

# 乳链菌肽的生物合成及其分子结构与功能的关系\*

陈秀珠 张振中 贾士芳 陈美玲 还连栋\*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

## Nisin Biosynthesis and The Relationships Between Structure and Function of Nisin Molecule\*

Chen Xiuzhou Zhang Zhenzhong Jia Shifang Chen Meiling Huan Liandong\*\*

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

关键词: 乳链菌肽, 生物合成, 结构与功能

中图分类号: Q516 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)05-0628-06

乳链菌肽(Nisin)是乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)某些菌株产生的一种小肽,亦称之为乳酸链球菌肽或乳酸链球菌素。由于它对许多革兰氏阳性菌,包括葡萄球菌(*Staphylococcus*)、梭菌(*Clostridium*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、利斯特氏菌(*Listeria*)等造成食品严重危害的腐败菌有强烈抑制作用,并对人体安全无毒,是人们广为应用的一种天然食品防腐剂,已被全世界 50 多个国家和地区用于乳制品、罐头食品、植物蛋白食品、肉制品的防腐保鲜。

近年来,作者一直致力于这种天然食品防腐剂的研究与开发。在国家自然科学基金和中国科学院“八五”重点项目的资助下,建立了定向筛选乳链菌肽产生菌的方法<sup>[1]</sup>,在获得乳链菌肽高产突变株乳酸乳球菌(*L. lactis*)AL2 的基础上<sup>[2]</sup>,对其发酵条件、产物的提取、纯化和性质进行了研究<sup>[3,4]</sup>,并与浙江天台银象生物化工厂和中国食品发酵工业研究所合作,使该产品中试和应用试验获得成功,在国家“九五”科技攻关项目和中国科学院“九五”重点项目资助下,完成了工业化规模生产试验,现已建厂投产,其产品销往国内外市场。同时,作者对乳链菌肽产生菌进行了分子生物学研究,构建了乳酸乳球菌 AL2 的基因文库,从中筛选到含有完整乳链菌肽生物合成基因簇的  $\lambda$ HJ-3<sup>[5]</sup>,克隆和表达了编码乳链菌肽前体的结构基因(*nisZ*)<sup>[6]</sup>。这将为深入研究乳链菌肽分子结构与功能的关系及进一步改造乳链菌肽的分子特性奠定了基础。

### 1 乳链菌肽的分子结构

1971 年 Gross 和 Morell<sup>[9]</sup>阐明了乳链菌肽分子的结构。成熟的乳链菌肽分子由 34 个氨基酸组成,含有 5 个硫醚键形成的分子内环,其中一个为 Ala-S-Ala,称为羊毛硫氨酸(Lan),其它 4 个为 Abu-S-Ala,称为  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸(MeLan)。另外,在第 5 位和第 33 位残基各有一个脱氢丙氨酸(Dha),第 2 位残基

\* 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-01-05)中国科学院“九五”重点项目(KY95-J1-331)

\*\* 通讯作者(微生物资源前期开发国家重点实验室)

作者简介: 陈秀珠(1944-)女,浙江宁波人,副研究员,主要从事乳酸菌分子遗传学研究。

收稿日期: 2001-10-8, 修回日期: 2001-11-28

有一个  $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸( Dhb )。当 Buchman 等<sup>[8]</sup>克隆和测定了 *nisA* 结构基因 DNA 序列以后 ,才发现成熟分子中的脱氢丙氨酸、 $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸、羊毛硫氨酸和  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸等稀有氨基酸是经翻译后修饰而产生。这种翻译后修饰作用涉及丝氨酸脱水成脱氢丙氨酸和苏氨酸脱水成  $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸 ,然后半胱氨酸的巯基侧链与脱氢丙氨酸和  $\beta$ -甲基脱氢丙氨酸反应 ,生成含有硫醚环结构的羊毛硫氨酸和  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸。

乳链菌肽分子由 2 个结构域组成 :N-端结构域( 3 ~ 19 位残基 )含有 A、B、C 3 个环 ,C-端结构域( 22 ~ 28 位残基 )含有 D 和 E 2 个互相缠绕的环。用核磁共振( NMR )测定了 A、B、C 环以及 D、E 环的方向 ,发现这两个结构域都具有疏水面和亲水面的两亲结构<sup>[9,10]</sup>。

NisinZ 是 1991 年发现的一个乳链菌肽天然变异体 ,它与 NisinA 的差异仅是一个氨基酸取代 ,即第 27 位的组氨酸( His )变成了天冬酰胺( Asn )<sup>[11]</sup>。这种改变并不影响 NisinZ 的抗菌活性 ,却使 NisinZ 较之 NisinA 有更好的扩散性和在高于 pH6 的溶液中有更好的溶解度<sup>[11,12]</sup>。

## 2 乳链菌肽的生物合成

在上个世纪七、八十年代 ,一些研究者<sup>[13,14]</sup>根据质粒消除和接合转移实验推测乳链菌肽生物合成基因位于质粒上 ,但也有许多研究者根据自己的研究结果认为乳链菌肽的产生与质粒的存在与否并无必然的联系。后来 ,好几个实验室同时发现乳链菌肽生物合成基因是位于乳酸乳球菌染色体的可接合转移的转座子上<sup>[15-18]</sup>。这才解开了这个争论多年的谜团。

### 2.1 乳链菌肽-蔗糖转座子

编码乳链菌肽的转座子大约有 70kb ,除了乳链菌肽生物合成基因外 ,还有利用蔗糖、一个或多个噬菌体抗性系统和合成 N<sup>5</sup>-( L-1-carboxyethyl )-L-ornithine 的功能( 表 1 )。Tn5276 是此类接合转座子中研究得最详细的一个。Tn5276 的最左端是一个 IS1068 因子 ,其后是乳链菌肽生物合成基因簇和蔗糖发酵基因 ,与转座有关的基因存在于 Tn5276 的最右端<sup>[17,19-21]</sup>。Ranch 等人<sup>[22]</sup>系统研究了 13 株乳酸乳球菌中的乳链菌肽—蔗糖转座子 ,依据接合转移能力以及能否与有关探针杂交 ,可将它们分成三个主要类型( 表 1 )。编码 *nisinA* 产生的转座子属第一类 :它们都含有 IS1068 ,它以同一方向整合于转座子的左端 ,与转座子左、右两端的探针都能杂交 ,全都可以接合转移 ;然而编码 *nisinZ* 产生的转座子则分成两类 :一类( 第二类 )不含有与 IS1068 同源的插入因子 ,但可接合转移到 *L. lactis* MG1614 中 ;另一类( 第三类 )没有接合转移能力 ,杂交研究显示可能没有左端区 ,是一类有缺损的转座子。

表 1 已经鉴定的乳链菌肽——蔗糖转座子

菌株	转座子	遗传标记	大小/kb	类型
<i>L. lactis</i> NIZO R <sub>5</sub>	Tn5276	<i>nisA</i> , <i>sacA</i> , <i>xis</i> , <i>int</i> ,IS1068	70	I
<i>L. lactis</i> NCBF 894	Tn5301	<i>nisA</i> ,IS904 , <i>scr</i>	70	I
<i>L. lactis</i> K1 - 23	Tn5306	<i>nisA</i> , <i>ceo</i> , <i>scrA</i> , <i>scrB</i> , <i>scrK</i> ,IS904	60	I
<i>L. lactis</i> ATCC 11454	Tn5307	<i>nisA</i> , <i>scrA</i> , <i>scrB</i> , <i>scrK</i> ,IS904	68	I
<i>L. lactis</i> 6F3		<i>nisA</i> , <i>scrR</i> ,ISXA ,ISXB		I
<i>L. lactis</i> ILC11	Tn5278	<i>nisZ</i>		II
<i>L. lactis</i> NIZO 22186		<i>nisZ</i> ,IS1069		III

*nisA* ,*nisZ* 编码乳链菌肽前体的结构基因 ;*sacA* ( *scrA* )编码蔗糖-6 磷酸水解酶 ;*sacK* ( *scrB* )编码依赖于烯醇丙酮酸磷酸蔗糖酶 II<sup>acp</sup>( 磷酸转移酶系统 ) ;*sacK* ( *scrK* )编码果糖激酶 I ;*sacR* 编码含有螺旋-环-螺旋 DNA 结合特征序列的调节物 ;*ceo* 编码 N<sup>5</sup>-( L-1-carboxy-ethyl )-L-ornithine( NADP<sup>+</sup> 氧化还原酶 ) ,IS1068、IS1069、IS904、ISXA、ISXB 为插入因子。

### 2.2 与乳链菌肽生物合成有关的基因

乳链菌肽生物合成十分复杂 ,涉及 11 个基因。以 *nisA* /Z、*nisR*、*nicT*、*nicC*、*nicL*、*nicP*、*nicR*、*nicK*、*nicF*、



乳链菌肽加工位点前后的 Ala<sup>-4</sup> 到 Dhh<sup>+2</sup> 残基专一性结合<sup>[31]</sup>。

**2.2.4 免疫性** NisI 和 ABtC 输出蛋白 NisFEG nisI 位于乳链菌肽基因簇的中间,与免疫性有关,可防御产生菌分泌的乳链菌肽对自身的伤害作用<sup>[20,30]</sup>。nisI 编码一个 32kD 蛋白,含有 245 个氨基酸。其 N-端信号肽与细菌脂蛋白的信号肽高度相似<sup>[32]</sup>,推测 NisI 位于细胞膜的外表面。将 nisI 基因克隆到不产乳链菌肽的乳酸乳球菌中,可提高该菌对乳链菌肽的免疫性,虽然免疫水平比乳链菌肽产生菌要低得多<sup>[20,30]</sup>。大肠杆菌异源表达的 NisP 也能增加敏感菌对乳链菌肽的抗性<sup>[20]</sup>。将乳链菌肽产生菌中 nisI 基因破坏,它并不影响乳链菌肽的产生,但明显增加了对乳链菌肽的敏感性<sup>[33,34]</sup>。

除了 nisI 基因以外,乳链菌肽产生菌的免疫性还与 nisFEG 基因有关。nisFEG 编码 3 个不同的蛋白:1 个结合 ATP 的 NisF 和 2 个膜蛋白 NisE 和 NisG。用插入失活造成 nisF、nisE 和 nisG 基因突变,所有的突变株都降低了对乳链菌肽的免疫性<sup>[33]</sup>。

至今尚不了解 NisI 和 NisFEG 是如何保护细胞不受外界乳链菌肽的伤害。推测 NisFEG 蛋白负责清除侵入膜中的乳链菌肽分子,其途径或者使它们重新返回胞外<sup>[35]</sup>,或者将它们引入胞内,再由对乳链菌肽前体分子没有活性的胞内蛋白酶降解这些分子<sup>[33,35]</sup>。NisI 蛋白则首先结合乳链菌肽分子,不让它们与脂质双分子层接触,充当保卫细胞门户的“前线卫士”。

**2.2.5 NisR 和 NisK 双组分调节系统** nisR 和 nisK 基因位于 nisFEG 基因之前,它们分别编码组氨酸激酶和应答调节物,构成乳链菌肽生物合成的双组分调节系统<sup>[21,30]</sup>。

将 nisA 基因引入一个 4bp 缺失,正如预期,构建的菌株不产生乳链菌肽。然而,该菌株还显示一个意想不到的表型:nisA 转录停止,乳链菌肽免疫性降低。含有完整的 nisA 或 nisZ 基因的质粒将可互补位于染色体上基因的转录和菌株的免疫性,表明乳链菌肽或它的成熟中间体将为它自身基因转录所需要<sup>[21]</sup>。

用 nisA/Z 或 nisT 基因发生突变的菌株来分析野生型乳链菌肽、乳链菌肽突变体、前乳链菌肽或它的前导序列诱导乳链菌肽免疫和乳链菌肽基因的转录或 nisA 启动子控制下的报告基因转录的能力<sup>[26,29,36,37]</sup>。结果显示成熟的乳链菌肽分子在亚抑制浓度下可作为诱导物,诱导作用与诱导物浓度呈正线性关系<sup>[36,38,39]</sup>。乳链菌肽的结构类似物,如枯草菌素(subtilin)、表皮菌素(epidermin)都不能诱导乳链菌肽基因的转录<sup>[36]</sup>。乳链菌肽的各种突变体表现了不同的诱导能力,虽然大部分突变体降低了诱导效率,但 Thr2Ser 和 Met17Trp 这两个 nisinZ 突变体是个例外。它们的诱导能力分别是野生型乳链菌肽的 11 倍和 2.2 倍。乳链菌肽分子中前 3 个环为诱导作用所必需,而前导序列则没有诱导作用<sup>[36,37]</sup>。

乳链菌肽生物合成基因簇的转录受 3 个启动子控制<sup>[20,36,40]</sup>,分别表达 nisABTCIP、nisRK 和 nisFEG 这 3 个多顺反子转录物。诱导物乳链菌肽分子通过 NisRK 双组分调节系统调节 PnisA 和 PnisFEG 的转录。克隆在这两个启动子下游的报告基因 gusA 的转录呈线性剂量效应,而 PnisRK 的表达是组成型的<sup>[29,40]</sup>。

### 2.3 乳链菌肽的成熟途径

de Vos 和 Kuipers 等<sup>[41]</sup>总结了乳链菌肽的生物合成,提出乳链菌肽成熟途径模型。首先,胞外信号(乳链菌肽分子)激活位于膜上的组氨酸激酶(NisK),NisK 在自我磷酸化以后,将磷酸基团转移给应答调节物 NisR;第 2 步,NisR 激活 nisA/Z 启动子的转录,导致下游基因表达,在核糖体上合成未经修饰的前乳链菌肽分子;第 3 步,NisB 和 NisC 对前乳链菌肽进行脱水,形成硫醚键等翻译后修饰;第 4 步,ABC 输出蛋白 NisT 水解 ATP 提供能量,将经过修饰的乳链菌肽前体(原乳链菌肽)跨膜转运到胞外;第 5 步,NisP 对修饰的乳链菌肽前体进行胞外加工,切去前导序列,释放出有活性的成熟乳链菌肽。NisI 以及 NisF、NisE 和 NisG 通过至今还不清楚的机制保护产生菌自身免受胞外乳链菌肽的伤害。

## 3 乳链菌肽分子结构与功能的关系

采用定点诱变,初步研究了乳链菌肽分子结构与功能的关系。从表 2 可见,在第 1 位用体积大的 Trp 残基替代 Ile 残基,结果使抗菌活性下降,但不严重。在第 2 位引入一个 Dha 残基,该突变(T2S)对菌

色微球菌和嗜热脂肪芽孢杆菌的抗菌活性比野生型 *nisinZ* 要高 2 倍。S3T 突变在 A 环导入 1 个  $\beta$ -甲基羊毛硫氨酸代替原来的羊毛硫氨酸,结果使抗菌活性急剧下降。K12P 突变的抗菌活性与野生型 *nisinZ* 相似,表明乳链菌肽分子前半部的一个正电荷对它的活性是非必需的。在乳链菌肽分子 13 和 19 位残基之间引入一个二硫键(Thr13Cys),抗菌活性明显降低。用 DTT 还原这个二硫键,则几乎完全丧失了抗菌活性,说明 C 环的结构完整性对乳链菌肽的抗菌活性至关重要。这个观点受到另一个实验的支持。用胰蛋白酶水解 M17K *nisinZ* 分子,在 Lys17 后专一性剪切打开 C 环,结果该突变的抗菌活性也几乎全部丧失。M17Q/G18T 对黄色微球菌的活性是野生型 *nisinZ* 的 2 倍,而对蜡状芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌没有活性,表明该突变的抑菌谱发生了变化<sup>[42, 43]</sup>。使 C 环和 D 环之间可塑绞链区柔性发生改变的 N20P/M21P 降低了抗菌活性,而这 2 个残基的缺失( $\Delta$ N20M21)则使活性严重丧失。由于乳链菌肽分子的 D、E 环与 A、B、C 环呈不同的方向,第 21 和 22 位残基的缺失破坏了乳链菌肽分子的两亲性<sup>[44]</sup>。N27K 和 H31K 这 2 个乳链菌肽突变分子在 pH7 中的溶解度比野生型乳链菌肽高 4~8 倍。这对乳链菌肽在中性 pH 和碱性 pH 中的应用将是重要的<sup>[45]</sup>。

表 2 <i>NisinA</i> 和 <i>NisinZ</i> 的定点诱变和突变体的性质				
突变	基因	特征	物理性质	生物学性质
I1W	<i>nisZ</i>	荧光标记	未试	具有类似的活性
I1W/Thr-2	<i>nisZ</i>	未修饰的 Thr-2	未试	活性降低
T2S	<i>nisZ</i>	Dhb→Dha	未试	活性增加
S3T	<i>nisZ</i>	Ala-S-Ala→Abu-S-Ala	未试	活性很低
S5T	<i>nisZ</i>	Dha→Dhb	改善了稳定性	活性降低
K12P	<i>nisZ</i>	正电荷减少	未试	具有类似的活性
T13C	<i>nisZ</i>	导入二硫键	可能被还原	活性降低
M17Q/G18Dhb	<i>nisZ</i>	导入新 Dhb	具有类似的稳定性	具有类似的活性
M17Q/G18T	<i>nisZ</i>	导入未修饰的 Thr	具有类似的稳定性	抗菌谱改变
M17W	<i>nisZ</i>	荧光标记	未试	活性降低
M17K	<i>nisZ</i>	C 环中赖氨基	溶解度增加	可被胰蛋白酶失活
N20P/M21P	<i>nisA</i>	改变了绞链区的柔性	未试	活性降低
$\Delta$ N20M21	<i>nisA</i>	除去部分绞链区	未试	活性剧烈降低
N27K	<i>nisZ</i>	正电荷增加	改善了溶解度	具有类似活性
H31K	<i>nisZ</i>	改变正电荷	改善了溶解度	具有类似活性

4 结语

最近,随着高纯度乳链菌肽的研制及乳链菌肽与螯合剂的联合使用,扩大了乳链菌肽的应用范围,特别是 Breukink 等<sup>[46]</sup>报道乳链菌肽作用的靶位点与万古霉素相同,再次激起了世界许多国家的研究热情 and 高度重视。可以预期,随着人们对乳链菌肽分子结构与功能关系的深入了解,乳链菌肽或经改造后的乳链菌肽将会在食品防腐和医疗保健方面发挥更大的作用。

- [ 3 ] 陈秀珠,何松,龙力红,等.微生物学通报,1995 **22** :215 ~ 218.
- [ 4 ] 陈秀珠,何松,龙力红,等.微生物学报,1996 **36** :269 ~ 275.
- [ 5 ] 陈秀珠,胡海菁,贾士芳,等.微生物学报,2000 **40** :465 ~ 469.
- [ 6 ] 陈秀珠,胡海菁,杨巍,等.遗传学报,2001 **28** :285 ~ 290.
- [ 7 ] Gross E,Morell J L. *J Am Chem Soc*,1971 **93** :4634 ~ 4635.
- [ 8 ] Buchman G W,Banerjee S,Hansen J N. *J Biol Chem*,1988 **263** :16260 ~ 16266.
- [ 9 ] van de Ven F J M,Jung G. *Antonie van Leeuwenhoek*,1996 **69** :99 ~ 107.
- [ 10 ] van den Hooven H W,Doeland C C M,van de Kamp M,et al. *Eur J Biochem*,1996 **235** :382 ~ 393.
- [ 11 ] Mulders J W M,Boerrigter I J,Rollema H S,et al. *Eur J Biochem*,1991 **201** :581 ~ 584.
- [ 12 ] de Vos W M,Mulders J W M,Siezen R J,et al. *Appl Environ Microbiol*,1993 **59** :213 ~ 218.
- [ 13 ] Kozak W,Rajchert-Trzpił M,Dobrzanski W T. *J Gen Microbiol*,1974 **83** :295 ~ 302.
- [ 14 ] Tsai H J,Sandine W E. *Appl Environ Microbiol*,1987 **53** :352 ~ 357.
- [ 15 ] Donkersloot J A,Thompson J. *J Bacteriol*,1990 **172** :4122 ~ 4126.
- [ 16 ] Horn N,Swindell S,Dodd H,et al. *Mol Gen Genet*,1991 **228** :129 ~ 135.
- [ 17 ] Rauch P J G,de Vos W M. *J Bacteriol*,1992 **174** :1280 ~ 1287.
- [ 18 ] Gireesh T,Davidson B E,Hillier A J. *Appl Environ Microbiol*,1992 **58** :1670 ~ 1676.
- [ 19 ] Rauch P J G,Beerthuyzen M M,de Vos W M. *Nucleic Acids Res*,1990 **18** :4253 ~ 4254.
- [ 20 ] Kuipers O P,Beerthuyzen M M,Siezen R J,et al. *Eur J Biochem*,1993 **216** :281 ~ 291.
- [ 21 ] van der Meer J R,Polman J,Beerthuyzen M M,et al. *J Bacteriol*,1993 **175** :2578 ~ 2588.
- [ 22 ] Rauch P J G,Beerthuyzen M M,de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*,1994 **60** :1798 ~ 1804.
- [ 23 ] Jung G,Sahl H G.Nisin and novel lantibiotics. Proceedings of the first international workshop on lantibiotics. Leiden :escom publishers,1991.218 ~ 230.
- [ 24 ] Engelke G,Gutowski-Eckel Z,Hammelman M,et al. *Appl Environ Microbiol*,1992 **58** :3730 ~ 3743.
- [ 25 ] Siegers K,Heinzmann S,Entian K-D. *J Biol Chem*,1996 **271** :12294 ~ 12301.
- [ 26 ] Qiao M,Ye S,Koponen O,et al. *J Appl Bacteriol*,1996 **80** :626 ~ 634.
- [ 27 ] van der Meer J R,Rollema H S,Siezen R J,et al. *J Biol Chem*,1994 **269** :3555 ~ 3562.
- [ 28 ] Entian K-D,de Vos W M. *Antonie van Leeuwenhoek*,1996 **69** :109 ~ 117.
- [ 29 ] Ra S R,Qiao M,Immonen T,et al. *Microbiology*,1996 **142** :1281 ~ 1288.
- [ 30 ] Engelke G,Gutowski-Eckel Z,Kiesau P,et al. *Appl Environ Microbiol*,1994 **60** :814 ~ 825.
- [ 31 ] Siezen R J,Rollema H S,Kuipers O P,et al. *Protein Eng*,1995 **8** :117 ~ 125.
- [ 32 ] von Heijne G. *Protein Eng*,1989 **2** :531 ~ 534.
- [ 33 ] Siegers K,Entian K-D. *Appl Environ Microbiol*,1995 **61** :1082 ~ 1089.
- [ 34 ] Ra R,Beerthuyzen M M,de Vos W M,et al. *Microbiology*,1999 **145** :1227 ~ 1233.
- [ 35 ] Saris P E J,Immonen T,Reis M,et al. *Antonie van Leeuwenhoek*,1996 **69** :151 ~ 159.
- [ 36 ] Kuipers O P,Beerthuyzen M M,de Ruyter P G G A,et al. *J Biol Chem*,1995 **270** :27299 ~ 27304.
- [ 37 ] Dodd H M,Horn N,Chan W C,et al. *Microbiology*,1996 **142** :2385 ~ 2392.
- [ 38 ] de Ruyter P G G A,Kuipers O P,de Vos W M. *Appl Environ Microbiol*,1996 **62** :3662 ~ 3667.
- [ 39 ] Eichenbaum Z,Federle M J,Marra D,et al. *Appl Environ Microbiol*,1998 **64** :2763 ~ 2769.
- [ 40 ] de Ruyter P G G A,Kuipers O P,Beerthuyzen M M,et al. *J Bacteriol*,1996 **178** :3434 ~ 3439.
- [ 41 ] de Vos W M,Kuipers O P,van der Meer J R,et al. *Mol Microbiol*,1995 **17** :427 ~ 437.
- [ 42 ] Kuipers O P,Bierbaum G,Ottenwalder B,et al. *Antonie van Leeuwenhoek*,1996 **69** :161 ~ 170.
- [ 43 ] van Kraaij C,Breukink E,Rollema H S,et al. *Eur J Biochem*,2000 **267** :901 ~ 909.
- [ 44 ] van de Ven F J M,van den Hooven H W,Konings R N H,et al. *Eur J Biochem*,1991 **202** :1181 ~ 1188.
- [ 45 ] Rollema H S,Kuipers O P,Both P,et al. *Appl Environ Microbiol*,1995 **61** :2873 ~ 2878.
- [ 46 ] Breukink E,Wiedemann I,van Kraaij C,et al. *Science*,1999 **286** :2361 ~ 2364.