

廣義而言，乳酸菌是一群利用碳水化合物進行發酵，產生多量乳酸的細菌，自古即被廣泛應用於乳製品、食品加工或保存，為應用最多、經濟效益最大的工業用菌之一。經乳酸菌發酵的食品，如乾酪、泡菜、醬油、養樂多、優酪乳等，具有特殊風味與質感。此外，乳酸菌更被應用於腸胃保健、抗過敏等藥物，甚至活菌疫苗的開發利用。

質體與乳酸菌的生理功能

質體是細胞內獨立於染色體之外能自行複製的遺傳物質，存在細菌、古生菌或酵母菌等原核生物中。乳酸菌含有各種質體 DNA，所含的質體數目和大小因菌種而異。筆者研究團隊曾分析市售乳酸發酵食品，包括優酪乳、發酵乳、乳酸飲料、酒釀食品及泡菜食品所含的乳酸菌，發現大多數乳酸菌株至少含有一個以上的質體，最多 10 個，質體大小介於 2.1kb 76.5kb 之間。

質體和乳酸菌的生理功能，例如乳糖、麥芽糖的利用、檸檬酸 (citric acid) 代謝系統、抑菌素的生成

與免疫防禦系統、風味生成、噬菌體抗性及蛋白分解酵素生成等有關聯。發酵過程中，產物可能會因為質體遺傳發生變異，而有品質、風味及產程穩定性改變等問題，以致發酵失敗。質體的功能與穩定性，影響乳酸菌能否在實際發酵應用上，發揮發酵菌的功能，而質體複製型態與複製次數的調控，是影響發酵功能穩定與否的重要因子。

乳酸菌質體的複製型態

就功能而言，乳酸菌質體可以分為無性狀質體 (cryptic plasmid) 及廣宿主質體 (broad-host plasmid)。在無性狀質體中沒有特定功能的基因，但是經過修飾可加上抗抗生素基因，用以構築篩選質體；廣宿主質體能在多種菌株內複製，可開發成穿梭載體。就質體複製型態差異，可分成滾動環狀型 (rolling-circle type) 及西塔型 (theta-type) 兩種。兩者最大的差別在於，前者在複製過程會產生單股 DNA，後者則無。

一般而言，西塔型複製質體的分子量比較大

乳酸菌的應用——蛋白質生產工廠

以基因重組技術，將外來基因與乳酸菌質體建構成穿梭載體，運送到乳酸菌，產生生理蛋白而被人體吸收。

顏聰榮



(> 5kb)、複製速度較慢、複製次數較少；而滾動環狀型複製質體分子量較小(< 10kb)、複製速度較快、複製次數較多。但滾動環狀型複製質體在複製過程，因會產生單股 DNA 容易被篩檢，導致質體消失或突變。而西塔型質體複製過程均以雙股出現，故就質體複製型態的穩定性上，以西塔複製質體較佳，且較能接納較大異源或同源性外來 DNA 片段。故在乳酸菌基因工程表現上，以西塔型複製質體較適合。質體複製數的調控也會影響質體的穩定性。在正常宿主中，質體複製數的數目會維持一定。但在細胞分裂或轉移至新的宿主時，都有可能造成質體複製數的減少而影響質體的穩定性。無論是西塔型或滾動環狀型複製的質體，均可藉由細胞內調控蛋白及反譯 RNA (antisense RNA) 來調控質體複製數的數目。

建構乳酸菌載體

乳酸菌被歸類為公認安全菌屬 (GRAS) 範疇，具促進健康活性、抗體佐劑特性、黏膜吸附性及體內免疫性低等諸多特性，對照於其他活菌疫苗媒介如沙門氏桿菌、大腸桿菌等，除了非屬安全菌株，其本身免疫性高，能定殖於黏膜的特性部位，誘導局部免疫反應及自身免疫性反應，因此乳酸菌被視為疫苗傳遞賦形藥的工具，可見以乳酸菌當作表現宿主的優勢。

此外，乳酸菌也是一個良好的表現系統，可應用在食品、醫藥用蛋白之生產，其具有分泌蛋白質的能力，故能用以產生胞外蛋白質，被認為是最佳的微生物蛋白質生產工廠。目前已有許多同源或異源蛋白質於乳酸菌中表現的實例，例如纖維素¹、澱粉²、木聚糖³、蛋白⁴、脂肪⁵等酵素；免疫球蛋白、綠色螢光蛋白；病菌的毒素蛋白或抗體蛋白片段，如破傷風毒素蛋白片段 C，人類乳突狀瘤病毒 16 型 E7 蛋白，和塵蟎致過敏原蛋白片段等。

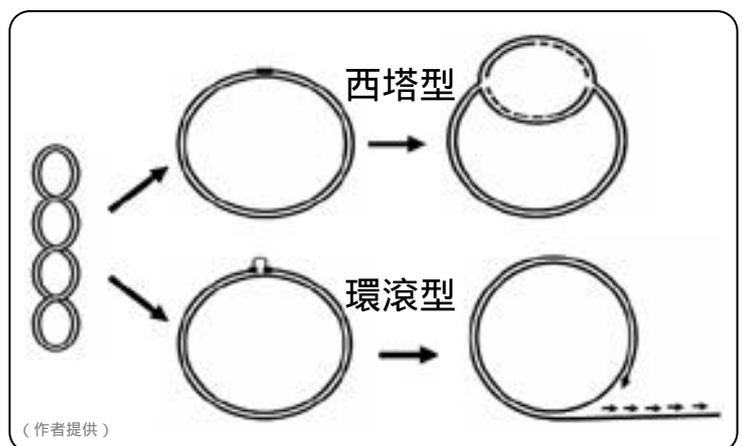
表現分泌載體的必備要件

就乳酸菌表現載體系統上，構築表現分泌載體的要件有幾項，例如可在菌體中裂殖的複製起始區；可顯示表現分泌載體確實進入，並存在細菌內的篩選性標誌；可供各類基因插入的轉殖區域；可表現基因並將其送出細胞膜外的啟動子，及分泌轉錄訊息序列等。其中，內源性質體複製起始區是一項重要因素，能影響表現分泌載體在宿主內自動複製功能、複製次數、宿主種類，及穩定度等重要性質。

為方便基因選殖及表現，我們找到一種分子量為 5.4kb、屬於西塔複製型的質體 pL2，進行核酸序列分析，並將其複製元和來自 pUC 表現載體整合，建構成穿梭載體，以利後續的研究工作。本文接下來針對以此質體建構乳酸菌-大腸桿菌穿梭載體和乳酸菌表現載體進行介紹。

建構大腸桿菌及乳酸菌穿梭載體

首先，我們利用限制酶 Pst 及 Hind 截切載體 pVA838 的抗紅黴素基因，作為篩選標誌。以連結



乳酸菌質體複製型態模式圖。滾動環狀型複製質體因為過程中會產生單股 DNA，容易被篩檢而被刪除或突變，西塔型複製質體因為都以雙股 DNA 進行整個流程而較穩定，故以西塔型較適合作為乳酸菌基因工程載體。

乳酸菌專輯



將乳酸菌表現啟動子 *nisA* (Nisin A, 一種抑菌素) 以聚合鏈鎖反應 (PCR) 技術合成, 並黏接到穿梭載體 pL2pGMETAmy, 即形成乳酸菌表現載體 pL2pGMETnisAAmy (8.0kb)。

總而言之, 乳酸菌含有各種質體 DNA, 而質體的存在會影響乳酸菌的生理及安定。以西塔型複製質體, 在質體穩定性上較佳, 較適用於乳酸菌基因工程表現載體上。乳酸菌穿梭載體及表現載體的建構, 將可表現機能性外來蛋白基因。生理活性物質及勝肽藥物, 可藉由乳酸菌基因傳遞系統的觀點, 利用乳酸菌載體運送到能駐留人體腸道細胞的乳酸菌, 再釋放到腸道細胞而為人體吸收利用, 最後藉由食物補給益生性乳酸菌而達到「醫食同源」的效果。🍄

參考資料

1. Tsong-Rong Yan et al., 1996, Studies on plasmid DNA from lactic acid bacteria. J. Chinese Agric. Chem. Soc. 34:723-731.
2. Tsong-Rong Yan et. al., 2001, Studies on high acid producing lactic acid bacteria flora and analysis of their plasmids in commercial fermented dairy beverage. Taiwanese J. Agric. Chem. Food Sci. 39:284-290.
3. Shaio-Ming Chang and Tsong-Rong Yan., 2005, Construction of shuttle vector of Lactic acid bacterium and Escheric coli, 10th conference on Biochemical Engineering, p.128, P2-090.
4. Shaio-Ming Chang and Tsong-Rong Yan., 2005, Construction food grade vector expressing system, 52th CIChE Annual Meeting and Conferences, p.32, 1-P-038.

顏聰榮：任教大同大學生物工程系