

乳酸菌載體表現系統之研究現況與趨勢

撰文/林志侯

乳酸菌簡介

「乳酸菌」是指一群能夠將醣類代謝成乳酸的微生物。乳酸菌可被分為 21 個屬，其中常應用在傳統發酵食品的乳酸菌有：乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*)、乳酸球菌屬 (*Lactococcus*)、雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*)、明串球菌屬 (*Leuconostoc*)、足球菌屬 (*Pediococcus*)、嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等，這些是被公認為安全的菌種 (generally regard as safe, GRAS)。其中又以乳酸桿菌屬最被廣為使用。

一般來說乳酸菌會有以下共同的特性：(1) 為革蘭氏陽性球菌或桿菌、無運動性、不產生孢子、耐酸性環境；(2) 營養需求複雜，需有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素及多種生長素等養分方可生長；(3) 通常缺乏過氧化氫酵素 (catalase) 活性，為厭氧、微好氧、或兼性厭氧菌。

乳酸菌是腸內最具代表性的有益菌，也是「益生菌 (probiotics)」中最重要的一群，益生菌的定義為「可以改善內生微生物相的平衡，有助益於宿主的活菌」。依據國內外研究報告，乳酸菌對人類健康的好處有：(1) 抑制有害菌生長、維持腸道菌群平衡。腸道中保持適量的乳酸菌可以與有害菌競爭生長空間，乳酸菌會形成生物膜 (biofilm)，造成屏障以防止有害菌黏附於腸道細胞，並可以抵抗環境或藥物的傷害以及增加乳酸菌吸附於腸道的能力；(2)

乳酸菌可以產生乳酸、醋酸、過氧化氫 (hydrogen peroxide)、丁二酮 (diacetyl)，這類代謝產物的蓄積皆不利於其他細菌的生長，可藉此達到抗菌的效果。另外，乳酸菌可產生抑菌素 (bacteriocin)，是細菌產生的一種含蛋白質之物質，可以抑制腸內有害菌的生長；(3) 去膽鹽及降膽固醇作用：膽固醇經氫氧化後產生膽鹽，常與醣類或胺基酸形成結合式膽鹽，經由消化道中乳酸菌分解後，形成去結合式膽鹽，於 pH6.0 以下會與膽固醇沉澱而被排出，降低膽固醇的吸收。另外，乳酸菌可以吸附腸道內的膽固醇，避免被人體吸收，並且可降低膽固醇合成酵素 (HMG-CoA reductase) 的活性，因而具有降膽固醇的作用；(4) 活化免疫功能：研究顯示乳酸菌細胞壁上的多醣成分 (如 Peptidoglycan 及 Teichoic acid)，可以誘發宿主免疫系統的活化，增加介白素 (interleukin) 和腫瘤壞死因子 (TNF) 等蛋白基因的表現，這些物質可以活化巨噬細胞，因而增進免疫功能；(5) 營養價值：乳酸菌可合成胺基酸、葉酸及維他命 B 群和 K 以供宿主利用，並促進鈣、鐵、鉀及其它營養被宿主消化吸收。

乳酸菌產品與研發趨勢

除了傳統的發酵食品例如乳酪、香腸、泡菜之外，目前台灣市面上所販售的乳酸菌相關產品，大致分為發酵乳製品與活菌錠劑或粉末。其中通過衛生署健康食品認證的共有 36 種，約佔所有案件兩成 (總件數 182 件)，顯示乳酸菌在健康食品市場上

有相當大的商機。在保健功效方面，由目前通過認證的乳酸菌商品中，多數為「改善腸道菌相或增加腸內益生菌」，只有以下幾件標榜其他特定功效，如景岳生技的「樂亦康」，使用 *Lactobacillus paracasei* 33，經動物實驗結果證實有助於減少血清中特異性 IgE 抗體之生成，以及降低脾臟細胞 IL-5 分泌量。葡萄王生技的「衛傑膠囊」，使用 *Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus gasseri*，有助於減少胃幽門螺旋桿菌之數量。光泉牧場的「LS99 機能優酪乳」，使用 *Lactobacillus salivarius*，經動物實驗結果證實，有助於降低血清中特異性 IgE 抗體之生成。

因此，未來乳酸菌商品研發的趨勢，除了篩選具有特異性的乳酸菌之外，透過基因工程技術改良，也是目前許多實驗室所著重的一環。基因工程技術是利用載體，將功能性基因導入乳酸菌中，將可提升乳酸菌產品的附加價值。

基因工程技術改良菌種亦有下列優點：(1) 可增加乳酸菌抵抗噬菌體的能力，以改善發酵製程穩定性；(2) 透過醣類代謝基因的研究，改變發酵途徑，可增進發酵效率，縮短製程；(3) 導入抑菌素基因，可取代防腐劑的使用；(4) 透過突變篩選，去除不良性狀；(5) 導入抗原基因片段，可研發乳酸菌口服疫苗；(6) 導入代醣合成基因，如山梨醣醇合成酶，可生產代糖。

研究人員已發展出食品級選殖 (food grade cloning) 與自體選殖 (self-cloning) 系統，用以建構食品級基因改造微生物。經由食品級選殖所得之基因改造微生物僅含有從 GRAS 微生物而來之 DNA，大小約在 1-50 kbp 之間。自體選殖是將一 DNA 片段從生物體取出經過酵素、化學或物理法處理後，再重新殖入該生物體內的改造過程，經由自體選殖所得之基因改造微生物體內無外來 DNA。食品級選殖與自體選殖的開發應用，使基因改造微生物發酵產品在美國成功上市販售，將是未來基因改造微生物食品發展之主流。

質體與複製模式

基因工程技術，多數是利用表現載體 (expression vector) 來運送同源基因或異源基因，所以乳酸菌表現載體的開發，便成了最基礎與優先的一項工作。乳酸菌載體多數來自於乳酸菌的原生性質體 (plasmid)，質體是獨立於染色體外的 DNA 片段，通常是雙股、可複製的環狀結構。

過去數十年來，在各種乳酸菌中發現了許多質體，大小介於 1.5 至 600kb，在這些質體上所帶的 DNA 序列，除了與複製相關的序列之外，部分會帶有一些生長非必要的基因，例如：醣類代謝、胺基酸代謝、抗藥性基因、抑菌素基因等 (Osborn, *et al.*, 2000; Takala and Saris, 2002)。此外，有許多質體屬於無性狀質體 (cryptic plasmid)，意指此質體並無顯著的功能，其對於乳酸菌宿主的顯性特徵也無影響 (von Wright and Sibakov, 1998)。無性狀質體通常較小，多數在 10kb 以下，因此是作為開發表現載體的最佳選擇。

研究質體的第一步，是將這些原生質體最小化，只保留其複製功能，換句話說，就是定義出複製子 (replicon) 的範圍。複製子通常包含：(1) 複製源 (*ori*)；(2) 調控複製起始的基因 (*cop/inc gene*)；(3) 複製時所需的複製蛋白基因 (*rep gene*) (Osborn, *et al.*, 2000)。複製子決定了一個質體的特性，其中最重要的就是在不同菌種之間複製的能力，意即宿主的廣泛性。廣宿主性 (broad host-range) 的質體適合應用於分生研究、機能性蛋白表現等，而窄宿主性 (narrow host-range) 的質體則適合應用於細菌疫苗的開發。其他評估一個質體的特性通常有：質體大小、複製方式、複製數量、穩定度、承載外來基因能力以及轉型效率等。

根據質體複製的方式可大致分為兩類： θ 型複製 (theta replication) 和滾動環狀型複製 (rolling-circle replication, RCR)。兩者最大的區別在於 RCR 型複製模式在複製過程中，有單股 DNA 的中間產物形成，而 θ 型複製模式則沒有。

RCR 型複製模式較常見於小型的質體，大小介於 1.3 至 10 kb 之間。此類質體呈現高複製數量 (high copy number) 及複製後分離較不穩定之特性。通常在同一個宿主中，只會有一個 RCR 型的質體存在。根據質體結構上的相似性等特徵，革蘭氏陽性菌的 RCR 大致可分為五種：pMV158/pE194、pC194、pT181、pSN2 和 pTX14-3 (Khan, 1997)。

革蘭氏陽性菌的質體大多為 RCR 型複製，但幾十年來也發現了許多 θ 型複製質體，這些質體通常很巨大 (>10kb)，且常帶有功能性的基因，例如噬菌體抗性、生產胞外多醣、抑菌素、乳糖酶。此類型質體有以下特性：(1) 多數呈現低複製數量 (low copy number)；(2) 複製後分離 (segregation) 穩定；(3) 在同一個宿主中，可同時存在二個以上不同的 θ 型質體；(4) 能夠承載較大片段的外來 DNA。在乳酸菌中也發現了一些 θ 型複製的無性狀質體，這些質體較小，又具有 θ 型的優點，故這類型的質體較適合用來建構成表現載體。

乳酸菌中的質體

(一) 乳酸球菌 (*Lactococcus* ; *L.*)

乳酸球菌屬中最具代表的是乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)，也是被研究最多的乳酸菌，可分為四個亞種，為 *L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、*L. lactis* subsp. *hordniae* 和 *L. lactis* subsp. *diacetylactis*。乳酸乳球菌多數含有 4-7 個質體，大小從 3 到 130kb (Davidson *et al.*, 1996)。乳酸乳球菌的原生質體在食品發酵工業上很重要，因為質體上常帶有醣類代謝基因、噬菌體抗性、接合生殖能力 (conjugation) 以及生產抑菌素的基因。乳酸乳球菌也有一些無性狀的質體，表一中列舉了乳酸乳球菌中所發現的質體及其分類 (Shareck *et al.*, 2004)。

(二) 乳酸桿菌 (*Lactobacillus* ; *Lb.*)

乳酸桿菌的分支極廣，包含 *Lb. acidophilus*、

表一 乳酸乳球菌的質體

質體名稱	來源菌種	大小(kb)	複製方式
pWV01	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	2.2	RCR
pCIS3	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	6.1	Theta
pBM02	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	3.9	RCR
pL2	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5.3	Theta
pSH71	<i>L. lactis</i>	2.1	RCR
PCI2000	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	60	Theta
pND324	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	3.2	Theta
pVS40	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	7.8	Theta
pS7a	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv.	7.3	Theta
pS7b	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv.	7.2	Theta

資料來源：Shareck *et al.*, 2004.

Lb. plantarum、*Lb. rhamnosus*、*Lb. casei*、*Lb. pentosus*、*Lb. fermentum*、*Lb. reuteri*、*Lb. helveticus*、*Lb. hilgardii*、*Lb. delbrueckii bulgaricus*、*Lb. curvatus*、*Lb. delbrueckii*、*Lb. sakei*、*Lb. delbrueckii lactis*。乳酸桿菌是最被廣泛使用在發酵食品上的菌種，例如乳製品、肉類、植物等。台灣衛生署核可的健康食品中所使用的菌種，幾乎是乳酸桿菌。乳酸桿菌中的質體個數相對較少，可能只含一至數個，大小在 1.2 至 150kb 之間。至今從乳酸桿菌中已發現許多質體，多數為無性狀質體，少部分則帶有乳糖代謝、抗生素抗性基因、抑菌素及其免疫蛋白、多醣生產等具有功能的基因。表二中列舉了乳酸桿菌中所發現的質體以及其分類 (Shareck *et al.*, 2004)。

(三) 雙歧桿菌 (*Bifidobacterium* ; *B.*)

雙歧桿菌在型態與外表特徵上類似乳酸桿菌，但在分類學上比較接近放線菌科 (Actinomycetaceae)。雙歧桿菌是腸道中的原生菌種，可與腸道壞菌競爭，對宿主健康扮演重要角

表二 乳酸桿菌的質體

質體名稱	來源菌種	大小(kb)	複製方式
p256	<i>Lb. plantarum</i>	7.2	Theta
pPB1	<i>Lb. plantarum</i>	2.9	RCR
pXY3	<i>Lb. plantarum</i>	2.9	RCR
pLFE1	<i>Lb. plantarum</i>	4.0	RCR
pD403	<i>Lb. plantarum</i>	2.8	RCR
pM4	<i>Lb. plantarum</i>	3.3	RCR
pC7	<i>Lb. paraplantarum</i>	2.1	RCR
pA1	<i>Lb. plantarum</i>	2.8	RCR
p256	<i>Lb. plantarum</i>	7.2	Theta
pLP1	<i>Lb. plantarum</i>	2.1	RCR
p8014-2	<i>Lb. plantarum</i>	1.9	RCR
pLP2000	<i>Lb. plantarum</i>	2.1	RCR
pLP9000	<i>Lb. plantarum</i>	9.3	RCR
pLKS	<i>Lb. plantarum</i>	2.0	Theta
pLEM3	<i>Lb. fermentum</i>	5.7	RCR
pLF1311	<i>Lb. fermentum</i>	2.4	RCR
p353-2	<i>Lb. pentosus</i>	2.3	RCR
pKC5b	<i>Lb. pentosus</i>	4.4	Theta
pGT232	<i>Lb. reuteri</i>	5.1	RCR
pTC82	<i>Lb. reuteri</i>	7.0	RCR
pLAB1000	<i>Lb. hilgardii</i>	3.3	RCR
pLC2	<i>Lb. curvatus</i>	2.6	RCR
pLBB1	<i>Lb. delbrueckii</i>	8.7	Theta
pJBL2	<i>Lb. delbrueckii bulgaricus</i>	8.1	Theta
pLA103	<i>Lb. acidophilus</i>	14.0	Theta
pLA105	<i>Lb. acidophilus</i>	3.2	Theta
pLA106	<i>Lb. acidophilus</i>	2.9	RCR
pLAC1	<i>Lb. acidiphiscis</i>	3.5	RCR
pLJ1	<i>Lb. helveticus</i>	11.5	Theta
pLH1	<i>Lb. helveticus</i>	19.4	Theta
pLH3	<i>Lb. helveticus</i>	5.7	RCR
pLH3	<i>Lb. helveticus</i>	3.4	RCR
pLH4	<i>Lb. helveticus</i>	2.6	RCR
pLR52-1	<i>Lb. helveticus</i>	6.4	Theta
pSAK1	<i>Lb. sakei</i>	19	Theta
pRV500	<i>Lb. sakei</i>	13	Theta
pYC2	<i>Lb. sakei</i>	1.8	RCR
pYSI8	<i>Lb. sakei</i>	5.0	RCR
pTXW	<i>Lb. paracasei</i>	3.2	RCR
pSF118-20	<i>Lb. salivarius</i>	20	Theta
pSF118-40	<i>Lb. salivariu</i>	40	Theta

資料來源：Shareck *et al.*, 2004.

色。臨床實驗亦證實服用含雙歧桿菌的發酵乳，可以抑制腸道腫瘤與促進免疫功能的效果。在部分雙歧桿菌屬中也發現了一些質體（表三），包含 *B. longum*、*B. globosum*、*B. breve*、*B. asteroides* 以及 *B. pseudocatenulatum*，其中以 *B. longum* 最多，這些質體多數為 RCR 複製型，大小在 5Kb 以下 (Shareck *et al.*, 2004)。

(四) 嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)

嗜熱鏈球菌屬於鏈球菌屬 (*streptococcus*)，是此屬唯一可用於食品發酵的菌種。嗜熱鏈球菌可在高溫下 (52°C) 進行醱類發酵，也是目前許多發酵乳製品的初步發酵過程中會使用的菌種。嗜熱鏈球菌中帶有質體的比例不高，目前已發現的質體如表四所示 (Shareck *et al.*, 2004)。

表三 雙歧桿菌的質體

質體名稱	來源菌種	大小(kb)	複製方式
pDOJH10L	<i>B. longum</i>	10.0	RCR
pDOJH10S	<i>B. longum</i>	3.6	Unknown
pMB1	<i>B. longum</i>	1.9	Theta
pJK50	<i>B. longum</i>	5.0	RCR
pMG1	<i>B. longum</i>	3.9	RCR
pBLO1	<i>B. longum</i>	3.6	RCR

資料來源：Shareck *et al.*, 2004.

表四 嗜熱鏈球菌的質體

質體名稱	來源菌種	大小(kb)	複製方式
pST1	<i>S. thermophilus</i>	2.1	RCR
pER8	<i>S. thermophilus</i>	2.2	RCR
pER371	<i>S. thermophilus</i>	2.7	RCR
pER341	<i>S. thermophilus</i>	2.8	RCR
pC165st	<i>S. thermophilus</i>	6.5	RCR
pSMQ172	<i>S. thermophilus</i>	4.2	RCR

資料來源：Shareck *et al.*, 2004.

乳酸菌複製型表現載體

一個複製型表現載體通常要具有以下特性：(1) 複製源 (replication ori)；(2) 篩選標記，通常為抗生素抗性基因（但食品級載體避免使用），以方便挑選轉型基因；(3) 具有一個以上的限制酶切位 (multiple cloning site)，以利選殖目標基因；(4) 整個載體大小不要太大；(5) 在無篩選壓力下（不添加抗生素），載體在宿主中維持的穩定度。

目前在分子生物學上使用的乳酸菌載體，有一部分是源自於 pIP501 與 pAMβ1，分別來至 *Streptococcus* 和 *Enterococcus*。此類載體為 θ 型質體，它們結構穩定，且可以在其他乳酸菌中複製，例如 *Lactococcus* spp.、*Lactobacillus* spp. 和 *Pediococcus* spp. (de Vos and Simons, 1994)，但是 Streptococci 和 Enterococci 並非 GRAS 的菌種，因此並不適合應用於食品工業。因此，各種乳酸菌來源的無性狀質體，也陸陸續續被建構成表現載體（表五）。例如 pGK 系列載體，源自於乳酸乳球菌的無性狀質體 pWV01，可以在 *Lb. acidophilus*、*Lb. brevis*、*Lb. casei*、*Lb. fermentum*、*Lb. helveticus*、*Lb. plantarum* 等乳酸桿菌中複製 (Posno *et al.*, 1991)，此類型載體為 RCR 複製型，複製後分離較不穩定，但用來表現小片段 DNA 還是有其可用之處。另外，有些乳酸桿菌質體的複製子可以在大腸桿菌 (*E. coli*) 中複製，例如 *Lb. plantarum* 的 pA1。因此利用 pA1 建構的載體可作為穿梭載體，方便在大腸桿菌操作 (Vujcic and Topisirovic, 1993)。有些載體源自於窄宿主性質體，例如 *Lb. fermentum* 的 pLEM5，只能在原始宿主中複製 (Fons *et al.*, 1997)。這類型的載體很適合用於基因改造乳酸菌，因為這類載體不會在宿主體內或環境中傳遞給其他菌種，尤其適合應用在細菌疫苗的開發。

由於複製型態的特性，RCR 型質體複製過程中會產生單股 DNA，相形之下 θ 型質體具有較高的質體穩定度，因此較適合被用來建構表現載體。但多數 θ 型質體的複製數目較少，所以透過篩選找出複製

數目較多的 θ 型質體，也是未來篩選質體的目標之一。另外，透過嵌入型表現載體將目標基因嵌入乳酸菌的染色體中，也是解決穩定度的一個好方法。

乳酸菌嵌入型表現載體

使用複製型載體的最大缺點即為載體的穩定性不佳，當在沒有篩選抗生素的壓力下，宿主繼代之後，載體非均勻的分配至子代而導致子代逐漸失去載體，載體上功能基因的表現總量逐漸變少，而解決此問題之方法為將載體上的篩選或功能基因嵌入宿主的染色體上，則此基因會隨著宿主繼代而傳至下一代。目前所知將基因嵌入染色體的方法有三種：轉位插入 (transposition)、特定位點重組 (site-specific recombination) 及同源基因或相似序列重組 (homologous recombination)。

轉位嵌入是利用轉位子來進行，轉位子依其大小可分為 transposon (Tn) 及 insertion sequences (IS)，在適當條件下轉位子會隨機嵌入宿主染色體，並將載體上的基因也一併嵌入，目前在乳酸菌已有找到不少的轉位子，例如：Tn916、Tn917、IS1191、IS1201、IS1223、ISS1、ISLrel 等 (Gury, Barthelmebs and Cavin, 2004；Jang *et al.*, 2003)，但是實際可作用於異種乳酸菌的轉位子並不多，因為大部分轉位子有其宿主專一性之特性，在他種乳酸菌中容易失去活性。轉位子型載體又依其轉位機制可分為複製型及非複製型，非複製型只有一套轉位子，將基因送至染色體的目標位置，複製型的載體上則有兩套；大部分轉位子型載體主要功能是利用轉位子隨機嵌入及跳出的特性，建構隨機突變系統，以此工具來研究宿主的代謝及生理作用機制。

特定位點重組是使用噬菌體嵌入酶 (integrase) 作用，嵌入酶會辨認噬菌體上的 *attP* 位置，與宿主染色體上的 *attB* 位置，此兩個位置有一段很短的相同序列 (core site)，嵌入酶可利用此相同序列進行重組將載體嵌入宿主染色體，有些嵌入酶還需有宿主因子同時參與才可進行重組。目前在乳酸菌中

表五 乳酸菌的複製型表現載體

載體名稱	複製子	來源菌種	篩選標記	大小(kb)	宿主範圍
pGK12	pWV01	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r Em ^r	4.4	<i>L. lactis</i> <i>B. subtilis</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. reuteri</i>
pGKV210	pWV01	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r Em ^r	4.4	<i>L. lactis</i> <i>B. subtilis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. reuteri</i>
pNZ11	pSH71	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r Km ^r	4.9	<i>B. subtilis</i> <i>L. lactis</i> <i>E. coli</i>
pNZ12	pSH71	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r Km ^r	4.1	<i>B. subtilis</i> <i>L. lactis</i> <i>E. coli</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>
pCP12	pWC1	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r	3.9	<i>L. lactis</i> <i>L. garviae</i> <i>S. thermophilus</i> <i>En. faecalis</i> <i>Sp. aureus</i>
pFX1	pD125	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r	5.5	<i>L. lactis</i>
p21-22	pBM02	<i>L. lactis</i> subsp.	AP ^r Em ^r	NA	<i>L. lactis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>B. subtilis</i>
pCI3340	pCI305	<i>L. lactis</i> subsp.	Cm ^r	5.7	<i>L. lactis</i>
pULP8	pLP1	<i>Lb. plantarum</i>	AP ^r Em ^r	6.6	<i>Lb. plantarum</i> <i>B. bacillus</i>
pLPV106	p256	<i>Lb. plantarum</i>	AP ^r Em ^r	NA	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>
pA1	pA1	<i>Lb. plantarum</i>	Cm ^r	4.0	<i>E. coli</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. delbrueckii</i>

(待續)

表五 乳酸菌的複製型表現載體

載體名稱	複製子	來源菌種	篩選標記	大小(kb)	宿主範圍
pLP825	p8014-2	<i>Lb. plantarum</i>	AP ^r Cm ^r	7.6	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. brevid</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. pentosus</i>
pLEM5	pLEM3	<i>Lb. fermentum</i>	Em ^r	3.4	<i>Lb. fermentum</i>
pLFVM2	pLF1311	<i>Lb. fermentum</i>	Cm ^r	5.0	<i>Lb. buchneri</i> <i>L. lactis</i> <i>En. faecalis</i> <i>En. faecium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>subsp. galleriae</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>subsp. kurstaki</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>subsp. finitimus</i> <i>B. flavum</i> <i>E. coli</i>
pSP1	pKC5b	<i>Lb. pentosus</i>	Em ^r	9.4	<i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. spp.</i> <i>Lb. gasserii</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. salivarius</i> <i>S. mutans</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. sanguis</i>
pLP3537	p353-2	<i>Lb. pentosus</i>	AP ^r Em ^r	6.3	<i>Lb. acidophilu</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. plantarum</i>
pNCKH 104	pGT232	<i>Lb. reuteri</i>	Em ^r	5.7	<i>Lb. reuteri</i>
pLAB1102	pLAB 1000	<i>Lb. hilgardii</i>	AP ^r Cm ^r	7.5	<i>B. bacillus</i> <i>En. Faecalis</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. casei</i>
pJK352	pLC2	<i>Lb. curvatus</i>	AP ^r Cm ^r	5.9	<i>B. bacillus</i> <i>Lb. casei</i> <i>L. lactis</i>
pLHR	pLJ1	<i>Lb. helveticus</i>	AP ^r Em ^r	8.5	<i>Lb. helveticus</i>
(待續)					

表五 乳酸菌的複製型表現載體

載體名稱	複製子	來源菌種	篩選標記	大小(kb)	宿主範圍
pULA105E	pLA105	<i>Lb. acidophilus</i>	AP ^r Em ^r	7.8	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i>
pLA106PVem	pLA106	<i>Lb. acidophilus</i>	Em ^r	3.6	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>E. coli</i>
pRV566	pRV500	<i>Lb. sakei</i>	AP ^r Em ^r	7.3	<i>Lb. sakei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i>
pLS203	pSF118-20	<i>Lb. salivarius</i>	Em ^r	NA	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. salivarius</i>
pLF5	pMB1	<i>B. longum</i>	Cm ^r Ap ^r	7.3	<i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. magnum</i>
pBKJ50F/R	pJK50	<i>B. longum</i>	Cm ^r Ap ^r	8.1	<i>B. animalis</i>
pBES2	pMG1	<i>B. longum</i>	Cm ^r Ap ^r	7.6	<i>B. longum</i>
pLAV	pMB1	<i>B. longum</i>	Cm ^r	4.3	<i>B. animalis</i>
pMEU5	pER8	<i>S. thermophilus</i>	AP ^r Em ^r	5.7	<i>S. thermophilus</i>
pSMQ172 cat	pSMQ172	<i>S. thermophilus</i>	Cm ^r	5.7	<i>S. thermophilus</i>
pND913	pND103	<i>S. thermophilus</i>	AP ^r Em ^r	6.4	<i>S. thermophilus</i>
pHRM1	pSt08	<i>S. thermophilus</i>	shsp	6.4	<i>S. thermophilus</i>

Cm^r: chloramphenicol resistance. Em^r: erythromycin-resistance.
 AP^r: ampicillin-resistance. Shsp: small heat shock protein (小型熱休克蛋白)。
 NA: not available.
 資料來源: Shareck *et al.*, 2004.

已發現多種溫和型噬菌體，例如：TP901-1、mv4、ΦLC3、ΦA2、ΦAT3(Alvarez, Herrero and Suarez, 1998; Lo *et al.*, 2005)，多種前述噬菌體之嵌入酶已被用來建構嵌入載體，載體上需有嵌入酶基因及 *attP* 序列，而宿主需有相對應之 *attB* 序列及宿主因子，因此 *attB* 序列之相似性與宿主因子有無，影響載體應用的宿主範圍。

利用同源或相似基因重組方式所建構之嵌入型

載體，可用來進行基因剔除，擴增，置換及插入。此種載體可用單一交換或是二次交換重組方式將基因嵌入宿主染色體；單一交換重組是載體上有一個同源性序列區域，此片段與宿主染色體上基因或序列有高相似性，經由同源性重組將整個載體嵌入宿主染色體特定序列內，因而可用來進行基因插入或破壞，又此種重組方式是可逆的，所以需要篩選條件以維持載體嵌入宿主染色體之穩定性。而二次

交換重組是載體上有二個同源性序列區域，經由同源性重組將載體上二個同源性序列區域內的基因片段與宿主染色體上的交換，因而造成宿主特定基因的剔除或插入，此種重組方式是極穩定的，在沒有篩選條件下，仍可保持載體與宿主染色體序列交換的結果 (Goh *et al.*, 2009 ; Rossi, Capodaglio and Dellaglio, 2008 ; Russell and Klaenhammer, 2001)。表六列舉使用上述三種方法所建構的嵌入重組載體。

表六 嵌入重組載體

載體名稱	轉位子/嵌入酶來源/同源基因	篩選或功能表現基因	宿主範圍
轉位嵌入載體			
pJC4	IS1223	Em ^r <i>celA</i>	<i>Lb. johnsonii</i> 、 <i>Lb. gasserii</i> 、 <i>Lb. bulgaricus</i> 、 <i>Lb. plantarum</i>
pGh9:IS S1	ISS1	Cm ^r <i>padA</i>	<i>Lb. plantarum</i> NC8
特定位點重組載體			
pBC143	TP901-1 from <i>Lc. cremoris</i>	Em ^r	<i>Lc. cremoris</i> 、 <i>Lc. lactis</i>
pMC1	mv4 from <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	Em ^r	<i>Lb. plantarum</i> 、 <i>Lb. casei</i> 、 <i>Lc. cremoris</i>
pEM40	ΦA2 from <i>Lb. paracasei</i>	Em ^r	<i>Lb. casei</i> 、 <i>Lb. paracasei</i> 、 <i>Lb. plantarum</i> 、 <i>Lc. lactis</i>
pSKEIN	ΦAT3 from <i>Lb. casei</i>	Em ^r	<i>Lb. casei</i>
同源基因重組載體			
pGAF002	<i>Cbh</i>	Em ^r 及澱粉酶alpha-amylase from <i>Lb. plantarum</i> Lp80 <i>Lb. amylovorus</i>	
pP7B6NI	<i>Cbh</i>	Em ^r 及 <i>nisI</i>	<i>Lb. plantarum</i> Lp80
pTRK935	<i>slpX</i>	<i>upp</i> Em ^r	<i>Lb. acidophilus</i> NCFM

Cm^r: chloramphenicol resistance. Em^r: erythromycin-resistance.

padA: gene encoding a phenolic acid decarboxylase.

Cbh: gene encoding conjugated bile salt hydrolase (結合型膽鹽水解酶)。

celA: gene encoding extracellular endoglucanase A of *Clostridium thermocellum*.

nisI: gene encoding nisin immunity gene *nisI*.

slpX: gene encoding S-layer complex.

資料來源: Gury *et al.*, 2004 ; Jang *et al.*, 2003 ; Alvarez *et al.*, 1998 ; Lo *et al.*, 2005 ; Goh *et al.*, 2009 ; Rossi *et al.*, 2008 ; Russell and Klaenhammer, 2001.

可誘導型載體

表現載體另一個重點在於可調控性。目的在於使目標基因在宿主的特定生長期間才表現。載體的調控性來自於各式的啟動子 (promoter)，但不是每一種皆可用於食品工業，關鍵在於啟動子對應的誘導物 (inducer) 也必須是食品級的。目前文獻中乳酸菌曾使用的可調控表現系統，大致可分為下列幾種 (表七) (Shareck *et al.*, 2004)：

(一) 醣類基因

在乳酸菌中醣類基因中，乳糖操作組 (lac operon) 的研究最多，乳糖的添加可誘導 lac promoter 下游基因的表現，而且乳糖本身即是乳酸菌發酵常用的碳源，因此作為表現載體的誘導物，並無安全之虞。

(二) 高溫誘導

乳酸菌噬菌體中的有些基因會受溫度提升而誘導其表現，例如 *Lb. casei*ΦFSW-TI 的啟動子，當溫度由 28°C 提升到 42°C 時，會啟動下由基因的表現 (Binishofer *et al.*, 2002)。另外乳酸乳球菌中的噬菌體基因 *rro* 與 *tec*，也具有相似的特性，這兩個基因的啟動子被拿來建構誘導型表現載體，當溫度由 24°C 提升到 42°C 時，可得到 500 倍的蛋白表現量 (Nauta *et al.*, 1996)。

(三) 低溫誘導

乳酸菌的冷休克蛋白 (cold-shock protein)，可以在 16°C 以下大量表現，利用此啟動子可建構低溫表現蛋白系統 (Derzelle *et al.*, 2002)。雖然低溫下細菌生長速度遲緩，需要較長時間來產生蛋白，但低溫下表現的蛋白亦有摺疊較穩定的特性，可解決部分摺疊錯誤造成無法溶解的問題 (inclusion body)。

(四) 酸性環境

乳酸菌是可耐酸性環境的菌種，因此必定有許多基因在酸性環境下會被誘導表現。根據這個

想法，研究發現了 GadR 蛋白，在酸性環境、穀氨酸鹽或氯化物存在時，會被活化並作為轉錄活化子 (transcription activator)，促使 *gadCB* 的基因的轉錄，可達 1000 倍之多 (Sanders *et al.*, 1998)。因此 *gad* 啟動子便成為建構表現載體的一個好選擇。

(五) 誘導胜肽分子(AIP)

目前最佳的誘導型表現載體是 NICE system(nisin controlled expression)。Nisin 是乳酸乳球菌所生產的一種抑菌素，也是美國食品與藥物管理局 (FDA) 核可的食品添加劑。Nisin 本身除了抑菌的功能外，也是一個誘導訊號分子，透過膜上的 NisK 蛋白接收訊號，活化轉錄活化子 NisR 蛋白，促使 *nisA* 啟動子下游基因的表現 (Henrich *et al.*, 2002)。此系統所可誘導超過 1000 倍的蛋白表現。除了在乳酸乳球菌中表現外，目前這套系統也可以在 *Lactobacillus* 與 *Leuconostoc* 中表現。類似的系統也陸陸續續被發表，例如利用 *Lb. sakei* 中所具有的抑菌素 sakacin A 作為誘導物，透過 SapK 和 SapR 的調控，可活化 *sapA* 啟動子下游的基因 (Axelsson, Lindstad and Naterstad, 2003)。

食品級載體

經由基因工程改造的乳酸菌必須要符合 GRAS 菌種的規範，因此建構的表現載體以及表現的目標基因來源都必須為 GRAS 菌種。另外為了方便在轉型 (transformation) 過程中，篩選轉型成功的菌株，必須使用的篩選標記 (selection marker)。分子生物學中最常用的篩選標記是抗生素的抗性基因，但這些抗生素抗性基因以及抗生素是並不符合食品級的規範，因此無法使用。故研究學者便開發出取代的篩選系統。大致可分為三類：

(一) 稀有醣類代謝基因

由於大部分乳酸菌可以代謝多種醣類，除了有些罕見的醣類之外，例如木糖 (xylose)、菊糖 (inulin)、蜜二糖 (melibiose) 等。因此從 GRAS 菌種找出這些醣類代謝基因，建構在載體上，可以用來作為篩選標記 (Posno *et al.*, 1991; Wanker *et al.*, 1995)。

(二) 代謝基因缺乏菌株

部分乳酸菌因天然或人工誘導突變，使之缺乏某些代謝基因，例如乳糖、胺基酸代謝基因等。因此這些基因缺陷菌株在特定營養成分的培養基中，因無法代謝而停止生長。利用載體表現系統，將這些代謝基因建構在載體上，配合基因缺陷菌株，便可建構篩選系統 (Sasaki, Ito and Sasaki, 2004)。

(三) 抑菌素系統

如前一章節「可誘導型載體」第五點所述，NICE system 中的 AIP 分子— Nisin，同時也是抑菌素。而宿主本身之所以不會被 Nisin 所抑制，是因為本身含有免疫蛋白 *nisI*，因此將 *nisI* 建構於表現載體中，便可作為篩選系統的標記 (Takala and Saris, 2002)。

結論

乳酸菌的質體已有部分被拿來作為複製型或嵌入

表七 乳酸菌可誘導型載體

乳酸菌種	誘導方法	被誘導元件
<i>L. lactis</i>	乳糖	<i>lacA</i> , <i>lacR</i> promoter
<i>S. thermophilus</i>	乳糖	<i>lacS</i> -GalR
<i>Lb. pentosus</i>	木糖(xylose)	<i>xyIA</i> promoter
<i>L. lactis</i>	高溫	<i>tec</i> promoter
<i>Lb. casei</i>	高溫	ΦFSW-TI promoter
<i>Lb. plantarum</i>	低溫	<i>cspL</i> promoter
<i>L. lactis</i>	Nisin	<i>nisA</i> promoter
<i>Lb. sakei</i>	sakacin A	<i>sapA</i> promoter

資料來源：Shareck *et al.*, 2004.

型載體，尤其是乳酸桿菌與乳酸球菌。未來乳酸菌載體研究發展重點可歸納為下列數點：

1. 尋找無性狀質體

雖然已從乳酸菌中找到許多質體，但不是每個皆適合作為表現載體。因此廣泛的尋找更多無性狀質體，是未來研究的首要目標。

2. 徹底研究質體的特性

許多新發現的質體還未被研究透徹，包括其複製子的定義、複製方式、承載 DNA 片段能力以及穩定度等。

3. 建構食品級載體

尋找取代抗生素的篩選系統，以建構食品級的載體。

4. 建構可誘導型載體

透過啟動子的研究，篩選出可誘導型的啟動子，且其誘導物需符合 GRAS。

然而透過載體表現系統改良乳酸菌，即面臨基因改造食品的問題。由於基因改造 (genetic modification) 一詞在不同國家有不同之定義，因此每個國家對於基因改造食品的規範也不盡相同，這使得同一個基因改造產品，在不同國家中卻有不同的命運。例如美國食品與藥物管理局 (FDA) 所核可的發酵菌株 MC010，是由 *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 所篩選出的突變株，其相關發酵產品在美國已成功上市，但是依歐盟規範則禁止此商品在歐洲地區販售。因此，國際上對於基因改造生物管理規範之調和，也是未來各國重要之議題。

AgBIO

林志侯 國立清華大學 分子醫學所 教授

參考文獻

1. Alvarez, M. A., Herrero, M. and Suarez, J. E. (1998) *The site-specific recombination system of the Lactobacillus species bacteriophage A2 integrates in gram-positive and gram-negative bacteria*. *Virology* 250(1):185-193.
2. Axelsson, L., Lindstad, G. and Naterstad, K. (2003) *Development of an inducible gene expression system for Lactobacillus sakei*. *Letts. Appl. Microbiol.* 37(2):115-120.
3. Binishofer, B. *et al.* (2002) *Inducible promoter-repressor system from the Lactobacillus casei phage phiFSW*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8):4132-4135.
4. Davidson, B. E. *et al.* (1996) *Genomic organization of lactic acid bacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70(2-4):161-183.
5. de Vos, W. M., and Simons, G. (1994) *Gene cloning and expression systems in Lactococci, in Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. In: de Vos, W. M. and Gasson, M. J. (Ed.) Chapman & Hall, Glasgow, UK. pp.52-105.
6. del Solar, G. and Espinosa, M. (2000) *Plasmid copy number control: an ever-growing story*. *Mol. Microbiol.* 37(3):492-500.
7. Derzelle, S. *et al.* (2002) *Cold shock induction of the cspL gene in Lactobacillus plantarum involves transcriptional regulation*. *J. Bacteriol.* 184(19):5518-5523.
8. Fons, M. *et al.* (1997) *Isolation and characterization of a plasmid from Lactobacillus fermentum conferring erythromycin resistance*. *Plasmid* 37(3):199-203.
9. Goh, Y. J. *et al.* (2009) *Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of Lactobacillus acidophilus NCFM*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(10):3093-3105.
10. Gury, J., Barthelmebs, L. and Cavin, J. F. (2004) *Random transposon mutagenesis of Lactobacillus plantarum by using the pGh9:IS S1 vector to clone genes involved in the regulation of phenolic acid metabolism*. *Arch. Microbiol.* 182(5):337-345.
11. Henrich, B. *et al.* (2002) *Food-grade delivery system for controlled gene expression in Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11):5429-5436.

參考文獻

12. Jang, S. J. *et al.* (2003) *New integration vector using a cellulase gene as a screening marker for Lactobacillus*. FEMS Microbiol. Lett. 224(2):191-195.
13. Khan, S. A. (1997) *Rolling-circle replication of bacterial plasmids*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(4):442-455.
14. Lo, T. C. *et al.* (2005) *Complete genomic sequence of the temperate bacteriophage PhiAT3 isolated from Lactobacillus casei ATCC 393*. Virology 339(1):42-55.
15. Nauta, A. *et al.* (1996) *Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from Lactococcus lactis bacteriophage r1t*. Mol. Microbiol. 19(6):1331-1341.
16. Osborn, A. M. *et al.* (2000) *Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons*. Microbiology 146(Pt9):2267-2275.
17. Posno, M. *et al.* (1991) *Incompatibility of Lactobacillus Vectors with Replicons Derived from Small Cryptic Lactobacillus Plasmids and Segregational Instability of the Introduced Vectors*. Appl. Environ. Microbiol. 57(6):1822-1828.
18. Rossi, F., Capodaglio, A. and Dellaglio, F. (2008) *Genetic modification of Lactobacillus plantarum by heterologous gene integration in a not functional region of the chromosome*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80(1):79-86.
19. Russell, W. M. and Klaenhammer, T. R. (2001) *Efficient system for directed integration into the Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus gasseri chromosomes via homologous recombination*. Appl. Environ. Microbiol. 67(9):4361-4364.
20. Sanders, J. W. *et al.* (1998) *A chloride-inducible acid resistance mechanism in Lactococcus lactis and its regulation*. Mol. Microbiol. 27(2):299-310.
21. Sasaki, Y., Ito, Y. and Sasaki, T. (2004) *ThyA as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 70(3):1858-1864.
22. Shareck, J. *et al.* (2004) *Cloning vectors based on cryptic plasmids isolated from lactic acid bacteria: their characteristics and potential applications in biotechnology*. Crit. Rev. Biotechnol. 24(4):155-208.
23. Takala, T. M. and Saris, P. E. (2002) *A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene nisl*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59(4-5):467-471.
24. von Wright, A., and Sibakov, M. (1998) *Genetic modification of lactic acid bacteria, in Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd Ed.* In: Salminen, S. and von Wright, A. (Ed.) Marcel Dekker, New York, USA. pp.161-210.
25. Vujcic, M. and Topisirovic, L. (1993) *Molecular analysis of the rolling-circle replicating plasmid pA1 of Lactobacillus plantarum A112*. Appl. Environ. Microbiol. 59(1):274-80.
26. Wanker, E. *et al.* (1995) *Expression of Bacillus subtilis levanase gene in Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43(2):297-303.