

# 产细菌素屎肠球菌 E6 的特性分析及发酵条件优化

饶瑜, 常伟, 唐洁, 李明元\*

(西华大学生物工程学院, 四川成都 610039)

**摘要:**研究了屎肠球菌 E6 抑菌活性的生物学特性, 并通过响应面法优化其发酵条件。结果表明, 屎肠球菌 E6 产蛋白质类细菌素, 能够抑制单增李斯特氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌生长, 在 pH3.0~7.0 条件下有明显抑菌活性, 60~121℃ 热处理 20min 后仍具有抑菌活性。通过 Box-Behnken 实验设计优化屎肠球菌 E6 发酵条件为培养时间 36.0h, 培养温度 31.0℃, 培养基 pH5.1。在此条件下, 发酵上清液抑菌圈直径可达 20.17mm, 较优化前提高了 27.2%。

**关键词:**屎肠球菌 E6, 细菌素, 生物特性, 响应曲面, 发酵条件

## Characteristics and optimization of fermentative condition for bacteriocin producing *Enterococcus Faecium* E6

RAO Yu, CHANG Wei, TANG Jie, LI Ming-yuan\*

(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

**Abstract:** The characteristics of antimicrobial activity and the fermentative condition of *Enterococcus Faecium* E6 were discussed. Proteinic bacteriocin produced by E6 showed inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. It showed obviously activity under pH3.0 ~ 7.0 condition. It was also active when heated at 60 ~ 121℃ for 20min. The fermentative condition, optimized by Box-Behnken design, was cultured at pH 5.1, temperature of 31.0℃ for 36.0h. Under this condition, the diameter of inhibition zone reached up to 20.17mm, which increased by 27.2% than optimization before.

**Key words:** *Enterococcus Faecium* E6; bacteriocin; biological characteristics; response surface; fermentative condition

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0199-04

细菌素 (Bacteriocins) 最早由 Jacob<sup>[1]</sup> 等人于 1953 年提出, 是指某些细菌产生的具有抗菌活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物。随着不断的研究表明, 细菌素是一类由核糖体合成的两性小分子多肽, 具有一定抑菌活性和抑菌范围, 热稳定性好, 对蛋白酶敏感。由于细菌素能有效抑制多种病原微生物和食物腐败菌, 能被人体蛋白酶降解, 对人体无毒副作用, 与抗生素无交叉拮抗作用, 因此将细菌素作为食品添加剂的研究已引起广泛的关注<sup>[2-3]</sup>。乳酸菌具有产细菌素的能力, 并且是食品安全级 (generally recognized as safe, GRAS) 微生物, 因此产细菌素的乳酸菌的筛选和应用于生物保鲜 (Biopreservation) 已成为国内外研究的热点<sup>[4-5]</sup>。细菌素的产量除了受菌株自身的遗传学特性决定之外, 还受培养条件影响<sup>[6-7]</sup>。本实验室从四川家庭自制泡菜中分离得到一株具有一定抑菌活性的乳酸菌——屎肠球菌 E6。

为了进一步将该菌株进行实际应用, 本研究探讨了屎肠球菌 E6 的抑菌特性, 并采用了响应曲面法<sup>[8-9]</sup>对屎肠球菌 E6 的发酵条件进行了优化, 并采用 Design Expert 统计分析软件分析了产细菌素的最佳条件, 为该菌株的进一步开发利用奠定科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

屎肠球菌 E6 从泡菜中筛选得到的一株产细菌素乳酸菌, 用 MRS 培养基<sup>[10]</sup> 培养; 指示菌及所用培养基如表 1 所示; 蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、琼脂 北京奥博星生物技术有限责任公司; 葡萄糖、吐温 80、乙酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、柠檬酸二胺 成都市科龙化工试剂厂; 蛋白酶 K、胰蛋白酶 Sigma 公司; 胃蛋白酶、木瓜蛋白酶 Merck 公司。

SGSP-02 电热恒温隔水式培养箱 黄石市恒丰医疗器械有限公司; SW-CJ-2F 双人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司; LDZX-40AI 立式自动压力蒸汽灭菌锅 上海三申医疗核子仪器厂; 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 高速离心机 Eppendorf; PHS-3C 酸度计 方舟科技; 游标卡

收稿日期: 2012-09-13 \* 通讯联系人

作者简介: 饶瑜 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 西华大学重点科研基金项目 (Z1120536)。

表1 屎肠球菌 E6 对指示菌的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activity of *E.faecium* E6 to the indicator strains

指示菌	来源	培养基	抑菌直径(mm)
单增李斯特氏菌( <i>Listeria monocytogenes</i> )	实验室保存	肉汤培养基 <sup>[10]</sup>	12.55 ± 0.18
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	CICC 21525	LB 培养基 <sup>[10]</sup>	13.73 ± 0.25
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	ATCC 6538	LB 培养基	14.26 ± 0.15
枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	CICC 20551	LB 培养基	15.79 ± 0.22

注: CICC, 中国工业微生物菌种保藏管理中心; ATCC, 美国模式培养物集存库; 抑菌圈直径包括牛津杯外径 8.00mm。

表2 不同蛋白酶对屎肠球菌 E6 发酵上清液抑菌活性的影响

Table 2 Influence of different proteinases on antimicrobial activity of free cell supernatants from *E.faecium* E6

酶处理	对照组	胰蛋白酶	胃蛋白酶	木瓜蛋白酶	蛋白酶 K
抑菌圈直径(mm)	15.95 ± 0.23	15.48 ± 0.15	8.06 ± 0.04	11.82 ± 0.12	12.44 ± 0.17

注: 抑菌圈直径包括牛津杯外径 8.00mm; 表 3~表 5 同。

表4 温度对屎肠球菌 E6 发酵上清液抑菌活性的影响

Table 4 Influence of different temperatures on antimicrobial activity of free cell supernatants from *E.faecium* E6

加热温度(℃)	60	80	100	121
抑菌直径(mm)	15.64 ± 0.20	13.82 ± 0.51	13.08 ± 0.63	10.24 ± 0.26

尺 成都量具刃具总厂。

## 1.2 实验方法

1.2.1 发酵液的制备 将冷冻保藏的屎肠球菌 E6 划线于 MRS 固体培养基中, 37℃ 培养过夜; 挑取单克隆于 5mL 液体培养基, 30℃ 静置培养过夜。1% 接种于 20mL MRS 液体培养基 (pH6.0, 50mL 锥形瓶), 30℃ 静置培养 24h, 10000r/min 离心 10min, 取上清液, 4℃ 保存备用。

1.2.2 抑菌实验 采用牛津杯扩散法测定发酵液的抑菌能力。取 50μL 新鲜培养的指示菌 (OD<sub>600nm</sub> = 0.5) 涂布固体培养基, 将菌液涂干后, 用无菌镊子将已灭菌的牛津杯轻压放置于平板上。取制备好的发酵液, 用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调 pH 至 6.0, 吸取 250μL 加入牛津杯中, 37℃ 培养 24h 后, 用游标卡尺测量抑菌圈 (其中牛津杯外径为 8.00mm), 测量三次取平均值。

1.2.3 细菌素特性分析 本实验指示菌为枯草芽孢杆菌。分别配制 1mg/mL 的蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶, 将各种酶与等体积的发酵上清液混合, 对照为无蛋白酶, 置 37℃ 保温 1h, 进行抑菌实验, 测量抑菌直径; 取等量的发酵上清液, 用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 将 pH 分别调至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, 对照分别为 pH3.0、5.0、7.0 的 MRS 液体培养基, 进行抑菌实验, 测量抑菌直径; 分别将等量的发酵上清液在 60、80、100、121℃ 加热 20min 后, 进行抑菌实验, 测量抑菌直径。

1.2.4 响应面法优化屎肠球菌 E6 发酵条件 在单因素实验结果的基础上, 选取培养时间 (h), 培养温度 (℃) 和培养基 pH 三个因素, 运用 Design-Expert 7.1.6 软件, 采用 Box-Behnken 设计, 以抑菌圈直径 (mm) 为响应值进行实验, 所有实验点重复 3 次, 实验设计如表 5 所示。根据实验结果拟合得到一个二阶经验方程, 用以确定各因素对发酵上清液抑菌活性的影响, 最终确定屎肠球菌 E6 产细菌素的最优培

养条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 屎肠球菌 E6 发酵上清液的抑菌谱

屎肠球菌 E6 发酵上清液对指示菌的抑菌谱见表 2。结果表明, 屎肠球菌 E6 发酵上清液对部分 G<sup>+</sup> 和 G<sup>-</sup> 菌均有抑制, 抑菌谱较广泛。

### 2.2 屎肠球菌 E6 发酵上清液对酶的敏感性和对温度、pH 的稳定性

如表 2 所示, 屎肠球菌 E6 发酵上清液对胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 敏感, 尤其经胃蛋白酶处理的发酵上清液, 抑菌圈的直径降为 (8.06 ± 0.04) mm。胰蛋白酶对抑菌圈直径影响较小。该实验结果表明屎肠球菌 E6 发酵上清液中具有抑菌活性的物质为蛋白质类化合物, 即细菌素。

屎肠球菌 E6 发酵上清液在酸性条件下 (pH3.0~7.0) 具有较高的抑菌活性, 在碱性条件下抑菌活性有所降低 (如表 3 所示)。屎肠球菌 E6 发酵上清液在 60℃ 加热 20min 后抑菌圈直径为 (15.64 ± 0.20) mm, 随着处理温度升高, 抑菌活性有所降低; 于 121℃ 加热 20min 后, 抑菌圈直径降为 (10.24 ± 0.26) nm, 但仍具有抑菌活性 (如表 4 所示)。

表3 pH 对屎肠球菌 E6 发酵上清液抑菌活性的影响

Table 3 Influence of different pH values on antimicrobial activity of free cell supernatants from *E.faecium* E6

pH	抑菌圈直径(mm)	
	对照组	发酵上清液
3.0	13.21 ± 0.09	24.25 ± 0.31
5.0	8.00 ± 0.00	18.86 ± 0.25
7.0	8.00 ± 0.00	15.52 ± 0.17
9.0	-	12.34 ± 0.12
11.0	-	10.02 ± 0.11

### 2.3 响应面实验优化屎肠球菌 E6 发酵条件

采用培养基 pH, 培养温度 (℃) 和培养时间 (h)

三个因素进行响应曲面实验设计的结果如表 5 所示,对实验数据进行多元回归拟合,得到抑菌圈直径(Y)对自变量培养时间(A)、培养温度(B)和 pH(C)的二次多项式回归模型方程为

$$Y = 20.22 - 0.097A + 0.31B + 0.54C - 0.92AB - 0.64AC + 0.37BC - 3.08A^2 - 1.08B^2 - 2.24C^2 \quad \text{式(1)}$$

该回归方程的相关系数  $R^2 = 0.9681$ ,说明该模型能够与实际实验结果有 96.81% 的符合度,修正相关系数  $R^2_{adj} = 0.9108$ ,说明此模型可信度较高。对实验设计中的一次项、交互项和二次项进行方差分析的结果见表 6,设计模型的  $p = 0.0031$ ,值小于 0.01,表明该模型极显著;失拟系数( $p = 0.1482$ )大于 0.05,说明失拟相对误差不显著。分析结果表明,该模型拟合程度良好,可利用此模型进行发酵条件的分析预测。

表 5 响应面实验设计及结果

Table 5 Design and results of response surface tests

实验号	A 培养时间 (h)	B 培养温度 (°C)	C pH	抑菌圈直径 (mm)
1	1(48)	-1(25)	0(5)	16.89
2	-1(24)	0(30)	1(6)	15.86
3	-1	1(35)	0	17.07
4	0(36)	0	0	19.97
5	-1	-1	0	15.36
6	0	-1	-1(4)	16.16
7	1	0	-1	15.23
8	0	0	0	20.12
9	-1	0	-1	13.25
10	1	0	1	15.28
11	1	1	0	14.92
12	0	-1	1	16.25
13	0	1	-1	16.81
14	0	0	0	20.58
15	0	1	1	18.38

表 6 回归模型方差分析表

Table 6 The variance analysis for regression model

方差来源	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	F 值	p 值
模型	60.53	9	6.73	16.88	0.0031
A	0.076	1	0.076	2.62	0.6804
B	0.79	1	0.79	1.68	0.2172
C	2.33	1	2.33	2.08	0.0601
AB	3.39	1	3.39	8.64	0.0332
AC	1.94	1	1.94	2.00	0.0984
BC	0.55	1	0.55	0.83	0.2939
A <sup>2</sup>	35.01	1	35.01	42.31	0.0002
B <sup>2</sup>	4.34	1	4.34	6.09	0.0215
C <sup>2</sup>	18.51	1	18.51	33.72	0.0010
残差值	1.99	5	0.40		
失拟性	1.79	3	0.60	5.91	0.1482
纯误差	0.20	2	0.10		
总离差	62.52	14			

注: $p < 0.05$  为显著差异; $p < 0.01$  为极显著差异。

根据回归分析的结果作出响应曲面图,如图 1 所示。由图 1-A 可知,培养温度与培养时间交互作用显著。不同培养时间条件下,达到最大抑菌直径的培养温度有所不同。在培养时间和培养温度较小的情况下,抑菌圈直径随着培养时间和培养温度的增加而增加,当培养时间超过 35.7h,培养温度超过 30.9°C 时,抑菌活性达到最大,随即逐渐下降。

由图 1-B 可知,培养时间和 pH 交互影响不显著,pH 不变时,抑菌活性随着培养时间的增加而增加,培养时间超过 35.7h 时,抑菌活性达到最大,再随着培养时间的增加曲面坡度下降。pH 对产生最大抑菌直径的最佳培养时间影响不大。

由图 1-C 可知,pH 和培养温度交互影响不显著,pH 的变化对产生最大抑菌直径的最佳培养温度影响不大。pH 一定时,抑菌活性先随温度升高而增加,超过 30.9°C 后,抑菌活性开始降低。

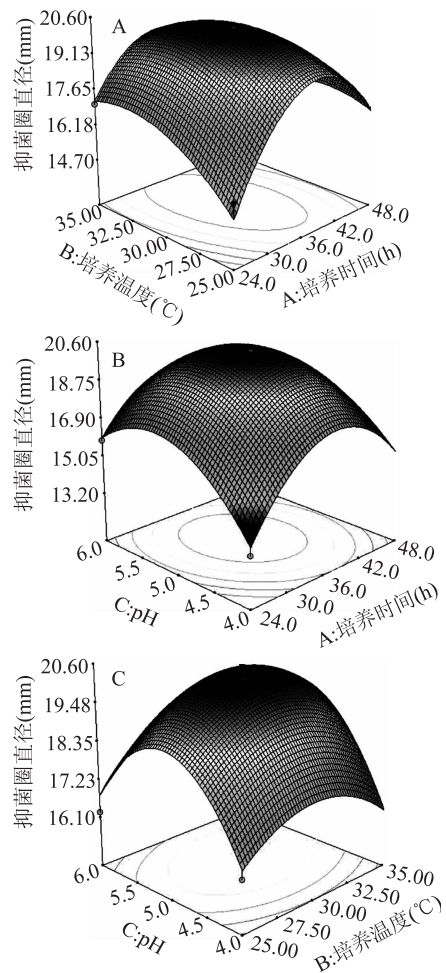


图 1 各因素对屎肠球菌 E6 发酵上清液抑菌活性影响的响应曲面图

Fig.1 Response surface plot for antibacterial activity of free cell supernatants from *E.faecium* E6 effected by three factors

## 2.4 验证实验

根据回归模型方程(1),可得屎肠球菌 E6 的最佳发酵条件为培养时间 35.7h,培养温度 30.9°C,培养基 pH 为 5.14。在此条件下抑菌圈直径可达到 20.28mm。为了方便实际操作,将最优发酵条件修正

(下转第 218 页)



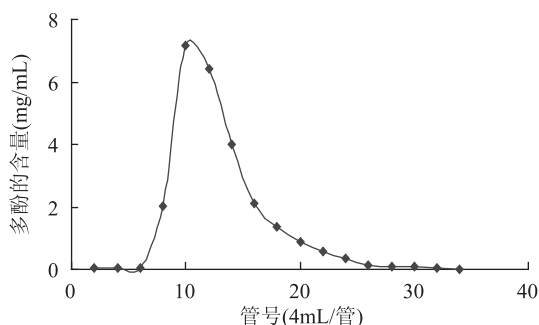


图8 NKA-9大孔树脂动态洗脱曲线

Fig.8 Dynamic elution curve of NKA-9 resin

3.2 当样液多酚浓度为 1.2mg/mL, pH 为 2 时,以 1.0mL/min 的流速上样, NKA-9 型树脂对番石榴多酚的吸附率最高, 达到 90.5%。

3.3 以 50% 的乙醇作为洗脱剂, pH 为 3, 洗脱速度为 1mL/min 时, 洗脱效果较好, 洗脱率可达 89.3%, 洗脱液经过冷冻干燥, 多酚纯度达到 46.5%。

### 参考文献

[1] 温靖, 徐玉娟, 肖更生, 等. 番石榴果实的营养价值和药理作用及其加工利用[J]. 农产品加工学刊, 2009(6): 11-13.

[2] 姚瑞祺. 植物多酚的分类及生物活性的研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2011(4): 99-100.

[3] Melo PS, Bergamaschi KB, Tiveron AP, et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues [J]. Ciencia Rural, 2011, 41(6): 1088-1093.

[4] 杜晓. 大孔树脂技术在中草药分离纯化中的应用[J]. 青海大学学报, 2012(1): 62-65.

[5] 熊何健, 吴国宏. 大孔树脂分离纯化葡萄多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(11): 74-77.

[6] 周文亮, 孙蕴哲, 唐星. 大孔树脂纯化柿叶总黄酮工艺考察[J]. 中国药理学杂志, 2008, 6(5): 276-282.

[7] 姚瑞祺. 青果多酚的提取、分离及体外抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2009.

[8] 周跃勇, 王岸娜, 吴立根. 大孔吸附树脂分离纯化猕猴桃中多酚的优选研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2007, 28(5): 32-36.

[9] 王振宇, 刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(4): 21-24.

[10] 艾志录, 王育红, 王海, 等. 大孔树脂对苹果渣中多酚物质的吸附研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(8): 245-248.

[11] 刘丽香. 甘薯叶中多酚提纯工艺及抗氧化活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

(上接第 201 页)

为培养时间 36.0h, 培养温度 31.0℃, 培养基 pH 为 5.1, 结果获得的抑菌圈直径为 (20.17 ± 0.24) mm, 与预测值的相对误差为 0.5%。原有发酵条件为培养时间 24.0h, 培养温度 30.0℃, 培养基 pH 为 6.0, 所得抑菌圈直径为 (15.86 ± 0.21) mm, 优化后发酵条件比原发酵条件提高了 27.2%。结果表明该响应面法优化得到的发酵条件稳定可靠。

### 3 结论

3.1 抑菌谱研究表明, 屎肠球菌 E6 发酵上清液能够抑制单增李斯特氏菌 ( $G^+$ )、大肠杆菌 ( $G^-$ )、金黄色葡萄球菌 ( $G^+$ ) 和枯草芽孢杆菌 ( $G^-$ )。蛋白酶敏感性实验表明, 发酵上清液中具有抑菌活性的物质为蛋白质类化合物, 即细菌素, 且该细菌素对蛋白酶敏感, 对胰蛋白酶不敏感。该细菌素在酸性条件下有明显的抑菌活性, 经热处理 20min 后仍有抑菌活性, 但随着处理温度的升高, 抑菌活性有所降低。

3.2 响应面法优化并修正的屎肠球菌 E6 发酵条件为培养时间 36.0h, 培养温度 31.0℃, 培养基 pH 为 5.1, 该条件下发酵上清液抑菌圈直径达到 20.17mm, 比原有条件提高了 27.2%。本研究对屎肠球菌 E6 的进一步实际应用提供了科学基础。

### 参考文献

[1] Jacob F, Lwaff A, Siminonvich A, et al. Definition de quelques terms relatifs à la lysogenie [J]. Annales de Institut Pasteur, 1953, 84: 222-224.

[2] Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate

immunity for food [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(10): 777-788.

[3] 田晓乐, 孟庆繁, 周杰, 等. 微生物防腐剂——细菌素的研究与应用[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 120-123.

[4] Jiang Jie, Shi Bo, Zhu Deqiang, et al. Characterization of a novel bacteriocin produced by Lactobacillus sakei LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish [J]. Food Control, 2012, 23(2): 338-344.

[5] Dal Bello B, Coccolin L, Zeppa G, et al. Technological characterization of bacteriocin producing Lactococcus lactis strains employed to control Listeria monocytogenes in Cottage cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1-2): 58-65.

[6] Cheigh Chan-Ick, Choi Hak-Jong, Park Hoon, et al. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis A164 isolated from kimchi [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 95(3): 225-235.

[7] Evrim Gunes Altuntas, Serap Cosansu, Kamuran Ayhan. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain Pediococcus acidilactici 13 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(1-2): 28-31.

[8] 罗海, 唐洁, 汪静心, 等. 响应曲面法优化乳杆菌产细菌素的条件研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 163-166.

[9] 陈琳, 孟祥晨. 响应面法优化植物乳杆菌代谢产细菌素的发酵条件[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 176-180.

[10] 李玉锋, 唐洁, 车振明. 工科微生物学实验[M]. 成都: 西南交通大学出版社, 2007: 28-36.