

## 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌群体感应的抑制作用

申悦<sup>1</sup>, 劳敏军<sup>2</sup>, 王当丰<sup>1</sup>, 崔方超<sup>1\*</sup>, 林洪<sup>3</sup>, 李婷婷<sup>4\*</sup>, 励建荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>浙江兴业集团有限公司 浙江舟山 316120

<sup>3</sup>中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266100

<sup>4</sup>大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

**摘要** 水产品腐败菌的群体感应现象是加速水产品腐败的原因之一。近年来,由于化学保鲜剂的使用导致许多腐败菌产生抗性,并且其安全性也令消费者担忧,因此研究安全、高效的生物保鲜剂是水产保鲜中的重要课题。本研究用固定化青霉素酰化酶来抑制水产品优势腐败菌——荧光假单胞菌的群体感应现象。利用 CV026 验证固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌 AHLs 的淬灭作用;利用光学显微镜和扫描电镜研究酶对生物被膜的影响;利用牛奶琼脂平板验证胞外蛋白酶的活性;通过分子对接预测酶与不同 AHLs 的相互作用。结果表明,固定化青霉素酰化酶能够降低荧光假单胞菌 AHLs 的含量,从而减少紫色杆菌 CV026 紫色菌素的生成,减缓荧光假单胞菌生物被膜和胞外聚合物的形成。同时也干预了胞外蛋白酶的生成,当酶质量浓度为 15 mg/mL 时无法观察到明显的蛋白抑制圈。分子对接结果显示,该酶与短链和长链的信号分子都能成功对接,然而,更偏向于长链 AHLs。3D 对接结果显示,C<sub>14</sub>-HSL 被活性中心周围的氨基酸残基全部包裹,相互以氢键连接,氢键的数量较多,结合作用更强。由此说明固定化青霉素酰化酶具有良好的群体感应淬灭活性,可作为新型保鲜剂应用于水产品保鲜。

**关键词** 青霉素酰化酶; 群体感应淬灭; 水产保鲜; 荧光假单胞菌

**文章编号** 1009-7848(2022)10-0077-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.009

微生物的生长代谢是导致水产品腐败的主要原因之一。在水产品腐败过程中,通常只有 1 种或几种微生物起主要作用,这些细菌就是优势腐败菌(Specific spoilage organisms,SSOs)<sup>[1]</sup>。随着微生物的繁殖,细菌密度逐渐增大,细菌通过自身合成并释放自诱导物——信号分子,来调控其生物行为(如生物发光、生物被膜形成、毒力因子表达及浮游等),这一过程称为群体感应(Quorum sensing, QS)<sup>[2]</sup>。López-Martín 等<sup>[3]</sup>发现鲍曼不动杆菌的 QS 系统在调节表面运动、生物膜形成和毒力方面起着重要作用。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是水产品贮藏过程中常见的嗜冷菌,属于好氧或兼性厌氧的革兰氏阴性细菌。因其适应性强、生长周期短、胞外酶活性高,故被公认为动

物和水产品中的 SSOs<sup>[4]</sup>。荧光假单胞菌能分泌 *N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)作为信号分子,来调控水产品的腐败<sup>[5]</sup>。对 QS 系统的干扰或破坏有助于控制许多致腐菌腐败表型的表达,从而延长水产品货架期。

通常将能够以 QS 为靶标,干扰信号通路的物质称为群体感应抑制剂(Quorum sensing inhibitors, QSIs)<sup>[6]</sup>。它们能在不杀死或不干扰细菌正常生命活动的前提下有效调控菌群的结构和功能<sup>[7]</sup>。目前 QSIs 主要从 3 个方面抑制 QS:①通过阻断 LuxI 型合酶中断 AHL 信号合成;②通过群体感应淬灭酶(Quorum quenching enzymes)降解 AHLs 信号传播,减少 AHLs 的积累;③干扰信号受体或阻断 AHL/LuxR 复合物<sup>[8]</sup>。这些方法旨在减少群体感应介导的表型表达,而不会对细菌产生其它破坏性的影响。群体感应淬灭酶中,研究最广泛的是 AHL 乳糖酶和 AHL 酰化酶,这两类的酶均以 AHLs 为底物。AHL 乳糖酶通过水解内酯环上的酯键产生酰基高丝氨酸,使短链和长链 AHLs 失活。相比之下,AHL 酰化酶通常对侧链长度超过

收稿日期: 2021-12-15

基金项目: “十三五”国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新重点专项(2019YFD0901702)

作者简介: 申悦(1996—),女,硕士生

通信作者: 崔方超 E-mail: cfc1031@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

10个碳的AHLs最有效<sup>[9]</sup>。AHL酰化酶可以分解AHLs的酰胺键,产生相应的脂肪酸和高丝氨酸内酯(HSL),其作用方式与青霉素酰化酶的作用方式非常相似。通过详细的结构研究,已证实AHL酰化酶与其它青霉素酰化酶属于同一Ntn水解酶超家族。由此可推测:青霉素酰化酶和其它Ntn水解酶超家族酶可能具有切割AHLs的能力<sup>[10]</sup>。2014年,Mukherji等<sup>[11]</sup>首次报道了产自柠檬克鲁维酵母(*Kluyvera citrophila*)的青霉素G酰化酶(KcPGA)活性,通过生化分析和分子对接验证了无论是否经过3-氧基修饰,KcPGA对含6~8个碳原子的AHLs都具有活性。

产自巨大芽孢杆菌的青霉素酰化酶主要用来合成青霉素或头孢霉素类抗生素,为了方便工业应用<sup>[12]</sup>,越来越多的研究集中于酶的性质方面。由于固定化酶灵敏度高、稳定性好、操作简单、成本低,因此被广泛应用于在食品工业中,降低了食品生产成本,也减少了生产过程中造成的污染<sup>[13]</sup>。迄今为止,尚未有文献报道固定化青霉素酰化酶对QS的淬灭作用。本文以市售青霉素酰化酶为对象,研究其对水产腐败菌的QS淬灭作用,以期为其在抑制水产品腐败方面的研究奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与试剂

紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum* 026, CV026)为紫色杆菌ATCC 31532的mini-Tn5突变体,卡那霉素抗性,仅当存在外源短链AHLs(C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL)时,菌株CV026产生特征性紫色色素。供试菌株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)从腐败大菱鲆中分离、鉴定。两种菌株均保藏于渤海大学食品科学学院水产品贮藏与加工研究所。

固定化青霉素酰化酶,产自巨大芽孢杆菌(酶活力:≥240 U/g),上海笛柏生物科技有限公司;卡那霉素、冰醋酸,国药集团化学试剂有限公司;乙酸乙酯,天津风船化学试剂有限公司;结晶紫,天津致远化学试剂有限公司;载玻片,江苏飞舟玻塑有限公司;LB肉汤培养基、LB营养琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;Skim Milk脱脂奶粉,北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖,美国Sigma

公司。

### 1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD超净工作台,苏景集团苏州安泰空气技术有限公司;Biofuge Stratos台式高速离心机,美国Thermo Fisher公司;LDZX-50KB立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;MS105UD电子分析天平,瑞士梅特勒-托利仪器有限公司;imark酶标仪,美国BIO-RAD;Nikon80i显微镜,日本尼康公司;Agilent 7890N/5975气质联用(GC-MS)仪,美国Agilent公司;LRH系列生化培养箱,上海一恒科技有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 固定化青霉素酰化酶抑菌活性确定及QSIs活性检测 参考梅永超等<sup>[14]</sup>的方法略加修改,将CV026和荧光假单胞菌过夜培养对数期(10<sup>6</sup> CFU/mL),按1:100的体积比接种于LB肉汤中(培养CV026的LB肉汤中需含有20 μg/mL卡那霉素;培养荧光假单胞菌的肉汤中分别含有0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL的固定化青霉素酰化酶),28 °C,160 r/min振荡培养16~18 h。吸取200 μL加入不同质量浓度固定化青霉素酰化酶培养的荧光假单胞菌菌液添加到96孔板中,用酶标仪于波长595 nm测定OD值,观察酶对菌株生长的影响。将用牛津杯提前放入平板中的10 mL CV026与100 mL LB营养琼脂培养基混合,倒平板,孔中加入不同质量浓度固定化青霉素酰化酶培养过的荧光假单胞菌上清液,以没有加固定化青霉素酰化酶培养的荧光假单胞菌上清液为空白对照,28 °C静置培养24~48 h后,观察紫色菌素的产生情况。

1.3.2 固定化青霉素酰化酶对紫色菌素产生的影响 根据参考文献[15],菌株CV026过夜活化后,按1:100的体积比接种于含有不同质量浓度固定化青霉素酰化酶(0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 mg/mL)的LB肉汤中,并加入200 μL的AHLs粗提液,160 r/min,28 °C振荡培养48 h。而后依次吸取300 μL培养液于1.5 mL离心管中,加入150 μL 10%十二烷基硫酸钠,振荡10 s,加入600 μL正丁醇,振荡5 s,10 000 r/min离心5 min,吸取200 μL紫色上清液添加到96孔板中,用酶标仪测定OD<sub>595nm</sub>,以不加信号分子的试验组作为对照。

### 1.3.3 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜的影响

1) 酶标板法测定生物被膜 将过夜培养的荧光假单胞菌,按 1:100 的体积比接种于 LB 肉汤中,分装至无菌离心管,每管 4 mL,加入终质量浓度为 0,2.5,5,10,15,20,25 mg/mL 的固定化青霉素酰化酶,培养 36 h,以没有加酶为对照,每组 3 次重复,具体参照孙晓佳等<sup>[16]</sup>的方法。取菌液测定波长 595 nm 处的菌液密度后,弃去菌液,用无菌水清洗 3 次,无菌风干燥 30 min,使生物被膜固定在离心管内壁上,取 1 mL 0.2% 的结晶紫染色 15 min。弃去染色液,无菌水清洗 3~5 次至干净透明。用 33%( $\varphi$ )冰乙酸溶解固定着的染色液。用酶标仪测定波长 595 nm 下的吸光度,每处理组取 3 个平行。生物被膜的相对生成率按公式(1)计算:

$$\text{生物被膜生成率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{QSI}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100 \quad (1)$$

2) 光学显微镜观察固定化青霉素酰化酶对生物被膜形态的影响 载玻片(普通载玻片,25.4 mm×76.2 mm,厚度 1~2 mm)预处理:置于体积分数 75%乙醇溶液中浸泡 24 h 后,用蒸馏水洗净、烘干,灭菌备用。

在无菌培养皿中加入 10 mL 含有 1% 荧光假单胞菌的 LB 肉汤,并分别加入终质量浓度为 0,2.5,5,10,15,20,25 mg/mL 的固定化青霉素酰化酶,混合均匀后放入处理后的载玻片,28 °C 静置培养 36 h。同时,设立没有添加酶的阴性对照组。36 h 后取出载玻片,无菌水冲洗,除去浮游菌及黏液,置于无菌培养皿中,加入适量甲醇固定 15 min,再加入适量 2% 结晶紫溶液染色 5 min 后,用无菌水冲洗干净,室温下干燥,干燥后在光学显微镜下观察,拍照记录。

3) 扫描电镜观察固定化青霉素酰化酶对生物被膜形态的影响 将载玻片换成锌片,前期操作同 1.3.3(2),培养 36~48 h。结束后用无菌水反复冲洗,洗去表面的浮菌。将锌片放入 4 °C 预冷的体积分数 2.5% 戊二醛溶液中浸泡 4 h,取出用 50%,70%,80%,90%,100% 的乙醇梯度脱水,自然干燥后喷金处理,用扫描电子显微镜观察。

1.3.4 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌胞外蛋白酶活力的影响 参照赵阳洁<sup>[17]</sup>的方法稍作改

动,制作牛奶平板,用牛津杯打孔,加入用不同质量浓度(2.5,5,10,15,20,25 mg/mL)的固定化青霉素酰化酶过夜培养的荧光假单胞菌上清液,28 °C 静置培养 18~24 h。蛋白酶水解酪蛋白后,在孔周围出现明显的水解圈,水解圈越大,说明胞外蛋白酶活力越高。以不加固定化青霉素酰化酶的上清液为阴性对照。

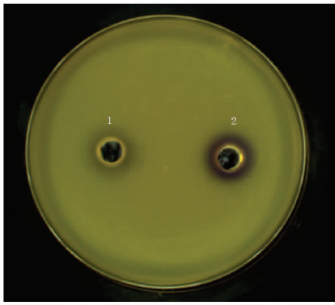
1.3.5 GC-MS 测定固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌产 AHLs 的影响 参照张清霞等<sup>[18]</sup>的方法稍作修改,荧光假单胞菌用 400 mL LB 肉汤培养。在 28 °C,160 r/min 振荡培养 24 h,5 000 r/min 离心 30 min 去沉淀,等体积乙酸乙酯(含体积分数 0.1% 冰乙酸溶液)萃取,35 °C 旋转蒸发有机相后,用 2 mL 甲醇溶解,粗提液保存于 -20 °C 备用。向上述粗提液中加入固定化青霉素酰化酶使其终质量浓度为 25 mg/mL,以不添加固定化青霉素酰化酶为对照。28 °C 作用 40 min 后,将样品用有机滤膜过滤于 GC-MS 检测确定加酶前、后 AHLs 的变化情况。参照孙晓佳<sup>[19]</sup>的方法设置 GC-MS 条件。

1.3.6 分子对接分析青霉素酰化酶与 AHLs 的相互作用 将 PDB 数据库中获得青霉素酰化酶(产自巨大芽孢杆菌)6nvy 的 3D 结构,使用 Discovery Studio(DS)软件进行 3D 蛋白结构的优化。从 ZINC 数据库(<http://zinc.docking.org/>)中得到 C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>10</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL、C<sub>14</sub>-HSL 的 3D 结构,在 DS 软件中优化结构后,采用半柔性对接分析酶和配体之间的作用方式,以及酶对不同碳链的 AHLs 的作用差异<sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 固定化青霉素酰化酶 QS 抑制活性的确定

经过测定培养结束后的菌液密度,发现添加不同质量浓度的固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌的生长没有影响。因此直接选取培养后的上清液加入孔中与培养基中的 CV026 作用,结果如图 1 所示。当荧光假单胞菌同 25 mg/mL 的固定化青霉素酰化酶培养后,使得 CV026 产生紫色菌素不明显,说明固定化青霉素酰化酶可能减少了荧光假单胞菌中的信号分子的产量。



注:1. 25 mg/mL 固定化青霉素酰化酶培养的荧光假单胞菌上清液;2. 没有加酶培养的荧光假单胞菌上清液。

图1 固定化青霉素酰化酶对 CV026 紫色菌素的抑制作用  
Fig.1 Inhibition of immobilized penicillin acylase on CV026

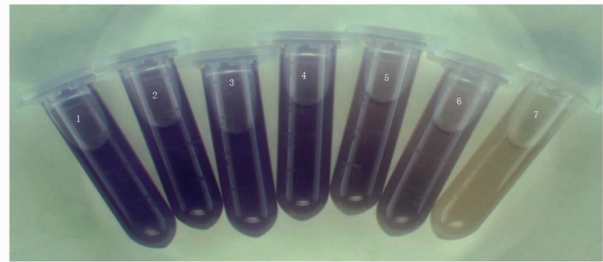
## 2.2 固定化青霉素酰化酶对 CV026 紫色菌素产生的影响及最小抑紫浓度的确定

通过观察 CV026 产紫色菌素的差异性能够看出不同酶浓度对 QS 的干扰程度不同,从图 2a 中能够直观看出酶添加量越多紫色越浅,说明固定化酰化酶的 QSI 活性呈剂量依赖性。从颜色变化来看,与不加酶的对照组相比,5 mg/mL 固定化青霉素酰化酶处理可以明显降低紫色菌素的产量。从图 2b 可知,随着酶质量浓度的增大,紫色菌素逐渐减少,当酶质量浓度为 25 mg/mL 时,对紫色菌素的抑制率达到 38.63%,由此推断固定化青霉素酰化酶可通过干扰 QS 现象,使得在外源 AHLs 存在的情况下,抑制 CV026 紫色菌素的产生。可以推测固定化青霉素酰化酶可通过降解 AHLs 达到抑制腐败菌间信息交流的目的,从而减少致病因子的产生以达到水产品保鲜的效果。

## 2.3 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜的影响

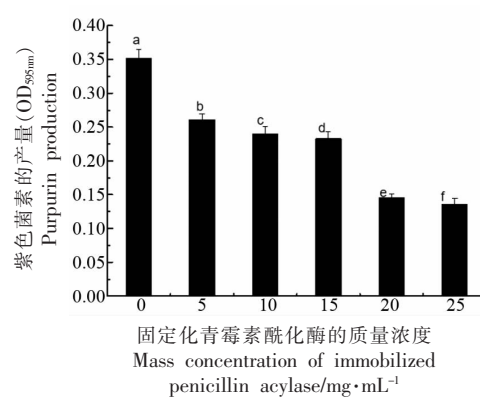
### 2.3.1 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜形成量的影响

生物被膜的形成是水产品污染的常见来源。研究发现有氧冷冻条件下贮藏时, QS 会参与新鲜肉制品的腐败以及其表面生物被膜的形成<sup>[21]</sup>。从腐败食品中分离到的荧光假单胞菌具有快速产生生物膜的特性<sup>[22]</sup>。从图 3 中可看出,固定化青霉素酰化酶的添加并没有对荧光假单胞菌的生长造成影响,随着酶质量浓度的升高,生物膜的生成率逐渐减小,当酶质量浓度为 25 mg/mL 时,对生物被膜形成的抑制率达到 57.41%。由此可知固定化酰化酶能够有效抑制荧光假单胞



(a)不同质量浓度固定化青霉素酰化酶培养 24 h 后 CV026 菌液的颜色

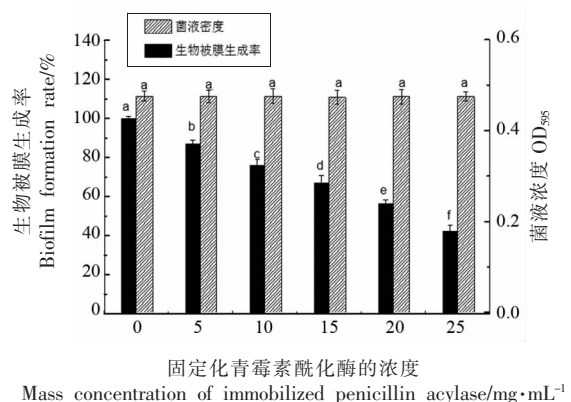
注:1~7 分别表示加入 0,2.5,5,10,15,20,25 mg/mL 固定化青霉素酰化酶培养后的菌液。



(b)不同质量浓度固定化青霉素酰化酶对 CV026 菌株紫色菌素产量的影响

注:图中不同小写字母表示各组之间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

图2 固定化青霉素酰化酶对 CV026 的 QSI 效应  
Fig.2 QSI effect of immobilized penicillin acylase on CV026



注:图中不同小写字母表示各组之间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

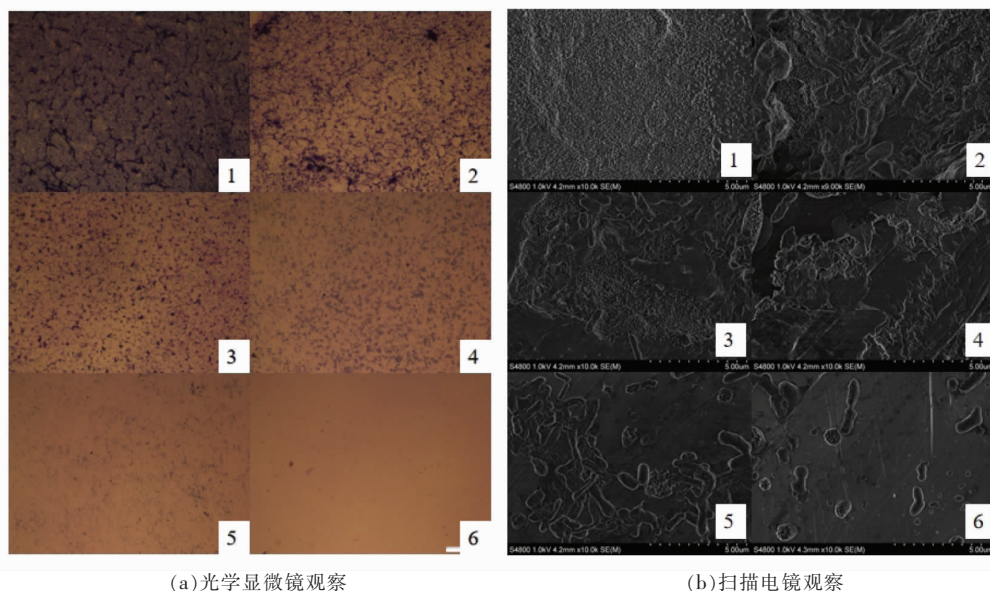
图3 不同质量浓度固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜形成率的影响

Fig.3 Effects of different mass concentrations of immobilized penicillin acylase on biofilm formation rate of *P. fluorescens*

菌生物膜的形成,减少其在水产品表面定殖。

2.3.2 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜形态的影响 通过光学显微镜可以观察到不同质量浓度的固定化青霉素酰化酶培养后的荧光假单胞菌生物被膜形态的微观结构。从图 4a 可看出随着固定化青霉素酰化酶质量浓度的升高,生物膜的形成量逐渐减少。未加固定化青霉素酰化

酶的荧光假单胞菌的生物被膜中密布的菌体连接成紧密的膜状物。随着酶浓度的升高,菌体越来越稀疏,生物被膜的产量难以在载体上牢固附着,因此菌体无法聚集形成膜状物。由此推断固定化青霉素酰化酶能够降低荧光假单胞菌生物被膜的形成量,从而减少其在水产品表面的附着,从而达到延缓腐败的效果。



注:1~6 分别表示加入 0,5,10,15,20,25 mg/mL 固定化青霉素酰化酶培养后的生物膜。

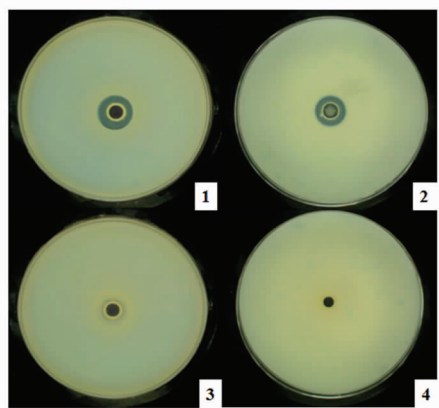
图 4 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜的影响

Fig.4 Light microscope observation of the effect of immobilized penicillin acylase on *P. fluorescens* biofilm

通过扫描电镜能够更加直观的观察生物膜表面的结构情况。从图 4b 中可看出没有加酶的对照组菌体形态最为致密,结构均匀,具有一定的层次感,无法看到单一菌体。添加不同质量浓度固定化青霉素酰化酶培养后,随着酶质量浓度增大,生物被膜出现了破裂,失去原有的立体网格结构,单一菌体周围的膜包围状物逐渐消失,当酶质量浓度为 25 mg/mL 时,出现了明显单菌,表明固定化青霉素酰化酶能够有效减弱荧光假单胞菌的成膜能力。与生物被膜形成量的测定结果一致,证实了固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌生物被膜的影响,推测其可能通过调控了 QS 相关基因的表达,有效减少了胞外聚合物的生成。

#### 2.4 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

假单胞菌具有较强的水解蛋白质和脂肪的能力,可以产生吲哚、苯酚、腐胺、尸胺、硫化氢等有毒物质,并导致水产品产生感官不可接受性的黏液、异味<sup>[23]</sup>。通过测定胞外蛋白酶的变化,能够了解固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌胞外蛋白酶表达量的影响。试验结果如图 5 所示,随着酶质量浓度的增加,透明圈逐渐减小,且当添加 15 mg/mL 酶后,可以完全抑制胞外蛋白酶的活性。由于 QS 是一个转录调控系统,可能通过调控编码胞外蛋白酶的基因转录来实现对胞外蛋白酶表达的干预<sup>[24]</sup>。Li 等<sup>[25]</sup>发现铜绿假单胞菌中的 QS 系统会干预其 3 种胞外蛋白酶的表达,通过构建 QS 突变



注:1~4 分别表示孔中加入 0,5,10,15 mg/mL 固定化青霉素酰化酶培养后的上清液。

图 5 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Fig.5 The effect of immobilized penicillin acylase on the extracellular protease activity of *P. fluorescens*

体研究,表明 QS 系统不只是通过转录来调节这些蛋白酶的活性,即使这些蛋白酶从细胞中分泌出来, QS 系统仍然控制着它们的活性。基于固定化青霉素酰化酶的功能,可以推测通过淬灭 AHLs 可抑制胞外蛋白酶的表达,而不影响其活性。

## 2.5 GC-MS 测定固定化酰化酶对荧光假单胞菌分泌 AHLs 的影响

通过 GC-MS 可以直观看出样品中 AHLs 的变化。从图 6a 中可以看出供试菌株荧光假单胞菌

主要产 3 种信号分子,根据课题组前期的研究结果表明,出峰时间在 6,8,11 min 左右所对应的 AHL 分别为 C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>10</sub>-HSL。由图 6b 中可看出 3 种 AHLs 都有下降趋势,其中 C<sub>8</sub>-HSL 下降最多,说明固定化青霉素酰化酶对 C<sub>8</sub>-HSL 的降解活性最强。张争等<sup>[26]</sup>从植物病原菌青枯菌中鉴定出了的 1 种 AHL 酰化酶 Aac 淬灭细菌的群体感应信号,控制细菌性病害,对 C<sub>8</sub>-HSL 有较强的淬灭活性。

## 2.6 分子对接分析青霉素酰化酶与 AHLs 的相互作用

分子对接是借助计算机模拟酶与底物之间的相互作用,预测其结合位点和结合强度。通过将酶与不同的底物对接可预测出与酶有相互作用的底物,为下一步试验验证提供理论依据。从表 1 可看出不同碳链的 AHLs 与酶对接的打分情况,其中 C<sub>14</sub>-HSL 的打分最高。有研究表明已知的大多数细菌 AHL 酰化酶是 N 端亲核酶 (Ntn)-水解酶的成员,这类酶由多种酶组成,它们识别不同种类的底物,然而具有共同的性质,如自动催化活化、N 端催化亲核(苏氨酸、丝氨酸或半胱氨酸)的存在和酰胺键的断裂,青霉素酰化酶也是其中的一员<sup>[28]</sup>。具有 AHL 酰化酶功能的青霉素酰化酶对长链的 AHLs 作用效果较好,一般都是含有  $\alpha$  和  $\beta$  2 个亚基的二聚体,在  $\alpha$  亚基上都含有 1 个保守的丝氨酸活性位点,该位点与周围的氨基酸残基盘曲折

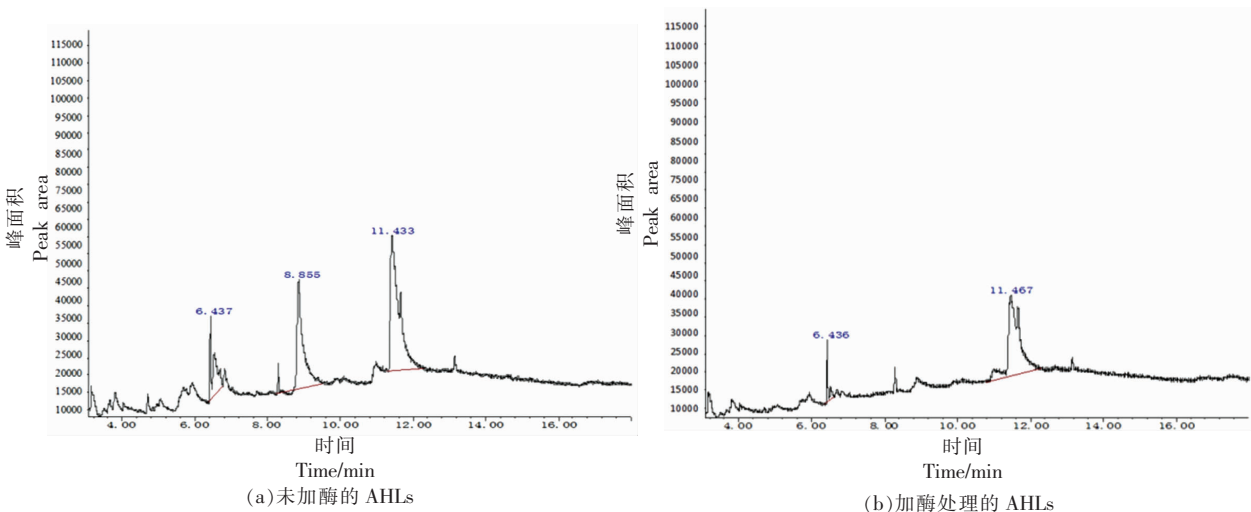


图 6 GC-MS 检测固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌产 AHLs 的影响

Fig.6 Effect of immobilized penicillin acylase on AHLs production by *P. fluorescens* detected by GC-MS

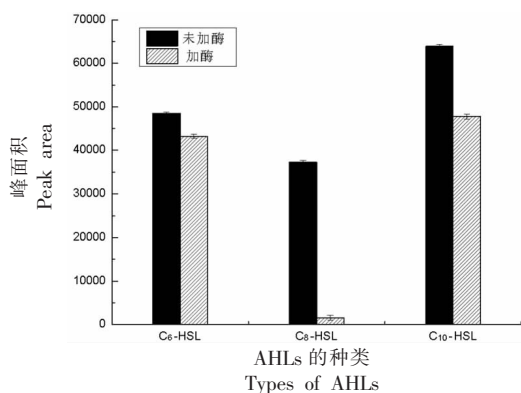


图 7 固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌 AHLs 的影响

Fig.7 Effect of immobilized penicillin acylase on AHLs of *P. fluorescens*

叠成一个疏水结合囊,更适合与长链 AHLs 结合,因此与短链的 AHLs 作用力较弱<sup>[28]</sup>。从表 1 可知随着碳链长度的增加,分值越来越大,说明该酶的最

佳底物更偏向于长链 AHLs。

表 1 青霉素酰化酶(产自巨大芽孢杆菌)与 AHLs 分子对接打分

Table 1 Molecular docking score of penicillin acylase (from *Bacillus megaterium*) and AHLs

AHL 种类	C <sub>4</sub> -HSL	C <sub>6</sub> -HSL	C <sub>8</sub> -HSL	C <sub>10</sub> -HSL	C <sub>12</sub> -HSL	C <sub>14</sub> -HSL
分值	78.314	83.513	100.351	102.007	113.816	126.04

从上述打分结果中选择短链、中长链、长链 3 种 AHLs 进行作用力分析,结果见图 8。图中呈现了青霉素酰化酶 6nvy 与 C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>14</sub>-HSL 对接的活性位点 2D 图。可以看出 AHLs 与酶之间的相互作用力,C<sub>4</sub>-HSL 与活性位点中 A 链的天冬酰胺形成 2 个氢键;C<sub>8</sub>-HSL 与活性位点中 A 链上的丝氨酸和天冬酰胺形成 3 个氢键,与缬氨酸形成 1 个碳氢键;C<sub>14</sub>-HSL 与活性位点中 A 链上的苏氨酸、酪氨酸和丝氨酸形成 3 个碳氢键。仅依靠 2D 图无法确定酶与底物间的空间构象,也无法确定酶对长链 AHLs 偏好的原因,故又对 C<sub>4</sub>-HSL 和 C<sub>14</sub>-HSL 与酶结合的 3D 图进行分析。

图 8b 分别显示了短链和长链 AHL 与青霉素酰化酶分子对接的 3D 图,从中可看出 C<sub>4</sub>-HSL 与酶的结合没有 C<sub>14</sub>-HSL 紧密。C<sub>14</sub>-HSL 被结合囊周围的氨基酸残基全部包裹,相互以氢键连接,与 C<sub>4</sub>-HSL 相比,氢键的数量较多。可能是由于 C<sub>14</sub>-HSL 具有更长的碳链,能够形成更多氢键。

### 3 结论

本文研究了固定化青霉素酰化酶(产自巨大芽孢杆菌)对荧光假单胞菌的 QS 抑制作用。通过紫色杆菌 CV026 验证了不同质量浓度固定化青霉素酰化酶对荧光假单胞菌 AHLs 的抑制作用,表明酶的加入能够使紫色菌素的产量减少,当质量浓度为 25 mg/mL 时,抑制率达到 38.63%。在酶的作用下,荧光假单胞菌的生物被膜和胞外蛋白酶活力均受到影响,且呈浓度依赖性,当酶质量浓度为 25 mg/mL 时,对生物被膜形成的抑制率达到 57.41%;当酶质量浓度为 15 mg/mL 时,完全抑制了胞外蛋白酶的活性,推测是由于酶的加入干扰了荧光假单胞菌的 QS 系统,使得蛋白酶的表达受到影响。GC-MS 结果表明,酶能够降低荧光假单胞菌的 AHLs,从而进一步证明酶是通过与 AHLs 作用来干扰 QS。分子对接结果表明酶对长链和短链 AHLs 都有作用,然而更偏好长链 AHLs。3D 对接图显示酶的活性中心会与 C<sub>14</sub>-HSL 形成更多的氢键,从而增大两者间的相互作用。前人已经研究

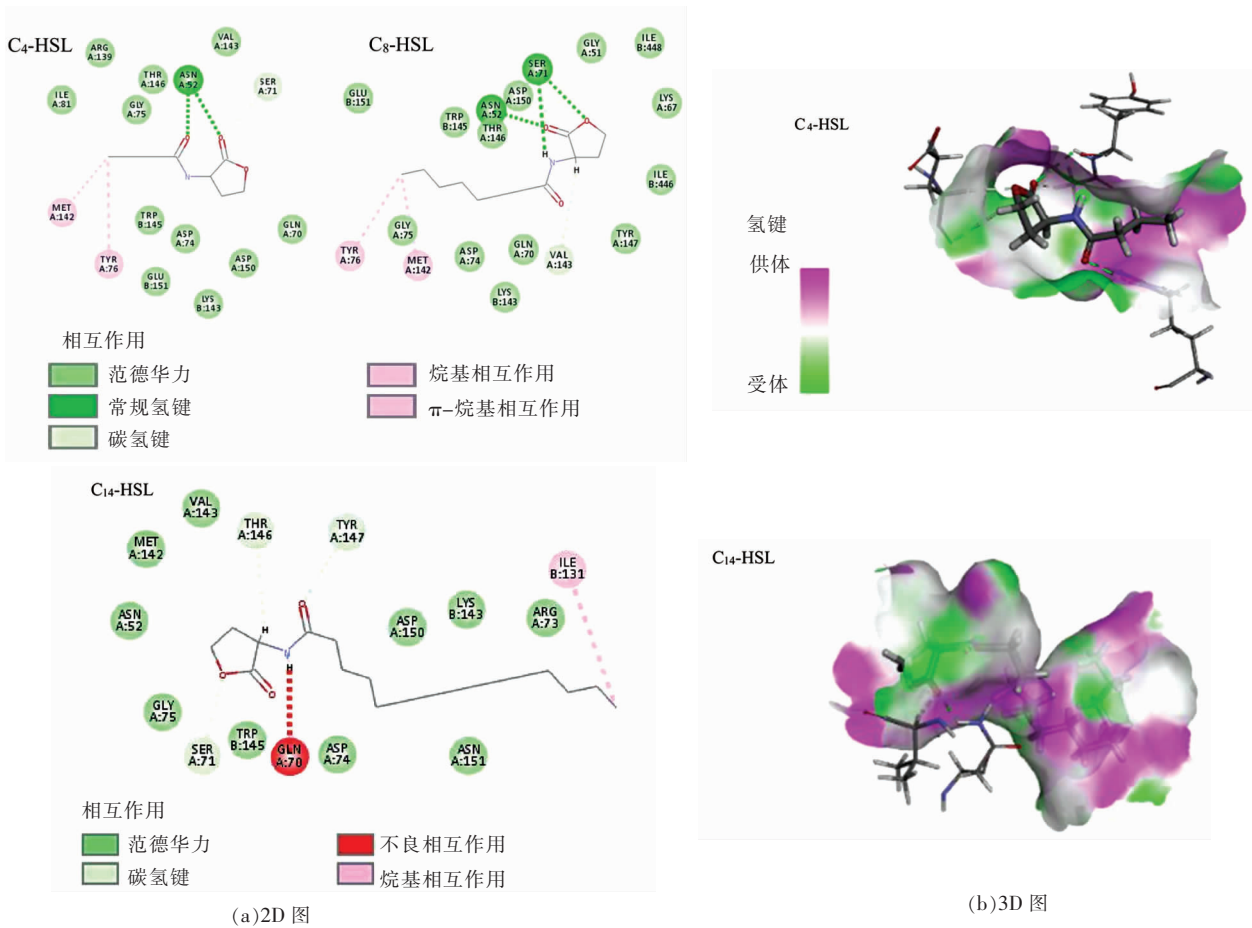


图 8 青霉素酰化酶 6nvy 与 AHLs 结合活性位点示意图

Fig.8 Schematic diagram of binding active sites of penicillin acylase 6nvy with AHLs

发现多种青霉素酰化酶都有淬灭 AHLs 的作用,并且已经利用蛋白质工程的方法来生产更加稳定、特异性和活性更强的 AHLs 淬灭酶<sup>[29]</sup>,本文中酶与荧光假单胞菌的 AHLs 作用后的产物还未清晰,需要进一步验证其作用机理。

### 参 考 文 献

- [1] 丁婷,李婷婷,王当丰,等.水产品腐败菌群体感应系统及群体感应抑制剂研究进展[J].生物加工过程,2019(3):227-235.  
DING T, LI T T, WANG D F, et al. Research progress on quorum sensing system and quorum sensing inhibitors of spoilage bacteria in aquatic products[J]. Biological Process, 2019(3): 227-235.
- [2] MACHADO I, SILVA L R, GIAOURIS E D, et al. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition[J]. Food Research International, 2020, 127: 108754.
- [3] LÓPEZ-MARTÍN M, DUBERN J F, ALEXANDER M R, et al. AbaM regulates quorum sensing, biofilm formation, and virulence in *Acinetobacter baumannii* [J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203 (8): e00635-20.
- [4] WANG Y, HONG X, LIU J, et al. Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol[J]. Food Microbiology, 2020, 10(91): 103506.
- [5] 崔方超,李婷婷,刘明爽,等.大菱鲆荧光假单胞菌的群体感应现象及不同碳源培养下的腐败特性研究[J].现代食品科技,2015,31(12):49-55.  
CUI F C, LI T T, LIU M S, et al. Quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* from turbot and its spoilage characteristics under different carbon sources



- [J]. *Modern Food Technology*, 2015, 31(12): 49–55.
- [6] LI X, LIU Y, WANG Y, et al. Resistance risk induced by quorum sensing inhibitors and their combined use with antibiotics: Mechanism and its relationship with toxicity[J]. *Chemosphere*, 2021, 265(9): 129153.
- [7] 宋雨, 蔡中华, 周进. 微生物群体感应抑制剂及其在海洋生态中的应用[J]. *微生物学报*, 2018, 58(1): 10–18.
- SONG Y, CAI Z H, ZHOU J. Microbial quorum sensing inhibitors and their application in marine ecology[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 58(1): 10–18.
- [8] LADE H, PAUL D, KWEON J H. Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10(5): 550–565.
- [9] MURUGAYAH S A, GERTH M L. Engineering quorum quenching enzymes: Progress and perspectives[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(3): 793–800.
- [10] DONG Y H, WANG L H, ZHANG L H. Quorum-quenching microbial infections: Mechanisms and implications[J]. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 2007, 362(1483): 1201–1211.
- [11] MUKHERJI R, VARSHNEY N K, PANIGRAHI P, et al. A new role for penicillin acylases: Degradation of acyl homoserine lactone quorum sensing signals by *Kluyvera citrophila* penicillin G acylase[J]. *Enzyme Microbiological Technology*, 2014, 56(5): 1–7.
- [12] MAYER J. Struktur-basiertes protein engineering von neuen penicillin G acylasen aus Gram-positiven bakterien für innovative biotechnologische anwendungen[D]. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 2021.
- MAYER J. Structure-based protein engineering of new penicillin G acylases from Gram-positive bacteria for innovative biotechnological applications [D]. Braunschweig: TU Braunschweig, 2021.
- [13] 侯瑾, 李迎秋. 固定化酶的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. *江苏调味副食品*, 2017(1): 9–12.
- HOU J, LI Y Q. Research progress of immobilized enzyme and its application in food industry [J]. *Jiangsu Seasoned Non-staple Food*, 2017(1): 9–12.
- [14] 梅永超, 李婷婷, 刘楠, 等. 绿薄荷精油对温和气单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(15): 27–33.
- MEI Y C, LI T T, LIU N, et al. Inhibitory effect of essential oil of *Mentha haplocalyx* on quorum sensing and spoilage characteristics of *Aeromonas sobria*[J]. *Food Science*, 2018, 39(15): 27–33.
- [15] KATO N, TANAKA T, NAKAGAWA S, et al. Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel [J]. *Journal of Inclusion Phenomena & Macrocyclic Chemistry*, 2007, 57(1/2/3/4): 419–423.
- [16] 孙晓佳, 李婷婷, 赫彬彬, 等. 富马酸钠对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败活性的抑制作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(11): 7–13.
- SUN X J, LI T T, HE B B, et al. Inhibition of sodium fumarate on colony induction and corruption activity of *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Food Science*, 2019, 40(11): 7–13.
- [17] 赵阳洁. 乌兰忽少海子和东营盐场嗜盐古菌多样性及其胞外蛋白酶研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- ZHAO Y J. Diversity of halophilic archaea and their extracellular proteases in Wulanhushaohaizi and Dongying saltworks[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.
- [18] 张清霞, 孔祥伟, 张迎, 等. 土壤中群体感应淬灭细菌的原位分离与筛选[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(3): 504–511.
- ZHANG Q X, KONG X W, ZHANG Y, et al. In situ isolation and screening of quorum sensing quenched bacteria from soil[J]. *Bulletin of Microbiology*, 2019, 46(3): 504–511.
- [19] 孙晓佳. 大菱鲆源温和气单胞菌群体感应 luxI/luxR 基因表达及其抑制剂的研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2020.
- SUN X J. Quorum sensing LuxI/LuxR gene expression and its inhibitors in *Aeromonas sobria* isolated from turbot[D]. Jinzhou: Bohai University, 2020.
- [20] YASUTAKE Y, KUSADA H, EBUCHI T, et al. Bifunctional quorum-quenching and antibiotic-acylase MacQ forms a 170-kDa capsule-shaped molecule containing spacer polypeptides[J]. *Science Reporter*, 2017, 7(1): 8946.
- [21] JAY J M, VILAI J P, HUGHES M E. Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 °C[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81(2): 105–111.

- [22] PUGA C H, ORGAZ B, SANJOSE C. *Listeria monocytogenes* impact on mature or old *Pseudomonas fluorescens* biofilms during growth at 4 and 20 °C[J]. Front Microbiol, 2016, 15(7): 134.
- [23] WANG Y, HONG X, LIU J, et al. Interactions between fish isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilms and sensitivity to carvacrol[J]. Food Microbiol, 2020, 91(5): 103506.
- [24] SCHUSTER M, LOSTROH C P, OGI T, et al. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: A transcriptome analysis [J]. J Bacteriol, 2003, 185(7): 2066–2079.
- [25] LI X H, LEE J-H. Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(51): 19635–19644.
- [26] 张争, 徐进, 许景升, 等. 植物青枯菌 *aac* 基因克隆及猝灭群体感应信号功能的研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2651–2656.
- ZHANG Z, XU J, XU J S, et al. Cloning of *aac* gene from *Ralstonia solanacearum* and its function research on quenching quorum-sensing signal [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(9): 2651–2656.
- [27] UTARI P D, JAN V, QUAX W J. Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1123.
- [28] KOCH G, NADAL-JIMENEZ P, REIS C R, et al. Reducing virulence of the human pathogen *Burkholderia* by altering the substrate specificity of the quorum-quenching acylase PvdQ[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(4): 1568–1573.
- [29] MURUGAYAH S A, GERTH M L. Engineering quorum quenching enzymes: Progress and perspectives[J]. Biochemical Society Transactions, 2019, 47(3): 793–800.

### Inhibitory Effect of Immobilized Penicillin Acylase on Quorum Sensing of *Pseudomonas fluorescens*

Shen Yue<sup>1</sup>, Lao Minjun<sup>2</sup>, Wang Dangfeng<sup>1</sup>, Cui Fangchao<sup>1\*</sup>, Lin Hong<sup>3</sup>, Li Tingting<sup>4\*</sup>, Li Jianrong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Bohai University, National Local Joint Engineering Research Center for Storage, Processing and Safety Control Technology of Fresh Agricultural Products, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>Zhejiang XingYe Group., Ltd., Zhoushan 316120, Zhejiang

<sup>3</sup>College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong

<sup>4</sup>College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning

**Abstract** Quorum sensing in spoilage bacteria of aquatic products is one of the reasons to accelerate the spoilage of aquatic products. In recent years, due to the use of chemical preservatives, many spoilage bacteria have developed resistance, and their safety also worries consumers, so the research on safe and efficient biological preservatives is an important topic in aquatic preservation. In this study, we tried to use immobilized penicillin acylase to inhibit the quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens*. The quenching effect of immobilized penicillin acylase on *Pseudomonas fluorescens* AHLs was verified by CV026; the effect of enzyme on biofilm was studied by optical microscope and scanning electron microscope; the activity of extracellular protease was verified by milk agar plate; the interaction between enzyme and different AHLs was predicted by molecular docking. The results showed that the immobilized penicillin acylase could reduce the content of AHLs in *Pseudomonas fluorescens*, thus reducing the production of purpurin in *Pseudomonas fluorescens* CV026 and the formation of *Pseudomonas fluorescens* biofilm and extracellular polymer. At the same time, it also interfered with the expression of extracellular protease. When the enzyme mass concentration was 15 mg/mL, no obvious protein inhibition circle could be observed. Molecular docking results showed that the enzyme could successfully dock with both short chain and long chain signaling molecules, but preferred to long chain AHLs. Compared with C<sub>4</sub>-HSL, C<sub>14</sub>-HSL was completely wrapped by amino acid residues around the binding capsule and connected with each other by hydrogen bonds, with more hydrogen bonds and stronger binding. It can be concluded that the immobilized penicillin acylase has good quorum sensing quenching activity and can be used as a new preservative for aquatic products.

**Keywords** penicillin acylase; quorum sensing quenching; aquatic preservation; *Pseudomonas fluorescens*