

# 乳酸菌食品级质粒及应用的研究进展

王 瑶, 韦云路, 李平兰\*

(北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要:** 乳酸菌是食品发酵工业中重要的益生菌, 利用分子生物学技术构建的菌种对食品产业发展及人类健康具有重要影响。本文主要通过介绍乳酸菌食品级系统的基本要求、食品级质粒的元件组成、食品级质粒构建策略及其应用的研究进展, 展示了乳酸菌食品级分子操作系统的建立对乳酸菌的深层次开发利用所具有的重要意义。

**关键词:** 乳酸菌; 食品级系统; 质粒

## A Review of Research on Lactic Acid Bacteria Food-Grade Vectors and Their Applications

WANG Yao, WEI Yunlu, LI Pinglan\*

(Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are important probiotic microorganisms used in food fermentation industry. Molecular biological manipulation of these microorganisms has great potential for the development of food industry and human health. Based on the characteristics of lactic acid bacteria and the development of molecular biology, this review aims at the basic principles of a food-grade vector system for LAB, the components of a food-grade plasmid, the strategies to construct and transform a food-grade plasmid, and recent applications of food-grade plasmids. This review highlights that food-grade molecular biology could have a major positive impact on further development and application of LAB.

**Key words:** lactic acid bacteria; food-grade system; plasmid

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201713044

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 13-0269-08

引文格式:

王瑶, 韦云路, 李平兰. 乳酸菌食品级质粒及应用的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(13): 269-276. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201713044. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Yao, WEI Yunlu, LI Pinglan. A review of research on lactic acid bacteria food-grade vectors and their applications[J]. Food Science, 2017, 38(13): 269-276. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201713044. <http://www.spkx.net.cn>

乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 是食品产业中应用最为广泛的革兰氏阳性菌, 主要包括乳球菌属 (*Lactococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 等19个属<sup>[1]</sup>。在食品领域可以应用于发酵性食品, 例如奶制品、肉制品、果蔬与谷物类食品的发酵<sup>[2]</sup>, 并且是微生物学中公认的具有益生功能的益生菌, 因而被公认为是安全的 (generally recognized as safe, GRAS) 食品级微生物<sup>[3-4]</sup>。

目前, 采用分子生物学技术提升菌种潜在的优良性能, 构建新型工程菌种是比较受关注的研究方向。基因工程技术可以对宿主菌种进行基因编辑, 发掘功能基

因, 调控代谢途径, 从而提升菌种潜在的益生功能, 因此分子生物学对食品科学及人类的健康具有促进作用<sup>[5-6]</sup>; 然而基因工程菌种的选育过程一般采用抗生素抗性基因作为选择性标记, 抗性标记易向环境中扩散, 危害生物安全<sup>[7]</sup>, 因此研究人员也一直研究获取无毒副作用的食品级分子操作系统。

基于分子生物学及合成生物学相关技术的不断突破, 乳酸菌相关的各类分子调控元件也已经得到验证, 相继研究出了新的克隆载体、表达载体及整合载体, 食品级分子表达系统得到了不断完善, 因此本文主要对最新的食品级菌种与质粒的背景、分子操作技术及相关应用进行综述。

收稿日期: 2016-06-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271827; 31671831)

作者简介: 王瑶 (1989—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品微生物。E-mail: wangyao897@126.com

\*通信作者: 李平兰 (1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

1 食品级系统的要求

由于乳酸菌在食品工业中的应用特殊性，要求食品级分子生物学所涉及的元件必须具有安全的特性，满足如下基本标准<sup>[8]</sup>：1）载体必须是食品级，载体的相关元件必须由同源宿主或密切相关的安全型微生物的DNA组成，不含有非食品级的DNA片段；2）宿主菌必须为食品级，宿主菌为可鉴定及稳定的菌种，经过先进的分类方法鉴定过，以及运用适当的分子生物学技术确认过宿主菌的遗传组成；3）选择性标记必须为食品级，传统的乳酸菌载体选择性标记为红霉素或氯霉素的抗性基因，但因抗性因子的转移，将其投放到环境、人或动物体内会带来严重的生物安全性后果，因此必须采用食品级选择性标记代替抗生素标记；4）外源诱导物必须为食品级，外源诱导物主要用于诱导启动子的启动，从而使外源基因进行表达，如乳糖、蔗糖、嘧啶、乳酸菌肽等可食用物质都是外源诱导蛋白表达常用的诱导物。

2 食品级质粒

质粒是存在于微生物中染色体以外的、能够独立复制的遗传因子。基因工程质粒是分子生物学研究的重要工具，主要包括复制区、选择标记区及蛋白表达区，复制区是保证质粒生存复制的必备元件，选择标记区是重组质粒与菌种筛选的重要标记，蛋白表达区是外源蛋白表达的区域<sup>[9]</sup>。

2.1 质粒复制原理

质粒的复制原理与其宿主菌的特点、稳定性及拷贝数具有密不可分的联系。根据环形质粒复制中间体的结构，可以分为滚动环式复制（rolling circle replication, RCR）及 $\theta$ 型复制（theta-replication）两种方式。滚环复制的引导链和延迟链在合成的启动时间和空间上相互独立。复制蛋白将一股在正链起点处切开一个小口，在置换合成期间，形成多个单股中间体，延迟链在负链起点合成的启动之后，置换合成，最终转化为双股螺旋分子<sup>[10]</sup>； $\theta$ 型复制在复制过程中产生双链复制叉，可以单向复制又可以双向复制，不仅保证了质粒结构的稳定，而且可以插入大片段DNA<sup>[11]</sup>，如*Lb. reuteri*的质粒pTC82<sup>[12]</sup>、*Lb. plantarum*的质粒pLP2000和pLP9000<sup>[13]</sup>以及*Lb. delbrueckii*的质粒pN42和pJBL2<sup>[14]</sup>等。

2.2 食品级选择性标记

基因工程质粒为了在其宿主菌体内存活复制，必须携带一个或者多个抗性基因防止质粒丢失，而抗生素抗性基因不仅不被允许在食品中使用，而且容易引起抗性转移，危害生态环境，因此最有效的策略就是利用食品级的选择性标记，此标记均来源于对人体及生态环境安

全的食品级微生物，这些食品级选择性标记与复制区、蛋白表达区进行整合，可构建出不同应用的食品级质粒，所应用的食品级选择性标记见表1。

表1 食品级选择性标记及相关菌种  
Table 1 Food-grade selective markers and corresponding bacteria

| 标记类型       | 供体菌                    | 受体菌                    | 基因                 | 文献   |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------|------|
| 细菌素        |                        |                        |                    |      |
| Nisin      | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>nsr</i>         | [15] |
| Lactacin F | <i>Lb. johnsonii</i>   | <i>Lb. fermentum</i>   | <i>lafI</i>        | [16] |
| 糖          |                        |                        |                    |      |
| 乳糖         | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>lac F</i>       | [19] |
| 木糖         | <i>Lb. pentosus</i>    | <i>Lb. casei</i>       | <i>xyl RAB</i>     | [21] |
| 蔗糖         | <i>P. pentosaceus</i>  | <i>L. lactis</i>       | <i>scr AB</i>      | [22] |
| 营养缺陷型      |                        |                        |                    |      |
| 腺苷酸        | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>thy A</i>       | [23] |
| 苏氨酸        | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>hom、thrB</i>    | [25] |
| 其他         |                        |                        |                    |      |
| 金属离子       | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>cdr</i>         | [26] |
| 温度         | <i>S. thermophilus</i> | <i>S. thermophilus</i> | <i>shs P</i>       | [27] |
| 噬菌体        | <i>L. lactis</i>       | <i>L. lactis</i>       | <i>abi EiliiiF</i> | [28] |

2.2.1 细菌素抗性或免疫性标记

细菌素中的乳链菌肽（Nisin）研究最深，目前已被50个国家认可用作食品防腐剂，因此可以将乳链菌肽作为选择性标记，Li Ruiqing等<sup>[15]</sup>将*L. lactis*TML 01菌种中新的乳链菌肽抗性基因*nsr*整合至pLEB590质粒，成功构建食品级质粒pLEB690，包括pSH71复制子、*nsr*基因和组成型启动子P45；*lafI*基因是*Lb. johnsonii* VPI 11088产生Lactacin F免疫基因，将含有*lafI*基因的质粒pTRK434转化到*Lb. fermentum*NCDO 1750后，于含有Lactacin F的培养基中进行选择培养转化子<sup>[16]</sup>。这些为细菌素作为食品级的选择性标记提供了基础。

菌体对细菌素具有免疫抗性，为了解决此问题，可以将一个以上的细菌素作为选择性标记，或者将细菌素与其余选择性标记联合使用，然后于培养基中进行选择性筛选，可以降低免疫抗性发生的频率，Liu Chunqiang等<sup>[17]</sup>利用Nisin抗性与镉抗性基因相结合，构建新型质粒pND968，于菌种*L. lactis* LM0230中存活40代依然保持稳定性。

2.2.2 糖类选择性标记

糖是乳酸菌食品发酵工业中重要的碳源，因此可以将糖类作为选择性标记，研究比较深入的是乳糖操纵子，MacCormick等<sup>[18]</sup>于*L. lactis* MG5276菌株中证明了乳糖可以作为选择性标记；在此基础之上，Platteeuw等<sup>[19]</sup>将乳糖操纵子（*lacA*）与选择性标记（*lacF*）进行整合，构建了食品级质粒pNZ2122/pNZ2123与其相适应的宿主菌*L. lactis* NZ3000（*lacF*<sup>-</sup>）；此外，Takara等<sup>[20]</sup>于*Lb. casei*中构建了含有乳糖筛选标记的质粒pLEB600。

乳酸菌中少数株系同样可以将木糖与蔗糖作为碳

源, Posno等<sup>[21]</sup>将*Lb. pentosus*MD353的木糖选择性标记(*xyl*)整合至pLP3573质粒, 于*Lb. casei* ATCC 393与*Lb. plantarum* NCDO 1193中证明了木糖作为选择性标记的可行性; Leenhouts等<sup>[22]</sup>将*P. pentosaceus* PPE1.0中的蔗糖选择性标(*scrA/scrB*)整合至*L. lactis* LL108/LL302, 证明了蔗糖作为选择性标记的可行性。

### 2.2.3 营养缺陷型标记

营养缺陷型标记一般建立在tRNA抑制基因基础上, 因此容易引发多效效应, 但是此种方法使用方便, 并且其主要产物是RNA, 而不是蛋白质, 也不会有酶活性改变或抑菌作用。Ross等<sup>[23]</sup>将*L. lactis*的腺苷酸合成酶(*thyA*)基因整合至pGD500质粒进行回补, 证明了*thyA*可以作为菌体的选择性标记; 并且, Zhu Duolong等<sup>[24]</sup>利用Cre/loxP技术构建了食品级的*L. lactis* NZ9000 (*thyA*<sup>-</sup>)营养缺陷菌; Glenting等<sup>[25]</sup>将*L. lactis* MG1613中的苏氨酸合成酶基因(*hom*、*thrB*)进行敲除, 构建营养缺陷型菌株*L. lactis* MG1613 (*hom*<sup>-</sup>、*thyB*<sup>-</sup>), 同时将选择性标记高丝氨酸脱氢酶与高丝氨酸激酶整合至质粒pJAG5进行回补, 证明了此基因可以用于选择性标记。

### 2.2.4 其他类型选择性标记

细菌素、糖类以及营养缺陷型是常用的食品级标记, 金属离子、温度以及噬菌体抗性也可以应用于食品级抗性标记。Liu Chunqiang等<sup>[26]</sup>将*L. lactis* M71中的镉抗性基因(*CdR*)整合至*L. lactis* LMO230中, 通过质粒pND302与pND625证明了镉抗性基因可以应用于食品标记; Demerdash等<sup>[27]</sup>将*S. thermophilus*中内生质粒pSt04的热休克蛋白(small heat shock protein, *SHSP*)基因整合至pHRM1质粒, 证明温度可以作为选择性标记; 质粒pNP40<sup>[28]</sup>与pAH90<sup>[29]</sup>于*L. lactis*中的应用充分证明了噬菌体抗性基因的食品级应用, 并且Millen等<sup>[30]</sup>证明CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) / Cas9技术可以提升*L. lactis*的噬菌体抗性基因选择性。

## 2.3 食品级诱导物及表达系统

质粒中的蛋白质表达区主要用于基因的表达, 启动子是促使外源基因表达的核心区域, 可以分为组成型启动子与诱导型启动子, 组成型启动子的调控不受外界条件的影响, 所启动基因的表达具有持续性; 诱导型启动子由于受外源诱导物调控, 可以将菌体生长与外源基因表达区分<sup>[31]</sup>。为了满足食品工业与生物技术的应用, 不同类型的启动子得到了不断的完善, 适合启动子的选择对外源基因的表达具有重要影响<sup>[32-33]</sup>。常用的食品级诱导物及表达系统见表2。

表2 食品级诱导物及表达系统

Table 2 Food-grade inducers and corresponding expression systems

| 诱导类型 | 启动子             | 诱导物         | 文献   |
|------|-----------------|-------------|------|
| 细菌素  | Pnisin          | Nisin       | [33] |
|      | Psakacin        | Sakacin P/A | [35] |
| 糖    | Plac            | 乳糖          | [48] |
|      | PxylT           | 木糖          | [49] |
|      | Pfos            | 果聚糖         | [50] |
|      | Ptre            | 海藻糖         | [50] |
| 其他   | P1/P2           | 温度          | [51] |
|      | P170            | 乳酸          | [52] |
|      | Pgad            | 谷氨酸         | [53] |
|      | P <sub>zn</sub> | 金属离子        | [54] |

### 2.3.1 细菌素诱导的双组分表达系统

细菌素可以作为双组分表达系统的诱导物。研究比较深入的是NICE与pSIP表达系统<sup>[34-35]</sup>, 其诱导物分别为乳酸链球菌素(Nisin)与米酒乳杆菌素(sakacin P/A)<sup>[34,36]</sup>, pSIP表达系统已经在*L. lactis*中成功表达了 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、氨肽酶、淀粉酶及 $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[35-37]</sup>, Sanati等<sup>[38]</sup>将pSIP表达系统的选择性标记整合为丙氨酸消旋酶抗性, 于*Lb. plantarum* WCFS1与*Lb. reuteri* L103中表达了 $\beta$ -半乳糖苷酶。

NICE表达系统是乳酸菌中应用最为广泛的食品级表达系统, 具有调控严谨性、表达高效性及产量高产性的优势<sup>[39]</sup>, 在此基础上得到了不断的优化改进, Wu Chiming等<sup>[40]</sup>将*nis A* (P *nis*A) 启动子与*nis R/K*调节因子整合至质粒pSTE32, 不需外源添加诱导物, 于*Lb. reuteri*中成功表达淀粉酶; Pavan等<sup>[41]</sup>将*nis R/K*调节因子整合至*Lb. plantarum* NCIMB8826基因组中, 制备出破伤风毒素的疫苗。

NICE与pSIP表达系统是研究比较清楚的双组分表达系统, 可以与糖<sup>[42]</sup>、pH值<sup>[43]</sup>及有机酸<sup>[44]</sup>诱导的表达系统相结合, 从而提高启动子的严谨性。

### 2.3.2 糖诱导的表达系统

糖进入菌体主要依赖PTS (phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase systems)、ABC (ATP-binding cassette transporters) 与GPH (galactoside pentose hexuronide) 转运系统<sup>[45-47]</sup>, 不仅可以调节糖的摄入控制启动子诱导的外源基因的表达, 并且部分与糖转运和代谢相关的基因都为糖调节的操纵子, 可以在转录水平对基因表达水平进行调控<sup>[48]</sup>。Ma Shijie等<sup>[49]</sup>将乳糖诱导的启动子(Plac)与*Lb. brevis*中的S层分泌信号肽整合, 于*Lb. casei*中利用乳糖诱导表达猪 $\alpha$ -干扰素; Miyoshi等<sup>[50]</sup>将木糖启动子(PxylT)与信号肽Usp45整合, 于*L. lactis*中利用木糖诱导表达金黄色葡萄球菌核酸酶(*nuc*); Duong等<sup>[31]</sup>构建了果聚糖(Pfos)、乳糖(Plac)及海藻糖(Ptre)的启动子, 利用 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GusA3)作为报告基因, 于*L. lactis*中对启动子强弱进行了分析。



### 2.3.3 其余诱导物诱导的表达系统

对于诱导型启动子而言, 温度、pH值(酸)及金属离子也可以作为外源诱导因子。D'Souza等<sup>[51]</sup>将含有温敏型启动子P1与P2的质粒, 转移至40℃培养解除抑制因子Rro12抑制, 目的蛋白表达产量提高了500倍; P170与Pgad启动子可分别由乳酸与谷氨酸诱导, 并且利用此启动子构建的工程菌, 将目的蛋白的生产应用到工业级别的分批发酵<sup>[33,52]</sup>; 金属离子可以通过ABC转运系统进入菌体内部, 调节菌体内部离子平衡<sup>[53]</sup>, Llu1等<sup>[54]</sup>构建的pVE6008诱导系统, 通过EDTA去除二价离子, 解除*zitR*抑制因子的抑制作用, 增强了P<sub>zn</sub>启动子的效应, 提高了蛋白质的表达产量。

## 3 食品级质粒构建及转化

质粒的不同区域具有不同的功能, 只有将各个功能区域相互组装才能发挥其生理功能, 并且转化到相对应的宿主菌中, 才能开展进一步的科学研究。传统的DNA限制性内切酶酶切及连接酶连接技术是经典的组装方法, 近几年, 高效的组装系统已被广泛应用于质粒组装, 如Gibson组装及同源重组组装系统<sup>[55-56]</sup>, 然而转化方法依然是传统的化学转化或电转化方法。

### 3.1 质粒构建

对于小片段DNA分子可以应用传统的酶切连接组装体系, Takala等<sup>[11]</sup>利用细菌素*nis* I作为选择标记, 组装了新的食品级质粒, 由此提供了比较标准的质粒构建体系, 将质粒pVS2的复制子pSH71与质粒pLEB415的抗性标记*nis* I、启动子P45同时用*Cla* I与*Sma* I酶切, 并利用T4连接酶进行组装, 转化*E. coli* TG1与*L. lactis* MG1614, 于乳酸链球菌素(*nisin*)抗性培养基筛选转化子, 构建食品级质粒pLEB590; 乳酸菌的转化效率比较低, 尤其对于大片段的组装, 目前Gibson组装体系广泛应用于质粒构建, 其体系具有核酸外切酶、DNA连接酶及DNA聚合酶混合酶体系, 于体外50℃恒温条件, 利用碱基互补实现高效率组装<sup>[57-59]</sup>, Jee等<sup>[55]</sup>利用此组装体系, 将*Cas9*基因(4 107 bp)整合至质粒中, 于*L. reuteri*与*L. lactis* NZ9000构建了CRISPR/Cas9的打靶质粒pVPL3004等。

### 3.2 质粒转化

转化是外源基因进入菌体内部的重要途径, 高效的转化效率为菌体转化的库容量提供了充分条件, 因此是阳性转化子获得的重要影响条件。相对于化学转化, 电转化过程繁琐, 耗时较长, 但具有转化效率高及适应宿主菌谱广的优势。革兰氏阳性菌细胞壁的肽聚糖网层比较厚, 对其细胞壁进行适当的弱化有助于电转化效率的提高, 常用的弱化剂主要有: 甘氨酸、氨基青霉素、

溶菌酶、醋酸锂及二硫苏糖醇等。在制备乳酸菌感受态时, 不仅需要适应的弱化剂含量, 同时还要有适宜渗透压维持剂-蔗糖。然后利用电脉冲对感受态细胞的细胞膜造成疏水性孔洞, 随着电压增大, 疏水性孔洞转变为亲水性, 从而介导外部的DNA进入胞内, 最后感受态细胞于高渗培养基中恢复细胞膜, 并于抗性标记培养基中筛选转化子<sup>[60]</sup>。总之, 电转化方法需要在适当破坏细胞壁的基础上并维持细胞的高存活率。

## 4 食品级质粒的应用

乳酸菌是人体内具有重要生理功能的菌群, 调节着人体肠道菌群的健康, 与人体健康有着直接关系。乳酸菌作为食品级的菌体制剂, 应用食品级的质粒构建新型的细胞工厂, 从而产生具有生理功能的酶、多肽及中间代谢物等表达产物, 可以应用于食品、医药、保健及工业等领域, 有巨大的应用前景和潜在的商业价值, 对食品、医药和工业等领域的发展具有一定的促进作用。

### 4.1 在基因编辑的应用

食品级质粒在基因编辑中具有质粒结构及筛选的不稳定性, 因此不同的食品级基因编辑系统不断进行了优化。Auvray等<sup>[61]</sup>将噬菌体的整合酶及特异性识别位点*attP*位点应用于*Lb. delbrueckii*, 建立了特异性位点重组技术, Martin等<sup>[62]</sup>利用β-重组酶提高了*attP*特异性位点重组的重组效率; Serror等<sup>[63]</sup>建立的pG<sup>+</sup>host整合系统是目前应用最为广泛的编辑系统, 其主要利用转座重组将目的基因整合至基因组; Song Li等<sup>[64]</sup>利用尿嘧啶磷酸核糖基转移酶作为反向筛选标记, 于*L. lactis*与*Lb. casei*也建立了食品级基因编辑系统; 最近CRISPR/Cas9系统已经被广泛应用于生物体的基因编辑, Oh等<sup>[55]</sup>已经于*Lb. reuteri*中建立了CRISPR/Cas9系统, 利用质粒pVPL3017诱导*RecT*蛋白的表达, 从而提升了外源DNA进入菌体的效率, 由sgRNA(signal guided RNA, sgRNA)的引导, 质粒pVPL3004诱导的*Cas9*蛋白实现了对特异性基因的编辑, 其编辑效率可达90%~100%。

### 4.2 在蛋白质表达的应用

质粒对蛋白质的高效表达具有促进作用, 因此研究人员可以直接将含有特异性质粒的菌种进行发酵生产, 此种方法是最简单高效的方法, 虽然食品级质粒的表达效率比较低, 并且一些工业级需求并不需要食品级制备, 直接用*E. coli*或*S. cerevisiae*的表达系统, 将目的蛋白纯化即可<sup>[65]</sup>, 但是一些研究仍然报道了食品级质粒的重要性。Liu Guorong等<sup>[66]</sup>利用食品级质粒于*L. lactis* NZ9000中高效表达Enteriocin P细菌素, 抑制了食品中有害微生物的生长, 并对细菌素性质进行了分析; Gu Wenliang等<sup>[67]</sup>将马槟榔甜蛋白于*L. lactis* NZ3900与*E. coli*

中表达,发现*L. lactis* NZ3900的酶活性明显高于*E. coli*; Nguyen等<sup>[68]</sup>应用食品级质粒将*Lb. reuteri*的 $\beta$ -半乳糖苷酶表达于*Lb. plantarum*,为食品级工业应用奠定了基础。

#### 4.3 在代谢工程的应用

乳酸菌是食品发酵工业中常用的菌种,利用代谢工程技术对其代谢途径进行优化,制备目的产物产量高、特异性强的菌种已备受关注。通过对*L. lactis*代谢途径优化,已经高产V<sub>B</sub>、叶酸及胞外多糖<sup>[69]</sup>,然而所用的分子元件并不满足食品级要求,因此不能应用于食品工业。Gosalbes等<sup>[70]</sup>利用食品级分子操作系统将*L. lactis*的乙酰羟酸合成酶基因*ihvB/N*整合至*Lb. casei*乳糖操纵子位置,提升了丁二酮的产量;Staudigl等<sup>[71]</sup>将*Lb. reuteri*的L-阿拉伯糖异构酶及L-木糖异构酶基因转化至*Lb. plantarum*中,可以通过代谢过程检测食品工业中糖的转化反应,从而控制发酵过程;透明质酸可以应用于医药、化妆品及疫苗制备,Sheng Juzheng等<sup>[72]</sup>利用NICE系统将*S. zooepidemicus*透明质酸合成酶基因转化至*L. lactis*,成功构建其代谢合成途径,生产出食品级的透明质酸。

#### 4.4 在人体健康的应用

乳酸菌是肠道菌群中的益生菌,能够促使机体产生特异性或非特异性的免疫应答,因此可以开发对机体安全且产生持续免疫力的口服型质粒<sup>[73]</sup>;并且具备酸耐受性及黏膜黏附性的优势,可以作为疫苗的递载体<sup>[74]</sup>。Hoang等<sup>[75]</sup>制备了含有单链抗体3D8的重组菌*L. paracasei* (scFv 3D8),为肠道菌群抵抗病毒因子的侵扰提供了可能;Shi Shaohua等<sup>[76]</sup>将构建的质粒NC8-pSIP409-HA于*L. plantarum*表达禽流感病毒H9N2的血细胞凝集素(hemagglutinin, HA)蛋白,成功诱发机体的免疫应答,并为H9N2病毒口服疫苗的制备奠定基础;Guo Shanguang等<sup>[77]</sup>将梭状芽胞杆菌感染毒素TcdA与TcdB整合至*L. lactis*,制备的疫苗对动物治疗具有显著作用,从而为口服疫苗的制备提供了技术保障;Alvarez等<sup>[78]</sup>将*Myxococcus xanthus*的肽链内切酶(prolyl endopeptidases, PEP)整合至*L. casei*,通过对机体肠道菌群的调节,患者的腹腔疾病得到治疗。

## 5 结 语

乳酸菌作为益生菌,应用前景广泛,对人体有益的益生菌菌株在不断地研究,因此新菌种的遗传背景及相关功能基因并不清楚,通过特异性重组质粒可以对其功能基因进行研究,并进一步解析其调控机理,对乳酸菌的基础型及应用型研究具有推动作用。

目前,已经有许多的食品级质粒构建成功,并应用于食品与医疗,但是其应用仍然比较受限,许多工业用菌株带有Nisin抗性,因此含有Nisin标记的菌种或质粒

不能应用Nisin选择体系;金属离子虽可以应用于筛选标记,可是金属离子对机体具有一定毒性;对于其诱导系统而言,糖诱导系统的严谨性有所限制,pH值与温度控制诱导系统不利于工业的大规模应用,因此在制备实验室及产业化所需的质粒与宿主菌时,需要综合考虑复制系统、选择标记与诱导系统。

食品级质粒的研究及应用,对推动乳酸菌的分子生物学研究起到关键作用。由于乳酸菌是肠道菌群的益生菌,肠道菌群对调节人体各个器官的健康具有重要作用,许多研究人员重点关注益生菌在肠道菌群中的重要性,但是益生菌对肠道菌群的调控机理,及菌体自身的益生机理还未深入解析,利用食品级质粒可以对菌体的调控及益生机理进行解析,从而增强其益生功能,可以作为食品级质粒未来应用的一个方向。因此食品级质粒对乳酸菌工程菌株的利用与研究发挥着重要作用。

#### 参考文献:

- [1] STILE M E, HOLZAPFEL W H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 36(1): 1-29. DOI:10.1016/s0168-1605(96)01233-0.
- [2] ROSENBERG E, DELONG E F, LORY S, et al. The prokaryotes applied bacteriology and biotechnology[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013: 241-256. DOI:10.1007/978-3-642-38922-1.
- [3] IQBAL M Z, QADIR M I, HUSSAIN T, et al. Review: probiotics and their beneficial effects against various diseases[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 27(2): 405-415. DOI:10.1007/978-3-319-28079-0\_2.
- [4] BORGES S, SILVA J, TEIXEIRA P. The role of *lactobacilli* and probiotics in maintaining vaginal health[J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 289(3): 479-489. DOI:10.1007/s00404-013-3064-9.
- [5] BERMUDEZ H L G, AUBRY C, MOTTA J P, et al. Engineering *lactococci* and *lactobacilli* for human health[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(3): 278-283. DOI:10.1016/j.mib.2013.06.002.
- [6] LEBLANC J G, AUBRY C, CORTES P N G, et al. Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria: an update[J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 344(1): 1-9. DOI:10.1111/1574-6968.12159.
- [7] TROMBERT A. Recombinant lactic acid bacteria as delivery vectors of heterologous antigens: the future of vaccination?[J]. Benef Microbes, 2015, 6(3): 313-324. DOI:10.3920/bm2014.0068.
- [8] VOS W M D. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(1): 3-10. DOI:10.1016/S0958-6946(99)00038-2.
- [9] LANDETE J M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016: 1-13. DOI:10.3109/07388551.2016.1144044.
- [10] SHARECK J, CHOI Y, LEE B, et al. Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2004, 24(4): 155-208.
- [11] TAKALA T M, SARIS P E. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 467-471. DOI:10.1007/s00253-002-1034-4.

- [12] LIN C F, HO Jinlin, CHUNG T C. Characterization of the replication region of the *Lactobacillus reuteri* plasmid pTC82 potentially used in the construction of cloning vector[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2001, 65(7): 1495-1503. DOI:10.1271/bbb.65.1495.
- [13] DAMING R, YINYU W, ZILAI W, et al. Complete DNA sequence and analysis of two cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus plantarum*[J]. Plasmid, 2003, 50(1): 70-73. DOI:10.1016/s0147-619x(03)00010-6.
- [14] BOURNIQUEL A A, CASEY M G, MOLLET B, et al. DNA sequence and functional analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* plasmids pN42 and pJBL2[J]. Plasmid, 2002, 47(2): 153-157. DOI:10.1006/plas.2001.1560.
- [15] LI Ruiqing, TAKALA T M, QIAO Mingqiang, et al. Nisin-selectable food-grade secretion vector for *Lactococcus lactis*[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(4): 797-803. DOI:10.1007/s10529-010-0503-6.
- [16] ALLISON G E, KLAENHAMMER T R. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *laf1*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker[J]. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62(12): 4450-4460.
- [17] LIU Chunqiang, SU P, KHUNAJAKER N, et al. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(1): 127-135. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02441.x.
- [18] MacCORMICK 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 Microbiology Letters, 1995, 127(1/2): 105-109. DOI:10.1016/0378-1097(95)00045-7.
- [19] PLATTEEUW C, van ALLEN B I, van SCHALKWIJK S, et al. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62(3): 1008-1013.
- [20] TAKARA T M, SARIS P E, TYNKKYNNEN S S. Food-grade host/vector expression system for *Lactobacillus casei* based on complementation of plasmid-associated phospho-beta-galactosidase gene *lacG*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 564-570. DOI:10.1007/s00253-002-1153-y.
- [21] POSNO M, HEUVELMANS P T, van GIEZEN M J, et al. Complementation of the inability of *Lactobacillus* strains to utilize D-xylose with D-xylose catabolism-encoding genes of *Lactobacillus pentosus*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57(9): 2764-2766.
- [22] LEENHOUTS K, BOLHUIS A, VENEMA G, et al. Construction of a food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(4): 417-423. DOI:10.1007/s002530051192.
- [23] ROSS P, O'GARA F, CONDON S. Thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* as a genetic marker: an alternative to antibiotic resistance genes[J]. Applied Environmental Microbiology, 1990, 56(7): 2164-2169.
- [24] ZHU Duolong, ZHAO Kai, XU Haijin, et al. Construction of *thyA* deficient *Lactococcus lactis* using the Cre-loxP recombination system[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1659-1665. DOI:10.1007/s13213-014-1005-x.
- [25] GLENTING J, MADSEN S M, VRANG A, et al. A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts[J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 5051-5056.
- [26] LIU Chunqiang, LEE L V, HARVEY L M, et al. Cloning vectors for *Lactococci* based on a plasmid encoding resistance to cadmium[J]. Current Microbiology, 1996, 33(1): 35-39. DOI:10.1007/s002849900070.
- [27] DEMERDASH H A M, HELLER K J, GEIS A. Application of the *shsp* gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4408-4412. DOI:10.1128/aem.69.8.4408-4412.2003.
- [28] HARRINGTON A, HILL C. Construction of a bacteriophage-resistant derivative of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 425A by using the conjugal plasmid pNP40[J]. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57(12): 3405-3409.
- [29] SULLIVAN D O, ROSS R P, TWOMEY D P, et al. Naturally occurring lactococcal plasmid pAH90 links bacteriophage resistance and mobility functions to a food-grade selectable marker[J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(2): 929-937. DOI:10.1128/aem.67.2.929-937.2001.
- [30] MILLEN A M, HORVATH P, BOYAVAL P, et al. Mobile CRISPR/Cas-mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e51663. DOI:10.1371/journal.pone.0051663.
- [31] DUONG T, MILLER M J, BARRANGOU R, et al. Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(3): 357-367. DOI:10.1111/j.1751-7915.2010.00200.x.
- [32] TAUER C, HEINL S, EGGER E, et al. Tuning constitutive recombinant gene expression in *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 1-11. DOI:10.1186/s12934-014-0150-z.
- [33] JORGENSEN C M, VRANG A, MADSEN S M. Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system[J]. Fems Microbiology Letters, 2014, 351(2): 170-178. DOI:10.1111/1574-6968.12351.
- [34] de RUYTER P G, KUIPERS O P, de VOS W M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin[J]. Applied Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3662-3667.
- [35] SORVIG E, GRONQVIST S, NATERSTAD K, et al. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*[J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 229(1): 119-126. DOI:10.1016/s0378-1097(03)00798-5.
- [36] AXEISSON L, HOLCK A. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(8): 2125-2137.
- [37] THAIWONG N, THAIUDUM S, HALTRICH D, et al. Production of recombinant  $\beta$ -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*, using a pSIP-based food-grade expression system[J]. Advanced Materials Research, 2014, 931/932: 1518-1523. DOI:10.4028.AMR.931-932.1518.
- [38] SANATI N A, GHANBARI M, AGUDELO C G, et al. Optimization of flow assisted entrapment of pollen grains in a microfluidic platform for tip growth analysis[J]. Biomedical Microdevices, 2014, 16(1): 23-33. DOI:10.1007/s10544-013-9802-8.
- [39] MIERAU I, OLIEMAN K, MOND J, et al. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 1-12. DOI:10.1186/1475-2859-4-16.
- [40] WU Chiming, LIN C F, CHANG Y C, et al. Construction and characterization of nisin-controlled expression vectors for use in *Lactobacillus reuteri*[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2006, 70(4): 757-767. DOI:10.1271/bbb.70.757.



- [41] PAVAN S, HOLS P, DELCOUR J, et al. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study *in vivo* biological effects[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4427-4432. DOI:10.1128/aem.66.10.4427-4432.2000.
- [42] BOUCHER I, PSRROT M, GAUDREAU H, et al. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6152-6161. DOI:10.1128/aem.68.12.6152-6161.2002.
- [43] O'CONNELL M M, van SINDEREN D, MOREL D F, et al. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363[J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt4): 935-947. DOI:10.1002/jfsa.3346.
- [44] LANDETE J M, GARCIA H L, BLASCO A, et al. Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for *L*-malic acid utilization via a malic enzyme pathway[J]. Applied Environmental Microbiology, 2010, 76(1): 84-95. DOI:10.1128/aem.02145-09.
- [45] POSTMA P W, LENGELER J W, JACOBSON G R. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria[J]. Microbiological Reviews, 1993, 57(3): 543-594.
- [46] HIGGINS C F. ABC transporters: from microorganisms to man[J]. Annual Review of Cell Biology, 1992, 8: 67-113. DOI:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.
- [47] ANDERSEN J M, BARRANGOU R, HACHEM M A, et al. Transcriptional analysis of prebiotic uptake and catabolism by *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. PLoS ONE, 2012, 7(9): 1-12. DOI:10.1371/journal.pone.0044409.
- [48] de VOS W M, KUIPERS O P, van der MEER J R, et al. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria[J]. Molecular Microbiology, 1995, 17(3): 427-437. DOI:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\_17030427.x.
- [49] MA Shijie, LI Kun, LI Xinshe, et al. Expression of bioactive porcine interferon-alpha in *Lactobacillus casei*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(9): 2379-2386. DOI:10.1007/s11274-014-1663-7.
- [50] MIYOSHI A, JAMET E, COMMISSAIRE J, et al. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 239(2): 205-212. DOI:10.1016/j.femsle.2004.08.018.
- [51] D'SOUZA R, PANDEYA D R, HONG S T. Review: *Lactococcus lactis*: an efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein[J]. Biomedical Research, 2012, 23(1): 1-7.
- [52] CHANG Shiao ming, YAN Tsongrong. Genetic engineering techniques for lactic acid bacteria: construction of a stable shuttle vector and expression vector for  $\beta$ -glucuronidase[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(2): 327-335. DOI:10.1007/s10529-013-1363-7.
- [53] SOLIOZ M, STOYANOV J V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 183-195. DOI:10.1016/S0168-6445(03)00053-6.
- [54] LLULL D, POQUET I. New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5398-5406. DOI:10.1128/aem.70.9.5398-5406.2004.
- [55] OH J H, PIJIKEREN J P. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(17): e131. DOI:10.1093/nar/gku623.
- [56] KONG W, KAPUGANTI V S, LU T. A gene network engineering platform for lactic acid bacteria[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(4): e37. DOI:10.1093/nar/gkv1093.
- [57] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345. DOI:10.1038/nmeth.1318.
- [58] GIBSON D G, SMITH H O, HUTCHISON C A, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome[J]. Nature Methods, 2010, 7(11): 901-903. DOI:10.1038/nmeth.1515.
- [59] BAENES W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(6): 2216-2220. DOI:10.1073/pnas.91.6.2216.
- [60] YOSHIDA N, SATO M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5): 791-798. DOI:10.1007/s00253-009-2042-4.
- [61] AUVRAY F, CODDEVILLE M, RITZENTHALER P, et al. Plasmid integration in a wide range of bacteria mediated by the integrase of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophage mv4[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(6): 1837-1845.
- [62] MARTIN M C, ALONSO J C, SUAREZ J E, et al. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2599-2604. DOI:10.1128/aem.66.6.2599-2604.2000.
- [63] SERRA P, ILAMI G, CHOUAYEKH H, et al. Transposition in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: identification of two thermosensitive replicons and two functional insertion sequences[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 6): 1503-1511. DOI:10.1099/mic.0.25827-0.
- [64] SONG Li, CUI Hongyu, TANG Lijie, et al. Construction of upp deletion mutant strains of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* based on countersensitive system using temperature-sensitive plasmid[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 102: 37-44. DOI:10.1016/j.mimet.2014.04.011.
- [65] SCHMIDT F R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(4): 363-372. DOI:10.1007/s00253-004-1656-9.
- [66] LIU Guorong, WANG Haifeng, GRIFFITHS M W, et al. Heterologous extracellular production of enterocin P in *Lactococcus lactis* by a food-grade expression system[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 123-129. DOI:10.1007/s00217-011-1494-9.
- [67] GU Wenliang, XIA Qiyu, YAO Jing, et al. Recombinant expressions of sweet plant protein mabinlin II in *Escherichia coli* and food-grade *Lactococcus lactis*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology B, 2015, 31(4): 557-567. DOI:10.1007/s11274-015-1809-2.
- [68] NGUYEN T T, NGUYEN H M, GEIGER B, et al. Heterologous expression of a recombinant *lactobacillal* beta-galactosidase in *Lactobacillus plantarum*: effect of different parameters on the sakacin P-based expression system[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 30. DOI:10.1186/s12934-015-0214-8.
- [69] SYBESMA W, STARRENBURG M, KLEEREBEZEM M, et al. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3069-3076. DOI:10.1128/AEM.69.6.3069-3076.2003.
- [70] GOSALBES M J, ESTEBAN C D, GALAN J L, et al. Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4822-4828. DOI:10.1128/AEM.66.11.4822-4828.2000.

- [71] STAUDIGL P, HALTRICH D, PETERBAUER C K. *L*-Arabinose isomerase and *D*-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of *D*-galactose and *D*-glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1617-1624. DOI:10.1021/jf404785m.
- [72] SHENG Juzheng, LING Peixue, WANG Fengshan. Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(2): 197-206. DOI:10.1007/s10295-014-1555-8.
- [73] FAN Hongying, WU Xianbo, YU Fang, et al. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2014, 21(2): 126-132. DOI:10.1128/cvi.00434-13.
- [74] AHMED B, LOOS M, VANROMPAY D, et al. Oral immunization with *Lactococcus lactis*-expressing *EspB* induces protective immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 in a murine model of colonization[J]. Vaccine, 2014, 32(31): 3909-3916. DOI:10.1016/j.vaccine.2014.05.054.
- [75] HOANG P M, CHO S, KIM K E, et al. Development of *Lactobacillus paracasei* harboring nucleic acid-hydrolyzing 3D8 scFv as a preventive probiotic against murine norovirus infection[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2793-2803. DOI:10.1007/s00253-014-6257-7.
- [76] SHI Shaohua, YANG Wentao, YANG Guilian, et al. Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice[J]. Virology, 2014, 464/465: 166-176. DOI:10.1016/j.virol.2014.07.011.
- [77] GUO Shanguang, YAN Weiwei, MCDONOUGH S P, et al. The recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine induces protection against *C. difficile* spore challenge in a mouse model[J]. Vaccine, 2015, 33(13): 1586-1595. DOI:10.1016/j.vaccine.2015.02.006.
- [78] ALVAREZ S P, MARTIN M C, REDRUELLO B, et al. Generation of food-grade recombinant *Lactobacillus casei* delivering *Myxococcus xanthus* prolyl endopeptidase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6689-6700. DOI:10.1007/s00253-014-5730-7.