

胡椒单萜类化合物 对单增李斯特菌抑菌机理的研究

李兆亭,陈文学,韩迎洁,孙志昶*

(海南大学食品学院,海南海口 570228)

摘要:本文研究了胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌(*L.monocytogenes*)的抑菌机制,通过分析单增李斯特菌差异蛋白、呼吸链复合体以及三磷酸腺苷酶(ATP酶)等指标,根据同源建模与分子对接技术探索其作用靶点。添加胡椒单萜类化合物可显著抑制单增李斯特菌的生长($p < 0.05$),同时 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 、呼吸链复合体I~V活力均显著低于对照组($p < 0.05$),其中复合体V在蛋白水平显著下调。胡椒单萜类化合物可使单增李斯特菌细胞膜通透性发生变化,抑制ATPase和呼吸链复合体活性,使得ATP合成减少,从而导致菌体衰亡。这为胡椒单萜类化合物应用于食品保鲜提供理论基础。

关键词:胡椒单萜类化合物,单增李斯特菌,差异蛋白,呼吸链

Study on the Antimicrobial Mechanism of *Listeria monocytogenes* from Pepper Monoterpenoids

LI Zhao-ting, CHEN Wen-xue, HAN Ying-jie, SUN Zhi-chang*

(College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: This paper studied the antibacterial mechanism of pepper monoterpenoids against *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*). Through the analysis of *L.monocytogenes* differential protein, respiratory chain complexes and adenosine triphosphatase (ATPase) indicators, according to homology modeling and molecular docking technology to explore its target. The addition of pepper monoterpenoids significantly inhibited the growth of *L.monocytogenes* ($p < 0.05$), while $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, and respiratory chain complex I~V activity were significantly lower than those of the control group ($p < 0.05$). The complex V was significantly down-regulated at the protein level. Pepper monoterpenoids could change the permeability of *L.monocytogenes* cell membrane, inhibit the activity of ATPase and respiratory chain complexes, and reduce the synthesis of ATP, which leads to the decline of bacteria. This provides a theoretical basis for the application of pepper monoterpenoids in food preservation.

Key words: pepper monoterpenoids; *Listeria monocytogenes*; differential proteins; respiratory chain

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306 (2018) 23-0154-05

doi: 10. 13386/j. issn1002 - 0306. 2018. 23. 027

引文格式:李兆亭,陈文学,韩迎洁,等.胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌抑菌机理的研究[J].食品工业科技,2018,39(23):154-158.

目前在食品保鲜方面,市场上占主导地位的是化学抑菌剂,但随着医学、毒理学和生物学的不断深入,发现大多化学抑菌剂对人体都有不同程度的伤害。与之相比,天然抑菌剂的毒性远远低于化学保鲜剂的毒性,且抑菌效果显著。胡椒是我国卫生部第一批公布的药食兼用的植物材料之一,属于

多年生常绿大型藤本植物^[1]。胡椒中挥发油含量4.5%以上,所含成分大多为胡椒单萜类化合物(如柠檬烯等),可抑制微生物生长,此外,胡椒碱和胡椒脂碱是构成胡椒辛辣风味的植物碱^[2]。

胡椒挥发油对动物和植物病菌、腐败菌均有抑制效果,椒醇提取物对常见食品污染菌有较强的抑

收稿日期:2018-04-16

作者简介:李兆亭(1993-),男,硕士研究生,研究方向:动物食品营养与工程,E-mail:2419736016@qq.com。

*通讯作者:孙志昶(1987-),男,博士,副教授,研究方向:畜产品加工,E-mail:371137837@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金(31760480);海南省自然科学基金(317034)。

of production, biochemical characterization and *in vitro*, evaluation of the therapeutic potential of fibrinolytic enzymes from a new

Bacillus amyloliquefaciens [J]. Macromolecular Research, 2016, 24 (7): 587-595.

制作用^[3]。Pradhan 等^[4]研究了青胡椒提取物的抑菌作用,发现该物质对鼠伤寒沙门氏菌、葡萄球菌和大肠杆菌均有抑制作用。目前,大多研究仅讨论了天然抑菌剂的宏观抑菌特性,但具体到胡椒中何种成分起作用以及对细菌的作用靶点却鲜有报道。

蛋白质组学是研究和探索蛋白质组的一门新兴学科,是功能基因组学的重要组成部分。同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)作为一种现代的蛋白质组学技术,几乎可以对任何蛋白样品进行定量分析,具有高定量精度的特点,目前已广泛应用于定量蛋白质组学领域^[5]。本文基于蛋白质组学技术,研究胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌(*L.monocytogenes*)的抑菌机制,通过分析单增李斯特菌的差异蛋白、呼吸链复合体以及三磷酸腺苷酶(ATP酶)等指标,根据同源建模与分子对接技术探索其作用靶点,为进一步明确胡椒单萜类化合物的抑菌机制提供基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

成熟胡椒果 海南省文昌市;*L.monocytogenes* 中国科学院微生物研究所;胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、碘乙酰胺(IAM)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、胰蛋白酶(Trypsin, potency ≥ 2500 units/mg)和牛血清蛋白(纯度 $\geq 98\%$) 海南海道森科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒、质谱级胰蛋白酶、iTRAQ 4-plex 标记试剂盒、低分子量预览蛋白质 Marker 美国 Sigma 公司。

TP-313 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯萃取头 美国 Supelco;Vaco2-II 冷冻干燥系统 德国 ZIRBUS;B-220 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;超声波细胞破碎仪 美国 SONICS;GC-6890 气相色谱仪 滕州市滕海分析仪器有限公司;强阳离子交换色谱柱(SCX) 上海楚定分析仪器有限公司;Triple TOF5600 液相串联质谱(LC-MS/MS) 美国 Applied Biosystem。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 将采集的成熟胡椒果 500 g 置于阳光下暴晒 3~4 d,液氮粉碎(2800 r/min)后冷冻($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$)干燥 38 h,保鲜袋密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

1.2.2 胡椒单萜类化合物的提取 参考王延辉等^[6]的方法,采用蒸馏萃取提取(SDE)的方法,提取胡椒中的单萜类化合物。SDE 条件:取 50 g 胡椒粉末置于 500 mL 的圆底烧瓶中,加入 200 mL 超纯水和少量玻璃珠。接收端装 90 mL 沸程 90~120 $^{\circ}\text{C}$ 石油醚,85 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴提取 60 min。萃取后上层有机相过 50 g 无水硫酸钠柱,滤液经旋转蒸发仪浓缩后便制得胡椒单萜类化合物。

1.2.3 菌种活化 吸取 5 μL 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的 *L.monocytogenes* 冻存液,接种到装有 5 mL 灭菌 TSB 肉汤培养基中。用试管塞塞好试管,并用报纸包好

试管管口,将试管倾斜放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中,将恒温振荡器速度调节至 80 r/min,振荡培养 16 h 后,在 TSB 肉汤培养基中传代三次,之后采取平板划线法纯化菌种,接种环接种于琼脂板上并倒扣。将平板倒放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 16~24 h 后,挑取单个菌落,在无菌条件下接种到 TSB 肉汤培养基的试管中,按照上述所说的方法再一次培养 12 h。用灭菌过的 TSB 肉汤培养基将菌液进行稀释,使溶液在 600 nm 波长处的吸光值为 0.1,此时菌液中的菌落个数为 5×10^8 cfu/mL,菌液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 *L.monocytogenes* 生长曲线的测定 参考 Qiu 等^[7]的方法,取 40 mL 菌液移入 EP 管中,实验组(SA)加入 0.3 g 胡椒单萜类化合物,同时设立空白对照组(CK)。EP 管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡摇床中培养,在 24 h 内每隔 4 h 移出 10 μL 菌液,滴在琼脂培养基上测定 *L.monocytogenes* 菌落数。

1.2.5 胡椒单萜类化合物对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力的影响 参考陆海霞等^[8]方法,将 CK 组与 SA 组用无菌生理盐水制备成 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 的菌悬液,经超声(25 W, 10 min)破碎。采用超微量 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 试剂盒测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性。菌悬液在 24 h 内每隔 4 h 测定一次酶活力,酶活力单位定义为每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量,单位 U/mg。

1.2.6 iTRAQ 法定量蛋白质 取 50 mL 菌液移入 EP 管中,SA 加入 0.3 g 胡椒单萜类化合物,同时设立 CK,4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏。将 SA 与 CK 用无菌生理盐水制备成 $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL 的菌悬液,进行超声(25 W, 10 min)破碎。参考周业丰^[6]的方法提取菌液中的蛋白,并对蛋白样品依次进行还原烷基化处理、Trypsin 酶解、iTRAQ 4-plex 标记肽段、标记后的肽段混合、SCX 进行预分离、LC-MS/MS 分析采集数据。用数据库(27029 sequences)对蛋白质序列进行鉴定, Mascot 进行数据库搜索,依据蛋白质丰度水平,当差异倍数大于 1.2 倍,且经统计检验其 P-value 值小于 0.05 时,视为 SA 与 CK 之间的表达上调或下调差异蛋白。

1.2.7 呼吸链复合体活性的测定 取 50 mL 菌液移入 EP 管中,SA 加入 0.3 g 胡椒单萜类化合物,同时设立 CK,4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏。在冷藏的第 8 h 取出菌液,将菌液在低压缓冲液中水浴与冰箱中反复冻融 3 次(冻 5 h、溶 1 h),使得呼吸链复合体能够尽可能释放。参考 Allen 等^[9]的方法测定呼吸链复合体(MRCC I、II、III、IV、V)的活性。

1.2.8 同源建模与分子对接 选取蛋白质组学中与呼吸链相关的蛋白作为受体,胡椒单萜类化合物作为配体。使用 Swiss-Model 软件,提交蛋白的序列数据,然后对每一条氨基酸序列在数据库中寻找各自的序列同源性较高的同源蛋白,使用这些已知晶体结构的蛋白质作为模板。根据模板蛋白序列质量、与目标蛋白的序列相似性以及序列覆盖度等指标,选择同源性最好的三种蛋白质结构作为目标蛋白的模板,构建其三维结构模型。分子对接过程中,在找到受体和与之结合的配体的三维结构模型的基础上,通过

计算寻找到靶标分子的活性结合位点,并将配体放置在活性结合位点处。通过不断优化配体分子的构象与结合方式,模拟受体与配体分子结合的过程,预测其可能的结合方式,通过打分函数从结果中筛选出与受体结合后最接近天然结合构象的配体^[10]。

1.2.9 统计分析 每组试验做3次重复实验。方差分析:SPSS 19.0 软件对数据进行 T 检验;图形制作:Origin 8.0.;数据库:27029sequences;蛋白质鉴定软件:Mascot 搜索。

2 结果与分析

2.1 添加胡椒单萜类化合物对单增李斯特菌落数的影响

图1为添加浓度30 mg/mL 胡椒单萜类化合物后0~24 h内 *L.monocytogenes* 的生长曲线,由图1可知,CK *L.monocytogenes* 菌落数不断增加,SA *L.monocytogenes* 菌落数呈先增后减的趋势。在培养4~16 h *L.monocytogenes* 菌落数显著降低($p < 0.05$),8~24 h SA 中 *L.monocytogenes* 菌落数显著低于CK($p < 0.05$)。胡椒提取物对来自于口腔中的细菌菌株具有较强的抑制作用,20 mg/mL 的胡椒石油醚相提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等抑菌效果良好^[11-12]。

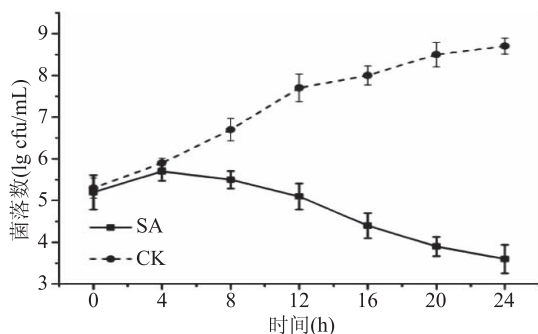


图1 *L.monocytogenes* 生长曲线

Fig.1 *L.monocytogenes* growth curve

2.2 添加胡椒单萜类化合物对 *L.monocytogenes* ATP 酶活力的影响

ATP 酶是一类能将三磷酸腺苷(ATP)催化水解为二磷酸腺苷(ADP)和磷酸根离子的酶,其中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是镶嵌在细胞膜磷脂双分子层中的一种蛋白质,可将细胞内的 Na^+ 释放到胞外同时将胞外的 K^+ 运输入细胞, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 对维持细胞正常生命活动至关重要^[13]。由图2可知,在24 h内,SA中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力呈先上升后下降的变化趋势,CK酶活力相对稳定。添加胡椒单萜类化合物后 *L.monocytogenes* 的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力在0~4 h均显著升高($p < 0.05$),在4~24 h显著下降($p < 0.05$),16~24 h SA显著低于CK组($p < 0.05$), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力迅速下降可使细胞膜内外形成 H^+ 梯度差, H^+ 梯度差会改变细胞膜的通透性^[14]。添加胡椒单萜类化合物后可能破坏了 *L.monocytogenes* 的细胞膜,使细胞膜的通透性增加,改变细胞膜的流动性,从而影响 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 的活性^[15]。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和

$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力降低导致细胞内多肽和蛋白质不能正常合成和分解,酶活力的变化会进一步改变膜的通透性,从而加快细胞凋亡^[16-18]。

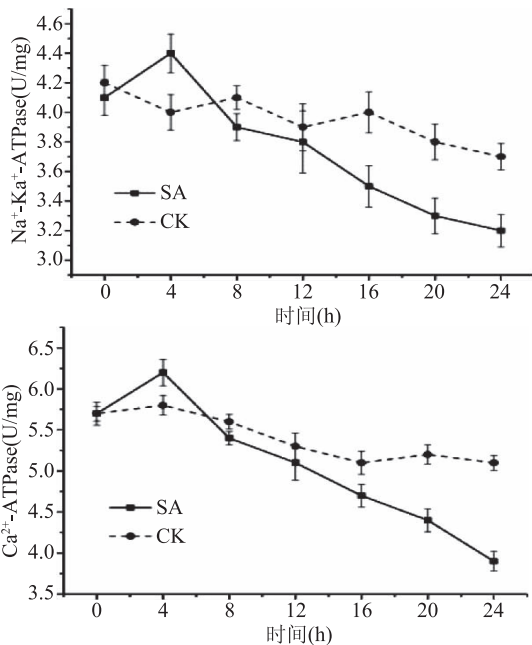


图2 单核增生李斯特菌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 活力随时间的变化

Fig.2 Changes of the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in *L.monocytogenes* with time

2.3 胡椒单萜类化合物对单核增生李斯特菌的蛋白组变化研究

在质谱图中,任何一种 iTRAQ 试剂标记的不同样本中的同一蛋白质表现为相同的质荷比。在串联质谱中,根据波峰的高度及面积,可以得到蛋白质的定量信息,寻找差异表达蛋白,分析蛋白功能。本研究对CK 0 h,SA 0 h,CK 8 h,SA 8 h,SA 24 h,CK 24 h六组数据两两进行比较,筛选出1.2倍以上的差异蛋白^[5]。

由图3可知,差异蛋白最多的是SA 24 h/CK 24 h,最少的是SA 0 h/CK 0 h,所以添加胡椒单萜类化合物后, *L.monocytogenes* 中差异蛋白数量与处理时间成正比。SA 24 h/CK 24 h 中上调蛋白数量显著高于下调蛋白($p < 0.05$), *L.monocytogenes* 生理状态可能受到胡椒单萜类化合物的影响,上调蛋白数量占多数,有着更多的生物学进程被激活。实验组SA 0 h,SA 8 h,SA 24 h三者之间进行互相比,同样也产生了差异蛋白,但相比SA 8 h/CK 8 h和SA 24 h/CK 24 h差异蛋白的数量显著降低($p < 0.05$),差异蛋白中上调蛋白和下调蛋白数目接近,这些差异蛋白应该是 *L.monocytogenes* 正常生长过程中的蛋白变化^[8]。

2.4 胡椒单萜类化合物对 *L.monocytogenes* 呼吸链复合体 I-V 的影响

由表1可知, *L.monocytogenes* 呼吸链复合体I~V活力均呈下降趋势,在8~24 h添加胡椒单萜类化合物后呼吸链复合体I和V活力显著低于对照组($p < 0.05$)。呼吸链可为细胞提供维持正常生命活动所需

表1 单核增生李斯特菌呼吸链复合体 I-V 活力随时间的变化
Table 1 Changes of I-V activity of LM respiratory chain complex with time

时间 (h)	单萜类化合物 MRCC (nmol/min/mg pro)					对照组 MRCC (nmol/min/mg pro)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
4	42.1 ± 1.4 ^a	50.2 ± 1.4 ^a	327.2 ± 11.8 ^c	173.2 ± 2.2 ^b	71.1 ± 1.2 ^a	53.1 ± 1.1 ^a	52.2 ± 2.4 ^a	331.0 ± 11.3 ^c	178.4 ± 2.6 ^b	74.1 ± 1.3 ^a
8	37.5 ± 1.5 ^a	46.1 ± 1.4 ^a	319.0 ± 12.6 ^e	171.3 ± 2.1 ^d	65.5 ± 1.6 ^{bc}	47.5 ± 1.4 ^a	49.5 ± 2.3 ^{ab}	324.6 ± 11.6 ^e	174.1 ± 1.1 ^d	72.5 ± 2.1 ^c
12	32.2 ± 1.7 ^a	42.4 ± 2.1 ^{ab}	308.1 ± 14.3 ^e	165.0 ± 3.1 ^d	60.2 ± 2.0 ^{bc}	51.2 ± 2.3 ^{abc}	45.7 ± 2.1 ^{ab}	311.2 ± 13.1 ^e	171.3 ± 2.1 ^d	69.2 ± 1.1 ^c
16	25.3 ± 2.1 ^a	38.3 ± 2.3 ^{ab}	297.4 ± 12.4 ^d	161.2 ± 3.2 ^d	43.1 ± 2.2 ^{ab}	45.1 ± 2.3 ^b	48.3 ± 2.4 ^b	319.1 ± 15.5 ^e	175.4 ± 2.2 ^c	66.1 ± 2.4 ^c
20	18.4 ± 2.3 ^a	34.4 ± 1.2 ^{ab}	282.1 ± 11.9 ^f	151.1 ± 1.3 ^d	42.4 ± 1.4 ^b	41.4 ± 1.2 ^b	44.4 ± 2.3 ^b	313.4 ± 12.3 ^g	168.1 ± 1.3 ^e	68.4 ± 1.5 ^c
24	9.1 ± 1.1 ^a	27.1 ± 1.7 ^{ab}	263.3 ± 12.8 ^f	132.3 ± 1.7 ^d	37.3 ± 1.3 ^b	35.3 ± 2.1 ^b	41.1 ± 2.2 ^b	307.5 ± 16.2 ^g	161.0 ± 1.9 ^e	64.3 ± 1.6 ^c

注:图中不同字母表示同一时间不同复合体之间的显著性差异(p<0.05)。

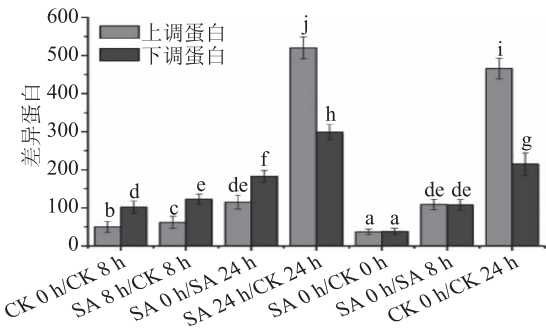


图3 胡椒单萜类化合物处理组差异蛋白统计
Fig.3 Statistics of differential protein in the treatment group of pepper monoterpenoids
注:图中不同字母表示差异显著(p<0.05)。

的 ATP,*L.monocytogene* 的呼吸链位于质膜上。胡椒单萜类化合物可能通过抑制 *L.monocytogene* 呼吸链复合体活性减弱呼吸作用,阻断电子从 NADH 到辅酶 Q 的传递,导致维持 *L.monocytogene* 正常生命活动的 ATP 和蛋白质不能及时合成,从而导致菌体衰亡。结合差异蛋白的统计结果来看,胡椒单萜类化合物可能抑制酶复合物蛋白的形成,从而引发酶复合物蛋白表达量的巨大变化。呼吸电子传递链是能量代谢过程中重要的组成部分,任何一个复合体活性受到抑制都将导致生物体不能正常地合成 ATP,进而衰竭死亡^[19]。

表2 具有胡椒单萜类化合物多肽对接活性的呼吸链复合体
Table 2 Respiratory chain complex with docking activity of pepper monoterpenoids and polypeptides

序号	Accession ^a	Description ^b	Fold			mitochondrial Complexes ^d
			0 h	8 h	24 h	
1	CL3569.Contig2_CK_0A	ATP synthase complex subunit	1.22	0.78	0.32	复合体 V
2	CL2659.Contig1_CK_0A	ATP synthase subunit	1.02	0.88	0.45	复合体 V
3	CL3151.Contig2_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase	0.92	0.73	0.28	复合体 I
4	CL1094.Contig4_CK_0A	NADH dehydrogenase subcomplex	0.90	1.12	1.33	复合体 I
5	Unigene2720_CK_0A	ATP synthase subunit	1.19	0.98	0.84	复合体 V
6	Unigene4104_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	0.95	0.86	0.77	复合体 I
7	CL3590.Contig2_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase	0.92	0.69	0.78	复合体 I
8	Unigene11357_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	0.99	1.01	1.03	复合体 I
9	CL4703.Contig1_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	0.97	1.05	1.38	复合体 I
10	CL1528.Contig4_CK_0A	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	0.98	1.23	1.14	复合体 I
11	Unigene6313_CK_0A	ATP synthase subunit 4	1.18	1.12	0.98	复合体 V

注:Accession^a 通过 ESI MS/MS 鉴定,Description^b 蛋白功能描述参考于 NCBI、Uniprot_Swissprot 数据库,Fold^c 显示了胡椒单萜类化合物表达量和控制组的比值,mitochondrial Complexes^d 指的是该蛋白归属于哪种复合物。

代表同源模建全局模型质量评估(QMQE)得分,序号1为0.7以上,代表建模情况最好,序号2~3为0.5以上,4~11为0.5~0.3。

2.6 胡椒单萜类化合物与 *L. monocytogenes* 呼吸链蛋白分子对接及抑制位点的确定

以 *L. monocytogenes* 为供试菌,利用 Discovery Studio2.1 中的 Build and Edit protein,以胡椒单萜类化合物为配体, *L. monocytogenes* 菌体蛋白为受体,进行分子对接,结果得到5条胡椒单萜类化合物与 *L. monocytogenes* 菌体蛋白对接成功(如图4),通过 London d G 打分函数排序找出具有与胡椒单萜类化合物分子结合活性蛋白,这些蛋白质全部集中在 *L. monocytogenes* 呼吸链上复合体 I 和 V 中,包括十个肽段,这些肽段与胡椒单萜类化合物的亲和能得分较高,考虑空间位阻,疏水作用、氢键作用及范德华力判断其结合活性较为可靠;综合前文所得复合体 V 在蛋白水平明显下调,说明其在翻译后阶段受到强烈调控。

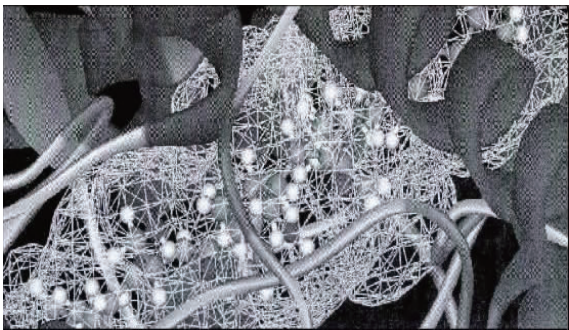


图4 胡椒单萜类化合物与单增李斯特菌菌体蛋白分子对接三维效果图

Fig.4 Molecular docking of pepper monoterpene and *L. monocytogenes*

3 结论

相比空白对照组,添加胡椒单萜类化合物可抑制 *L. monocytogenes* 的生长,同时 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 、呼吸链复合体 I~V 活力均降低,其中复合体 V 在蛋白水平显著下调,说明其在翻译及翻译后阶段受到强烈调控。结合同源模建和分子对接的结果,我们推测复合体 V 是胡椒单萜类化合物对 *L. monocytogenes* 呼吸链的重要抑制位点。胡椒单萜类化合物可使 *L. monocytogenes* 细胞膜通透性发生变化,维持 *L. monocytogenes* 正常生命活动的 ATP 和蛋白质不能及时合成,从而导致菌体衰亡。

参考文献

- [1] 徐燕,刘德清.胡椒中天然防腐剂的提取方法及其抑菌作用研究[J].中国调味品,2007(7):57-60.
- [2] 李祖光,高云芳,刘文涵.黑胡椒风味成分的研究[J].食品科学,2003(10):128-131.
- [3] Dorman H J, Deans S G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 308-316.

- [4] Pradhan K J, Variyar P S, Bandekar J R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. LWT-Food Science and Technology, 1999, 32(2): 121-123.
- [5] 周业丰.基于蛋白组学技术的松属素对柑橘青霉抑菌机理研究[D].武汉:华中农业大学,2016.
- [6] 王延辉,师邱毅,孙金才,等.胡椒梗中挥发性成分提取及其抑菌效果研究[J].安徽农业科学,2016,44(7):52-56,75.
- [7] Qiu J, Jiang Y, Xia L, et al. Subinhibitory concentrations of licochalcone A decrease α -toxin production in both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(2): 223-229.
- [8] 陆海霞,黄小鸣,朱军莉.超高压对单增李斯特菌细胞膜的损伤和致死机理[J].微生物学报,2014,54(7):746-753.
- [9] Allen K L, Almeida A, Bates T E, et al. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia [J]. Journal of Neurochemistry, 1995, 64(5): 2222-9.
- [10] 李伟.蛋白质配体结合位点柔性的系统分析及分子柔性对接方法的发展和应用[D].北京协和医学院,2012.
- [11] Chaudhry N M, Tariq P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006, 19(3): 214.
- [12] 杨敏,袁佳依,陈文学.胡椒提取物抑菌活性研究[J].食品工业科技,2013(4):125-128.
- [13] Kato M, Hayashi R, Tsuda T, et al. High pressure-induced changes of biological membrane. Study on the membrane-bound $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ as a model system [J]. Febs Journal, 2002, 269(1): 110-118.
- [14] Bowker B C. Effects of myosin heavy chain isoform composition on muscle fiber ATPase activity, postmortem metabolism, and meat quality in porcine muscle [J]. Dissertation Abstracts International, 2003, 644-690.
- [15] 孙卫,郑学芝,李丽,等.葛根素对糖尿病大鼠胰腺腺体氧化应激及 ATP 酶的影响[J].临床合理用药杂志,2011,10(8):1154-1155.
- [16] Ouali A. Sensitivity to ionic strength of $\text{Mg} - \text{Ca}$ -enhanced ATPase activity as an index of myofibrillar ageing in beef [J]. Meat Science, 1984, 11(2): 79.
- [17] Schempp C M, Von S K, Schreiner L, et al. V-ATPase inhibition regulates anoikis resistance and metastasis of cancer cells [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2014, 13(4): 926-937.
- [18] Chaves A L, DE Lima P O, Soares J M, et al. Effects of digoxin and $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ immunoexpression on human oral squamous carcinomas [J]. Anticancer Research, 2014, 34(10): 5397-403.
- [19] Skulachev V P. Functions of mitochondria: From intracellular power stations to mediators of a senescence program [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2009, 66(66): 1785-1793.
- [20] 刘冠军,周莉,颜思奇,等.基于结构比对模板库的蛋白质模型评估[J].药物生物技术,2015(2):105-111.