

附件 2

项目编号	200107
项目类型	创新训练



惠州卫生职业技术学院
HUIZHOU HEALTH SCIENCES POLYTECHNIC

大学生创新创业训练计划 中期检查报告

课 题 名 称 植物源提取物的抑菌研究与产品开发

项 目 层 次 省级 校级

项 目 负 责 人 陈玉婧

负责人所在学院 药学与检验学院

联 系 电 话 13553608871

大学生创新创业中心制表

2021 年 03 月

项目组成员	姓名	学号	所在学院	联系电话	E-mail
	谢艳慧	19570133	药学与检验学院	13542874514	2321364581@qq.com
	梁嘉慧	19570156	药学与检验学院	18818689092	1569519112@qq.com
	姚彦羽	19570120	药学与检验学院	13660355222	1275743341@qq.com
	曾丽丹	19570232	药学与检验学院	15119174432	Zenglidan20031212@163.com
指导教师	姓名	职务/职称	所在单位	联系电话	E-mail
	蔡天舒	专业主任/讲师	惠州卫生职业技术学院	18503075676	caitianshu88@163.com
	陈嘉聪	质量管理助理/高级工程师	惠州市食品药品检验所	13719697696	675147325@qq.com
一、项目开展的情况					
<p>按照项目实施计划，完成前三个阶段的主要工作：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 筛选抑菌活性最佳的多酚植物提取物 <p>利用多种多酚类植物提取物开展单药对荧光假单胞菌的抗菌敏感性分析，如丁香酚、百里香酚、香芹酚、EGCG等，测定最小抑菌浓度。</p> 2. 抑菌效果评估——生长曲线和联合药敏试验 <p>利用筛选后的植物多酚提取物——香芹酚，对荧光假单胞菌进行生长曲线测定。同时，增加月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐(LAE)与香芹酚复配，建立香芹酚与LAE联用对荧光假单胞菌的最佳抑菌浓度模式(棋盘法)，增强其生物利用度、评估抑菌效果。</p> 3. 香芹酚和LAE联用对细菌菌体结构的影响 <p>利用蛋白质和核酸泄漏、透射电子显微镜观察和胞内蛋白质电泳的方法分析香芹酚和LAE联用对荧光假单胞菌的菌体结构影响，探索抑菌机制。</p> 					
二、已取得的阶段性成果					

1. 香芹酚和 LAE 对荧光假单胞菌的 MIC 测定

香芹酚对荧光假单胞菌的 MIC 为 0.5 mg/mL, LAE 对荧光假单胞菌的 MIC 为 64 μg/mL (表 1)。

表 1 香芹酚与 LAE 对荧光假单胞菌的抑制作用¹⁾

Table 1 Antibacterial effect of carvacrol and LAE against *P. fluorescens*¹⁾

抗菌物质 ²⁾	质量浓度 ³⁾			生长情况 ⁴⁾	抗菌物质 ²⁾	质量浓度 ³⁾			生长情况 ⁴⁾
	(mg/mL)	ΔOD _{600nm} ⁵⁾	ΔOD _{600nm} ⁵⁾			(μg/mL)	ΔOD _{600nm} ⁵⁾	ΔOD _{600nm} ⁵⁾	
香芹酚 ³⁾	8.000 ⁻¹⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾	LAE ³⁾	256.000 ⁻²⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		
	4.000 ⁻¹⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		128.000 ⁻²⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		
	2.000 ⁻¹⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		64.000 ⁻²⁾	0.001 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		
	1.000 ⁻¹⁾	0.000 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		32.000 ⁻²⁾	0.557 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾		
	0.500 ⁻¹⁾	0.002 ⁻¹⁾	- ⁴⁾		16.000 ⁻²⁾	0.687 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾		
	0.250 ⁻¹⁾	0.120 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾		8.000 ⁻²⁾	0.742 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾		
0.125 ⁻¹⁾	0.550 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾	4.000 ⁻²⁾	0.758 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾				
0.063 ⁻¹⁾	0.600 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾	2.000 ⁻²⁾	0.776 ⁻¹⁾	+ ⁴⁾				

注: 1) ΔOD_{600nm}-OD_{600nm}(t)-OD_{600nm}(t-1) -表示细菌无明显生长; +表示细菌明显生长。²⁾

2. 香芹酚和 LAE 对荧光假单胞菌的联合抑菌作用

根据“棋盘法”进行联合抑菌效果的研究, 找出最佳联合抑菌浓度。通过 FICI 公式计算, 1/2 MIC 香芹酚+1/16 MIC LAE 的 FICI 值为 0.56, 该组合具有相加作用, 表明香芹酚与 LAE 的联合应用可以有效降低独立作用剂量 (图 1)。

3. 香芹酚和 LAE 联用对荧光假单胞菌生长曲线的影响 (图 2)。

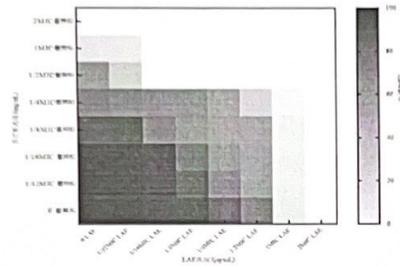


图 1 香芹酚和 LAE 对荧光假单胞菌的联合抑菌作用¹⁾

Fig. 1 Combined antimicrobial effect of carvacrol and LAE against *P. fluorescens*¹⁾

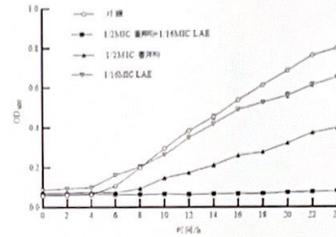
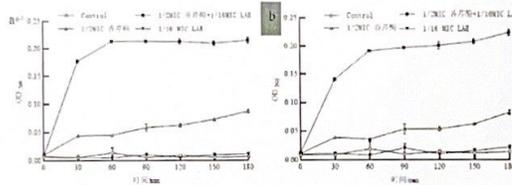


图 2 香芹酚和 LAE 联合对荧光假单胞菌生长曲线的影响¹⁾

Fig. 2 Effect of carvacrol and LAE on the growth of *P. fluorescens*¹⁾

4. 香芹酚和 LAE 联用对菌体蛋白质和核酸泄漏的影响 (图 3)。



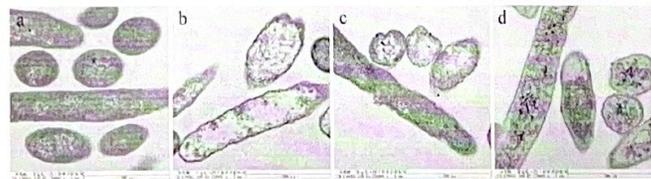
a. 蛋白质泄漏情况; b. 核酸泄漏情况¹⁾

图 3 香芹酚和 LAE 联用对荧光假单胞菌胞内蛋白质和核酸的泄漏的影响¹⁾

Fig. 3 Effect of combined treatment with carvacrol and LAE on release of intracellular protein and nucleic acid from *P. fluorescens*¹⁾

5. 透射电镜观察香芹酚和 LAE 联用对细菌形态的影响 (图 4)

香芹酚和 LAE 联用促进荧光假单胞菌的菌体结构破损, 导致细胞内容物泄漏, 从而抑制细菌生长。



a. 对照组 (3h); b. 1/2MIC 香芹酚+1/16MIC LAE (3h); c. 1/2MIC 香芹酚 (3h); d. 1/16MIC LAE (3h)。¹⁾

图 4 荧光假单胞菌的透射电镜图 (50000×)¹⁾

Fig. 4 Transmission electron micrographs of *P. fluorescens* (50000×)¹⁾

三、目前存在的主要困难及解决思路

由于香芹酚水溶性差，为了进一步增强香芹酚溶解性和抑菌效果，使用月桂酰精氨酸乙酯盐酸盐（LAE）作为复配剂。LAE 是一种阳离子型表面活性剂，水剪性强，对霉菌、酵母菌、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌等多种微生物表现出强烈的抗菌活性。研究证实，LAE 作为食品添加剂安全性较高，易在体内分解成月桂酸和 L-精氨酸等天然成分。2005 年，LAE 被 FDA 批准为 GRAS 类食品添加剂。因此，建立香芹酚与 LAE 联用对荧光假单胞菌的最佳抑菌浓度模式，增强香芹酚生物利用度，提升抑菌效果。

由于受疫情影响，实验进展稍有延迟，部分试验未按期完成，需在后期加快进度开展研究。

四、下一阶段主要任务与时间安排（不少于 200 字）

根据研究计划，接下来主要开展以下三方面的工作：

1. 研究多酚类植物提取物对细菌群体感应影响。
2. 根据全国大学生基础医学创新研究暨实验设计论坛竞赛要求，积极开展准备工作，阅读文献，完成实验设计和材料撰写。
3. 项目研究的数据汇总整理，参与文章撰写。
4. 以本项目研究基础，准备材料，积极申报 2023 年“攀登计划”专项资金。

五、有何体会或建议

从项目申请到开展过程中，学会查阅和阅读文献，提升了学习能力，拓宽了专业视野。同时，在老师的指导下，逐步开展实验，提升了实验操作技术，将课堂知识转化为专业实践。思考问题，通过文献阅读、团队小组讨论寻找突破点，增强了每个团队成员的逻辑思维能力和团队凝聚力，自身综合素质显著提升。希望能进一步开展项目的深入研究，学会数据整理，参与文章撰写工作。

六、经费使用情况		
序号	开支项目	开支金额（元）
1	实验耗材	2600.3
2	实验试剂	575
3	菌种购买	508
4		
5		
7		
合计		3683.3
七、下阶段费用预算安排		
序号	开支项目	开支金额（元）
1	实验耗材和试剂	1500
2		
3		
4		
5		
6		
7		
合计		1500
八、指导教师意见		
<p>团队成员遵循项目拟定的研究计划和方案，有计划、有步骤地开展研究工作进展较为顺利。项目经费使用合理。</p> <p style="text-align: right;">指导老师签字：蔡天舒 陈嘉聪 2021年5月6日</p>		

九、学院审核意见

同意

单位公章

学院负责人签字：

年

月

日



十、学校审核意见

课题已按原计划完成



2021年5月10日

注：支撑材料需提交附件，表格可加页。