

安全級/食品級異源蛋白分泌表現系統之開發及應用

撰文/葉娟美

前言

最近有媒體報導有關基改食品的安全疑慮問題，筆者心中不由升起戚戚之感。多年前，同樣有類似報導，在媒體大幅渲染下，“基改”兩字似乎與“不安全”畫上了等號。以生物技術為專長的研究者們，難免有有口難言之感。筆者當時認為，生物技術是工具，猶如刀可雕出藝術品，可切出適當食材表現美味，但也可能傷人見血；端視使用者如何設計開發刀型及應用方式。在此思考模式之下，筆者乃以開發安全級/食品級異源蛋白分泌表現系統為目標，期能在學術方面開發改進異源蛋白分泌表現系統，更希望能以生物技術，做出優質且安全的產品，達到產業化，讓科學結晶成為有利於社會的產品。

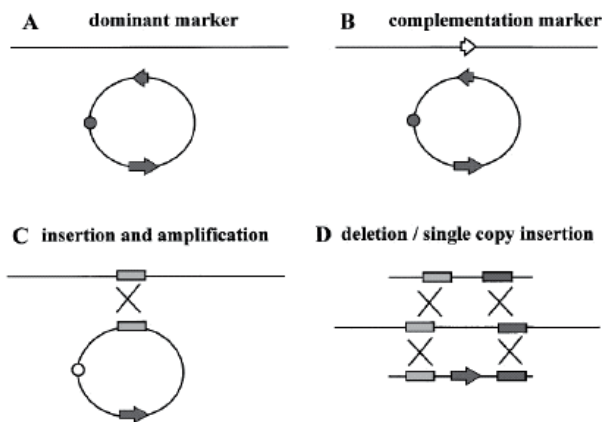
安全級/食品級表現系統

食品生技產業中，消費大眾對食用基因轉殖作物的安全性仍存疑慮，基因轉殖動物也有道德及倫理爭議。相較之下，以微生物生產食品生技產品，有成本低、安全性易掌控、較無爭議之優點。然而以微生物生產食品生技產品之首要訴求，在於生產系統之安全性。例如大腸桿菌，雖然已有充分的背景知識及遺傳工程技術，純化產物經嚴謹且耗時耗錢的安全測試後，可應用於醫藥業，獲得極大經濟利益；然而以大腸桿菌應用於食品仍因有潛在毒素物質之疑慮，無法被接受。依據聯合國食品標準(法典)委員會安全基改規範(CAC/GL 46-2003)，應用於食品工業之宿主應為安全級(generally recognized

as safe, GRAS) 或食品級(food grade) 宿主。安全級宿主應符合 FDA 之規範。食品級宿主則應有人類長遠食用歷史，應用於人類食用為安全或具有健康促進功能者。

除宿主之安全性外，由於基因工程操作過程，操作 DNA 的載體需要適當的選擇標記(selection marker) 及篩選標記(screening marker)，方能順利進行選殖及表現，因此需考慮微生物宿主-質體系統的整體安全性。早期食品級微生物宿主-質體系統廣義的定義為：凡帶有食品中被認可使用之成分者均可認定為食品級(Platteeuw *et al.*, 1996)。自此食品級微生物宿主-質體系統陸續被開發，然而大多仍以抗抗生素基因作為選擇標記。稍後有關基因改造微生物之安全規範，在 2001 年聯合國糧農組織(Food and Agriculture Organization, FAO) 及世界衛生組織(World Health Organization, WHO) 專家會報中有初步規範。在使用之宿主及載體方面，宿主須有長遠之食用安全歷史(無論作為食品或食品成分)，載體則須來自具食用安全歷史之菌株，所選用之篩選標記需依安全考量謹慎選擇，其序列及表現蛋白質需提供其安全性依據，特別是抗抗生素篩選標記應避免使用，並不可在產物中殘留抗生素。所殖入 DNA 片段則須已具有或建立其食品使用之安全性。2003 年聯合國食品標準(法典)委員會(Codex Alimentarius Commission, 簡稱 Codex) 公布基因改造食品安全評估方針，則對基改微生物作出更詳細而嚴謹的規範(CAC/GL 46-2003)，依據 Codex 之建

議，不可使用抗抗生素選擇標記 (selection marker)，可以採取其他取代法，例如染色體嵌入法，異營宿主配合質體互補功能基因表現，或以食品級抑菌劑做為選擇標記等法 (圖一)。



資料來源：de Vos, 1999.

(A)：食品級抑菌劑選擇標記；(B)：異營宿主配合質體互補功能基因選擇標記；(C)與(D)：染色體嵌入法

圖一 取代抗生素之食品級系統選擇標記法

筆者實驗室開發初始時，以未來能量產產業化為主要考量因素之一，有鑑於染色體嵌入可能需反覆測試轉形株之基因型安定性，也較可能造成無法預期的基因改變，此外，基因拷貝數不可能高。以異營宿主配合質體互補功能基因表現，則需先將宿主染色體上之基因破壞，或搜尋適合宿主，再導入表現質體，操作過程較繁複，突變株之基因型安定性同染色體嵌入法，需反覆測試，也有無法預期基因改變的疑慮，並且質體可能因缺乏選擇壓力而丟失，導致表現量受影響。以食品級抑菌劑來做選擇標記，則須選擇適當食品級抑菌劑，並建立條件。優點為菌株及質體較穩定，拷貝數高因而表現量高。筆者實驗室因而採用食品級抑菌劑 nisin，對人體基本上無毒性，也不與醫用抗生素產生交叉抗藥性，能在腸道中被蛋白水解酶所降解，1988 年 FDA 正式通過 nisin 在食品保存之安全應用 (GRAS)，且

已在 60 多個國家和地區作為食品保存劑之用。因此，以抗 nisin 基因作為食品級選擇標記載體是極為理想的。本實驗室目前有 nisin 免疫相關基因 *nisI* 以及分解 nisin 的 *nsr* 基因兩種系統，前者適用於安全級菌株枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)，後者適用於食品級乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 系統，同時也證明兩系統在不使用 nisin 時，同樣可穩定大量生產異源蛋白質。

分泌表現系統的優點

欲達工業化，除了安全性外，成本也是必然需考慮的一環。因此“量產”是產業化的前提之一。為了達到異源蛋白質的高量表現，蛋白的表現過程中轉錄轉譯機制達到最佳化，是首要考量。本實驗室已分別就此方向，設計合成、融合或挑選出最佳安全級枯草桿菌及食品級乳球菌系統之最佳化轉錄、轉譯原件。

除高量表現外，導入分泌元件，以達菌體外生產，是另一重要考量。先前基因工程大多以大腸桿菌為宿主，然而大腸桿菌並不具強力的菌體外分泌系統，因此欲大量表現重組蛋白時，常造成重組蛋白之蓄積，形成內涵體 (inclusion body)，且蛋白質功能性會因結構不佳而受影響，在回收及純化時造成極大不便，不利於工業化大量生產之需要 (Kane and Hartly, 1998)。本實驗室所開發之安全級枯草桿菌及食品級乳球菌，本身即具有較強分泌能力，可將基因產物即蛋白質分泌至菌體外。只需導入適當分泌訊息胜肽，即可利用原本所有之菌體外分泌機組表現重組蛋白於胞外，容易獲得正確折疊具活性之蛋白質，改進以大腸桿菌為宿主細胞之缺點，使發酵完成後續步驟如分離回收及純化等更有效率，利於大量生產重組蛋白之工業化 (Harwood, 1992; Le Loir *et al.*, 2005)。

筆者實驗室目前已針對抗凍蛋白、靈芝免疫調節蛋白等異源蛋白之分泌完成最佳化，抗凍蛋白可以提升冷凍藏食品品質並延長貯藏期限，靈芝免疫

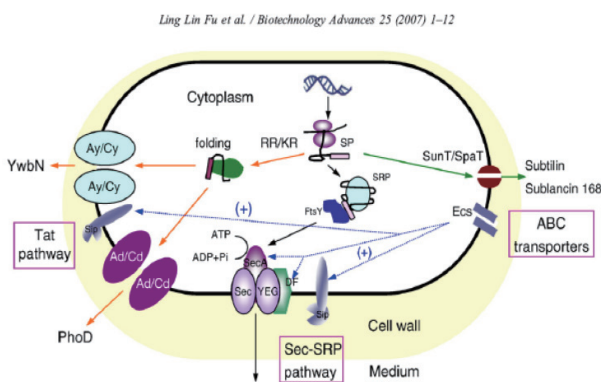
調節蛋白則可以降低過敏反應，或應用於減敏治療，也可應用於癌症癒後緩解效果。此二技術已分別技轉原味鮮生技及葡萄王生技，進行放大規模生產，達到最初的理想—科學結晶成為有利於社會的產品。然而，對較難表現的異源蛋白，尚需進行不同訊息胜肽之探討。例如安全級枯草桿菌目前之分泌機制（圖二），其中主要包括 Tat 分泌途徑及 Sec-SRP 分泌途徑，可經由導入不同訊息胜肽來導引經由不同分泌機組驅動分泌。通過細胞膜時訊息胜肽水解酶 (signal peptidase, Spase, Sip) 很快將訊息胜肽切除，膜折疊因子 (extracellular folding factors) 幫助熟成蛋白正確折疊，最後具活性之熟成蛋白被分泌至胞外，然不同分泌途徑之蛋白質摺疊機制不同，會造成功能性的差異 (Fu, *et al.*, 2007)。乳酸菌方面目前仍未確定 Tat 分泌途徑之存在與否，但已有許多成功的 Sec 途徑分泌案例，筆者實驗室亦已找出最佳化分泌元件配套。

安全級/食品級表現系統的應用潛能及安全性

以安全級/食品級宿主生產異源蛋白質如酵素等，或經基因工程法生產食品工業用添加物如維生素、保鮮防腐劑等，不論是粗萃或純化應用，因添加量少，最終食品中含量甚低或不存在，早已行之

多年，也早已廣為業界採用，遵循各國法規進行，並無爭議。那麼，為什麼要大費周章，建立安全級/食品級宿主—質體分泌表現系統呢？原因無他，隨著時代的進展，基因工程法所生產的各種產品，已進展至保健食品或醫藥用等級，例如分泌 IL-10 乳酸菌可口服抑制發炎反應 (Huibregtse, 2012)。此外，隨著媒體的傳播及民眾知識的提升，對所謂“基改”安全議題關注性更高。因此，開發安全級/食品級宿主—質體分泌系統，生產異源蛋白質，可增進現有生產模式之安全性，消除消費者疑慮。此外，並可進一步生產保健及醫藥用途的產品。至於直接食用基改菌株，筆者認為技術上可以由染色體嵌入法製作成基因缺陷異營性菌株，避免對環境的污染及生態衝擊，然而法規方面，挑戰極大，短期間內尚難上市。但是開發安全級/食品級宿主—質體分泌系統，分離濃縮或純化目標蛋白質，確實是安全的基因工程生產法。

有關基改產品之安全性，由於導入外源 DNA (包括基因片段及驅動基因轉錄轉譯之相關 DNA 元件)，並表現出蛋白質，而達到各種目的 (參考表一)，其爭議性之處甚多，諸如基改植物首需顧慮對環境生態平衡的衝擊，基改動物除倫理人道爭議之外，與現存物種交配繁衍可能影響生態平衡。此外，目前已在多國上市的基改玉米及基改大豆是爭議最多的。由於導入之 DNA 及蛋白質非原本食物鏈中物質，雖然通過腸胃道可被胃酸分解，但仍難全面避免驅動基因表現之 DNA 片段，在人類腸道中微乎極微的平行移轉可能性。蛋白質過腸胃道雖可被胃酸分解，但也有可能成為新過敏源，影響免疫力之疑慮，也有影響子代生殖能力之負面報導，這些都是反對者強烈質疑的原因。雖然如此，各國在政治、經濟、環評、消費者端種種條件考量之下，多半開放進口，規範寬嚴不一，市售產品標示從 0.9% (歐盟) 至 5% (臺灣) 含量以上須標示為基改不等，購買決策則交由消費者自行判斷。筆者稍加整理食品相關基因改造產品如表一，疏漏之處在所



資料來源：Fu, *et al.*, 2007.

圖二 枯草桿菌之 Tat 分泌途徑及 Sec-SRP 分泌途徑

難免，尚祈各方先進不吝指教修正。其中以安全級/食品級宿主分泌生產異源蛋白質，生產過程採取發酵生產方式，可嚴密控制不影響環境，由於去除菌株只取發酵液進行後續濃縮純化，完全無 DNA 殘留問題，且蛋白質原本即為食物鏈中物質，使用於終產品中含量極微。所用生產技術與目前食品用酵素、添加物等生產法相同，屬於一種高度安全的基因工生產方式，也是學界可以貢獻於產業的技術之一。

結論

將科學結晶轉化成為有利於社會的成果，是整體科學界的貢獻，並非個人微薄之力所能獨力完

成。筆者有幸在安全級/食品級分泌生產異源蛋白質系統上有微少貢獻，實則是科學界的貢獻。然而有關基因工程產品，必定面臨政治、國際經貿、法規、環評、消費者諸多角度影響。現今消費大眾最關心的是日常餐桌上常見的食物內容是否安全？僅就學界科技技術而言，是可以達到的。但是難的是環境汙染壓力，甚至有政治、經濟考量及少數業者良心或專業不足等變因。但無論如何，在現今全球競爭壓力下，創新是不可避免的；我們不能因為害怕“不安全”，而關上科學研究的大門。在此同時，資訊的透明化，消費者知識的提升及自主選擇，是增強餐桌食物內容安全性的方法之一。

AgBIO

葉娟美 國立中興大學 食品暨應用生物科技系 教授

表一 部分食品/藥品相關基因改造產品比較表

宿主	基改植物		基改動物		基改微生物（安全級/食品級宿主）			
					胞內表現型		分泌型	
產品舉例	基改玉米/ 基改大豆	甜甜米 ¹ / 黃金米 ² / 抗旱抗寒植物	基改鮭魚 ³	哺乳動物乳腺 生產平台 ⁴	酵母菌生產靈 芝免疫調節蛋 白 ^{5,6}	酵母菌生產抗 凍蛋白 ^{7,8}	枯草桿菌/乳 酸菌分泌生產 靈芝免疫調節 蛋白 ⁹	枯草桿菌/乳 酸菌分泌生產 抗凍蛋白 ¹⁰
上市情形	上市	未上市	審議	上市	上市	上市	將上市	將上市
技術	導入抗蟲/ 抗除草劑/ 抗病毒基因	導入營養代謝 相關基因/抗 旱抗寒基因/ RNA干擾代謝 工程	導入生長激素 相關基因	導入醫藥相關 基因	導入保健營養 相關基因/破 菌/萃取純化	導入食品保鮮 風味品質相關 基因/破菌/萃 取	導入保健相關 基因/分離發 酵液/濃縮純 化	導入食品保鮮 風味品質相關 基因/分離發 酵液/濃縮純 化
目的	增加產量/抗 病害	增加營養/產 量/食品工業 應用	縮短養殖時程	醫療用途	保健功能 （免疫調節）	提升冷凍食品 品質及貯藏期	保健功能 （免疫調節）	提升冷凍食品 品質及貯藏期
食用/ 應用 方式	基改大豆以榨 油為主、基改 玉米多為飼料	產品未上市	一般食用，未 上市	由乳汁提供藥 用蛋白質	目標蛋白作為 保健食品素材	目標蛋白作為 食品添加劑	目標蛋白作為 保健食品素材	目標蛋白作為 食品添加劑

資料來源：¹蕭介夫(2003)、²匡麟芸(2011)、³朱鴻鈞(2011)、⁴陳政忻(2007)、⁵益生生技網站、⁶柯俊良等人(2010)、⁷Moskin(2006)、⁸Meldolesi(2009)、^{9,10}葉娟美(2009、2012)

參考文獻

1. 朱鴻鈞 (2011) 生物技術在水產動物之應用現況分析。農業生技產業季刊, 26:13-22。
2. 匡麟芸 (2011) 黃金米的故事。科學發展, 459:42-49。
3. 柯俊良等 (2010) 利用微生物製備真菌免疫調節蛋白(FIP)及其用途, 中華民國專利發明I328038號。
4. 益生生技網站, From <http://www.yeastern.com.tw/>、http://www.taiwanservices.com.tw/org2/1/company_detail/zh_TW/44056。
5. 陳政忻 (2007) 動物生技代表性個案分析-GTC分析。全球動物生技產業趨勢分析代表性個案研究, 台灣經濟研究院。
6. 葉娟美 (2009) 重組靈芝免疫調節蛋白之食品級生產系統研發及應用潛力。農業生技產業季刊, 18:56-59。
7. 葉娟美 (2012) 抗凍蛋白技術於食品工業之應用。食品資訊, 248:74-77。
8. 蕭介夫 (2003) 台灣出好米甜甜米。中國時報2003.7.13 報導。
9. Codex Guidelines (2003) *Guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms*. CAC/GL 46-2003. From http://www.who.int/foodsafety/biotech/codex_taskforce/en/.
10. de Vos, W. M. (1999) *Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria*. Int dairy J. 9:3-10.
11. Fu, L. L., Xu, Z. R., Li, W. F., Shuai, J. B., Lu, P. and Hu, C. X. (2007) *Protein secretion pathways in Bacillus subtilis: Implication for optimization of heterologous protein secretion*. Biotechnol Adv. 25: 1-12.
12. Harwood, C. R. (1992) *Bacillus subtilis and its relative: molecular biological and industrial workhorses*. TIBTECH 10:247-256.
13. Huijbregtse, I. L., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L., da Silva, M. A. S., Maikel P. Peppelenbosch, M. P., van Deventer, S. J. H. and Braat, H. (2012) *Genetically Modified Lactococcus lactis for Delivery of Human Interleukin-10 to Dendritic Cells*. Gastroenterol Res Pract. doi:10.1155/2012/639291.
14. Kane, J. F. and Hartley, D. L. (1998) *Formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli*. Trends Biotech 6:95-101.
15. Le Loir, Y., Azevedo, V., Oliveira, S. C., Freitas, D. A., Miyoshi, A., Bermudez-Humaran, L. G., Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Leclercq, S., Gabriel, J. E., Guimaraes, V. D., Oliveira, M. N., Charlier, C., Gautier, M. and Langella, P. (2005) *Protein secretion in Lactococcus lactis: an efficient way to increase the overall heterologous protein production*. Microb Cell Fact. 4(1): 2.
16. Moskin, J. (2006) *Creamy, Healthier Ice Cream? What's the Catch?* The New York Times. From <http://www.nytimes.com/2006/07/26/dining/26cream.html?pagewanted=all>.
17. Meldolesi, A. (2009) GM fish ice cream. Nature Biotechnol 27(8):682.
18. Platteeuw, C., van Alen-Boerriegter, I., van Schalkwijk, S. and de Vos, W. M. (1996) *Food grade cloning and expression system for lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol 62(3):1008-1013.