

分子水平上益生菌研究进展

袁铁铮 姚斌^{**}

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

摘要 益生菌是指能在生物体内存活,对生物体的健康有益的一类微生物。目前已经对益生菌的作用机理进行了深入和广泛的研究,获得了许多使用益生菌的经验。近些年来,分子生物学特别是基因工程技术的发展将益生菌的理论和应用研究推向了一个新的高度。从益生菌菌株的鉴定、菌株的遗传学修饰、益生菌功能基因组学 and 安全性等几个方面,综述了近年来国际上在分子水平上研究益生菌的技术方法、获得的主要研究成果和面临的挑战,并提出了益生菌研究的发展方向。

关键词 益生菌(益生菌) 分子生物学 安全性 遗传修饰

一般认为益生菌就是指能够在生物体(主要是人和动物)内存活,对宿主的生命健康有益的一类微生物^[1-3],一般把益生菌活菌制剂或含有微生物培养物的微生物制剂称作益生菌。从上个世纪初人们就开始认识到微生物及其产物能够对机体产生影响,并且从细菌、真菌、酵母等微生物中筛选得到了许多被认为是益生菌的微生物。从 Lilly 和 Stillwell(1965)提出“Probiotics(益生菌)”的概念到现在,在微生物菌群之间的关系、菌群细胞自身的代谢、与疾病的关系等方面都进行了深入研究,在应用于人以及畜禽方面积累的很多经验,出版了多本有关益生菌的专著^[1,3-6]。益生菌研究囊括了多个学科,传统的微生物学方法已经为益生菌的研究奠定了良好的基础,随着分子生物学方法的大量应用,把益生菌研究推向细胞和分子水平上。

1 目前对益生菌益生作用的认识

综合目前文献的报道,多数益生菌的益生作用主要体现在以下三个方面:防治消化道疾病、帮助消化吸收和刺激免疫系统。在所有益生菌当中,乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是目前最受重视、研究得最深入的一类,目前对乳酸菌在维持肠道菌群平衡的作用、与免疫系统关系、营养学意义、基因表达和调控等方面都做了研究。益生菌具有重要

的生理功能已经得到公认,并且在食品、畜牧、医药等领域都被大量应用。

在农业上,益生菌主要用于维持动物体内微生物生态系统的平衡,即在幼龄家畜尚未建立起良好的肠道微生物区系的情况下,使用益生菌减少动物生产损失;益生菌还能够部分替代抗菌药物,通过帮助恢复动物体内微生物生态系统的平衡,达到治疗动物疾病的目的,具有使用安全、无残留、不产生抗药性的优点。另外在饲料中添加能分泌纤维素酶、淀粉酶、葡聚糖酶等多种消化酶的益生菌,能补充畜禽自身酶系不全或酶量的不足,提高畜禽对饲料的利用率,同时益生菌自身也可以是一种很好的饲料原料。

目前人用益生菌主要使用乳酸菌和双歧杆菌^[3],涉及婴儿食品、发酵过的奶制品和药用制剂三类,随着益生菌研究的深入,出现了含有所谓益生元(Gibson, 1995)的功能性食品。大量研究表明益生菌能够通过恢复或改善人体内的微生态平衡和刺激机体的免疫机能,防治与细菌感染有关的疾病(包括胃肠道疾病、泌尿系统感染),降低乳糖不适应症,改善食品的营养价值,抗肿瘤抗突变延缓衰老等。

2 分子水平上研究益生菌的几个热点问题

综合近几年的文献,可以发现益生菌的研究呈现两个特点:(1)大量借鉴其它学科领域发展比较成熟的技术手段,主要涉及菌株的分离与鉴定的方法、菌株的改良、微生物代谢研究等方面;(2)注重

收稿日期:2004-07-05 修回日期:2004-08-18

* 通讯作者,电子邮箱:yaobin@mail.caas.net.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对益生菌作用机理的研究, 主要包括消化道内微生物菌群的动态变化、菌体细胞的代谢、菌群与宿主免疫系统的关系、菌群对宿主代谢的影响等方面, 开始关注益生菌使用的安全性, 结合益生菌功能基因组学研究, 对细胞内基因的表达和调控进行研究。下面概述一下在分子水平上研究益生菌的一些研究进展。

2.1 菌株的分离与鉴定

动态的、完整的描绘整个消化道内微生物的分布和组成, 对于正确评价益生菌在细胞水平上的营养调控机制和评价益生菌制剂的质量具有重要意义。应用分子生物学的方法, 能够根据益生菌基因组 DNA 序列的特异性, 进行群间、属间、种间、亚种间、乃至菌株之间的鉴定, 帮助从复杂的培养物中间分离菌株^[7]。

帮助鉴定益生菌的分子生物学方法主要包括基因组探针技术和基因组指纹技术(如 RFLPs 技术、RAPD 技术和 AFLPs 技术)^[8]。探针技术与生物芯片技术结合, 能够从复杂微生物环境中快速检出并追踪感兴趣的菌株, 探针技术使用的探针包括核糖体寡核苷酸探针(一般是 16S rRNA)、全染色体探针、根据基因组的特殊的序列设计的 DNA 片段、质

粒 DNA 探针等。基因组指纹技术利用 DNA 片段长度的多态性, 能够区分不同的菌株, 帮助分析动态的、多样的微生物菌群。

另外 PCR 技术和其它技术联用为益生菌的研究提供了有力的技术手段, PCR 技术相对简单快速, 不需要进行繁杂的微生物培养, 利用专一性的引物, 分析复杂菌群的菌种分布情况, 检测染色体上是否存在致病因子的基因, 帮助进行菌株鉴定。

2.2 益生菌细胞的遗传修饰

利用基因工程技术改良已经过筛选或被证明有临床效果的菌株, 拓宽它的应用范围, 增强应用效果。与传统诱变方法相比, 直接对染色体 DNA 定向操作更可能保持菌株原有的优良性状。这方面研究比较多的益生菌就是乳酸菌, 归纳起来主要有两条技术路线:

2.2.1 利用益生菌作为体内生物反应器表达外源基因 目前芽孢杆菌、酿酒酵母和乳酸菌都可以作为表达外源基因的宿主菌, 其中乳酸菌作为“体内生物反应器”最有代表性, 也可能是最有价值的。表达的外源基因主要包括酶基因和治疗抗病基因, 目前许多报道都集中在对促进消化的外源酶基因的克隆和表达(表 1)。

表 1 使用益生菌作为“体内生物反应器”表达外源基因
Table 1 Heterologous gene expressed by probiotics organisms as “endo bioreactor”

宿主菌	表达产物	外源基因来源	文献
Host	Expressed product	Source of heterologous gene	References
<i>Lactococcus lactis</i>	脂肪酶	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Drouault et al, 2002
<i>Lactobacillus gasseri</i> 、 <i>L. johnsonii</i>	内切葡聚糖酶	<i>Clostridium thermocellum</i>	Jaie Soon et al, 2000
<i>L. plantarum</i>	α 淀粉酶	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Scheirlinck et al, 1989
<i>L. plantarum</i>	α 淀粉酶	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Jones et al, 1990
<i>L. plantarum</i>	内切葡聚糖酶	<i>Clostridium thermocellum</i>	Bates et al, 1989
<i>Streptococci lactis</i>	β -半乳糖苷酶	<i>E. coli</i>	De Cos et al, 1988
<i>L. acidophilus</i>	β -半乳糖苷酶	<i>L. bulgaricus</i>	Lin et al, 1996

另外随着对益生菌与免疫系统关系研究的深入, 有人提出利用食品级的乳酸菌作为活疫苗^[9], 或者把乳酸菌作为受体菌表达和运输抗原分子, 但是尚未见成功应用的报道。

把益生菌作为表达外源基因的宿主菌, 除了必须得到适合基因操作的菌株外, 还必须建立合适的载体以及解决外源基因表达的相关问题, 从目前的报道来看主要表现出以下一些特点: (1) 目前受体

菌主要使用乳酸菌, 特别是乳酸乳杆菌; (2) 构建表达载体的一些元件都来源于益生菌; (3) 表达载体通常使用诱导型的启动子(见表 2)^[10~12]; (4) 一些研究表明整合到染色体上的外源基因稳定性较高。其中使用 *nisA/nisF* 启动子的乳酸菌表达系统是近些年发展起来的^[13~16], 表达过多种外源基因, 进行诱导表达的诱导物是一种 3.5kDa 大小的抗菌肽——乳链菌肽 *nisin*, 可以在食品中使用。

表 2 在乳酸菌中表达外源基因使用的启动子

Table 2 Characteristics of inducible promoters for expressing genes in LAB	
启动子	说明
Promoter	Relevant properties
<i>lacA/ lacR</i>	来源于 <i>L. lactis</i> , 诱导型启动子, 诱导物是乳糖
<i>nisA/ nisF</i>	来源于 <i>L. lactis</i> , 诱导型, 诱导物是 nisin
<i>tpE</i>	来源于 <i>L. lactis</i> , 诱导型启动子, 限制色氨酸
<i>pai70</i>	诱导型启动子, 低温或低 pH 启动表达

2.2.2 对内源基因的遗传修饰 对益生菌染色体上内源基因的遗传修饰主要指敲除有害基因, 构建缺陷型菌株, 或者改造功能性的内源基因, 筛选更为优良的益生菌菌株。报道比较多的是对乳酸杆菌进行遗传修饰, 研究表明乳酸杆菌在儿童体内帮助调控肠道菌群, 但是许多乳酸菌能够产生乳酸

脱氢酶(LDH, lactate dehydrogenase) 降解丙酮酸, 产生乳酸, 引发 D-乳酸中毒, 如果能得到不产生乳酸脱氢酶的乳酸菌就能解决乳酸中毒症的问题, 目前已经得到植物乳杆菌 *L. plantarum*、瑞士乳杆菌 *L. helveticus*、约氏乳杆菌 *L. johnsonii* La1 乳酸脱氢酶缺陷型菌株($ldhD^{-}$)^[17]。

2.3 报告系统

报告系统能够对菌体细胞代谢进行动态监测, 建立报告系统首先要将报告基因(见表 3)转化到益生菌中, 筛选得到表达报告基因的重组菌株, 把报告基因的产物作为生化标记, 通过检测这些生化标记, 监测益生菌生长繁殖情况、益生菌基因表达情况、与宿主和有害微生物之间的相互作用等。

表 3 用于益生菌体内监测的报告基因

Table 3 Reporter gene for monitor in probiotics organisms		
报告基因	基因产物	参考文献
Reporter genes	Expressed product	References
<i>cat</i> ⁺ 194(<i>Staphylococcus aureus</i>)	氯霉素乙酰转移酶	Achen et al, 1986
<i>gusA</i> (<i>E. coli</i>)	β -葡萄糖醛酸酶	Christ et al, 1994
<i>lacI/ lacM</i> (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	β -半乳糖苷酶	Hans et al, 1995
<i>amyL</i> (<i>Bacillus licheniformis</i>)	α -淀粉酶	Pascal et al, 1992
<i>luxAB</i> (<i>Vibrio fischeri</i>)	荧光素酶	Eaton et al, 1993
<i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>)	核酸酶	Poquet et al, 1998
<i>gfp</i> (<i>Aequorea victoria</i>)	绿色荧光蛋白	Martin et al, 1994

用作报告基因的 *gfp* 基因编码绿色荧光蛋白 GFP, 检测时不需要外源底物或辅因子, 可以监测基因表达和在活细胞里定位蛋白质, 实现在消化道内实时监测 GFP⁺ 菌株的代谢情况^[18,19]。已经在小鼠内使用 GFP 作为生化标记, 通过乳酸菌表达 *gfp* 基因, 利用流式细胞计量术, 对发荧光的乳酸菌计数, 监测乳酸菌的生命活动, 分析乳酸菌与不同细胞的相互作用, 到目前 GFP 系统已经被成功地应用于 *Mycobacterium bovis*、*Streptococcus thermophilus*、*Lactococcus lactis*、*Lactococcus plantarum* 等多种益生菌^[9]。

2.4 安全性

虽然目前对益生菌安全性并没有公认的解释, 但综合目前对益生菌的研究对益生菌安全性可以获得如下的认识: 益生菌一定不能是致病菌而且不能产生有害物质, 菌株不能通过遗传修饰获得有害基因或者具有把有害基因转移的潜力, 这里的有害基因包括了耐药性因子^[20]

耐药性是筛选益生菌的一个重要指标, 许多微生物自身存在抗某些抗生素的抗性基因, 一方面益生菌只有对抗菌物质具有一定耐受性才能在消化道内存活, 另一方面益生菌因为具有抗性而成为耐药性的病原体, 就会导致一些临床问题^[21~23]。通常肠道球菌 *Enterococcus faecalis* 和 *E. faecium* 对万古霉素(vancomycin) 敏感, 但是陆续从抗性菌株分离到了抗性基因 *van* 基因, 还发现一些肠道球菌能够获得 *van* 抗性基因。甚至还发现一些乳酸菌, 如 *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Leuconostoe*、*L. rhamnosus* 等自身存在包括抗万古霉素的一些抗性基因, 但这些基因与 *van* 基因没有同源性, 也没有证据表明乳酸菌会把抗性基因转移到其它微生物当中^[24]。

值得注意的是益生菌株如果含有可转移的耐药性因子, 那么对宿主生物体安全是有害的。目前认为由于基因转移获得致病基因可能是造成益生菌转变成有害菌的一个重要因素。肠道球菌被认为可以在消化道内通过自然接合(conjugation) 交换

基因信息,少数情况下会成为致病菌,当然这与宿主的免疫状况很有关系。

2.5 益生菌的功能基因组学

大规模全基因组测序为开展微生物基因组学研究提供了可能,同时为益生菌的研究开辟了一条全新的道路,形成所谓的益生菌功能基因组学研究^[25]。根据目前得到的资料,已经完成枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)^[26]、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)^[27]、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[28,29]、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[30]全基因组的测序,其它一些益生菌的全基因组测序工作也正在进行中(表 4)。

表 4 有关益生菌的测序情况^{b)}

Table 4 Genomes sequencing in progress of probiotics organisms	
菌株	基因组大小
Strain	Size(Mb)
完成全基因组测序的益生菌	
<i>Bacillus subtilis</i> 168 枯草杆菌	4.20
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403 乳酸乳球菌	2.36
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c 酿酒酵母	13
<i>Lactobacillus plantarum</i> 植物乳杆菌	3.31
正在进行全基因组测序的益生菌	
<i>Aspergillus nidulans</i> 构巢曲霉	30
<i>Aspergillus niger</i> 黑曲霉	34.5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987 腊状芽孢杆菌	5.2
<i>Bacillus stearothermophilus</i> 10 嗜热脂肪芽孢杆菌	ND
杆 菌	
<i>Bacteroides forsythus</i> 富塞思拟杆菌	ND
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC9343 脆弱拟杆菌	5.3
<i>Enterococcus faecalis</i> V583 粪肠球菌	3.0
<i>Enterococcus faecium</i> DO 屎肠球菌	2.8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC700396 嗜酸乳杆菌	1.9
乳杆菌	
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311 嗜热链球菌	1.80
链球菌	

1) 数据来源 TIGR Microbial Database, URL: <http://www.tigr.org>

研究功能基因组学的目的是研究基因突变对菌株安全性的影响,发展抗有害菌的微生物,指导益生菌的代谢工程,指导新酶或新基因的功能鉴定,实现对感兴趣的菌株进行高通量的突变分析,发展针对有害微生物的快速鉴定方法,确定种间、属间的遗传学分子标记等。

3 益生菌研究存在的问题

虽然国内外已有大量商品化的益生菌产品问世,但是除了对一些乳酸菌和酿酒酵母的研究相对

深入一些以外,大部分益生菌的研究只停留在作用效果研究上,而且这些研究结果还不系统,应该讲益生菌的研究还存在诸多难点,面临一些问题。

3.1 缺乏行之有效的研究平台 因为益生菌需要在消化道内发挥作用的,消化道内多种微生物构成了一个复杂的微生态环境,单纯通过体外微生物培养,很难全面认识某种益生菌的作用;一般的作用效果研究,还受宿主的群体和个体差异的影响,只能观察间接的生理指标,很难排除各种不确定因素对实验结果的影响。

主要是一些关键技术方法有待创新:利用体外微生物培养从复杂环境进行菌株分离已被证明很有效,但是许多微生物是不能培养的,数量少的微生物菌群可能不被检出,所以要动态的检测肠道微生物的组成分布就有困难,也无法全面描述整个微生态环境,而且费时,工作量巨大,工作过程中很难预测和评估。其次目前鉴定菌株的分类方法主要依赖于表型特征,但是有可重复性差,大规模检测费时费钱,分辨率低的缺点,虽然应用分子生物学方法有力地补充了传统方法的不足,但是对于亲缘关系很近的种或进行种内鉴定时分辨率不高。最后由于缺少细胞内部代谢和基因调控的知识,相关的技术方法也不够完善,利用基因工程技术对益生菌细胞进行遗传修饰成功的例子并不多。

所以面对这样比较复杂的研究系统,有必要建立一套研究平台,包括选择几种生理代谢研究得比较清楚、对细胞内部基因调控研究得比较深入的微生物模式种,选择合适的实验动物,建立一系列有针对性的分析方法等等。

3.2 菌株作用效果的重复性差

有的益生菌菌株在应用时存在较大的不确定性,有时作用效果不理想,可能有以下几个原因:

3.2.1 菌株自身的缺陷 有的益生菌菌群要发挥作用对宿主的消化道条件要求较高,有的在消化道内的定殖能力差,有的抗逆性差存活期短,这些因素都影响益生菌持续发挥作用。

3.2.2 益生菌的安全性问题 益生菌有益生作用并不意味着它没有有害作用,许多益生菌存在这样的争议,比较典型的就肠道球菌,它能够维持人或动物肠道内微生物的菌群平衡,用于治疗胃肠炎,也是一些食物当中的正常菌群,但是同时也能产生细菌毒素,污染食品,导致食物中毒。问题在于:(1)致病菌和安全使用菌株(GRAS, generally-

recognised as safe) 之间的界限并不清晰, 一些机会致病菌可能是人或动物消化道内的正常菌群, 具有一定的生理作用, 但是在某些条件下会产生有害作用; 还有证据表明一些致病菌的变种可以产生与传统益生菌相类似的作用^[31]。(2) 有些菌株在遗传上不稳定。遗传不稳定原因可能有多种, 目前已经证明有许多菌株容易接受外源 DNA, 存在安全的菌株变成有害菌株的可能。

3.2.3 菌株不纯 常规手段分离鉴定菌株的分辨力不够高, 不能保证菌株中所有细胞在遗传上是一致的, 由于工业上连续大规模使用, 如果缺乏足够的选择压力, 其中的“杂菌”可能产生的副作用是无法预料的。Lin 等^[32]报道过三个 *L. acidophilus* 菌株中, 只有一株能够降解乳糖, 还有报道发现在一些商品化的益生菌中对所含益生菌的鉴定比较混乱^[33]。

3.3 缺乏技术标准

缺乏包括筛选、效用、安全性和产品质量等方面的统一技术标准, 一方面是因为益生菌理论研究落后于实际应用, 即使是对应用历史很长的益生菌的作用机理还不完全清楚, 大多数的研究仅停留在试验使用效果的水平上, 结果差异大, 甚至可能出现相反的结果; 另一方面由于必要的技术方法不完善, 对于如何评价某一种益生菌的益生作用还需要进行深入研究。

评价标准不统一是阻碍益生菌应用的巨大障碍, 限制了应用范围, 增加了开拓市场的难度。目前生产在人或动物上应用的益生菌, 必须参照相关立法部门的规定, 在我国可以参照卫生部颁布的“益生菌类保健食品评审规定”(只列出了 9 种益生菌)和农业部第 105 号公告公布的允许使用的饲料添加剂品种目录(列出了饲料级微生物添加剂 12 种), 这些微生物都有较长的安全使用历史, 还有许多微生物不在批准之列, 虽然有报道证实它们具有益生作用, 但是就现有的技术条件要获得管理部门和市场的认可还需要时间, 这就造成一些益生菌不能够大规模应用。

4 展 望

4.1 益生菌作用机理研究仍然是核心问题

目前对益生菌的研究都意在揭示益生菌在生物体内的作用, 并研究如何加以利用, 但是即使是几种研究比较深入的益生菌, 还有许多问题要探

索。在分子水平上研究益生菌能够把益生菌的研究推进到一个更高的层次, 通过研究在消化道内菌体细胞的代谢、宿主对菌体细胞生产的功能性成分的利用、微生物菌群对宿主各器官的影响以及菌群之间的相互作用, 真正弄清楚益生菌在生物体内所扮演的“角色”。

4.2 安全性日益重要

近年来, 一些重大食品安全事件的爆发使人类认识无论是食品还是饲料, 只要最终消费者是人, 那么之前所有环节都至关重要, 在这样一个背景下, 使用益生菌在保障和提高食品安全性必然有它的重大意义。同时随着对安全性认识的逐步深入, 也不断对益生菌制剂的自身质量提出了新的要求, 所以无论是从技术发展情况和研究成本, 还是从法律法规要求和消费者的心理承受能力的角度讲, 应该深入研究益生菌的作用机理、开发功能明确、安全性较高的益生菌; 或者直接加入功能性成分代替使用活菌制剂, 这样效果更直接也便于效果评估。

4.3 应用更有针对性

益生菌对人或动植物的作用通常都是间接的, 更多情况下是与其它措施综合运用, 益生菌的特殊性决定益生菌的使用必须有针对性, 就是指产品功能明确, 使用对象有针对性。在畜牧生产当中, 必须找到生态效益和经济效益的最佳结合点, 认识到益生菌特殊作用的同时, 不能无限夸大它的作用, 开发针对不同禽畜和在畜禽的不同发育阶段时应用的专用益生菌产品。对于人用益生菌更多是关注益生菌在改善食品营养品质的巨大贡献以及益生菌产品中的活性成分, 根据需要开发针对不同人群和在人体不同发育阶段甚至在不同生理条件下使用的专用益生菌产品。

参考文献

- [1] Fuller R. Probiotics: The scientific basis. London: Chapman&Hall, 1992. 1~ 7
- [2] Salminen S, Bouley C, Boutrou R, Ruault M C, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr, 1998, 80(Suppl 1): S147~ S171
- [3] Shortt C, O' Brien J. Handbook of Functional Dairy Products. New York: CRC Press LLC, 2004. 1~ 29
- [4] Tannock G W. Probiotics: a critical review. Norfolk, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 1999
- [5] Fuller R. Probiotics 2: applications and practical aspects. London: Kluwer Academic Publishers, 1997

- [6] Yuarr Jun Lee. Handbook of Probiotics. New York: John Wiley&Sons, Inc, 1999
- [7] McCartney A L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. British Journal of Nutrition, 2002, 88[Suppl 1]: S29~ S37
- [8] Franco L, Vladimir K, Camilla C, et al. Specific detection of a probiotic *Lactobaillus* strain in faecal samples by using multiplex PCR. FEMS Microbiology Letters, 1998, 158: 273~ 278
- [9] Geoffroy M, Cyril G, Brigitte Q, et al. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 383~ 391
- [10] Oscar P K, Pascale G G, Ruyter A de, et al. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. Elsevier Science, 1997, 15: 135~ 140
- [11] Andrea M, Mark S T, Phil G. Analysis of promoter sequences from lactobacillus and lactococcus and their activity in several *Lactobaillus* species. Archives of Microbiology, 2000, 173: 383 ~ 389
- [12] Van Rooijen R J, Gasson M J, De Vos W M. Characterization of the *lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. J Bacteriol, 1992, 174: 2273~ 2280
- [13] De Ruyter P G G A, Kuipers O P, De Vos W M. Controlled gene expression systems for *lactococcus lactis* with the food grade inducer nisin. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 3662 ~ 3667
- [14] Helen M D, Nikki H, Michael J G. A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin. Gene, 1995, 162: 163~ 164
- [15] De Ruyter P G, Kuipers O P, De Vos W M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food grade inducer nisin. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 3662 ~ 3667
- [16] Zehava E, Michael J F, Diana M, et al. Use of the Lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in gram positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 2763~ 2769
- [17] Lapierre L, Gemond J, Andreas O, et al. D-lactate dehydrogenase Gene(*ldhD*) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobaillus johnsonii* strains Lal and N312. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 4002~ 4007
- [18] Prein B, Natter K, Kohlwein S D. A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 2000, 485: 29~ 34
- [19] Li J, Wang S, VanDusen W J, et al. Green fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae*: real-time studies of the GAL1 promoter. Biotechnol Bioeng, 2000, 70: 187~ 196
- [20] Salminen S, Von Wright A, Morelli L, et al. Demonstration of safety of probiotics —— a review. Int J Food Microbiol, 1998, 44: 93~ 106
- [21] Franz C M, Holzapfel W H, Stiles M E. Enterococci at the crossroads of food safety?. Int J Food Microbiol, 1999, 47: 1~ 24
- [22] Soile T, Kavindra V S, Pekka V. Vancomycin resistance factor of *Lactobaillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance(*van*) genes. International Journal of Food Microbiology, 1998, 41: 195~ 204
- [23] Tracy J E, Michael J G. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and protential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1628~ 1635
- [24] Klein G, Hallmann C, Casas I A, et al. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobaillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. J Appl Microbiol, 2000, 89: 815 ~ 824
- [25] Oscar P K. Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high throughput technologies for the improvement of food microorganisms. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10: 511 ~ 516
- [26] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature, 1997, 390: 249~ 256
- [27] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res, 2001, 11: 731~ 753
- [28] Goffeau A. 1996: a vintage year for yeast and Yeast. Yeast, 1996, 12: 1603~ 1605
- [29] Goffeau A, Park J, Paulsen I T, et al. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. Yeast, 1997, 13: 43~ 54
- [30] Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of *Lactobaillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 1990~ 1995
- [31] Fuller R. Probiotics: their development and use. In probiotics: prospects of use in opportunistic infections. Edited by Fuller R, Heidt P J, Rusch V, et al. Institute for microbiology and biochemistry, Old Herborn University, 1995. 1~ 8
- [32] Lin M Y, Savaiano D, Harlander S. Influence of non fermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. Dairy Sci, 1991, 74: 87~ 95
- [33] Ngo T H, Loredana B, Ashley H, et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5241~ 5247

Investigation of Probiotics through Molecular Biology

YUAN Tie zheng YAO Bin

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Probiotics is commonly defined as viable microorganisms which exhibit a beneficial influences on the health of the host when they are ingested. History of research and applications is long enough. Mechanism of probiotics has been investigated widely and thoroughly, and lots of results are practicable in applications. Nowadays the development of molecular biology, especially genetic engineering technology, promotes both the theoretical research and applications of probiotics. This paper reviews the probiotics research progresses and trends in molecular biology, from the identification of strain, safety to genetic modification of probiotics. Moreover, future recommendation for the development of probiotics is given.

Key words Probiotics Molecular biology Safety Genetic modification

化学工业出版社推荐新书

《药物微生物技术》 李越中主编 2004 年 4 月出版 定价: 30 元

本书是《现代微生物技术丛书》中的一个分册。全书系统论述了药物微生物技术的概念、研究内容和具体的应用技术。在介绍和归纳药物微生物、微生物药物和药物微生物技术的概念和内容的基础上, 详细论述了药源微生物药物的筛选技术以及药物发酵合成的生产技术, 概述了微生物技术在基因工程药物和疫苗中的应用, 对次级代谢产物合成的基因工程改造(次级代谢工程)和药物微生物基因技术等新方法进行了分析和讨论。

本书在顾及药物微生物生物技术传统内容的同时, 将更多的篇幅用于介绍和归纳各种新的技术和思维策略, 以向读者提供更多的参考和可借鉴的思路。

《现代固态发酵原理及应用》 陈洪章等主编 2004 年 8 月出版 定价: 30 元

固态发酵是指没有或几乎没有自由水存在下, 在有一定湿度的水不溶性固态基质中, 用一种或多种微生物的一个生物反应过程。从生物反应过程的本质考虑, 固态发酵是以气相为连续相的生物反应过程。固态发酵具有节水、节能的独特优势, 属于清洁生产技术, 现已逐步得到世界各国的重视。本书从全新的角度并从发展的观点来讨论固态发酵, 以期使人们对固态发酵有重新认识。

本书共分两大部分: 第 1 部分介绍现代固态发酵技术原理、研究进展等; 第 2 部分简要叙述固态发酵具体应用的工艺路线等。本书所讨论的内容充分体现了现代的特色, 已经跳出了我国传统的固态发酵的范畴, 纯种大规模培养及基因重组工程菌等概念已深入其中, 不但表明了液体发酵无法取代传统食品生产中的固态发酵, 也显示了我国在固态发酵研究和应用领域的领先性。

《生物技术原理与方法》 刘佳佳等主编 2004 年 8 月出版 定价: 30 元

本书系统地介绍了微生物的分类和分类技术, 细胞的分离纯化与保存, 细胞的生长与检测, 基因的复制、修复、转录、表达与调控, 基因重组技术, 生物反应器, 干细胞工程和生物技术在医药工业中的应用。本书选材注重工科的学科特点, 同时强调基础知识, 力求做到理论与实际应用并重。本书可作为生物工程、发酵工程、制药工程、食品科学与工程等专业的本科生、研究生的教学用书, 也可作为生物工程领域的工程技术人员的参考书。

以上图书全国各大新华书店均有销售, 邮购方法(加收 10% 邮费):

地址: 北京市朝阳区惠新里 3 号 邮编: 100029 收款人: 化学工业出版社发行部 邮购电话: 010 64918013

欢迎加入“化学工业出版社读者俱乐部”, 可免收邮费并享受其他购书优惠, 详情请致电: 010 64982530

了解更多相关图书信息, 请登录化学工业出版社网站 www.cip.com.cn