

IIa 类乳酸菌细菌素的异源表达研究进展

刘国荣^{1,3}, 孙 勇², 李平兰^{3,*}

(1.北京工商大学食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 食品风味化学北京重点实验室, 北京 100048;

2.北京市食品研究所, 北京 100162; 3.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: IIa 类乳酸菌细菌素由于其对单核细胞增生李斯特菌的强烈抑菌活性, 已成为天然食品防腐剂研究与开发的热点。但是受生物合成调控系统控制, 天然细菌素的产量往往很低而且提取过程较为复杂, 很难满足相关研究和实际应用的需求。为此, 许多研究者进行过 IIa 类细菌素的异源表达研究, 本文对该类细菌素在大肠杆菌、乳酸菌以及酵母菌中的异源表达研究作较为全面系统的综述, 并指出目前存在的主要问题及今后的研究方向。

关键词: IIa 类乳酸菌细菌素; 单核细胞增生李斯特菌; 异源表达

Research Advances in Heterologous Expression of Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria

LIU Guo-rong^{1,3}, SUN Yong², LI Ping-lan^{3,*}

(1. Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Food Research Institute,

Beijing 100162, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering,

China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria, which have a strong antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, have become a hot topic in the research and development of natural preservatives. However, the bacteriocins are always produced at very low levels under the control of the biosynthesis regulatory system and their extraction is very complex, which makes it very difficult to meet the demands for relevant studies and practical applications. For this reason, the heterogenous expression of class IIa bacteriocins has been widely studied in recent years. This paper summarizes a comprehensive systematic review of recent studies on the heterogenous expression of the bacteriocins in *E. coli*, lactic acid bacteria and yeast and points out the current main problems and future research directions.

Key words: class IIa bacteriocins; *Listeria monocytogenes*; heterologous expression

中图分类号: Q939.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)05-0323-05

乳酸菌及其活性代谢产物与人类的健康密切相关, 常常被有意识地引进食品产品或自然地发生在食品中, 从而使食品拥有人们渴望的风味、结构、营养及安全性。乳酸菌细菌素是乳酸菌在代谢过程中合成并分泌到环境中的一类具有抑菌活性的多肽或蛋白类物质, 它在人体内可被降解, 具有无毒、无残留, 高效、耐酸、耐高温、无抗药性等特点, 目前已成为天然防腐剂研究与开发的热点^[1-2]。

IIa 类乳酸菌细菌素, 是指一类具有共同 N 端 YGNGVXaaC 序列的抗李斯特菌的小肽, 它们是乳酸菌细菌素中数量最多且研究最为深入的一群, 主要包括片

球菌素(pediocin)、肠球菌素(enterocin)等小分子细菌素。这类细菌素不仅可以强烈抑制食源性病原菌单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的生长, 而且对某些腐败乳酸菌、索丝菌(*Brochothrix* spp.)、梭状杆菌(*Clostridium* spp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)等都表现有明显抑制作用, 具有很好的控制食品腐败菌及病原菌的潜在应用价值。此外, 与其他细菌素相比, IIa 类细菌素的抑菌活性较强且具有良好的物理化学性质, 是目前公认的最有希望应用于多种工业用途的细菌素^[3-4]。

目前, IIa 类乳酸菌细菌素的获得主要是通过天

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 北京工商大学青年教师科研启动基金项目(QNJJ2011-042); 国家自然科学基金项目(31071591)

作者简介: 刘国荣(1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品微生物学。E-mail: liuguorong@th.btbu.edu.cn

* 通信作者: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳酸菌及其活性代谢产物的理论与应用。E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

然生物合成,但是由于其受调控系统的影响,产量往往比较低,而且从机体中提取步骤复杂、得率低,不足以进行抑菌作用机制、构效关系及开发应用研究。另有少量研究报道可以采用化学方法合成细菌素,它是依据细菌素的天然氨基酸序列和活性结构特点,通过固相法合成的细菌素或类似物,但是价格比较昂贵,也很难满足细菌素相关研究和实际应用的需求。随着IIa类细菌素遗传学特征的深入研究及基因工程技术的广泛应用,很多学者发现通过异源分泌表达生产细菌素可克服这些不足。已有研究显示,不同来源的不同属、种的乳酸菌可以产生相似的IIa类细菌素,这说明编码IIa类细菌素的基因在不同菌株之间是可以转移的^[5-7]。

许多实践证明,通过异源表达生产IIa类乳酸菌细菌素可以:1)提高细菌素的产量,以便进行细菌素的作用模式、结构与功能及应用性研究;2)减少在目标细胞中细菌素抗性的发生,提高其在食品中的抗菌效率;3)在更安全的宿主中生产细菌素;4)构建出对多种不良微生物都有抑菌活性的细菌素产生菌;5)构建出对食品环境有更好适应性的重组宿主;6)为乳酸菌提供更好的抗菌特性,使其在作为食品发酵剂、益生菌制剂、饲料添加剂等时能更好的发挥作用^[8]。IIa类乳酸菌细菌素的异源表达研究,不仅可为全面解析IIa类乳酸菌细菌素的异源分泌机制提供直接证据,也可对IIa类乳酸菌细菌素的工业化生产和应用提供有效途径,并进一步推动我国食品天然生物防腐剂的快速发展。

近年来,有许多研究学者进行了乳酸菌细菌素异源表达研究,取得了大量的重要成果。本文重点综述了IIa类乳酸菌细菌素在大肠杆菌、乳酸菌以及酵母菌中的异源表达研究。

1 IIa类乳酸菌细菌素的异源表达概况

乳酸菌细菌素异源表达或基因工程技术的研究从20世纪90年代开始,在国外逐渐成为热点,尤其在欧洲诸国研究居多,国内近五年开始出现报道。通过文献检索发现,已有近20种乳酸菌细菌素在10多种宿主菌中表达,使用的表达宿主包括大肠杆菌、乳酸菌、酵母菌等,其中表达的IIa类乳酸菌细菌素主要有Pediocin PA-1、Enterocin A、Enterocin P、Carnobacteriocin B2、Divercin V41、Piscicolin 126、Mesentericin Y105、Plantaricin 423、Hiracin JM79等,见表1。

表1 已报道IIa类乳酸菌类细菌素异源表达
Table 1 Previous studies on the heterogenous expression of class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria

IIa类细菌素	产生菌	异源表达宿主菌	分泌方式	参考文献
Carnobacteriocin B2	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>E. coli</i>	胞内	[9]
		<i>C. piscicola</i>	胞外	[10]
		<i>C. divergens</i>	胞外	[10]
Divercin V41	<i>C. divergens</i>	<i>E. coli</i>	胞内	[11]
			胞外	[12]
Enterocin A	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	胞内	[13]
			胞内	[6]
Enterocin P	<i>E. faecium</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	胞内	[5]
			胞内	[14]
			胞外	[15]
			胞外	[16]
Hiracin JM79	<i>E. hirae</i>	<i>Methylobacterium extorquens</i>	胞外	[17]
		<i>L. lactis</i>	胞外	[18]
		<i>Pichia pastoris</i>	胞外	[18]
Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>E. coli</i>	胞内	[19]
			胞内	[20]
			胞内	[12]
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	胞外	[21]
		<i>P. pastoris</i>	胞外	[22]
Piscicolin 126	<i>C. piscicola</i>	<i>L. lactis</i>	胞外	[23]
		<i>L. mesenteroides</i>	胞外	[24]
Plantaricin 423	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>E. coli</i>	胞内	[25]
Mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>S. cerevisiae</i>	胞外	[26]
			胞内	[27]

2 大肠杆菌异源表达系统

大肠杆菌是细菌素异源表达研究中使用最多的宿主,这首先是因为大多数乳酸菌细菌素对大肠杆菌并不表现抑制活性,所以不必担心细菌素对宿主菌的细胞毒性作用。其次是因为大肠杆菌表达系统是目下最完善的异源表达体系,它的主要优点包括:人们对其遗传背景、分子生物学特点、生物化学特性等方面有较深入的认识,易于人为改造;很多目的基因在大肠杆菌中都能迅速而有效地表达出目的蛋白,通常能获得目的蛋白占总蛋白30%~40%的工程菌株;大肠杆菌的培养条件简单,表达条件易于控制,生产成本低廉;很多成熟的表达载体及宿主菌组合可供选择,研究者可根据需要选择最适组合。目前大肠杆菌表达系统已被广泛用于各种工具酶的生产、抗原及疫苗的制备、细胞因子的生产、结构生物学的研究等方面^[28]。

对 IIa 类细菌素而言, 由于大肠杆菌不能编码前导肽切除酶, 不能对 IIa 类细菌素前体的前导肽进行切除, 因此, 通常采用的表达策略是直接成熟 IIa 类细菌素基因编码序列克隆到大肠杆菌表达系统中, 利用大肠杆菌自身的分泌机制进行分泌表达。产物多数不能成功分泌到胞外, 大部分以胞内融合蛋白形式表达, 而且产物产量和活性差异较大且其分离纯化过程涉及细胞裂解、酶解等, 过程繁琐, 成本较高^[8]。另外, 大肠杆菌高效表达系统还容易形成包涵体, 致使重组蛋白的提取、纯化及复性过程更加困难。此外, 由于大肠杆菌菌株本身不具有食品应用特性, 因此仅表达产物可用于食品工业, 有一定的局限性。

近年来, 已有许多 IIa 类细菌素在大肠杆菌中的异源表达研究报道。早在 1998 年, Miller 等^[29]就利用 PMAL-p2x 载体在大肠杆菌中分泌表达了麦芽糖结合蛋白 (MBP)-pediocin AcH, 并发现该融合蛋白具有与天然 Pediocin AcH 相似的生物学活性。这个实验首次证明了可以利用大肠杆菌的标准信号肽依赖机制进行 IIa 类细菌素的功能性分泌表达。随后, 其他一些 IIa 类细菌素利用大肠杆菌异源表达生产的研究也陆续被报道, 如 Moon 等^[19]将 Pendiocin PA-1 成熟肽基因与带有 His-tag 的仓鼠二氢叶酸还原酶基因序列融合, 在大肠杆菌细胞质内成功表达了 His-tag- 仓鼠二氢叶酸还原酶 -pendiocin PA-1, 并发现在利用 Xa 因子蛋白酶切除融合标签后, 重组 Pendiocin PA-1 具有与天然细菌素相似的活性, 但是产量仅有 0.06mg/L。如 Richard 等^[11]依据大肠杆菌密码子嗜好性, 设计合成 Divercin V41 成熟肽基因, 与表达载体 pET-32b 中的含有硫氧还原蛋白基因的核苷酸序列融合, 在大肠杆菌细胞质内成功表达了可溶性的硫氧还原蛋白 -His-tag-divercin V41, 该重组蛋白切除融合标签后具有较高的抗李斯特菌活性, 纯化后产量可达 23mg/L。又如 Gibbs 等^[25]将细菌素 Piscicolin 126 基因片段克隆到表达载体 pET-32a 上, 并配合使用能够在细胞质内形成二硫键的宿主菌, 融合表达了硫氧还原蛋白 -piscicolin 126, 切除融合标签后的重组 Piscicolin 126 具有生物活性, 且产量高达 26mg/L。通过这些成功的例子可以看出, 采用以上表达系统可以获得大量可溶性的融合目的蛋白, 但是存在的共同问题就是目的蛋白只有在切除融合标签后才显示与天然细菌素相似的抑菌活性, 不利于细菌素的工业化生产和应用。

本课题组前期研究建立了 IIa 类细菌素 Enterocin P 在大肠杆菌中的高效异源表达系统, 所得重组细菌素产量高达 32mg/L^[5,30]。该系统所采用的表达载体为 pET-22b(+), 它的 N 端含有 pelB 信号肽序列, 为分泌型表达载体, 它可以增加重组蛋白的溶解性、引导其穿过细胞质膜, 进入细胞周质内。而由于细胞周质的氧化环境更有利于

蛋白折叠和二硫键的形成, 所以有利于获得可溶的活性蛋白^[31]。此外, 该载体 C 端含有 6 × His 标签序列, 该融合标签的存在有利于在天然条件下用金属亲和层析纯化融合蛋白并阻止大肠杆菌细胞内蛋白酶对细菌素的降解, 同时重组蛋白分子上仅融合了 6 个组氨酸短肽, 可使重组细菌素在结构和特性上都更加接近天然 Enterocin P。

3 乳酸菌异源表达系统

已有许多研究发现, 产生细菌素的发酵剂在发酵过程中可以防止或抑制不良菌的污染, 因而将产细菌素的乳酸菌加入到食品中比直接加细菌素更简便、安全。但是并不是所有的工业乳酸菌都可产生细菌素, 产生细菌素的菌株也并不一定适应细菌素发挥作用的环境, 因此可以将细菌素基因导入不产生细菌素的发酵剂菌株中而使其获得细菌素产生的能力, 既可以发酵食品, 又可以抑制食品中的腐败菌和病原菌。而且不同的食品级乳酸菌菌株可基于它们在特定食品中的特性被选择在不同食品中作为细菌素宿主, 从而可构建出适应于不同类型食品的细菌素产生菌株。

与大肠杆菌表达系统相比较, 乳酸菌表达系统获得相对困难, 但是乳酸菌本身安全且能够将目的蛋白分泌到胞外, 可放心应用于食品工业化生产^[8]。截止目前, 以乳酸菌为宿主异源表达细菌素的研究报道非常少, 存在的主要问题是细菌素异源分泌表达水平太低, 如 Sanchez 等^[18]利用乳酸乳球菌表达细菌素 Hiracin JM79, 获得了胞外活性重组细菌素, 但是抑菌活性明显低于原宿主菌株。

此外, 还有许多学者致力于构建完全食品级异源表达系统来生产 IIa 类乳酸菌细菌素。这是考虑到传统的乳酸菌表达载体大多以红霉素或氯霉素等抗生素抗性基因作为筛选标记, 虽然这可以为遗传操作保持一定的选择压力并有效选择转化子, 但是将抗生素抗性基因投放到环境中或人和动物体内, 由于存在抗性因子转移的隐患, 可能带来生物安全性的严重后果, 所以从食品安全角度考虑, 含抗生素抗性基因标记的微生物不能应用于食品生产中^[32]。而为了防止使用抗生素抗性标记所引起的危害, 最有效的办法是选用对人体安全的食品级筛选标记替代抗生素抗性标记以构建食品级受体及载体系统。

本课题组前期也研究了 IIa 类细菌素 Enterocin P 在食品级乳酸菌中的异源表达与分泌, 所使用的是食品级表达载体 pLEB590, 该载体完全以乳酸乳球菌 DNA 构建的, 它包含 pSH 71 复制子, 组成型启动子 P₄₅, 并以 Nisin 免疫基因 *nisI* 为标记基因^[16]。对 Nisin 敏感的宿主菌因电转化导入 pLEB590 而对 Nisin 产生免疫性, 这为它的应用带来了极大的方便。此外, 提供选择压力

的物质 Nisin 是公认安全的天然食品防腐剂, 且 *nisI* 基因来源于乳酸菌自身, 这使得将 *nisI* 基因作为乳酸菌食品级筛选标记更有优势。该研究结果不但拓展了乳酸乳球菌食品级表达载体的应用范围, 而且为开发产 IIa 类细菌素的工业化发酵剂、益生菌制剂等奠定了坚实基础。目前, 课题组在验证了 pLEB590 能够表达 IIa 类细菌素基因的基础上, 开始对载体 pLEB590 进行改进, 将组成型启动子 P_{45} 换成诱导型启动子, 如 *PnisA-MCS-TpepN*。即构建以 *nisI* 作为食品级选择标记的 NICE 高效诱导表达系统。

4 酵母菌异源表达系统

酵母菌是一种单细胞低等真核生物, 培养条件普通, 生长繁殖速度迅速, 能够耐受较高的流体静压, 用于表达基因工程产品时, 可以大规模生产, 有效降低了生产成本。而且某些酵母表达系统具有外分泌信号序列, 能够将所表达的外源蛋白质分泌到细胞外, 因此很容易纯化。

以酵母菌为宿主异源表达细菌素的报道相对较少, 其表达宿主菌主要有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。目前, 存在的主要问题是宿主特异性使得产物常常出现无活性或活性很低的现象, 如 Sanchez 等^[18]利用毕赤酵母表达细菌素 HirJM79, 结果发现, 培养基对其抑菌活性影响较大, 重组细菌素的产量明显高于野生菌株, 但是活性却远不及野生菌; van Reenen 等^[26]利用酿酒酵母表达 Plantaricin 423, 其工程菌表现出了抑菌活性, 但培养上清液中却未检测出抑菌能力。Beaulieu 等^[22]利用毕赤酵母表达片球菌素 Pediocin PA-1, 虽然获得了胞外的重组片球菌素, 但却未检测出生物抑菌活性。以上均表明构建高产且高活性细菌素的酵母工程菌是可行的, 但仍需探索更为优良的表达体系。

5 结 语

纵观 IIa 类细菌素异源表达研究现状可以看出, 构建高产且高活性细菌素的基因工程菌是可行性的, 但存在以下主要问题: 细菌素的异源分泌水平太低; 某些异源表达系统仅适合特定菌株及细菌素。除解决以上问题外, 未来还可以进行以下几个方面的探索研究。

5.1 在用于食品发酵的乳酸菌中表达外源 IIa 类细菌素基因

并不是所有的工业乳酸菌都可产生细菌素, 产生细菌素的菌株也并不一定适应细菌素发挥作用的环境, 因此可以将细菌素基因导入不产生细菌素的发酵剂菌株中而使其获得细菌素产生的能力, 既可以发酵食品, 又

可以抑制食品中的腐败菌和病原菌, 甚至可以根据不同食品级乳酸菌菌株在特定食品中的特性而选择不同食品级乳酸菌作为细菌素异源表达宿主, 进而构建出适应于不同类型食品的细菌素产生菌。

5.2 建立 IIa 类乳酸菌细菌素在芽孢杆菌中的异源表达系统

由于芽孢杆菌表达载体转化效率低、表达产物量少以及产物活性受环境影响大等因素, 使得有效芽孢杆菌分泌表达系统的构建和获得非常困难, 目前有关细菌素在芽孢杆菌中的异源表达还未见研究报道。但是芽孢杆菌具有良好的分泌特性, 其发酵工艺和产物回收技术也较为成熟, 用作细菌素的分泌型宿主菌, 具有很大的潜力。

5.3 将无细胞蛋白质合成系统应用于 IIa 类细菌素的重组表达

近几年, 无细胞蛋白质合成系统迅速发展, 该系统能使外源基因在体外快速表达, 避免了细胞体系中宿主菌的复杂调控和新陈代谢带来的干扰, 以及基因工程菌表达抗菌肽时对宿主的毒性作用, 可以成为 IIa 类细菌素重组表达的一种有效手段。然而, 到目前为止, 国内外只有谢燕^[33]利用大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统实现了 IIa 类细菌素 NB-C1 融合蛋白的可溶性表达。这说明有关 IIa 类细菌素在无细胞蛋白质合成系统中的重组表达研究上还存在很大的探索和发展空间。

参考文献:

- [1] CLEVELAND J, MONTVILLE T J, NES I F, et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 71: 1-20.
- [2] DEEGAN L H, COTTER P D, HILL C, et al. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1058-1071.
- [3] ENNAHAR S, SASHIHARA T, SONOMOTO K, et al. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24: 85-106.
- [4] 郭兴华. 益生乳酸细菌: 分子生物学及生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 219-385.
- [5] 刘国荣. 一种 IIa 肠球菌素的分离纯化、异源高效分泌表达及应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [6] 余占桥, 杨芳, 张日俊. 细菌素异源表达的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 51-55.
- [7] 赵爱珍. Enterocin A 结构基因的克隆、功能性表达及构效关系研究[D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [8] RODRIGUEZ J M, MARTINEZ M I, HORN N. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80: 101-116.
- [9] QUADRI L E N, YAN L Z, STILES M E, et al. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2: overproduction of the anti-inicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(6): 3384-3388.

- [10] McCORMICK J K, WOROBO R W, STILES M E. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4095-4099.
- [11] RICHARD C, DRIDER D, ELMORJANI K, et al. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(13): 4276-4284.
- [12] INGHAM A B, SPROAT K W, TIZARD M I V, et al. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli* EJ3[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98: 676-683.
- [13] KLOCKE M, MUNDT K, IDLER F, et al. Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 87(4): 532-538.
- [14] GUTIERREZ J, CRIADO R, CITTI R, et al. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 239-250.
- [15] GUTIERREZ J, LARSEN R, CINTAS L M, et al. High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72: 41-51.
- [16] LIU Guorong, WANG Haifeng, GRIFFITHS M W, et al. Heterologous extracellular production of enterocin P in *Lactococcus lactis* by a food-grade expression system[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(1): 123-129.
- [17] GUTIERREZ J, BOURQUE D, CRIADO R, et al. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 248: 125-131.
- [18] SANCHEZ J, BORRERO J, GOMEZ-SALA B, et al. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2471-2479.
- [19] MOON G S, PYUN Y R, KIM W J. Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108: 136-140.
- [20] BEAULIEU I, TOLKATCHEV D, JETTE J F, et al. Production of active pediocin PA-1 in *Escherichia coli* using a thioredoxin gene fusion expression approach: cloning, expression, purification, and characterization [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(11): 1246-1258.
- [21] SCHOEMAN H, VIVIER M A, du TOIT M, et al. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1999, 15 (8): 647-656.
- [22] BEAULIEU L, GROLEAU D, MIGUEZ C B, et al. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen like material[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 43 (2): 111-125.
- [23] HORN N, MARTINEZ M I, MARTINEZ J M, et al. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4443-4450.
- [24] MORISSET D, FRERE J. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 569-576.
- [25] GIBBS G M, DAVIDSON B E, HILLIER A J. Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant class IIa bacteriocins and its application to piscicolin 126[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3292-3297.
- [26] van REENEN C A, DICKS L M, CHIKINDAS M L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(6): 1131-1137.
- [27] BIET F, BERJEAUD J M, WOROBO R W, et al. Heterologous expression of the bacteriocin mesentericin Y105 using the dedicated transport system and the general secretion pathway[J]. Microbiology, 1998, 144(10): 2845-2854.
- [28] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2008, 5(3): 77-82.
- [29] MILLER K W, SCHAMBER R, CHEN Y, et al. Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus pap* operon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 14-20.
- [30] LIU Guorong, GRIFFITHS M W, WU Pengpeng, et al. *Enterococcus faecium* LM-2, a multi-bacteriocinogenic strain naturally occurring in "Byaslag", a traditional cheese of Inner Mongolia in China[J]. Food Control, 2010, 22: 283-289.
- [31] 李硕. IIa类乳酸菌细菌素的克隆表达研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [32] 孙强正, 徐建国. 乳酸乳球菌食品级表达载体的研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2006, 18(3): 260-261.
- [33] 谢燕. 一种新型 IIa 类乳酸菌细菌素的重组表达策略研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.