

# Biểu hiện protein trên bề mặt tế bào ở vi khuẩn lactic acid

Nguyễn Thị Phương Thảo<sup>1,2,3,4</sup>, Nguyễn Thanh Tấn<sup>2,3,4</sup>, Trần Văn Hiếu<sup>2,3,4,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Sự phát triển mạnh mẽ trong thời gian gần đây của các hệ thống biểu hiện protein mới ở vi khuẩn lactic acid đang thu hút, đồng thời đặt ra nhiều thách thức lớn, cho các nhà khoa học do tính an toàn và khả năng bảo quản thực phẩm của các vi khuẩn này. Với lợi thế sở hữu cấu trúc thành tế bào cứng chắc cùng tính kháng acid đặc trưng, vi khuẩn lactic acid đã và đang là mục tiêu tiềm năng dùng làm nhà máy tế bào để sản xuất sản phẩm hay làm chất xúc tác sinh học toàn tế bào trong ngành công nghiệp thực phẩm, hoặc dùng làm phương tiện vận chuyển kháng nguyên để phát triển vaccine đường niêm mạc. Một loạt các gene được biểu hiện trong nhiều vi khuẩn lactic acid dùng làm hệ thống protein nhắm trúng đích đã được nghiên cứu, phát triển. Bài tổng quan này trình bày tóm tắt các cơ chế tiết protein qua màng, các hệ thống biểu hiện protein dạng tiết hoặc biểu hiện trên bề mặt tế bào mới được phát triển gần đây ở hai loài vi khuẩn lactic acid là *Lactococcus lactis* và *Lactobacillus plantarum*, và tình hình nghiên cứu phát triển các promoter biểu hiện thường trực hiện nay nhằm nâng cao, tăng hiệu quả biểu hiện protein trên bề mặt tế bào vi khuẩn lactic acid.

**Từ khoá:** vi khuẩn lactic acid, cơ chế tiết protein qua màng, biểu hiện protein trên bề mặt tế bào, promoter

<sup>1</sup>Trường Đại học Tiền Giang, Việt Nam

<sup>2</sup>Phòng Thí Nghiệm Cầm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

<sup>3</sup>Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

<sup>4</sup>Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

## Liên hệ

**Trần Văn Hiếu**, Phòng Thí Nghiệm Cầm biến Sinh học, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học – Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 24-02-2023
- Ngày sửa đổi: 05-3-2024
- Ngày chấp nhận: 23-10-2024
- Ngày đăng: 31-12-2024

## DOI:



## 1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn lactic acid (lactic acid bacteria, LAB) thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương được công nhận an toàn GRAS (Generally Recognized As Safe), thường được ứng dụng trong bảo quản thực phẩm, đã và đang thu hút sự chú ý trong quá trình nghiên cứu và phát triển hệ thống biểu hiện protein an toàn cấp thực phẩm (food-grade expression system)<sup>1</sup>. LAB thường được tìm thấy trong nhiều dạng môi trường sống tự nhiên như khoang miệng, đường sinh dục, đường tiêu hóa của người và động vật, hoặc sản phẩm lên men của sữa, thịt và rau củ<sup>2</sup> và đã được sử dụng suốt một thời gian dài trong quá trình chế biến các loại thực phẩm. LAB bao gồm một số loài trong các chi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, và *Streptococcus* có thể phát triển trong điều kiện kỵ khí lẫn hiếu khí và lên men đường hexose để sản xuất lactic acid như sản phẩm chính cuối cùng<sup>3</sup>. Quá trình acid hóa khi sản xuất lactic acid là lý do chính cho tác dụng bảo quản của LAB nhằm ức chế sự phát triển của vi sinh vật thường gây hư hỏng thực phẩm<sup>4</sup>. LAB cũng có thể sản xuất ra các bacteriocin, là các peptide kháng khuẩn, có khả năng ức chế sự phát triển của mầm bệnh cạnh tranh<sup>5,6</sup>. Nhiều LAB như *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. đã được công nhận là vi sinh vật có khả năng tăng cường sức khỏe cho đường tiêu hóa của vật chủ, hay còn được gọi là lợi khuẩn. Một ứng dụng tốt khác của

lợi khuẩn LAB là kích thích hệ thống miễn dịch của vật chủ. Cụ thể, *L. casei* Shirota đã cải thiện tình trạng viêm đại tràng ở chuột bằng cách ức chế chuyển vị của NF- $\kappa$ B và sản xuất IL-6<sup>7</sup>. Thành phần chưa được xác định của vi khuẩn *L. paracasei* Ncc2461 đã cảm ứng các tế bào T CD4<sup>+</sup> trong lách chuột, tạo ra IL-10 và TGF- $\beta$ <sup>8</sup>. Gần đây, Florin Barla và cộng sự<sup>9</sup> đã ghi nhận việc sử dụng LAB từ thực phẩm lên men truyền thống của tỉnh Ishikawa để sản xuất  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) có tác dụng hạ huyết áp. Ngoài ra, LAB được chứng minh giúp giảm cholesterol và hydrolase muối mật<sup>10</sup>.

Với những lợi ích trên, LAB là đối tượng tiềm năng trong các ứng dụng liên quan đến thực phẩm chức năng để cộng sinh/cạnh tranh với một số loài vi khuẩn và nấm khác như *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae* hoặc *A. niger* dùng để sản xuất các sản phẩm tự nhiên và tái tổ hợp<sup>11</sup>. Ngoài ra, nhờ đặc tính cấu trúc cứng của thành tế bào và khả năng kháng acid cao của vi khuẩn Gram dương, nên LAB có tiềm năng được ứng dụng làm xúc tác sinh học toàn tế bào và làm phương tiện vận chuyển kháng nguyên để phát triển vaccine đường niêm mạc. Với mục đích này, một loạt các gene được biểu hiện như là hệ thống protein nhắm trúng đích đã được phát triển trong nhiều LAB<sup>12</sup>.

Các thuộc tính của những hệ thống biểu hiện này và các ứng dụng hiện tại hoặc tiềm năng đã và đang được

**Trích dẫn bài báo này:** Thảo N T P, Tấn N T, Hiếu T V. **Biểu hiện protein trên bề mặt tế bào ở vi khuẩn lactic acid.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; (0):1-13.

**Bản quyền**

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



nhằm đến chủ yếu ở *Lactococcus lactis* và *Lactobacillus plantarum*, là hai loài LAB được nghiên cứu nhiều nhất cho các ứng dụng này. Phần tổng quan này có thảo luận về cấu trúc, chức năng và tình hình nghiên cứu cho đến thời điểm hiện tại của các hệ thống tiết protein qua màng và biểu hiện protein ngoại lai ở vi khuẩn Gram dương nói chung và LAB nói riêng.

**64 CƠ CHẾ TIẾT PROTEIN QUA MÀNG**  
**65 TẾ BÀO CHẤT Ở LAB**

**66 Các hệ thống tiết và đích đến cuối cùng của**  
**67 các protein ở vi khuẩn Gram dương**

Protein tái tổ hợp có thể được sản xuất trong tế bào chất hoặc được vận chuyển qua màng và xuất trực tiếp ra môi trường, hoặc được đính trên bề mặt vi khuẩn<sup>3</sup>. Một số cơ chế khác nhau để vận chuyển protein đã được ghi nhận. Ở vi khuẩn Gram dương, bảy cơ chế chính để tiết protein đã được mô tả như Twin-arginine translocation (Tat pathway), Flagella export apparatus (FEA pathway), WXG100 secretion system (Wss pathway), Fimbriin-protein exporter (FPE pathway), Peptide efflux ABC-transporters, Holin-system, và tiết thông qua con đường Sec (Sec pathway) (Hình 1)<sup>2</sup>. Trong đó, protein được tiết ra có thể: (i) Được neo vào màng tế bào (lipoprotein); (ii) Được gắn vào vách tế bào (cell wall/CW) hoặc bằng liên kết cộng hóa trị (protein LPxTG) hoặc không cộng hóa trị (bằng cách biến hiện các motif LysM, GW, CWBD2, SLHD hoặc WXL); (iii) Là một phần của các cấu trúc phụ trên bề mặt tế bào như cellulosome hoặc lông nhung (các tiểu đơn vị được tiết ra qua Sec), pseudopili (được lắp ráp thông qua FPE) hoặc tiên mao (được lắp ráp thông qua FEA); (iv) Được tiết ra ngoại bào thông qua Sec, Tat, holin hoặc Wss; hoặc (v) Được chuyển vào tế bào chủ sau khi tiết thông qua Sec của cytolysin phụ thuộc vào cholesterol, được sáp nhập vào màng plasmatic của tế bào chủ và sau đó cho phép chuyển các chất tiết ra bằng quá trình dịch mã qua trung gian cytolysin (CMT).

Gần đây, con đường Tat ở vi khuẩn và vi khuẩn cổ được chứng minh là con đường dùng để vận chuyển các protein ở dạng gấp cuộn hoàn toàn với một motif twin-arginine được bảo tồn cao có chứa peptide tín hiệu<sup>19</sup>. Con đường FEA vốn có liên quan đến sự chuyển vị của các thành phần trong tế bào vi khuẩn Gram dương, nhưng cũng được sử dụng để tiết các yếu tố độc lực ra ngoại bào ở vi khuẩn Gram dương<sup>20</sup>. Một hệ thống tiết chuyên biệt khác được xác định ở vi khuẩn Gram dương là con đường Wss, liên quan đến sự vận chuyển của họ protein WXG100 (ESAT-6)<sup>21</sup>. Con đường FPE có vai trò trong sự chuyển vị của các tiền chất liên quan đến sự phát triển của vi khuẩn khi

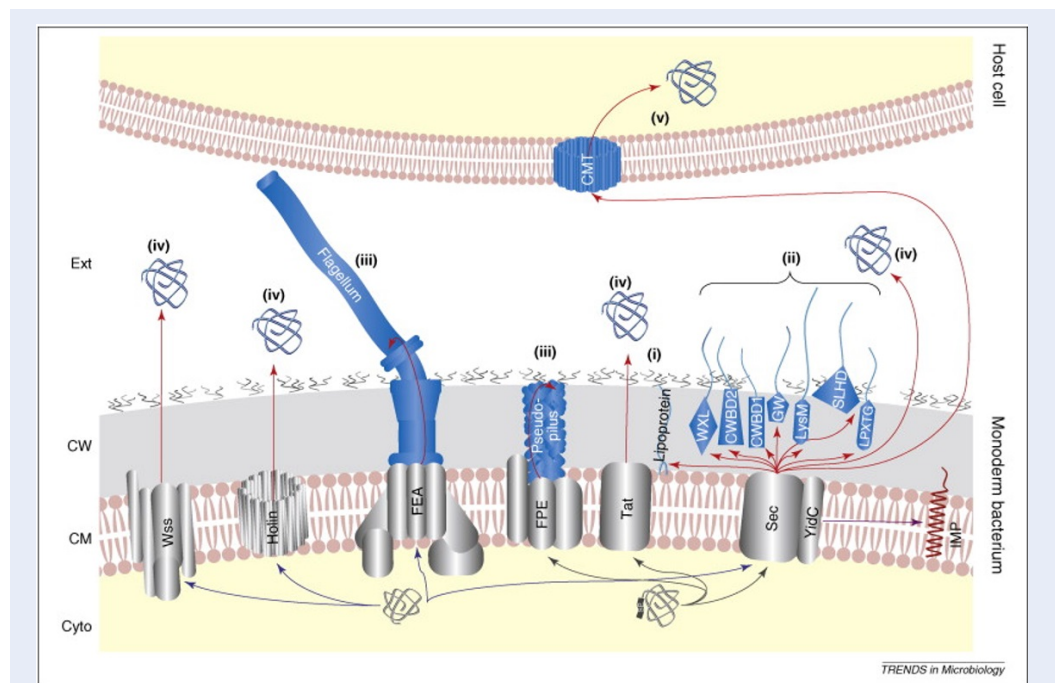
cho phép nhập bào DNA ngoại lai qua màng tế bào<sup>18</sup>. Holin là các protein sáp nhập xuyên màng nhỏ tạo thành một hệ thống tiết chuyên biệt chỉ có ở vi khuẩn Gram dương<sup>21</sup>. Hệ thống holin có liên quan đến hoạt động tiết của hydrolase murein vốn thiếu peptide tín hiệu và đóng vai trò quan trọng trong quá trình tự phân giải. Con đường Sec là con đường tiết protein chủ yếu ở vi khuẩn Gram dương, sử dụng các peptide tín hiệu ở đầu N với các tính năng được bảo tồn ở vi khuẩn Gram dương. Nhờ công cụ tìm kiếm trình tự tương đồng và domain của protein, bộ gene của *Lactobacillus* đã được chứng minh có chứa các gene mã hóa cho các hệ thống Sec, FPE, holin và không mã hóa cho các yếu tố quan trọng có liên quan đến con đường tiết protein Tat, FEA và Wss<sup>2</sup>.

**Vai trò của peptide tín hiệu trong cơ chế tiết protein qua màng ở LAB**

Peptide tín hiệu (signal peptide, SP), có vai trò trong sự vận chuyển qua màng tế bào chất ở phần lớn các protein tiết, có cấu trúc gồm 3 domain riêng biệt là N, H và C, đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển vị và tiết của protein<sup>22</sup>. Một arginine hoặc lysine bảo tồn có trong domain ở đầu N được sử dụng để tương tác với động cơ chuyển vị và phospholipid tích điện âm trong màng lipid kép của màng. Vùng kỵ nước bảo tồn cũng như glycine hoặc proline bảo tồn ở giữa lõi kỵ nước của vùng H (vùng phá xoắn bảo tồn) có thể tạo thành cấu trúc giống kẹp tóc hỗ trợ cho sự chèn vào màng. Vùng phá xoắn bảo tồn có thể được tách ra nhờ vai trò của peptidase tín hiệu (signal peptidase, SPase): vị trí phân tách trên domain ở đầu C của SP được nhận diện bởi một SPase đặc hiệu giúp cắt SP ra khỏi phần còn lại, trở thành protein tiết được vận chuyển qua màng tế bào chất. Mặc dù các SP có cấu trúc tương tự nhau, nhưng các biến thể nhỏ ở các SP khác nhau quyết định đích vận chuyển đến các điểm đến khác nhau hoặc xuất qua các con đường khác nhau<sup>23</sup>. Dựa trên các phân tích trình tự của SP và protein nhận biết của chúng, bốn đặc tính đã được chứng minh có mối tương quan với chức năng của SP là tính kỵ nước cao, sự hiện diện của chuỗi xoắn xuyên màng, sự vắng mặt của một motif neo trong protein nhận biết và độ dài của domain H+C<sup>24</sup>. Những thay đổi về tính kỵ nước của vùng lõi của SP và chiều dài của SP đã được chứng minh là ảnh hưởng đến hiệu quả tiết ở vi khuẩn Gram dương<sup>25</sup>. Ngoài sự phụ thuộc cao vào SP, hiệu quả tiết được phát hiện có tính đặc hiệu cao với vật chủ và phụ thuộc vào tính chất của protein mục tiêu như kích thước hoặc mức độ biểu hiện nội bào của chúng<sup>24-28</sup>. *L. lactis* đã được chứng minh có thể tiết ra các protein từ 10 đến 160

**Bảng 1:** Một số protein đã được biểu hiện trên bề mặt tế bào LAB

| Tên protein (tài liệu tham khảo)         | Chủng chủ                  | Chức năng  | Ứng dụng   |
|--|----------------------------|------------|--|
| Surface layer protein SlpA <sup>13</sup> | <i>L. acidophilus</i> NCFM | Bám dính   | Liên kết bề mặt  |
| $\beta$ -mannanase ManB <sup>14</sup>    | <i>L. plantarum</i>        | Enzyme     | Chất xúc tác   |
| $\phi$ g1e Lys <sup>15</sup>             | <i>L. plantarum</i> G1e    | Phage      | Ly giải các thể thực khuẩn và vi sinh vật gây bệnh                       |
| Brevicin 174A BreD, BreG <sup>16</sup>   | <i>L. brevis</i>           | Điều hoà   | Sản xuất bacteriocin (chất kháng khuẩn)                                  |
| Lam29 <sup>17</sup>                      | <i>L. mucosae</i> ME-340   | Vận chuyển | Protein liên kết với cysteine của vận chuyển cassette liên kết ATP (ABC) |



**Hình 1:** Các hệ thống tiết và đích đến cuối cùng của các protein được tiết ra ở vi khuẩn Gram dương<sup>18</sup>. Mũi tên đen biểu thị protein có đích đến là màng tế bào mang peptide tín hiệu ở đầu N. Mũi tên xanh là con đường tiết qua màng ở các protein thiếu peptide tín hiệu. Mũi tên đỏ là các con đường tiết. Mũi tên tím là con đường gắn vào màng lipid kép ở protein màng (IMP). Protein màu xanh là các protein tiết qua màng. Chữ viết tắt: Cyto, tế bào chất; CM, màng tế bào chất; CW, vách tế bào; OM, màng ngoài; Ext, ngoại bào<sup>18</sup>.

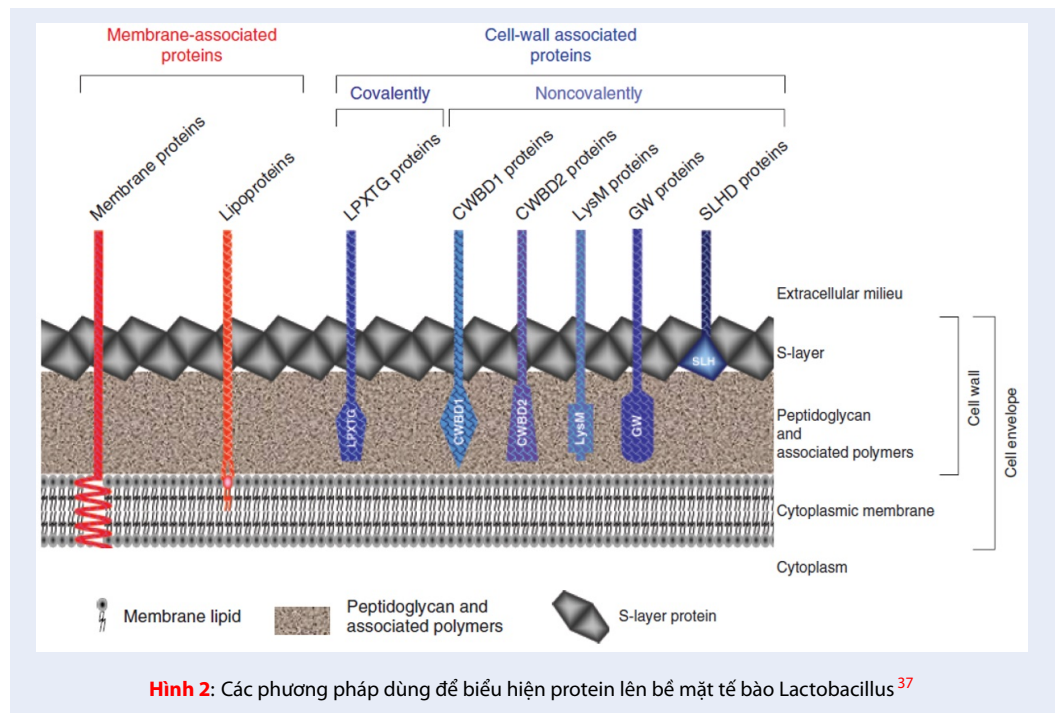
159 kDa thông qua con đường phụ thuộc Sec<sup>29</sup>. Mức sản  
 160 xuất cao của protein mục tiêu có thể gây ra tình trạng  
 161 quá tải động cơ chuyển vị, từ đó dẫn đến hiệu quả tiết  
 162 thấp<sup>24</sup>. Do đó, sự kết hợp tối ưu giữa SP và protein  
 163 mục tiêu mong muốn là điều cần thiết và thiết yếu để  
 164 có thể đạt được hiệu quả tiết cao. Một số vi khuẩn  
 165 Gram dương có khả năng tiết ra protein với hiệu suất  
 166 khá cao. Các mô hình trên vi khuẩn Gram dương như  
 167 *B. subtilis*, *L. lactis* và *L. plantarum* đã được nghiên  
 168 cứu kỹ về tiềm năng dùng trong sản xuất protein ngoại  
 169 lai ở dạng tiết<sup>25,26</sup>.  
 170 Usp45 là SP được khai thác rộng rãi nhất ở LAB biến  
 171 đổi gene ở *Lactococcus*<sup>28</sup>. Các SP dị loài khác đã được  
 172 sử dụng để tiết các protein ngoại lai trong *L. plan*  
 173 *tarum* bao gồm SP từ *Streptococcus pyogenes* là pro  
 174 tein M6, từ *L. amylovisus* là amylase, và từ *L. brevis* là  
 175 protein S-layer (SlpA). Geir Mathiesen (2008) đã thử  
 176 nghiệm các SP tương đồng từ *L. plantarum* WCFS1 và  
 177 so sánh chức năng của chúng trong quá trình tiết hai  
 178 mô hình protein ngoại lai khác nhau (NucA từ *Staphy*  
 179 *lococcus aureus* và AmyA từ *L. amylovorus*)<sup>30</sup>. Trong  
 180 nghiên cứu này, hệ thống pSIP cảm ứng biểu hiện dựa  
 181 trên pheromone peptide trong *Lactobacillus* đã được  
 182 sử dụng<sup>31</sup> và hiệu quả tiết của các SP này đã được so  
 183 sánh với hai SP (ngoại lai) nổi tiếng Usp45 và M6. Kết  
 184 quả cho thấy 4 trong số 10 trình tự được chọn có vị trí  
 185 phân cắt là Ala-X-Ala-Ala, nhưng chúng không đạt  
 186 hiệu quả tiết cao. Hai SP từ *L. plantarum* là Lp-0373  
 187 và Lp-0600, vốn có trình tự motif là Val-X-Ala ở vị trí  
 188 -3 đến -1 so với vị trí phân cắt, là các SP hoạt động tốt  
 189 nhất để tiết nuclease và amylase<sup>30</sup>. Trong một nghiên  
 190 cứu khác, Karlskes và đồng nghiệp cũng chỉ ra rằng  
 191 ba SP có nguồn gốc từ Lp-3050, Lp-0373 và Lp-2578  
 192 cho thấy mức độ sản xuất và hiệu quả tiết của nuclease  
 193 NucA ở năm loài *Lactobacillus* bao gồm *L. rhamnosus*,  
 194 *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. curvatus* và *L. plantarum* khá  
 195 khác nhau; trong đó SP có nguồn gốc từ Lp-3050 cho  
 196 lượng NucA tiết ra cao nhất<sup>32</sup>. Kết quả này cho mỗi  
 197 sự kết hợp giữa chủng chủ và protein mục tiêu có thể  
 198 cần phải được tối ưu hóa riêng biệt.

## 199 CÁC HỆ THỐNG BIỂU HIỆN PROTEIN 200 TRÊN BỀ MẶT Ở LAB

201 Việc biểu hiện các protein ngoại lai trên bề mặt tế bào  
 202 vi khuẩn là một chiến lược hấp dẫn cho nhiều ứng  
 203 dụng trong lĩnh vực công nghệ sinh học, điều trị bệnh  
 204 và công nghiệp như phát triển vaccine sống, sản xuất  
 205 kháng thể, xúc tác sinh học toàn tế bào, hấp thụ sinh  
 206 học và cảm biến sinh học<sup>33</sup>. Một số protein đã được  
 207 biểu hiện trên bề mặt tế bào LAB được trình bày ở  
 208 Bảng 1.

209 Một trong những tính năng hấp dẫn nhất của nghiên  
 210 cứu biểu hiện trên bề mặt tế bào là việc các protein

mục tiêu dung hợp với các motif neo vốn được đồng 211  
 thời vừa tổng hợp vừa cố định trên bề mặt tế bào vi 212  
 khuẩn; kết quả là dễ dàng thu nhận được protein mục 213  
 tiêu từ các tế bào vi khuẩn trong quá trình nuôi cấy. 214  
 Trong cách tiếp cận này, các tế bào tự thực hiện toàn 215  
 bộ quy trình phức tạp gồm nhiều phản ứng ở nhiều 216  
 bước vốn tốn nhiều năng lượng và thời gian, do đó 217  
 mang lại lợi ích lớn về mặt kinh tế. Ngoài ra, các pro- 218  
 tein ngoại lai neo trên bề mặt của tế bào vi khuẩn có 219  
 tính ổn định cũng như khả năng bảo toàn trong điều 220  
 kiện khắc nghiệt cao hơn nhiều lần so với protein tự 221  
 do, đặc biệt là khi protein được chèn vào thành của 222  
 tế bào vi khuẩn<sup>34</sup>. Điều này có nghĩa chiến lược biểu 223  
 hiện protein trên bề mặt cần được cân nhắc, phân tích 224  
 kỹ lưỡng và lựa chọn hợp lý, đủ cao để cải thiện khả 225  
 năng tiếp cận của protein với các đích đến của chúng 226  
 và đủ thấp để bảo vệ các protein được biểu hiện trên 227  
 bề mặt khỏi bị phân hủy<sup>3</sup>. Mặt khác, mức độ biểu hiện của 228  
 protein phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm protein 229  
 mục tiêu, chủng chủ và các loại neo được sử dụng. 230  
 Một protein mục tiêu tự nó cũng có ảnh hưởng đến 231  
 quá trình dịch mã và biểu hiện lên bề mặt. Kích thước 232  
 quá lớn hoặc mức độ biểu hiện quá cao của protein 233  
 mục tiêu có thể dẫn đến tiết không hiệu quả, điều 234  
 này có thể làm giảm sự tăng trưởng của vật chủ tái 235  
 tổ hợp và lượng thấp protein biểu hiện trên bề mặt 236  
 của nó<sup>35</sup>. Các protein mục tiêu khác nhau được dung 237  
 hợp vào cùng một loại neo sẽ được chuyển đến các 238  
 vị trí khác nhau trong cùng một chủng chủ<sup>36</sup>. Rõ 239  
 ràng, việc lựa chọn chủng chủ để sử dụng có vai trò 240  
 cực kỳ quan trọng trong chiến lược biểu hiện trên bề 241  
 mặt. Một chủng chủ tốt phải phù hợp với “protein đi 242  
 theo/passenger protein”, dễ dàng nuôi cấy mà không 243  
 cần ly giải tế bào và hoạt tính protease ngoại bào và 244  
 protease tương ứng của thành tế bào thấp. Xem xét 245  
 điểm này, vi khuẩn Gram dương dường như là sự lựa 246  
 chọn thuận lợi hơn là vi khuẩn Gram âm vì chúng 247  
 có cấu trúc thành tế bào khá cứng<sup>34</sup> và chỉ có một 248  
 màng kép thuận lợi cho protein đi xuyên qua<sup>35</sup>. Các 249  
 neo chứa một SP hiệu quả để xuất protein mục tiêu 250  
 qua màng trong. Một cấu trúc neo ổn định cũng như 251  
 chiều dài và trình tự của neo nên được cân nhắc để có 252  
 thể giữ được protein dung hợp trên bề mặt tế bào mà 253  
 không bị tách ra. Ngoài việc tương thích với các chuỗi 254  
 ngoại lai được dung hợp, neo còn có khả năng chống 255  
 lại sự tấn công của các protease có mặt trong không 256  
 gian chu chất hoặc trong môi trường nuôi cấy. Tất cả 257  
 các lưu ý cần thiết được đề cập ở trên gợi ý rằng sự hiểu 258  
 biết sâu về chức năng của neo có thể có ích cho việc 259  
 tối ưu hóa hệ thống biểu hiện trên bề mặt. Về nguyên 260  
 tắc, có hai cách khác nhau để gắn protein được tiết ra 261  
 lên trên bề mặt của vi khuẩn là thông qua liên kết cộng 262  
 hóa trị với màng tế bào hoặc thành tế bào và liên kết 263



264 không cộng hóa trị thông qua protein domain tương  
 265 tác mạnh với các thành phần của thành tế bào hoặc  
 266 màng (Hình 2). Cả hai hệ thống này đã được sử dụng  
 267 trong LAB, chủ yếu ở *L. lactis* và các lactobacilli khác  
 268 nhau.

269 **Neo không cộng hoá trị**

270 **Neo xuyên màng ở đầu N**

271 Sự tiết protein vào môi trường ngoại bào thông qua  
 272 con đường Sec phụ thuộc vào SPase tạo điều kiện giải  
 273 phóng protein trưởng thành bằng cách tách SP ở đầu  
 274 N từ preprotein (SP+protein tiết)<sup>3</sup>. Tuy nhiên, ở cơ  
 275 chế neo xuyên màng ở đầu N, trình tự amino acid  
 276 trong peptide tín hiệu ở preprotein thiếu vị trí phân  
 277 cắt của SPase, dẫn đến sự hình thành neo trong đó  
 278 protein sẽ được gắn vào thành tế bào bởi các liên kết  
 279 không cộng hóa trị. Trong trường hợp này, SP không  
 280 được phân cắt với liên kết kỵ nước ở trung tâm sẽ có  
 281 chức năng như một chuỗi xoắn xuyên màng ở đầu N  
 282 có thể gắn protein vào màng. Để có thể hình thành  
 283 được neo xuyên màng đầu N, protein mục tiêu cần  
 284 phải được dung hợp với chuỗi neo có độ dài thích  
 285 hợp. Một neo ngắn sẽ có khả năng bảo vệ protein  
 286 mục tiêu bằng cách chèn hoàn toàn vào thành của tế  
 287 bào, nhưng hạn chế là thiếu khả năng tiếp cận. Po-  
 288 quet và cộng sự (1998) đã xác định được hai đoạn  
 289 gene có nguồn gốc từ *Lactococcus* mã hóa cho các neo  
 290 có kích thước đa dạng từ 40 đến 234 amino acid dựa  
 291 trên phương pháp sàng lọc ngẫu nhiên với tín hiệu

292 xuất thu nhận từ thư viện gene của *L. lactis* và sử dụng  
 293 nuclease của *Staphylococcus aureus* làm reporter pro-  
 294 tein. Một trong những neo xoắn xuyên màng ở đầu N  
 295 được khai thác nhiều nhất là protein PgsA từ *B. sub-*  
 296 *tilis*, bao gồm một vùng xuyên màng dài từ 25 đến 44  
 297 amino acid được phân tích bởi hệ thống SOSUI. Prote-  
 298 in PgsA đã được chứng minh là một phần của phức  
 299 hợp poly- $\gamma$ -glutamate synthetase và có chức năng ổn  
 300 định phức hợp bằng cách neo vào trong màng của  
 301 tế bào. Narika đã chỉ ra rằng sự dung hợp của  $\alpha$ -  
 302 amylase vào đầu C của PgsA dẫn đến việc biểu hiện  
 303 thành công trên bề mặt *E. coli* và *L. casei*<sup>38</sup>. Việc định  
 304 vị protein dung hợp PgsA-AmyA-FLAG trên bề mặt  
 305 tế bào sẽ được phát hiện bằng phương pháp flow cy-  
 306 tometry và miễn dịch huỳnh quang. Các tế bào *L. ca-*  
 307 *sei* biểu hiện AmyAF trên bề mặt thể hiện hoạt động  
 308 thủy phân tăng đáng kể so đối với tinh bột dạng hòa  
 309 tan. Gần đây, một neo xuyên màng từ Lp-1568, đây  
 310 là một protein neo đầu N và có nguồn gốc từ *L. plan-*  
 311 *tarum* đã được ứng dụng để biểu hiện các phiên bản  
 312 dài và ngắn của invasin (Inv và InvS tương ứng) từ tác  
 313 nhân gây bệnh ở người là *Yersinia pseudotuberculo-*  
 314 *sis* trên bề mặt của tế bào vi khuẩn *L. plantarum*. Sự  
 315 định vị trên bề mặt của cả hai phiên bản invasin đã  
 316 được xác nhận bằng phương pháp flow cytometry và  
 317 miễn dịch huỳnh quang, nhưng chỉ có InvS được neo  
 318 bởi Lp-1568 mới có hoạt động NF- $\kappa$ B trong dòng tế  
 319 bào monocytic<sup>39</sup>. Các kết quả được công bố nêu trên  
 320 cho thấy chiến lược neo xuyên màng ở đầu N-terminal

321 để biểu hiện các protein ngoại lai trên bề mặt tế bào  
322 LAB là một phương pháp có nhiều tiềm năng.

### 323 **Neo gắn miền trung gian**

324 Sự hình thành liên kết không cộng hóa trị trong chiến  
325 lược gắn protein ngoại lai vào thành tế bào có thể thu  
326 được bằng cách sử dụng các domain gắn thành tế bào  
327 khác nhau như surface (S)-layer protein (SLP), do-  
328 main LysM hoặc domain WxL<sup>40-42</sup>. Các S-layer là  
329 mạng lưới các đơn phân của tiểu đơn vị protein hoặc  
330 glycoprotein với trọng lượng phân tử 40–200 kDa<sup>43</sup>.  
331 Cấu trúc S-layer gồm hai vùng chức năng là domain  
332 tự lắp ráp và domain gắn tế bào, chịu trách nhiệm  
333 cho quá trình neo vào bề mặt tế bào thông qua việc  
334 hình thành các liên kết không cộng hóa trị với cấu  
335 trúc trên bề mặt của tế bào, thường là với lipopolysac-  
336 charide (LPS) có sẵn trong vi khuẩn Gram âm và với  
337 các polysaccharide có trên thành tế bào ở vi khuẩn  
338 Gram dương<sup>42</sup>. Những vùng này đã được mô tả rõ  
339 ràng trong S-layer protein S<sub>A</sub> của *L. acidophilus* ATCC  
340 4356<sup>44</sup>, SlpA của *L. brevis* ATCC 8287<sup>45</sup> và CbsA của  
341 *L. crispatus* JCM 5810<sup>46</sup>. Các nghiên cứu đã chứng  
342 minh S-layer protein trong một số loài *Lactobacillus*  
343 có trọng lượng phân tử nhỏ (25–71 kDa), giá trị pI  
344 cao 9,35–10,4<sup>47</sup> và chiếm 10–15% tổng số protein.  
345 So với SLP từ các loài khác sử dụng motif tương đồng  
346 lớp S (S-layer homology, SLH) cho sự gắn kết không  
347 cộng hóa trị vào thành tế bào, thì SLP từ *Lactobacil-*  
348 *lus* đóng vai trò là trung gian cho quá trình gắn kết  
349 với thành tế bào thông qua tương tác giữa các amino  
350 acid cơ bản trong vùng gắn kết với thành tế bào và các  
351 polymer thành tế bào tích điện âm như lipoteichoic  
352 acid hoặc teichoic acid<sup>48</sup>. Các tính năng khác biệt kể  
353 trên của SLP từ *Lactobacillus* đã mang đến nhiều tiềm  
354 năng trong khai thác các cognate promoter và SP có  
355 nguồn gốc từ SLP để biểu hiện và tiết các protein ngoại  
356 lai trong LAB, cũng như sử dụng SLP làm chất mang  
357 cho biểu hiện protein ngoại lai trên bề mặt của *Lac-*  
358 *tobacillus* và *Lactococcus*<sup>48-50</sup>. Một số SLP trong các  
359 loài *Lactobacillus* đã được nghiên cứu rộng rãi cho các  
360 mục đích khác nhau như: phương tiện để vận chuyển  
361 kháng nguyên, hoặc chất xúc tác sinh học toàn bộ tế  
362 bào<sup>51</sup>. S-layer subunit (SlpA) của *L. brevis* đã biểu  
363 hiện thành công mô hình epitope ngoại lai trên bề  
364 mặt tế bào trong khi vẫn duy trì được cấu trúc mạng  
365 tinh thể của S-layer<sup>52</sup>. Protein gắn collagen (collagen-  
366 binding protein, Cnb) từ *L. reuteri* NCIB 11951, vốn  
367 có quan hệ tương đồng khá gần với neo S-layer là  
368 BspA, đã được sử dụng làm protein neo để biểu hiện  
369 β-glucanase trên bề mặt tế bào của *L. reuteri* Pg4. Vị  
370 trí trên bề mặt và khả năng phân hủy β-glucan của β-  
371 glucanase biểu hiện trên bề mặt đã được công nhận<sup>53</sup>.

Một nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng SLP từ *L. crispatus*  
K2-4-3 được phân lập từ ruột gà có thể được sử dụng  
để biểu hiện các protein ngoại lai trên bề mặt của một  
số chủng *Lactobacillus* không có S-layer thí dụ như *L.*  
*lactis*, suy ra tiềm năng sử dụng neo SLP để biểu hiện  
trên bề mặt của bản thân vật chủ vốn không thể tự sản  
xuất ra SLP<sup>54</sup>.

Một phương pháp neo khác dựa vào liên kết không  
cộng hóa trị giữa protein với thành của tế bào là thông  
qua domain LysM. Đây là một module phổ biến trên  
thành tế bào, có khả năng phân hủy enzyme và pro-  
tein, là tác nhân gây độc lực ở vi khuẩn<sup>55</sup>. Các do-  
main LysM với độ dài khác nhau từ 44 đến 65 amino  
acid, tồn tại một hoặc nhiều bản sao trong mỗi pro-  
tein<sup>3</sup>, thường hiện diện ở vùng đầu N hoặc đầu C của  
protein và gắn kết với peptidoglycan và chitin<sup>56</sup>. Khả  
năng gắn kết này của các domain LysM đã được áp  
dụng rộng rãi cho các chiến lược biểu hiện trên bề mặt  
không biến đổi gene dựa trên việc tạo ra protein dung  
hợp có chứa LysM trong một chủng chủ sản xuất, ví  
dụ như *E. coli* hoặc *L. lactis*, sau đó là cố định lên trên  
bề mặt một chủng chủ không tái tổ hợp nào đó ví dụ  
như LAB<sup>57</sup>. Với phương pháp này, chủng chủ có thể  
được trộn lẫn với protein dung hợp đã hoặc chưa qua  
tinh sạch, và lượng protein được nạp lên trên bề mặt  
tế bào có thể được kiểm soát dễ dàng hơn khi được  
so sánh với cách biểu hiện tái tổ hợp thông thường<sup>3</sup>.  
Nhiều protein neo có chứa motif LysM đã được phát  
hiện và ứng dụng cho mục đích này<sup>57,58</sup>. Neo protein  
(protein anchor, PA) AcmA có nguồn gốc từ pepti-  
doglycan hydrolase của *L. lactis* là một ví dụ. Neo này  
chứa ba motif LysM dài 45 amino acid được phân tách  
bằng các spacer sequences. Bosma và cộng sự đã sử  
dụng PA để biểu hiện hoặc α-amylase (α-PA) hoặc  
β-lactamase (β-PA) trên bề mặt của các tế bào *lacto-*  
*coccus* đã qua xử lý bằng acid. Cả hai enzyme đều hoạt  
động khi chúng được neo một cách vô tình bởi PA.  
Raha và cộng sự (2005) cũng đã sử dụng chuỗi lặp lại  
255 bp của vùng gắn kết với thành tế bào của protein  
AcmA đã được để cập ở trên để biểu hiện vùng A1 và  
A3 của protein VP1 của enterovirus 71 (EV71) trên bề  
mặt. Việc biểu hiện thành công các epitope VP1 của  
EV71 trên bề mặt của *L. lactis* được xác nhận bằng  
whole-cell ELISA đã mở ra hướng mới để phát triển  
vaccine uống. Một ví dụ khác liên quan đến chiến  
lược không biến đổi gene này là MurO từ *L. plantarum*  
hoặc Ly5C từ *L. fermentum* khi biểu hiện thành công  
β-galactosidase trên bề mặt *L. plantarum*<sup>59</sup>, hoặc trên  
các tế bào LAB<sup>58</sup> khi ứng dụng trên phạm vi rộng hơn.  
Các nghiên cứu này cung cấp phương thức gắn pro-  
tein ngoại lai trên bề mặt của các chủng lợi khuẩn LAB  
không sử dụng phương pháp biến đổi gene.

424 **Neo cộng hoá trị**

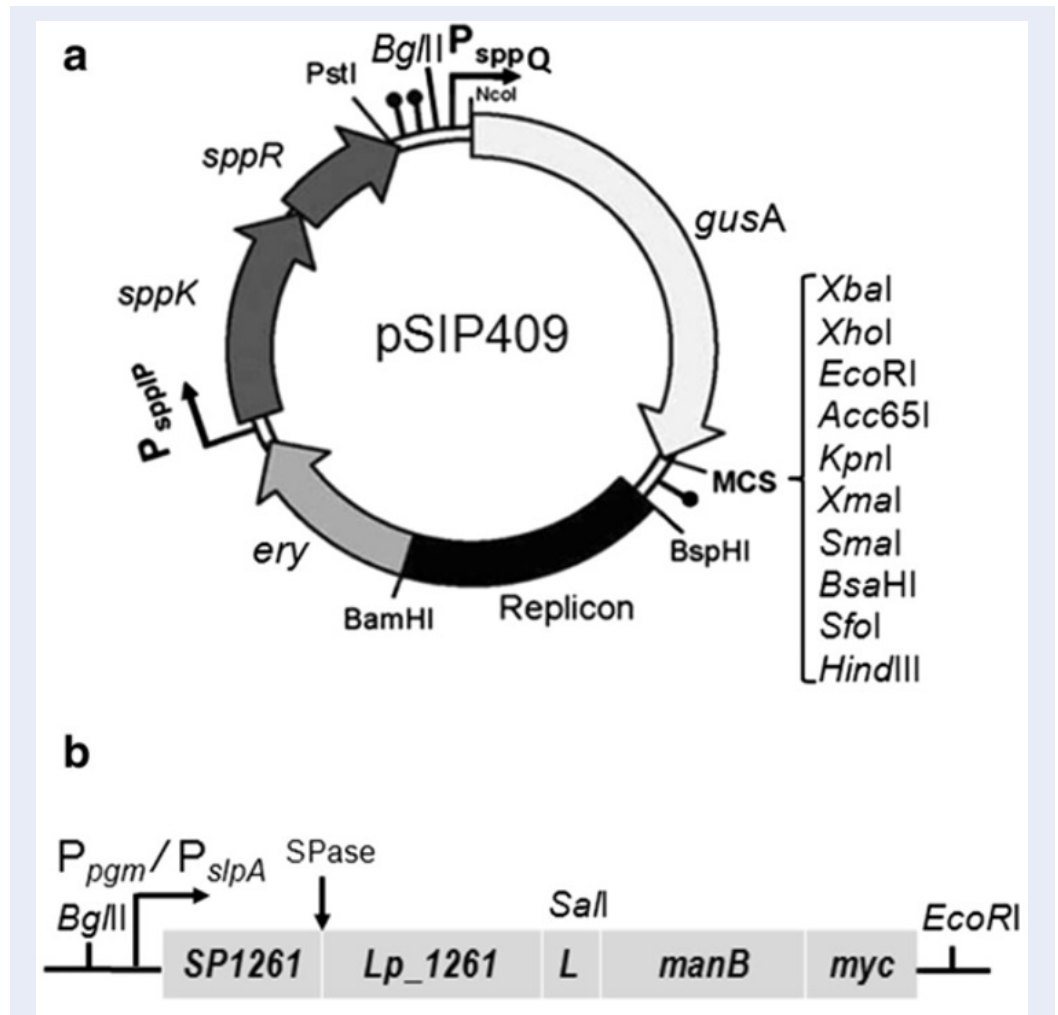
425 **Neo lipoprotein**

426 Liên kết cộng hóa trị với màng tế bào có thể được  
 427 hình thành qua các neo lipoprotein, thường bao gồm  
 428 một SP ở đầu N có chứa motif lipobox trong vùng  
 429 đầu C. Sau khi tiết ra protein theo con đường Sec,  
 430 một diacylglycerol transferase xúc tác việc gắn cộng  
 431 hóa trị một cysteine bảo tồn trong lipobox với một  
 432 phospholipid trong lớp màng, trong khi SP được loại  
 433 bỏ bởi peptidase đặc hiệu của lipobox. Do đó, việc  
 434 neo protein tái tổ hợp vào màng tế bào có thể đạt  
 435 được bằng cách dung hợp một protein ngoại lai ở  
 436 vùng hạ lưu của một neo lipoprotein thích hợp. Việc  
 437 sử dụng neo lipoprotein để biểu hiện protein ngoại  
 438 lai trong LAB đã nhận được tương đối ít sự chú ý  
 439 so với các phương pháp biểu hiện trên bề mặt khác.  
 440 Trong *L. plantarum*, hai neo lipoprotein khác nhau  
 441 là Lp-1261 và Lp-1452 có nguồn gốc tương ứng từ  
 442 oligopeptide ABC transporter (Lp-1261) và peptidyl-  
 443 prolyl isomerase PrsA (Lp-1452), đã được sử dụng  
 444 để biểu hiện trên bề mặt một đoạn dài (Inv) và một  
 445 đoạn ngắn (InvS) của extracellular domain của in-  
 446 vasin từ tác nhân gây bệnh *Yersinia pseudotuberculosis*  
 447 trên người. SP và vùng của domain xúc tác chịu trách  
 448 nhiệm cho quá trình neo cộng hóa trị vào lớp ngoài  
 449 của màng plasma thông qua cysteine ở đầu N đã bị  
 450 chuyển hóa lipid. Sự biểu hiện thành công lên bề mặt  
 451 của Inv và InvS trên bề mặt tế bào *Lactobacillus* của cả  
 452 hai neo Lp-1261 và Lp-1452 đã được xác nhận bằng  
 453 phân tích miễn dịch huỳnh quang và flow cytometry.  
 454 Đáng chú ý, cả hai neo lipoprotein cho kết quả hoạt  
 455 động tốt nhất trong số các neo đã được thử nghiệm  
 456 vốn chứa invasin nguyên bản có cấu trúc khá lớn và  
 457 gây ra phản ứng viêm mạnh mẽ<sup>39</sup>. Trong một nghiên  
 458 cứu khác, Kuczkowska và cộng sự<sup>60</sup> cũng đã sử dụng  
 459 hai neo Lp-1261 và Lp-1452 để gắn CCL3Gag, là loại  
 460 protein dung hợp bao gồm kháng nguyên HIV-1 Gag  
 461 bị cắt ngắn và chemokine CCL3 của chuột, lên trên  
 462 bề mặt của *L. plantarum* NC8. Kết quả nghiên cứu  
 463 cho thấy không thể xác định vị trí gắn trên bề mặt của  
 464 protein neo Lp-1261 khi quan sát bằng kính hiển vi, có  
 465 thể là do quá trình tiết protein hiệu quả thấp, có quá  
 466 nhiều vị trí chèn vô thành của tế bào. Trong khi đó,  
 467 các tế bào vi khuẩn biểu hiện CCL3Gag bằng neo Lp-  
 468 1452 cho thấy tín hiệu huỳnh quang mạnh hơn nhiều,  
 469 có thể do Lp-1452 giúp cho domain CCL3 tiếp xúc  
 470 nhiều hơn với kháng thể.

471 **Neo LPxTG**

472 Một neo khác, trong đó có sự hình thành liên kết cộng  
 473 hóa trị với thành tế bào, có thể được tạo ra bằng cách  
 474 sử dụng con đường sortase (SrtA)<sup>61</sup>. Cụ thể, protein

tiết ra mang một neo ở đầu C, mà bản thân neo này  
 có chứa motif LPxTG (LPQTxE trong *L. plantarum*),  
 theo sau là một domain kỵ nước và một đuôi tích  
 điện dương. Domain kỵ nước và đuôi tích điện giữ  
 cho protein không bị giải phóng vào môi trường do  
 đó cho phép nhận ra motif LPxTG bởi một transpep-  
 tidase liên quan đến màng gọi là sortase<sup>33</sup>. Sortase  
 xúc tác phản ứng cắt liên kết peptide, thí dụ như liên  
 kết giữa threonine và glycine trong motif LPxTG và  
 liên kết giữa threonine ở đầu C của protein bề mặt với  
 cấu nối pentapeptide của peptidoglycan<sup>62</sup>. Phản ứng  
 đặc hiệu này đã được khai thác hàng loạt trong lĩnh  
 vực công nghệ sinh học như tổng hợp nên các liên  
 kết nucleic acid-peptide và neoglycoconjugate, tuần  
 hoàn protein, đánh dấu protein bề mặt tế bào trên  
 tế bào sống, phương tiện phân phối vaccine sống và  
 xúc tác sinh học toàn tế bào<sup>63</sup>. Piard và các đồng  
 nghiệp đã kết luận rằng hiệu quả neo của protein M6  
 từ *Streptococcus pyogenes* với thành tế bào cho kết quả  
 rất khác biệt trong các chủng chủ khác nhau bao gồm  
*L. lactis*, *L. fermentum*, *L. sake* và *S. thermophilus*. Di-  
 eye và cộng sự<sup>28</sup> nghiên cứu về biểu hiện thành công  
 nuclease NucA trên bề mặt của tế bào vi khuẩn *L. lac-  
 tis* bằng cách sử dụng tín hiệu phân loại (sorting sig-  
 nal) ở đầu C của protein M6. Các tác giả này đã có  
 một đánh giá tổng quan về trọng lượng phân tử của  
 các protein dung hợp có chứa neo với thành tế bào  
 của protein M6. Các dải có trọng lượng phân tử lớn  
 đã được phát hiện trong mảnh vỡ thành tế bào cho  
 thấy sự hiện diện của các mảnh peptidoglycan có kích  
 thước khác nhau được liên kết cộng hóa trị với pro-  
 tein bề mặt. Turner và các đồng nghiệp<sup>64</sup> đồng ý với  
 quan sát trên khi protein dung hợp Mlp-His6 chứa tín  
 hiệu neo với thành tế bào là LPxTG được phát hiện  
 bằng kỹ thuật Western blot với khối lượng phân tử cao  
 hơn. Các tác giả phỏng đoán kết quả trên có được là  
 do quá trình glycosyl hóa protein này. Gần đây, một  
 neo vách tế bào mới từ *L. plantarum* WCFS1 đã được  
 tìm thấy và sử dụng trong biểu hiện 37-kDa oncofe-  
 tal antigene (OFA) trên bề mặt tế bào *L. plantarum*  
 WCFS1<sup>65</sup>. Dựa trên trình tự của Lp-2578, là một pro-  
 tein được ghi nhận là protein “bám dính” trên bề mặt  
 của thành tế bào từ *L. plantarum* WCFS1, Fredrik-  
 sen và các cộng sự đã thiết kế ba neo chứa LPxTG với  
 độ dài khác nhau tương ứng với vùng có độ phức tạp  
 thấp (low-complexity region) đã bị cắt ngắn, vùng có  
 độ phức tạp thấp còn nguyên vẹn và gần như là pro-  
 tein hoàn chỉnh. Dữ liệu từ nghiên cứu đã cho thấy  
 rằng sự khác biệt về chiều dài của neo ảnh hưởng đến  
 hiệu quả của quá trình neo và độ ổn định của protein;  
 tuy nhiên sự khác biệt này không lớn cũng như không  
 rõ ràng để dự đoán.



**Hình 3:** Hệ thống vector biểu hiện trên bề mặt tế bào LAB. (a) Cấu trúc vector biểu hiện pSIP409 sử dụng motif neo lipoprotein đầu N của mannanase (ManB) trong *L. plantarum*. Các gene *sppK* và *sppR* mã hóa các protein trong hệ thống điều hòa hai thành phần. Gene quan tâm được đặt dưới sự kiểm soát của chất kích thích bacteriocin cảm ứng mạnh P<sub>sppQ</sub>-sakacin Q. Vùng chèn gene với các vị trí enzyme cắt giới hạn (MCS). Vùng sao chép bao gồm hai yếu tố quyết định pUC(pGEM)-ori đối với *E. coli* và 256 lần đối với *L. sakei* và *L. plantarum*. Gene sàng lọc kháng erythromycin (*ery*), và điểm kết thúc phiên mã. (b) Cấu trúc vùng biểu hiện sử dụng motif neo lipoprotein đầu N của mannanase (ManB) với các vị trí enzyme cắt giới hạn *Bgl*III và *Eco*RI, L biểu thị trình tự enzyme *Sal*I. Các phần chèn chứa trình tự *manB* được hợp nhất với *myc*-tag để phát hiện protein. *Ppgm* và *PslpA*, phosphoglycerate mutase (*pgm*) từ *L. acidophilus* NCFM và protein lớp S *SlpA* của *L. acidophilus* ATCC 4356. *SP1261* và *Lp-1261*: peptide tín hiệu và neo lipoprotein. *Spase*: lipobox với vị trí phân cắt Signal Peptidase II (*Spase*)<sup>14</sup>.

527 Đáng chú ý là trong một nghiên cứu gần đây của  
 528 Hoàng Minh và cộng sự<sup>14</sup>, hệ thống vector pSIP  
 529 đã được sử dụng để nghiên cứu chức năng của hai  
 530 phương pháp gắn cộng hóa trị để biểu hiện các en-  
 531 zyme liên quan đến lĩnh vực thực phẩm như man-  
 532 nanase hoặc chitosanase trên bề mặt tế bào của *L.*  
 533 *plantarum* như là chất xúc tác sinh học toàn tế bào  
 534 (Hình 3). Hai khác biệt chính khi so sánh hai phương  
 535 pháp này là: (i) Protein được gắn vào màng hoặc  
 536 thành tế bào, kết quả là phương pháp neo vào thành

tế bào qua trung gian sortase sẽ biểu hiện nhiều pro- 537  
 tein ngoại vi hơn phương pháp còn lại; (ii) Đầu N của 538  
 protein được gắn vào bề mặt của tế bào trong phương 539  
 pháp sử dụng lipobox, còn phương pháp neo vào vách 540  
 tế bào qua trung gian sortase lại gắn protein ở đầu C. 541  
 Việc sử dụng hai phương pháp neo cộng hóa trị này để 542  
 biểu hiện các protein mục tiêu khác nhau trên bề mặt 543  
 tế bào *Lactobacillus* đã cho cái nhìn sâu sắc và toàn 544  
 diện về hệ thống neo của vi khuẩn. 545



**546 PHÁT TRIỂN CÁC PROMOTOR BIỂU**  
**547 HIỆN THƯỜNG TRỰC Ở LAB**

548 Như đã đề cập ở trên, việc phát triển các công cụ di  
 549 truyền để sản xuất protein và enzyme ngoại lai trong  
 550 LAB đang rất được quan tâm. Một số các hệ thống  
 551 vector biểu hiện cảm ứng đã được phát triển trong  
 552 LAB. Các vector pSIP dựa trên promoter cảm ứng  
 553 mạnh P<sub>sppA</sub> vốn dành riêng cho chủng chủ *Lactobacil-*  
 554 *lus*, đã được chứng minh là cung cấp mức độ biểu hiện  
 555 cao, kiểm soát chặt chẽ bằng lượng nano gram được  
 556 thêm vào của tác nhân cảm ứng là peptide cảm ứng  
 557 (induction peptide, IP). Nhìn chung, hệ thống vector  
 558 biểu hiện cảm ứng hữu ích trong trường hợp cần phải  
 559 đạt được mức sản xuất tối đa của protein tái tổ hợp  
 560 tại một thời điểm nhất định và cụ thể của quá trình  
 561 nuôi cấy, hoặc khi protein có tác động tiêu cực đến  
 562 quá trình chuyển hóa tế bào vi khuẩn<sup>66</sup>. Ngoài ra,  
 563 ngày càng có nhiều sự quan tâm đối với sự phát triển  
 564 của LAB với vai trò là nhà máy sản xuất tại chỗ hoặc là  
 565 phương tiện phân phối các hợp chất điều trị hoặc en-  
 566 zyme trong cơ thể người, nhưng điều này khiến cho hệ  
 567 thống biểu hiện cảm ứng không còn phù hợp<sup>67</sup>. Đối  
 568 với các ứng dụng này, chiến lược sử dụng các vector  
 569 biểu hiện thường trực liên quan đến sản xuất protein  
 570 ở mức mong muốn sẽ là một giải pháp thay thế khả  
 571 thi. Đáng chú ý là các promoter vi khuẩn có chung  
 572 đặc tính có thể có tác động và cường độ khác nhau  
 573 trong LAB; do đó, cần thiết phải xác định, đánh giá các  
 574 promoter và kiểm tra tính hiệu quả của các hệ thống  
 575 vector biểu hiện khác nhau cho mỗi vật chủ mới<sup>68</sup>.  
 576 Nhìn chung, có ba chiến lược chính để tìm kiếm và  
 577 xác định các promoter có nguồn gốc từ *L. lactis* và các  
 578 LAB khác hiện hữu bao gồm: (a) Sử dụng các vector  
 579 sàng lọc mang promoterless reporter genes; (b) Phân  
 580 lập các promoter từ các gene house-keeping mạnh và  
 581 thường trực; (3) Tạo ra các promoter tổng hợp từ các  
 582 consensus promoter<sup>12</sup>. Rud và cộng sự đã phát triển  
 583 một thư viện promoter tổng hợp (synthetic promoter  
 584 library, SPL) cho *L. plantarum* dựa trên cách tiếp cận  
 585 của Jensen & Hammer, trong đó một thư viện các pro-  
 586 moter nhân tạo cho *L. lactis* thu được bằng cách sắp  
 587 xếp ngẫu nhiên spacer sequence vốn phân tách các  
 588 consensus sequences của promoter. SPL thu được đã  
 589 cung cấp một loạt các promoter thường trực sở hữu  
 590 các thể mạnh khác nhau trong sản xuất ổn định pro-  
 591 tein; và các promoter mạnh nhất, điển hình là P<sub>11</sub>,  
 592 đã mang lại sản lượng protein tương đương với native  
 593 rRNA promoters<sup>67</sup>. Tauer và đồng nghiệp<sup>66</sup> đã  
 594 so sánh chức năng của bốn promoter thường trực bao  
 595 gồm P<sub>11</sub>, P<sub>tuf33</sub>, P<sub>tuf34</sub> và P<sub>efp</sub> và kiểm tra biểu hiện  
 596 trong tế bào chất của gene mCherry với mục đích  
 597 cung cấp một hệ thống thường trực phù hợp cho các

598 ứng dụng trong lên men thực phẩm hoặc phân phối  
 599 thuốc trong điều kiện *in vivo*. Promoter P<sub>11</sub> được  
 600 đánh giá là promoter mạnh nhất. Việc biểu hiện cũng  
 601 đạt được kết quả tốt khi sử dụng cả hai promoter mới  
 602 là P<sub>tuf33</sub> và P<sub>tuf34</sub>, hiện có sẵn dưới dạng các yếu tố  
 603 bổ sung để thúc đẩy quá trình biểu hiện thường trực  
 604 trong *L. plantarum* và *L. buchneri* trong khi promoter  
 605 P<sub>efp</sub> cho hiệu quả rất yếu. Do đó, việc đánh giá độ  
 606 mạnh của các promoter thường trực này có thể có ích  
 607 cho sự phát triển các hệ thống biểu hiện thường trực  
 608 trong LAB, từ mức độ sản xuất trung bình cho đến  
 609 mạnh.

610 Trong một nghiên cứu gần đây, ảnh hưởng của ba pro-  
 611 moter thường trực là *pgm*, *slpA* và *slpB* đến biểu hiện  
 612 dạng tiết và biểu hiện trên bề mặt của gene *manB*  
 613 trong chủng chủ *L. plantarum* đã được tiến hành so  
 614 sánh. Những promoter thường trực này được đánh  
 615 giá là yếu tố tiềm năng cho khả năng biểu hiện trong  
 616 nội bào của các protein ngoại lai trong lactobacilli.  
 617 Promoter cho đột biến phosphoglycerate (phospho-  
 618 glycerate mutase, *pgm*) là một promoter thường trực  
 619 mạnh có nguồn gốc từ *L. acidophilus* NCFM, vốn  
 620 là một chủng lợi khuẩn đã có lịch sử được sử dụng  
 621 rộng rãi trong các sản phẩm bổ sung dinh dưỡng, các  
 622 sản phẩm từ sữa và sữa công thức cho trẻ sơ sinh  
 623 (Hình 4)<sup>47,66</sup>. Promoter *pgm* được xác định dựa trên  
 624 phân tích bộ gene đã chứng minh một số operon biểu  
 625 hiện khác biệt để đáp ứng với các nguồn carbohydrate  
 626 hoặc biểu hiện thường trực bất kể nguồn carbohy-  
 627 drate<sup>69</sup>. Tri Duong và cộng sự đã phát hiện ra mức độ  
 628 biểu hiện của GUS, vốn chịu kiểm soát bởi promoter  
 629 thường trực *pgm*, cao xấp xỉ 10 lần so với mức biểu  
 630 hiện trong cấu trúc cảm ứng ở hai chủng chủ là *L. aci-*  
 631 *dophilus* và *L. gasserii*. Promoter đã có thể điều khiển  
 632 biểu hiện của operon oxalate, cải thiện đáng kể quá  
 633 trình phân hủy oxalate của *L. gasserii* ATCC 33323.  
 634 Kết quả này cho thấy việc sử dụng một hệ thống vec-  
 635 tor biểu hiện thường trực dựa trên promoter *pgm* có  
 636 thể là một công cụ hữu ích để biểu hiện vượt mức các  
 637 protein và enzyme mong muốn trong lactobacilli và  
 638 các chủng khác của LAB.

639 Promoter *slpA* của *L. acidophilus* ATCC 4356 đã được  
 640 nghiên cứu rộng rãi trong phát triển các hệ thống biểu  
 641 hiện gene ngoại lai trong một loạt các chủng chủ *Lac-*  
 642 *tobacillus*. Promoter *slpA* đã được chứng minh là có  
 643 hiệu quả cao không chỉ trong chủng chủ tự nhiên mà  
 644 còn trong cả chủng *L. casei* ATCC 393, vốn không sở  
 645 hữu S-layer protein<sup>48,68</sup>. Đáng chú ý, vùng promoter  
 646 của vị trí biểu hiện gene *slpA* từ *L. acidophilus* bao gồm  
 647 hai promoter tiềm năng là P-1 (vị trí -228 đến -198) và  
 648 P-2 (vị trí -335 đến -303) (Hình 5). Kết quả này cho  
 649 thấy lượng mRNA được định hướng bởi một cấu trúc  
 650 nhiều promoter có thể cao hơn so với khi chỉ được  
 651 định hướng của một promoter<sup>48</sup>.



## 652 KẾT LUẬN

653 Bài báo này trình bày tổng quan về các hệ thống biểu  
654 hiện protein ngoại lai ở dạng tiết và biểu hiện trên bề  
655 mặt của LAB, và một số giải pháp nhằm tăng hiệu quả  
656 biểu hiện của chúng. Mặc dù có rất nhiều tiềm năng  
657 đã và đang được chứng minh, nhưng thực tế là để có  
658 thể áp dụng phổ biến các hệ thống biểu hiện ở LAB,  
659 các nhà khoa học cần phải có thêm nhiều nghiên cứu  
660 sâu hơn với hy vọng rằng trong tương lai, các nghiên  
661 cứu này sẽ có thêm nhiều đột phá nhằm đưa ứng dụng  
662 của các chúng đến tất cả các lĩnh vực của cuộc sống  
663 con người.

## 664 DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

665 LAB: Lactic Acid Bacteria  
666 GABA: Gama-Aminobutyric Acid  
667 CM: Cell Membrane  
668 Cyto: Cytoblast  
669 CW: Cell Wall  
670 OM: Double-Stranded Ribonucleic Acid  
671 SRP: Signal Recognition Particle  
672 SP: Signal Peptide  
673 SPase: Signal Peptidase  
674 SLP: Surface (S)-Layer Protein  
675 SLH: S-Layer Homology  
676 PA: Protein Anchor  
677 LPS: Lipopolysaccharide  
678 NICE: Nisin Controlled Gene Expression System  
679 SICE: Stress - Induced Controlled Expression  
680 IP: Induction Peptide  
681 HK: Histidine Kinase  
682 SPL: Synthetic Promoter Library

## 683 LỜI CẢM ƠN

684 Nghiên cứu được tài trợ bởi Sở Khoa học Công nghệ  
685 tỉnh Tiền Giang trong khuôn khổ Đề tài mã số ĐTN  
686 05/19.  
687 Nguyễn Thanh Tấn được tài trợ bởi Chương trình  
688 học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của  
689 Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số  
690 VINIF.2022.ThS.077.

## 691 XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

692 Các tác giả cam kết không có xung đột lợi ích.

## 693 ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

694 Các tác giả Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thanh  
695 Tấn viết, tổng hợp, và chỉnh sửa bản thảo. Tác giả Trần  
696 Văn Hiếu tham gia chỉnh sửa bản thảo. Tất cả các tác  
697 giả đồng ý với bản thảo cuối cùng khi nộp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol J*. 2011;6(9):1147-61; 700 701
2. Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ, et al. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(2):199-230; 702 703 704
3. Michon C, Langella P, Eijsink VGH, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: Strategies and applications. *Microb Cell Fact*. 2016;15(1):70; 705 706 707 708
4. Pontes DS, De Azevedo MSP, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. Lactococcus lactis as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif*. 2011;79(2):165-75; 709 710 711 712
5. Assouhoun-Djeni NMC, Djeni NT, Messaoudi S, Lhomme E, Koussoumon-Camara M, Ouassa T, et al. Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d'Ivoire. *Food Control*. 2016;62:397-404; 713 714 715 716 717
6. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci*. 2016;120:118-32; 718 719 720 721
7. Matsumoto S, Hara T, Hori T, Mitsuyama K, Nagaoka M, Tomiyasu N, et al. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(3):417-26; 722 723 724 725 726 727
8. Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4+ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor  $\beta$  and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(4):695-701; 728 729 730 731 732
9. Barla F, Koyanagi T, Tokuda N, Matsui H, Katayama T, Kumagai H. The  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing ability under low pH conditions of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods of Ishikawa Prefecture, Japan, with a strong ability to produce ACE-inhibitory peptides. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2016;10:105-10; 733 734 735 736 737 738
10. Shehata MG, El Sohaimy SA, El-Sahn MA, Youssef MM. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ann Agric Sci*. 2016;61(1):65-75; 739 740 741 742
11. Halbmayr E, Mathiesen G, Nguyen TH, Maischberger T, Peterbauer CK, Eijsink VGH, et al. High-level expression of recombinant  $\beta$ -galactosidases in Lactobacillus plantarum and Lactobacillus sakei using a sakacin p-based expression system. *J Agric Food Chem*. 2008;56(12):4710-9; 743 744 745 746 747
12. De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(3):289-95; 748 749
13. Ávall-Jääskeläinen S, Palva A. Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(3):511-29; 750 751
14. Nguyen HM, Pham ML, Stelzer EM, Plattner E, Grabherr R, Mathiesen G. Constitutive expression and cell-surface display of a bacterial  $\beta$ -mannanase in Lactobacillus plantarum. *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):147; 752 753 754 755
15. Kakikawa M, Yokoi KJ, Kimoto H, Nakano M, Kawasaki KI, Taketo A. Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by Lactobacillus plantarum phage  $\phi$ g1e. *Gene*. 2002;299(1-2):227-34; 756 757 758 759
16. Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in Lactobacillus brevis 174A is mediated by two regulatory proteins. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(7):e02810-17; 760 761 762 763 764
17. Watanabe M, Kinoshita H, Huang IN, Eguchi K, Tsurumi T, Kawai Y, et al. An adhesin-like protein, lam29, from Lactobacillus mucosae ME-340 binds to histone H3 and blood group 765 766 767

- antigens in human colonic mucus. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(9):1665-71;.
18. Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson IR. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 2009;17(4):139-45;.
19. Dilks K, Rose RW, Hartmann E, Pohlschröder M. Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: A genomic survey. *J Bacteriol.* 2003;185(4):1478-83;.
20. Tillotson GS, Tillotson J. Bacterial secreted proteins: Secretary mechanisms and role in pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(6):691-707;.
21. Fagerlund A, Lindbäck T, Granum PE. *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol.* 2010;10:304;.
22. Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):207-33;.
23. Stathopoulos C, Georgiou G, Earhart CF. Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA(46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;45(1-2):112-9;.
24. Mathiesen G, Sveen A, Brurberg MB, Fredriksen L, Axelsson L, Eijsink VGH. Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics.* 2009;10:425;.
25. Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: A powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol.* 2006;362(3):393-402;.
26. Caspers M, Brockmeier U, Degering C, Eggert T, Freudl R. Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(6):1877-85;.
27. Perez-Martinez G, Kok J, Venema G, van Dijk JM, Smith H, Bron S. Protein export elements from *Lactococcus lactis*. *Mol Gen Genet.* 1992;234(3):401-11;.
28. Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 2001;183(14):4157-66;.
29. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: An efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact.* 2005;4:2;.
30. Mathiesen G, Sveen A, Piard JC, Axelsson L, Eijsink VGH. Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J Appl Microbiol.* 2008;105(1):215-26;.
31. Sørvig E, Grönqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijsink VGH, Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;229(1):119-26;.
32. Karlskås IL, Maudal K, Axelsson L, Rud I, Eijsink VGH, Mathiesen G. Heterologous protein secretion in lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS One.* 2014;9(3):e91125;.
33. Leenhouts K, Buist G, Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999;76(1-4):367-76;.
34. Bielen A, Teparić R, Vujaklija D, Mrša V. Microbial anchoring systems for cell-surface display of lipolytic enzymes. *Food Technol Biotechnol.* 2014;52(2):179-86;.
35. Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P Å, Ståhl S. Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol.* 2002;96(2):129-54;.
36. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1990-5;.
37. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hébraud M. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;256(1):1-15;.
38. Narita J, Okano K, Tateno T, Tanino T, Sewaki T, Sung MH, et al. Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bio-conversion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(5):564-72;.
39. Fredriksen L, Kleiveland CR, Hult LT, Lea T, Nygaard CS, Eijsink VGH, et al. Surface display of N-terminally anchored invasin by *Lactobacillus plantarum* activates NF- $\kappa$ B in monocytes. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5864-71;.
40. Brinster S, Furlan S, Serror P. C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* 2007;189(4):1244-53;.
41. Visweswaran GRR, Leenhouts K, Van Roosmalen M, Kok J, Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(10):4331-45;.
42. Fagan RP, Fairweather NF. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(3):211-22;.
43. Ävall-Jääskeläinen S, Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(3):511-29;.
44. Smit E, Jager D, Martinez B, Tielen FJ, Pouwels PH. Structural and functional analysis of the S-layer protein crystallisation domain of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Evidence for protein-protein interaction of two subdomains. *J Mol Biol.* 2002;324(5):953-64;.
45. Ävall-Jääskeläinen S, Hynönen U, Ilk N, Pum D, Sleytr UB, Palva A. Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiol.* 2008;8:165;.
46. Antikainen J, Anton L, Sillanpää J, Korhonen TK. Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol.* 2002;46(2):381-94;.
47. Johnson B, Selle K, O'Flaherty S, Goh YJ, Klaenhammer T. Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology.* 2013;159(Pt 11):2269-82;.
48. Boot HJ, Kolen CPAM, Andreadaki FJ, Leer RJ, Pouwels PH. The *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequences, one of which directs transcription of stable mRNA. *J Bacteriol.* 1996;178(18):5388-94;.
49. Hynönen U, Ävall-Jääskeläinen S, Palva A. Characterization and separate activities of the two promoters of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;87(2):647-54;.
50. McCracken A, Turner MS, Giffard P, Hafner LM, Timms P. Analysis of promoter sequences from *Lactobacillus* and *Lactococcus* and their activity in several *Lactobacillus* species. *Arch Microbiol.* 2000;173(5-6):383-9;.
51. Mesnage S, Weber-Levy M, Haustant M, Mock M, Fouet A. Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant *Bacillus anthracis* protects against tetanus toxin. *Infect Immun.* 1999;67(9):4847-50;.
52. Ävall-Jääskeläinen S, Kylä-Nikkilä K, Kahala M, Miikkulainen-Lahti T, Palva A. Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):5943-51;.
53. Huang SJ, Chen MJ, Yueh PY, Yu B, Zhao X, Liu JR. Display of *Fibrobacter succinogenes*  $\beta$ -glucanase on the cell surface of *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem.* 2011;59(5):2131-8;.
54. Hu S, Kong J, Sun Z, Han L, Kong W, Yang P. Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the S-layer protein. *Microb Cell Fact.* 2011;10:86;.
55. Bosma T, Kanninga R, Neef J, Audouy SAL, van Roosmalen ML, Steen A, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(11):880-9;.
56. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptidoglycan). *Mol Microbiol.* 2006;256(1):1-15;.

- 910 2008;68(4):838-47;.
- 911 57. Raha AR, Varma NRS, Yusoff K, Ross E, Foo HL. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(1):75-81;.
- 913 58. Hu S, Kong J, Kong W, Guo T, Ji M. Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(8):2410-8;.
- 918 59. Xu W, Huang M, Zhang Y, Yi X, Dong W, Gao X, et al. Novel surface display system for heterologous proteins on *Lactobacillus plantarum*. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(6):641-8;.
- 922 60. Kuczkowska K, Mathiesen G, Eijsink VGH, Øynebråten I. *Lactobacillus plantarum* displaying CCL3 chemokine in fusion with HIV-1 Gag-derived antigen causes increased recruitment of T cells. *Microb Cell Fact*. 2015;14:169;.
- 926 61. Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(1):192-221;.
- 928 62. Navarre WW, Schneewind O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*. 1994;14(1):115-121;.
- 932 63. Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. *Biotechnol Lett*. 2010;32(1):1-10;.
- 934 64. Turner MS, Hafner LM, Walsh T, Giffard PM. Peptide surface display and secretion using two LPXTG-containing surface proteins from *Lactobacillus fermentum* BR11. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(10):5855-5863;.
- 938 65. Fredriksen L, Mathiesen G, Sioud M, Eijsink VG. Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(21):7359-7362;.
- 942 66. Tauer C, Heidl S, Egger E, Heiss S, Grabherr R. Tuning constitutive recombinant gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact*. 2014;13:150;.
- 946 67. Rud I, Jensen PR, Naterstad K, Axelsson L. A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology*. 2006;152(Pt 4):1011-1019;.
- 948 68. McCracken A, Timms P. Efficiency of transcription from promoter sequence variants in *Lactobacillus* is both strain and context dependent. *J Bacteriol*. 1999;181(20):6569-6572;.
- 952 69. Duong T, Miller MJ, Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR. Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*. *Microb Biotechnol*. 2011;4(3):357-367;.
- 955

# Protein display on lactic acid bacteria cell surface

Phuong-Thao Thi Nguyen<sup>1,2,3,4</sup>, Thanh-Tan Nguyen<sup>2,3,4</sup>, Hieu Tran-Van<sup>2,3,4,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

The strong development of novel protein expression systems, especially in lactic acid bacteria, has attracted a lot of attention and presented many challenges for scientists, not only in terms of safety but also in the ability to preserve food. With the advantage of possessing a rigid cell wall structure and typical acid resistance, lactic acid bacteria have become a potential target not only as a cell factory for producing recombinant proteins used in the food industry but also as a means of delivering antigens for mucosal vaccine development. To achieve this goal, a series of target protein expression systems have been developed in many lactic acid bacteria. This review summarizes recent developments in foreign protein expression systems in both secretion and surface display forms in lactic acid bacteria, including prominent examples such as *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*, as well as current research on developing promising promoter systems to not only improve their ability but also increase their expression efficiency on the surface of lactic acid bacteria.

**Key words:** lactic acid bacteria, protein secretion, cell surface protein display, promoter

<sup>1</sup>Tien Giang University, Vietnam

<sup>2</sup>Laboratory of Biosensors, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>4</sup>Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

## Correspondence

**Hieu Tran-Van**, Laboratory of Biosensors, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Department of Molecular and Environmental Biotechnology, Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

## History

- Received: 24-02-2023
- Revised: 05-3-2024
- Accepted: 23-10-2024
- Published Online: 31-12-2024

DOI :



**Cite this article :** Nguyen P T, Nguyen T, Tran-Van H. **Protein display on lactic acid bacteria cell surface** . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2025; ( ):1-1.