

专论与综述

II a 类细菌素的结构、生物合成与活性^{*}吕燕妮^{1,2} 李平兰^{1,*} 周 伟¹ 刘国荣¹ 郭兴华³

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083) (国贸食品科学研究所 北京 100070)

(中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要 乳酸菌产生的细菌素中 II a 类细菌素是很大的一类,这类细菌素数量众多且抑菌活性广,尤其是它们都对单核细胞增生李斯特氏菌有较强的抑菌活性,而且它们的理化性质也比较稳定,因而它们是最有希望作为食品添加剂应用的细菌素。对目前研究比较清楚的一些 II a 类细菌素的分子构成、基因组织、生物合成、作用方式进行了概述,并对未来 II a 类细菌素在食品中的应用途径做出了展望。

关键词 :II a 类细菌素,李斯特氏菌,生物合成,结构

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)05-0955-05

Class II a Bacteriocins : Biosynthesis , Structure and Activity^{*}LV Yan-Ni LI Ping-Lan^{**} ZHOU Wei LIU Guo-Rong GUO Xing-Hua

(College of Food Science and Nutritional Engineering , China Agricultural University , Beijing 100083)

(Institute of GuoMao Food Science , Beijing 100070)

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101)

Abstract :Class II a bacteriocins can be considered as the major subgroup of bacteriocins from lactic acid bacteria , not only because of their large number , but also because of their activities and potential applications . They have first attracted particular attention as listericidal compounds and are now believed to be the next in line if more bacteriocins are to be approved in the future . The present review attempts to provide an insight into general knowledge available for class II a bacteriocins and discuss common features and recent findings concerning these substances .

Key words :Class II a bacteriocin , *Listeria* , Biosynthesis , Structure

随着近年来世界范围内发生的多起单核细胞增生李斯特氏菌引起的中毒事件以及由此而带来的危害,使得预防和控制食品中的李斯特氏菌成为了人们关注的热点^[1,2]。在研究中发现,某些乳酸菌细菌素对李斯特氏菌具有抑制活性,因此这类细菌素引起了人们特别的关注,这些细菌素通常都属于 II a 类细菌素。

在细菌素分类中, I 类细菌素羊毛硫抗生素,是一种小的包含有特殊氨基酸羊毛硫键的细菌素; II 类细菌素包含了非修饰性的氨基酸,并可以分为

3 个亚类: II a 类抗李斯特氏菌的小肽,它们有共同的 N-端 YGNGVXaaC 序列; II b 类细菌素一般需要 2 个肽段才能发挥活性,其中必须有 1 个肽段显示生理活性, 2 个肽段结合起来时有明显的累加效应; II c 类细菌素包括那些既不属于 II a 也不属于 II b 类的非羊毛硫氨酸细菌素,一般认为是包含巯基活性和信号肽编码机制的多肽^[3]。 II a 类细菌素是 II 类中数量最多且研究得也最多的一群,目前为止发现的所有 II a 类细菌素都有强烈的抗李斯特氏菌的活性。某些 II a 类细菌素还可抑制某些食品中的腐

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 30671482) 863 重大项目(No. 2006AA10A208) 北京市自然科学基金资助项目(No. 6052015)

^{**} 通讯作者 Tel 010-62737664 ,E-mail :plli@sohu.com

收稿日期 :2006-11-21 ,修回日期 :2007-04-28

败菌,因而Ⅱa类细菌素具有很好的控制食品腐败菌及病原菌的潜在应用前景,他们可以被认为是最有希望应用于多种工业用途的细菌素^[4]。

1 Ⅱa类细菌素的基本性质

1.1 组成及其主要结构

Ⅱa类细菌素通常包含 37 至 48 个残基,并且

拥有相似的氨基酸序列(见图 1)^[4]。N-端有 YGNGVXaaC 基团,通常认为这个基团是膜结合蛋白受体的识别序列,随着新的Ⅱa类细菌素的发现,其 N-端基团也可以表现为 YGNGVXaaCXaa(K/N)XaaXaaCXaa(W/D)(W/K/R)-Xaa(G/A/S)(A/N)括号中是很少变动的残基,大写字母的残基可能会被小写字母的残基替换,变化频率高的残基以 Xaa 表示。

Bacteriocin

Amino acid sequence

Leucocin A	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W																					
Mesentericin Y105	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	N	W	G	E	A	A	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W																					
Mundticin	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	K	G	C	S	V	D	W	G	K	A	I	G	I	G	N	N	S	A	A	N	L	A	T	G	G	A	A	G	W	S	K																
Piscicolin 126	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	N	G	C	T	V	D	W	S	K	A	I	G	I	G	N	N	A	A	N	L	T	T	G	G	A	A	G	W	N	K	G																
Bavaricin A	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	H	S	C	T	V	D	W	G	T	A	I	G	N	I	G	N	N	A	A	N	X	A	T	G	X	N	A	G	G																		
Sakacin P	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	H	S	C	T	V	D	W	G	T	A	I	G	N	I	G	N	N	A	A	N	W	A	T	G	G	N	A	G	W	N	K																
Pediocin PA-1	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	D	W	G	K	A	T	T	C	I	I	N	N	G	A	M	A	W	A	T	G	G	H	Q	G	N	H	K	C														
Bavaricin MN	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	Q	A	A	G	G	I	G	Q	T	V	V	X	Q	W	L	G	G	A	I	P	G	K																
Divercin V41	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	Q	A	S	G	C	I	G	Q	T	V	Y	G	G	W	L	G	G	A	I	P	O	K	C															
Enterocin A	T	T	H	S	G	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	T	K	N	K	C	T	V	D	W	A	K	A	T	T	C	I	A	G	M	S	T	G	G	F	L	G	G	A	I	P	G	K	C											
Enterocin P	A	T	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	C	W	V	N	W	G	E	A	K	E	N	I	A	G	I	V	I	S	G	W	A	S	G	L	A	G	M	G	H															
Carnobacteriocin BM1	A	I	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	K	E	K	C	W	V	N	K	A	E	N	K	Q	A	I	T	G	I	V	I	G	G	W	A	S	S	L	A	G	M	G	H															
Sakacin A	A	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	N	K	K	C	W	V	N	R	G	E	A	T	Q	S	I	I	G	G	M	I	S	Q	W	A	S	G	L	A	G	M																	
Carnobacteriocin B2	V	N	Y	G	N	G	V	S	C	S	K	T	K	C	S	V	N	W	G	Q	A	F	Q	E	R	Y	T	A	G	I	N	S	F	V	S	G	V	A	S	Q	A	G	S	I	G	R	P											
Bacteriocin 31	A	T	Y	Y	G	N	G	L	Y	C	N	K	Q	K	C	W	V	D	W	N	K	A	S	R	E	I	G	K	I	I	V	N	G	W	V	Q	H	G	P	W	A	P	R															
Acidocin A	K	T	Y	Y	G	T	N	G	V	H	C	T	K	R	S	L	W	G	K	V	R	L	K	N	V	I	P	G	T	L	C	R	K	Q	S	L	P	I	K	Q	D	L	K	I	L	L	G	W	A	T	G	A	F	G	K	T	F	H

图 1 Ⅱa类细菌素的氨基酸序列

Ⅱa类细菌素的一个重要特征是 N-端保守区中至少含有 2 个半胱氨酸,并形成了 1 个二硫键,二硫键的存在使得Ⅱa类细菌素的 N-端具有 1 种两亲性结构,并且二硫键对Ⅱa类细菌素抑制李斯特菌的活性是必须的^[5]。另外,pediocin PA-1/AcH, enterocin A 和 divercin V41 还形成另 1 个二硫键(由另两个半胱氨酸形成)^[6]。Ⅱa类细菌素的 C-端只有 34% ~ 80.5% 的序列相似性,C-端是 1 个 α 螺旋的两亲性结构,这个螺旋结构在敏感菌细胞膜形成孔洞时可作为跨膜组分起作用。

1.2 Ⅱa类细菌素的产生菌株

大部分Ⅱa类细菌素是由乳杆菌属、肠球菌属、片球菌属、明串珠菌属、肉食杆菌属等的乳酸菌产生。所有的Ⅱa类细菌素都是由与食品相关的乳酸菌菌株产生,这些菌株分离自不同来源的食品中,主要是肉和乳制品,也有蔬菜制品^[8,9]。

中国农业大学食品学院益生菌研究室从云南宣威火腿、内蒙古传统奶酪、广西巴马长寿老人肠道中分离到了多株产细菌素的乳酸菌,其中的戊糖乳杆菌素 31-1、植物乳杆菌素 L-1、肠球菌素 M-2 纯

化后经抑菌谱检测,发现对多种乳酸菌、李斯特氏菌、芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及部分大肠杆菌具有抑制作用,并就其对单核细胞李斯特氏菌的作用机理进行了研究^[10]。目前正对其结构及分子生物学性质进行深入研究,初步认为其属于Ⅱa类细菌素。将该细菌素产生菌株作为发酵剂应用于发酵香肠和干酪的生产亦获得了良好的效果,可以加速发酵进程,提高并改善发酵产品的安全性及品质特性。

2 细菌素的合成及分泌

2.1 生物合成的基因结构

通常细菌素的产生都与质粒相关,但某些Ⅱa细菌素的编码基因却位于染色体片段上。编码Ⅱa细菌素及其细菌素周边结构的基因,包括细菌素产生和跨膜定位、产生菌的免疫性方面的基因,以及细菌素生物合成的调控基因,形成了 1~3 个操纵子结构^[11]。大部分Ⅱa细菌素的操纵子至少控制 2 个编码与 ABC-转运体及其辅助蛋白同源的蛋白基因,这些蛋白对细菌素的膜外定位是必须的^[12]。

2.2 生物合成途径

II a 类细菌素的合成过程跟其他细菌素相似,首先是由核糖体合成没有生物活性的前体肽,前体肽的 N-端是引导序列,前体肽在某一特定位置分裂去掉引导序列形成有生物活性的分子并将细菌素分泌到胞外。

起初认为 II a 类细菌素的双甘氨酸引导序列中由于含有特殊氨基酸残基从而使其带有正电荷和具有疏水性,但后来发现这些特征一直存在于相应的位置上。在亲水构型上 II a 类细菌素引导序列的排列有明显的相似性,疏水性残基通常出现在 -4, -7, -12, -15 位,亲水性残基出现在 -5, -6, -11 位。这些双甘氨酸引导序列的相似性说明其相应的 ABC-转运体及其相关蛋白都是相似的,这就使得 II a 类细菌素利用其它细菌素的分泌机制进行异源表达成为可能^[4]。

然而也有 II a 类细菌素使用着另一种转运系统,如 enterocin P 的合成就没有双甘氨酸引导序列,它是典型的信号肽依赖型,由 GSP 系统加工和运输^[11]。很多研究都表明,II a 类细菌素可由两种不同的加工分泌机制合成。

2.3 生物合成调控系统

II a 类细菌素的调控系统包括 IF、HPK 和 RR,它们是诱导目标基因进行翻译的信号。这个三组分系统可调控大部分 II a 类细菌素的产生,近来发现 *Carnobacterium divergens* V41 产生的 divercin V41 是由一个双组分的信号转导系统指导合成的,而 carnobacteriocins 的产生却可由这两个系统共同指导。有的报道认为,随着细胞的生长,IF 浓度积累,诱发三组分系统开始运转,在这种机制中 IF 可能起到了细胞浓度的信号作用。但也有报道认为是 II a 类细菌素的信号诱导系统诱导了对环境信号的反应,如乳酸菌可根据环境条件提高或降低细菌素的产生,这很可能与细菌素的调控系统有关系。另外,环境因素还可以影响 IF 对 HPK 的结合,或影响对 RR 发挥活性所必需的磷酸化作用的平衡^[13]。

2.4 加工及分泌过程

II a 类细菌素的跨膜运输是由 ABC-转运体和 1 个辅助蛋白进行的,这两个膜结合蛋白形成了运输系统,编码这些蛋白的基因缺失突变会导致细菌素不能产生。II a 类细菌素的 ABC-转运体蛋白有着高度的同源性,C-端有 1 个高度保守的 ATP 结合

区,N-端是 1 个疏水的膜结合区域,有 1 个长约 150 个氨基酸的延伸序列。这个结构域可在引导序列的去除中发挥作用,在前体肽的分裂中作为识别信号,且在成熟分子的跨膜运输中也作为识别信号,两者是一个同时发生的整体过程。细菌素分泌时,ABC-转运体的水解结构域结合在前体肽的引导序列上,引发 ATP 水解,转运体构象变化,使得引导序列分离,同时成熟分子跨细胞质膜运输出去^[12,13]。

对利用异源分泌机制进行 II a 类细菌素的表达近来也进行了深入的研究。大量研究表明,双甘氨酸引导序列之间的相似性,以及 II a 类细菌素相应的运输蛋白之间的相似性,使得利用某一细菌素运输系统产生细菌素,或利用一种细菌素转运系统产生多种细菌素成为可能^[14]。另外,以信号肽代替双甘氨酸引导序列,也使得本来由其他运输系统产生的 II a 类细菌素可由 GSP 系统产生。II a 类细菌素的异源表达需使用其他 II a 类细菌素的分泌系统,例如,使用 ABC-转运体和 leucocin A 的相关蛋白可使 lactococcin A 在 *Leuconostoc gelidum* UAL187 中得到部分表达。另一方面,II a 类细菌素分泌系统也具有相当大的灵活性,他们可以通过 GSP 系统进行表达。如 carnobacteriocin B2 在没有特异性分泌基因的情况下,可由乳球菌宿主提供基因信息进行加工和运输,其中包括 divergicin A 的分泌所必需的引导序列,而 divergicin A 却是通过 GSP 系统进行表达。反之,II a 类细菌素的分泌机制和引导序列也可以被使用 GSP 系统的细菌素利用进行分泌表达^[15]。

2.5 产生菌的免疫性

很多 II a 类细菌素产生菌可产生 88 ~ 114 个氨基酸的免疫蛋白,除了对菌体本身产生的细菌素具有完全免疫性之外,这个免疫蛋白对其它 II a 类细菌素也有部分的抵抗作用。有试验证明,在 II a 类细菌素之间存在“交叉免疫性”,即产生菌中存在的免疫基因不一定与编码同源细菌素的基因之间有必然联系^[9]。II a 类细菌素产生菌通常控制着一个或多个 II a 细菌素的免疫基因,这些基因具有一定的同源性,且在不同情况下有不同程度的表达。

Eijsink 等人对 12 个 II a 类细菌素免疫蛋白的对比研究发现,相似的细菌素,其免疫蛋白的同源性很低,反之相似性高的免疫蛋白其相应细菌素之间的相似性却不一定高,这说明这些相似的细菌素

之间可能存在某种通用的靶物或“受体”^[11]。尽管Ⅱa类细菌素的免疫蛋白之间的相似性很低,但这些蛋白也有一些共同的特征,即它们大都是阳离子的亲水性分子。很多实验表明Ⅱa类细菌素的免疫蛋白很可能是自由跨膜穿梭的分子,通过形成膜结合蛋白来保护细菌素在膜位点的作用,而非直接作用^[16]。然而,关于Ⅱa细菌素的免疫机理仍无定论。

3 Ⅱa类细菌素的作用机理

3.1 杀菌作用

像其它乳酸菌细菌素一样,Ⅱa类细菌素主要通过渗透到敏感细胞的细胞膜内而起到杀死细胞的作用,使细胞形成孔洞,离子失去平衡,磷酸盐渗漏。这些干扰的结果是PMF质子驱动力包括膜电位 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 梯度部分或全部丧失,不像其他羊毛硫细菌素一样使 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 全部丧失,Ⅱa类细菌素可能会使 ΔpH 全部丧失,但 $\Delta\psi$ 只是部分丧失,只有mundticin可使得 $\Delta\psi$ 全部丧失。Ⅱa类细菌素作用细胞后,胞内ATP以98.9%的速度消耗,同时氨基酸的吸收(作为活性运输的介质)也发生了堵塞或泄漏^[17]。

不像羊毛硫细菌素一样,Ⅱa类细菌素不会引起ATP的泄漏,这或许由于Ⅱa类细菌素形成的孔洞没有羊毛硫细菌素形成的孔洞大。Chen观察了pediocin PA-1引起的胞内ATP消耗和ATP加速累积,对比ATP消耗和无机磷酸盐的流出速度后,认为很可能由于细胞为了使PMF再生而引起ATP耗尽,而不是ATP为了平衡无机磷酸盐而水解^[18]。

3.2 细菌素与膜相互作用模型

据推测,Ⅱa类细菌素的两亲性结构使其可形成跨膜螺旋,在与膜结合时形成了“桶板”模型。Ⅱa类细菌素作用于敏感菌细胞膜的最初步骤是带正电荷、具疏水性的细菌素N-端与膜的阴离子磷脂头部极性残基结合,通常发生在膜的阴离子磷脂头部,接着C-端的疏水/两亲性结构域和膜脂酰基链之间发生疏水相互作用,然后整个分子插入膜中,形成水溶性孔洞。这个疏水结构也许是Ⅱa类细菌素的细胞特异性识别区域,这与结构域和膜表面之间静电作用的非特异性形成了对比^[19]。

3.3 影响细菌素活性的因素

Ⅱa类细菌素使细胞死亡是以浓度和时间累积型方式发生的,而且这个过程可被靶细胞或培养基

所影响。靶细胞膜的脂肪含量可影响pediocin PA-1的活性,随着脂质泡囊的阴离子脂肪含量的增加,细菌素对它们的亲和力也增加。Ⅱa类细菌素对目标细胞膜的亲和力也受pH值影响,如果将pH从7.5降低至6.0,pediocin PA-1的膜结合力和渗透能力也相应增加了^[20]。另外,bavaricin MN在pH6.0下最易形成孔洞,而在其它pH下形成孔洞的有效性会降低。由于Ⅱa类细菌素带有正电荷,可吸附在带负电荷的膜磷脂头部,因此,改变培养基的pH值或改变膜的脂肪组成都可以明显地影响肽链与脂肪间的静电结合^[21]。

3.4 抑菌谱

Ⅱa类细菌素对乳杆菌、明串珠菌、片球菌、乳球菌、肉食杆菌、肠球菌、微球菌、葡萄球菌、链球菌、梭状杆菌、芽孢杆菌、环丝菌(*Brochothrix*)等种属中的细菌表现敏感。另外,一些Ⅱa类细菌素还可抑制梭状杆菌的芽孢出芽和营养体的生长。虽然Ⅱa类细菌素的N-端有大量的序列相似性及相近的同源性,但在抑菌谱上它们有很多差异,Ⅱa类细菌素在抑菌谱上唯一明显的共同特征是对李斯特氏菌有强烈的抑制活性。据推测,这可能是由于此菌属中含有的同源性脂肪成分决定的。但值得一提的是,Ⅱa类细菌素从整体上来说与其它类的细菌素如nisin相比抑菌谱较窄^[4]。

4 展望

Ⅱa类细菌素在乳酸菌中数量很多,它们可以有效地控制不良微生物的生长,具有很大的作为食品防腐剂使用的潜力。许多研究已发现,Ⅱa类细菌素在提高食品的安全性和延长食品的货架期上有潜在的应用前景^[4,6]。其中Pediocin PA-1即是一个典型代表,这类细菌素可应用于肉制品、奶酪、沙拉中,目前为止已获得多个美国和欧洲专利。

出于消费者对很少经过加工的、安全的、长货架期的方便食品的需要,这类安全天然的蛋白类防腐剂很明显具有很大的应用空间。未来如果有更多的细菌素被批准用于食品添加剂,那么Ⅱa类细菌素将由于其广谱高效的抑菌效果而排在首位。为了能利用细菌素很好地提高商品质量,实现工业化生产,应采用高新技术大力进行多方面的研究,促使形成具有多控制能力的防腐系统。未来对Ⅱa类细菌素的研究应围绕以下方面进行:

4.1 异源、超量、多源表达

限制发酵食品中细菌素的有效性有多种因素,如产量低、调控系统、基因不稳定性、失活、敏感细胞抗性的出现等。在近来的研究中,细菌素在不同乳酸菌菌株中的异源表达为克服这些障碍提供了很好的工具。尤其是Ⅱa类细菌素基因在新宿主中的克隆和表达克服了细菌素调控系统的制约,使得细菌素可连续产生或超量表达。而且可基于不同的食品级乳酸菌菌株在不同食品中的特性来选择作为细菌素产生的宿主,从而可构建出适用于不同类型食品的细菌素产生菌株,这也有助于解决细菌素产量的问题。另外,细菌素的异源表达可使乳酸菌产生多种细菌素,其中每一种都有其特定的抑菌作用范围,这可以提高乳酸菌在食品中的抑菌效率。事实上,这将构建出对很多不良微生物都有抑制活性的细菌素产生菌,同时也可减少在敏感细菌细胞中细菌素抗性的发生。因此,异源表达为将来细菌素作为防腐剂在食品工业应用提供了新的可能性及发展发向。

4.2 细菌素基因工程

通过基因或化学的修饰可以提高细菌素的抑菌活性和稳定性。通常对Ⅱa类细菌素的多肽序列进行修饰如单残基替换后会失去抑菌活性,然而近来 Miller 等人的研究表明 pediocin PA-1 的 Lys-11 被 Glu 替换后抑菌活性显著增强,这可能意味着将来的细菌素基因工程有了新的发展方向^[22]。

4.3 多控制抑菌

食品保藏既可由一系列具有独立抑菌作用的Ⅱa类细菌素起作用,也可以将细菌素复合使用来提高对目的微生物全面而有效的控制。Ⅱa类细菌素尤其适合用于多控制食品防腐系统,通过多种细菌素相互作用产生的叠加协同效应,可更好地抑制不良菌群的活性^[23,24]。

虽然Ⅱa类细菌素都具有抑制李斯特氏菌的活性,但在抑菌谱上仍有很大的差异,不同类细菌素的联合使用可以有效地抑制多种腐败细菌。目前为止,细菌素尤其是Ⅱa类细菌素已经成为多控制防腐系统的一部分,成为控制食品腐败菌和病原菌最有效的方法。

参考文献

- [1] Bradley W, Lash T, Tami H, Mysliwiec, Hassan Gourama. *Food Microbiology* 2005 **22**:199~204.
- [2] Ohmomo S, Murata S, Katayama N, *et al.* *J Appl Microbiol* 2000 **88**: 81~89.
- [3] Klaenhammer T R. *FEMS Microbiol Rev* ,1993 **12**: 39~86.
- [4] Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, *et al.* *FEMS Microbiology Reviews* 2000 **24**: 85~106.
- [5] Drider D, Fimland G, Hechard Y, *et al.* *Microbiology and molecular biology reviews* 2006 **70**(2): 564~582.
- [6] Juan M Rodriguez, Maria I Martinez, Jan Kok. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2002 **42**(2): 91~121.
- [7] Bhugalo-Vial P, Dousset X, Metivier A, *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1996 **62**: 4410~4416.
- [8] Tahiri I, Desbiens M, Benech R. *International Journal of Food Microbiology* 2004 **97**: 123~136.
- [9] Sahar F Deraz, Eva Nordberg Karlsson, Martin Hedstrom, *et al.* *Journal of biotechnology* 2005 **117**: 343~354.
- [10] 周伟, 刘国荣, 李平兰, 等. *微生物学报* ,2007 **47**(2): 260~264.
- [11] Eijsink V G H, Skeie M, Middelhoven P H, *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64**: 3275~3281.
- [12] Nes I F, Diep D B, Havarstein L S, *et al.* *Antonie Van Leeuwenhoek. Int J Gen Mol Microbiol* ,1996 **70**: 113~128.
- [13] Nilsen T, Nes I F, Holo H. *J Bacteriol* ,1998 **180**: 1848~1854.
- [14] Horn N, Martinez M I, Martinez J M, *et al.* *Appl Environ Microbiol* , 1998 **64**: 818~823.
- [15] McCormick J K, Worobo R W, Stiles M E. *Appl Environ Microbiol* , 1996 **62**: 4095~4099.
- [16] Abdel-Dayem M, Fleury Y, Devilliers G, *et al.* *FEMS Microbiol Lett* , 1996 **138**: 251~259.
- [17] Tjakko Abee, Lothar Krockel, Colin Hill. *International Journal of Food Microbiology* ,1995 **28**: 169~185.
- [18] Chen Y, Shapira R, Eisenstein M, *et al.* *Appl Environ Microbiol* , 1997 **63**: 524~531.
- [19] Fimland G, Johnsen L, Axelsson L, *et al.* *J Bacteriol* , 2000 **182**: 2643~2648.
- [20] Chen Y, Ludescher R D, Montville T J. *Appl Environ Microbiol* . 1998 **64**: 3530~3532.
- [21] Hilario C Mantovani, James B Russell. *International Journal of Food Microbiology* . 2003 **89**: 77~83.
- [22] Miller K W, Schamber R, Osmanagaoglu O, *et al.* *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64**: 1997~2005.
- [23] O'Sullivan L, Ross R P, Hill C. *Biochimie* 2002 **84**: 593~604.
- [24] Dykes G A, Moorhead S M. *International Journal of Food Microbiology* , 2002 **73**: 71~81.