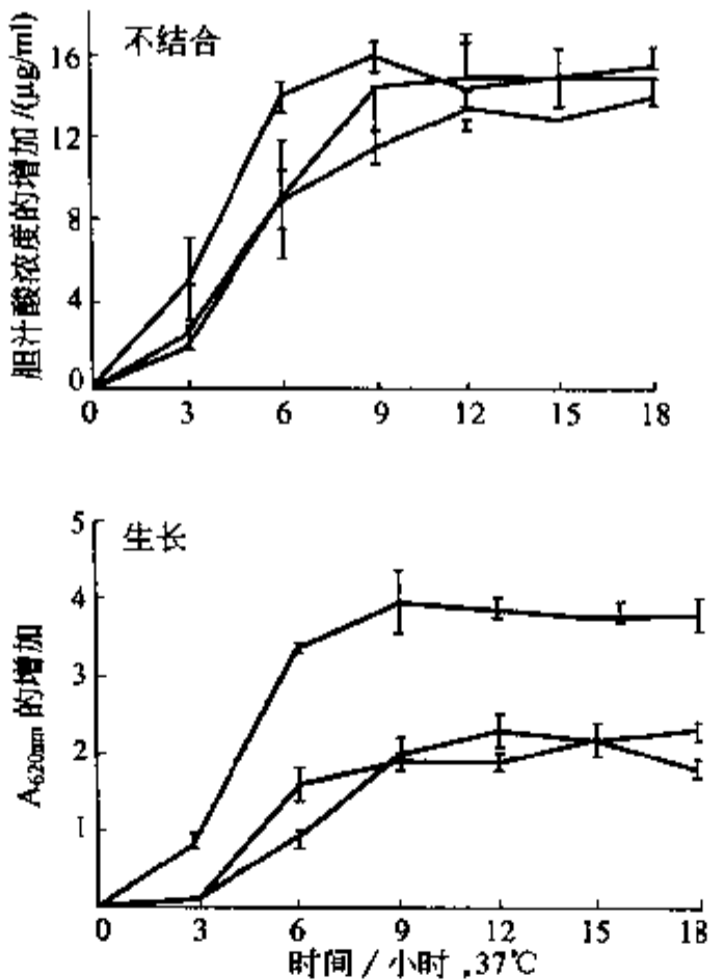


图 5-26 三株 *L. acidophilus* 对牛磺胆酸钠的生长和解离曲线情况

低关系研究如表 5-38 所示, 各种菌解离胆汁酸的能力不同, 且差异较大, 菌株 ATCC43121、DKW-9、251、RP42、GP4A、P16、GP18、RP43、NCFM-L、ATCC4356 和 RP34 较其他菌释放更多的游离胆汁酸, HM₂, NCFM-L、14、15、2、12 和 5f 分解更多的牛磺胆汁酸。在降低胆固醇的能力方面菌株间存在明显差异, 其程度从 ATCC4356 和 14F1 的 0mg/ml 直至 ATCC 43121 的 50mg/ml, 菌株 ATCC 43121、RP34、25 和 RP42 较其他菌有更强的降胆固醇能力, RP43 降胆固醇的能力居中, 有趣的是 ATCC4356、DKW-9、NCFM-L、P1 和 GP1B 不能和其他菌株一样降低更多的胆固醇, 但它们在降低牛磺胆汁酸的能力方面呈最高的活性。统计分析的结果表明在胆汁耐受性和胆固醇降低之间没有显著关系, 同样胆汁酸耐受性和牛磺胆汁酸钠解离间及胆固醇降低和胆汁酸解离间的关系也是如此。

表 5-38 *L. acidophilus* 的胆固醇降低和胆汁酸分解活性比较

菌	胆固醇去除 /(mg/ml)	胆汁酸释放 /(mmol/ml)	菌	胆固醇去除 /(mg/ml)	胆汁酸释放 /(mmol/ml)
ATCC 43121	50.00	4.30	RP34	48.67	3.38
DKW-9	11.67	4.30	HM ₂	4.00	2.97
251	47.33	4.15	NCFM-L	5.33	2.85
RP42	48.00	4.06	14	9.33	2.19
GP4A	10.67	3.93	15	14.67	2.17
P16	5.33	3.89	2	3.33	1.78
GP18	8.00	3.86	12	9.33	1.60
RP43	39.33	3.77	5	7.33	1.40
NCFM-L	6.67	3.69	14F1	0	0.17
ATCC 4356	0	3.59			

综上所述可以看出降低胆固醇能力强的菌株具有较高的胆汁酸解离和耐受活性, 但它们间不存在显著的因果关系。虽然它们间不存在必然的因果关系, 但在选择 *L. acidophilus* 作为膳食补充剂时, 考虑其胆汁耐受性是其能否在肠道定殖的先决条件, 故是十分重要的。在 *L. acidophilus* 的选择时, *L. acidophilus* 的胆汁解离也是十分重要的, 但它需另外的研究进行评估。由于菌株降低胆固醇的能力不同, 故能否降低胆固醇成为 *L. acidophilus* 能否适宜作为益生制剂的重要指标之一。

三、*L. acidophilus* NCFM 对结肠肿瘤的预防作用

结肠癌是某些人群的高发病, 其致病原因复杂多样。Rao 等 (1999) 利用鼠摄入 *L. acidophilus* NCFMTM 进行结肠癌的预防实验, 结果发现喂食 2% 和 4% NCFMTM 菌制剂的鼠在肾、肺、肠和肝等组织器官方面没有任何变化, 即说明摄入含 *L. acidophilus* NCFMTM 产品是安全的。鼠摄入生理盐水或含有 *L. acidophilus* 的制剂, 在结肠均未发现有异常滤泡形成 (ACF), ACF 是结肠肿瘤的代表性数据, 其值愈高, 结肠癌几率愈大。 *L. acidophilus* 摄入对 ACF 的影响如表 5-39 所示, 对照组平均 161ACF/结肠, 摄入 2% 和 4% NCFMTM 后其量分别下降为 114 和 98ACF/结肠, NCFMTM 不仅抑制了结肠中 ACF 的总量, 也抑制了滤泡的多样性和每平方厘米上的 ACF 量; 并且 NCFMTM 对 ACF 的抑制呈剂量依赖性, 2% 的 NCFMTM 对 ACF 抑制率为 29%, 4% NCFMTM 则达到 39% (见图 5-27)。2% 或 4% NCFMTM 大大抑制了每个病原区的异常滤泡量, 对于 2% NCFM 能减少在一个区域产生 4 个或 4 个以上 NCFM 的比例为 38%, 4% NCFM 则能抑制达 45% (见图 5-28)。NCFMTM 对盲肠 β-葡萄糖苷酶活性的抑制如图 5-29 所示, 2% 和 4% NCFMTM 对盲肠中此酶的活性有抑制

作用，抑制强度呈浓度依赖型，即抑制能力和浓度呈正相关。

表 5-39 NCFM™对小鼠 F344 诱导 ACF 形成的影响

实验组	总 ACF/结肠	含 ACF 数				总的 ACF/结肠
		1 个	2 个	3 个	4 个以上	
对照	161±12	23±2.2	47±2.7	51±3.3	40±4.5	476±18
2% NCFM™	114±4.5(29)g	16±8(30)	35±2.8(25)	38±2.8(25)	25±4.1(38)	331±23(30)
4% NCFM™	98±7.1(39)	11±1.4(32)	32±2.4(32)	33±2.5(36)	22±3.0(45)	278±56(42)

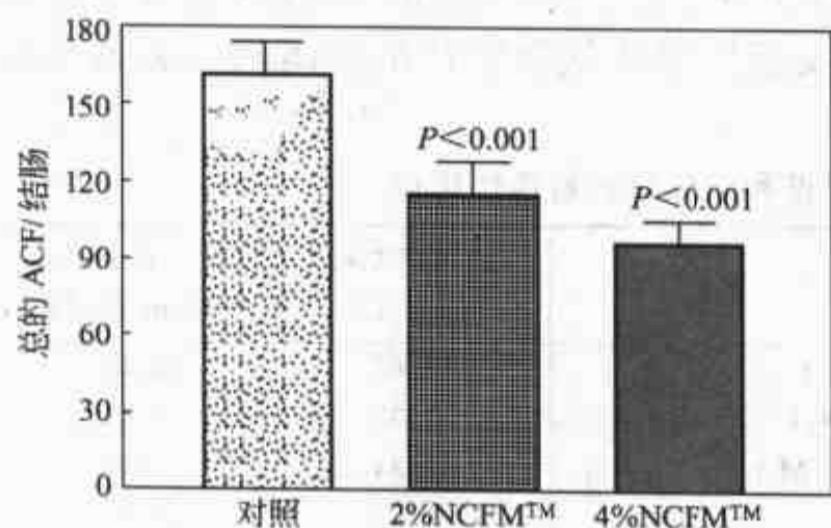


图 5-27 NCFM™对 ACF 总量的影响 (小鼠 F344)

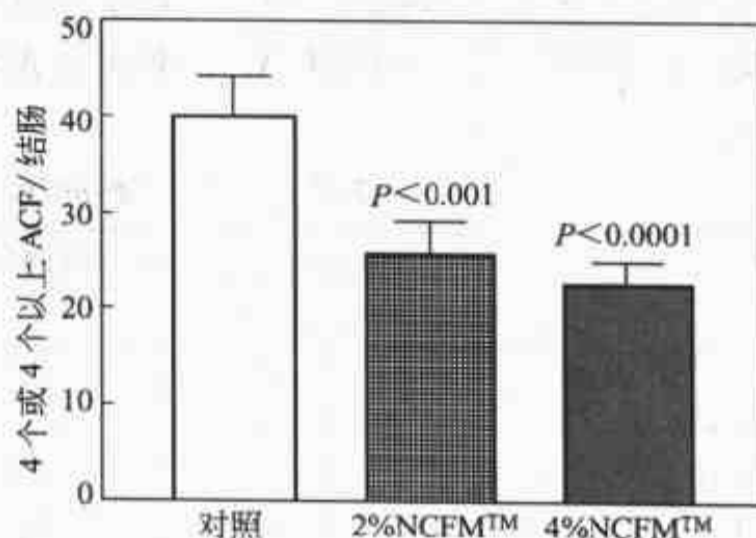


图 5-28 NCFM™对小鼠 F344 4 个或 4 个以上异常滤泡的影响

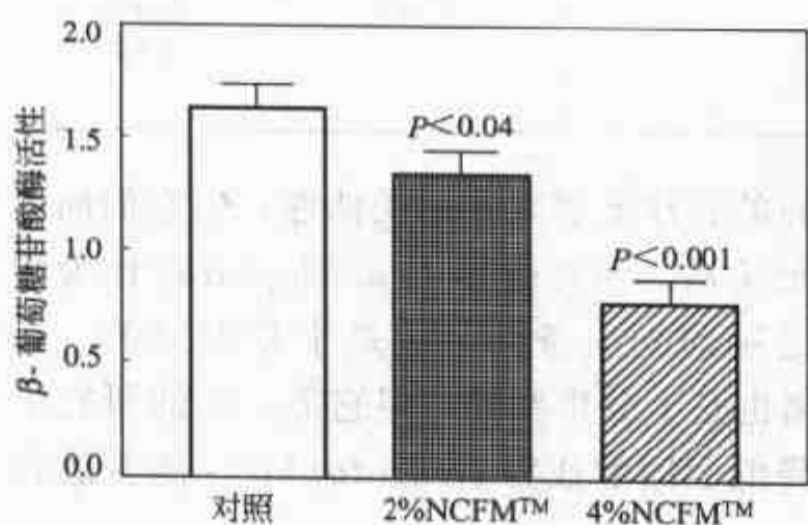


图 5-29 NCFM™对盲肠 β-葡萄糖苷酶活性的影响

NCFM™是一种广泛消费的益生菌，它具有 ACF 抑制作用，但不影响鼠的体重，也不产生中毒和感染症状，证实 NCFM™是一种预防结肠癌的有效菌制剂。但目前尚没有确定益生菌（包括 NCFM™）预防癌症的机理，同样要阐明 NCFM™预防结肠癌的机理也十分困难，可以确切地说益生菌可改变肠道微生物的构成（酶活性）、改变产生肿瘤胆汁水平及对病原菌形成抑制均是其预防癌症的重要原因之一，其他方面 NCFM™（包括其他益生菌）对人体生理相关因素的影响尚需进一步研究和证实。

四、L. acidophilus 在泌尿系统的存活情况

Reid 等 (1987、1995、1999) 和 Bruce (1988) 研究了集中 *L. acidophilus* 对于泌尿系统微生物的影响，表明 *L. acidophilus* 具有减少尿路感染疾病的作用。直接的阴道灌输是将这些微生物引进泌尿系统的一种有效途径，事实上许多妇女应用酸奶作为阴道的灌剂；口服是一种摄入此类菌的方法，经肠道消化后到达阴道和膀胱，*L. acidobacilli* 类菌也可通过此方法摄入。口服 *L. acidophilus* 定殖于阴道的结果最先由 Reid (2000) 证实。

Reid (2000) 的研究表明：*L. acidophilus* NCFM 不产生任何凝血活性（见表 5-40）。通过电子显微镜观测到 *Lactobacilli* 类菌在尿道和阴道的定殖情况，*E. coli* 则大量存在。*L. rhammosus* GR-1 和尿道上皮细胞、阴道上皮细胞有最高的黏附能力（表 5-41），这种微生物能定殖于阴道，故在体外黏附实验中也观察到相同的结果；在尿道上皮细胞上 *L. fermentum*R-14 的黏附能力要高于 *L. acidophilus* NCFM，但对于阴道上皮细胞则后者稍

高于前者。

表 5-40 菌的凝血作用

菌 株	人血液		动物血液			菌 株	人血液		动物血液		
	A	B	O	兔	羊		A	B	O	兔	羊
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	-	-	±	-	-	<i>E. coli</i> Hu 734	4+	4-	4-	2+	-
<i>L. acidophilus</i> NCFM™	-	-	-	-	-	磷酸盐缓冲液	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> RC-14	±	-	±	-	-						

表 5-41 *L. acidophilus* 对尿道上皮细胞和阴道上皮细胞的黏附

菌 株	每 50 个细胞的黏附菌数		菌 株	每 50 个细胞的黏附菌数	
	UEC	VEC		UEC	VEC
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	30.7±13.6	24.1±8.6	<i>L. fermentum</i> RC-14	P=0.002 ^b	P=0.177 ^b
	P<0.0001 ^b	P<0.0001 ^b		25.7±13.4	15.1±6.2
<i>L. acidophilus</i> NCFM™	18.7±9.6	17.4±7.6		0	0

L. acidophilus NCFM 能竞争性地排除尿道感染的三种菌，它通过黏附于尿道上皮细胞达到上述效果，这种能力不强于 *L. rhamnosus* GR-1 和 *L. fermentum* RC-14 (表 5-42)。 *L. acidophilus* NCFM 产生胞外因子，它能很好地抑制 *E. faecalis* 1130 黏附于聚苯乙烯，其能力和 *L. fermentum* RC-14 相近 (减少 90%)。

表 5-42 菌黏附的竞争性排斥 (尿道上皮细胞上)

菌 株	尿道黏附抑制的百分比		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i> AK1
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	48.4	25.9	46.8
<i>L. acidophilus</i> NCFM™	30.3	11.0	39.2
<i>L. fermentum</i> RC-14	44.3	26.6	38.5
磷酸盐缓冲液	0	0	0

L. fermentum RC-14 产生 H₂O₂，*L. acidophilus* NCFM 和 *L. rhamnosus* GR-1 不产生 H₂O₂。琼脂扩散实验表明 *L. rhamnosus* GR-1、*L. fermentum* RC-14 和 *L. acidophilus* NCFM 均对尿道病原菌 *C. coli* Hu 734 形成抑制剂，抑制能力依上述顺序减弱；在 80℃ 加热 2hr *L. acidophilus* 的抑菌性质被破坏，*L. rhamnosus* GR-12 对病原性 *E. coli* Hu 734 抑制依然存在。

上述研究结果表明 *L. acidophilus* NCFM 对于防止尿路感染不是一种非常好的活菌制剂，这个结论是以体外实验预测体内实验结果为基础的；虽然体外实验不能完全预测体内情况，但体外实验的成功是体内有效作用的前提的想法已得到大多数研究者的认同。菌的黏附部分是由于 *L. rhamnosus* GR-1 和 *fermentum* RC-14 等产生的凝血素，凝血素能增加菌对上皮细胞的黏附；其他物质如 Lipoeinchoid 酸和蛋白质 (胶原结合蛋白)。糖基和菌的黏附密切相关。虽然还不能描述出菌黏附的详细情况，但增加益生菌的浓度可导致 *L. acidophilus* NCFM 和其他益生菌的定殖已成定论。

在健康成年女性的阴道微生物主要是 *Lactobacilli*，其他外源性微生物由于和受体的竞争很难定殖；一个具有非正常菌群的女性在其阴道中主要是需氧革兰氏阴性 *coliform* 菌或厌氧革兰氏阴性棒状菌。因此益生 *Lactobacilli* 能够和这些微生物竞争病干扰它们的生长和定殖。竞争性排出尿道和阴道病原菌的能力部分和 *Lactobacilli* 的黏附性相对应，事实上两

株对尿道上皮细胞黏附力最强的菌 *L. rhamnosus* GR-1 和 *L. fermentum* RC-14 能更好地排斥 *E. coli* Hu 734 和 *K. pneumoniae* 以及 *P. aeruginosa*。

五、*L. acidophilus* 对肠道和食物病原菌的抑制作用

L. acidophilus NCFM 对于病原菌 *S. aureus*、*S. typhimurium* 和 *C. perfringens* 具有抑制作用 (表 5-43 所示)。*L. acidophilus* 4962 对 *S. aureus*、*S. typhimurium* 和 *E. coli* 的抑制作用如表 5-44 所示, 它对 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 具有同等程度的抑制作用, 较 *S. aureus* 的抑制作用更强。由 *Lactobacilli* 生长而引起的 pH 下降不足够对上述菌达到如此程度抑制, 故 Gilliland 等 (1984) 通过控制 pH6.5 的方法测定 *L. acidophilus* 4962 对病原菌的抑制情况如表 5-45 所示, 可以看出 *L. acidophilus* 4962 产生的物质对菌的抑制起到最重要的作用, 抑制率达 62.5% 和 61.2%, 同时 pH 的下降也有作用, 对 *S. aureus* B925 和 *E. coli* 0222: B4 抑制率达 98.2% 和 87.0% 就是二者累加作用的结果。

表 5-43 *L. acidophilus* NCFM 对病原菌的抑制

测试菌	样品	病原菌/cfu · g ⁻¹ · ml ⁻¹	抑制/%	pH
<i>S. aureus</i> B925	Control	3.1 × 10 ⁵	96.8	6.2
	<i>L. acidophilus</i>	1.0 × 10 ⁴		5.5
<i>S. typhimurium</i>	Control	3.1 × 10 ⁵	87.4	
	<i>L. acidophilus</i>	4.8 × 10 ⁵		
<i>C. perfringens</i>	Control	1.9 × 10 ⁷	98.1	6.6
	<i>L. acidophilus</i>	3.6 × 10 ⁵		5.4

表 5-44 *L. acidophilus* 4962 对病原菌的抑制

测试菌	样品	病原菌/cfu · g ⁻¹ · ml ⁻¹	抑制/%	pH
<i>S. aureus</i> B925	Control	1.5 × 10 ⁷	98.2	6.4
	<i>L. acidophilus</i>	2.7 × 10 ⁵		5.8
<i>S. typhimurium</i>	Control	1.7 × 10 ⁴	86.5	6.4
	<i>L. acidophilus</i>	2.3 × 10 ⁵		5.8
Enteropathogenic	Control	3.3 × 10 ⁷	87.0	6.2
	<i>L. acidophilus</i>	4.3 × 10 ⁴		5.7

表 5-45 恒定 pH6.5 情况下 *L. acidophilus* 4962 对病原菌的抑制

测试菌	样品	cfu/ml	抑制/%	测试菌	样品	cfu/ml	抑制/%
<i>S. aureus</i> B925	Control	1.2 × 10 ⁷	62.5	Enteropathogenic <i>E. coli</i> 0222: B4	Control	8.5 × 10 ⁸	61.2
	<i>L. acidophilus</i>	4.5 × 10 ⁶			<i>L. acidophilus</i>	2.2 × 10 ⁸	

不同的 *L. acidophilus* 的菌株对病原菌表现出不同的抑制能力, 不同 *L. acidophilus* 菌株产酸和抑制病原菌的能力如表 5-46 所示, 滴定曲线表明 *Lactobacilli* 达对数后期需 6h 左右, 除 *L. acidophilus* HM6 外, *S. aureus* 对 *L. acidophilus* 菌株的抑制敏感性要高于 *S. typhimurium*。

表 5-46 *L. acidophilus* 的产酸和抑菌能力

<i>L. acidophilus</i>	NaOH 的 ml 数	抑制/%		<i>L. acidophilus</i>	NaOH 的 ml 数	抑制/%	
		<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>			<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
4962	3.2	75.8	49.4	HM6	2.9	55.3	55.0
216	3.2	84.7	64.4	HA3	2.3	70.0	61.1
NCFM	3.1	73.7	66.7				

为了测定低氧化还原电位对抑制作用的影响，以刃天青为还原剂对生长介质还原保持低氧化还原电势，菌的抑制效果如表 5-47 所示。*L. acidophilus* NCFM 和 4962 在有无介质还原情况下均抑制病原菌，在两种介质的情况下均 4962 均较 NCFM 有更强的抑制活性；在还原情况下的抑制量少于对照组，但还原情况 NCFM 和 4962 对 *E. coli*0222: B4 仍分别有 62.7% 和 75.5% 的抑制。这种结果表明在菌的培养抑制过程中挥发物暴露于空气可提高抑制能力。

表 5-47 在还原介质中 *L. acidophilus* 的抑菌

介质	样品	cfu/ml	抑制/%	介质	样品	cfu/ml	抑制/%
未还原	Control	1.0×10^8		预还原	Control	1.1×10^8	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	2.4×10^7	76.0		<i>L. acidophilus</i> NCFM	4.1×10^7	62.7
	<i>L. acidophilus</i> 4962	1.7×10^7	83.0		<i>L. acidophilus</i> 4962	2.7×10^7	75.5

将过氧化物酶加入协同培养物减少了三株 *L. acidophilus* 产生抗菌的物质的量（见表 5-48），另外 *S. aureus* 较 *S. typhimurium* 更为敏感，除 *L. acidophilus* 4962 对 *S. typhimurium* 外，所有含过氧化物酶的样品表现出更弱的菌抑制能力，这表明 H_2O_2 部分包括在 *L. acidophilus* 的抑菌体系中。

表 5-48 过氧化物对 *L. acidophilus* 抑菌作用的影响

<i>L. acidophilus</i>	抑制率 ^①			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	Control ^②	Catalase ^③	Control ^②	Catalase ^③
NCFM	73.1	60.3	60.2	48.1
4962	76.2	63.5	57.1	59.3
216	92.3	79.4	75.5	64.4

① 在 37℃ 下 6h 后测定，取两组实验数据的平均值；

② 每 ml 中含有 70 单位的热失活过氧化氢酶；

③ 每 ml 中含有 70 单位的活性过氧化氢酶活性。

综上所述可以看出 *L. acidophilus* 的抑菌体系中包括酸、 H_2O_2 、介质的电极电势，以及现已被证明的 *L. acidophilus* 产生的细菌素。

第七节 用于膳食调节剂的 *Lactobacillus* 菌的选择和制备技术

应用 *L. acidophilus* 等益生菌是为了达到对人体的益生作用，应用的膳食调节剂必须含有足够数量的 *L. acidophilus* 等益生菌的活体细胞。*Lactobacillus* 发酵浓缩物作为保持和利用益生菌的有效形式，已得到世界范围内的认可和承认，但其冷冻或干燥浓缩物在贮存过程中存在着活性损失问题，*Klaenhammer* 对这种情况进行了讨论并提出了很好的解决方案。

一、*Lactobacillus* 发酵剂浓缩物

浓缩发酵剂由单一或混合乳酸菌组成，它是以批次进料形式加工而成，并通过浓缩方式成为较小体积，以冷冻或干燥方式贮存的产品。传统上乳酸菌的浓缩发酵物用作母发酵剂的接种物或用于乳发酵的直投发酵剂。

浓缩发酵剂的培养技术使其能够产生可用于乳制品工业生产的质量稳定且品质优良的发酵剂，但为使其活性损失最小而使分销和贮存的成本高限制了它的广泛应用和可接受性。由于 *Lactobacillus* 在冷冻干燥、喷雾干燥和 -20°C 下贮存带来较大的活性损失，故为了保持其高活性采用液氮或深度冷冻（ $-80 \sim -100^\circ\text{C}$ ）的方法保存浓缩发酵剂。许多研究表明：

Lactobacillus 浓缩物受冷冻或干燥的破坏程度依赖于菌的种类、生长情况、悬浮的溶媒和冷冻贮存温度。在 *Lactobacillus* 发酵剂浓缩物的生产过程中，生长介质和发酵情况要以获得高浓度的菌体细胞为目的，即这些条件必须适于该细胞浓度要求的酶或物理状态，在冷冻或贮存时的稳定性以及关键的生物活性。由于菌的生长较困难，在 *Lactobacillus* 生长的培养基中必须提供不同种类的复合营养。传统上乳被广泛应用作乳酸菌的生长介质，但 *L. acidophilus* 在乳中不能很好地生长，在没有酪蛋白溶解物或水解物的情况下乳基介质中不能获得足够量的 *L. acidophilus* 活体细胞。在批次进料生产中复合营养剂包括 MRS 和 APT 肉汁，含有碳水化合物、胰蛋白胨或肽、酵母浸膏和 Tween 80 的培养基有利于 *L. acidophilus* 和 *L. bulgaricus* 的生长，但生长速度和冷冻细胞稳定性随着生长介质中营养素的有无而有巨大变化。

批次发酵剂生产中的培养基配方设计以生产最大细胞浓度为先决条件。在发酵生长过程中要控制许多其他因素如搅拌、温度、pH 和营养物浓度，pH 的控制是通过中和剂（最典型的是 NaOH 或 NH₄OH）来完成，对于 *Lactobacilli* 为 pH5.5~6.0；在 *L. acidophilus* 浓缩发酵剂的制备时，以在 20% NH₄OH 中应用 20% Na₂CO₃ 作为缓冲中和剂以保持 pH6.0。中和剂的类型和 pH 影响最终的菌体细胞数、菌体活性，多数情况也影响冷冻和贮存稳定性。除了 pH 对生长的影响外，乳酸铵盐的积累和 H₂O₂ 的量也对 *Lactobacilli* 类菌的生长产生较大影响。

在 *L. acidophilus* 浓缩物的生产时，Duggan 等在乳清基介质中繁殖该菌细胞，介质中含有 7% 乳清、2% Nz-胺、0.1% KH₂PO₄ 和 0.5% NaAc；在此介质中 *L. acidophilus* 可达 2.2×10⁹ cfu/ml，浓缩物在 -20℃ 贮存 6 个月呈稳定性。乳基介质中含有 10% 无脂干乳固体、0.1% Tween 80 和 0.1% 酵母浸膏，它用于 *L. acidophilus* NCFM 浓缩物的制备，菌体浓缩物在 -196℃ 下贮存稳定，-20℃ 贮存极易死亡；若介质中无脂干乳固体的量小于 10%，会导致菌体细胞对冷冻的敏感性增强，即使在液氮贮存情况下也容易死亡。

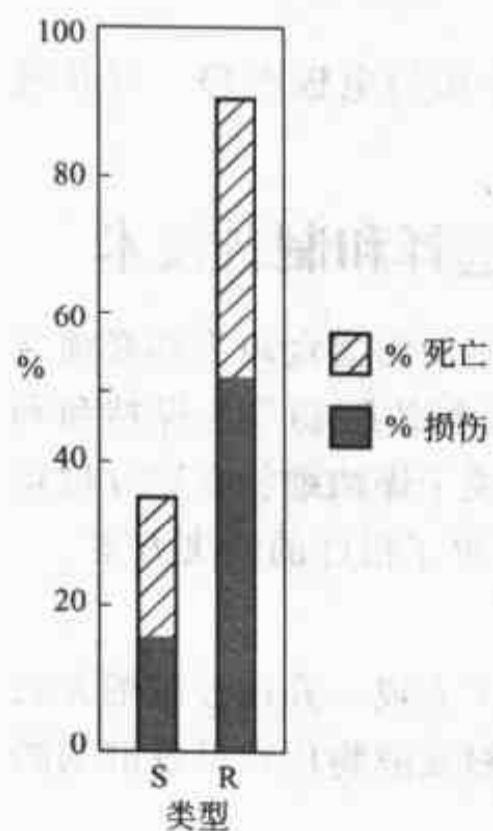


图 5-30 *L. acidophilus* 和 RL8K 浓缩细胞的冷冻干燥过程中的细胞死亡和伤害

对于 *Lactobacilli* 菌的冷冻和干燥破坏情况可归因于菌的自身差异和细胞繁殖方法。不幸的是，由于菌种浓缩物地生长状况不同和菌株组成不同，因此很难简单确定菌种浓缩物的最佳培养条件和保存条件。Gilliland 等指出发酵剂浓缩物的生产方法必须针对专一性微生物考虑其特殊的生长条件。

许多研究者对单一 *L. acidophilus* 生长的最适条件进行了研究，*L. acidophilus* 随着环境变化其生物学形态亦发生变化，如可呈短棒状和长条状等形态。

革兰氏阳性长纤维状菌体形成多发生在介质营养缺乏的情况下，对于 *Lactobacilli* 长纤维状菌是在氧化还原电势、pH、温度等变化，维生素、矿物质和脱氧核糖核酸形成营养限制的情况下生成的。当在固体培养基上生产纤维状菌时，*Lactobacilli* 产生绒毛状不规则菌落，外观粗糙，杆状菌生产时产生光滑菌落。再光滑和粗糙菌落间的生态学过渡是 *Lactobacilli* 菌的特征，反映了在该菌对不同生长环境的适应过程中基因表现型的反应，故在 *Lactobacillus* 发酵浓缩物的制备过程中细胞的菌落形态是生长情况好坏的直观指示和表现。

对于 *L. acidophilus* NCFM 在其 MRS 肉汁中简单添加 CaCl_2 导致其形态由长、厚纤维状向较小、棒状或小链状转化, CaCl_2 的添加有利于 -20°C 时的贮存稳定性, 具体情况如表 5-49 所示, 这种转化形态导致冷冻和贮存稳定性的提高是我们最期望的。在单一的 *L. acidophilus* 发酵物中, 于相同培养基上可同时观察到它的粗糙和光滑菌落; 和环境变化引起的表现型反应不同, 两个细胞类型的存在表明单一细胞对单一环境会有不同反应。在这种环境保持不变的情况下, 评估每个细胞冷冻或干燥稳定性, *L. acidophilus* RL8K 粗糙(纤维状)和光滑(短棒状)分离物对冷冻或干燥的敏感性明显不同, 在 -20°C 35 天的贮存过程中, 粗糙发酵物的可计数细胞下降了 95%, 相反光滑菌落发酵剂仅有较少的活性损失, *L. acidophilus* RL8K 在冷冻干燥过程中的破坏如图 5-30 所示。

表 5-49 在 -20°C 冷冻贮存 *L. acidophilus* 浓缩物的情况

生长介质	死亡/%		损伤/%	
	1 天	28 天	1 天	28 天
MRS	51	84	82	88
1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 强化的 MRS	13	39	0	20

Barber 等和 Koreloff 等研究表明 *Lactobacillus* 产生的光滑菌落比粗糙菌落对环境变化有更强的抵御性, 这包括 UV 照射、X 射线、加热和冷冻贮存。随着浓缩发酵技术的发展, *L. acidophilus* 菌对冷冻和干燥贮存有了更高的适应性, 和他们的研究报告一样, *L. acidophilus* 的粗糙菌落即纤维状细胞结构对贮存和运输呈更高的敏感性。

Lactobacilli 的形态会对环境的较小变化产生反应, 这种形态反应和变化是此菌的特征, 以前我们往往忽视了这种变化的作用。不同的培养介质和分类反应对 *Lactobacilli* 在冷冻或干燥贮存情况下的稳定性产生决定性影响, 在稳定整体 *Lactobacillus* 发酵剂浓缩物生产过程中, 必须考虑能抵御冷冻和干燥过程破坏的细胞状态; 因此可以优先选择光滑菌株, 以诱导和保持短棒状细胞类型为主。

二、*L. acidophilus* 在商业化产品中的稳定性

自 20 世纪 70 年代始美国即有非发酵含有益生菌的液态乳可供选用, 这种产品的第一代是通过 *L. acidophilus* 的浓缩制备物加工而成的, 后来 *Bifidobacteria* 也被添加于乳中。在乳中期望 *L. acidophilus* 和 *Bifidobacteria* 两株菌均达到 2×10^6 cfu/ml 水平, 以实现对人体健康作用。但目前在美国仅有加州和冈州对非发酵乳中益生菌的活菌数有法律的规定, 其他国家在这类产品中益生菌数尚无明确规定。消费者希望提供一种技术上有保证且成本适中的益生菌浓度标准, 而不是以有益人体健康的最低限量为标准的。

Sanders 等 (1996) 研究了在液态奶中商业化益生菌的加工和存活特性, 他们研究了 6 株 *L. acidophilus*、5 株 *Bifidobacteria* 和 6 株 *S. thermophilus* 在非发酵液态奶中的活性和稳定性。他们测定的菌株情况如表 5-50 所示。*L. acidophilus*、*Bifidobacterium* 和 *S. thermophilus* 在同一种液态奶中共存, 给各个菌株的计数带来了挑战, 为了确定配方奶中菌数达到生理功能所需的数量级, 要在其他菌存在情况下进行每种菌的单独计数。虽然没有一种培养基同时具有使这些菌株良好生长而且可使其区分的能力, 但许多培养基能在乳中对各株菌分别计数, 故对这些培养基进行了评估。以发表文献和 Sanders 等的研究为基础, 非选择性和选择性培养基及菌生长情况如表 5-51 所示。在非选择性肉汁、选择性和非选择性琼脂上进行了菌株计数比较情况如表 5-52 所示。和选择性培养基比较, 对于任何的 *Lactobacilli* 和 *S. thermophilus*, 在非选择性培养基上没有统计学意义上的差异。Ishibashi 建议

应用 LiCl 作为 *S. thermophilus* 的选择性试剂，他的研究表明应用 0.15% LiCl 就能实现 *S. thermophilus* 和 *Lactobacilli*、*Bifidobacteria* 之间的有效分离计数。相反 *Bifidobacteria* 对选择性培养基更敏感，5 株菌中 4 株在计数上有 24%~7% 的下降。在以冷冻浓缩培养物为原料生产的液态奶产品中，由于细胞的冷冻伤害在选择和非选择培养基之间产生巨大的计数差异，菌数评估以选择性培养基上的计数为标准。

表 5-50 实验中测定和评估的菌株

建议的菌株	名称	测定后的菌株名称
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LE1	<i>Lactobacillus gasseri</i> (B1)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LG1	<i>Lactobacillus johnsonii</i> (B2)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LG9	<i>Lactobacillus johnsonii</i> (B2)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LH1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (A1)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LH7	<i>Lactobacillus gallinarum</i> (A4)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LF1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (A1)
<i>Bifidobacterium longum</i>	BE1	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	BG1	BG1a; <i>Lactobacillus acidophilus</i> BG1b; <i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	BG9	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	BH1	BH1a; <i>Bifidobacterium bifidum</i> BH1b; <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
<i>Bifidum</i>	BF1	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SG1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SG9	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SH1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SH7	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SF1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SF8	<i>Streptococcus thermophilus</i>

表 5-51 选择和非选择培养基的计数情况

菌株	情况	
	选择	非选择
<i>Lactobacillus</i>	LBS 琼脂 37℃ 厌氧	MRS 琼脂 37℃ 厌氧
<i>Bifidobacterium</i>	LP 琼脂 37℃ 厌氧	Reinforced clostridial 琼脂 37℃ 厌氧
<i>Streptococcus</i>	M17 琼脂 加 0.125% LiCl(M17-LiCl)40℃ 好氧	M17 琼脂 40℃ 厌氧

表 5-52 在各种培养基上进行的菌计数情况比较

菌株	介质				下降 (%)
	非选择性		选择性		
	X	SD	X	SD	
<i>Lactobacillus</i>					
LE1	1.4×10^8	2.8×10^8	1.4×10^9	2.2×10^8	0
LF1	7.3×10^8	8.2×10^7	7.7×10^8	1.4×10^8	0
LG1	6.8×10^8	7.8×10^7	5.6×10^8	1.6×10^8	18
LG9	1.2×10^9	2.2×10^8	9.7×10^8	2.3×10^8	19
LH1	6.5×10^8	1.1×10^8	6.8×10^8	1.7×10^8	0
LH7	8.1×10^8	1.6×10^8	7.1×10^8	2.3×10^8	12
<i>Bifidobacterium</i>					
BE1	6.6×10^7	1.0×10^7	5.0×10^7	1.3×10^7	24
BF1	5.2×10^8	7.5×10^7	1.7×10^8	2.9×10^7	67
BG1	8.1×10^6	1.5×10^6	2.2×10^6	1.4×10^6	73
BG9	4.8×10^8	6.9×10^7	1.1×10^8	3.5×10^7	77
BH1	2.6×10^8	3.7×10^7	2.6×10^8	3.5×10^7	0

续表

菌 株	介 质				下降 (%)
	非选择性		选择性		
	X	SD	X	SD	
<i>Streptococcus</i>					
SF1	3.2×10^8	3.8×10^7	3.0×10^8	3.9×10^7	6
SF8	1.1×10^7	6.0×10^6	1.1×10^7	7.2×10^6	0
SH1	8.5×10^7	2.3×10^7	6.8×10^7	2.4×10^7	20
SH7	3.0×10^8	1.9×10^7	2.8×10^8	1.6×10^7	7
SG1	2.2×10^8	1.7×10^7	2.1×10^8	1.3×10^7	4
SG9	1.1×10^8	1.7×10^7	1.0×10^8	2.4×10^7	9

由于许多 *Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 种呈宿主专一性, 故认为用于益生目的的菌株专一性是十分重要的, 前面表中已列出用于益生目的的许多菌株。有的产品中 *Lactobacillus* 的量为 $(5 \sim 6) \times 10^{10}$ cfu/ml; *Bifidobacteria* 的量 $> 10^{11}$ cfu/ml, 但另一浓缩物 BG1 仅含 4×10^8 cfu/ml。对于 *Streptococci* 的计数是类似的, 其数量在 $(2 \sim 7) \times 10^{10}$ cfu/ml 范围内。冷冻浓缩物高的起始活菌数对于用合理的培养速度和成本达到产品要求的活菌数是非常重要的。

表 5-53 对数期发酵物的乳糖酶活性

菌 株	乳糖酶活性	SD	菌 株	乳糖酶活性	SD
LF1	<0.01		BG9	1.95	0.05
LF1	4.62	0.18	BH1	1.53	0.13
LG1	4.73	0.15	SF1	77.2	1.27
LG9	0.02		SF8	189.0	4.0
LH1	4.43	0.05	SH1	26.4	0.90
LH7	1.11	0.08	SH7	11.8	0.64
BE1	5.53	0.25	SG1	36.5	0.15
BF1	2.44	0.14	SG9	44.9	1.36
BG1	4.93	0.18			

在冷冻贮藏过程中浓缩物随时间变化其稳定性变化如图 5-31 所示。

一般的 *Lactobacilli* 菌株 LH1、LE1、LF1 和 LG1, *Bifidobacteria* 菌株 BH1、BG9 和 BG1, 以及所有的 *Streptococci* 是稳定的, 在贮存过程中的损失是极微的。其他一些菌株在贮存过程中损失超过一个半衰期, 故在产品加工中建议应用其新鲜制备物以使冷冻伤害致死造成的菌株失活最小化。也建议深冷贮藏 ($-80 \sim -100^\circ\text{C}$), 在此情况下的细胞损失较 -20°C 贮存时少。

各种菌在产品中的贮存稳定性情况如图 5-32 所示。所有三株菌 *Streptococci*、*Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 在 21 天的过程中呈稳定性, pH 由 6.8 下降为 6.5, 说明微生物的代谢产生了副产物 (见图 5-33), 含有乳酸菌发酵物的乳和对照乳比较没有快速酸化。嗜冷菌迅速增加, 说明嗜冷菌对产品的破坏而非添加乳酸菌是产品稳定性的最大影响因素。

10°C 贮存产品更易变坏, 未添加乳酸菌的巴氏灭菌乳在 14 天后产生 10^8 cfu/ml 的嗜冷菌, 在这个时间后很快凝结; 但和 4°C 时的研究情况相同, 添加乳酸菌后产品呈稳定性, 21 天后稍有下降。无论有无乳酸菌发酵物存在测试乳 10°C 贮存 7 天后 pH 下降, 21 天后 pH 下降为 5.5。 10°C 贮存明显阻碍了含有乳酸菌乳的嗜冷菌生长, 这种阻碍作用在 4°C 贮存时没有观察到。我们知道乳酸菌会产生能够抑制乳中腐败菌生长的产物, 但在 Sanders 的研究

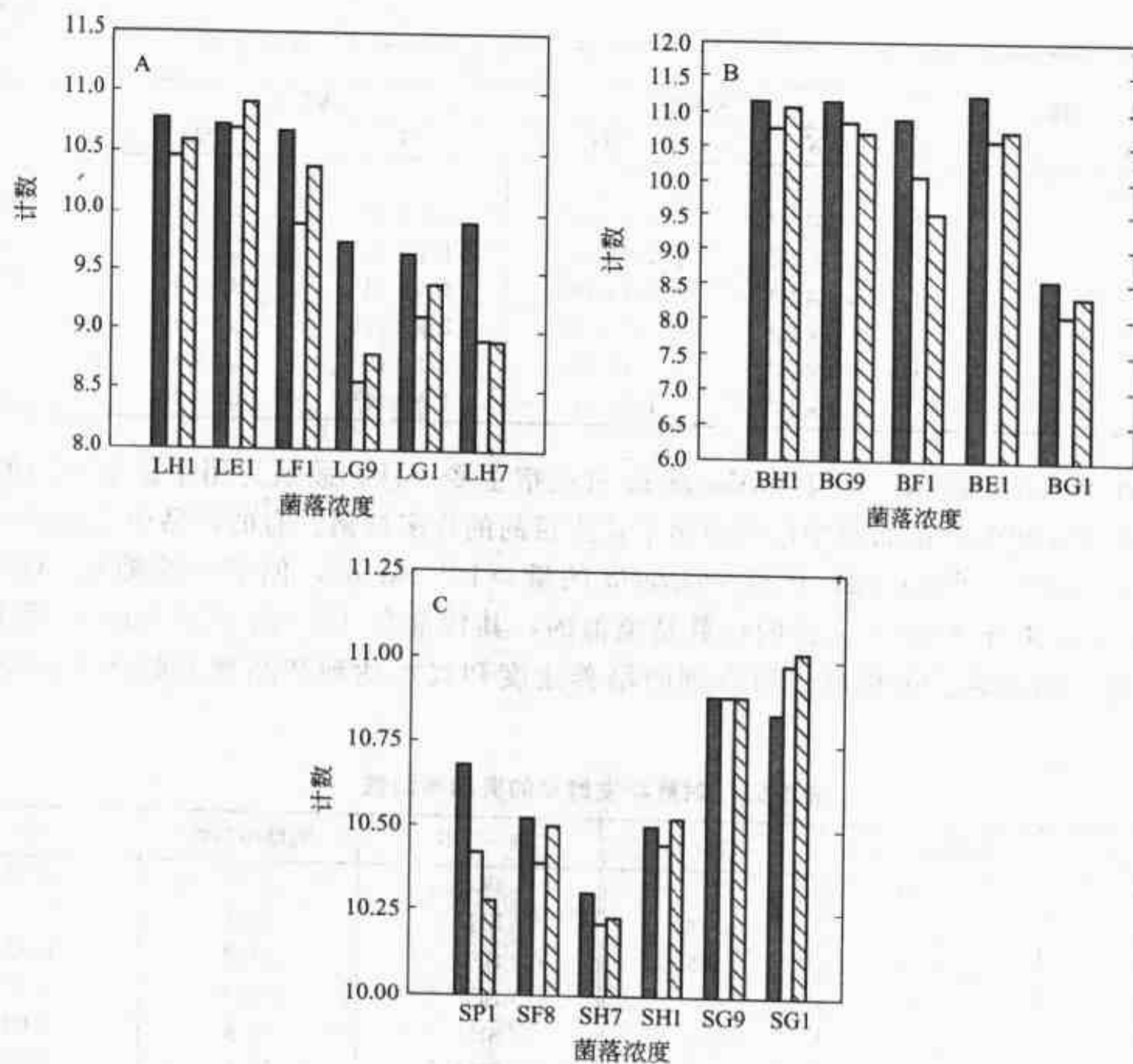


图 5-31 菌株贮存存活情况

中没有确认这一结果。

在选择培养基上未添加乳酸菌乳贮存时嗜冷菌变化情况如图 5-34 所示。结果表明 LBS 培养基对嗜冷菌有较强抑制性，当嗜冷菌的量达 10^8 cfu/ml 时测得其量 < 10 cfu/ml。所有菌的计数和非选择性培养基比均有大大降低，故在测定时应选择 Sanders 研究的专用培养基。

Lactobacillus 对高浓度的胆汁具有高耐受性，LF1 菌株在 3% 浓度的胆汁培养基中菌数有小幅下降，有趣的是 LH7 在 3% 的胆汁中有两个半衰期的下降。所有的 *Streptococci* 菌株均呈低浓度胆汁敏感性；5 株 *Bifidobacteria* 中的 3 株 (BG9、BF1 和 BH1) 对胆汁不敏感，菌株 BG1 和 BE1 对低浓度的胆汁敏感。在肠道能够存活被认为是益生菌起到保健作用的一个必要前提，菌株能够在生理胆汁水平存活很可能在肠道也能存活，研究结果表明胆汁的存在对大多数 *Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 的生长不会形成生长障碍；但 *Streptococci* 不能通过胆汁存活推测其也不能在肠道存活，*Streptococci* 的作用是向肠道输送乳糖酶，*Streptococci* 对胆汁敏感，但他的细胞具有通透性，可向外分泌乳糖酶，从而改善乳糖消化，因此可以弥补其对胆汁敏感的缺陷。因此对 *S. thermophilus* 或其他和乳酸菌等应用于传递乳糖酶进入肠道的菌而言，它们对胆汁的敏感性可能是一种我们希望具有的特性。

Sanders 等亦研究了三种菌的乳糖酶产生特性，新生长菌的单克隆产生乳糖酶的浓度如表 5-53 所示。由于菌落产生于不同长度的细胞链，故这些数据不能产生每个细胞的精确乳

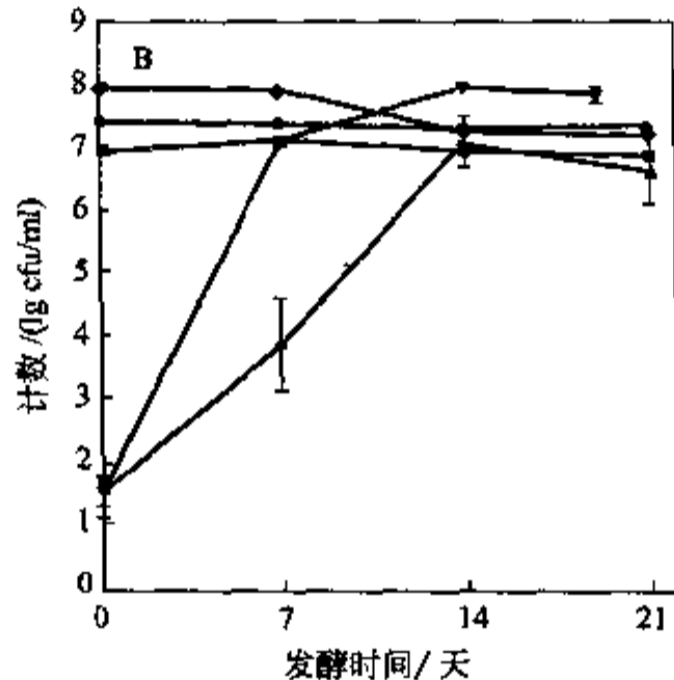
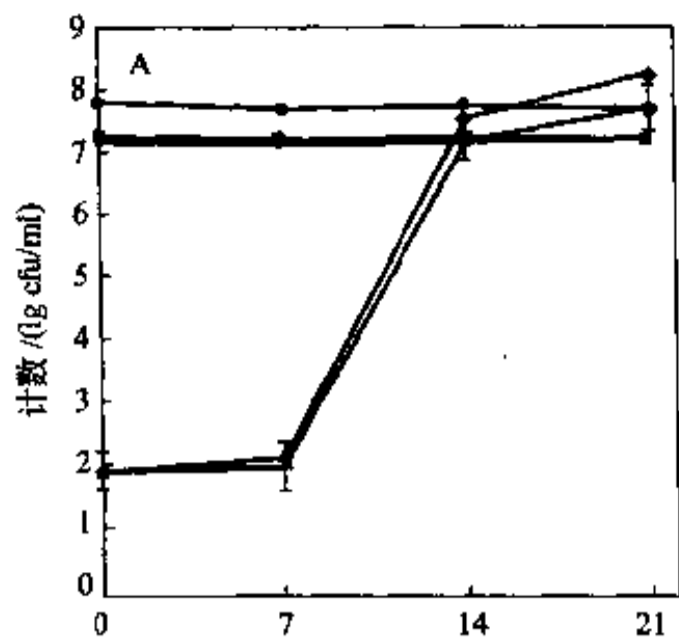


图 5-32 在 4°C (A) 和 10°C (B) 下贮存 31 周菌存活情况

●—*S. thermophilus* SG9; ▼—*Lactobacillus*;
■—*Bifidobacterium* BG9; ▲—嗜冷菌; ◆—非发酵乳中的嗜冷菌

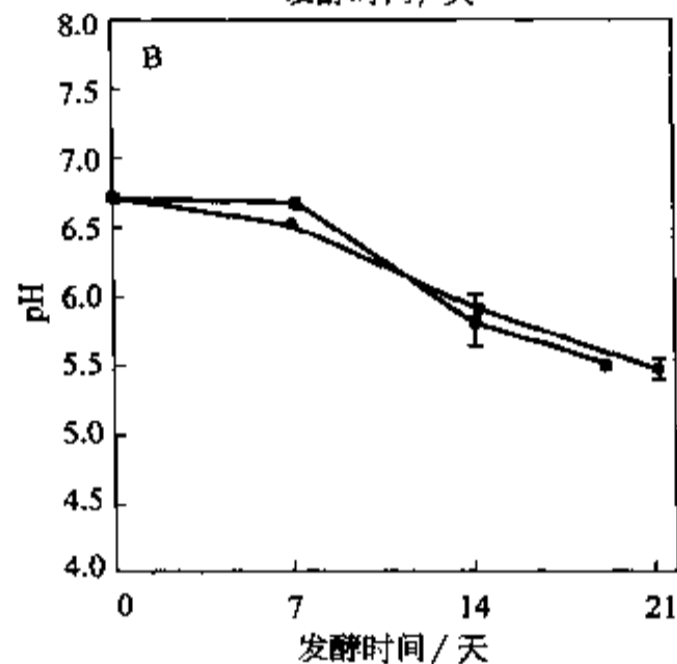
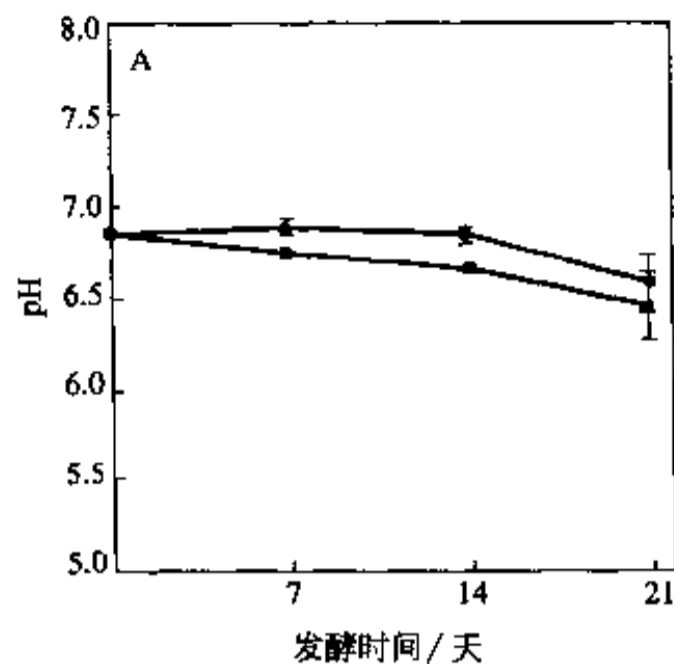


图 5-33 含乳酸菌乳在贮存过程中的 pH 变化

A 4°C、21 天; B 10°C、20 天;
■—对照乳

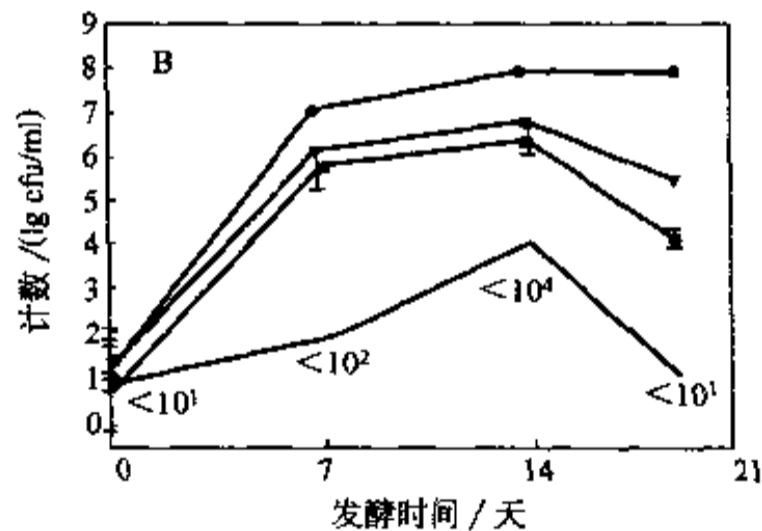
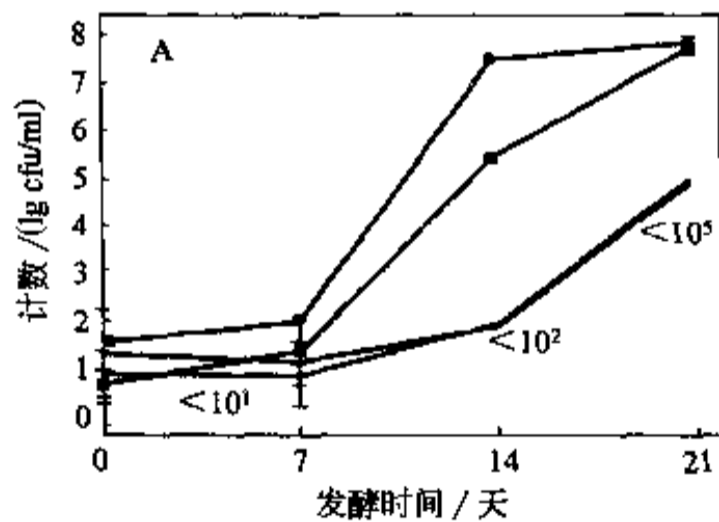


图 5-34 在非发酵乳中贮存过程中的总菌数变化

A 4°C、21 天; B 10°C、20 天; ●—PCA 培养基; ▼—M17-乳糖-LiCl; ■—LP

糖酶活性, 但每个吸附单位的计数值能够揭示相关趋势。此报道的乳糖酶活性来自于氯仿处理细胞, 故其是整个细胞乳糖酶活性。对于每个克隆的 *S. thermophilus* 菌株乳糖酶活性要高于 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli*。所有菌株均表现出宽的乳糖酶活性, 其范围对于 *Streptococci* 从 11.8 直至 189 单位/cfu, *Bifidobacteria* 为 1.53~5.53 单位/cfu, *Lactobacilli* 为 <math><0.01</math> 直至 4.73 单位/cfu。PAGE 测定 *S. thermophilus* SG1, SH1, SF1 和 SF8 的

基因组是相同的，表明这些菌株是同源的，从表中可以看出尽管它们间存在遗传同源关系但乳糖酶的活性是不同的。*Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 在 -20°C 贮存 6 周，其乳糖酶活性保持稳定，对 *Streptococci* 而言乳糖酶活性下降了 42%，故对 *Streptococci* 建议应用新鲜冷冻浓缩物以保证其乳糖酶活性。

三、含 *L. acidophilus* 产品对人粪便菌群组成的影响

在 1908 年 Eli Metchnikoff 建议人们食用能够在人肠道存活菌发酵的乳制品，其目的是控制在宿主体内产生毒素的微生物生长。自此以后许多研究均表明 *Lactobacilli* 在保持肠道菌群平衡方面具有重要作用，其中 *L. acidophilus* 已被证明是一种肠道益生菌。许多年来以发酵乳形式存在的 *L. acidophilus* 为消费者食用，但这种产品口味差不易为消费者接受，且冷冻贮存时发酵物很快失活，后期 Myer 等研究制出具有鲜乳风味的非发酵 *L. acidophilus* 乳，此产品含有高浓度活性 *L. acidophilus*，这种 *L. acidophilus* 在 2 天内可定殖于人肠道。Duggan 等研究成功可提供足量 *L. acidophilus* 活体细胞的 5~10ml 液态产品，他们也建议将其加入乳中食用。

Gilliland 等研究了 *L. acidophilus* 产品对人体粪便微生物的影响。他们发现其应用的 *L. acidophilus* 是一种过氧化物酶阴性、形成芽孢、直型、革兰氏阳性棒状菌。喂食 *L. acidophilus* 产品前人群粪便的微生物情况如表 5-54 所示，最宽的范围是兼性 *Lactobacilli* (2.28~8.19/g)，厌氧 *Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 一般含量最高，其次为大肠菌群和兼性 *Lactobacilli*。

表 5-54 在产品消费中 25 人粪便微生物情况

菌 株	介 质	对数值/g	
		范 围	平 均
Coliform	VRBA	4.80~8.53	6.79
兼性 <i>Lactobacilli</i>	LBS-CO ₂	2.28~8.19	5.27
厌氧 <i>Lactobacilli</i> 和 <i>Bifidobacteria</i>	LBS-GP	4.18~8.86	7.56

在摄入含有 *L. acidophilus* 乳后，人体粪便中大肠菌群的量下降，但平均下降不明显，3 组中的 2 人差异性明显（见表 5-55）。厌氧 *Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 量受含 *L. acidophilus* 乳的影响不大（见表 5-56），许多个体表现出二者量的增加，但这些组和其他组比较有较少的起始菌数，一组表现为二者菌总量的下降。

表 5-55 消费含 *L. acidophilus* 的非发酵乳对人类粪便中 *coliforms* 的影响

乳中 <i>L. acidophilus</i> 的量	测试人	样品摄入			观察较大差异的几率	
		前	中	后	测试人群	用于饮乳
0/ml(对照)	I-D	5.3	5.3	4.5	0.0004	0.52
	I-E	6.8	6.8	7.5		
	I-I	7.0	7.0	6.9		
	I-K	6.9	6.9	7.2		
	平均	6.5	6.5	6.5		
2×10^7 /ml	I-B	6.7	7.2	5.6	0.76	0.10
	I-F	7.0	6.4	4.0		
	I-G	6.4	6.7	5.8		
	I-J	5.7	7.3	7.5		
	平均	6.8	6.9	5.5		

续表

乳中 <i>L. acidophilus</i> 的量	测试人	样品摄入			观察较大差异的几率	
		前	中	后	测试人群	用于饮乳
8×10^8 /ml	I-A	8.5	7.7	8.7	0.0006	0.10
	I-C	6.8	6.6	6.5		
	I-H	8.4	8.3	8.0		
	I-L	8.2	7.2	5.9		
	平均	8.0	7.5	7.3		

表 5-56 摄入含 *L. acidophilus* 非发酵乳对厌氧 *Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 的影响

乳中 <i>L. acidophilus</i> 的量	测试人	样品摄入			观察较大差异的几率	
		前	中	后	测试人群	用于饮乳
0/ml(对照)	I-D	8.2	8.2	7.7	0.0028	0.07
	I-E	8.4	8.0	8.1		
	I-I	8.6	8.2	7.3		
	I-K	5.9	7.3	6.1		
	平均	8.5	8.3	8.0		
2×10^7 /ml	I-B	7.9	8.0	7.9	0.0004	0.58
	I-F	8.8	7.0	8.2		
	I-G	5.4	7.0	4.9		
	I-J	4.8	5.5	4.6		
	平均	6.7	7.1	6.4		
8×10^8 /ml	I-A	8.5	8.6	8.3	0.0001	0.19
	I-C	8.2	8.6	8.9		
	I-H	8.6	9.3	8.0		
	I-L	5.9	7.3	6.1		
	平均	7.8	8.4	7.8		

测试组在食用含有 *L. acidophilus* 的乳后, 粪便中兼性 *Lactobacilli* 的量大大增加(见表 5-57)。这种差异性在所有组别中均表现出来, 对照组在喂养前、中、后均表现为粪便中兼性 *Lactobacilli* 的量不变, 测试组在喂食前(I-F, I-A) 有少量兼性 *Lactobacilli*, 在摄入含 *L. acidophilus* 的产品后有较大幅度上升, 摄入停止后兼性 *Lactobacilli* 的量下降, 但大多数测试组均保持高于摄入前兼性 *Lactobacilli* 的量。

表 5-57 含 *L. acidophilus* 非发酵低脂乳对人粪便中兼性 *Lactobacilli* 的影响

乳中 <i>L. acidophilus</i> 的量	测试人	样品摄入			观察较大差异的几率	
		前	中	后	测试人群	用于饮乳
0/ml(对照)	I-D	2.5	2.9	2.0	0.0001	0.73
	I-E	7.8	7.8	8.5		
	I-I	5.1	5.2	4.4		
	I-K	7.3	7.2	7.0		
	平均	5.7	5.8	5.5		
2×10^7 /ml	I-B	6.8	7.3	7.9	0.0001	0.0001
	I-F	3.6	6.0	4.7		
	I-G	5.1	6.9	4.8		
	I-J	4.8	6.2	4.6		
	平均	5.1	6.6	5.5		

续表

乳中 <i>L. acidophilus</i> 的量	测试人	样品摄入			观察较大差异的几率	
		前	中	后	测试人群	用于饮乳
8×10^8 /ml	I-A	2.0	8.0	4.9	0.0002	0.0001
	I-C	6.4	8.5	7.6		
	I-H	7.1	8.6	7.9		
	I-L	4.3	6.4	5.9		
	平均	4.9	7.9	6.6		

喂养 *L. acidophilus* 在多数情况下能够改变肠道微生物进而使肠道菌群出现更好的平衡, 这也包括由于病原性微生物 *Escherichia coli* 引起胃肠疾病的人群在内。摄入 *L. acidophilus* 的人群兼性 *Lactobacilli* 的量大大增加, 而大肠菌群的量基本不受影响, 这可能缘于所有测试人是健康的, 没有出现肠道紊乱的情况。

参 考 文 献

- 1 Barefoot, S. F., C. G. Nettles, and Y. R. Chen. Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, p. 353-376. In L. De Vuyst and E. I. Vandamme (ed.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, 1994
- 2 Barefoot, S. F., Y. R. Chen, T. A. Hughes, A. B. Bodme, M. Y. Shearer, and M. D. Hughes. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B Appl. Environ. Microbiol. 60, 3522-3528. 1994
- 3 Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemotherpy 26, 328-334. 1984
- 4 Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1808-1815. 1983
- 5 Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70, 1-12. 1987
- 6 Dunn, S. R., M. L. Simenhoff, K. E. Ahmed, W. J. Gaughan, B. O. Eltayeb, M. E. D. Fitzpatrick, S. M. Emery, J. W. Ayres and K. E. Holt. Effect of oral administration of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* on small bowel bacterial overgrowth in patients with end stage kidney disease: reducing uremic toxins and improving nutrition. Int. Dairy J. 8, 545-553. 1998
- 7 Dunn, S. R., M. L. Simenhoff, M. E. Fitzpatrick, B. Eltayeb, K. Ahmed, S. Emery, M. Wrigley, J. M. Chow, D. Ataya and W. J. Gaughan. Effects of orally administered *L. acidophilus* in reducing an endogenous uremic toxin (dimethylamine) and a carcinogen (nitrosodimethylamine) and improving nutritional status in a placebo controlled, double blind, parallel study in 24 hemodialysis patients. J. Amer. Soc. Nephrol. 9 (October): Abstract # A0750 1998
- 8 Gilliland, S. W., M. L. Speck, C. F. Nauyok, Jr., and F. G. Giesbrecht. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males J. Dairy Sci. 61, 1-10. 1978
- 9 Gilliland, S. E. and M. L. Speck. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. J. Food Protect. 40, 820-823. 1977
- 10 Gilliland, S. E. and D. K. Walker. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans J. Dairy Sci. 73, 905-911. 1990
- 11 Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 49, 377-381. 1985
- 12 Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Amer. J. Clin. Nutr. 39, 756-761. 1984
- 13 Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. The effect of oral administration of *Lactobacillus* and antibiotics on intestinal bacterial activity and chemical induction of large bowel tumors. Dev. Indus. Microbiol. 25, 139-150. 1984
- 14 Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*,

- decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J. Nat. Cancer Inst.* 73; 689-695. 1984
- 18 Goldin, B. R. , L. Swenson, J. Dwyer, M. Sexton, and S. Gorbach. . Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.* 64; 255-261. 1980
 - 19 Goldin, B. R. and S. L. Gorbach. . Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J. Nat. Cancer Inst.* 64; 263-265. 1980
 - 20 Goldin, B. and S. L. Gorbach. . Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. *Cancer* 40; 2421-2426. 1977
 - 21 Greene, J. D. , and T. R. Klaenhammer. . Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 60; 4487-4494. 1994
 - 22 Guerrero, M. , M. Dohnalek, P. Newton, O. Kuznetsova, T. Murphy, J. Calva, M. Hilty, T. Costigan and G. Ruiz-Palacios. . Effect of probiotic-containing beverages on incidence of diarrhea. Abstracts of the 1st World Congress of Pediatric Infectious Diseases, 15th InterAmerican Congress of Pediatric Infectious Diseases, Abstr. # 610; 45-2. 1996
 - 23 Guerrero, M., M. Dohnalek, P. Newton, J. Calva, F. Tuz, F. Arteaga, T. Costigan, M. Hilty and G. Ruiz-Palacios. . Feeding of a probiotic for prevention of diarrhea. Abstracts of the 1st World Congress of Pediatric Infectious Diseases, 15th InterAmerican Congress of Pediatric Infectious Diseases, Abstr. # 601; 45-2. 1996
 - 24 Hood, S. K. and E. A. Zottola. . Electron microscopic study of the adherence properties of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 52; 791-805. 1987
 - 26 Hughe S, D. B. , and D. G. Hoover. . Viability and enzymatic activity of *Bifidobacteria* in milk. *J. Dairy Sci.* 78; 268-276. 1995
 - 27 Iturriria-Laverty, K. , P. S. Tong, and M. E. Sanders. . Microbiological stability of probiotic and starter bacteria in commercial yogurt and cottage cheese. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl. 1); 6. Abstract D23. 1999
 - 28 Kaplan, Christopher, J. C. Astaire, M. E. Sanders, B. S. Reddy, C. L. Kitts. . 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 67; 1935-1939. 2001
 - 29 Kaplan, Handan and R. W. Hutkins. . Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66; 2682-2684. 2000
 - 30 Kim, G. S. and S. E. Gilliland. . *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.* 66; 959-966. 1983
 - 31 Klaenhammer, T. R. . Microbiological considerations in the selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjuncts. *J. Dairy Sci.* 65; 1339-1349. 1982
 - 32 Klaenhammer, T. R. and E. G. Kleeman. . Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41; 1461-1467. 1981
 - 33 Klaenhammer, T. R. , C. Fremaux, C. Aim, and K. Milton. . Molecular Biology of bacteriocins produced by *Lactobacillus*. In *Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria*, D. Hoover & L. Steenson (eds), Academic Press, NY, pp 151-180. 1992
 - a) Kleeman, E. G. and T. R. Klaenhammer. . Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 65; 2063-2069. 1982
 - 34 Lin, M. -Y, D. Savaiano, and S. Harlander. . Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. *J. Dairy Sci.* 74; 87-95. 1991
 - 35 Klaenhammer, T. R. , M. J. Kullen. . Selection and design of probiotics. *Intl J Food Micro.* 50; 45-57. 1999
 - 36 Kullen, M. and T. R. klaenhammer. Identification of the pH-inducible, protontranslocating F1F0-ATPase (atpBEF-HAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display; gene structure, cloning and characterization. *Molec. Microbiol.* 33; 1152-1161. 1999
 - 37 Luchansky, J. B. , M. C. Tennant, and T. R. klaenhammer. . Molecular cloning and DNA polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasserii*. *J. Dairy Sci.* 74; 3293-3302
 - 38 McDonough, F. E. , A. D. Hitchins, N. P. Wong, P. Wells, and C. E. Bodwell. 1987 Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose-intolerant persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 45; 570-574. 1991
 - 39 Montes, R. G. , T. M. Bayless, J. M. Sasvedra and J. A. Perman. . Effect of milks inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *J. Dairy Sci.* 78; 1657-1664. 1995
 - 40 Newcomer, A. D. , H. S. Park, P. C. O'Brien, and D. B. McGill. . Response of patients with irritable bowel syndrome

- and lactase deficiency using unfermented acidophilus milk. *Amer. J. Clin. Nutr.* 38; 257-263. 1983
- 41 Nielsen, J. W. and S. E. Gilliland. The lactose hydrolyzing enzyme from *Lactobacillus acidophilus*. *Cult Dairy Prod J.* 27; 20-28. 1992
 - 42 Payne, D. L. , J. D. Welsh, C. V. Manion, A. Tsegaye, A, and L. D. Herd. . Effectiveness of milk products in dietary mangement of lactose malabsorption. *Amer J. Clin. Nutr.* 34; 2711-2715. 1981
 - 43 Rao, D. L. , J. D. Welsh, C. V. Manion, A. Tsegaye, A, and L. D. Herd. . Effectiveness of milk products in dietary management of lactose malabsorption. *Amer J. Clin. Nutr.* 34; 2711-2715. 1981
 - 44 Rao, C. V. , M. E. Sanders, C. Indranie, B. Simi, and B. S. Reddy. . Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ in F344 rats. *Intrnl J Oncol* 14; 939-944. 1999
 - 45 Reid, G. . The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ Microbiol* 65; 3763-3766. 1999
 - 46 Reid, G. 1999. Investigation of the properties of *Lactobacillus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal* Vol 10, Nos 5-6, pp. 415-419, 2000
 - 47 Ruiz-Palacios, G. , M. L. Guerrero, M. Hilty, M. Dohnalek, P. Newton, J. J. Calva, T. Costigan, F. Tuz and F. Arteaga. . Feeding of a probiotic for the prevention of community-acquired diarrhea in young Mexican children. *Rediatric Research* 39 (Part 2); 104, Abstr. # 1089. 1996
 - 48 Ruiz-Palacios, G. , F. Tuz, F, Arteaga, M. L. Guerrero, M. Dohnalek, and M. Hilty. . Tolerance and fecal colonization with *Lactobacillus reuteri* in children fed a beverage with a mixture of *Lactobacillus* ssp. *Pediatric Res.* 39 (Part 2); 104, Abstract # 1090. 1996
 - 49 Thompson, L. U. , D. L. A. Jenkins, M. A. V. Amer, R. Reichert, A. Jenking and J. Kamulsky. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Amer. J. Clin Nutr* Wagner, 1982
 - 50 R. , T. Warner, L. Robert, J. Farmer and E. Balish. . Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect. Immun.* 65; 345-351. 1997
 - 51 Walker, D. C. and T. R. Klaenhammer. . Electrotransformation of *Lactobacillus acidophilus* group AI. *FEMS Microbiol. Lett.* 138; 233-237. 1996
 - 52 Wright, C. T. and T. R. Klaenhammer. . Calcium-induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. *Appl Environ. Microbiol.* 41; 807. 815. 1981
 - 53 Sanders, M. E. and T. R. Klaenhammer. . The scientific basis of lactobacillus acidophilus NCFM™ functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84; 319-331. 2001
 - 54 Sanders, M. E. , D. C. Walker, K. M. Walker, K. Aoyama, and T. R. Klaenhammer. . Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79; 943-955. 1996
 - 55 Strain LHI = NCFM Savaiano, D. A. , D. A. G. AbouElAnouar, D. E. Smith, and M. D. Levitt. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Amer. J. Clin. Nutr.* 40; 1219-1223. 1984
 - 56 Schauss, A. G. *Lactobacillus acidophilus*; method of action, clinical application, and toxicity data. *J Adv. Med.* 3; 163-178. 1990
 - 57 Simenhoff, M. L. , S. R. Dunn, G. P. Zollner, M. E. D. Fitzpatrick, S. M. Emery, W. E. Sandine, and J. W. Ayres. . Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. *Mineral and Electrolyte Metab.* 22; 92-96. 1996
 - 58 Strain LBA = NCFM Simenhoff, M. L. and S. R. Dunn. Altered gut flora in uremia. *J. Renal Nutr.* 6; 68-74 36; 1106-1111. 1996
 - 59 Tejada-Simon, M. V. , J. H. Lee, Z. Ustunol and J. J. Pestka. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J. Dairy Sci.* 82; 649-660. 1999
 - 60 Wagner, Ri D. , C. Pierson, T. Warner, M. ' Dohnalek, J. Farmer, L. Robertsw; M. ' Hilty and E. Balish. . Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice *Infect. Immun.* 65; 4165-4172. 1997
 - 61 Walker, D. K. and S. E. Gilliland. . Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci* 76; 956- 961. 1993

第六章 LGG 菌及其制品

第一节 概 述

人体胃肠道不同部位微生物的浓度存在着很大的差异，具体情况如图 6-1 所示。

口腔黏膜和牙齿表面有高浓度的微生物，它们和唾液、咀嚼食品一起进入食道而后进入胃中，此时食品和胃液混合呈流体状态，胃液破坏了和其接触的大部分微生物，食品留在胃中 4h，后逐渐释放于小肠。由于从胃中进入的酸影响小肠的前端使其也呈酸性，此外分泌于小肠前端的胆汁也破坏微生物，故菌的水平相对较低。随着酸的浓度下降和胆汁的被稀释，在小肠末端菌的水平上升，在几米长的小肠表面布满致密的绒毛 (microvilli)，它在肠黏膜表面生长多达到展开可达一个网球场的面积。大肠区域对食品进行充分的分解，通过肠黏膜吸收进入血液，系统免疫组织的大部分与小肠连接，它可在黏膜的上皮细胞上被发现。

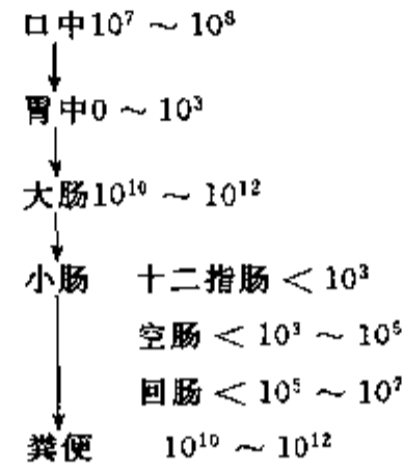


图 6-1 胃肠道不同部分菌的水平 (cfu/g)

消化道通过蠕动推动食物和食糜向前，使其从小肠转向大肠，在大肠中蠕动速度变慢，

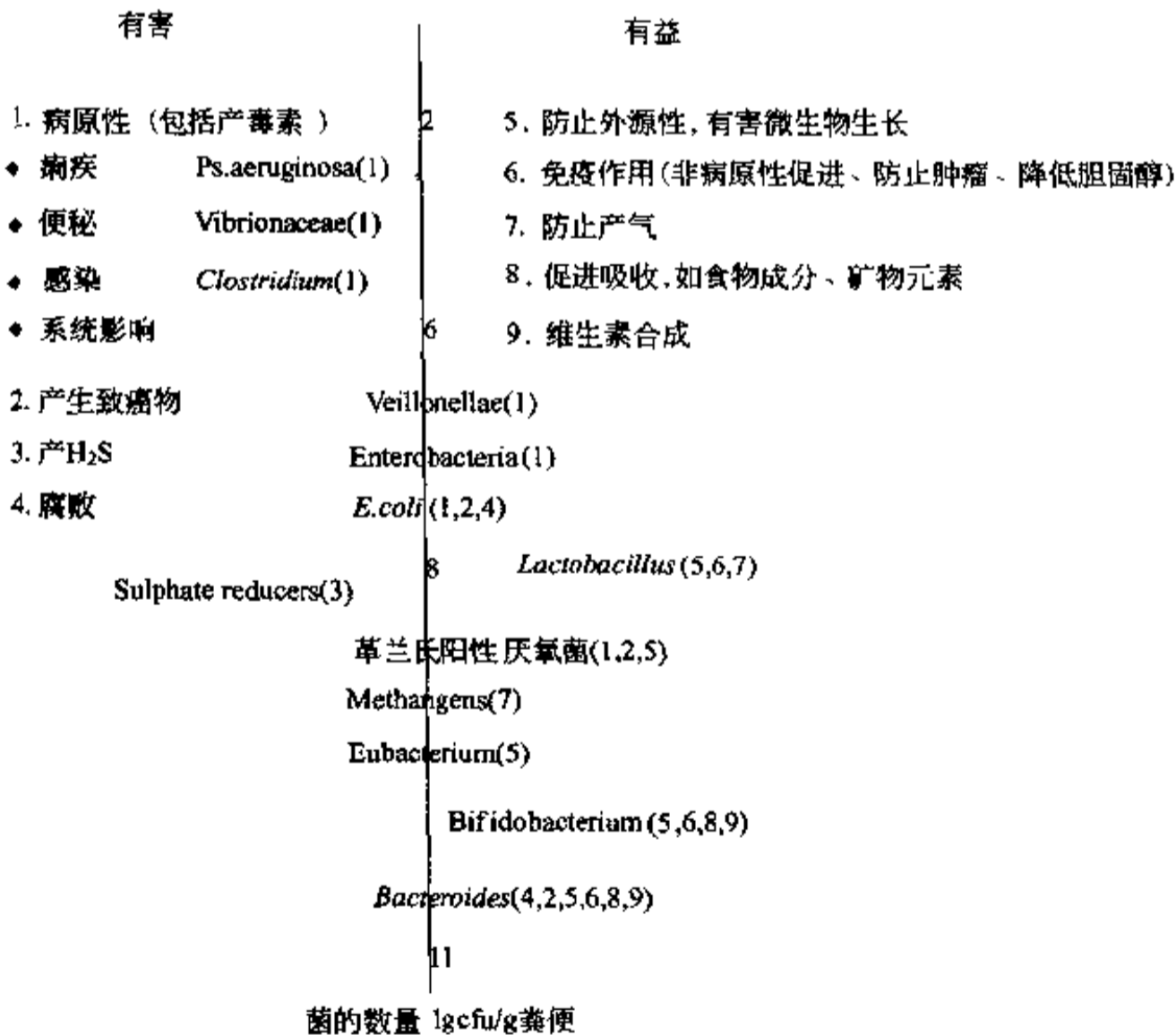


图 6-2 按菌的功能对肠道优势菌的大致分类

注：括号内的数字表示其相应的功能，长竖线的数字表示菌的数量 (单位: lgcfu/g 粪便)

Na⁺、Cl⁻离子和水被吸收进入血液，结果粪便中产生更多的固体，同时微生物的量迅速上升。在大肠中有广泛的微生物代谢，微生物分解剩余的营养素如部分消化蛋白质和纤维成分。粪便的近一半是由微生物构成，在人肠和粪便中已确认 400~500 种微生物，厌氧菌的量是需氧菌的 100~1000 倍以上，按有益、有害作用对肠道菌的大致分类如图 6-2 所示。

Lactobacilli 是正常肠道菌的一部分，它们具有相对好的耐酸性，可在胃和小肠前段存活，在肠黏膜上被确认的最常见的乳杆菌是 *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*、*L. gasseri*、*L. jenseni* 和 *L. crispatus*)、*L. casei*、*L. paracasei*、*L. rhamnosus*、*L. agilis*、*L. salivarius*、*L. plantarum*、*L. pseudoplantarum*、*L. buchneri* 和 *L. reuteri*、*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103) 或 *Lactobacillus* GG 或 LGG 是从健康人肠道分离的菌株，人们对其进行了大量的研究，现对其系统介绍以为该类产品的研究开发提供借鉴和帮助（见表 6-1）。

表 6-1 LGG 菌的属、种和菌株情况

属	种	菌株
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> GG
约有 60 个 <i>Lactobacillus</i> 的种	一组 <i>L. rhamnosus</i> 菌株它们基因组的同源性 >70%	能通过表现型或基因型方法从相同种中不同菌株中分离
属的特征 • 革兰氏阳性 • 棒状 • 链形 • 同型或异型发酵 • 过氧化物酶阴性 • G+C%33~35 [DNA 中鸟嘌呤(C)和胞嘧啶(G)的比例]	种的特征 • 普通形态 • 相似的生物化学特征 • G+C%45~47	菌株特征 • 典型的发酵特征(API50CH) • 无质粒 • 基因组分析 • 菌的特征、黏着、定殖、具有免疫作用等

第二节 LGG 在肠道的黏着和定殖

人胃肠道菌群构成一个复杂的生态体系，在人的粪便中存在 400 种以上的菌群，正常菌群和病原菌具有胃肠道黏膜表面的定殖能力，胃肠道对微生物也具有活性清洁机制，已证明在此生态体系中引入新的菌系是困难的。

Lactobacilli 虽不是菌群中的优势菌，但它可从整个健康人的胃肠道分离出来。对于菌株而言它有寄主定殖的专一性，如 *Lactobacillus acidophilus*、*L. fermentum* 和 *L. plantarum* 通常在人的粪便中发现；相反生产酸奶用的 *L. bulgaricus* 和 *S. thermophilus* 不能定殖在肠道，不能从粪便中分离。虽然动物研究表明 Lactobacilli 通过结合于上皮细胞而定殖于肠道、阴道和尿道黏膜的表面，但这种专一性的原因尚不清楚。

在不同环境中，通过引入 Lactobacilli 改变肠道菌群是有益的，来自这种方法的营养和治疗益处许多研究中已有报道，这种益处包括增加营养素的利用、乳糖不耐症的减少、脑病治疗和肠道感染防治，以及肠道中产生致癌物的菌类抑制。从人肠道分离的一种新菌我们称之为 *Lactobacillus* GG (LGG)，它有其特定的特征，现分别讨论之。

一、LGG 在不同 pH 胃液中的存活

LGG 在 pH3.0~7.0 的范围于胃液中 4h 没有明显的变化，但 pH1.0 时它的量急剧减少，具体情况如表 6-2 所示。

表 6-2 LGG 和 *L. bulgaricus* 菌在不同 pH 胃液中的存活情况

pH	时 间					
	0	30min	1h	2h	3h	4h
LGG						
7.0	8.45	9.12	8.56	8.59	8.58	8.44
5.0	8.88	8.93	8.45	8.47	8.47	8.58
3.0	8.51	8.62	8.31	8.30	8.30	8.30
1.0	<4.00	0	0	0	0	0
<i>L. bulgaricus</i>						
7.0	8.27	8.32	7.86	7.92	8.02	7.69
5.0	8.02	8.05	7.83	7.96	7.67	7.47
3.0	7.43	6.24	5.23	3.17	2.60	2.3
1.0	<4.00	0	0	0	0	0

注：数字单位为 Lg cfu/ml。

L. bulgaricus 在每一种 pH 均有不同程度下降，尤为值得注意的是 pH=3.0 时，时间由 30min 变为 4h，则 *L. bulgaricus* 下降了 5 个对数单位。上述数据表明 LGG 能存活通过胃液，尤其是 LGG 以食品或乳制品消费时，会使胃中的 pH 上升至 3.0 以上，这有助于 LGG 通过胃液。

二、LGG 在肠黏膜的黏着和定殖

对有益菌的选择重要标准之一就是它在肠道表面黏着的能力，这种黏着延长了有益菌影响胃肠道免疫系统和寄主微生态的时间，故有益菌对肠表面的黏着能力是和其效率相关的，用有益菌处理的人血清中的抗体效价是和菌的黏着能力直接相关的，菌的黏着起始以两个表面间非专一性物理作用为基础，这使得黏着物（通常为蛋白质）和受体间发生专一性相互作用。在体内研究菌的黏着是困难的，体外模拟体系中进行的评估已是公认的方法。

覆盖上皮细胞的黏膜是消化肠道中相遇微生物的起始膜，它在菌的黏着和定殖方面具有重要作用。黏膜连续不断的分解，新的黏蛋白糖蛋白（黏膜的主要成分）不断分泌，故菌可黏着于黏膜但不能到达上皮细胞，这是因为菌随着分解的黏蛋白被从黏膜表面强行解离和其他液体一起被移去，这部分说明了许多有益菌定殖特征的暂定模型。以此为基础，人肠道黏膜菌黏着的体外评估为研究菌对肠表面的黏着能力提供了好的模式。

肠黏膜蛋白的组成在人出生后会随着年龄和生理情况的不同发生变化，和膳食密切相关，在许多动物研究中肠黏膜和肠细胞中许多病原菌可利用的受体的量在出生后增加了。此外肠道 *Lactobacillus* 的量在婴儿期发生变化，研究表明许多菌（包括 LGG）具有黏着和定殖肠黏膜的能力，进而发挥平衡外源菌和调整胃肠免疫系统的作用。

菌对黏膜的结合能力呈年龄依赖性，Pirkka 等的研究表明：他研究的所有菌对成人黏膜的黏着均高于婴儿黏膜的黏着（0.3%~6.5%），具体情况如表 6-3 所示。从表中可以看出不同菌株对肠黏膜的结合能力不同，*L. rhamnosus* GG 为 44.1%~46.0%，*B. lactis* 为 23.2%~29.9%，*L. johnsonii* 介于 9.4%~14.4% 之间，*L. salivarius* 和 *L. crispatus* M247 及 *L. paracasei* 的黏着率为 2.5%~9.7%，*L. crispatus* Mu5 的黏着率最低，LGG 和 *B. lactis* 较其他菌株无论是在婴儿还是成人黏膜上均有较高的结合，且 LGG 的黏着率明显高于 *B. lactis* 的黏着率。*L. crispatus* Mu5 是 *L. crispatus* M247 的自发非疏水性诱变体，它基本无结合黏膜的能力，而非诱变体结合黏膜的能力属中等水平。

表 6-3 各类乳酸菌对不同年龄的人肠黏膜的结合能力

微生物	黏着率(标准方差)			
	新生儿	2月婴儿	6月婴儿	成人
<i>Bifidobacterium</i> Bb-12	26.3(5.1)	23.2(8.9)	26.9(6.0)	29.8(13.0)
<i>Lactobacillus crispatus</i> Mu5	1.8(0.4)	1.5(0.5)	1.7(0.7)	2.1(0.5)
<i>Lactobacillus crispatus</i> M247	6.2(2.2)	6.7(2.1)	7.2(2.3)	10.4(4.0)
<i>Lactobacillus</i> GG	45.3(5.5)	45.7(5.9)	44.1(7.2)	46.0(3.8)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LJ-1	9.6(3.6)	9.4(2.5)	11.8(2.9)	14.4(5.4)
<i>Lactobacillus casei</i> F19	6.6(2.1)	6.0(2.5)	6.2(2.2)	9.7(4.4)
<i>Lactobacillus salivarius</i> LM 2-118	4.6(1.5)	2.5(0.7)	3.7(0.7)	7.7(3.4)

菌在肠道黏膜结合呈年龄依赖性,即成人黏膜结合优于婴儿黏膜结合的结果,可能是缘于婴儿肠道环境不成熟为黏着提供的黏着位较少,但菌结合肠黏膜年龄间的差异性不显著。

Sarem-Damerdji 等研究了 5 种 *Lactobacillus* 结合于结肠组织的能力,发现乳杆菌不同程度定植于结肠组织表面,数值总结于表 6-4 中。*L. plantarum* 43364 和 *L. casei* 212.3 均有较高的定植性,可以非常密集、均匀的覆盖于整个黏膜表面,在添加 *L. rhamnosus* GG 和 *L. acidophilus* NCFB1748 后也发现有好的定植,这四种菌的定植和控制组明显不同,控制组在肠膜表面有不同的复相菌存在,但 *L. acidophilus* Ki 添加后和其他菌的结果相反,仅测定到非常少量乳杆菌黏着。

表 6-4 外源性 *Lactobacillus* 培养(8h)后于人结肠黏膜的定殖结果

<i>Lactobacillus</i>	bacilli 数 ($\times 10^5$) ^①	定殖能力 评估 ^②	<i>Lactobacillus</i>	bacilli 数 ($\times 10^5$) ^①	定殖能力 评估 ^②
控制组 ^③	0.12 \pm 0.06	—	<i>L. casei</i> GG	14.32 \pm 1.82	+
<i>L. acidophilus</i> NCFB1748	12.96 \pm 6.29	+	<i>L. casei</i> 212.3	33.46 \pm 8.25	++
<i>L. acidophilus</i> Ki	0.15 \pm 0.09	—	<i>L. plantarum</i> 43364	24.75 \pm 2.14	++

① 每 mm² 的定殖 bacilli 数;

② “—”~没有定殖,“+”~定殖,++~高度定殖;

③ 没有添加 *Lactobacillus* 的组织。

表 6-5 菌在人回肠糖蛋白的黏着和 *Lactobacillus* 的 API 识别

菌	APICHL(4.0) 识别	黏着率/% 平均方差 \pm
<i>Lb. rhamnosus</i> (Human faecal isolate)	<i>Lb. rhamnosus</i>	31.6 \pm 4.2
<i>Lactobacillus</i> GG ATCC53103	<i>Lb. rhamnosus</i>	28.7 \pm 4.7
<i>Lb. acidophilus</i> 1(LC1,Nestle)	<i>Lb. acidophilus</i>	5.6 \pm 1.5
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lb. plantarum</i>	1.7 \pm 0.49
<i>Lb. casei</i> (Fyos,Nutricia)	<i>Lb. rhamnosus</i>	1.2 \pm 0.31
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>Lb. rhamnosus</i>	0.74 \pm 0.25
<i>Lb. casei</i> Imunitass (Actimel,Danone)	<i>Lb. casei</i>	0.53 \pm 0.22
<i>Lb. casei</i> 01(Starter culture,Chr. Hansen)	<i>Lb. casei</i>	0.45 \pm 0.11
<i>Lb. casei</i> var. Rhamnsous(Lactophilus,Laboratoires Lyocentre)	<i>Lb. rhamnosus</i>	0.43 \pm 0.25
<i>Lb. rhamnosus</i> LC-705	<i>Lb. rhamnosus</i>	0.41 \pm 0.20
<i>Lb. casei</i> (BIO,Danone)	<i>Lb. casei</i>	0.36 \pm 0.14
<i>Lb. casei</i> Shirota (Yakult, Yakult)	<i>Lb. casei</i>	0.35 \pm 0.12
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>Shermanii</i> JS		5.2 \pm 3.6
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i> ARH 74		0.51 \pm 0.15
<i>Escherichia coli</i> HB101(pAZZ50)(阳性对照)		9.5 \pm 0.86
<i>E. coli</i> B44(阴性对照)		0.88 \pm 0.36

Tuomola 等研究了多种乳酸菌对人回肠糖蛋白的黏着能力(如表 6-5 所示), *Lactobacillus rhamnosus* 和 LGG 是研究菌中定殖性最高的两种菌(分别为 31.6% 和 28.7%), 它们的黏着性均好于 *E. coli* HB 101(pAZZ 50) ($P < 0.05$)。 *Lactobacillus rhamnosus* 和 LGG 表现出相似的浓度依赖性, 每孔菌数 $> 4 \times 10^7$ cfu 时菌结合数不再线性增加, 表明达到菌的饱和值(如图 6-3 所示)。

三、LGG 对 Caco-2 细胞的黏着和定殖

菌在肠细胞上的黏着也是鉴定菌能否在肠道结合和定殖的重要方法之一, Tuomola 等、Lehto 等、Chauviere 等研究了多种菌在肠细胞上的黏着和定殖, 现在就有关方面的问题进行介绍和探讨。

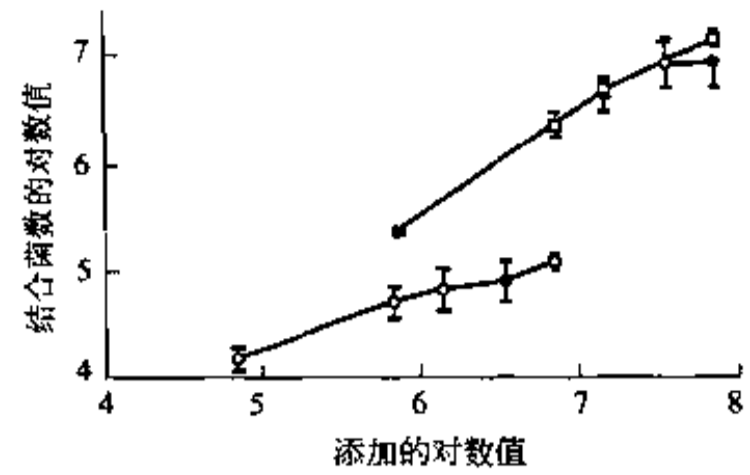


图 6-3 菌回肠黏蛋白结合的浓度依赖性
○—*L. acidophilus*;
□—*L. rhamnosus*; ●—LGG

表 6-6 菌对 Caco-2 细胞的黏着

菌	黏着率/%(标准方差)
<i>Lactobacillus GG</i> (ATCC 53103)	10.4(2.5)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LC-705	11.3(2.1)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ARH 74	16.0(2.6)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i> JS	12.2(1.3)
<i>E. coli</i> B 44 (阴性对照)	4.0(0.43)
<i>E. coli</i> H 10407 (阳性对照)	14.2(5.0)

各种菌在 Caco-2 细胞上的结合率为 10%~16% (如表 6-6 所示), 黏着性最强的菌是 *Lactobacillus lactis*。所有测试菌呈浓度依赖性(如图 6-4), 结合于 Caco-2 细胞上的菌数作为菌添加量的函数线性增加, 并没有饱和值出现。

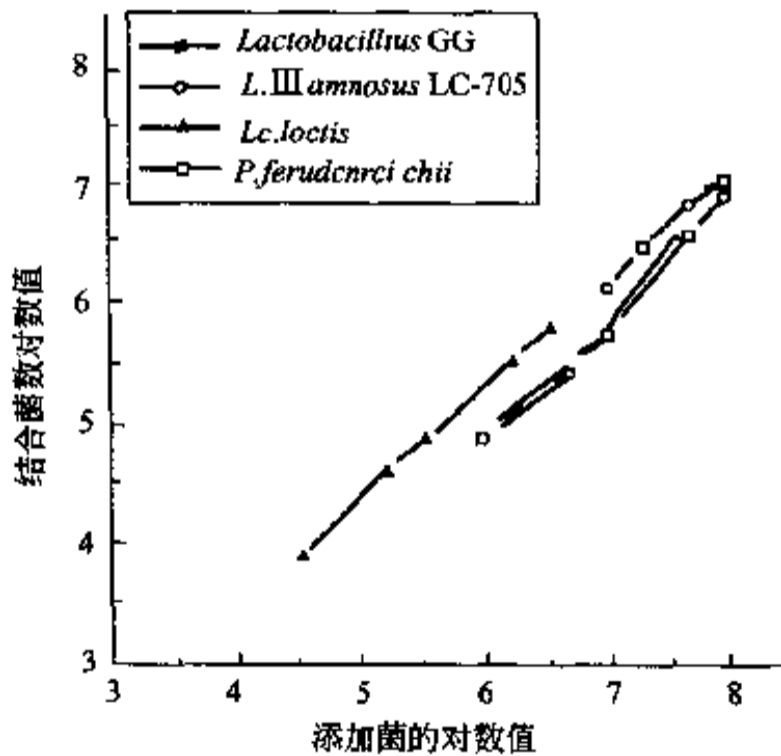


图 6-4 不同细菌对 Caco-2 细胞结合的浓度依赖性

Chauviere 等研究了 25 种 *Lactobacillus* 对 Caco-2 细胞的结合能力, 结果如表 6-7 所示, 不同菌间 Caco-2 细胞的结合能力有较大的差异。

L. acidophilus 对不同 Caco-2 细胞的黏着动力学研究表明(应用固定量的单层细胞 4×10^5 个, 固定菌数 2×10^8 cfu ml⁻¹): 它对 Caco-2 细胞的扩散结合最大值发生在 90min 以内, 在 150min 内保持恒定(图 6-5 所示)。

不同物质的存在影响菌在 Caco-2 细胞上的定殖性, 去除培养上清液或当采用新鲜培养基替代时菌的结合急剧减少(见表 6-8), 这种结果

表明: 培养上清液中某些成分参与了 *L. acidophilus* LB 的结合, 培养上清液经胰蛋白酶或 pronase 处理几乎完全失去使 *L. acidophilus* LB 在 Caco-2 细胞上的结合能力, 故这种结合由菌体所分泌的蛋白成分介导。用胰蛋白酶单独处理菌而不对培养上清液处理, 则不改变

表 6-7 培养基中 *Lactobacilli* 对 Caco-2 细胞的黏着 (钙依赖和不依赖结合的测定)

菌	黏 着 菌		黏着率的下降
	没有 EGTA	20mmol/LEGTA	
<i>Lactobacillus</i> 人体分离			
<i>L. acidophilus</i> LB	210(15)	175(2)*	17
<i>L. acidophilus</i> CIP 6218	13(4)	ND	—
<i>L. acidophilus</i> NCK88	8(2)	ND	—
<i>Lactobacillus</i> 临床分离			
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> FPC 01. 89	19(7)	ND	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> FPC02. 90	36(12)	ND	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> FPC03. 90	17(6)	ND	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> FPC04. 90	48(11)	ND	—
<i>Lactobacillus</i> 植物分离			
FPC 06. 90	5(2)	ND	—
FPC 07. 90	4(2)	ND	—
FPC 08. 90	7(3)	ND	—
<i>Lactobacillus</i> 动物分离			
<i>L. acidophilus</i> C2	43(11)	40(10)*	7
<i>L. acidophilus</i> C7	150(12)	88(10)+	41
<i>L. acidophilus</i> PA3	66(12)	63(12)*	4
<i>L. acidophilus</i> PA19	92(9)	85(15)*	8
<i>L. acidophilus</i> PA 47	45(5)	15(2)+	67
乳的 <i>Lactobacillus</i>			
<i>L. rhamnosus</i> GG	125(15)	105(10)*	16
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> ATCC 7469	6(2)	ND	—
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> CNRZ 205	5(2)	ND	—
<i>L. casei</i> CNRZ 383	3(1)	ND	—
<i>L. casei</i> CNRZ 36	6(3)	ND	—
<i>L. helveticus</i> CNRZ 32	200(21)	40(15)+	80
<i>L. helveticus</i> CNRZ 240	215(27)	35(15)+	84
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ 239	190(20)	90(19)+	53
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ 1006	17(7)	ND	—
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CNRZ 394	55(7)	ND	—

* 没有明显不同, + $P < 0.01$; ND—没有作用。

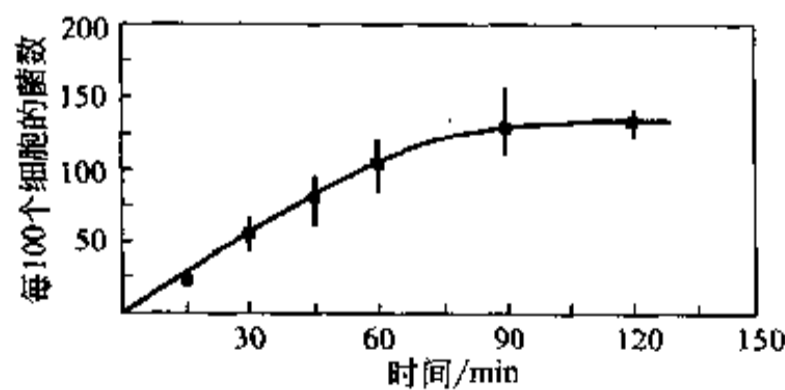


图 6-5 从人肠道分离的 *Lactobacillus acidophilus* 在 Caco-2 细胞上的结合动力学

结合; 菌用过碘盐单独处理表明: 细胞表面的碳水化合物成分可能参与或促进菌体对 Caco-2 细胞的黏着。在 100℃ 以下黏着不受温度影响, 大于 100℃ 细菌被杀死, K-甘露糖、L-果糖和 D-半乳糖的添加对 LB 菌的黏着没有影响。

表 6-8 *L. acidophilus* LB 的细胞或培养上清液经过处理后对其与 Caco-2 细胞结合的影响

情况	菌	废弃肉汁	黏着菌	下降/%
控制组	—	—	215(16)	
单独组	—	—	37(10)	83
新鲜培养基	—	—	31(5)	86
胰蛋白酶 ^①	+	+	20(3)	91
pronase ^②	+	+	33(5)	85
pronase	—	+	27(6)	87
胰蛋白酶	—	+	43(7)	80
胰蛋白酶	+	—	190(15)	12
100℃加热	+	+	194(25)	10
100℃加热	—	+	170(14)	21
间过碘酸盐 ^③	+	—	145(10)	32
D-甘露糖 ^③	+	—	86(15)	60
L-果糖	—	—	195(20)	9
D-半乳糖	—	—	190(15)	12
	—	—	200(13)	7

① 胰蛋白酶 (2.5mg/ml) 或 pronase (2.5mg/ml), 37℃, 60min, 后失活;

② 用 50mmol/L 的过碘酸盐预培养 30min;

③ 最终浓度达 100mmol/L 时产生潜在抑制作用。

L. acidophilus LB 对 Caco-2 细胞的结合受细胞分离的影响, 这种黏着和 Caco-2 细胞培养物的年龄 (时间) 有关 (如图 6-6)。

在 5 天后的培养物中, 阳性蔗糖酶~异构麦芽糖酶对细胞免疫反应活性的比例低于 4%, 如图 6-6 所示 (图 a), 表明小比率的细胞进行了分化, 在培养物后期免疫反应活性增加 (图 b), 15 天后 Caco-2 的 90% 分化 (图 c), *Lactobacillus* 结合的发展和分化开始是平等进行的, 在培养的第一天 LB 在 Caco-2 细胞上没有黏着, 菌黏着出现在第 9 天, 随后增加, 这表明 *Lactobacillus* 在 Caco-2 细胞分化过程中, 在刷状缘细胞质上和培养的人肠细胞相互作用。

Tuomola 等的研究表明: *L. casei* 是和 Caco-2 细胞结合能力最强的菌之一 (见表 6-9), 但 *L. casei* 的黏着和 *L. acidophilus* 1、*L. rhamnosus* Lc-705 和 *Lactobacillus* GG 间没有明显的不同, 与作为黏着阳性对照组的 *E. coli* B44 比较, 其黏着性基本相同; 而 *L. casei*、*L. acidophilus* 1、*L. rhamnosus* LC-705、*Lactobacillus* GG、*L. rhamnosus* ATCC7469、*L. rhamnosus* 和 *L. plantarum* ATCC8014 的 Caco-2 细胞结合能力优于作为阴性对照组的 *E. coli* H10407。

全部测试的 *Lactobacillus* 的结合均依赖于菌的数量 (见图 6-7), 结合于 Caco-2 细胞培养物的菌数与添加的乳杆菌数量成正比, 它们的饱和浓度在 Tuomola 等的研究没有达到。

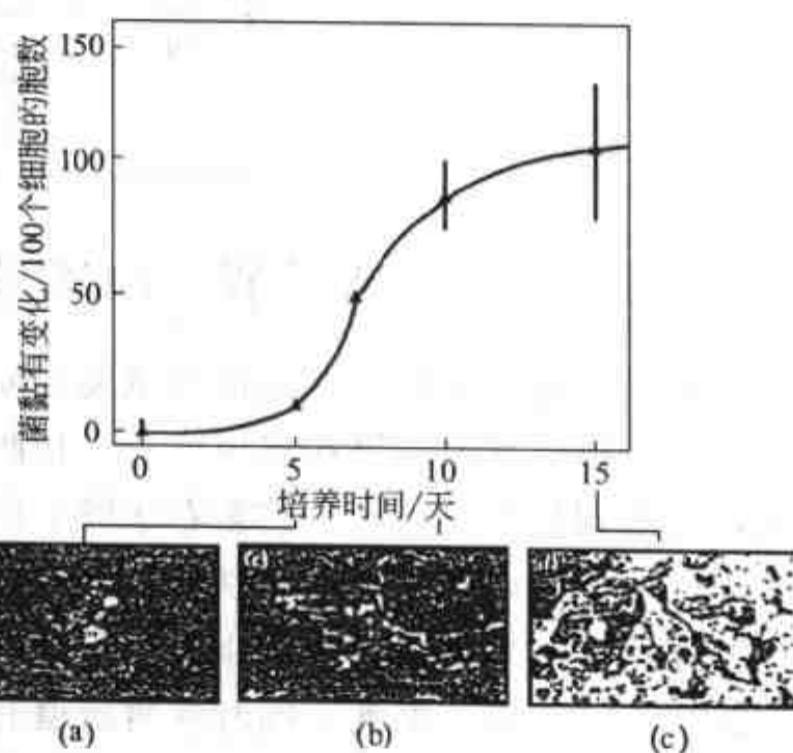


图 6-6 *L. acidophilus* LB 对 Caco-2 细胞的黏着与 Caco-2 细胞培养物年龄 (时间) 的关系

表 6-9 各种菌对人肠上皮 Caco-2 细胞的结合能力

菌	API CHL(4.0)识别	黏着率/%(±标准方差)
<i>L. casei</i> (Fyos, Nutricional)	<i>L. rhamnosus</i>	14.4±3.9
<i>L. acidophilus</i> 1 (LCl, Nestle)	<i>L. acidophilus</i>	12.6±2.5
<i>L. rhamnosus</i> LC-705	<i>L. rhamnosus</i>	9.8±1.8
<i>Lactobacillus</i> GG ATCC 53103	<i>L. rhamnosus</i>	9.7±3.3
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	<i>L. rhamnosus</i>	7.4±1.5
<i>L. rhamnosus</i> (human faecal isolate)	<i>L. rhamnosus</i>	7.2±1.6
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. plantarum</i>	6.7±1.4
<i>L. casei</i> (BIO, Danone)	<i>L. paracasei</i>	4.8±1.3
<i>L. casei</i> Imunitass(Actimel, Danone)	<i>L. paracasei</i>	4.4±1.1
<i>L. casei</i> 01 (Starter culture, Chr. Hansen)	<i>L. paracasei</i>	4.3±1.3
<i>L. casei</i> Shirota(Yakult, Yakult)	<i>L. paracasei</i>	3.2±0.52
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> (Lactophilus, Laboratoires Lyocentre)	<i>L. rhamnosus</i>	2.6±0.69
<i>E. coli</i> B44 (negative control)		4.0±0.43
<i>E. coli</i> H10407 (positive control)		14.2±5.0

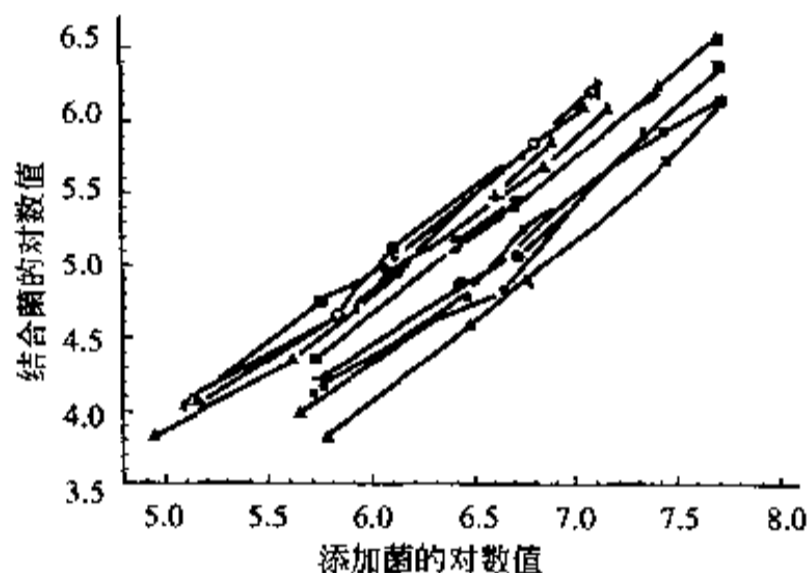


图 6-7 *Lactobacillus* Caco-2 细胞黏着的菌浓度依赖性

第三节 LGG 菌在人粪便中的检出

定殖性是进入胃肠道有益菌的重要性质，目前已有许多乳酸菌制备物和发酵乳的治疗和预防效果的报道，但如果在胃中或十二指肠中有益菌不能存活，它们就不可能影响肠道菌群平衡，当菌到达十二指肠，它黏着于肠上皮细胞定殖于肠道是重要的，一般认为通过胃、小肠的 *Lactobacillus* 的存活比率为 1.3%，故不会有足够可利用的细胞定殖于肠道。

发酵乳中的活菌数通常约 10^8 cfu/ml，故 100~200ml 的产品可提供 10^{10} ~ 10^{11} cfu 的活菌，发酵乳（酸奶、酪乳）同时含对肠道有生理作用的代谢物质。以临床应用的有益乳酸菌多以冷冻干燥或干粉形式存在，它们通常含 10^6 ~ 10^9 cfu/胶囊。

Saxelin 等的研究表明：人服用 LGG 制剂前粪便中没有 LGG 菌存在，口服 10^5 ~ 10^8 cfu 剂量的 LGG 时，粪便中也不能检测到有 LGG 存活，当口服 LGG 的量达 10^9 cfu 时，7 个人中有 2 人粪便中 LGG 的量达 10^3 ~ 10^4 cfu/g，其他粪便中不存在 LGG（但应注意 LGG 的测定极限是 10^3 cfu/g 粪便）。当口服 LGG 的量达 10^{10} cfu/天，所有人粪便中均有 LGG 定殖，但有 1 个人是在口服的 2、3、4 天定殖的，粪便中 LGG 的平均量为 10^5 ~ 10^6 cfu/g 粪便。

口服 10^{10} cfu/天，LGG 冷冻干燥产品后粪便中 LGG 的量如图 6-8、图 6-9 所示。图 6-10、图 6-11 是口服 10^{11} cfu/天 LGG 其他冷冻干燥粉后粪便中 LGG 的情况，发现 LGG 的定殖率和量变化不大。

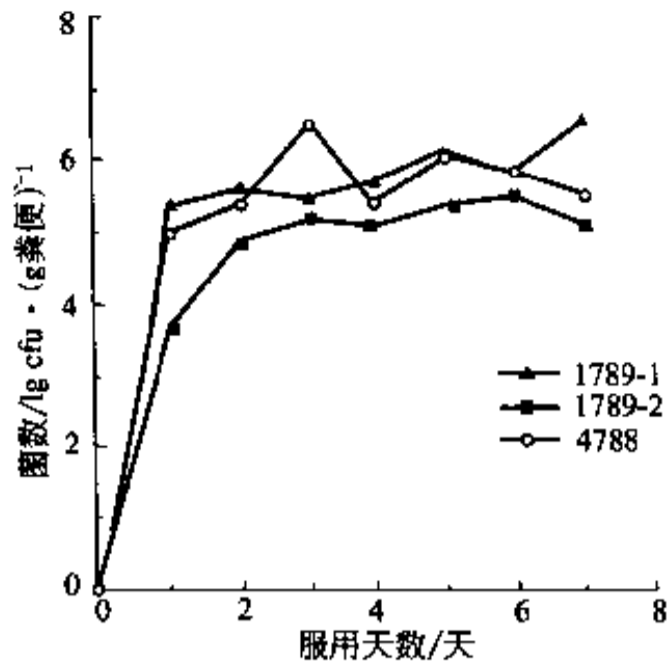


图 6-8 口服 10^{10} cfu/天不同冷冻干燥 LGG 粉后粪便中 LGG 的量
(每个值是口服 LGG 定殖人的平均值)

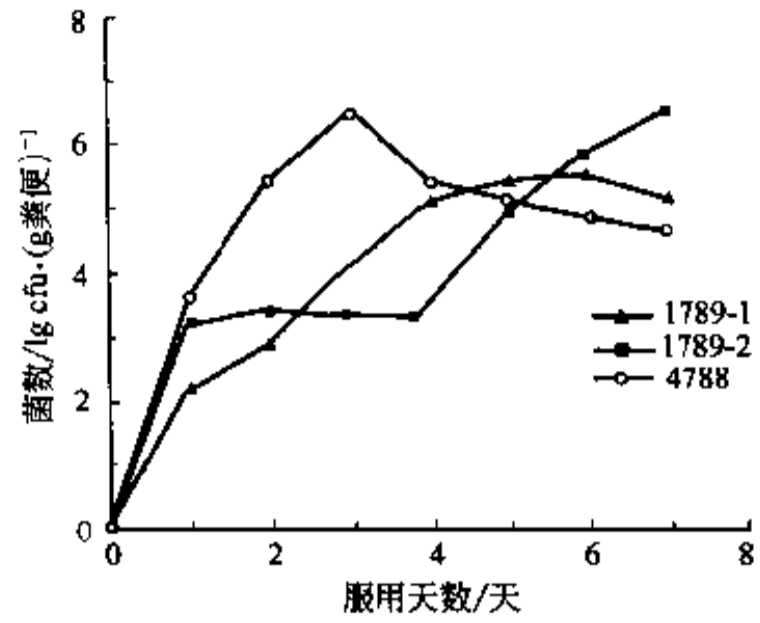


图 6-9 口服 10^{10} cfu/天不同冷冻干燥 LGG 粉后粪便中 LGG 的量
(每个值是 7 个人的平均值)

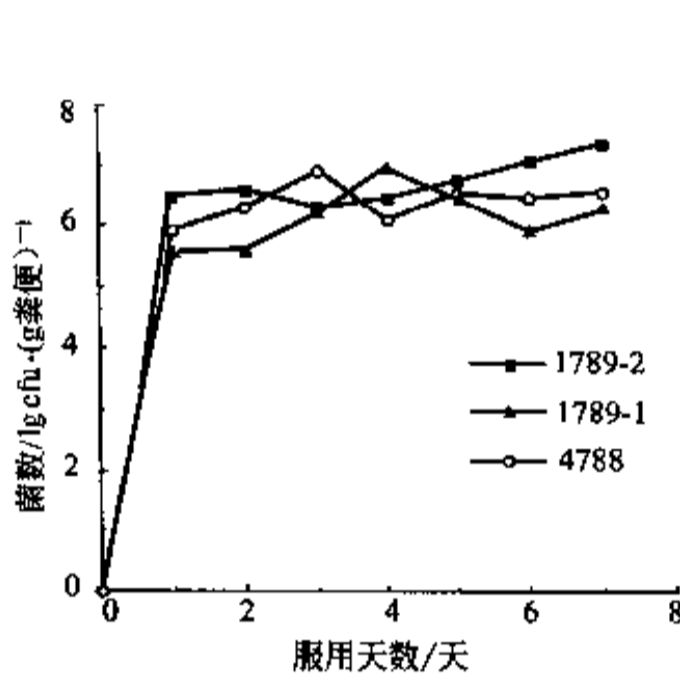
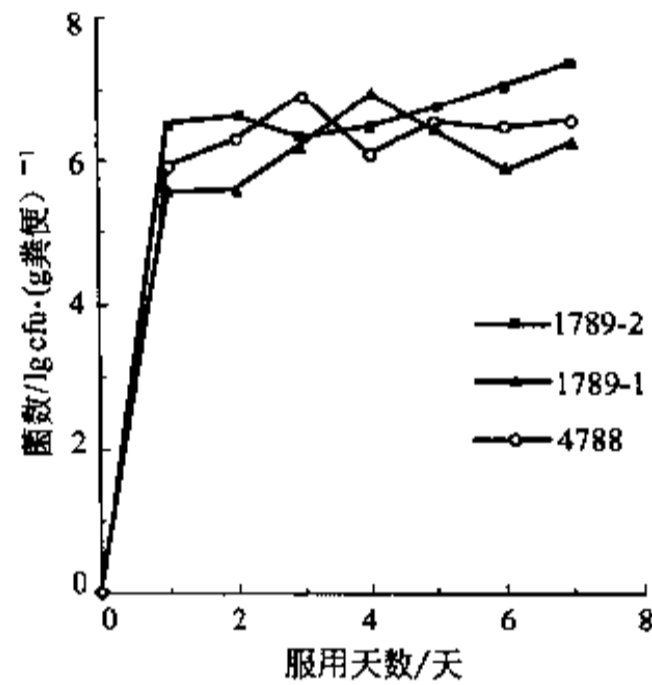


图 6-10 口服 10^{11} cfu/天不同冷冻干燥 LGG 粉后粪便中 LGG 的量
(每个值是口服日 LGG 定殖人的平均值)



Saxelin 等对口服 LGG 胶囊后粪便中 LGG 的定殖情况进行研究, 其结果如表 6-10 所示。在口服高剂量的 LGG 人粪便中均发现 LGG 的存在, 低剂量的 LGG 服用仅在服用末期发现一个人粪便中有 LGG 存在, 口服 LGG 不会明显改变粪便中 Lactobacilli 的总数, 这和 Saxelin 的早期研究结果是一致的。

Chauvierre 等报道了 LGG 对 Caco-2 细胞的结合具有高度钙依赖性, 这种结合性质对其对肠道的定殖有重要作用。Saxelin 等除研究胶囊、冷冻干燥粉的 LGG 服用效果外, 还对天然发酵的 LGG 乳制品的口服效果进行了评估, 结果如表 6-11 所示。从中可以看出口服 1~4 个 LGG 的片剂后, 粪便中 LGG 的量分别为 1.1×10^6 cfu/g 和 1.7×10^6 cfu/g, 口服 8 片时达 $8.3 \times$

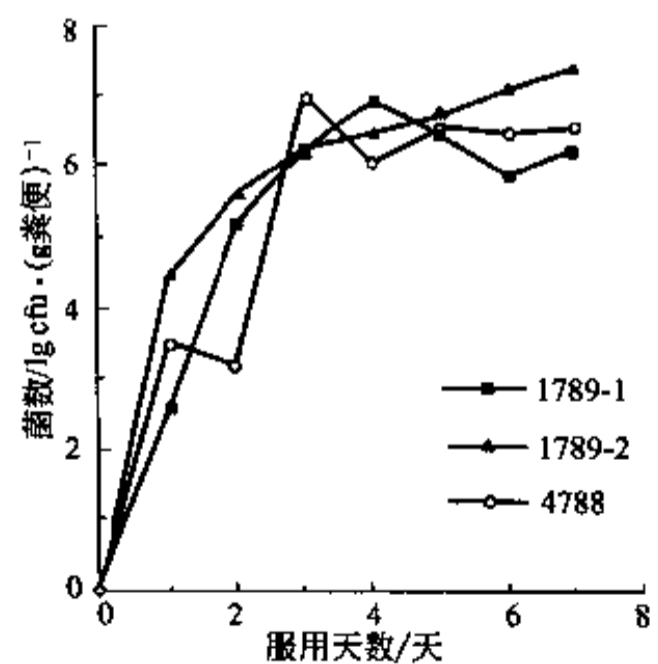


图 6-11 口服 10^{11} cfu/天不同冷冻干燥 LGG 粉后粪便中 LGG 的量
(每个值是 7 个人的平均值)

表 6-10 在口服 LGG(7 天,以 1.6×10^8 或 2×10^{10} cfu/天)后健康人粪便中的 Lactobacilli 量

cfu/天	0 天		3 天		5 天		7 天	
	总乳杆菌	LGG	总乳杆菌	LGG	总乳杆菌	LGG	总乳杆菌	LGG
1.6×10^8 low dose	1.5×10^8 ($10^5 \sim 1.5 \times 10^8$) ^d	n. d. ^b	1.7×10^7 ($10^7 \sim 2.6 \times 10^7$)	n. d.	2.8×10^8 ($1.5 \times 10^6 \sim 3.8 \times 10^8$)	n. d.	8.0×10^7 ($10^8 \sim 2.1 \times 10^7$)	10^{3c} (n. d. $\sim 10^3$)
1.2×10^{10} high dose	9.2×10^7 ($10^5 \sim 3.4 \times 10^7$) ^d	n. d.	2.1×10^8 ($1.8 \times 10^7 \sim 4.9 \times 10^8$)	2.0×10^6 ($10^3 \sim 5.6 \times 10^6$)	2.5×10^8 ($10^6 \sim 10^9$)	1.5×10^6 ($10^4 \sim 10^7$)	9.8×10^7 ($5.3 \times 10^5 \sim 2.9 \times 10^8$)	1.2×10^5 ($10^3 \sim 2.9 \times 10^5$)

注: a. cfu/g 粪便; b. 没有发现 (n. d., not detected); c. 仅在一个样品中发现; d. 括号中指范围。

表 6-11 在口服片剂和发酵剂过程中平均粪便中 LGG 的浓度 (lgcfu/g \pm SD)

天/剂量 (cfu/天)	1 片 (1×10^9) n=8	4 片 (4×10^9) n=10	8 片 (8×10^9)	发酵乳 (2.1×10^9) n=10	发酵剂 (1.2×10^{10}) n=7
0	ND	ND	ND	ND	ND
3	5.93 ± 0.83	6.16 ± 0.65	6.71 ± 0.65	4.89 ± 1.78	7.38 ± 0.83
5	6.11 ± 1.02	6.17 ± 0.90	6.89 ± 0.72	5.47 ± 0.42	7.07 ± 0.94
7	6.21 ± 0.91	6.34 ± 0.78	6.99 ± 0.77	5.43 ± 0.51	7.27 ± 0.88

注: ND—没有发现, 测定极限 10^3 cfu/g。

10^6 cfu/g, 随着服用片剂量的增加, 粪便中 LGG 量略有增加, 但不具有统计学意义上的差异性。当饮用 1.2×10^{10} cfu/天和 2.1×10^9 cfu/天的发酵乳制品时, 粪便中 LGG 的量存在明显的差异, 其粪便中 LGG 的量分别为 1.7×10^7 cfu/g 和 1.8×10^5 cfu/g。对片剂和发酵乳的比较可以看出, 若服用相同水平的 LGG 产品, 二者粪便中 LGG 量没有大的差异。

Alander 等进行口服 LGG 饮品实验, 当口服饮品后所有人粪便中均发现 LGG 菌的存在,

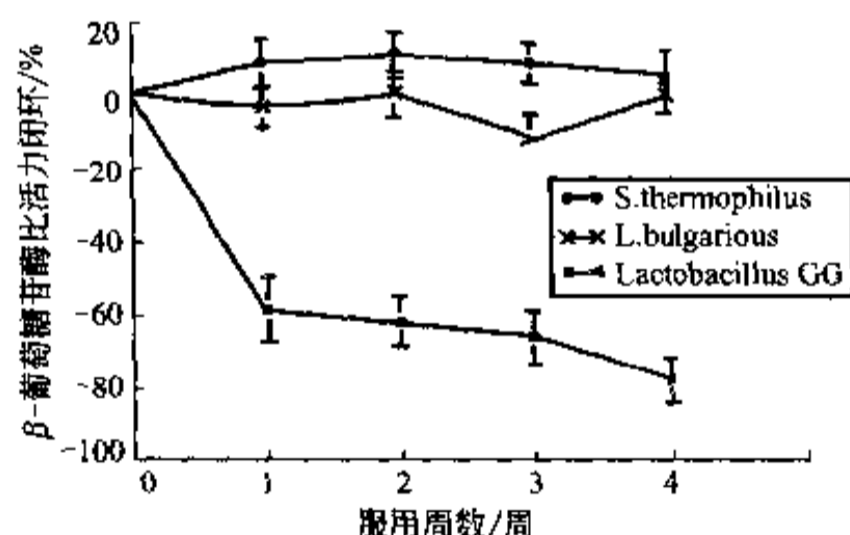


图 6-12 LGG、*S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 对 β -葡萄糖醛苷酶的活性的影响

口服 12 天后, 粪便中 LGG 量达 8×10^7 cfu/g, 成为粪便中的优势菌, 好氧菌和厌氧菌数分别由 8×10^5 增至 8×10^7 (好氧菌), 1×10^7 变为 8×10^7 (厌氧菌), 排便过程中所有菌 (好氧、厌氧、乳酸菌、LGG) 均呈下降趋势。

Goldin 等研究氨苄青霉素 (Ampicillin) 对 LGG 的影响, 及 LGG 对粪便 β -葡萄糖醛苷酶活性的影响。口服治疗剂量的氨苄青霉素对粪便中 LGG 的回收没有大的影响, 但 LGG 在体外对氨苄青霉素非常敏感。口服

LGG 后, 粪便中 β -葡萄糖醛苷酶的活性下降, 4 周后其值低于原值近 80%, 但口服 *S. thermophilus* 或 *L. bulgaricus* 后 β -葡萄糖醛苷酶的活性没有变化, 这也表明 LGG 对人体的有益作用 (见图 6-12)。

第四节 LGG 对肠道菌群的影响

一、LGG 对早产儿肠道微生物的影响

早产儿肠道菌群不同于正常婴儿的微生物, Lactobacilli 和 Bifidobacteria 的肠道定殖被延迟, 早产儿应进行特殊护理以防止环境中细菌 (主要是病原菌) 的感染, 这期间最易引起

婴儿感染的是凝血酶阴性的 *Staphylococci* 和 *Enterobacteriaceae*，尤其是引起新生儿坏死性小肠结肠炎发病的 *Enterobacteriaceae*。

口服有益菌制剂（或产品）是诱导早产儿肠道有益菌群定殖的好方法之一，它能对早产儿产生菌群、代谢和临床方面的好处，也能防止其他菌在肠道的黏着和定殖。Lactobacilli 是应用最广泛的有益菌之一，它产生广谱性抗菌物质如有机酸、细菌素、microcins、reuterin、挥发性脂肪酸、 H_2O_2 、 H^+ 等。LGG 是能定殖于成人肠道、能用于多种肠道疾病治疗的有益菌，Millar 等报道了 LGG 对早产儿肠道菌群定殖的影响。

在 Rogosa 琼脂培养基中经 48h、37°C 培养后 LGG 产生具有特殊外观的菌落，该菌落呈分离、圆形、不透明的白色，直径为 2~4 毫米。

从早产儿粪便中分离的微生物包括：*Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Citrobacter* sp, *Proteus* sp 和 *Acinetobacter* sp)、*Staphylococci* (凝血酶阴性菌株和 *Staphylococcus aureus*)、酵母、*Enterococcus* sp, *Bacteroides* sp, *Clostridium* sp, *Veillonella* sp, *Bifidobacterium* sp, 和其他未知的厌氧或微需氧 Gram 阳性杆菌、芽孢菌和 LGG (*Lactobacillus GG*)，在口服 LGG 一周后，口服 LGG 组和未口服 LGG 组粪便中除 LGG 外其他菌的定殖情况基本相同，这包括 *Enterobacteriaceae*、凝血酶阴性 *Staphylococci*、*Enterococcus* sp 和厌氧菌。在口服 LGG 中断后粪便中 LGG 的数量和比例下降。

在喂养和不喂养 LGG 组间换氧次数、慢性肺炎的几率、体重获得、其他菌的定殖方面均无明显差异，说明 LGG 对早产儿而言它可以在其肠道定殖，但它并没有减少粪便中病原菌的量或增加有益菌的量，故认为 LGG 对早产儿而言有很少或没有临床方面的有益作用，这和 Reumann 等的结果是一致的。Marini 等的报道和上述结果相反，他们的研究结果认为经口服 LGG 后好氧菌和厌氧菌的比率进一步下降，口服 10 次和 15 次后真菌（霉菌）比例分别下降了 10.9% 和 32.2%，服用 LGG 后 Gram 阳性菌和 Gram 阴性菌之比上升，这种结果的差异性可能缘于研究者喂食 LGG 菌的方式（剂量、时间）上的差异，故需进一步证实上述结果（具体值如表 6-12 所示）。Marini 等的研究认为 LGG 能在早产儿的肠道中诱

表 6-12 LGG 对早产儿肠道菌、IgA、IgM 的影响和定殖性

名称		服用次数				
		服用前	2 次	5 次	10 次	15 次
LGG(cfu/g 粪便)		<10	3.45×10^5	6.35×10^4 (-81.5%)	<10 (-100%)	<10 (100%)
IgM		0.108 ± 0.007	0.106 ± 0.013 (-1.8%)	0.119 ± 0.004 (10.1%)	0.227 ± 0.015 (110.1%)	0.277 ± 0.014 (156.4%)
IgA		0.130 ± 0.008	0.127 ± 0.008 (-2.3%)	0.133 ± 0.013 (2.3%)	0.227 ± 0.011 (74.6%)	0.339 ± 0.010 (160.7%)
真菌	对照组	1.65×10^7	2.24×10^7 (36%)	2.54×10^7 (53.7%)	2.73×10^7 (64.4%)	2.89×10^7 (74.5%)
	服用组	2.54×10^7	3.95×10^7	4.35×10^7	3.87×10^7	2.94×10^7
好氧菌厌氧菌之比	对照组	0.96	0.94	0.89	0.88	0.78
	服用组	1	0.93	0.74	0.71	0.66
Gram 阳性与 Gram 阴性菌之比	对照组	0.98	1.01	1.05	1.14	1.19
	服用组	1.06	1.09	1.18	1.28	1.37

导乳杆菌的快速定殖，这和以前的研究结果是一致的，同时伴随着肠道 LGG 水平的下降，肠道专一性免疫球蛋白 IgM、IgA 的量上升。

Stansbridge 等研究了 LGG 对肠道发酵的影响，表明 LGG 的摄入对短链脂肪酸、乙醛、尿、2,3-丁二醇的代谢没有太大的影响，故认为 LGG 在这方面没有重要的生理意义。

二、LGG 对新生儿及 1~3 岁婴儿胃肠道菌群的影响

(一) LGG 对新生儿胃肠道菌群的影响

新生儿肠道的防护机制主要和 Bifidobacteria 的定殖相关，近年来人们发现在早期婴儿的粪便中 Lactobacilli 占有重要的比例，Seppo 等研究了 LGG 在健康新生儿肠道的定殖和口服 LGG 对肠道正常菌建立的影响。

LGG 在新生儿肠道的定殖情况如表 6-13 所示。LGG 喂食 3~7 天后，其值介于 4.8~8.5 对数 cfu/g 粪便，在 1 个月时明显增加，达 7.4~9.0 对数 cfu/g 粪便，LGG 对 Lactobacilli 总数的影响在个体间有较大的差异。

表 6-13 新生儿粪便中总的 Lactobacilli 和 *Lactobacilli rhamnosus* GG 的数量 (lg cfu/g)

新生儿序号 (喂养 LGG)	3~7 天		28~31 天	
	总的 Lactobacilli	<i>L. rhamnosus</i> GG	总的 Lactobacilli	<i>L. rhamnosus</i> GG
1	8.5	8	9.4	9
2	5	4	9	8.9
3	8.7	5.6	4	0
4	5	0	8.8	8.8
5	6.9	6.9	9.5	9
6	8.4	8	8.9	0
7	8.7	8.5	9.5	9
8	9.6	8	8.6	7.5
9	8.5	8.4	8.4	7.4
10	8.7	8.4	9.8	8.5

在新生儿粪便中最常分离的微生物是 Coliform (26%)、Bacteriodes (27%)、Bifidobacteria (28%)，Coliforms 的最大对数值为 11.1 cfu/g，Bifidobacteria 为 9.1cfu/g，Lactobacilli 的分离比例为 11%，其发现的几率低于常见菌。出生 3~4 天的新生儿若喂食 LGG，Coliforms 的发现几率为 67%，Lactobacilli 为 89%，其数量超过了对照组。5~7 天时情况相似，第一个月末喂养 LGG 组 Bifidobacteria 定殖明显好于对照组。

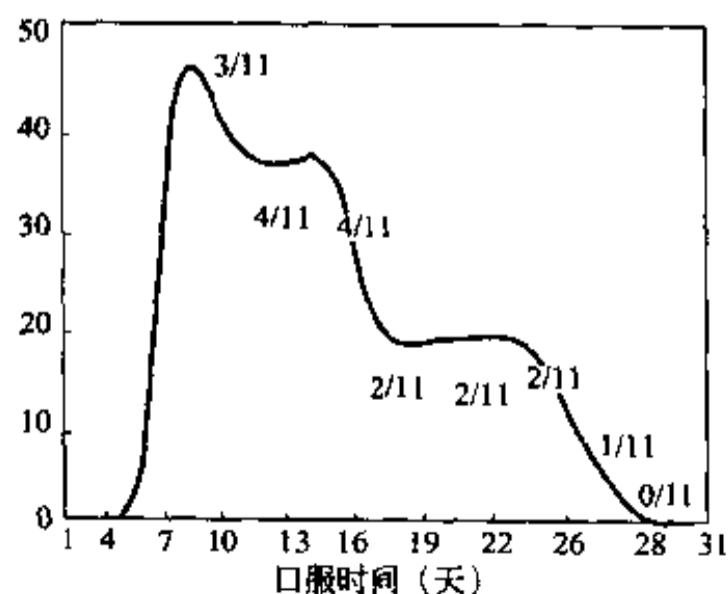


图 6-13 LGG 在 1~3 岁婴儿肠道中的定殖

(二) LGG 对 1~3 岁婴儿胃肠道的定殖

Sheen 等进行的 1~3 岁婴儿肠道 LGG 定殖情况如图 6-13 所示。口服的儿童数 11 人，口服时间 10 天，观察期 31 天，每 3 天测定一次，结果表明 1~3 岁儿童在 LGG 服用期间，从第 4 天始肠道有 LGG 的大量定殖，在服用的 10 天内定殖比例为 35%~45%，随着 LGG 服用的停止，肠道内 LGG 的量随着时间的延长而呈下降趋势，28 天以后 LGG 在所有人的肠道中消失，说明在 1~3 岁婴儿肠道 LGG 定殖和口服 LGG 间的依存关系。

三、LGG 对成人肠道菌群的影响

LGG 对成人粪便菌群的影响 Hosoda 等、Benno 等均有较详细的报道，他们的结果是相似的。

Hosoda 等对 8 名健康成人分别喂食 90g 或 300g LGG 酸奶，对粪便中总菌数、厌氧菌/好氧菌比率，*Bacteroides*、*Eubacterium*、*Peptostreptococcus*、*Bifidobacterium*、*Bifidobacterium* 在总数中的比率，*Veillonella*、*Megasphaera*、*Clostridium*、*Lactobacillus* 总数、LGG、*Enterobacteriaceae* 和 *Enterococcus* 的变化进行了测定，其结果如表 6-14 所示。在 10 天的测试期间总菌数没有变化，食用发酵乳的所有人均在粪便中检出 LGG 菌，厌氧菌和好氧菌之比增加了 2.5~4.0 倍，*Bifidobacteria* 在总菌中的比例增加。*Lactobacilli* 的总数增加，这主要缘于 LGG 的摄入，摄入 LGG 后（每日食用 300g/日的酸奶）*Clostridium* 减少。

表 6-14 LGG 酸奶(LGG 1.5×10^8 cfu/ml)对健康人粪便菌群和性质的影响

微生物	(1)摄入前	(2)摄入中(90g/天)	(3)摄入后
Total count	10.3±0.2	10.4±0.2	10.3±0.3
Bacteroidaceae	10.0±0.1(100)	10.0±0.3(100)	9.9±0.2(100)
Eubacterium	9.6±0.4(100)	9.5±0.6(100)	9.4±0.4(100)
Peptostreptococcus	8.9±0.9(63)	9.2±0.4(75)	9.4±0.6(75)
<i>Bifidobacterium</i>	9.5±0.2(100)	9.9±0.3(100)	9.2±0.9(100)
Bifidobacteria%	16.9±6.6	36.0±16.4	18.4±9.8
<i>Veillonella</i>	9.5±0.3(25)	9.5±0.3(25)	9.6(13)
<i>Megasphaera</i>	ND	ND	8.6
Clostridia(lecithinase+)	4.1±1.5(38)	5.0(13)	3.9±1.8(75)
Clostridia(lecithinase-)	8.7±0.5(100)	7.1±1.7(100)	7.9±2.3(88)
Lactobacilli (total)	5.2±1.2(100)	6.8±0.7(100)	5.5±0.9(100)
<i>Lactobacillus GG</i>	ND	6.5±0.6(100)	ND
Lactobacilli (other)	5.2±1.2(100)	6.4±1.0(100)	5.5±0.9(100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	7.3±1.2(100)	6.6±1.0(100)	7.1±0.9(100)
Enterococci	7.0±1.1(100)	7.2±1.0(100)	7.2±0.9(100)
Percentage of moisture	71.2±10.3	77.2±8.4	73.5±8.1
pH	6.9±0.7	6.5±0.7	6.9±0.7
fecal ammonia($\mu\text{g/gm}/\text{feces}$)	965.8±424.9	658.7±351.5	686.8±365.2

LGG 酸奶的摄入不仅对肠道菌群产生影响，也影响粪便的水分、pH 和氮含量（如表所示）其中水分、pH 变化不大，氮含量在摄入期有明显减少。

第五节 LGG 的抑菌性和产生的抑菌物质

一、LGG 产生的抑菌物质和其抑菌活性

Silva 等、Yang 等对 LGG 产生的抗菌物质进行了研究。Silva 等发现 LGG 产生的抑制物质对 *E. coli*、*Streptococcus*、*Pseudomonas*、*Salmonella*、*Bacteroides fragilis*、*Clostridium* 和 *Bifidobacterium* 有抑制作用，这种抑制作用的结果如表 6-15 所示。

LGG 对 *E. coli* 总是在厌氧情况下表现出更大的抑制活性，即比有氧情况下产生更大的抑制范围，LGG 对任何 *Lactobacillus* 没有抑制活性。抗菌物质的活性有效区间为 pH=3~5，当 pH 达 5.3 时，抑制活性消失，当 pH 再次下降时其活性得以恢复。LGG 的 10 倍浓缩物经 90℃、1 小时和 121℃、15 分钟的热处理仍保持很好的活性，它对下列蛋白酶呈稳定性：胰蛋白酶、蛋白酶 K、 α -胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶、羧肽酶 A 和 *S. griseus* 蛋白酶。

表 6-15 *Lactobacillus* GG 10 倍浓缩物对其他菌抑制作用

抑制菌	在下列抑制区域(直径 mm)出现的菌株数						
	0	7	10	12	14	16	>16
<i>Bifidobacterium</i> spp(1)				1			
<i>Escherichia coli</i> (11)			4	7			
<i>Streptococcus</i> spp(12)				8	4		
<i>Pseudomonas</i> spp(2)			2				
<i>Salmonella</i> spp(2)		2					
<i>Lactobacillus</i> (9)	9						
<i>Bacteroides fragilis</i> (8)				3	2	1	2
<i>Clostridium</i> spp (18)			4	5	7	2	

Silva 等并没有对 LGG 所产生的抑菌物质的性质进行研究, 只知道它是一种低分子量, 对 Gram 阳性和 Gram 阴性菌, 包括乳酸菌均有抑制性的广谱抑菌物质, 加之它抑菌的最适 pH 很窄, 推测它为短链脂肪酸。

Yang 等后来的研究表明乳酸菌除产生细菌素、有机酸、 H_2O_2 、二乙酰等抗菌物质外, 还产生一种叫做 2-吡咯烷-5-羧基酸, 即焦谷氨酸的环状氨基酸类抗菌物质 (2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid, PCA), Huttunen 等首次对其从 *L. casei* 中进行了分离纯化, 后来 Yang 等对其抑菌谱进行了研究, 他们发现的能产生 PCA 的乳酸菌如表 6-16 所示, PCA 的抑菌活性受 pH 的影响, 降低介质中的 pH 有助于增强 PCA 的活性, 当 pH 值 >3.8 时, 1% 和 2% PCA 对三种被测试的细菌都不具有抑菌作用 (见表 6-17)。PCA 的抑菌谱如表 6-18 所示, 除乳酸菌和 *Enterococcus faecalis* 外, 2% PCA 对其他腐败菌均表现出不同程度的抑制 (pH2.24), *E. cloacae* 1575、*P. fluorescens* KJLG 和 *P. putida* 1560-2 受 1% PCA (pH2.39) 抑制, 0.5% PCA 在 pH2.24 时对 *E. cloacae*1575 和 *P. putida*1560-2 也能抑制。

表 6-16 产生 PCA 的乳酸菌

菌种	生长情况
<i>Lactobacillus</i> spp.	
acidophilus NCFB Lb 1748	MRS, 30°C, 25h
casei C	MRS, 30°C, 25h
casei subsp. casei LC-10	MRS, 37°C, 72h
casei LC1/6-1	MRS, 30°C, 25h
casei HHIROTA	MRS, 37°C, 25h
delbrueckii subsp. delbrueckii strain 13s	MRS, 37°C, 25h
helveticus	MRS, 37°C, 45h
lactis KKNO 1134 Lb78	MRS, 37°C, 25h
lactis subsp. bulgaricus KKNO 312 Lb389	MRS, 37°C, 25h
paracasei subsp. paracasei Lb1931	MRS, 37°C, 72h
reuteri DSM20016	MRS, 30°C, 25h
rhamnosus GG	MRS, 37°C, 24h
rhamnosus LC-705	Whey permeate, 30°C, 48h
riococcus spp.	
strain VN13	MRS, 30°C, 24h
strain VN18	MRS, 30°C, 24h
strain 435	MRS, 30°C, 24h
strain 4025	MRS, 30°C, 24h
strain 4035	MRS, 30°C, 24h

注: KKNO=Valio 发酵培养物, 芬兰。

表 6-17 pH 对 PCA 抑制活性的影响

PCA 抑制						
pH	<i>P. putida</i> 1560-2		<i>E. cloacae</i> 1575		<i>P. fluorescens</i> KJLG	
	1%PCA	2%PCA	1%PCA	2%PCA	1%PCA	2%PCA
对照	++	+++	+	+++	+	++
2.5	++	++	+	++	+	+
3.0	++	++	+	+	-	+
3.5	+	+	-	+	-	-
3.8	-	+	-	-	-	-
4.0	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-	-	-

注: +++—>12mm 抑制区域; ++—10~12mm; +—<10mm; ——没有抑制; 对照—1%PCA (pH2.39) 或 2%PCA (pH2.24)。

表 6-18 PCA 的抑菌谱

被测试的细菌	生长情况	PCA		
		0.5%	1%	2%
<i>Bacillus</i>				
<i>subtilis</i> 1205	BHI, 30℃	-	-	+
<i>subtilis</i> MCM-1	BHI, 30℃	-	-	+
<i>Escherichia</i>				
<i>coli</i> 3260	BHI, 30℃	-	-	+
<i>coli</i> 3338	BHI, 30℃	-	-	+
<i>coli</i> ECM1	BHI, 30℃	-	-	+
<i>coli</i> ECM2	BHI, 30℃	-	-	+
<i>Enterobacter</i>				
<i>aerogenes</i> KKNO 1584	BHI, 30℃	-	-	+
<i>agglomerans</i> KJL-L	BHI, 30℃	-	-	+
<i>cloacae</i> 1575	NB, 37℃	+	+	+++
<i>cloacae</i> KJL12	BHI, 30℃	-	-	+
<i>cloacae</i> KJL7	BHI, 30℃	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	M17, 37℃	ND	-	-
<i>Klebsiella</i>				
<i>ozaenae</i> KJL 15	BHI, 30℃	-	-	+
<i>sakazakii</i> KJL B	BHI, 30℃	-	-	+
<i>Lactobacillus</i>				
<i>brevis</i>	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>buchnerii</i> 205	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 8s KKNO 1848	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>fermentum</i>	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>Leuconostoc</i>				
<i>dextranicum</i> 5C	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>mesenteroides</i> 1C	MRS, 37℃	ND	-	-
<i>Pseudomonas</i>				
<i>fluorescens</i> KJLG	BHI, 30℃	-	+	++
<i>putida</i> 1560-2	NB, 25℃	++	++	+++

注: +++—抑制区域>12mm; ++—10~12mm; +—<10mm; ——没有抑制; ND—没有发现。

PCA 经 63℃、30min, 72℃、15s 和 121℃、20min 热处理抑菌活性没有变化, 但 pH 上升 PCA 活性下降, 在 pH=3.5 时对 *P. fluorescens* KJLG 的抑制作用消失, 在 pH=3.8

时对 *E. cloacae* 1575 和在 pH=4.6 时对 *P. putida* 1560 PCA 也失去抑制作用 (见表 6-17)。

PCA 浓度变化对菌抑制作用的影响如表 6-19 所示, PCA 浓度增加导致其抑菌活性的上升, *P. putida* 1560-2 和 *E. cloacae* 1575 分别被 0.075% (pH=5.44) 和 0.10% (pH=5.08) PCA 完全抑制, *P. fluorescens* KJLG 和 *Bacillus subtilis* 1205 对 PCA 不敏感, 当浓度分别达 0.25% (pH=5.89) 和 0.3% (pH=5.50) 时才被抑制。

表 6-19 PCA 在液体培养基中的抑菌活性

浓度	pH		PCA 抑制			
	NB	BHI	<i>P. putida</i> 1560-2	<i>E. cloacae</i> 1575	<i>P. fluorescens</i> KJLG	<i>B. subtilis</i> 1205
0.50%		4.53	+	+	+	+
0.40%		4.87	ND	ND	ND	+
0.30%		5.50	ND	ND	+	+
0.25%	4.21	5.89	+	+	+	-
0.15%	4.70	6.55	+	ND	-	-
0.10%	5.08	6.81	+	+	-	-
0.085%	5.27		+	-	ND	ND
0.075%	5.44		+	-	ND	ND
0.05%	5.89		-	-	-	-
对照	7.04	7.35	-	-	-	-

注: +—抑制; -—没有抑制; ND—没有测定; 对照—没有 PCA 或乳酸在 NB 或 BHI 肉汁生长的菌。

和乳酸相比, 相同浓度的 PCA 抑菌性稍差, PCA 对 *E. cloacae* 1575 和 *B. subtilis* 1205 的生长抑制弱于乳酸, *B. subtilis* 1205 完全被 0.3% 的乳酸抑制, 相同浓度的 PCA 在 pH5.50 时具有强抑制作用, 此外, 0.15PCA (pH6.55) 不抑制 *P. fluorescens* KJLG 的生长, 此浓度的乳酸延缓了它的对数生长期。

二、LGG 对粪便中短链脂肪酸的影响

短链脂肪酸是人结肠厌氧菌代谢碳水化合物和蛋白质的主要最终产物, 粪便中 SCFAs (Short-chain fatty acids) 的浓度和分布变化可反映出肠道微生物的改变, 如抗菌素、碳水化合物的吸收不良或许多膳食均会引起这种变化。食用 LGG 产品会影响正常肠道菌的代谢活性, 这种作用伴随着几种酶活性的变化。

Siigur 等研究了患 *Shigellosis* 或 *Salmonellosis* 性痢疾患者口服 LGG ($10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/天, 10 天) 后粪便中 SCFA 的变化, 其结果如表 6-20 所示。痢疾患者粪便中 SCFA 的量很低, 醋酸仅在一个患者中发现, 占整个 SCFA 量的 77%, 异构化丁酸、戊酸、己酸仅在半数以下的患者中发现, 异构化己酸仅在一个患者的粪便中存在。Salmonellosis 型痢疾患者中许多酸的浓度低于 *Shigellosis* 患者, 这两组患者对乙酸、丙酸、戊酸均表现出较大的差异性。在服用 LGG 的第 5 天, SCFA 的量明显增加, 且两组患者间的差异性变小, SCFA 的总浓度、乙酸、丙酸和己酸量均高于服用 LGG 的第一天, 总的 SCFA 和乙酸已接近正常成人的水平。

抗菌剂的应用对 SCFA 的量没有重要影响, 在口服 LGG 10 天后 SCFA 达最高浓度, 总的 SCFA、乙酸、丙酸和丁酸的量较 5 天均有增长。痢疾是分泌于胃肠道的流体量和肠道上皮对这些流体再吸收间的不平衡引起的, SCFA 是缘于碳水化合物和蛋白质的发酵, 而蛋白质和碳水化合物是结肠的主要能量源, 正常情况下它们会刺激结肠对 Na^+ 和水的吸收。在急性痢疾患者粪便中 SCFA 的低浓度缘于膳食摄入的减少和肠道菌群的变化, 后者直接影响

表 6-20 痢疾患者粪便中的 SCFA 及其改变

时间和组别	SCFA 的浓度 (mmol/kg)							
	总量	乙酸	丙酸	异丁酸	正丁酸	异戊酸	正戊酸	正己酸
第一天 (n=24)全部	27.5 2.2~131.3	18.8 2.0~74.1	3.5 0~27.8	0 0~3.2	0.7 0~21.6	0.2 0~4.4	0 0~3.6	0 0~6.1
(n=10) Salmonellosis	12.4 2.2~112.0	5.9 2.0~72.4	1.2 1.0~13.8	0 0~1.3	1.3 0~21.6	0 0~1.6	0 0~1.4	0 0~6.1
(n=14) shigellosis	37.0 5.8~131.3	27.1 5.2~74.1	5.3 0.6~27.8	0.3 0~3.2	0.7 0~18.4	0.4 0~4.4	0 0~3.6	0 0~1.1
第 5 天 (n=25)全部	75.9 2.3~148.0	48.7 1.6~88.5	8.4 0~35.1	0.5 0~6.8	8.2 0~26.3	0.6 0~5.6	0 0~4.0	0 0~0.3
第 10 天 (n=28)全部	108.7 14.1~193.1	66.6 11.3~148.6	13.6 1.1~50.5	0.8 0~10.1	12.5 0.1~31.0	1.2 0~12.3	0.1 0~8.0	0 0~0.5
成人 ^a (n=93)	83.5 24.2~242.6	46.0 14.4~156.3	13.4 2.4~41.4	1.54 0.2~4.5	14.2 1.9~47.1	2.0 0.2~7.9	1.74 0~6.0	0.4 0~4.5

注: a 取自文献 63。

病原菌的侵入, 患者肠道菌群的一个显著特征是厌氧菌减少、好氧菌增加, 这会引起 SCFA 量的减少。

Elina 等报道 LGG 可抑制 *Salmonella typhimurium* 对 Caco-2 细胞的黏着, Sylvie 等也进行了相关报道。

第六节 LGG 菌的生理生化特性

一、LGG 菌的安全性

在传统食品中许多乳酸菌被看成安全性的有益菌, 如酸奶发酵菌 *S. thermophilus*、*Lactobacillus bulgaricus*。产品中天然存在、长期被食用的乳酸菌被认为是安全的, 不需要进行毒性实验, 随着新型乳酸菌引入发酵食品(乳品)及应用于医学领域, 这些乳酸菌应用安全性就显得日益重要和必要, 由于也有乳酸菌人体感染的报道, 研究 LGG 的安全性也是必要的。

对乳酸菌的毒性评价主要集中于它们引起感染的能力和口服该菌的毒性。Donohue 等对乳酸菌毒性研究的有关结果如表 6-21 所示, 他们应用鼠作为实验对象, 人和动物的口服 LD₅₀ 间存在一定的相关性, 据此可推断对于一个 70kg 的人而言, LD₅₀ 为 420g 冷冻干燥物(每克含乳酸菌 10¹⁰~10¹¹ cfu/g), 正常从发酵乳中摄入的乳酸菌为 10⁹~10¹⁰ cfu (10⁶~10⁹ cfu/ml 发酵乳), 对应 150~500g 酸奶, 摄入 10¹⁰ 数量级的乳酸菌即仅相当于 20g 干酪和 400g 酸奶或 1~2g 冷冻干燥物, 根本不会引起人体的危害。

表 6-21 各种乳酸菌的 LD₅₀ 值

乳 酸 菌	LD ₅₀ (g/kg 体重)	乳 酸 菌	LD ₅₀ (g/kg 体重)
<i>Streptococcus faecium</i> ^① AD1050	>6.6	<i>Lactobacillus casei</i> GG	>6.00
<i>Streptococcus equinus</i> ^①	>6.39	<i>Lactobacillus helveticus</i>	>6.00
<i>Lactobacillus salivarius</i> ^① AD0002	>6.62	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	>6.00
<i>Lactobacillus salivarius</i> ^① AD0001	>6.47	<i>Bifidobacterium longum</i>	>5

① 热处理制备物。

胃肠道菌包括 *Lactobacilli* 可能被进入血液循环，如口腔不卫生、胃肠道损伤或外科手术，故 LGG 能否对血小板凝集产生影响是 LGG 食用安全性的重要方面之一。Korpe 等研究了 LGG 菌和血小板凝集间的关系，发现 *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC7469)、*Lactobacillus rhamnosus* GG 或 *Enterococcus faecium* T2L6 不影响血小板的自发凝集，从而在这方面证明了 LGG 应用的安全性。

二、LGG 的菌落特征和糖代谢

(一) LGG 的菌落特征

当 LGG 菌在 MRS 琼脂培养基中培养时，其菌落具有特定的形态，这使它在混合培养物中易于辨认，LGG 在 MRS 琼脂培养基中的菌落特征如图 6-14、图 6-15 所示。

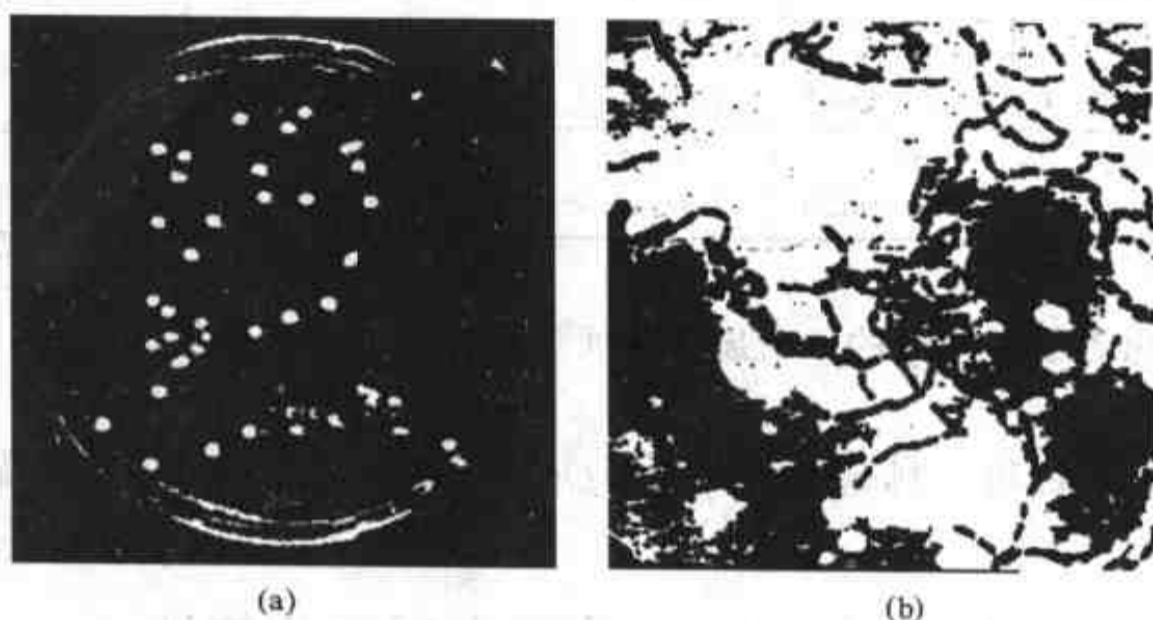


图 6-14 *Lactobacilli* 在 MRS 琼脂培养基上的形态

(大菌落 LGG 菌，小菌落是其他 *Lactobacillus*，如图 (a) LGG 菌的光学显微照片，革兰氏染色，如图 (b))

LGG 是厌氧菌，它在厌氧情况下能很好地生长，在有 CO_2 存在的情况下也能生长，

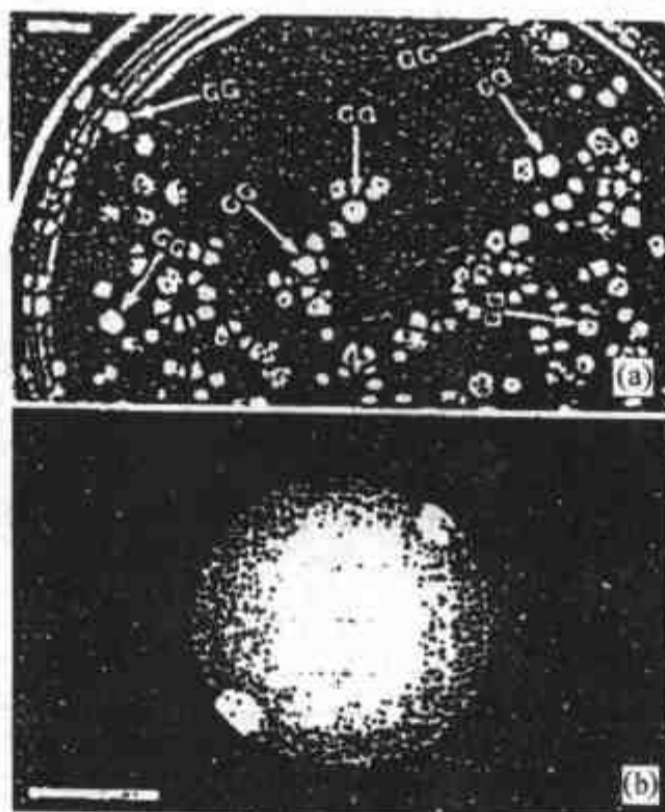


图 6-15 LGG 在 MRS 平板上的菌落

(a) 10mm; (b) 0.2mm

LGG 菌可溶性蛋白的电泳模式和 *L. casei* subsp. *rhamnosus* 相似，但它不同于那些不发酵乳糖、麦芽糖或蔗糖的亚种。LGG 菌产生的少量醋酸和大量乳酸，抗生素敏感性测试表明 LGG 对青霉素、氯林可霉素、红霉素、万古霉素、四环素和氯霉素敏感，而对灭滴灵有抗性，LGG 在 LBS 番茄汁琼脂和 MRS 琼脂培养基中生长呈现特定的形态学特征，这使其易于在含菌中辨认，在这两种培养基中 LGG 菌呈大的、奶油白色、不透明菌落，且散发奶油味。

(二) LGG 的糖代谢

Saxelin 等研究了多种 *Lactobacilli* 的糖代谢特征，乳酸菌的碳水化合物发酵和其生长温度、Gram 反应及细胞形态一起用于菌分类的指标，此外临床方面 *Lactobacilli* 的鉴定以 Gram 染色、过氧化物酶反应阴性和万古霉素抗性为基础，近年来又引入基因序列测

定作为鉴定依据，Saxelin 等有关 *L. casei*、*L. paracasei* 和 *L. rhamnosus* 的碳水化合物代谢特征如表 6-22 所示。表中数据可为 LGG 菌的鉴定提供部分依据。

表 6-22 Lactobacilli 的糖代谢

碳水化合物	<i>L. casei</i> cluster		<i>L. paracasei</i> cluster*					<i>L. rhamnosus</i> cluster						
	2	7	4	6	14	18	19	1	3	5	13	15	17	20
甘油	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
赤藓醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-阿拉伯糖	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
核糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-木糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿东糖醇	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
β -甲基-木糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-山梨糖	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
鼠李糖	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
甜醇	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
肌醇	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
甘露醇	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
α -甲基-D-甘露糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -甲基-D-葡萄糖苷	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
N-乙酰-葡萄糖胺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
扁桃苷	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
能果苷	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
马栗树糖苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
麦芽糖	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
蜜二糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
海藻糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菊粉	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
松二糖	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D-蜜三糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿米酮	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖原	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
木糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -龙胆二糖	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
松二糖	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
来苏糖	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
D-塔格糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-岩藻糖	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
D-阿拉伯糖醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯糖醇	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖酸盐	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2-十六烷基-葡萄糖盐	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-十六烷基-葡萄糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：数字代表不同来源的菌株，* 根据新的分类标准，*L. paracasei* 被建议归入 *L. casei*。

Tynkkynen 的研究表明, LGG 具有与万古霉素抗性相关的万古霉素抗性因子, 这是 LGG 菌的生理生化特征性质之一。糖肽类抗菌剂万古霉素 (Vancomycin) 成功地用于阳性菌引起的严重感染, 尤其是 *Enterococci* 和 *Staphylococci* 的感染。

三、LGG 菌的酶体系和相关生理作用

(一) LGG 菌的酶体系

LGG 菌典型的酶体系如图 6-16 所示。LGG 菌有强烈的亮氨酸和缬氨酸胺酶活性, 酯酶和脂肪酶的活性较低, LGG 有较高的胰凝乳蛋白酶活性, 但胰蛋白酶活性较低。

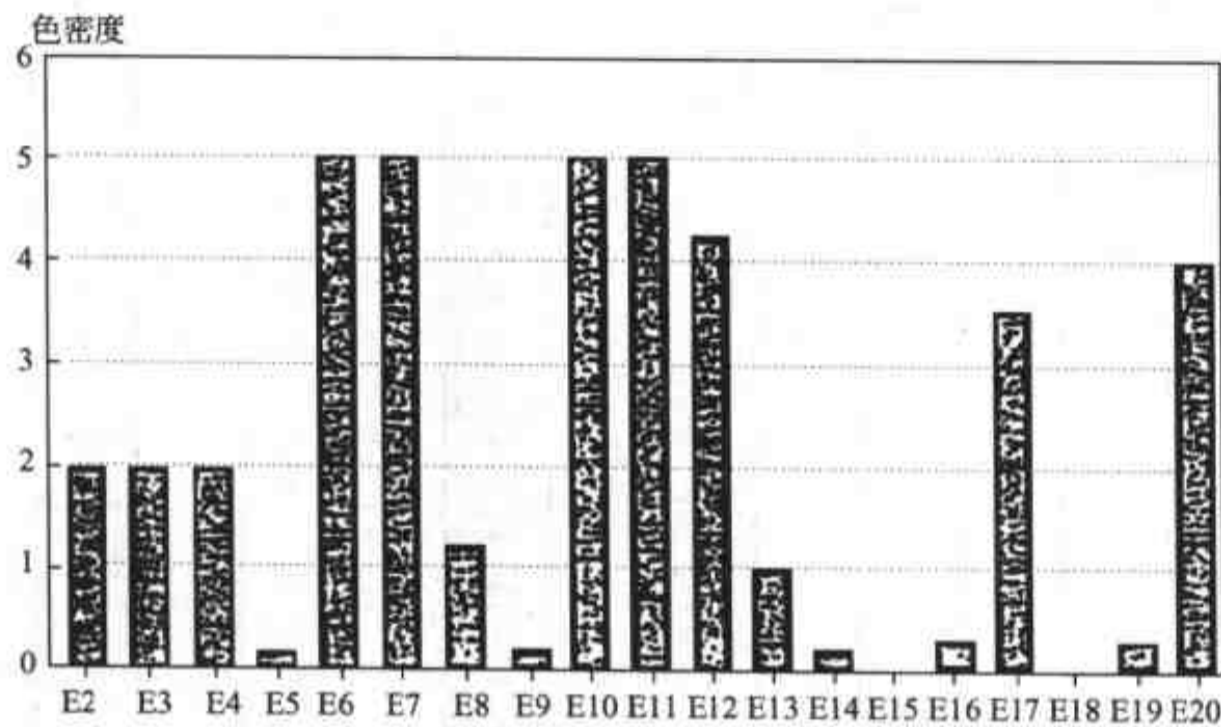


图 6-16 LGG 菌的酶体系

颜色密度 (Colour intensity): 0 (无活性), 5 (最高活性) E2—碱性磷酸酶, E3—酯酶, E4—脂肪酶~脂解酶, E5—脂肪酶, E6—亮氨酸氨肽酶, E7—缬氨酸氨肽酶, E8—胱氨酸氨肽酶, E9—胰蛋白酶, E10—胰凝乳蛋白酶, E11—酸性磷酸酶, E12—磷酸水解酶, E13— α -半乳糖苷酶, E14— β -半乳糖苷酶, E15— β -葡糖醛苷酶, E16— α -葡萄糖苷酶, E17— β -葡萄糖苷酶, E18— α -葡萄糖胺酶, E19— α -甘露糖苷酶, E20— α -岩藻糖苷酶

LGG 菌的这种酶体系特征适于生产乳制品。

(二) LGG 菌酶水解释放的活性肽类

乳中存在多种生物活性肽类, 如吗啡肽、降血压肽、矿物元素促进肽类等, 但这些生物活性肽 (bioactive peptides) 在乳蛋白 (称之为前体) 中以非活性状态存在, 只有在酶促作用下水解而释放出来, 通过受体或游离化合物发挥生理作用。

Rokka 等对 LGG 发酵乳经进一步胃蛋白酶和胰蛋白酶的研究表明: 这种作用物中存在着类吗啡肽, 免疫刺激肽、ACE 抑制肽和降血压肽 (见表 6-23)。这表明 LGG 酸奶制品的生

表 6-23 LGG 发酵乳经进一步酶水解后所释放的活性肽

分子量	肽	前 体	作 用
747	Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	α_{s1} -酪蛋白	免疫刺激
335	Gly-Leu-Phe	α -乳白蛋白	免疫刺激
522	Tyr-Pro-Phe-Pro	β -酪蛋白	吗啡
912	Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu	α_{s1} -酪蛋白	吗啡
498	Tyr-Gly-Leu-Phe	α -乳白蛋白	吗啡
1200	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu	β -酪蛋白	吗啡
830	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Glu-Arg	β -酪蛋白	ACE 抑制
1156	Tyr-Glu-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg	β -酪蛋白	ACE 抑制

理作用部分归因于 LGG 菌的这种酶促作用，这些生理作用包括 LGG 菌对 *rotavirus* 痢疾的辅助治疗/IgA 生成刺激等。

(三) LGG 菌对肠黏膜糖蛋白的作用

对肠黏类疾病如溃疡、结肠炎的研究表明，这类疾病的发生与复发和肠黏膜遭破坏密切相关，故食用 LGG 菌是否可破坏或分解肠黏膜糖蛋白对 LGG 菌的生理特性是十分重要的。Johanneke 等、Ruseler 等对此进行了深入的研究。

L. rhamnosus GG 和发酵乳中的其他菌 (*L. acidophilus*, *B. bifidum*) 均不能分解或破坏猪胃黏膜或人肠黏膜糖蛋白。杯状细胞分泌的黏膜由糖蛋白构成，它的碳水化合物含量在 80% 以上，它是肠道菌群的重要能量来源之一，*Bacteriodes vulgatus* 能分解兔肠道中的黏膜碳水化合物，上述结果表明 LGG 菌不能破坏黏膜蛋白，表明它不会对肠膜炎患者造成潜在的危害。LGG 的摄入可能会有利于肠炎患者的治愈和恢复，其有效性要依赖于 pH 较低 (因为 pH6.8 时黏膜分解速度是 pH5.2 时的 2 倍)，pH 较低增加了外源细菌定殖的难度和保持黏膜蛋白不受损害。

由于未进行大量的 LGG 菌和酸奶菌种的治疗和恢复肠炎实验，故 LGG 等对肠炎的治疗作用方面的有关问题尚需实验的进一步证实。

(四) LGG 菌对人体器官中酶活性的抑制

人体的健康状况和体内酶的活性相关，如 β -葡糖醛苷酶、硝酸还原酶的高活性对人体健康是不利的。含有 LGG 的发酵乳可影响人体菌群的酶活性和代谢。Ling 等人测定了 54 人口服 LGG 酸奶后粪便中酶活性情况，结果如表 6-24 所示。LGG 酸奶或 LGG 菌加纤维可减少粪便中 β -葡糖醛苷酶、硝酸还原酶和甘胆酸水解酶活性。甘胆酸水解酶活性下降约 40%，而 β -葡糖醛苷酶和硝酸还原酶活性下降 30%，LGG 菌基本可改变粪便中尿激酶和 β -葡萄糖苷酶的活性，当停止服用 LGG 酸奶后，已降低活性的上述酶又恢复至原有活性。从表中还可以看出纤维对酶活性无影响。Ling 等在另一研究也获得类似的结果。

表 6-24 口服 LGG 酸奶和纤维对女性粪便中酶活性的影响

	对照	2周	4周	停止后
β -Glucuronidase, nmol/(min mg fecal protein)				
L. GG(14)	8.0±2.4	5.7±2.3	5.2±2.4	8.5±
L. GG fiber(16)	8.0±2.4	5.7±2.3	5.2±2.4	8.5±
placebo fiber(12)	7.2±1.1	6.7±1.5	6.6±1.6	7.0±
β -Glucosidase, nmol/(min mg fecal protein)				
L. GG(14)	11.6±6.1	12.7±5.0	13.5±7.3	11.7±
L. GG fiber(16)	11.8±5.8	12.2±4.8	13.3±4.4	13.7±
placebo fiber(12)	10.4±5.1	10.7±5.3	11.4±4.2	12.0±
Glycocholic acid hydrolase, nmol/(min mg fecal protein)				
L. GG(15)	11.9±6.5	7.3±5.0	8.1±4.6	13.8±
L. GG fiber(16)	15.8±6.3	10.1±5.1	8.6±4.4	13.8±
placebo fiber(11)	11.5±7.6	14.7±6.4	14.2±7.1	13.6±
Nitroreductase, nmol/(h mg fecal protein)				
L. GG(15)	32.5±4.3	24.0±6.7	23.9±7.8	33.3±
L. GG fiber(15)	31.3±9.8	23.2±6.2	22.2±7.5	28.5±
placebo fiber(11)	31.8±6.9	30.0±6.2	31.3±6.9	32.9±
Urease, nmol/(min mg fecal protein)				
L. GG(14)	50.9±32.6	44.6±26.6	46.0±25.0	42.2±
L. GG fiber(16)	50.6±23.8	41.0±23.5	47.2±26.4	50.1±
placebo fiber(12)	52.0±22.4	35.7±17.3	34.1±28.3	41.2±

(五) LGG 对牛乳酪蛋白过敏的缓解作用

牛乳的过敏反应是对牛乳蛋白免疫调整的逆向反应，解决这种问题的关键是牛乳抗原的完全不摄入。对婴儿而言，若不能食用母乳则必须食用代乳品，以乳清蛋白或酪蛋白水解为基础的配方，具有较低的过敏原但能提供婴儿充足的营养。对于水解婴儿食品中部分婴儿仍有过敏反应，主要是原有乳抗原的残留或水解过程中活性肽的释放。Isolauroi 等的研究表明 LGG 能促进 IgA 对肠道相遇膳食抗原的反应，故可帮助去除免疫反应。

肠道微生物分解食物成分成更易消化的形式，从而影响肠黏膜的局部免疫反应和促进对病原菌定殖的抵抗力。肠道菌群参与膳食中有害化合物的代谢、药物分解和脱毒。西方膳食中的高脂低纤维增加人体患结肠癌的可能性，结肠微生物的组成被证明和这种疾病相关。微生物的水解酶分解潜在致癌物为致癌物，流行病学研究证明发酵乳的大量食用可降低结肠癌的发病率，高发病的患者较低发病的人群肠道中乳酸菌的数量少。这种有益作用可能缘于钙或共轭亚油酸的保护作用、乳酸菌中水解酶的低活性及粪便中 pH 的下降。

含有 LGG 的发酵乳能降低结肠内水解酶的活性 (β -葡萄糖苷酶、甘氨酸胆酸水解酶、亚硝酸还原酶和胰蛋白酶)，同时降低毒性 *p*-甲酚的泌尿分，许多研究也发现 LGG 可降低粪便的 pH 及胺的含量，LGG 对肠道微生物的影响如下。

- (1) 竞争性定殖 LGG 可抑制有害微生物的入侵。
- (2) 提高免疫反应 LGG 可加强黏膜屏障，促进感染恢复和加强免疫记忆。
- (3) 产生抑菌化合物 防止有害微生物的生长。
- (4) 影响大肠中酶的活性 LGG 可降低致癌活性酶的活性，减少有毒化合物的分泌，增加短链脂肪酸的数量。
- (5) LGG 能结合霉菌和细菌毒素 由鼠进行的动物实验表明：LGG 具有减少或延迟肿瘤形成的作用（见图 6-17），但 Lactocilli 对肿瘤的生长没有作用。

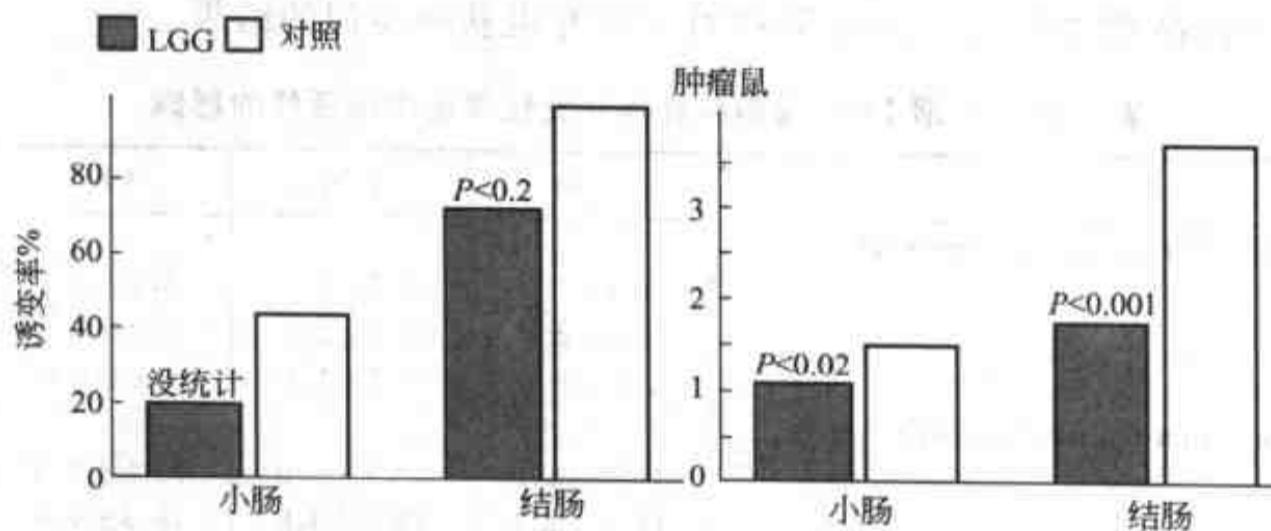


图 6-17 LGG 对鼠化学诱导性肿瘤形成的影响

四、LGG 对 *Salmonella* 在肠道定殖的抑制作用

体外实验表明，LGG 能减少 *Salmonella typhimurium* 在肠道黏膜的定殖，细胞培养实验证实 LGG 菌能减少 *Salmonella typhimurium* 对细胞的入侵。动物实验表明 LGG 改善肠道定殖的抵抗力，防止有害菌对肠道的损害。与对照组相比，接受 LGG 的鼠肠道内 *Salmonella* 的数量较低，而且被 *Salmonella* 感染的无菌鼠的寿命在服用 LGG 后大大延长（见图 6-18）。LGG 菌也能防止 *Candida albicans* 对鼠的感染，减少酵母的生长和延长鼠的寿命。LGG 的保护作用是以其免疫和非免疫因素为基础的，且证明 LGG 能防止 *Clostridium difficile* 在豚鼠肠壁的定殖和黏着，如果和木糖醇同时应用，能防止 *Clostridium difficile* 引

起的死亡，其他研究者的实验证实 LGG 能防止肠内病原性 *Escherichia coli* 对肠黏膜和肠细胞黏着，防止病原菌对人体的侵染。

五、LGG 对肠黏膜透过性的影响

当发生肠道感染和菌群失衡时，肠黏膜透过性增加，大的抗原分子和肠道微生物可能穿过肠黏膜进入系统，业已证明在急性痢疾后人体对食物抗原的敏感性增加，是由于抗原可以非正常状态透过肠黏膜，且膳食抗原或 rotavirus 感染增加了早产儿肠黏膜的透过性，早产儿不具有特异性局部抗原反应。

当接受 LGG 治疗时，肠道黏膜的成熟正常发生了，抗原透过被大大地减少，其透过发生在经 Peyer 片 (Peyer's patches) 的控制路线上 (见图 6-19)。结果表明 LGG 促进了局部专一性抗体 IgA 的反应，人体的实验结果也表明 LGG 可促进人体对食物抗原的局部专一性抗体 IgA 反应，这种促进反应在食品抗原的耐受性方面是重要的。LGG 能防止被测试动物肠道菌群向血液或其他组织的易位，当在鼠的膳食补充 LGG 时，对其的辐射致死表明易位到血液的肠道菌极少，其血液的酒精实验表明其内毒素量较少。

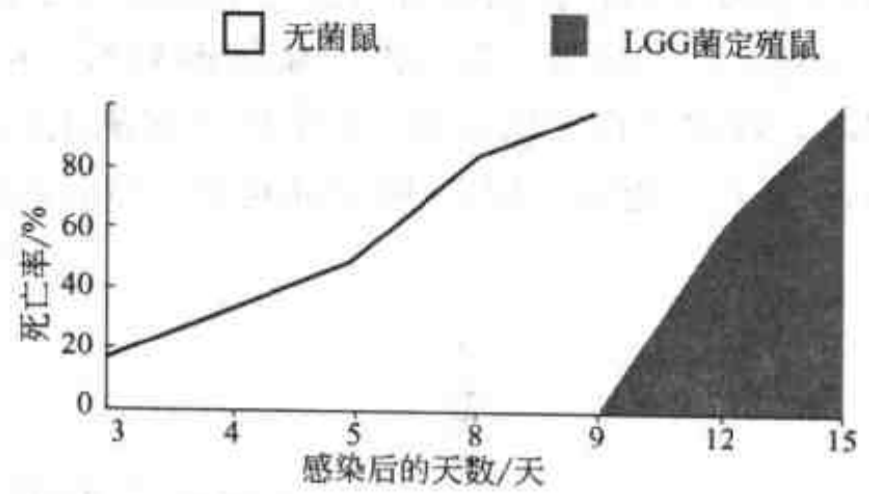


图 6-18 无菌鼠和 LGG 定殖鼠在 *Salmonella typhimurium* 感染后的死亡率

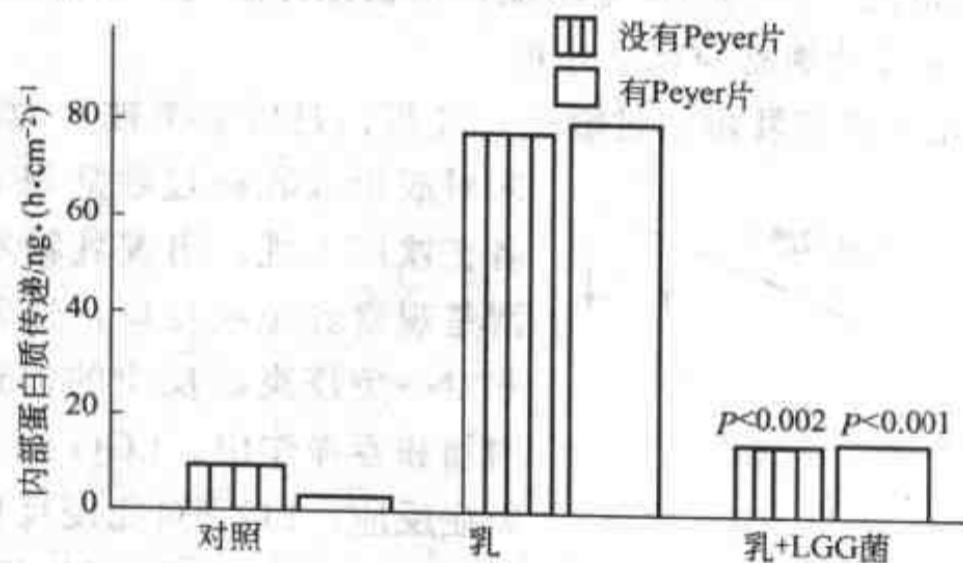


图 6-19 LGG 对肠黏膜透过性的影响

14 天的鼠分别喂以牛乳、LGG、21 天时分析透过性

六、LGG 与过敏反应

(一) LGG 可加速过敏反应的恢复

在西方国家过敏反应发病情况一直在增加，近年来人们试图通过生物治疗的方法改变这种趋势。有关特异治疗和食品过敏反应的研究表明：通过恢复肠黏膜的透过性，调整局部免疫反应及应用能改变食品抗原的微生物，机体的免疫反应能被引导恢复至正常状态。

Majamaa 等对由乳过敏引起湿疹的儿童进行的研究结果表明：当儿童食用不含乳的 LGG 食品时，患者的症状和程度大大减轻了 (见图 6-20)。通过测定粪便中的细胞因子 (以 TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 作为标记) 的含量，可以确定肠道感染的程度，他们发现 LGG 处理组和对照组比较，肠道感染下降非常迅速。LGG 能帮助仅食用母乳的孩子或遭受这些微生物侵害的母亲恢复健康。

人们一直在研究 LGG 可防止过敏反应发生的机理，LGG 可防止过敏反应的机理为：

LGG 能改变酪蛋白为具有减少过敏性的分子形式，例如以患遗传性湿疹儿童的淋巴细胞进行实验，发现酪蛋白促进淋巴细胞的繁殖，但被 LGG 分解的酪蛋白具有明显的调整作用，同时，和酪蛋白比较，被 LGG 分解的酪蛋白也可调整淋巴细胞对于干扰素-4 的分泌。随着 LGG 降解乳蛋白，LGG 可形成其他生物活性肽，它也对消化道产生影响。

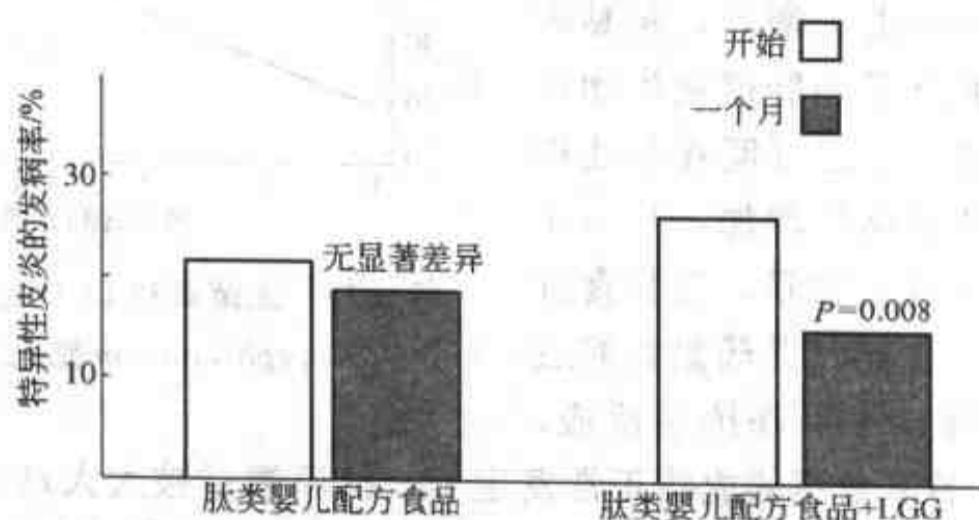


图 6-20 LGG 对乳过敏儿童特异性皮炎的影响

动物实验表明：LGG 对肠黏膜的影响依赖于 LGG 在肠道的定殖情况及肠腔中抗原的类型，外来抗原如牛乳增加了肠黏膜的通透性，LGG 在相同时间内可使其正常化。完全水解的乳清蛋白质，降解抗原不增加黏膜的透过性，和 LGG 相结合，可减少已降解和未降解抗原的转移。这些复杂的机理，它们的调整功能将在临床方面进一步通过实验确认和完善。

(二) LGG 对免疫反应的调整和促进作用

2.5% 左右芬兰的儿童患有乳蛋白过敏症，乳蛋白过敏通常被认为是儿童所专有，但后来对成年人乳糖过敏症患者的研究中发现，患者在饮用牛乳、出现乳糖不耐反应时还可同时清楚观察到免疫反应，这表明牛乳本身可作为非专一免疫炎症反应的促进物，促进巨噬细胞增加和吞噬作用。LGG 能大大降低牛乳蛋白的炎症反应，LGG 对免疫反应的调节作用如图 6-21 所示。另一方面 LGG 增加了免疫防御能力，促进了免疫反应和提高了感染者的免疫反应，及它能减少过敏反应中的过度活性免疫反应。

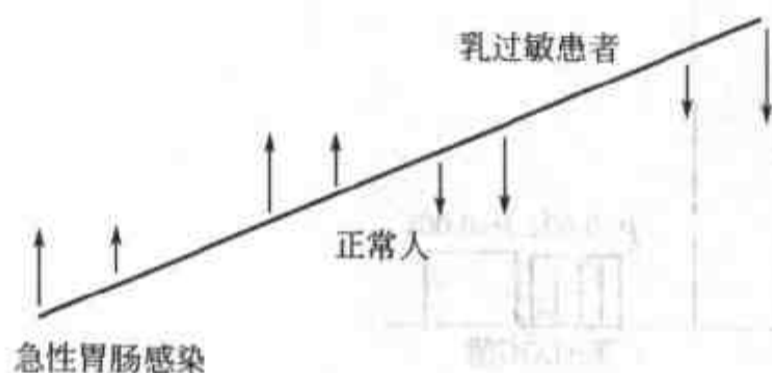


图 6-21 LGG 对免疫反应的影响
(健康人，胃肠感染和乳过敏的人)

七、LGG 生理功能未来研究的重点领域和内容

(一) 节段性回肠炎

节段性回肠炎是常发于肠道但在消化道任何部位均可发生的不明病理的严重病症，对 LGG 作用的研究应着重其增加肠黏膜通透性和干扰食品抗原的传送方面。

(二) 慢性关节炎

对患有慢性关节炎的儿童，LGG 被证明能促进 IgA 类局部免疫反应，增加对食品抗原的专一性 IgA 反应，及使粪便中具有高尿素酶活性正常化，高尿素酶活性表明肠道微生物的不平衡。根据上述可推断 LGG 能加强慢性关节炎病中肠黏膜的免疫障碍，这类研究应是 LGG 未来研究的重点之一。

(三) 膀胱纤维化

微生物治疗的一个新领域是膀胱纤维化的治疗。Guarino 研究表明：服用 LGG 6 个月

能大大减少肺感染和腹痛，尤其是增加 *Pseudomonas* 感染者的体重。LGG 能否治疗膀胱纤维化有待实验的证实和确认。

LGG 的功能可概括如下：

- (1) 能在食品和胶囊中存活和保持活性；
- (2) 能在消化的环境中保持活性；
- (3) 能黏着于肠黏膜，促进免疫反应；
- (4) 平衡消化道微生物；
- (5) 能影响粪便的代谢和减少有害化合物的形成；
- (6) 能预防和治疗不同类型的痢疾；
- (7) 能对损伤的黏膜进行修复，增加黏膜的免疫障碍；
- (8) 加速乳过敏反应的恢复和减少过敏症状。

第七节 LGG 菌对痢疾的治疗作用

一、LGG 菌对痢疾的预防和治疗作用

(一) 对儿童急性痢疾的预防作用

Oberbelman 等对营养不良的秘鲁儿童痢疾发病率进行了为期 15 个月的研究，他们对 204 个儿童的一半每周六次服用 LGG，另一半则作为对照组，在期间共发生 954 起痢疾，其原因是由于病原菌（占总数的 1/2），寄生虫（总数的 1/2）和病毒（总数的 1/3）引起的，混合感染的情况非常普遍。LGG 组被发现对于病毒引起的痢疾具有明显预防效果，在其他病原菌引起的痢疾发病率方面服用 LGG 组和对照组没有什么不同。

LGG 组每年每个儿童的痢疾病为 5.2 次，对照组 6 次，LGG 对 18~29 个月的孩子痢疾的预防是有效的（4.9 次对 6.2 次），它主要对非母乳喂养的孩子痢疾发病的预防更为有效。

(二) 对抗生素引起痢疾的治疗

抗生素的副作用之一常引起抗生素性痢疾，抗生素改变了肠道的微生物组成，使病原菌如 *Clostridium difficile* 有滋生的机会，同时它也干扰微生物的代谢，如抗生素能防止结肠中短链脂肪酸的形成；Siitonen 等证实 LGG 菌能大大降低红霉素引起痢疾的发病率，同时它对腹痛也有一定的缓解作用。Young 等发现胶囊化的 LGG 也能减少抗生素的副作用，他们对用抗生素治疗的 188 个患急性感染的儿童，用 LGG 胶囊治疗其副作用的结果如图 6-22 所示，可见 LGG 对抗生素治疗引起的痢疾和腹痛有明显的治疗效果，且 LGG 在任何研究情况下无任何副作用。

LGG 对抗生素呈敏感性（见表 6-25），但 LGG 在肠道中对用于治疗抗生素有一定的耐受性，如在用红霉素、氨苄青霉素和青霉素治疗的患者的粪便中，分别有 75%、76% 和 57% 的患者存在着 LGG 菌。许多 *Lactobacilli* 的种对万古霉素具有天然耐受性，如 *L. rhamnosus*、*L. casei*、*L. plantarum* 和 *L. reuteri*，LGG 的

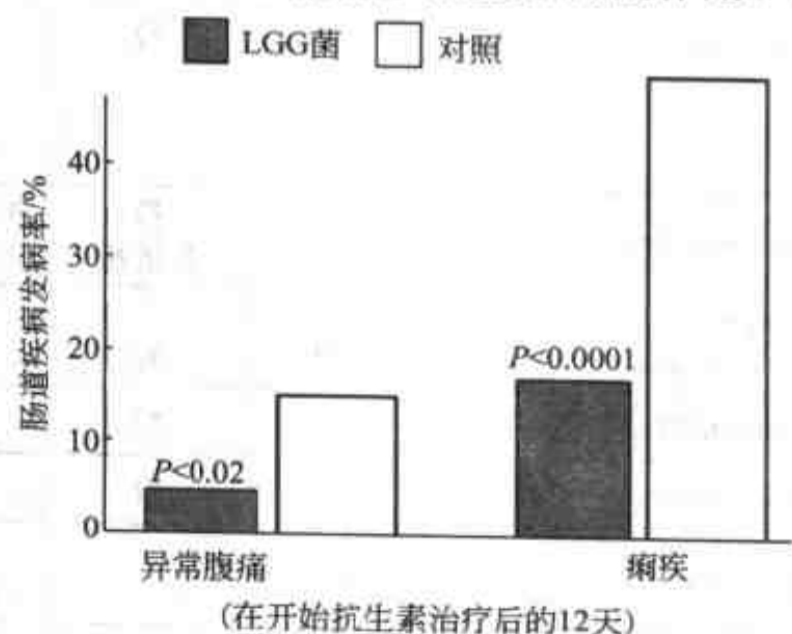


图 6-22 LGG 对抗生素引起肠道疾病的作用
(在开始抗生素治疗后的 12 天)

万古霉素耐受性业已证明源于不同基因。

表 6-25 LGG 菌对抗生素的耐受最小值表

抗 生 素	耐受最小值($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抗 生 素	耐受最小值($\mu\text{g}/\text{ml}$)
苄基青霉素	0.19	红霉素	0.094
庆大霉素	24.0	羟氨苄青霉素	0.50
氨苄青霉素	0.50	强力霉素(盐酸盐)	0.125
万古霉素	>258		

(三) 对旅行者痢疾的治疗

从寒带国家去温、热带国家的旅行者常发生肠道疾病，乳酸菌常用于旅行过程中肠道疾病的治疗。Oksanen 等在土耳其对来自芬兰的旅行者进行了研究，发现 43.8% 旅行者患了痢疾，他们用一天口服两次 LGG 产品的方法对其治疗，发现 LGG 对其的治疗是十分有效的。Hilton 等对美国去亚洲、东非、南美等地的旅行者痢疾发病情况进行了研究，发现每天口服一粒 LGG 胶囊可预防旅行痢疾的发生，口服组痢疾发病率为 3.9%，对照组为 7.4%，且发现 LGG 对以前从未发生旅行痢疾者更为有效。

(四) 对轮状病毒 (rotavirus) 性痢疾的治疗

LGG 菌能加速急性痢疾的恢复。在西方国家 rotavirus 是引起痢疾最主要的原因之一，LGG 对急性 rotavirus 性痢疾的儿童患者治疗结果如表 6-26 所示，可见 LGG 能加速 rotavirus 性痢疾的恢复约一天的时间；LGG 治疗一般在痢疾发生的第二天开始，治疗组持续时间大致为对照组的一半（见图 6-23）。

表 6-26 LGG 对急性痢疾的治疗(LGG 一天口服二次)

感染	样本数	LGG 发酵乳粉	痢疾持续天数或小时		P
			LGG 组	对照组	
82% rotavirus	>1	发酵乳粉	1.4(0.8)	2.4(1.1)	<0.001
88% rotavirus	39	发酵乳	1.1(0.6)	2.5(1.4)	0.001
100% rotavirus	42	粉	1.5(0.7)	2.3(0.8)	0.002
100% rotavirus	49	粉	1.8(0.8)	1.8(1.2) <i>Lactobacillus acidophilus</i> 2.6(1.4) 酸奶发酵剂 2.6(1.3) 对照组	0.04
100% rotavirus	26	粉 失活粉	1.5(1.0~2.2) 1.6(1.1~2.3)		0.8
27% rotavirus 21% rotavirus	123	粉	2.7(2.2)	3.8(2.8)	0.0
脱水性痢疾	26	粉	1.9(0.6)	3.3(2.3)	<0.0
61% rotavirus	100	粉	3	6	<0.01
92% rotavirus	123		17.7h (12.2~25.6h)	30.4h (23.6~39.03h)	0.03
总数	287		58.3h(27.6)	71.9h(35.8)	<0.0
rotavirus 引起痢疾	101		56.2h(16.9)	76.6(41.6)	
非 rotavirus 引起痢疾	186		59.5h(33.5)	69.4(21.9)	

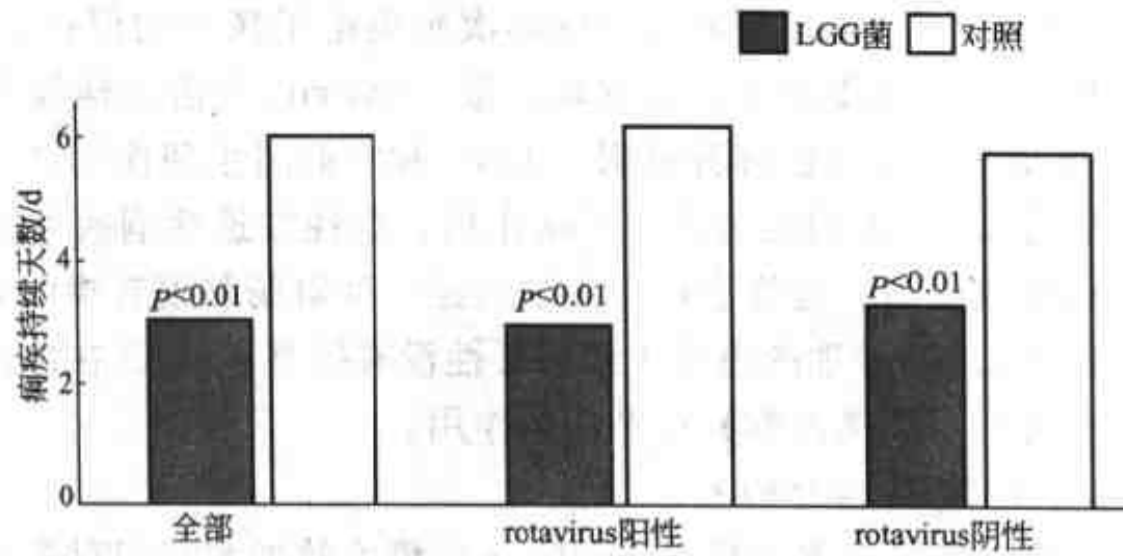


图 6-23 LGG 对急性痢疾持续时间的影响

(五) 对其他类型急性痢疾的治疗

在泰国、巴基斯坦用 LGG 治疗急性痢疾的结果表明：LGG 能加速水泻性痢疾的恢复，但对于血便性痢疾无效。此外，LGG 不能从早产儿肠道去除 *Klebsiella oxytoca* 菌。在意大利进行的研究表明 LGG 对 rotavirus 痢疾和其他未知其原因痢疾均有一定的治疗效果，俄罗斯地区的研究也同样支持这一结论，故 LGG 不仅对 rotavirus 性痢疾有治疗作用，且对病因学不明性痢疾也有疗效；如果肠黏膜已被严重破坏，LGG 的有效性尚不清楚。

LGG 和 *Lactophilus* 粉、酸奶发酵剂进行治疗痢疾效果的比较，发现仅 LGG 菌对痢疾的加速恢复有作用，因为 *Lactophilus* 也含有 *L. rhamnosus* 菌株，据此可推断在相同种的不同菌株在功能上有重要不同，故在疗效研究时必须实验单一菌株的作用。

二、LGG 治疗痢疾的机理

(一) 提高免疫反应和平衡肠道菌群

业已证明在人体患 rotavirus 性痢疾期间 LGG 有提高免疫反应的作用。LGG 在痢疾的急性发作阶段能大量增加非专一性体液免疫反应 (IgA、IgG、IgM)，随后阶段可增加 rotavirus 专一性抗体，在治疗三周后患者的 90% 有 rotavirus 专一性 IgA 反应，而对照组仅

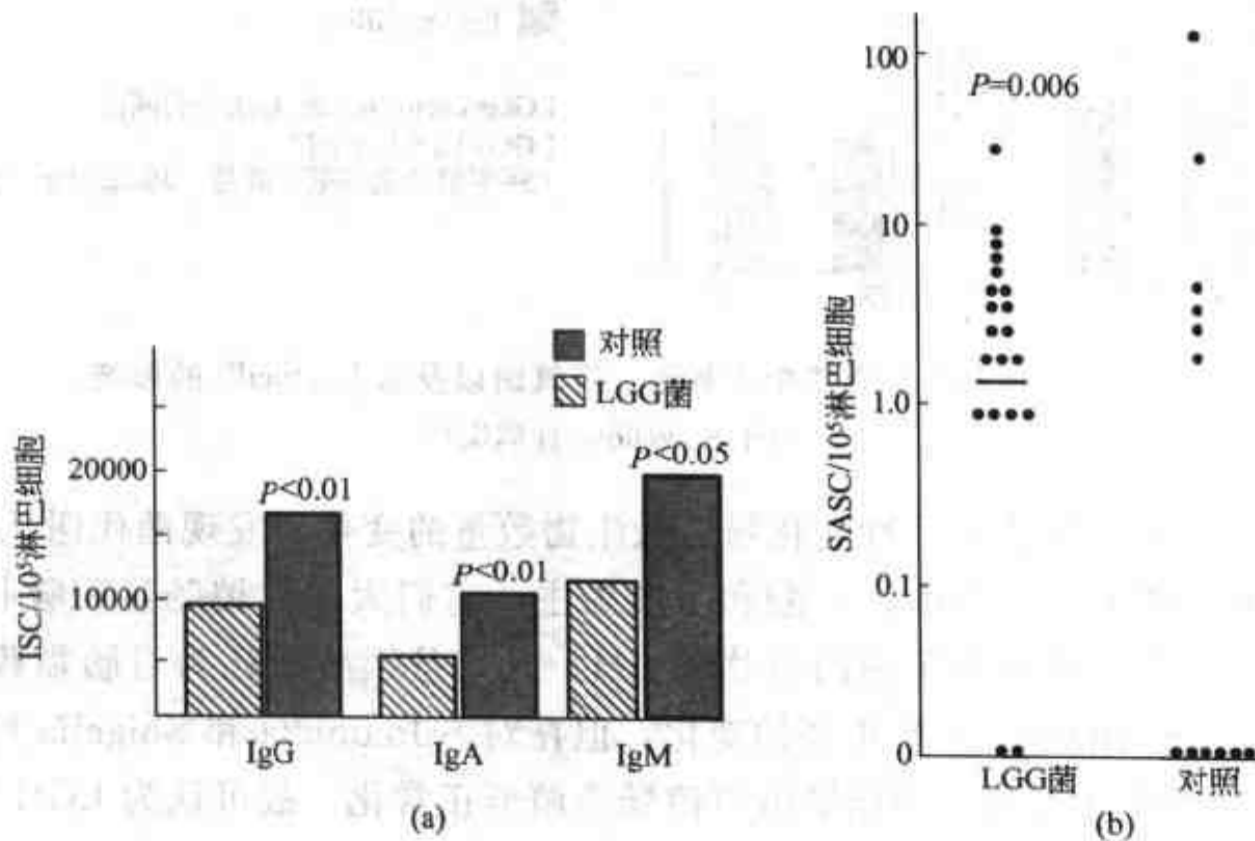


图 6-24 LGG 对免疫反应的影响

(a) 免疫球蛋白分泌细胞 (ISC) 的总数 (在急性痢疾阶段)；

(b) 在 rotavirus 感染的恢复阶段 rotavirus 专一性 Ig 分泌细胞 (SASC) 的总数

46% (见图 6-24), 因此 LGG 的口服对患者的再次感染给予额外的保护。LGG 的作用是通过提高区域免疫反应而专一性传递的, 且发现口服 rotavirus 疫苗同样提高免疫反应, 所有的 *Lactobacillus* 不增加免疫反应也部分说明了 LGG 和它们间生理作用的不同。另外, 缩短痢疾延续的原因可能是 LGG 菌的肠道菌群平衡作用, 急性渗透性痢疾伴随着菌群失衡和专一性产生尿素酶菌的过度生长, 这样它们产生的胺是一种对肠黏膜有毒性的物质, 故会引起相关的生理问题, 但用 LGG 处理的患者尿素酶活性没有提高。LGG 在急性痢疾延续期间仍在粪便中存活, 故认为它对肠道菌群具有平衡的作用。

(二) 抗生素治疗和 LGG 治疗的差异

Sepp 等研究了 LGG 和抗生素治疗 Shigellosis 性痢疾效率和它们对粪便菌群的影响, 结果发现经十天处理后 LGG 组的恢复率为 79%, 抗生素组为 67% ($P < 0.05$)。在治疗的起始阶段患者的肠道菌群完全失衡, 其肠道中需氧菌的数量远大于厌氧菌, 且 Lactocilli 几乎没有, 异常菌相对比例很高。在用 LGG 治疗 5 天后, Lactocilli 开始上升, 肠道菌群部分正常化, 十天治疗肠道菌群恢复正常, 但是药物治疗 Lactocilli 的量在治疗初期增长, 但始终较低 (如图 6-25 所示)。肠道菌群失衡, 尤其是缺乏厌氧菌增加了从肠道到组织的肠道菌群易位, 增加了感染和脓毒病的可能性。LGG 对此抗生素有抗性, 故在治疗过程中具有菌群平衡作用。

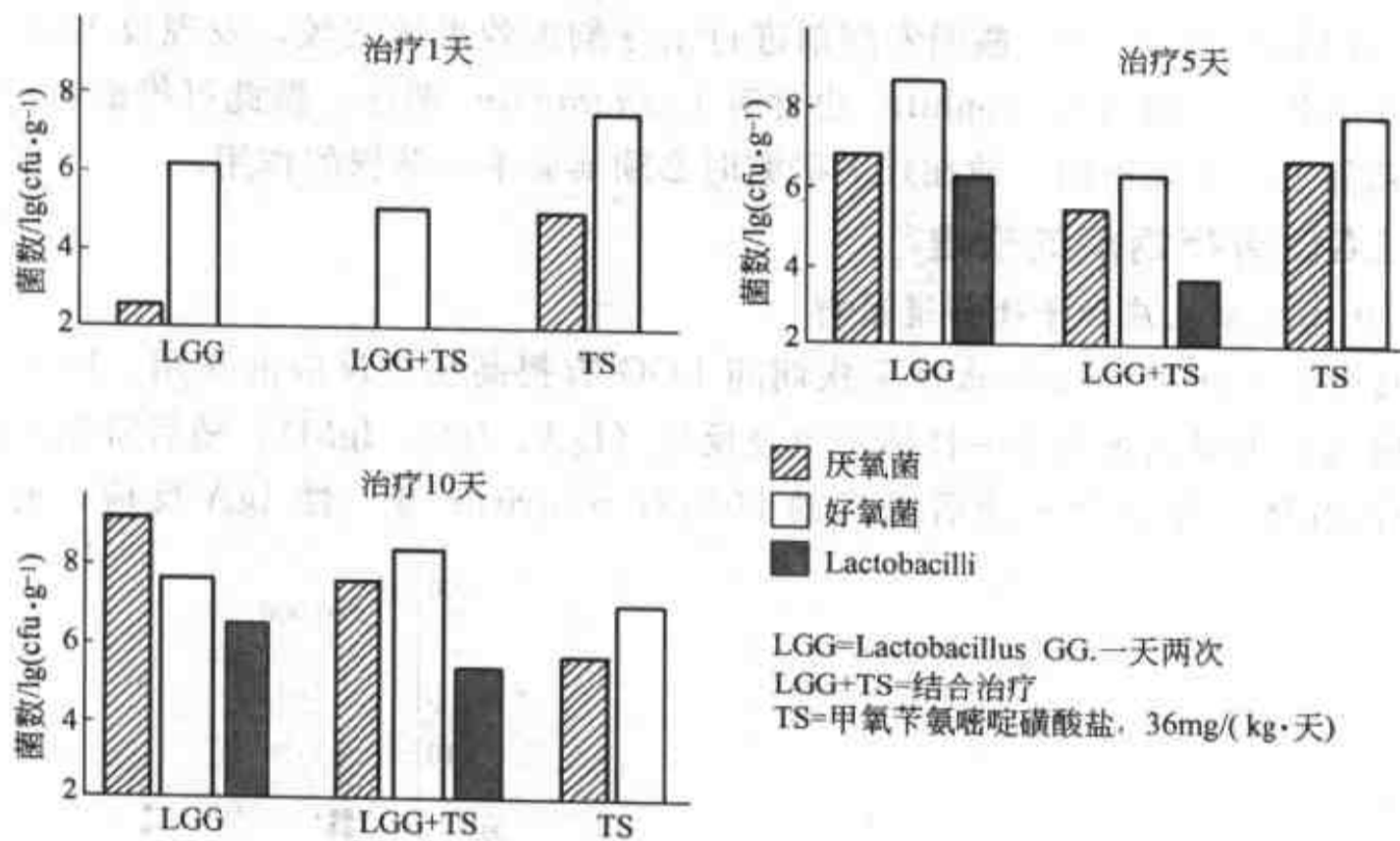


图 6-25 LGG 对粪便中厌氧菌、需氧菌以及总 Lactocilli 的影响
(对于 Shigellosis 性痢疾)

研究者测定了微生物代谢活性变化肠道微生物数量的变化, 发现菌代谢从碳水化合物和蛋白质产生短链脂肪酸, 以丙酸、乙酸和丁酸为主, 它们大多数被肠黏膜吸收作为 colono-cyte 的能量, 短链脂肪酸降低了便内容物的 pH, 尤其是丁酸被认为对肠黏膜有保护作用, LGG 不能使短链脂肪酸的量产生重要的变化, 但在对 *Salmonella* 和 *Shigella* 性痢疾治疗时, LGG 使脂肪酸的产生正常化, 而脂肪酸可使肠道菌群正常化, 故可认为 LGG 可导致肠道菌群正常化。

(三) *C. difficile* 性痢疾的治疗机理

Clostridium difficile 是在正常人体菌群中也能发现的“机会性”病原菌, 通常它不会

引起任何问题(症状),但当正常菌群平衡被破坏时,如抗生素处理,*C. difficile*的量会大量增加,它产生的毒素会引起不同程度的慢性痢疾甚或假膜性结肠炎,*C. difficile*性痢疾约占抗生素处理患者的10%~20%,主要是用万古霉素或灭滴灵治疗。LGG治疗*C. difficile*性痢疾已有多人进行了报道,其有效率达84%,重复治疗有效率达94%。

Naaber等进行的*C. difficile*结肠炎病理学及其对肠道菌群影响的实验中发现:*C. difficile*和抗生素(氨苄青霉素)结合不可避免地使大鼠死亡。LGG能使肠道菌群正常,而木糖醇可防止*C. difficile*的肠道黏着,二者结合用于大鼠实验发现,这种方法可防止其结肠炎的发生和避免其死亡,而不用结合治疗的鼠在2.5天内死亡。患有结肠炎的鼠上皮中的厌氧微生物完全被破坏,兼性菌、Coliform菌成为肠道优势菌。

第八节 LGG类产品的加工技术

人们习惯于食品是食品药品是药品的说法,认为二者没有交叉,但自20世纪80年代,尤其是90年代开始,二者的模糊区域增加了,具有健康作用的功能性食品的发展极为迅速,现已有数以千计的该类产品投放市场,它们除营养外,还兼有有益健康和治疗的作用。LGG产品就是这其中的一个。

有关LGG产品加工技术的资料不多,现仅就收集到的文献和我们自己的研究结果介绍,以供LGG产品研究开发时参考。

一、LGG及相关菌的生长底物

营养素的可利用性是决定结肠中Bifidobacteria和乳酸菌代谢活动的重要因素。进入结肠的碳水化合物来源于胃肠道上部未被消化的多聚和低聚膳食碳水化合物,主要的成分是淀粉和植物细胞壁的结构成分,即我们熟知的膳食纤维。多聚碳水化合物,在大肠的降解是一个包含多种酶的复杂过程。

前面已介绍多种低聚糖是Bifidobacteria的增殖因子,近期Jaskari等、kontula等、Salovaara等分别研究了燕麦麸作为Bifidobacteria和乳酸菌底物,对它们的增殖效果。燕麦麸含有高比例的可发酵膳食纤维。(1→3), (1→4)-β-D-葡萄糖和阿拉伯木糖,麦麸葡萄糖对脂肪和葡萄糖代谢具有改善作用,这种功能部分源于肠道对燕麦麸发酵产物的吸收。

(一) 燕麦β-葡萄糖和木糖的水解产物

燕麦麸β-葡萄糖用*B. subtilis*的地衣多糖酶水解产生低分子量的β-低聚葡萄糖,仅约一半的(53.4±3.0)%β-葡萄糖被降解为还原糖,低分子量的水解物通过80%乙醇沉淀从高分子量产物中分离,经HPLC分析醇溶部分的主成分为β-葡萄糖三糖(61.8%, GLc3)和β-葡萄糖四糖(33.5%, GLc4)。

燕麦麸木糖用*T. reesei*的木糖水解物水解为低分子量的低聚物,其中还原糖的比例为(31.6±4.1)%,80%的醇溶部分的主成分是木糖(8.4%, xyl1)、木二糖(57.6%, xyl2)和木三糖(6.9%, xyl3)。

(二) 菌对β-低聚葡萄糖和低聚木糖的利用性

1. 菌对β-低聚葡萄糖的利用性

L. rhamnosus GG在降解β-低聚葡萄糖的能力上和其他菌明显不同,分析结果表明在24小时的培养过程中*L. rhamnosus* GG消耗了整个培养基介质中β-低聚葡萄糖总量的70%(见表6-27),约30%的β-葡萄糖四糖和全部的β-葡萄糖三糖被利用,且由上述两种低聚糖降解产生一种新的低分子量低聚糖。其他菌利用β-低聚葡萄糖的能力很弱,如*L. acidophilus* 24h培

养利用率为 17%，而 *Bifidobacterium* 仅 4%。

表 6-27 在基础培养基(PYF)中菌对碳水化合物的利用情况

菌	测试数	β -低聚葡萄糖		低聚木糖		棉子糖	
		利用率 /%	呈阳性 菌数	利用率 /%	呈阳性 菌数	利用率 /%	呈阳性 菌数
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ^a	1	70.2 \pm 1.0	1	0	0	1.9 \pm 0.1	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a	2	17.2 \pm 3.1	2	0	0	18.9 \pm 2.1	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ^b	1	5.8 \pm 0.5	1	77.8 \pm 7.7	1	57.2 \pm 2.2	1
<i>Bifidobacterium infantis</i> ^b	1	1.0 \pm 0.5	0	80.1 \pm 0.5	1	98.7 \pm 2.2	1
<i>Bifidobacterium longum</i> ^b	1	4.1 \pm 0.8	0	80.0 \pm 7.6	1	62.3 \pm 0.1	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ^b	2	7.1 \pm 5.0	2	16.6 \pm 12.5	2	20.8 \pm 4.8	2
<i>Bacteroides vulgatus</i> ^b	2	0.8 \pm 1.8	0	27.6 \pm 7.4	2	8.8 \pm 6.5	1
<i>Bacteroides fragilis</i> ^b	5	2.5 \pm 4.2	1	9.1 \pm 3.7	5	7.7 \pm 6.8	3
<i>Clostridium difficile</i> ^b	1	22.1 \pm 2.6	1	55.2 \pm 1.0	1	19.5 \pm 5.8	1
<i>Escherichia coli</i> ^b	3	0	0	9.2 \pm 2.2	3	11.0 \pm 12.1	1

注：a 为培养时间 24 小时；b 为培养时间 72 小时。

13 种不同的肠道微生物在它们的生长时间对 β -低聚葡萄糖的降解和利用能力很差，如 *C. difficile* 有最高的 β -低聚葡萄糖的利用率也仅为 22%。测试的益生菌较肠道菌在此种培养基上有更高的生长速度，这是因为 *Bifidobacterium* 和 *L. rhamnosus* GG 转移 β -低聚葡萄糖成生长能量的能力，较其他肠道菌强（见表 6-28），这可能缘于菌本身的分解 β 1~3 或 β 1~4 键的酶能力。

表 6-28 细菌生长速度与生长底物的关系

菌	生长速度(OD \times min)				
	β -低聚葡萄糖	低聚木糖	棉子糖	低聚果糖	葡萄糖
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	300 \pm 10	ND	ND	5 \pm 5	950 \pm 15
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50 \pm 5	ND	160 \pm 10	50 \pm 5	125 \pm 10
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	25 \pm 5	340 \pm 15	460 \pm 100	250 \pm 5	300 \pm 50
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ND	410 \pm 15	600 \pm 10	350 \pm 15	410 \pm 50
<i>Bifidobacterium longum</i>	ND	110 \pm 10	395 \pm 12	0 \pm 0	500 \pm 10
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	85 \pm 50	190 \pm 15	190 \pm 60	100 \pm 20	400 \pm 50
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ND	180 \pm 20	ND	200 \pm 40	400 \pm 20
<i>Bacteroides fragilis</i>	110 \pm 10	50 \pm 15	400 \pm 5	375 \pm 150	350 \pm 20
<i>Clostridium difficile</i>	60 \pm 15	230 \pm 30	0 \pm 50	175 \pm 10	200 \pm 100
<i>Escherichia coli</i>	ND	20 \pm 5	60 \pm 10	75 \pm 10	0 \pm 0

2. 菌对低聚木糖的利用性

Bifidobacterium 对低聚木糖的平均利用率为 77%，远高于其他测试菌。三种 *Bifidobacterium* 的菌株 *B. bifidum*、*B. infantis* 和 *B. longum* 几乎完全降解三种最多的低聚木糖，引起木糖积累（见表 6-29）。*Lactobacillus* 不能利用低聚木糖。

肠道微生物能部分降解低聚木糖，但它们的全部均较 *Bifidobacterium* 分解低聚木糖的能力弱，所有肠道菌均可利用低聚木糖，肠道菌中 *C. difficile* 有最大的低聚木糖的利用率（55%）。

燕麦麸低聚木糖是 *Bifidobacterium* 生长的较好促进剂，其效果明显优于肠道菌群，其中 *B. bifidum* 和 *B. infantis* 在低聚木糖培养基中获得最佳的生长速度。

表 6-29 不同菌对低聚糖的消耗和形成

菌	利用率或形成/%								
	β-低聚葡萄糖			低聚木糖				棉子糖	
	Glc4	Glc3	Glc2	Xyl5	Xyl3	Xyl2	Xyl1	棉子糖	蔗糖
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	36	100	b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	34	29	c	ND	ND	ND	ND	19	0
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	15	2	a	100	100	98	-43 ^①	64	0
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ND	ND	ND	100	100	99	-43	96	100
<i>Bifidobacterium longum</i>	ND	ND	ND	100	100	94	-35	70	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	4	9	0	0	21	16	100	48	-87
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ND	ND	ND	0	42	30	100	53	-227
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	14	0	0	50	0	42	87	-500
<i>Clostridium difficile</i>	40	13	0	14	46	58	100	89	-38
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	0	42	0	83	22	33

① 负值意味着产生更多的化合物。

注：a~c：产生 GLc2，初始浓度 a. 0.1g/L, b. 0.3g/L, c. 0.7g/L。

3. 菌对棉子糖的利用性

当棉子糖作为惟一碳源加于生长介质时，*B. infantis* 对其的利用性明显不同于其他菌，它对棉子糖的利用率达 99%，此菌也利用蔗糖。虽然 *B. longum* 和 *B. bifidum* 不像 *B. infantis* 一样降解棉子糖，但它们对棉子糖的利用率明显高于其他肠道菌。当棉子糖存在时，*Lactobacillus* 不能利用蔗糖，*L. rhamnosus* GG 完全不能利用棉子糖，*L. acidophilus* 对棉子糖的利用和 β-低聚葡萄糖相同，约为 19%。

肠道菌群在棉子糖培养中培养通常导致棉子糖下降和蔗糖浓度上升，如 *Bacteroides* 和 *Clostridium* 降解 80% 的棉子糖，但对碳水化合物利用为 8%~21%，这是由于棉子糖的降解产物蔗糖的大量存在。*E. coli* (IH50817) 直接利用棉子糖。

棉子糖（包括葡萄糖）对益生菌较其他肠道菌是更好的生长促进剂，对 *Bifidobacterium* 而言棉子糖较葡萄糖以更高的速度转化为能量，同时 *Bact. fragilis* 生长和 *Bifidobacterium* 一样快，*L. acidophilus* 在此培养基中生长缓慢。

表 6-30 菌对燕麦麸中低聚糖的利用性

分子	未发酵混合物中量 (mg/L)	利用率/%		
		<i>Lactobacillus</i> GG	<i>L. plantarum</i>	<i>Lc. lactis</i>
β-Gluco-oligomers				
Glc1*	495.0	99.09	99.29	96.57
Glc2(1→4)	825.0	93.15	98.67	98.85
Glc3(1→4)	95.00	81.05	76.32	75.26
Glc4(1→4)	27.50	27.27	14.55	3.636
Glc5	435.0	51.15	0.000	13.79
Glc3(1→3, 1→4)	1840	51.09	-12.22 ^b	16.30
Glc4(1→3, 1→4)	2395	-7.090 ^c	-7.090 ^d	6.054
Arabinoxyloligomers				
Xyl1	273.0	0.000	40.00	0.000
Xyl2	140.0	0.000	0.000	0.000
Xyl3	<30	0.000	0.000	0.000
Xyl4	<100	0.000	0.000	0.000
Xyl5	140.0	0.000	0.000	0.000

注：a：数值是指分子中单体的数量。

b~d：负值表示测到更多的化合物。

初始浓度 (mg/L), b=2065, c=2565, d=2565。

GLc—葡萄糖，Xyl—木糖。

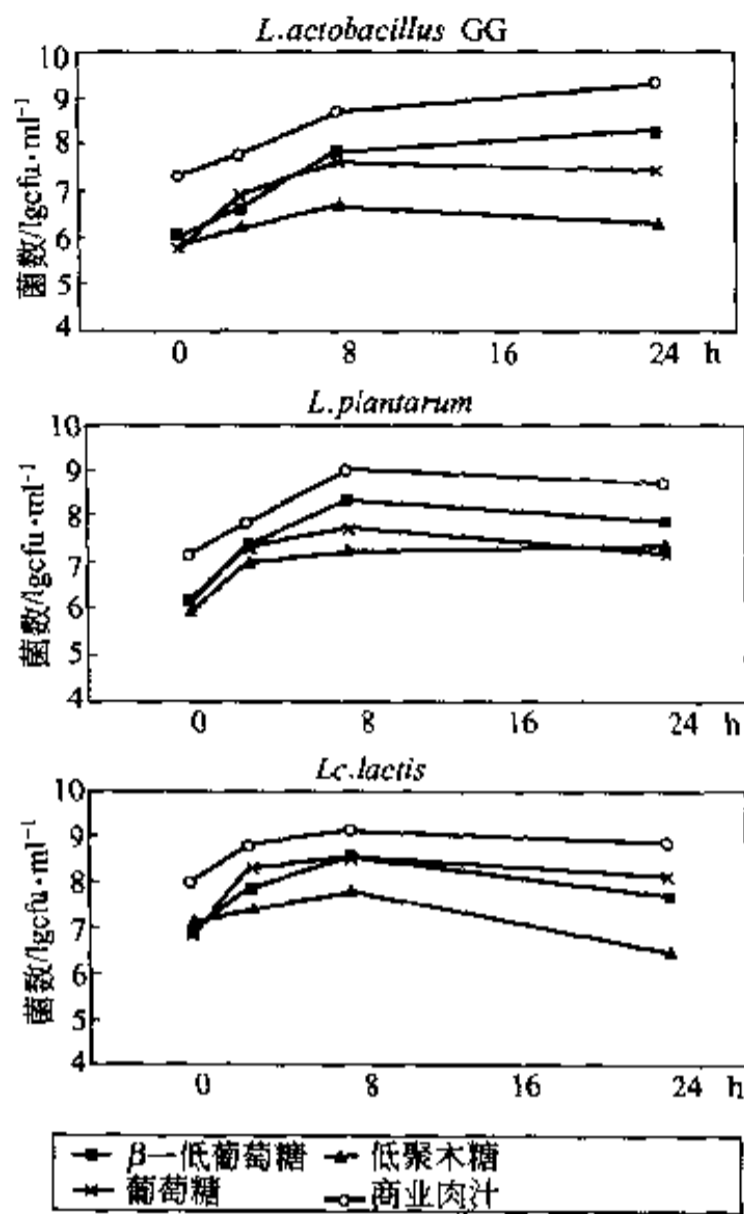


图 6-26 菌的生长速度 (lgcfu/ml)

注: 商业化培养基指 MRS 培养基,
结果为两样品的平均值

低聚果糖对益生菌不是选择性生长底物, 13 种肠道菌全部可在此培养基上生长, 6 种益生菌的 3 种, *B. infantis*, *B. bifidum* 和 *L. acidophilus* 能够利用低聚果糖, *B. longum* 不能利用低聚果糖, *Bact. fragilis* 生长同 *B. infantis* 一样多。

4. *Lactobacillus* 的糖利用特点

Kontula 等着重研究了燕麦对 *Lactobacillus* 的增殖效果, *Lactobacillus* GG、*L. plantarum* 和 *Lc. lactis* 对其的利用率如表 6-30 所示。从表中可以看出 β-低聚葡萄糖对 *Lactobacillus* 的增殖效果优于低聚木糖, 这与以前的研究结果一致。

Lactobacillus 对各种糖培养基中的生长速度如图 6-26 所示。结果发现仅 *L. plantarum* 在低聚木糖培养基上有一定增殖, 其他菌无增殖性。LGG 和 *Lc. lactis* 能够在某种程度利用全部种类的 β-低聚葡萄糖。

各种乳酸菌利用糖类发酵的最终产物如表 6-31 所示。对低聚糖发酵最终产物和葡萄糖发酵最终产物比较时, 通常是乳酸下降, 甲酸、乙酸和乙醇上升, 此外还发现有少量乙醛和二乙酰存在, 低聚木糖的最终产物中乙醇量明显上升; 和其他

两种 *Lactobacilli* 比较, *Lc. lactis* 产生明显多的 CO₂。

表 6-31 在不同糖类底物上菌代谢的最终产物

菌	乳酸/(μmol/ml)	乙酸/(μmol/ml)	甲酸/(μmol/ml)	CO ₂ /(nmol/ml)	乙醇/(nmol/ml)
β-Gluco-lligosaccharides					
<i>Lactobacillus</i> GG	27	2.2	3.9	0.4	5.0
<i>L. plantarum</i>	24	1.1	0.6	0.4	5.7
<i>Lc. lactis</i>	38	1.1	0.9	2.4	5.0
Arabinoxylo-oligosaccharides					
<i>Lactobacillus</i> GG	1.7	1.2	0.0	0.0	15
<i>L. plantarum</i>	2.4	1.2	0.0	0.1	14
<i>Lc. lactis</i>	2.0	2.1	0.0	5.4	15
Glucose					
<i>Lactobacillus</i> GG	58	0.0	1.5	0.7	0.6
<i>L. plantarum</i>	50	0.0	0.0	0.7	0.0
<i>Lc. lactis</i>	42	0.0	0.4	5.7	1.0

二、冷藏过程中发酵乳制品的 LGG 活菌数量变化

Nighswonger 等研究含有 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 酸奶和发酵酪乳, 在 5~7°C 贮存 28 天的有益菌数变化情况。传统认为 *L. acidophilus* 发酵乳仅在一周的贮存期内能提供足以保

持健康的活菌数，贮存一周以上的产品活菌数下降，其疗效作用降低；早期研究中由于其他菌的存在对 *L. acidophilus* 定量较为困难，这主要源于无选择性好的培养基，以使 *L. acidophilus* 和其他菌落有效地分辨；后来 Kulp 的研究表明若贮存得当，*L. acidophilus* 在一周以上的贮存应是稳定的；目前 *L. acidophilus* 因其风味的缺陷使其发展受到限制。

Nighswonger 的研究表明：*L. acidophilus* 和 *L. casei* 在 CLBS、CLBSO 和 Lactobacilli 的 MRS (MRS 肉汁 + 1.5% 琼脂) 培养基上，形成相等数量的菌落，且无 Lactobacilli 时培养基对照实验发现无菌落形成，故认为 CLBS 和 CLBSO 是发酵酪乳和酸奶中，*L. acidophilus* 和 *L. casei* 总菌数、胆汁耐受菌数计数的合适培养基。

含 *L. acidophilus* 43121 的酪乳，贮于 5℃ 7 天以后贮存时间增加，菌数下降 (见表 6-32)，在 0~7 天的范围内菌数稍有增加，这可能归因于贮存初期 Lactobacilli 簇或链的破坏，在 21 天时菌数的下降变得很明显；*L. acidophilus* 的胆汁耐受性菌数呈类似的变化规律性。*L. acidophilus* MUH-41 在贮存期总菌数没有下降，*L. acidophilus* La-5 的情况和其相似，但在 CLBSO 培养基上较 CLBS 在许多实验点上总菌数要低。*L. acidophilus* L-1、O-16 和 *L. rhamnosus* GG 在 5℃、0~28 天的贮存过程中，总菌数和胆汁耐受菌数没有下降，且在 CLBS 和 CLBSO 培养基上计数没有差异。

表 6-32 酪乳贮存(5℃)对 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 活菌数的影响

介 质	贮存(5℃)	<i>L. acidophilus</i>					<i>L. caesi</i> GG
		43121	MUH-41	O-16	L-1	La-5	
	(d)	(lg cfu/g)					
CLBS	0	7.38 ^{ab}	7.30 ^{ab}	7.89 ^b	6.85 ^b	6.97 ^{ab}	7.47 ^b
	7	7.55 ^a	7.58 ^a	8.33 ^a	7.48 ^a	7.20 ^a	8.16 ^a
	14	7.09 ^b	7.16 ^b	7.84 ^b	6.91 ^b	6.73 ^{bc}	7.58 ^b
	21	6.69 ^c	6.99 ^b	7.85 ^b	7.13 ^{ab}	6.62 ^{bc}	7.39 ^b
	28	6.36 ^c	7.00 ^b	7.00 ^b	6.79 ^b	6.57 ^c	7.34 ^b
CLBSO	0	7.34 ^{ab}	7.17 ^{ab}	7.17 ^{ab}	6.83 ^b	6.93 ^a	7.49 ^b
	7	7.44 ^a	7.34 ^{a-2}	7.34 ^{a-2}	7.41 ^a	7.13 ^a	8.15 ^a
	14	6.74 ^{b-2}	6.76 ^{c-2}	6.76 ^{c-2}	6.81 ^b	6.55 ^{b2}	7.64 ^b
	21	6.52 ^{b-2}	6.84 ^{bc-2}	6.84 ^{bc-2}	7.00 ^b	6.46 ^{b2}	7.40 ^b
	28	6.19 ^{b-2}	6.78 ^{c-2}	6.78 ^{c-2}	6.66 ^b	6.52 ^b	7.29 ^b

注：a, b, c 代表三个样品的平均值。

1. CLBS=以纤维二糖作为惟一碳源的 *Lactobacillus* 选择培养基；

CLBSO=CLBS+0.15%牛胆汁 (oxgall)。

2. 对相同菌株相同样品以 CLBSO 计数少于在 CLBS 培养基上计数。

酸奶中的 *L. acidophilus* 或 *L. rhamnosus* GG 在贮存的任何天数 (7℃) 总数菌和胆汁耐受菌数间没有不同 (见表 6-33)；含 *L. acidophilus* 43121 的酸奶在 7℃、28 天的贮存其菌数大大下降，*L. acidophilus* MUH-41 和 La-5 在 21 天的贮存菌数就有大的变化，在 28 天贮存中 *L. acidophilus* L-1 和 *L. rhamnosus* GG 没有下降。

用 YC-4 生产的酸奶，在 CLBSO 上计数结果高于 CLBS (见表 6-34)。*L. acidophilus* 43121 在 28 天的贮存过程中没有下降，*L. acidophilus* MUH-41 则有明显下降，酸奶中 *L. acidophilus* O-16 的总菌数在贮存 14 天下降，21 天进一步下降，28 天再次减少。*L. acidophilus* L-1 和 *L. rhamnosus* GG 在 28 天贮存期内稳定。

表 6-33 用 CM-2 生产酸奶于 7℃ 贮存对菌数的影响

介 质	贮存(7℃)	<i>L. acidophilus</i>					<i>L. caesi</i> GG
		43121	MUH-41	O-16	L-1	La 5	
	(d)	(lg cfu/g)					
CLBS	0	7.67 ^a	7.13 ^a	7.87 ^a	7.28 ^a	6.94 ^a	7.29 ^b
	7	7.68 ^a	7.16 ^a	7.81 ^a	7.34 ^a	6.82 ^a	7.67 ^a
	14	7.50 ^a	7.06 ^{ab}	7.68 ^{ab}	7.33 ^a	6.64 ^a	7.65 ^a
	21	7.42 ^{ab}	6.79 ^b	7.39 ^{bc}	7.13 ^a	5.72 ^b	7.71 ^a
	28	7.13 ^b	6.83 ^{ab}	7.29 ^c	7.03 ^a	5.39 ^b	7.62 ^{ab}
CLBSO	0	7.69 ^a	7.25 ^a	7.83 ^a	7.30 ^{ab}	7.05 ^a	7.26 ^b
	7	7.68 ^a	7.27 ^a	7.84 ^a	7.36 ^a	6.92 ^a	7.68 ^a
	14	7.52 ^{ab}	7.11 ^{ab}	7.77 ^a	7.38 ^a	6.74 ^a	7.69 ^a
	21	7.38 ^{ab}	6.71 ^b	7.54 ^{ab}	7.12 ^{ab}	6.03 ^b	7.68 ^a
	28	7.23 ^b	6.85 ^b	7.22 ^b	7.02 ^b	5.82 ^b	7.58 ^a

注: a, b—每个值代表 3 个样品平均值, 介质培养基同表 34。

表 6-34 用 YC-4 发酵酸奶于 7℃ 贮存活菌数的变化

介 质	贮存(7℃)	<i>L. acidophilus</i>					<i>L. caesi</i> GG
		43121	MUH-41	O-16	L-1	La-5	
	(d)	(lg cfu/g)					
CLBS	0	7.30 ^a	7.15 ^{ab}	7.39 ^a	7.41 ^a	7.00 ^a	7.30 ^a
	7	7.29 ^a	7.20 ^a	7.12 ^{ab}	7.22 ^{ab}	7.08 ^a	7.45 ^a
	14	7.20 ^a	7.04 ^{ab}	6.75 ^{bc}	7.23 ^{ab}	6.38 ^b	7.46 ^a
	21	7.36 ^{a,2}	6.76 ^{bc}	6.59 ^c	7.14 ^a	5.86 ^c	7.61 ^a
	28	7.30 ^{a,2}	6.63 ^c	6.02 ^d	6.87 ^b	5.56 ^c	7.47 ^a
CLBSO	0	7.30 ^a	7.21 ^{ab}	7.35 ^a	7.40 ^a	7.02 ^a	7.33 ^a
	7	7.28 ^a	7.48 ^{a,3}	7.20 ^{ab}	7.21 ^{ab}	7.13 ^a	7.47 ^a
	14	7.27 ^a	7.11 ^{ab}	6.92 ^b	7.27 ^{ab}	6.59 ^b	7.43 ^a
	21	7.35 ^{a,2}	7.45 ^{a,3}	7.05 ^{ab,3}	7.23 ^{ab}	6.22 ^{b,3}	7.55 ^a
	28	7.24 ^{a,2}	6.92 ^{b,3}	6.33 ^{c,3}	6.90 ^b	5.66 ^c	7.45 ^a

注: a, b, c 同表 6-32。

上述结果表明: 发酵酪乳是 *L. acidophilus* 和 *L. rhamnosus* GG 良好食品载体, 它对保存对人体健康起到有益作用的活菌数是适宜的。在酪乳或酸奶发酵后向其中添加 1×10^7 cfu/g 的活菌, 在 28 天贮存后 *L. acidophilus* 的量在 1×10^6 cfu/g 以上, *L. rhamnosus* GG 表现出高的贮存稳定性。鉴于 *L. acidophilus* 不同菌株间的贮存稳定性差异较大, 故建议对 *L. acidophilus* 不同菌株进行筛选和优化, 以期找出贮存稳定、肠道定殖性好的菌株。

参 考 文 献

- 1 Finegold SM, et al., Am. J. Clin. Nutr. 30: 1781-1792, 1977
- 2 Paul D. and Hoskins LC, J. Clin. Nutr., 25: 763-765, 1972
- 3 Savage DC, Am. J. Clin. Nutr., 32: 113-118, 1979
- 4 Conway PL, et al., J. Dairy Sci., 70: 1-12, 1987
- 5 Hethelius M. et al., Infect. Immun. 57: 2447-2451, 1989
- 6 Goubach, Sl. et al., Ann. Med 27: 37-41, 1990
- 7 O'Halloran, S., et al., Functional Foods, Designer Foods for the Future, Cork, Ireland, 1997
- 8 Beachey, E. H. J. Infect. Dis., 143 (3): 325-345, 1981
- 9 Lehto, e. M. and salminen, so, Biosci. Microflora, 16 (1): 13-17, 1997
- 10 Mikelsaar, M. et al., Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Marcel Dekker, New York, P279-342, 1998

- 11 Turck, D. et al. , *Pediatr. Res.* 33 (6): 546-567, 1993
- 12 Midtredt, A. C. et al. , *J. Pediatr. gastroenterol. Nutr.* , 18: 321-326, 1994
- 13 Kirjavainen, P. V. et al. , *FEMS Microbiol. letters* 167: 185-189, 1998
- 14 Sarem-Damerdj, L. O. et al. , *FEMS Microbiol. letters* 131: 133-137, 1995
- 15 E. M. Tuomola, et al. , *letters in Applied Microbiology* 28: 159-163, 1999
- 16 Chavviere, G. , et al. , *J. General Microbiol.* , 138: 1689-1696, 1992
- 17 Elina M. lehto and Seppo Salminen, *Bioscience Microflora*, 16 (1): 13-17, 1997
- 18 Elina M. Tuomola (dee'lehto) and seppo J. Salminen, *International J. Fod Microbiol.* , 41: 45-51, 1998
- 19 Clements ML. , et al. , *Progress in food and Nutritional Sciences* 7: 29-37, 1983
- 20 Friis-Moller, A. and Hey, A. *Current Therapeutic Research*, 33: 807-815, 1983
- 21 Hitchins, A. D. and McDonough, F. E. *Amo J. Clin. Nutrition* 49: 675-684, 1989
- 22 Perteson, L. et al. , *XV Symposia of the Swedish Nutrition Foundation. Almqvist and Wiksell, Vppsala P127-130*, 1983
- 23 Silva , M. et al. , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 1231-1233, 1987
- 24 M. saxelin, et al. , *Microbial Ecology in Health and Disease* 4: 209-214, 1991
- 25 Saxelin, M. et al. , *International J. Food Microbiol.* , 25: 199-203, 1995
- 26 Goldin, B. et al. , *Digestive Diseases Science* 37: 121-128, 1992
- 27 M. Sexelin, et al. , *Microbial Ecology in Health and Disease* 6: 119-122 (1993)
- 28 Bennet, R. et al. , *Pediatr. Infect. Dis. , J.* , 5: 533-539, 1986
- 29 Sakata, Ho et al. , *Eur J. Pediatr.* , 144: 186-190, 1985
- 30 Hall, M. A. et al. , *Arch. Dis. Chilk.* 65: 185-188, 1990
- 31 Goldman, D. A. et al. , *J. Pediatr.* , 92: 288-293, 1978
- 32 Millar, M. R. , et al. , *arch. Dis. child.* 67: 53-56, 1992
- 33 Hoy, C. , et al. , *Arch. Dis. Chilk.* 65: 1057-1059, 1990
- 34 Millar, M. R. , et al. , *Arch. Dis. chilk* 69: 483-487, 1993
- 35 Keumanu, P. D. , et al. , *Pediatr. Infect. Dis. , 5: 663-668*, 1986
- 36 Marini, a. , et al. , *Developmental phsiopathology and clinics*, 7: 87-94, 1997
- 37 Stansbridge, E. M. et al. , *Arch. Dis. Child.* 69: 488-492, 1993
- 38 Hall, M. A. et al. , *Arch. Dis. child.* , 65: 185-188, 1990
- 39 E. sepp, et al. , *Microbial Ecology in Health and Disease* 6: 309-314, 1993
- 40 Sheen, P. et al. , *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 52 (5): 389-392, 1995
- 41 細田正孝等, *ゼアイズス* 8: 21-28, 1994
- 42 Benno, Yo, et al. , *Nutrition Today Supplement* 31 (6), 9-11, 1996
- 43 Silva, M. et al. , *Am. Soe. Microbiol.* , 31 (8): 1231-1233, 1987
- 44 Yang . Z. N. et al. , *J. Food Protection* 60 (7): 786-790, 1997
- 45 Huttunen, E. et al. , *Dairy J.* 5: 503-513, 1995
- 46 Elina, M. et al. , *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18: 125-132, 1997
- 47 S. Hudault, et al. , *american Society for Mccrobiology*, 63 (2): 513-528, 1997
- 48 D. C. Donobue, et al. , *Lactic Acid Bacteria Ed. Salminen and Vonwright , 1993 P307-313 Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hongkong*
- 49 M. Saxelin, et al. , *Infectious Diseases in clinical practice* 5: 331-335, 1996
- 50 Collins MD, et al. , *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 105-108, 1989
- 51 S. Tynkkynen, et al. , *Inter. J. Food Microbiol.* 41: 195-204, 1998
- 52 W. H. Ling, et al. , *Microbiol Ecology in Health and Disease*, 7: 99-104, 1994
- 53 T. Rokka et al. , *Milchwissenschaft*, 52 (12): 675-677, 1997
- 54 W. H. Ling et al. , *American Institute of Nutriton*, 18-23, 1994
- 55 W. H. Ling et al. , *Ann Nutr. Metab.* , 36: 162-166, 1992
- 56 J. hanneke, G. H. et al. , *Microecology and Therapy* 25: 304-309, 1995
- 57 J. G. H. Ruseler, et al. , *Scand. J. Gastroenterol.* 30: 675-680, 1995
- 58 R. korpela, et al. , *Inte. J. Food Microbiol.* , 37: 83-86, 1997
- 59 Goldin BR, et al. , *Digestive Diseases and Sceences* 37: 121-128, 1992
- 60 Ling WH, et al. , *annals of Nutrition and Metabolism* 36: 162-166, 1992

- 61 U. Siigur, et al. , *Microbial Ecology in Health and Disease* 9; 271-277, 1996
- 62 Siigur, U. et al. , *Microbial Ecology in Health*
- 63 Oberbelman RA, Gilman RH et al. , *J. Pediatr.* , 134; 15-20, 1999
- 64 Siitonen S, et al. , *Ann. Med.* , 22; 57-59, 1990
- 65 Yougn RJ, et al. , *Gastroent. Int* 11, Suppl. 1; 86, 1998
- 66 Tynrryinen S. et al. , *Inter. J. Food Microbiol.* , 41; 195-204, 1998
- 67 Oksanen, P. et al. , *Ann. Med.* , 22; 53-56, 1990
- 68 Hilton, E. et al. , *J. Travel Med.* , 4; 41-43, 1997
- 69 Isolauri E. et al. , *Pediatrics* 88; 90-97, 1991
- 70 Kaila M. et al. , *Pediatr. Res.* , 32; 141-144, 1992
- 71 Isolauri E. , et al. , *Dig Dis. Sc.* , 39 (12); 2595-2600, 1994
- 72 Majamaa, H. , et al. , *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* , 20; 333-338, 1995
- 73 Kaila, M. , et al. , *Arch. Dis. Child.* , 72; 51-53, 1995
- 74 Shornikova, A-V. , et al. , *Acta Pediatr.* 86; 460-465, 1997
- 75 Pant, AR. et al. , *J. Tropic Pediatrics* 42; 162-165, 1996
- 76 Raza, S. , et al. , *Pediatr. Infect. Dis.* , 14; 107-111, 1995
- 77 Guarino, A. , et al. , *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* , 25; 516-519, 1997
- 78 Rautanen, T. , et al. , *Arch. Dis. child.* . 79; 157-160, 1998
- 79 Guanda lin, S. , et al. , *Gastroent. Inter.* 11, Suppl. 1; 87-90, 1998
- 80 Sepp, E. , et al. , *Microecol. Therapy* 23; 74-80, 1995
- 81 Naaber, P. , et al. , *J. Med. Microbiol.* , 47; 1-8, 1998
- 82 Salminen, S. et al. , *Br. J. Nutr.* 80, Suppl. 1; S147-S171, 1998
- 83 Standsbridge, EM. et al. , *Arch. Dis. Child.* , 69; 488-492, 1993
- 84 Siigu, U. et al. , *Microbial. Ccol. Health Dis.* , 9" 271-277, 1996
- 85 Bennet, RG. et al. , *Nutrition Today* 31 (6), Suppl. 1; 35S-38S, 1996
- 86 Biller, JA. et al. , *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* , 21; 224-226, 1995
- 87 Gorbach, SL. et al. , *Lancet* Dec. 26; 1519, 1987
- 88 Isolauri, E. et al. , *Gastroenterol.* , 105; 1643-1650, 1993
- 89 Majamaa, H. et al. , *J. Allergy Clin. Immunol.* , 99; 179-185, 1997
- 90 Sutas, Y. et al. , *J. Allergy Clin. Immunol.* 98; 216-224, 1996
- 91 Guarino, A. *Gastroent Inter.* 11, Suppl. 1, P91, 1998
- 92 Tuomola, E. PH. D. Thesis Turku university Department of Biochemistry and Food chemistry, 1990
- 93 Hudault, S. , et al. , *Appl. Environ. Microbiol.* , 63; 513-518, 1997
- 94 Goldin BR *Nutrition Today* 31 (6), suppl. 1; S24-S27, 1996
- 95 Lidbeck, A. , et al. , *Eur J. Cancer prev.* , 1; 341-353, 1992
- 96 Goldin BR, et al. , *Nutr. Cancer*, 25; 197-204, 1996
- 97 J. Jaskari. et al. , *Appl. Microbiol, Biotech.* , 49; 175-181, 1998
- 98 P. Kontula, et al. , *Inter. J. Food Microbiol.* , 45; 163-169, 1998
- 99 HoSalovaara, et al. , *Proceedings of Euro Food Chem.* VII, P314-316, 1993 Valencia, Spain
- 100 B. D. Nighswonger, et al. , *J. Dairy Sci.* , 79; 212-219, 1996
- 101 Kosikowski, F. V. , *Cheese and Fermented Milk Products.* 2nd ed. Edwards Brothers , Inc. , Ann Arbor, MI. 1977
- 102 J. Jaskari, et al. , *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 49; 175-181, 1998
- 103 Pia Kontula, et al. , *International J. Food Microbiol.* , 45; 163 169, 1998
- 104 H. Salovaara, et al. , *Proceedings of Euro Food Chem.* III , Valencia, Spain, 1993

第七章 植物乳杆菌及其制品

第一节 *L. plantarum* 生理生化特征

一、*L. plantarum* 生长的影响因素

乳酸菌，尤其是 *Lactobacillus* 经常可以从不同的食品中分离得到，如泡菜、发酵蔬菜、酸奶、干肠和饮料。*L. plantarum*、*L. sake* 和 *L. curvatus* 经常从烟熏鱼和海产品中分离获得，由于它们分泌的有机酸、 H_2O_2 和细菌素对腐败菌和病原菌有抑制作用，故它们常用于确保海产品的微生物安全。在这些产品中水分活性、NaCl 浓度和烟熏情况均和 *L. plantarum* 的生长密切相关，Catle 等 (1999) 研究了这些影响，为 *L. plantarum* 发酵产品中 *L. plantarum* 生长最适条件的确立提供了理论依据。

表 7-1 列出 *L. plantarum* 在不同介质中生长时，NaCl 和烟熏剂对延滞期 (T_{lag}) 和对数期 (T_{growth}) 的数据。*L. plantarum* 在介质 7 和 8 ($a_w=0.91$ 和 $NaCl=80g/L$) 中不能生长。当 $a_w=0.95$ 时高盐、高浓度烟熏剂使 *L. plantarum* 具有较长的延滞期 (介质 4)， $a_w=0.91$ 时延滞期较短。同时在烟熏剂和水分活度间对延滞期存在相反的影响，在含 $4.33mol/L$ 烟熏剂的介质中到达最大 T_{lag} 的时间较长。

表 7-1 *L. plantarum* 生长的相关数据

介质	烟熏剂 / (ml/L)	NaCl / (g/L)	a_w	T_{lag}	T_{growth}	OD_{max}	ΔpH	最终 pH	$\Delta pH/OD_{max}$
1	0.33	40	0.95	0.7(0.0)	2.3(0.4)	1.38(0.26)	1.50(0.03)	4.66(0.02)	0.97
2	4.33	40	0.95	0.7(0.0)	13.1(0.6)	2.05(0.20)	1.32(0.03)	4.85(0.00)	0.68
3	0.33	80	0.95	2.9(0.9)	9.5(1.6)	0.94(0.07)	1.50(0.09)	4.48(0.10)	1.56
4	4.33	80	0.95	5.4(0.3)	10.4(1.3)	1.04(0.11)	1.36(0.11)	4.60(0.07)	1.27
5	0.33	40	0.91	13.7(2.0)	6.9(1.5)	0.69(0.15)	1.41(0.01)	4.94(0.01)	2.19
6	4.33	40	0.91	0.9(0.1)	19.7(0.9)	0.82(0.21)	1.28(0.07)	4.92(0.04)	1.39
7	0.33	80	0.91	>28	nd	0.24(0.01)	0.04(0.05)	6.17(0.08)	nc
8	4.33	80	0.91	>28	nd	0.30(0.06)	0.12(0.04)	6.08(0.04)	nc

对 OD_{max} 、 ΔpH 、最适 pH 的观察结果表明：*L. plantarum* 生长获得的最大生物量 (OD) 从 0.69 至 2.05 间变化，该菌能在 $a_w=0.95$ 时于 $80g/L$ NaCl 中生长；当进一步添加甘油时，即使 $a_w=0.91$ 时在相同浓度 NaCl 中 *L. plantarum* 也不能生长。Matano 等 (1993) 研究了 *L. plantarum*221 在 $80g/L$ NaCl 中 (改良 MRS 液体培养基)， $a_w \geq 0.93$ 时 *L. plantarum* 的 4 株菌能够生长。当 NaCl 浓度限制在 $40g/L$ 和 $a_w=0.91$ 时，发现 *L. plantarum* 也能够生长，故说明 NaCl 对 *L. plantarum* 的影响不仅仅限于它对介质 a_w 的影响。

烟熏剂浓度对菌生长的最大值没有抑制作用。介质的最终 pH 在 4.60~4.94 之间，酸的产生和生长周期有关 (当 pH 保持恒定时)。对于高盐或低 a_w 介质酸化比率 ($\Delta pH/OD_{max}$) 较高，这表明酸化能力既不被盐浓度也不被水分活性降低。

三因素 OD_{max} 、 ΔpH 、最终 pH 之间的相互作用如表 7-2 所示。对于 OD_{max} ，NaCl 和 a_w

表 7-2 影响因素和因素相互作用对 *L. plantarum* 的生长重要性

	M	烟熏	NaCl	a_w	烟熏-NaCl	NaCl- a_w	烟熏- a_w	烟熏-NaCl- a_w
OD _{max}	0.93	** (0.12)	*** (-0.30)	*** (-0.42)	* (-0.08)	NS (0.06)	* (-0.07)	NS (0.06)
ΔpH	1.07	*** (-0.05)	*** (-0.31)	*** (-0.35)	* (0.03)	*** (-0.32)	* (0.03)	NS (0.02)
最终 pH	5.09	NS (0.02)	*** (0.24)	*** (0.44)	NS (-0.02)	*** (0.35)	*** (-0.05)	NS (0.00)

是重要因素，当它们的水平为+1时 OD_{max} 下降。烟熏的影响是重要的，但计算值和实验误差同一数量级，故不能将其作为影响因素。在因素间无相互作用影响到 OD_{max}，NaCl、 a_w 和 a_w -NaCl 相互作用对 ΔpH 的影响较大，最终 pH 受相互因素影响。

二、*L. plantarum* 的乳糖代谢性质

L. plantarum 是同型发酵乳酸菌，它能代谢乳糖产生乳酸，*L. plantarum* 在处理乳清中乳糖转化时，具有其他菌无法比拟的优越性，它既可高转化率地利用乳糖转化为乳酸，又可利用乳清中的残留蛋白质。Fu 等 (1999) 对 *L. plantarum* 代谢乳糖的动力学模型、pH、底物和氧的影响进行了深入的研究，获得了很多具有借鉴意义的成果。

(一) 发酵物中 pH 的影响

图 7-1 是不同 pH (4~7) 情况下用合成乳糖培养基进行的 *L. plantarum* 批次发酵情况。在此发酵体系中乳酸是唯一的代谢产物，仅有极少量的乙酸产生 (<0.3%)，故认为

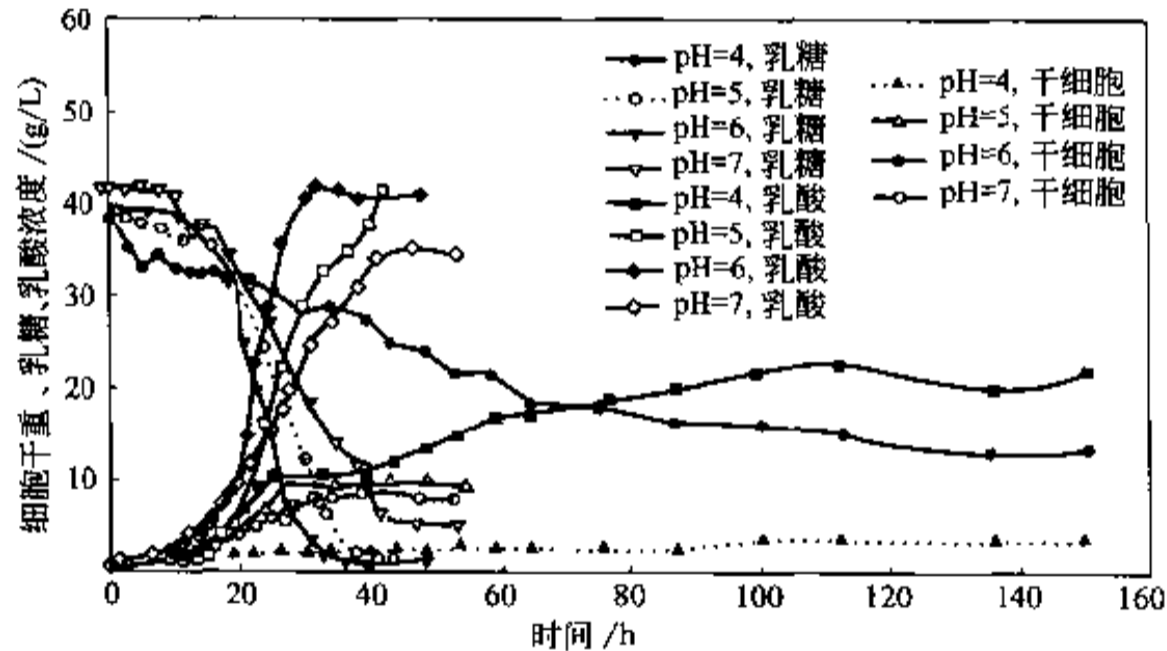


图 7-1 厌氧条件下 pH 对乳糖批次发酵的影响
(乳糖对乳酸的完全转化率为 105% W/W)

L. plantarum 对乳糖是同型发酵，图中清晰地表明在 pH=4 时低 pH 抑制了菌的生长，而较高的 pH5~7 时菌生长速度较快，在 pH5~6 时菌的生长曲线经历了一个快速生长期，接下来是一个长的平衡期 (15~20h)。在乳糖底物被用尽时细胞生长进入死亡期。pH 对细胞生长的影响部分是由在培养基中已解离和未解离乳酸的浓度所引起的，许多研究表明解离和未解离乳酸有抑制作用，且未解离乳酸较解离乳酸的抑制能力更强。乳酸的 pK_a 是 3.86，解离的乳酸根离子浓度 $[L^-]$ 和未解离乳酸的浓度 $[HL]$ 可通过下式来表示： $pK_a = \text{pH} - \lg ([L^-] / [HL])$ 。在乳清发酵时乳酸的典型浓度是 50gL^{-1} ，这种酸的总摩尔浓度为： $[L^-] + [HL] = 50\text{gL}^{-1}$ ，在 pH5.0 时据上面两式可得到总乳酸的 93.2% 被解离，这就意味着仅有 6.8% 的乳酸未解离。但当 pH 降为 4 时未解离乳酸达 42%，这说明在低 pH 时细胞低速生长的部分原因。许多研究表明无论酸化剂如何，*L. plantarum* 保持起始 pH4.6~4.8 梯度降至 pH3.0，故它能在 pH4.0 继续生长，只是生长速度变慢，

L. plantarum 和其他乳酸菌比较更适于在低 pH 时发酵。

在图中表明了不同 pH 时乳糖的消耗速度，直至乳糖消耗完，乳酸的形成一直继续。pH=4 时由于高酸度环境导致低的细胞生长速度和细胞密度，乳糖消耗缓慢，一周的发酵也未完全消耗完乳糖。*L. plantarum* 发酵的最适 pH 为 5~6，此时仅需 36~40h 就可完全消耗尽乳糖，这表明 *L. plantarum* 是从废水中转化乳糖为乳酸的高效菌株。只要介质 pH 远离菌的最适 pH，无论乳酸是否解离，抑制效应均增加。

在最适 pH5~6 时产生最高量的生物量 (11.0g/L^{-1}) 和乳酸 (41.0g/L^{-1})，乳酸产生和菌生长呈强相关性，菌体的快速生长直接影响乳糖向乳酸的转化 (>95% 的转化率) 和最终产量，在合适 pH 36h 可发酵完全。

(二) 底物浓度对批次发酵物的影响

为了测试底物浓度对细胞生长的影响，在没有控制 pH 的情况下对不同底物浓度 (20~60 g/L^{-1}) 乳糖进行了实验，其细胞生长曲线如图 7-2 所示。研究表明在对数期仅有轻微的底物抑制发生，20 g/L^{-1} 的低底物浓度有最短的菌生长延滞期，当底物浓度为 60 g/L^{-1} 时延滞时间增长为 5h。在延滞期以后即在菌的对数期所有底物浓度条件下菌的生长速度相同。由于没有控制 pH，pH 下降是由乳酸积累引起，乳酸积累和 pH 下降大大缩短了平衡期，生长曲线经过短的平衡期而后进入死亡期，在死亡期细胞浓度剧烈下降，此时底物的起始浓度影响很小。据此可以认为底物起始浓度影响细胞生长的延滞期，但在乳酸发酵时底物的抑制效应可以忽略不计。

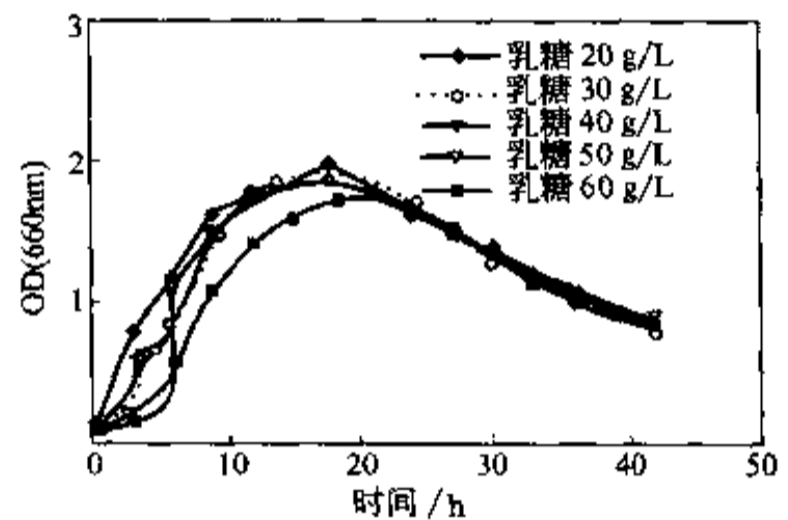


图 7-2 起始乳糖浓度对细胞增长的影响 (不控制 pH)

(三) 厌氧和有氧乳酸发酵的比较

L. plantarum 是一种兼性菌，它能利用氧作为细胞生长和代谢的电子受体。Murphy 等 (1984) 研究了 *L. plantarum* 在厌氧和有氧情况下葡萄糖发酵情况，在起始发酵的 4~5h 内介质中积累的代谢物是相似的；在长时间发酵后，厌氧代谢的最终产物是乳酸，有氧代谢最终产物为乙酸。37°C、pH6.0 有氧和厌氧乳糖发酵情况如图 7-3 所示，在厌氧情况下细胞生长在对数期较快，最终的细胞产量较低，40h 发酵后达到 10g/L^{-1} 。相比较有氧情况下最终的细胞产生量较高，经过 48h 发酵后，细胞浓度可达 125g/L^{-1} 。这些结果和 Dirar 等相一致，他们以乳糖为底物，在有氧情况下观察到类似的影响。*L. plantarum* 生长速率的不同归因于有氧和厌氧条件下代谢途径的不同，特别是在有氧条件下 ATP 的产生有利于细胞生长。另一方面氧和 O_2 对有氧条件下细胞生长的低速率负责，这可以说明为什么有氧情况下细胞生长慢而最终细胞产量较高的原因。很明显在两种情况下发酵主要和细胞生长有关，厌氧条件下乳酸的产量是有氧发酵条件下乳酸产量的 2.3 倍。

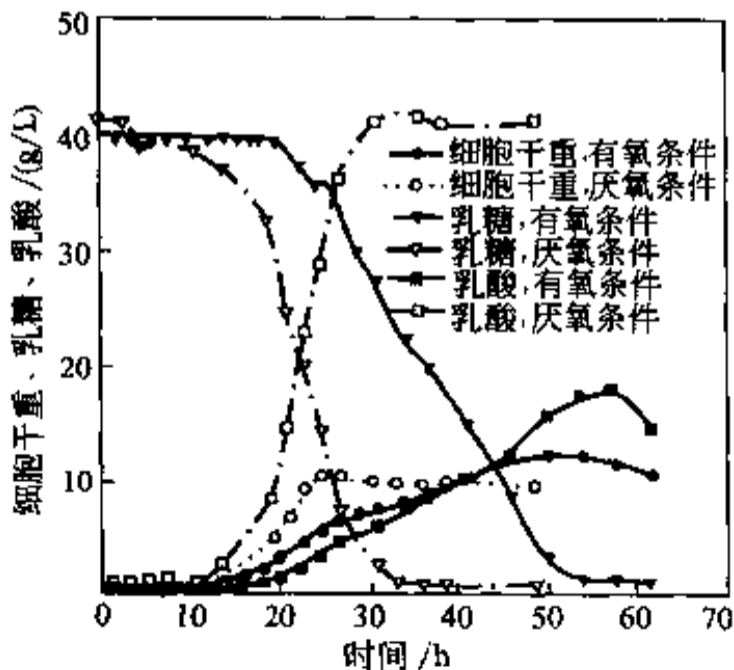


图 7-3 有氧和厌氧发酵比较

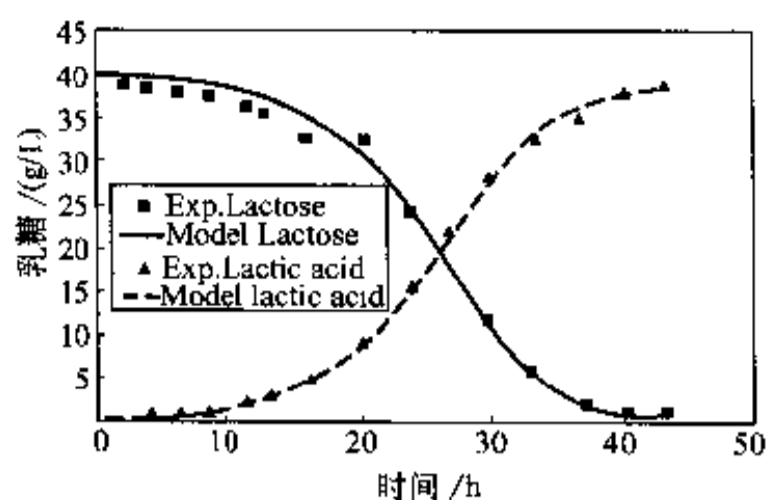


图 7-4 pH5.0 厌氧发酵的模型预言值和实验值

(四) 发酵的动力学模型和参数

图 7-4 是乳糖消耗和乳酸生成的实验数据以及相应的预测模型。二者间有很好的吻合,说明这种方法可用于 *L. plantarum* 乳酸发酵情况的评估。

对于 4 个不同的 pH 值用方程 $P = Y_{P/S} (pH) (S_0 - S) + P_0$ (这里 P 是产生乳酸的浓度, $Y_{P/S}$ 是产品产量系数, P_0 、 S_0 和 S 分别代表产物起始值、底物浓度初始值和测定时刻的浓度) 可以描述如乳糖消耗和乳酸产生的关系,除 pH4.0 外的

所有 pH 情况 $Y_{P/S} = 1$, 故两者是一种线性关系 (见图 8-5)。pH=4.0 时 $Y_{P/S} = 0.724$, 这是由于在如此低 pH 时发酵开始底物的消耗主要用于细胞的生长和保持, 导致产生较低量的乳酸。在延滞期以后, 产量系数 $Y_{P/S}$ 增加为 1.03 (W/W), 这大约是 pH5~7 时的 $Y_{P/S}$ 水平, 最大的理论产量是 1.05 (W/W), 实验数据给出的 $Y_{P/S}$ 范围是 0.95~1.03。低 pH 可以大大降低细胞生长速率, 但产品产量系数不被重要影响, 由非线性实验数据倒推得出的 $Y_{P/S}$ 数据情况如表 7-5 所示。需要指出的是产量系数 $Y_{P/S}$ 可能不能反映转化为产品的底物真实数量, 这是因为在厌氧条件应用的介质不仅含有乳糖而且含有胰蛋白酶产生的胨 (BBL, 10g/L^{-1}) 和酵母浸膏 (5g/L^{-1}), 这些材料含有蛋白质和其他营养素, 它们可为 *L. plantarum* 细胞生长提供营养。表中参数可通过下列方程计算:

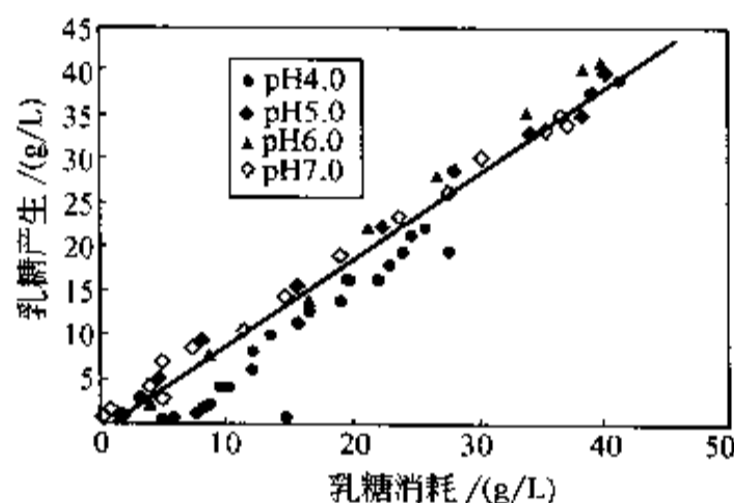


图 7-5 在厌氧条件下乳糖消耗和乳酸产生

$$\mu_{\max} = 0.523 \exp[-0.0106(\text{pH}-5.0)^2] - 0.265 / [0.614 + (\text{pH}-4.0)]$$

$$K_s = 0.605 \exp[0.85(\text{pH}-5.0)^2] + 106.4 / [0.65 + (\text{pH}-4.0)]$$

$$Y_{P/S} = 1.036 \exp[-0.092(\text{pH}-6.0)^2]$$

表 7-3 *L. plantarum* 乳酸发酵的参数

pH	μ_{\max} (1h)	K_s	$Y_{x/s}$ (W/W)	$Y_{p/s}$ (W/W)	pH	μ_{\max} (1h)	K_s	$Y_{x/s}$ (W/W)	$Y_{p/s}$ (W/W)
4	0.0072	178.0	0.005	0.724(1.03)	6	0.364	44.4	0.39	1.02
5	0.382	49.0	0.45	0.97	7	0.286	45.0	0.27	0.956

对于 pH4~7 时的标准误差为 $\mu_{\max} = 0.017$ 、 $K_s = 7.7$ 和 $Y_{P/S} = 0.1$ 。 K_s (比生长速率) 是最大生长速率一半时限制营养素的浓度值, 此值对于许多有氧过程相当小, 在此实验中获得的 K_s 值相当大, 这一模型很好地反映了实验情况。

三、*L. plantarum* 对 β -低聚葡萄糖和低聚木糖的发酵

燕麦纤维 (燕麦麸) 常用于作为乳酸菌的底物, 已有研究表明 *L. rhamnosus* GG 能利用燕麦衍生的 β -葡萄糖低聚物, 燕麦的摄入有利于它在肠道的定殖。另外的体外实验证明燕麦能降低乙酸的摩尔比 11%, 增加丙酸和丁酸的摩尔比 58% 和 5%。丙酸和丁酸影响人体胆固醇的产生, 丁酸能防止肠上皮细胞繁殖, 因此对癌症有抑制作用。近年来 LAB 发酵燕麦产品在市场上的流行, 就是希望结合燕麦纤维和乳酸菌二者的功能, 以便开发更适于人体功

表 7-4 微生物发酵后复聚糖的分布情况

分 子	未发酵混合物的量/(mg/L)	利用率/%		
		<i>Lactobacillus GG</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Lc. lactis</i>
β-葡萄糖原低聚糖				
Glc ₁	495.0	99.09	99.29	96.57
Glc ₂ (1→4)	825.0	93.15	98.67	98.85
Glc ₃ (1→4)	95.00	81.05	76.32	75.26
Glc ₄ (1→4)	27.50	27.27	14.55	3.636
Glc ₅	435.0	51.15	0.000	13.79
Glc ₃ (1→3,1→4)	1840	51.09	-12.22	16.30
Glc ₄ (1→3,1→4)	2395	-7.090	-7.090	5.054
阿拉伯糖低聚糖				
Xyl ₁	273.0	0.000	40.00	0.000
Xyl ₂	140.0	0.000	0.000	0.000
Xyl ₃	<50	0.000	0.000	0.000
Xyl ₄	<100	0.000	0.000	0.000
Xyl ₅	140.0	0.000	0.000	0.000

能特性的产品。

胃肠道微生物酶水解纤维多糖为短链的低聚糖 (2~5 单元), 此时它可以作为乳酸菌和其他肠道菌的碳源。Kontula 等研究了 *L. plantarum* 等菌在燕麦衍生复聚糖中的生长和发酵性质, 这可为 *L. plantarum* 类产品的开发和其他功能的完善提供借鉴和帮助。

Kontula 等 (1998) 的研究表明: β-葡聚糖原的 90% 和木糖原的 33% 能被酶解为低聚糖, β-葡聚糖原的水解产物主要为三糖和四糖 (表 7-4), 聚阿拉伯糖原的水解产物为二糖和三糖。木糖低聚糖的整个混合物含 2350mg/L 的木糖和 720mg/L 的阿拉伯二糖, 后者相当于前者的 31%。

一般而言 β-低聚葡萄糖较低聚木糖更适合作为研究的底物, 这一结论是从分析菌的生长和糖的利用得出的。所有菌株在 β-低聚葡萄糖上的生长和以葡萄糖为底物有可比性 (见图 7-6), 三株菌中仅有 *L. plantarum* 有能力利用低聚木糖, 三株菌的生长和 β-低聚葡萄糖的利用具有很好的相关性, *Lactobacillus GG* 和 *L. lactis* 几乎可以完全利用 β-低聚葡萄糖。*LGG* 和 *L. plantarum* 发酵时三聚或四聚体量稍有上升, 说明高聚物分解成低聚物可以补偿三、四聚糖的消耗。*Lactobacillus GG* 能降解 β-低聚葡萄糖混合物的 27% 为单糖, *L. plantarum* 的能力为 16%, *L. plantarum* 对低聚木糖仅有 1% 的利用。

β-低聚葡萄糖能促进 LAB 的生长, 在低聚糖上的发酵最终产物和以葡萄糖为底物的产物比, 乳酸的生成下降, 乙酸、甲酸和乙醇的产量上升 (见表 7-5)。此外也发现有少量的乙醛和二乙酰生成。对低聚木糖而言, 乙醇的生成明显增加。在三株菌间稍

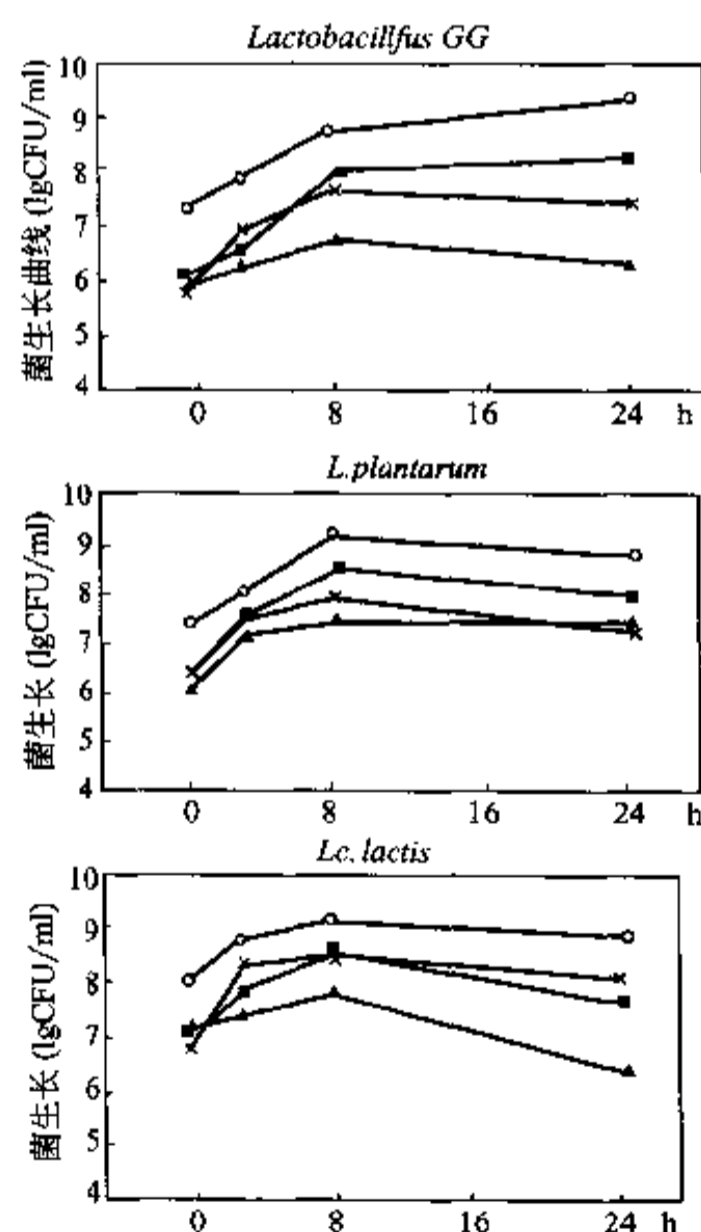


图 7-6 在两种低聚糖上菌的生长速率 (lgcfu/ml)
 ■—β-葡萄糖原低聚糖; ▲—低聚木糖;
 ×—葡萄糖; ○—商业肉汁

表 7-5 LAB 的代谢产物情况

	乳酸/($\mu\text{mol/ml}$)	己酸($\mu\text{mol/ml}$)	甲酸/($\mu\text{mol/ml}$)	CO ₂ /(nmol/ml)	乙醇/(nmol/ml)
β -葡萄糖原低聚糖					
<i>Lactobacillus</i> GG	27	2.2	3.9	0.4	5.0
<i>L. plantarum</i>	24	1.1	0.6	0.4	5.7
<i>Lc. lactis</i>	38	1.1	0.9	2.4	5.0
阿拉伯木糖低聚糖					
<i>Lactobacillus</i> GG	1.7	1.2	0.0	0.0	15
<i>L. plantarum</i>	2.4	1.2	0.0	0.1	14
<i>Lc. lactis</i>	2.0	2.1	0.0	5.4	15
葡萄糖					
<i>Lactobacillus</i> GG	58	0.0	1.5	0.7	0.6
<i>L. plantarum</i>	50	0.0	0.0	0.7	0.0
<i>Lc. lactis</i>	42	0.0	0.4	0.7	1.0

有不同, *L. lactis* 菌较 LGG 和 *L. plantarum* 菌产生更多的 CO₂。

菌的生长模式依赖于细胞的生理状况。同型发酵 LAB 能发酵己糖, 90% 的葡萄糖被代谢成乳酸。异型发酵 LAB 产生乙酸、乳酸、CO₂ 或甲酸, 许多 LAB 能同型代谢己糖和异型代谢戊糖, 菌的代谢产物依赖于可利用的碳水化合物和其生长情况。

MacFarlane 等 (1995) 发现当碳水化合物的浓度低时, *B. breve* 产生甲酸和乙酸, 反之代谢产物为乙酸和乳酸。在 Kontula 等的研究中测试菌在 β -低聚葡萄糖上的生长可能首先利用易代谢的糖, 但乙醇和 CO₂ 的上升表明发酵产生混合酸, 这仅发生在糖的链长度为 3~5 个单元可以被利用的情况。糖的缺乏是菌从同型发酵向异型发酵转化的因素之一, 在低聚木糖为底物时, 由于三株菌对其利用性差导致菌不能很好生长, 故较其他底物产生更多的乙醇。综上可以看出纤维衍生低聚糖能够影响 LAB 代谢的最终产物, 不同的菌株对 β -低聚葡萄糖有很好的利用性, 对低聚木糖仅 *L. plantarum* 有 1% 利用率, 且三株菌对二种糖的代谢产物不同。

四、亚致死性损伤对 *L. plantarum* 延滞期的影响

在食品加工中期望采用最少的加工处理以保持食品的风味和质地, 同时保证食品在微生物方面的安全性和稳定性。许多学者发展了多种模型以预估在有限保质期内食品腐败情况, 这些模型描述了延滞时间、最适生长速率和平衡期之间的关系。当考虑微生物的生长曲线时, 平衡期本身和食品发生腐败多数情况下相关性较差; 最适生长速率模型化比较容易, 模型评估的最大问题在延滞期。Smett 等 (2002) 评估了亚致死损伤对 *L. plantarum* 延滞期的影响, 可为 *L. plantarum* 在食品中的应用提供理论依据。

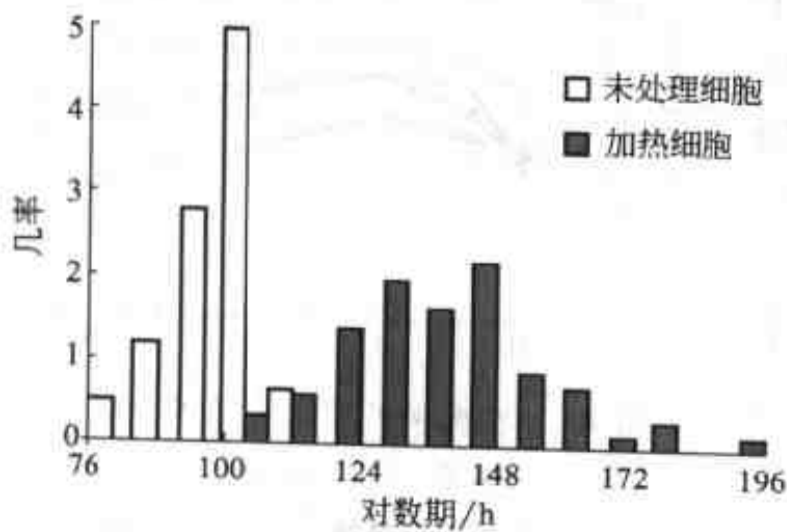


图 7-7 *L. plantarum* 单个细胞延滞时间分布

(一) 延滞时间的分布

图 7-7 是从不同细胞中获得的个体细胞延滞时间测定结果。曲线清楚表明延滞时间的分布在热处理后改变了。经热处理后未损伤细胞和破坏细胞的延滞时间发生了较大的变化, 我们称之为非常值分布 (an extreme value distribution)。Monte Carlo 总结的非常值分布函数如下:

$$F(x) = 1 - \exp \{ -\exp[(x-a)/b] \}$$

(其中 a, b 是从数据评估的未知系数)

图 7-8 是延滞时间和分布的直方图，在延滞期和对数期两方面表现为非常值分布。 a 、 b 可以称之为运动评估体 (movement estimators) 中获得，平均 $E(x)$ 和变量 (x) 之间的变化量为 $x-EV(a, b)$ ， x 按照非常值分布表示为：

$$E(x) = a - 0.5772b$$

$$\text{Var}(x) = b^2 \pi^2 / b$$

延滞时间 (未破坏细胞)

$$\sim EV(a=94.4, b=6.1)$$

lg (延滞时间) (破坏细胞)

$$\sim EV(a=4.95, b=0.10)$$

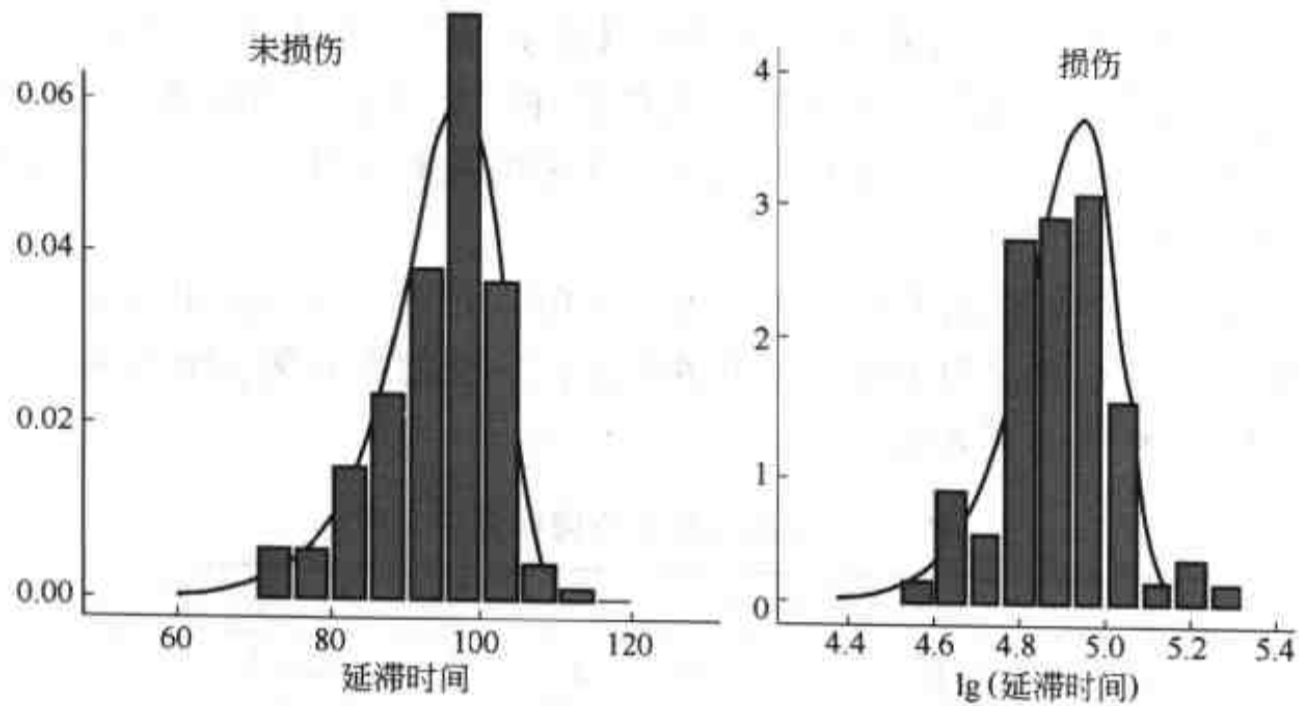


图 7-8 *L. plantarum* 延滞时间的预估

(二) 最短的延滞时间

研究清楚表明：样品的量愈大 (n)，其延滞时间愈短。大量细胞快速生长的机会多。

为了描述一个样品 (n) 最短延滞时间的分布，Smett 等 (2002) 引入 X_i (样品第 i 个细胞的延滞时间)、 Y (所有细胞的最短延滞时间 (min))，得到如下结果：

$$F_Y(y) = 1 - \exp\{-\exp[(x-a)/b]\}$$

$$EY = a - 0.05772b$$

$$\text{Var}(Y) = b^2 \pi^2 / b$$

(1)

这里 $\alpha = a - b \lg n$

当 $n=1$ 时，得到以前的分布状态。方程 (1) 中 X_i 是独立的，即一个细胞的延滞时间和其他细胞无关的情况下该式成立。现在 n 未损伤细胞的最短延滞时间如下：

$$F_{Y_n}(y) = 1 - \exp\{-\exp[y - (97.4 - 6.1 \lg n) / 6.1]\}$$

$$EY_n = 97.4 - 3.5209 - 6.1 \lg n$$

$$\text{Var}(Y_n) = 61.2$$

对于损伤细胞，我们感兴趣 $Y = \exp\{\min[\lg(X_1), \dots, \lg(X_n)]\}$ ，因为 $\lg(X)$ 是非常值分布，故对损伤细胞：

$$F_{\lg(Y)} = 1 - \exp\exp\{x - [4.95 + 0.1 \lg(n) / 0.1]\}$$

$$E \lg(Y_n) = 4.95 - 0.05772 - 0.1 \lg(n)$$

$$\text{Var}(\lg(Y_n)) = 0.0164$$

计数结果表明在菌达到 10^7 cfu/ml 前，腐败不是明显可以觉察到。因为传代时间为 5~9h (或 $\mu_{opt}=0.117$)，故期望的延滞时间和接种量、依赖起始污染程度的腐败时间可通过下列计算：

$$\text{预期腐败时间}(Tts)=5.9(7-\lg(N_0)/\lg(z)+EY_{N_0})$$

式中 N_0 ——接种水平。

五、*L. plantarum* 对亚油酸氧化的抑制作用

脂肪氧化是食品尤其是肉制品腐败的最主要原因之一。在干肠加工过程中，几种因素影响它的氧化速率，这包括原料肉的组成、盐、硝酸盐、佐料和抗氧化剂。肠类的加工也常包括发酵剂，常用发酵菌为 *Staphylococci* 和乳酸菌，乳酸菌和 *Pediococcus* 已被广泛承认对产品的酸化负责。*Staphylococci* 通过亚硝酸还原酶确保产品的颜色，它们也对产品的风味进行贡献，尤其是调整来自脂肪氧化所产生的挥发性物质的水平和性质，但发酵微生物的抗氧化性不清楚。Talon 等 (2000) 研究了干肠发酵菌的抗氧化性质，他们发现 *L. plantarum* 对亚油酸氧化具有抑制作用。

Talon 等研究了影响氧化的不同因素 (见表 7-6)。在菌培养过程中亚油酸的氧化程度不同，表 7-7 是亚油酸在培养过程中氧化上升的情况，乳酸菌在有无 Mn 存在介质中和亚油酸氧化的相互作用在表中也体现出来。

表 7-6 对底物氧化不同因素的影响

因素	<i>Staphylococci</i>		乳酸菌	
	变化区间/%	重要程度	变化区间/%	重要程度
底物	80.0	*****	5.7	**
菌株	1.2	***	14.5	**
培养时间	3.1	*****	45.0	*****
相互作用				
底物和菌株	1.6	*	8.1	*
底物和培养时间	8.0	***	4.3	NS
菌株和培养时间	1.8	NS	13.0	NS
其他因素	4.0		9.2	

表 7-7 灭菌介质中底物氧化的动力学

时间(天)	0	2	5	8	15	20
猪脂肪	3.12	2.23	3.28	3.68	3.27	3.27
C18:1	3.21	3.73	3.73	3.67	2.32	2.19
C18:2	5.12	11.92	24.85	22.40	15.61	13.19
C18:2+Mn	3.63	3.66	15.71	30.47	34.00	ND
C18:3	11.26	31.26	48.18	35.16	32.77	32.01
C18:3+Mn	5.24	5.83	20.59	23.40	22.03	ND

在没有 Mn 存在条件下仅有 *L. plantarum* 具有抑制亚油酸氧化的作用 (见表 7-8)。这种抑制作用在培养的前 8 天一直延续，但 15 天以后亚油酸的氧化和对照组相似；其他乳酸菌在培养过程中没有重要的抑制作用发生。在有 Mn 的介质中培养 8 天后不仅 *L. plantarum* 抑制了亚油酸的氧化，而且 *L. sakei*、*L. curvatus* 和 *P. pentosaceus* 也具有亚油酸氧化的抑制作用；但 15 天后，仅有 *L. plantarum* 和 *P. pentosaceus* 具有抑制亚油酸氧化的效果。两株 *Carnobacterium* 对亚油酸没有重要的抗氧化作用。

表 7-8 乳酸菌对亚油酸氧化的影响

菌株	对照	<i>C. divergens</i>	<i>C. piscicola</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. pentosaceus</i>
C18:2							
8天	24.85	18.17	19.84	22.29	23.00	9.62	19.31
15天	15.61	21.44	18.20	20.36	21.00	16.04	20.33
C18:2+Mn							
8天	30.47	20.33	20.68	5.24	7.40	5.86	3.86
15天	34.00	31.80	35.19	14.73	25.28	7.25	5.96

许多乳酸菌具有抗氧化剂作用, 在没有 Mn 的介质中, *Staphylococci* 较乳酸菌具有更强的抑制亚油酸氧化的能力 (见表 7-9), 所有的 *Staphylococci* 在培养过程中均强烈地抑制亚油酸的氧化, *L. plantarum* 有较小的影响。在 Mn 存在条件下不饱和脂肪酸的氧化被修正。在对照组油酸和亚油酸的氧化被延迟两天, 这是因为 Mn^{2+} 能清除超氧化阴离子 O_2^- , 因而防止了脂类氧化。亚油酸的氧化强烈地被 *S. carnosus* 和 *S. xylosum* 抑制, 它们以 Mn^{2+} 作为辅助因子情况下分泌超氧化物歧化酶 (SOD), 在 Mn^{2+} 存在条件下 *L. plantarum*、*P. pentosaceus* 抑制了亚油酸的氧化, 它们在整个培养期表现出活性; 而 *L. sakei* 和 *L. curvatus* 仅在培养的前 8 天内抑制氧化。乳酸菌不产生 SOD, 但 *L. plantarum* 在 Mn^{2+} 存在条件下的精提物有去除 O_2^- 的高活性, 这是由于 *L. plantarum* 细胞内的 Mn 具有类似 SOD 酶的作用。许多其他乳酸菌能够浓缩 Mn^{2+} , 也能去除 O_2^- ; 而且 *L. plantarum* 和 *P. pentosaceus* 在 Mn^{2+} 存在条件下培养可合成假过氧化物酶。*L. sakei* 在介质中用血红素合成过氧化物酶, 但 *L. curvatus* 不表现出任何过氧化物酶活性。Talon 等 (2000) 实验中未添加血红素, 故不能用过氧化物酶活性来说明 *L. sakei* 的抗氧化活性。

表 7-9 *Staphylococci* 对底物氧化的影响

时间(天)	对照	833	836	831	873	16	863	852
猪脂肪	3.90	2.64	2.94	2.70	2.52	2.64	2.87	3.44
C18:1	3.14	2.57	2.22	2.36	2.32	2.30	2.35	2.41
C18:2	15.51	2.82	2.99	5.63	3.74	3.54	4.05	3.80
C18:3								
5天	48.18	30.93	31.86	28.50	36.90	43.10	40.60	48.00
20天	32.01	29.56	36.66	29.85	26.06	34.17	32.64	30.70
C18:3+M								
5天	20.59	4.77	3.09	4.11	6.33	3.88	ND	ND
15天	22.03	2.86	3.58	2.86	4.40	3.67	ND	ND

综上所述可以看出不同种的 *Staphylococci* 抑制了亚油酸的氧化, 乳酸菌在无 Mn^{2+} 存在条件下无抗氧化作用。在 Mn^{2+} 存在条件下, *S. carnosus*、*S. xylosum*、*L. sakei*、*L. plantarum*、*L. curvatus* 和 *P. pentosaceus* 的抗氧化性质被改善, 它们均具有较好的抑制亚油酸氧化的活性。

六、干酪中乳酸菌的蛋白质、脂肪水解活性

蛋白、脂肪水解是干酪成熟过程中最重要的变化之一, 发酵剂和非发酵剂乳酸菌构成了干酪成熟的主要菌。残存于凝乳剂中的乳酸菌进行了最初的蛋白水解后, 胞浆素、微生物蛋白酶和肽酶进行了第二次水解, 产生小肽和氨基酸。氨基酸不仅对干酪的风味有贡献, 同时也作为其他重要风味物质和芳香化合物的前体。由于许多脂肪酸的低阈值, 大量的弱脂解微

生物如乳酸菌也在长成熟期干酪的脂解方面起到一定的作用。

嗜热菌 *L. bulgaricus*、*S. thermophilus* 是硬质意大利和瑞士干酪的常用菌，嗜温菌 *L. casei* 和 *L. plantarum* 是多种干酪成熟的主要非发酵剂菌。Gobbetti 等 (1999) 研究了温度、pH、NaCl 和 a_w 对干酪相关乳酸菌，如 *L. bulgaricus*、*S. thermophilus* 和 *L. plantarum* 的蛋白水解和脂肪水解活性的影响。

(一) 蛋白酶活性

Gobbetti 等 (1999) 测定了几种菌的酶活性情况，如表 7-10 所示。*L. bulgaricus* B397 在底物 α_{s1} -酪蛋白 (α_{s1} -CN) 上的细胞包裹蛋白质 (CEP) 活性仅被 pH 和温度影响，NaCl 浓度对活性影响不大。 α_{s1} -CN 的水解在 4℃ 前未测定，在 7~16℃ α_{s1} -CN 的水解明显随温度上升而活性上升，仅在 16℃ 发现有 pH 的轻微影响。*L. plantarum* 2739 的蛋白酶具有相似的活性。*L. lactis* T12 水解 α_{s1} -CN 的活性较其他两株菌高，它具有 P_{II} 型蛋白酶，活性被温度和 pH 值影响；随着温度上升酶活性提高，但在 pH=5.0~5.5，对 α_{s1} -CN 的水解较低，16℃ 为 12u/mg，相当于最大活性的 10%；该酶在 pH=7.0 时有较大活性，其值为 42 u/mg，相当于最大活性的 37%。T₁₂ 的 CEP 活性随 NaCl 浓度的增加而减少。在 NaCl 和温度间相互作用表明当温度下降时 NaCl 的不利影响增加，在 10℃、pH=6.0 NaCl 浓度的抑制范围为 3.75%~7.5%。

表 7-10 三株菌的酶活性特征

酶活性	底物	最适 pH	最适温度 /℃	比活性	酶活性	底物	最适 pH	最适温度 /℃	比活性
CEP(B397)	α_{s1} -CN	6.5	45	76	PepA(B397)	Glu-p-NA	7.0	40	334
CEP(T12)		6.5~7.0	40	112	PepA(T12)		7.0	40~45	200
CEP(2739)		8.0	45	58	PepA(2739)		7.0	35	217
CEP(B397)	β -CN	6.5	45	80	PIP(B397)	Pro-p-NA	7.0	40	75
CEP(T12)		6.5~7.0	40	412	PIP(T12)		8.0	40	88
CEP(2739)		8.0	45	48	PIP(2739)		35	80	
PepN(B397)	Lys-p-NA	7.0	40	644	PepO(B397)	N-CBZ	7.0	40	80
PepN(T12)		7.0	35~40	212	PepO(T12)		6.0~6.5	35	255
PepN(2739)		7.0	35~40	242	PepO(2739)		7.0	40	102
PepN(B397)	Ala-p-NA	7.0	40	388	LE(B397)	β -NA-C4	7.0	40	86
PepN(T12)		7.0	35~40	187	LE(T12)		6.5~7.0	35~40	288
PepN(2739)		6.5~7.0	35~40	342	LE(2739)		7.0~7.5	35	514

L. bulgaricus B397 对 β -CN 的水解作用较 α_{s1} -CN 低；温度是一个独立的可变因素，它对酶活性影响最大，在 pH=7.0 和 5% NaCl 中活性可在 40~140u/mg 间变化，随温度上升活性增加。*L. plantarum* 2739 的 CEP 活性被 CCD 独立影响，10℃ β -CN 的水解几乎完全抑制，这种影响不依赖于 pH 和 NaCl 浓度，在酶活性的最适 pH 和温度，NaCl 对活性的影响较轻。提高 NaCl 浓度对 *L. lactis* T12 的不利影响是通过 NaCl 对 a_w 的影响体现出来，因为通过甘油使 a_w 减少至相同值，酶对 β -CN 的水解作用受到相同程度的影响。

(二) 肽酶 N 和 A 的活性

L. bulgaricus B397 有最高的肽酶 N (pepN) 和 A (pepA) 的活性，在 pH=5.0 和 50% 的 NaCl 中，温度由 4℃ 上升至 16℃ 酶活性的上升是非常大的，达到 160u/mg。NaCl 在低浓度对酶活性有利，在酶活性最高值时 NaCl 仅有轻微影响。除 NaCl 的较少影响外，对于 *L. plantarum* 2739 的 pepN 活性也有相似的结果。*L. lactis* T12 的 pepN 活性和前两株菌

不同, pH 对活性有最大影响, 并和 NaCl 相互作用影响酶活性; 在 16℃、5%NaCl 中 pH=5~6 时 pepN 对于 lys-p-NA 无活性; 在 pH=5~5.5 和 10℃活性完全被 5%NaCl 浓度抑制。经研究确认 NaCl 对酶活性的抑制来自它对水活性的影响, 这种影响和 NaCl 中的离子无关。

L. bulgaricus B397 的 pepA 活性和 pepN 活性有所不同, 温度对 pepA 的影响更大, pepA 活性与 pH 无关。*L. lactis*T12 的 pepA 受 pH 的影响要弱于 pepN, 但 pepA 对 pH 仍呈敏感性, 在 16℃、5%NaCl 时实验的 pH 内活性介于 12~46u/mg 之间; pepA 对 NaCl 的敏感也进行了测定, 16℃、pH=6.0 时 NaCl 在 5%~7.5%之间 pepA 活性迅速下降。对 *L. plantarum*2739 而言, pepN 和 pepA 之间仅有较小差异, 在 13℃、pH5.0、5%~7.5% NaCl 中 pepA 保持了最大活性的 37%。

(三) 亚氨基肽酶和肽内切酶活性

温度和 pH 的变化对 *L. bulgaricus* B397 的亚硝基肽酶 (PIP) 的活性具有中等程度的影响, 当 NaCl 浓度为 7.5%时, 它能抵消由于温度增加而引起的酶活性增加, 酶活性的范围在最大活性的 20%~36%之间。和其他肽酶一样, *L. lactis* T12 的 PIP 活性对低 pH 也相当敏感, 在 10℃、pH=5.0~5.5 和 3.75%~7.5%NaCl 使 PIP 活性减至最大活性的 10%以下。在所有的温度和 pH 值 *L. plantarum*2739 的 PIP 在 NaCl 达 5.0%以前均有较高活性, NaCl 浓度继续上升, 活性稍有下降。

L. bulgaricus B397 的肽内切酶 (pepO) 活性在 pH6.0 以下下降, 低温也减少 pepO 的活性, NaCl 浓度的影响极微。*L. lactis* T12 的 pepO 活性和 B397 相似, 但 NaCl 浓度上升, 其 pepO 活性亦下降。*L. plantarum*2739 的 pepO 活性影响因素较为复杂, 5%NaCl 浓度对活性有最适值, pepO 在 4~16℃之间呈温度敏感性, 在此情况下 pH 的影响有限。

(四) 脂酶和脂肪酶活性

L. bulgaricus B397 脂酶活性受温度、pH 和 a_w 三因素的影响, 且 pH、NaCl 和温度的影响有相互作用。pH5.0 和 5.0%~7.5%NaCl 明显抑制酶活性, 在 16℃、5%NaCl 和 pH7.0 时脂酶活性是 pH5.0 时的 2 倍。和 B397 比较 T12 的脂酶活性, 在 pH 和温度间有相互作用, 活性对 NaCl 浓度上升不敏感。*L. plantarum*2739 的脂酶活性在最适条件下有最高值, 它不被 NaCl 浓度影响, pH 也不影响该酶活性。

七、高压 CO₂ 处理对 *L. plantarum* 的细胞破坏和酶失活作用

非热杀菌方法是近年来发展的一种食品保存方法, 新的杀菌方法包括高压杀菌、脉冲高压电场杀菌、辐射等。CO₂ 高压杀菌可使微生物失活, 这种失活可能是由于细胞生物系统平衡的破坏和干扰。Hong 等 (2001) 研究了高压 CO₂ 处理对 *L. plantarum* 的细胞破坏和酶失活情况, 这有助于对 *L. plantarum* 性质的进一步了解和深入。

(一) *L. plantarum* 细胞的损伤和死亡

对不同介质中如 MRS、MRSS (含 3%NaCl 的 MRS) 生长的 *L. plantarum* 细胞生长、死亡和损伤情况进行了评估。在 MRS 和 MRSS 介质上菌体经 CO₂ 处理细胞的菌落形成能力如图 7-9 所示。7MPa CO₂30℃处理 10min 导致 MRS 和 MRSS 培养基上 *L. plantarum* 活体细胞下降了 1~2 对数周期。对细胞

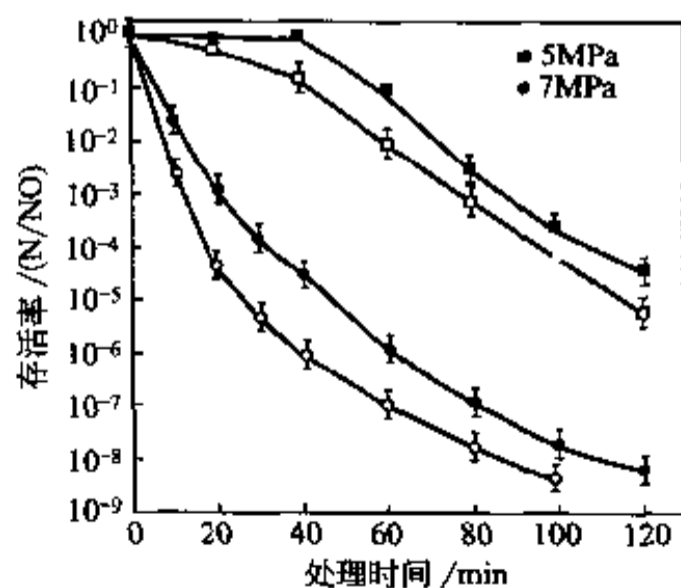


图 7-9 MRS 和 MRSS 培养基上 *L. plantarum* 细胞在高压 CO₂ 处理下的存活 (起始值为 $2.4 \times 10^8 \sim 6.2 \times 10^8$ cfu/ml)

暴露于加压 CO₂，在 MRSS 培养基上活细胞数量下降较 MRS 培养基多 1~2 个对数周期，这表明剩余菌 (≥90%) 受到了严重的损伤。

在 30℃ 时随着压力由 5MPa 上升至 7MPa，细胞的死亡加速。压力控制着 CO₂ 的溶解速率和它在悬浮介质中的溶解性，因此较高压力增加了 CO₂ 的溶解使其和细胞的接触更容易。高压和 CO₂ 的微生物失活主要是 CO₂ 对细胞的穿透作用，它的效果可通过提高传递速度得以改善。Hong 等 (1999) 对 *L. plantarum* 细胞进行了低 pH 柠檬酸缓冲液和高压 N₂ (7MPa 和 30℃) 相结合处理菌，结果发现对菌失活没有效果，这可能是由于 N₂ 在水中的低溶解度所致。另外酸化对于高压杀菌没有辅助作用，也表明 CO₂ 的杀菌有其他气体的特异性。

(二) 细胞膜的破坏

细胞膜的破坏意味着细胞成分外漏于环境中。当细胞处于亚致死状态时，发生细胞膜完全性破坏的情况，此时氨基酸、肽、膜脂肪和离子可能在胞外环境中被发现；在外漏成分中，UV 吸收物质及胞外离子常被测定。*L. plantarum* CO₂ 高压处理后 UV 吸收物质和离子如图 7-10 所示，20min 处理后 Mg²⁺ 和 K⁺ 的外漏具有相同的模式，这表明在早期处理阶段细胞膜已被严重破坏。7MPa、CO₂ 30℃ 处理 10min 后细胞表现出对周围低 pH 值环境具有一定的中和作用。乳酸菌内胞质 pH 一般较细胞周围介质 pH 更呈碱性，这是由于细胞经过离子转移过程向细胞外介质分泌质子酸，另外也由于细胞膜对于细胞外质子也是不能渗透的。Phloxine B 染色实验证明 *L. plantarum* 在高压 CO₂ 作用下失去细胞的完整性，仅有 10% 以内细胞没有着色，这和 CO₂ 处理后活体细胞下降 1 个对数周期的结果相一致。

(三) 糖酵解、H⁺-ATP 酶和相关酶活性

L. plantarum 细胞和高压 CO₂ 处理后的细胞能完全消耗添加的葡萄糖 (16.7mmol/L) (见图 7-11)。但 CO₂ 处理 20min 的细胞糖酵解能力明显下降，处理 30min 后的细胞糖酵解作用低于原有水平 20% 以下，这种活性的下降可能来自细胞生物系统的破坏或代谢酶的失活。

有关乳酸菌的 pH 细胞内平衡，质子传递 ATP 酶 (H⁺-ATP 酶) 在胞质 pH 调整起重要作用，这源于该酶在膜的位置、ATP 产生和菌最佳 pH 调整中的重要性，估计加压 CO₂ 处理主要影响 *L. plantarum* 细胞 H⁺-ATP 酶的功能，这主要表现在细胞悬浮物 pH 较大幅

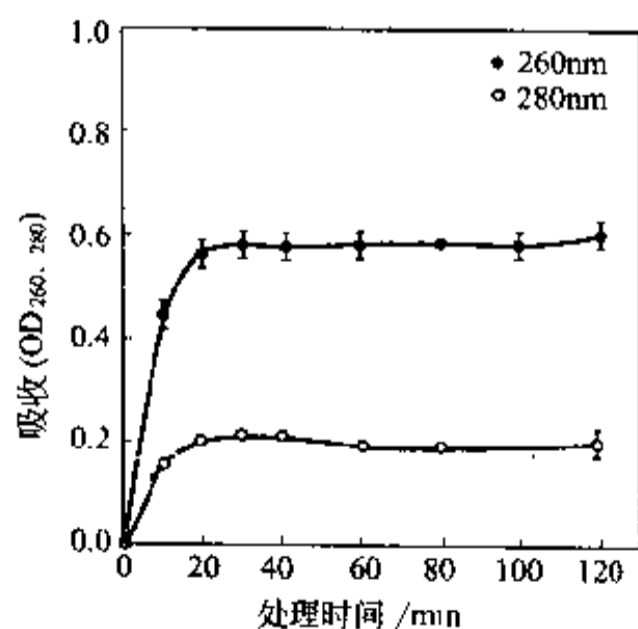


图 7-10 UV 吸收材料进入细胞悬浮物的量 (*L. plantarum* 在 0.85NaCl 溶液中，在 30℃ 7MPaCO₂ 下处理)

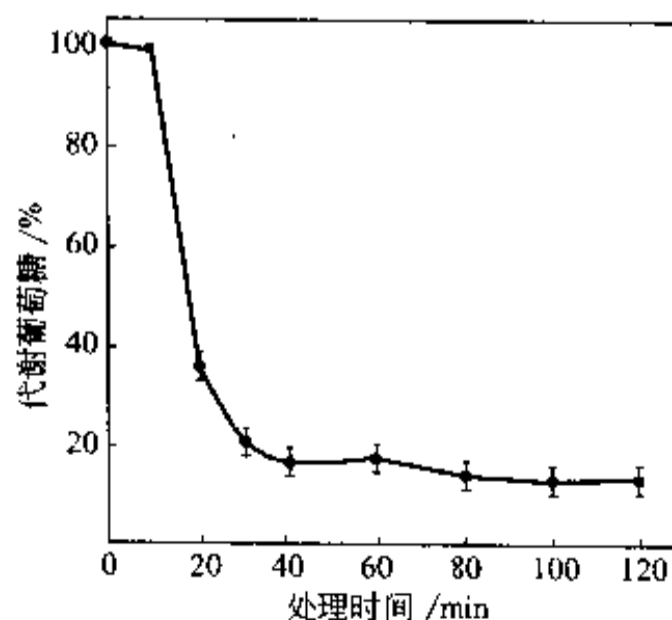


图 7-11 CO₂ 高压处理糖酵解活性的变化 (30℃、7MPa 处理，2h、37℃ 培养后葡萄糖的水解百分比)

度的下降上,但细胞的膜 ATP 酶活性 ($2.50 \pm 0.22 \text{u/mg}$ 蛋白质) 受 CO_2 处理影响很小。在环境 $\text{pH} < 3.0$ 时, *L. plantarum* 细胞中仍存在高活性碱性 ATP 酶, 当用 7MPa CO_2 、 30°C 、 10min 处理后 ATP 酶活性稍有增加 ($2.61 \pm 0.17 \text{u/mg}$ 蛋白质)。

高压 CO_2 可能使酶活化或失活, 这主要依据酶的类型、生物化学特征和环境情况而定。表 7-11 是用 CO_2 处理或无处理情况下几种酶活性变化情况, 在 13 种未处理细胞分泌酶中, 包括胱氨酸芳香基胺酶、 α -半乳糖苷酶、 α 和 β 葡萄糖苷酶和 *N*-乙酰- β -葡萄糖胺酶在高压 CO_2 处理下失活, 其他酶如脂肪酶、 β -半乳糖苷酶、磷酸酶等活性受影响很小。酶的选择性失活来自 CO_2 处理过程中微生物的 pH 下降, 细胞的显著酸化对于具有酸性等电点的碱性磷酸酶或 β -半乳糖苷酶影响小, 这种结果和暴露于 CO_2 中 *L. plantarum* 酶失活情况不一致。当 *L. plantarum* 的几种酶活性在 7MPa CO_2 、 30°C 、 10min 处理后, 实际细胞数被减少低于 10% , 故酶的失活和细胞死亡间存在着不确定性。

表 7-11 高压 CO_2 处理 *L. plantarum* 细胞酶失活的情况

酶	残存活性/%		
	<i>L. plantarum</i> (未处理)	<i>L. plantarum</i> (已处理)	
		10min	60min
碱性磷酸酶	100	91.6 ± 1.5	90.3 ± 1.3
脂酶(C_4)	100	33.4 ± 3.2	32.4 ± 2.3
脂酶(C_5)	100	86.1 ± 2.4	72.2 ± 4.9
亮氨酸芳香基胺酶	100	70.3 ± 3.3	59.1 ± 7.3
缬氨酸芳香基胺酶	100	10.9 ± 2.1	10.6 ± 1.3
胱氨酸芳香基胺酶	100	8.8 ± 2.2	8.7 ± 2.3
磷酸酶	100	99.5 ± 1.5	99.9 ± 0.8
萘酚-AS-BI-磷酸酶	100	87.4 ± 3.2	74.5 ± 2.7
α -半乳糖苷酶	100	6.6 ± 1.7	6.1 ± 1.4
β -半乳糖苷酶	100	92.3 ± 2.5	73.8 ± 2.8
α -葡萄糖苷酶	100	6.8 ± 1.2	6.5 ± 2.0
β -葡萄糖苷酶	100	5.9 ± 1.0	5.7 ± 1.4
<i>N</i> -乙酰- β -葡萄糖胺酶	100	9.7 ± 1.8	7.2 ± 0.4

(四) 在微生物死亡过程中 CO_2 的作用

CO_2 在一定温度、压力下在水中和脂肪中有高溶解性, CO_2 溶于水形成碳酸, 它将对介质的 pH 变化有所影响, 由于溶解 CO_2 降低 pH 抑制了许多微生物的生长和代谢, 也降低了许多微生物对失活的抵御性。在压力下大量 CO_2 的分子扩散进入细胞膜, 在细胞内积累破坏了它的结构, 同时它也能透过膜, 对细胞内部 pH 的降低作用足以超越胞质本身的缓冲能力, 而内部 pH 较外部 pH 对细胞的活性影响更大, 内部 pH 的降低引起了关键酶的抑制或失活, 如在糖酵解、氨基酸和肽转移、离子活性转移和质子位移等代谢和调整过程受到影响。 CO_2 提取了包括磷脂、疏水化合物等细胞膜和细胞壁成分, 再加上 pH 的降低作用导致细胞的死亡。

第二节 *L. plantarum* 的酶体系

一、*L. plantarum* 分泌的蛋白质

包括 *Lactobacillus* 在内的乳酸菌在生长时需要多种氨基酸, 在乳中氨基酸和肽的浓度相对较低, 不足以支持高浓度菌体细胞的生长, 为克服这一方面的限制, 乳酸菌具有支持高

密度细胞在乳中生长的蛋白水解体系。在乳中乳酸菌的蛋白水解反应是由胞外蛋白酶的作用而引起的, 这种胞外蛋白酶可作用于酪蛋白产生不同大小的肽。最近许多研究者对乳酸菌类发酵剂的蛋白酶体系进行了研究, 表明 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 的蛋白酶在生物化学和遗传学方面是密切相关的, 对 *Lactobacillus* 蛋白酶体系的研究主要着眼于嗜热种, 它是许多干酪、酸奶和其他发酵食品的发酵菌种, 对嗜温性 *Lactobacillus* 蛋白酶体系研究很少, 但这类微生物在干酪成熟过程中是一种优势菌, Magboul 等 (1999) 对 *L. plantarum* DPC2739 的蛋白酶活性进行仔细的研究。

(一) 蛋白酶活性的细胞分布情况

从细胞组成获得的亚细胞部分为细胞壁、胞质和膜。在 pH7.5 时测定了亚细胞部分蛋白酶的活性, 发现在细胞壁上为 7%, 膜部分为 3%, 这些结果说明 *Lactobacillus* 的蛋白酶主要分布在细胞的胞质部分, 这种蛋白酶在细胞壁的低活性和胞质部分的高活性可以说明为什么嗜温性乳酸菌在乳中不易生长, 因为它的蛋白酶很难将乳中蛋白质分解为肽和氨基酸, 故对菌的生长形成限制。

(二) 蛋白酶的纯化

Lactobacillus 蛋白酶的纯化情况如表 7-12 所示, 酶通过三个色谱步骤进行纯化, 第一步是在 DEAE-Sphacel 上进行的离子交换色谱分离, 主要的蛋白酶用 0.22mol/L NaCl 洗脱, 此步蛋白酶的回收率达 90%, 比活性增加 9 倍。第一步被纯化的酶的冷冻干燥物在 Sephacryls-300HR 上进行凝胶过滤, 这步导致比活性 3 倍的增加。第三步在 TSKG3000SW 柱进行凝胶过滤, 在第二步基础上导致比活性 3 倍增加, 整个蛋白酶活性回收 40%, 经三步分离后 SDS-PAGE 分析表明得到了活性蛋白酶的纯品。

表 7-12 *Lactobacillus plantarum* DPC2739 蛋白酶的纯化

纯化步骤	总体积/mL	总蛋白/mg	总活性/units	比活性/(units/g)	比活性的增加	活性产量/%	蛋白产量/%
胞质部分	300	1410	3125	2.2	1	100	100
DEAE Sephacel	150	139	2850	20.5	9.3	91	9.9
Sephacryl S300HR	50	65	1780	27.4	12.4	57	4.6
SKG3000SW	15	36	1206	33.5	15.2	39	2.6

(三) 蛋白酶的分子量

由 *L. plantarum* DPC2739 获得的纯蛋白酶有 ~45KDa 或 42KDa 的分子量, 它们分别通过 TSKG3000SW 和 SDS-PAGE 测定, 其他 *Lactobacilli* 的细胞内和细胞壁相关蛋白酶有较高分子量, Yamamoto 等 (1993) 报道 *L. helveticus* 分离的蛋白酶有最小分子量 45KDa, 但他们认为由于纯化过程中较大的酶分子被分解, 故对其分子量有所低估。

(四) 温度对蛋白酶活性的影响

由 *L. plantarum* DPC2739 获得的蛋白酶, 以标记酪蛋白作底物, pH7.5 时的最适温度是 45~50℃, 在 30℃ 和 60℃ 发现蛋白酶活性分别为最大活性的 40% 和 50%。从 *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 得到的两种胞内酶也有类似的最适温度。

蛋白酶呈热敏性, 65℃、2min 加热后活性仅有 2% 存在 (见图 7-12), *Lactococci* 和 *Lactobacilli* 的蛋白酶均有报道呈热敏性。

(五) 最适 pH

在 45℃ 酶的最适 pH 为 9.5 (图 7-13)。酶在较宽的碱性 pH 范围具有较高的活性, 在 pH7.5 为最大活性的 70%, pH10.5 为最大活性的 80%。从 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 获

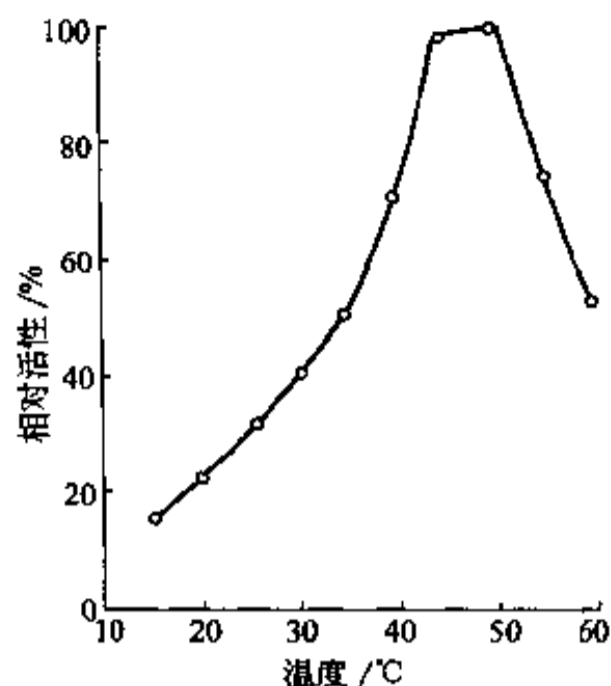


图 7-12 温度对 *L. plantarum* DPC2739 蛋白酶的影响
(以酪蛋白为底物, pH7.5)

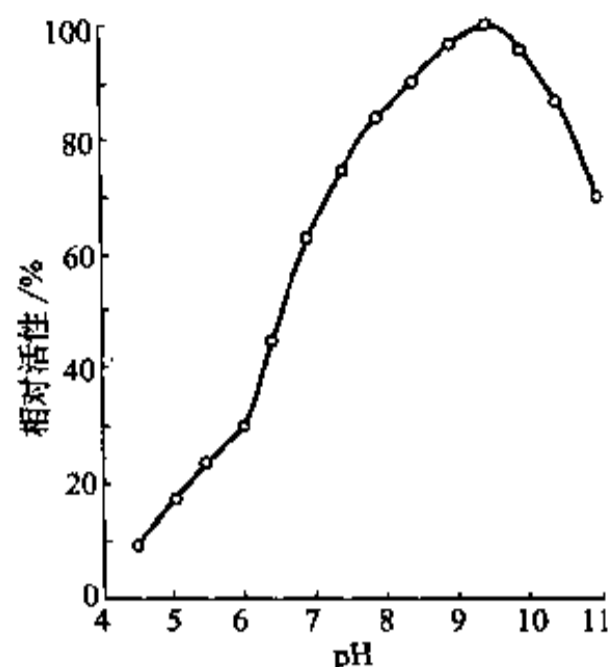


图 7-13 pH 对蛋白酶活性的影响
(45°C, 以酪蛋白为底物)

得蛋白酶的大多数在 pH5.5~7.0 表现出最适活性, 仅有从 *L. belveticus* 分离的细胞壁蛋白酶最适 pH 为 7.5~8.0。

(六) 蛋白酶抑制剂的影响

蛋白酶抑制剂的影响如表 7-13 所示, 测试抑制剂中只有苯甲基硫酰氟化物引起蛋白酶活性的较大下降。它在 1mmol/L 浓度时实现酶的完全抑制。能够修饰巯基的试剂在 1mmol/L 浓度时引起蛋白酶活性 70% 的抑制, EDTA 等仅在 2mmol/L 时对蛋白酶活性产生重要影响。这些结果表明 *L. plantarum* 的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶, 接近其活性中心可能有一个巯基 (Sulphydryl group)。这一结果在很多方面和来自 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 的细胞壁蛋白酶的性质相一致, 区别在于达到相同的抑制效果所需抑制剂的浓度不同。

表 7-13 组织蛋白酶 D 蛋白酶的脂解和蛋白水解活性

样 品	相对脂解活性 / %	相对蛋白水解活性 / %	样 品	相对脂解活性 / %	相对蛋白水解活性 / %
上清液	81	81	上清液 + 0.125U Cat + pep.	256	70
上清液 + pep.	81	96	上清液 + 0.25UCat	385	85
上清液 + 0.05U Cat	81	46	上清液 + 0.25UCat + pep.	167	38
上清液 + 0.05U Cat + pep.	236	96	未培养	100	100
上清液 + 0.125U Cat	179	50			

注: Cat—组织蛋白酶 D。

(七) 二价离子的影响

1mmol/L 的二价金属离子对蛋白酶活性有影响, 酶强烈地被 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制, 其残留活性仅剩 10% 和 20%, Co^{2+} 的抑制较弱, 蛋白酶活性剩余 70%, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 和 Mn^{2+} 能提高蛋白酶活性 10%, 从其他 *Lactobacillus* 的种获得的蛋白酶也有类似的结果。

(八) N 端氨基酸序列

酶的 N 端氨基酸序列是 $\text{H}_2\text{N-Ala-lys-Leu-Thr-Val-lys-Asp-Val-Glu-leu-lys-lys-val-leu-val-Arg-Val-Asp}$, 这个序列和已知的 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 的任何蛋白酶无任何的相似性。

(九) 酪蛋白的水解活性

用纯的 *L. plantarum* DPC2739 蛋白酶水解酪蛋白钠的情况, 由 Magboul 等 (1997) 通

过尿素-PAGE 电泳的方法进行了研究, 电泳谱图表明 α_{s1} -和 β -酪蛋白在 45℃ 7h 的培养后完全水解, 产生几种不同的水解产物, 水解产物经过尿素 PAGE 电泳后的组成说明该蛋白酶具有酪蛋白的广泛水解能力, 这种结果和 Zevaco 等 (1983)、Tamamoto 等 (1993) 研究的 *Lactobacillus* 的蛋白酶性质是相一致的。

综上可以得出 *L. plantarum* DPC2739 蛋白酶在 N 端氨基酸结构方面具有不同于其他 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 的丝氨酸蛋白酶的性, 该酶具有较高的最适 pH 值, 高的最适 pH 和最适温度减少了该酶在干酪成熟过程中对蛋白水解的作用。

二、*L. plantarum* 分泌的脂酶

分解脂肪是脂酶的重要性质, 一般的微生物脂酶是胞外酶, 多数仅在细胞外具有活性, 这也避免了对细胞内脂的影响。事实上胞外脂酶被蛋白水解可能是脂酶成熟的一个步骤, 虽然缺乏充分证据, 但已证实有许多胞外脂酶通过蛋白酶水解形成; *S. aureus*、*S. epidermids*、*S. hyicus* 和 *Acinetobacter calcoeticus* 均存在多种前脂酶体形式; 由 *S. aureus* 和 *S. hyicus* 产生的脂酶前体, 经金属蛋白酶和金属胱氨酸蛋白酶水解后形成脂酶。

Lopes 等 (1999) 的研究表明 *L. plantarum* DSMZ12028 产生多种胞外脂酶, 有 4 种具有水解橄榄油的水解物质经部分纯化, 证明它们的 N 端氨基酸顺序非常相似。由于 Lopes 等 (1999) 进行了进一步研究, 发现 *L. plantarum* 胞外脂酶对金属离子、丝氨酸和酸性蛋白酶敏感; *L. plantarum* 的生长导致发酵介质的 pH 下降, 酸性蛋白酶可能是脂酶形成的首选蛋白酶。他们选择组织蛋白酶 D 和血管紧张肽原酶进行了实验, 血管紧张肽原酶实验结果如表 7-14。用组织蛋白酶 D 培养下降了蛋白水解活性, 但随着蛋白酶量的增加下降程度变小, 这种结果可能和其他蛋白酶被组织蛋白酶 D 水解有关, 随着该酶量的增加影响变得不明显是因为此酶已代表了整个体系总的蛋白水解活性。随着组织蛋白酶 D 添加量的增加脂肪水解活性增加, Pepstatin 也增加脂肪水解活性, 但随着组织蛋白酶 D 的同时添加, 这种增加消失, 即该酶对脂肪水解的正向影响被 Pepstatin 抵消。这一结果表明 Pepstatin 抑制组织蛋白酶 D, 且对于整个蛋白水解活性也发现相同情况。

表 7-14 血管紧张肽原酶脂解和蛋白水解活性

样 品	相对脂解活 性/%	相对蛋白水解 活性/%	样 品	相对脂解活 性/%	相对蛋白水解 活性/%
10min(上清液+0.01U Ren)	107	83	60min(上清液+0.05U Ren)	78	55
10min(上清液+0.05U Ren)	145	55	60min 上清液	45	69
10min 上清液	61	83	未培养	100	100
60min(上清液+0.01U Ren)	49	90			

注: Ren—血管紧张肽原酶。

血管紧张肽原酶实验表明: 这种酶和上清液的总蛋白水解活性和脂肪水解活性相互作用, 事实上增加该酶的浓度增加了脂肪水解活性, 但总的蛋白水解活性降低。随着培养时间增加, 脂酶和蛋白酶的活性下降, 因此我们可以得出如下结论: 酶的活性对酸性蛋白酶如组织蛋白酶 D 和血管紧张肽原酶敏感。

三、*L. plantarum* 的磷酸酶

L. plantarum 是一种非发酵剂类乳酸菌, 它在 cheddar 干酪和其他干酪成熟过程中具有重要作用, 酸性磷酸酶在干酪成熟过程中对于磷酸肽的水解非常重要, Magboul 等 (1999) 对 *L. plantarum* 的酸性磷酸酶性质进行了研究。

(一) 酶的纯化

对 *L. plantarum* DPC2739 中提取的酸性磷酸酶经 4 步色谱分离进行了纯化。首先在 DEAE-Sephacel 上进行了分离, 用 0.18mol/L NaCl 的洗脱, 洗脱峰酸性磷酸酶活性上升了 7 倍, 活性回收率 62.4% (见表 7-15)。第二步纯化在 phenyl Sepharose 上进行, 用 0.2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗脱, 酸性磷酸酶比活性增加 18 倍, 总的回收率 26.7%。第三步是用 Sephacryl S200 进行色谱分离, 酶回收率为 20%, 比活性增加 41 倍。最后一步是在 Mono Q 上进行, 活性回收率 6.2%, 比活性增加 62 倍。最终产品经 SDS-PAGE 分析发现存在两个蛋白带, 分子量分别为 24 和 29kDa, 但凝胶过滤显示其分子量为 110kDa。

表 7-15 *L. plantarum* DPC2739 的酸性磷酸酶纯化

纯化步骤	总蛋白/mg	总活性/U	比活性/(U/mg)	比活性增加倍数	活性产量/%
CCFE	19868	13710	6.9	1	100
DEAE-Sephacel	244	8556	35.1	7	62.4
HIC	29	3654	126	18	26.7
S200	10	2819	281.9	41	20.6
Mono Q	2	850	425	62	6.2

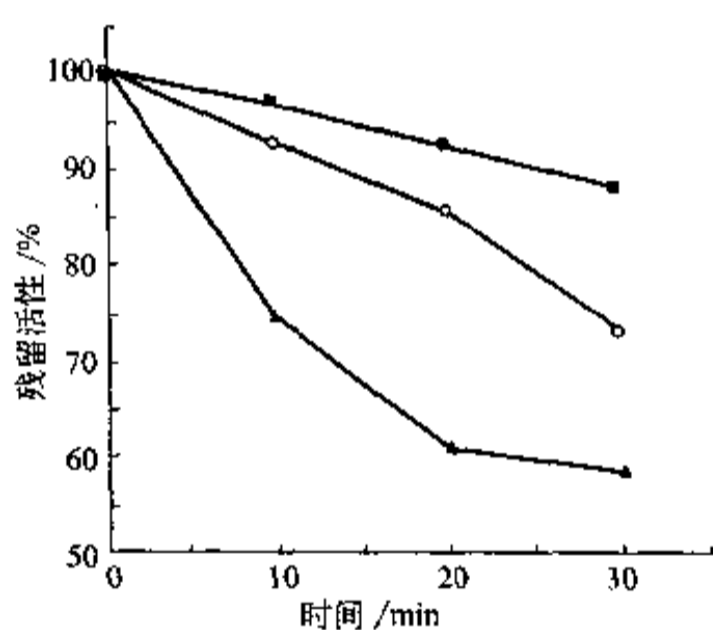


图 7-14 *L. plantarum* 的酸性磷酸酶的热稳定性
■—50°C; ○—60°C; ▲—70°C

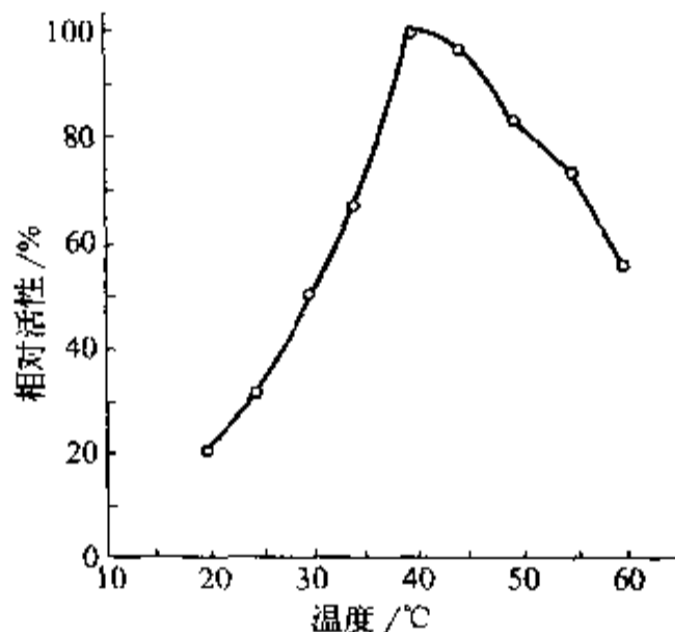


图 7-15 酸性磷酸酶受温度的影响
(pH5.2 NaAc)

(二) 温度和 pH 的影响

酸性磷酸酶的热稳定性在 20mmol/L NaAc 缓冲液中, 于 pH5.2, 在 50、60、70°C 培养 10、20 和 30min 进行了实验, 在 50°C 经 30min 培养后活性保留为 90%, 60°C、30min 为 75%, 70°C、30min 为 60% (图 7-14)。在 pH5.2 和 20 mmol/L NaAc 缓冲液中酸性磷酸酶的最佳温度为 40°C, 35°C、50°C 和 55°C 最大活性的 60% 以上得以保留 (见图 7-15)。酸性磷酸酶在 pH=3.5~5.5 范围内具有较好的活性, 活性最佳 pH 为 4.0 (见图 7-16)。

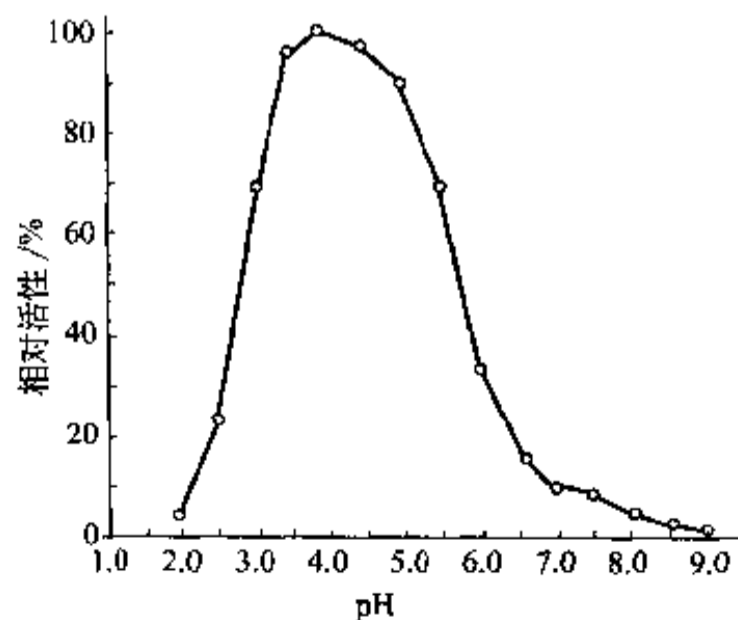


图 7-16 pH 对酸性磷酸酶的影响 (40°C)

(三) 抑制剂和金属离子的影响

金属离子和抑制剂对酸性磷酸盐的影响如表 7-16 所示, 酶强烈地被 0.5mmol/L NaF 和六聚

表 7-16 金属离子和抑制剂对酸性磷酸酶活性的影响

化 合 物	浓度/(mmol/L)	残留活性/%	化 合 物	浓度/(mmol/L)	残留活性/%
无	0	100	三聚磷酸盐	5	7
EDTA	5	95	正磷酸盐	5	0
菲绕啉	5	100	BaCl ₂	5	101
苯甲基硫酰氟化物	5	96	CaCl ₂	5	102
NaF	0.5	0.5	CoCl ₂	5	96
乙基酰胺	5	97	CuCl ₂	5	101
山梨酸	5	105	MgCl ₂	5	100
六聚磷酸盐	0.5	5	MnCl ₂	5	102
β-甘油磷酸酯盐	5	82	ZnCl ₂	5	100
焦磷酸盐	5	24			

磷酸盐、5mmol/L 的正磷酸盐、三聚磷酸盐和焦磷酸盐抑制。另一方面其他物质如抗坏血酸等酸性磷酸酶活性没有影响。

酶活性不受二价离子 (5mmol/L 水平) 的影响, 在 5mmol/L 的二价金属离子 Ba²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺ 和 Zn²⁺ 对酸性磷酸酶没有抑制和激活作用。

(四) 底物的专一性

酸性磷酸盐对底物 PNPP、D-葡萄糖-6-磷酸、O-磷酸-DL-丝氨酸、D-果糖-6-磷酸呈高活性 (见表 7-17), 但对底物 O-磷酸-DL-苏氨酸、O-磷酸-DL-酪氨酸、焦磷酸、α-D-葡萄糖-1-磷酸盐和尿苷-5'-磷酸盐有低的活性, 而对其他底物几乎没有活性。酪蛋白钠用酸性磷酸酶 (50μL) 40℃ 培养 17h 产生 1.2μmol 的磷酸盐。

表 7-17 不同底物酸性磷酸盐的专一性

底 物	μmol 无机磷酸盐释放	底 物	μmol 无机磷酸盐释放
p-硝基苯磷酸	92	尿嘧啶-5-磷酸盐	12
α-萘基磷酸盐	3	2-(p-硝基苯)-磷酸盐	0
β-萘基磷酸盐	0	β-甘油基磷酸酯盐	3
D-果糖-6-磷酸	48	正磷酸盐	20
α-D-葡萄糖-1-磷酸盐	16	三聚磷酸盐	0
D-葡萄糖-6-磷酸	77	酪蛋白酸	1.2
D-果糖-1'6-磷酸	0	O-磷酸-DL-丝氨酸	51
腺苷-5'-磷酸	8	O-磷酸-DL-苏氨酸	34
腺苷-5'-二磷酸	2	O-磷酸-DL 酪氨酸	25
腺苷-5'-三磷酸	0		

(五) N 端氨基酸序列

对该酶的 N 端 20 个氨基酸测定结果为: H₂N-AQFSIYFVRHGQTFFNLYNR, 这是电泳移动蛋白部分, 经变性和未变性的酶 N 端测试结果。在变性情况下高移动率的酶 N 端氨基酸序列为 H₂N-ATFSVYMIRHGQTYFNKYRR。

四、L. plantarum 分泌的淀粉酶

L. plantarum 是非洲等地谷物发酵食品中的主要菌之一, 谷物中重要的成分是淀粉, 故 L. plantarum 对淀粉的水解能力, 即其淀粉酶分泌性质, 对谷物发酵食品的生产、质量均至关重要。Sanni 等 (2002) 研究了 L. plantarum 和 L. fermentum 的淀粉酶分泌性质, 并对其性质进行了全面研究和表征。

(一) 菌株的一般特征

Sanni 等从尼泊尔传统食品 fufu、burukwtu、Ogibaba 和 Kunu-zakki 中分离出分泌淀粉酶的菌株 *L. plantarum* 和 *L. fermentum*。9 株分离物在 MRS 培养基中有相对较强的淀粉水解能力，菌体细胞呈革兰氏阳性，无运动性，无过氧化物酶和不生成芽孢，它们呈短棒状，以成对或短链形式存在。见表 7-18。菌株之一 (K9) 有相对长的棒，且具有短链。所有的分离物能耐受胆汁酸，在 15℃ 能生长，45℃ 停止生长，在 10% NaCl 中无任何菌株生长，在 6.5% NaCl 中除 K9 外均能生长。

(二) 糖发酵和酶活性

在 API50CH 上分离物的糖发酵能力如表 7-18 所示。以此发酵谱为基础，可以确认存在三组菌，其一是 K₁、K₂、K₃，来自 Kunu-zakki，组 II 的菌株在发酵 D-木糖、蜜二糖、L-阿拉伯糖、松三糖的能力方面不同于第 I 组菌；和 I、II 组菌相反，菌 K₉ (第 III 组) 发酵较少的碳水化合物种类。除 K₉ 外所有菌株发酵淀粉和糖原，K₉ 不发酵糖原。

表 7-18 从尼泊尔发酵食品分离菌的碳水化合物发酵情况

	I					II				III		
	A ₆	K ₁	K ₂	K ₃	C ₄	C ₅	BK ₇	C ₆	OB ₈	K ₉	OgiE1*	Mw ₇
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	±
L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Methyl-D-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

续表

	I					II				III		
	Δ_5^6	K_1	K_2	K_3	C_4	C_5	BK ₇	C_6	OB ₈	K_9	OgiEI*	Mw ₂ '
Inulin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
D-Raffinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Gentobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucuronate	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
2-keto-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glucuronate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±

所有菌株产生不同浓度的 DL-乳酸，C₅ 菌株 D/L 的比率是 72.7%/27.3%，OB₈ 为 63.5%/36.5%，K₉ 为 84.3%/15.7%。酶的分布呈多样性，具体情况如表 7-19 所示，如 I 组和 II 组菌株可以发酵 N-乙酰- β -葡萄糖胺，N-乙酰-葡萄糖胺酶的活性仅在 8 株菌中的 5 株测定到。

表 7-19 不同乳酸菌分泌的酶类型

菌 株	发 酵 组								
	I						II		III
	K_1	K_2	K_3	C_4	C_5	BK ₇	C_6	OB ₈	K_9
碱性磷酸酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脂酶 C ₄	-	-	-	-	-	-	+	+	+
脂酶 C ₈	-	-	-	-	-	-	+	+	+
脂酶 C ₁₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-
亮氨酸芳香酶	+	+	+	+	+	+	±	+	+
缬氨酸芳香酶	+	+	+	+	+	-	+	-	±
胱氨酸芳香酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
胰蛋白酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
凝乳酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
磷酸酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
茶基-AS-BI-磷酸水解酶	-	-	±	±	±	-	W±	W±	+
α -半乳糖苷酶	-	-	-	-	-	-	+	+	+
β -半乳糖苷酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α -葡萄糖苷酶	+	±	-	±	±	±	+	+	+
β -葡萄糖苷酶	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N-乙酰- β -葡萄糖胺酶	+	+	+	-	+	+	-	-	-
α -甘露糖苷酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -果糖酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-

具有碳水化合物发酵能力的糖苷酶活性和菌株表现的发酵能力是一致的， β -半乳糖苷酶的存在和所有菌株的乳糖发酵性质有关。C₅、OB₈和K₉菌株能发酵蜜二糖（棉子糖）。 β -葡萄糖苷酶活性在所有I、II组菌中存在，它以能发酵纤维二糖等为标志；所有菌株能发酵麦芽糖，说明它们存在 α -葡萄糖苷酶活性。

(三) DNA 限制图谱和部分 16S-rDNA 序列

DNA 指纹分析表明 C₅ 和 BK₇、C₅ 和 OB₈、K₉ 均属于一组。获得三种不同的限制模型，C₅、OB₈ 和 K₉ 是其代表菌株，对它们的部分 16SrDNA 序列分析表明：C₅ 和 OB₈ 和 *L. plantarum* 之间存在 100% 的同源性，菌株 K₉ 和 *L. fermentum* ATCC14931、*L. fermentum* KRM 的同源性分别达到 98.9% 和 98.7%，即 C₅ 和 OB₈ 属于 *L. plantarum* 菌株。

(四) 在不控制 pH 情况下的淀粉发酵

淀粉发酵的模式和它们菌株呈一致性，C₅ 和 OB₈ 发酵产生单一乳酸，最终 pH4.2，其发酵动力学如图 7-17 所示。K₉ 是异型发酵，它不产生乙酸，乳酸和乙醇的摩尔比为 1.00±0.02，最终 pH=4.7（见图 7-18）。三株菌有类似的 μ_{max} ，在 5h 内淀粉被快速水解，在 5~6h 发酵过程中发现减少糖的积累。在发酵 12h 后淀粉酶活性达到 12.7u/ml (C₅ 和 K₉)、11.9 u/ml (OB₈)。

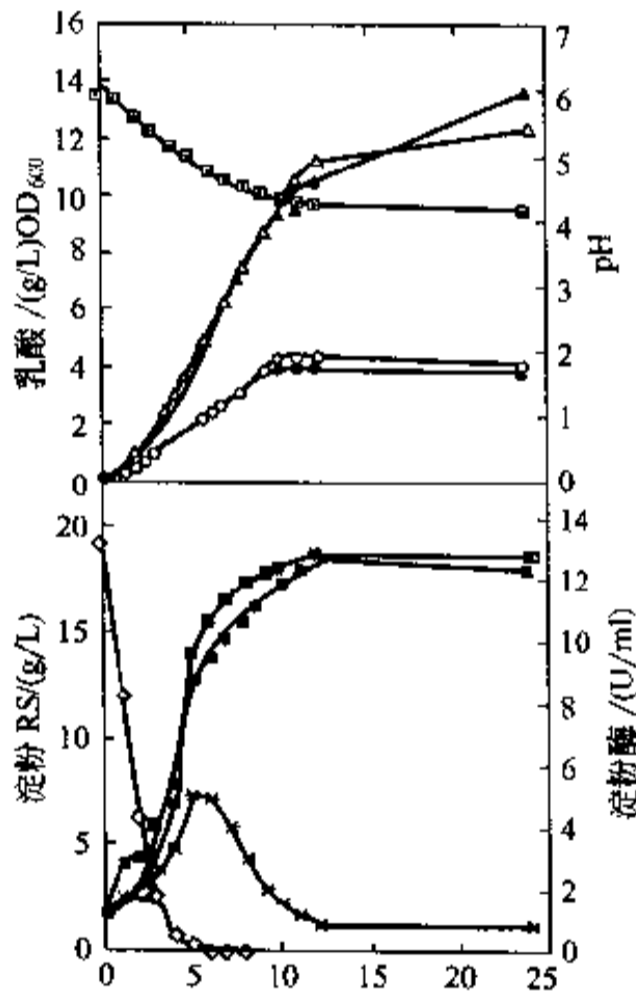


图 7-17 *L. plantarum* 的淀粉发酵 (C₅ 和 OB₈)
(无 pH 控制, 30℃ 于 MRS-淀粉培养基)

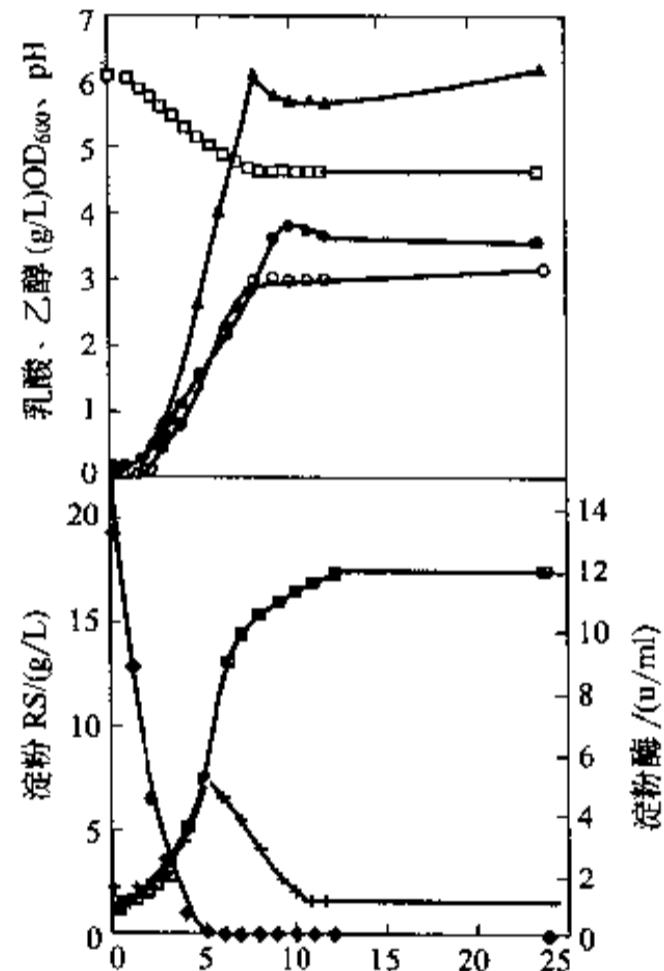


图 7-18 *L. fermentum* (K₉) 的淀粉发酵
(无 pH 控制, 30℃ 于 MRS-淀粉培养基)

●—C₅ OD 值; ▲—C₅ 乳酸; +—C₅ 糖的减少; ◆—淀粉; □—C₅ 的 pH; ■—淀粉酶活性
○—OB₈ OD 值; △—OB₈ 乳酸; ◇—OB₈ 淀粉; ×—OB₈ 糖减少; ▣—淀粉酶活性

表 7-20 菌株在不控制 pH 情况下 30℃ 时的生长和淀粉酶产生

菌株	μ_{max}/h^{-1}	$(q_{amy}) \times 10^3 / (u/g \text{ 生物量})^{-1} h^{-1}$	$(Y_{amy, s}) \times 10^3 / (u/g \text{ 生物量})$	$(R_{amy, starch}) / (u/g \text{ 淀粉})$
<i>L. plantarum</i> C ₅	0.39	2.5	6.3	0.7
<i>L. plantarum</i> OB ₈	0.39	3.3	8.5	0.7
<i>L. fermentum</i> K ₉	0.38	2.6	6.9	0.6
<i>L. plantarum</i> A6 ^①	0.43	1.0	2.3	0.2
<i>L. fermentum</i> OgiE1 ^②	0.35	1.9	5.4	0.2

① 来自 Guyot 等 (2000); ② 来自 Calderon 等 (2001)。

五、*L. plantarum* 分泌的过氧化物酶

Barynin 等 (2001) 从 *L. plantarum* 中获得了两种新的过氧化物酶晶体结构 (见表 7-21)。

表 7-21 *L. plantarum* 过氧化物酶的晶体结构

空间结构	a	b	c	α	β	γ	Sub/a. u.	Vm	T(K)	分辨极限/ 10^{-10} m	结构
以前报道的结构											
P4,2,2	146.9	146.9	84.5	90.0	90.0	90.0	3	2.56	293	2.0	—
P2,	83.7	107.7	124.9	90.0	113.4	90.0	6	2.90	293	2.5	—
P2,	83.7	107.7	119.6	90.0	106.5	90.0	6	2.90	293	2.5	—
I2,3	147.2	147.2	147.2	90.0	90.0	90.0	2	2.24	293	1.9	—
新晶体结构											
P2,	74.2	95.5	106.1	90.0	106.2	90.0	6	2.03	100	1.0	0.20°
P2,2,2	85.3	124.1	146.1	90.0	90.0	90.0	6	2.17	100	1.5	0.70°

过氧化物酶对活性细胞生存起保护作用, 它催化代谢物 H_2O_2 和 O_2 , 这种功能对于所有暴露于 O_2 中的微生物时必须的, 它们通过氧化作用或通过细胞成分的自动氧化或微生物呼吸作用形成 H_2O_2 。 H_2O_2 对菌体细胞有毒性作用, 这包括过渡金属离子的活性, 产生 OH^- 基团和破坏 DNA, 无过氧化物酶细胞对诱变和 H_2O_2 致死作用呈高度敏感性。

过氧化物酶以两种不同的蛋白形式独立演变, 导致发生两种不同结构的酶, 即血红素和非血红素过氧化物酶、血红素过氧化物酶 (类型 I) 在好氧微生物中普遍存在, 并广泛被研究, 它们以球形构象为基础, 结合一个喹啉铁氧化还原辅助因子。相反地非血红素过氧化物酶 (类型 II) 在微需氧微生物中存在, 包括嗜温乳酸菌如 *L. plantarum*、嗜热菌 *Thermus thermophilus* 和 *Thermoleophilus album*。 *T. thermophilus* 过氧化物酶的三维结构是 α -螺旋束蛋白质, 含有 2 个 Mn^{2+} 活性中心, 形成二电子催化循环, 在 Mn^{2+} 和 Mn^{3+} 两个状态下互相转移。 Barynin 等 (2001) 对 *L. plantarum* 过氧化物酶的研究表明: *L. plantarum* 的过氧化物酶被紧密互相作用的亚单元稳定, 这包括一个 β -折叠和一个钙离子桥交联在相邻亚单元上。每个亚单元含有 2 个 Mn^{2+} 活性位, Mn^{2+} 通过一个 $\mu_{1,3}$ -桥式谷氨酸羧化物 and 两个 μ -桥式溶剂氧连接, 活性位区域包括两个残基 (Arg147 和 Glu178), 这对于 *L. plantarum* 过氧化物酶是独一无二的。

L. plantarum 和 *T. thermophilus* 过氧化物酶的比较说明两种不同结构的过氧化物酶存在, 这种不同在于单晶结构、活性位组织等方面, 这种结构的不同意味着催化能力的不同和生物学功能的不同。

六、*L. plantarum* 分泌的乳酸脱氢酶

Krishnan 等在 2000 年研究发现, 对于 *L. plantarum* NCIM2084 完整的细胞而言, 检测不到乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, 而无细胞提取物具有该酶活性。二乙基酯、甲苯、乙醇、阳离子消毒剂 CTAB 用于 *L. plantarum* NCIM2084 菌体细胞通透性的改善, 除 CTAB 外, 用这些试剂改善的 *L. plantarum* 细胞较无细胞提取均有更高的 LDH 活性 (见图 7-19)。这种改善能力二乙基酯 > 甲苯 > 甲苯 + 乙醇

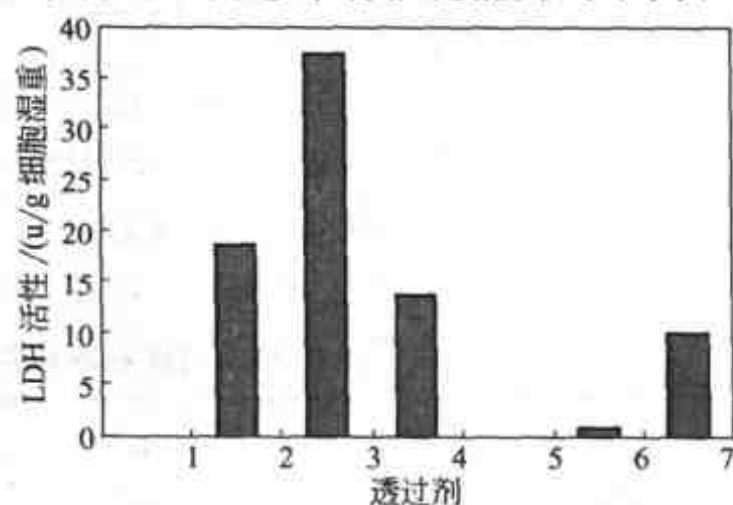


图 7-19 不同细胞透过剂对胞内 LDH 活性的影响
1-对照; 2-甲苯 (5% V/V); 3-二乙基酯 (1% V/V); 4-甲苯+乙醇 (1:2) (10% V/V); 5-对照;
6-CTAB (0.1%); 7-无细胞提取物

(1:2) (10% V/V)。

通透性改善受温度、改善剂浓度和培养时间的影响。4℃时细胞暴露于二乙基酯 1min 有最大的细胞通透性改善，时间延长 LDH 活性损失，获得 LDH 最佳活性的培养温度为 28℃，二乙基酯的浓度在 1%~1.5% 左右。所有的菌仅在细胞透过性改善后才能测定到，与 LDH 相比，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和乙醇脱氢酶的水平较低，FDP 醛缩酶和丙酮酸激酶较后二者酶活性高（见表 7-22）。

表 7-22 发酵 18h 后与乳酸合成相关酶的活性

酶	活性/ μ /g 细胞		酶	活性/ μ /g 细胞	
	未处理细胞	通透性细胞		未处理细胞	通透性细胞
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	nd	0.15	FDP 醛缩酶	nd	0.68
乙醇脱氢酶	nd	0.19	丙酮酸激酶	nd	1.4

注：nd—未测定到。

(一) pH 的影响

pH 对经过酯透过的细胞和无细胞提取物中 LDH 活性的影响如图 7-20 所示，当 pH 介于 6~8，丙酮酸钠为底物时，酯透过细胞的 LDH 最适 pH 为 6.5~7.0，无细胞提取物 LDH 的最适 pH 为 7.0。活性对 pH 曲线表明酯透过细胞和无细胞提取液 LDH 的 pK_a 分别为 6.5 和 6.8。

pH 对 LDH 稳定性产生影响，pH=7.0 60min 酯透过细胞 LDH 活性保留 80%，纯化酶的活性保持 70%；在 pH=7.0 左右 LDH 最稳定。pH=3.0 和 9.0 时 10min 内 LDH 活性消失（见图 7-21）。

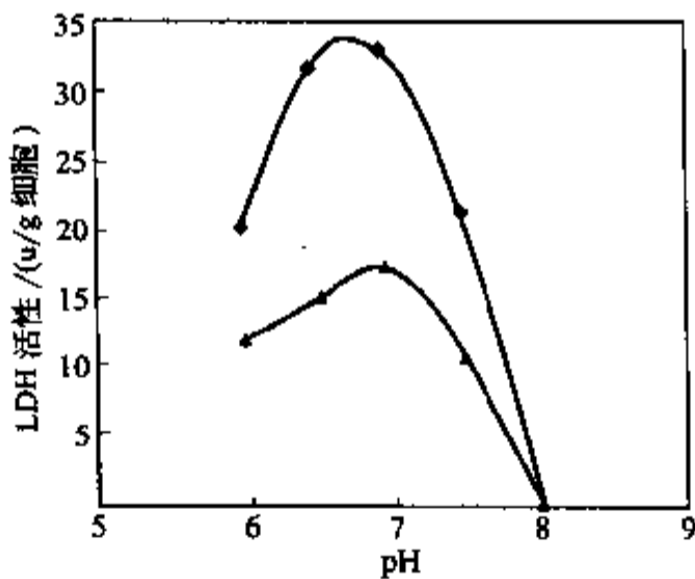


图 7-20 pH 对 LDH 活性影响
 Δ —*L. plantarum* NCIM2084 无细胞提液；
 \blacklozenge —酯透过细胞

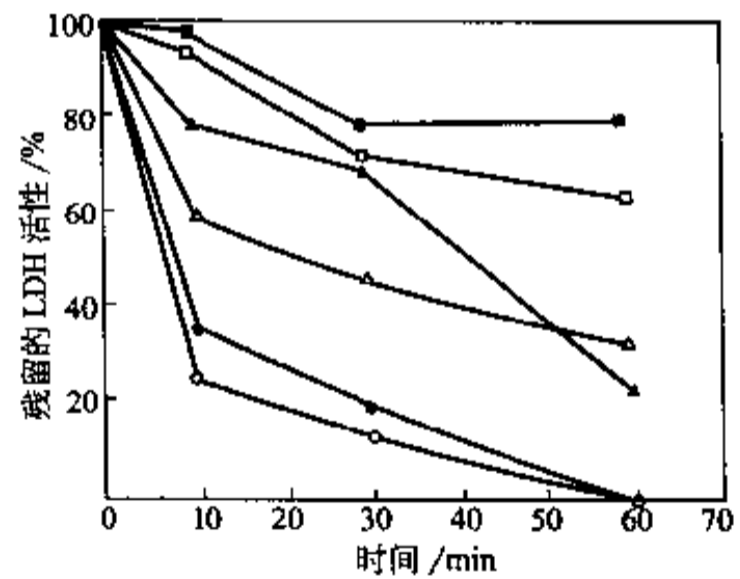


图 7-21 pH 对 LDH 稳定性的影响
 (●—pH=3.0; ■—pH=7.0; ▲—pH=9.0)
 实心点表示酯透过细胞，非实心点是无细胞提取液

(二) 温度的影响

LDH 在酯透过细胞中活性的最适温度 4~15℃，无细胞提取液中 LDH 活性的最适温度是 15℃。温度对 LDH 活性和稳定性影响见图 7-22 和图 7-23。图 7-24 表明 28℃、5min 加热酯透过细胞活性保留 81%，15min 下降为 37%。无细胞提取液中 LDH 活性 28℃、5min 保留 75%，28℃15min 下降为 32%。两种介质中的 LDH 在 37℃ 或 45℃ 都不稳定，45℃ 时 LDH 迅速失活。

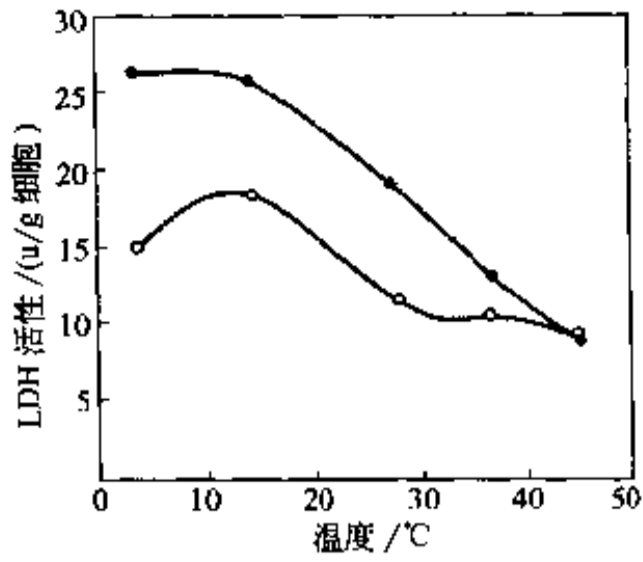


图 7-22 温度对 LDH 活性影响
●—酯透过细胞；○—无细胞提取液

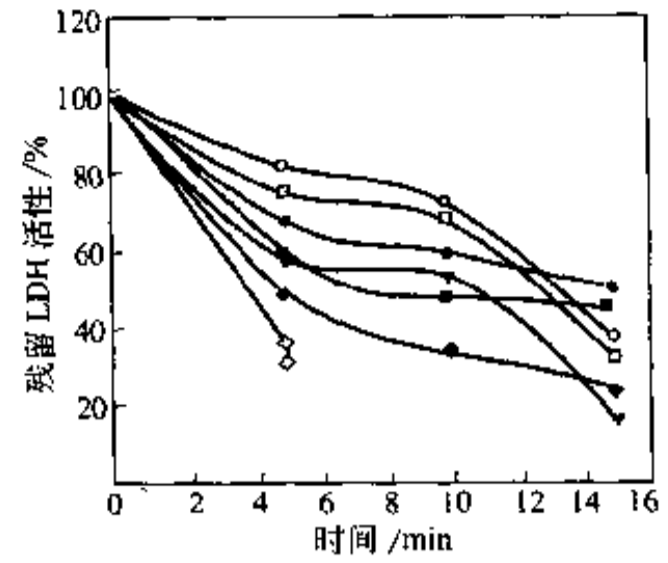


图 7-23 LDH 的温度稳定性
酯透过细胞：● 15°C；○ 28°C；▼ 37°C；▽ 45°C
无细胞提取液：■ 15°C；□ 28°C；◆ 37°C；◇ 45°C

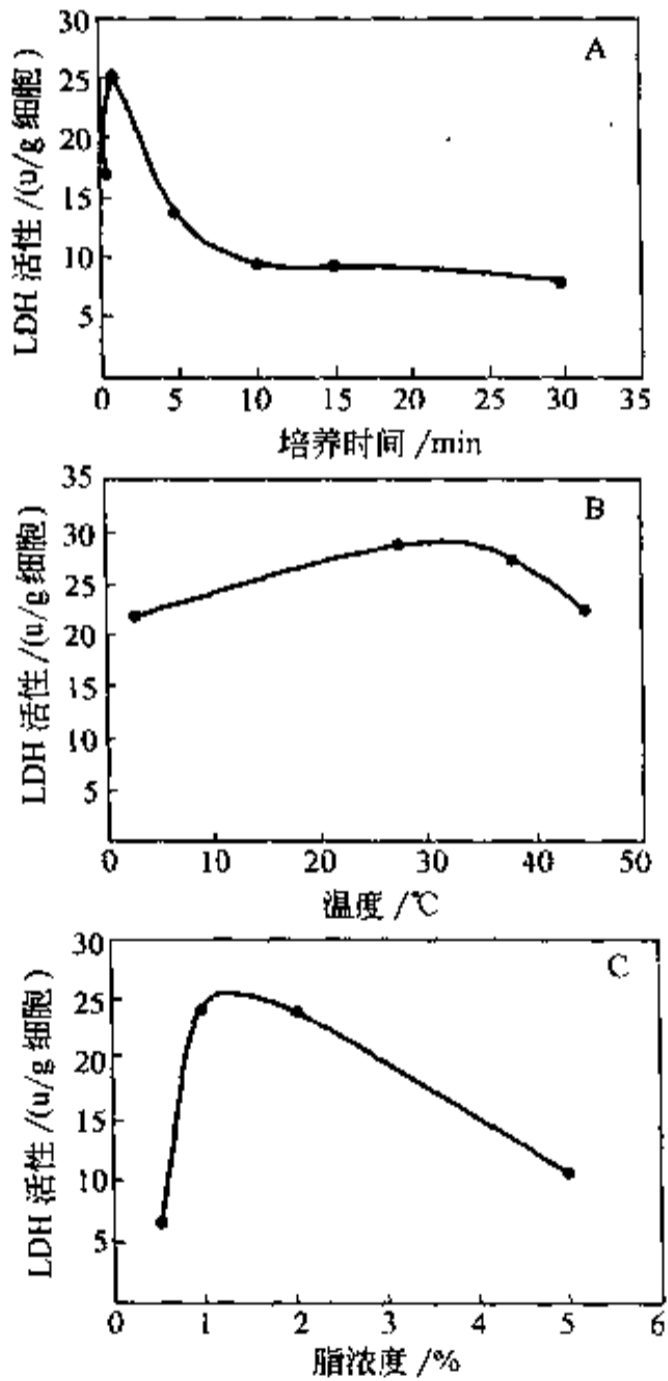


图 7-24 二乙基酯透过细胞透过液
LDH 活性最适条件 (28°C、1%
的酯处理)

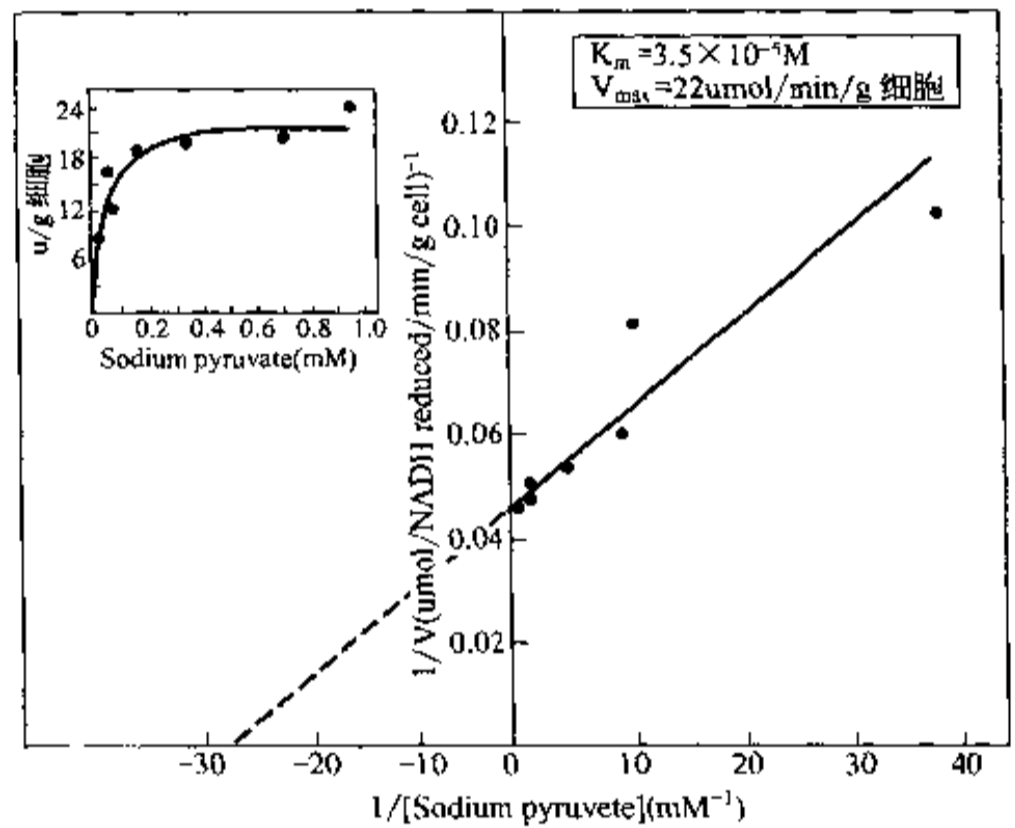


图 7-25 以丙酮酸钠为底物的 LDH 反应动力学

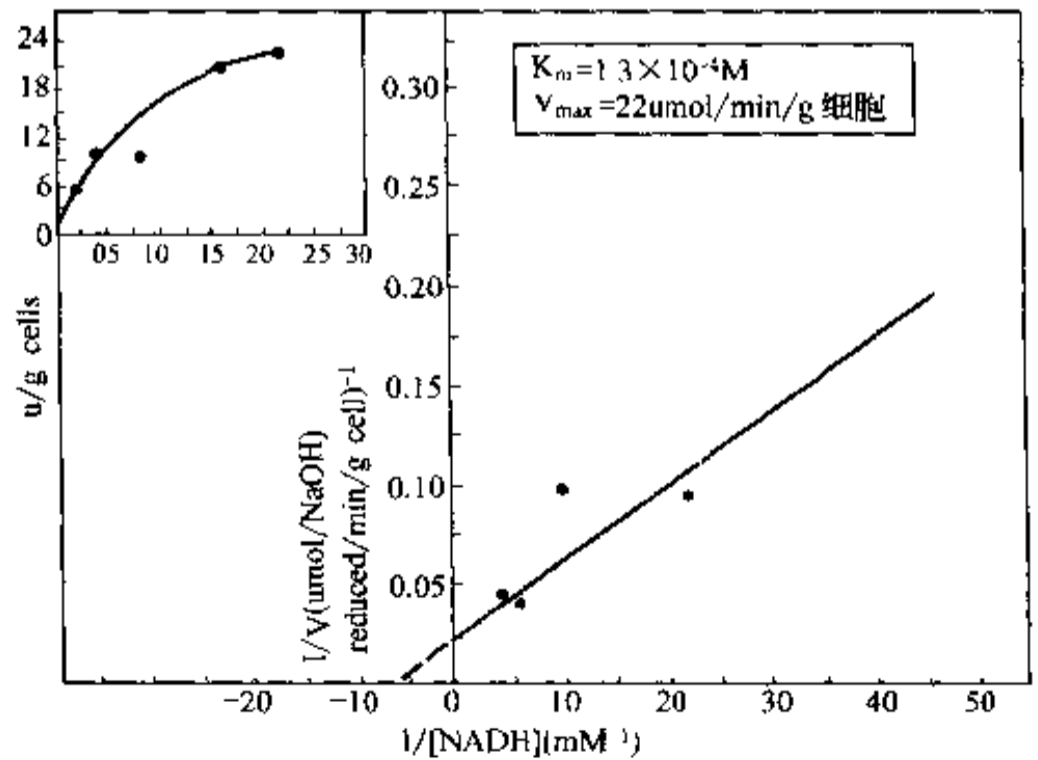


图 7-26 以 NADH 为底物的 LDH 反应动力学

(三) 反应动力学参数

以丙酮酸钠和 NADH 为底物的 LDH 反应动力学情况如图 7-25、图 7-26 所示。酯透过细胞中丙酮酸钠和 NADH 为底物的 Michaelis 常数分别为 3.5×10^{-5} 和 1.3×10^{-4} mol/L, 对应无细胞提取物中的值为 8.3×10^{-4} (FDP)。

(四) 抑制剂的影响

羟基喹啉 (8HQ)、 Hg^{2+} 对 LDH 活性的影响被研究, 8HQ 对 LDH 活性有抑制作用, 3×10^{-6} mol/L $HgCl_2$ 可抑制 LDH 活性 60%, 当 $HgCl_2$ 浓度达到 3×10^{-4} mol/L 时 LDH 活性仅存 10%, 发生 50% LDH 活性抑制时 $HgCl_2$ 的浓度为 2×10^{-9} mol/L, $HgCl_2$ 的抑制呈不可逆性, 它不可逆地使酶失活。

七、*L. plantarum* 的精氨酸脱亚氨酶活性

L-精氨酸是一种柠檬汁中存在主要氨基酸, 精氨酸经精氨酸脱亚氨酶的催化可分为微生物的生长提供能源, 它包括以下三个酶反应过程:



许多从橙汁以外来源分离的乳酸菌具有经过精氨酸脱亚氨酶 (Arginine deiminase, ADI) 途径分解精氨酸的能力。由于 *L. plantarum* 经 Arena 等 (1999) 的研究发现也具有这种能力, 故它有可能利用橙汁中的精氨酸快速生长而成为橙汁的主要腐败菌。故 *L. plantarum* 代谢精氨酸性质的清楚的研究, 对防止橙汁中 *L. plantarum* 引起的腐败亦能提供帮助。

(一) *L. plantarum* 的生长和 pH 变化

L. plantarum N₈ 和 N₄ 在基础培养基中的生长如图 7-27 所示。*L. plantarum* N₈ 在添加 L-瓜氨酸的基础培养基 (BM) 中活体细胞上升了 13%, 比生长速率由 0.028 上升为 0.037, 精氨酸和鸟氨酸的添加不改变 *L. plantarum* 的生长。对于 *L. plantarum* N₄, 生长被精氨酸和瓜氨酸的存在改变, 瓜氨酸对 *L. plantarum* N₄ 有最高的生长刺激作用, N₄ 的生长速率由 0.038 上升至 0.055, 精氨酸的生长刺激提高 10%。添加瓜氨酸或精氨酸的 BM 的 pH 稍高于对照组。

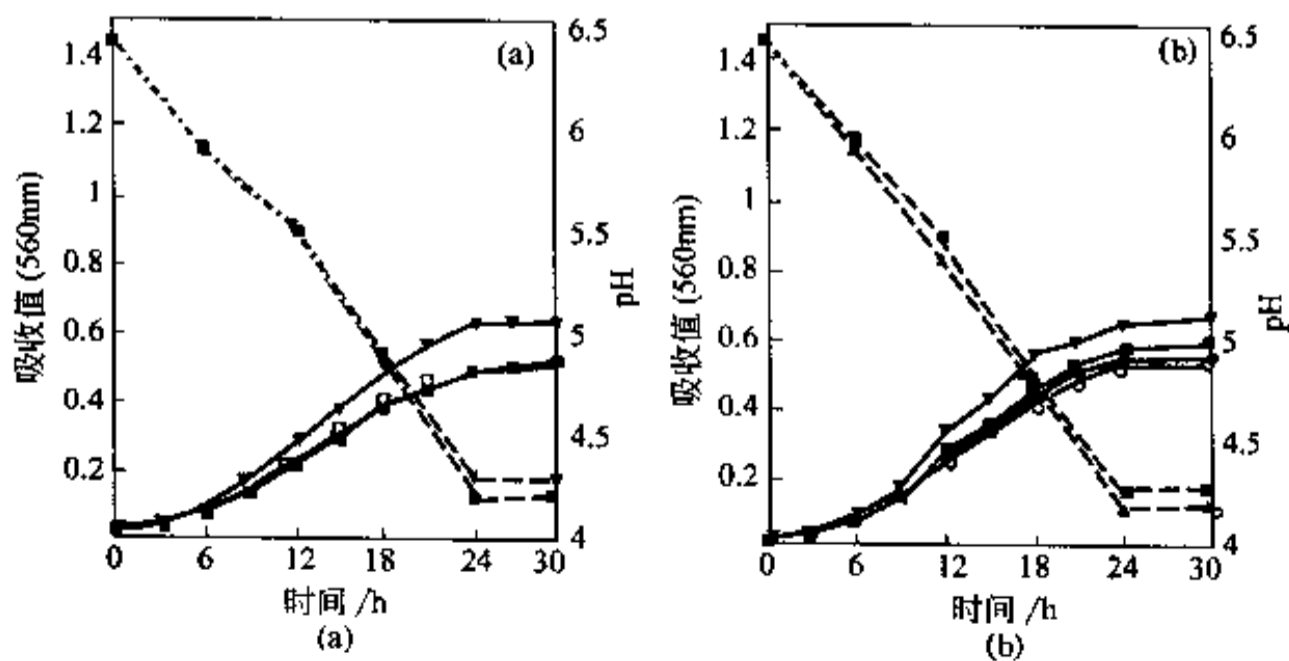


图 7-27 在 BM 中添加精氨酸 (■)、瓜氨酸 (▼) 或鸟氨酸 (▲) 菌的生长和 pH 变化
(a) — *L. plantarum* N₈; (b) — *L. plantarum* N₄

(二) 精氨酸的催化作用和代谢产物

精氨酸部分地被 N_8 和 N_4 代谢 (图 7-28), 在其代谢过程中形成瓜氨酸、鸟氨酸和 NH_3 。 N_8 培养 24h 后仅消耗了 0.13mmol/L 精氨酸, 它的上述三种代谢产物可被检测到。 N_4 消耗精氨酸的量较 N_8 大, 从代谢形成的产物看氨基酸是通过 ADI 途径代谢的。

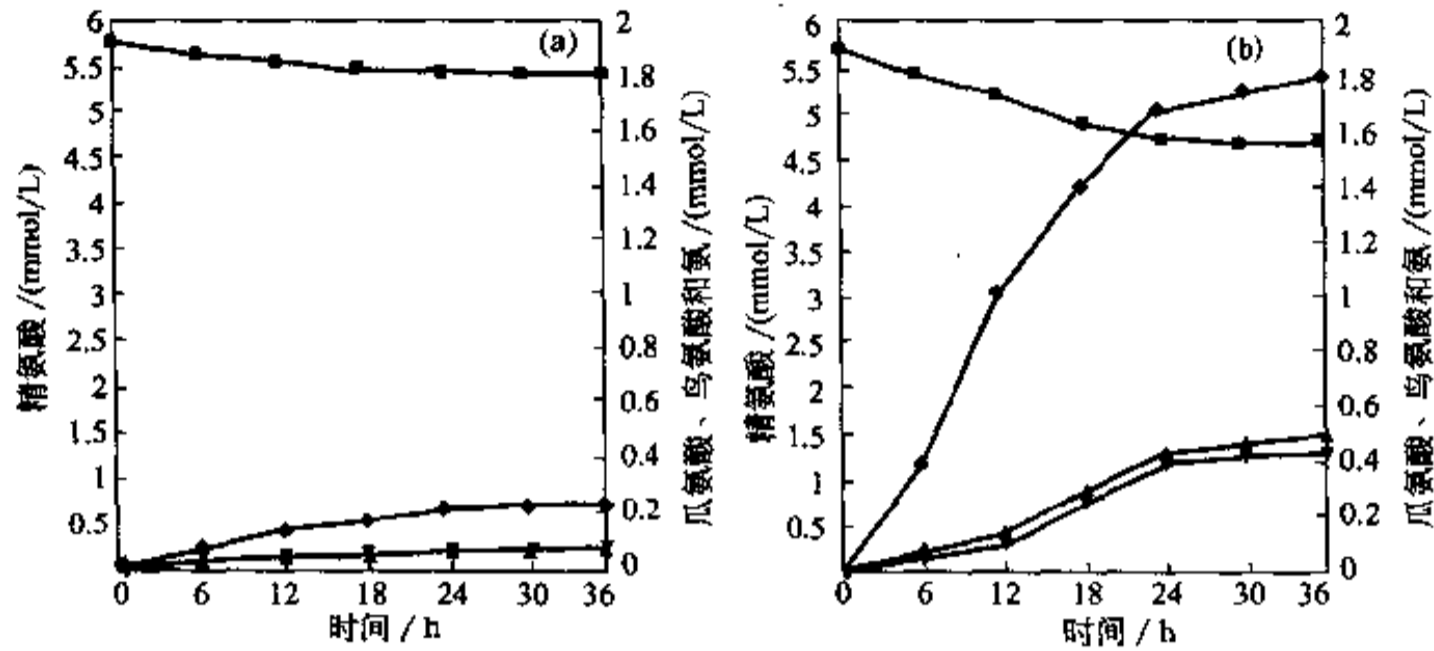


图 7-28 精氨酸代谢 (■) 和代谢物形成 (瓜氨酸 (▽), 鸟氨酸 (▲)、氨 (◆))
(a) -*L. plantarum* N_8 ; (b) -*L. plantarum* N_4

(三) 瓜氨酸催化过程和代谢产物

图 7-29 是 *L. plantarum* N_8 和 N_4 代谢瓜氨酸的情况, *L. plantarum* N_8 产生 0.34mmol 鸟氨酸和 0.87mmol 氨 (每代谢 1mmol 瓜氨酸); *L. plantarum* N_4 则形成 0.55mmol 鸟氨酸和 0.89mmol 氨/mmol 瓜氨酸。

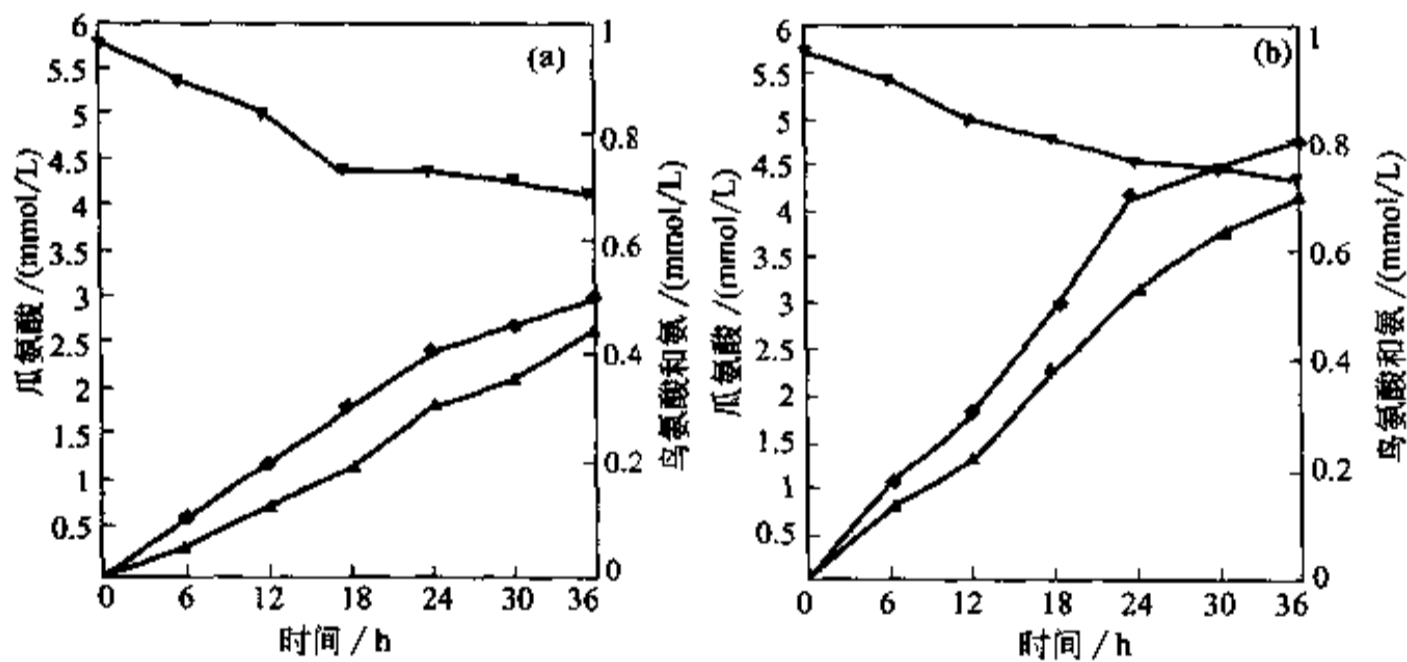


图 7-29 瓜氨酸催化过程 (▽) 和代谢产物 [鸟氨酸 (▲) 和氨 (◆)]
(a) -*L. plantarum* N_8 ; (b) -*L. plantarum* N_4

(四) 鸟氨酸的代谢

L. plantarum N_8 仅仅消耗 0.07mmol/L 鸟氨酸, 说明在强化或没有强化鸟氨酸的基础培养基 (BM) 中有相同的生长反应。虽然 *L. plantarum* N_4 的生长不受到鸟氨酸的强烈刺激 (3% 增长), 但对鸟氨酸的利用量却达 1.53mmol/L 的高水平, 每消耗 1mol 鸟氨酸生成 0.01mmol 瓜氨酸 (见图 7-30)。

(五) 葡萄糖的利用

表 7-23 是强化营养的 BM 和 BM 中的 *L. plantarum* N_8 和 N_4 消耗葡萄糖的情况, 随着

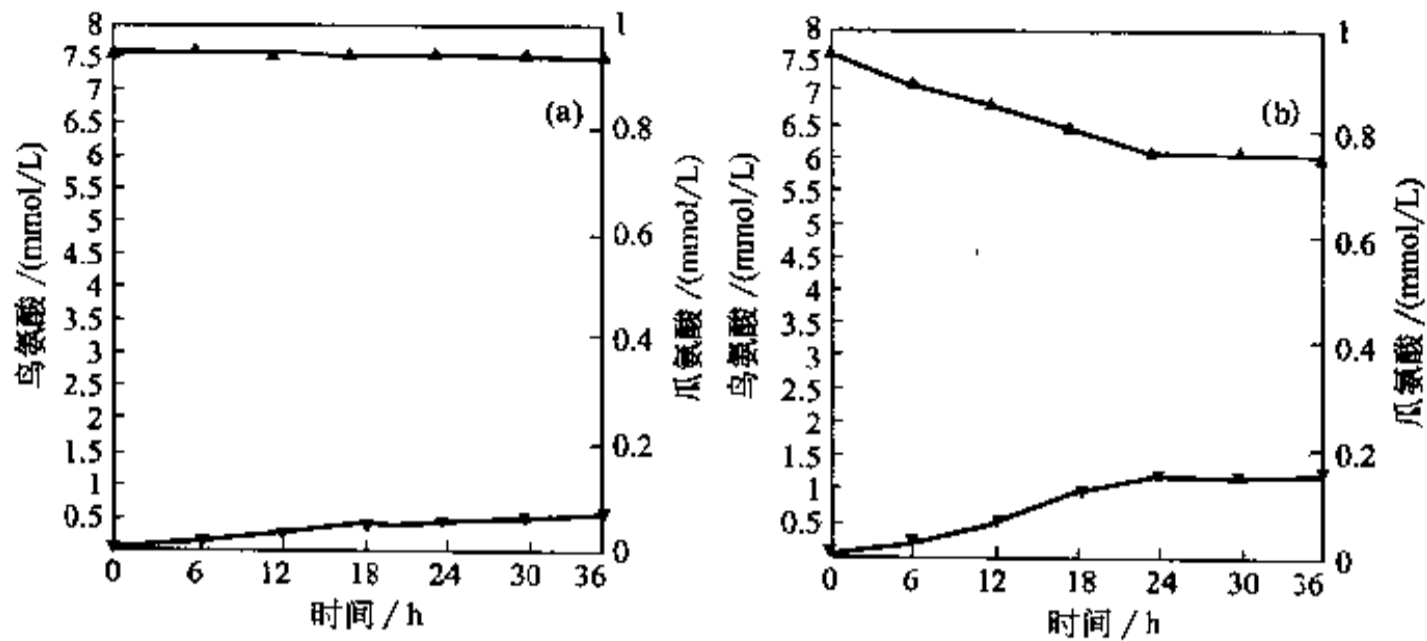


图 7-30 鸟氨酸催化过程 (▲) 和瓜氨酸形成 (▼)
 (a) - *L. plantarum* N₈; (b) - *L. plantarum* N₄

表 7-23 在 BM 和强化 BM 中葡萄糖的消耗 (强化量 1g/L)

生长/h	葡萄糖消耗/mmol/L							
	<i>Lactobacillus plantarum</i> N ₈				<i>Lactobacillus plantarum</i> N ₄			
	BM	BM+Arg	BM+Cit	BM+Orn	BM	BM+Arg	BM+Cit	BM+Orn
6	1.66	1.55	1.45	1.47	1.46	1.22	1.25	1.50
12	3.40	3.20	3.20	3.42	3.50	2.70	3.25	3.40
18	5.10	4.91	4.81	5.20	5.12	4.60	4.80	5.20
24	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55

菌生长开始, 葡萄糖和每种氨基酸被共同代谢。在精氨酸存在条件下, 葡萄糖以较慢速度代谢, 尤其是对于 *L. plantarum* N₄。当 *L. plantarum* 培养 12h 后, 在 BM 和 BM+精氨酸中葡萄糖消耗分别是 3.50 和 2.70mmol/L。瓜氨酸也降低了 *L. plantarum* 对葡萄糖的利用, 其利用率的下降在两株菌中相似, 在 24h 培养后无论是否强化氨基酸, 葡萄糖完全被利用。

综上可知 *L. plantarum* N₈ 和 N₄ 对氨基酸有不同的利用能力, *L. plantarum* N₄ 较 N₈ 更大程度上代谢精氨酸和鸟氨酸, ADI 途径被 N₈ 和 N₄ 菌利用, 两株菌不利用精氨酸酶-尿酶途径, 因此在果汁中强化营养物质容易引起产品的腐败。

第三节 *L. plantarum* 产生的细菌素

L. plantarum 产生的细菌素有许多报道, 包括来自肉和肉制品、乳、奶酪、发酵胡瓜、橄榄、发酵谷物、果汁的 *L. plantarum*。许多来自 *L. plantarum* 的细菌素被分离和部分表征, 如 *plantaricin A*、*plantaricin C* 和 *plantaricin 149* 等。*plantaricin A* 是一种由两条肽组成的细菌素, *L. plantarum* C11 分泌三种细菌素 PlnA, 据推测还存在着其他五种细菌素 Pln E、Pln F、Pln J、Pln K 和 Pln N。当 PlnE 和 PlnF、PlnJ 和 PlnK 结合时在毫微克浓度水平可测定到细菌素的活性, PlnEF 和 PlnJK 清晰的是两种肽细菌素系统, PlnA 22-、23-、26-的结合以及这些肽和 PlnEF 或 PlnJK 的结合产生增效的抑菌效果, 因此 PlnA 不能归类于上述两类细菌素, *Plantaricin C* 是一种分子量为 3500KDa 的细菌素, *plantaricin 149* 是一种 22 个氨基酸的肽, 其氨基酸顺序和 PlnA 不同, 这些细菌素的氨基酸顺序没有明显的同源性, 和其他乳酸菌分泌的细菌素也没有同源性。由 *L. plantarum* WHE 92 分离的 *pedivcin ACH* 是一种分子量 4.6kDa、44 个氨基酸的肽类, 其一级结构和 *Pediococcus acidilactici* 菌株分泌的细菌素 *pedicin ACH* 相同。

一、细菌素 Plantaricin ST31 的性质

Todorol 等 (1999) 从近 100 株 *L. plantarum* 菌中分离出 Plantaricin ST31, 它来自 *L. plantarum* ST31, 现我们以它为例来说明 *L. plantarum* 菌分泌细菌素的性质。

(一) Plantaricin ST31 的一般特征

L. plantarum ST31 是一种不运动、无芽孢、革兰氏阳性、兼性厌氧乳酸菌, 由发酵谷物产品中分离。 *L. plantarum* 分泌的细菌素 Plantaricin ST31 具有抑菌活性, 具体情况见表 7-24。在被测试菌中它能抑制 46 株乳酸菌中 32 株菌的生长, 革兰氏阴性菌不被抑制, 革兰氏阳性菌呈敏感性, 在乳酸菌中 6 株 *Leuconostoc*、2 株 *Pediococcus* 和 1 株 *S. thermophilus* 呈敏感性。38 株 *Lactobacillus* 的 28 株被抑制, 说明这种细菌素几乎可抑制全部的 *Lactobacillus*, 值得注意的是 *L. plantarum* 12 对 18 株测试菌具有抑制作用, 对于其他革兰氏阳性菌主要抑制 *Bacillus subtilis*、*Enterococcus faecalis* 和 *Staphylococcus aureus*。

表 7-24 对 *L. plantarum* ST31 无细胞上清液对细菌的抑制情况

菌 株	来 源	介 质	活 性
<i>Lactobacillus plantarum</i> 14917	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1011	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1033	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1060	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1095	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1175	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1189	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1220	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1254	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1287	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1341	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1361	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1383	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1390	LdC Boll	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1397	LdC Boll	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1408	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1409	ENITIAA	MRS	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> 1	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus helveticus</i> 2	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i> 1125	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i> 1127	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i> 1128	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i> 1131	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i> 1141	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> 1038	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> 1416	IP	MRS	-
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> 1374	SD PC	MRS	-
<i>Lactobacillus brevis</i> 1078	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus brevis</i> 1104	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus brevis</i> 1142	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> 1307	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> 1371	SD PC	MRS	+

续表

菌 株	来 源	介 质	活 性
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> 1280	SD PC	MRS	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> C	ENITIAA	MRS	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1386	IP	MRS	+
<i>Lactobacillus amylophilus</i> 1394	IP	MRS	+
<i>Lactobacillus sakei</i> 1	ENITIAA	MRS	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i> 1404	IP	MRS	-
<i>Carnobacterium piscicola</i> 2762	NCDO	Elliker	-
<i>Carnobacterium divergens</i> 2763	NCDO	Elliker	+
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 117	INRA CNRZ	MRS	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	ENITIAA	Elliker	+
<i>Streptococcus thermophilus</i> 1	ENITIAA	Elliker	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	ENITIAA	NB	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1	ENITIAA	MRS	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 2	ENITIAA	MRS	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 8293	ATCC	MRS	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1000	SD PC	MRS	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1044	SD PC	MRS	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1324	SD PC	MRS	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1228	SD PC	MRS	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> 1055	SD PC	MRS	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> 1414	LdC	MRS	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> 1185	SD PC	MRS	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ENITIAA	NB	
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	ATCC	NB	+
<i>Bacillus subtilis</i> 1	ENITIAA	NB	+
<i>Bacillus cereus</i> 2	ENITIAA	NB	-
<i>Listeria innocua</i> F	ENITIAA	Elliker	-
<i>Listeria innocua</i> VI	ENITIAA	Elliker	-
<i>Listeria monocytogenes</i> R ser. 4b	ENITIAA	Elliker	-
<i>Pediococcus damnosus</i> 1	ENITIAA	Elliker	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1164	SD PC	Elliker	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1272	SD PC	Elliker	+
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 1	ENITIAA	RCMr	-
<i>Clostridium perfringens</i> 2	ENITIAA	RCM	-
<i>Clostridium sporogenes</i> 2	ENITIAA	RCMr	-
<i>Salmonella heidelberg</i> 1	ENITIAA	NB	-
<i>Citrobacter freundii</i> 2	ENITIAA	NB	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 3	ENITIAA	NB	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	ENITIAA	NB	-
<i>Proteus vulgaris</i> 2	ENITIAA	NB	-
<i>Serratia marcescens</i> 1	ENITIAA	NB	-
<i>Escherichia coli</i> 1	ENITIAA	NB	-
<i>Escherichia coli</i> 2	ENITIAA	NB	-

Todorov 等 (1999) 研究了不同酶对抑制 Plantaricin ST31 活性的影响, 经过蛋白酶 IV、VII、胰蛋白酶或 Pronase 作用以后, Plantaricin ST31 使其失活活性明显下降 (见表 7-25), 表明 Plantaricin ST31 具有蛋白质性质, 用淀粉酶和过氧化物酶处理不能改变其活性, 说明 H₂O₂ 对抑制活性没有影响, 也从另一方面说明碳水化合物成分不是抑制活性物质的必需

表 7-25 影响 *L. plantarum* ST31 细菌素活性的因素

处 理	细菌素活性	处 理	细菌素活性
酶/(0.1mg/ml)		4	+
蛋白酶 IV	-	5	+
蛋白酶 VII	-	6	+
内酯酶 E	-	7	+
胰蛋白酶	-	8	+
α -淀粉酶	+	9	-
表面活性剂/%		10	-
SDS	+	11	-
Tween 20	+	温度/ $^{\circ}\text{C}$	
Tween 80	+	30~80	+
尿素	-	90	+
pH		100	+
3	+		

成分。

活性制备物的稳定性呈 pH 依赖性，在 pH=3.0~8.0，其抑制活性没有大的差异，

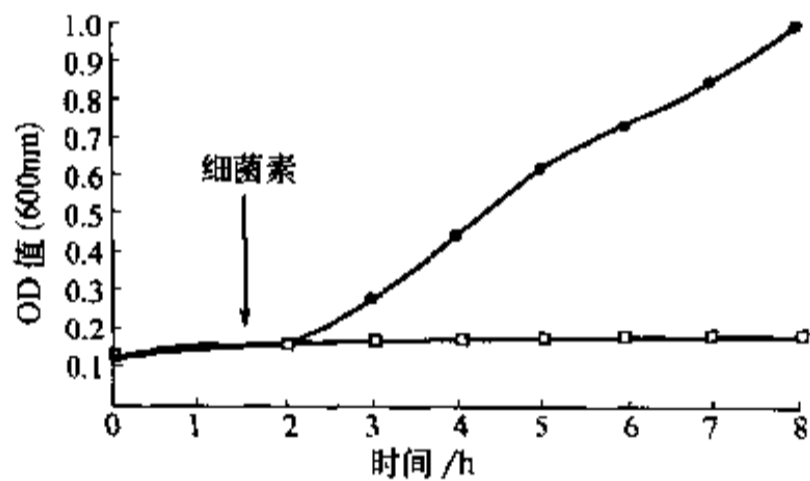


图 7-31 Plantaricin ST31 对 *L. plantarum* LAB73 的抑制作用 (30 $^{\circ}\text{C}$ 培养)

●—无细菌素；□—有 3200AU/ml plantaricin

(二) 细菌素的生产

为了改进 Plantaricin ST31 的产量，介质的起始 pH、环境情况、温度和培养时间必须被优化。好氧和厌氧培养产生的 Plantaricin ST31 的量相似，介质的 pH 和培养温度和对 *L. plantarum* 生长和 Plantaricin ST31 的产生具有主要影响。当微生物于 pH4.0~7.0 的起始值，经 5 小时培养后开始对于 *L. plantarum* LAB73 产生抑制。在 pH6.0 时 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时获得最大的 Plantaricin ST31 产量 (600AU/ml)，进一步培养至 48 小时 Plantaricin ST31 的产生逐渐下降。

当调整 pH 时获得类似的结果，在 pH6.0 时在对数早期的 *L. plantarum* 培养物中即可测定到 Plantaricin ST31，在平衡期 (pH=6.0) 有最大的抑菌活性，至少保持 10 小时的稳定 (图 7-32)。

(三) 细菌素的纯化

由于在菌的平衡期发现 Plantaricin ST31 的最大活性，故 Plantaricin ST31 在 pH6.0 的 MRS 培养基中 24 分批培养后进行分离，经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀进程预纯化，回收率为 40%。沉淀物经 Sep-pack 18 过滤，活性部分用 40% 的 2-丙醇洗脱，此阶段 Plantaricin ST31 回收率为 4%，比活性增加了 1.9×10^5 倍。这个部分在 HPLC C-18 逆相柱上进一步分离，Plan-

但在相对碱性 pH 值时抑制活性相对减少。在中性 pH 条件下，发酵物上清液中的活性成分呈热稳定性，抑制活性在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟没有变化。消毒剂也不影响细菌素的活性，但尿素存在情况下抑菌活性消失，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 2 个月以上或冷冻状态贮存 6 个月以上不影响 Plantaricin ST31 的活性。

Plantaricin ST31 的抗菌活性如图 7-31 所示，说明该细菌素对 *L. plantarum* LAB 73 具有抑制作用。

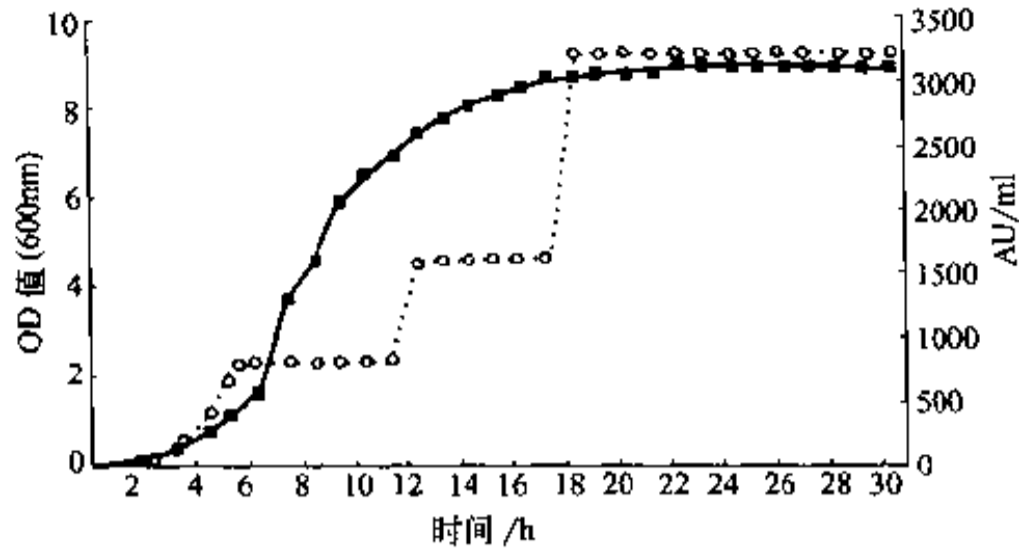


图 7-32 *L. plantarum* ST31 的生长 (■) 和细菌素活性 (○)
(30℃、调整 pH 为 6.00, 无 Tween80 的 MRS 培养基)

taricin ST31 回收率仅为 0.8%，但比活性上升了 1.2×10^6 倍 (表 7-26)。Plantaricin ST31 是分子量为 2755.63KDa 的具有 20 氨基酸残基组成的肽类，其结构为：Lys-Arg-Lys-Lys-His-Arg-X-Glu-Val-Tyr-Asn-Asn-Gly-Met-Pro-Thr-Gly-Met-Tyr-Arg，Plantaricin ST31 是一种疏水性肽。

表 7-26 *L. plantarum* ST31 细菌素的纯化

样 品	总体活性/AU	蛋白质/mg	比活性/(AU/mg)	产量/%	纯化系数
表面活性剂(200 ml)	6.4×10^5	1810	3.6×10^2	100	1
60%的(NH ₄) ₂ SO ₄ (20 ml)	2.5×10^5	10.6	2.4×10^4	40	6.7×10^3
Sep - Pack 40%异丙醇(2 ml)	2.5×10^4	0.038	6.7×10^5	4	1.9×10^5
HPLC C ₁₈ (0.2 ml)	5.1×10^3	0.001	4.3×10^6	0.8	1.2×10^6

二、细菌素 Plantaricin C19 的性质

(一) pH 对 Plantaricin C19 在产生菌上吸附的影响

pH 对 Plantaricin C19 在其产生菌 *L. plantarum* C19 上吸附或抗性细胞吸附影响如图 7-33 所示。pH 强烈地影响这两种吸附，最适吸附发生在 pH=5.0 和 pH=7.0，两种吸附的完全解离发生在 pH=1.5 和 pH=2.0。

(二) Plantaricin C19 的纯化

pH 对吸附的影响及 Plantaricin C19 从产生菌的解离性质可用于它的分离和纯化，它在生长菌的解离发生在 pH=2.0。从产生菌脱附的 Plantaricin C19 经过粗浓缩后比活性大大增加，活性回收率 20%，比活性为 17808AU/mg 蛋白质。经 HPLC 后比活性上升了 900 倍，活性回收率 15%。

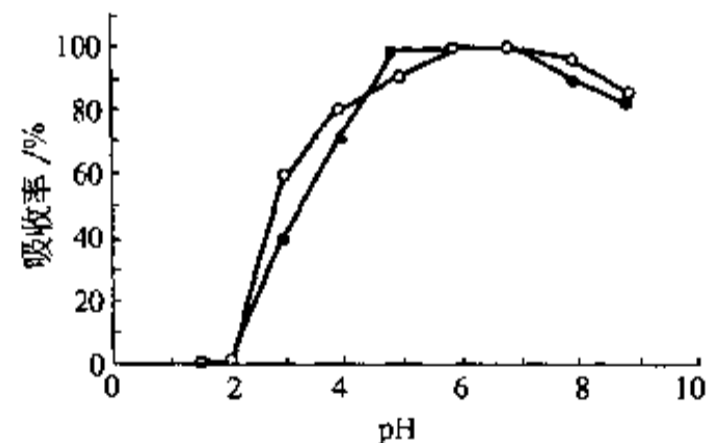


图 7-33 Plantaricin C19 在产生菌 (○) 和抗性细胞 *L. lactis* INRA141 (●) 上的吸附

(三) Plantaricin C19 的氨基酸序列和分子量

纯化 Plantaricin C19 的氨基酸组成如表 7-27 所示，包含高比例的甘氨酸、疏水性氨基酸 (主要是丙氨酸和缬氨酸) 和赖氨酸。能测定到胱氨酸，但由于它在水解情况下的不稳定，不能准确定量。它的 1~36 氨基酸序列为：KY YGNGLSCSKKGCTVNWGQAF-SCGVN R VATAGHGK，在 37 位未测定到氨基酸残基，质谱分析得到 Plantaricin C19 的分子量是 3846.3 和 3844Da。

表 7-27 Plantaricin C19 的氨基酸组成

氨基酸	实验值	残基数	氨基酸	实验值	残基数
Glycine	7.6	7 - 8	Glutamine/glutamate	1.2	1
Alanine	4.2	3	Asparagine/aspartate	2.6	2 - 3
Valine	3.3	3 - 4	Serine	2.9	3
Leucine	1.5	1	Theorine	2.2	2
Ileucine	0	0	Lysine	4.6	4
Proline	0	0	Arginine	1	1
Methionine	0	0	Histidine	0.9	1
Phenylalanine	1.3	1	Cysteine	ND	-
Tryptophane	2.2	2	Tryptophane	ND	-

(四) Plantaricin C19 在不同温度 pH、温度下对目标菌的影响

在 7~37℃ 范围内, *Plantaricin* C19 对 *L. grayi* CIP 6818 有抑制作用, 7℃ 时 *Plantaricin* 对 CIP6816 有明显的抑菌作用, 抑制作用可以持续到 192 小时; 但 37℃ 在 9 小时后被测试的细菌出现部分再生长情况 (见图 7-34)。

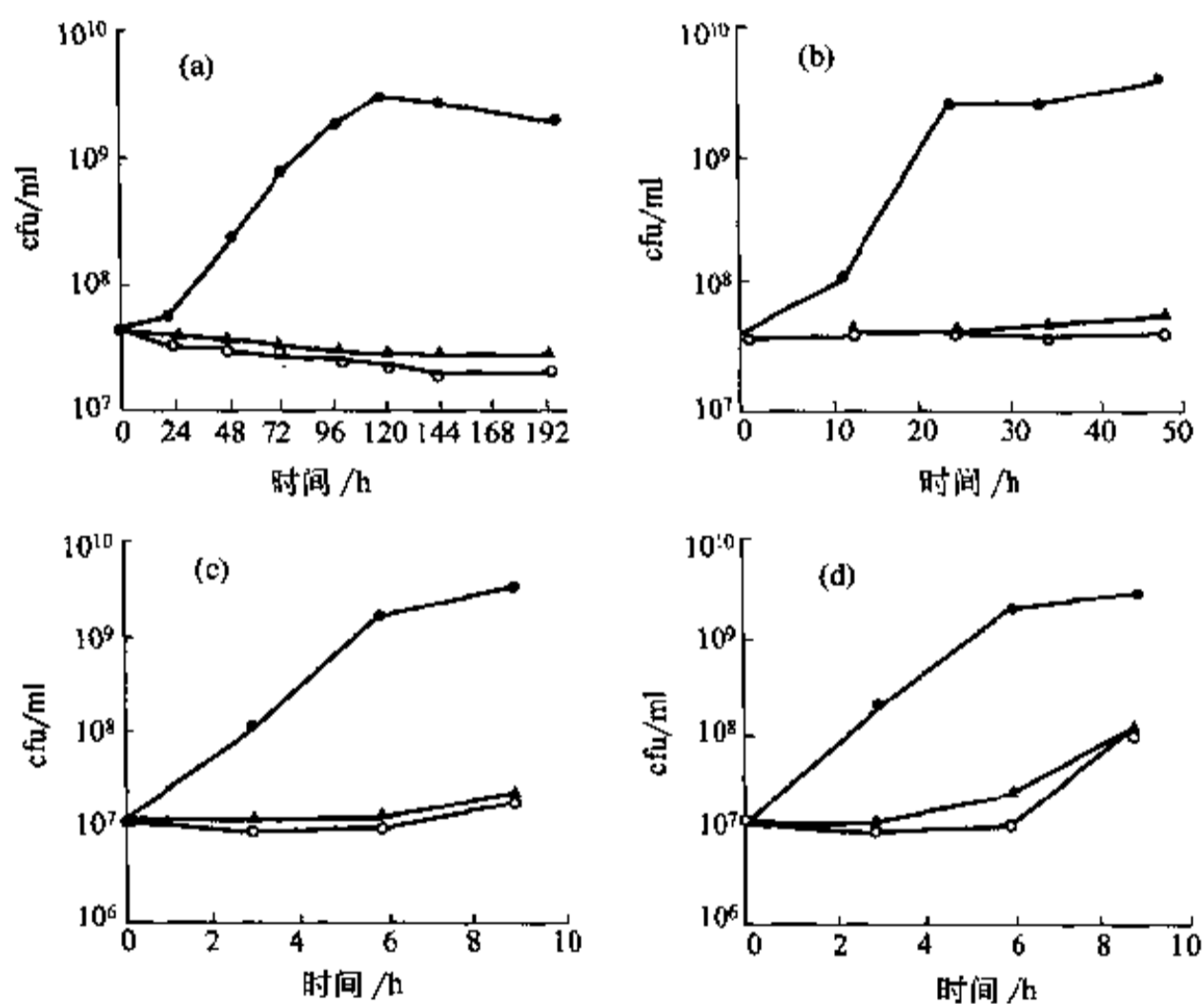


图 7-34 *Plantaricin* C19 对 *L. grayi* CIP6818 细胞的影响

(在 BHI 肉汁中) (a) 7℃; (b) 15℃; (c) 30℃; (d) 37℃

●—对照; ○—320AU/ml; ▲—1280AU/ml

(五) 其他物质对 *Plantaricin* C19 在目标菌上吸附的影响

用 4mol/L 盐酸胍、1% SDS、2% 三萜基 Poly 和 2% Triton X-100 处理细胞不减少 *Plantaricin* C19 在 *L. gragi* 上的吸附。甲醇处理细胞减少了 *Plantaricin* C19 的吸附 90%, 但其他有机溶剂对吸附没有影响, Lipoteichoic acid 的添加完全抑制了 *Plantaricin* C19 的吸附。

不同的盐类 MgSO₄、KCl、CaCl₂ 或 NaCl 减少了细菌素的吸附 (表 7-28), 这种减少和浓度增加正相关, 对 MgSO₄ 最大的减少发生在 100mmol/L 时, 仅 25% *Plantaricin* C19 能够吸附。当 *Plantaricin* C19 的吸附减少时, 菌的存活情况不受影响。

表 7-28 不同物质对 Plantaricin C19 在 *L. grayi* CIP 6818 上吸附的影响

盐/mmol/L		在磷酸盐缓冲液中的吸附/%	L. grayi CIP 6818 的存活/(10 ⁶ cfu/ml)	
			BHI 介质	磷酸盐缓冲液
MgSO ₄	0	100	34	12
	10	100	39	22
	25	70	55	28
	100	25	60	42
KCl	0	100	34	12
	50	85	38	14
	100	65	40	13
	200	25	54	10
NaCl	0	100	34	12
	50	90	39	13
	100	75	42	17
	200	50	45	14
CaCl ₂	0	100	34	12
	10	100	42	nd
	25	75	46	nd
Control	—	—	2200	40

(六) Plantaricin C19 对细胞物质释放的影响

Plantaricin C19 对细胞膜完整性的影响可通过多个参数测定。用 Plantaricin C19 处理的 *L. grayi* CIP 6818 不能引起紫外吸附物质的漏出，因此用细菌素处理后没有发现从细胞中漏出的 K⁺ 和 Mg²⁺。

三、Plantaricin LP84 的性质

Plantaricin LP84 是 *L. plantarum* NCIM 2084 分泌的一种细菌素，Suma 等 (1998) 对其性质进行了系统的研究。不同指示菌和其来源见表 7-29。

表 7-29 应用的不同指示菌和其来源

指 示 菌	来 源
食品病原菌	
<i>Bacillus cereus</i> F 4810	Dr. J. M. Kramer, Central Pul. Hlth. Lab., UK
<i>Escherichia coli</i> D 21	Dr. M. A. Linggood, Unilever Research, UK
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 722	Dr. E. Notermans, National Inst. Publ. Hlth Netherlands
腐败微生物	
<i>B. licheniformis</i> CFR 162	印度天然分离
<i>B. subtilis</i> CFR1604	食品
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CFR 1704	
乳酸菌	
<i>Lactobacillus casei</i> B-1922	Dr. L. K. Nakamura
<i>L. helveticus</i> B-4526	Northern Regional Research Centre
<i>L. plantarum</i> B-4496	IL, USA
<i>L. amylovorus</i> DSM 20531	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

在葡萄糖介质中 40℃ 培养 48 小时获得 *L. plantarum* NCIM 2084 的上清液抑菌谱如表 7-30 所示。这种细菌素表现出广泛的抑菌活性，对 *E. coli* 的抑制最低浓度是 132AU/ml，在全部乳酸菌的测试中，仅有 *L. amylovorus* 是敏感的。

表 7-30 Plantaricin LP84 的抑菌谱

指 示 菌	抑制菌活性/(AU/ml)	指 示 菌	抑制菌活性/(AU/ml)
<i>Bacillus cereus</i> F 4810	228	<i>Bacillus subtilis</i> CFR 1604	208
<i>Escherichia coli</i> D 21	132	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CFR 1704	268
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 722	188	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531	238
<i>Bacillus licheniformis</i> CFR 1621	234		

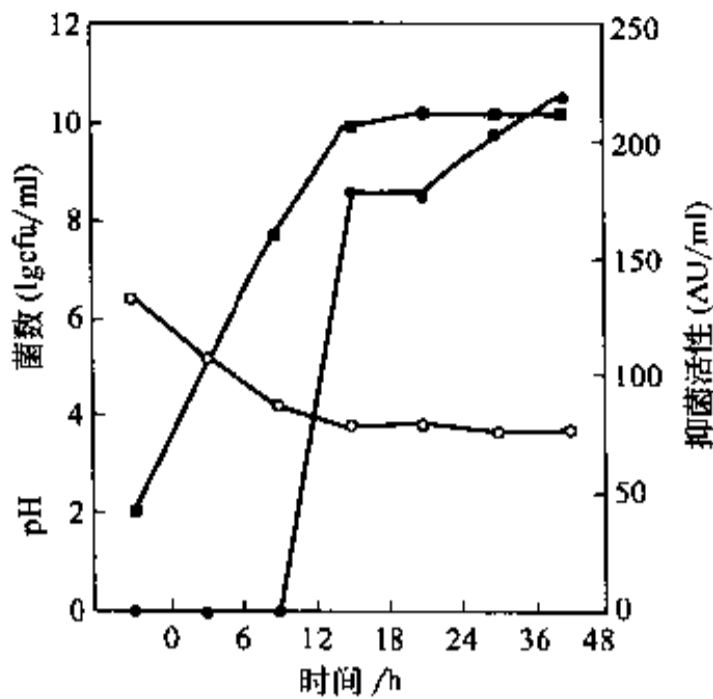


图 7-35 在 40°C 培养时间对细菌数 (■)、pH (○) 和抑菌活性 (●) 的影响

L. plantarum NCIM 2084 在葡萄糖介质中的生长模式如图 7-35 所示。在 40°C 培养 24 小时，细胞数由起始的 2.2 上升至 10.2lgcfu/ml，pH 由起始的 6.4 下降为 3.8。在培养 18 小时后对 *B. cereus* F 4810 (178AU/ml) 的抑菌活性测定到，48 小时后增至 220AU/ml。

L. plantarum NCIM 2084 在 37、40°C 发酵 48 小时产生对 *B. cereus* F 4810 的抑菌活性，但 30°C 时则不产生 (见表 8-31)，37°C 较 40°C 的抑菌活性低，菌在 55°C 不能生长。

许多研究表明，由 *L. plantarum* 产生的细菌素 Plantaricin B、Plantaricin SIK 83、A、BN、S、T、LC74、SA6 和 KW30 对其密切相关菌如嗜热和嗜温菌 *Lactobacilli*、*Pediococci* 和 *Leuconostoc* 有抑制作用，它们具有较宽的抑菌谱，不仅包括乳酸菌，也包括其他革兰氏阳性菌如 *Listeria*、

Staphylococcus aureus、*L. tyrobutyricum*、*Listeria grayi*。Plantaricin LP84 和上述报道的细菌素性质不同，它主要抑制革兰氏阴性和阳性菌，它和 *L. plantarum* BF 001 分泌的细菌素 Plantaricin F 性质相似。Plantaricin LP84 不抑制关系密切的乳酸菌，最佳 pH4.5~4.8，121°C，20 分钟不失活 (表 7-32)，对蛋白酶敏感，对指示菌细胞有溶解作用。

表 7-31 温度对产 Plantaricin LP84 活性影响 (葡萄糖介质，48h 培养)

指示温度/°C	乳酸菌/(lgcfu/ml)	pH	抑菌活性/(AU/ml)
30	9.7	4.3	ND
37	10.0	3.7	102
40	10.3	3.7	218
55		No growth	

Staphylococcus aureus、*L. tyrobutyricum*、*Listeria grayi*。Plantaricin LP84 和上述报道的细菌素性质不同，它主要抑制革兰氏阴性和阳性菌，它和 *L. plantarum* BF 001 分泌的细菌素 Plantaricin F 性质相似。Plantaricin LP84 不抑制关系密切的乳酸菌，最佳 pH4.5~4.8，121°C，20 分钟不失活 (表 7-32)，对蛋白酶敏感，对指示菌细胞有溶解作用。

表 7-32 不同处理对 Plantaricin LP84 活性影响

处 理	对 <i>Bacillus cereus</i> F4810 活性/(×10 ² AU/ml)
加热	10.2
100°C, 10, 15 和 20 min	10.2
121°C, 20 min	10.3
酶	10.2
过氧化物酶	10.2
凝乳酶	Nil
胰蛋白酶	Nil
对照(未处理)	10.3

Plantaricin LP84 在 40°C 有较高活性，30°C 时无活性，在这些方面它和其他 *L. plantarum* 菌产生的细胞素具有不同性质，由 *L. plantarum* LPC010 产生的 Plantaricin S 和 T 在对数期的平衡期产生，而 Plantaricin C19 在生长周期 (培养 4~6 小时) 产生，在 18 小时培养后达到最大值，在平衡期则不产生。Plantaricin C 在平衡期开始其最大值，在生长停止以后保持长期稳定。Plantaricin LC74 在生长 10 小时 (pH4.2) 有最大活性，在 24 小时培养后活性下降；Plantaricin SA6 在起始培养 4 小时活性较弱，在 13 小时活性最高 (对

数期), 22 小时后活性下降 50%。而对于 Plantaricin KW30, 开始培养的 7 小时不产生细菌素, 在 12 小时菌达到平衡期后活性迅速增加, 直至 24 小时活性没有下降。

Plantaricin LP84 可以通过 Sephadex G-25 纯化, 其效果如表 7-33 所示, 冷冻干燥物活性为 2666AU/ml。用凝乳酶和胰蛋白酶处理 *Plantaricin* LP84 失去抑菌活性, 说明它具有蛋白质性质, 目前报道的 Plantaricin 仅有 Plantaricin BN 不受胰蛋白酶、胃蛋白酶和内脏酶的影响, H₂O₂ 不影响 Plantaricin LP84 的活性。

表 7-33 *Plantaricin* LP84 的纯化

材料类型	总体积 /ml	活性 / (AU/ml)	总的单位 / ($\times 10^2$ AU)	蛋白浓度 / (mg/ml)	比活性 / (AU/mg 蛋白质)	纯化/倍数
Concentrated culture supernatant	100	266	266	0.4	665	1
M - A extract	20	1062	212	0.2	5310	8
Purified fractions from Sephadex G-25 (peak I, see Fig. 2)	5	2666	133	0.05	53320	80

Plantaricin LP84 (266AU/ml) 在 37°C 培养 18 小时使 *B. cereus* F4810 完全失活, 其活菌数 $< 1.0 \lg \text{cfu/ml}$, 对 *E. coli* D21 有一般性抑制, 抑制后其活性数为 $5.9 \lg \text{cfu/ml}$ 。对 *Plantaricin* LP84 的抑菌机理研究表明: 这种细菌素对指示菌细胞壁具有溶解作用, 这种溶解作用对于 *B. cereus* 更为明显。*Plantaricin* LP84 对细胞壁的溶解特征不同于早期报道的其他细菌素 *Plantaricin* C、F、和 KW30, 这些细菌素的抑菌机理不包括细胞壁的溶解。

以葡萄糖和酵母浸膏为底物, 可从 *L. plantarum* NCIM 2084 中得到有效量的 *Plantaricin* LP84, 它具有热稳定性、对蛋白酶敏感, 和它具有的广谱抑菌性相结合, 表明它在食品工程中具有良好的生物防腐剂应用前景。

第四节 *L. plantarum* 的生理功能

一、*L. plantarum* 对肠道病原菌的影响

对限制性营养素的竞争能力可能是决定肠道微生物组成的最重要因素, 那些不能有效竞争的种将从这个系统中被清除, Fooks 等 (2002) 就益生菌、益生元对肠道微生物组成的影响进行了研究, 这其中也包括摄入 *L. plantarum* 对肠道菌群的影响。

(一) 益生菌的生长

Lactobacilli 在含葡萄糖作为能源和碳源的培养基中获得最高速的增长, 对于 *Bifidobacteria* 而言 FOS : XOS 混合物使菌有较好的生长, *L. plantarum* 0407 和 *B. Bifidum* Bb12 一般较其他菌生长更快, 这和应用的碳源的种类无关。一般 FOS、XOS 或其混合物能作为额外的碳源被试验菌很好地发酵 (见图 7-36)。各种菌在不同碳源介质中生长 pH 变化情况如表 7-34 所示。

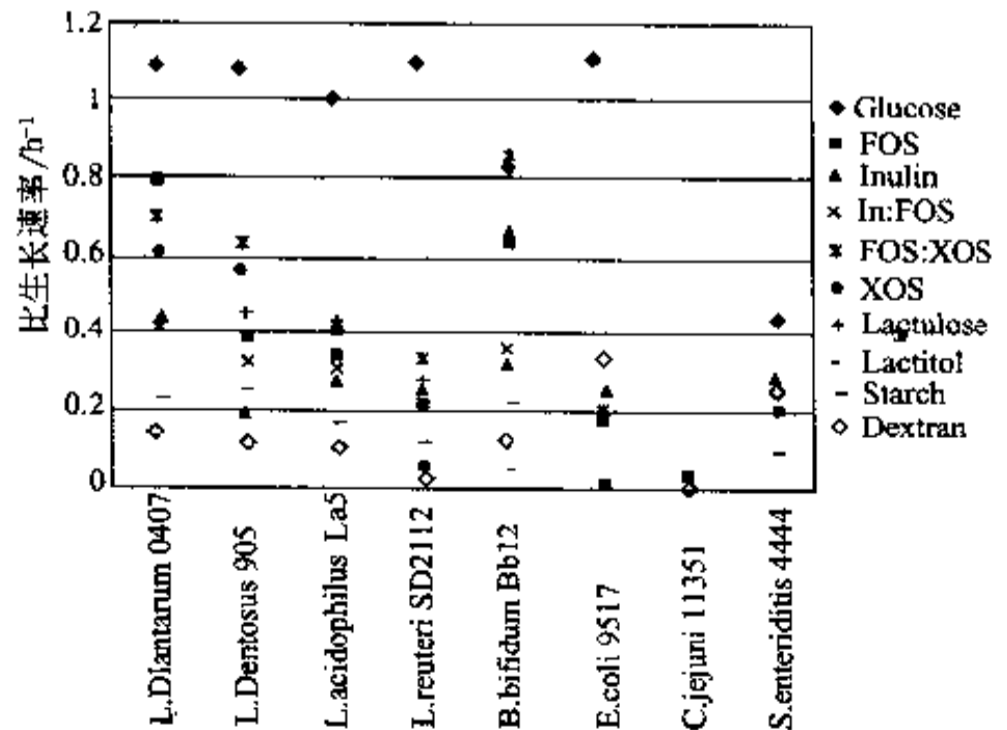


图 7-36 不同碳源情况下益生菌和肠病原菌的生长速率

表 7-34 不同碳源生长的益生菌 (过夜) 上清液部分 pH 的变化

益生菌	FOS	In	In + FOS	XOS	FOS : XOS	Lactulose	Lactitol	Starch	Dextran
<i>L. plantarum</i> 0407	4.29 (±0.05)	4.52 (±0.04)	5.00 (±0.03)	4.92 (±0.02)	4.78 (±0.03)	5.98 (±0.04)	6.55 (±0.05)	6.56 (±0.04)	6.73 (±0.07)
<i>L. pentosus</i> 905	4.35 (±0.08)	4.77 (±0.05)	5.02 (±0.03)	4.83 (±0.09)	4.72 (±0.05)	6.14 (±0.05)	6.39 (±0.04)	6.54 (±0.06)	6.84 (±0.03)
<i>L. acidophilus</i> La5	4.31 (±0.06)	5.10 (±0.02)	5.38 (±0.04)	5.15 (±0.03)	4.63 (±0.07)	6.27 (±0.04)	6.09 (±0.05)	6.33 (±0.08)	6.41 (±0.05)
<i>L. reuteri</i> SD2112	4.54 (±0.03)	5.26 (±0.04)	5.24 (±0.08)	5.85 (±0.06)	4.89 (±0.05)	6.23 (±0.07)	6.86 (±0.02)	6.78 (±0.04)	6.67 (±0.04)
<i>B. Bifidum</i> Bb12	4.27 (±0.02)	4.49 (±0.06)	5.72 (±0.06)	4.47 (±0.03)	4.17 (±0.03)	6.08 (±0.03)	6.11 (±0.04)	6.05 (±0.01)	6.18 (±0.03)

(二) 肠道病原菌的生长

三种测试的病原菌 *E. coli*、*C. jejuni* 和 *S. enteritidis* 在不同碳源中的生长能力如图 7-36 所示。*E. coli* 能在葡萄糖培养基上很好生长, *S. enteritidis* 也能有效利用葡萄糖, 生长速率是 *E. coli* 的 50%。*C. jejuni* 在任何碳水化合物上均不能生长。pH 对病原菌生长的研究表明 (见图 7-37), pH ≤ 3.0 的介质能完全抑制 *E. coli*、*C. jejuni* 生长, *S. enteritidis* 的生长抑制则发生在 pH ≤ 4.0 的情况。

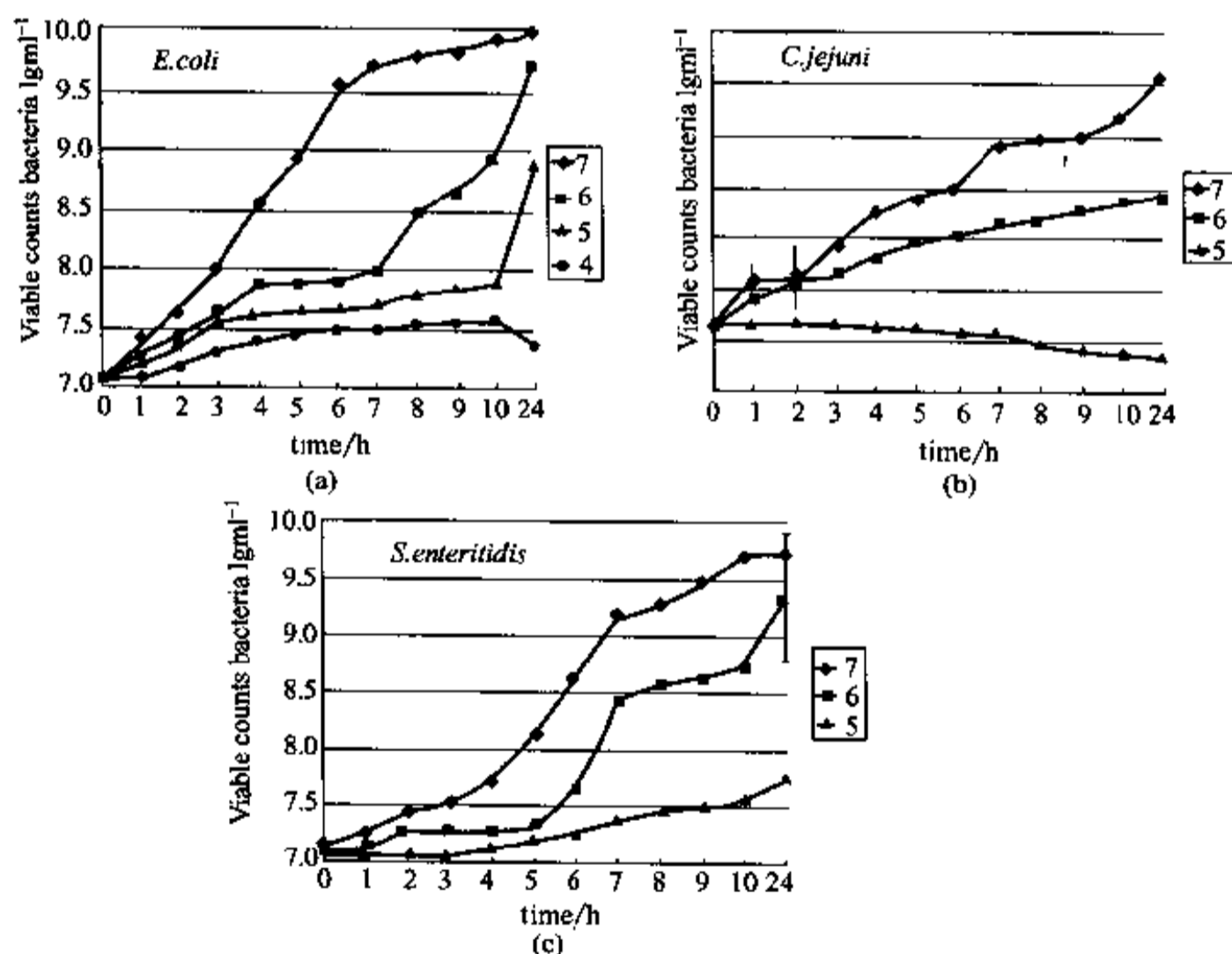


图 7-37 不同 pH 下肠道病原菌的存活

(三) 共同培养试验

L. plantarum 和 *Bifidum* 在所有培养基中的存活情况如表 7-35、表 7-36 所示。*Bifidobacterium Bifidum* 在 FOS 存在时培养 24h 后活菌数增加了 1 个对数周期, 当以 FOS : XOS 混合物为碳源时增加 2 个对数周期。当 *L. plantarum*、*B. Bifidum* 和 *C. jejuni* 一起生长时, 无论应用何种碳源均发现益生菌活体细胞的生长。

表 7-35 *L. plantarum* 0407 在共同培养中对肠道病原菌的抑制

	碳源	菌数、pH 或浓度(0~24h)的变化				
		淀粉	FOX	菊粉·FOS	FOS·XOS	XOS
<i>E. coli</i>	益生菌数	+1.62×10 ⁹ (±1.33×10 ⁹)	+2.14×10 ⁹ (±2.00×10 ⁹)	+1.35×10 ¹⁰ (±2.83×10 ⁹)	+1.40×10 ⁸ (±2.02×10 ⁷)	+9.40×10 ⁸ (±2.11×10 ⁹)
	病原菌数	+4.50×10 ⁹ (±4.33×10 ⁸)	-8.25×10 ⁸ (±2.83×10 ⁷)	+3.27×10 ⁹ (±1.31×10 ⁹)	-2.37×10 ⁷ (±6.66×10 ⁷)	-2.25×10 ⁸ (±1.98×10 ⁷)
	培养物 pH	+0.03(±0.04)	-1.15(±0.06)	-1.02(±0.03)	-1.00(±0.24)	-0.94(±0.22)
	乙酸(mmol/L)	+2.32(±0.33)	+2.24(±0.18)	+2.35(±0.47)	+1.23(±0.04)	+1.20(±0.09)
	乳酸(mmol/L)	+16.64(±2.12)	+25.38(±0.55)	+9.77(±2.02)	+23.06(±0.51)	+17.62(±0.75)
	<i>C. jejuni</i>	益生菌数	+9.98×10 ¹² (±0.00)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)
病原菌数		-1.29×10 ⁷ (±1.78×10 ⁵)	-2.09×10 ⁹ (±0.00)	-1.74×10 ⁹ (±0.00)	-1.30×10 ⁹ (±0.00)	-1.89×10 ⁹ (±0.00)
培养物 pH		-0.41(±0.21)	-2.20(±0.06)	-1.99(±0.14)	-2.33(±0.25)	-2.13(±0.18)
乙酸(mmol/L)		+2.73(±0.33)	+2.26(±0.13)	+2.27(±0.11)	+1.87(±0.30)	+1.92(±0.05)
乳酸(mmol/L)		+17.39(±2.86)	+20.17(±0.41)	+11.37(±1.12)	+21.27(±0.89)	+20.68(±1.29)
<i>S. enteritidis</i>		益生菌数	+1.21×10 ¹⁰ (±7.36×10 ⁹)	+2.15×10 ¹⁰ (±1.70×10 ¹⁰)	+2.20×10 ¹⁰ (±1.48×10 ¹⁰)	+1.76×10 ⁸ (±5.65×10 ⁷)
	病原菌数	+7.42×10 ¹⁰ (±8.08×10 ⁹)	-7.25×10 ¹⁰ (±0.00)	-8.08×10 ⁸ (±2.09×10 ²)	-2.68×10 ⁷ (±1.04×10 ⁷)	-7.15×10 ⁶ (±2.26×10 ⁶)
	培养物 pH	-0.35(±0.04)	+1.79(±0.04)	-1.55(±0.04)	-1.87(±0.08)	-1.43(±0.03)
	乙酸(mmol/L)	+2.58(±0.43)	+0.94(±0.10)	+1.52(±0.22)	+2.04(±0.16)	+1.81(±0.05)
	乳酸(mmol/L)	+11.55(±5.36)	+20.89(±0.70)	+11.06(±1.62)	+20.74(±0.38)	+13.46(±0.33)

表 7-36 *B. Bifidum* Bb12 在共同培养中对肠道病原菌的抑制

	碳源	菌数、pH 或浓度(0~24h)的变化				
		碳源				
		淀粉	FOX	菊粉·FOS	FOS·XOS	XOS
<i>E. coli</i>	益生菌数	+1.69×10 ⁷ (±5.99×10 ⁷)	+1.89×10 ⁹ (±1.20×10 ⁹)	+5.27×10 ⁷ (±3.09×10 ⁷)	+1.26×10 ⁹ (±2.18×10 ⁸)	+2.02×10 ⁸ (±6.78×10 ⁷)
	病原菌数	-2.56×10 ⁸ (±2.61×10 ⁸)	-1.92×10 ⁷ (±6.46×10 ⁶)	-4.80×10 ⁷ (±4.89×10 ⁷)	-1.25×10 ⁸ (±6.13×10 ⁵)	-6.68×10 ⁷ (±4.08×10 ⁷)
	培养物 pH	+0.16(±0.13)	-1.46(±0.09)	-1.02(±0.52)	-0.77(±0.12)	-0.97(±0.21)
	乙酸(mmol/L)	+14.02(±0.57)	+28.39(±1.32)	+22.70(±1.07)	+14.63(±0.47)	+11.15(±1.18)
	乳酸(mmol/L)	+9.05(±1.34)	+12.64(±0.72)	+14.52(±0.53)	+29.11(±2.38)	+18.29(±1.40)
	<i>C. jejuni</i>	益生菌数	+1.00×10 ¹³ (±1.11×10 ⁵)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)	+1.00×10 ¹³ (±0.00)
病原菌数		-1.26×10 ⁸ (±4.92×10 ⁷)	-2.29×10 ⁸ (±1.24×10 ⁹)	-2.38×10 ⁸ (±0.00)	-2.77×10 ⁸ (±0.00)	-2.07×10 ⁸ (±5.03×10 ⁸)
培养物 pH		-0.49(±0.73)	-2.20(±0.18)	-2.06(±0.19)	-2.43(±0.26)	-1.97(±0.51)
乙酸(mmol/L)		+10.82(±1.85)	+25.82(±0.97)	+21.71(±2.05)	+26.19(±1.04)	+15.19(±2.49)
乳酸(mmol/L)		+10.93(±0.92)	+12.82(±1.92)	+14.23(±2.00)	+16.50(±1.28)	+11.01(±1.27)
<i>S. enteritidis</i>		益生菌数	+3.68×10 ⁸ (±0.00)	+1.42×10 ⁹ (±3.91×10 ⁸)	+8.84×10 ⁷ (±5.95×10 ⁷)	+8.75×10 ⁸ (±2.07×10 ⁶)
	病原菌数	-1.66×10 ⁸ (±1.11×10 ⁵)	-1.36×10 ⁹ (±0.00)	-3.19×10 ⁷ (±1.99×10 ⁷)	-1.70×10 ⁹ (±0.00)	-3.05×10 ⁸ (±2.10×10 ⁸)
	培养物 pH	+0.09(±0.16)	-1.59(±0.08)	-1.38(±0.64)	-1.37(±0.13)	-0.95(±0.12)
	乙酸(mmol/L)	+10.65(±1.25)	+21.55(±1.97)	+22.98(±1.23)	+26.26(±3.03)	+12.81(±3.98)
	乳酸(mmol/L)	+11.40(±1.50)	+13.08(±0.25)	+17.12(±2.25)	+17.45(±3.20)	+11.49(±1.62)

L. plantarum 0407 和 FOS 结合能最有效地抑制病原菌的生长, 其中 *E. coli* 有 6 个对数周期的下降, 但 *C. jejuni* 和 *S. enteritidis* 没被完全抑制。*B. Bifidum* 和 FOS : XOS 混合物一起证明是一种有效结合, *C. jejuni* 和 *S. enteritidis* 被完全抑制, *E. coli* 下降了 2 个对数周期。

发酵 24h 后 pH 变化对于 *L. plantarum* 和 *B. Bifidum* 的抑菌活性无重要影响, pH 下降和菌数下降间不存在直接的联系, 发酵 3h 后发生 pH 下降, 但病原菌的降低直到 9~24h 后才能观察到, 且在 XOS 存在情况下 *B. Bifidum* Bb12 和 *E. coli* 一起培养发现 pH 变化, 但没有抗菌活性的证据。

对于 *L. plantarum* 而言乳酸最终浓度的变化依赖于碳源情况。对于 *B. Bifidum* 发酵结束乙酸浓度要高于乳酸水平, FOS 和 FOS : XOS 提高了乙酸量, 在 24h 发酵后达到 20~30mmol/L 的水平。

综上可以得出如下结论: 在不同碳源生长的益生菌 *L. plantarum* 和 *B. Bifidum* 具有抑制 *E. coli*、*Campylobacter jejuni* 和 *Salmonella enteritidis* 的能力, 抑制程度和碳源情况相关。这两种菌能够利用寡聚糖 FOS、菊粉、XOS、菊粉 : FOS (80 : 20W/W) 和 FOS : XOS (50 : 50W/W)。每株菌和选择的碳源结合均大大加强了对肠道病原菌的抑制。发酵过程中产生的乙酸和乳酸参与抑菌作用, 它和培养基 pH 的下降没有直接相关性。

二、*L. plantarum* 对于急性肝脏损伤的治疗作用

急性肝脏损伤是和感染、败血症高发率相关的一种严重临床疾病, 研究表明由 D-半乳糖胺诱导的急性肝损伤引起肠道向肠道以外部位移位。肠道是微生物的主要贮存器, 正常情况下消化道不同部位的区间分隔和系统保护机制防止潜在病原菌通过肠道和胃以外, 这种机理最重要的部分是肠道定殖防御机制、黏膜血流和渗透以及人体免疫防御系统。严重的生理改变可能影响这种机制, 如肠道菌会通过肠黏膜移位; 在 D-半乳糖胺诱导急性肝损伤患者的区域保护机制和 RES 吞噬功能严重的不正常情况下, 会发生肠道菌的移位现象。

肠道厌氧菌尤其是 *Lactobacillus* 在定殖防御和阻止肠道病原菌的过度生长方面具有重要作用。此外 *Lactobacillus* 也具有其他营养和保护作用, 它的毒素去除作用有利于肠道 IgA 分泌和巨噬细胞反应的提高。另一方面 D-半乳糖胺是一种选择性庚糖毒素的主要组成部分, 在它的毒性中内毒素起主要作用, 减少从内脏转移内毒素的速率或保护人体对内毒素没有反应, 能成功防止 D-半乳糖胺摄入后的肝脏损伤。据此原理 Kasiravi 等 (1997) 研究了 *L. plantarum* 和 *L. reuteri* 对肝脏损伤的预防作用, 及它对菌移位、肠黏膜和微生物改变和血清内毒素水平的影响。

他们分别研究了对照组 (CON - DG)、摄入 20% 异构化乳糖 5ml (7 天) (LAC - DG)、摄入 20mg/d 的新霉素 (NEO - DG)、5ml/d *L. reuteri* R2LC ($0.5 \sim 1.0 \times 10^9$ cfu/ml) (REU - DG) 和 5ml/d *L. plantarum* DSM9843 (0.5×10^9 cfu/ml) (PLT - DG), 对 D-半乳糖胺引起急性肝脏损伤鼠的影响。结果发现在 CON - NL、CON - DG 和 LAC - DG 组间, 小肠和十二指肠的微生物量没有差异 (见表 7-37、表 7-38)。用新霉素预处理, *L. plantarum*、*L. reuteri* 能大大降低小肠和结肠中 Enterobacteriaceae 的数量, 新霉素也减少了总的需氧菌的数量, *Lactobacillus* 的强化主要增加了小肠和结肠中 *Lactobacillus* 的数量。

表 7-37 小肠微生物情况 (lg cfu/g, 平均±SEM)

	总的需氧菌	总的厌氧菌	G(-)厌氧菌	Enterobacteria	Lactobacillus
CON-NL	8.1±0.8	8.2±1.1	6.2±0.4	6.9±0.2	7.2±0.5
CON-DG	8.2±1.1	8.7±0.7	6.4±0.7	6.7±0.4	7.1±0.7
LAC-DG	7.8±0.7	8.3±1.1	6.6±0.6	6.4±0.4	7.3±0.8
NEO-DG	7.2±0.7	7.6±0.8	6.3±0.5	4.3±0.7	6.8±0.4
REU-DG	8.6±0.9	8.8±0.7	6.3±0.5	4.8±0.6	8.9±0.7
PLT-DG	8.8±0.7	8.7±0.8	6.3±0.7	5.2±0.3	8.3±0.5

表 7-38 试验组结肠内微生物的状况 (lg cfu/g, 平均±SEM)

	总的需氧菌	总的厌氧菌	G(-)需氧菌	Enterobacteria	Lactobacillus
对照	8.1±1.1	8.7±1.2	7.7±0.5	7.3±0.5	8.0±0.8
CON-DG	8.4±1.2	8.8±1.1	7.5±0.4	7.3±0.8	7.8±0.6
LAC-DG	8.2±1.2	8.3±0.9	7.2±0.8	6.8±1.3	7.5±0.8
NEO-DG	7.1±0.8	8.1±0.9	6.9±0.8	5.1±0.9	6.9±0.9
REU-DG	8.3±1.2	8.8±1.3	7.4±1.0	4.7±0.4	9.1±0.7
PLT-DG	8.5±1.2	8.9±1.2	7.3±0.7	4.3±0.6	9.0±0.7

在所有的 CON - DG 组中小鼠由于 D - 半乳糖胺造成的肝脏损伤而导致菌移位到肝脏和淋巴结 (见表 7-39)。新霉素和异构化乳糖减少了菌向肝脏和淋巴结的移位, 异构化乳糖更为有效。L. plantarum 组仅在肝脏菌的移位方面使菌移位产生显著下降, L. reuteri 组没有显示任何移位速度的减少。菌向血液的移位不存在明显的差异。在所有试验鼠中血清内毒素的水平低于监测值 (<0.25EU/ml)。

表 7-39 实验室微生物的移位 (平均 cfu 单位/ml 血液或 g 组织)

	静脉血液	动脉血液	肾	淋巴结
对照	0/8	0/8	1/8(77/65)	1/8(56/44)
CON-DG	3/8(64/42)	3/8(30/45)	8/8(128/94)	8/8(140/125)
LAC-DG	2/8(42/40)	1/8(51/45)	2/8(118/105)	2/8(135/122)
NEO-DG	3/8(65/72)	2/8(48/53)	4/8(98/84)	4/8(114/108)
REU-DG	2/8(75/68)	3/8(55/71)	6/8(154/135)	6/8(208/184)
PLT-DG	2/8(58/55)	2/8(42/47)	4/8(115/74)	5/8(104/117)

对鼠的黏膜 DNA、RNA 和核苷酸的测定表明: 急性肝脏损伤鼠在小肠内 DNA、RNA 的水平显著性下降 (表 7-40), 口服强化物对小肠或结肠内 RNA 的水平没有任何有益的影响。在小肠 DNA 的水平, L. reuteri 对其明显改善, 但在结肠用 L. reuteri 处理 DNA 水平反而下降。以 DNA/RNA 的比率为指数, Lactobacillus 大大改善了小肠内这一比率, L. reuteri、L. plantarum 和正常对照组其值分别为 1.24、1.30 和 0.73, 在结肠其值分别为 1.12、1.05 和 0.77。

表 7-40 在小肠和大肠内核苷酸、RNA、DNA 的测定

	末端小肠			盲肠		
	核苷酸	RNA	DNA	核苷酸	RNA	DNA
CON-NL(8)	3.75±0.26	8.30±0.64	6.02±0.31	2.96±0.21	7.16±0.40	5.53±0.33
CON-DG(8)	2.84±0.24	6.28±0.47	4.55±0.50	2.67±0.16	6.03±0.52	5.12±0.34
REU-DG(8)	2.47±0.38	5.67±0.45	7.04±0.21	2.53±0.08	5.42±0.63	6.05±0.26
PLT-DG(8)	2.95±0.19	5.14±0.44	6.69±0.21	2.57±0.17	4.81±0.47	5.06±0.37
NEO-DG(8)	3.70±0.38	5.63±0.54	5.34±0.31	4.27±0.61	4.82±0.40	3.97±0.33
LAC-DG(8)	3.85±0.41	5.27±0.61	5.09±0.19	3.64±0.33	4.85±0.65	4.99±0.29

Lactobacillus 是肠道微生物的重要部分, 在定殖防御方面起重要作用。摄入 *L. plantarum* DSM9843 大大减少了微生物向肝脏的移位, 在肝脏损伤后没有发现微生物的变化发生, 故 *Lactobacillus* 的数量影响和它对防御定殖的贡献可能不仅仅局限于防止微生物移位这一单一机制。事实上 *Lactobacilli* 通过不同的机理发挥它的有效作用, 包括免疫调整和促进肠道抗体分泌, 这种影响具有 *Lactobacillus* 种的专一性, 如 *L. casei* 在吞噬活化反应方面具有强烈影响, 也证实肠道 IgA 分泌水平呈该菌的依赖性。Kasiravi 等的实验表明口服 5ml 含菌 1×10^9 cfu/ml 的 *L. reuteri* 和 *L. plantarum* 7 天大大增加了小肠和结肠 *Lactobacilli* 的量, 并使 Enterobacteriaceae 的量下降, 在这方面人和鼠两者没有差异。

综上所述可以看出异构化乳糖在急性肝脏损伤情况下对于内毒素的防止和微生物的移位是最有效的; 新霉素在减少产内毒素革兰氏阴性好氧菌的数量方面是有效的, 但这种作用要弱于异构化乳糖等。*Lactobacilli* 的摄入改善了小肠和盲肠黏膜的繁殖状态, 但对于肝脏损伤的影响程度居中等水平, 且仅有 *L. plantarum* 具有微生物移位的减少作用。

三、*L. plantarum* 对生氰糖苷的降解作用

食品和饲料中应用的植物性原料常含有毒性和抗营养化合物, 如生物碱、非蛋白氨基酸和不同的毒性糖苷, 生氰糖苷在大多数植物中存在。亚麻子中含有 Linustatin 和 Neolinustatin, 木薯中含有亚麻杏苷, 杏中含有苦杏仁苷。这些化合物的摄入会引起急性或慢性中毒, 故许多加工方法试图水解或去除这些化合物, 这包括传统方法和工业方法。传统方法采用有氧和厌氧自动发酵的方法, 如世界范围内广泛应用的发酵木薯产品。

Lei 等 (1999) 研究了 *L. plantarum* 降解生氰糖苷的情况, 这为应用 *L. plantarum* 降解各种植物中的毒性物质, 开发具有健康性质的产品奠定了基础。

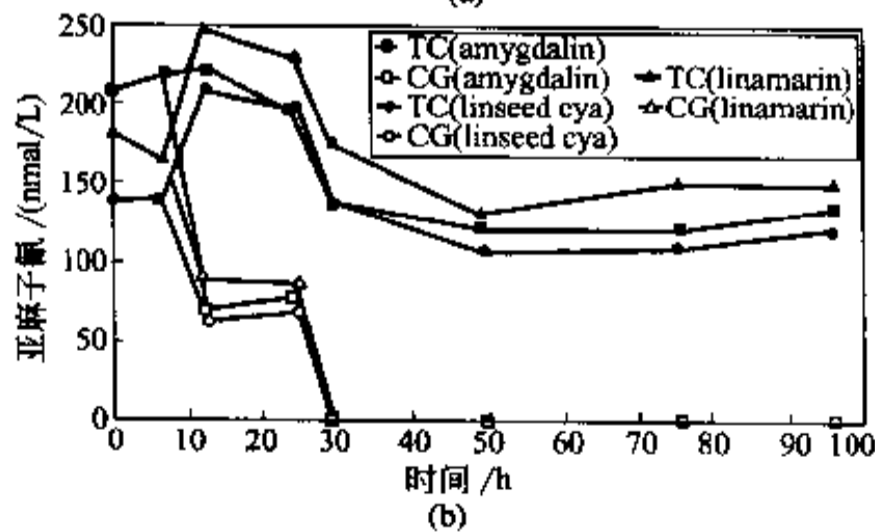
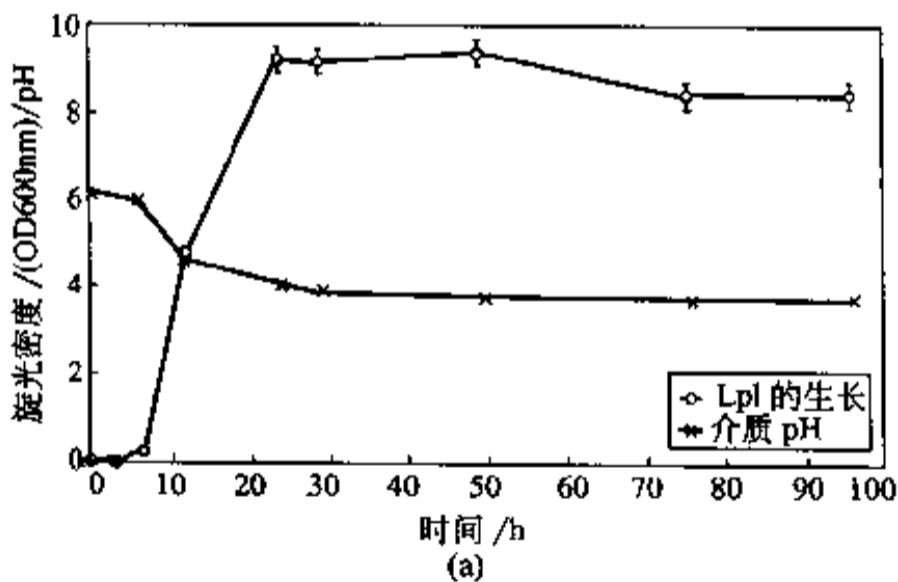


图 7-38 发酵过程中 *L. plantarum* LP1 的生长和 pH 变化 (a) 发酵过程中总的氰浓度和生氰糖苷浓度变化 (b)

(一) *L. plantarum* 的 β -葡萄糖苷酶活性

不同的 *L. plantarum* 菌株有相似的酶的分布, LP7 较其他菌有相对低的酶活性, 对于 β -葡萄糖苷酶而言 LP1、LP2、LP3、LP5、LP6 和 LP11 有相对高的酶活性, LP7 无该酶活性。

(二) 生氰糖苷的降解

L. plantarum 在有无生氰糖苷条件下的生长和 pH 变化情况如图 7-38 所示, 它降解生氰糖苷的能力也在图中表现出来。*L. plantarum* LP1 的生长不受生氰糖苷的影响, 其发酵 pH 在整个培养过程中降低, 最终 pH3.8。生氰糖苷、苦杏仁苷、亚麻苦苷和亚麻子氰在发酵的 29h 内完全降解, 生氰糖苷的最快降解发生在发酵的 8~11h 之间。

其他菌株的生长和 *L. plantarum* LP1 类似, 菌株 LP2、LP5、LP6 和 LP11 能够降解和 LP1 相同浓度的糖苷。相反地 LP3

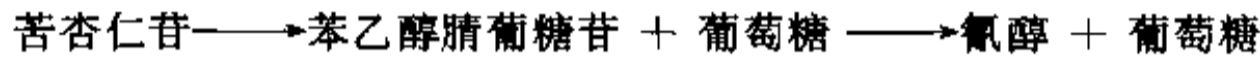
仅能在 96h 内才能完全降解生氰糖苷，LP7 没有生氰糖苷降解活性。测试的 *L. mesenteroides* 有较 *L. plantarum* 低的生长，无任何降解生氰糖苷的活性。

用 *L. plantarum* LP5 和 *C. tropicalis* 644 共同培养时，发现生长曲线和单株菌生长相似，pH 也和 LP5 单独发酵一样下降至 3.9，混合物发酵物降解苦杏仁苷和亚麻子氰要在 25h 发酵才能完成，效果和 LP5 单独发酵相同，但对亚麻苦杏仁能在 14h 内完全降解，说明在酵母和 LAB 间对生氰糖苷的降解具有协同作用。

(三) *L. plantarum* LP1 的 β -葡萄糖苷酶活性

β -葡萄糖苷酶是 *L. plantarum* LP1 的胞内酶。它对不同生氰糖苷如苦杏仁苷、苯乙醇腈葡萄糖苷、亚麻苦杏仁和亚麻子氰的活性谱如表 7-42 所示。结果发现它对苯乙醇腈葡萄糖苷有最高活性，其次为亚麻苦杏仁。当苦杏仁苷在介质中存在时 β -葡萄糖苷酶活性没有变化，说明它没有该酶的诱导作用。

苦杏仁苷被 LP1 细胞分两步降解：



因此苯乙醇腈葡萄糖苷是在发酵过程中形成。

在 pH=5.5~7.0 时，该酶表现出对 4 种底物降解的最大值， β -葡萄糖苷酶的最适温度是 35℃。

表 7-41 *L. plantarum* LP1 对不同底物的水解活性

生长介质	<i>L. plantarum</i> LP1 的酶活性(U/ml 细胞悬浮液)			
	底物			
	苦杏仁苷	苯乙醇腈葡萄糖苷	亚麻苦杏仁	亚麻子氰
MRS	0.019(0.022)	0.044(0.052)	0.037	0.016(0.019) ^c
MRS + amygdalin	0.016	0.044	0.027	0.019

(四) 亚麻子的脱毒

在人工介质中 *L. plantarum* 能够降解生氰苷，其目的是希望它作为食品发酵剂时具有降解生氰糖苷的能力，如亚麻子中亚麻苦杏仁的降解。

从降解情况看，*L. plantarum* 作为发酵剂能够降解亚麻子中的生氰糖苷，最快的降解发生在发酵 40min 以后（见图 7-39）。

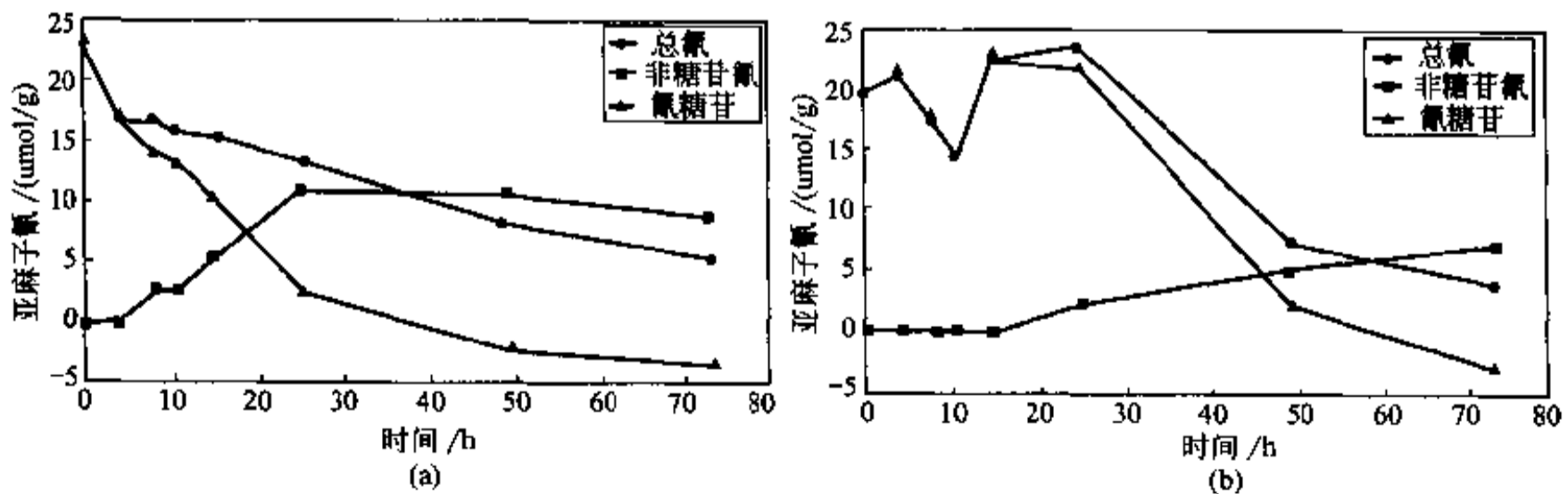


图 7-39 (a) 总的氰浓度 (TC)、非糖苷氰 (氰醇+HCN) 和生氰糖苷 (CG)
(用 10^7 cfu/g *L. plantarum* 培养)

(b) 上述物质无接种物条件发酵

综上所述可以看出 *L. plantarum* 的 7 株菌具有不同的 β -葡萄糖苷酶活性，故导致其降解生氰糖苷的能力有所不同，*L. plantarum* 和 *C. tropicalis* 共同发酵能更好地降解亚麻苦苷。*L. plantarum* LP1 具有脑内 β -葡萄糖苷酶活性，它分解苦杏仁苷分两步进行；①苦杏仁苷变为苯乙醇腈葡萄糖苷；②苯乙醇腈葡萄糖苷变为氰醇。用 *L. plantarum* 作为发酵菌能降解亚麻子中的糖苷物质。

第五节 *L. plantarum* 在食品中的应用

一、*L. plantarum* 在发酵调味品 (Tempoyak) 中的应用

榴莲是东南亚地区的重要水果之一，由于它贮存期较短故将其加工成发酵产品以便可在其他季节对其食用，Tempoyak 就是其中最重要的一种，它是通过发酵榴莲水果果实而制成。产品有酸咸味，且以酸味为主要风味。Tempoyak 作为鱼和蔬菜的调味料食用。结籽的榴莲和少量盐混合在密封容器中于室温发酵 4~7 天，最终酸度为 3.6%，pH3.8~4.6，最主要的酸性成分为乙酸。榴莲中 15%~20% 的糖分支持乳酸菌和酵母菌生长，低盐 (1.3%) 也有利于二者生长。Leisner 等在 2001 年研究了 Tempoyak 中乳酸菌的分布情况，这为更进一步加工优质的 Tempoyak 产品提供了理论依据。

马来西亚的 Tempoyak 含有高水平的乳酸菌，一般范围为 $8.5 \sim 9.2 \lg \text{cfu}$ (见表 7-42)，乳酸菌构成了最终产品中的优势菌。所有菌的分离物呈革兰氏阳性，过氧化物酶

表 7-42 SDS-PAGE 和 API50CH 对 Tempoyak 产品菌的确认

组	产品代号	菌 株	SDS-PAGE 确认	API50CH 确认
同型发酵菌	组 A	19184, 19185, 19187, 19189	Lb. plantarum group	Lb. plantarum
	B1	MA2 ^C , MA6, MA8, MA13, MA14, MA16, MA17	Not done	Not done
	I B1	19218, 19220, 19221, 19222	Lb. plantarum group	Lb. plantarum
	B2	MB6, MB7, MB16	Not done	Not done
	B2	19211, 19212, 19214, 19219	Lb. plantarum group	Lb. plantarum
	B2	19213	Lb. plantarum group	Lb. plantarum/Lb. pentosus
	C1	MC1, MC4, MC7, MC9, MC12, MC14, MC15, MC18	Not done	Not done
	C1	19201, 19205, 19206, 19210	Lb. plantarum group	Lb. plantarum
	C2	MD3, MD7, MD8, MD12, MD15, MD16, MD17, MD18	Not done	Not done
	C2	19200, 19202, 19204, 19207	Lb. plantarum group	Lb. plantarum
	组 II C1	19193, 19196	Not identified	Not identified
	C2	19195	Not identified	Not identified
	组 III B2	19208	Lb. plantarum group	Not identified
C2	19194	Lb. mali	Not identified	
异型发酵菌	组 A	19186	Lb. brevis group	Lb. brevis/ Lb. collinoides
	IV	19188	Lb. brevis group	Lb. brevis
		19190	Lb. brevis group	Not identified
		19191	Lb. brevis group	Lb. brevis/ Lb. collinoides
		B1	19192	Lb. brevis group
	B1	19216, 19217	Lb. brevis group	Lb. brevis
	B2	19215	Lb. brevis group	Lb. brevis
	B2	19197	Lb. fermentum	Not identified
	组 C1	19199	Leuconostoc Mesenteroides group	Lb. brevis
	V	19203	Ln. mesenteroides group	Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides/ dextranicum
		19209	Ln. mesenteroides group	Not identified

阴性、无芽孢，仅有一个无运动性。经确认 Tempoyak 中的主要微生物为：*L. plantarum* 组为主要优势菌，主要包括 *L. plantarum*、*L. pentosus* 和 *L. paraplantarum*；此外还有 *L. brevis* 组菌，主要包括 *Leuconostoc mesenteroides*、*L. mali*、*L. fermentum* 和其他未鉴定的 *Lactobacillus spp.*

L. plantarum、*L. brevis* 和 *Leuconostoc mesenteroides* 在许多酸发酵性植物食品中的作用已广泛认知，如对于泡菜、黄瓜和朝鲜辣泡菜，故在发酵榴莲中确认有这些菌存在也是正常的，在泡菜中起始发酵主要靠 *L. mesenteroides*，后被异型发酵 *Lactobacilli* 代替，如 *L. brevis*，最主要的是耐酸性的异型发酵菌 *L. plantarum*。植物性食品木薯中也发现类似的发酵规律。在 Tempoyak 中也发现最终产品中 *L. plantarum* 成为优势菌。

最终产品的 pH 为 4.0~4.2。要获得高酸度的 Tempoyak 产品只能依赖于乳酸菌或醋酸菌发酵，在 Tempoyak 中存在较高量的 D-乳酸和 L-乳酸，灭菌的榴莲产品中乳酸含量较低，这可能是源于乳酸菌的发酵。*L. plantarum* 和产生乳酸的异构体，产品中存在的乙酸是 LAB 异型发酵的结果，在 Tempoyak 产品中发酵的乙醇也可能源于 LAB 的异型发酵，也可能是酵母产生。碳水化合物组成分析表明榴莲中的葡萄糖、果糖或果糖元、蔗糖均可作为发酵菌的底物。

二、在 Almagro 茄子发酵过程中 *L. plantarum* 的作用

Almagro 茄于是西班牙 Almagro 镇及其周边地区广泛食用的一种酸性食物，发酵前茄子被加工，置于塑料容器中，加盐后进行自然发酵，一般在环境温度发酵 7 天。Palop 研究了这种自然发酵的微生物状况，其中 *L. plantarum* 在发酵中起非常关键的作用。

(一) 微生物的数量变化

图 7-40 代表了整个发酵过程中微生物和 pH 变化情况。乳酸菌起始时数量较低 (10^3 cfu/ml)，但在几小时内迅速上升，在 48 小时发酵后达 10^8 cfu/ml，尔后保持这一水平直至发酵结束。好氧嗜温菌的变化和乳酸呈平行关系，直至发酵 4 天后其值才高于乳酸菌。pH 的变化较小，从开始 pH=3.8 到 2 天发酵后的 pH=4.0，这是茄子和盐液间交换的结果，pH 的峰值伴随着菌数最高值的同时发生，尔后 pH 下降为 3.9，一直保持不变。盐液的缓冲作用防止了 pH 的迅速下降，这有利于发酵时间的延长，可去除产品中的碳水化合物，不至于在发酵后期微生物的生长受到抑制。

(二) 分离微生物的鉴定

从天然发酵 Almagro 茄子中分离的乳酸菌的生物化学和生理特征如表 7-43 所示。在天然发酵过程中乳酸菌的变化情况如图 7-41 所示，乳酸菌在整个发酵过程的生长分为两个阶

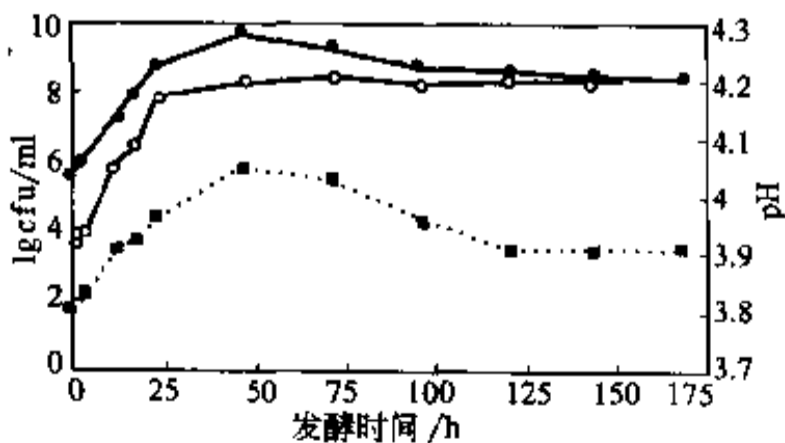


图 7-40 在茄子发酵过程中微生物和 pH 的变化
○—乳酸菌；●—好氧嗜温菌；■—pH

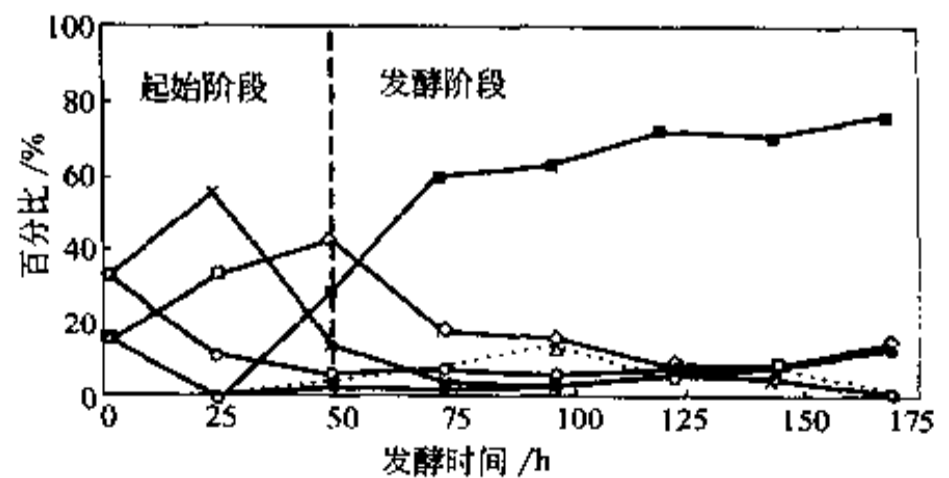


图 7-41 在 Almagro 茄子自动发酵时 *Lactobacillus* 的变化

表 7-43 代表菌株碳水化合物的发酵特征

亚组 分离物号	A 4	B 6	C 2	D 2	E 5	F 2	亚组 分离物号	A 4	B 6	C 2	D 2	E 5	F 2
甘油	-	-	+	-	-	-	水杨苷	+	+	+	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	-	+	+	+	-	纤维二糖	+	+	+	-	-	-
D-木糖	-	-	+	+	80	+	乳糖	+	+	+	-	-	+
半乳糖	+	+	+	d	+	+	蜜二糖	+	+	+	+ r	+	50
D-甘露糖	+	+	+	-	-	-	蔗糖	+	+	+	-	+	+
鼠李糖	d	17	d	-	-	-	海藻糖	+	+	+	-	40	-
甘露醇	+	+	+	-	-	-	菊粉	-	-	-	-	-	-
山梨醇	+	+	+	-	-	-	松三糖	+	-	-	-	-	-
α-甲基-D-葡萄糖苷	-	17	+	+	-	-	棉子糖	75	67	+	-	+	-
N-乙酰葡萄糖胺	+	+	+	+	-	-	β-龙胆二糖	+	+	+	-	-	-
苦杏仁苷	+	+	+	-	-	-	D-松二糖	+	+	+	-	-	-
熊果糖	+	+	+	-	20	-	D-阿拉伯醇	75	50	+	-	-	-
七叶苷	+	+	+	-	-	-	5-ceto-葡萄糖酸盐	-	-	-	+	+	+

段，起始阶段异型发酵的 *L. fermentum* 和 *L. brevis* 占优势，在第 2 天出现 *L. fermentum* 的峰值，接下来更多的糖发酵发生。兼性异性发酵的 *L. plantarum* 在 25 小时发酵后不断上升，2 天后成为优势菌。

Tamang 等 (1996) 在竹笋的发酵时发现了类似的结果。*L. plantarum* 的高盐耐受性和对底物较好地利用能力可能说明为什么它成为最终产品中的优势菌。和橄榄、泡菜、黄瓜的发酵不同，竹笋发酵时 *Lactobacillus*、*Pediococcus* 和 *Leuconostoc* 全部参与。在茄子发酵时菌种的差异性相对较小，起始的低 pH 抑制了 *Pediococcus* 和 *Leuconostoc* 的生长，因为它们仅能分别耐受 pH=4.0 和 4.5 的酸度，而 *Lactobacillus* 有较强耐酸性，pH=3.8 仍能生长。此外发酵相对的高温，也是 *Leuconostoc* 不能生长的另一原因，它倾向于 8~18℃ 的发酵中占优势。

三、乳酸菌对泡菜中胺形成的影响

由甘蓝制备的泡菜是许多欧洲国家的常见食品，对这类产品的 121 个样品的分析结果表明：常有胺的存在，如酪胺和腐胺的水平常达 mg/kg 级水平。这些胺主要通过微生物对氨基酸的脱羧作用形成，单胺类的组胺、酪氨、色胺主要来自组氨酸、酪氨酸和色氨酸；类似腐胺和尸胺的二胺类物质主要来自鸟氨酸和赖氨酸，腐胺是多胺、精胺形成的前提物质。

人体在摄入正常量的胺类后可通过单胺氧化酶 (MAO) 和二胺氧化酶在肠道内通过脱毒作用有效地加以去除，脱毒效率在个体间存在差异，也可能被许多因素抑制，主要是许多 MAO 抑制剂的摄入。从食品中过量摄入胺会引起不良反应，故采用科学方法生产泡菜，尽量降低产品中胺的含量，一直是人们所期望的。Kalac 等 (2000) 以 *L. plantarum* 等为发酵菌生产泡菜，有效地降低了产品中胺的含量，取得了令人满意的实验结果。

Kalac 等 (2000) 测定的胺浓度和泡菜参数如表 7-44、表 7-45、表 7-46 所示。没有测定到其他乙醇和挥发性脂肪酸的存在。酪胺 (TY)、腐胺 (PUT) 和尸胺 (CAD) 是泡菜的优势类胺，接种物对它们形成的影响见图 8-42。四种胺中组胺 (HI)、酪胺 (TR)、SPD 和精胺 (SPM) 的浓度低于 10mg/kg，许多样品无法检出，故它们的不利影响基本可以忽略，对它们不再考虑。

表 7-44 在 6 个月贮存后胺浓度和泡菜质量参数 (样品 1)

参 数	对照	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecium</i>	Microsil
胺/(mg/kg)						
酪胺	212	95.7	105	116	92.7	96.9
腐胺	446	12.5	391	286	295	82.5
尸胺	122	11.8	78.4	79.6	75.7	26.3
组胺	2.7	1.4	1.6	2.3	7.0	0.8
色胺	6.6	1.6	2.2	3.2	2.8	3.9
精胺	14.6	4.9	7.7	7.1	7.6	11.0
亚精胺	ND	1.6	2.0	2.3	1.0	1.1
pH	3.51	3.49	3.51	3.55	3.50	3.48
总酸度	1010	790	895	805	920	800
乳酸/%	1.76	1.59	1.74	1.71	1.70	1.58
乙酸/%	0.48	0.22	0.38	0.33	0.44	0.33
α -氨基因/(mg/100g)	54	37	60	61	51	46
胺/(mg/100g)	33	18	30	27	31	21
乙醇/%	0.47	0.98	0.67	0.92	0.55	0.20

表 7-45 在 6 个月贮存后胺浓度和泡菜质量参数 (样品 2)

参 数	对照	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecium</i>	Microsil
胺/(mg/kg)						
酪胺	108	31.6	85.9	100	107	29.5
腐胺	327	8.7	175	165	421	8.3
尸胺	59.4	7.3	36.2	16.9	80.0	3.3
组胺	4.8	2.0	0.6	1.3	3.0	1.0
色胺	4.3	13.2	8.5	8.4	5.4	28.4
精胺	8.6	5.8	6.9	6.0	8.4	5.7
亚精胺	2.5	1.2	1.7	1.7	ND	ND
pH	3.49	3.42	3.39	3.43	3.55	3.42
总酸度	860	725	880	790	935	790
乳酸/%	2.04	2.11	2.26	2.20	2.14	2.14
乙酸/%	0.46	0.19	0.38	0.29	0.46	0.29
α -氨基因/(mg/100g)	70	42	55	56	57	39
胺/(mg/100g)	31	18	31	25	28	17
乙醇/%	0.41	0.11	0.12	1.00	0.64	0.12

表 7-46 在 6 个月贮存后胺浓度和泡菜质量参数 (样品 3)

参 数	对照	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecium</i>	Microsil
胺/(mg/kg)						
酪胺	84.3	52.2	122	114	93.0	70.1
腐胺	265	4.0	315	329	418	36.2
尸胺	97.5	4.7	129	97.3	107	68.4
组胺	1.0	1.1	0.6	2.2	2.7	2.4
色胺	2.6	2.4	4.7	1.2	3.1	4.5
精胺	9.4	3.6	13.8	7.8	15.6	9.4
亚精胺	ND	ND	1.8	1.5	ND	2.1
pH	3.59	3.53	3.61	3.62	3.59	3.55
总酸度	690	610	715	665	750	660
乳酸/%	2.03	2.01	2.06	2.10	2.08	2.01
乙酸/%	0.46	0.27	0.43	0.34	0.45	0.33
α -氨基因/(mg/100g)	65	47	78	71	74	51
胺/(mg/100g)	34	23	38	35	37	24
乙醇/%	0.21	0.13	0.24	0.61	0.56	0.11

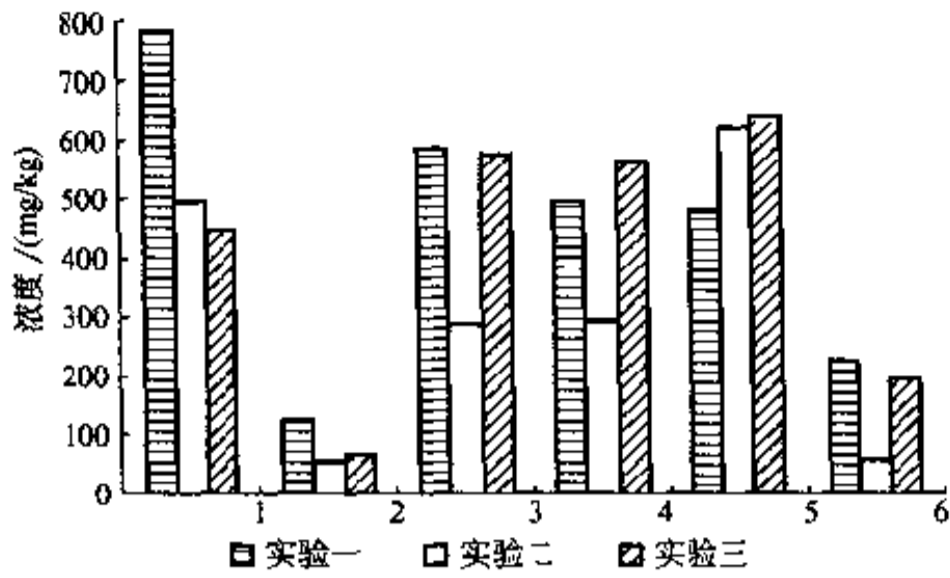


图 7-42 在三个实验中酪胺、腐胺和尸胺浓度
1-对照组; 2-*L. plantarum*; 3-*L. casei*; 4-*P. pentosaceus*;
5-*E. faecium*; 6-*Microsil*

在室温下保存 2 年, 产品的低 pH 保持了对 *Clostridium botulinum* 的抑制, Castro 等 (1998) 应用 *L. plantarum* 发酵热烫大蒜生产该产品, 这是 *L. plantarum* 在传统产品生产中的一个典型例子。

(一) 发酵情况

对于漂烫和未漂烫大蒜在 1~7 天的发酵过程中 (盐溶液) pH 变化和微生物生长情况如图 7-43 所示。Enterobacteriaceae 生长较少, 在发酵的第 5 天没有测定到, 漂烫和未漂烫大蒜均是如此。对于漂烫大蒜, 培养导致乳酸菌生长; 但未漂烫大蒜不仅接种 *L. plantarum* 的生长受到抑制, 而且盐水中从第 5 天起 *L. plantarum* 的细胞数量有明显下降。已有报道大蒜提取物浓度 > 1% 能抑制 *L. plantarum* 的生长, 当浓度 > 2% 表现出强抑菌活性。漂烫可能破坏了大蒜中存在的抑菌物质。7 天的发酵过程中均未发现酵母和霉菌的生长抑制作用。

在漂烫大蒜中由于 *L. plantarum* 生长, 盐水的 pH 逐渐下降, 在 7 天时达到 pH = 3.77; 未漂烫大蒜, 在起始时 pH 下降, 但由于 *L. plantarum* 的生长受到抑制, pH 开始上升。

在漂烫大蒜中底物的代谢情况如表 7-47 所示, 蔗糖、果糖和柠檬酸在 7 天的发酵后保持不变, 乳酸是主要的产物, 每发酵 1mmol/L 己糖平均产生 2.4mmol/L 乳酸。乙酸的产生完全来自 *L. plantarum* 对柠檬酸的水解, 柠檬酸降解最主要的产物是乙酸和过氧乙酸, 后者进一步转化为乙酸, 也有少量乙偶姻、二乙酰等产生。发酵后平均碳的回收率为 108%, 大蒜的颜色和硬度没有变化。

对于未漂烫大蒜而言, 底物没有消耗, 只产生少量的乳酸和乙酸, 但果糖和乙醇的量有较大增加, 果糖和乙醇也在含 2.01% 蛋氨酸盐溶液 (5% W/W) 抑制微生物生长的平衡实验中被发现, 这表明它们的生成主要是大蒜呼吸作用的结果。乙偶姻、二乙酰和 2,3-丁二醇也被少量测定到 (<5% mmol/L)。整个产品一直呈绿色, 长期贮存变为白色或褐色。

泡菜接种 *L. plantarum* 或 *Microsil*, TY, PUT 和 CAP 有相对低的浓度, 乙酸、胺和 α -氨基物质比其他产品低, 故这两种接种物对于改善泡菜质量是有效的。胺在产品中量下降的重要原因是泡菜生产过程中产胺微生物污染的防止, 不产胺的接种菌也对污染菌有竞争性抑制作用。

四、大蒜的 *L. plantarum* 发酵和贮存

近年来不同的西班牙公司上市了大蒜丁香的产品, 商品化产品的 pH 2.87~4.14, 盐含量 0.2%~12.5%, 它们可在

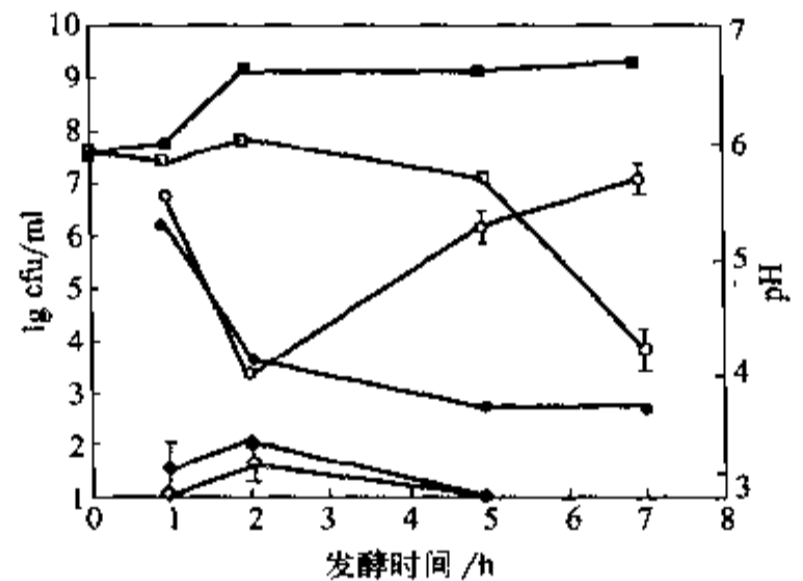


图 7-43 在盐溶液中漂烫和未漂烫大蒜 pH 和菌变化情况
Enterobacteriaceae (●, ○); 乳酸菌 (■, □);
pH (●, ○)

表 7-47 在 7 天发酵后底物的利用和形成的产物

项 目	漂烫大蒜		未漂烫大蒜		项 目	漂烫大蒜		未漂烫大蒜	
	B1	B2	U1	U2		B1	B2	U1	U2
剩余底物/(mmol/L)					乳酸	120.9	106.0	20.2	17.2
蔗糖	6.2	4.5	23.3	25.3	乙酸	23.5	22.3	4.5	4.7
果糖	6.2	4.4	50.4	49.2	乙醇	N.D	N.D	73.5	81.5
葡萄糖	N.D	N.D	4.4	6.8	二乙酰	0.2	0.2	0.3	0.3
柠檬酸	8.5	7.7	22.7	24.0	偶氮烟	1.8	1.8	2.7	3.2
形成的产物/(mmol/L)					2,3-丁二醇	0.2	0.1	0.3	0.5

(二) *L. plantarum* 发酵漂烫大蒜的贮存

发酵的漂烫大蒜需经杀菌以确保产品的稳定性。在 *L. plantarum* 发酵的漂烫大蒜产品贮存过程中没有菌的生长，这归因于低 pH 的保护作用，它抑制了 *L. plantarum* 的生长，同时也抑制了酵母和霉菌的生长。

表 7-48 是杀菌产品贮存 5 天和 3 个月后的化学特征、颜色和硬度情况，发酵和非发酵产品特征上没有重要不同，除葡萄糖、果糖和蔗糖外，还测定到果糖原的存在，在发酵产品和未发酵产品中随葡萄糖、果糖和蔗糖的同时增加，果糖原大大降低，表明贮存过程中果糖水解为单糖和二糖，这可能是酸性环境所致。贮存过程产品颜色不变，硬度稍有下降，发酵产品更为明显，存放 3 个月后产品风味没有重要变化。

表 7-48 在 30℃ 贮存产品感官和理化指标变化情况

项 目	发酵漂烫大蒜		非发酵漂烫大蒜		项 目	发酵漂烫大蒜		非发酵漂烫大蒜	
	5 天	3 月	5 天	3 月		5 天	3 月	5 天	3 月
化学特征					乳酸/(mmol/L)	74.4	75.5	43.3	47.8
pH	3.48	3.52	3.96	3.95	乙酸/(mmol/L)	96.7	98.3	65.0	66.7
酸度/(乳酸%)	1.58	1.66	1.43	1.48	颜色				
NaCl(%)	2.9	2.9	2.9	2.8	L	69.9	68.7	70.4	67.9
蔗糖/(mmol/L)	3.8	7.6	24.6	24.8	a	-2.9	-2.5	-3.5	-2.8
果糖/(mmol/L)	15.0	164.4	13.9	155.5	b	9.8	11.8	11.4	16.8
葡萄糖/(mmol/L)	N.D ^a	9.4	4.4	13.9	硬度	16.5	11.0	20.8	19.5
柠檬酸/(mmol/L)	5.2	5.2	18.2	19.3					

应用 *L. plantarum* 发酵剂可以对漂烫大蒜进行发酵，产品的风味感官质量良好，且在 3 个月贮存时理化微生物及感官指标稳定。

五、*L. plantarum* 发酵燕麦饮料

Johnsson 等 (1998) 应用 *L. plantarum* 发酵的含燕麦蔷薇果饮料，其摄入能够降低人粪便中短链脂肪酸 (SCF) 的含量，同时对粪便 pH 和微生物产生影响。这种产品已在瑞典和芬兰以 Proviva 商标的形式上市。

(一) 对粪便的 SCF、总脂肪酸和干物质

在摄入 *L. plantarum* 发酵的产品后，粪便中总的羧酸 (CA) 含量，尤其是乙酸、丙酸和乳酸的量增加 (见表 7-49)。在摄入 1 周和 3 周后 CA 的总浓度上升，在摄入 3 周后乙酸和丙酸浓度上升，在摄入结束 8 天后丙酸量仍保持上升趋势；在对照组乳酸的浓度也明显增加 (不含菌产品)，CA 的量没有重要变化。

在粪便中 CA 的增加不改变粪便的 pH，在摄入后对照组和实验组粪便干重明显增加，

表 7-49 CA 和 SCF 的含量 (RHL-测试产品, RH-对照产品)

项 目	平均粪便 CAS 的量/($\mu\text{mol/g}$ 湿粪便)			
	摄入前	摄入 1 周后	摄入 3 周后	停止摄入 1 周后
总的 CA				
RHL 组	83(34-134)	94(44-173)	113(45-437)	95(36-171)
RH 组	93(35-217)	99(33-177)	97(40-177)	105(41-218)
乙酸				
RHL 组	48(21-73)	54(32-105)	64(28-216)	56(24-101)
RH 组	57(26-138)	57(19-102)	56(23-91)	64(29-132)
丙酸				
RHL 组	11(3-21)	12(4-29)	17(4-91)	14(3-42)
RH 组	14(3-37)	14(2-41)	14(5-28)	16(6-37)
丁酸				
RHL 组	11(1-38)	9(1-21)	10(3-27)	12(2-35)
RH 组	10(1-35)	9(1-21)	9(1-29)	10(1-31)
乳酸				
RHL 组	5(2-10)	12(4-43)	11(2-28)	6(3-15)
RH 组	5(2-12)	12(4-36)	11(4-28)	8(3-41)

在摄入含 *L. plantarum* 的产品停止 8 天后, 干重仍有明显增加。在粪便干重增加和 CA 浓度增加间没有关系存在。

(二) 粪便菌群组成的影响

在摄入含 *L. plantarum* DSM 9843 的饮料 1~3 周后, 在粪便中发现大量 *L. plantarum* DSM 9843 存在, 在 1 周摄入后粪便中 *L. plantarum* DSM 9843 的平均值为 7.0lgcfu/g, 3 周后为 6.7lgcfu/g, 在摄入停止 8 天后仍有 5 天粪便中发现有 *L. plantarum* DSM 9843 存在。

蔷薇果饮料的摄入大大增加了粪便中 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的数量, 在实验组中 *Clostridia* 的量迅速下降, 对照组 3 周摄入后也有下降, 厌氧菌或总的好氧菌的总量没有变化, 在摄入停止后 8 天对照组中总的好氧菌量明显下降 (见表 7-50)。

表 7-50 摄入产品粪便中微生物的变化

项 目	平均菌数/lgcfu/g 粪便			
	摄入前	摄入 1 周后	摄入 3 周后	停止摄入 1 周后
<i>L. plantarum</i> DSM 9843				
RHL 组	< 4.5	7.0(5.0~8.8)	6.7(5.0~8.9)	
RH 组	< 4.5	< 4.5	< 4.5	< 4.5
<i>Lactobacilli</i>				
RHL 组	8.6(4.8~9.5)	9.0(6.7~9.9)	9.0(6.5~9.5)	8.6(5.6~9.7)
RH 组	8.6(4.0~9.3)	9.0(5.0~9.5)	8.9(4.6~9.7)	8.9(6.3~9.9)
<i>Bifidobacteria</i>				
RHL 组	5.3(4.5~9.9)	7.8(4.8~9.3)	8.0(4.9~9.3)	5.9(4.8~8.7)
RH 组	5.0(4.8~9.6)	8.0(4.7~9.3)	7.3(4.8~8.8)	5.8(4.7~9.3)
<i>Clostridia</i>				
RHL 组	6.7(4.7~7.7)	5.6(4.5~7.6)	5.0(4.8~7.8)	5.8(4.8~7.8)
RH 组	6.0(4.9~7.6)	6.6(4.7~7.8)	5.0(4.6~7.5)	6.2(4.7~8.0)
厌氧菌				
RHL 组	10.0(9.0~10.8)	9.8(8.9~11.8)	9.8(9.3~10.3)	9.8(8.7~10.3)
RH 组	10.0(8.8~10.9)	10.0(9.3~10.3)	9.8(9.0~10.5)	9.9(8.3~10.8)
需氧菌				
RHL 组	7.9(6.8~9.6)	7.9(6.0~9.5)	7.8(6.3~9.8)	7.7(5.8~9.3)
RH 组	7.7(5.9~9.9)	7.6(5.9~9.0)	7.3(6.0~9.3)	6.8(6.0~9.7)
革兰氏阴性菌				
RHL 组	9.7(8.6~10.9)	9.7(8.3~10.3)	9.6(8.5~10.3)	9.5(8.0~10.3)
RH 组	9.6(7.6~10.5)	9.6(7.6~10.3)	9.5(8.8~10.0)	9.7(7.5~10.8)
Enterobacteriaceae				
RHL 组	6.7(4.5~9.3)	6.5(4.5~8.0)	6.0(4.6~8.6)	6.3(4.8~8.3)
RH 组	6.2(4.8~8.0)	6.4(4.7~8.0)	6.3(4.8~7.5)	5.3(4.8~8.0)

在摄入的过程中, 摄入 *L. plantarum* 组经历了粪便体积的大量增加、气胀的明显减少和粪便均匀性的稍微改善。

Berggrtn (1996) 研究表明 SCF 的 90%~95% 在人结肠度吸收, 其余 5%~10% 排泄于粪便中。

六、*L. plantarum* 用于干肠发酵的研究

干肠的风味形成是菌和碳水化合物、蛋白、脂肪肌肉酶代谢的结果, 所有代谢物和佐料构成了干肠的风味物质。对于北欧干肠而言, 乳酸是主要的风味物质, 但也要求乙酸以低浓度存在, 其他酸的量是非常低的。游离氨基酸和脂肪酸在成熟过程中上升, 也对风味产生形成影响, 一般认为不同发酵剂产生不同的干肠风味特征。Errkkila 等 (2001) 应用新型发酵剂发酵干肠, 得到了新风味的干肠制品, 他们的发酵剂由 *L. rhammosus* GG、LC-705、E-97800, *P. pentosaceus* E90390 和 *L. plantarum* E98098 组成, 这些菌除有正常的乳酸菌功能外, 还具有特殊的功能, 利用这些菌株发酵干肠, 不仅在产品风味, 而且在产品功能创新上均提供了可能性。

(一) 乳酸的产生

在肉汁培养基中乳酸菌数量的增长达到 9.5~9.9 lgcfu/ml, 最低数量的菌是 E90390, 最高数量是对照组。pH 变化区间为 4.1~4.3, 菌株间产生乳酸的量不同 (见图 7-44), 但所有试验菌均能产生足够的乳酸以达到干肠加工过程中发酵乳酸菌应起的作用。

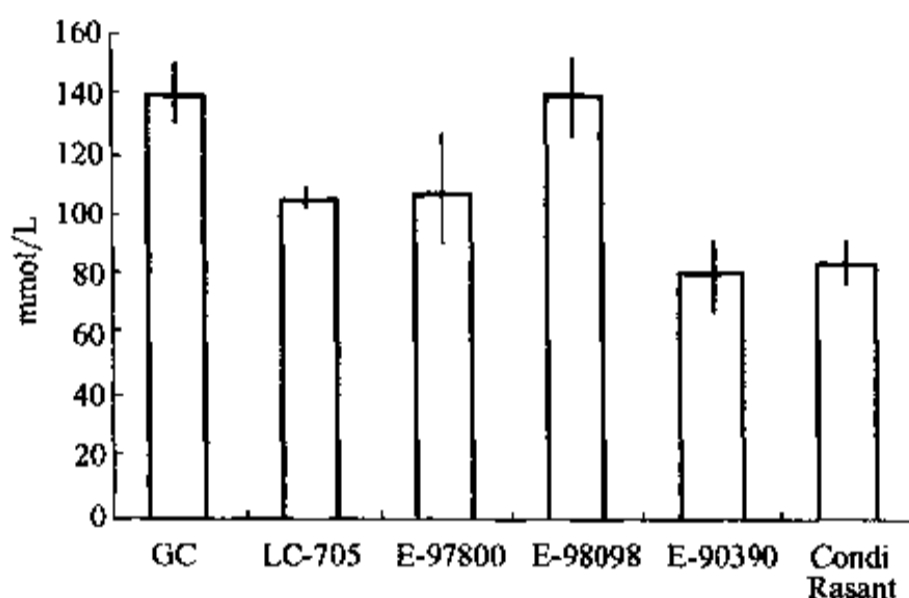


图 7-44 在 22°C 48h 培养后 MRS 中乳酸量 (mmol/L)

(二) 胺化合物的产生

在干肠中一般存在着胺类化合物, 这是由于在干肠加工过程中具有胺分解酶阳性的微生物的脱羧反应而引起, 这种反应温度介于 5~7°C 之间, 此情况下, 脱羧微生物高水平存在。在干肠中存在的胺最高浓度足以引起食物中毒, 因此主要的发酵微生物要求是脱羧反应阴性菌。Maijala (1993) 研究认为在肉制品发酵剂中最常用的是乳酸菌, 所有菌株呈产胺阴性才被认为是安全的。Erkkila 等 (2001) 的研究清楚表明应用菌不产生组胺和酪胺, 组胺在产品中的水平 < 10 μg/ml, 酪胺 < 15 μg/ml。

(三) 产品的微生物、pH 和失重

干肠在发酵和成熟过程中, 乳酸菌的数量增加 (图 7-45), 干肠中微生物的 Riboprint

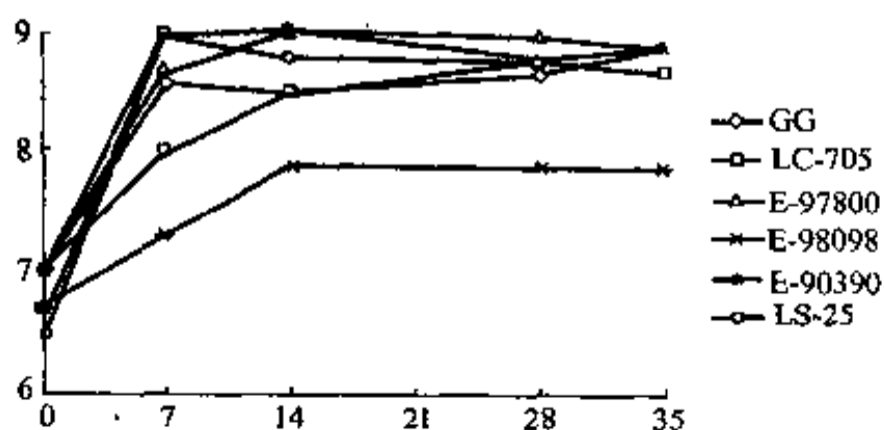


图 7-45 在发酵 (0~7 天) 和成熟 (7~35 天) 过程中乳酸菌的数量变化 (lgcfu/ml)

模型如图 7-46 所示, Riboprint 模型即是基因指纹模型, 应用这种技术可以从每个样品中鉴别 3 个或 3 个以上的菌株, 结果表明这些微生物对干肠的发酵负责, 他们主要负责乳酸和风味物质的形成。

(四) 干肠的风味模型

用 5 种实验菌和一种商品菌发酵的风味模型几乎是完全一样的 (见图 7-47), 用 LGG 发酵产品的后味较弱, 用 LC705 发酵

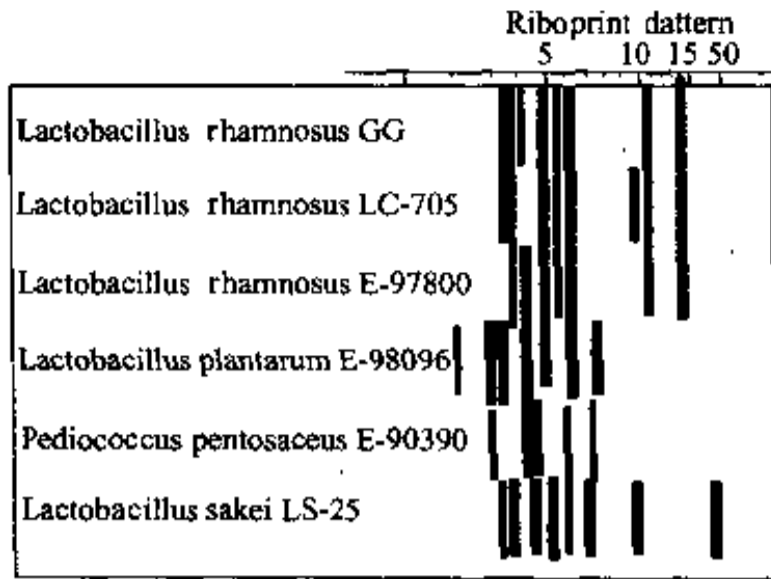


图 7-46 菌的 Riboprint 模型

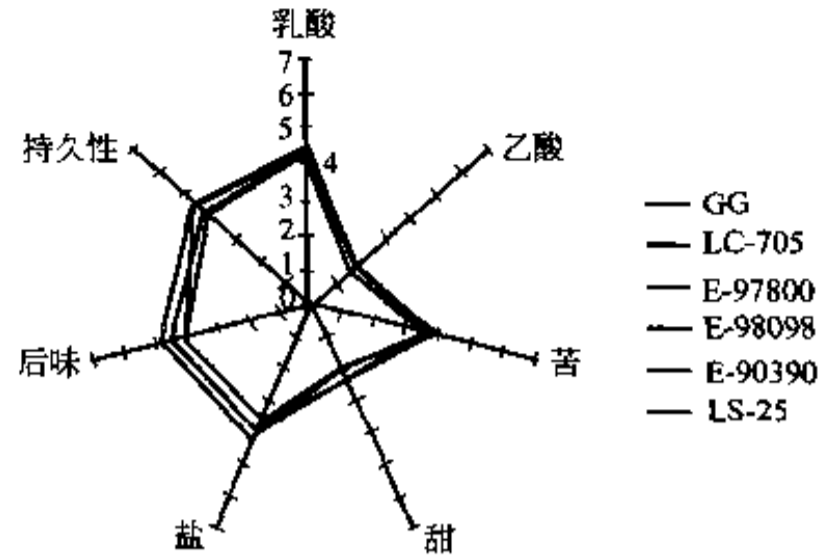


图 7-47 不同菌发酵干肠的风味模型

风味的持久性弱，总的印象是产品质量介于好和优秀之间。

用新型菌产生的风味类似于工业化方式生产产品的风味。

综上所述可以看出，干肠可用益生菌如 *L. rhamnosus* GG、LC705 和 E-98098，以及 *P. pentosaceus* E 90390、*L. plantarum* E 98098 加工，最终产品中乳酸菌数量为 8~9 lgcfu/g，在最终产品中 pH、风味、干燥和商业化产品没有明显不同，这为生产有类似感官质量和理化指标，同时也为兼具益生功能的健康型干肠产品的开发提供了技术上的保障。

七、*L. plantarum* 对橄榄的低温发酵

西班牙风格绿橄榄的加工包括采用 NaOH 溶液 (1.8~3.0W/V) 处理，使其透入橄榄体内 2/3 到 3/4，接下来经过 1~3 次清洗去除过量的 NaOH，然后橄榄于 12% (w/v) NaCl 溶液中腌制而进行乳酸发酵。这种天然的传统发酵过程，经研究发现是以兼性棒状乳酸菌为主的发酵过程。产细菌素和不产细菌素的 *L. plantarum* 菌株对 NaCl 浓度 (5%~6% NaCl w/v) 的耐受性不同，在 pH4.5 时 6%NaCl 抑制了乙酸的生成。产物的形成也受 pH 和其他因素影响，乳酸和乙酸的比例、L-乳酸和 D-乳酸比例随着这些参数的不同而不同。橄榄的发酵呈自发状态，对发酵微生物要求快速和优势生长，同型代谢、耐盐耐酸，要求有多酚和少量生长促进因子存在；在低温下生长也是必须考虑的问题。Quintana 等 (1999) 应用 *L. plantarum* 作发酵菌种，低温条件对绿橄榄进行发酵，他们确立了发酵的各种参数，这为绿橄榄产品的生产提供了一种方便、有效的方法。

(一) 在 MRS 肉汁和盐水中菌株的选择和生长

在 *L. plantarum* 的菌株间生长速率和酸化情况没有显著性差异，忽视其他因素菌株的平均产酸量是 50~60mmol/L (0.45%~0.54%，W/V，以乳酸表示)，其结果见表 7-51。这些菌均可用于绿橄榄的发酵。研究表明所有其他因素的影响呈线性，温度影响最为明显 (见图 7-48)。温度、温度和 pH 相互作用，盐、盐和 pH 相互作用也是重要的，但有较低的绝对值。在 MRS 培养基中含有 *L. plantarum* 生长所需的全部营养素，最大的限制条件是低温。

表 7-51 6 天培养后不同菌株的产酸水平

<i>L. plantarum</i>	酸 化		<i>L. plantarum</i>	酸 化	
	mmol/L	乳酸/%		mmol/L	乳酸/%
LPC1	53.7(1.1)	0.483(0.010)	LPC24	52.4(1.1)	0.472(0.010)
LPC4	61.8(1.1)	0.556(0.010)	LP33	57.1(1.1)	0.514(0.010)

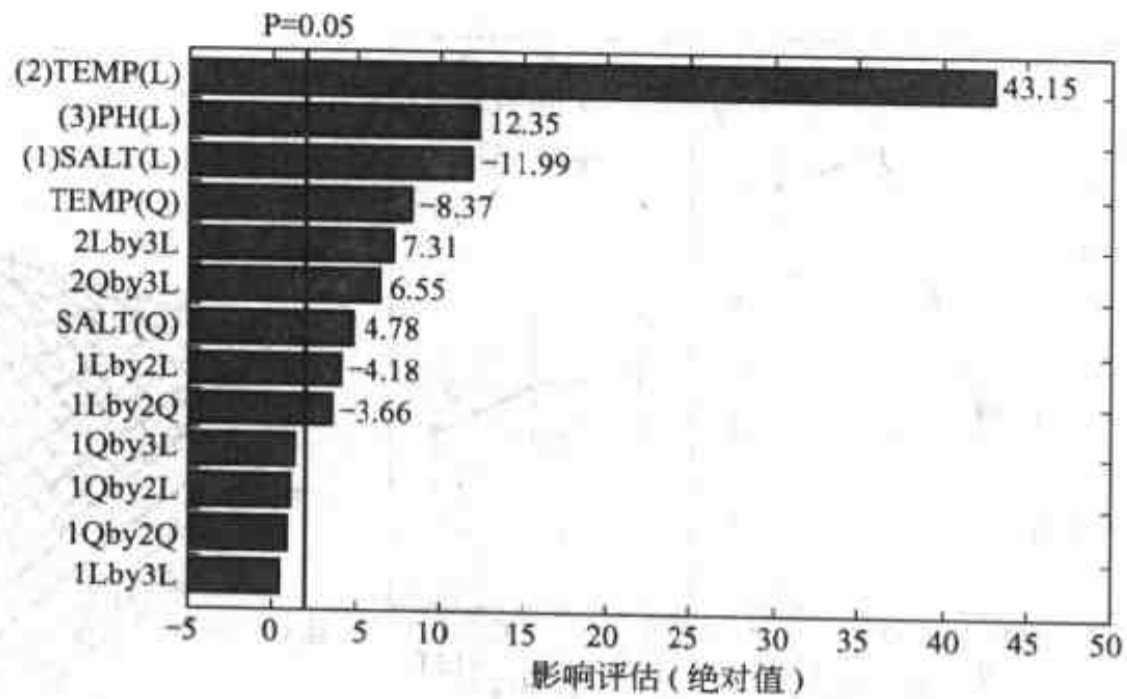


图 7-48 在培养后各因素对产酸的影响

四株 *L. plantarum* 在盐水中具有较低的生长速率和产酸能力，在四株菌中 LPC24 对低温敏感，在其他影响因素中最重要的是 pH（见图 7-49），后依次为盐和温度的相互作用、温度和盐。产酸分析表明发酵过程中的产酸作用和菌株无关，酸化过程中温度的影响最大，后依次为 pH、盐和其他相互作用。这种复杂的相互关系见图 7-50。9℃ 时酸化是非常有限的，其他因素的影响可忽略不计；在 12℃ 和 15℃ 时，应用 3% 和 4% NaCl，酸化速率大大提高，特别是对于 pH=5.0 的情况；盐上升至 5% 以上，引起酸化的明显下降，类似的影响在直接盐水橄榄中也能观测到。

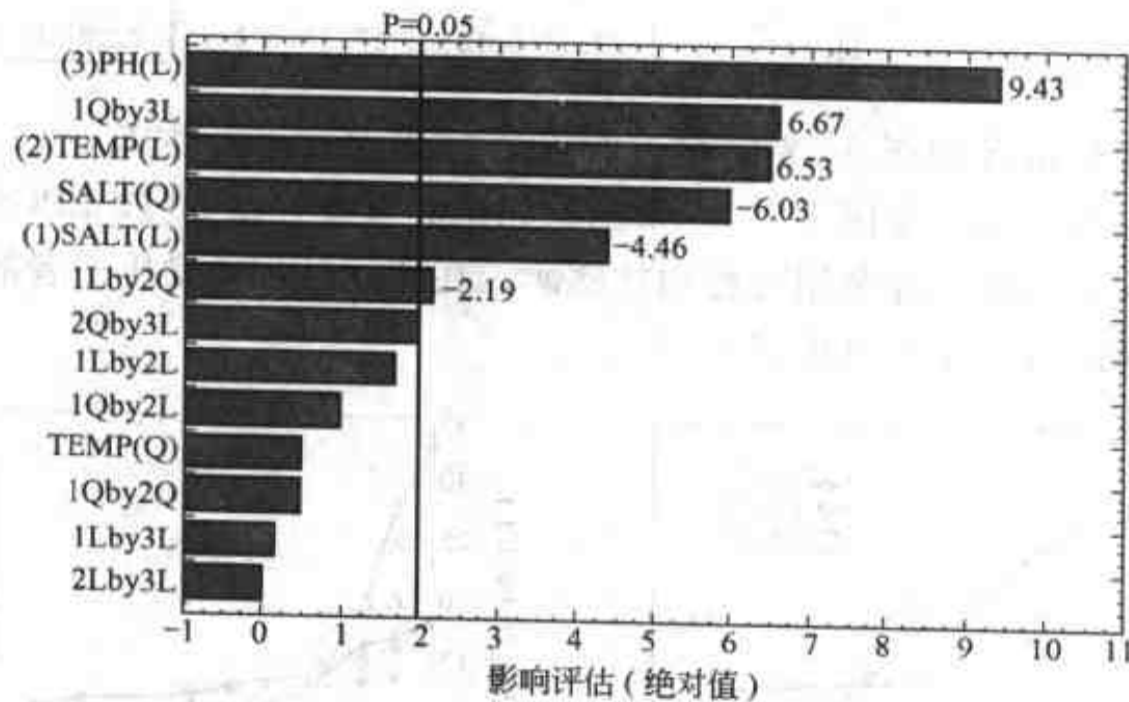


图 7-49 6 天发酵后各因素对 *L. plantarum* 生长速度的影响

培养的最适条件如图 7-51 所示。在固定 pH5.0 的条件下最大的酸化发生在 13℃、3.3% NaCl 的情况，在 12℃ 和 3%、4% NaCl 的情况如表 7-52 所示，这些菌株在 3 天有值得注意的比生长速率，在 6 天时明显增长，酸化在 3% NaCl 中较 4% NaCl 中高。

从腌制橄榄产品中分离的 *L. plantarum* 一般对盐有高的耐受性，但在低温时这种耐受性降低，在 9~15℃ 的低温 5% NaCl 的抑制作用能说明这种现象的存在。

(二) 对低温发酵的改善

Quintana 等 (1999) 研究表明：在低温条件下能够发酵的底物是有限的，产物中无甲醇和乙醇产生，存在乙酸和乳酸。起始调整至最适发酵条件：3% NaCl、pH=5.0。此条件

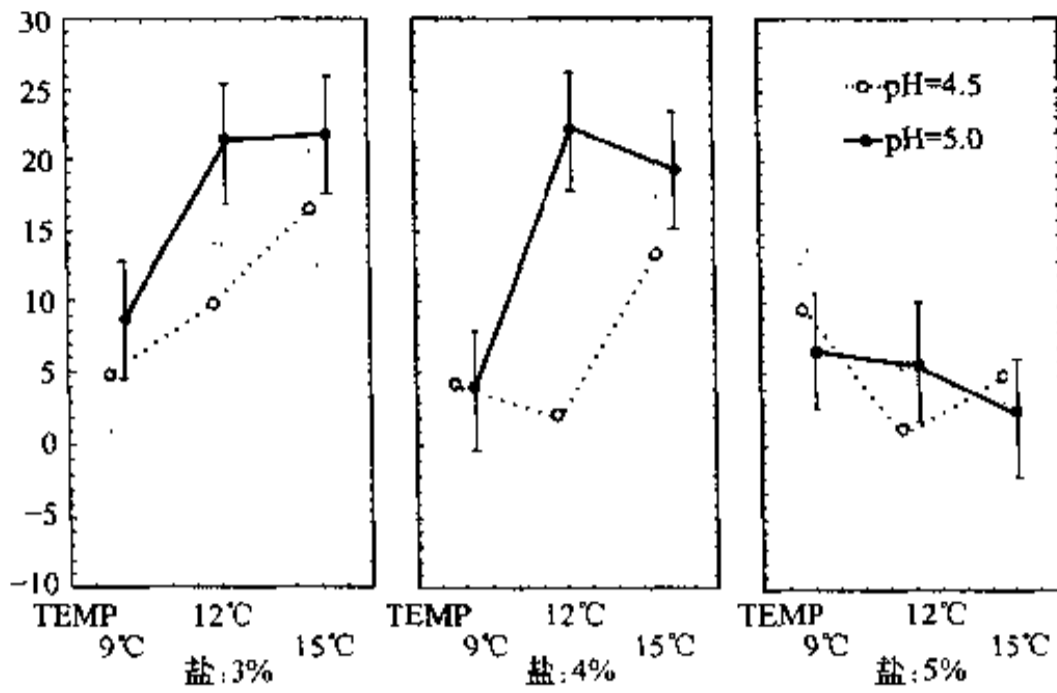


图 7-50 各因素在 6 天发酵后对生长速度的影响

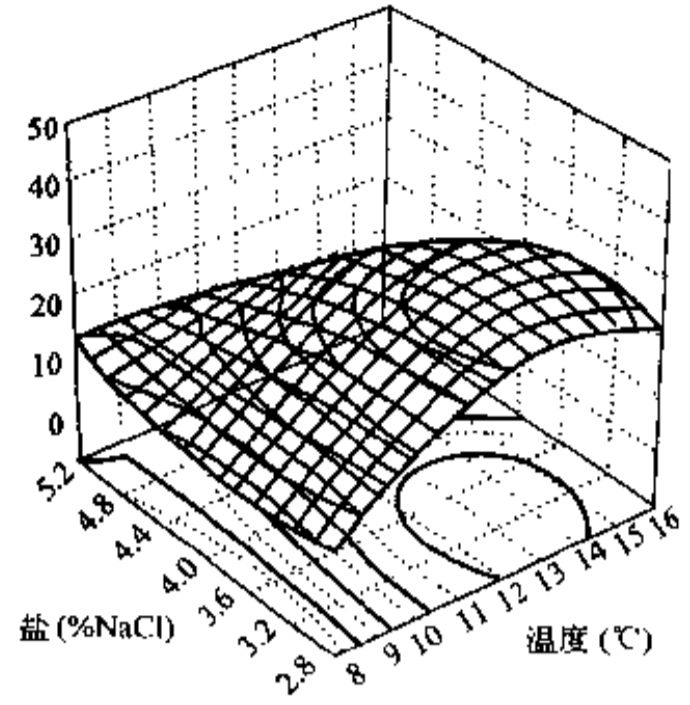


图 7-51 盐浓度和温度相互作用对酸化的影响 (pH=5.0)

表 7-52 3 天和 6 天培养后比活性生长

时间/天	<i>L. plantarum</i>					
	LPC1		LPC4		LP33	
	3%	4%	3%	4%	3%	4%
比生长速率	0.320(0.047)	0.048(0.047)	0.309(0.047)	0.032(0.047)	0.32(0.047)	0.073(0.047)
最终酸度/(mmol/L)	0.417(0.033)	0.456(0.033)	0.409(0.033)	0.362(0.033)	0.413(0.033)	0.333(0.033)
	19.22(0.13)	14.44(0.13)	21.11(0.13)	17.33(0.13)	22.67(0.13)	16.56(0.13)

L. plantarum 的生长情况如图 7-52 所示, 所有菌株快速、平行生长, 10 天后达最高活菌数。葡萄糖实际上被消耗 (见图 7-53), 果糖的利用非常慢, LP33 较 LPC4 和 LPC1 能稍快酸化。*L. plantarum* 菌株不能利用蔗糖和甘露醇, 在实际过程中发生二者的降解是由于后期发酵阶段或贮存时酵母的作用 (见表 7-53)。

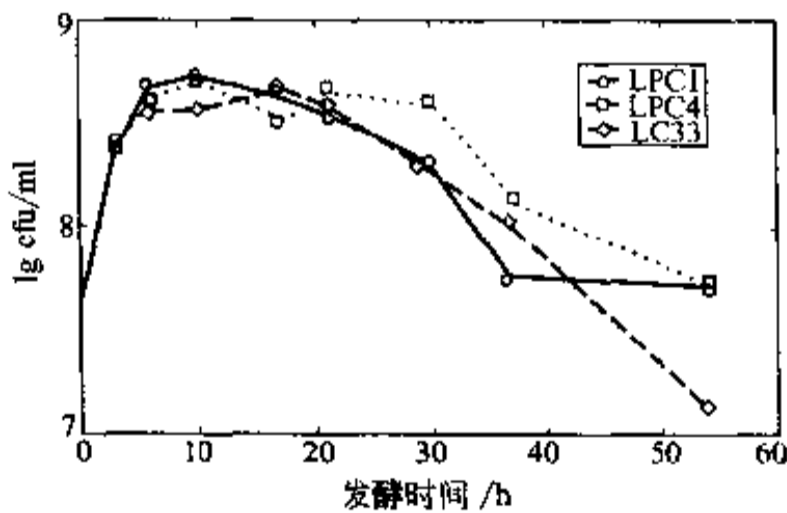


图 7-52 在发酵过程中 *L. plantarum* 的生长 (pH=5.0, NaCl 3%, 12°C, 接种量 4×10^7 cfu/ml)

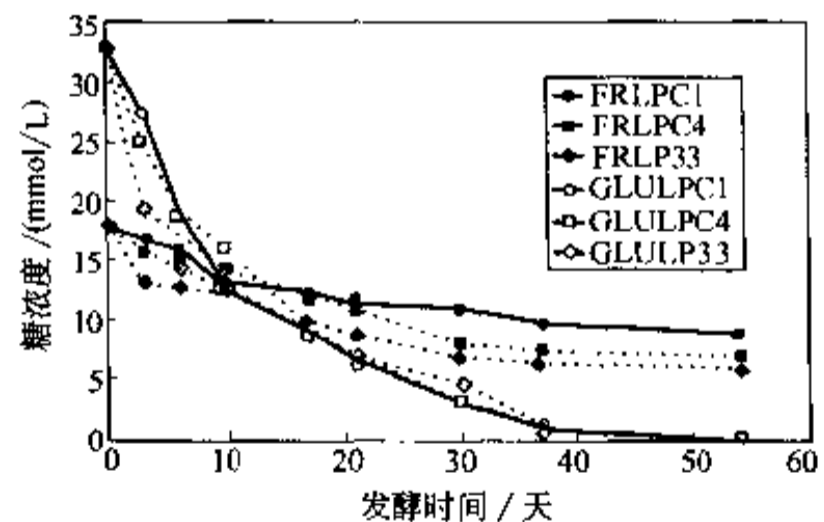


图 7-53 *L. plantarum* 对糖 (葡萄糖、果糖) 的利用 (pH=5.0, NaCl 3%, 12°C, 接种量 4×10^7 cfu/ml)

苹果酸和柠檬酸的分解是完全的。乳酸产生是快速的 (见图 7-54), 在发酵 20~30 天后达到最大值, 产酸过程碳源的损失对于所有菌株是非常小的, 碳的回收率对于 LPC1、LPC4 和 LP33 分别为 100%、110% 和 98%。在头 20 天中乙酸的量较低, 最终乳酸/乙酸为 7.5:1 (LPC1)、6.4:1 (LP33) 和 5.0:1 (LPC4), 也发现少量甲醇、乙醇和琥珀酸存在。

表 7-53 产品发酵的起始和最终产品特征

化 合 物	起 始	最 终		
		LPC1	LPC4	LP33
碳水化合物				
葡萄糖	32.2(1.69)	ND	ND	ND
果糖	18.3(1.04)	8.93(0.42)	6.76(0.20)	6.03(0.14)
甘露醇	9.58(0.65)	9.59(0.650)	9.03(0.65)	9.29(0.65)
蔗糖	1.76(0.13)	1.75(0.13)	1.89(0.13)	1.73(0.13)
有机酸				
乳酸	16.92(0.74)	89.89(0.40)	90.77(0.45)	90.17(0.05)
乙酸	7.99(0.03)	11.59(0.04)	17.81(0.30)	13.9(0.08)
苹果酸	1.71(0.01)	ND	ND	ND
柠檬酸	0.19(0.021)	ND	ND	ND

在 3% NaCl、pH = 5.0 的情况下可用 *L. plantarum* 进行西班牙式绿橄榄的低温发酵生产，上述实验证明 *L. plantarum* 是一种有效、实用的绿橄榄发酵菌株。

八、*L. plantarum* 在干酪成熟中的作用

嗜温乳酸菌在干酪成熟过程中发挥着重要作用，对于这些菌的准确作用尚不完全清楚，一般认为它们参与蛋白水解和形成氨基酸。Manu 等在 2000 年以 Fiore Sardo 干酪成熟为例，研究了非发酵剂乳酸菌在干酪成熟中的作用，Fiore Sardo 是以绵羊奶为原料在 Sardinia 岛上牧民生产的一种传统硬质干酪，它应用皱胃酶，不添加任何发酵剂以天然方式进行生产。这种天然酸化产品的发酵和成熟过程完全依赖于手工挤奶和干酪加工过程中乳中存在或来自环境的天然微生物。

(一) 在成熟过程中微生物的变化

整个 Fiore Sardo 干酪成熟期活菌数的变化如表 7-54 所示，在不同培养基 OH 和 FH 上 cfu/g 的量基本相同。在加工 24h 后干酪 A 和 B 嗜温菌水平 4×10^5 cfu/g，干酪 C 达 2×10^7 cfu/g，在 72h 后微生物上升至 $10^6 \sim 10^7$ cfu/g 以上，成熟 15 天后约为 10^8 cfu/g。嗜温的

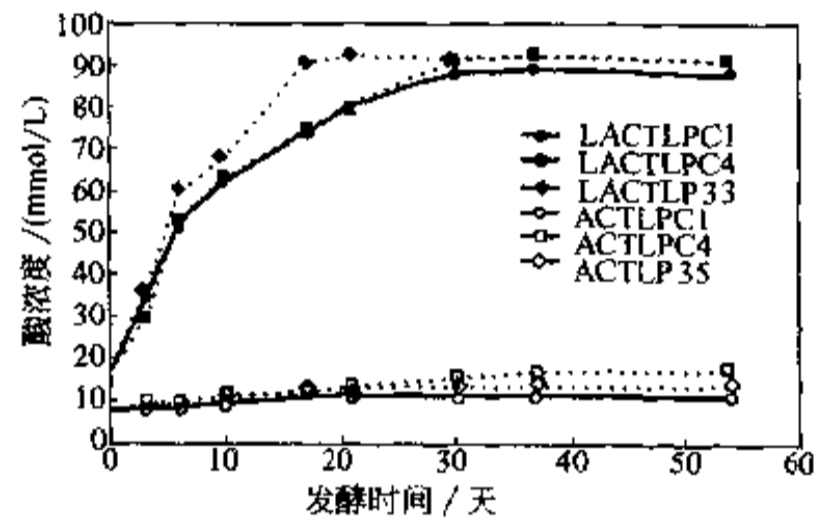


图 7-54 *L. plantarum* 的产酸情况
(LACT—乳酸, ACT—乙酸) pH5.0, 3.0% NaCl, 接种量 4×10^7 cfu/ml, 12°C

表 7-54 Fiore Sardo 干酪成熟过程中微生物的变化

	干酪 A			干酪 B			干酪 C		
	OH (cfu/g)	FH (cfu/g)	M17 (cfu/g)	OH (cfu/g)	FH (cfu/g)	M17 (cfu/g)	OH (cfu/g)	FH (cfu/g)	M17 (cfu/g)
24h	4.8×10^5	4.7×10^5	2.1×10^9	4.7×10^5	2.4×10^5	3.8×10^9	2.3×10^7	2.5×10^7	4.4×10^9
72h	2.9×10^7	3.7×10^7	2.9×10^9	1.2×10^6	1.2×10^6	5.2×10^9	—	—	—
15天	3.7×10^8	4.8×10^8	—	9.1×10^7	1.2×10^8	1.9×10^9	1.2×10^8	9.1×10^7	2.7×10^8
1个月	2.8×10^8	1.7×10^8	6.3×10^8	8.7×10^7	8.7×10^7	2.9×10^8	7.0×10^7	5.6×10^7	9.6×10^7
2个月	8.7×10^7	1.7×10^8	3.3×10^8	4.8×10^7	3.2×10^7	6.4×10^7	6.4×10^6	6.2×10^6	5.3×10^6
3个月	1.9×10^8	2.0×10^8	2.3×10^8	2.5×10^8	2.2×10^6	2.3×10^6	—	—	—
4个月	—	—	—	—	—	—	3.3×10^5	$< 1 \times 10^2$	5.0×10^5
5个月	2.8×10^6	2.3×10^6	2.0×10^7	2.8×10^6	2.3×10^6	2.0×10^7	—	—	—
6个月	—	—	—	—	—	—	8.6×10^4	6.1×10^4	1.8×10^5
7个月	$< 1 \times 10$	2.1×10^2	2.8×10^5	7.1×10^4	$< 1 \times 10^2$	7.7×10^4	—	—	—

Lactobacilli 代表 Fiore Sardo 干酪中的主要菌，这主要发生在 3 个月的成熟期内，在成熟 7 个月后 *Lactobacilli* 下降为 $10^2 \sim 10^4$ cfu/g 的水平。

(二) 微生物分离物的表型特征和 PCR 鉴别

所有的分离菌株为棒状，呈革兰氏阳性、过氧化物酶阴性，能在 15°C 于 MRS 培养基中培养 7 天后生长，能够在 45°C 生长的分离物所占的百分比如表 7-55 所示，在表中也反映了分离物代谢柠檬酸的能力。在 419 个兼性或异型发酵 *Lactobacilli* 菌株中，31 个属于专性异型发酵，419 株 *Lactobacilli* 菌中有 302 株属于 *L. plantarum*。

表 7-55 Fiore Sardo 干酪中乳酸菌分离物的表型特征及 PCR 鉴定情况

菌种	干酪															Total no
	A					B					C					
	No	生长		KCA+		No	生长		KCA+		No	生长		KCA+		
		15°C	45°C	%	%		15°C	45°C	%	%		15°C	45°C	%	%	
<i>L. plantarum</i>	184	96	100	70	98	69	43	100	45	93	49	67	100	53	100	302
<i>L. casei</i>	2	1	100	0	100	90	56	100	24	75	24	33	100	0	100	116
<i>L. curvatus</i>	1	0.5	100	100	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
未确认	5	2.5	100	80	100	2	1	100	50	50	—	—	—	—	—	7
总菌数	192	100				161	100				73	100				426

L. plantarum 是 Fiore Sardo 干酪中的优势菌，它占测试样品 A 的 96%，B 的 67%，样品 B 也占到 43%。图 7-55 代表了整个干酪成熟过程中各种菌的变化情况，样品 A 中分离物全部为 *L. plantarum*。样品 B 中 *L. plantarum* 和 *L. paracasei* 在成熟 24h 时是相似的，但 72h 后 *L. plantarum* 的量上升，1 个月达最大值，此时 *L. paracasei* 下降，3 个月时 *L. plantarum* 几乎不存在。样品 C 中成熟的前 2 个月 *L. plantarum* 是优势菌，但 2 个月后 *L. paracasei* 达到和 *L. plantarum* 相同的量，在以后的成熟过程中 *L. paracasei* 成为优势菌。

用绵羊奶生产的 Fiore Sardo 干酪由非发酵剂乳酸菌构成了它的成熟菌，总菌数从起始时的 10^5 cfu/g 变化为 30 天后的 10^8 cfu/g，后缓慢下降至 7 个月的 10^4 cfu/g。经过测定，下

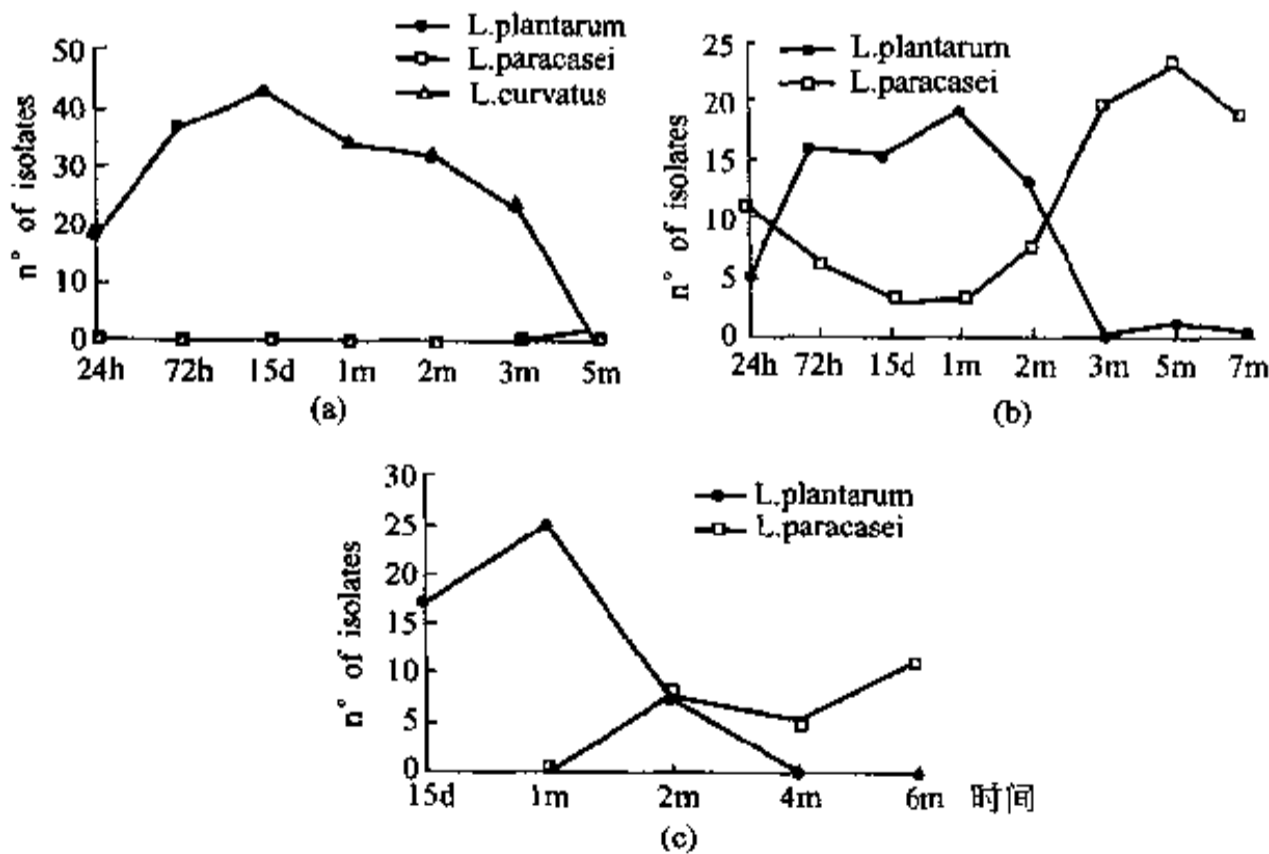


图 7-55 Fiore Sardo 干酪成熟过程中微生物的变化
(a) 样品 A; (b) 样品 B; (c) 样品 C

列乳杆菌与 Fiore Sardo 干酪的成熟有关: *L. plantarum*、*L. casei*、*L. paracasei*、*L. rhamnosus*、*L. pentosus*、*L. paraplantarum*、*L. curvatus*、*L. gaminis* 和 *L. sake*, 但这些成熟菌中 *L. plantarum*、*L. paracasei* 是优势菌, 它们对 Fiore Sardo 的成熟起至关重要的作用, 虽然也存在不同生产状况两种菌生长状况和相对比例不同的情况, 这种差异性源于原料奶、环境微生物状况的差异, 也不排除手工操作引起差异的可能性。

参 考 文 献

- 1 A. Cristina Freitas et al. , Inter. Dairy. J. 9 (1999) 593-603
- 2 A. Yaman et al. , Meat Science. 49 (1998) 387-397
- 3 A. Arich et al. Inter. J. Food Micro. 68 (2001) 93-104
- 4 A. D. Castro et al. , Inter. J. Food Micro. 39 (1998) 205-211
- 5 A. Gelman et al. , Inno. Food Sci. Emerging Tech. 1 (2001) 219-226
- 6 A. A. A. Magboul et al. , Food Chem. 65 (1999) 15-22
- 7 A. A. A. Magboul et al. , Inter. Dairy J. 9 (1999) 849-855
- 8 A. Escalante et al. , Inter. J. Food Micro. 64 (2001) 21-31
- 9 A. G. Williams and J. M. Bankd. Int. Dairy J. (1997) 763-774
- 10 A. Maldonado et al. , Inter. J. Food Micro. 77 (2002) 117-124
- 11 A. I. Sanni et al. , Inter. J. Food Micro. 72 (2002) 53-62
- 12 A. H. Con and H. Y. Gokalp. Meat Science. 55 (2000) 89-96
- 13 A. A. A. Magboul et al. , Inter. Dairy J. 7 (1997) 693-700
- 14 A. G. Williams et al. , Food Res. Inter. 35 (2002) 483-493
- 15 A. Corsetti et al. , Inter. J. Food Micro. 64 (2001) 95-104
- 16 A. A. K. A. Arab. Food and Chem. Toxicology 40 (2002) 33-41
- 17 C. P. Muller et al. , Inter. J. Food Micro. 73 (2002) 61-70
- 18 C. P. Muller et al. , Inter. J. Food Micro. 46 (1999) 219-299
- 19 D. Adawi et al. , Inter. J. Food Micro. 70 (2001) 213-220
- 20 E. M. Beukes et al. , Inter. J. Food Micro. 63 (2001) 189-197
- 21 E. Hypes et al. , Inter. Dairy J. 11 (2001) 587-597
- 22 F. B. Kasravi et al. , J. Hepatology 26 (1997) 417-424
- 23 H. K. No et al. , Inter. J. Food Micro. 74 (2002) 65-72
- 24 I. Sanchez. et al. , Inter. J. Food Micro. 59 (2000) 9-17
- 25 J. J. Leisner et al. , Inter. J. Food Micro. 63 (2001) 149-157
- 26 J. P. P. M. Smell et al. , Inter. J. Food Micro. 73 (2002) 207-212
- 27 K. Suma et al. Inter. J. Food Micro. 40 (1998) 17-25
- 28 K. Kumasaka et al. , Clinica Chimica Acta. 306 (2001) 71-77
- 29 L. J. Fooks. FEMS Micro. Ecology. 39 (2002) 67-75
- 30 L. Mannu et al. , Inter. Dairy J. 10 (2000) 383-389
- 31 L. Truel Struup Hansan and H. H. Huss. Food Res. Inter. 10 (1998) 703-711
- 32 L. Nollet et al. , Animal Feed Sci. Tech. 74 (1998) 189
- 33 M. V. Leal et al. , Inter. J. Food Micro. 43 (1998) 129-134
- 34 M. Cattle et al. , Inter. J. Food Micro. 52 (1999) 105-108
- 35 M. A. Ehrmann et al. , Biochim. Et Biophys. Acta. 1490 (2000) 355-361
- 36 M. DLopes et al. , Inter. J. Food Micro. 76 (2002) 107-115
- 37 M. H. S. Santos. Inter. J. Food Micro. 39 (1998) 227-230
- 38 M. L. Johansson et al. , Inter. J. Food Micro. 42 (1998) 29-38
- 39 M. Morea et al. , Inter. J. Food Micro. 43 (1998) 53-60
- 40 M. E. Arena et al. , Inter. J. Food Micro. 47 (1999) 203-209
- 41 M. L. Johansson et al. , Inter. J. Food Micro. 42 (1998) 29-38
- 42 M. D. Fatima. Silva Lopes et al. FEMS Micro Lettrts 00 (1999) 483-487
- 43 M. Fernandez et al. , Inter. J. Food Micro. 48 (1999) 113-123

- 44 M. C. O. Quintana et al. , *Inter. J. Food Micro.* 51 (1999) 133-143
- 45 M. Lema et al. , *Small Ruminant Res.* 39 (2001) 31-39
- 46 M. H. E. Jalil et al. , *Biomass and Bioergy.* 21 (2001) 301-309
- 47 M. Karikawa et al. , *Gene.* 242 (2000) 155-166
- 48 M. Gobbetti et al. , *Inter. Dairy J.* (1999) 763-773
- 49 M. ALbenzio et al. , *Inter. J. Food Micro.* 67 (2001) 35-48
- 50 M. Kakikawa et al. , *Gene.* 215 (1998) 371-379
- 51 M. Gobbetti et al. , *Enzyme and Micro. Tech.* 25 (1999) 795-809
- 52 N. G. Franseu et al. , *Bioresource Tech.* 65 (1998) 145-150
- 53 N. Revenean et al. , *Vaccine* 20 (2002) 1769-1777
- 54 Nancy. J. Gardener et al. , *Inter. J. Food Micro.* 64 (2001) 261-275
- 55 O. Reichart. *Inter. J. Food Micro.* 64 (2001) 289-294
- 56 O. B. Oyewole. *Inter. J. Food Micro.* 65 (2001) 213-218
- 57 P. Chagnaud et al. , *J. Micro. Methods.* 44 (2001) 139-148
- 58 P. Kontula et al. , *Inter. J. Food Micro.* 45 (1998) 163-169
- 59 P. Kalac et al. , *Food Chem.* 70 (2000) 355-359
- 60 R. Marasco et al. , *FEMS Micro. Letters.* 186 (2000) 269-273
- 61 R. Marasco et al. , *FEMS Micro. Letters.* 208 (2002) 143-146
- 62 R. Talon et al. , *Meat Science.* 54 (2000) 41-47
- 63 R. Meeske et al. , *Animal Feed Sci. Tech.* 81 (1999) 237-248
- 64 R. L. V. Winsen et al. , *Veterinary Micro.* 87 (2002) 267-276
- 65 S. Tajchakavit et al. , *Food Res. Inter.* 31 (1998) 713-722
- 66 S. S. Yoon et al. , *Inter. J. Food Micro.* 65 (2001) 63-74
- 67 S. A. cuozzo et al. , *FEMS Micro. Letters.* 185 (2000) 157-161
- 68 S. Krishnan et al. , *Process Biochemistry.* 35 (2000) 1191-1198
- 69 S. I. Hong and Y. R. Pyun. *Inter. J. Food Micro.* 63 (2001) 19-28
- 70 S. Todorov et al. , *Inter. J. Food Micro.* 48 (1999) 167-177
- 71 T. K. Sobdeva et al. , *Inter. J. Food Micro.* 57 (2000) 183-192
- 72 T. K. Soboleva et al. , *Inter. J. Food Micro.* 64 (2001) 317-323
- 73 V. V. Barynin et al. , *Structure.* 9 (2001) 725-738
- 74 V. Lei et al. , *Inter. J. Food Micro.* 53 (1999) 169-184
- 75 W. Fu et al. , *Biochem. Engineering J.* 3 (1999) 163-170
- 76 Y. L. Song et al. , *FEMS Micro. Letters.* 187 (2000) 167-173
- 77 Y. Babji and T. R. K. Murthy. *Meat Sci.* 54 (2000) 197-202

第八章 其他益生菌类

除了前面已经介绍的益生菌，如 *Bifidobacteria*、*L. acidophilus*、*L. casei* GG、*L. plantarum* 等外，其他益生菌，包括动物用乳酸菌、*Propionibacterium* spp.、*L. reuteri* 和 *S. boulardii* 正日益受到重视，它们的生理功能、抗菌物质的分泌、酶体系及在产品中的应用，许多研究者均进行了较为深入的研究。可以预期在不久的将来，还会有更多的生理功能经过认证的益生菌推向市场，上述益生菌可能就在其中。鉴于此就这些益生菌的研究情况进行回顾，并就其将来发展提出展望是十分必要的，这可为它们的进一步研究，包括对市场化提供借鉴和帮助。

第一节 动物用乳酸菌

肠道微生物的组成和代谢在许多方面影响动物的生理状态。在其出生后形成的肠道微生物和其他消化、免疫系统相互作用，产生有益和有害作用，特定菌的定殖是对抗外来微生物或膳食中毒性物质的第一道屏障。在成年哺乳动物中纤维膳食的消化主要是以瘤胃中微生物的发酵为基础的，另外肠道微生物可能产生某些物质或对宿主代谢物质进行再加工以利于宿主的消化和吸收。

在健康动物中肠道的每一部分都被典型的菌所定殖，它们适合于宿主的健康生长。目前广泛采用的牧业管理方法，很可能导致动物肠道的菌群失衡，产生消化不良、营养素吸收异常和生长障碍等问题。为克服这些问题，膳食中通常强化抗生素，这些抗生素对治疗痢疾和促进生长是有益的；但有害菌的抗药性出现干扰了抗生素的应用，同时也降低了抗生素的药效，它们在动物产品中的残留也会给摄人人带来健康问题。

基于上述原因，目前用益生菌替代抗生素用于动物的疾病预防和治疗已引起广泛关注。本文的目的在于介绍动物胃肠道的主要微生物及应用乳酸菌作为潜在改善菌的情况，以 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 为主要对象，集中于猪和牛的饲养应用，来反映动物中乳酸菌的研究和应用状况。

一、猪和牛的胃肠道菌

(一) 组成

胃肠道微生物呈宿主和环境专一性，年龄、消化道的部位和膳食类型也是肠道微生物的重要影响因素，消化道某些部位的微生物可在肠腔中发现。

1. 猪肠道菌组成

小猪在出生 48h 后其胃中至少已定殖了 *Lactobacilli*、*Streptococci* 和 *Coliforms*，几天后严格厌氧菌如 *Bacteroides* 也能在猪粪便中测定到；在吮乳的幼猪肠上段的微生物可利用乳成分，故乳的构成对肠道微生物组成具有决定性的影响。在幼猪使用谷物和断奶后，成年猪体内常见的微生物开始在肠道的不同段发展，同时微生物发酵的主要位置开始从胃向大肠道转移，事实上除无 Protozoa 外，成年猪结肠微生物和其粪便中的微生物相似。

乳酸菌黏着于猪胃的上皮细胞被认为是肠腔微生物的来源，*Lactobacillus fermentum* 和 *Streptococcus salivarius* 是这个区域的主要菌，可达到 10^8 cfu/cm² 的水平，类似的菌在禽和

人、鼠胃中被测定到，但黏着菌株的种类方面存在差异。现已证明猪胃乳酸菌的数量在其一生中会经历变化，这意味着从幼猪分离的菌株不一定能定殖于成年猪的胃中。

除乳酸菌外，*E. coli* 和酵母常在猪胃中发现，它们被认为是非原生菌，其依据是它们不能定殖于猪胃的鳞状区域。小肠微生物受胆汁和其通过速率的影响，但和胃相同的微生物种类也能定殖于小肠。进入小肠以后，由于食糜流速的降低，以及解离胆汁酸浓度的降低，小肠内细菌的数量开始增加。Jonsson (1985) 认为猪的胃肠道微生物是过渡性的，因为它们不能定殖，事实上 Muralidhara 等 (1977) 发现每克肠腔内容物含有高达 $10^7 \sim 10^8$ cfu 的 *Coliforms* 和 *Lactobacilli*，从小肠壁匀浆分离的多株乳杆菌和链球菌可以黏附到小肠上皮细胞上，而数量在膜上为 10^5 cfu/g。Wadstron 等 (1987) 用体外实验证实小肠上皮细胞上黏着着 *Lactobacilli* 和 *Streptococci*，Fuller 等 (1981) 也证明在禽的十二指肠上皮细胞上存在 *Streptococcus faecium*。

由于慢通过，在猪大肠中微生物的浓度最高，其数量达到 $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/g 湿重，*Bacteroides*、*Lactobacilli* 和 *Bifidobacteria* 是最优势菌的代表，但 *Enterococci* 和 *Coliforms* 也以高数量级存在。

2. 牛肠道微生物的组成

对于幼牛而言，其前胃是微生物生长的较好场所，从空气、母体和环境中获得的微生物，在瘤胃中定殖生长。小牛出生三天后在其网状瘤胃中发现了能分解纤维素和产生甲烷的微生物，1~3 周后出现了纤维素分解菌、乳酸发酵菌和 *Coliforms*，此后乳酸发酵菌数量下降；9~13 周后牛的瘤胃微生物和成年牛的相似。

Lengemann 等 (1959) 发现哺乳喂养的小牛体内纤维素分解菌的发展慢于喂养采用乳+干饲料的小牛，Nieto 等 (1985) 发现小牛由喂乳过渡至干饲料导致瘤胃中更快的产生 *Protozoa*，*Protozoa* 将在 8 天后于瘤胃中产生。人工喂养菌不影响其瘤胃微生物的建立，但用瘤胃成分一起接种 *Protozoa* 在 6 周龄牛的瘤胃出现。正常情况下纤毛状 *Protozoa* 在小于 13 周龄牛的瘤胃中无法测定到。

对于非反刍动物而言，在出生后乳和代乳品是其主要饲料，液体喂养后通过网状瘤胃，到重瓣胃、abomasum 和小肠，故在瘤胃定殖的第一批菌必然是乳酸菌，在早期阶段瘤胃微生物对饲料消化没有大的影响，这就意味着牛消化道的紊乱可以采用处理小猪的方法加以解决。

牛的小肠和大肠微生物与瘤胃相似，也受膳食和牛年龄的影响，从各个部位分离的黏附性 *Lactobacilli* 的数量为 $10^4 \sim 10^7$ cfu/cm²。Gillilemd 等 (1980) 研究表明 *Lactobacilli* 在牛小肠和大肠的量分别为 $10^6 \sim 10^7$ 和 $10^5 \sim 10^7$ cfu/g 干重，而 *Coliforms* 的量分别为 $10^8 \sim 10^9$ 和 $10^8 \sim 10^9$ cfu/g 干重。

(二) 消化

1. 碳水化合物

在猪的胃中由乳酸菌产生大量乳酸，这主要以乳糖和葡萄糖为底物，这对于 pH 调整和酸障碍形成是十分必要的，因为对于哺乳期的小猪而言，胃中盐酸的分泌非常有限。后期研究中发现高浓度乳酸的产生能抑制盐酸的分泌，表明酸的调整作用是以 H⁺ 浓度为基础的，和酸本身的类型无关。乳酸构成哺乳期小猪胃总酸量的 80%~90%，而以谷物为主食的较大猪胃中此比例低于 50%。糖也是小肠微生物发酵的最适底物，但用于实际发酵的量是有限的。在小猪胃中发现有机酸的量达 50~100mmol/L，乳酸是主要的有机酸，乙酸则是主

要的挥发性酸。

大肠允许充分的微生物发酵，尤其是对于成年猪。植物壁碳水化合物、黏蛋白和其他分泌物的降解产生有机酸，食糜中有机酸的量介于 150~200mmol/L，醋酸、丙酸和丁酸的量分别达到 60、30 和 15mmol/L，乳酸仅偶尔痕量发生。对于处于生长阶段的小猪而言，从大肠所吸收的挥发性酸可提供生长所需能量的 15%。

2. 蛋白质和氮化合物的代谢

在消化道的上半部分细菌不可能具有任何重要的蛋白质活性，此时用氨基酸、肽和尿素可作为主要的 N 源。几乎所有的氨基酸能够通过脱氨或脱羧产生胺和氨类，*E. coli* 是主要的胺的生产者，摄入乳酸菌大大减少了幼猪体内的胺形成。一般认为氨和胺的形成是肠道菌的有害代谢过程，抗生素的预防效应被认为是降低这些含氮化合物的形成。

尿素在组织氮转化时形成，伴随消化液分泌进入胃肠道的各个部分或直接穿过肠腔壁，和上皮细胞密切相连的微生物降解尿素，在腔中释放氨；氨可以作为菌的氮源或通过肾吸收和转为尿素成为分泌物或重新循环进入肠道。这种尿的循环需要从宿主获得能量，可能扰乱肠黏膜，但在低氮摄入情况下这个过程可为宿主贮存氮。

3. 脂肪

肠道菌以两种不同的方式帮助宿主完成脂肪代谢，首先细菌可通过肠酶消化膳食和内生性脂肪，使其变为游离态的氢化脂肪酸；其次它们能降解胆汁酸和调整胆固醇代谢。脂肪的表观消化可能由于菌的作用而下降，因为氢化脂肪酸的吸收较不饱和脂肪酸差，但实际上也与大肠内脂肪的从头合成有关。

游离胆汁酸可结合牛磺酸或甘氨酸或可以和葡萄糖苷硫酸盐结合，初级胆汁酸可被肠道菌降解，尤其是 *Lactobacilli* 降解为不易溶解和吸收的次级产物。次级胆汁酸可部分通过菌和肝酶的作用转化为三级胆汁酸，它们可能对宿主产生毒性。

肠道菌也与胆固醇的代谢有关，这是因为胆汁酸是由胆固醇合成的，尽管其作用方式在猪或牛方面尚未完全研究清楚。已有证据表明肠道菌通过催化和使其变得更不易吸收来降低体内的胆固醇。由于胆固醇会对心脏病带来额外的风险，许多研究者试图通过乳酸菌摄入的方法来降低血清胆固醇。

(三) 肠道壁功能

在肠道的所有部分肠壁具有特殊结构，在皱的肠膜表面被指状的微毛所覆盖。研究结果表明在菌和肠黏膜结构间存在明显的相互作用，一般无菌动物具有长的绒毛、浅的滤泡，这些形态学的差异导致无菌动物具有比普通动物更高的酶活性。菌的氮代谢产物氨，胺对肠膜结构产生有害影响。研究表明在猪断乳后绒毛长度迅速下降和滤泡深度增加，这明显是肠道菌变化的结果。

Sakata (1987) 证明鼠的喂食挥发性脂肪酸 (VFA) 加速了滤泡的产生和增加了肠壁的量，这种刺激用丁酸盐是十分有效的，这种影响可能是系统而非局部的。Hül 等 (1990) 研究证明普通鼠较无菌鼠结肠中有长的滤泡和更少量的成熟杯状细胞。另一方面膳食抗菌剂能明显降低肠道菌的活性，证明也可减少肠壁量和刺激营养素的吸收。

淋巴组织形成对有害菌和其他膳食抗原的第一道防御防线。来自 Peyer's 斑的淋巴腺中分泌 IgA，分泌性 IgA 以二聚体的形式存在，sIgA 具有专一性的肽“丁链”，能结合 Ig 的重链。IgA 被接近膜表面的局部抗原活化，肠上皮细胞为分泌的肽类合成受体，使 IgA 结合于黏蛋白变得容易，并分布于黏膜外层作为防护层。巨噬细胞和 T 细胞负责肠的细胞免疫

反应，肠道菌和淋巴结存在着重要的相互作用，抗体调整病原菌在上层细胞上的定殖。另一方面肠道土著菌群可以存在于表面散布有抗体的黏膜上，这种分布明显可增强黏膜的防御能力，此外肠道的正常菌群能刺激消化道淋巴组织的免疫保护作用。

二、益生菌增强动物生理机能的作用方式

(一) 竞争性排除

竞争性排除的概念最初来自于对养鸡厂雏鸡的观察，由于采取的现代化管理措施，新孵化的雏鸡无法从亲鸡获得正常的消化道菌群。由于匮乏正常菌群，雏鸡的肠道很容易被致病菌所定殖，其中以沙门氏菌或大肠菌群为主。被沙门氏菌感染的幼禽很少发病，甚至不表现出生长延迟的现象，但作为一种条件致病菌，沙门氏菌会污染由被感染禽类生产的各种产品。如果给刚孵化的幼禽喂食成年禽的回肠内含物，基本上可以消除沙门氏菌的侵染，而且沙门氏菌在幼禽体内成功定殖时所需的数量被极大的提高。

构成竞争性排除的最主要的因素包括竞争消化道壁上的受体部位、由厌氧菌产生挥发性脂肪酸（VFA）和/或其他抗菌物质、不同细菌之间对有限的营养物质的竞争等。Juven 等详细论述了乳酸菌作为益生菌对禽类的特定作用，但在猪或牛的饲养过程中，竞争性排除作为改善猪或牛生理机能的方法尚未系统的研究，部分原因是对这些动物的管理方式存在巨大的差异，但采用部分消化道细菌主要是乳酸菌来改善这些动物的饲养，在过去二十年内已被深入地研究。Fuller 认为这些益生菌可能的作用方式包括：①抑制致病菌和有害细菌的活菌数；②改变肠道菌群的代谢作用（酶活）；③刺激免疫反应。

(二) 改变微生物或宿主的代谢作用

据报道，乳杆菌可影响宿主的胆固醇代谢。Gilliland 等选择一株能在胆盐存在的条件下良好生长并且在体外具有同化胆固醇能力的 *L. acidophilus* 喂食成年公猪，观察其对公猪胆固醇代谢的影响，结果表明 *L. acidophilus* 可以抑制猪因高胆固醇饮食可能引起的血清胆固醇水平上升。Danielson 等给成年公猪喂食在体外具有抗胆固醇血症和抗菌作用的 *L. acidophilus* 后，也观察到类似的作用。

乳杆菌对胆酸的分解作用可能造成对小肠下端和大肠内其他细菌的抑制。Fernandes (1988) 等发现给培养基中添加生理浓度的游离胆酸可降低 *L. acidophilus* 的生长和抗菌作用。Tannock (1989) 则发现，与普通小鼠相比，乳杆菌或乳杆菌与肠球菌缺乏时的小鼠回肠内胆盐水解酶的活性分别降低 86% 和 98%。

除影响胆固醇和胆酸代谢外，乳酸菌还可以减少肠道内有害氮化合物的产生。与喂食未发酵乳的对照组猪相比，喂食由 *L. acidophilus* 制备的发酵乳的猪肠道内胺的产生减少，同时在实验组猪体内产胺的部位从小肠转向盲肠。体外实验表明，*E. coli* 是猪体内胺产生的主要肠道菌。在人的饮食中添加 *L. acidophilus* 以后，可降低粪便中致癌性酶的活性，如 β -葡糖醛苷酶、硝酸还原酶和叠氮还原酶，给大鼠喂食乳杆菌以后，可减少其肠道内从食物中添加的芳香胺和叠氮化合物以及含胺的葡糖醛苷化合物产生的游离胺。

摄入的乳酸菌可以产生和释放水解性酶，从而帮助家畜的消化，尤其是小牛和小猪生长的早期。例如，对 β -半乳糖苷酶缺乏的人而言，其对酸奶中乳糖的消化较乳糖含量相同的牛乳中的乳糖消化更加容易。事实上，喂食酸奶的大鼠小肠内 β -半乳糖苷酶活性增强，而且这种酶活性主要来自于细菌。

部分研究表明，乳杆菌可以消化比乳糖更复杂的碳水化合物。Champ 等 (1983) 从鸡囊腺中分离的三株乳杆菌具有淀粉水解作用。其中淀粉水解作用最强的一株乳杆菌类似

L. acidophilus, 它可以分解淀粉产生麦芽糖、麦芽三糖和少量的葡萄糖, 其淀粉酶的最适 pH 值和温度分别为 5.5 和 55°C。Jonsson 等 (1991) 则在喂食含有 2%β-葡聚糖的玉米糖浆、年龄分别为 3 天和 35 天的仔猪粪便中分离到具有 β-葡聚糖降解能力的乳杆菌, 其数量可达到 10⁶ cfu/g 粪便。具有葡聚糖水解作用的益生菌在含有麸皮和燕麦的禽和猪饮食中非常有用, 因为这些动物体内的酶不能降解 β-D-葡聚糖, 而后者对淀粉的代谢具有干扰作用。

益生性乳酸菌还可以影响宿主刷状缘的酶的活力。Collington 等 (1990) 的研究表明, 给仔猪喂食抗生素或益生性乳酸菌以后, 小肠黏膜上乳糖酶和蔗糖酶活力增强。这两种处理的作用方式可能并不是直接的, 而是通过减少有害细菌代谢产物的产生, 后者会干扰黏膜, 从而影响肠细胞的寿命。不过, Whitt 等 (1987) 则发现多种内源性的乳杆菌对无菌鼠十二指肠细胞的酶活性不产生直接影响, 研究者认为益生菌对消化道黏膜的有益影响可能来自于与肠腔内整个菌群 (如致病菌) 作用的结果。

(三) 免疫刺激

微生物与免疫系统相互作用的证据在很大程度上来自于拥有完整土著菌群的普通动物, 与同类的无菌动物相比, 这些动物体内具有更高的免疫球蛋白水平和吞噬作用。因此, 根据已有的实验结果, 许多研究者认为益生菌对免疫功能的促进作用既可以是局部的, 也可以是系统性的。给无菌小鼠单次接种 *E. faecium* 以后, 即可减少由静脉注射沙门氏菌所引起的脾脏部位感染, 表明 *E. faecium* 引起小鼠系统性的免疫反应; 与此相反, Kluber (1985) 等则发现, 给人工喂养的仔猪服用 *E. faecium* 不引起任何细胞介导的免疫应答。Perdigon 等 (1986) 发现通过口腔途径给小鼠服用 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 后, 小鼠巨噬细胞的吞噬作用增强。Saito (1988) 也观察到 *L. casei* 对小鼠巨噬细胞的激活作用。Lessard 等 (1987) 的研究表明, 给仔猪喂食由乳杆菌混合物发酵的还原脱脂奶后, 猪血清内 IgG 水平出现轻微的增加; 后来, Perdigon 等 (1990) 报道乳酸菌可以增加小鼠的局部免疫作用。口服 *L. casei* 可以增加肠腔内 IgA 的分泌, 从而增强黏膜对 *Salmonella typhimurium* 的抵抗力。以上的研究表明乳酸菌确实具有调节免疫功能的作用, 但目前还缺乏直接的证据来说明。益生菌在商业化饲养的动物体内也具有类似的作用, 因为后者肠道内已经具有非常复杂的菌群组成。

三、动物用乳酸菌

(一) 猪用乳酸菌

三种菌常用作猪的益生菌, 即死的和活的 *Lactobacillus* (主要是 *L. acidophilus*) 或活的 *Enterococcus faecium*, 菌以 10⁴~10⁷ cfu/g 的水平混合于饲料中, 或用这些菌发酵液体饲料, 少数情况下应用多株菌, 大多数菌株缺乏宿主专一性。幼猪摄入乳酸菌的影响如表 8-1 所示, 成年猪的情况如表 8-2 所示。可以发现成年猪能很好消化饲料, 改善免疫, 比幼猪有更强的抗肠道紊乱能力, 从实验无法确定 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 产品的优劣。

Nonsiainen 等应用宿主专一性菌株 *L. fermentum* 和 *E. faecium* 单独摄入或和乳果糖、乳糖醇结合喂食幼猪进行了实验, 其结果如表 8-3 所示。乳酸菌的摄入对幼猪产生有利影响, 日增重明显增加, 总体改进达 5.5%; 猪的死亡率也稍有下降, 益生菌组和对照组分别为 7.7% 和 9.9%。研究表明混合乳酸菌的效果要优于单一乳酸菌, 断奶后用磺胺药物喂食幼猪后, 明显减弱了天然菌的障碍效应, 大大改进了益生菌的竞争性, 由于益生菌的竞争排斥作用导致益生菌摄入组出现明显的体重增加和低死亡率。

表 8-1 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 益生菌对幼猪的影响

益生菌的类型和剂量	结 果			参考文献
	动 物	体 重	饲料/体重	
<i>L. acidophilus</i>	Starter fed	+10.8	-7.2	Bair(1977)
<i>L. acidophilus</i>	Starter fed	无报道数据	无报道数据	Noland 等(1978)
<i>L. acidophilus</i> , 非活菌	Starter fed	+4.7	-6.4	Hale 和 Newton(1979)
<i>L. acidophilus</i> 4×10^6 cfu g^{-1}	Starter fed	+7.2	± 0.0	Pollman 等(1980)
<i>L. acidophilus</i> 750mg/kg(实验 1)	Starter fed	+4.5	-6.7	
<i>L. acidophilus</i> 750mg/kg(实验 2)	Starter fed	+9.7	-21.4	Pollman 等(1980)
<i>E. faecium</i> 1250mg/kg(实验 2)	Starter fed	-7.6	-8.7	
<i>L. acidophilus</i> 4×10^6 cfu kg^{-1}	Starter fed	-1.6	± 0.0	Harper 等(1983)
<i>L. acidophilus</i> 非活菌	乳替代	-8.2	+4.0	Pollman 等(1984)
		-6.8	9.9	
<i>E. faecium</i> , 10^6 (per os)	0~3 周	+0.8	+39.8	
单独	乳替代	-8.3 到 +1.3	-9.5 到 +11.2	Kluber 等(1985)
		-5.7 到 -1.6	+0.0 到 +3.0	
3 天连续				
<i>E. faecium</i> , $10^6 g^{-1}$	断乳	+9.7	无数据	Gualtieri 和 Betti(1985)
<i>L. fermentum</i> $10^9 d^{-1}$ (宿主专一性)	0~9 周	-7.1	无数据	Jonsson(1986)
<i>S. faecium</i> , 2×10^8 cfu/d	Starter fed	11.1	无数据	Mordenti(1986)
<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	脱脂乳	-8.8	18.6	
<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	脱脂乳	-21.0	+19.5	Ratcliffe 等(1986)
<i>L. reuteri</i> (宿主专一性)	脱脂乳	-22.5	+48.3	
<i>E. faecium</i> 10^6 cfu g^{-1}		+2.3	-1.8	
抗生素	Starter fed	+6.3	± 0.0	Roth 和 Kirchgessner(1986)
10^6 cfu g^{-1} + 抗生素		+4.0	± 0.0	
<i>E. faecium</i> 实验 1	Starter fed	-15.4	无数据	Danek(1987)
10^6 cfu g^{-1} 实验 2		+23.3	-10.4	
<i>L. acidophilus</i> 宿主专一性(0.1%)	Starter fed	+10.4	± 0.0	Lessard 和 Brisson(1987)
<i>E. faecium</i> , $10^6 g^{-1}$	Starter fed	提高	提高	Wu 等(1988)
<i>E. faecium</i> , $10^6 g^{-1}$	Starter fed	+13	+2	
抗生素		+24	+11	
抗生素 + <i>E. faecium</i>		+33	+11	
<i>L. acidophilus</i> 10^9 cfu + <i>E. faecium</i> 10^9 cfu 产后口服 3 天	断乳	+14.3	无数据	Tournut(1989)

表 8-2 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 益生菌对成年猪的影响

益生菌的类型和剂量	结 果			参考文献
	动 物	体 重	饲料/体重	
<i>L. acidophilus</i>	成年猪	+8.4	-5.8	Baird(1977)
<i>L. acidophilus</i> 非活菌	成年猪	+4.3	-0.7	Hale 和 Newton(1979)
<i>L. acidophilus</i> 750mg/kg	成年猪	-1.2	-0.9	Pollmann 等(1980)
<i>S. faecium</i> 1250mg/kg	(35~95kg)	-1.2	-0.9	
<i>L. acidophilus</i>	成年猪	-5.8	+3.1	Harper 等(1983)
$4 \times 10^6 kg^{-1}$ (实验 1)	(17~100kg)			
<i>L. acidophilus</i>		+1.3	± 0.0	
$4 \times 10^6 kg^{-1}$ (实验 2)				
<i>L. acidophilus</i>	成年猪	提高	无报道数据	Maxwell 等(1983)
<i>E. faecium</i>		提高	无报道数据	
<i>E. faecium</i> , $10^6 g^{-1}$	成年猪	提高	提高	Wu 等(1988)

表 8-3 宿主专一性 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 对幼猪的影响

实验时间	动物数量	益生菌类型和数量	生长反应	死亡率
1987	108 0~6周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> (10^9 cfu/d) 乳果糖 + 乳糖醇	+14.2	0.0 比 1.1
1987	102 0~5周	<i>Lactobacillus</i> sp. 10^9 cfu d ⁻¹	+1.8	3.9 比 6.8
1991	98 0~11周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> $10^6 \sim 10^7$ cfu g ⁻¹	+15.0	6.8 比 15.9
1991	102 0~11周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> $10^8 \sim 10^7$ cfu g ⁻¹	+5.5	6.6 比 10.7
1991	189 0~10周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> $10^6 \sim 10^7$ cfu g ⁻¹	-5.0	11.6 比 12.6
1991	106 0~11周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> (10^9 cfu/d) 乳果糖 + 乳糖醇	-3.5	15.6 比 19.5
1991	130 0~10周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> $10^6 \sim 10^7$ cfu g ⁻¹	+4.7	9.7 比 2.7
1991	50 0~7周	<i>E. faecium</i> + <i>L. fermentum</i> (10^9 cfu/d) 乳果糖 + 乳糖醇 <i>L. fermentum</i> + <i>L. acidophilus</i> (10^9 cfu/d)	+11.2 +6.0	

(二) 牛用乳酸菌

表 8-4 是 1978~1990 年间应用乳酸菌效果的总结, 表中数据表明乳酸菌有利于牛的增重, 平均增重比例 4.6%, 这和猪的增重效果相似。

表 8-4 *Lactobacillus* 和 *Enterococcus* 对牛的影响

益生菌的类型和数量	动物	结 果		
		体 重	饲料/体重	参 考 文 献
<i>L. acidophilus</i> + <i>L. lactis</i> (发酵乳)	小牛	-11.6	无反应	Morril 等(1997)
<i>L. acidophilus</i> 10^6 cfu L ⁻¹ 乳	小牛	无反应	无反应	Ellinger 等(1978)
<i>L. acidophilus</i>	小牛	无反应	无反应	Hutcheson 等(1980)
<i>Lactobacillus</i> 发酵产品	小牛(0~8周)	+5.3	无反应	Schwab 等(1980)
	小牛(0~10周)	+28.3	-1.5	
<i>Lactobacillus</i> 发酵产品	断乳牛(28天)	-8.5	无反应	Dew 和 Thomas(1981)
<i>Lactobacillus</i> (死菌)	断乳牛(35天)	无反应	减少	Kiesling 和 Lofgreen (1981)
	转移牛(28天)	改进	改进	
<i>Lactobacillus</i> (活菌)	转移牛(28天)	无反应	无反应	Kiesling 等(1982)
<i>E. faecium</i> 0.5×10^7 g ⁻¹	小牛	改进	改进	Burgstaller 等(1983)
<i>Lactobacillus</i> sp. 0~21天 0~9周	小牛	-0.3	无数据	Owen 和 Larson(1984)
<i>E. faecium</i> 1.0×10^7 g ⁻¹	小牛	无反应	无反应	Burgstaller 等(1985)
<i>L. acidophilus</i> $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/天	小牛 0~7周	-7.6	+1.8	Jonsson 和 Olsson(1985)
<i>E. faecium</i> 10^6 cfu/g MR	小牛 0~8周	+4.1	-7.6	Havrevoll 等(1988)
<i>L. acidophilus</i> 10^6 cfu/g MR	小牛 0~10周	+0.5	-4.0	
<i>E. faecium</i> 10^{10} cfu/g MR(0~5天)	小牛 30天	+20	无数据	Tournut(1989)
<i>Lactobacillus</i> sp. $0.8 \sim 8.0 \times 10^6$ cfu/g MR	小牛	+6~7	-4~5	Vanbelle 等(1989)
<i>Enterococcus</i> sp. $0.8 \sim 8.0 \times 10^6$ cfu/g MR	小牛	+3~4	-23	
<i>L. fermentum</i> + <i>L. delbrueckii</i> + 乳糖醇	转移牛 4~10周	+15	无数据	Nousiainen(1991)

(三) 反刍动物用乳酸菌

乳酸菌在反刍动物饲料中的应用效果如表 8-5 所示。复杂瘤胃微生物形成对益生菌的障碍, 故在瘤胃发酵的影响方面呈多样性, 解释起来较为困难。

表 8-5 乳酸菌对反刍动物的应用

处 理	益 处	研 究 者
<i>L. acidophilus</i>	瘤胃中挥发性乙酸、丙酸变化	McCormick(1984)
<i>L. acidophilus</i>	降低乙酸:丙酸比率,产生较多挥发性酸和较好的纤维消化	McCormick(1984)
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. faecium</i> + <i>S. cerevisiae</i>	增加了泌乳量和脂肪含量	Hoyos 等(1987)
<i>L. acidophilus</i>	在体重和健康方面无益处	Rust 等(1989)
<i>Bifidobacterium</i> sp.		
<i>L. faecalis</i>		
<i>L. lactis</i>	在体重和健康方面无益处	Rust 等(1989)
<i>L. acidophilus</i>		
<i>B. subtilis</i>		

McCormick (1984) 观察了瘤胃发酵的变化情况, 他用 *L. acidophilus* 喂食小公牛, 益生菌对于反刍动物消化道的最大影响在于网状型瘤胃。反刍动物在肠道的发酵反应要较非反刍动物复杂, 如雌鹿若摄入发酵产物(乳酸和其他挥发性酸)能减少饲料摄入量。

四、结论

乳酸菌应用产生不同效果是因为环境和体系的复杂性所致。在宿主动物肠道内已定殖了具有益生特征的优势乳酸菌时, 益生乳酸菌的改进效果不明显。但当由于环境因素如管理方法和膳食引起动物肠道菌群失衡时, 高质量的益生菌能够改善动物的生理状况, 如增加体重和减少死亡率等。另外应用乳酸菌的性质、剂量和基础乳酸菌概念形成一致性, 如应用乳酸菌的剂量太低以致无法克服天然存在微生物的影响, 或者未应用合适的乳酸菌类型。分离肠道菌对于工业化生成的敏感性和复合饲料的加工也是一实际问题。在长时间应用过程中乳酸菌可能失去其黏着能力, 这是由于它自身质粒的消失, 故应注意改善益生菌的耐受性和存活性, 对于 *Lactobacillus* 类菌株尤其应该如此。为了克服益生菌自身的问题, 目前常将益生菌和非消化糖相结合, 使益生效果更明显。

第二节 益生性 *Propionibacterium*

在历史上 *Propionibacterium* 被用作乳品生产的发酵剂而倍受注目, 它常用于瑞士干酪的生产, 在生产过程中具有产丙酸的能力。

Propionibacterium 分类情况如表 8-6 所示, 一般将其分为皮肤和乳品类。乳品组 *Propionibacterium* 主要从乳产品和青贮饲料中分离, 这些微生物商业上用于丙酸的生成, 它通常被看成是食品级的微生物。皮肤类 *Propionibacterium* 是作为正常菌从人的皮肤中分离得到, 人、鸡和猪粪便中也有该菌的存在。*Propionibacterium acnes* 是和人的皮肤相关的微生物, 它和人的偶发性感染有关。

近年来应用遗传方法进行的 *Propionibacterium* 分类研究表明, 皮肤类和乳制品类 *Propionibacterium* 之间的亲缘关系比较远, 这种差异是以不同种的 16rRNA 的比较为基础的。由

表 8-6 丙酸菌的初步分群

乳 品 类	皮 肤 类
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Propionibacterium frudenreichii</i>	<i>Propionibacterium avidum</i>
<i>Propionibacterium jensenii</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
<i>Propionibacterium theonii</i>	<i>Propionibacterium lymphophilum</i>

于这两类 *Propionibacterium* 存在环境的差异, 导致其进化为 *Propionibacterium* 的两个差异性种类。

一、乳品发酵剂

在乳品发酵剂中 *Propionibacterium* 的应用是十分活跃的研究课题, 在乳品中应用的种包括 *P. jensenii*、*P. acidipropionici*、*P. theonii* 和 *P. freudenreichii*。 *Propionibacterium* 在干酪加工中通过蛋白分解和产生丙酸, 对产品风味化合物的产生具有重要作用。

在瑞士干酪成熟过程中, *Propionibacteria* 利用其他发酵剂产生的乳酸, 产生二氧化碳而使产品具有气孔质地。干酪中环境 *Propionibacteria* 菌株是自溶性的, 它能降解干酪中存在的肽和氨基酸, 这种活性可增加干酪中的脯氨酸, 对风味的形成有所帮助。

二、丙酸菌用作保藏剂

丙酸对一定种类的细菌和真菌具有抑制作用, 因此 *Propionibacteria* 可添加于食品用作食品保藏剂。丙酸通过它在菌体细胞内的积累达到对细菌和真菌的抑制目的, 最终也形成对酶的抑制作用。

由于 *Propionibacteria* 能够抑制腐败菌, 故其常用于面包的加工, 以防止 *Bacillus mesentericus* 类微生物引起面包的黏性质构。在世界许多国家丙酸被允许作为食品的保藏剂。通过应用 *Propionibacteria* 和乳酸菌, 面包的保质期能够延长 2~4 天。

商业化的被称之为 Microgard 产品添加于食品, 防止革兰氏阴性菌的生长, Microgard 是由 *Propionibacteria shermanii* 的代谢物质加工而成的, 其有效成分为细菌素, 次要有效成分是有有机酸如丙酸等。其他商业化产品 BioProfit 主要在欧洲应用, 它含有 *L. rhamnosus* LC-705 和 *P. shermanii* JS 菌株, *L. rhamnosus* 可单独应用, 后者的添加增强了对真菌的抑制作用。

丙酸菌添加于青贮饲料中可防止有害微生物生长, 并通过产丙酸而改善了产品的保质期。 *P. shermanii* 和 *L. rhamnosus* 结合应用能成功地抑制青贮饲料中酵母和霉菌地生长, 和未添加两种菌的产品比较, 肠道菌、*Clostridia* 和真菌的生长均受到抑制。

三、丙酸发酵

几十年来对商业化丙酸发酵进行优化一直是生物化学家处理乳清和获得廉价丙酸所期望的, 这种发酵主要利用下列丙酸菌: *P. acidipropionici*、*P. shermanii* 和 *P. freudenreichii*。

不幸的是在这种发酵中只能生成相对低浓度的丙酸, 一般为 1%~3%, 丙酸从发酵产物中提取的复杂性限制了应用这种技术进行丙酸的商业化生产。丙酸发酵有时应用两种发酵剂, 首先应用的菌能够利用乳清中的乳糖产生乳酸, 这种菌要求同型发酵, 常用 *Lactobacillus*; 第二种菌为 *Propionibacterium*, 它能利用乳酸产生 CO₂、乙酸和丙酸。

四、*Propionibacteria* 作为益生菌的应用

关于 *Propionibacteria* 作为益生菌应用的文献和研究不多, 这是和其他作为益生菌的乳酸菌如 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 比较而言。Martene 等认为 *Propionibacteria* 具有抵御胃酸的能力, 故 *P. freudenreichii* 将可作为益生菌应用; 应用 *P. freudenreichii shermanii* 进行鼠和猪的喂养实验时, 发现它对体重增加有一定作用。Kornyeva (1981) 报道 *P. shermanii* 能够定殖于健康婴儿和细菌性胃肠炎婴儿的消化道。其他的研究也报道食用含有 *Propionibacteria* 的发酵乳产品在防止婴儿被 *Salmonella* spp. 和 *Shigella* spp. 感染方面是有效的。

丙酸菌对肠道上皮细胞黏着性质是其能够作为益生菌的决定因素, 因为这决定了菌可在

胃肠道存活和停留多长时间。Lehto 等 (1997) 证实 *P. freudenreichii* JS 有类似于 *Lactobacillus* sp. GG 的水平黏着于 Caco-2 肠上皮细胞, 即其能和 Caco-2 细胞很好的黏着。Caco-2 用 *L. rhamnosus* LC-705 处理后发现有少量的 *P. freudenreichii* JS 细胞, 这表明在肠上皮细胞上这些菌对于结合位存在着竞争。许多 Propionibacteria 结合于肠上皮细胞的能力越来越多的得到研究者的确认, 下一步的工作包括 Propionibacteria 在体内的定殖性, 以及在其他菌存在情况下它于胃肠道的存活和定殖情况。

目前尚无 Propionibacteria 在消化道对病原菌抑制, 或对人体健康有益的临床证据, 但 *Propionibacterium* spp. 能够定殖于人体消化道的事实已被确认。最近 *P. acnes* 被发现存在于人的胆结石内。Propionibacteria 和丙酸具有食品抗菌剂的作用也表明了它在防止胃肠道感染方面的潜在作用。通过挥发性酸的产生降低肠道 pH 值, 尤其是结肠的 pH, 能对肠道菌群平衡和调整产生有益作用。

Chaia 等 (1995) 报道了雄鼠摄入 *P. acidpropionici* CRL 1198 的情况, 在摄入此菌后在鼠的粪便中观察到 Propionibacteria 菌由 10^6 cfu/g 上升为 10^9 cfu/g; 当该菌的摄入停止后, *Propionibacterium* spp. 的菌数保持 10^9 cfu/g 水平 14 天。这一研究表明当摄入 *Propionibacterium* 停止后菌至少能在鼠的肠道存活 7 天。网状内皮系统的吞噬细胞活性刺激, 腹膜巨噬细胞吞噬活性增加, 以及血脂水平的降低, 均在菌的摄入过程中被发现。

和其他消化道的厌氧微生物比较 Propionibacteria 的生长相对缓慢, 在胃肠道系统, 它的实际定殖和作用目前尚不能精确确定。大量的 Propionibacteria 在人的粪便中测定到, 约 $10^8 \sim 10^{10}$ cfu/g 干粪便, 分离菌株通常被确认为皮肤的 *Propionibacterium* spp., 即 *P. acnes*、*P. avidum* 和 *P. granulosum*。

(一) 丙酸产生和乳酸利用

Propionibacterium 能够利用乳酸产生丙酸, 在消化道高水平的丙酸对于结肠的完整性是有用的, 因此 Propionibacteria 在肠道的存在是有益的, 它能够利用 *Bifidobacteria*、*Lactobacilli* 和其他菌产生的乳酸, 进而生产丙酸达到益生作用。

(二) 对 *Bifidobacterium* spp. 的生长刺激作用

Kaneko 等 (1994) 报道 *Propionibacterium freudenreichii* 能够产生双歧增殖因子, 它被发现存在于无细胞过滤液中。产生的双歧因子能促进 *Bifidobacterium longum*、*B. bifidum*、*B. adolescentis* 和 *B. breve* 的生长, 它不受蛋白质酶、羧肽酶 A、核酸内切酶或核酸酶 P1 的影响。由 *P. freudenreichii* 7025 产生的双歧增殖因子在短链脂肪酸存在条件下具有促进 *Bifidobacteria* 生长作用, 它对 *Bifidobacteria* 生长的刺激作用较单独丙酸要大。这种促进生长因子存在于发酵剂上清液的甲醇提取物中, 其分子量 < 3000 Da。

这些结果表明在混合发酵情况下, Propionibacteria 和 *Bifidobacteria* 的生长间存在直接关系。Kaneko 等 (1994) 证实当 *P. freudenreichii* 7025 被添加于发酵剂系统, 在 *Clostridium perfringens* 7028 存在条件下, *B. adolescentis* 6003 的活菌数量增加。

(三) 食品级菌株

虽然在人肠道中 Propionibacteria 的组成不清楚, 但可确认其主要菌株为 *P. acnes*, 但乳制品中的 Propionibacteria 也能够定殖于人的消化道。由于乳品 Propionibacteria 已广泛地被确认为食品级微生物, 故其可考虑作为人体益生菌株使用。

(四) 肠道微生物

皮肤类 Propionibacteria 是人和动物肠道内丙酸菌中的优势菌株, Propionibacteria 菌株

在人肠道中的主要作用和它们的分布尚不清楚。在健康人肠道存在 *Propionibacteria* 的事实从一个侧面说明了它具有作为人体益生菌的潜力，进一步的工作是选择能定殖于人肠道的菌株作为益生菌，以使它们能被认为是人体“正常的微生物”。

(五) 胆汁酸解离和胆固醇吸收

Propionibacteria 能够在体内阻碍胆固醇合成和保留胆固醇，这种能力类似于其他菌，这被认为在降低人体血清胆固醇的水平方面是有效的，这缘于胆固醇是和菌体细胞结合在一起的，这样可使其未被人体吸收即可排除体外。

(六) 细菌素的产生

在益生菌选择时的一个重要因素是其能够产生细菌素，这可使其在肠道定殖过程中处于优势地位，细菌素或其他代谢物质的产生可为这种定殖功能服务。现已有多个关于 *Propionibacterium* spp. 产生细菌素和类细菌素物质的报道。

Fujimura 等 (1978)、Paul 等 (1988) 报道了两种 *Propionibacterium acnes* 的类细菌素物质。它们具有蛋白质性质，和细胞相连。Acnecin 对其他 *P. acnes* 和 *Corynebacterium parvum* 具有抑制活性；由 *P. acnes* RTT 108 产生的物质具有广谱的抑菌活性，对革兰氏阴性和阳性微生物均具抑制作用。

Al-Zoreky 等 (1993) 在 *P. freudenreichii* 发酵剂上清液的商业制备物中发现细菌素活性，它能抑制革兰氏阴性菌。Grinstead 等 (1992) 描述了 *P. jensenii* P126 产生的细菌素，它能抑制 *Propionibacterium* spp.、*Lactococcus* spp. 和 *Lactobacillus* spp. 的生长。Lyon 等 (1991) 研究了 *P. theonii* 产生的其他细菌素，它对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母氏霉菌以及 *Propionibacterium* spp. 具有活性。

仅有一部分 *Propionibacterium* 的菌株具有产细菌素的活性。其细菌素的抑菌谱可能非常广，也可能呈非专一性。在 *Propionibacteria* 作为益生菌株的研究中，完全可能分离出能定殖于人和动物肠道的菌株，这可为这种菌作为益生菌使用奠定基础。

(七) 免疫调节

通过将 *Propionibacteria* 的细胞注入不同的动物来评价其免疫调节作用。Pulverer 等 (1994) 证实给鼠注射 *P. avdium* KP-40 后降低了 RAW 117-H10 淋巴肉瘤在肾组织中的定殖。Mará 等 (1994) 认为 *P. acnes* 细胞对于 *Listeria* 菌感染具有抗性，它能防止肉瘤 180 的致死作用，活化了网状内皮系统。其活性成分存在于酚-水提取的残留物中。

这两个例子说明 *P. acnes* 具有免疫调节能力，它能够刺激系统和局部免疫系统，它对微生物和某些类型的癌症具有有限的抑制作用。

免疫调节作用的研究不仅通过 *Propionibacterium* spp. 的注射实现，也可通过它在无菌鼠的定殖实验进行研究。这和通过定殖乳酸菌研究免疫刺激呈相似性。结果表明通过 *Propionibacteria* 消化的刺激免疫系统和其他乳酸菌刺激免疫系统一样呈相关性。通过消化 *P. acidipropionici* CRL 1198 的鼠的免疫调整由 Perez 等 (1995) 进行了研究，Gil 等 (1982)、Pulverer 等 (1990) 直接应用 *Propionibacteria* 处理疾病，将其作为免疫刺激因子应用。

五、*Propionibacteria* 的安全性

目前尚未发现 *Propionibacteria* 存在任何毒性，但在其作为益生菌前仍需其在食品中的广泛应用来验证其安全性。

近年来在胆结石中发现了 *P. acnes*，但目前尚不知道这种微生物的存在和骨形成之间的

关系,这种微生物在骨中的存在很可能是随机的。Funke等(1997)发现在手术后的患者中存在 *P. acnes* 的偶发感染问题。Kooijmans等(1989)报道了皮肤 Propionibacteria 存在和类风湿关节炎发生间存在假定的联系,这可能和系统免疫的非专一性刺激相关,这涉及下列菌 *P. acnes*、*P. avidum* 和 *P. granulosum*。在美国进行的流行病学研究表明 *P. acnes* 是不常见的,但它是潜在的重要病原菌。

在医院手术后皮肤的 Propionibacteria 引起的感染经常发生,这种感染无一例外是由皮肤引起,这类菌具有透明质酸酶活性,因而提高了它们的病原性质。

来自 Propionibacteria 的病原影响可能性使其作为益生菌产生了问题,故在乳品中应用 Propionibacteria 更容易被人们接受,所以应对乳用菌株测定它们的毒性以确保它们作为益生菌的安全性。

六、蛋白酶活性

乳品 Propionibacteria 具有蛋白酶活性,能够降解结合于细胞膜上的酪蛋白(Dupuis等,1995)。Ostlie等(1995)发现在瑞士干酪中细胞自动溶解时 Propionibacteria 菌释放氨肽酶。

Macfarlane等(1980)报道在人肠道中发现具有蛋白酶活性的主要菌是 *Propionibacterium* spp., 并从其一分离物中确认存在胞内蛋白酶。虽然测试的 *Propionibacterium* spp. 分离物的蛋白酶活性较低,但 *Propionibacterium* spp. 在粪便中高几率的出现使其蛋白酶活性变得重要。他们进一步的研究表明 *P. acnes* (由人回肠分离)分泌胞内酶,其胞内蛋白酶活性受 EDTA 抑制,受 PMSF 部分抑制。

Propionibacterium spp. 的蛋白酶使其作为益生菌应用成为一个问题,由于氨基酸的脱氨、脱羧作用产生的物质,当其被肠道吸收时是宿主微生物的潜在有害物质;故 *Propionibacterium* spp. 欲作为益生菌应用,其蛋白水解作用必须详细研究。

七、结论

Propionibacterium spp. 菌株作为益生菌已展现了良好的前景。乳品类 *Propionibacterium* spp. 由于其消化的安全性为其作为新的益生微生物提供了良好的机会。皮肤类 Propionibacteria 具有特异的调整宿主免疫系统的能力,它在人胃肠道存在;但这组 Propionibacteria 是和人的疾病相联系的。除非这种微生物的无毒性菌株被分离或通过生物工程方法得以改良,这类 Propionibacteria 用作益生菌是有限制的。

许多研究者一直在不断的研究 *Propionibacterium* spp., 研究其与肠道微生物的关系。从其作为新益生菌的角度,应着重研究它定植于人和动物肠道的能力,以及它在胃、消化道的存活性;另外其病原性研究也十分重要。当这类菌株生产时,再进行实验验证这些菌株在人或动物体内的益生作用,最终筛选出具有益生作用的 *Propionibacterium*。

第三节 *Lactobacillus reuteri* 作为动物益生菌的应用

L. reuteri 早期被定为 *L. fermentum* 的亚种,现被分类作为异型发酵的肠道 *Lactobacillus*, 它在人、牛、猪、禽和其他动物的胃肠道内广泛存在。Mitsuoka(1992)报道此菌是肠道 Lactobacilli 的主要成分,是人和所有哺乳动物及鸟类肠道内的原生菌。

从不同宿主分离的 *L. reuteri* 菌株具有不同的菌落形态学特征,但其具有相似的生理和遗传特征,这种情况可能是 *L. reuteri* 为了适应不同宿主的结果。迄今为止已从鼠、田鼠、沙士鼠、禽、火鸡、猪和家庭宠物肠道中分离出 *L. reuteri*, 人和猪乳中均分离出 *L. reuteri*。

对于猪而言, *L. reuteri* 能在乳头、乳、出生一天后猪的粪便和所有的幼猪胃肠道部位测定到。对禽类而言是由母体将 *L. reuteri* 传递给幼体。黏着性质研究表明 *L. reuteri* 1063 (猪专一性菌株) 有相对的疏水表面。

L. reuteri 具有独特的性质, 它是惟一能在体内产生和分泌具有抗菌活性代谢中间体的肠道菌株, 这种中间体对周围环境具有潜在的抗菌活性, 被称为 reuterin, 它是甘油经过脱水随后被还原为 1,3-丙二醇两步反应的中间物, 由 3-羟基丙醛等摩尔的单体、水合单体和环化二聚体组成。15~30 μ g/ml 的 reuterin 能抑制革兰氏阳性、阴性菌、酵母菌和真菌以及 Protozoa 的生长, 浓度提高 4~5 倍以后才能杀死乳酸菌, 包括 *L. reuteri*; 目前尚不清楚乳酸菌为何有更高的对该物质的抗性, 有的学者认为对 reuterin 抗性的差异可能有助于调节胃肠道微生物的组成。

负责将甘油转化为 reuterin 的是依赖于辅酶 B₁₂ 的甘油脱氢酶, 该酶已从 *L. reuteri* 中得以纯化和分离, 同时从 *L. reuteri* 中也分离得到了 NAD⁺ 依赖氧化还原酶, 它具有将 reuterin 还原为 1,3-丙二醇的能力。这两种酶使 *L. reuteri* 可选择甘油作为碳水化合物发酵过程中的氢受体, 它能提供更大的 ATP 产量, 增加生长速率和获得更高的生物量。*L. reuteri* 产生的 3-羟基丙醛仅是中间的过渡性产物, 它立即被还原为 1,3-丙二醇; *L. reuteri* 具有特殊的产生更多 3-羟基丙醛的能力, 这比生物需求能量期望的更多, 这种过量分泌伴随着对周围环境的抗菌活性。

体外 reuterin 产生的 pH 和 Eh 和其在小肠、大肠发现的条件呈类似性, 这就意味着 reuterin 在肠的末端产生的可能性大, 此处具有足够量的甘油作为瘤胃微生物的发酵底物。作为甘油的上皮细胞受体在猫小肠中得到确认, 但现仍有许多原因尚不能确认 reuterin 在肠道产生, 首先没有甘油在肠任何区域数量的数据可供利用; 其二我们不清楚 *L. reuteri* 在肠道的什么地方被发现; 其三即使知道这些因素, 由于微生物细胞的快速变化及和巯基、氨基的自发反应, 使 reuterin 产生的评估变得十分困难, 对于许多动物而言, reuterin 在整个胃肠道均存在较为丰富的量。

Stahl 等 (1994) 以染色体 NDA 限制内切核苷酸酶分析为基础发展出新的 *L. reuteri* 分类方法。*L. reuteri* 在人肠道的不同部位被发现, 其 19 株 *Lactobacillus* 菌的 5 株能定殖于成人肠黏膜。*L. reuteri* 呈宿主专一性, 在 6 个不同测试的 *Lactobacillus* 中仅有一种鼠的 *L. reuteri* 能有效的定殖于鼠黏膜, 故在不同的益生菌摄入中应该应用宿主专一性菌株。

一、*L. reuteri* 在禽类中的应用

鸡和火鸡仅能定殖较少量的 *L. reuteri*, 宿主专一性菌的摄入量导致其较好的定殖, 这种发现为 *L. reuteri* 益生菌潜力的评估打开了方便之门, 但也有其他方法。

(一) *L. reuteri* 的定殖情况

Casas 等 (1998) 研究的 *L. reuteri* 在禽类的定殖情况如表 8-7 所示。由表可知对照组和 *L. reuteri* 处理组能定殖相对高数量的 *Lactobacillus*, 其数量为 $5 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^{11}$ cfu/g 盲肠物质, 在总 *Lactobacillus* 中 *L. reuteri* 的数量在 *L. reuteri* 处理组是明显高的, 达到总 *Lactobacillus* 量的 30%~80%, 而对照组仅为 10%。另一个情况是在未有 *L. reuteri* 摄人的禽类中仅有 20% 定殖了 *L. reuteri*; 其他的研究结果也表明在商业化禽类中约 10% 定殖了 *L. reuteri*。以这些数据为基础可以用未摄人 *L. reuteri* 组为对照组来决定摄人 *L. reuteri* 的效果。

表 8-7 在 5 天幼禽肠道 *L. reuteri* 的定殖率

处 理	Lactobacillus/(cfu/g 盲肠物质)		
	总 菌 数	<i>L. reuteri</i>	比 例/%
对照组	9.0×10 ⁸ 到 1.5×10 ¹⁰	1.5×10 ⁵ 到 1.2×10 ⁸	20
+ <i>L. reuteri</i>	5.0×10 ⁷ 到 3.7×10 ⁹	4.0×10 ⁷ 到 1.1×10 ⁹	80

(二) *L. reuteri* 对禽类生长的影响

禽类的生长障碍主要源于膳食中蛋白质的缺乏，用 *L. reuteri* 处理或和 monensin、抗生素一起结合能明显改善蛋白质缺乏造成的生长障碍。当蛋白质充分时这种处理无任何生长方面的影响，但当蛋白量减少 16.1% 时其改善生长障碍效果明显，其情况如表 8-8 所示。抗生素或益生菌处理能达到相同的改善生长障碍效果，这是因为二者具有相同的作用模式。

表 8-8 *L. reuteri* 对蛋白缺乏禽类的体重影响

膳 食	处 理	体 重		膳 食	处 理	体 重	
		体重/g	增加/%			体重/g	增加/%
19.9%蛋白质	对照	601	—	16.1%蛋白质	对照	530	—
	+ Mon., Bact.	609	1.3		+ Mon., Bact.	549	3.5
	+ Mon., Bact., Lr	609	1.3		+ Lr	553	4.3
	+ Lr	609	1.3				

虽然鸡较其他禽类更为耐寒，但观察结果表明鸡对低温仍呈敏感性，其情况如表 8-9 所示。低温明显增加了幼鸡的死亡率。实验一中虽然 *L. reuteri* 在两种情况下稍微刺激鸡的生长，但其影响和最好相比是较低的；实验二表明 *L. reuteri* 处理能大大改善低温和 *Salmonella* 感染引起的生长障碍，但死亡率没有改善。实验三中不仅由冷和 *Salmonella* 引起的生长障碍得以改善，即体重增加 9.4%，且死亡率大幅下降，由 28% 下降为 6%；图 8-1 是从实验三获得的结果。从图中可以看出外界压力引起的死亡发生在出生后 3~6 天之间，*L. reuteri* 对体重生长的影响在其出生一周后变得明显。*L. reuteri* 诱导了幼鸡的羽毛发育。

表 8-9 对 21 天鸡生长和死亡率的影响（低温或感染 *Salmonella* 的情况）

情 况	体 重/g	体重变化/g	p	死 亡 率
1 NB-C	758			0
NB-Lr	781	+3.0	0.22	1
SB-C 70 °F	749			0
SB-Lr 70 °F	767	+2.4	0.29	0
2 SB-C 74 °F + St(10 ⁵ cfu)	735			0
SB-Lr 74 °F + St(10 ⁵ cfu)	771	+4.9	0.01	0
3 SB-C 65 °F + St(10 ⁴ cfu)	640			28
SB-Lr 65 °F + St(10 ⁴ cfu)	700	+9.4	0.02	6
4 SB-C 65 °F + St(10 ⁶ cfu)	750			4
SB-Lr 65 °F + St(10 ⁶ cfu)	769	+2.5	0.19	0
5 NB-C	751			0
NB-Lr	769	+2.4	0.13	0
SB-C 65 °F + St(10 ⁶ cfu)	733			21
SB-Lr 65 °F + St(10 ⁶ cfu)	772	+5.3	0.01	11
6 SB-C 65 °F	565			40
SB-Lr 65 °F	609	+7.8	0.02	25
SB-C + St(10 ⁷ cfu)	542			3
SB-Lr + St(10 ⁷ cfu)	644	+18.8	0.01	1

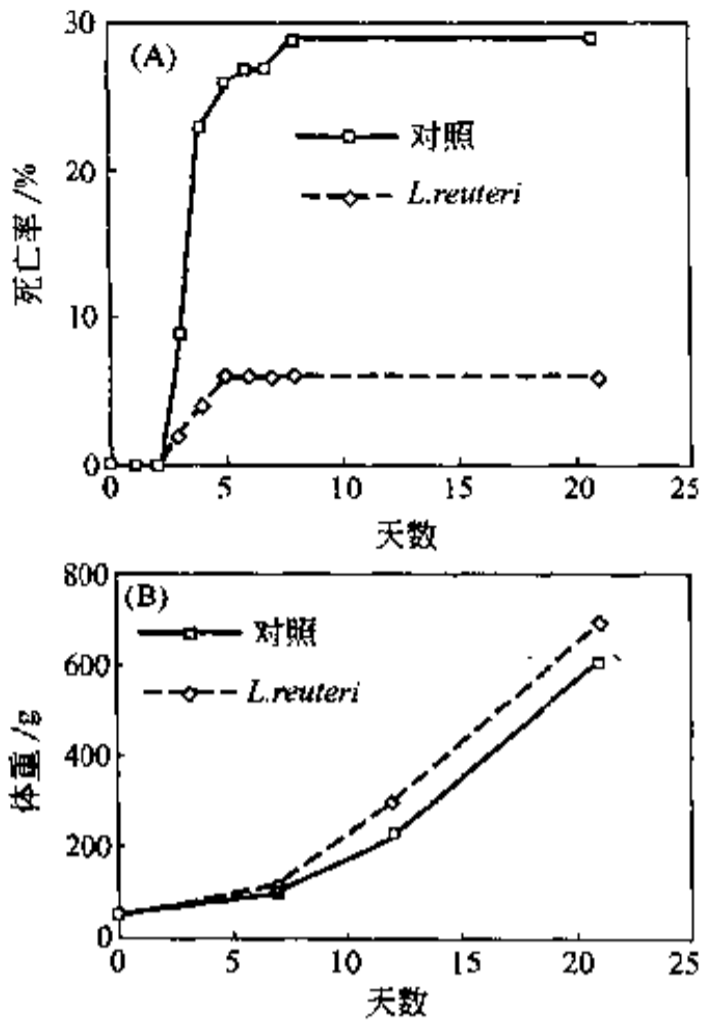


图 8-1 *L. reuteri* 对幼鸡生长和存活率的影响 (A) 死亡率 (B) 体重

综合以上研究可以看出 *L. reuteri* 对于调整外界环境敏感幼鸡的生长障碍是有效的，同时对减少幼鸡的死亡率也是成功的。

(三) *L. reuteri* 对鸡和火鸡盲肠 *Salmonella* 感染的影响

为了测定 *L. reuteri* 对盲肠 *Salmonella* 影响的有效性，Casas 等 (1998) 对出生 1 天或 5 天的幼鸡喂食 *S. typhimurium*，这种菌对幼鸡有较高的病原性。微生物分析的结果如表 8-10 所示。一周内出生鸡 *L. reuteri* 处理对鸡盲肠的总菌数或 *S. typhimurium* 感染有较少或没有影响，但对 14 天和 21 天出生鸡可有 2 个对数周期的总菌数或 *Salmonella* 菌的下降。对出生 1.5 天幼鸡 *L. reuteri* 的影响如图 8-2 所示，对孵化鸡也有 2 个对数周期总菌数和 *Salmonella* 下降的影响，1 天出生鸡也有下降，但对 5 天鸡 *L. reuteri* 处理对 *Salmonella* 下降没有作用，盲肠中 *Salmonella* 的量仍在 $10^5 \sim 10^6$ 的水平。据此可以得出以下结论：

①鸡出生时间越短，*L. reuteri* 处理对 *S. typhimurium* 的盲肠定殖影响越大；②*L. reuteri* 对盲肠内 *Salmonella* 的定殖有 2 个对数周期影响，但仅对刚出生不久的鸡有效。*L. reuteri* 降低 *Salmonella* 作用源于它的抗 *Salmonella* 抗体的分泌活性。

表 8-10 *L. reuteri* 处理对鸡盲肠总菌数和 *Salmonella* 的影响 (在鸡出生的前 3 周)

菌	处 理	lg cfu/g 盲肠						
		1 天	3 天	4 天	5 天	7 天	14 天	21 天
Enterobacteria	对照	10.0	10.4	10.4	9.2	ND	ND	ND
	<i>L. reuteri</i>	10.3	9.9	9.5	8.8	ND	ND	ND
<i>S. typhimurium</i>	对照	ND	6.2	ND	ND	6.1	4.6	4.2
	<i>L. reuteri</i>	ND	6.0	ND	ND	6.0	2.8	2.1

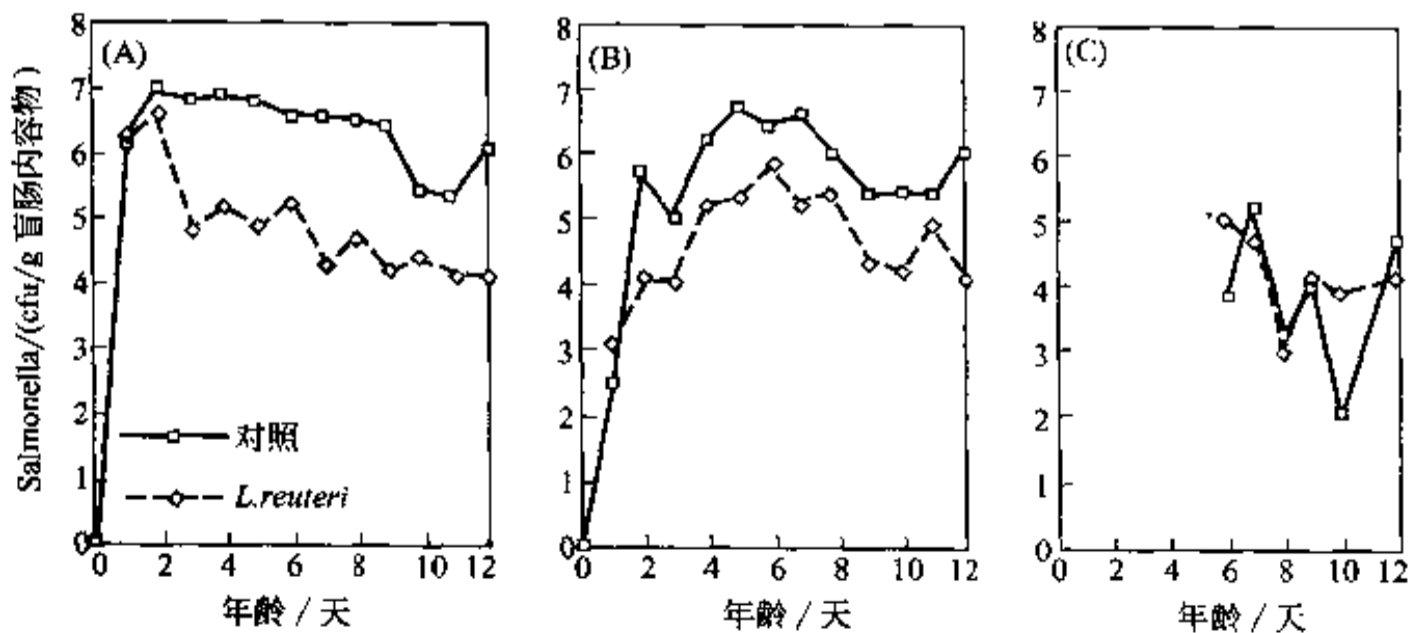


图 8-2 *L. reuteri* 对盲肠 *Salmonella* 的影响 (*S. typhimurium* 2×10^8 cfu/个)
(A) 在孵化中；(B) 出生 1 天；(C) 出生 5 天

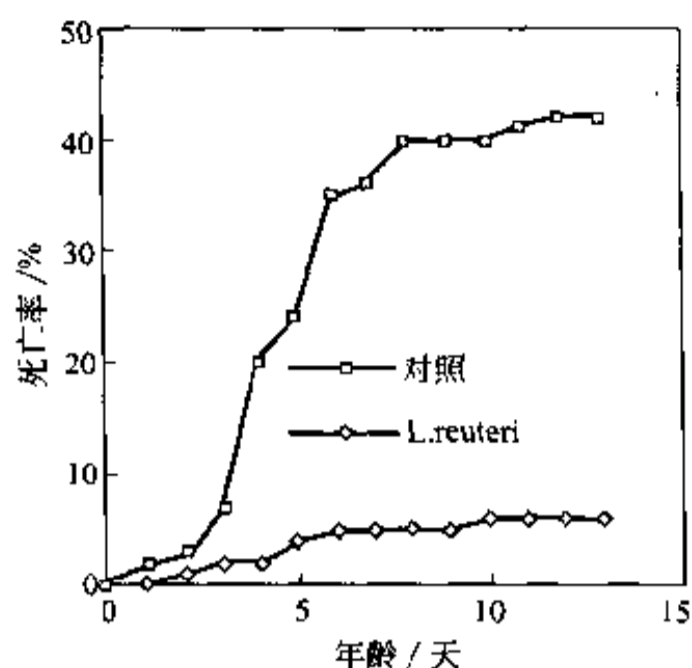


图 8-3 *L. reuteri* 对鸡死亡率的影响
(鸡孵化时感染 *Salmonella*)

图 8-3 表明 *S. typhimurium* 的有害影响和 *L. reuteri* 的保护作用。表明再孵化过程中接种 *S. typhimurium* 引起幼鸡出生 3~7 天后死亡, *L. reuteri* 在防止这种死亡方面非常有效。盲肠内微生物的测定结果如表 8-11 所示, 对照组高度感染了 *S. typhimurium*, 尤其是较早孵化出来的鸡, 它暴露于病原菌的时间更长, 在这些鸡的盲肠中无 *L. reuteri* 存在。相反的 *L. reuteri* 处理幼鸡在盲肠中能很好定殖, 它们减少了 *Salmonella* 的感染。

(四) 孵化蛋中接种 *L. reuteri* 对病原菌的影响

研究表明将 *L. reuteri* 接种于已孵化 24~27 天的火鸡蛋和已孵化 18 天的鸡蛋中, 在孵化前即能产生盲肠定殖, 且对孵化率没有影响。先于孵化卵中接种 *L. reuteri*, 再在幼鸡孵化出后接种 *Salmonella*, 表 8-12 是二者的作用结果。接种 *Salmonella* 的对照组到 40 天死亡了 41%, 36% 是出生 6 天后死亡; 而 *L. reuteri* 处理组 40 天死亡率仅有 9%, 比对照组平均重 11%。

表 8-11 *L. reuteri* 处理对盲肠中各类菌的影响 (出生 1 天的鸡, 在孵化蛋中感染 *Salmonella*)

情 况	lg (cfu/g) 盲肠物质		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. reuteri</i>	全部 <i>Lactobacilli</i>
对照鸡			
早孵化	7.1	Neg	4.6
晚孵化	5.3	Neg	5.7
处理组			
早孵化	≤1.7	5.6	5.6
晚孵化	≤1.7	4.4	4.4

表 8-12 卵接种 *L. reuteri* 对孵化后接种 *Salmonella* 的影响

处 理	孵化后 6 天		孵化后 40 天	
	死亡率/%	体重/g	死亡率/%	体重/g
接种	36	72	41	1728
接种 + <i>L. reuteri</i>	6	107	9	1937

在禽类的胃肠道, 尤其是十二指肠区域感染病原菌会引起生长障碍, 摄入 *L. reuteri* 会带来有益影响。

第四节 益生酵母菌

一、益生酵母在肠黏膜的黏着

Ouwehand 等 (1999) 研究了乳酸菌 *S. boulardii* 在肠道黏膜的黏着情况。各个不同年龄组黏膜特征如表 8-13 所示, 6 月婴幼儿和成年黏膜不含硫酸盐, 所有黏膜均有很少或无 H 抗原存在, 但均具有 A 抗原活性, 除了 6 月婴幼儿外, 其他黏膜也具有相对高 B 抗原活性。

测试益生菌的肠黏膜黏着结果如图所示, 这种黏着对于同一菌而言不呈年龄依赖性, 但

表 8-13 肠黏膜性质

黏膜来源	蛋白质/%	碳水化合物/%	脂肪/%	硫酸盐/%	黏蛋白/%	血液抗体		
						A	B	C
新生儿	30.0	29.1	1.8	1.4	66.9	1/128	1/4	1/32
2月婴儿	49.4	15.3	1.6	1.7	71.6	1/64	1/128	1/32
6月婴儿	37.2	31.3	1.0	ND ^a	73.1	1/4	1/512	1/16
成人	30.4	17.1	1.5	ND ^a	72.2	1/128	1/128	1/32

黏着呈菌株专一性。当黏着发生时，微生物相对紧地结合于基质上（见图 8-4），仅有小部分微生物在培养的第一小时从基质上脱离，但量极微。在细胞表面疏水性和平均黏着间不存在对应关系。

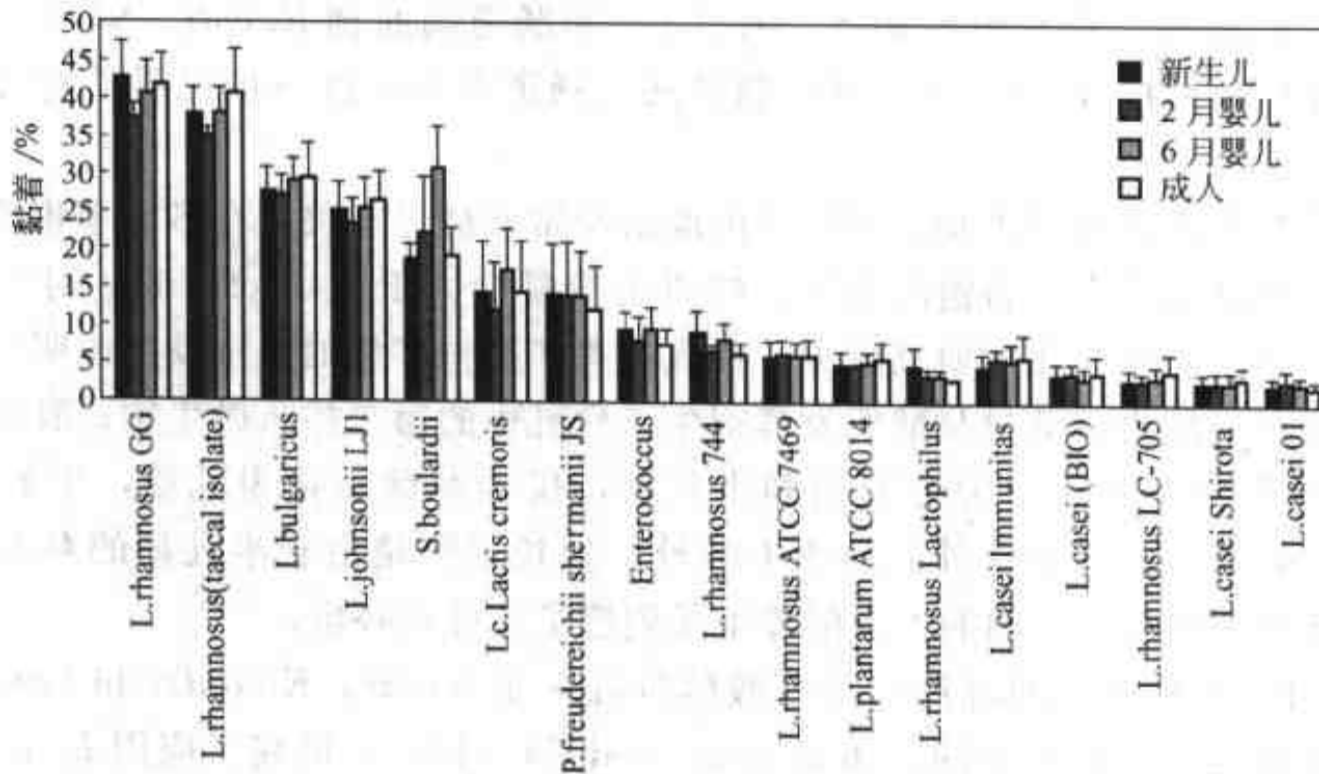


图 8-4 益生菌对肠黏膜的黏着

选择益生菌的重要标准是黏着，对肠黏膜的黏着度被认为是肠道定殖的重要性质，尤其是在小肠液体流速相对较高时更是如此。高活性 A, B 抗原的存在说明黏膜制备物中的黏蛋白分子是相对完整的。在菌的黏着能力方面明显不同，相同的种内黏着能力也明显存在差异（见图 8-5）。有趣的是许多乳制品菌 *L. bulgaricus*、*L. cremoris* 具有高的黏着性，但它们不被认为是肠道定殖菌。具有高黏着的菌株为 *Lactobacillus GG*、*L. johnsonii*、*L. bulgaricus*

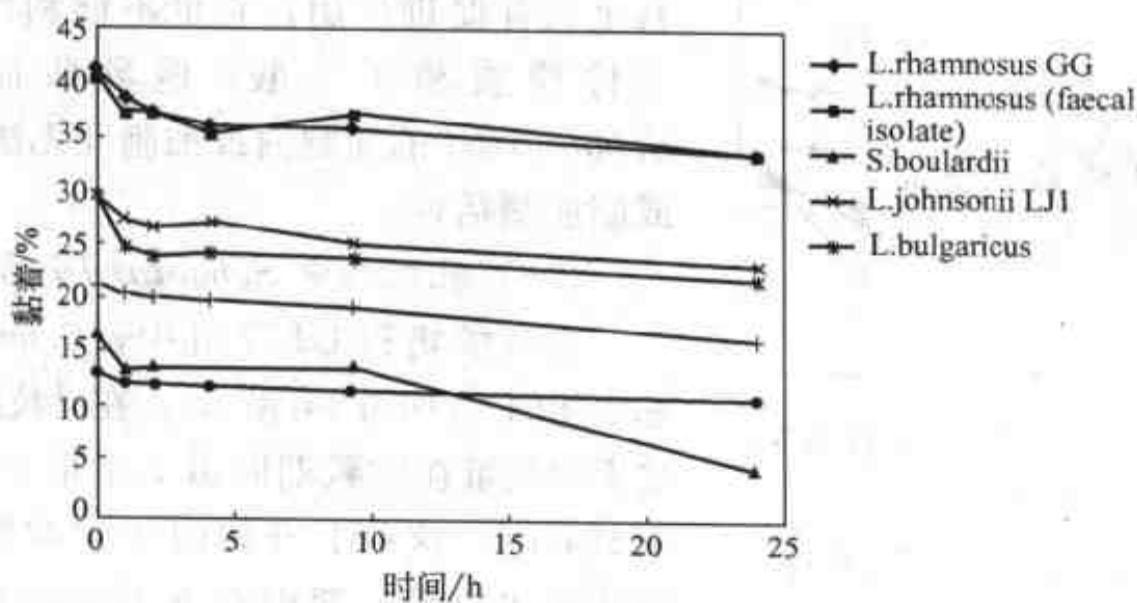


图 8-5 益生菌的肠黏膜黏着 (200r/min 搅拌)

和 *L. cremoris*，这些菌株被认为在基质中存在相同的受体，但对这些菌株的大多数受体性质尚不清楚。

在类似的模拟系统中，许多测试菌的黏着比肠道菌具有更强的黏着能力，Sfa II 表达为 *E. coli* 13%，*Salmonella typhimurium* 14%，*S. enteritidis* 2.5%。*S. boulardii* 在肠黏膜上具有相对高的黏着能力，黏着百分比在 20%~35% 之间，说明它有在肠道定殖的能力。

综上可以看出测试微生物间黏着百分比明显不同，这种黏着呈菌株专一性，但和人的年龄无关。菌株较牢固黏着于肠黏膜上，经一小时搅拌仅有少量的黏着脱附。在细胞表面疏水性和黏着能力方面没有关系。

二、益生酵母在乳制品中的生长和存活

酵母作为益生菌的应用起源于饲料，如 *Saccharomyces* 就是如此。*S. boulardii* 被用于不同类型痢疾的处理，也有酵母如 *S. cerevisiae* 和肠道病原菌 *E. coli*、*Shigella* 和 *Salmonella* 间相互作用的报道，*S. cerevisiae* 能够通过肠道存活，进一步说明了它可以作为益生菌的可能性。

虽然酸奶发酵没有酵母参加，但产品的腐败经常和酵母有关，在各种零售酸奶中通常会有 $\geq 10^3$ cfu/g 的酵母存在，若情况允许，酵母的数量会大于 $\geq 10^7$ cfu/ml。对于乳和酸奶中酵母生长的动力学和生物化学研究较少，在乳相关产品中酵母的经常发生说明它有在乳中生长和代谢乳成分的能力。酵母是酸奶发酵剂生长后乳中的第二梯队微生物；乳酸菌发酵了乳中 35% 左右的乳糖，将其变为葡萄糖和半乳糖，仅葡萄糖转化为乳酸，半乳糖主要通过 *S. thermophilus* 释放进入细胞外，酸奶中酵母的生长主要是由于半乳糖的存在，而且酸奶的低 pH 和酵母利用有机酸的能力为酵母生长创造了选择性环境。

在发酵剂中含有酵母的乳产品是嗜酸酵母乳，如 *Kefir*、*Koumiss* 和 *Labau* 等，他们是酵母和乳酸菌混合发酵而成的。如 Subramanian 等 (1983) 研究了应用 *L. acidophilus* 和乳糖发酵酵母 *Kluyveromyces marxianus* 和 *Candida pseudotropicalis* 发酵产生 *acidophilus* 乳产品，*L. acidophilus* 的生长受酵母存在的刺激，*Bacillus cereus* 和 *E. coli* 在 *L. acidophilus* 酵母中不能存活。

益生菌欲达其健康剂量每天必须摄入一定量的活菌数，一般建议为 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml，即摄入 100ml 左右含活菌数 $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml 的产品。Haltingh 等 (2001) 研究了酵母在乳制品中的生长和存在情况，这可为益生菌酵母产品开发提供食品和载体。

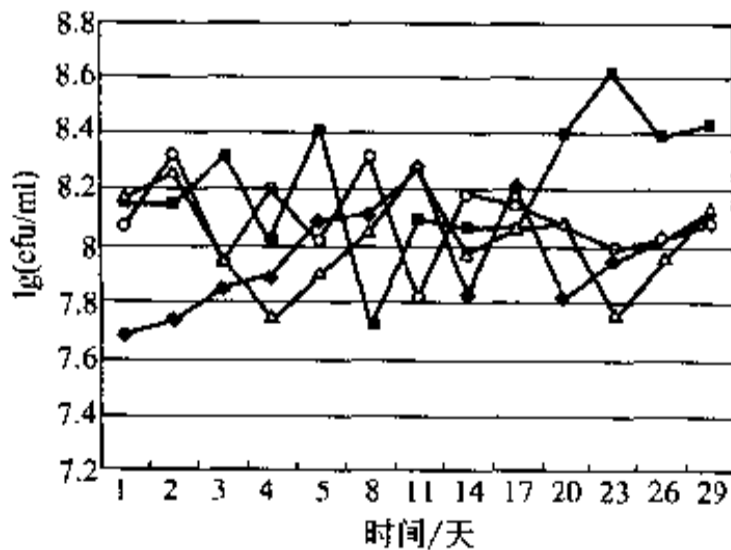


图 8-6 乳制品 *S. boulardii* 的生长

○—UHT 乳；△—淡酸奶；

●—果粒酸奶；■—UHT 酸奶 5°C 贮藏

S. boulardii 不能降解或者发酵乳糖，半乳糖对其生长有促进作用，它也不能利用大部分有机酸，如柠檬酸和丁二酸，但乳酸促进其生长。在 *S. boulardii* 的细胞内或细胞间无法测得蛋白酶和酯或脂肪酶活性。

(一) 乳制品中 *S. boulardii* 的存活和生长

在淡酸奶和 UHT 乳中，*S. boulardii* 的细胞数基本相同。(如图 8-6 所示)，在果粒酸奶中 *S. boulardii* 的平均数量在贮藏期间由 7.7 lg cfu/ml 上升为 8.1 lg cfu/ml，这种上升归因于它对糖的发酵更容易，如蔗糖和果糖，蔗糖对 *S. boulardii* 起发酵底物的作用，在这种产品中它能帮助 *S. cerevisiae* 成为优

势菌，这和 Fleet 等 (1987) 的结果相一致。

UHT 乳中 *S. boulardii* 细胞数贮藏期由 $8.15 \lg \text{cfu/ml}$ 上升为 $8.5 \lg \text{cfu/ml}$ ，和果粒酸奶中生长不同，在 UHT 乳中 *S. boulardii* 的生长更困难，这缘于它对乳成分的利用能力，尤其是它的碳水化合物成分的利用能力变弱；*S. boulardii* 不能发酵和降解乳糖，但 *S. boulardii* 生长产生少量乳酸 (1.04%) 和乙醇 (0.5%) (见图 8-7)，也说明存在碳水化合物的代谢。Fleet 等 (1987) 研究表明 *S. cerevisiae* 在 UHT 乳中其菌数可高达 $10^8 \sim 10^9 \text{cfu/ml}$ ，这种生长不能通过他们利用乳糖、蛋白或者脂肪的能力来说明，因为 *S. cerevisiae* 缺乏这种能力，可能它利用了其他乳成分，如少数游离氨基酸、脂肪酸和微量的半乳糖和葡萄糖。UHT 处理导致少量乳糖水解，这部分说明 UHT 中碳水化合物的代谢原因。

(二) 糖的利用和乙醇、气体产生

S. boulardii 在不同乳制品中的生长情况如图 8-7 所示。在淡酸奶中乳糖含量由 4.5% 下降为 4.0% 说明贮藏期内乳酸菌利用了乳糖；半乳糖起始含量为 0.68%，在贮藏期内也被 *S. boulardii* 利用。Giudici 等 (1996) 报道在酸奶中总是存在高比例的半乳糖，它是乳酸菌分解乳糖而获得的产物。

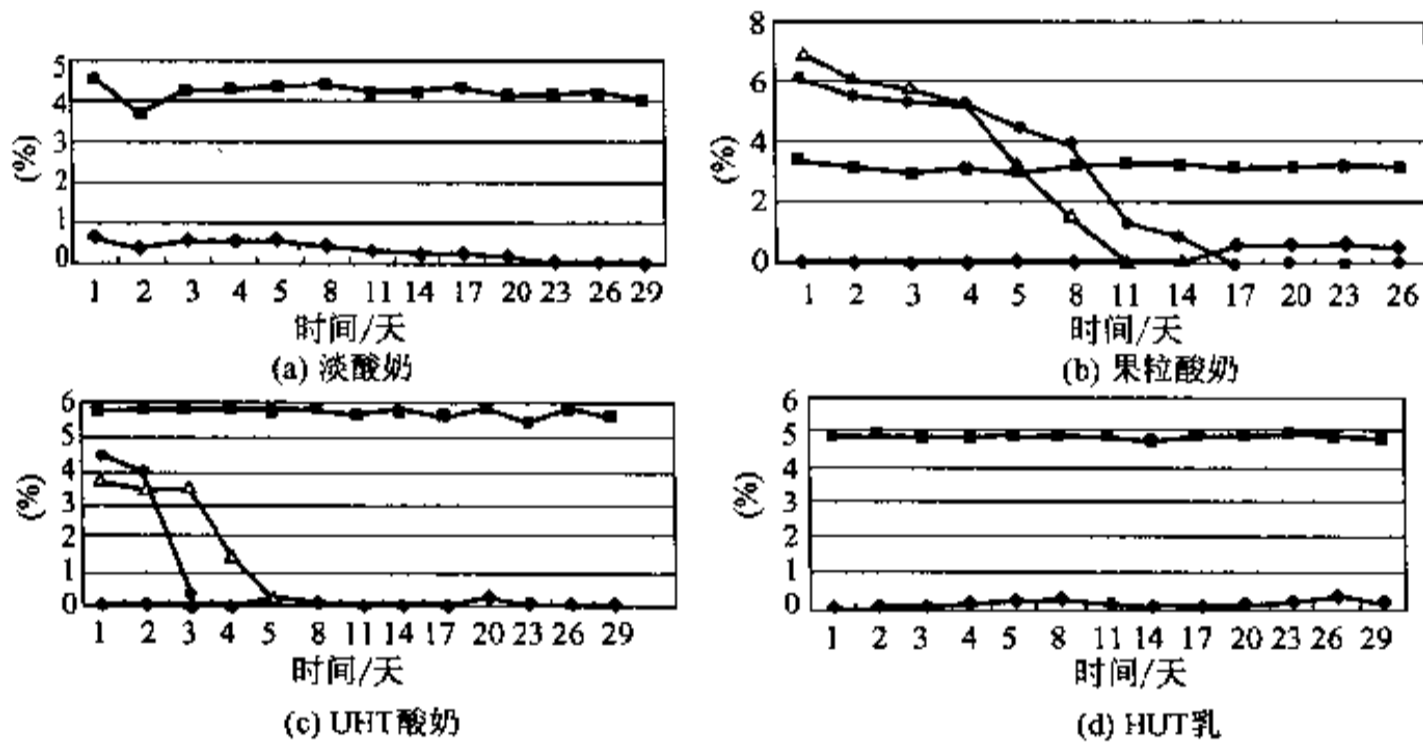


图 8-7 *S. boulardii* 生长过程中糖浓度的变化

果粒酸奶的乳糖成分仅有轻微下降，这也归因于在贮藏后期乳酸菌生长引起的半乳糖增加。在 5°C 时，*S. boulardii* 在果粒酸奶中生长伴随着葡萄糖和果糖下降，也有过量的乙醇 (5.9%) 产生。

UHT 酸奶中乳糖成分由于乳酸菌缺乏保持稳定。*S. boulardii* 的存活伴随着添加于产品中葡萄糖、果糖的下降，和高浓度乙醇的产生 (4.03%)。尽管在 UHT 酸奶中葡萄糖和果糖完全被利用，但 *S. boulardii* 的生长仍很少。

在果粒酸奶和 UHT 酸奶中较高比例的乙醇归因于发酵糖的存在，这些酸奶中非乳糖发酵酵母产生乙醇发酵，最终产生 CO_2 。在这些产品高含量的酵母对发酵过程中过量气体的产生负责，在 UHT 酸奶和果粒酸奶中在酵母生长的第五天和第 11 天气体产生停止，这是因为可被利用的发酵糖类被完全利用了。

尽管存在有机酸，接种乳制品酵母的 pH 在贮藏期内保持较稳定，这归因于

S. boulardii 对有机酸的利用。

(三) 有机酸的变化

在酵母生长前发酵乳产品中的主要有机酸是乳酸 (1.57%~1.98%)，还有少量的柠檬酸 (0.46%~0.55%) 和丁二酸 (0.0025%~0.050%)；果粒酸奶中不存在丁二酸。UHT 乳中柠檬酸浓度最高 (0.55%)，乳酸为 0.07%，丁二酸为 0.026%。

在淡酸奶和果粒酸奶中乳酸的轻微增加归因于乳酸菌利用乳糖产生乳酸的结果。虽然 *S. boulardii* 能够利用乳酸作为碳源，但在厌氧条件下对其降解是不可能的。UHT 酸奶和 UHT 乳中乳酸浓度保持稳定是由于乳酸菌缺乏。一般柠檬酸和丁二酸的含量在所有乳制品中都会增加，这是由于酵母没有利用这种酸的能力，它来源于乳酸菌生长或酵母代谢。

(四) 结论

S. boulardii 具有利用酸奶组分的能力，这一般发生在生长底物中其活性细胞大于 10^6 cfu/ml 的情况。故酵母菌作为益生菌的应用应以乳和淡酸奶为产品载体，它们中无气体或乙醇生成。过量乙酸和气体产生发生在果粒酸奶存在大量 *S. boulardii* 的情况下。

三、*Saccharomyces boulardii* 对痢疾病原菌的作用

无论病因学如何，痢疾总是和病原菌定殖改变了肠道菌群平衡有关的，大量研究表明摄入活性益生菌对肠道病的预防和治疗具有重要作用，他们对肠道病原菌直接产生影响或通过对肠道微生物结构或免疫系统的调整间接产生影响。作用机制包括抗菌物质的产生、病原菌定殖抑制、sIgA 分泌刺激、毒素或毒素受体变化以及对营养素的竞争等。

Saccharomyces boulardii 是从荔枝水果中分离的一种酵母菌 (见图 8-8)，它具有耐热性，能在 37°C 下生长。*Saccharomyces* 以表现型和基因型为基础的改良几十年来已进行了几次，*S. boulardii* 被确认从 *S. cerevisiae* 分离出来成为一个分离种。传统的生物化学特征不能应用于分离 *S. cerevisiae* 它们本身的菌株，也不能从 *S. boulardii* 中分辨 *S. cerevisiae*。经典的对于种的确认的基因方法也不能被利用鉴定 *S. boulardii*，这缘于它不能产生芽孢。系列的 DNA-DNA 杂交研究表明 *Saccharomyces* 包括四个相关种：*S. bayanus*、*S. cerevisiae*、*S. paradoxus* 和 *S. pastorianus*。凝胶电泳谱图确认有四种 *Saccharomyces* 存在，这包括 *S. boulardii*。另外 Mallie 等报道 *S. boulardii* 是 *S. seusu stricto* 的一部分，但不同于 *S. cerevisiae*，故建议用 *S. cerevisiae* var *boulardii* 表示之。最近其他方法确认了该菌株的专一性序列 (CAG) 9 (在位点 4) 仅存在于 *S. boulardii* 中，因此将 *S. boulardii* 菌株从 *S. cerevisiae* 的其他菌株中分离出来，确定为一个分离种。

口服 *S. boulardii* 的实验表明：*S. boulardii* 在 3 天内能于结肠获得较高的浓度 (见图 8-8)，在中断口服 2~5 天后，它在粪便中消失。*S. boulardii* 对抗生素存在天然抗性，它

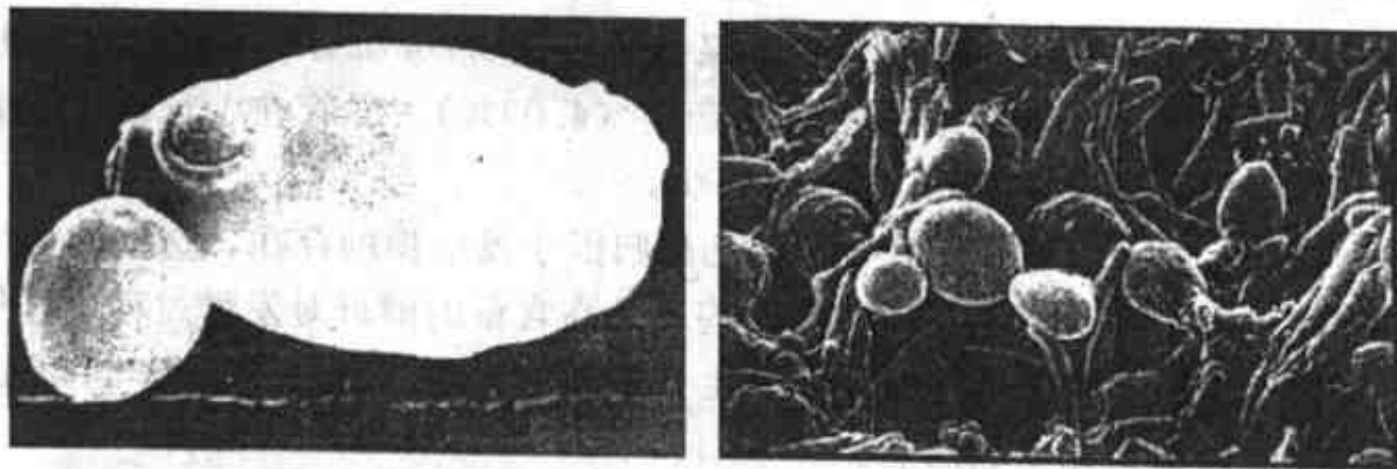


图 8-8 *S. boulardii* 的扫描电谱图

可被抗真菌剂如真菌素清除出消化道。

S. boulardii 用于各种不同类型痢疾的处理，如抗生素痢疾、旅游者痢疾、成人和婴幼儿急性胃肠性痢疾、导管喂食患者痢疾和 HIV 感染患者的慢性痢疾等。研究表明 *S. boulardii* 对于 *Clostridium difficile* 引进的肠道痢疾是有效的。*S. boulardii* 的摄入是安全的，人体对其有很好的耐受性，*fungemia* 的感染基质目前尚不十分清楚，但它很可能和导管的污染有关。*S. boulardii* 对各种感染的作用机理被广泛地研究，动物实验和体外实验表明 *S. boulardii* 对肠道的不同病原菌具有抗性和专一性。

(一) *Clostridium difficile*

抗生素应用是肠道定殖抗性丧失和病原菌感染的主因。*C. difficile* 是一种革兰氏阳性严格厌氧菌，是抗生素引起成人痢疾的主因，假膜结肠炎的 9% 是其引起的，这是一种抗生素引起的严重痢疾。*C. difficile* 病原菌产生毒素 A 和 B，他们引起膜的破坏和结肠感染。

在几种动物模型中，*S. boulardii* 对 *C. difficile* 型结肠炎具有预防作用。Toothaker 等在氯林可霉素使用前用 *S. boulardii* 处理大鼠，结果大大减少了由于 *C. difficile* 感染氯林可霉素诱导的死亡率。其累积死亡率由微处理组的 80% 下降为 *S. boulardii* 摄入组的 51%。Corthier 等 (1986) 证实感染 *C. difficile* 限菌鼠，单用一次 *S. boulardii* 处理对 16% 鼠有效，连续摄入 *S. boulardii* 使有效率提高到 56%。进一步的研究证实这种保护作用不仅依赖于 *S. boulardii* 摄入的剂量，而且和酵母活体细胞数有关。在限菌鼠实验中没有测定到酵母对 *C. difficile* 量的直接影响，单酵母处理的鼠的粪便细胞毒素量较对照组下降了 1000 倍以上。Caster 等 (1990) 报道无菌鼠用 *S. boulardii* 处理后小肠和大肠黏膜 *C. difficile* 诱导损伤基本不发生或无法造成严重伤害；实验中未测到 *C. difficile* 数的下降，但毒素 A 浓度和 B 浓度的减少被测定出来。由于 *C. difficile* 引起的疾病是严格和毒素 A 和 B 的产生相连的，故 *S. boulardii* 对毒素 A 和 B 浓度的影响是其发挥生理作用的根本原因。体外实验表明毒素 A 和 B 发挥细胞毒素作用，即使细胞圆形化 (cell rounding)，在 *C. difficile* 添加前用 *S. boulardii* 和上皮细胞一起培养部分或完全防止了细胞的圆形化。*S. boulardii* 对毒素 A 的抗分泌作用首先由 Pothelakies 等 (1993) 于鼠的肠道内发现，在毒素 A 添加于肠道前摄入 *S. boulardii* 减少了诱导毒素的肠分泌和渗透。毒素 A 和 *S. boulardii* 过滤上清液混合减少了诱导毒素 A 的分泌，表明抗分泌作用是由酵母分泌因子调整的。这种预防作用呈 *S. boulardii* 专一性，由 *S. cerevisiae* 的过滤上清液不能很大程度上改变毒素 A 引起的分泌和渗透。*S. boulardii* 中分离的一种活性成分降低毒素 A 诱导回肠分泌的 46% 和肠渗透的 74%，防止了毒素 A 引起的感染。这种活性成分中含有较高活性蛋白酶，它通过毒素 A 的蛋白水解和毒素 A 结合于刷状缘膜受体的抑制发挥生理作用。蛋白酶经确认是分子量为 54KDa 的丝氨酸蛋白酶，此蛋白酶也对毒素 B 分子具有蛋白分解活性。*S. boulardii* 蛋白酶减少了毒素 A 和 B 结合于人刷状缘膜的能力，抑制了毒素对结肠上皮细胞的病原作用。

无论如何我们不能排除其他机制在 *S. boulardii* 防止此类感染时发挥作用的可能性。Qamar 等 (2001) 证实 *S. boulardii* 喂食鼠抗毒素 A 的专一性肠道 IgA 活性上升 4 倍，血清中抗毒素 A 的 IgM 也有重要上升，对 *C. difficile* 毒素的专一抗免疫反应也是 *S. boulardii* 具有防止 *C. difficile* 感染作用的重要机制。

(二) *Vibrio cholerae*

对鼠小肠进行的病理学解剖实验表明：*S. boulardii* 能够防止 *V. cholerae* 引起的形态学

损伤。*V. cholerae* 产生的霍乱毒素 (Cholera toxin, CT) 由 5 个亚单位构成, 每个亚单位由毒素结合区域和活化腺苷酸环化酶的活性 A 亚单元构成, 它能导致环状 AMP 水平的上升。Viaon 等 (1986) 发现 3.1×10^9 cfu/ml *S. boulardii* 能减少 CT 诱导液体 50%, 这表明 *S. boulardii* 对于 CT 诱导类疾病具有预防和治疗作用, 这种作用通过抑制离子传递来实现。*S. boulardii* 对氯化物通过空肠和结肠传递的直接影响由 Krammer 等 (1993) 加以证实, *S. boulardii* (10^8 cfu/g) 添加于短循环的鼠空肠和结肠, 发现它能刺激黏膜至绒毛膜的氯化物传递, 增加氯化物的吸收; 但空肠中, 通过前列腺 (PGF₂) 分泌氯化物 cAMP 依赖性刺激, *S. boulardii* 没有作用。酵母仅仅活化黏膜至绒毛膜的氯化物传递, 净的氯化物分泌因而被转化为氯化物的吸收。

S. boulardii 对于 CT 的抑制作用在鼠肠道细胞上得到证实, 这些细胞用酵母培养, 暴露于 CT 中 90min, 酵母处理细胞中 CT 刺激 cAMP 的量下降了 50%。和 Vidon 结果相反, 有研究者报道酵母的辐射和加热不减少抗分泌效果, 在细胞模型中酵母被热杀死时酵母对 cAMP 的抑制作用也随之消失。CT 和酵母上清液的共同培养足以下降 CT 诱导 cAMP 的浓度, 这种影响通过热处理或三氯乙酸沉淀而减少, 表明调整预防作用的因素是一种蛋白质, 经确认其分子量是 120KDa。CT 和酵母上清液结合不能改变 CT 和上皮细胞的结合, 不能对 CT 产生任何蛋白水解活性。人的结肠细胞 T84 被应用于证实二者结合反作用于其他主动肌诱导的 cAMP, 即 *E. coli* LT 毒素, VIP、PGE、cAMP 的下降是和氯化物分泌下降相关的。百日咳毒素抑制了 CT 和酵母上清液共同培养物的活性, 表明中和作用和酵母蛋白质结合于受体的能力有关。共培养物能减少氯化氨甲酰胆碱诱导的氯化物分泌, 这种化合物刺激 T84 细胞内 Ca²⁺ 依赖途径。

S. boulardii 的抗分泌作用可能构成这种酵母的作用机理之一。Brandao (1998) 建议 CT 对酵母壁的结合构成了 *S. boulardii* 对 *V. cholerae* 感染有防止作用的其他机理, 但酵母细胞壁上 CT 受体目前尚没有得到确认。

(三) *Enterobacteriaceae*

Rodrigues 等 (1996) 研究了 *S. boulardii* 对鼠的 *Salmonella typhimurium* 和 *Shigella flexneri* 感染的影响, 表明该酵母对这两种菌的感染具有预防作用, 这种预防作用不是由于肠道内菌数的减少, 而是由于酵母和这些病原菌对肠道内的黏着位形成竞争。

和 *Salmonella*、*Shigella* 相反, 宿主组织的入侵是病原性的一个自然过程, 肠道病原菌 *E. coli* (EPEC) 是直肠型黏着病原菌, 它结合于胃肠上皮细胞, 形成典型的黏着。在定殖后 EPEC 破坏了上皮细胞的信号传导, 引起上皮细胞的功能变化, 包括细胞透过性的明显改变。

人结肠上皮细胞 T84 被广泛应用于 EPEC 感染机制的研究。EPEC 感染导致细胞透过性增加, 这伴随着转上皮细胞抗性的下降。这种细胞模式被用于研究 *S. boulardii* 对 EPEC 感染不同步骤的影响, 当 *S. boulardii* 存在时, 转上皮细胞抗性在被 EPEC 感染的 T84 细胞内不受影响。*S. boulardii* 保护了感染细胞内的密切连接结构, 而且在 *S. boulardii* 存在时 EPEC 诱导细胞 apoptosis 被延迟, 这证实了在 EPEC 感染时酵母的保护作用。值得注意的是酵母存在条件下黏着 EPEC 的数量没有变化, 这说明在此菌和酵母对上皮细胞的黏着方面没有任何竞争存在, 但 *S. boulardii* 降低了细胞内 EPEC 数量的 50%。T84 细胞内 EPEC 对信号传导反应的影响研究表明: EPEC 感染诱导了许多蛋白质的磷酸化, 在这些被 EPEC 感染过程中磷酸化的蛋白质中 *S. boulardii* 极大地或严重地减少了 ERK1/2 途径的有丝分裂

原活化蛋白激酶的磷酸化, 上皮细胞 *Listeria monocytogenes* 入侵要求 MEK1/ERK2 途径的活化, 因为这种途径的专一性抑制剂 PD98059 阻碍了入侵过程。相同方法 PD98059 降低了 T84 细胞内 EPEC 的内在化, 说明 ERK1/2 途径的调整可以阐明 *S. boulardii* 存在情况下细胞内菌量下降的原因。

(四) 结论

S. boulardii 对病原菌性痢疾的预防和治疗作用有多种机制。*S. boulardii* 对 *C. difficile* 作用模式在几种动物实验中被进行了评估, 证实 *S. boulardii* 合成 54 KDa 的丝氨酸蛋白酶, 能降解毒素 A 和 B 在结肠黏膜上的受体。另外 *S. boulardii* 改善了对毒素 A 肠道免疫系统。

S. boulardii 能够抑制空肠 CT 诱导分泌, 也能降低 CT 诱导的 cAMP。酵母活性和 120KDa 的热和胰蛋白敏感性蛋白质相关。*S. boulardii*-CM 不改变 CT 或 CT2 受体的结合, *S. boulardii* 和宿主细胞受体的相互作用在减少 CT 感染的病原性影响方面是重要的, 它也被证实直接影响调整氯化物分泌的 cAMP 和 Ca^{2+} 。CT 能结合于该酵母细胞壁, 可通过蠕动清除机制从肠道被清除。

S. boulardii 对 *C. difficile* 和 *C. cholerae* 感染的预防作用, 是通过其产生的抑菌物质, 即 54KDa 蛋白酶和 120KDa 的蛋白质来实现。*S. boulardii* 也能对体外的 EPEC 感染发挥拮抗作用, 在 T84 细胞内它不和这些菌在结合位上竞争, 但它具有感染细胞的障碍功能, 能调整 EPEC 感染过程中信号传导途径。

S. boulardii 对肠道黏膜的直接影响, 尤其是酶活性刺激和宿主肠道黏膜免疫反应的增加, 是 *S. boulardii* 防止痢疾病原菌的另一机制, 最后值得强调的是 *S. boulardii* 对一种病原菌抑制可能存在几种机理。

参 考 文 献

- 1 Al-zoreky, et al., Cultured Dairy prod. J. 4-13, 1993
- 2 Arthur C. Ouwehand and S. J. Salminen, Int. Dairy J. 8, 749-758, 1998
- 3 Arthur C. Ouwehand, et al., Int. Dairy. J. 9, 623-630, 1999
- 4 E. B. Berezin, Int. J. Antimicro. Agents 160, 521-526, 2000
- 5 Casas, I. A. et al., prevention and control of potentially Pathogenic Micro. in poultry and Poultry Meat products, Beck-bergen, The Metherland, 63-71, 1993
- 6 Charfreitag and Gilliland, S. E., J. dairy Sci. 77, 2925-2933, 1994
- 7 D. Czerucka and P. Rampal, Microbes and Infection, 4, 733-739, 2002
- 8 Dupuis, C. Corr and Boyaval, P. Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 750-755, 1995
- 9 Ruller, R. et al Appl. Environ. Microbiol., 41, 1433-1931
- 10 Fujimura, S. and Nakamura, J., Antimicrob. Agents Chemother., 14, 893-898, 1978
- 11 Funke, G. et al., Clin. Microbiol. Rev., 10, 125-129, 1997
- 12 Gilliland, S. E. et al., J. Dairy Sci., 63, 964, 1980
- 13 Hill, R. H. and Courley, H. M. Acta Anat., Int., 137, 137, 1990
- 14 Kameko, T. et al., J. Dairy Sci., 77, 393-404, 1994
- 15 Kooijmans, C. M. F. et al., Ann. Rheum. Dis., 48, 851-852, 1989
- 16 Iebto, E. And Salminen, S. Biosci. Microflora, 16, 13-17, 1997
- 17 Iengemann, F. W. and Allen, N. N., J. Dairy Sci., 42, 1171, 1959
- 18 Lyon, W. J. and Glatz, B. A., Appl. Environ. Microbiol., 57, 706, 1991
- 19 Macfarlane, G. T. et al., J. Appl. Bacteriol., 64, 37-46, 1988
- 20 Mara, M. et al., Zentrall Bakteriolo., 281, 549-555, 1994
- 21 McCormick, M. E. proc. Georgia Nutrition conf. Feed Industry 62-69, 1984

- 22 Muralidhare, K. S. et al. , J. Food Protection, 40; 288, 1977
- 23 Nieto, N. et al. , Nutr. Abstr. Rev. 56; 5347, 1985
- 24 Nousiainen, J. and Suomi, K. , J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 66; 212, 1991
- 25 Ostlie, H. et al. , J. Dairy. Sci. 78, 1224-1237, 1995
- 26 Paul, G. E. and Booth, J. S. Can. J. Microbiol. , 34, 1344-1347, 1988
- 27 Pulverer, G. et al. , Zentralblatt für Bakteriologie, 81, 49-494, 1994
- 28 Sakata, J. Br. J. Nutr. , 58; 95, 1987
- 29 Wadstrom, J. W. et al. , J. appl. Bact. , 62; 513, 1978

[G e n e r a l I n f o r m a t i o n]

书名 = 益生菌

作者 =

页数 = 460

SS号 = 0

出版日期 =