

doi:10.12301/spxb202300003

文章编号:2095-6002(2023)06-0088-15

引用格式:张莹凡,吕昕昱,肖瑀晗,等.基于网络药理学-分子对接的藤椒精油抗解淀粉芽孢杆菌生物被膜机理[J].食品科学技术学报,2023,41(6):88-102.



ZHANG Yingfan, LÜ Xinyu, XIAO Yuhan, et al. Study on antibiofilm mechanism of *Zanthoxylum armatum* essential oil against *Bacillus amyloliquefaciens* based on network pharmacology and molecular docking[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(6): 88-102.

基于网络药理学-分子对接的藤椒精油抗解淀粉芽孢杆菌生物被膜机理

张莹凡, 吕昕昱, 肖瑀晗, 杨露, 申光辉*

(四川农业大学食品学院/农业农村部农产品加工与营养健康重点实验室(部省共建), 四川雅安 625014)

摘要:为探讨藤椒精油抗解淀粉芽孢杆菌生物被膜的关键活性分子及其胞内作用机理,采用 PharmMapper 数据库进行靶点预测,结合基因组注释信息对筛选后的靶点进行清洗过滤,预测筛选藤椒精油关键活性组分及抗生物被膜的作用靶点,并应用 Cytoscape 软件构建藤椒精油活性分子-潜在靶点互作网络,通过 String 数据库对潜在靶点进行 GO 与 KEGG 通路富集分析。应用 STITCH 数据库获得潜在靶点互作关系, Cytoscape 软件进行网络拓扑分析,筛选关键核心靶点。采用 CB-DOCK2 在线分子对接服务器进行藤椒精油活性分子与核心靶点的分子对接。最后通过离体培养结合结晶紫染色法、细菌运动能力实验验证藤椒精油关键活性分子的抗生物被膜活性。结果表明,通过网络药理学方法共筛选获得了 21 种藤椒精油活性组分, 133 个潜在作用靶点, 8 个核心靶点。GO 富集分析共获得 17 个 GO 二级条目,包括生物学过程条目 6 个、分子功能条目 8 个和细胞组分条目 3 个。KEGG 通路富集分析共获得 8 条信号通路,涉及次级代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成等通路。分子对接结果表明,藤椒精油关键活性组分中桉叶醇、金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇可通过氢键和疏水相互作用等分子间作用力与核心靶点 OdhA、CarB、PurF 紧密结合并形成稳定构象。离体生物被膜培养验证实验结果表明,0.32~1.28 μL/mL 的金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌均有显著的抗生物被膜活性。研究结果旨在为藤椒精油抗细菌生物被膜的胞内分子机理提供新的研究思路。

关键词:网络药理学;分子对接;生物被膜;藤椒精油;解淀粉芽孢杆菌

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

生物被膜是细菌菌体被自分泌的胞外多糖、蛋白质、核酸等基质大分子聚合物包裹构成的高度结

构化的细菌群体^[1],难以彻底杀灭和清除,给食品安全生产和流通带来严重威胁^[2]。因此,开发高效

收稿日期:2023-01-02

基金项目:国家级大学生创新训练计划项目(202210626040);四川省科技成果转化示范项目(2022ZHSF0064);雅安市创建国家现代农业产业科技创新中心“揭榜挂帅”项目(KCZX2023-2025-07)。

Foundation: National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202210626040); Sichuan Province Science and Technology Achievement Transfer and Transformation Demonstration Project (2022ZHSF0064); Open Competition Program of creation of Yaan National Modern Agricultural Industry Science and Technology Innovation Center (KCZX2023-2025-07)。

第一作者:张莹凡,女,本科生,研究方向为食品微生物安全控制。

*通信作者:申光辉,男,副教授,博士,主要从事食品微生物安全控制方面的研究。

安全的生物被膜控制技术,对保障食品安全生产和品质稳定具有重要意义。

植物精油作为天然来源的抗菌分子资源,在食品抗菌保鲜技术领域备受关注^[3-4]。藤椒是花椒属竹叶花椒(*Zanthoxylum armatum* DC.)的果实,富含芳樟醇、柠檬烯等组分。藤椒精油具有良好的抗菌抗生物被膜活性。Manoharan等^[5]研究发现,芳樟醇可抑制白色念珠菌生物被膜的形成;Park等^[6]发现,桉烯通过抑制致龋毒力因子来抑制变形链球菌的生物被膜及其细胞黏附能力;Subramenium等^[7]证实了柠檬烯通过结合链球菌表面相关毒力因子来抑制生物被膜的形成。解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)DY1a是非发酵豆制品的优势腐败菌,具有抗逆性强^[8]、代谢产生有毒生物胺^[9]、生物被膜形成速度快^[10]等特点,给生产设备清洗消毒和产品贮藏安全带来了严重威胁。本团队前期研究表明,藤椒精油对解淀粉芽孢杆菌DY1a生物被膜的形成具有良好的抑制效果^[11],但由于藤椒精油的组分复杂性及细菌生物被膜调控通路的多样性,目前对藤椒精油抗细菌生物被膜的分子作用机理了解不够深入。

分子对接是采用计算机辅助分子模拟技术,对活性小分子与靶点分子之间的作用模式、结合位点和影响因素等进行预测的虚拟研究手段^[12]。网络药理学是以系统生物学等多学科为理论基础,利用互作网络和可视化等技术揭示生命活动与活性药物分子之间互作机理的学科^[13-14]。网络药理学结合分子对接技术在药物靶点发现、活性物质筛选及功能食品分子挖掘等领域凸显出良好的方法学优势^[15-16]。

本研究拟借助网络药理学和分子对接技术,揭示藤椒精油抑制解淀粉芽孢杆菌生物被膜的关键潜在活性分子及其胞内作用靶点,并验证关键小分子的抗生物被膜活性,以解析藤椒精油抗细菌生物被膜的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

解淀粉芽孢杆菌DY1a,四川农业大学食品学院。氯化钠、甲醇、结晶紫、草酸铵、无水乙醇、冰乙酸、吐温-80,均为分析纯,成都市科隆化学品有限公司;金合欢醇乙酸酯(色谱纯)、反式金合欢醇(色谱

纯),上海迈瑞尔生化科技有限公司。肉汤培养基(LB)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基,青岛海博生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

ZWY-211B型恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;QL-901型涡旋仪,江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司;ST16R型高速冷冻离心机、Varioskan Flash型荧光酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司;SW-CJ-2FD型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 藤椒精油主要组分的收集整理

以“*Zanthoxylum armatum* DC. essential oil”和“藤椒精油”为主要关键词检索中外相关研究文献,整理收集后得到藤椒精油小分子相关信息,通过Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载小分子sdf格式文件,构建藤椒精油主要组分数据库。

1.3.2 潜在靶点的筛选与小分子-潜在靶点互作网络的构建

将藤椒精油小分子sdf格式文件上传至PharmMapper反向对接服务器(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)进行小分子-靶点分子对接,以标准化得分(normalized fit score)大于0.4为选择指标进行潜在作用靶点初筛,STITCH数据库(<http://stitch.embl.de/>)寻找靶点作补充。通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)查找筛选结果的基因名(gene name)。通过产生物被膜菌株*Bacillus amyloliquefaciens* L-17基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP074391.1>)^[17]进一步查询筛选得到与解淀粉芽孢杆菌有关的靶点。

根据藤椒精油小分子与潜在靶点的关系制作网络(network)文件和类型(type)文件,将2个文件导入Cytoscape软件绘制PPI(蛋白相互作用)网络。

1.3.3 KEGG和GO靶点通路分析

通过STRING数据库(<https://string-db.org/>)进行基因本体(gene ontology,GO)功能富集,分析藤椒精油小分子与靶点结合过程中可能影响的生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)。通过京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析,获得藤椒精油小分子与靶点结合过程中的潜在信号通路。使用

Chiplot 在线可视化工具 (<https://www.chiplot.online/>) 绘制 GO 功能富集与 KEGG 通路分析气泡图。

1.3.4 核心靶点的筛选

将潜在靶点导入 STITCH (<http://stitch.embl.de/>) 数据库, 以置信度大于 0.9 为选择指标^[16], 得到潜在靶点分子相互作用的网络关联图, 下载 tsv 格式文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 通过互作网络拓扑分析获得潜在靶点的节点度值、特征向量中心性、介数中心度和接近中心度的平均值, 以大于各节点的平均值为标准获得核心靶点。

1.3.5 藤椒精油小分子与核心靶点的分子对接

通过 UniProt 数据库获取核心靶点的一级结构序列信息, 提交至 SWISS-MODEL 在线服务器 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行靶点蛋白 3D 建模。以核心靶点为受体, 藤椒精油小分子为配体, 利用基于 AutoDock Vina 软件的 CB-DOCK2 在线分子对接服务器 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>) 依次进行对接口袋检测和盲对接, 配体分子通过加氢和部分电荷处理, 并由 RDKit 生成初始 3D 构象。受体蛋白质缺失的侧链原子和氢原子的添加, 去除结晶水等操作均由在线服务器采用 OpenBabel 和 MGL 程序工具自动处理^[18]。对接结合能以 AutoDock Vina score 函数^[19] 计算并表示, 单位 kJ/mol。采用 Discovery Studio 2021 对最佳对接复合物进行相互作用分析和可视化^[20]。

1.3.6 潜在小分子抗生物被膜活性的验证

1.3.6.1 培养基制备

TSBS 培养基: A 液为胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基 (30.0 g/L), B 液为豆浆粉 (50.0 g/L)。将灭菌后的 A、B 液按体积比 1:1 混合均匀。A 液 121 °C 灭菌 15 min, B 液 115 °C 灭菌 20 min。

1.3.6.2 细菌生物被膜的培养

将本课题组实验室保存的解淀粉芽孢杆菌 DY1a^[8] 接种至 LB 培养基, 37 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃去培养基, PBS 缓冲液轻轻冲洗菌体沉淀 3 次, 并调节菌悬液 600 nm 吸光度至 0.10。根据小分子化合物与靶点的结合能力, 综合考虑小分子化合物的可获得性, 选择金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇进行抗生物被膜活性验证。用体积分数 0.20% 的吐温-80 进行乳化, 分别加入到灭菌 TSBS 培养基^[11], 再接入制备好的菌悬液, 使 2 种小分子化合物最终添加体积比分别为 0.32、0.64、1.28 μL/mL, 初始接菌量为

10⁶ CFU/mL, 同时以未添加精油组分培养体系为对照组, 用涡旋仪混合均匀后分装至 5 mL 的灭菌小烧杯, 用封口膜封口, 37 °C 静置培养 48 h, 观察生物被膜形成情况并拍照。

1.3.6.3 生物被膜的定量检测

参考 Stepanović 等^[21] 的方法并略加修改。将烧杯内菌液吸弃, 用生理盐水轻轻冲洗生物被膜 2 次, 加入 2 mL 甲醇固定 15 min, 吸弃甲醇。生理盐水冲洗 1 次, 加入 1 mL 质量分数 0.10% 的结晶紫染色 5 min, 吸弃结晶紫染色液, 生理盐水冲洗 2 次, 再加入 3 mL 体积分数 33% 的乙酸溶液, 静置 24 h。转移 200 μL 反应液至 96 孔板, 酶标仪检测 595 nm 处吸光度, 不同处理组均重复 3 次。

1.3.6.4 细菌运动能力测定

参考杨露等^[10] 的方法并略加修改。配制金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇添加体积比分别为 0.32、0.64、1.28 μL/mL 的泳动、丛集 TSB 培养基, 泳动培养基琼脂质量分数为 0.475%, 丛集培养基琼脂质量分数为 0.600%, 同时以未添加精油组分的 TSB 培养基为对照组。泳动实验: 待泳动培养基凝固后, 在培养基中心滴入 5 μL 10⁶ CFU/mL 的菌悬液, 待菌液吸干, 37 °C 培养 24 h, 测量泳动圈直径大小。丛集实验: 待丛集培养基凝固后, 用接种针挑取少量单菌落刺入培养基中心, 37 °C 培养 24 h, 测量泳动圈直径大小, 并按式 (1) 计算藤椒精油小分子对细菌泳动或丛集运动的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (1)$$

式 (1) 中, A_1 为对照组泳动或丛集圈面积; A_2 为处理组泳动或丛集圈面积。

1.4 数据处理

所得数据利用 IBM SPSS 20.0 软件进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。采用 Cytoscape 软件绘制互作网络, 采用 Chiplot 在线可视化工具绘制富集分析图和分组对接结合能的 2D 热图, 采用 Origin Pro 2019 软件绘制生物被膜定量实验结果。

2 结果与分析

2.1 藤椒精油主要组分

通过 Web of Science 和 CNKI 等国内外学术文献数据库检索整理, 共收集到 60 种藤椒精油组分, 见表 1。

表1 藤椒精油主要化学组分

Tab.1 Main components of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil

序号	化合物名称	分子式	CAS号	序号	化合物名称	分子式	CAS号
1	亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	301-00-8	31	2-苾醇	C ₁₀ H ₁₈ O	10385-78-1
2	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	628-97-7	32	松油烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O	562-74-3
3	金合欢醇乙酸酯	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	29548-30-9	33	桉叶油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	470-82-6
4	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1957-10-3	34	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	106-24-1
5	棕榈烯酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	373-49-9	35	松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	98-55-5
6	十六烷	C ₁₆ H ₃₄	544-76-3	36	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	78-70-6
7	橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	40716-66-3	37	水芹醛	C ₁₀ H ₁₆ O	21391-98-0
8	桉叶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	1209-71-8	38	柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	5392-40-5
9	榄香醇	C ₁₅ H ₂₆ O	639-99-6	39	桃金娘烯醇	C ₁₀ H ₁₆ O	515-00-4
10	反式法尼醇	C ₁₅ H ₂₆ O	106-28-5	40	薄荷酮	C ₁₀ H ₁₆ O	89-81-6
11	氧化丁香烯	C ₁₅ H ₂₄ O	1139-30-6	41	4-乙烯基愈创木酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	7786-61-0
12	β-榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	33880-83-0	42	对百里酚	C ₁₀ H ₁₄ O	3228-2-2
13	α-萜荳茄油烯	C ₁₅ H ₂₄	17699-14-8	43	桔萆醇	C ₁₀ H ₁₄ O	536-60-7
14	萜草烯	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	44	香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	99-49-0
15	γ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	1460-97-5	45	茴香醚	C ₁₀ H ₁₂ O	4180-23-8
16	δ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	483-76-1	46	桔萆醛	C ₁₀ H ₁₂ O	122-03-2
17	(E)-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	118-65-0	47	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	124-19-6
18	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	48	隐酮	C ₉ H ₁₄ O	500-02-7
19	(Z)-水化香桉烯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	77318-48-0	49	侧柏烯	C ₁₀ H ₁₆	28634-89-1
20	乙酸芳樟酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	115-95-7	50	罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	3779-61-1
21	乙酸香叶酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	105-87-3	51	桉烯	C ₁₀ H ₁₆	3387-41-5
22	云实素	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	90-24-4	52	异松油烯	C ₁₀ H ₁₆	586-62-9
23	α-松油醇	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	80-26-2	53	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	138-86-3
24	乙酸桃金娘烯酯	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	35670-93-0	54	月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3
25	香茅酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	502-47-6	55	α-萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	99-86-5
26	甲基正壬酮	C ₁₁ H ₂₂ O	112-12-9	56	萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	99-85-4
27	桂皮酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	103-26-4	57	水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	99-83-2
28	槲皮素	C ₁₀ H ₁₈ O	29803-81-4	58	苾烯	C ₁₀ H ₁₆	79-92-5
29	薄荷醇	C ₁₀ H ₁₈ O	16721-38-3	59	对伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	99-87-6
30	(E)-4-侧柏醇	C ₁₀ H ₁₈ O	15537-55-0	60	萘	C ₁₀ H ₈	91-20-3

2.2 藤椒精油小分子的潜在靶点筛选

通过 PharmMapper、L-17 基因组信息的寻找和筛选,以标准化得分大于 0.4 为标准,共得到 54 种藤椒精油小分子对应的 720 个潜在靶点,去除重复得到 133 个靶点。用 STITCH 数据库共筛选到 18 种藤椒精油小分子对应的 56 个靶点。合并整理 2 个数据库的靶点,使用 Cytoscape 软件进行数据可视化分析,获得藤椒精油小分子-潜在靶点互作网络(图 1)。

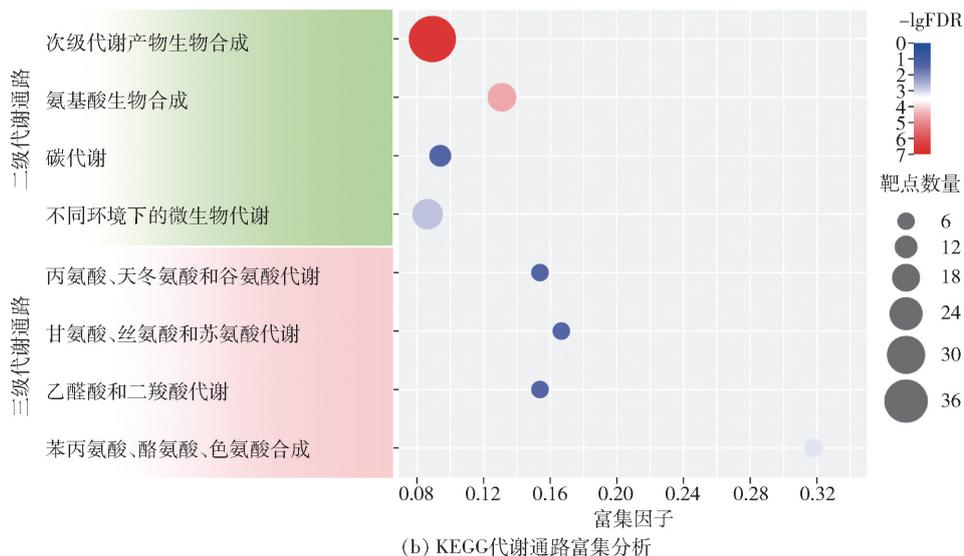
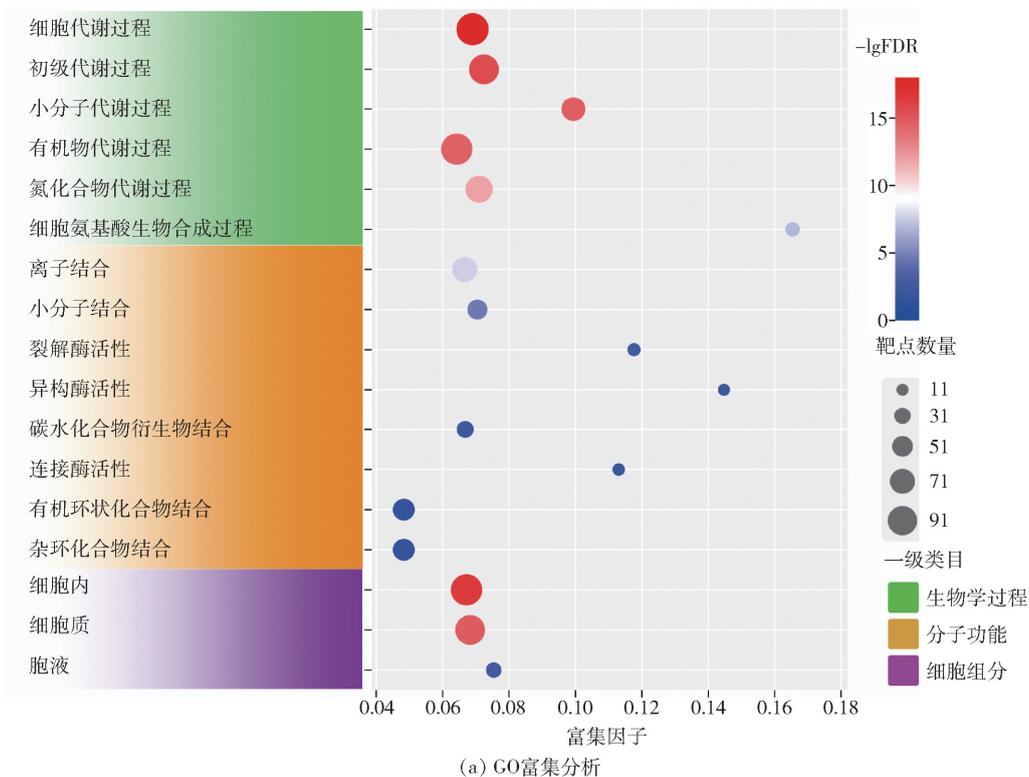
藤椒精油 60 种化合物中有 54 种小分子与潜在靶点存在互作关系,且绝大部分精油小分子存在多个潜在靶点,表明藤椒精油小分子作用的多靶点性。

2.3 潜在靶点功能富集分析

藤椒精油组分的 133 个潜在抗生物被膜作用靶点的 GO 富集和 KEGG 代谢通路富集分析结果见图 2。由图 2(a)可知,GO 富集分析共获得了 17 条 GO 二级条目,包含生物学过程、分子功能和细胞组

分。藤椒精油小分子与相关潜在靶点的作用可能与细胞代谢过程(cellular metabolic process)、初级代谢过程(primary metabolic process)等生物学过程,离子结合(ion binding)、小分子结合(small molecule binding)等分子功能,及细胞内(intracellular)、细胞质(cytoplasm)等细胞组分有关。这些涉及生物代谢过程、分子结合功能及细胞组分构建的核心靶点,在藤椒精油调节细菌生物被膜发育和形成过程中起着重要作用。

进一步对解淀粉芽孢杆菌的 133 个潜在靶点进行 KEGG 代谢通路富集分析,得到排名前 8 的显著富集信号通路[图 2(b)],表明藤椒精油小分子与相关潜在靶点的作用可能与次级代谢产物的生物合成(biosynthesis of secondary metabolites)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)、不同环境下的微生物代谢(microbial metabolism in diverse environments)等二级代谢通路有关。在三级代谢通路



气泡大小与富集的靶点基因数目成正比,气泡颜色由蓝变红代表富集的显著程度提高。

图2 潜在靶点的GO和KEGG通路富集分析

Fig.2 GO and KEGG pathway enrichment analysis of potential targets

氢键(碳氢键),与 ILE298、LEU210、ILE167、MET240、ALA144、ARG169、HIS243、PRO170 通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用。图 6(b)表明,金合欢醇乙酸酯能够同 CarB 的关键氨基酸残基 SER935 形成典型氢键,同时与 LEU895、LEU907、TYR1040、ALA793、PHE928 通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用。图 6(c)表明,反式法尼醇主要与 OdhA 的氨

基酸残基 LEU323、LEU659、VAL695、HIS260、HIS322、HIS460 通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用,与 PHE689 通过 π - σ 疏水堆积作用连接,配体与受体间无氢键作用。图 6(d)表明,金合欢醇乙酸酯能够与 OdhA 的关键氨基酸残基 GLN363、LEU323 形成典型氢键,同时与 GLU661 形成非典型氢键(碳氢键),与 LEU659、ALA359、ALA358、HIS260、

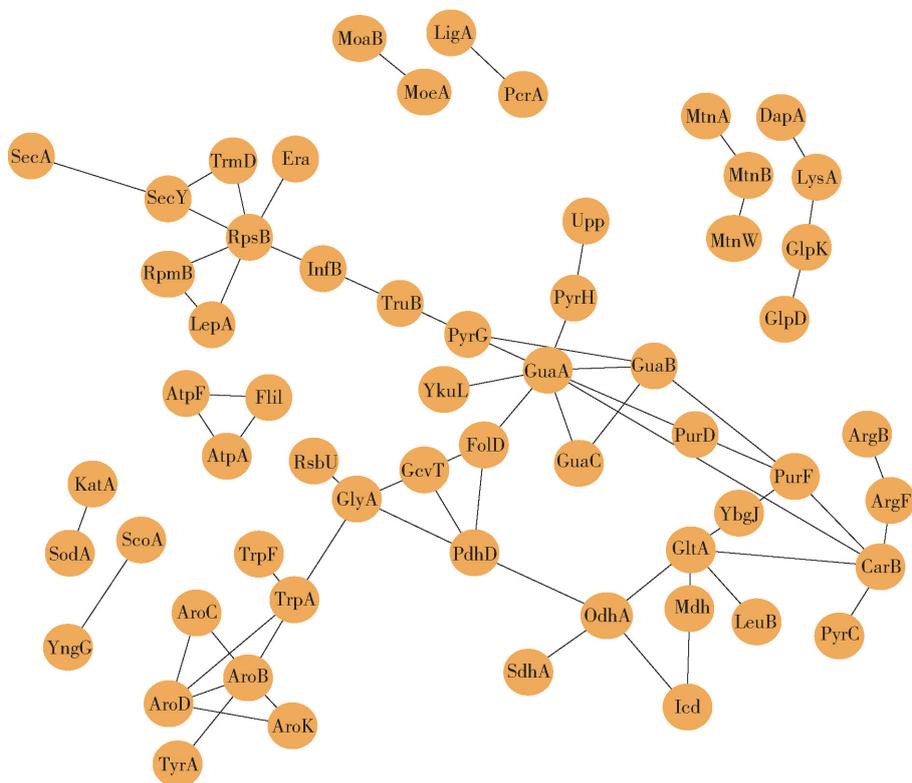


图 3 潜在靶点相互作用网络

Fig. 3 Interactions network of potential targets

表 2 核心靶点交互网络拓扑学参数

Tab. 2 Topological parameters of interactions network of core targets

序号	靶点	节点度	特征向量 中心性	介数 中心度	接近 中心度
1	GuaA	20.0	0.49	1 007.33	0.050
2	GltA	14.0	0.31	278.17	0.048
3	PurF	12.0	0.41	168.83	0.049
4	GlyA	10.0	0.10	526.00	0.048
5	CarB	10.0	0.32	304.50	0.049
6	OdhA	8.0	0.13	187.33	0.048
7	PdhD	8.0	0.11	157.67	0.048
8	FolD	8.0	0.18	508.33	0.049
	平均值	4.7	0.07	92.44	0.038

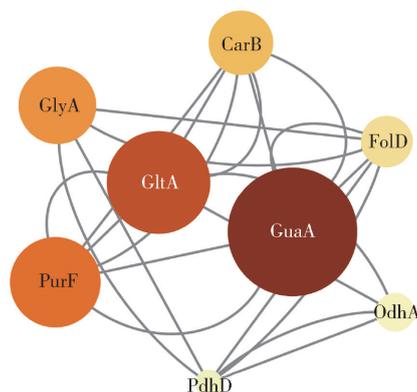


图 4 生物被膜形成密切相关的核心靶点交互网络

Fig. 4 Interaction network of core targets closely associated with biofilm formation

HIS460 通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用,与 PHE689 通过 π - σ 疏水堆积作用连接。图 6(e) 表明,反式法尼醇能够同 PurF 链 A 中的关键氨基酸残基 LEU99 形成典型氢键,与链 C 中的氨基酸残基 LEU99 通过烷基产生疏水相互作用,同时与氨基酸残基 LEU98、TYR92、LYS56、PHE100 通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用。图 6(f) 表明,金合欢醇乙

酸酯能够同 PurF 的关键氨基酸残基 LEU99、LYS56 形成典型氢键,同时与氨基酸残基 TYR92 通过 π -烷基产生疏水相互作用。

PdhD 与桉叶油醇结合能较弱,桉叶油醇能与 PdhD 的氨基酸残基通过烷基或 π -烷基产生疏水相互作用,但无典型氢键。GltA 与棕榈酸乙酯和棕榈烯酸结合能也较弱,棕榈酸乙酯和棕榈烯酸与 GltA 的氨基酸残基虽存在典型氢键,但存在盐桥和静电

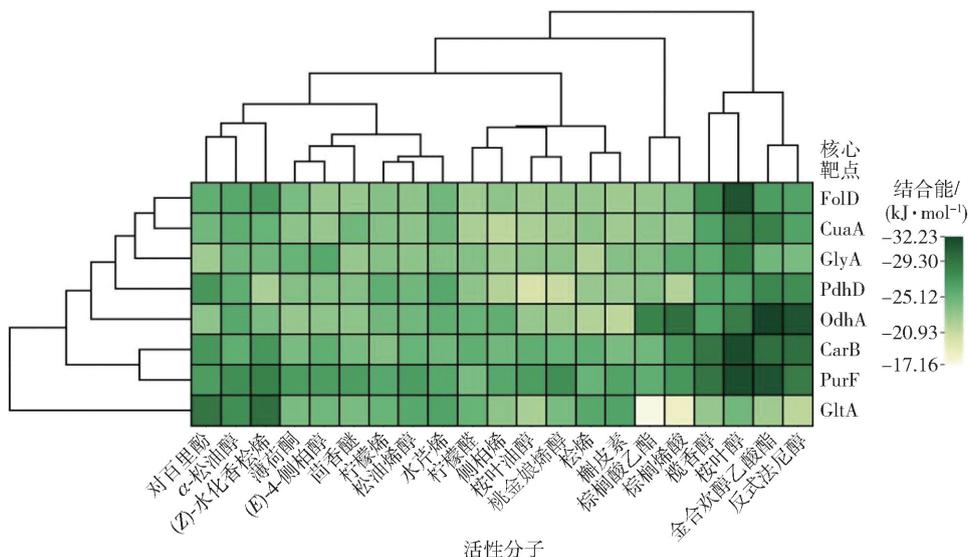


图5 藤椒精油活性分子与核心靶点分子对接结合能的2D热图

Fig. 5 2D Heatmap of molecular docking binding energy of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil compounds and core targets

相互作用力。而结合能高的靶点-小分子复合物中不存在盐桥和静电相互作用力,因此推测盐桥和静电相互作用力可能会影响分子的几何构型,导致对接结合能较低。

2.6 藤椒精油小分子抗生物被膜活性验证结果

根据虚拟计算对接结果,选择金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇进行抗生物被膜活性验证。图7是解淀粉芽孢杆菌 DY1a 在添加 0.32、0.64、1.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 金合欢醇乙酸酯或反式法尼醇的 TSBS 培养基培养 48 h 后形成的气液界面生物被膜。由图7可知,对照组气液界面生物被膜较为致密厚实,且在空气一侧形成了明显的肉眼可见的皱褶。添加金合欢醇乙酸酯的培养基界面虽形成了明显的生物被膜,但生物被膜较单薄松散,且无肉眼可见的皱褶,易被外界机械力分散破坏,表明藤椒精油活性分子金合欢醇乙酸酯在实验体积比范围内对菌株生物被膜的发育和成熟均有良好的延缓作用。添加不同体积比的金合欢醇乙酸酯对菌株生物被膜的抑制活性无明显差异,而添加 1.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 反式法尼醇的培养体系气液界面未见明显的生物被膜形成,表明在该体积比下反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 气液面生物被膜的形成具有完全抑制作用。

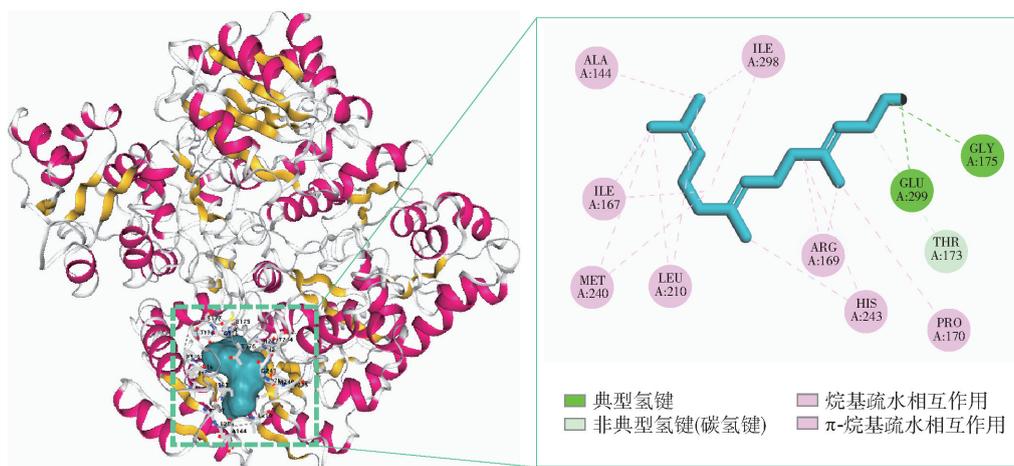
通过结晶紫染色法进一步对不同培养条件下形成的生物被膜进行定量分析,结果见图8。由图8可知,添加金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇的培养基形成的生物被膜生物量(以 $OD_{595\text{ nm}}$ 表示)均低于对照组,说明这2种化合物对于解淀粉芽

孢杆菌 DY1a 气液面生物被膜生长均有抑制活性。在 1.28、0.64 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 条件下,添加反式法尼醇的培养基的生物被膜形成量低于添加相同体积比的金合欢醇乙酸酯的培养基的生物被膜生物量,说明反式法尼醇的抗生物被膜活性强于金合欢醇乙酸酯。

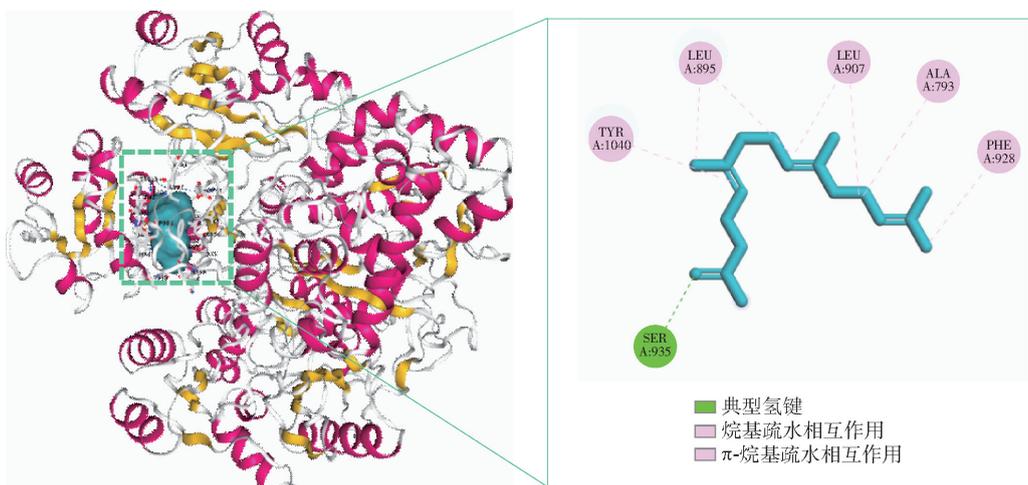
细菌运动能力测定结果见图9、表4。随着精油组分添加量的提高,细菌泳动圈直径逐渐减小,表明金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 泳动能力均有抑制作用。与泳动结果相似,丛集圈直径也随着精油组分含量的升高而减小,表明金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇对细菌丛集能力均有抑制作用。在相同添加量下,添加反式法尼醇的丛集培养基形成的丛集圈直径比添加金合欢醇乙酸酯的丛集培养基形成的丛集圈直径小,表明反式法尼醇抑制细菌丛集的能力强于金合欢醇乙酸酯。添加 1.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 反式法尼醇的 TSB 培养基无肉眼可见丛集圈生成,表明该添加量能完全抑制丛集圈的形成,与结晶紫结果一致。

3 讨论

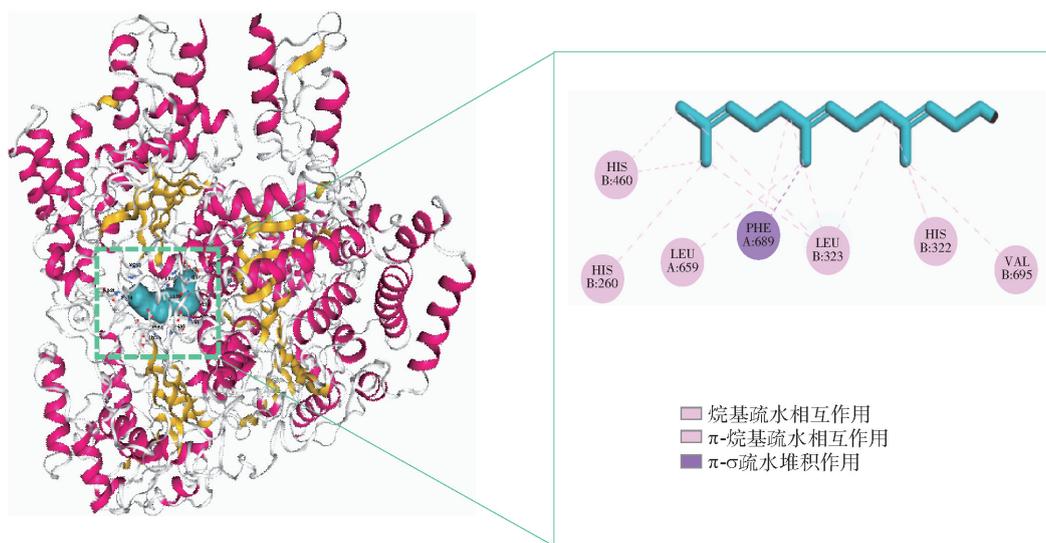
藤椒精油对解淀粉芽孢杆菌气液界面生物被膜的形成具有良好的抑制与清除活性,在食源性致病菌和腐败菌生物被膜绿色防控领域具有良好的应用潜力^[11]。细菌生物被膜形成过程复杂,涉及菌体黏附能力、运动能力和胞外基质多糖和蛋白质合成分泌等过程^[2,23]。同时,植物精油组分复杂,不同化合



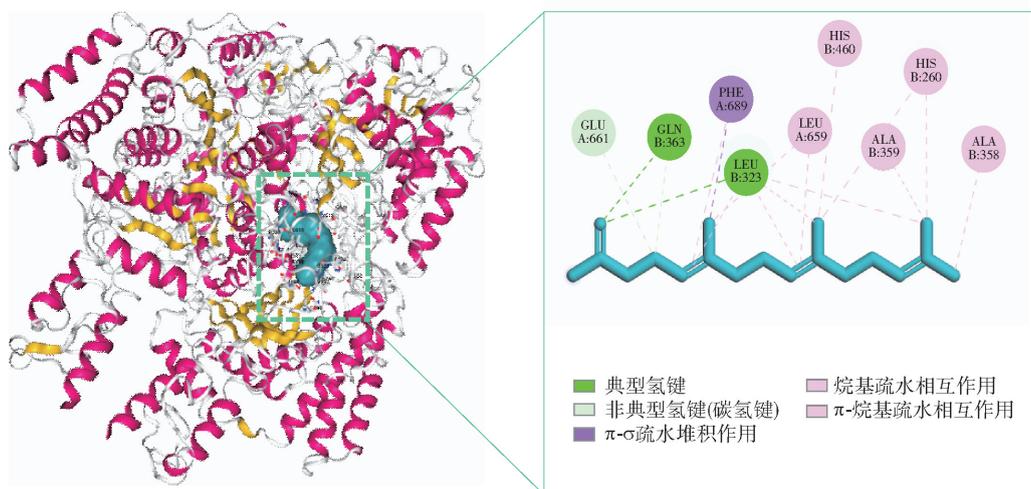
(a) CarB-反式法尼醇



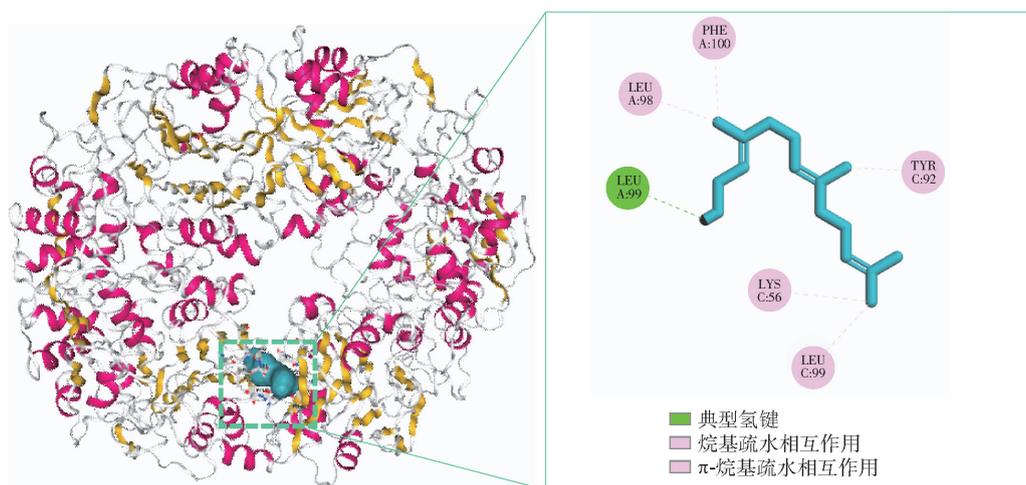
(b) CarB-金合欢醇乙酸酯



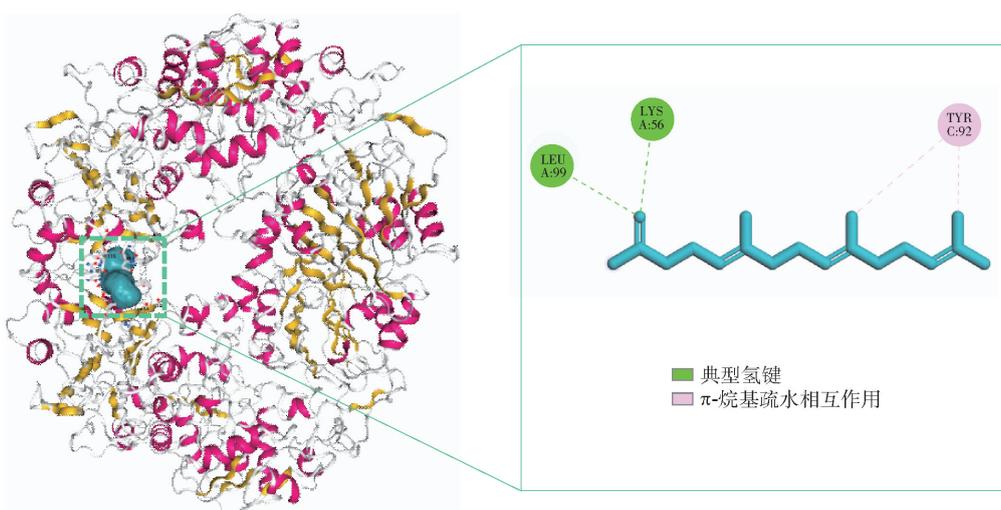
(c) OdhA-反式法尼醇



(d) OdhA-金合欢醇乙酸酯



(e) PurF-反式法尼醇



(f) PurF-金合欢醇乙酸酯

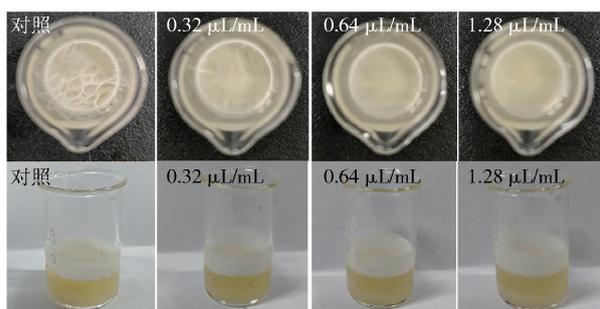
图6 部分藤椒精油活性分子与核心靶点的结合方式和2D相互作用

Fig.6 Binding model and 2D interactions of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil compounds with core targets

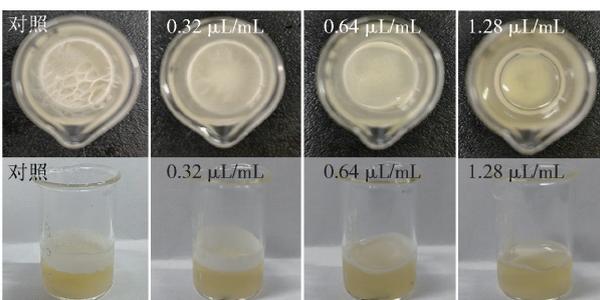
表3 稳定对接构象的化学结合特征

Tab. 3 Chemical binding characteristics of stable docking conformation

复合物	结合口袋体积(\AA^3)	结合口袋的氨基酸残基	氢键数量
CarB-反式法尼醇	408	链 A: ARG129、ALA144、ILE167、ILE168、ARG169、PRO170、THR173、MET174、GLY175、GLY176、SER177、ASP207、GLU208、LEU210、GLU215、MET240、GLY241、ILE242、HIS243、THR244、GLN285、ILE298、GLU299、ASN301、THR376	3
CarB-金合欢醇乙酸酯	4 099	链 A: GLU783、ASP791、ALA793、GLU892、VAL893、LEU895、PHE897、PRO905、LEU907、PHE928、GLN932、SER935、ASN936、SER937、THR938、HIS1039、TYR1040、ASP1041、THR1042、THR1043、GLY1046、THR1050	1
OdhA-反式法尼醇	40 692	链 A: GLU616、LEU659、GLU661、GLN685、PHE689、GLY692 链 B: HIS260、SER321、HIS322、LEU323、GLU324、ILE325、GLN363、VAL365、PHE394、HIS460、GLU662、VAL695	0
OdhA-金合欢醇乙酸酯	40 692	链 A: GLU616、LEU659、GLU661、GLN685、PHE689、GLY692 链 B: HIS260、SER321、HIS322、LEU323、GLU324、ILE325、GLY356、ASP357、ALA358、ALA359、GLN363、ASN390、VAL392、GLY393、PHE394、HIS460、VAL695	3
PurF-反式法尼醇	5 549	链 A: LYS56、GLU93、LEU98、LEU99、PHE100、GLN134、THR135 链 C: LYS56、TYR92、GLU93、PRO97、LEU98、LEU99、PHE100、GLN134、THR135	1
PurF-金合欢醇乙酸酯	5549	链 A: ALA54、LYS56、TYR92、GLU93、PRO97、LEU98、LEU99、GLN134、THR135 链 C: LYS56、TYR92、GLU93、LEU98、LEU99、ARG101、GLN134、THR135	2

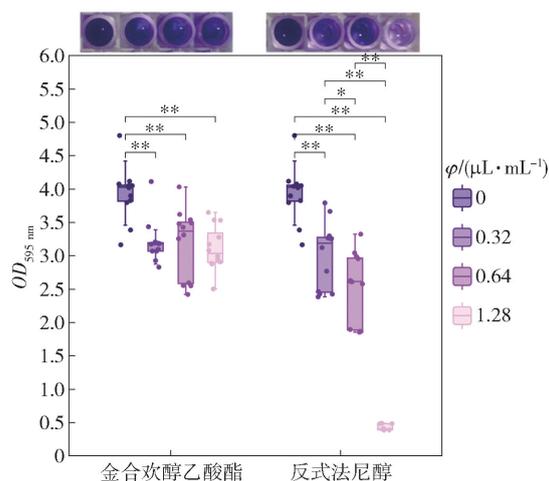


(a) 金合欢醇乙酸酯



(b) 反式法尼醇

图7 金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制作用

Fig. 7 Antibiofilm effects of farnesol acetate and *trans*-farnesol on *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a

* 表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示组间数据差异极显著 ($P < 0.01$)。

图8 生物被膜定量结果

Fig. 8 Results of biofilm biomass quantification

物可能在抗生物被膜形成方面发挥不同的生物活性功能^[4]。因此,采用常规实验方法逐一分析精油单一组分的抗生物被膜活性及相关机理是一项十分庞大的研究工作,往往难以找到切入点和突破口。为进一步阐明藤椒精油抗细菌生物被膜的分子机理,

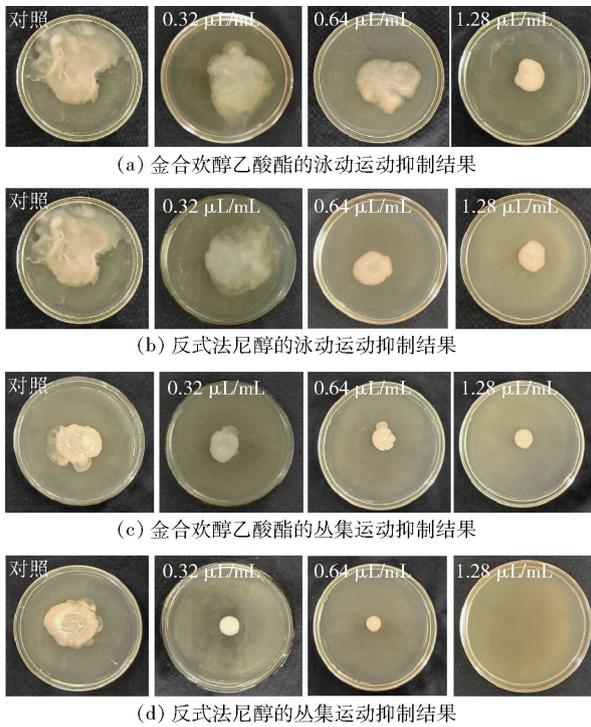


图9 金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌DY1a 泳动和丛集能力的抑制作用

Fig. 9 Inhibitory effects of farnesol acetate and *trans*-farnesol on swimming and swarming motilities of *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a

表4 金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌DY1a 泳动和丛集能力的抑制率

Tab. 4 Inhibitory ratio of farnesol acetate and *trans*-farnesol on swimming and swarming motilities of *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a

藤椒精油活性分子	$\varphi / (\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1})$	泳动运动		丛集运动	
		d/cm	抑制率/%	d/cm	抑制率/%
金合欢醇乙酸酯	0.00	6.53 ± 0.49^a	0.00	3.70 ± 0.27^a	0.00
	0.32	5.10 ± 0.32^b	29.15	2.47 ± 0.17^b	53.50
	0.64	4.11 ± 0.46^d	60.00	1.82 ± 0.20^c	74.60
	1.28	2.61 ± 0.38^a	83.73	1.22 ± 0.13^d	88.60
反式法尼醇	0.00	6.53 ± 0.49^a	0.00	3.70 ± 0.27^a	0.00
	0.32	5.50 ± 0.31^b	39.01	1.28 ± 0.08^b	88.16
	0.64	4.08 ± 0.72^c	60.00	0.88 ± 0.17^c	94.26
	1.28	2.05 ± 0.39^d	89.80	0.00 ± 0.00^d	100.00

不同字母表示相同组分不同体积比的数据差异显著($P < 0.05$)。

-20.93 kJ/mol,其中金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇与OdhA、CarB和PurF这3个靶点的结合能力强于其他靶点。OdhA是三羧酸循环中2-氧代戊二酸脱氢酶复合物的组分之一,该复合物在催化2-氧代戊二酸氧化脱羧为琥珀酰辅酶A过程中起着重要作用^[28];PurF为谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸盐酰胺转移酶,作为嘌呤生物合成关键酶,可促进钾离子的依赖性扩散,从而对枯草芽孢杆菌表现出菌落的广泛扩散效应^[29];CarB为精氨酸特异性氨甲酰磷酸合成

本研究借助网络药理学-分子对接技术,从分子层面解析精油中起抗生物被膜作用的关键活性组分及其胞内作用靶点。

温泽文等^[24]的研究表明,奥替溴铵通过抑制细菌初级代谢,降低其蛋白质合成能力从而表现出良好的生物被膜抑制效应;黄宁^[25]通过Pathway分析发现,次生代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成、各种环境中的微生物代谢通路与细菌生物被膜的形成有关;刘琳等^[26]发现,某些信号分子可以调控一些次级代谢,从而维持细菌生物被膜结构;Pisithkul等^[27]发现生物被膜的生长与初级生物合成途径、发酵途径和次级代谢的代谢有关,生物被膜生长过程中三羧酸循环的活性会增强。本研究通过网络药理学研究方法同代谢通路富集分析相结合,揭示了藤椒精油小分子是通过影响细胞代谢和生物合成等生物功能,以及通过多靶点-多成分-多通路来抑制解淀粉芽孢杆菌生物被膜的形成。

同时,本研究采用分子对接技术,验证了藤椒精油中金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇、桉叶醇、茴香醚、柠檬烯等21种主要活性组分与解淀粉芽孢杆菌DY1a的8个核心靶点的结合能力及相互作用模式,结果表明,大部分对接复合物结合能低于

酶,是柑橘黄单胞菌泳动和生物被膜形成必需的基因^[30]。因此,藤椒精油活性分子通过与OdhA、PurF、CarB等靶点结合,从而干扰与生命活动相关的大分子合成代谢,最终抑制细菌生物被膜的形成和成熟。

结果表明,金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇在实验添加量范围内对菌株生物被膜的发育和成熟均有良好的延缓作用。同时在相同添加量下反式法尼醇的抗生物被膜活性强于金合欢醇乙酸酯。然而,分

子对接结果显示,金合欢醇乙酸酯结合的核心靶点数目更多。这可能是由于金合欢醇乙酸酯对部分调控靶点的基因表达存在上调作用,致使金合欢醇乙酸酯抑制生物被膜的总体活性比反式法尼醇低。从细菌群体感应调控机制层面进行分析,金合欢醇乙酸酯可能需要与多种信号分子的含量同时达到阈值,才可协调调控与生物被膜形成有关的基因表达^[31]。同时,由于网络药理学方法是基于已有实验研究证据构建的数据库进行预测分析,可能还存在一些尚未研究解析的生物被膜靶点与反式法尼醇具有更强的结合能力。分子对接环境与实际生命代谢胞内环境存在差异也会导致分子对接和生物被膜活性验证结果存在差异。尽管网络药理学和分子对接技术存在一些不足,但在当前技术条件下,仍然值得被用于复杂生命代谢活动有关机理的辅助解析工作。

4 结 论

本研究借助网络药理学,对藤椒精油抗解淀粉芽孢杆菌生物被膜作用的关键活性分子、关键靶点、代谢通路信息和拓扑网络进行分析,共筛选出21种主要精油活性组分及8个核心靶点,证明了藤椒精油抗细菌生物被膜的多组分、多靶点、多通路的特点。结合分子对接技术,验证了3种藤椒精油活性组分桉叶醇、金合欢醇乙酸酯、反式法尼醇可通过氢键、疏水作用与核心靶点 OdhA、CarB、PurF 结合。抗生物被膜活性实验验证结果进一步表明,金合欢醇乙酸酯和反式法尼醇对解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的形成和细菌运动能力具有显著抑制活性。研究结果希望为藤椒精油抗细菌生物被膜的胞内分子机理提供新的见解,同时为利用藤椒精油开发抗细菌生物被膜新策略奠定理论依据。

参考文献:

- [1] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623 - 633.
- [2] BRIDIER A, SANCHEZ-VIZUETE P, GUILBAUD M, et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens [J]. *Food Microbiology*, 2015, 45(Part B): 167 - 178.
- [3] BAZARGANI M M, ROHLOFF J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms [J]. *Food Control*, 2016, 61: 156 - 164.
- [4] EL-TARABILY K A, EL-SAADONY M T, ALAGAWANY M, et al. Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(9): 5145 - 5156.
- [5] MANOHARAN R K, LEE J H, KIM Y G, et al. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans* [J]. *Biofouling*, 2017, 33(2): 143 - 155.
- [6] PARK B I, KIM B S, KIM K J, et al. Sabinene suppresses growth, biofilm formation, and adhesion of *Streptococcus mutans* by inhibiting cariogenic virulence factors [J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2019, 11(1): 1632101.
- [7] SUBRAMENIUM G A, VIJAYAKUMAR K, PANDIAN S K. Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(8): 879 - 890.
- [8] 郑丽君, 申光辉, 张志清, 等. 真空包装免泡豆杆优势腐败细菌分离鉴定及其致腐能力分析 [J]. *食品科学*, 2018, 39(2): 177 - 184.
ZHENG L J, SHEN G H, ZHANG Z Q, et al. Isolation, identification and evaluation of dominant spoilage bacteria from vacuum-packaged nonrehydrated Dougan, a Chinese traditional rod-shaped soybean product prepared with protein-lipid film [J]. *Food Science*, 2018, 39(2): 177 - 184.
- [9] 郑丽君, 申光辉, 张志清, 等. 免泡豆杆优势腐败菌腐败能力及产生物胺特性分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(10): 56 - 62.
ZHENG L J, SHEN G H, ZHANG Z Q, et al. Evaluation of the spoilage potential of specific *Bacillus bacteriain* vacuum-packed rehydration Dougan and characteristic of producing biogenic amines [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(10): 56 - 62.
- [10] 杨露, 覃书漫, 李志洪, 等. 丁香酚对解淀粉芽孢杆菌气液界面生物膜的抑制作用 [J]. *食品科学技术学报*, 2023, 41(1): 88 - 98.
YANG L, QIN S M, LI Z H, et al. Inhibitory effect of eugenol on biofilm of *Bacillus amyloliquefaciens* formed at air-liquid interface [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2023, 41(1): 88 - 98.
- [11] 余生玲, 申光辉, 黄廷, 等. 藤椒精油对腐败解淀粉芽孢杆菌 DY1a 生物被膜的抑制作用 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49(6): 2135 - 2151.
YU S L, SHEN G H, HUANG T, et al. Antibiofilm effect of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil against spoilage *Bacillus amyloliquefaciens* DY1a [J]. *Microbiology China*,

- 2022, 49(6): 2135–2151.
- [12] SANTOS L H S, FERREIRA R S, CAFFARENA E R. Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 2053: 13–14.
- [13] WANG X, WANG Z Y, ZHENG J H, et al. TCM network pharmacology: a new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2021, 19(1): 1–11.
- [14] 吕品, 李晓天. 基于体外试验和网络药理学研究金银花抗炎抗菌活性及分子机制[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(14): 1678–1685.
- LÜ P, LI X T. Molecular mechanism of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Lonicerae japonicae* Flos based on *in vitro* experiments and network pharmacology [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2021, 38(14): 1678–1685.
- [15] VIDAL-LIMON A, AGUILAR-TOALÁ J E, LICEAGA A M. Integration of molecular docking analysis and molecular dynamics simulations for studying food proteins and bioactive peptides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(4): 934–943.
- [16] 严家慧, 申雪, 彭昶, 等. 基于网络药理学和分子对接研究青果-槐花药对抗幽门螺杆菌感染的活性成分和作用机制[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(4): 429–436.
- YAN J H, SHEN X, PENG C, et al. Active components and mechanism of *Canarii fructus-sophorae* Flos on inhibition of *Helicobacter pylori* infection based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2022, 39(4): 429–436.
- [17] ZAIDI-AIT SALEM M, NAIT CHABANE Y, GIRBAL-NEUHAUSER E. Architecture and physico-chemical properties of *Bacillus amyloliquefaciens* L-17 pellicle formed at the air-liquid interface[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, 132(6): 560–568.
- [18] LIU Y, YANG X C, GAN J H, et al. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(W1): 159–164.
- [19] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455–461.
- [20] AOUF A, BOUAOUINA S, ABDELGAWAD M A, et al. *In silico* study for Algerian essential oils as antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria isolated from pus samples[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(10): 1317.
- [21] STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, DAKIĆ I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40(2): 175–179.
- [22] ZHOU W, WANG J N, WU Z Y, et al. Systems pharmacology exploration of botanic drug pairs reveals the mechanism for treating different diseases[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36985.
- [23] RAMÍREZ-LARROTA J S, ECKHARD U. An introduction to bacterial biofilms and their proteases, and their roles in host infection and immune evasion[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 306.
- [24] 温泽文, 陈程纯, 沈宗霖, 等. 奥替溴铵抑制革兰阳性菌生长与生物被膜形成的活性及机制研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(5): 554–562.
- WEN Z W, CHEN C C, SHEN Z L, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of otilonium bromide and its antibacterial mechanism against Gram-positive bacteria [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(5): 554–562.
- [25] 黄宁. 两种狄克氏细菌生物被膜形成影响因子和转录组研究[D]. 南宁: 广西大学, 2019: 108–115.
- HUANG N. Influencing factors on biofilm formation of two *Dickeya* spp. and transcription of *Dickeya zeae* MS1 [D]. Nanning: Guangxi University, 2019: 108–115.
- [26] 刘琳, 谭小娟, 贾爱群. 细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J]. *微生物学报*, 2012, 52(3): 271–278.
- LIU L, TAN X J, JIA A Q. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation: a review [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(3): 271–278.
- [27] PISITHKUL T, SCHROEDER J W, TRUJILLO E A, et al. Metabolic remodeling during biofilm development of *Bacillus subtilis*[J]. *mBio*, 2019, 10(3): e00623–e00619.
- [28] ZHANG W, HE Y L, GAO W X, et al. Deletion of genes involved in glutamate metabolism to improve poly-gamma-glutamic acid production in *B. amyloliquefaciens* LL3[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(2): 297–305.
- [29] KINSINGER R F, KEARNS D B, HALE M, et al. Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(24): 8462–8469.
- [30] ZHUO T, ROU W, SONG X, et al. Molecular study on

the *carAB* operon reveals that *carB* gene is required for swimming and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 225.

- [31] 孙锋, 严慧聪, 汪美贞. 细菌群体感应调控多样性及群体感应淬灭[J]. 微生物学报, 2019, 59(3):

454–467.

SUN F, YAN H C, WANG M Z. Advance of the diversity of bacterial quorum sensing and quorum quenching[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(3): 454–467.

Study on Antibiofilm Mechanism of *Zanthoxylum armatum* Essential Oil Against *Bacillus amyloliquefaciens* Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

ZHANG Yingfan, LÜ Xinyu, XIAO Yuhan, YANG Lu, SHEN Guanghui*
(College of Food Science/Key Laboratory of Agro-Products Processing and Nutritional Health
(Co-Construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: To elucidate the key antibiofilm components of *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil (ZAEO) against *Bacillus amyloliquefaciens* and their associated intracellular mode of action, the PharmMapper server was used to screen potential targets and these predicated targets were then refined by genome annotation information, to predict and select the key active components of ZAEO and action targets involved in antibiofilm. The interaction network between ZAEO's active components and potential targets was constructed by using Cytoscape software. The GO function and KEGG pathway enrichment analysis were further performed using the String database. The core targets were obtained through potential target interactions analysis by STITCH database and performed network topology was analysed by Cytoscape software. Additionally, the CB-DOCK2 web server was used to carry out the molecular docking between the active components and the core targets. Finally, the *in vitro* antibiofilm activity of key components of ZAEO was assessed through culture experiments involving crystal violet staining and bacterial motility test. The results showed that a total of 21 active ZAEO components, 133 potential targets and 8 core targets were obtained by network pharmacology analysis. GO enrichment analysis yielded a total of 17 subcategories, including 6 subcategories related to biological processes, 8 subcategories related to molecular functions, and 3 subcategories related to cellular components. KEGG pathway enrichment analysis revealed 8 signaling pathways, including secondary metabolite biosynthesis, amino acid biosynthesis and other pathways. Molecular docking analysis demonstrated that three key active components, namely uncineol, farnesol acetate and *trans*-farnesol, exhibited strong binding affinity to the core target OdhA, CarB and PurF through intermolecular forces such as hydrogen bonds and hydrophobic interactions, forming stable complex conformation. Furthermore, the *in vitro* biofilm culture verification experiment confirmed that the range of 0.32 to 1.28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of farnesol acetate and *trans*-farnesol displayed significant antibiofilm effects against *Bacillus amyloliquefaciens*. These results aimed to provide new technical routes for the intracellular molecular mechanism of the antibiofilm of ZAEO.

Keywords: network pharmacology; molecular docking; biofilm; *Zanthoxylum armatum* DC. essential oil; *Bacillus amyloliquefaciens*