

芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物的 抗菌抗氧化性能评价及应用

高亚惠, 吴夏冷, 杨丹敏, 刘 群*, 翁武银, 张玉苍*

(集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 363100)

摘要: 芽孢杆菌及其细胞外代谢物具有抗氧化、抗菌等性能, 已被用于护肤品中。通过盐酸沉淀法从芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵产物中提取出活性物质, 以自由基清除率为指标评价提取物的体外抗氧化活性, 通过牛津杯扩散实验评估提取物的抗菌能力, 通过急性皮肤刺激和人体涂抹实验检测了添加提取物面霜的生物安全性。结果表明, 该提取物对 2,2-联苯基-1-苦基肼基自由基和 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基具有一定的清除活性, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.732 和 0.267 g/L; 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用, 可使细菌形貌严重受损。在中国化妆品行业, 单一的尼泊金酯最高质量分数为 0.4%, 混合酯的最高质量分数为 0.8%, 当提取物质量浓度为 8 g/L (质量分数约为 0.8%) 时, 能有效抑制 6 种常见的致病菌生长, 具有替代市售防腐剂的可行性; 且所制备的面霜具有安全性、无皮肤刺激性。

关键词: 发酵提取物; 芽孢杆菌 ZYCHH-01; 抗氧化性; 抗菌性; 面霜; 生物工程

中图分类号: TQ658.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 11-2445-09

Evaluation of antibacterial and antioxidant properties of *Bacillus* ZYCHH-01 fermentation extract and its application on facial cream

GAO Yahui, WU Xialing, YANG Danmin, LIU Qun*, WENG Wuyin, ZHANG Yucang*

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 363100, Fujian, China)

Abstract: *Bacillus* and its extracellular metabolites have been used in skin care products due to their antioxidant and antibacterial properties. Herein, active substances from the fermentation product of *Bacillus* ZYCHH-01 were extracted by hydrochloric acid precipitation method, with their *in vitro* antioxidant activity evaluated using free radical scavenging rate as index, antibacterial performance assessed by Oxford cup diffusion test, and the biosafety of the extract-added cream examined by acute skin irritation and human application tests. The results showed that the extract exhibited certain scavenging activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) free radicals with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.732 and 0.267 g/L, respectively. Meanwhile, the extract inhibited the growth of both gram-positive and negative bacteria and severely destroyed the bacterial morphology. In the Chinese cosmetic industry, the maximum amount (mass fraction) of single nipagin ester and mixed ester used was 0.4% and 0.8%, respectively. The extract obtained with a mass concentration of 8 g/L (mass fraction about 0.8%) could effectively inhibit the growth of six common pathogenic bacteria, indicating their strong potential to replace commercially available preservatives. The facial cream added with the extract displayed biosafety and no skin irritation.

Key words: fermented extract; *Bacillus* ZYCHH-01; anti-oxidation; antimicrobial properties; facial cream; biological engineering

收稿日期: 2023-02-09; 定用日期: 2023-05-09; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230081

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21978059); 福建省科技计划高校产学研合作项目 (2021N5013); 科技部重点研发计划项目 (2021YFD210020202/2021YFD210020404)

作者简介: 高亚惠 (1996—), 女, 硕士生, E-mail: 202011710035@jmu.edu.cn. 联系人: 刘 群 (1990—), 女, 讲师, E-mail: qunliu@jmu.edu.cn; 张玉苍 (1964—), 男, 教授, E-mail: yczhang@jmu.edu.cn.

在化妆品中添加防腐剂是为了在生产、包装、储存,尤其是使用过程中,抑制微生物繁殖,防止产品变质或产生毒素^[1]。市场上大多数化妆品中使用的防腐剂主要是苯氧乙醇、羟基苯甲酸酯类、苯甲酸及其盐类和酯类等^[2-3]。尽管在化妆品中防腐剂添加的浓度很低,但研究表明,化妆品中的这些防腐剂可能会对人类健康造成风险,如皮肤刺激、炎症反应和过敏性反应等^[4-5]。因此,很多合成防腐剂已被禁止在化妆品中大量使用。人们对具有抗菌活性但不含合成防腐剂的天然化合物的需求日益增多^[6-7]。

微生物发酵的化学副产物因其有益的生理作用受到人们的广泛关注^[8-9]。研究表明,使用发酵产物对多种皮肤状况显示出积极作用^[10],如特应性皮炎、痤疮、烧伤和疤痕^[11]。帖航等^[12]发现,表皮葡萄球菌发酵提取物对皮肤的屏障具有修复作用,能有效地提高受损屏障中丝聚蛋白和兜甲蛋白含量。KIM等^[13]将卷曲乳酸杆菌 MGB0015 提取物配制成水包油型乳液,在储存期间可抑制致病菌生长。据 MAJEED 等^[14]报道,微生物产生的乳酸菌素具有抗菌作用,在临床研究中已对其抗痤疮的功效进行评估,并成功注册化妆品条例。芽孢杆菌是一类好氧或兼性厌氧菌,能产生多种抗菌物质和抗氧化物质,包括细菌素^[15]、超氧化物、羟基自由基、多肽类以及抗菌蛋白类等,具有广泛的应用价值^[16]。

虽然已有研究表明,微生物发酵提取物对人体皮肤有积极作用,但芽孢杆菌属发酵液提取物在化妆品中的应用研究较少,特别是人体皮肤的实际应用仍处于起步阶段。本研究从芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液中提取出活性物质,探究该提取物对多种致病菌的抗菌作用及抗氧化能力,以探索芽孢杆菌发酵提取物在化妆品领域的应用。测试了添加提取物面霜抑制微生物繁殖能力及与人体皮肤的相容性和安全性,为芽孢杆菌发酵产物在化妆品中应用提供理论依据,为开发与制备芽孢杆菌发酵成分相关的化妆品原料提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

芽孢杆菌 ZYCHH-01 为本实验室发现的菌种(经 16S rRNA 基因序列测定为芽孢杆菌,已保存在中国微生物保藏中心,保藏号为 CGMCC No. 26758);大肠埃希氏菌(*E. coli*) ATCC25922、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) CMCC(B)26003、单核增生李斯特菌(*L. monocytogenes*) ATCC14028、福氏志贺氏菌(*Shigella*) CMCC(B)51572、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) ATCC9027 和鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*) ATCC19430 为指示菌株,上海鲁维科

技术有限公司,其中 *Shigella*、*S. typhimurium* 用牛肉膏蛋白胨培养基培养,*E. coli*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*P. aeruginosa* 用 Luria-Bertani 肉汤(LB)培养基培养;牛肉浸膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、酵母提取物、胰蛋白胨,生化试剂,上海生工生物科技有限公司;牛肉膏蛋白胨培养基成分(均为质量分数):牛肉浸膏 0.3%,蛋白胨 1%,氯化钠 0.5%,琼脂 1.5%(仅固体培养基添加),pH 7.0~7.2;LB 培养基成分(均为质量分数):酵母提取物 0.5%,胰蛋白胨 1%,氯化钠 1%,琼脂 1.5%(仅固体培养基添加),pH 7.0~7.2。

2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH,质量分数为 96%)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS,质量分数为 98%)、3-氧代-2-苯基-4,4,5,5-四甲基咪唑啉-1-氧(PTIO,质量分数为 98%)、角鲨烷(质量分数为 98%)、异十六烷(质量分数为 98%)、1,2-戊二醇(质量分数为 98%)、PEG-26 甘油醚(质量分数为 98%)、甘油(质量分数为 99%)、1,3-丁二醇(质量分数为 99%)、聚乙二醇-32(质量分数为 99%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;PEG-10/15 交联聚合物/聚二甲基硅氧烷(质量分数为 99%),上海轻工业研究所有限公司;聚二甲基硅氧烷、聚二甲基硅油、聚甲基硅倍半氧烷(质量分数为 99%),黄山市强力化工有限公司;二硬脂基二甲基胺铝蒙脱石(Bentone 38CG,密度 1.7 g/cm³,常温活化,水分含量 < 3%),德谦(上海)化学有限公司;双-PEG-18 甲基醚二甲基硅烷(DC2501,质量分数 99%),道康宁(美国)有机硅有限公司;玫瑰精油(货号 TC2018),江西泰诚天然香料有限公司;PEG-10 聚二甲基硅氧烷,黏度 900~2300 mPa·s(25 °C),武汉欣欣佳丽生物科技有限公司;过氧化氢(质量分数为 50%)、无水乙醇(质量分数为 95%),西陇化工股份有限公司;氮苄青霉素(质量分数为 98%),武汉科斯坦生物科技有限公司;苯氧乙醇(质量分数为 99%),山东优索化工科技有限公司;戊二醛(质量分数为 50%),上海麦克林生化科技有限公司;硫酸亚铁(质量分数为 95%)、维生素 C(Vc,质量分数为 99%),上海生工生物科技股份有限公司;去离子水,杭州哇哈哈集团有限公司;甲醇(质量分数为 99.8%),赛默飞世尔科技公司;氦气(质量分数为 99.999%),法国液化空气集团。

SPL-80 型生化培养箱,天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;FE28-Standard 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UPR-11-10TN 型优普系列超纯水机,四川优普超纯科技有限公司;FDU-1200 型冷冻干燥机,上海爱朗仪器有限公司;Phenom ProX G6 型扫描电子显微镜,美国 Thermo

公司; UH5300 型紫外-可见分光光度计, 日本日立有限公司; SDC-100 型接触角测定仪, 东莞市晟鼎精密仪器有限公司; IMJ-78A 型高压灭菌锅, 施都凯仪器设备(上海)有限公司; J-2.5FS 型均质机, 广州聚能纳米生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物的制备

参照韩旭东等^[17]的提取方法, 以最大抑菌圈为最佳提取工艺。首先, 将芽孢杆菌 ZYCHH-01 按接种量(体积分数)0.1%接种至 10 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 37 °C、150 r/min 条件下培养 24 h; 其次, 将菌液按接种量(体积分数)3%接种至 200 mL 新鲜牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 36 °C、190 r/min 条件下培养 27.5 h; 最后, 将发酵液在 4 °C、10000 r/min 下离心 30 min。取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 2.0, 放入 4 °C 冰箱, 沉淀 12 h, 在 8000 r/min、4 °C 下离心处理 10 min。收集沉淀, 在-40 °C 下冷冻干燥 3 d, 得到约 0.24 g 冻干的芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物(简称冻干提取物)。

使用时, 将冻干提取物用 10 mL 生理盐水复溶^[18], 超声(300 W, 超声 15 min)分散均匀后, 经 0.22 μm 水系混合纤维素(MCE)微孔滤膜过滤得到提取液, 通过干燥法^[19]计算其固含量为 0.58%。

1.2.2 提取物的 GC-MS 分析

为初步探究冻干提取物中的组分, 将得到的冻干提取物用 10 mL 甲醇溶解后进行 GC-MS 分析。GC-MS 检测条件如下: 色谱柱为 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 升温程序为柱温 40 °C 保持 2 min, 以 10 °C/min 升至 300 °C; 载气为氦气, 柱流速为 1 mL/min, 进样温度为 250 °C, 进样方式不分流进样; MS 测试时, 离子源为 EI 源, 接口温度为 280 °C, 离子源温度为 220 °C, 扫描范围为 45~500 m/z。

1.2.3 提取物的抑菌活性测试

采用牛津杯扩散法^[20]进行提取物的抑菌活性测定。将指示菌株(*E. coli*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*Shigella*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium*) 在 150 r/min、37 °C 条件下培养 24 h, 用生理盐水稀释至菌浓度约为 1×10^8 CFU/mL。取 100 μL 稀释后的指示菌液均匀涂布于固体培养基中, 然后将灭菌的牛津杯(内径 6 mm, 外径 8 mm)置于固体培养基中, 并在牛津杯中加入 100 μL 提取液, 4 °C 静置 4 h 后, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 测量并记录抑菌圈直径的大小^[21]。以质量浓度为 1 g/L 的氨苄青霉素(A⁺)为阳性对照品, 生理盐水为阴性对照品。

1.2.4 提取物最低抑菌浓度(MIC)的测定

参照张勇等^[22]的方法, 具体步骤为: 首先, 将

指示细菌培养液在 3000 r/min 下离心 10 min 后, 倒出上清液, 用无菌水反复洗涤、涡旋并离心 3 次, 用无菌水稀释制成菌浓度为 1×10^8 CFU/mL 的细菌分散液, 待用; 其次, 用生理盐水配制质量浓度分别为 0.25、0.50、1、2、4、8、16 g/L 的冻干提取物溶液和苯氧乙醇溶液, 并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。最后, 取 100 μL 样品溶液至 96 孔板中, 再分别加入 100 μL 细菌分散液至每个孔中, 在 600 nm 下测定溶液的吸光值(OD₆₀₀); 将微孔板在 37 °C 下培养 24 h, 再次进行 OD₆₀₀ 测试, 以细菌分散液为阳性对照品, 生理盐水为阴性对照品; 以完全抑制细菌生长的最低提取物质量浓度记为 MIC, 实验重复测定 3 次取平均值。

1.2.5 提取物对致病菌菌体形态的测定

将 10 μL 指示菌株移至 10 mL 液体培养基中培养 12 h 后, 在指示菌液中加入 1 mL 提取液, 继续培养 15 h 后, 于 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 加入 20 mL 质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液, 在 4 °C 下固定 12 h, 然后在 4 °C、5000 r/min 条件下离心 10 min, 除去戊二醛溶液, 用 10 mL 去离子水洗涤沉淀物 3 次, 依次加入 8 mL 不同体积分数的乙醇水溶液(分别为 30%、50%、80%、95%、100%)将细菌脱水后, 在-40 °C 下冷冻干燥 2 d, 喷涂金层 100 s, 用扫描电子显微镜(SEM)进行形貌观察^[23]。

1.2.6 提取物的体外抗氧化活性测定

(1) DPPH 自由基清除能力测定

采用吴颖等^[24]的方法稍作修改。首先配制待测溶液, 将冻干提取物加入生理盐水中超声(300 W 超声 15 min)分散均匀后过 0.22 μm 微孔滤膜, 得到质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 的溶液; 然后, 配制浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液。在测定管中加入 2 mL 待测溶液和 2 mL DPPH-乙醇溶液, 在对照管中加入 2 mL 待测溶液和 2 mL 无水乙醇, 在空白管中加入 2 mL DPPH-乙醇溶液和 2 mL 无水乙醇, 摇匀后在室温下避光静置 30 min, 于 517 nm 处测定溶液的吸光度, 测定时用无水乙醇进行调零。以 Vc 为对照测定 DPPH 自由基清除率。DPPH 自由基清除率按式(1)计算:

$$\text{自由基清除率}/\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

式中: A₁ 为测定管中溶液的吸光度; A₂ 为对照管中溶液的吸光度; A₀ 为空白管中溶液的吸光度。

(2) ABTS 自由基清除能力的测定

首先, 按上述方法配制质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 的待测溶液; 然后, 配制 7 mmol/L 的 ABTS 和 4.9 mmol/L 过硫酸钾溶液, 将两者按体积比 1:1 进行混合, 避光反应 16 h, 作为自由基供体, 使用前用体积分数为 50% 乙醇稀释,

使其在 734 nm 波长处的吸光度为 0.75 ± 0.02 , 得到 ABTS 溶液。在测定管中加入 2 mL 待测溶液和 2 mL ABTS 溶液, 在对照管中加入 2 mL 待测溶液和 2 mL 的体积分数为 50%乙醇, 在空白管中加入 2 mL ABTS 溶液和 2 mL 的体积分数为 50%乙醇。混匀后室温放置 30 min, 在 734 nm 波长处测定溶液的吸光度。以 Vc 为对照测定 ABTS 自由基清除率。ABTS 自由基清除率按式 (1) 进行计算。

(3) 羟自由基清除能力测定

根据文献[25]的方法稍作修改。首先按上述方法配制质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50 g/L 的待测溶液。在测定管中加入 1 mL FeSO_4 (9 mmol/L) 溶液、1 mL 水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L)、1 mL 待测溶液, 最后加入 1 mL H_2O_2 ; 在对照管中用蒸馏水代替 H_2O_2 , 其他条件相同; 在空白管中用蒸馏水代替待测溶液, 其他条件相同。混匀后, 于 37 °C 水浴 30 min, 在 510 nm 处测定溶液的吸光度。以 Vc 为对照测定羟自由基清除率。羟自由基清除率按式 (1) 进行计算。

(4) PTIO 自由基清除能力测定

首先按上述方法配制质量浓度分别为 5、10、20、30、40、50 g/L 的待测溶液。在测定管中加入 0.2 mL 待测溶液、1.8 mL PTIO (1 mmol/L) 溶液, 充分摇匀后, 置于黑暗条件下反应 2 h, 于 555 nm 处测定溶液吸光度, PTIO 溶液作为空白对照。与 Vc 的 PTIO 自由基清除能力进行比较。PTIO 自由基清除率按式 (2) 计算:

$$\text{PTIO清除率} / \% = [1 - (D_0 - D) / D_0] \times 100 \quad (2)$$

式中: D_0 为 PTIO 溶液的吸光度; D 为待测溶液吸光度。

1.2.7 提取物在面霜中的应用

面霜的基础配方如表 1 所示。首先, 将 A 相组分混合后加热至 75 °C, 搅拌成均相, 恒温维持 25 min; 然后, 将 B 相组分中冻干提取物超声 (300 W 超声 15 min) 分散于水中后, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 再将其他组分溶于水中加热至 75 °C, 搅拌成均相, 恒温维持 25 min; 最后, 将 B 相缓慢地加入到 A 相中, 利用均质机于 800 r/min 乳化 30 min, 制成 30 g W/O 乳膏^[26]。停止乳化后, 加入 1 滴玫瑰精油, 于 300 r/min 搅拌 10 min。以不加提取物作为空白对照组, 将所制成的面霜进行相关性能检测。

1.2.8 面霜性能测定

面霜的性状评价参考行业标准 QB/T 1857—2013^[27]: 观察面霜膏体是否细腻, 香气是否正常, 有刺激性气味, 测定面霜 pH 是否符合规定范围 4.0~8.5。面霜离心稳定性测定: 通过对面霜进行离心实验验证面霜的稳定性^[28], 取 1.3 g 面霜于离心管

中, 在 25 °C、5000 r/min 下离心 10 min, 若离心后油水不分离则说明面霜的稳定性好。面霜热稳定性测定: 将 5 mL 面霜放入玻璃瓶中, 将玻璃瓶依次置于 4、25、40、25 °C 下各 6 h, 观察面霜性状。面霜皮肤相容性测定: 通过皮肤斑贴实验进行评估^[28], 评测人员由 5 名志愿者 (3 女和 2 男) 组成, 先将手臂内侧清洗、擦干, 将少量的面霜涂抹在手臂清洗部位, 贴上纱布, 外盖一层保鲜膜, 用绷带固定, 如果在 24 h 内不出现刺激、发红和发痒的迹象, 则认为该面霜皮肤相容性好。面霜润湿性测定: 用接触角测定仪测量面霜的润湿性, 将面霜均匀涂抹在玻璃板表面, 用微量注射器在涂抹表面滴落 15 μL 纯水, 用接触角测定仪测定纯水在样品板的接触角, 每个样品在不同的点测定 3 次, 取平均值^[29]。

表 1 面霜的基础配方

Table 1 Base formulation of creams

相别	组分	质量分数/%
A 相	角鲨烷	6
	PEG-10/15 交联聚合物/聚二甲基硅氧烷	6
	聚二甲基硅油	6
	聚甲基硅倍半氧烷	6
	双-PEG-18 甲基醚二甲基硅烷	6
	异十六烷	6
	PEG-10 聚二甲基硅氧烷	8
	冻干提取物或苯氧乙醇	0.5
	二硬脂基二甲基胺锂蒙脱石	1
	PEG-26 甘油醚	5
B 相	1,3-丁二醇	5
	甘油	10
	1,2-戊二醇	2
	聚乙二醇-32	5
	超纯水	27.5

注: 不添加提取物或苯氧乙醇时, 水质量分数为 28%。

1.2.9 面霜的抑菌能力测定

以 *E. coli* 为指示菌, 评估分别添加提取物和市售防腐剂苯氧乙醇面霜的抑菌效果。首先, 按照表 1 制备 3 份面霜, 其中 1 份不含提取物和防腐剂, 1 份含质量分数 0.5%提取物, 1 份含质量分数 0.5%苯氧乙醇。将 *E. coli* 均匀涂布于 LB 固体培养基中, 用无菌注射器吸取 0.5 mL 面霜, 轻轻放入培养基上, 于 37 °C 下培养 12 h, 观察并测量抑菌圈直径。以不加提取物和防腐剂的面霜为对照组, 评估面霜的抑菌效果^[30]。

1.2.10 急性皮肤刺激实验

根据 AMER 等^[31]的方法并稍作修改进行急性皮肤刺激实验。具体步骤为:

(1) 动物脱毛

实验动物应在饲养条件下检疫和适应环境至少 5 d。实验过程中严格遵守《实验动物管理条例》和《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)^[32]中的要求, 符合动物实验伦理要求。实验开始前 24 h, 对小鼠背部脊柱两侧进行脱毛, 注意不得损伤皮肤, 脱毛范围每块约为 3 cm×3 cm, 选择健康无损的皮区进行实验。

(2) 染毒方法

取 0.5 mL 添加提取物的面霜到 2.5 cm×2.5 cm 纱布贴片作为处理贴片, 而另一贴片用 0.5 mL 蒸馏水作为对照贴片, 将两个贴片轻轻贴到每只小鼠选定的脱毛皮肤部位, 用无刺激性胶布和绷带进行固定, 用弹力布包裹小鼠的整个躯干 4 h 以防贴片脱位。在去除贴片后 72 h 观察皮肤情况, 并记录反应过程中损伤和其他毒性作用^[33]。

2 结果与讨论

2.1 提取物的成分分析

用 GC-MS 对提取物的成分进行分析, 共检测出 60 余种生物活性化合物, 用峰面积归一化法计算主要化合物的相对含量, 结果见表 2。提取物主要成分为亚油酸、*N*-棕榈酸、亚麻酰氯、环丙辛酸、硬脂酸、芥酸酰胺、环二肽、油酸酰胺。其中, 亚油酸含量最高, 占提取物总质量的 29.07%; 其次为 *N*-棕榈酸、亚麻酰氯、环丙辛酸和环二肽, 分别占提取物总质量的 6.31%、4.21%、3.78%和 3.71%。这些主要化合物中含有不饱和键、酸类、肽类等, 具有抗菌、抗氧化、抗炎特性, 因此, 需进一步对提取物的抗菌抗氧化活性进行研究。

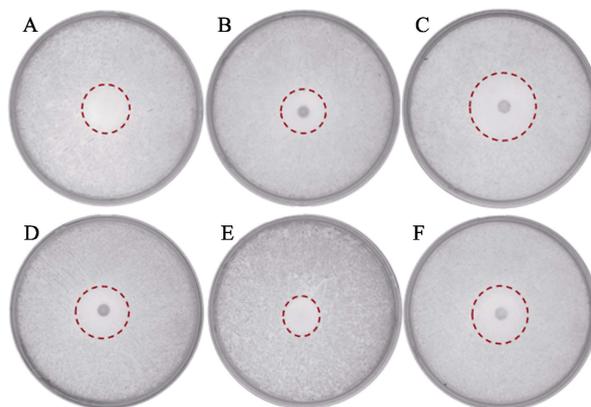
表 2 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物 GC-MS 分析
Table 2 GC-MS analysis of *Bacillus* ZYCHH-01 fermentation broth extract

序号	保留时间/min	分子式	相对含量/%	检出化合物
1	22.147	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	29.07	亚油酸
2	20.321	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6.31	<i>N</i> -棕榈酸
3	25.061	C ₁₈ H ₃₁ ClO	4.21	亚麻酰氯
4	24.103	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	3.78	环丙辛酸
5	22.328	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	3.02	硬脂酸
6	27.509	C ₂₂ H ₄₃ NO	2.70	芥酸酰胺
7	20.179	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂	2.54	环(亮氨酸-亮氨酸)二肽
8	22.514	C ₁₈ H ₃₅ NO	2.27	油酸酰胺
9	18.111	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	1.17	环(脯氨酸-甘氨酸)二肽

注: 通过峰面积归一化法计算各成分的相对含量。

2.2 提取物的抑菌活性分析

为了验证该提取物抗菌活性, 对 6 种生活中常见的致病菌(*E. coli*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、*Shigella*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium*) 进行抗菌活性测试, 并测量抑菌圈直径, 结果如图 1 和表 3 所示。



A~F 分别对应 *E. coli*、*S. aureus*、*Shigella*、*L. monocytogenes*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium*

图 1 提取物对指示菌的抗菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of extract on indicator bacteria

表 3 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物对指示细菌的抗菌活性

Table 3 Antibacterial activity of *Bacillus* ZYCHH-01 fermentation broth extract against indicator bacteria

指示菌	抑菌圈直径/mm		
	提取物	A ⁺	生理盐水
<i>E. coli</i>	20.85±0.23	18.84±0.39	0
<i>S. aureus</i>	18.64±0.23	9.11±0.07	0
<i>Shigella</i>	27.34±0.19	19.85±0.37	0
<i>L. monocytogenes</i>	21.17±0.19	11.44±0.51	0
<i>P. aeruginosa</i>	17.24±0.35	11.86±0.39	0
<i>S. typhimurium</i>	22.21±0.58	27.31±1.38	0

提取物对 6 种指示菌均有不同程度的抑制作用。抑菌圈直径 < 10 mm 为具有弱抗菌活性; 抑菌圈直径在 10~16 mm 为具有中等抗菌活性; 抑菌圈直径 > 16 mm 为具有强抗菌活性^[34]。由图 1 可见, 6 种指示菌的培养基都有抑菌圈出现, 且抑菌圈明显, 说明该提取物对 6 种指示菌株都表现出显著的抑制作用。从表 3 可以看出, 该提取物对 *Shigella* 抑菌效果最好, 抑菌圈直径为 (27.34±0.19) mm, 对 *S. typhimurium* 和 *L. monocytogenes* 的抑菌效果次之, 抑菌圈直径为 (22.21±0.58) mm 和 (21.17±0.19) mm, 对 *P. aeruginosa* 抗菌潜力最弱, 但仍保持较高的抑菌活性, 抑菌圈直径为 (17.24±0.35) mm。其中, 该提取物对 *E. coli*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*、

Shigella、*P. aeruginosa* 的抗菌效果均比质量浓度 1 g/L 的氨苄青霉素 (A⁺) 好。抗菌实验表明, ZYCHH-01 芽孢杆菌发酵液提取物具有广谱抗菌活性, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有抗菌作用, 且抗菌效果好, 在抗菌原料方面有着潜在的应用价值。

2.3 提取物对指示菌的最低抑菌浓度

通过测定该提取物的最低抑菌浓度, 明确其对相关致病细菌的抑菌能力, 结果如表 4 所示。该提取物对 *Shigella* 和 *S. typhimurium* 的抑制作用最强, 其次为 *E. coli*、*L. monocytogenes*, 其对 *S. aureus* 和 *P. aeruginosa* 的抑制作用较弱, 且该提取物对致病细菌的抑制作用与浓度呈正相关, 即浓度越大, 抑制性越强, 抑制效果越明显, 这与抑菌圈直径结果一致。提取物的抗菌活性与其活性成分有关, 结合提取物的成分分析, 可以初步推断出提取物的主要抑菌活性成分有环丙辛酸、环二肽等。

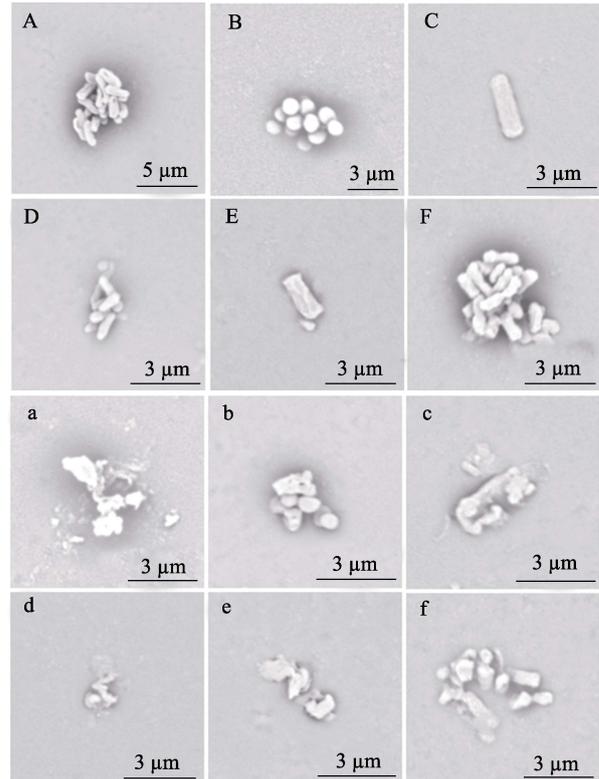
表 4 样品的 MIC
Table 4 MIC of sample

供试菌种	MIC/(g/L)	
	提取物	苯氧乙醇
<i>E. coli</i>	4	4
<i>S. aureus</i>	8	2
<i>Shigella</i>	2	4
<i>L. monocytogenes</i>	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	8	1
<i>S. typhimurium</i>	2	2

苯氧乙醇作为化妆品常用防腐剂之一, 添加至化妆品中, 对化妆品稳定性无影响, 是一种高效的抗菌剂。芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物的最低抑菌浓度大多比苯氧乙醇高, 而对 *Shigella* 的最低抑菌浓度则低于苯氧乙醇, 说明在实际应用中该提取物作为防腐剂使用时添加量要略高些, 但苯氧乙醇在化妆品中添加量受限制, 其最高质量分数为 1%^[35], 因此, 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物具有作为天然防腐剂的可行性。目前, 化妆品中常用防腐剂是尼泊金酯, 中国化妆品中单一的尼泊金酯最高质量分数为 0.4%, 混合酯的最高质量分数为 0.8%。由表 4 可见, 当芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物质量浓度为 8 g/L (质量分数约为 0.8%) 时, 能有效地抑制 6 种指示菌的生长, 说明其具有替代化学防腐剂的潜能。

2.4 提取物对致病菌菌体形态的影响

为了更好地了解提取物的抗菌作用, 用 SEM 观察致病菌菌体形貌, 进一步研究其对细菌细胞表面的影响, 结果如图 2 所示。



A~F 分别为 *E. coli*、*S. aureus*、*Shigella*、*L. monocytogenes*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium*; a~f 分别为加入提取物后 *E. coli*、*S. aureus*、*Shigella*、*L. monocytogenes*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium*

图 2 加入提取物前后指示菌株的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of indicator strains before and after addition of extract

可以看出, 6 种指示菌株在添加提取物处理后的形态发生了变化。*E. coli* 未经处理的细菌细胞呈现完美的棒状, 在细胞表面没有观察到损伤, 而用该提取物处理后的细菌细胞有不规则碎片形成, 并且细胞没有保留太多的棒状; 未经处理的 *S. aureus* 细胞呈葡萄状, 细胞表面完整, 未观察到损伤, 而用芽孢杆菌 ZYCHH-1 提取物处理后, 细菌细胞没有保留葡萄状特征, 细胞出现损伤, 破碎较多; *L. monocytogenes* 未经处理的细菌细胞呈棒状, 细胞表面平滑, 而用提取物处理的样品中, 细菌细胞表面不平整, 有不均匀的碎片产生。*Shigella*、*P. aeruginosa*、*S. typhimurium* 也出现相同的情况。

SEM 结果表明, 所选 6 种指示菌用芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物处理后, 细菌形貌均严重受损, 细菌细胞膜受到了显著影响, 该结果与 XU 等^[36]从 *Bacillus siamensis* JFL15 发酵液提取的抑菌物质对 *Gloeosporioides* 的作用现象一致。这些损伤性变化的出现可能是由于, 该提取物引起了细胞膜组分的溶解以及转变, 导致细菌细胞出现形态学上的变化, 从而容易导致细胞内容物的泄露、受损, 发生代谢紊乱和死亡^[37]。形貌观察结果进一步说明,

该提取物具有较好的抗菌活性且抗菌谱广, 其抗菌机制可能是通过诱导细菌膜破坏, 从而杀死细菌。

2.5 提取物的抗氧化活性分析

为研究芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物的抗氧化活性, 利用 4 种不同的体外模型更系统、更全面地评价了该提取物的抗氧化能力, 结果如图 3 所示。可以看出, 提取物对 DPPH 自由基、ABTS 自由基具有更好的清除活性。当提取物质量浓度为 1.5 g/L 时, ABTS 自由基清除率接近 100%; 当提取物质量浓度为 2.0 g/L 时, DPPH 自由基清除率达到 90% 以上; 随着提取物质量浓度从 0.1 g/L 增加到 2.5 g/L, DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率显著增加, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.732 和 0.267 g/L, 但其抗氧化能力弱于 V_c , V_c 溶液对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的 IC_{50} 为 0.021 和 0.022 g/L。该提取物对羟自由基、PTIO 自由基抗氧化效果次之, 当提取物质量浓度为 30 g/L 时, PTIO 自由基清除率约为 94%, 羟自由基清除率约为 63%, 随着提取物质量浓度的增加, 羟自由基和 PTIO 自由基清除率增加, 其 IC_{50} 值分别为 7.872 和 5.943 g/L, V_c 溶液对羟自由基和 PTIO 自由基的 IC_{50} 为 0.405 和 0.290 g/L。从抗氧化数据可以看出, 虽然芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物对自由基的清除效果不如 V_c , 但均表现出随着提取液质量浓度的增加, 自由基清除活性随之增强的趋势, 因此, 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物有一定的抗氧化活性, 具有应用于化妆品的潜力^[38]。

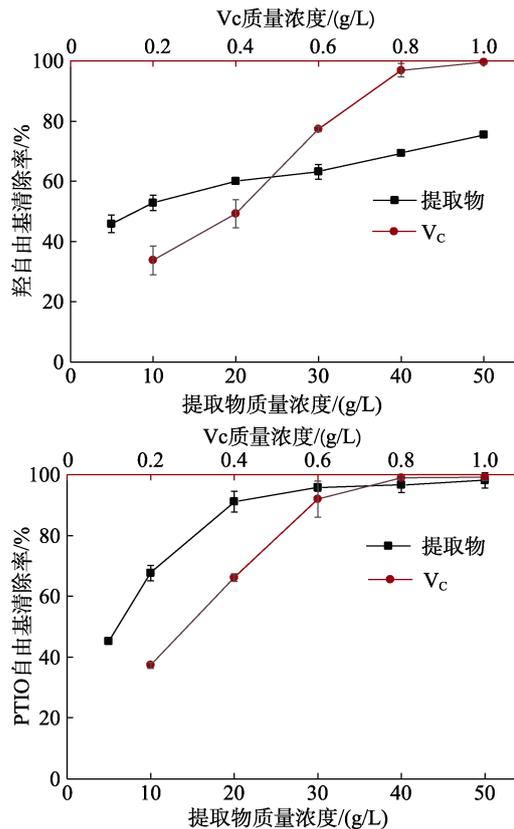
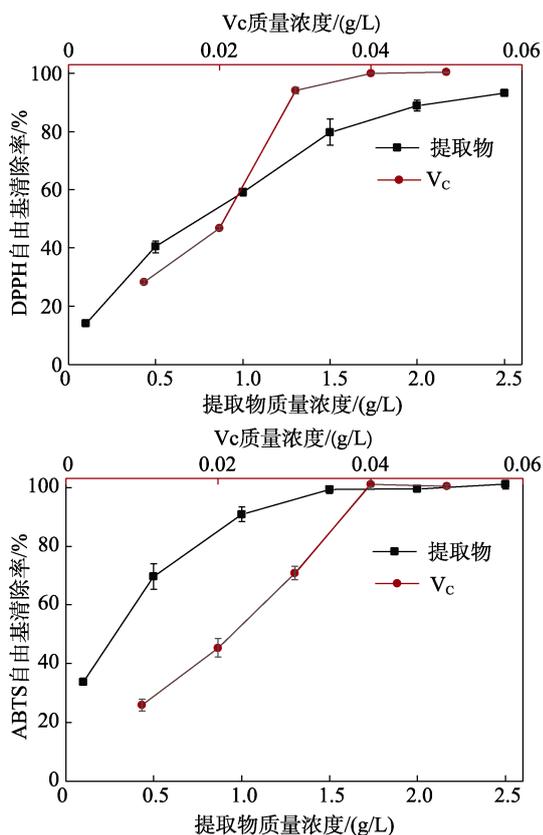


图 3 提取物的自由基清除率
Fig. 3 Free radical scavenging rates of extract

2.6 面霜的制备与性能分析

根据配方配制的面霜样品性状如图 4A 所示。该面霜呈现膏霜状态、质地均一, 无刺激性气味, 并且面霜在静置 30 d 后仍未出现油水分层或固液分离现象, 表明面霜体系稳定。健康皮肤的 pH 为 4.5~6.5, 不添加提取物面霜 pH 为 5.05, 添加提取物的面霜 pH 为 5.23, 因此, 该面霜符合人体皮肤适用的 pH 范围。

如图 4B 和 C 所示, 对面霜进行离心、冷热循环之后, 面霜并没有出现油水分层情况, 表明该提取物能较好地分散在面霜体系中, 且含有提取物的面霜体系具有良好的稳定性。如图 4D 所示, 涂抹面霜 24 h 后没有出现任何类型的不良反应, 因此, 可以确认所制面霜与皮肤相容较好, 具有安全性。

通过对面霜进行静态水接触角测量, 研究了添加与不添加芽孢杆菌 ZYCHH-01 提取物对面霜润湿性的影响。如图 4E 所示, 不添加提取物所制面霜水接触角为 103.67°, 而添加提取物所制面霜水接触角为 107.58°, 说明添加提取物对面霜的亲水性和疏水性无明显影响, 且面霜的水接触角 > 90°, 说明面霜涂层具有一定的疏水性, 能够阻止水分挥发, 有利于保持皮肤表面水分。

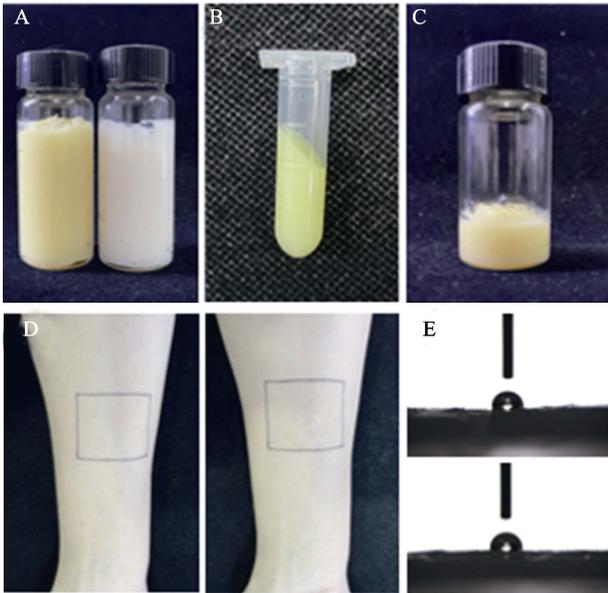


图 4 面霜性能图:添加提取物(左)和不添加提取物(右)面霜(A);离心后面霜(B);冷热循环后面霜(C);涂抹面霜前(左)、后(右)照片(D);添加提取物(上)和不添加提取物(下)面霜水接触角(E)

Fig. 4 Cream performance images: Cream with added extract (left) and without added extract (right) (A); Frost behind centrifugal (B); Frost behind hot and cold cycle (C); Photos before (left) and after (right) application of cream (D); Contact angle of cream water with added extracts (top) and without added extracts (bottom) (E)

2.7 面霜抗菌能力分析

如图 5 所示,不添加防腐剂和提取物的面霜没有出现抑菌圈,说明该面霜没有抗菌效果;添加提取物面霜出现抑菌圈,抑菌圈直径为 16.56 mm;添加苯氧乙醇面霜也出现抑菌圈,抑菌圈直径为 16.84 mm。结果表明,该提取物有抑菌活性,加入面霜后仍具有抗微生物的能力,因此,该提取物可作为防腐剂用于化妆品中,具有代替化妆品中防腐剂的潜能,保护面霜免受微生物污染。

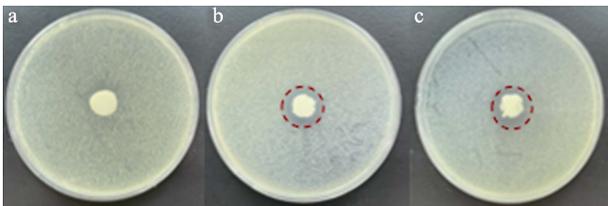


图 5 空白组面霜(a)、加入提取物面霜(b)和加入苯氧乙醇面霜(c)的抗菌效果图

Fig. 5 Graphs of antibacterial effects of blank group of cream (a), cream with extract (b) and cream with phenoxyethanol (c)

2.8 急性皮肤刺激效果分析

为评估面霜的安全性,对其进行 72 h 急性皮肤

刺激测试,结果如图 6 所示。受试的 2 只小鼠在观察时间内,未在受试区中发现红斑、水肿现象。添加提取物的面霜未引起小鼠不良反应,说明该面霜作用温和,具有皮肤安全性。因此,本研究制备的面霜对皮肤无刺激性。

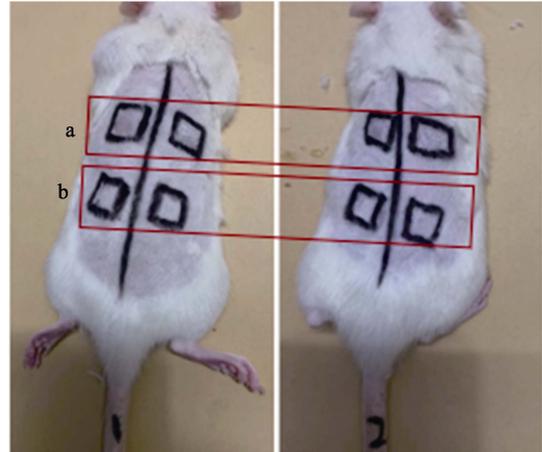


图 6 小鼠背侧皮肤涂抹面霜(a)或蒸馏水(b)的照片

Fig. 6 Photographs of mice with dorsal skin coated with cream (a) or distilled water (b)

3 结论

(1) 抑菌实验和 SEM 测试结果表明,芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物具有较好的抗菌能力,对 *Shigella* 抑菌直径为(27.34±0.19) mm,对 *S. typhimurium* 抑菌圈直径为(22.21±0.58) mm,对 *L. monocytogenes* 抑菌圈直径为(21.17±0.19) mm,可能是该提取物诱导致病菌细菌膜破坏,从而杀死细菌。此外,最低抑菌浓度实验表明,当提取物质量浓度为 8 g/L 时,能有效地抑制 6 种指示菌的生长,因此,该提取物能在较低浓度下起到抗菌作用,作为天然抗菌剂在化妆品领域有良好的应用前景。

(2) 芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物对自由基清除实验结果表明,该提取物具有一定的抗氧化效果,其对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基具有较好的清除活性,其 IC₅₀ 分别为 0.732 和 0.267 g/L;对羟基自由基、PTIO 自由基清除效果次之,IC₅₀ 分别为 7.872 和 5.943 g/L,且随着提取物质量浓度的增加,自由基清除率增加。

(3) 添加提取物面霜经过离心、冷热循环后没有出现水油分离现象,结果表明,该提取物能较好地融入整个面霜体系,且稳定性好。对人体皮肤和小鼠表层皮肤进行面霜涂抹实验,结果表明,添加提取物的面霜未引起皮肤刺激反应,因此,芽孢杆菌 ZYCHH-01 发酵液提取物在护肤品方面具有潜在应用价值。

参考文献:

- [1] ZHOU L M (周龙梅). Study on the antibacterial properties of *Lactobacillus rhamnosus* fermented extract in skin care emulsions[J]. Detergent & Cosmetics (日用化学品科学), 2019, 42(1): 31-34.
- [2] HAN D (韩迪). Application of *Lactobacillus rhamnosus* ferment extract in skin care products[J]. Biological Chemical Engineering (生物化工), 2018, 4(2): 26-29.
- [3] LI K L (李凯利), HE Y B (何一波), ZHU Y (祝愿), et al. Commonly used preservatives for cosmetics and development trends[J]. China Cleaning Industry (中国洗涤用品工业), 2022, (7): 82-88.
- [4] GIGLIOBIANCO M R, CORTESE M, NANNINI S, et al. Chemical, antioxidant, and antimicrobial properties of the peel and male flower by-products of four varieties of *Punica granatum* L. cultivated in the Marche region for their use in cosmetic products[J]. Antioxidants, 2022, 11(4): 768.
- [5] MELO R S, REIS S A G B, GUIMARAES A L, et al. Phytocosmetic emulsion containing extract of *Morus nigra* L. (*Moraceae*): Development, stability study, antioxidant and antibacterial activities [J]. Cosmetics, 2022, 9(2): 39.
- [6] LEAL C, GOUVINHAS I, SANTOS R A, et al. Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 154: 112675.
- [7] AGUILAR-TOALA J E, HEMANDEZ-MENDOZA A, GONZALEZ-CORDOVA A F, et al. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products[J]. Peptides, 2019, 122: 170170.
- [8] LEE N K, KIM W S, PAIK H D. *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(5): 1297-1305.
- [9] MAJEED M, MAJEED S, NAGABHUSHANAM K, et al. Skin protective activity of LactoSpurin-The extracellular metabolite from *Bacillus coagulans* MTCC 5856[J]. Cosmetics, 2020, 7(4): 76.
- [10] YAN Y Q (闫雅倩), ZHANG Y Z (张玉芝), FU H (付豪), et al. Cosmetic efficacy evaluation of daily fermentation broth[J/OL]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(5): 1073-1081.
- [11] ELSHAGHABEE F M F, ROKANA N, GULHANE R D, et al. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1490.
- [12] TIE H (帖航), LYU Y F (吕瑜峰), ZHANG Y (张阳), et al. Effect of *Staphylococcus epidermidis* fermented extract on human skin barrier[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2022, 52(4): 383-389.
- [13] KIM H T, LEE J, JO Y J, et al. Application of liposome encapsulating lactobacillus curvatus extract in cosmetic emulsion lotion[J]. Materials, 2021, 14(24): 7571.
- [14] MAJEED M, MAJEED S, NAGABHUSHANAM K, et al. Novel topical application of a postbiotic, lactosporin[®], in mild to moderate acne: A randomized, comparative clinical study to evaluate its efficacy, tolerability and safety[J]. Cosmetics, 2020, 7(3): 70.
- [15] GANESAN N G, RANGARAJAN V. A kinetics study on surfactin production from *Bacillus subtilis* MTCC 2415 for application in green cosmetics[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 33: 102001.
- [16] LU B (淦波), KORRES. Skin care into the "micro-ecological" era: Probiotics, prebiotics become the hot new focus of skin care[J]. China Cosmetics Review (中国化妆品), 2022, (3): 51-55.
- [17] HAN X D (韩旭东), ZHANG Y C (张玉苍), LI R S (李瑞松), et al. Fermentation optimization and antibacterial substances of *Bacillus* sp. ZYCHH-01[J]. China Brewing (中国酿造), 2020, 39(2): 38-43.
- [18] VAIRAGKAR U, MIRZA Y. Antagonistic activity of antimicrobial metabolites produced from seaweed-associated *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 10456 against *Malassezia spp*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(4): 1228-1237.
- [19] ZHU H Q (朱红琴), CAO H (曹环), YU L (余磊), et al. Coerlation analysis of brix value and solid content, extraction rate of reconstituted tobacco material extract[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学), 2020, 48(7): 207-209, 218.
- [20] LIU D C (柳成东), XIAO M X (肖明霞), LI Q H (李琦华), et al. Study on the antibacterial performance of probiotic *Bacillus coagulans* for feeding[J]. Chinese Journal of Animal Science (中国畜牧杂志), 2021, 57(10): 236-241.
- [21] LEE S, LEE J, JIN Y I, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 79: 518-524.
- [22] ZHANG Y (张勇), JIN Y X (金雨馨), LIN Z X (刘贞鑫), et al. Extraction process, chemical composition and antimicrobial properties of volatile oil from *Lagerstroemia indica* fruit[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(8): 1641-1647.
- [23] LU C H (卢彩会), ZHAO M M (赵明明), MOU D H (牟德华). Antimicrobial activity and bacteriostatic mechanism of turmeric oil[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2018, 39(21): 108-113.
- [24] WU Y (吴颖), LIU Q (刘晴), TANG W (唐文), et al. Application of complexes of *Salvia miltiorrhiza* volatile oil and dandelion extract in cosmetics[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(3): 562-568.
- [25] DE ALBUQUERQUE N L L, JACOB I T T, DA SILVA A R, et al. Photoprotective, biological activities and chemical composition of the non-toxic hydroalcoholic extract of *Clarisia racemosa* with cosmetic and pharmaceutical applications[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 180: 114762.
- [26] SOLEIMANI S, YOUSEFZADI M, NEZHAD S B M, et al. Evaluation of fractions extracted from *Polycladia myrica*: Biological activities, UVR protective effect, and stability of cream formulation based on it[J]. Journal of Applied Phycology, 2022, 34(3): 1763-1777.
- [27] National Technical Committee for Standardization of Fragrance and Flavor Cosmetics. Skin care cream/润肤膏霜: GB/T 1857—2013[S]. Beijing: China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 2014.
- [28] FERREIRA S M, SANTOS L. A potential valorization strategy of wine industry by-products and their application in cosmetics-case study: Grape pomace and grapeseed[J]. Molecules, 2022, 27(3): 969.
- [29] HE Y J (何怡静), XU H J (许虎君). Preparation of pickering emulsion stabilized by lauroyl lysine[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2021, 51(5): 413-420.
- [30] VASYLIEV G, LYUDMYLA K, HLADUN K, et al. Valorization of tomato pomace: Extraction of value-added components by deep eutectic solvents and their application in the formulation of cosmetic emulsions[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022, 12: S95-S111.
- [31] AMER R I, EZZAT S M, ABOREHAB N M, et al. Downregulation of MMP1 expression mediates the anti-aging activity of *Citrus sinensis* peel extract nanoformulation in UV induced photoaging in mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 138: 111537.
- [32] National Laboratory Animal Standardization Technical Committee. Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare (实验动物 福利伦理审查指南): GB/T 35892—2018[S]. Beijing: China National Standardization Administration Press (国家标准化管理委员会出版社), 2018: 9-11.
- [33] QU Z C (区梓聪). Study on safety evaluation of *Polygonatum odoratum* and its application in anti-aging cosmetics[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University (广东药科大学), 2017.
- [34] GUL Z, AKBAR A, LEGHARI S K. Elucidating therapeutic and biological potential of *Berberis baluchistanica* Ahrendt bark, leaf, and root extracts[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 823673.
- [35] LIANG C Y (梁辰宇). Cosmetic preservatives and their development[J]. Technology Innovation and Application (科技创新与应用), 2015, (22): 10-11.
- [36] XU B H, LU Y Q, YE Z W, et al. Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15[J]. PLoS One, 2018, 13(8): 0202893.
- [37] ZHANG M L (张美龄), LIANG R (梁蓉), CAO G Q (曹光群), et al. Extraction for antibacterial active ingredient of *Phryma leptostachya* L. and its mechanism for bacteria inhibition[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics (日用化学工业), 2017, 47(6): 326-330, 335.
- [38] SALEM Y, RAJHA H N, FRANJIEH D, et al. Stability and antioxidant activity of hydro-glyceric extracts obtained from different grape seed varieties incorporated in cosmetic creams[J]. Antioxidants, 2022, 11(7): 1348.