

老蒜提取物石油醚部位对大肠杆菌的抑制作用研究

王小敏^{1,2}, 杨钰昆³, 张民²

(1. 山西中医药大学制药与食品工程学院, 山西晋中 030619)

(2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457) (3. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006)

摘要: 本文自制了两种老蒜提取物 (aged garlic extract, AGE) AGE-1 和 AGE-2, 用石油醚进行萃取后挥发溶剂得到 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位。采用微量肉汤稀释法测定了 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度, 发现 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度分别为 31 $\mu\text{g/mL}$ 和 62 $\mu\text{g/mL}$ 。通过大肠杆菌生长曲线、细胞内容物泄漏、培养液电导率的测定以及激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜观察等方法研究了 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位对大肠杆菌的抑菌机理, 发现 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位在其最低抑菌浓度下能够抑制大肠杆菌的生长发育, 导致细胞内电解质和大分子物质的泄漏, 并能对大肠杆菌细胞壁和细胞膜造成损伤, 改变细胞膜的通透性, 促使细胞凋亡或坏死, 从而使大肠杆菌细胞表面粗糙, 菌体之间互相黏连, 细胞形态发生变形和凹陷。

关键词: 老蒜提取物; 大肠杆菌; 抑菌机理; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2018)09-32-37

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.006

Inhibitory effect of Petroleum Ether Fractions of Aged Garlic Extract on *Escherichia coli*

WANG Xiao-min^{1,2}, YANG Yu-kun³, ZHANG Min²

(1. College of Pharmaceutical and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

(2. College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(3. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In this study, two kinds of Aged garlic extract (AGE-1 and AGE-2) were prepared and the two samples were extracted by petroleum ether to obtain the petroleum ether fractions of AGE-1 and AGE-2. The minimum inhibitory concentration (MIC) of AGE-1 and AGE-2 against *Escherichia coli* was determined by broth microdilution method. The MIC of AGE-1 and AGE-2 against *Escherichia coli* was 31 $\mu\text{g/mL}$ and 62 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antibacterial mechanism of AGE-1 and AGE-2 against *Escherichia coli* was studied by growth curves, leakage of cell contents, conductivity of culture medium, confocal and scanning electron microscope. Further research found that AGE-1 and AGE-2 inhibited the growth of *Escherichia coli*, damaged the cell wall and cell membrane, changed the permeability of cell membrane, which led to the leakage of electrolyte and macromolecules as well as cell apoptosis. The cell surface was rough and the cell was sticky and depressed.

Key words: aged garlic extract; *Escherichia coli*; antibacterial mechanism; apoptosis

大蒜作为传统的药食两用植物其抑菌活性已被广泛认可, 然而大蒜刺激性和难闻的气味限制了其消费和利用。将新鲜大蒜切片后浸泡于低浓度乙醇水溶液中, 于室温下避光保存 10 个月或者 20 个月, 过滤后得到的浸提液经减压低温浓缩即得到市售的老蒜提取

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 天津科学技术委员会项目 (14JCZDJC34800); 山西省应用基础研究项目 (201601D021116); 山西中医药大学博士科研启动基金 (2016BK11)

作者简介: 王小敏 (1989-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 食品营养与食品添加剂

通讯作者: 张民 (1972-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品化学与食品营养

物^[1]。老蒜提取物是一种特殊的大蒜产品, 具有安全、低刺激性的特点。老蒜提取物在其制备过程中, 生蒜中原有的不稳定的化合物, 通过酶催化或者自然反应产生了独特的对人体有益的有机硫化物以及生物碱, 且大蒜的刺激性和臭味也得到改善^[2]。

老蒜提取物对一些疾病如: 糖尿病、老年痴呆症、动脉粥样硬化、血管冠状钙化、内皮功能异常、抗癌药物引起的心脏毒性和细胞凋亡、心脏病、癌症、高血压、高血脂以及衰老^[3,4]的治疗或预防有积极地作用, 但关于老蒜提取物抑菌活性研究较少。有文献报道称 λ -谷氨酰半胱氨酸是大蒜中含硫化合物的前体物质, 经过水解氧化可以转化为蒜氨酸^[5]。在老蒜提取

物的制作过程中, 蒜氨酸逐渐损失形成硫代亚磺酸酯, 硫代亚磺酸酯不稳定逐渐转化为二烯丙基二硫化物、二烯丙基三硫化物等具有二硫键的化合物, 这些具有二硫键的化合物是大蒜中主要的抑菌活性物质^[6,7]。课题组前期已经对两种自制老蒜提取物的抑菌活性以及可能的抑菌活性成分做了研究分析, 发现老蒜提取物石油醚部位含有多种具有二硫键的化合物以及有机酸和酚类物质使其对多种细菌表现出了较强的抑菌活性^[8], 但两种自制老蒜提取物石油醚部位的抑菌机理尚不明确。

本实验以课题组自制的两种老蒜提取物为原料采用石油醚萃取, 萃取液挥干溶剂得到老蒜提取物石油醚部位, 以大肠杆菌为试验菌株, 通过激光共聚焦显微镜和扫描电镜观察、细胞内容物泄漏等实验, 研究老蒜提取物石油醚部位对大肠杆菌的抑制机理。

1 材料与方法

1.1 原料

按实验室前期获得的方法制备两种老蒜提取物样品, AGE-1: 将普通白皮大蒜切片后于室温下在 10% 乙醇水溶液中浸泡 90 d, 过滤得到浸提液, 浸提液 40 °C 旋转蒸发浓缩后即得; AGE-2: 将大蒜切片后于室温下在蒸馏水中浸泡 20 d, 过滤得到浸提液, 浸提液 40 °C 旋转蒸发浓缩后即得^[8]。取 AGE-1、AGE-2 加水溶解后分别采用石油醚 (60 °C~90 °C) 进行液液萃取, 萃取两次, 合并两次萃取液进行浓缩, 浓缩液在水浴锅上挥干残留溶剂, 得到 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位。AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位分别溶解于少量二甲基亚砜, 取试管加定量的蒸馏水, 在漩涡振荡器中一边震荡一边用移液器逐滴加入已经溶解于二甲基亚砜的样品, 配制成样品的分散液, 实验中根据需要以蒸馏水为溶剂将样品稀释成不同浓度的分散液。

供试菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, ATCC 25922), 由广东省微生物菌种保藏中心提供。

1.2 主要仪器设备

分析天平, JD1000-2, 沈阳龙腾电子有限公司; 酶标仪, Multiskan FC, 美国 Thermo 公司; 生化培养箱, SPX-250, 上海博迅实业公司医疗设备厂; 往复式双门双层恒温培养振荡器, SPF-1112, 上海世平实验设备有限公司; 高压灭菌锅, DY2009(X)-032-00, 上海博迅实业公司医疗设备厂; 分光光度计, TU-1810, 北京普析通用仪器有限责任公司; 电导率

仪, DDS-307, 北京华瑞博远科技发展有限公司; 激光共聚焦显微镜, C1 plus, 日本 Nikon 公司; 扫描电子显微镜, SU1510, 日本 Hitachi High 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 最低抑菌浓度的测定

采用微量肉汤稀释法测定石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度 (MIC)^[9]。分别取 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位配制成浓度为 20 mg/mL 的分散液, 采用倍比稀释法稀释为一系列浓度。取无菌 96 孔板, 第一行 1~10 孔加 10 μ L 系列浓度的样品, 第 11 和 12 孔不加样品作为生长对照, 1~12 孔加 100 μ L 的 10^5 CFU/mL 大肠杆菌菌悬液, 平行三行。第四行 1~10 孔加 100 μ L 肉汤培养液作为空白, 盖上 96 孔板盖, 将加样后的 96 孔板于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 24 h, 用酶标仪测定 600 nm 的 OD 值。以小孔内细菌生长被完全抑制的最低样品浓度为该样品的 MIC。

1.3.2 石油醚部位对大肠杆菌生长曲线的影响

大肠杆菌活化后, 接种于液体肉汤培养基, 置于 37 °C 培养箱中培养 12 h, 稀释为 10^5 CFU/mL 的菌悬液, 取 50 mL 稀释后的菌悬液与 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位分散液分别混合, 使 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位的终浓度分别为其最低抑菌浓度, 37 °C, 150 r/min 摇床培养, 另外以无菌水代替样品做空白对照。每培养两小时取样, 采用分光光度计在 600 nm 测菌液的 OD 值^[10]。

1.3.3 细胞内容物的泄漏

通过培养液中高分子物质的测定分析微生物细胞内容物的泄漏。取 50 mL 稀释为 10^5 CFU/mL 的菌悬液与 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位分散液分别混合, 使 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位的终浓度分别为其最低抑菌浓度, 37 °C, 150 r/min 摇床培养, 另外以无菌水代替样品做空白对照。培养 0、3、6、9、12、18、24、30、36、42、48 h 取样, 采用分光光度计在 260 nm 测定菌液的 OD 值, 该值可以代表细胞内 DNA/RNA 的泄漏程度由此反映出细胞膜的受损情况^[11]。

1.3.4 培养液电导率的测定

取 50 mL 稀释为 10^5 CFU/mL 的菌悬液与 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位分散液分别混合, 使 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位的终浓度分别为其最低抑菌浓度, 37 °C, 150 r/min 摇床培养, 另外以无菌水代替样品做空白对照。培养 0、2、4、6、8、10、12 h 取样, 测定培养液的电导率^[12]。

1.3.5 激光共聚焦显微镜研究石油醚部位对大肠杆菌的影响

为了研究两种自制老蒜提取物石油醚部位对大肠杆菌细胞通透性和细胞凋亡情况的影响,采用Hoechst33342和PI对大肠杆菌双染。取50 mL浓度为 10^5 CFU/mL的菌悬液加样品溶液,使AGE-1和AGE-2的石油醚部位的终浓度为其最低抑菌浓度,37℃培养24 h,另外以无菌水代替样品溶液作为对照组。取1 mL培养后的菌悬液加10 μ L浓度为0.5 mg/mL的Hoechst 33342(激发波长355 nm,发射波长465 nm),37℃染色10 min,5000 r/min,4℃离心5 min,弃上清后分散于1 mL缓冲溶液,加5 μ L浓度为1 mg/mL的PI染液避光染色10 min(激发波长540 nm,发射波长620 nm),缓冲溶液洗三次。滴加一滴处理好的大肠杆菌悬浮液到载玻片上,盖上盖玻片,然后利用激光共聚焦显微镜进行观察^[13]。

1.3.6 扫描电镜观察

为了研究AGE-1和AGE-2石油醚部位对大肠杆菌形态的影响,取50 mL浓度为 10^5 CFU/mL的大肠杆菌菌悬液分别与AGE-1和AGE-2的石油醚部位混合培养,使AGE-1和AGE-2的石油醚部位的浓度为其最低抑菌浓度,以无菌水代替样品作为对照组,37℃,150 r/min培养24 h后5000 r/min离心5 min,弃上清,菌体用2.5%的戊二醛固定24 h,5000 r/min离心5 min弃上清,超纯水清洗三次后菌体分散于超纯水中。取一滴菌悬液滴加到载玻片上冷冻干燥后喷金,扫描电子显微镜观察^[14]。

1.4 数据分析

所有试验重复三次,结果以平均值(mean) \pm 标准差(SD)表示,用Origin 8.0软件作图。

2 结果与讨论

2.1 最低抑菌浓度测定

采用微量肉汤稀释法测定了AGE-1和AGE-2石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度,结果发现AGE-1和AGE-2石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度分别为31 μ g/mL和62 μ g/mL。

2.2 对生长曲线的影响

为了研究石油醚部位对大肠杆菌生长曲线的影响,将AGE-1和AGE-2石油醚部位分别与大肠杆菌混合培养48 h,AGE-1和AGE-2石油醚部位对大肠杆菌生长曲线的影响见图1,实验中正常对照组很快进入对数生长期,12 h以后 OD_{600} 保持稳定。AGE-1和AGE-2石油醚部位处理组降低了大肠杆菌的

OD_{600} ,培养12 h后大肠杆菌的 OD_{600} 有一定程度的增加,但始终低于正常对照组,说明AGE-1和AGE-2石油醚部位在其最低抑菌浓度下抑制大肠杆菌的活性,培养12 h后大肠杆菌能够再次进行生长发育但生长速度受到限制,导致其 OD_{600} 始终低于正常对照组。

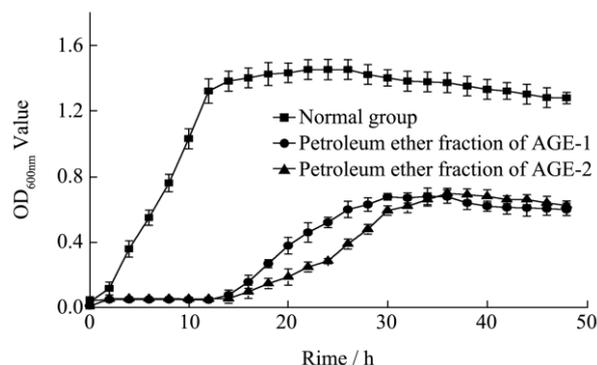


图1 石油醚部位对大肠杆菌的生长曲线的影响

Fig.1 Effects of petroleum ether fractions on the growth curve of *Escherichia coli*

2.3 细胞内容物的泄漏

将AGE-1和AGE-2石油醚部位在其最低抑菌浓度下分别与大肠杆菌混合培养48 h,采用分光光度计对培养液中核酸等大分子物质进行了检测,结果见图2,与正常对照组相比,AGE-1和AGE-2石油醚部位导致了培养液中核酸等大分子物质的增加,该结果表明AGE-1和AGE-2石油醚部位造成了大肠杆菌细胞壁和细胞膜的损伤而导致了细胞内容物的泄漏。

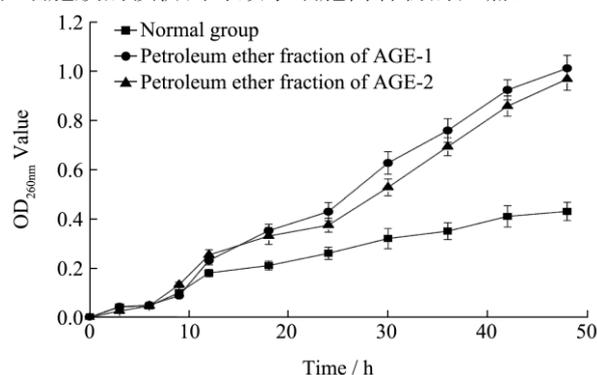


图2 石油醚部位对大肠杆菌大分子物质泄漏的影响

Fig.2 Effect of petroleum ether fractions on large molecules leakage of *Escherichia coli*

2.4 培养液中电导率的变化

细菌细胞膜遭到破坏后,细胞内的电解质大量渗漏到培养液中导致培养液电导率增加,电导率变化可以反映出细胞膜通透性的变化。

将AGE-1和AGE-2石油醚部位在其最低抑菌浓度下分别与大肠杆菌混合培养,每2 h测定培养液的

电导率, 结果见图 3, 由图可以发现正常对照组菌液的电导率一直处在比较低的水平, AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位处理组电导率明显高于正常对照组, 且 AGE-1 石油醚部位处理组的电导率大于 AGE-2 石油醚部位。

以上结果说明 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位在各自最低抑菌浓度时造成了细菌细胞膜的破坏, 导致细胞内电解质渗漏, 且 AGE-1 的石油醚部位对细胞膜的破坏作用大于 AGE-2 的石油醚部位。

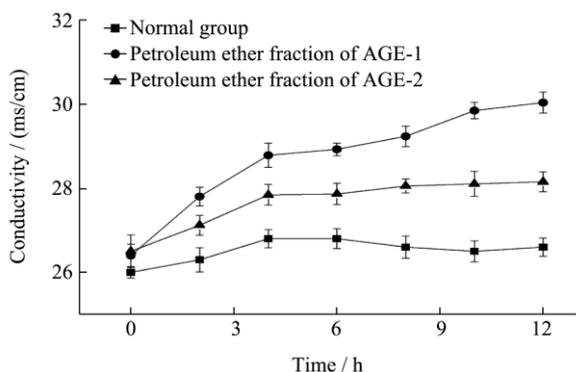


图 3 石油醚部位对大肠杆菌培养液电导率的影响

Fig.3 Effect of petroleum ether fractions on conductivity of *Escherichia coli* culture fluid

2.5 激光共聚焦显微镜研究石油醚部位对大肠杆菌细胞膜通透性的影响

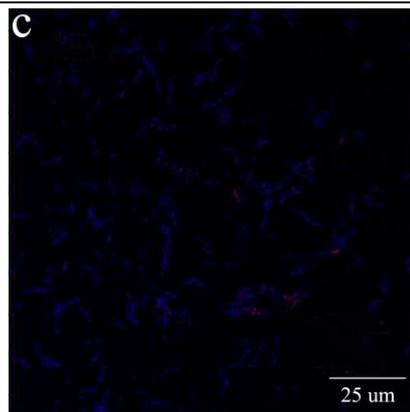
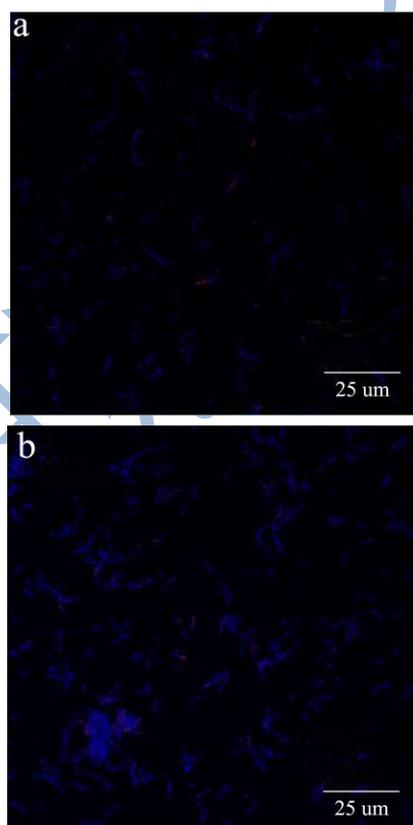


图 4 处理 24 h 后大肠杆菌激光共聚焦显微镜拍摄图

Fig.4 Laser scanning confocal microscope image of *Escherichia coli* after exposure for 24 h

注: (a) 对照组; (b) 31 µg/mL 的 AGE-1 石油醚部位处理 24 h; (c) 62 µg/mL 的 AGE-2 石油醚部位处理 24 h。

利用 PI 和 Hoechst33342 对大肠杆菌双染后用激光共聚焦显微镜观察, 结果见图 4。Hoechst33342 是细胞渗透性荧光染料, 可以对所有细胞的 DNA 进行染色, 且健康细胞染色后呈现微弱的蓝色荧光, 凋亡细胞呈现强烈的蓝色荧光^[15], PI 可以对坏死细胞的 DNA 和 RNA 进行染色并呈现红色荧光^[16]。图 4 (a) 中正常对照组多数细胞都呈微弱的蓝色荧光, 红色荧光细胞较少; 图 4 (b) 和 (c) 中 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位最低抑菌浓度下处理 24 h 后细胞蓝色荧光增强, 表明 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位可以促使大肠杆菌细胞发生凋亡; 红色荧光细胞数量增加, 表明 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位可以促使大肠杆菌细胞发生坏死; 与正常对照组相比 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位在其最低抑菌浓度下分别处理 24 h 能够促使大肠杆菌凋亡和坏死, 提高了大肠杆菌细胞膜的通透性使 Hoechst33342 的透过率增大, 且 AGE-1 的石油醚部位对大肠杆菌的作用大于 AGE-2 的石油醚部位。

2.6 扫描电子显微镜观察石油醚部位对大肠杆菌细胞膜的影响

采用了扫描电子显微镜观察石油醚部位对大肠杆菌表面形态的影响, 结果见图 5。图 5 (a) 中对照组大肠杆菌培养 24 h 后菌体表面光滑, 形态完整、饱满, 呈现典型的短杆状, 没有细胞膜破损及内容物的泄漏; 图 5 (b) 中 31 µg/mL 的 AGE-1 石油醚部位处理 24 h 后菌体发生变形、凹陷, 细胞表面粗糙, 菌体之间互相黏连, 甚至有菌体发生解体; 图 5 (c) 中 62 µg/mL 的 AGE-2 石油醚部位处理 24 h 后菌体也发生变形和凹陷, 细胞表面粗糙, 菌体之间互相黏连; AGE-2 石

油醚部位处理组细胞受损情况小于 AGE-1 石油醚部位处理组, 该结果与培养液中电导率测定、细胞内容物泄漏测定结果以及激光共聚焦显微镜观察结果一致。细胞膜遭到破坏导致细胞表面粗糙, 细胞内原生质泄漏导致菌体之间互相黏连, 并发生变形和凹陷。以上结果表明 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位对大肠杆菌具有损伤作用, 可以破坏细胞壁和细胞膜造成细胞原生质的泄漏。

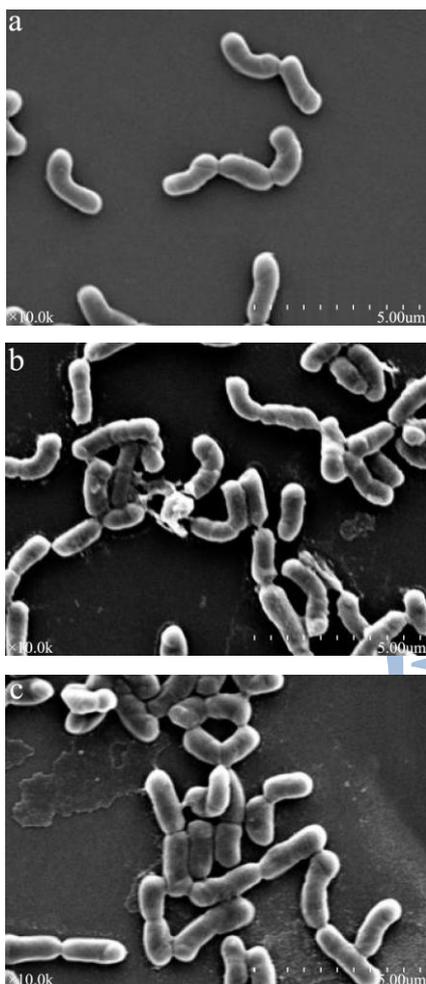


图5 处理 24 h 后大肠杆菌扫描电子显微镜图 ($\times 10000$)

Fig.5 SEM image of *Escherichia coli* after exposure for 24 h ($\times 10000$)

注: (a) 对照; (b) 31 $\mu\text{g/mL}$ 的 AGE-1 石油醚部位处理 24 h; (c) 62 $\mu\text{g/mL}$ 的 AGE-2 石油醚部位处理 24 h。

3 结论

3.1 本实验分析了 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位对大肠杆菌的最低抑菌浓度, 发现 AGE-1 和 AGE-2 石油醚部位对大肠杆菌最低抑菌浓度分别为 31 $\mu\text{g/mL}$ 和 62 $\mu\text{g/mL}$ 。AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位在其最低抑菌浓度下能够抑制大肠杆菌的生长发育, 导致细胞内电解质和大分子物质的泄漏, 并能对大肠杆菌细胞

壁和细胞膜造成损伤, 改变细胞膜的通透性, 促使细胞凋亡或坏死, 从而使大肠杆菌细胞表面粗糙, 菌体之间互相黏连, 细胞形态发生变形和凹陷。

3.2 课题组前期已经对两种自制老蒜提取物的抑菌活性以及可能的抑菌活性成分做了研究分析, 发现 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位含有多种具有二硫键的化合物如: 二甲基三硫、二烯丙基二硫醚、3-乙烯基-1,2-二硫杂环己-4-烯、3-乙烯基-1,2-二硫杂环己-5-烯^[8], 研究发现具有二硫键的化合物是大蒜中主要的抑菌活性物质^[6,7], 这些具有二硫键的化合物可以与具有巯基的氨基酸发生反应产生竞争性抑制作用, 阻碍含有巯基的氨基酸的正常利用, 通过抑制细胞中蛋白质的正常合成起到抑制细菌生长的作用; 具有二硫键的化合物还可以与不含巯基的氨基酸反应, 影响一些酶的活性和一些生物过程^[17], 使其表现出较强的抑菌活性。前期实验还发现 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位含有多种有机酸和酚类物质, 这些物质可以阻碍细胞膜、细胞壁的合成, 并阻碍微生物细胞能量代谢及发育^[18]。实验中生长曲线测定结果验证了 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位可以抑制大肠杆菌的生物合成, 培养液中核酸等大分子物质和电导率的测定结果, 以及激光共聚焦显微镜和扫描电镜观察证实了 AGE-1 和 AGE-2 的石油醚部位可以通过损伤大肠杆菌的细胞壁和细胞膜, 致使细胞凋亡和坏死达到其抑菌效果。

参考文献

- [1] Chandrashekar P M, Venkatesh Y P. Identification of the protein components displaying immunomodulatory activity in aged garlic extract [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 124(3): 384-390
- [2] Amagase H, Petesch B L, Matsuura H, et al. Intake of garlic and its bioactive components [J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131(3): 955S-962S
- [3] Xu C, Mathews A E, Rodrigues C, et al. Aged garlic extract supplementation modifies inflammation and immunity of adults with obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2018, 24: 148-155
- [4] Ushijima M, Takashima M, Kunimura K, et al. Effects of S-1-propenylcysteine, a sulfur compound in aged garlic extract, on blood pressure and peripheral circulation in spontaneously hypertensive rats [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2018, 70(4): 559-565
- [5] Iciek M, Kwiecień I, Włodek L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds [J].

- Environmental and Molecular Mutagenesis, 2009, 50(3):247-265
- [6] Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(9): 1948-1955
- [7] Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(4): 564-582
- [8] 王小敏,张民,杨钰昆.老蒜提取物萃取部位的抑菌活性及成分分析[J].现代食品科技,2015,31(1):65-70
WANG Xiao-min, ZHANG Min, YANG Yu-kun. Antimicrobial properties and components analysis of solvent extracts from aged garlic extract [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 65-70
- [9] Runti G, Pacor S, Colomban S, et al. Arabica coffee extract shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis* and low toxicity towards a human cell line [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1): 108-114
- [10] Filippini M, Ortellì C, Svercel M, et al. Interspecies variation in survival and growth of filamentous heterotrophic bacteria in response to UVC radiation [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2011, 103(3): 234-242
- [11] Paul S, Dubey R C, Maheswari D K, 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(5): 725-731
- [12] Nakayama M, Shigemune N, Tsugukuni T, et al. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Food Control, 2012, 25(1): 225-232
- [13] Pan X, Wang Y, Chen Z, et al. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂ [J]. ACS applied materials & interfaces, 2013, 5(3): 1137-1142
- [14] Yong A L, Ooh K F, Ong H C, et al. Investigation of antibacterial mechanism and identification of bacterial protein targets mediated by antibacterial medicinal plant extracts [J]. Food Chemistry, 2015, 186: 32-36
- [15] George S, Pokhrel S, Xia T, et al. Use of a rapid cytotoxicity screening approach to engineer a safer zinc oxide nanoparticle through iron doping [J]. ACS Nano, 2009, 4(1): 15-29
- [16] Hwang B K, Lee C H, Chang I S, et al. Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis [J]. Journal of Membrane Science, 2012, 419: 33-41
- [17] Waag T, Gelhaus C, Rath J, et al. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(18): 5541-5543
- [18] 马超,吴瑛.抗菌剂抗菌机理简述[J].中国酿造,2016,35(1): 5-9
MA Chao, WU Ying. Research on antimicrobial agents and their mechanism of actions [J]. China Brewing, 2016, 35(1): 5-9