

紫苏抗菌剂的制备及其抗菌作用研究

邓文娟¹, 翟春涛², 冯 蓓², 金敏蓉^{2*}¹无限极(中国)有限公司, 广州 510663; ²莱博药妆技术(上海)股份有限公司, 上海 201401

摘要:为了研究紫苏抗菌剂的制备及其抗黑曲霉和金黄色葡萄球菌的抗菌机理。采用正交实验研究紫苏抗菌剂的配比。用牛津杯法和最小抑菌浓度研究紫苏抗菌剂的抑菌效果,通过检测黑曲霉的PH值、电导率、离子、RNA和蛋白质的泄露情况以及麦角固醇含量的测定来研究紫苏抗菌剂对黑曲霉的抗菌机理;通过检测金黄色葡萄球菌细胞外电导率、细胞内还原糖、RNA和蛋白质、离子泄露情况、肽聚糖含量以及对细胞壁损伤情况来研究紫苏抗菌的对金黄色葡萄球菌的抗菌机理。结果表明,紫苏抗菌剂的最佳配比为紫苏子:广藿香:松萝=4:1:1;对黑曲霉和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(MIC)为0.2%和0.06%;紫苏抗菌剂对黑曲霉的作用机理主要表现在破坏了黑曲霉和金黄色葡萄球菌的细胞膜结构。

关键词:紫苏抗菌剂、配比、黑曲霉、金黄色葡萄球菌、抗菌活性、抗菌机理

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0066-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.013

Studies on preparation and antibacterial actions of *Perilla frutescens* antibacterial agent

DENG Wen-juan¹, ZHAI Chun-tao², FENG Bei², JIN Min-rong^{2*}¹Infinite (China) Company Ltd, Guangzhou 510663, China; ²LB Cosmeceutical Technology Co., Ltd., Shanghai 201401, China

Abstract: In order to study the preparation of *Perilla frutescens* antibacterial agent and its antibacterial mechanism against *Aspergillus Niger* and *Staphylococcus aureus*. The composition of *Perilla frutescens* antibacterial agent was studied by orthogonal experiment. The inhibitory effect of *Perilla frutescens* antibacterial agent was studied by Oxford cup method and minimum inhibitory concentration. The antibacterial mechanisms of *Perilla frutescens* antibacterial agent against *Aspergillus Niger* was studied by measuring the PH, electrical conductivity, ion, RNA and protein leakage of *Aspergillus Niger* and the ergosterol content. By detecting the extracellular conductivity of *Staphylococcus aureus*, the intracellular leakage of reducing sugar, RNA and protein ions, the content of peptidoglycan, and the damage to the cell wall, the antibacterial mechanism of *Perilla* against *Staphylococcus aureus* was studied. The results showed that the best ratio of *Perilla frutescens* antibacterial agent was: fructus perillae: pogostemon cablin: sunglo = 4: 1: 1; the minimum inhibitory concentration (MIC) for *Aspergillus Niger* and *Staphylococcus aureus* were 0.2% and 0.06%. The main mechanism of action of *Perilla frutescens* antibacterial agent on *Aspergillus Niger* and *Staphylococcus aureus* was that it destroyed the membrane structure of *Aspergillus Niger*.

Key words: *Perilla frutescens* antibacterial agent; ratio; *Aspergillus Niger*; *Staphylococcus aureus*; antibacterial activity; antibacterial mechanism

紫苏(*Perilla frutescens* L.)在我国是一种传统草药,已被开发为藿香正气水、参苏丸等含紫苏的10余种中药制剂^[1],可用于治疗多种疾病,如解表散寒、理气宽中、细菌和真菌感染等^[2]。广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 具有芳香化浊,开胃止呕,发表解暑之功效,常用于湿浊中阻,脘痞呕

吐,暑湿倦怠等症状,现代研究发现具有很好的抗菌功效^[3]。松萝(*Usnea diffracta* Vain.)为松萝科植物,生于深山的老树枝干或高山岩石上,呈悬垂条丝状。《中华本草》记载,松萝属等许多地衣类都含有抗菌物质,其中松萝酸之抗菌作用尤为突出^[4]。紫苏抗菌剂以紫苏为君药,辅以广藿香和松萝,经过现代生物技术,精心制备而成,具有显著的杀菌作用,可以达到防腐功效。本文通过一定配比的紫苏抗菌

剂,研究了它对黑曲霉和金黄色葡萄球菌的抗菌机理。

1 材料与设备

材料:紫苏子,安徽谓博中药股份有限公司;广藿香,安徽谓博中药股份有限公司;松萝,安徽谓博中药股份有限公司;琼脂;葡萄糖;土豆;黑曲霉(ATCC 16404);金黄色葡萄球菌(ATCC 6538);蛋白胨、牛肉膏、琼脂、氯化钠、氢氧化钠、无菌水等。

设备:SW-CJ-2F型双人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司;DHZ-C型大容量恒温振荡器,上海福玛实验设备有限公司;DHZ-C立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;AL206电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TPOPETTE移液枪,大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司;霉菌培养箱,上海精宏实验设备有限公司;牛津杯,蓝宇科技试剂公司;打饼器,蓝宇科技试剂公司;SPX-250B-Z型生化恒温培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;万用电炉,上海实研电炉有限公司;酒精灯、移液管、三角瓶、涂布棒、镊子、培养皿、牛津杯、接种针等。

2 实验方法

2.1 紫苏抗菌剂配比研究

本实验选定紫苏子、广藿香和松萝这3个因素作为参数,每个因素选择3个水平,设计正交实验 $L_9(3^3)$,研究其对抗黑曲霉效果的影响,如表1所示。

表1 因素水平表
Table 1 Factors level

水平 Level	因素 Factors		
	A 紫苏子 Perilla Fruit (g)	B 广藿香 Pogostemon cablin (g)	C 松萝 Chinese Usnea (g)
1	60	10	10
2	70	15	15
3	80	20	20

2.2 紫苏抗菌剂对黑曲霉抑菌效果及机制的研究

2.2.1 紫苏对黑曲霉抑菌圈测定

采用牛津杯法^[5]评价紫苏抗菌剂对黑曲霉的抑制效果。

2.2.2 紫苏抗菌剂对黑曲霉的最低抑制浓度(MIC)测定

参照 Sharma N 等^[6]的方法,观察黑曲霉的生长

状况,以肉眼看不到菌丝生长的最小试剂浓度作为紫苏抗菌剂的最低抑菌浓度。

2.2.3 测定黑曲霉的 pH

参照 Tian J 等^[7]描述的方法,通过 pH 酸度计测定菌丝在细胞外 pH 值。

2.2.4 测定紫苏作用于黑曲霉后的电导率

参照 Paul S 等^[8]描述的方法,评价紫苏对黑曲霉细胞膜通透性的影响。

2.2.5 黑曲霉菌丝体离子泄露的测定

参照 Wu 等^[9]描述的方法测定紫苏作用于黑曲霉后的离子泄露情况,以研究紫苏抗菌剂是否对黑曲霉细胞膜通透性产生破坏。

2.2.6 黑曲霉 RNA 及蛋白质泄露的测定

分别取 49 mL 孢子悬浮液(10^6 孢子/mL),添加 1 mL 紫苏抗菌剂溶液使抑菌剂终浓度分别为 0.00% (作为对照)、1.00%、2.00%。在恒温摇床培养箱中 28 °C 培养,分别在培育 30、60、90、120、150 min 后取出 10 mL 孢子悬浮液,以孢子悬浮液(10^6 孢子/mL)为参比调零,用紫外可见分光光度计分别在 260、280 nm 波长处检测其上清液的吸光度,并绘制曲线。

2.2.7 麦角固醇含量的测定

采用 Wang YZ 等^[10]描述的方法提取并测定黑曲霉细胞质膜上麦角固醇的含量,来评价紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞质膜上的麦角固醇合成的影响。麦角固醇的计算公式如下:

$$\text{麦角固醇}\% + 24(28)\text{脱氢麦角固醇}\% = (A_{282}/290)/\text{菌丝湿重}$$

$$24(28)\text{脱氢麦角固醇}\% = (A_{230}/518)/\text{菌丝湿重}$$

$$\text{麦角固醇}\% = (\text{麦角固醇}\% + 24(28)\text{脱氢麦角固醇}\%) - 24(28)\text{脱氢麦角固醇}\%$$

2.3 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌抑菌效果及机制的研究

2.3.1 紫苏对金黄色葡萄球菌抑菌圈测定

用牛津杯法^[5]测定紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的抑制效果。

2.3.2 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度(MIC)测定

参照 Sharma N 等^[6]描述的方法,测试紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的 MIC。

2.3.3 金黄色葡萄球菌细胞外电导率测定

参照 Paul S 等^[8]描述的方法测定紫苏抗菌剂

与金黄色葡萄球菌作用后电导率变化,研究紫苏抗菌剂对细菌细胞膜通透性的影响。

2.3.4 金黄色葡萄球菌细胞内还原糖泄露的测定

将金黄色葡萄球菌培养至对数期,分别取 9 mL 菌液,离心后,所得菌体用 PBS 洗涤并重悬于 9 mL 的 PBS 中。菌液混匀后在各管中添加紫苏抗菌剂溶液使终浓度分别为 0.50%、1.00%、2.00% (同时等量无菌水做对照)。在恒温摇床培养箱中 37 °C 培养,每隔半小时,分别用还原糖测定仪测定反应液中还原糖的含量。

2.3.5 金黄色葡萄球菌细胞内 RNA 及蛋白类泄露的测定

将金黄色葡萄球菌培养至对数期末期,500 mL 菌液平均分装在 25 个离心管中(其中 5 个作为参比溶液),离心后,所得菌体用 PBS 洗涤并重悬于 20 mL PBS 中。每 5 个离心管中的菌液混匀后平均分为 4 组,混匀后在各管中添加紫苏抗菌剂溶液使终浓度分别为 1.00%、2.00% (同时等量无菌水做对照)。在恒温摇床培养箱中 37 °C 培养,分别在培育 0.5、1、1.5、2、2.5 h 后取出 20 mL 菌液,以含有菌体的 PBS 为参比调零,用紫外可见分光光度计分别在 260、280 nm 波长处检测其上清液的吸光度,并绘制曲线。

2.3.6 金黄色葡萄球菌细胞离子泄露的测定

参照 Wu T 等^[9]描述的方法测定紫苏抗菌剂作用于金黄色葡萄球菌后的离子泄露情况,以验证紫苏抗菌剂是否对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性产生破坏。

2.3.7 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的影响

将金黄色葡萄球菌培养至对数期,取 100 mL 菌液离心获得菌体,用 PBS 洗涤后,重选于 5 mL 的 PBS 缓冲液中,分别吸取 1 mL 菌液至 9 mL 不同浓度抗菌剂中使终浓度分别为 0.50%、1.00%、2.00%,对照加入 9 mL 无菌水。将样品置于恒温振荡器中 37 °C 处理 4 h。然后 6 000 rpm 离心 10 min 取离心得到的金黄色葡萄球菌菌体,悬浮于 10 g/L 的三氯乙酸溶液中,75 °C 水浴处理 25 min 裂解菌体,去除细胞壁中磷壁酸成分,冷却至室温,8 000 rpm 离心 10 min 收集不含磷壁酸的细胞壁沉淀,用 PBS 洗涤沉淀。沉淀按固液比(1:5,质量体积比)加入胰蛋白酶磷酸盐缓冲液(胰蛋白酶 3 mg/mL

PBS,pH = 8.0),37 °C 摇床震荡培养 12 h,然后 1 500 rpm 离心 5 min,弃去未溶解于胰蛋白酶的沉淀,上清用 8 000 rpm 离心 15 min,得到不含蛋白的细胞壁沉淀,沉淀用无菌水洗涤 2 次,加入氯仿甲醇混合溶液(氯仿:甲醇 = 1:2)处理 6 h(去除脂类物质)。8 000 rpm 离心 15 min,重悬于 5 mL 的 0.5 mol/L 硫酸中。100 °C 水解 6 h,冷却后无菌水定容至 5 mL。分别取各浓度待测样品 1 mL,冰浴条件下加入 5% 苯酚(重蒸)1.4 mL、浓硫酸 5 mL,混匀后置 100 °C 水浴 25 min,冷却至室温,在波长 490 nm 下测定吸光值。

2.3.8 流式细胞仪 PI 染色测定紫苏抗菌剂对细胞的损伤

分别吸取培养至对数期的菌液与不同浓度的紫苏抗菌剂溶液混匀,使紫苏抗菌剂终浓度分别为 1.00% 和 2.00% (对照加等体积无菌生理盐水),将混合好的各处理组菌悬液置于摇床处理 4h(37 °C, 130 rpm)后,经离心并去除上清液,用无菌生理盐水冲洗细胞 2 次。此外,取等量细胞进行热处理(80 °C 水浴 30 min)并离心收集菌体作为阳性对照。然后将各浓度紫苏抗菌剂处理后的细胞沉淀悬浮于无菌生理盐水中使细菌终浓度约为 10^6 CFU/mL。取重悬后的 1 mL 菌悬液移入微量离心管后,用 50 μ g/mL 的 PI 染色液 40 μ L 在 25 °C 条件下避光染色 15 min 后,用 200 mW、488 nm 激发激光器的成像流式细胞仪检测细胞内各染料的荧光强度。设置参数放大率最大,流速最慢,每组样品收集 1 000 个细胞。PI 通过细胞膜进入细胞内部染色 DNA 后产生红色荧光,该荧光可以在 FL4 通道(610 ± 30 nm)被检测收集到,收集各通道的细胞荧光数据后并以此生成峰面积图。

3 实验结果及讨论

3.1 紫苏抗菌剂的制备方法研究

3.1.1 紫苏抗菌剂配比研究

由表 2 的极差值 R 和表 3 的分析结果可以看出,3 种药材对金黄色葡萄球菌的影响程度依次为 B > A > C,最佳提取比例为 A3B3C3,即紫苏子:广藿香:松萝 = 4:1:1;根据黑曲霉的最佳提取比例为 A3B2C3,即紫苏子:广藿香:松萝 = 16:3:4。同时根据两种 MIC 结果都显示广藿香影响最显著,紫苏子次之,松萝影响最小,因此,最终选择提取比例为紫苏子:广藿香:松萝 = 4:1:1。

表2 抗菌实验结果与分析
Table 2 Antibacterial tests' results and analysis

菌种 Strains	实验号 No.	A	B	C	黑曲霉 Aspergillus niger MIC(μL/mL)	金黄色葡萄球菌 (staphylococcus aureus) MIC(μL/mL)	
	1	1	1	1	1	2.3	0.8
	2	1	2	2	2	1.9	0.76
	3	1	3	3	3	1.65	0.612
	4	2	1	2	3	1.25	0.73
	5	2	2	3	1	1.17	0.68
	6	2	3	1	2	1.5	0.64
	7	3	1	3	2	1.09	0.65
	8	3	2	1	3	1.12	0.63
	9	3	3	2	1	1.11	0.61
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> MIC(μL/mL)	K1	1.95	1.547	1.64	1.52		
	K2	1.307	1.397	1.42	1.497		
	K3	1.107	1.42	1.303	1.34		
	R	0.843	0.15	0.337	0.187		
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> MIC(μL/mL)	K1	0.724	0.727	0.69	0.697		
	K2	0.683	0.69	0.7	0.683		
	K3	0.63	0.621	0.647	0.657		
	R	0.094	0.106	0.053	0.04		

表3 MIC 方差分析
Table 3 Analysis of variance for MIC

菌种 Strains	误差来源 Error sources	SS	f	S	F	P
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	A	1.165	2	19.417	19	<0.05
	B	0.039	2	0.65	19	<0.05
	C	0.175	2	2.917	19	<0.05
	误差 Deviation	0.06	2			
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	A	0.013	2	6.5	19	<0.05
	B	0.017	2	8.5	19	<0.05
	C	0.005	2	2.5	19	<0.05
	误差 Deviation	0.002	2			

3.1.2 紫苏抗菌剂的制备方法

根据正交实验结果,紫苏抗菌剂的制备方法如下:取紫苏子 80 g、广藿香 20 g 和松萝 20 g 分别粉碎并混合均匀,加 100 g 的水碾磨至 60~200 目,调节 pH 值为 5;加入脂肪酶,至酶活性为 10 U/g,在 50 °C 的温度下,酶解 2 h;加入 3 000 g 95 wt% 的乙醇溶液,进行渗漉法提取;渗漉提取 24 h,过滤,取滤

液;低温减压浓缩除去溶剂,置换成辛酸癸酸甘油酯,定容至 200 g;在 -10 °C 下陈化 12 h,分层后过滤,取上清液,即得紫苏抗菌剂。

3.2 紫苏抗菌剂对黑曲霉的抗菌作用

3.2.1 紫苏抗菌剂对黑曲霉的抗菌效果

从图 1 可以看出:对照组未观察到抑菌圈,而注入 0.15% 和 0.20% 紫苏抗菌剂的牛津杯周围则能

观察到明显的抑菌圈。从表 4 中可以看出:随着紫苏抗菌剂浓度的增加,黑曲霉中牛津杯抑菌圈大小也越大。因此紫苏抗菌剂对黑曲霉有较明显的抑制效果,且紫苏抗菌剂浓度越大,抑菌效果越好。

3.2.2 紫苏抗菌剂对黑曲霉的最低抑制浓度(MIC)测定

不同浓度的紫苏抗菌剂溶液处理后的黑曲霉生长结果见图 2(a-f)。如图 2(a-f) 所示,随着紫苏抗菌剂浓度的增加,培养皿中菌丝的生长逐渐减少。在浓度为 0.15% 时,存在少量菌丝,而当浓度为

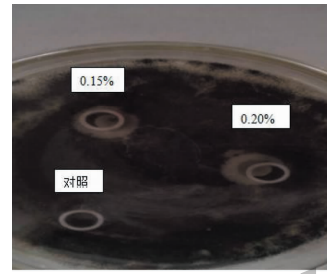


图 1 紫苏抗菌剂对黑曲霉的抑菌效果

Fig. 1 Effect of *Perilla frutescens* antibacterial agent on *Aspergillus niger*

表 4 紫苏抗菌剂对黑曲霉抑菌圈直径的影响

Table 4 Effect of *Perilla* antibacterial agent on the diameter of *aspergillus Niger*'s antibacterial zone

测试指标 Testing index	紫苏抗菌剂浓度 Concentrations of <i>Perilla</i> antibacterial agent (%)						
	对照 Control	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
直径 Diameter(mm)	5 ± 0.3	5 ± 0.3	8 ± 0.1	9 ± 0.5	15 ± 0.1	18 ± 0.4	20 ± 0.2

0.20% 时,培养皿中无菌丝生长。所以紫苏抗菌剂对黑曲霉的最小抑菌浓度是 0.20%。这些结果也表明,紫苏抗菌剂对黑曲霉具有显著的抑制效果,且随着浓度的增长,抑制效果更加显著。

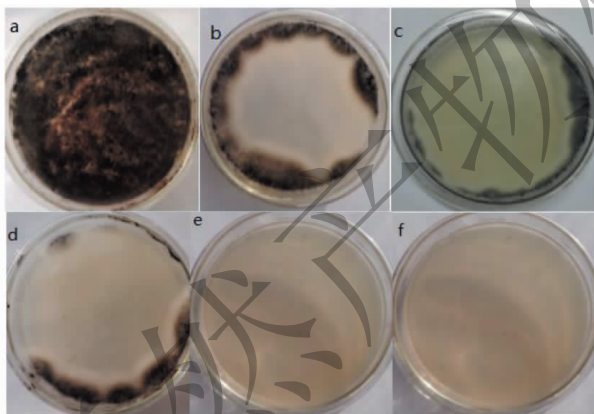


图 2 (a-f) 不同浓度紫苏抗菌剂处理后的黑曲霉生长状况

Fig. 2 (a-f) Growth of *Aspergillus niger* treated with different concentrations of *Perilla* antibacterial agents

注 1: a. 对照; b. 0.05%; c. 0.10%;
d. 0.15%; e. 0.20%; f. 0.25%。

Note 1: a. control; b. 0.05%; c. 0.10%;
d. 0.15%; e. 0.20%; f. 0.25%.

3.2.3 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞外 pH 的影响

如图 3 所示,对照组随着时间的延长,细胞外溶液 pH 值下降趋势较为明显;而不同浓度(0.50%, 1.00%, 1.50%, 2.00%)紫苏抗菌剂处理的黑曲霉

菌丝细胞外溶液 pH 值随着时间的增加下降趋势不明显。当时间相同,紫苏抗菌剂浓度增大,各组的 pH 值也增大;同时,2.00% 紫苏抗菌剂处理的黑曲霉菌丝的细胞外溶液 pH 值下降趋势更为缓慢。结果显示,紫苏抗菌剂阻止了由葡萄糖诱导的黑曲霉细胞外溶液 pH 值的降低。且随着时间的延长和紫苏抗菌剂浓度的增大,这种趋势越明显。

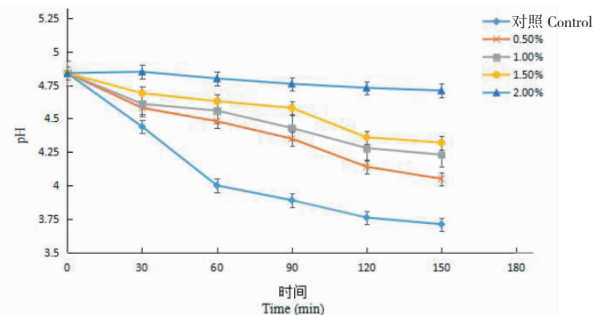


图 3 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞外 pH 的影响

Fig. 3 Effect of *Perilla* antibacterial agents on extracellular pH of *Aspergillus niger*

3.2.4 紫苏抗菌剂对黑曲霉电导率的影响

从图 4 可以看出,对照组电导率随着处理时间的变化基本上保持不变;而随着紫苏抗菌剂处理时间的增加,电导率逐渐变大。在相同处理时间条件下,紫苏抗菌剂浓度越增大,黑曲霉的电导率也随之变大。因此,紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞膜的通透性具有破坏作用,且随着处理时间和浓度的增加,紫苏

抗菌剂对黑曲霉细胞膜的通透性的破坏增大。

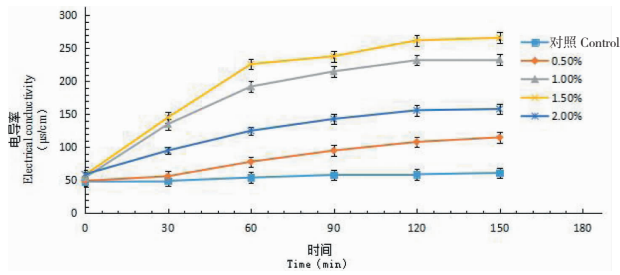


图4 不同浓度紫苏抗菌剂对黑曲霉电导率的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of Perilla antibacterial agents on electrical conductivity of *Aspergillus niger*

3.2.5 紫苏抗菌剂对黑曲霉离子泄露的影响

从图5-7中可以看出,随着处理时间的增加,紫苏处理抗菌剂的菌液中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度都明显高于对照组。且随着时间和浓度的增加, K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度逐渐增大。因此,可知紫苏抗菌剂对黑曲霉菌丝体细胞膜造成了破坏,使其细胞膜的通透性增加,从而引起细胞内金属离子的泄露,最终致使菌丝体死亡。

3.2.6 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞内RNA及蛋白质泄露的影响

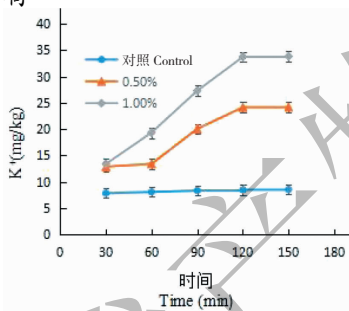


图5 紫苏抗菌剂对黑曲霉菌丝细胞内 K^+ 泄露的影响

Fig. 5 Effect of Perilla antibacterial agents on K^+ leakage in *Aspergillus niger* cells

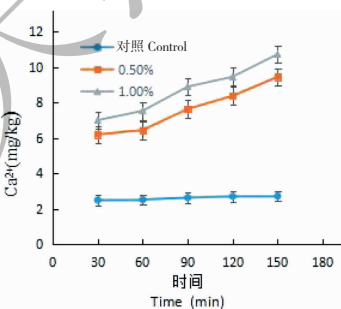


图6 紫苏抗菌剂对黑曲霉菌丝细胞内 Ca^{2+} 泄露的影响

Fig. 6 Effect of Perilla antibacterial agents on Ca^{2+} leakage in *Aspergillus niger* cells

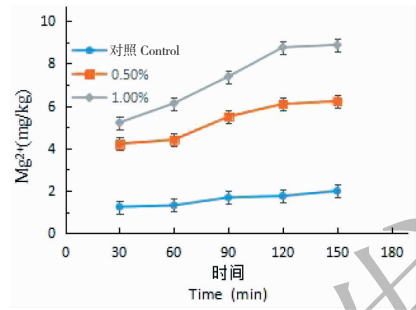


图7 紫苏抗菌剂对黑曲霉菌丝细胞内 Mg^{2+} 泄露的影响

Fig. 7 Effect of Perilla antibacterial agents on Mg^{2+} leakage in *Aspergillus niger* cells

从图8和图9中可以看出,对照组的上清液中核酸类、蛋白类物质的几乎没有变化。而紫苏抗菌剂处理的实验组中核酸和蛋白类物质含量明显高于对照组,并且随着处理时间的延长和紫苏抗菌剂浓度的增加而核酸和蛋白类物质泄露量增加。因此,紫苏抗菌剂能破坏黑曲霉细胞的细胞膜,使其通透性增加,引起核酸及蛋白类物质的泄露,进而抑制黑曲霉的各项生理活性,最终导致其死亡。

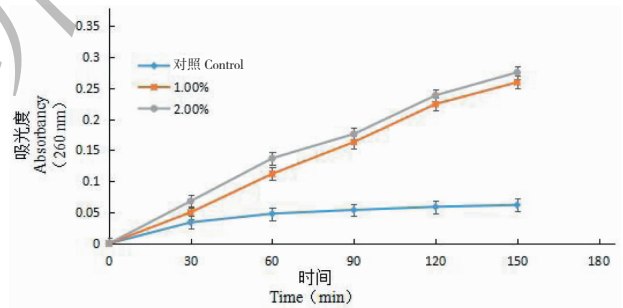


图8 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞内RNA泄露的影响

Fig. 8 Effect of Perilla antibacterial agents on RNA leakage in *Aspergillus niger* cells

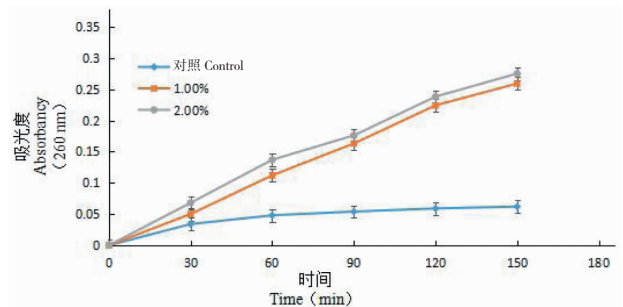


图9 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞内蛋白质泄露的影响

Fig. 9 Effects of Perilla antibacterial agents on protein leakage in *Aspergillus niger* cells

3.2.7 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞内麦角固醇的影响

从图 10 中看出,紫苏抗菌剂处理的菌液的吸光度值比未经处理低,且随着紫苏抗菌剂浓度的增大,吸光值越来越低,说明紫苏抗菌剂能够影响黑曲霉细胞膜上麦角固醇成分。由图 10 给出的数据计算得到麦角固醇的含量。与对照组相比,0.05%,0.10%,0.15%紫苏抗菌剂处理的菌液中麦角固醇的含量降低了 6.8%,12.8%,47.9%。这些结果表明,紫苏抗菌剂能够通过抑制黑曲霉细胞膜上麦角固醇的合成或者是破坏细胞膜来抑制霉菌的生长繁殖,且随着紫苏抗菌剂浓度的增大,抑制效果越明显。

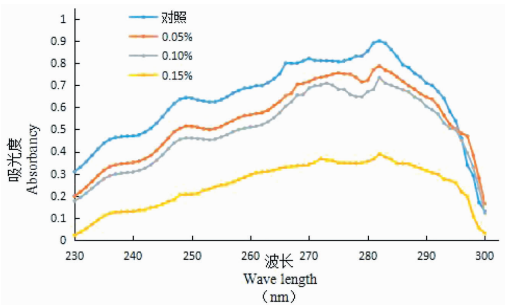


图 10 紫苏抗菌剂对黑曲霉细胞膜上麦角固醇含量的影响

Fig. 10 Effect of Perilla antibacterial agent on ergosterol content in cell membrane of *Aspergillus niger*

3.3 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的抗菌作用

3.3.1 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的抑制效果

图 11 中可以看出:加入 0.08% 和 0.10% 浓度

的紫苏抗菌剂处理金黄色葡萄球菌,会产生明显的抑菌圈,说明紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用。并且随着浓度的提高,抑菌圈的直径也有所增加,说明紫苏抗菌剂的抑菌作用和浓度有关,在一定范围内随着浓度的增加抑菌作用逐渐增强。

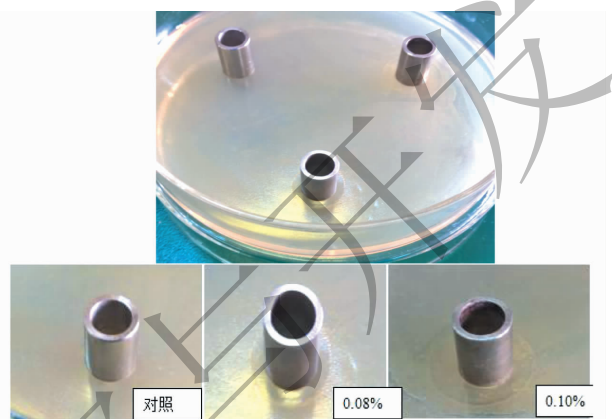


图 11 不同浓度紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的抑制效果

Fig. 11 Inhibition of different concentrations of Perilla antimicrobial agents on *Staphylococcus aureus*

3.3.2 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度(MIC)测定

从图 12 可以看出,随着紫苏抗菌剂浓度的增加,金黄色葡萄球菌菌落总数逐渐减少,但当紫苏抗菌剂浓度在 0.06% 时,菌落总数减少有明显的下降,说明 0.06% 为其最小抑菌浓度。

表 5 不同浓度紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌菌落总数的影响

Table 5 Effects of different concentrations of Perilla antimicrobial agents on the total number of *Staphylococcus aureus* colonies

抗菌剂浓度 Concentration of antimicrobial agents (%)	对照 Control	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
Lg CFU/mL	8.61	8.58	8.12	7.12	6.67	6.40

3.3.3 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌电导率的影响

如图 13 所示用紫苏抗菌剂处理的金黄色葡萄球菌的电导率随着时间的增加逐渐升高;在相同的时间,一定浓度内随着紫苏抗菌剂浓度的增加,各组的电导率逐渐增加;但当紫苏抗菌剂浓度为 2.00% 时,电导率变化较小,可能是油状抗菌剂导致离子聚集。但与空白对照组相比有所变化。由此可见,紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性有影响。

3.3.4 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞内还原糖泄漏的影响

根据图 14 的实验结果,紫苏抗菌剂组还原糖含量明显高于对照组还原糖的含量,并且随着时间的延长和紫苏抗菌剂浓度的增加而增加,且上升速度较快,并在 1.5 h 后趋于平稳。结果表明,紫苏抗菌剂能破坏金黄色葡萄球菌细胞的细胞壁膜,使其通透性增加,引起还原糖的泄漏,进而抑制金黄色葡萄球菌的各项生理活性导致其死亡。

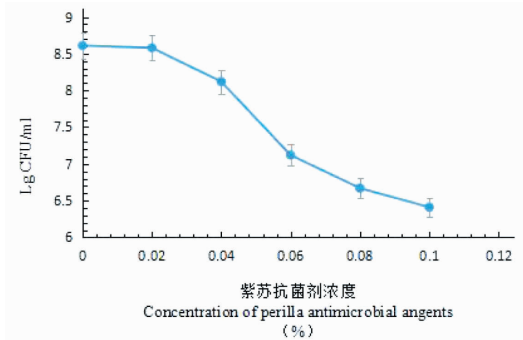


图 12 不同浓度紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌菌落总数的影响

Fig. 12 Effects of different concentrations of Perilla antimicrobial agents on the total number of *Staphylococcus aureus* colonies

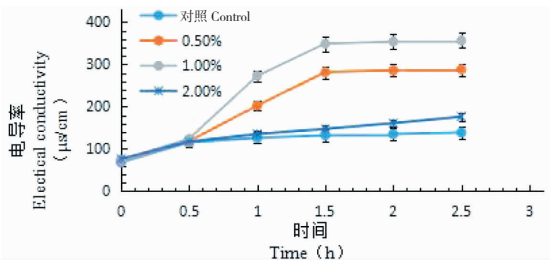


图 13 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌电导率的影响
Fig. 13 Effect of Perilla antibacterial agent on the conductivity of *Staphylococcus aureus*

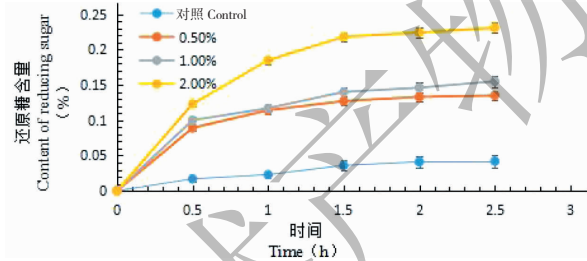


图 14 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞内还原糖泄漏的影响

Fig. 14 Effect of Perilla antibacterial agent on reducing sugar leakage in *Staphylococcus aureus* cells

3.3.5 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞内 RNA 及蛋白类成分泄漏的影响

根据图 15 和图 16 的实验结果,处理组的核酸和蛋白类物质泄露量明显高于对照组,并且随着时间的延长和紫苏抗菌剂浓度的增加而其泄露量增加。表明紫苏抗菌剂能破坏金黄色葡萄球菌细胞的细胞壁膜,使其通透性增加,引起核酸及蛋白类物质的泄露,从而抑制金黄色葡萄球菌的各项生理活性导致其死亡。

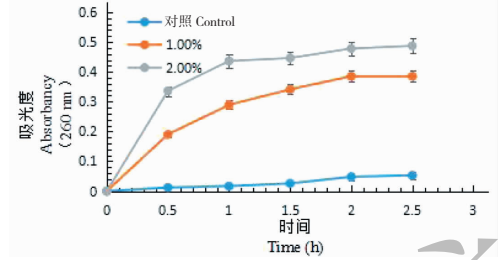


图 5 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞内 RNA 泄漏的影响
Fig. 15 Effect of Perilla antimicrobial agents on RNA leakage in *Staphylococcus aureus* cells

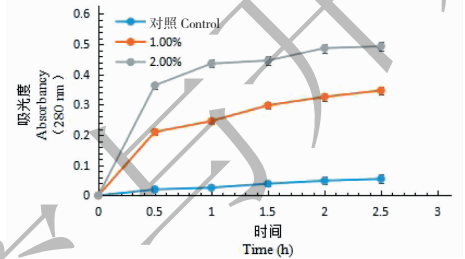


图 16 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞内蛋白质泄漏的影响

Fig. 16 Effect of Perilla antimicrobial agents on protein leakage in *Staphylococcus aureus* cells

3.3.6 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞离子泄露的影响

图 17 ~ 图 19 中可以看出,随着时间的增加,对照组中的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度变化较小,基本保持平稳趋势,而处理组的菌液中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度都高于对照,且随浓度增加效果更为明显。原因是由于紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞壁膜造成了破坏,使其细胞壁膜的通透性增加,从而引起细胞内金属离子的泄露。

3.3.7 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的影响

从图 20 中可以看出,1.00% 紫苏抗菌剂组和对

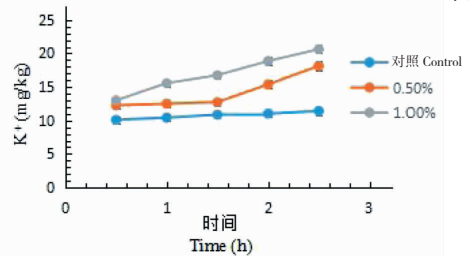


图 17 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞 K^+ 泄露的影响
Fig. 17 Effect of Perilla antibacterial agent on K^+ leakage of *Staphylococcus aureus* cells

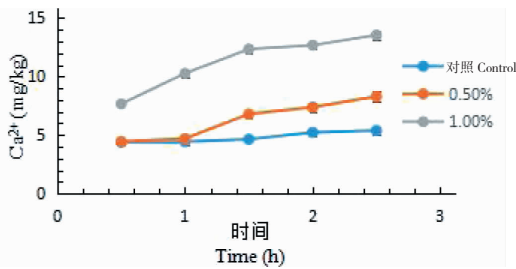


图 18 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞 Ca^{2+} 泄露的影响

Fig. 18 Effect of Perilla antibacterial agent on Ca^{2+} leakage of *Staphylococcus aureus* cells

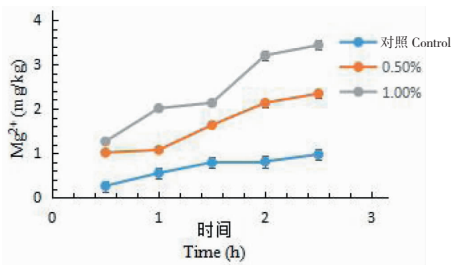


图 19 紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞 Mg^{2+} 泄露的影响

Fig. 19 Effect of Perilla antibacterial agent on Mg^{2+} leakage of *Staphylococcus aureus* cells

照之间具有显著差异 ($p < 0.05$), 2.00% 紫苏抗菌剂组和对照组之间具有非常显著差异 ($p < 0.01$)。随抗菌剂浓度增大, 肽聚糖含量下降。因此, 紫苏抗菌剂能对金黄色葡萄球菌细胞壁中的肽聚糖造成损伤, 或者是直接干扰细菌肽聚糖的合成, 导致金黄色

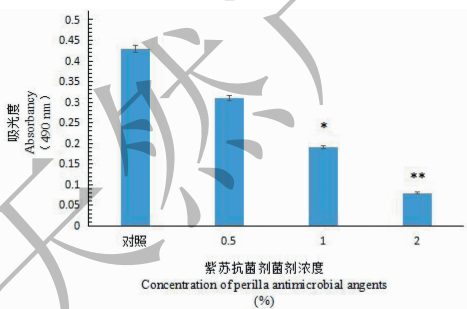


图 20 不同浓度抗菌剂对金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖的影响

Fig. 20 Effect of different concentrations of antimicrobial agents on the cell wall peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*

注: * 1.00% 浓度处理和对照之间具有显著差异 ($P < 0.05$); ** 2.00% 浓度处理和对照之间具有非常显著差异 ($P < 0.01$)。

Note: * a significant difference between 1.00% and control ($P < 0.05$); ** a greatest significant difference between 2.00% and control ($P < 0.01$).

葡萄球菌损伤, 影响其生长或造成死亡。

3.3.8 紫苏抗菌剂对菌体死亡及膜损伤的影响

从图 21 ~ 23 中可知, 对照组、1% 和 2% 浓度紫苏抗菌剂处理组的金黄色葡萄球菌, 受损或死亡细胞占总体的百分比分别为 14.7%, 54.3% 和 87.3%。紫苏抗菌剂处理后细胞的损伤或死亡率均高于对照组, 且紫苏抗菌剂浓度越高, 细胞的损伤或死亡率也越高。峰面积变化趋势则表明了细胞损伤

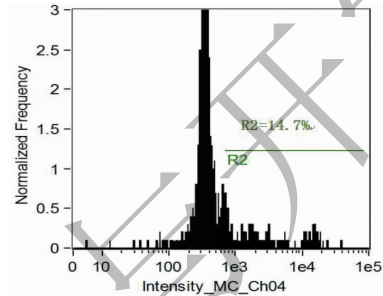


图 21 对照对金黄色葡萄球菌菌体死亡及膜损伤的影响

Fig. 21 Effect of control on the death and membrane damage of *Staphylococcus aureus* bacteria

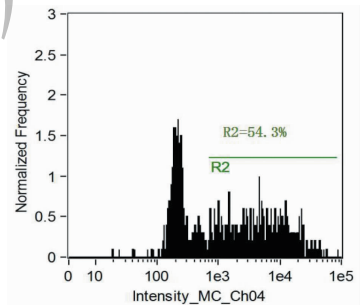


图 22 1% 浓度紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌菌体死亡及膜损伤的影响

Fig. 22 Effect of 1% Perilla antibacterial agent on the death and membrane damage of *Staphylococcus aureus* bacteria

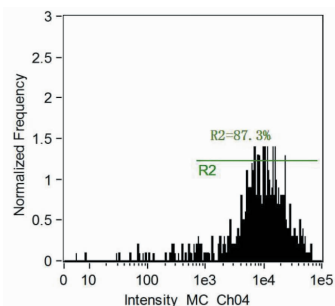


图 23 2% 浓度紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌菌体死亡及膜损伤的影响

Fig. 23 Effect of 2% Perilla antibacterial agent on the death and membrane damage of *Staphylococcus aureus* bacteria

至死亡的渐进性。因此,紫苏抗菌剂可损伤金黄色葡萄球菌细胞,导致细胞膜破损继而使细胞死亡。

4 结论

根据正交试验结果显示三种药材对金黄色葡萄球菌和黑曲霉 MIC 的影响程度为广藿香 > 紫苏子 > 松萝,因此,最终选择提取比例为紫苏子:广藿香:松萝 = 4: 1: 1。

紫苏抗菌剂对黑曲霉和金黄色葡萄球菌具有抑菌作用,且浓度越大,抑菌作用越大。其次通过实验确定了紫苏抗菌剂对黑曲霉和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 是 0.20% 和 0.06%。

通过 pH、电导率、离子泄漏、麦角固醇、RNA 和蛋白质泄漏评价紫苏抗菌剂对黑曲霉的细胞膜破坏作用。结果表明紫苏抗菌剂可使黑曲霉的细胞膜通透性增加,引起离子、核酸及蛋白类物质的泄漏,同时能够抑制黑曲霉细胞膜上麦角固醇的合成或破坏细胞膜来抑制霉菌的生长和繁殖,且随着紫苏抗菌剂浓度的增大,对细胞膜破坏越严重,抑制效果越明显。

通过测定还原糖、核酸蛋白质、电导率的变化、离子泄露、肽聚糖的变化等证明紫苏抗菌剂能作用于金黄色葡萄球菌的细胞膜,改变其通透性;破坏或影响细胞壁的合成;损伤金黄色葡萄球菌细胞,导致细胞膜破损或死亡,紫苏抗菌剂对金黄色葡萄球菌的破坏或损伤效果随浓度的增加而变得更加显著。

参考文献

- 1 Ai ZX. Cultivation and application of perilla frutescens [J]. Forest Invest Des (林业勘查设计), 2013, 1: 89-91.
- 2 Zhong HJ. Knowledge and experience of perilla [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med (内蒙古中医药), 2014, (3): 86-87.
- 3 Yan PA, Peng C, Li YX, et al. Advances in antibacterial activity of patchouli [J]. West China J Pharm Sci (华西药学报), 2016, 31: 540-543.
- 4 Peng F, Bian J, Peng P, et al. Research progress of genus usnea [J]. Chem Ind Forest Prod (林产化学与工业), 2012, 32: 111-118.
- 5 Wang Y, Lu Z, Wu H, et al. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136(1): 71-74.
- 6 Sharma N, Tripathi A. Effects of citrus sinensis (L.) osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem [J]. Microbiol Res, 2008, 163: 337-344.
- 7 Tian J, Ban XQ, Zeng H, et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *aspergillus flavus* [J]. PLoS One, 2012, 7: e30147.
- 8 Paul S, Dubey RC, Maheswari DK, et al. Trachyspermum ammi (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens [J]. Food Control, 2011, 22: 725-731.
- 9 Wu T, Cheng D, He MY, et al. Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavonoid from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger* [J]. Food Control, 2014, 35: 354-359.
- 10 Wang YZ, Zeng XB, Zhou ZK, et al. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism [J]. Food Control, 2015, 55: 54-61.
- 8 Xie JP. Technical principles and application of tobacco flavor (烟草香料技术原理与应用技术手册) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.
- 9 Fan YH. Research progress on the product of vanillin by microbial transformation substrate from ferulic acid [J]. Cere Food Ind (粮食与食品工业), 2017, 24(6): 43-47.
- 10 Bao YF, Shen XC, Wang F. The research progress and development prospects of biosynthesis, structure activity relationship and biological activity of caffeic acid and its main types of derivatives [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1-15.
- 11 Zhang YJ, Jin WB. Tobacco flavors and fragrances [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1996.

(上接第9页)