

doi:10.12301/spxb202300136

文章编号:2095-6002(2023)06-0103-12

引用格式:黄志远,董文明,田洋,等.辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J].食品科学技术学报,2023,41(6):103-114.



HUANG Zhiyuan, DONG Wenming, TIAN Yang, et al. Effect of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptide on *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(6):103-114.

辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜的影响

黄志远, 董文明, 田洋, 黄艾祥, 王雪峰*

(云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

摘要:辣木籽抗菌肽 MOp2、MOp3 对金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌效果,但是其对生物膜是否产生影响尚未清楚。采用结晶紫半定量法、荧光显微镜观察、酶解实验和分子对接技术等探讨从辣木籽蛋白水解物中分离鉴定到的新型抗菌肽 MOp2、MOp3 对金黄色葡萄球菌生物膜的影响。结果表明:MOp2、MOp3 的最小抑制生物膜质量浓度(MBIC)和最小清除生物膜质量浓度均为 4 mg/mL 和 8 mg/mL;1 × MBIC 下 MOp2 与 MOp3 对金黄色葡萄球菌生物膜清除率分别为 63.28% 和 67.90%;荧光显微镜发现,MOp2、MOp3 处理后的生物膜黏附减少,细菌数量减少;细菌初期黏附率在 1 × MBIC 的 MOp2、MOp3 处理后分别降低 44.19% 和 50.77%,且表面疏水性降低;酶解实验表明,金黄色葡萄球菌生物膜胞外聚合物中含量最多的为胞外蛋白(质量分数 49.01%),其次为胞外多糖和胞外 DNA,且 MOp2、MOp3 会抑制胞外聚合物中这 3 种成分的分泌合成;分子对接结果显示,MOp2、MOp3 均可以与生物膜形成关键蛋白 AgrA、CshA、LuxS 和 SarA 结合,这可能对金黄色葡萄球菌群体感应系统造成一定影响,从而抑制生物膜形成。研究旨在为辣木籽抗菌肽在食品工业中的防腐保鲜应用提供理论依据。

关键词:辣木籽抗菌肽;金黄色葡萄球菌;生物膜;胞外聚合物;分子对接

中图分类号:TS201.6

文献标志码:A

近年来,食品安全已成为全球公共卫生关注的焦点问题。微生物污染是最常见的食品安全问题之一,可引起食品腐败和食源性疾病,从而影响人类的健康,并造成巨大的经济损失^[1]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是一种革兰氏阳性共生细菌^[2],作为世界上第三大食源性致病菌,可引起菌血症、败血症等疾病^[3],在中国超过 25% 的食源性疾病都与 *S. aureus* 有关^[4]。而导致感染的

毒力因子受细菌生长阶段的调控,细菌在早期对数时期会产生细胞因子,这些因子使细菌能够逃避宿主的防御并建立生物膜^[5]。生物膜是一种具有良好结构和多样性的动态细菌胞外聚集物,对抗生素的耐药性是原菌株的 10 ~ 1 000 倍^[6]。因此,有必要寻找新型抑制剂进一步抵抗细菌生物膜的形成。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是一类具有天然生物活性的多肽,对细菌、病毒、真菌都有抑

收稿日期:2023-03-09

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31960462);云南省农业联合专项(202101BD070001-013);云南省科协青年科技人才托举工程项目。

Foundation: National Natural Science Foundation of China (31960462); Joint Agricultural Project of Yunnan Province (202101BD070001-013); Young Elite Scientists Sponsorship Program by Yunnan Science and Technology Association.

第一作者:黄志远,男,硕士研究生,研究方向为抑菌类生物活性肽及其抑菌机制。

*通信作者:王雪峰,男,副教授,博士,主要从事食品蛋白质资源利用与乳品科学方面的研究。

制作用^[7]。它们是生物体(如两栖动物、哺乳动物、昆虫和植物)用来对抗病原体入侵的天然免疫屏障,被称为“第二防御系统”^[8]。与传统抗生素不同,AMPs具有多靶点的抑菌机制,一些AMPs可以通过破坏细胞壁膜、作用于DNA和RNA、抑制蛋白质合成以及增加细胞内活性氧的水平来发挥作用,因此不易产生耐药性^[9]。并且AMPs对环境友好,具有良好的稳定性,可以在食品工业中作为一种新型食品防腐剂保存原料与产品^[10]。同时,有研究表明,一些AMPs可以有效抑制生物膜的形成,甚至对成熟的生物膜造成破坏^[11]。如来自舌兰蛙的抗菌肽brevin-gr23可显著抑制胞外多糖的产生、金黄色葡萄球菌生物膜的附着和形成^[12]。螺旋肽G3可以在不同阶段干扰变形链球菌生物膜的形成,在初始阶段,G3通过降低细菌表面电荷、疏水性、膜完整性和黏附相关基因转录来抑制细菌黏附;在后期,G3与胞外聚合物中的胞外DNA(eDNA)相互作用,破坏成熟生物膜的3D稳定性结构,从而分散它们^[13]。

MOp2和MOp3是本课题组前期从辣木籽蛋白水解物中分离鉴定到的2种新型阴离子抗菌肽。MOp2相对分子质量为907.06,MOp3相对分子质量为712.81,都带1个负电荷,固体状态下结构以 β -转角为主,具有良好的稳定性,使用胃蛋白酶和胰蛋白酶处理1h后仍保留70%以上的活性。它们对*S. aureus*表现出了良好的抑菌活性,并且对*S. aureus*造成一定的膜损伤^[14-15]。但MOp2、MOp3是否会对*S. aureus*的生物膜产生抑制作用鲜有研究。因此,本研究拟通过分析MOp2、MOp3对*S. aureus*生物膜的形成能力以及成熟生物膜的影响,结合分子对接技术解析2种辣木籽抗菌肽对*S. aureus*生物膜的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

S. aureus (CICC 10384),中国工业培养收集中心。结晶紫(分析纯)、DAPI荧光染料(分析纯),中国碧云天生物技术有限公司;刃天青(分析纯),中国索莱宝科技有限公司。MOp2(肽序列:HVLDT-PLL)、MOp3(肽序列:HVLDTPLL),肽段纯度98%以上,安徽省国药药业有限公司。

1.2 仪器与设备

Multiskan Go型酶标仪,美国 Thermo Scientific

公司;Dmi3000B型荧光显微镜,德国 Carl Zeiss AG公司;DHp-600型电热恒温培养箱,北京市永光明医疗仪器有限公司;TGL20M型台式高速离心机,北京中兴伟业仪器有限公司;LDZM-60KCS型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

1.3 实验方法

1.3.1 *S. aureus* 生物膜形成能力测定

参照 Ommen 等^[16]方法并稍加修改。在24孔板中分别加入2 mL 无菌胰蛋白胨大豆培养基(TSB)和体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL),在37℃下分别培养4、8、12、24、48、72、96、120 h。培养完成后,弃去培养基,并用PBS清洗以除去浮游细菌。然后向各孔添加500 μ L 甲醇,固定1 h后弃去甲醇并用PBS洗涤。向各孔加入体积分数1%结晶紫染色15 min后用PBS洗涤。干燥后,加入200 μ L 乙醇-丙酮溶液(体积比4:1),然后在595 nm处测定吸光度。

1.3.2 辣木籽抗菌肽处理后*S. aureus*最小抑制生物膜质量浓度和最小清除生物膜质量浓度测定

参照 Zhang 等^[17]方法并稍加修改。最小抑制生物膜质量浓度(MBIC)测定:在24孔板中分别加入2 mL 无菌TSB和体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL),随后加入抗菌肽,使之终质量浓度分别为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 mg/mL,37℃培养48 h以形成生物膜。然后在每孔中加入噻唑蓝(MTT)溶液20 μ L(5 mg/mL),2 h后吸去上清液,用PBS清洗以除去游离菌,乙醇脱色后测定 $OD_{570\text{nm}}$ 。以无菌TSB孔为空白对照组,OD值与空白组相比无显著变化的最小质量浓度定为MBIC。最小清除生物膜质量浓度(MBEC)测定:生物膜在24孔板中培养完成后,用PBS洗去游离菌,加入与测定MBIC相同质量浓度的抗菌肽,然后在37℃下培养24 h。MTT染色后测定 $OD_{570\text{nm}}$,OD值与对照组相比无明显变化的最小质量浓度定为MBEC。

1.3.3 辣木籽抗菌肽对*S. aureus*生物膜的清除作用测定

参照 Ommen 等^[16]方法并稍加修改。在24孔板中分别加入2 mL 无菌TSB和体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)。37℃培养48 h以形成生物膜,随后弃去TSB并使用无菌PBS清洗,然后加入MOp2与MOp3(2、4、8 mg/mL),空白对照组中加入无菌水,在37℃下培养12 h。在0、2、4、6、8、10、

12 h时,参照1.3.1节中结晶紫染色法测定各组样品的 $OD_{595\text{ nm}}$ 。

1.3.4 辣木籽抗菌肽处理后 *S. aureus* 生物膜微观形态的变化

参照 Lin 等^[18]方法并稍加修改。在6孔板中分别加入5 mL 无菌TSB、体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)及1片无菌盖玻片(2 cm × 2 cm)。37 °C培养48 h以形成生物膜,随后弃去TSB并使用无菌PBS清洗,然后加入MOp2与MOp3(4 mg/mL),空白对照组中加入无菌水。37 °C培养12 h后,取出盖玻片,并加入DAPI(10 μg/mL)在黑暗中染色20 min,随后用荧光显微镜观察生物膜结构。

1.3.5 辣木籽抗菌肽处理后 *S. aureus* 生物膜内细菌新陈代谢的变化

将不锈钢片(1 cm × 1 cm)在体积分数75%乙醇中浸泡24 h,并超声处理1 h以除去表面杂质。随后用无菌去离子水彻底清洗,并将不锈钢片121 °C高压灭菌30 min备用。在24孔板中分别加入2 mL 无菌TSB、体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)及1片灭菌不锈钢片。37 °C下培养48 h以形成生物膜,随后弃去TSB并用无菌PBS清洗,然后加入抗菌肽MOp2与MOp3(2、4、8 mg/mL),空白对照组中加入无菌水。处理4 h,取出不锈钢片置于无菌均质袋,加入10 mL PBS超声15 min,使生物膜细菌从不锈钢片上分离并收集菌悬液,在菌悬液中加入体积分数10%的刃天青溶液,37 °C黑暗中振荡2 h,4 °C下10 000 r/min离心10 min取得上清液,用酶标仪分别检测其在560 nm激发波长和590 nm发射波长处的荧光值。

1.3.6 辣木籽抗菌肽处理后 *S. aureus* 生物膜初期形成的变化

1.3.6.1 细菌初期黏附实验

参照 Bai 等^[19]方法并稍加修改。体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)接种于含3 mL 葡萄糖(质量分数0.5%)、氯化钠(质量分数3%)的脑心浸液培养基中,并加入抗菌肽MOp2与MOp3(2、4、8 mg/mL),空白对照组中加入无菌水,在37 °C下培养至对数期。以5 000 r/min冷冻离心5 min,得细菌沉淀物,将细菌沉淀物置于37 °C下,并加到含纤维蛋白原的96孔板中,孵育1 h后,用体积分数25%的甲醛固定,然后进行结晶紫染色,用酶标仪测定 $OD_{595\text{ nm}}$ 。相对黏附率计算见式(1)。

$$\text{相对黏附率} = \frac{OD(\text{实验})_{595\text{ nm}}}{OD(\text{空白})_{595\text{ nm}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6.2 辣木籽抗菌肽处理后 *S. aureus* 表面疏水性变化

体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)接种于3 mL的TSB肉汤,并加入抗菌肽MOp2与MOp3(2、4、8 mg/mL),空白对照组中加入无菌水,在37 °C下培养24 h。之后向试管中加入500 μL 甲苯,剧烈旋转3 min,然后静止10 min,以获得相分离。最后,仔细吸取下层水相,并在涡流前后测定600 nm处吸光度。疏水率计算见式(2)。

$$\text{疏水率} = 1 - \frac{OD(\text{涡流后})_{600\text{ nm}}}{OD(\text{涡流前})_{600\text{ nm}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.7 辣木籽抗菌肽处理后 *S. aureus* 生物膜胞外聚合物的变化

1.3.7.1 酶解实验

在48孔板中分别加入2 mL 无菌TSB和体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)。37 °C下培养48 h以形成生物膜,培养后弃掉培养基。实验共设置4组样品,其中1组为空白组,其余3组为实验组,每组设置10个复孔。空白组中加入无菌水,实验组分别加入高碘酸钠(10 μmol/L)、脱氧核糖核酸酶(2 mg/mL)和蛋白酶K(100 μg/mL)。将48孔板在37 °C培养2 h,并用结晶紫染色。乙醇脱色30 min后,用酶标仪测定595 nm处的吸光度。

1.3.7.2 细菌胞外多糖含量测定

参照崔海英等^[20]方法并稍加修改。将不锈钢片(1 cm × 1 cm)在体积分数75%的乙醇中浸泡24 h,并超声处理1 h以除去表面杂质。随后用无菌去离子水彻底清洗,并将不锈钢片在121 °C下高压灭菌30 min备用。在24孔板中分别加入2 mL 无菌TSB、体积分数1%的细菌菌悬液(10^8 CFU/mL)及1片灭菌的不锈钢片。37 °C下培养48 h以形成生物膜,培养开始时加入抗菌肽MOp2与MOp3(2、4、8 mg/mL),空白组加入等量无菌水。培养完成后,弃去TSB,并用PBS冲洗以除去表面游离菌。将清洗后的不锈钢片置于PBS中超声处理1 h,收集菌悬液,10 000 r/min离心10 min取上清液作为胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)样本备用。

采用苯酚-硫酸法测定上清液中胞外多糖的含量,将1 mL上清液和1 mL苯酚(50 g/L)溶液混合,

混合均匀后振荡 30 s,之后加入 15 mL 硫酸(体积分数 95%)溶液,在黑暗中反应 15 min 后,将溶液涡旋振荡 10 s,置于恒温水浴中反应 20 min。使用紫外分光光度计检测溶液在 490 nm 处的吸光度,以分析胞外多糖的质量浓度。

1.3.7.3 细菌胞外蛋白含量测定

使用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定样品蛋白质含量。取 1.3.7.2 节中制备的 EPS 样本 40 μ L 于试管中,按照蛋白质加样量(表 1)加样,静置 10 min,用酶标仪在波长 595 nm 处测定各管的吸光度,按式(3)计算蛋白质含量。

$$\rho(\text{样品}) = \frac{OD(\text{测定})_{595\text{ nm}} - OD(\text{空白})_{595\text{ nm}}}{OD(\text{标准})_{595\text{ nm}} - OD(\text{空白})_{595\text{ nm}}} \times \rho(\text{标准})。 \quad (3)$$

表 1 蛋白质加样量

Tab. 1 Protein sample loading amount μ L

组别	V(试剂)			考马斯亮蓝显色液
	蒸馏水	蛋白质标准液	样品	
空白管	0.05	0.00	0.00	3.00
标准管	0.00	0.05	0.00	3.00
测定管	0.00	0.00	0.05	3.00

1.3.7.4 细菌 eDNA 含量测定

按照 1.3.7.2 节中方法制备 EPS 样本,使用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取 EPS 中 eDNA 后,使用酶标仪检测 260 nm 处的吸光度,并根据吸光度计算 eDNA 含量。

1.3.8 分子对接分析

对接使用的 AgrA、LuxS、CshA、SarA 蛋白质晶体结构从 Uniprot 数据库中下载获得,其中 AgrA 蛋白的 PDB ID 为 6PRA,其余蛋白质为基于 Alphafold 预测的结构。MOp2、MOp3 的 3D 结构采用 PyMol 2.5.2 构建,并保存为 PDB 格式。

采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接,在对接开始之前,使用 PyMol 2.5.2 对受体蛋白进行处理,包括去除水分子、盐离子以及小分子。随后设置对接盒子,使之包裹整个蛋白质结构。此外,使用 ADRsuite 1.03 将所有处理好的小分子以及受体蛋白转换为 AutoDock Vina 1.1.2 对接必需的 PDBQT 格式。对接时,全局搜索的详尽度设为 32,其余参数保持默认设置。打分最高的对接构象被认为

是结合构象,最后使用 PyMol 2.5.2 对接结果进行可视化分析。

1.4 数据处理

实验结果使用 SPSS 26.0 软件分析,采用单因素方差分析和 Bonferroni 统计学检验来确定 $P < 0.05$ 的显著性水平下的统计差异,数据表示为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 S. aureus 生物膜的形成能力

S. aureus 可以在食品原料或者食品加工机器表面形成生物膜。金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力见图 1。由图 1 可知,随着培养时间的延长,吸光度不断上升,并且在 48 h 达到最高(1.78),表明此菌株有很强的生物膜形成能力,其结果判读依据是 $OD_{595\text{ nm}} > 4OD_c$ ($OD_c = 0.08$) 为强生物膜形成株^[21]。48 h 时被认为是生物膜的成熟阶段,生物膜复杂的三维结构完全形成,生物膜内细菌群也处于活跃状态^[22-23]。因此,在后续的实验,生物膜培养时间选择为 48 h。

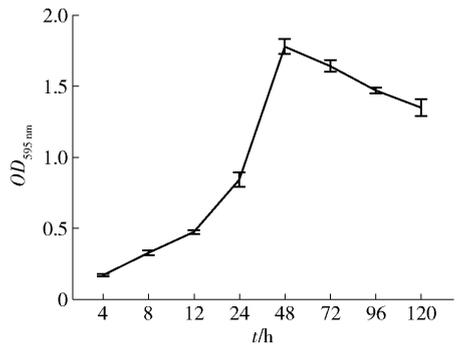


图 1 金黄色葡萄球菌的生物膜形成能力

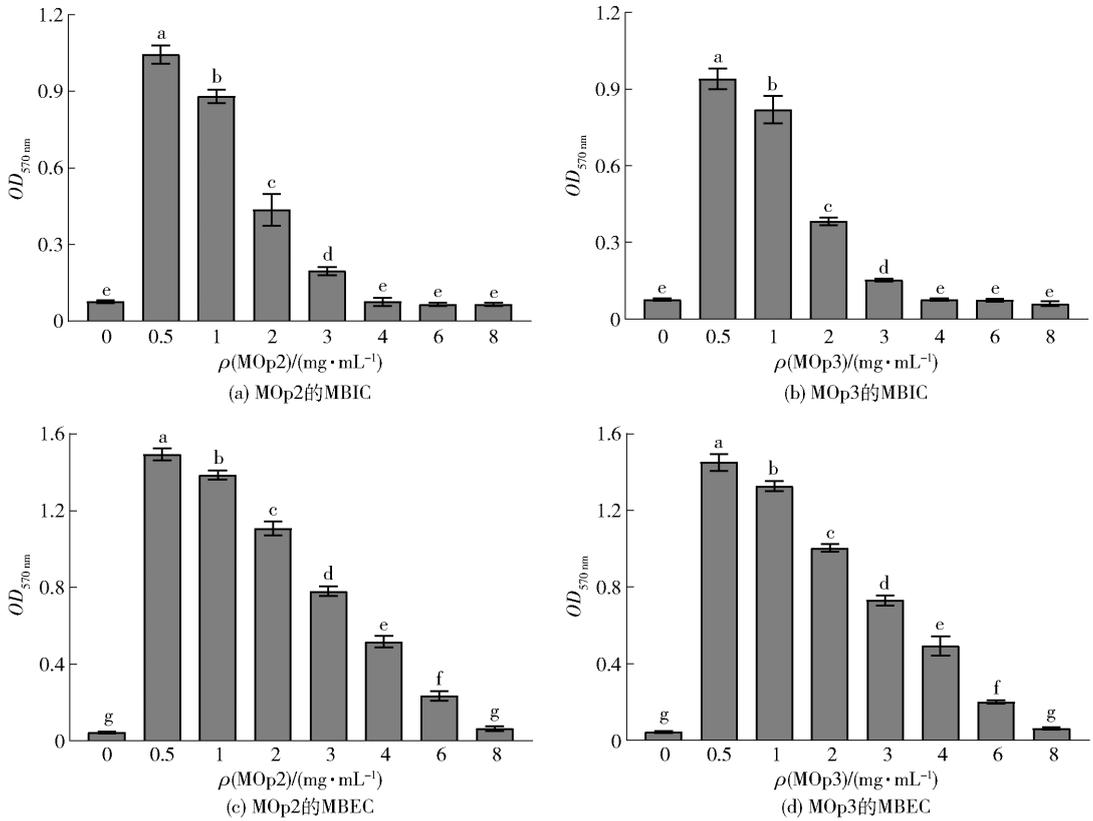
Fig. 1 Biofilm forming ability of *S. aureus*

2.2 辣木籽抗菌肽对 S. aureus 生物膜的 MBIC 和 MBEC 测定结果

辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌的 MBIC 和 MBEC 见图 2。由图 2 可知,MOp2、MOp3 对 *S. aureus* 的 MBIC 均为 4 mg/mL,MBEC 均为 8 mg/mL。MOp2 与 MOp3 的 MBIC 处于成熟生物膜抑制剂桉叶素(8 mg/mL)^[24]与丁香精油(1 mg/mL)^[17]之间,因此,MOp2、MOp3 有望成为一种新型生物膜抑制剂。

2.3 辣木籽抗菌肽对 S. aureus 生物膜的清除作用

MOp2、MOp3 对 *S. aureus* 生物膜的清除效果采



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图2 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌的 MBIC 和 MBEC

Fig. 2 MBIC and MBEC of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on *S. aureus*

用结晶紫半定量法测定,结果见图3。空白组的吸光度在12 h内基本保持不变,实验组的吸光度随着MOp2、MOp3质量浓度的增加而减少,说明MOp2与MOp3的质量浓度越高对*S. aureus*生物膜的清除效果越好。1×MBIC的MOp2处理12 h后,生物膜清除率达到63.28%,2×MBIC时生物膜清除率达到80.56%。1×MBIC的MOp3处理12 h后,生物膜清除率达到67.90%,2×MBIC时生物膜清除率达到81.64%,进一步说明MOp2、MOp3可以有效清除生物膜且呈现一定的剂量依赖性。

2.4 辣木籽抗菌肽对*S. aureus*生物膜微观形态的影响

为了研究MOp2、MOp3对*S. aureus*生物膜形态结构的影响,采用荧光显微镜对菌体结构进行了微观观察,见图4。由图4可知,空白组[图4(a)]生物膜结构完整、立体,处理组[图4(b)至图4(e)]荧光强度明显下降,生物膜三维结构解体,大多呈游离状态分散在玻片表面。结果表明:MOp2、MOp3能破坏*S. aureus*的生物膜立体结构,导致细菌死

亡,这与Reis-Teixeira等^[25]的研究结果一致。

2.5 辣木籽抗菌肽对*S. aureus*生物膜内细菌新陈代谢的影响

细菌的新陈代谢能力一定程度上能反映出菌体细胞的活力。刃天青具有荧光强度,能够穿透细胞膜,通过不同细菌氧化还原酶的作用降解为高荧光强度的中间产物试卤灵。刃天青向试卤灵转化是不可逆的,并且这种转化与参与代谢的细菌数量成正比,因此这种方法可以检测细菌的生存能力^[26]。

MOp2、MOp3对金黄色葡萄球菌生物膜新陈代谢的影响见图5。由图5可知,经过0.5×MBIC的MOp2与MOp3处理后,*S. aureus*生物膜的代谢活性明显下降($P < 0.05$),分别下降了15.60%和20.62%;而经过1×MBIC的MOp2与MOp3处理后,*S. aureus*生物膜的代谢活性显著下降了54.11%和62.34%。造成*S. aureus*生物膜代谢活性下降的原因可能是细菌代谢过程中能量传递的电子传递链主要位于细胞膜的内表面,细胞膜在受到抗菌肽的刺激和破坏后,能量代谢功能紊乱,因此代

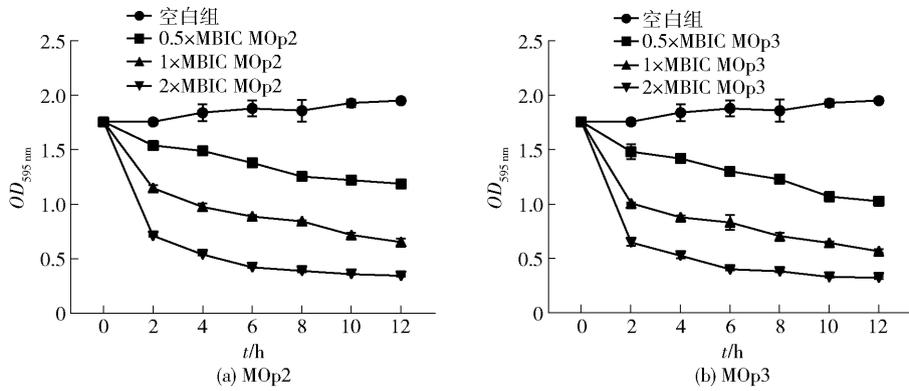


图3 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果

Fig. 3 Clearance effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on *S. aureus* biofilm

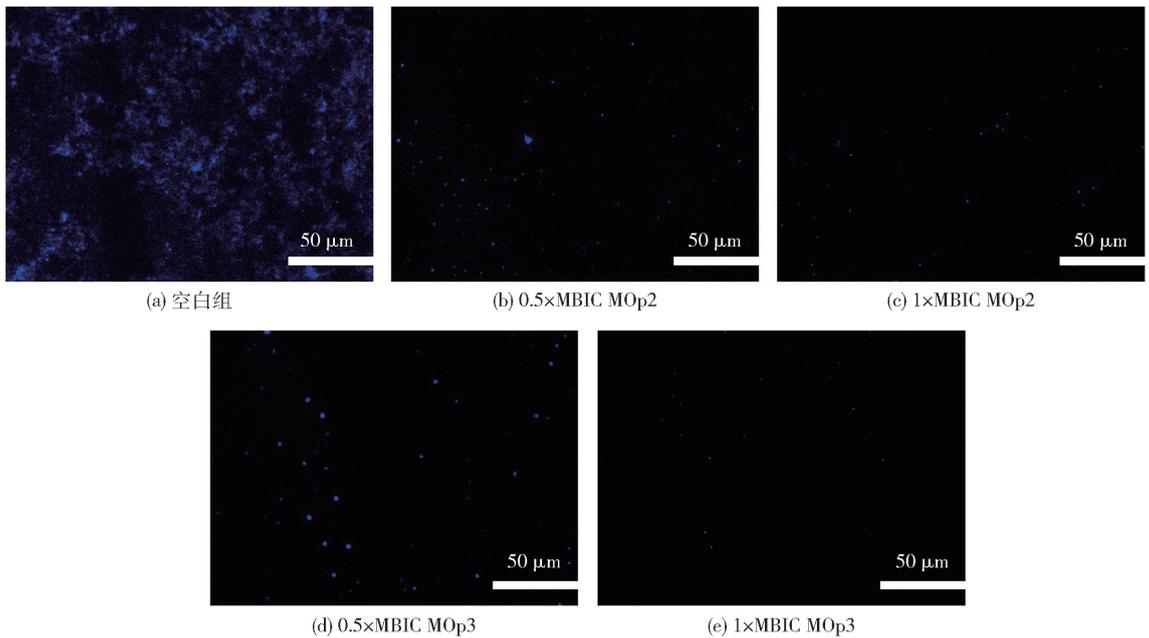


图4 金黄色葡萄球菌生物膜经辣木籽抗菌肽处理前后的荧光显微照片

Fig. 4 Fluorescence micrographs of *S. aureus* biofilm before and after treatment with *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides

谢活性大大下降,同时先前的研究通过冷冻扫描电镜也发现 MOp2、MOp3 可以破坏 *S. aureus* 的细胞壁膜结构^[14-15]。

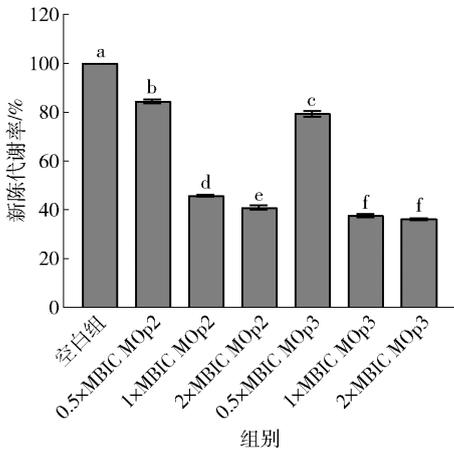
2.6 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 生物膜黏附率的影响

生物膜初期形成阶段主要依靠细菌细胞之间的黏附作用聚集到一起,此时细菌利用细胞壁锚定蛋白(CWA)附着于不同载体的表面^[27]。本研究测定了 MOp2、MOp3 对 *S. aureus* 初期黏附的影响,见图6。由图6可知,0.5×MBIC 的 MOp2 与 MOp3 可以显著抑制 *S. aureus* 的初始定值($P < 0.05$),黏附率分别下降了 19.84% 和 24.04%;1×MBIC 的 MOp2 与 MOp3

对 *S. aureus* 的黏附呈现了更好的抑制作用,黏附率分别下降了 44.19% 和 50.77%;特别是在 2×MBIC 时,黏附率分别下降了 74.45% 和 75.96%。结果表明:MOp2、MOp3 对生物膜菌体的初期黏附能力具有抑制作用且呈现剂量依赖性,细菌初期黏附能力下降,生物膜的形成能力也随之下降。

2.7 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 表面疏水性的影响

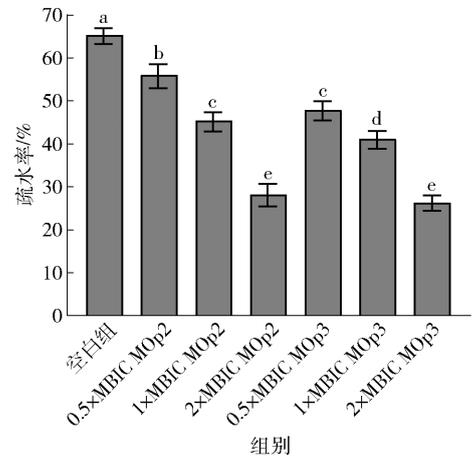
细胞表面疏水性与细菌黏附、生物膜的形成密切相关,细菌表面疏水性的降低可能会弱化生物膜的形成能力^[28]。MOp2 与 MOp3 对 *S. aureus* 表面疏水性的影响见图7。由图7可知,与空白组相比,



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图5 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜新陈代谢的影响

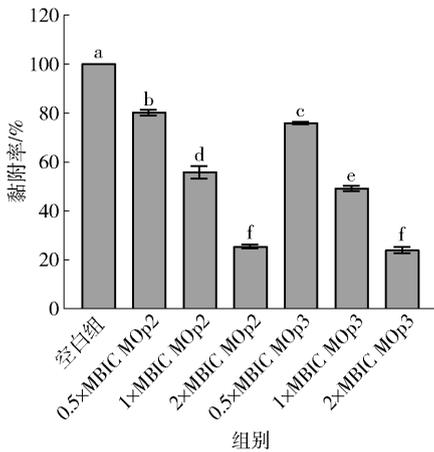
Fig. 5 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on biofilm metabolism of *S. aureus*



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图7 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜疏水性的影响

Fig. 7 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on biofilm hydrophobicity of *S. aureus*



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图6 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜黏附率的影响

Fig. 6 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on biofilm adsorption of *S. aureus*

在经过 MOp2 与 MOp3 处理后,细菌表面疏水性均有显著下降($P < 0.05$),且与抗菌肽质量浓度呈正相关;在 $2 \times \text{MBIC}$ 时,*S. aureus* 的表面疏水性分别下降了 71.94% 和 73.77%,这与杨露等^[28]的研究结果一致。

2.8 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 胞外聚合物的影响

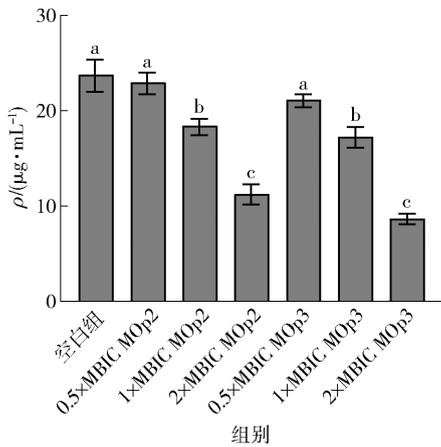
2.8.1 *S. aureus* 生物膜组成分析

成熟的生物膜是附着的微生物群落,能够抵抗

外来分子(包括许多小分子抗菌剂)并导致持续感染^[29]。生物膜的形成首先是细菌黏附到表面,然后是群体感应(QS)的聚集、菌落发育和EPS的分泌。其中,EPS具有一系列的功能,如作为支架和将生物膜细胞连接在一起^[30]。同时,EPS还为生物膜提供了结构稳定性,并维持了其代谢活性。使用高碘酸钠、DNase I 和蛋白酶分别水解多糖、DNA 和蛋白质,测定胞外多糖、eDNA 和胞外蛋白的含量,发现 *S. aureus* 生物膜中含量最高的是蛋白质(质量分数 49.01%),其次是胞外多糖(质量分数 39.73%)和 eDNA(质量分数 11.26%)。

2.8.2 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 生物膜胞外多糖的影响

多糖是EPS中研究最多的成分,基于糖单体,多糖分为同多糖和杂多糖。EPS的含量在增长平稳期开始时处于峰值,在指数阶段和稳定阶段观察到QS活性,QS系统的转录调控因子影响胞外多糖操纵子的转录调控因子,并控制胞外多糖的产生^[31]。MOp2 与 MOp3 对细菌胞外多糖含量的影响见图8。在经过 $1 \times \text{MBIC}$ 的 MOp2 与 MOp3 处理后,胞外多糖的含量出现显著下降($P < 0.05$),分别下降了 22.66% 和 27.39%; $2 \times \text{MBIC}$ 时,胞外多糖含量下降更为明显。可能的原因是 MOp2 与 MOp3 对 *S. aureus* 的 QS 系统造成影响,使胞外多糖合成受阻。



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图8 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜胞外多糖的影响

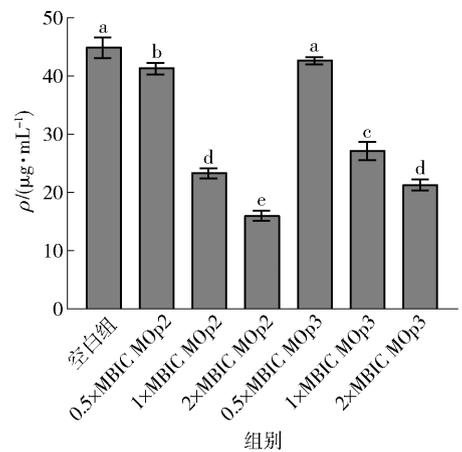
Fig. 8 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on extracellular polysaccharides of *S. aureus* biofilm

2.8.3 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 生物膜胞外蛋白的影响

S. aureus 的胞外聚合物中含量最高的为蛋白质,并且有研究对生物膜的 EPS 基质进行蛋白组学分析,发现存在一些毒力因子,它们是感染宿主的主要蛋白质^[32],因此,探究 MOp2 与 MOp3 对细菌胞外蛋白分泌的影响尤为重要。辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜胞外蛋白的影响见图 9。经过 1×MIBC 的 MOp2、MOp3 作用后,胞外蛋白的含量分别下降了 48.05% 和 39.55%;经过 2×MIBC 的 MOp2、MOp3 作用后,胞外蛋白的含量分别下降了 61.57% 和 54.54%。这说明 MOp2 与 MOp3 在很大程度上阻止了胞外蛋白的形成,并且明显抑制了胞外蛋白的合成与分泌,这与 Vazquez-Armenta 等^[33]的研究结果一致。

2.8.4 辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 生物膜胞外 DNA 的影响

eDNA 是 *S. aureus* 生物膜的功能成分,起初 eDNA 被认为是一种次要成分,主要与基因转移的基因库有关,但是最近有研究重新评估了其对生物膜形成的贡献。eDNA 通过细胞死亡和裂解释放,主要发生在生物膜的内部,保护细菌免受抗菌剂和抗生素的影响^[34],此外,eDNA 还能促进细胞间的细胞黏附^[35]。MOp2 与 MOp3 对 eDNA 的影响见图 10。在 0.5×MBIC 与 1×MBIC 时,生物膜 eDNA 的含量变化不显著,在 2×MBIC 时,eDNA 含量明显

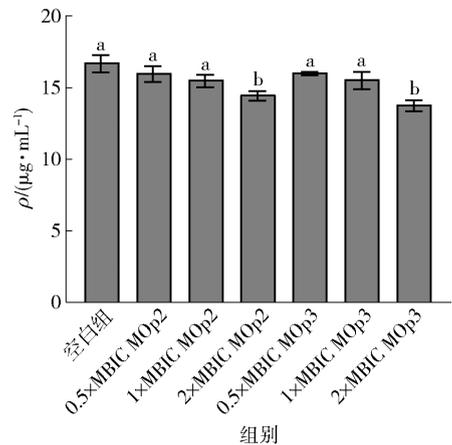


不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图9 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜胞外蛋白的影响

Fig. 9 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on extracellular protein of *S. aureus* biofilm

下降($P < 0.05$),分别下降了为 14.24% 和 17.55%,与 Secchi 等^[36]的研究结果一致,说明 MOp2 与 MOp3 通过抑制 eDNA 的合成,破坏细菌的自我防御系统并导致生物膜无法黏附。



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图10 辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌生物膜 eDNA 的影响

Fig. 10 Effect of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides on eDNA of *S. aureus* biofilm

2.9 辣木籽抗菌肽与 *S. aureus* 生物膜形成关键蛋白的分子对接分析

QS 系统在生物膜形成过程中起关键作用。QS 系统中的 AgrA 蛋白对菌体生物膜的形成、毒力因子分泌等多种生物活性起调控作用^[37]。CshA 是一种细菌黏附蛋白,覆盖在细菌细胞表面,

细菌可以利用其附着在基质或者其他细菌上形成生物膜^[38]。QS系统中AI-2信号分子的合成依赖LuxS蛋白酶。LuxS蛋白酶可以影响细菌形成生物膜以及其耐药性^[39]。葡萄球菌辅助调节因子(SarA)是重要的毒力基因调控因子,可调控约120个基因的表达,涉及QS系统、生物膜合成、耐药性等众多与*S. aureus*致病相关的生理过程^[40]。这4种蛋白质在生物膜形成过程中发挥重要作用,使用分子对接技术可推测MOp2、MOp3是否与这4种蛋白质发生相互作用。

结合能表示对接的可能性,低于-20.92 kJ/mol通常被认为更有可能结合^[41]。辣木籽抗菌肽与*S. aureus*生物膜形成关键蛋白的分

子对接位点见表2。由表2可知,MOp2、MOp3与这4种蛋白的结合能均小于-20.92 kJ/mol。辣木籽抗菌肽与*S. aureus*生物膜形成关键蛋白的分子对接结果见图11。由图11可知,MOp2通过3个氢键与AgrA结合,MOp3通过6个氢键与AgrA结合;MOp2通过3个氢键与CshA结合,MOp3通过6个氢键与CshA结合;MOp2通过6个氢键与LuxS结合,MOp3通过6个氢键与LuxS结合;MOp2通过2个氢键与SarA结合,MOp3通过4个氢键与SarA结合。结果表明:MOp2与MOp3均可能通过氢键与这4种蛋白质结合,从而抑制这些蛋白质的表达,最终导致细菌无法黏附和形成生物膜。

表2 辣木籽抗菌肽与金黄色葡萄球菌生物膜形成关键蛋白的分子对接分析

Tab.2 Molecular docking analysis of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides with key biofilm formation proteins of *S. aureus*

肽	关键蛋白	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数	结合位点
MOp2	AgrA	-29.71	3	ASN-18、ARG-57、LYS-32
	CshA	-25.52	3	ASN-292、ASP-381、ASN-426
	LuxS	-28.45	6	PRO-78、GLY-80、CYS-81、ASN-46、HIS-13、SER-8
	SarA	-21.76	2	ASN-61、ILE-6
MOp3	AgrA	-30.12	6	THR-96、GLN-95、THR-121、THR-46、LYS-45、ARG-44
	CshA	-21.76	6	GLU-384、GLN-239、ASP-381、ASN-426、LYS-266、ASN-292
	LuxS	-26.78	6	GLN-122、HIS-60、HIS-56、ARG-67、LEU-76、GLU-59
	SarA	-22.18	4	GLU-77、SER-33、PHE-34、LYS-69

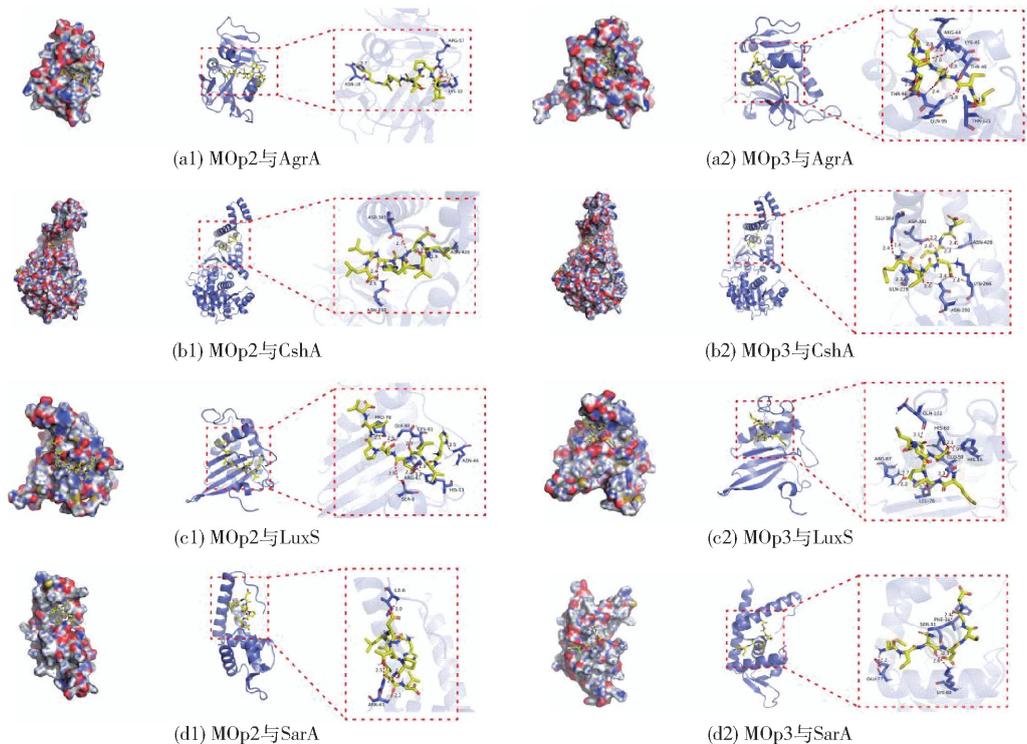


图11 辣木籽抗菌肽与金黄色葡萄球菌生物膜形成关键蛋白的分子对接结果

Fig. 11 Molecular docking results of *Moringa oleifera* seeds antimicrobial peptides with key biofilm formation proteins of *S. aureus*

3 结 论

本研究采用结晶紫半定量法证明了 *S. aureus* CICC 10384 有很强的生物膜形成能力,而辣木籽抗菌肽 MOp2、MOp3 对 *S. aureus* 生物膜的 MBIC 和 MBEC 均为 4 mg/mL 和 8 mg/mL,能有效清除 *S. aureus* 生物膜。经 MOp2、MOp3 处理后,*S. aureus* 生物膜黏附减少、细菌数量减少,生物膜菌体新陈代谢能力和生物膜早期形成能力显著下降,细菌初期黏附能力及表面疏水性降低。酶解实验结果表明,*S. aureus* 生物膜 EPS 中含量最多的为胞外蛋白,其次为胞外多糖和 eDNA,而 MOp2、MOp3 会抑制 EPS 中 3 种成分的分泌合成。分子对接结果发现,MOp2、MOp3 均可能通过氢键与生物膜形成关键蛋白 AgrA、CshA、LuxS 和 SarA 结合,这可能导致群体感应系统紊乱,进而导致细菌无法黏附和形成生物膜。研究结果可为辣木籽抗菌肽对 *S. aureus* 生物膜的影响提供一定的参考,希望为其在食品工业中的进一步应用提供一定的科学依据。接下来的研究将通过蛋白质组学、Western blot、平行反应监测、RT-qPCR 等技术针对性地分析 2 种肽抑制生物膜的具体靶点。

参考文献:

[1] GUO N, BAI X, SHEN Y, et al. Target-based screening for natural products against *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(14): 2216–2230.

[2] TUCHSCHERR L, LÖFFLER B. *Staphylococcus aureus* dynamically adapts global regulators and virulence factor expression in the course from acute to chronic infection [J]. *Current Genetics*, 2016, 62(1): 15–17.

[3] SERRA R, GRANDE R, BUTRICO L, et al. Chronic wound infections; the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2015, 13(5): 605–613.

[4] XU Z B, LI L, CHU J, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains [J]. *Food Research International*, 2012, 47(2): 166–173.

[5] KONG K F, VUONG C, OTTO M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection [J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296(2/3): 133–139.

[6] PANG Z, RAUDONIS R, GLICK B R, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(1): 177–192.

[7] YEAMAN M R, YOUNT N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [J]. *Pharmacological Reviews*, 2003, 55(1): 27–55.

[8] LAZZARO B P, ZASLOFF M, ROLFF J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution [J]. *Science*, 2020, 368(6490): e5480.

[9] REDDY K V R, YEDERY R D, ARANHA C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(6): 536–547.

[10] PARISIEN A, ALLAIN B, ZHANG J, et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(1): 1–13.

[11] MULANI M S, KAMBLE E E, KUMKAR S N, et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 539.

[12] ZHONG H R, XIE Z P, ZHANG S X, et al. Brevinin-GR23 from frog *Hylarana guentheri* with antimicrobial and antibiofilm activities against *Staphylococcus aureus* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(1): 143–153.

[13] ZHANG J Y, CHEN C X, CHEN J X, et al. Dual mode of anti-biofilm action of G3 against *Streptococcus mutans* [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(25): 27866–27875.

[14] ZHAO Q, HE L, WANG X F, et al. Characterization of a novel antimicrobial peptide isolated from *Moringa oleifera* seed protein hydrolysates and its membrane damaging effects on *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(20): 6123–6133.

[15] WANG X F, HE L, HUANG Z Y, et al. Isolation, identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Moringa oleifera* seeds based on affinity adsorption [J]. *Food Chemistry*, 2023, 398: 133923.

[16] OMMEN P, ZOBOK N, MEYER R L. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 141: 87–89.

[17] ZHANG C H, LI C Z, ABDEL-SAMIE M A, et al. Unraveling the inhibitory mechanism of clove essential oil against *Listeria monocytogenes* biofilm and applying it to vegetable surfaces [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 134: 110210.

[18] LIN L, LIAO X, LI C Z, et al. Inhibitory effect of cold

- nitrogen plasma on *Salmonella* Typhimurium biofilm and its application on poultry egg preservation [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2020, 126: 109340.
- [19] BAI M, LI C Z, CUI H Y, et al. Preparation of self-assembling *Litsea cubeba* essential oil/diphenylalanine peptide micro/nanotubes with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 146: 111394.
- [20] 崔海英, 李虹, 方厚智, 等. 山苍子精油对 MRSA 生物被膜及其调控基因 *ica A* 的抑制机理研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(5): 9-13.
- CUI H Y, LI H, FANG H Z, et al. Antibacterial mechanism of *Litsea cubeba* oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm and its regulatory gene *Ica A* [J]. *China Food Additives*, 2020, 31(5): 9-13.
- [21] 张能华, 沈惠, 陈兴英, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药特性及生物膜形成能力分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(22): 2728-2730.
- ZHANG N H, SHEN H, CHEN X Y, et al. Drug resistance and biofilm formation ability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2019, 29(22): 2728-2730.
- [22] WANG H H, YE K P, WEI X R, et al. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China [J]. *Food Control*, 2013, 33(2): 378-384.
- [23] TURKI Y, OUZARI H, MEHRI I, et al. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella kentucky* isolated in Tunisia [J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 940-946.
- [24] KIFER D, MUŽINIĆ V, KLARIĆ M Š. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1, 8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2016, 69(9): 689-696.
- [25] REIS-TEIXEIRA F B, SOUSA I P, ALVES V F, et al. Evaluation of lemongrass and ginger essential oils to inhibit *Listeria monocytogenes* in biofilms [J]. *Journal of Food Safety*, 2019, 39(4): e12627.
- [26] JIANG L M, HOOGENKAMP M A, VAN DER SLUIS L W M, et al. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms [J]. *Journal of Endodontics*, 2011, 37(1): 31-35.
- [27] ZHANG Y, ZHONG H C, ZHENG Y X, et al. Use of whole-genome analysis to study the effect of various quorum-sensing inhibitors on the biofilm formation of *Lactobacillus fermentum* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114378.
- [28] 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.
- [29] XIE T, LIAO Z L, LEI H, et al. Antibacterial activity of food-grade chitosan against *Vibrio parahaemolyticus* biofilms [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 110: 291-297.
- [30] MANGWANI N, KUMARI S, DAS S. Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology [J]. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 2016, 32(1/2): 43-73.
- [31] MAHTO K U, KUMARI S, DAS S. Unraveling the complex regulatory networks in biofilm formation in bacteria and relevance of biofilms in environmental remediation [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 57(3): 305-332.
- [32] CABALLERO GÓMEZ N, ABRIOUÉL H, ENNAHAR S, et al. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to enterocin AS-48 in planktonic and sessile states [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167(2): 202-207.
- [33] VAZQUEZ-ARMENTA F J, BERNAL-MERCADO A T, TAPIA-RODRIGUEZ M R, et al. Quercetin reduces adhesion and inhibits biofilm development by *Listeria monocytogenes* by reducing the amount of extracellular proteins [J]. *Food Control*, 2018, 90: 266-273.
- [34] CHIANG W C, NILSSON M, JENSEN P Ø, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(5): 2352-2361.
- [35] ALLESEN-HOLM M, BARKEN K B, YANG L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(4): 1114-1128.
- [36] SECCHI E, SAVORANA G, VITALE A, et al. The structural role of bacterial eDNA in the formation of biofilm streamers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(12): e2113723119.
- [37] SKANDAMIS P N, NYCHAS G J E. Quorum sensing in the context of food microbiology [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5473-5482.
- [38] OUN S, REDDER P, DIDIER J P, et al. The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus* [J]. *RNA Biology*, 2013, 10(1): 157-165.

- [39] 魏光强,王藤,赵波,等. 群体感应信号分子 AI-2 调控乳酸菌生物膜形成机制的研究进展[J]. 食品科学技术学报,2023,41(2):141-153.
WEI G Q, WANG T, ZHAO B, et al. Research progress of formation mechanism of quorum sensing signal molecule AI-2 regulated lactic acid bacteria biofilm[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(2): 141-153.
- [40] LI Y F, LI S J, YANG K, et al. Antibiofilm mechanism of a novel milk - derived antimicrobial peptide against *Staphylococcus aureus* by downregulating agr quorum sensing system[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133: 2198-2209.
- [41] RAVINDRANATH P A, FORLI S, GOODSSELL D S, et al. AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility[J]. PLoS Computational Biology, 2015, 11(12): e1004586.

Effect of *Moringa oleifera* Seeds Antimicrobial Peptide on *Staphylococcus aureus* Biofilm

HUANG Zhiyuan, DONG Wenming, TIAN Yang, HUANG Aixiang, WANG Xuefeng*
(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides MOp2 and MOp3 had good antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), but their effects on biofilm were still unclear. Therefore, crystal violet semi-quantitative method, fluorescence microscopy, enzymatic digestion experiment and molecular docking technology were used to study the effects of the newly identified antimicrobial peptides MOp2 and MOp3, which were isolated from hydrolysates of *Moringa oleifera* seeds proteins, on *S. aureus* biofilm. The results showed that the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) and minimum biofilm eradication concentration of MOp2 and MOp3 were both 4 mg/mL and 8 mg/mL, respectively. At 1 × MBIC concentration, both MOp2 and MOp3 exhibited biofilm clearance rates of 63.28% and 67.90%, respectively. It was found by fluorescence microscopy that after treatment with MOp2 and MOp3, biofilm adhesion decreased and bacteria numbers reduced. The initial bacterial adhesion rates decreased by 44.19% and 50.77% after treatment with 1 × MBIC of MOp2 and MOp3, respectively, and the surface hydrophobicity also decreased. Enzymatic digestion experiments showed that the extracellular proteins (mass fraction 49.01%) were the most abundant component in *S. aureus* biofilm extracellular polymeric substances, followed by extracellular polysaccharides and extracellular DNA. MOp2 and MOp3 could inhibit the secretion and synthesis of the three components in extracellular polymeric substances. The results of molecular docking showed that MOp2 and MOp3 could both bind to key biofilm formation proteins AgrA, CshA, LuxS and SarA in *S. aureus*, which might have certain effects on the quorum sensing system of *S. aureus* and thus inhibit biofilm formation. The study aimed to provide a theoretical basis for the application of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides in preservation of food industry.

Keywords: *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides; *Staphylococcus aureus*; biofilm; extracellular polymeric substances; molecular docking

(责任编辑:张逸群)