



源自发酵凡纳滨对虾的抗菌肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的抑菌机制及其在米饭中的应用

陶玮红¹, 林蓉^{1,2,3}, 梁铎^{1,3}, 杨燊^{1,2,3}, 金日天^{1,2,3*}

1 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

2 集美大学 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021

3 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034

陶玮红, 林蓉, 梁铎, 杨燊, 金日天. 源自发酵凡纳滨对虾的抗菌肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的抑菌机制及其在米饭中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2768-2783.

TAO Weihong, LIN Rong, LIANG Duo, YANG Shen, JIN Ritian. The antimicrobial peptide BCE3 isolated from fermented *Penaeus vannamei*: inhibition mechanism on *Bacillus cereus* and application in rice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2768-2783.

摘要:【目的】利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)加工废弃物, 并从发酵液中鉴定出一种新型抗菌肽(命名为 BCE3), 探究其对蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的抑菌作用和机制。【方法】通过超高效液相色谱-质谱联用技术(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)对发酵液中的小分子多肽序列进行鉴定, 并进一步通过生物信息学筛选潜在抗菌肽; 通过微量稀释法和平板涂布法分析 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)和时间-杀伤曲线(time-kill curve); 通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)泄漏、碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色分析、核酸和蛋白质泄漏实验以及流式细胞术分析 BCE3 对细菌细胞壁和细胞膜的影响; 通过 DNA 凝胶阻滞实验、与 EB 竞争性结合的荧光光谱实验以及分子对接模拟实验探究 BCE3 对细菌 DNA 的影响; 通过菌落计数法探究 BCE3 在米饭中的抑菌作用。【结果】利用生物信息学筛选出潜在抗菌肽 BCE3, 其对蜡样芽孢杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其可在 3 h 内使细菌数减少 86.0% (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 与乳酸链球菌素(nisin)相比具有更好的杀菌效果。BCE3 破坏细菌细胞壁和细胞膜, 导致细胞胞内核酸和蛋白质泄漏, 并与细菌 DNA

资助项目: 福建省自然科学基金(2023J01771); 福建省高校产学研合作项目(2023N5008)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2023J01771) and the Industry-University Cooperation Project of Fujian Province (2023N5008).

*Corresponding author. E-mail: ritianjin@jmu.edu.cn

Received: 2024-01-12; Accepted: 2024-04-23; Published online: 2024-04-25

结合并导致细菌死亡。另外, BCE3 (125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对米饭中蜡样芽孢杆菌的生长具有明显的抑制作用。【结论】BCE3 能够改变蜡样芽孢杆菌细胞膜的通透性, 同时与细菌的 DNA 结合导致细菌死亡。这些发现为 BCE3 应用于蜡样芽孢杆菌的防治提供了理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾加工废弃物; 抗菌肽 BCE3; 蜡样芽孢杆菌; 抑菌机制

The antimicrobial peptide BCE3 isolated from fermented *Penaeus vannamei*: inhibition mechanism on *Bacillus cereus* and application in rice

TAO Weihong¹, LIN Rong^{1,2,3}, LIANG Duo^{1,3}, YANG Shen^{1,2,3}, JIN Ritian^{1,2,3*}

1 College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China

3 Collaborative Innovation Center of Key Technologies of Deep Processing of Marine Food, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To study the inhibitory effect and mechanism of a novel antimicrobial peptide (BCE3) isolated from *Penaeus vannamei* processing waste fermented with *Bacillus subtilis* against *Bacillus cereus*. [Methods] The small peptide sequences in the fermentation broth were identified by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS), and the potential antimicrobial peptides were screened by bioinformatics. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and time-kill curve of BCE3 against *B. cereus* were determined by the microdilution method and plate colony counting method. Then, the alkaline phosphatase release assay, propidium iodide (PI) staining, nucleic acid and protein leakage assays, and flow cytometry were employed to examine the effects of BCE3 on the cell wall and cell membrane of *B. cereus*. The effect of BCE3 on bacterial DNA was explored by the gel retardation assay, fluorescence spectroscopy, and molecular docking. Finally, the antimicrobial effects of BCE3 in rice were evaluated by the colony counting method. [Results] The potential antimicrobial peptide BCE3 screened out showed the MIC of 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBC of 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *B. cereus*. The time-kill curve revealed that BCE3 reduced the bacterial count by 86.0% within 3 h (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), outperforming nisin. BCE3 caused damage to the bacterial cell wall and membrane, leading to the leakage of cell contents. Moreover, it can bind with DNA to kill the bacteria. In addition, BCE3 (125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) exerted a significant inhibitory effect on the growth of *B. cereus* in rice. [Conclusion] BCE3 inhibits *B. cereus* by altering the permeability of the cell membrane and binding to DNA, thus leading to bacterial death. These findings provide a theoretical basis for application of BCE3 in the control of *B. cereus*.

Keywords: *Penaeus vannamei* processing waste; antimicrobial peptide BCE3; *Bacillus cereus*; antimicrobial mechanism

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种重要的革兰氏阳性食源性病原菌,可通过产生毒素而引起呕吐或腹泻性食物中毒^[1]。此外,蜡样芽孢杆菌具有强大的生存能力能够在食品生产和加工过程中存活,甚至抵御食品加工中的大多数清洁步骤,因此其广泛分布于淀粉类、肉制品、乳制品等富含碳水化合物和蛋白质的食物中^[2]。其中,由于煮熟的米饭富含碳水化合物并具有接近中性 pH 值的特性,为蜡样芽孢杆菌的生长和毒素的产生提供了最佳环境,因此蜡样芽孢杆菌易污染米饭及其制品,引起食物中毒^[3-4]。目前针对蜡样芽孢杆菌污染食物常采用的措施是添加苯甲酸、山梨酸钾和脱氢乙酸钠等化学防腐剂,但是随着消费者对食品添加剂安全需求的增加,寻找新的食品防腐剂以确保米饭及其制品的安全是非常必要的^[5-6]。抗菌肽(antimicrobial peptide, AMPs)主要是一类带正电荷、具有两亲结构的小分子多肽,具有杀菌速度快、不易产生耐药性和更高的安全性等优点,被认为是传统化学防腐剂潜在的替代品^[7-8]。

全球对海产品的消费需求增长迅速,尤其是对虾类的消费。据 2023 年中国渔业统计年鉴的统计数据显示,2022 年我国海水养殖中凡纳滨对虾产量达 134.028 万 t,占虾类养殖总产量的 80%左右^[9]。然而,在加工食用对虾时约有 50% (主要是虾头和硬壳)被作为废弃物丢弃^[10]。对虾加工废弃物中富含蛋白质、虾青素以及其他多种营养物质,可用于生产高价值产品^[11]。例如,Zhou 等^[12]研究从酶解 Kuruma 虾头中发现具有显著抑菌性能的抗菌肽 VTVP。枯草芽孢杆菌是一种广泛存在于自然界的革兰氏阳性菌,能分泌蛋白酶降解蛋白质,常用于动物饲料和发酵工业。研究表明枯草芽孢杆菌在发酵过程中可产生不同的蛋白酶,使富含蛋白质的食品降解产生一系列的生物活性肽,其中包括抗菌肽^[13]。

例如,Cheng 等^[14]从枯草芽孢杆菌 E20 发酵豆粕中鉴定出能有效抑制溶藻弧菌和副溶血性弧菌的抗菌肽。

本研究通过枯草芽孢杆菌发酵凡纳滨对虾加工废弃物,鉴定了一种新型抗菌肽 BCE3,发现其对蜡样芽孢杆菌表现出很强的抑菌活性。因此,对抗菌肽 BCE3 的抑菌机理进行了深入研究,并进一步探索其在米饭防腐中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)由本实验室(集美大学福建省食品微生物与酶工程重点实验室)前期从凡纳滨对虾中分离、鉴定后保藏;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 由本实验室提供;实验前,所有细菌均在营养肉汤培养基或 LB 培养基中 37 °C 培养至对数期;多肽 BCE3 由北京中科亚光生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基、LB 培养基和琼脂粉均购自厦门兰博利德生物技术有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸染料、10×DNA 上样缓冲液、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)和 Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/PI 凋亡试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;碱性磷酸酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司;大米和凡纳滨对虾加工废弃物购自厦门市嘉农农贸市场。

超滤膜,密理博仪器(上海)有限公司;超高效液相色谱仪,沃特世科技(上海)有限公司;质谱仪、多功能酶标仪和超微量分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;流式细胞仪,贝

克曼库尔特商贸(中国)有限公司; 凝胶成像系统, 莫纳(苏州)生物科技有限公司; 模态智能显微成像系统, 上海徕卡仪器有限公司。

1.2 发酵液的制备及抗菌肽的筛选

将凡纳滨对虾加工废弃物用无菌水冲洗3遍, 并按料液比1:3(质量比)加入无菌蒸馏水, 于无菌条件下研磨成匀浆, 置于250 mL锥形瓶中作为发酵培养基。然后, 接入 1×10^8 CFU/mL的枯草芽孢杆菌, 接种量4%, 37 °C、160 r/min发酵3 d。发酵结束后, 取发酵液于3 000 r/min离心5 min进行固液分离并收集上清液, 并用截留分子量为3 000 Da的超滤管对发酵上清液进行超滤处理, 收集分子量为3 000 Da以下的部分。利用超高效液相色谱-质谱联用(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)技术对发酵液中的多肽序列进行鉴定^[15]。最后使用蛋白组学搜库软件(MaxQuant v1.6.5.0)搜UniProt *Penaeus vannamei* 蛋白库, 对比得到虾肽段序列。

1.3 抗菌肽的筛选及合成

利用在线软件APD3 (<https://aps.unmc.edu/>)计算多肽的电荷数和疏水性, 并筛选出电荷数从+2~+9, 疏水性从30%~55%的肽段^[16]。多肽采用固相法合成, Agela C18柱纯化后, 利用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)测定合成肽的纯度^[17]。

1.4 抑菌活性的测定

为了探究BCE3的抑菌活性, 测定蜡样芽孢杆菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)^[18]。将生长对数期的菌液(OD_{600} 至0.8)用无菌NB培养基稀释至 1×10^5 ~ 1×10^6 CFU/mL, 在96孔板中将100 μ L稀释后的菌液与100 μ L不同浓度的多肽混合均匀, 每个梯度做3个平行, 37 °C混合孵育16 h。MIC定义为抑制细菌可见生长的最低多肽浓度。

为了测定MBC, 从每个孔中取出20 μ L菌悬液涂布于平板上。MBC定义为平板在37 °C孵育24 h后, 无细菌菌落生长的最低多肽浓度。设置等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(0.01 mol/L, pH 7.2; 下同)与菌液混合作为阴性对照组, 等量乳酸链球菌素(nisin)(250 μ g/mL)与菌液混合作为阳性对照组, 实验重复3次取平均值。

1.5 时间-杀伤曲线的分析

将对数期的蜡样芽孢杆菌(OD_{600} 为0.8)用无菌PBS稀释至 1×10^5 ~ 1×10^6 CFU/mL。将肽BCE3与菌液等体积混合至最终浓度为1×MIC、2×MIC、4×MIC, 于37 °C恒温生化培养箱孵育3 h。在不同的时间点(即0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 h), 分别取20 μ L混合液, 于平板上均匀涂布, 并在37 °C生化培养箱中培养24 h后进行菌落计数。设置等量PBS与菌液混合作为阴性对照组, 等量nisin(250 μ g/mL)与菌液混合作为阳性对照组, 实验重复3次取平均值。

1.6 BCE3对细胞壁的影响

为了评价细胞壁的完整性, 进行了细菌上清液中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活力的测定^[19]。将培养至对数期的细菌菌液(OD_{600} 为0.8)经10 000 r/min离心1 min, 用无菌PBS清洗3次, 调节菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL, 与BCE3等体积混合均匀至终浓度分别为1×MIC、2×MIC、4×MIC, 置于37 °C、160 r/min孵育3 h。以等量PBS作为阴性对照, 同时设置了等量nisin(250 μ g/mL)作为阳性对照。孵育结束后在3 500 r/min条件下离心10 min, 获得上清液。根据碱性磷酸酶检测试剂盒说明书测定上清液中AKP活力。

1.7 BCE3对细胞膜的影响

1.7.1 PI染色实验

采用PI染色分析BCE3对蜡样芽孢杆菌细

胞膜通透性的影响^[20]。将对数生长期的菌液经离心、重悬并调节浓度至 1×10^5 – 1×10^6 CFU/mL, 加入等体积 BCE3 至终浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$, 于 37°C 孵育 3 h, 以 PBS 和 nisin ($250 \mu\text{g/mL}$) 分别作为阴性对照和阳性对照。孵育结束后取出 $100 \mu\text{L}$ 混合液离心弃上清, 加入等量 PI (终浓度 $30 \mu\text{mol/L}$) 染料, 混匀后避光孵育 15 min。孵育结束后, 用无菌 PBS 清洗并重悬至 $100 \mu\text{L}$, 使用多功能酶标仪测定样品在激发波长 535 nm 及发射波长 570 – 750 nm 处的荧光光谱。

参考 Li 等^[21]的方法并进行了修改。将培养至对数期的菌液 (OD_{600} 为 0.8) 稀释到 1×10^5 – 1×10^6 CFU/mL, 加入等体积的 BCE3 至终浓度为 $2 \times \text{MIC}$, 于 37°C 孵育 3 h, 以等量 PBS 作为对照组。孵育结束后取 $100 \mu\text{L}$ 混合液加入等量 PI (终浓度 $30 \mu\text{mol/L}$) 染料, 25°C 涡旋混匀, 避光孵育 15 min。待染色完成后洗涤并重悬于无菌 PBS 中以除去过量的染料, 制片后使用荧光显微镜, 选择 PI 通道捕获图像。

1.7.2 核酸蛋白质泄漏

通过测定细菌胞内核酸和蛋白质的泄漏情况判断细胞膜的完整性^[22]。将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液与肽 BCE3 等体积混合至终浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$, 等量 PBS 和 nisin ($250 \mu\text{g/mL}$) 分别作为阴性对照和阳性对照, 于 37°C 恒温孵育, 分别在 0、1、2、3 h 取样, $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 2 min, 使用多功能酶标仪测定上清液的 OD_{260} 和 OD_{280} 。

1.8 AnnexinV-FITC/PI 双标记法

按照 Ravichandiran 等^[23]的方法稍作修改, 使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒探究 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的影响。将培养至对数期的细菌菌液 (OD_{600} 为 0.8) 浓度调节至 1×10^5 – 1×10^6 CFU/mL, 加入等体积的 BCE3 至

终浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$, 于 37°C 孵育, 分别处理 1、2、3 h, 用等量 PBS 和菌液混合作为对照组。接下来, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书进行处理, 并使用配备有 CytExpert 软件 (version 2.4.0.28) 的流式细胞仪分析。

1.9 BCE3 与菌体 DNA 的相互作用

1.9.1 DNA 凝胶阻滞实验

菌体 DNA 的提取: 将蜡样芽孢杆菌接种于 50 mL NB 培养基中, 在 37°C 、 160 r/min 条件下培养 12 h 后, $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 1 min 收集菌体。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书的步骤提取细菌基因组 DNA。使用超微量分光光度计测定所提 DNA 的质量浓度和纯度 ($1.7 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 1.9$)。

参考 Yang 等^[24]的方法并稍作修改, 采用琼脂糖凝胶电泳技术研究 BCE3 与菌体 DNA 在体外的相互作用。在微量离心管中分别加入 BCE3 与蜡样芽孢杆菌基因组 DNA, 等体积混合, 使其质量比分别为 0、10:1、10:2、10:4、10:6、10:8、10:10, 混匀后置于 37°C 下孵育 90 min。随后对各个处理组的 DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳分析, 取 $8 \mu\text{L}$ DNA 溶液与 $1 \mu\text{L}$ 的 $10 \times \text{DNA}$ 上样缓冲液吹打混匀后, 在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳 (电压 110 V) 分离。电泳结束后, 将电泳胶置于凝胶成像仪中, 在紫外灯下曝光 20 s 成像来检测 DNA 的迁移情况。

1.9.2 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱实验

参考杨昆等^[25]所述的方法略作修改, 采用 BCE3 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱实验进一步分析 BCE3 与菌体 DNA 的相互作用。菌体 DNA 的提取方法与 1.9.1 相同。在 96 孔板中加入 $5 \mu\text{L}$ 稀释后的 DNA 溶液 ($50 \mu\text{g/mL}$) 和 $10 \mu\text{L}$ EB 溶液 ($100 \mu\text{g/mL}$), 混匀后于 37°C 避光孵育 10 min, 使 EB 和 DNA 结合形成 EB-DNA 复合物。接着加入 BCE3 至终浓度分别为 $1 \times \text{MIC}$ 、 $2 \times \text{MIC}$ 、

4×MIC, 用等体积无菌去离子水替代 BCE3 作为对照组, 混匀后于 37 °C 避光孵育 30 min。利用多功能酶标仪测定样品在激发波长 535 nm 及发射波长 570–750 nm 处的荧光光谱。

1.9.3 分子对接

BCE3 与 DNA 的分子对接通过 AutoDock Vina 进行。蜡样芽孢杆菌 DNA 从 PDB (ID: 3U3W) 下载, 去除配体、水分子、加氢, 并设为受体分子^[26]。用 ChemDraw 21.0.0 软件预测肽段的二维(2D)结构, 然后通过 Chem3D 21.0.0 能量最小化生成其三维(3D)结构, 并添加极性氢原子, 设置为配体分子。通过 AutoDock Vina 软件将配体分子对接到设置的受体分子中, 对接结果使用 PyMOL 2.5 可视化。

1.10 BCE3 在米饭中的应用

将培养至对数期的蜡样芽孢杆菌(OD_{600} 为 0.8)用 PBS 洗涤并重悬至浓度为 1×10^4 CFU/mL, 然后取 1 mL 稀释后的菌液接种在准备好的无菌米饭(30 g/每份)中, 分别加入等体积的 BCE3 至终浓度为 2×MIC、4×MIC, 对照组用无菌 PBS 替换, 样品于 25 °C 放置 8 h。每隔 2 h 称取 5 g 样品, 加入 45 mL 无菌生理盐水进行均质处理并进行 10 倍梯度稀释, 选取 3 个合适的稀释度, 每个稀释度设 3 个平行, 最后倾注平板计数琼脂培养基并混合均匀。待琼脂凝固后, 培养皿倒置并于 37 °C 恒温培养 48 h, 以便菌落生长及后续的计数分析。

1.11 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 软件(8.0.2)对数据进行分析并绘图, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 抗菌肽的筛选

通过对凡纳滨对虾加工废弃物的发酵液进行质谱鉴定, 共得到 393 个多肽。所鉴定的多肽

分子量范围在 772–2 881 Da, 电荷数为 -6 – $+2.5$, 疏水性分布于 10%–73%。其中一条多肽序列 GSFYAWVLDK (命名为 BCE3) 的分子量为 1 582.87 Da, 其净电荷为 $+2$, 疏水性为 45%, 符合抗菌肽的典型特征, 因此对其抑菌活性进行进一步研究。

2.2 BCE3 的抑菌活性分析

MIC 和 MBC 是用来评估抗菌肽对细菌的抑制和杀死效果的常见指标。肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 125.0 $\mu\text{g/mL}$, 而 nisin 对蜡样芽孢杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 250 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明 BCE3 对蜡样芽孢杆菌具有较好的抑菌效果, 其抑制效果强于 nisin。

通过时间-杀伤曲线进一步确证 BCE3 的抑菌效果, 结果如图 1 所示。与阴性对照组相比, 经 BCE3 处理后的蜡样芽孢杆菌的数量迅速减少。经 1×MIC 的 BCE3 处理蜡样芽孢杆菌 1 h 后, 细菌数量减少了约 43.5%; 3 h 后, 细菌数量减少了 86.0%; 经 2×MIC 的 BCE3 处理 3 h 后, 细菌全部被杀死。然而, 当浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$

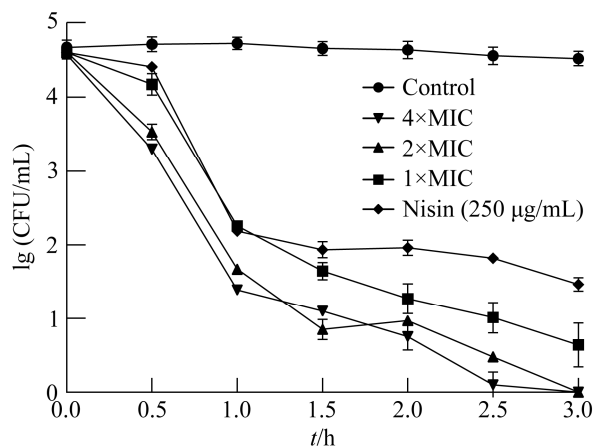


图 1 肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的时间-杀伤曲线
Figure 1 Time-kill curve of peptide BCE3 against *Bacillus cereus*. Data represent the mean±SD of three biological replicates.

(1×MIC)的 nisin 处理细菌 3 h 后, 其杀菌率为 68.0%。结果表明 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的抑制作用呈浓度和时间依赖性, 其杀菌速度和杀菌效果强于 nisin。

2.3 BCE3 对细胞壁的影响

AKP 是一种位于细胞壁和细胞膜之间的胞内酶, 在细胞正常状态下被严格地限制在细胞内; 当细胞壁受损时, AKP 则会泄漏到细胞外的环境中^[27]。因此, 可通过检测 AKP 的活力判断肽 BCE3 对细胞壁的破坏情况。如图 2 所示, 与阴性对照组相比, 1×MIC、2×MIC 和 4×MIC 处理组的 AKP 活力分别约为阴性对照组的 1.6、2.5 和 3.6 倍。这一结果表明 BCE3 可能作用于细胞壁, 诱导细胞壁损伤并导致胞内的 AKP 泄漏。

2.4 BCE3 对细胞膜的影响

研究表明, PI 是一种仅能通过受损细胞膜与核酸结合而发出强烈荧光的核酸染料, 因此 PI 荧光信号强弱能够反应细胞膜的破坏程度^[28]。如图 3 所示, 与对照组相比, 不同浓度的 BCE3 作用于细菌 3 h 后, 其荧光强度随 BCE3 浓度的增

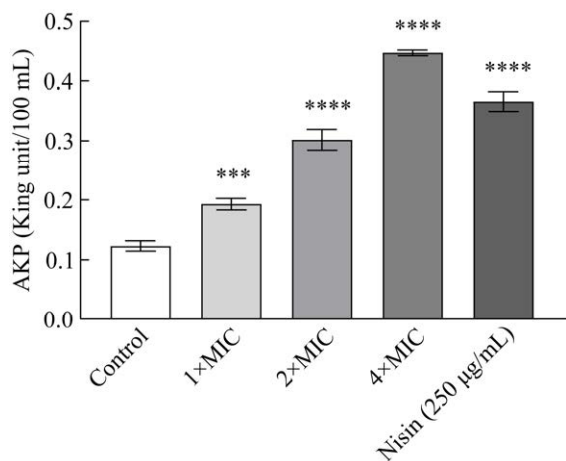


图 2 BCE3 对蜡样芽孢杆菌胞外 AKP 活力的影响
Figure 2 Effect of BCE3 on extracellular AKP activity of *Bacillus cereus*. Data represent the mean±SD of three biological replicates. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

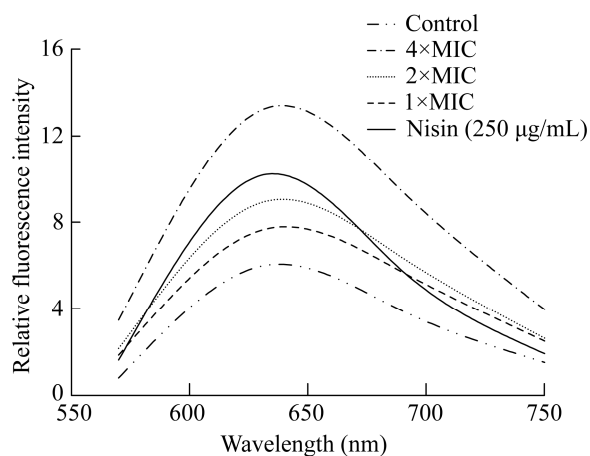


图 3 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的 PI 荧光染色的影响
Figure 3 Effects of BCE3 on PI fluorescence staining of *Bacillus cereus*.

加而增加; 而阳性对照组的荧光强度高于 BCE3 (1×MIC 和 2×MIC) 处理组, 表明 nisin (250 µg/mL) 对细菌细胞膜有更强的破坏作用。利用 PI 作为荧光探针, 在荧光显微镜下进一步观察细胞膜的损坏情况。由图 4 可知, 对照组在显微镜下仅有少量微弱的红色荧光, 推测其为细菌细胞的正常死亡所导致的; 经 2×MIC 的 BCE3 处理后的大部分细菌细胞发出强烈红色荧光。结果表明肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌细胞膜的完整性具有破坏作用, 是对 PI 荧光强度的数值结果的证明。

通过检测细菌上清液在 260 nm 和 280 nm 处吸光度的变化, 进一步探究 BCE3 对细胞膜完整性的影响。如图 5 所示, 阴性对照组的 OD_{260} 值和 OD_{280} 值随着时间的增加无明显变化; BCE3 处理组 (1×MIC、2×MIC 和 4×MIC) 的核酸、蛋白质泄漏量比空白组增加, 呈时间依赖性。研究表明 BCE3 能破坏细胞膜的完整性, 导致胞内的核酸和蛋白质泄漏, 同时也进一步地证实了上述实验的结论。

2.5 Annexin V-FITC/PI 双标记法分析

当细菌细胞受到损伤时, 位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 会从膜

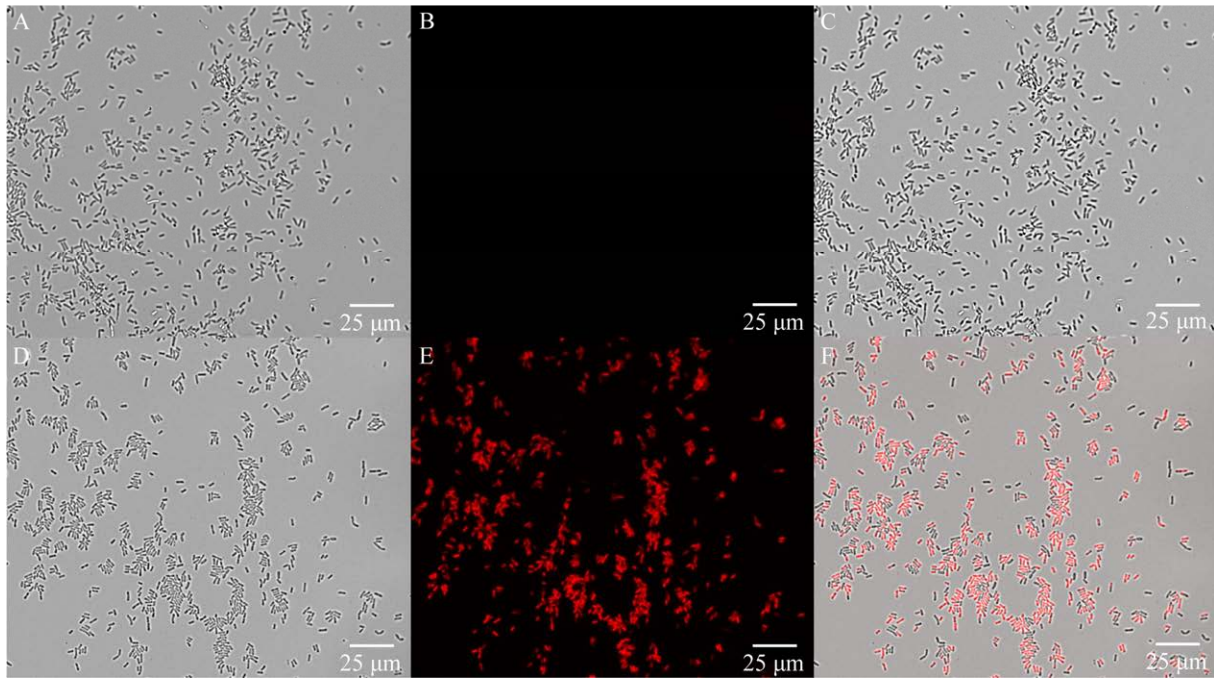


图 4 BCE3 处理后蜡样芽孢杆菌的荧光显微镜分析 A: 对照组的明场图. B: 对照组的荧光图. C: 对照组的叠加工. D: BCE3 处理组的明场图. E: BCE3 处理组的荧光图. F: BCE3 处理组的叠加工. BCE3 处理浓度为 $2\times\text{MIC}$

Figure 4 Fluorescence microscopy analysis of *Bacillus cereus* treated with BCE3. A: Bright field image of control. B: Fluorescence image of control. C: Merged image of control. D: Bright field image treated with BCE3. E: Fluorescence image treated with BCE3. F: Merged image treated with BCE3. The concentration of BCE3 used was $2\times\text{MIC}$.

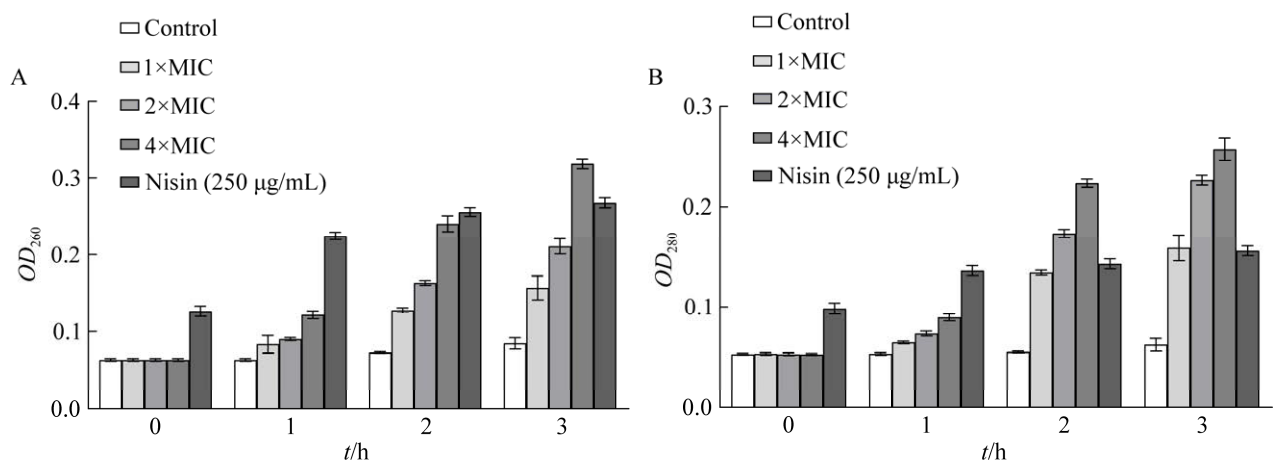


图 5 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的核酸(A)和蛋白质(B)泄漏含量的影响

Figure 5 Effects of BCE3 on nucleic acid (A) and protein leakage (B) of *Bacillus cereus*. Data represent the mean \pm SD of three biological replicates.

内翻转到膜外, PS 外翻可以通过 Annexin V 进行检测^[29]。因此使用带有 FITC 标记的 Annexin V 和 PI 进行双重染色, 对不同浓度 BCE3 处理的蜡样芽孢杆菌进行流式细胞仪分析(图 6)。当浓度为 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 的肽 BCE3 作用于蜡样芽孢杆菌 1 h 后, 细菌活细胞比例分别降至 81.66%、75.92%; 孵育 3 h 后, $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 的活细胞率降至 38.62%、16.94%。因此, 根据以上实验结果表明肽 BCE3 损坏蜡样芽孢杆菌细胞膜, 并导致细菌死亡, 其抑菌效果具有时

间-浓度依赖性。

2.6 BCE3 对菌体 DNA 的影响

通过 DNA 凝胶阻滞实验探究肽 BCE3 与蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 在体外的相互作用。如图 7A 所示, 经过不同质量比的肽(0、10:1、10:2、10:4、10:6、10:8、10:10) BCE3 处理后的条带随着肽 BCE3 浓度的增加, 部分被阻滞在孔洞中, 部分仍能迁移到凝胶中; 当 BCE3 与 DNA 质量比为 10:4 时, 电泳条带完全被阻滞在孔洞中; 当 BCE3 与 DNA 质量比为 10:1 时, 孔洞中

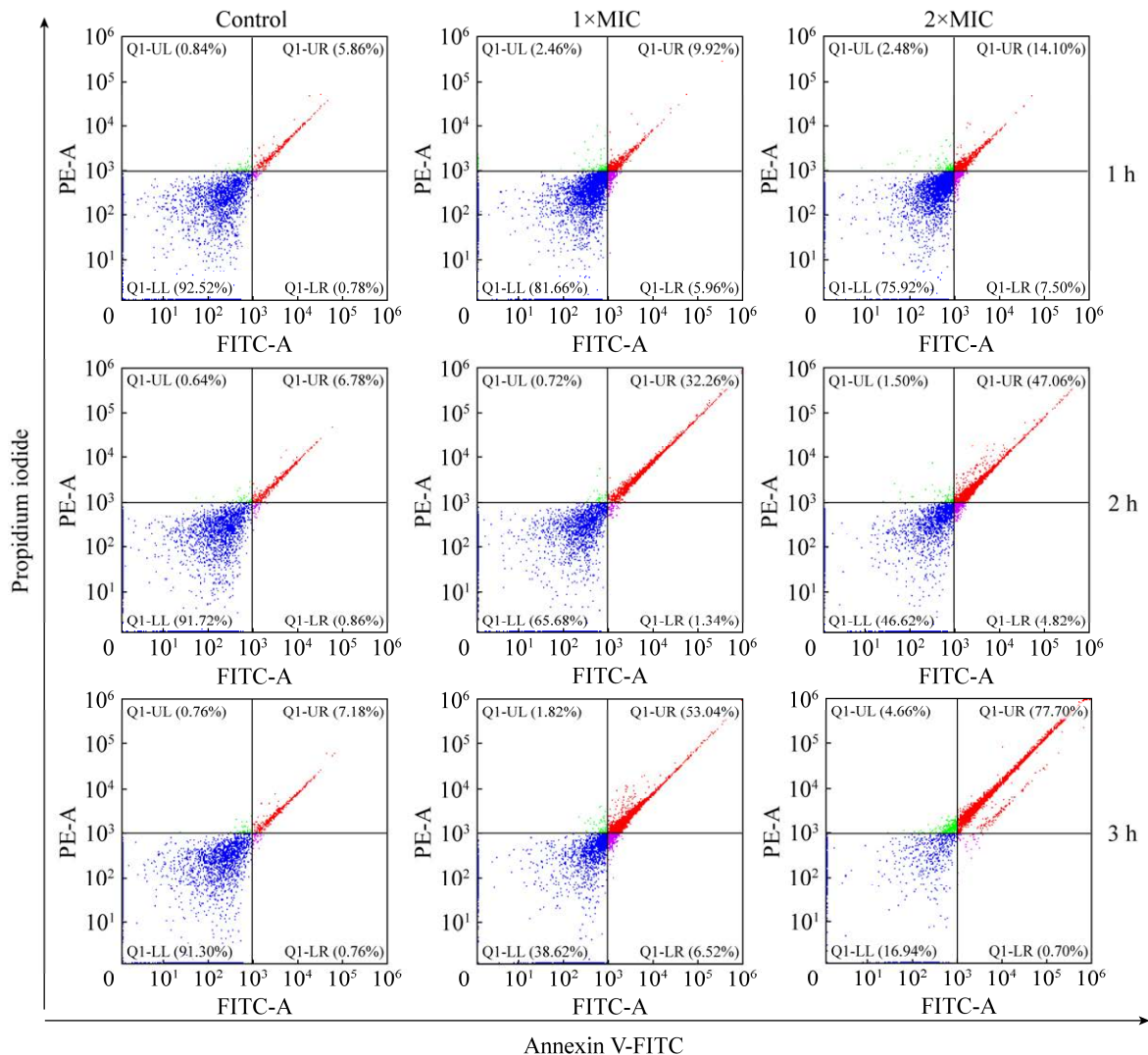


图 6 流式细胞术探究 BCE3 对蜡样芽孢杆菌细胞膜完整性的影响

Figure 6 Effects of BCE3 on the integrity of *Bacillus cereus* cell membranes assessed with flow cytometry.

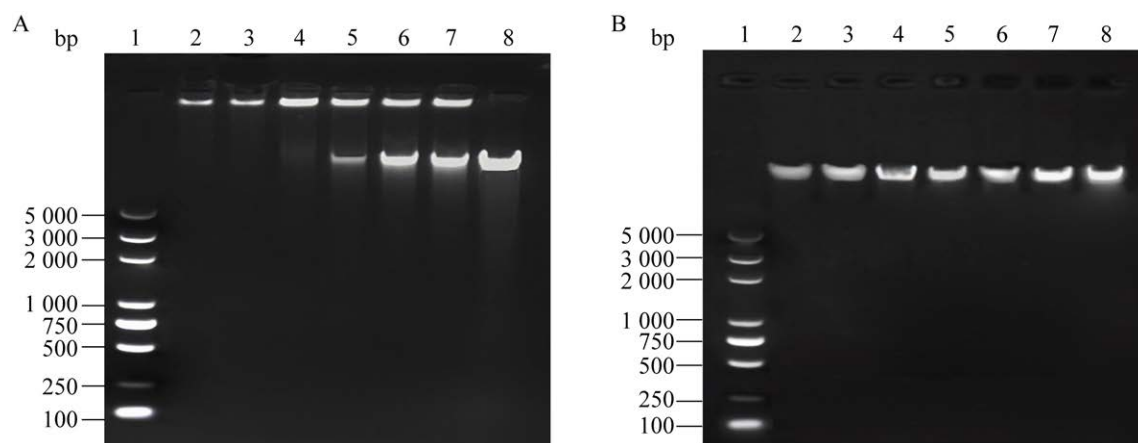


图 7 凝胶阻滞分析 BCE3 (A)和 nisin (B)与蜡样芽孢杆菌 DNA 的相互作用

Figure 7 Gel retardation analysis of BCE3 (A) and nisin (B) with the genomic DNA of *Bacillus cereus*. Lane 1: DNA marker; Lane 2–7: Peptide BCE3 (A) and nisin (B) DNA weight ratios of 10:1, 10:2, 10:4, 10:6, 10:8, and 10:10, respectively; Lane 8: Control.

的亮度变暗。然而,从图 7B 可以看出,随着 nisin 浓度增加(条带 8—条带 2),蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 仍能迁移到凝胶中,且条带亮度无明显变化。

EB 作为一种高灵敏、高选择性的 DNA 荧光探针,与具有类似效应的其他分子同时存在时,会与 DNA 形成竞争性结合,从而改变 EB-DNA 复合体系的荧光强度^[30]。因此,利用肽 BCE3 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱进一步探究 BCE3 与蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 的相互作用。如图 8 所示,对照组中的相对荧光强度最高,随着 EB-DNA 复合体系中 BCE3 浓度升高,相对荧光强度明显降低。

通过分子对接法模拟肽 BCE3 与蜡样芽孢杆菌 DNA 的相互作用,对接结果如图 9 所示。对接结合自由能为 -5.3 kcal/mol,表明这个对接结构是稳定的。从对接模型可以看出,肽 BCE3 嵌插到 DNA 双螺旋链上的碱基对中,在结合过程中通过氢键分别与 A6、A17、T16、G5 相互作用。根据以上实验结果,推测肽 BCE3 可能以嵌插碱基对的方式作用于菌体 DNA,从而影响细菌正常的生理功能,导致菌体死亡。

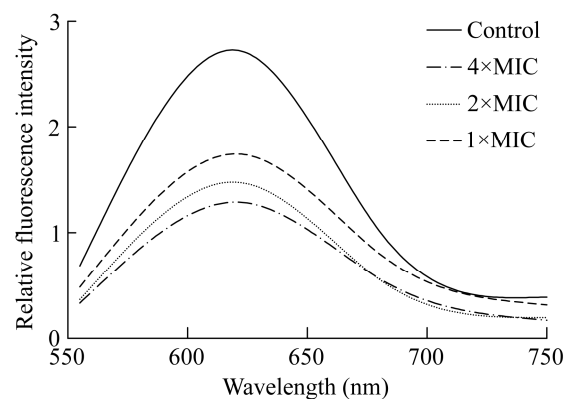


图 8 BCE3 与 EB 竞争性结合蜡样芽孢杆菌 DNA 的荧光光谱

Figure 8 Fluorescence spectra of BCE3 competing with EB for binding to *Bacillus cereus* DNA.

2.7 BCE3 在米饭中的应用

通过测定米饭中的菌落总数评估 BCE3 在被蜡状芽孢杆菌污染的米饭中的抑菌效果。如图 10 所示,对照组中蜡样芽孢杆菌的菌落总数在 8 h 内升至 4.8 lg (CFU/g)。经 2×MIC 的 BCE3 处理后,菌落总数减少了约 1.3 lg (CFU/g); 相同时间内经 4×MIC 的 BCE3 处理后则减少了约 1.5 lg (CFU/g)。上述结果表明, BCE3 处理可

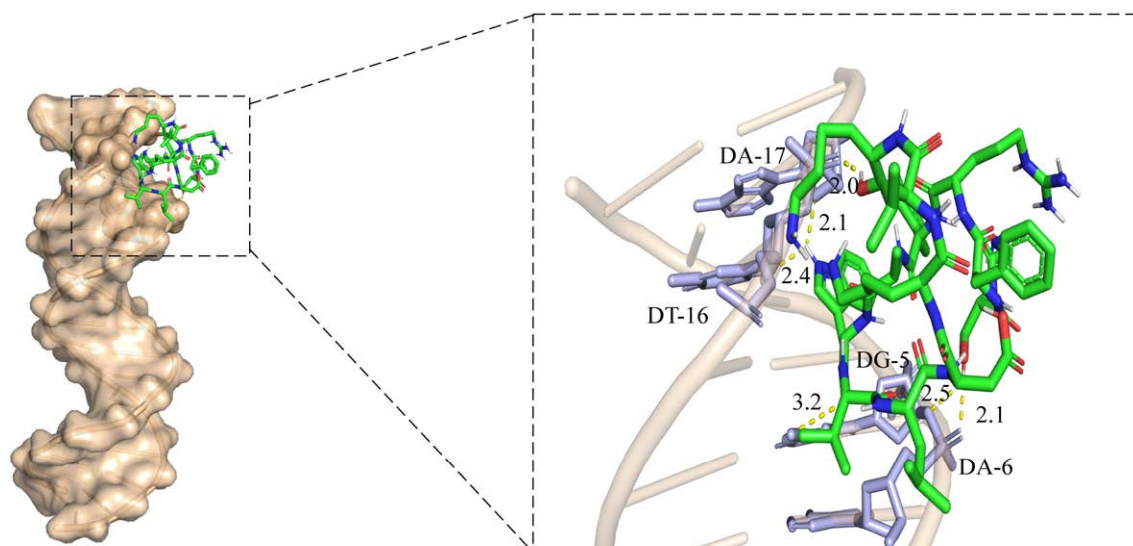


图9 BCE3对蜡样芽孢杆菌DNA的分子对接模型

Figure 9 Molecular docking pattern of BCE3 with *Bacillus cereus* DNA.

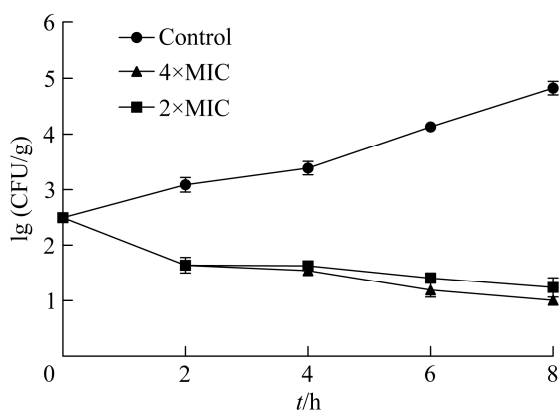


图10 米饭中蜡样芽孢杆菌活菌数的变化

Figure 10 The viable count change of *Bacillus cereus* in rice. Data represent the mean \pm SD of three biological replicates.

有效抑制米饭中蜡样芽孢杆菌的生长,降低食品安全风险。

3 讨论与结论

抗菌肽具有各种物理化学特征,包括净电荷和疏水性等,这些特征在其发挥抑菌活性方面起着关键作用^[31]。一般来说,抗菌肽的净正

电荷为+2~+9,可以与细胞膜上带负电荷的脂多糖和少部分阴离子脂质或细胞壁中带负电荷的磷壁酸通过静电作用相结合,干扰细胞膜或细胞壁,这可能是其抑菌活性的主要机制^[32]。此外,抗菌肽的疏水性氨基酸残基的占比一般为30%~55%,这同样利于抗菌肽干扰细胞膜,改变细胞膜通透性,使细胞内容物泄漏或允许抗菌肽进入细胞内与DNA结合,从而导致细菌死亡^[33]。因此,通过生物信息学分析,筛选得到一条具有潜在抑菌活性的多肽BCE3(GSFYAWVLDKLLK)。

BCE3是一条源自延伸因子1 α (elongation factor 1 alpha, EF1 α)蛋白的肽段。EF1 α 是一种重要的多功能蛋白,在不同的物种中它的基因及表达调控具有高度保守性^[34]。EF1 α 除了参与多肽链的延伸外,还参与细胞凋亡、免疫防御、应激保护等过程^[35]。研究表明EF1 α 在虾头的肝胰腺组织和鳃组织中高度表达,当虾受到胁迫时,EF1 α 蛋白水平上调以保护或修复细胞^[36]。此外,BCE3的组成氨基酸中含有带正电荷的精

氨酸(R)残基和赖氨酸(K)残基, 它们的存在可以提高肽的抑菌活性: 精氨酸和赖氨酸因带正电荷可与细胞膜上带负电荷的分子产生静电相互作用, 精氨酸的胍基能与细胞膜表面的磷脂分子形成双氢键, 增强肽段 BCE3 与细胞膜的结合能力^[37]。疏水性氨基酸残基(即苯丙氨酸 F、丙氨酸 A、缬氨酸 V、亮氨酸 L)有助于肽 BCE3 插入细胞膜的磷脂双分子层, 甚至穿过细胞膜, 从而发挥抑菌活性^[8]。

Nisin 是一种从乳酸链球菌发酵产物中提取的由 34 个氨基酸组成的带正电荷的多肽类物质, 分子量约 3.5 kDa, 对革兰氏阳性菌具有较强的抑菌效果, 已广泛应用于食品防腐保鲜^[38]。在本研究中, 抑菌实验结果发现源自发酵凡纳滨对虾加工废弃物的肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌的 MIC 为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抑菌效果强于 nisin (MIC=250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。这可能是由于革兰氏阳性菌细胞壁含 40–80 nm 厚的多孔网眼, 推测分子量小的抗菌肽相对容易通过, BCE3 的分子量仅为 1 582.87 Da, 远小于 nisin 的分子量, 因此 BCE3 更容易穿过细胞壁, 进而与细胞膜发挥作用^[39]。细胞壁对于革兰氏阳性菌在自然环境中的生存起着关键作用, 因此细胞壁完整性是细胞存活的必要条件^[40]。本研究利用上清液中 AKP 活力作为探究细胞壁完整性的指标, 结果显示经 BCE3 处理后胞外的 AKP 活力呈明显上升趋势。这一结果表明 BCE3 可能先作用于细胞壁, 诱导细胞壁损伤导致 AKP 泄漏。

细胞膜对维持细胞渗透压、控制物质交换、信号传导和能量生成等生化过程有重要作用, 其受损后会导致胞内物质外泄或胞外物质进入胞内, 对细胞正常生理功能产生严重影响并诱导细胞死亡^[41]。当细菌细胞壁被破坏时, 细胞膜会进一步受损。因此, 通过 PI 染色分析, 核

酸蛋白质泄漏以及流式细胞术等实验分析发现, 随着 BCE3 作用时间和浓度的增加, 蜡样芽孢杆菌的细胞膜受到损伤, 细胞膜通透性增大, 导致胞内大分子物质泄漏, 造成细菌死亡。类似地, Zhao 等^[42]研究发现甘氨酸碱性肽严重破坏大肠杆菌细胞壁和细胞膜的完整性, 导致细胞内容物外流, 释放出 AKP、还原糖等, 从而对大肠杆菌表现出较强的抑菌效果。在比较 nisin 和 BCE3 对蜡样芽孢杆菌细胞壁和细胞膜的作用效果时, 浓度为 $1\times\text{MIC}$ 的 nisin 对细胞壁和细胞膜的破坏作用更强。然而, BCE3 的抑菌浓度更低, 推测是与 BCE3 不止一个作用靶点有关。

研究表明, 一些抗菌肽除了破坏细菌细胞膜, 还可以穿过细胞膜结合基因组 DNA 导致细菌快速死亡^[43]。DNA 是最重要的遗传物质之一, 抗菌肽能够通过 DNA 结合, 造成 DNA 损伤, 进而影响基因的表达, 阻碍酶及受体蛋白的合成, 引起细菌死亡^[44]。通过 DNA 凝胶阻滞实验、与 EB 竞争性结合 DNA 实验以及分子对接模拟实验探究肽 BCE3 对蜡样芽孢杆菌 DNA 的作用。在 DNA 凝胶阻滞实验中, 随着 BCE3 浓度增加, 滞留在孔洞中的 DNA 条带亮度逐渐变暗。说明肽 BCE3 在低浓度时能与 DNA 部分结合, 影响菌体 DNA 的正常迁移率, 因此条带部分未迁移到凝胶中; 同时由于肽 BCE3 在高浓度时完全竞争了核酸染料与 DNA 的结合位点, 造成孔洞中 DNA 条带变暗^[45]。然而, 随着 nisin 浓度增加, 蜡样芽孢杆菌基因组 DNA 仍能迁移到凝胶中, 并且条带亮度无明显变化, 这可能是 nisin 的抑菌活性弱于 BCE3 的原因。通过 BCE3 与 EB 竞争性结合 DNA 的荧光光谱实验, 进一步探究 BCE3 与细菌 DNA 的相互作用。结果表明, 与对照组相比, BCE3

处理组的相对荧光强度明显降低,随着 BCE3 的浓度增加,EB-DNA 的相对荧光强度下降趋势越明显,这可能与 EB 被 BCE3 竞争性取代有关。BCE3 与 EB 相比有更强的结合力,能够通过嵌入碱基对的形式取代 EB,并使得 EB-DNA 复合物的荧光强度降低^[46]。此外,结合分子对接模拟结果可知,BCE3 可嵌入 DNA 的碱基对中并形成 6 个氢键,氢键能增加分子间的接触面积,提高分子间的相互作用能,从而使分子结合更紧密;同时带正电荷的抗菌肽 BCE3 与带负电荷的 DNA 磷酸骨架可以通过静电引力相结合,因此 BCE3 对蜡样芽孢杆菌 DNA 具有较强的结合作用力。类似地,抗菌肽 TroHepc2-22 改变细菌细胞膜通透性,穿透细胞膜进入细胞后与基因组 DNA 相互作用,导致细菌死亡^[47]。由此可知,BCE3 的作用机制涉及多个靶点共同作用^[48]。BCE3 除了膜损伤机制,还能通过嵌入 DNA 碱基对的方式与 DNA 结合,影响 DNA 正常复制,进而起到抑菌效果,其抑菌效果优于 nisin。

本研究从枯草芽孢杆菌发酵对虾加工废弃物的发酵液中鉴定出一种名为 BCE3 的肽,序列为 GSFYAWVLDKLLK,研究显示其对蜡样芽孢杆菌表现出较强的抑菌效果,MIC 为 62.5 $\mu\text{g/mL}$,在 3 h 内可杀死 86.0%细菌,抑菌效果优于 nisin (MIC=250 $\mu\text{g/mL}$)。BCE3 首先以细胞壁和细胞膜为目标靶点,改变细胞膜的通透性,使细胞内容物外泄,对细胞正常生理功能产生严重影响;其可穿过细胞膜,通过氢键与 DNA 碱基对结合,从而干扰细菌的基因功能,使细菌死亡。另外,BCE3 对米饭中蜡样芽孢杆菌的生长具有较好的抑制作用。这些结果表明 BCE3 在食品防腐、生物防治领域显示出良好的应用潜力。

参考文献

- [1] 赵驰,董玲,张凤菊,陈善波,胡文,赵跃军,黄志标,朱永清,李治华. 青花椒精油抑制蜡样芽孢杆菌的活性与机理[J]. *食品科学*, 2022, 43(17): 64-73. ZHAO C, DONG L, ZHANG FJ, CHEN SB, HU W, ZHAO YJ, HUANG ZB, ZHU YQ, LI ZH. Antibacterial activity and mechanism of green Huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) essential oil against *Bacillus cereus*[J]. *Food Science*, 2022, 43(17): 64-73 (in Chinese).
- [2] NAVANEETHAN Y, EFFARIZAH ME. Post-cooking growth and survival of *Bacillus cereus* spores in rice and their enzymatic activities leading to food spoilage potential[J]. *Foods*, 2023, 12(3): 626.
- [3] JOVANOVIĆ J, ORNELIS VFM, MADDER A, RAJKOVIĆ A. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(4): 3719-3761.
- [4] RODRIGO D, ROSELL CM, MARTINEZ A. Risk of *Bacillus cereus* in relation to rice and derivatives[J]. *Foods*, 2021, 10(2): 302.
- [5] DEHGHAN P, MOHAMMADI A, MOHAMMADZADEH-AGHDASH H, DOLATABADI JEN. Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 80: 123-130.
- [6] DEL OLMO A, CALZADA J, NUÑEZ M. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: uses, exposure, and controversy[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(14): 3084-3103.
- [7] WANG Q, XU YZ, HU JH. Intracellular mechanism of antimicrobial peptide HJH-3 against *Salmonella pullorum*[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(23): 14485-14491.
- [8] 范学楠,林蓉,金日天,梁铎,邱绪健,杨燊. 一种源自人 α -2-巨球蛋白的抗菌肽 A2M3 及其对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J]. *微生物学报*, 2024, 64(3): 938-952. FAN XN, LIN R, JIN RT, LIANG D, QIU XJ, YANG S. A novel antimicrobial peptide A2M3 derived from human α -2-macroglobulin inhibits *Staphylococcus aureus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 938-952 (in Chinese).
- [9] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴-2023[M].

- 北京: 中国农业出版社, 2023.
- Bureau of Fisheries and Fisheries Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Extension Station, China Fisheries Association. China Fisheries Statistics Yearbook-2023[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023 (in Chinese).
- [10] 徐文思, 张梦媛, 李柏花, 杨祺福, 危纳强, 杨品红, 周顺祥. 虾加工副产物蛋白肽提制及其生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 432-438.
- XU WS, ZHANG MY, LI BH, YANG QF, WEI NQ, YANG PH, ZHOU SX. Research progress of protein polypeptides extraction and bioactivities from shrimp processing by-products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 432-438 (in Chinese).
- [11] 李雨霖, 余炼, 倪婕, 姜毅, 江虹锐, 刘小玲. 对虾加工下脚料的综合提取技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 337-345.
- LI YL, YU L, NI J, JIANG Y, JIANG HR, LIU XL. Research progress on comprehensive extraction technology of prawn processing scraps[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 337-345 (in Chinese).
- [12] ZHOU J, HAN QY, KOYAMA T, ISHIZAKI S. Preparation, purification and characterization of antibacterial and ACE inhibitory peptides from head protein hydrolysate of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. Molecules, 2023, 28(2): 894.
- [13] HU Y, LING YX, QIN ZY, HUANG JM, JIAN LY, REN DF. Isolation, identification, and synergistic mechanism of a novel antimicrobial peptide and phenolic compound from fermented walnut meal and their application in *Rosa roxburghii* Tratt spoilage fungus[J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137333.
- [14] CHENG AC, LIN HL, SHIU YL, TYAN YC, LIU CH. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 67: 270-279.
- [15] 王铭遥, 郑明静, 任中阳, 石林凡, 邓尚贵, 杨桑. 凡纳滨对虾抗菌肽的筛选及与 DNA 的结合机制[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 140-151.
- WANG MY, ZHENG MJ, REN ZY, SHI LF, DENG SG, YANG S. Antimicrobial peptides screened from *Penaeus vannamei* shrimp and investigation of their DNA binding mechanism[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 140-151 (in Chinese).
- [16] HANCOCK REW, SAHL HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24: 1551-1557.
- [17] YANG S, HUANG H, WANG F, AWEYA JJ, ZHENG ZH, ZHANG YL. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Amino Acids, 2018, 50(8): 995-1005.
- [18] LI YM, WANG M, LI YQ, HONG B, KANG D, MA Y, WANG JF. Two novel antimicrobial peptides against vegetative cells, spores and biofilm of *Bacillus cereus*[J]. Food Control, 2023, 149: 109688.
- [19] HUANG ZY, DONG WM, FAN JP, TIAN Y, HUANG AX, WANG XF. Tandem mass tag-based proteomics technology provides insights into multi-targeted mechanism of peptide MOp2 from *Moringa oleifera* seeds against *Staphylococcus aureus*[J]. LWT, 2023, 178: 114617.
- [20] ZHU CL, BAI YL, ZHAO XQ, LIU SQ, XIA XJ, ZHANG SP, WANG YM, ZHANG HH, XU YZ, CHEN SJ, JIANG JQ, WU YD, WU XL, ZHANG GP, ZHANG XM, HU JH, WANG L, ZHAO YY, BAI YY. Antimicrobial peptide MPX with broad-spectrum bactericidal activity promotes proper abscess formation and relieves skin inflammation[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(6): 1608-1625.
- [21] LI ZL, WU HY, LIU JN, HAO HS, BI JR, HOU HM, ZHANG GL. Synergistic effects of benzyl isothiocyanate and resveratrol against *Listeria monocytogenes* and their application in chicken meat preservation[J]. Food Chemistry, 2023, 419: 135984.
- [22] NING YW, MA MG, ZHANG YJ, ZHANG DC, HOU LL, YANG K, FU YN, WANG ZX, JIA YM. Antibacterial mechanism of sucrose laurate against *Bacillus cereus* by attacking multiple targets and its application in milk beverage[J]. Food Research International, 2022, 154: 111018.
- [23] RAVICHANDIRAN P, SHEET S, PREMNATH D, KIM AR, YOO DJ. 1,4-naphthoquinone analogues: potent antibacterial agents and mode of action evaluation[J]. Molecules, 2019, 24(7): 1437.
- [24] YANG S, LI J, AWEYA JJ, YUAN ZJ, WENG WY, ZHANG YL, LIU GM. Antimicrobial mechanism of *Larimichthys crocea* whey acidic protein-derived peptide (LCWAP) against *Staphylococcus aureus* and its application in milk[J]. International Journal of Food

- Microbiology, 2020, 335: 108891.
- [25] 杨昆, 王欢, 高洁, 李钰芳, 赵琼, 施娅楠, 黄艾祥. 抗菌肽 BCp12 对大肠杆菌壁膜及 DNA 损伤的作用机制[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 114-121.
YANG K, WANG H, GAO J, LI YF, ZHAO Q, SHI YN, HUANG AX. Mechanism by which antimicrobial peptide BCp12 acts on the cell wall and membrane of *Escherichia coli* cells and induces DNA damage[J]. Food Science, 2021, 42(19): 114-121 (in Chinese).
- [26] CUI HY, YANG M, CHEN XC, LI CZ, LIN L. Mechanism of eugenol inhibiting the growth of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and its application in rice cakes[J]. Food Bioscience, 2023, 54: 102930.
- [27] OUYANG QL, DUAN XF, LI L, TAO NG. Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by disrupting the cell wall integrity of *Geotrichum citri-aurantii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 55.
- [28] FAN L, WEI YY, CHEN Y, JIANG S, XU F, ZHANG CD, WANG HF, SHAO XF. Epinecidin-1, a marine antifungal peptide, inhibits *Botrytis cinerea* and delays gray mold in postharvest peaches[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134419.
- [29] 耿飞, 王伟, 周涛. 乌梅提取液对李斯特菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 88-93.
GENG F, WANG W, ZHOU T. Antibacterial mechanisms of fructus mume extract against *Listeria innocua*[J]. Food Science, 2011, 32(15): 88-93 (in Chinese).
- [30] WU YP, BAI JR, ZHONG K, HUANG YN, GAO H. A dual antibacterial mechanism involved in membrane disruption and DNA binding of 2*R*,3*R*-dihydromyricetin from pine needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus*[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 463-470.
- [31] XUAN JQ, FENG WG, WANG JY, WANG RC, ZHANG BW, BO LT, CHEN ZS, YANG H, SUN LM. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections[J]. Drug Resistance Updates, 2023, 68: 100954.
- [32] BROWN S, SANTA MARIA JP Jr., WALKER S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2013, 67: 313-336.
- [33] KOEHBACH J, CRAIK DJ. The vast structural diversity of antimicrobial peptides[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2019, 40(7): 517-528.
- [34] 周峰, 刘燕, 马永贵, 黄原. 真核翻译延伸因子 1A 蛋白家族功能位点的进化踪迹分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(8): 773-782.
ZHOU F, LIU Y, MA YG, HUANG Y. Evolutionary trace analysis of functional sites of the eEF1A family[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 29(8): 773-782 (in Chinese).
- [35] HAMEY JJ, WILKINS MR. Methylation of elongation factor 1A: where, who, and why?[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2018, 43(3): 211-223.
- [36] WANG L, LIU Y, WANG WN, MAI WJ, XIN Y, ZHOU J, HE WY, WANG AL, SUN RY. Molecular characterization and expression analysis of elongation factors 1A and 2 from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(3): 2167-2178.
- [37] AGRILLO B, PORRITIELLO A, GRATINO L, BALESTRIERI M, PROROGA YT, MANCUSI A, COZZI L, VICENZA T, DARDANO P, MIRANDA B, ESCRIBÁ PV, GOGLIETTINO M, PALMIERI G. Antimicrobial activity, membrane interaction and structural features of short arginine-rich antimicrobial peptides[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1244325.
- [38] YANG CY, SU ZW, LI ZF, YAO R, LIU W, YIN H. Harvest of nisin from fermentation broth using foam separation with the assistance of ultrasonic treatment: foam property evaluation and antimicrobial activity retention[J]. Separation and Purification Technology, 2023, 311: 123253.
- [39] ZHAO CF, WU LN, WANG XW, WENG SH, RUAN ZP, LIU QC, LIN LQ, LIN XH. Quaternary ammonium carbon quantum dots as an antimicrobial agent against Gram-positive bacteria for the treatment of MRSA-infected pneumonia in mice[J]. Carbon, 2020, 163: 70-84.
- [40] CAVENEY NA, CABALLERO G, VOEDTS H, NICIFOROVIC A, WORRALL LJ, VUCKOVIC M, FONVIELLE M, HUGONNET JE, ARTHUR M, STRYNADKA NCJ. Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1849.
- [41] LI LL, ZHOU P, WANG YD, PAN Y, CHEN M, TIAN Y, ZHOU H, YANG BR, MENG HC, ZHENG J. Antimicrobial activity of cyanidin-3-O-glucoside-lauric acid ester against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132410.
- [42] ZHAO GP, LI YQ, SUN GJ, MO HZ. Antibacterial

- actions of glycinin basic peptide against *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(25): 5173-5180.
- [43] OMIDBAKHSI AMIRI E, FARMANI J, RAFTANI AMIRI Z, DEHESTANI A, MOHSENI M. Antimicrobial activity, environmental sensitivity, mechanism of action, and food application of α 165-181 peptide[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 358: 109403.
- [44] XU P, YUAN LB, WANG K, PAN BY, YE Y, LU K. Interaction of bifunctional peptide-carbazole complexes with DNA and antimicrobial activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 237: 124070.
- [45] HSU CH, CHEN C, JOU ML, LEE AYL, LIN YC, YU YP, HUANG WT, WU SH. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(13): 4053-4064.
- [46] 陈旋, 李莉蓉. 抗菌肽 P7 抑制大肠杆菌的非膜作用机制[J]. *微生物学报*, 2016, 56(11): 1737-1745.
- CHEN X, LI LR. Non-membrane mechanisms of antimicrobial peptide P7 against *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(11): 1737-1745 (in Chinese).
- [47] ZHANG ZS, ZHOU YC, ZHANG H, DU XY, CAO ZJ, WU Y, LIU CS, SUN Y. Antibacterial activity and mechanisms of TroHepe2-22, a derived peptide of hepcidin2 from golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9251.
- [48] ZHANG JX, ISLAM MS, WANG JY, ZHAO Y, DONG WB. Isolation of potato endophytes and screening of *Chaetomium globosum* antimicrobial genes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4611.