

裂解酶对食源性病原菌的生物防治研究及应用

李陇平

(榆林学院 陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心,陕西 榆林 719000)

摘要: 噬菌体裂解酶能够高效消化细菌细胞壁,对多重耐药病原菌表现出独特的裂解能力,是一种新型抗菌分子,具有重要的应用潜力和研究价值。本文对裂解酶在食品生产中的研究进展进行了概述,重点综述了裂解酶及其嵌合体对食源性病原菌的生物防治研究以及裂解酶作用于革兰氏阴性菌的研究进展。

关键词: 裂解酶;食源性病原菌;生物防治;食品安全

中图分类号:S 182 文章编号:1673-1689(2019)12-0142-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.021

Research Progress of Lysins for Biocontrol of Foodborne Pathogens and Its Applications

LI Longping

(Shaanxi Province Engineering & Technology Research Center of Cashmere Goat, Yulin University, Yulin 719000, China)

Abstract: Bacteriophage lysins have emerged as a new class of antimicrobial agents used for bio-controlling bacterial infection or other unwanted contaminations in various fields, particularly with increasing frequency of drug-resistant pathogens in the worldwide. In the present review, developments regarding the use of lysins for food safety are outlined. Furthermore, lysins for bio-controlling bacterial contamination and novel approaches regarding to lysins towards Gram-negative cells will also be highlighted.

Keywords: bacteriophage lysin, food-borne pathogens, biocontrol, food safety

病原菌污染食品,严重威胁到食品安全并危害人类健康,导致人类疾病甚至死亡,产生巨大的经济损失。这些致病菌主要包括李斯特菌、沙门氏菌、弯曲杆菌、大肠埃希氏菌、梭状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等。噬菌体是自然界中数量最多的一类生物,经过了数百万年的进化,它们能够特异性识别和高效杀死细菌^[1]。裂解酶是一种细菌肽聚糖水解

酶,在噬菌体感染细菌后期,裂解酶被大量释放出来,具有快速、高效裂解细菌肽聚糖层的特殊能力,使细菌破裂从而释放子代噬菌体颗粒^[1-2]。和革兰氏阴性菌不同,革兰氏阳性菌不存在肽聚糖之外的外膜结构,所以,裂解酶从外加入时可以直接作用于革兰氏阳性菌的肽聚糖,将其杀死。正因为如此,噬菌体裂解酶在医学、生物技术、农业和食品安全等

收稿日期:2017-03-18

基金项目:陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目(2019JQ-903);陕西省高校科协青年人才托举计划资助项目(20160236);榆林学院高层次人才科研启动基金项目(16GK21)。

作者简介:李陇平(1985—),男,博士,讲师,主要从事畜牧微生物研究。E-mail:llp_315@163.com

引用本文:李陇平.裂解酶对食源性病原菌的生物防治研究及应用[J].食品与生物技术学报,2019,38(12):142-149.

众多领域都有所研究和应用^[3-6]。革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶结构相似,一般由水解底物的催化活性域(Enzymatically Active Domains,EAD)和细胞壁结合域(Cell Wall-Binding Domains,CBD)构成。EAD 是裂解酶的核心部分,能够特异性的识别肽聚糖层的化学键,根据它们在肽聚糖层作用的靶位点不同可以分为胞壁酸酶、葡萄糖苷酶、转糖基酶、酰胺酶和肽链内切酶。多数 CBD 能够和细胞壁上的特殊配基特异性结合,引导 EAD 发挥裂解作用^[2]。此外,裂解酶不仅能高效快速的杀灭多重耐药细菌,而且不易诱导细菌产生新的耐药性^[3]。

本文作者将综述裂解酶在检测和防控食源性致病菌方面的研究进展,同时,也将介绍裂解酶降解细菌生物膜和革兰氏阴性菌的最新研究进展。

1 裂解酶检测食源性病原菌

噬菌体裂解酶 CBD 结构域和配基的结合具有特异性,并且结合能力特别强,这些特点使裂解酶成为非常理想的细菌快速而又准确的检测(诊断)工具。研究表明,李斯特菌噬菌体裂解酶对其靶位点的亲和力甚至超过了用抗原抗体反应检测的准确性和灵敏性^[7-8]。文献[9]发明以裂解酶 CBD 为基础的磁选法(CBD-Based Magnetic Separation,CBD-MS),这种方法可以对不同李斯特菌进行快速(时间控制在 48 h 内,传统方法至少需要 96 h)、准确(灵敏性远远超过传统的培养方法)的检测。CBD-MS 的操作流程如下:1)采集样品,包括蔬菜、奶牛和肉制品等;2)选择性培养液对样品中的目标细菌进行短期增殖(6~12 h);3)将表面共价结合着不同李斯

特菌噬菌体 CBD 结构域的小磁珠加入到细菌培养液中,静置几分钟,使磁珠能够识别、结合不同血清型的细菌;4)用一块磁铁在试管外将吸附了细菌的磁珠聚集;5)倒掉培养液;6)水洗磁珠,并用缓冲液重悬;7)采用不同的方法检测吸附在磁珠上的细菌:①分子生物学方法,PCR 或实时定量 PCR^[10];②直接在选择性培养基上进行平板培养;③由于不同裂解酶能够结合不同血清型细菌,可以将不同荧光标记蛋白(Fluorescent Proteins,FP),如 GFP、CFP、和 dsRed 和 CBD 进行融合表达,混合液中不同的 CBD-FP 可以使不同血清型李斯特菌的着色存在差异性,然后再通过用荧光显微镜进行检测和区分不同血清型的李斯特菌^[8]。类似 CBD-MS 的方法还应用到其他革兰氏阳性细菌,包括芽孢杆菌和产气荚膜梭菌^[9]及炭疽杆菌^[11]。需要指出的是,这些方法都只是针对革兰氏阳性菌,由于革兰氏阴性细菌细胞壁外面存在外膜结构,使得噬菌体裂解酶无法穿过外膜层到达肽聚糖的配基位点发挥作用,因此,从外加入裂解酶时对革兰氏阴性菌不起作用。

2 裂解酶控制食源性病原菌

食品生产和加工的各个环节都有可能存在致病菌污染。所以,在食品生产加工诸多环节(生产、加工、包装、分装等),裂解酶都可以发挥控制病原菌感染的作用。表 1 是最近几年来裂解酶作用于食源性病原菌的一些主要研究实例。其中,一些裂解酶已经在食品工业中得到了应用,一些裂解酶虽然还未开始用于实践,但是,它们在体外实验的研究中表现出非常独特的裂解能力。

表 1 裂解酶在控制食源性病原菌上的研究进展

Table 1 Bacteriophage lysins that have been tested against foodborne pathogens

裂解酶	裂菌谱	应用特点	参考文献
LysH5	葡萄球菌	裂解多种葡萄球菌及其生物膜,在牛奶中具有活性,与乳链菌肽(nisin)协同作用	[12-15]
HydH5Lyso, HydH5SH3b, CHAPSH3b	葡萄球菌	裂解多种葡萄球菌,与 LysH5 协同作用,用在牛奶加工和储藏	[16-17]
80α, phi11, LysK, CHAP (K), P68, Ply187AN - KSH3b, Ply187N-V12C	葡萄球菌	裂解多种葡萄球菌及其生物膜,阻止生物膜形成	[18-23]
2638A, PhiSH2, PlyGRCS, SAL -1, DW2, LysGH15, ClyH	金黄色葡萄球菌	裂解金黄色葡萄球菌及其生物膜	[18, 24-29]
TWORT, WMY	葡萄球菌	裂解多种葡萄球菌和金黄色葡萄球菌及其生物膜	[18-30]
λSA2-E-Lyso-SH3b	金黄色葡萄球菌	裂解奶牛乳腺炎源葡萄球菌和链球菌,在牛奶和小鼠乳腺组织中具有裂解活性,与溶葡萄球菌酶协同作用	[31-32]
λSA2-E-LysK-SH3b	链球菌属		

续表 1

裂解酶	裂菌谱	应用特点	参考文献
LysSA4	葡萄球菌	裂解奶牛乳腺炎源葡萄球菌	[33]
Ctp1L, CS74L	梭状芽胞杆菌	裂解牛乳中梭状芽胞杆菌	[34–35]
CP25L	产气荚膜梭菌	裂解多种产气荚膜梭菌	[36–37]
Psm, ΦCP390, ΦCP26F		高度耐热稳定性	[38–40]
PlyGVE2CpCWB			
LysPBC1	芽孢杆菌属	裂解多种芽孢杆菌	[41]
PlyBt33		高度耐热稳定性	[42]
LysBPS13		甘油环境下高度热稳定	[43]
LysB4	蜡状芽孢杆菌 枯草芽孢杆菌,	体外裂解多种杆菌, 高度耐热稳定性	[44]
Ply500	李斯特菌	裂解多种李斯特菌,与纳米材料协同作用	[45–46]
Ply511, Ply118, PlyP35		裂解多种李斯特菌,高度耐热稳定性	
LysZ5		裂解多种李斯特菌,应用在豆浆中	[47]
PlyLM	单核细胞增多性 李斯特氏菌	与蛋白酶 K 协同作用清除单核细胞增多性李斯特氏菌形成的单分子层	[48]
PlySs2 (CF–301)	多种革兰氏阳性菌	裂解葡萄球菌和李斯特菌, 以及金黄色葡萄球菌生物膜	[49]
PVP–SE1gp146, Lys68	铜绿假单胞菌, 大肠杆菌, 沙门氏菌	高度耐热稳定性	[50–53]
OBPgp279, 201ψ2 –1gp229, SPN1S, Lyspep3, PCNP–OBPgp279		需外膜渗透剂 EDTA 作用, 能够裂解大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌	
S–394	大肠杆菌	与阳离子抗菌肽协同作用	[54]
SPN9CC	大肠杆菌	裂解经外膜渗透剂处理后的革兰氏阴性菌	[55]
PsP3gp10, P2gp09, BcepC6Bgp22, K11gp3.5, KP32gp15	铜绿假单胞菌, 鼠伤寒沙门氏菌, 大肠杆菌		[56]

2.1 裂解酶在食品生产中的应用

裂解酶是一种蛋白质,所以可以体外表达纯化之后直接添加到食品中。文献[14]首次报道噬菌体裂解酶 lysH5 能够快速(4 h 内)、有效地杀死巴氏消毒牛奶中的金黄色葡萄球菌,并且 LysH5 和细菌素-乳酸链球菌肽表现出协同裂菌作用^[12]。LysH5 和其他肽聚糖水解酶及 LysH5 和溶葡萄球菌酶组成的嵌合体裂解酶对细菌的裂解活力也出现类似的协同作用^[17–57]。CHAPSH3b 是裂解酶 HydH5 肽链内切酶结构域和溶葡萄球菌酶细胞壁结合域融合表达的嵌合体裂解酶,可以将牛奶中金黄色葡萄球菌的浓度在 15 min 内降低到检测水平以下,并且能够在经过巴氏灭菌消毒和 4 °C 保存的奶制品中保持相当高的活性^[57],因此,CHAPSH3b 被作为奶制品保存的添加剂在使用。其他已经报道的能够在牛奶或者其他奶制品中发挥活性的噬菌体裂解酶或者嵌合体裂解酶包括梭状芽胞杆菌噬菌体 ΦCTP1 裂解酶(奶酪生产中)^[34],链球菌噬菌体裂解酶 Ply700^[58],

λSA2^[59],B30^[59–60],λSA2–SH3b^[32]和 Ply187AN–KSH3b^[20]。LysZ5 能有效杀死豆浆中的李斯特菌^[47]。李斯特菌噬菌体裂解酶 Ply511 不仅具有广谱裂菌活性(有效裂解不同血清型李斯特菌),而且 90 °C 作用 30 min 仍然保持 60%的裂解活性,表现出特别强的高温耐受性^[45]。这些热稳定性的噬菌体裂解酶可以应用到需要经过巴氏消毒等热处理的一些食品工艺中。裂解酶 Ply511 和 Ply118 可以有效抑制李斯特菌生长,应用在生菜和牛奶等食品中^[3]。除此之外,一些裂解酶还可以直接应用到食物的消毒和除菌,将水果浸泡在表达欧文氏菌噬菌体裂解酶的溶液中,欧文氏菌的增殖得到了有效的控制^[61]。另一种策略是使用可以在发酵过程中表达和分泌裂解酶的乳酸菌来控制病原菌^[36–37]。到目前为止,许多研究表明可以通过鉴定新的裂解酶进行体外控制食源性病原菌(表 1)。但是,大多数研究都集中在牛奶及其奶制品。因此,在其他众多食品产品中,还需要开展大量噬菌体裂解酶的相关研究工作。

2.2 裂解酶在农业生产中的应用

文献[62]成功研制表达 T4 噬菌体裂解酶转基因的马铃薯,可以有效保护植株对革兰氏阴性欧文氏菌所导致的软腐病。文献[63]利用烟草对裂解酶 Cpl-1、Pal(裂解肺炎链球菌)和 PlyGBS(针对 B 型链球菌噬菌体裂解酶)表达之后,生产能够治疗人和畜禽疾病的裂解酶蛋白。奶牛乳腺炎是由多种病原微生物感染而引起的奶牛乳腺组织及乳头发炎的一种疾病,是严重影响奶牛养殖业和人类健康的一种疾病。抗生素在奶牛养殖业的大量使用,使很多细菌对常用药物产生耐药性,甚至产生多重耐药,抗生素已经无能为力,加之抗生素残留问题给食品安全造成了巨大隐患,人类开始进入后抗生素时代,因此迫切需要新型的抗微生物制剂。在小鼠乳腺炎模型的研究中发现,乳导管灌注噬菌体裂解酶 λ SA2 和 B30 可以显著的减少导致乳腺炎发生的 3 种链球菌浓度(无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌)。同时,乳腺组织的炎症也得到了有效的缓解^[59]。裂解酶 λ SA2-LysK-SH3b(嵌合体)与溶葡萄球菌酶联合作用能够有效清除金黄色葡萄球菌诱导的小鼠乳腺炎模型中的病原菌,并且两者具有协同作用^[32]。另外,能够产生裂解酶的转基因小鼠^[64]和奶牛^[65]均能够对使动物对引起乳腺炎的金黄色葡萄球菌产生耐受性。

3 裂解酶在革兰氏阴性菌中的研究

由于革兰氏阴性菌细胞壁外面存在着外膜结构,所以对于革兰氏阴性菌,加入裂解酶之后这层外膜结构阻挡了裂解酶和细菌肽聚糖层的结合,因此,裂解酶不能将革兰氏阴性菌裂解。最近几年,很多研究都在探讨裂解酶如何跨越细菌外膜,有效裂解阴性菌的新途径和新方法。主要策略包括:鉴定本身具有跨膜能力的裂解酶;使用外膜渗透剂;构建嵌合体裂解酶和混合裂解酶或抗生素;构建裂解酶-抗菌肽融合体等。目前采用较多的方法有使用外膜渗透剂(Outer Membrane Penetrating agent, OMP)、构建嵌合裂解酶和混合裂解酶或抗生素等。其中最常用的 OMP 是 EDTA。研究表明:EDTA 与裂解酶联合使用时,裂解酶能发挥良好的裂解效果,如裂解酶 OBPgp279^[66]和 Lysep3^[51]。还有研究证实裂解酶 Lys68 与柠檬酸或苹果酸联合使用,能够有效杀死沙门氏菌和其他一些革兰氏阴性菌,并强

于 EDTA^[52]。可以与裂解酶联合使用的 OMP 还包括一些阳离子多肽,即抗菌肽,例如 PGLa 和 poly-L-arginine 可以增强沙门氏菌裂解酶对大肠杆菌的作用^[54]。除此之外,通过充分利用抗菌肽的细胞膜破坏功能与裂解酶的肽聚糖水解功能,设计可以穿透细菌外膜结构到达肽聚糖层发挥作用的融合蛋白,为有效防控多重耐药革兰氏阴性细菌提供了新思路。典型的例子是将裂解酶 KZ144 的 N 端融合抗菌肽 SMAP-29,通过原核表达之后 N 端抗菌肽能够帮助裂解酶 SMAP-29-KZ144 和细菌细胞壁肽聚糖层结合,高校切割形成肽聚糖的化学键,革兰氏阴性的菌铜绿假单胞菌得到了有效的裂解^[67]。另外,OBPgp279 是含有 9 肽的融合裂解酶蛋白,OBPgp279 单独或和 0.5 mmol/L 的 EDTA 联合使用能够在 30 min 内使细菌浓度降低 5 个数量级^[53]。

此外,研究还表明,一些裂解酶具有从外裂解革兰氏阴性菌的能力。包括沙门氏菌噬菌体 SPN9CC 裂解酶^[55],解淀粉芽孢杆菌噬菌体裂解酶 Lys1521^[68]和对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有裂解活性的鲍曼不动杆菌噬菌体裂解酶 LysAB2^[69]。存在这种独特溶解特性可能的原因是这些裂解酶固有的一些阳离子或者存在能干扰细菌外膜的双亲性螺旋基序,提高了细胞膜的渗透性。还有一些裂解酶对革兰氏阴性菌发挥裂解作用的前提条件是细菌需要经过热或氯仿等灭活处理,像阪崎肠杆菌噬菌体裂解酶 LysSs1^[70],高度热稳定性的 *Thermus scotoductus* 噬菌体裂解酶 Ph2119^[71]。总之,裂解酶对革兰氏阴性菌的自外裂解研究还处于起步阶段,还有很多工作值得深入研究。然而,利用蛋白质工程和基因工程方法对裂解酶及其嵌合体进行研究的成功例子,无疑为未来利用裂解酶控制革兰氏阴性菌感染提供了一种新的途径和方法。

4 裂解酶对细菌生物被膜的作用

细菌生物被膜主要由细菌分泌的一些糖类(polysaccharides)组成,包裹在细菌周围,不仅保护细菌免受宿主免疫细胞的攻击,而且使细菌很难被抗生素或普通消毒剂清除,非常容易造成临床和食品生产加工的持续感染和持续污染^[72]。研究表明,噬菌体裂解酶对生物被膜有降解作用,能清除特定的生物被膜。裂解酶 LysH5 在 6 h 之内就能够有效清除 96 孔板中金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌形成

的生物膜^[13]。金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 PlyGRCS 也能对生物膜发挥作用,有趣的是, PlyGRCS 只有一个酶促活性域,却表现出 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶和 D-alanyl-glycyl 肽链内切酶两种酶活功能^[26]。另外,对 8 种完全不同的葡萄球菌噬菌体裂解酶降解生物膜的能力进行比较研究,发现它们对生物膜的裂解活力存在差异,活性最高的是 LysK^[18]。其他裂解酶降解生物膜的能力依次为: SAL-1 (几乎与 LysK 相当)^[27], phi11 (与 LysH5 相当)^[19], PlySs2 (即 CF-301)^[49], SAP-2^[73] 和 CHAP(K)^[22]。其中, CHAP(K) 是金黄色葡萄球菌噬菌体 K 裂解酶 LysK 的截短结构域 CHAPK (Cysteine histidine dependant amidohydrolase/peptidase) 产生的肽酶。研究表明 CHAP(K) 能在 4 h 内完全消除金黄色葡萄球菌 DPC5246 生物被膜。此外, CHAP(K) 还能阻止金黄色葡萄球菌 DPC5246 形成生物被膜,并能够减少皮肤表面定殖的金黄色葡萄球菌数量。除此之外,酰胺酶 PlyLM 和蛋白酶 K 联合作用可以清除李斯特菌生物膜结构^[48]。沙门氏菌裂解酶 Lys68 可以有有效的裂解多种革兰氏阴性菌形成的生物膜^[52]。不难发现,裂解酶对革兰氏阳性菌和阴性菌形成的生物被膜都有一定的降解作用,而且有些清除生物被膜的能力比较强,在前人的研究基础和启发下,继续发掘和设计针对食源性病原菌生物膜的裂解酶及其嵌合体,对于保障食品安全具有重要的作用和巨大的潜力。

参考文献:

- [1] HENDRIX R W. Bacteriophages: evolution of the majority[J]. **Theor Popul Biol**, 2002, 61(4): 471-480.
- [2] LOESSNER M J. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications[J]. **Curr Opin Microbiol**, 2005, 8(4): 480-487.
- [3] SCHMELCHER M, DONOVAN D M, LOESSNER J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials[J]. **Future Microbiol**, 2012, 7(10): 1147-1171.
- [4] FISCHETTI V A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens[J]. **Int J Med Microbiol**, 2010, 300(6): 357-362.
- [5] RODRIGUEZ-RUBIO L, GUTIERREZ D, DONOVAN D M, et al. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials[J]. **Crit Rev Biotechnol**, 2016, 36(3): 542-552.
- [6] HERMOSO J A, J L GARCIA P GARCIA. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics[J]. **Curr Opin Microbiol**, 2007, 10(5): 461-472.
- [7] LOESSNER M J, KRAMER K, EBEL F, et al. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates[J]. **Mol Microbiol**, 2002, 44(2): 335-349.
- [8] SCHMELCHER M, SHABAROVA T, EUGSTER M R, et al. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by

5 展望

多重耐药菌株的出现和快速传播,严重危害食品安全、动物和人类健康,在寻找新型抗菌分子或抗生素替代品的研究中,人们发现噬菌体裂解酶有着抗生素众多无法比拟的优点:高效的杀菌活性;本身是一类蛋白质,易于人工设计和改造;不易产生耐药性;不同裂解酶之间的协同效应等。这些特点使裂解酶具有用于控制耐药细菌污染食品生产加工从而保障食品安全的大潜力。食品生产的流程长、环节多,裂解酶可以作为其中的一员或者直接应用到某一个环节来中。目前这方面的研究报道也越来越多,从研究趋势来看,裂解酶不仅可以在食品生产和加工中发挥积极、有效的作用,而且可以作为食品添加剂和祛除细菌生物膜强有效的武器应用到食品工业中。特别是随着蛋白质工程技术和基因工程技术的发展,对裂解酶的结构可以进行多种改造,使其能够适应各种不同的物理化学环境(如适宜的 pH、一定的盐浓度)和耐受一定的温度环境,从而能够适应食品生产的某些重要环节,保证食品安全。值得一提的是,裂解酶和其他抗菌物质联合使用发挥协同作用,以及噬菌体存在数量(估计 1 031)之多使其成为具有裂解活性结构域用之不竭的储藏库。因此,裂解酶的研究和应用有着非常广阔的前景和价值。

- use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2010, 76(17): 5745-5756.
- [9] KRETZER J W, LEHMANN R, SCHMELCHER M, et al. Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73(6): 1992-2000.
- [10] WALCHER G, STESSL B, WAGNER M, et al. Evaluation of paramagnetic beads coated with recombinant *Listeria* phage endolysin-derived cell-wall-binding domain proteins for separation of *Listeria monocytogenes* from raw milk in combination with culture-based and real-time polymerase chain reaction-based quantification[J]. **Foodborne Pathog Dis**, 2010, 7(9): 1019-1024.
- [11] FUJINAMI Y, HIRAI Y, SAKAI I, et al. Sensitive detection of *Bacillus anthracis* using a binding protein originating from gamma-phage[J]. **Microbiol Immunol**, 2007, 51(2): 163-169.
- [12] GARCIA P, MARTINEZ B, RODRIGUEZ L, et al. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk[J]. **Int J Food Microbiol**, 2010, 141(3): 151-155.
- [13] GUTIERREZ D, RUAS-MADIEDO P, MARTINEZ B, et al. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5[J]. **PLoS One**, 2014, 9(9): e107307.
- [14] OBESO J M, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, et al. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk[J]. **Int J Food Microbiol**, 2008, 128(2): 212-218.
- [15] RODRIGUEZ-RUBIO L, GUTIERREZ D, MARTINEZ B, et al. Lytic activity of LysH5 endolysin secreted by *Lactococcus lactis* using the secretion signal sequence of bacteriocin Lcn972[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2012, 78(9): 3469-3472.
- [16] RODRIGUEZ-RUBIO L, MARTINEZ B, DONOVAN D M, et al. Potential of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 and its derivative fusion proteins in milk biopreservation[J]. **PLoS One**, 2013, 8(1): e54828.
- [17] RODRIGUEZ-RUBIO L, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, et al. Enhanced staphylococcal activity of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiPLA88 HydH5 virion-associated peptidoglycan hydrolase: fusions, deletions, and synergy with LysH5[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2012, 78(7): 2241-2248.
- [18] SCHMELCHER M, SHEN Y, NELSON D C, et al. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection[J]. **J Antimicrob Chemother**, 2015, 70(5): 1453-1465.
- [19] SASS PG BIERBAUM. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2007, 73(1): 347-352.
- [20] MAO J, SCHMELCHER M, HARTY W J, et al. Chimeric Ply187 endolysin kills *Staphylococcus aureus* more effectively than the parental enzyme[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2013, 342(1): 30-36.
- [21] O'FLAHERTY S, COFFEY A, MEANEY W, et al. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. **J Bacteriol**, 2005, 187(20): 7161-7164.
- [22] FENTON M, KEARY R, MCAULIFFE O, et al. Bacteriophage-derived peptidase CHAP (K) eliminates and prevents staphylococcal biofilms[J]. **Int J Microbiol**, 2013, 2013: 1-8.
- [23] DONG Q, WANG J, YANG H, et al. Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci[J]. **Microb Biotechnol**, 2015, 8(2): 210-220.
- [24] ABAEV I, FOSTER-FREY J, KOROBOVA O, et al. Staphylococcal phage 2638A endolysin is lytic for *Staphylococcus aureus* and harbors an inter-lytic-domain secondary translational start site[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97(8): 3449-3456.
- [25] SCHMELCHER M, KOROBOVA O, SCHISCHKOVA N, et al. *Staphylococcus haemolyticus* prophage PhiSH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis 'from without' [J]. **J Biotechnol**, 2012, 162(2/3): 289-298.
- [26] LINDEN S B, ZHANG H, HESELPOTH R D, et al. Biochemical and biophysical characterization of PlyGRCS, a bacteriophage endolysin active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015, 99(2): 741-752.
- [27] JUN S Y, JUNG G M, YOON S J, et al. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1 [J]. **Int J Antimicrob Agents**, 2013, 41(2): 156-161.
- [28] GU J, XU W, LEI L, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. **J Clin Microbiol**, 2011, 49(1): 111-117.
- [29] YANG H, ZHANG Y, YU J, et al. Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo[J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2014, 58(1): 536-542.

- [30] BECKER S C, SWIFT S, KOROBOVA O, et al. Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2015, 362(1): 1-8.
- [31] BECKER S C, FOSTER-FREY J, STODOLA A J, et al. Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain[J]. **Gene**, 2009, 443(1/2): 32-41.
- [32] SCHMELCHER M, POWELL A M, BECKER S C, et al. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2012, 78(7): 2297-2305.
- [33] MISHRA A K, RAWAT M, VISWAS K N, et al. Expression and lytic efficacy assessment of the *Staphylococcus aureus* phage SA4 lysin gene[J]. **J Vet Sci**, 2013, 14(1): 37-43.
- [34] MAYER M J, PAYNE J, GASSON M J, et al. Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2010, 76(16): 5415-5422.
- [35] DUNNE M, MERTENS H D, GAREFALAKI V, et al. The CD27L and CTP1L endolysins targeting *Clostridia* contain a built-in trigger and release factor[J]. **PLoS Pathog**, 2014, 10(7): e1004228.
- [36] GERVASI T, HORN N, WEGMANN U, et al. Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2014, 98(6): 2495-2505.
- [37] GERVASI T, R LO CURTO, MINNITI E, et al. Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens* [J]. **Lett Appl Microbiol**, 2014, 59(4): 355-361.
- [38] NARIYA H, MIYATA S, TAMAI E, et al. Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2011, 90(6): 1973-1979.
- [39] SEAL B S. Characterization of bacteriophages virulent for *Clostridium perfringens* and identification of phage lytic enzymes as alternatives to antibiotics for potential control of the bacterium[J]. **Poult Sci**, 2013, 92(2): 526-533.
- [40] SWIFT S M, SEAL B S, GARRISH J K, et al. A thermophilic phage endolysin fusion to a clostridium perfringens-specific cell wall binding domain creates an anti-clostridium antimicrobial with improved thermostability[J]. **Viruses**, 2015, 7(6): 3019-3034.
- [41] KONG MS RYU. Bacteriophage PBC1 and its endolysin as an antimicrobial agent against *Bacillus cereus* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2015, 81(7): 2274-2283.
- [42] YUAN Y, Q PENG M GAO. Characteristics of a broad lytic spectrum endolysin from phage BtCS33 of *Bacillus thuringiensis* [J]. **BMC Microbiol**, 2012, 12: 297.
- [43] PARK J, YUN J, LIM J A, et al. Characterization of an endolysin, LysBPS13, from a *Bacillus cereus* bacteriophage [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2012, 332(1): 76-83.
- [44] SON B, YUN V, LIM J A, et al. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4 [J]. **BMC Microbiol**, 2012, 12: 33.
- [45] SCHMELCHER M, WALDHERRM F, LOESSNER J. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2012, 93(2): 633-643.
- [46] SOLANKI K, ROVER N, DOWNS P, et al. Enzyme-based listericidal nanocomposites [J]. **Sci Rep**, 2013, 3: 1584.
- [47] ZHANG H, BAO H, BILLINGTON C, et al. Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk [J]. **Food Microbiol**, 2012, 31(1): 133-136.
- [48] SIMMONS M, MORALES C A, OAKLEY B B, et al. Recombinant expression of a putative amidase cloned from the genome of *Listeria monocytogenes* that lyses the bacterium and its monolayer in conjunction with a protease [J]. **Proteomics**, 2012, 12(1): 1-10.
- [49] SCHUCH R, LEE H M, SCHNEIDER B C, et al. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia [J]. **J Infect Dis**, 2014, 209(9): 1469-1478.
- [50] PARK Y, LIM J A, KONG M, et al. Structure of bacteriophage SPN1S endolysin reveals an unusual two-module fold for the peptidoglycan lytic and binding activity [J]. **Mol Microbiol**, 2014, 92(2): 316-325.
- [51] LYU M, WANG S, YAN G, et al. Genome sequencing and analysis of an *Escherichia coli* phage vB_EcoM-ep3 with a novel lysin, Lysep3 [J]. **Virus Genes**, 2015, 50(3): 487-497.

- [52] OLIVEIRA H, THIAGARAJAN V, WALMAGH M, et al. A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids[J]. **PLoS One**, 2014, 9(10): e108376.
- [53] BRIERS Y, WALMAGH M, VAN PUYENBROECK V, et al. Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens[J]. **MBio**, 2014, 5(4): e01379-01314.
- [54] LEGOTSKY S A, VLASOVA K Y, PRIYMA A D, et al. Peptidoglycan degrading activity of the broad-range Salmonella bacteriophage S-394 recombinant endolysin[J]. **Biochimie**, 2014, 107 Pt B: 293-299.
- [55] LIM J A, SHIN H, HEU S, et al. Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against gram-negative bacteria[J]. **J Microbiol Biotechnol**, 2014, 24(6): 803-811.
- [56] WALMAGH M, BOCZKOWSKA B, GRZYMONPREZ B, et al. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97(10): 4369-4375.
- [57] RODRIGUEZ-RUBIO L, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, et al. The phage lytic proteins from the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-phiPLA88 display multiple active catalytic domains and do not trigger staphylococcal resistance[J]. **PLoS One**, 2013, 8(5): e64671.
- [58] CELIA L K, NELSON D, KERR E. Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*[J]. **Vet Microbiol**, 2008, 130(1-2): 107-117.
- [59] SCHMELCHER M, POWELL A M, CAMP M J, et al. Synergistic streptococcal phage lambdaSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015, 99(20): 8475-8486.
- [60] DONOVAN D M, DONG S, GARRETT W, et al. Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2006, 72(4): 2988-2996.
- [61] KIM W S, H SALMK GEIDER. Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*[J]. **Microbiology**, 2004, 150: 2707-2714.
- [62] DURING K P P, FLADUNG M, LORZ H. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* [J]. **Plant J**, 1993, 3: 587-598.
- [63] OEY M, LOHSE M, SCHARFF L B, et al. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2009, 106(16): 6579-6584.
- [64] KERR D E, PLAUT K, BRAMLEY A J, et al. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice[J]. **Nat Biotechnol**, 2001, 19(1): 66-70.
- [65] WALL R J, POWELL A M, PAAPE M J, et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection [J]. **Nat Biotechnol**, 2005, 23(4): 445-451.
- [66] WALMAGH M, BRIERS Y, DOS SANTOS S B, et al. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201phi2-1 and PVP-SE1[J]. **PLoS One**, 2012, 7(5): e36991.
- [67] BRIERS Y, WALMAGH M, GRZYMONPREZ B, et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2014, 58(7): 3774-3784.
- [68] MORITA M, TANJI Y, ORITO Y, et al. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria[J]. **FEBS Lett**, 2001, 500(1-2): 56-59.
- [69] LAI M J, LIN N T, HU A, et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage varphiAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2011, 90(2): 529-539.
- [70] ENDERSEN L, GUINANE C M, JOHNSTON C, et al. Genome analysis of Cronobacter phage vB_CsaP_Ss1 reveals an endolysin with potential for biocontrol of Gram-negative bacterial pathogens[J]. **J Gen Virol**, 2015, 96: 463-477.
- [71] PLOTKA M, KACZOROWSKA A K, STEFANSKA A, et al. Novel highly thermostable endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 bacteriophage Ph2119 with amino acid sequence similarity to eukaryotic peptidoglycan recognition proteins[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2014, 80(3): 886-895.
- [72] ABEE T, KOVACS A T, KUIPERS O P, et al. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria [J]. **Curr Opin Biotechnol**, 2011, 22(2): 172-179.
- [73] SON J S, LEE S J, JUN S Y, et al. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 86(5): 1439-1449.