

## I. Tổng quan về Enterocin

Ảnh hưởng của các loại enzyme, pH, nhiệt độ lên hoạt tính của enterocin từ *Enterococcus faecium* JCM 5804

Tác nhân	Hoạt tính của enterocin
Enzyme	Proteinase K, trypsin, $\alpha$ -chymotrypsin, papain
	-
	Lysozyme, $\beta$ -glucosidase, lipase, catalase
pH	2-10
	+
Nhiệt độ	50°C (10, 30, 60 phút); 75°C (10, 30, 60 phút); 100°C (10, 30 phút)
	+
	100°C (60 phút) 121°C (15 phút)
	-

## I. Tổng quan về Enterocin

### 1.2 Phân loại

Enterocin

Nhóm 1: Lantibiotic enterocin

Nhóm 2: small, nonlantibiotic peptides

Nhóm 3: cyclic enterocins

Nhóm 4: large proteins

## I. Tổng quan về Enterocin

### 1.2 Phân loại

Một số cách phân loại bacteriocin từ loài *Enterococcus*

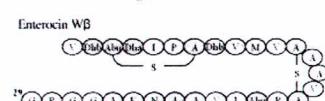
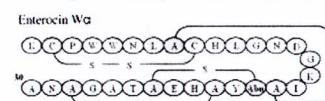
Class	Klaenhammer [2]	Cotter et al. [5]	Heng and Tagg [23]	Franz et al. [24] (Proposed Classification for enterocins)	Examples Bacteriocin/producer strain (genus and species)
I	Lantibiotics	Lantibiotics	Lantibiotics	Lantibiotic enterocins	Cytolysin <i>E. faecalis</i>
IIa	Pediocin-like or active against <i>Listeria</i> , consensus sequence (YNGVGXC) near N-terminus and leader peptide GG	Pediocin-like or active against <i>Listeria</i> , consensus sequence (YNGVGXC) near N-terminus and leader peptide GG	Pediocin-like or active against <i>Listeria</i> , consensus sequence (YNGVGXC) near N-terminus and leader peptide GG	Pediocin family of enterocins active against <i>Listeria</i> , consensus sequence (YNGVGXC) near N-terminus and leader peptide GG	Enterocin A/ <i>E. faecium</i>
IIb	Two peptides, with leader peptide GG	Two peptides, with leader peptide GG	Two peptides with leader peptide GG	Enterocins synthesized without leader peptide	Enterocin L50A/ <i>E. faecium</i>
IIc	Peptides with thiol group (SH) and leader peptide GG	Cyclic peptides	—	Other linear enterocins not from the pediocin family	Enterocin B/ <i>E. faecium</i>
IID	—	Lineal and single peptide bacteriocins (not pediocins)	Non-pediocins	—	—
IIIa	Large thermostable proteins	Bacteriolytic	Bacteriolytic	Cyclic peptides	Enterocin AS48/ <i>E. faecalis</i>
IIIb	—	—	Non-lytic	—	—
IV	Protein complexes	—	Cyclic peptides	Large proteins	Enterolysine A/ <i>E. faecalis</i>

## I. Tổng quan về Enterocin

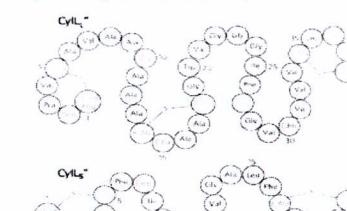
### 1.2 Phân loại

#### Nhóm I: Lantibiotic enterocin

- Chứa peptide (<5kDa) bền nhiệt, sau biến đổi hậu dịch mã chứa các nhóm dehydro-axit amin, thioether amino acids (dehydroalanine, dehydrobutyryne, lanthionine and  $\beta$ -methyl-lanthionine).



Enterocin W



Cytolysin

## I. Tổng quan về Enterocin

### 1.2 Phân loại

#### Nhóm II: Small, nonantibiotic peptides

- Peptide chịu nhiệt (<10kDa), mạch thẳng, không chứa nhóm lanthanionine, không cần biến đổi hậu dịch mã.
- Chia thành 3 nhóm nhỏ:
  - Polypeptide giống pediocin kháng *Listeria*. Đầu N có trình tự Tyr-Gly-Asn-Gly-Val (YGNGV - «pediocin box»)
  - Có peptide dẫn
  - VD: Enterocin A, enterocin P...
- Cắn kết hợp của 2 polypeptide để có hoạt tính.
- Không có trình tự dẫn → cản hẽ thông xuất ngoại bào đặc hiệu có ABC transporters
- VD: Enterocin L50A, enterocin Q

Nhóm IIa

Nhóm IIb

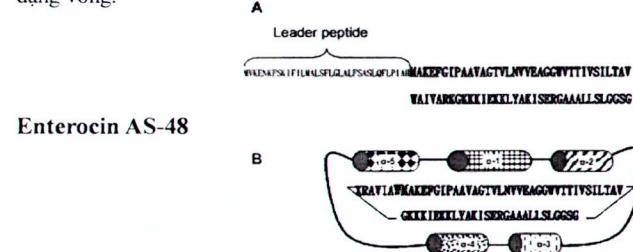
Nhóm IIc

## I. Tổng quan về Enterocin

### 1.2 Phân loại

#### Nhóm III: Cyclic enterocins

- Polypeptide sau dịch mã được biến đổi cắt đoạn dẫn và nối 2 đầu thành dạng vòng.



#### Nhóm IV: large proteins

- Kích thước lớn, phức hợp gồm cả lipid, gluco(enterolysin A hơn 30kDa)

## I. Tổng quan về Enterocin

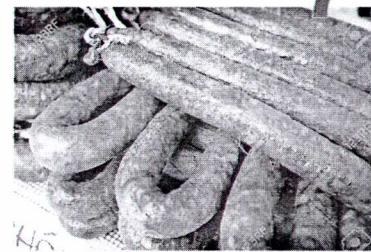
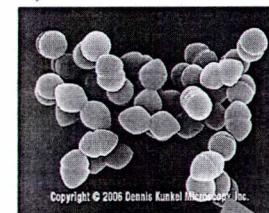
### 1.3 Ứng dụng

- Ứ thực phẩm với giống bao vệ (thường là vi khuẩn lactic - LAB: Lactic acid bacteria) để tạo bacteriocin in situ. Trong trường hợp này, khả năng LAB sinh trưởng và tạo bacteriocin trong sản phẩm sẽ quyết định khả năng kéo dài thời gian bảo quản thực phẩm.
- Bổ sung bacteriocin tinh chế hay bán tinh chế như là các chất bảo quản thực phẩm.
- Sử dụng bán thành phẩm lên men trước đó với một chủng sinh bacteriocin trong quá trình chế biến thực phẩm.
- Hiện nay, các nhà khoa học còn hướng tới việc tạo màng polythen hoạt tính có gắn bacteriocin để đóng gói thực phẩm

## II. Giới thiệu về Enterocin P

### 2.1 Đặc tính

1997

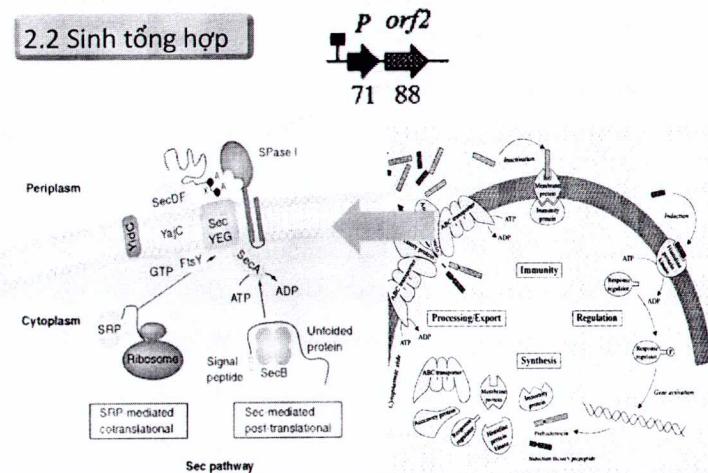
*Enterococcus faecium P13*

## 2.1 Đặc tính

- Giải trình tự Edman: 44 axit amin, 4493Da  
ATRSYNGVY NNSK C WVNWGEAKENIAGIVISGW ASGLAGMGH
- Bền nhiệt (100°C-60 phút, 121°C-15 phút)
- Bền với các pH cực trị (pH 2-11, trong 24h ở 25°C); pIa: 8.3.
- Chịu muối NaCl 6.5%
- Không bị mất hoạt tính khi làm đông và rã đông, bảo quản lâu ở 4 và -20°C

## II. Giới thiệu về Enterocin P

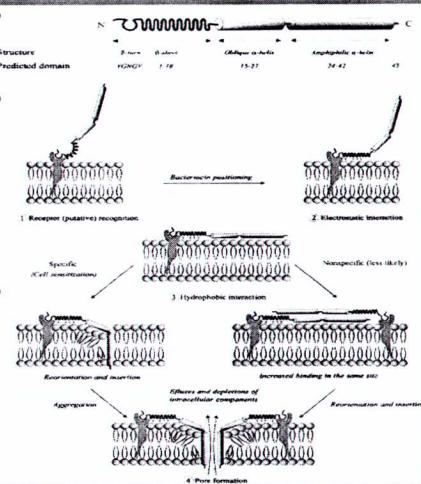
### 2.2 Sinh tổng hợp



## II. Giới thiệu về Enterocin P

### 2.3 Cơ chế tác dụng

- Hầu hết các vi khuẩn gây bệnh và làm hỏng thực phẩm Gram + đều bị ức chế với ngưỡng MIC 4-559 ng/ml
- Chủ yếu kháng *Listeria*, *Clostridium*, và *Staphylococcus*



## II. Giới thiệu về Enterocin P

### 2.4 Phương pháp phân tích

#### Sinh

Nuôi chủng cản kiểm tra bacteriocin cùng sinh vật kiểm định arbitrary units (AU); bacteriocin units (BU)

#### Di truyền

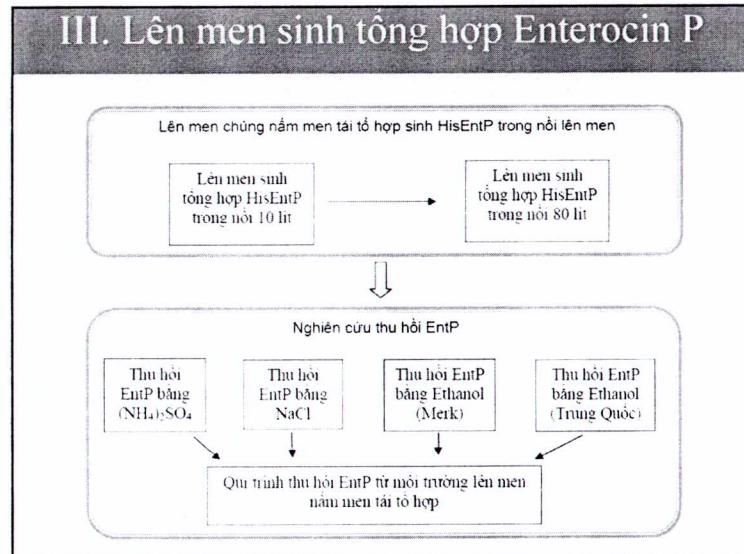
PCR hoặc Southern blotting

Phát hiện chủng có mang gen mã hóa bacteriocin

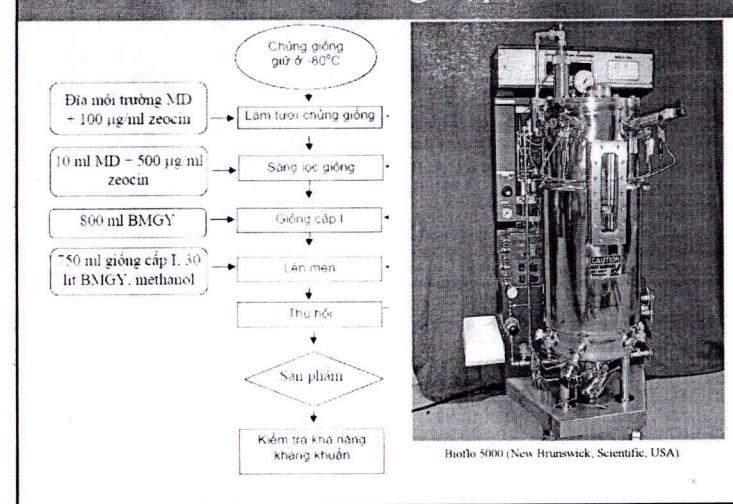
#### Miễn dịch

Phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa dịch có bacteriocin và kháng nguyên

### III. Lên men sinh tổng hợp Enterocin P



### III. Lên men sinh tổng hợp Enterocin P



### III. Lên men sinh tổng hợp Enterocin P

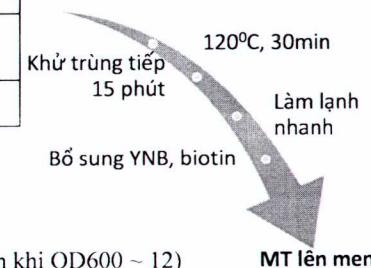
#### 3.1 Môi trường nhân giống cấp 1

STT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Glycerol	1
2	Yeast extract	1
3	Pepton	2
4	YNB	1.34
5	Biotin	$4 \times 10^{-5}$

- Nhiệt độ:  $30^{\circ}\text{C}$
- Lắc: 250 rpm
- Thời gian: 2 ngày (hoặc đến khi OD600 ~ 12)

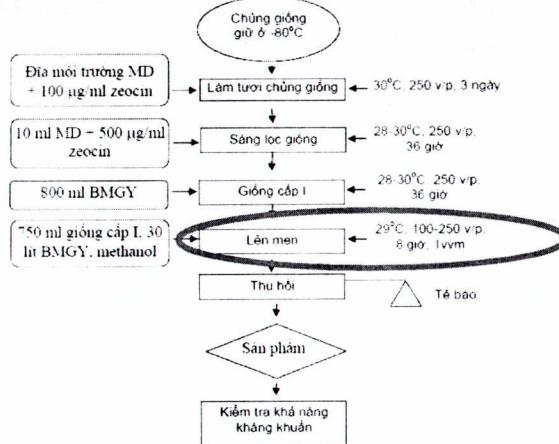
#### 3.2 Môi trường lên men

STT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Glycerol	4
2	Yeast extract	1
3	Pepton	2



- Nhiệt độ:  $29^{\circ}\text{C}$
- Lắc: 250 rpm
- Thời gian: 2 ngày (hoặc đến khi OD600 ~ 12)

### 3.3 Lên men



BD: Tiếp giống

- Duy trì nhiệt độ lên men ở 29°C

### 3.3 Lên men

GD 1: Trong 20h

- Khuấy: 100 rpm
- Duy trì pH 6 – 6.7
- Sức khí: 1vvm

GD 2: 21-24h

- Khuấy: 200 rpm
- Duy trì pH và sức khí

GD 3: Sau 24h

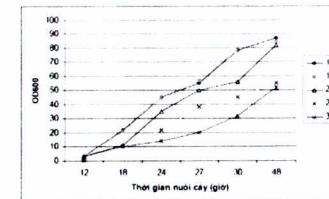
- Bổ sung methanol
- Khuấy: 250 rpm
- pH tự do

### 3.4 Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình lên men

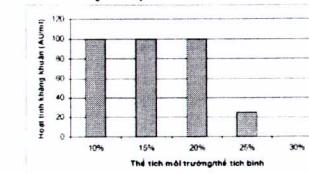
Parameter	Reason
Temperature (30.0°C)	Growth above 32°C is detrimental to protein expression
Dissolved oxygen (>20%)	<i>Pichia</i> needs oxygen to metabolize glycerol and methanol
pH (5.0-6.0 and 3.0)	Important when secreting protein into the medium and for optimal growth
Agitation (500 to 1500 rpm)	Maximizes oxygen concentration in the medium
Aeration (0.1 to 1.0 vvm*	Maximizes oxygen concentration in the medium which depends on the vessel
Antifoam (the minimum needed to eliminate foam)	Excess foam may cause denaturation of your secreted protein and it also reduces headspace
Carbon source (variable rate)	Must be able to add different carbon sources at different rates during the course of fermentation

\* volume of oxygen (liters) per volume of fermentation culture (liters) per minute

### 3.4.1 Ảnh hưởng của nồng độ oxy



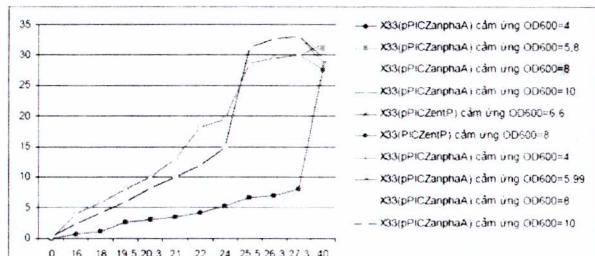
Hình 3.36: Khả năng sinh trưởng của chủng nấm men *P. pastoris* X33 mang gen his4P trong các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau.



Hình 3.37: Hạn chế kháng *L. monocytogenes* từ dịch nuôi cấy *P. pastoris* X33 tại thể tích khi được nuôi cấy trong các thể tích môi trường nuôi cấy khác nhau.

### 3.4.2 Thời gian cảm ứng

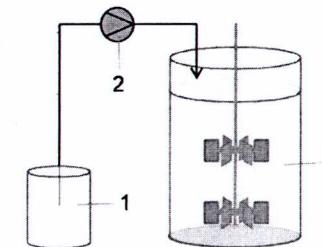
Tiến hành cảm ứng với 0,4% methanol, 0,2% glycerol ở OD<sub>600</sub> khoảng 4, 6, 8, 10.



Hình 3.33. Sự sinh trưởng của các chủng nấm men tái tổ hợp khi được cảm ứng ở các thời điểm khác nhau.

### 3.4.3 Nâng cao sản lượng EntP bằng cách lên men fed-batch

- Các chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường MD và cấy chuyên sang môi trường BMGY (1% glycerol)
- Khi OD<sub>600</sub> ~ 7 thì bổ sung thêm 4,2% glycerol trong hỗn hợp GYT (500g glycerol + 500g (40% pepton, 20% yeast extract))
- Nuôi đến OD<sub>600</sub>~50.
- Mẫu được chia làm hai lô để cảm ứng:
  - lô 1 được cảm ứng với 4% methanol chia làm ba lần cảm ứng
  - lô 2 được cảm ứng với 0.8 % glycerol, 3.2% methanol.
- Tất cả các mẫu đều bổ sung thêm với cazamino acid. Mẫu dịch nuôi cấy được thu 6 giờ và 17 giờ sau cảm ứng.



### 3.4.4 Nâng cao sản lượng EntP bằng cách lên men fed-batch

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng của chủng tái tổ hợp khi được bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng trong quá trình lên men.

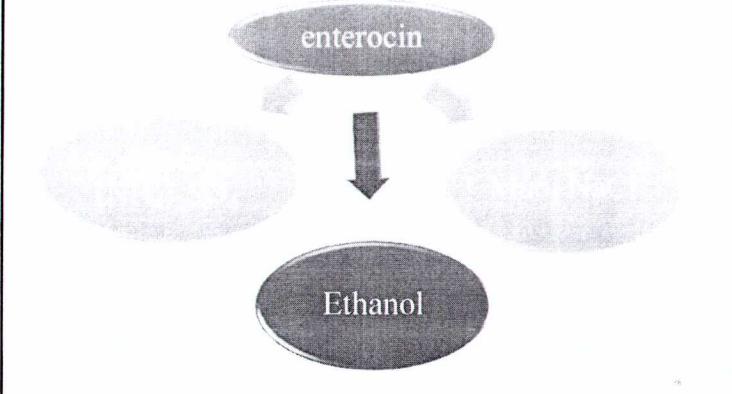
	Cảm ứng glycerol+methanol			Cảm ứng với methanol		
	X33	EntP	HisEnt	X33	EntP	HisEnt
OD sau 6 giờ cảm ứng	62	74	80	76	90	83
OD sau 17 giờ cảm ứng	67	66	74	73	76	80

Bảng 3.2. Hoạt tính kháng *S. aureus* từ dịch nuôi cấy môi trường lên men.

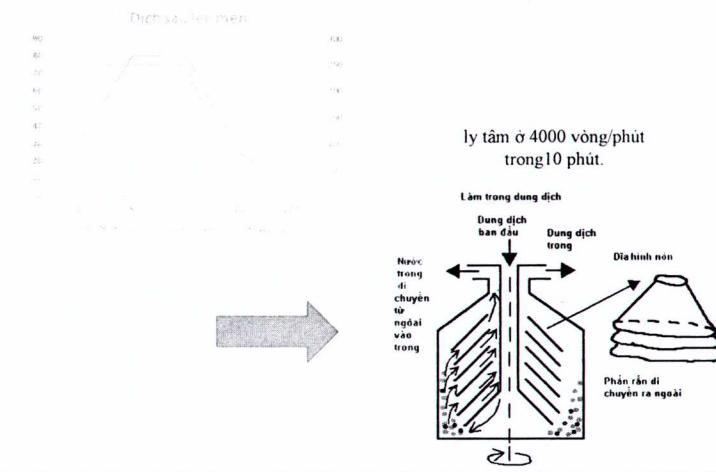
AU/ml môi trường	Mẫu thu 6 giờ				Mẫu thu 17 giờ							
	X1	E1	H1	N2	E2	H2	X1	E1	H1	X2	E2	H2
0	50	25	0	0	0	0	50	25	0	50	50	50
50												

Mẫu ghi số 1 là mẫu cảm ứng với methanol, mẫu ghi số 2 là mẫu được cảm ứng methanol và glycerol.

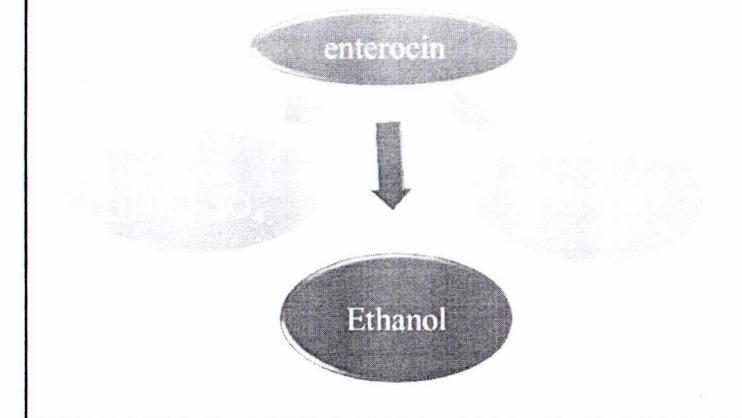
## IV. Nghiên cứu thu hồi enterocin tái tổ hợp



#### 4.1 Xử lý dịch sau quá trình lên men



#### 4.2 Nghiên cứu thu hồi enterocin tái tổ hợp



##### 4.2.1 Thu hồi enterocin từ môi trường bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- Thu hồi enterocin từ môi trường bằng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Bước 1: Bổ sung từ từ muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - Bước 2: Ly tâm
  - Bước 3: hòa vào đệm phosphate 10 mM, pH 7.0
  - Bước 4: Loại muối bằng thâm tích

##### 4.2.1 Thu hồi enterocin từ môi trường bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Nồng độ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tua	AU thu hồi từ 1ml dịch						
	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
X33-hisentP	25	0	1	0.5	1	0	0

KL: enterocin được tua tốt ở nồng độ amonium sulfate từ 30% đến 40%. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi rất thấp, chỉ đạt khoảng 4%

#### 4.2.2 Thu hồi enterocin từ môi trường bằng muối NaCl

AU thu hồi từ 1ml dịch							
Nồng độ muối ( $\text{NH}_4\text{}_2\text{SO}_4$ tua)	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
X33-hisentP	25	0	1	0.5	1	0	0

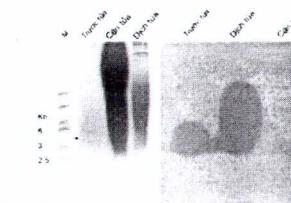
Hoạt tính kháng khuẩn của HisEntP trong các phân đoạn tua bằng muối NaCl.

Nồng độ NaCl (%)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.4	1.6
Hoạt tính kháng <i>S. aureus</i> (AU/ml)	50	0	5	7.5	2.5	0	0	0
Hiệu suất thu hồi (%)	0	10	15	5	0	0	0	0

#### 4.2.3 Thu hồi enterocin từ môi trường bằng ethanol

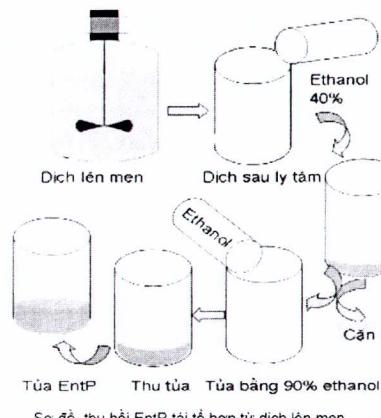
Hoạt tính kháng *S. aureus* của HisEntP trong các phân đoạn tua bằng ethanol

% ethanol	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
AU/ml	50	0	0	0	0	0	0	2.5	10	50
Hiệu suất	0	0	0	0	0	0	5%	20%	100%	

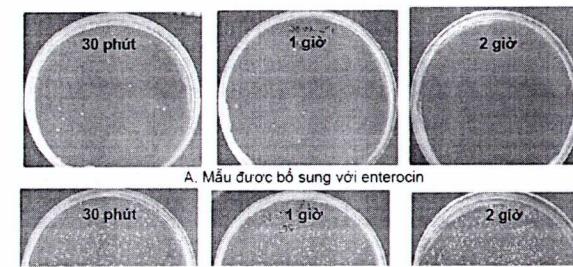


Hình 3.52. Phân tích protein trong các phân đoạn tua môi trường nuôi cấy nấm men sinh tổng hợp HisEntP bằng ethanol Trung Quốc.  
A: Protein trên gel điện di Tricine SDS-PAGE; B: Gel được phủ với vi khuẩn *L. monocytogenes*.

#### 4.2.3 Thu hồi enterocin từ môi trường bằng ethanol



#### 4.3 Xác minh khả năng diệt khuẩn của chế phẩm enterocin



Khả năng diệt *L. monocytogenes* của chế phẩm enterocin theo thời gian

Mẫu	Số lượng vi khuẩn <i>L. monocytogenes</i> (cfu/ml)					
	30 phút	1 giờ	2 giờ	4 giờ	6 giờ	20 giờ
HisnetP	$2.4 \cdot 10^4$	$2.4 \cdot 10^4$	0	0	0	0
Đối chứng	$9 \cdot 10^5$	$9.5 \cdot 10^5$	$1.7 \cdot 10^6$	$7.3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$7.5 \cdot 10^9$

#### 4.4 Phô kháng khuẩn của chế phẩm enterocin

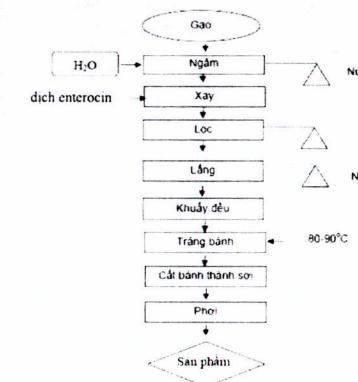
Bảng 3.7 Phô kháng khuẩn của chế phẩm enterocin

Số	Tên chủng	Ký hiệu chủng	Nguồn	Môi trường	AU (unit/ml)
1	<i>Bacillus subtilis</i>		PTHTSH	LB	0
2	<i>Bacillus subtilis</i>		KTDT	LB	0
3	<i>Bacillus cereus</i>		PTHTSH	LB	0
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	KTDT	MRS	0
5	<i>L. plantarum</i> A98	JCM1048	KTDT	MRS	0
6	<i>L. plantarum</i> A17	JCM1230	KTDT	MRS	0
7	<i>L. plantarum</i> B33	N4	BTGCVSV	MRS	0
8	<i>L. plantarum</i> B14	LpA98	KTDT	MRS	0
9	<i>L. algens</i>	Lp A17	KTDT	MRS	0
10	<i>L. salivarius</i>	Lp B33	KTDT	MRS	0
11	<i>L. fermentum</i>	Lp B14	KTDT	MRS	400
12	<i>Enterococcus faecium</i>	JCM5804	KTDT	MRS	600
13	<i>Enterococcus faecium</i>	B650	BTGCVSV	MRS	400
14	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Str Themo	KTDT	LB	0
15	<i>Staphylococcus aureus</i>		PTHTSH	LB	800
16	<i>Staphylococcus aureus</i>		PKTDT	LB	400
17	<i>Listeria monocytogenes</i>		PKTDT	BHI	800
18	<i>Escherichia coli</i> NC31	EcNC 31	PKTDT	LB	0
19	<i>E. coli</i> NC22	EcNC22	PKTDT	LB	0
20	<i>E. coli</i> NC10	EcNC10	PKTDT	LB	0
21	<i>E. coli</i> NC11	EcNC11	PKTDT	LB	0
22	<i>E. coli</i> K12TG1	ECK12TG1	PKTDT	LB	0
23	<i>E. coli</i> LCB	ECLCB	PKTDT	LB	0

PTHTSH: phòng thí nghiệm sinh học, Viện Hồi học  
BTGCVSV: Bảo tàng giông chua Vi sinh vật

#### Một số ứng dụng của chế phẩm enterocin trong thực phẩm

##### 1. Bảo quản bánh phở bằng chế phẩm enterocin



##### 1. Bảo quản bánh phở bằng chế phẩm enterocin

Bảng 2.40 Bảo quản bánh phở bằng chế phẩm enterocin ở các nồng độ khác nhau

Enterocin (ml/ml dịch bành phở)	Bảo quản bánh phở bằng chế phẩm enterocin				
	Chất lượng cảm quan của sản phẩm trong thời gian bảo quản				
0	+ Bánh có mùi thơm từ 1 đến 20 giờ, mất mùi thơm ở giờ thứ 22, sau 24 giờ bánh bắt đầu có mùi chua + Sợi bánh săn từ 1 đến 22 giờ, sau 22 giờ sợi bánh bắt đầu nát + Lượng bánh phở thu được là 2,2 kg từ 1kg gạo nguyên liệu				
3,5	+ Bánh có mùi thơm từ 1 đến 20 giờ và mất mùi thơm ở giờ thứ 30, sau 36 giờ bánh bắt đầu có mùi chua + Sợi bánh săn từ 1 đến 36, sau 36 giờ sợi bánh bắt đầu nát				
7	+ Bánh có mùi thơm từ 1 đến 44 giờ và mất mùi thơm ở giờ thứ 46, sau 48 giờ bánh bắt đầu có mùi chua + Sợi bánh săn 1 đến 36 giờ, sau 36 giờ sợi bánh bắt đầu nát + Lượng bánh phở thu được là 2,3 kg từ 1kg gạo nguyên liệu				
14	+ Bánh có mùi hơi hắc nhưng không chua từ 1 đến 46 giờ, sau 48 giờ bánh bắt đầu có mùi chua + Sợi bánh săn từ 1 đến 46 giờ, sau 48 giờ sợi bánh bắt đầu nát				

Bảng 2.41 Hiệu quả giảm các vi sinh vật gây bệnh chua bánh phở được bảo quản bằng chế phẩm enterocin

Lượng enterocin (ml/l dịch bành phở)	Mật độ các sinh vật trong bánh phở sau 48 giờ bảo quản (CFU/g)	Σ nấm men, nấm mốc		
		<i>B. coagulans</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. coagulans</i>
0	$3 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^7$	
7	$5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$	

##### 2. Bảo quản một số loại rau

Bảng 2.43 Hiệu quả giảm các vi sinh vật gây bệnh nhiễm thực nghiệm trên rau xà lát bảo quản bằng chế phẩm enterocin ở các nhiệt độ khác nhau

Lượng enterocin	Mật độ các vi sinh vật gây nhiễm thực nghiệm trên rau xà lát ( CFU/g)				
	Coliform	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>E. coli</i>
0	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
3,5 ml enterocin / nước	$1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$

Bảng 2.45 Hiệu quả giảm các vi sinh vật gây bệnh nhiễm thực nghiệm trên rau húng thom bảo quản bằng chế phẩm enterocin ở các nhiệt độ khác nhau

Lượng enterocin	Mật độ các vi sinh vật gây nhiễm thực nghiệm trên rau húng thom ( CFU/g)				
	Coliform	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>E. coli</i>
0	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
3,5	$1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$

### Tài liệu tham khảo

1. Toshihiro Sashihara, Kenji Sonomoto, Ayaaki Ishizaki. *Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity*. FEMS Microbiology Reviews 24 (2000) 85-106.
2. Luis M. Cintas, Pablo E. Hernández, and Ingolf F. Nes. *Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel sec-Dependent Bacteriocin from Enterococcus faecium P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum*. Applied And Environmental Microbiology (1997) 4321–4330.
3. Gutiérrez, J., et al. *Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from Enterococcus faecium P13, in Pichia pastoris*. Antimicrobial agents and chemotherapy (2005). **49**(7), p. 3004-3008.
4. I., Carlsbad, CA. *Pichia Fermentation Process Guidelines*, version B, 2002.