

乳酸菌食品级表达系统的研究进展

苏松坤, 晏励民, 刘芳

(浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 乳酸菌是一类广泛使用的工业菌。近几十年来, 乳酸菌作为同源和异源蛋白表达的宿主菌的潜在应用已得到深入研究, 在此基础上建立和发展了乳酸菌食品级基因表达系统。首先介绍了乳酸菌食品级表达系统的一些基本条件, 表达和标记系统的适用原则, 然后追踪其前沿应用进展情况, 对乳酸菌食品级基因表达系统的最新应用进行了归纳, 根据此表达系统在当前食品经济中的位置, 对其在食品工业、医药和保健品等领域的应用前景进行了展望。

关键词: 乳酸菌; 食品级; 表达系统; 应用

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)12—1233—06

Research Development of LAB Food-Grade Expression System

SU Song-kun, YAN Li-min, LIU Fang

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) has been widely used in food industry for centuries. In recent decades, the LAB food-grade expression systems have been established and developed since the potential use of these bacteria as homologous and heterologous protein expression hosts has been investigated extensively. Here we briefly introduced the basic conditions and principles of the LAB food-grade expression systems, we also summarized and tracked its latest application development. According to the location of the LAB food-grade expression systems in the food economy, we prospect its application foreground in the areas as follows: food industry, medicine and health protection.

Keywords: lactic acid bacteria, food-grade, expression system, application

乳酸菌包括大量革兰氏阳性球菌和杆菌, 在发酵食品的生产和保存中广泛应用。由于乳酸菌是安全级食品, 所以大量的菌在基因水平上都进行了修饰, 并且通过克隆技术介入特定的基因来改善乳酸菌本身的性状, 但是, 传统乳酸菌表达外源蛋白的

效率仍然比较低。同时, 目前报道的乳酸菌表达载体系统所使用的选择标记均是抗生素抗性基因, 而抗药性基因将不断向环境中漂移扩散, 这对生物安全性造成了严重危害^[1]。鉴于传统乳酸菌基因表达系统的上述弊端, 国内外学者一直致力于获取高效

收稿日期: 2012-11-20

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金项目(Nycytx-43-kxj4)。

作者简介: 苏松坤(1970—), 男, 福建莆田人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蜜蜂科学方面的研究。E-mail: susongkun@zju.edu.cn

且对人和动物无毒副作用的表达系统,也就是所谓的食品级表达系统。早在 1987 年, Willem 就提出了乳酸菌的选择标记必须采用食品级这一观点^[2],之后,乳酸菌食品级表达系统作为高效而安全的表达系统得到了广泛的应用。作者就乳酸菌食品级表达系统在食品、医学、保健品上的应用的最新进展进行了综述。

1 乳酸菌食品级基因表达系统必须具备的基本条件

1.1 表达载体必须是食品级

乳酸菌食品级表达系统所使用的载体必须是食品级的,不能含有非食品级功能性 DNA 片段。长久以来,人们构建了大量具有抗生素抗性标记的载体用于乳酸菌基因水平上的修饰。但由于抗生素抗性基因存在安全隐患,许多用于乳酸菌的食品级选择标记已经发展起来,这些选择标记是基于生物的天然性质,如糖发酵、氨基酸代谢、核苷酸生物合成和细菌的免疫抗性^[3]。同时,一些基于环境压力的新的选择标记也得到开发,如热休克蛋白、金属抗性基因和细菌素抗性基因。Yin Sheng 等采用胆汁盐水解酶基因构建了乳酸菌的食品级表达载体^[4]。在研究中,将能够耐受压力和可进行安全选择的表达载体系统应用于食品工业,得名为“食品级”表达载体^[2]。

1.2 宿主乳酸菌必须是食品级微生物

构建的“食品级”表达载体必须要转化到宿主菌中才能发挥功能,所以转化表达载体的宿主菌也必须具备生物安全性,我们一般都使用安全的、遗传背景清楚且稳定的食品级微生物,如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)及其它已经在食品工业中得到长期而广泛应用的菌类。可以使用先进的分类方法对宿主菌进行鉴定,并通过适当的分子生物学手段阐明表达宿主的遗传组成,如核苷酸测序、PCR 扩增、DNA 杂交等技术。此外,该宿主菌在生理状况下,要能够稳定在食品中定植或进入人和动物的消化道,并且能顺利通过消化道的各种理化因素和酶屏障^[5]。

1.3 表达所使用的诱导物必须是食品级

乳酸菌的表达系统按照基因组内启动子的类型可以分为组成型表达系统(Constitutive expression system)和诱导型表达系统(Controlled/inducible

expression system)。在乳酸菌中大量的蛋白质生产已经通过乳酸乳球菌组成型的启动子获得^[2]。但是连续的高产量表达会导致细胞内蛋白质的积累、聚集甚至蛋白质的沉淀,这些都对细胞有害。为解决这些问题,研究了诱导型表达的启动子,通过这些启动子,基因表达可以被诱导物、抑制物、环境因素控制,比如 pH、温度和离子浓度^[2]。乳酸菌食品级表达系统所使用的诱导物必须是食品级的,如乳糖、蔗糖、嘌呤、嘧啶、乳链菌肽等可被人食用的物质^[5]都能用来做诱导物。

2 乳酸菌食品级表达和标记系统

2.1 利用乳糖作为选择标记的表达系统

乳糖是一类常用的食品级选择标记。MacCormick 等首先将实验菌株 *L. lactis* MG5276 的质粒敲除,然后将完整的乳糖操纵子整合到其染色体上,通过双交换使 *lacF* 基因失活,结果该菌株丧失了利用乳糖的能力(*Lac*⁻)。之后再将克隆有 *lacF* 基因的质粒转到上述菌株中,该菌株恢复了利用乳糖的能力(*Lac*⁺)^[6]。Platteeuw 等将大肠杆菌(*E. coli*)中的 β -葡萄糖醛酸酶基因(*gusA*)克隆到 *L. lactis* 乳糖操纵子 *lacA* 启动子的下游,然后转到缺失受体菌中,转化后该菌能够利用乳糖^[7],证明了乳糖可以作为一种有效的选择标记。此外, Takala 等构建了以乳糖合成酶为选择标记的乳酸菌表达载体,并命名为 PLEB600^[8]。

2.2 Nisin 诱导的食品级基因表达系统

Nisin 是由乳酸乳球菌产生的一种小分子抗菌肽,由 34 个氨基酸组成,相对分子质量为 3 510。Nisin 对人体无毒副作用,进入消化道后被其中的蛋白酶作用从而失活,不会影响肠道的菌群平衡。FAO/WHO 于 1969 年接受 Nisin 作为一种食品添加剂,现在 Nisin 已作为一种天然防腐剂在食品工业广泛使用。Nisin 的以上特性决定了它可以作为一种食品级诱导物在食品级表达系统中诱导异源蛋白的表达。

在 Nisin 自动调节过程中, Nisin 通过一个典型的两组分调节系统诱导了生物合成基因簇的转录,包括组氨酸蛋白激酶 *nisK* 和反应调节蛋白 *nisR*^[9]。当 Nisin 诱导了 *NisK*, *NisK* 发生自动磷酸化并且进一步将磷酸基团转移到细胞内的反应调节蛋白 *nisR*, *nisR* 起到激活转录启动子 *nisA/F* 的作用,并且诱导

基因表达^[10]。

基于 Nisin 生物合成的自动调节机制,de Ruyter 等在 1996 年构建了 NICE 系统^[11]。nisA 启动子被分离用于构建质粒,nisR 和 nisK 基因被结合到合适的宿主菌的染色体上,当一个基因被克隆到一个质粒的 PnisA 基因下游并转化到含 NisinRK 基因的菌中,克隆基因的表达可以被 Nisin 的加入而激活,Nisin 首先诱导 PnisA 的转录,接着启动基因表达。通过双组分调节系统,表达基因的产物会在细胞中累积,也可以被分泌到细胞外,这依赖于构建过程中一个信号序列的存在与否^[12]。许多报道证明了 NICE 系统在 LAB 中表达异源蛋白的多功能性和高效性^[12-13],其诱导效率可超过 1 000 倍以上^[14]。

2.3 其它常用的食品级表达系统

以盐为诱导物的表达系统也较为常用。Sanders 等分离了一个氯化盐诱导型乳酸乳球菌启动子,并采用缺失作图、核苷酸序列分析和引物延伸鉴定了这个盐诱导启动子,并用该启动子成功表达了乳酸乳球菌 Cre 重组酶^[15]。

利用乳酸菌发酵产乳酸,发展了 pH 诱导的表达系统。从乳酸乳球菌中分离到受 pH 调节的启动子。该启动子(P170)受低 pH、低温等因子的正调节^[5]。Madsen 等对其进行了缺失突变,结果使 P170 的 pH 诱导作用提高 150 倍^[16]。

此外,嘌呤、细菌素、抗金属离子和噬菌体等作为选择标记在乳酸菌食品级表达系统中也有一定程度的应用^[1]。

3 乳酸菌食品级表达系统的最新应用

食品级乳酸菌系统因其高效表达的特点和应用性强的特征,很多蛋白质(酶、膜蛋白、细胞因子等)已经在乳酸菌体内得到表达应用,而其中利用乳酸菌制成的微生态制剂是广泛使用的保健品之一。LIU 等将肠道菌素 P 基因通过食品级表达系统在乳酸球菌中进行细胞外异源表达,得到了与肠球菌 LM-2 中的天然肠道菌素 P 相同相对分子质量、具有生物活性的肠道菌素 P,标志着食品级系统表达水平的显著提高^[17]。近些年,食品级表达系统活跃于生物、食品、医药等各个研究领域,从最初的少数的几种宿主菌株及与其相适应的质粒载体,到现在品种丰富且高效的食品级表达系统,从之前数量有限的、常见的表达产物,到现在各种营养食品、医药

用品的层出不穷的表达产物的出现,乳酸菌食品级表达系统正发挥着越来越重要的作用。Neuter 等构建了一种新的食品级表达系统—基于 pSIP 表达载体,以同源丙氨酸消旋酶基因作为选择标记,以胚芽乳杆菌为宿主菌的表达系统,这个新系统适用于食品工业的添加剂和成分生产^[18]。食品级的乳酸菌工程菌在食品、生物制药等领域的有着广阔的应用前景和商业价值。接下来,就乳酸菌食品级表达系统在食品、医学和保健品上的最新应用做一归纳。

3.1 乳酸菌食品级表达系统在食品上的应用

GL Douglas 等在 *L. acidophilus* 染色体上插入编码 β -半乳糖苷酶的基因^[19],构建了产 β -半乳糖苷酶的菌株,该重组菌应用于奶业生产中,提高了乳糖的水解率,从而提高了乳糖在人体中的吸收利用率,重组后的含风味酶基因的乳酸菌在食品生产与加工中不仅可以改善食品风味,还可以将一些合成营养物质的基因导入乳酸菌体内,生产出含高蛋白质的营养食品。

在发酵牛奶和奶酪的生产中,乳酸乳球菌菌株是一种在经济上和科技上都非常重要的乳品前体培养物^[20]。雷特氏乳酸球菌亚种 MG1363 是一种穿梭质粒型菌株,在遗传学和生理学等领域都有非常广泛的应用。该菌株中的 *dar* 基因是编码二乙酰还原酶的基因,Karakas-Sen 和 Akyol 将 *dar* 基因克隆在食品级表达载体 pMG36e 中。编码二乙酰还原酶的基因在菌株 MG1363 中超表达,菌株新陈代谢的终产物在葡萄糖培养基上生长,从而获得了二乙酰还原酶产物。而且,超表达 *dar* 基因的菌株和野生型菌株被用作奶酪生产中的前体培养物。与野生型菌株相比,在奶酪中发酵的两个星期中可以检测到不同水平的代谢终产物^[21]。

3.2 乳酸菌食品级表达系统在医学上的应用

乳酸菌能够寄生于胃肠道,并被传送至活体的黏膜水平,在人体临床试验中证实,乳酸菌可以减轻肠炎等疾病,从而提供了使用这种菌来治疗其他疾病的可能性^[22]。乳酸菌的这些特性使其能够成为一种良好的生产药物蛋白的重组菌^[23]。

孙强正等将 Mn-SOD 基因克隆至食品级表达载体 Psh91 中,将该载体转入乳酸乳杆菌中,在重组菌 *L. lactis* MBP71 成功表达了锰超氧化物歧化酶^[24]。SOD 具有很强的抗氧化能力,目前已在化妆品、食品及保健品等领域应用,并在一些疾病(如肿瘤、

炎症、自身免疫性疾病以及辐射损伤等)的治疗中显示了良好的应用前景^[25]。而食品级乳酸菌的表达产物与传统方法中以大肠杆菌为宿主菌的产物相比,不需要经过复杂的纯化过程就可以达到食品医药标准,为锰超氧化物歧化酶的应用提供了更广阔的空间。

从病原菌、病毒和寄生虫中分离出来的许多抗原已经在重组乳酸菌中生产出来^[26-28]。最先构建的生产疫苗的重组乳酸菌是乳酸乳球菌 MG1363,来生产破伤风毒素抗原^[29]。从这之后就有了很多用不同种乳酸菌作为细胞工厂的例子,包括胚芽乳杆菌和干酪乳杆菌。两项近期研究显示,当抗原通过重组乳酸菌表达,融合入树突状细胞靶向肽^[30-31],就可以测定增长的免疫力水平。嗜酸乳杆菌 NCFM 和加氏乳杆菌 ATCC33323 表达树突状细胞靶向肽,融合炭疽杆菌保护性抗原之后让小鼠口服,提供小鼠 100% 的抗炭疽能力,清晰的显示出与简单的抗原呈递(30% 的抗炭疽能力)有明显的差异^[30-31]。

患有乳糖不耐症的个体,在摄入乳糖之后往往会出现腹泻症状,而 β -半乳糖苷酶可以帮助机体更好地使用乳糖,促进肠道菌株中的乳糖耐受性。Jingjie Li 以乳糖不耐症的小鼠为模型,将内生的 β -半乳糖苷酶基因克隆入乳酸乳杆菌 MG1363 菌株中,通过让小鼠口服 MG1363 菌液来进行试验。结果显示,在服用菌液之后的 6 h 内,总排泄物质量减少,肠道的运动性降低。这是乳酸菌食品级表达系统治疗乳糖不耐症的成功应用^[32]。

Gao 等使用食品级表达载体在乳酸乳球菌 NZ9000 中功能性地表达小鼠胰岛素类似物 I 类生长因子(IGF-I)。小鼠胰岛素类似物 I 类生长因子编码序列被插入食品级表达载体 pLEB688,转化进入 *Lc. lactis* NZ9000,通过 SDS-PAGE 和 west blotting 进行分析和验证,证明该重组蛋白具有生物活性,促进了 NIH3T3 的细胞增殖。小鼠胰岛素类似物 I 类生长因子在乳酸菌中表达之后被植入培养基中,在终产物质量浓度为 100 ng/mL 时,促进 NIH3T3 细胞增殖的能力达到最佳水平^[33]。

3.3 乳酸菌食品级表达系统在保健品上的应用

乳酸菌在保健品方面的应用主要是作为微生物制剂,微生物制剂中广泛使用的益生菌就是乳酸

菌。市场上用于微生物制剂的菌种(包括乳酸菌)大多数都是野生菌株,而野生菌株所含有的抗药因子的转移,将对经济、社会和生态造成潜在的危害^[34]。食品级乳酸菌不含有抗药性因子,排除了野生菌株造成的潜在危害。张丽芳等采用标准药敏纸片琼脂扩散法(K-B法),以金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为标准对照,研究了 15 株乳酸球菌、14 株乳酸杆菌、5 株双歧杆菌对 8 大类 19 种常用抗生素的敏感性,为研制益生菌食品级微生物制剂提供了科学依据^[35]。乳酸菌微生物制剂能改善食物酸碱度、增加食欲、促进消化代谢、增强免疫力、保护生态环境,具有良好的应用前景。

4 展望

目前,多种食品级基因表达系统正在乳酸菌中建立起来,我们可以把一些与营养保健或疾病治疗等相关的基因导入这种系统中制成制剂或疫苗,直接口服,从而简化或免除了一般基因工程所需的复杂繁琐的分离纯化过程,为基因工程生产安全廉价的生物制品提供了一种新思路。

在蜂学研究领域,食品级表达系统的应用还比较少,几乎还是空白。但是其潜在的应用价值还是值得我们研究和利用。蜂王浆中的主要王浆蛋白(Major Royal Jelly Proteins, MRJPs)占总蛋白质质量分数的 46%~89%,是蜂王浆的主要成分。研究表明,MRJPs 是由同源性很高的一系列蛋白质组成的蛋白质家族,这一家族共有 9 个成员。大量实验证明,蜂王浆具有重要的医疗保健作用和生物学功能,这可能与王浆中的 MRJPs 密切相关^[36]。因此,我们可以试图将编码王浆蛋白的基因导入乳酸菌食品级系统中,让其在乳酸菌中获得高效表达,这样制成的乳酸菌食品不仅美味可口,而且极富营养价值。这样也丰富了乳酸菌表达系统在食品工业领域的应用。

鉴于乳酸菌诱导表达系统的诸多优势,乳酸菌“食品级”高效表达载体系统无疑将在发酵工程和口服功能性生物制剂方面得到巨大的发展,乳酸工程菌及其表达产物可以应用于食品、医药、保健品和工业领域,有巨大的应用前景和潜在的商业价值。

参考文献:

- [1] 郝凤奇,杨桂连,叶丽萍,等. “食品级”乳酸菌表达载体系统的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 824-830.
HAO Feng-qi, YANG Gui-lian, YE Li-ping, et al. The research development of “food-grade” LAB expression vector system[J]. **Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine**, 2008, 30(10): 824-830. (in Chinese)
- [2] De Vos W M. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria[J]. **International Dairy Journal**, 1999, 9(1): 3-10.
- [3] Defoor E, Kryger M B, Martinussen J. The orotate transporter encoded by *oroP* from *Lactococcus lactis* is required for orotate utilization and has utility as a food-grade selectable marker[J]. **Microbiology**, 2007, 153: 3645-3659.
- [4] YIN Sheng, ZHAI Zheng-yuan, WANG Guo-hong, et al. A novel vector for lactic acid bacterial that uses a bile salt hydrolase gene as a potential food-grade selection marker[J]. **Biotechnology**, 2011, 152: 49-53.
- [5] 张振中, 陈秀珠, 贾士芳. 乳酸菌食品级基因表达系统[J]. 生物工程报, 2002, 18(4): 516-519.
ZHANG Zhen-zhong, CHEN Xiu-zhu, JIA Shi-fang. Lactic acid bacteria (LAB) “food-grade” expression system[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2002, 18(4): 516-519. (in Chinese)
- [6] McCormick C A, Griffin H G, Gasson M J. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1995, 127(1-2): 105-109.
- [7] Platteeuw C, Van A B, Van S S, et al. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62(3): 1008-1013.
- [8] Takala T M, Saris P E, Tynkkynen S S. Food-grade host/vector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phosphor-beta-galactosidase gene *lacG* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 60(5): 564-570.
- [9] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, De Ruyter P, et al. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction[J]. **Biol Chem**, 1995, 270: 27299-27304.
- [10] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, Siezen R J, et al. Characterization of the nisin gene cluster nisABTClPR of *Lactococcus lactis*: requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity[J]. **Eur J Biochem**, 1993, 216: 281-291.
- [11] De Ruyter P, Kuipers O P, Beerthuyzen M M, et al. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* [J]. **Bacteriol**, 1996, 178: 3434-3439.
- [12] Mierau I, Leij P, Van Swam I, et al. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE; the case of lysostaphin[J]. **Microbial Cell Factories**, 2005, 4: 15.
- [13] Miyoshi A, Poquet I, Azevedo V, et al. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(6): 3141-3146.
- [14] Llull D, Poquet I. New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, 70(9): 5398-5406.
- [15] Sanders J W, Leenhouts K, Burghoorn J, et al. A chloride inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation[J]. **Mol Microbiol**, 1998, 27(2): 299-310.
- [16] Madsen S M, Amau J, Vrang A, et al. Molecular characterization of the pH-inducible and growth phase-dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis* [J]. **Mol Microbiol**, 1999, 32(1): 75-87.
- [17] Liu G, Wang H F, Griffiths M W, et al. Heterologous extracellular production of enterocin P in *Lactococcus lactis* by a food-grade expression system[J]. **Eur Food Res Technol**, 2011, 233: 123-129.
- [18] Nguyen T T, Mathiesen G, Fredriksen L, et al. Food-grade system for inducible gene expression in *Lactobacillus plantarum* using an alanine racemase-encoding selection marker[J]. **J Agric Food Chem**, 2011, 59: 5617-5624.
- [19] Douglas G L, Goh Y J, Klaenhammer T R. Integrative food grade expression system for lactic acid bacteria [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2011, 765: 373-387.
- [20] Wood B J B, Holzapfel W H. The genera of lactic acid bacteria [M]. London: Blackie Academic & Professional, 1995: 173-234.
- [21] Karakas-sen A, Akyol I. Expression of dar gene in lactic acid bacteria and effect on metabolite formation in feta-type cheese quality[J]. **Food Biotechnology**, 2012, 26: 45-57.

- [22] Villatoro -hemandez J, Kuipers O P, Saucedo -cardenas O, et al. Heterologous protein expression by *Lactococcus lactis* [J]. **Methods in Molecular Biology**, 2012, 824: 155-266.
- [23] Daniel C, Roussel Y, Kleerebezem M, et al. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents [J]. **Cell Press**, 2011, 29: 499-509.
- [24] 孙强正, 熊衍文, 李振军, 等. 乳酸乳球菌食品级载体的构建及 Mn-SOD 基因的克隆和表达 [J]. **中国人兽共患病学报**, 2006, 22(6): 498-501.
SUN Qiang-zheng, XIONG Yan-wen, LI Zhen-jun, et al. Construction of the food-grade vector for *Lactobacillus lactis* and its use for cloning and expression of Mn-superoxide dismutase gene [J]. **Chinese Journal of Zoonoses**, 2006, 22(6): 498-501. (in Chinese)
- [25] Danel C, Erzurum S C, Prayssac P, et al. Gene therapy for oxidant injury -related diseases; adenovirus -mediated transfer of superoxide dismutase and catalase cDNA protects against hyperoxia but not against ischemia reperfusion lung injury [J]. **Hum Gene Ther**, 1998, 9(10): 1487-1496.
- [26] Wwlls J M, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria [J]. **Nat Rev Microbiol**, 2008, 6: 349-362.
- [27] Berlec A, Strukelj B. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering [J]. **Recent Pat Biotechnol**, 2009, 3: 77-87.
- [28] Villatoro -hemandez J. Targeting diseases with genetically engineered *Lactococcus lactis* and its course towards medical translation [J]. **Exp Opin Biol Ther**, 2011, 11: 261-267.
- [29] Robinson K. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis* [J]. **Nat Biotechnol**, 1997, 15: 653-657.
- [30] Mohamadzadeh M. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 2009, 106: 4331-4336.
- [31] Mohamadzadeh M. Targeted expression of anthrax protective antigen by *Lactobacillus gasseri* as an anthrax vaccine [J]. **Future Microbiol**, 2010, 5: 1289-1296.
- [32] Li J J, Zhang W, Wang C, et al. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice [QK/QT]. (2012-02-06) [2012-3-15]. <http://www.springerlink.com/content/196u16214758u379/>
- [33] Gao G, Qiao J J, Yang C H, et al. Functional expression of mouse insulin-like growth factor-I with food-grade vector in *Lactococcus lactis* NZ9000. [QK/QT]. (2012-03-08) [2012-3-15]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2012.03222.x/abstract>
- [34] 刘晗璐, 李光玉, 孙伟丽. 益生菌益生特性的研究进展 [J]. **中国畜牧兽医**, 2010, 37(2): 116-118.
LIU Han-lu, LI Guang-yu, SUN Wei-li. The research progress of probiotics characteristics [J]. **China Animal Husbandry and Veterinary Medicine**, 2010, 37(2): 116-118. (in Chinese)
- [35] 张丽芳, 田洪涛, 张玉兰, 等. 健康人体及保健品中乳酸菌和双歧杆菌的抗药性分析 [J]. **中国食品学报**, 2009, 9(6): 144-151.
ZHANG Li-fang, TIAN Hong-tao, ZHANG Yu-lan, et al. The analysis of lactic acid bacterial and bifidobacterium drug-resistance in healthy people and health products [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2009, 9(6): 144-151. (in Chinese)
- [36] Baitala T V, Faquinello P, de Toledo, et al. Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in *Africanized honeybee* colonies [J]. **Apidologie**, 2010, 41: 160-168.
- [37] 包秋华, 吕婧, 于洁, 等. 四川牦牛奶和曲拉中九株乳酸菌的分子鉴定 [J]. **食品与生物技术学报**, 2012, 31(4): 396-402.
BAO Qiu-hua, LU Jing, YU Jie, et al. Molecular identification of nine strains lactic acid bacteria isolated from yak milk and triton in Sichuan [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(4): 396-402. (in Chinese)