



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109221174 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 05

(21) 申请号 201811152236.1

A01P 1/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.09.29

A01P 3/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109221174 A

(56) 对比文件

CN 107439617 A, 2017.12.08

CN 106566443 A, 2017.04.19

(43) 申请公布日 2019.01.18

CN 108314959 A, 2018.07.24

CN 107468549 A, 2017.12.15

(73) 专利权人 广东省微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)

姜萍 等. 苦楝提取物的提取及其抑菌活性的研究.《林产化学与工业》.2004,第24卷(第4期),第27页3.1和3.2节.

地址 510070 广东省广州市越秀区先烈中路100号大院56号

衣秀娟. 川楝素的稳定性及其抑菌效果研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2010,(第5期),第39页第2-3段.

(72) 发明人 彭红 周刚 王颖思 谢小保  
陆舜盈 施庆珊

彭红 等. 苦楝素联合BIT对白色念珠菌的协同抑菌效果研究.《工业微生物》.2019,第49卷(第5期),第24-28页.

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 胡素丽 刘明星

审查员 杨冰清

(51) Int. Cl.

A01N 43/80 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物

(57) 摘要

本发明公开了一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物。所述的协同抑制细菌及真菌生长的组合物包括1,2-苯并异噻唑啉-3-酮和苦楝素。通过本发明的试验研究表明,将1,2-苯并异噻唑啉-3-酮与苦楝素复配,对细菌和真菌的生长有抑制作用,且这种抑制作用比单独使用任何一种组分都具有更好的效果,在一定范围内具有明显的抑菌增效作用,能够很好的提高药效,降低1,2-苯并异噻唑啉-3-酮的使用量,有利于人体健康和保护环境。本发明配方简单,配制容易,效果显著,应用范围和前景广阔。

1. 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物,其特征在于,包括1,2-苯并异噻唑啉-3-酮和苦楝素,所述的1,2-苯并异噻唑啉-3-酮的浓度为0.1~0.2mM,所述的苦楝素的浓度为2~8mM;所述的细菌为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099,所述的真菌为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404。

2. 权利要求1所述的组合物在制备抑制细菌或真菌生长的药物中的应用;所述的细菌为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099,所述的真菌为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404。

## 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物

### 技术领域：

[0001] 本发明属于化学和微生物领域，具体涉及一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

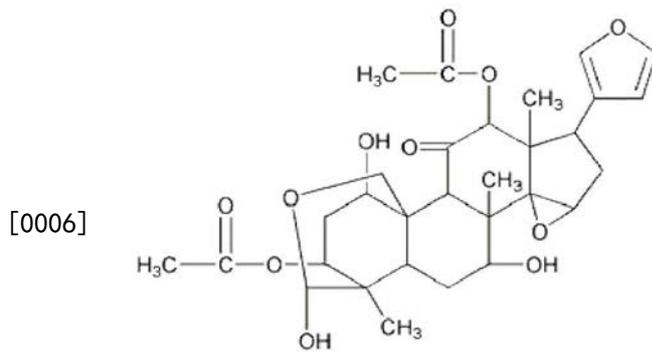
### 背景技术：

[0002] 多种高效化学杀菌剂如季铵盐类、尼泊金酯(对羟基苯甲酸酯类)、甲基异噻唑啉酮及其氯代物凯松(卡松)等，对于抑制微生物的生长有很好的作用，特别是异噻唑啉酮类杀菌剂，已被广泛添加于化妆品、洗涤用品、个人护理产品等领域，取得了较好的抑菌和杀菌效果。

[0003] 美国人Goerdeler和Mittle在1963年发表了异噻唑啉酮类杀菌剂的制备方法，并由美国罗门哈斯公司在1972年开发研制，2015年以后才首次引入中国并推广应用。常见的异噻唑啉酮类杀菌剂有：1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)、2-n-辛基-4-异噻唑啉-3-酮(OIT)、2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(MIT)、5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(CMIT)。异噻唑啉酮类杀菌剂是一种杂环结构的化学合成产物，依靠杂环上的活性部分破坏微生物细胞内的DNA分子，从而抑制或者杀死微生物。异噻唑啉酮类杀菌剂，在水处理、化妆品、造纸、轻纺、水性涂料等领域广泛应用。它们的作用特点是抗菌能力强、应用剂量小、相容性好、毒性低等优点，并且它对多种细菌、真菌都具有很强的抗菌作用；具有高效性、广谱、低毒、配伍性好、较宽的pH适用范围、能够自然生物降解等优点。

[0004] 但由于上述化学杀菌剂的过于广泛应用甚至滥用，导致致病菌的耐药性正日益成为人类面临的普遍问题，目前多重抗药性菌株进化，增加“超级细菌”无法用可用药物治疗的概率。而随着真菌或细菌引起的皮肤病害日趋严重并可能危及人体生命安全，呼吁人类限制大规模使用化学杀菌剂，积极开发新产品和寻找新的治疗方法，以减少或替代化学杀菌剂在日化产品的使用。因此，创新方法，研发新产品抑制细菌或真菌感染迫在眉睫，一些天生带有杀菌能力的特殊植物被人们所关注，从植物中寻找天然的杀菌剂进行复配增效已成为潜在趋势。

[0005] 在从天然植物中寻找具有杀菌杀虫活性物质的研究中，美国、印度等国家对于印楝做了大量而深入的研究，已发现全世界约1600种以上植物具有优异的杀菌杀虫活性，其中研究最多的是楝科植物，主要是苦楝、川楝和印楝。川楝是我国四川一带常见的绿化植物，具有滞尘、抑菌、杀菌作用。我国学者从上世纪50年代起开始了关于苦楝(包括川楝)的化学成分、药理、杀菌杀虫作用等方面的研究。苦楝素(Toosendanin)是从苦楝的树皮、果实中提取出来的呋喃三萜类化合物，由C、H、O组成，分子量为574，分子式为： $C_{30}H_{38}O_{11}$ ，结构如式(I)所示。



式 (I)

[0007] 苦楝素作为天然杀菌剂、杀虫剂,对真菌、农业害虫具有很高的活性,同时,苦楝素作为一种植物性杀菌剂,在自然环境下易分解,对人、畜安全无害。

#### 发明内容:

[0008] 本发明的目的是提供一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物。本发明通过1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(BIT)与天然植物杀菌剂的复配得到新的复配物,该复配物具有提高抑制细菌及真菌生长的效果,从而减少BIT的使用量。

[0009] 本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物,包括1,2-苯并异噻唑啉-3-酮和苦楝素。

[0010] 所述的1,2-苯并异噻唑啉-3-酮和苦楝素的物质的量的比优选为1:20~40。

[0011] 所述的1,2-苯并异噻唑啉-3-酮的浓度优选为0.1~0.2mM,所述的苦楝素的浓度优选为2~8mM。

[0012] 所述的协同抑制细菌及真菌生长的组合物中的细菌优选为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)埃希氏菌属(Escherichia)的细菌,真菌优选为半知菌纲(Sphaeropsidales)曲霉属(Aspergillus)的真菌。

[0013] 所述的细菌优选为大肠埃希氏菌(Escherichia coli) 8099,所述的真菌优选为黑曲霉(Aspergillus niger) ATCC 16404。

[0014] 本发明还提供了上述组合物在制备抑制细菌或真菌生长的药物中的应用。

[0015] 优选,所述的细菌为埃希氏菌属(Escherichia)的细菌,真菌为曲霉属(Aspergillus)的真菌。

[0016] 所述的细菌为大肠埃希氏菌(Escherichia coli) 8099,所述的真菌为黑曲霉(Aspergillus niger) ATCC 16404。

[0017] 通过本发明的试验研究表明,将1,2-苯并异噻唑啉-3-酮与苦楝素复配,对细菌和真菌的生长有抑制作用,且这种抑制作用比单独使用任何一种组分都具有更好的效果,在一定范围内具有明显的抑菌增效作用,能够很好的提高药效,降低1,2-苯并异噻唑啉-3-酮的使用量,有利于人体健康和保护环境。

[0018] 本发明配方简单,配制容易,效果显著,应用范围和前景广阔。

**具体实施方式：**

[0019] 以下实施例是对本发明的进一步说明，而不是对本发明的限制。

**[0020] 测试方法范例**

[0021] 以下实施例中的测试菌株为大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099时，测试方法为：用该实施例中普通NA斜面培养基（每升含有蛋白胨10g，酵母粉5g，NaCl 10g，琼脂粉20g，pH 7.0）将测试菌株于37℃恒温培养箱中培养24h。然后用无菌水把菌洗下，稀释到 $OD_{600}=1.0$ 配制成菌悬液工作液。在已灭菌的直径为90mm平板中倾注20mL左右NA培养基，水平静置凝固，接种0.1mL菌悬液工作液，涂布均匀后备用。用已灭菌的打孔器在上述试验平板上打孔，孔的直径为5.0mm，向孔中注入50 $\mu$ L的待测样品，在37℃培养24h，测定抑菌环的大小。

[0022] 以下实施例中的测试菌株为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404时，测试方法为：用该实施例中PDA（马铃薯葡萄糖琼脂）斜面培养基将测试菌株于30℃恒温培养箱中培养72h。然后用无菌水把菌洗下，稀释到 $OD_{600}=1.0$ 配制成菌悬液工作液。在已灭菌的直径为90mm平板中倾注20mL左右PDA培养基，水平静置凝固，接种0.1mL菌悬液工作液，涂布均匀后备用。用已灭菌的打孔器在上述试验平板上打孔，孔的直径为5.0mm，向孔中注入50 $\mu$ L的待测样品，在30℃培养72h，测定抑菌环的大小。

**[0023] 实施例1：**

[0024] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物，包括0.1mM的BIT和2mM的苦楝素。制备方法：向去离子水中加入BIT和苦楝素，使BIT的终浓度为0.1mM，苦楝素的终浓度为2mM，混合均匀，得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0025] 用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099作为测试菌株，按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试，测定的0.2mM的BIT溶液（0.2mM的BIT溶液的制备方法：向去离子水中加入BIT，使其终浓度为0.2mM，混匀后得到0.2mM的BIT溶液）对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为：7.3mm；测定的4mM的苦楝素溶液（4mM的苦楝素溶液的制备方法：向去离子水中加入苦楝素，使其终浓度为4mM，混匀后得到4mM的苦楝素溶液）对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为：5.8mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为：8.5mm。

[0026] 由此可见，使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099，与单独使用0.2mM的BIT溶液或者4mM的苦楝素溶液相比，抑制效果更好。

**[0027] 实施例2：**

[0028] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物，包括0.15mM的BIT和4mM的苦楝素。制备方法：向去离子水中加入BIT和苦楝素，使BIT的终浓度为0.15mM，苦楝素的终浓度为4mM，混合均匀，得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0029] 用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099作为测试菌株，按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试，测定的0.3mM的BIT溶液（0.3mM的BIT溶液的制备方法：向去离子水中加入BIT，使其终浓度为0.3mM，混匀后即得0.3mM的BIT溶液）对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为：8.5mm；测定的8mM的苦楝素溶液（8mM的苦楝素

溶液的制备方法:向去离子水中加入苦楝素,使其终浓度为8mM,混匀后即得8mM的苦楝素溶液)对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为:7.0mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为:10.5mm。

[0030] 由此可见,使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099,与单独使用0.3mM的BIT溶液或者8mM的苦楝素溶液相比,抑制效果更好。

[0031] 实施例3:

[0032] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物,包括0.2mM的BIT和8mM的苦楝素。制备方法:向去离子水中加入BIT和苦楝素,使BIT的终浓度为0.2mM,苦楝素的终浓度为8mM,混合均匀,得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0033] 用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试,测定的0.4mM的BIT溶液 (0.4mM的BIT溶液的制备方法:向去离子水中加入BIT,使其终浓度为0.4mM,混匀后得到0.4mM的BIT溶液) 对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为:11.3mm;测定的16mM的苦楝素溶液 (16mM的苦楝素溶液的制备方法:向去离子水中加入苦楝素,使其终浓度为16mM,混匀后得到16mM的苦楝素溶液) 对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为:7.6mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099的抑菌环大小为:12.8mm。

[0034] 由此可见,使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 8099,与单独使用0.4mM的BIT溶液或者16mM的苦楝素溶液相比,抑制效果更好。

[0035] 实施例4:

[0036] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物,包括0.1mM的BIT和2mM的苦楝素。制备方法:向去离子水中加入BIT和苦楝素,使BIT的终浓度为0.1mM,苦楝素的终浓度为2mM,混合均匀,得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0037] 用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试,测定的0.2mM的BIT溶液 (0.2mM的BIT溶液的制备方法:向去离子水中加入BIT,使其终浓度为0.2mM,混匀后即得0.2mM的BIT溶液) 对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:5.6mm;测定的4mM的苦楝素溶液 (4mM的苦楝素溶液的制备方法:向去离子水中加入苦楝素,使其终浓度为4mM,混匀后即得4mM的苦楝素溶液) 对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:5.5mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:7.0mm。

[0038] 由此可见,使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404,与单独使用0.2mM的BIT溶液或者4mM的苦楝素溶液相比,抑制效果更好。

[0039] 实施例5:

[0040] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物,包括0.15mM的BIT和4mM的苦楝素。制备

方法:向去离子水中加入BIT和苦楝素,使BIT的终浓度为0.15mM,苦楝素的终浓度为4mM,混合均匀,得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0041] 用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试,测定的0.3mM的BIT溶液(0.3mM的BIT溶液的制备方法:向去离子水中加入BIT,使其终浓度为0.3mM,混匀后得到0.3mM的BIT溶液)对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:6.6mm;测定的8mM的苦楝素溶液(8mM的苦楝素溶液的制备方法:向去离子水中加入苦楝素,使其终浓度为8mM,混匀后得到8mM的苦楝素溶液)对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:6.2mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:7.6mm。

[0042] 由此可见,使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404,与单独使用0.3mM的BIT溶液或者8mM的苦楝素溶液相比,抑制效果更好。

[0043] 实施例6:

[0044] 一种协同抑制细菌及真菌生长的组合物,包括0.2mM的BIT和8mM的苦楝素。制备方法:向去离子水中加入BIT和苦楝素,使BIT的终浓度为0.2mM,苦楝素的终浓度为8mM,混合均匀,得到协同抑制细菌及真菌生长的组合物。

[0045] 用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404作为测试菌株,按照上述测试方法范例中的测试方法进行测试,测定的0.4mM的BIT溶液(0.4mM的BIT溶液的制备方法:向去离子水中加入BIT,使其终浓度为0.4mM,混匀后即得0.4mM的BIT溶液)对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:8.5mm;测定的16mM的苦楝素溶液(16mM的苦楝素溶液的制备方法:向去离子水中加入苦楝素,使其终浓度为16mM,混匀后即得16mM的苦楝素溶液)对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:7.6mm。而本实施例的协同抑制细菌及真菌生长的组合物对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404的抑菌环大小为:10.0mm。

[0046] 由此可见,使用本发明的协同抑制细菌及真菌生长的组合物作用黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404,与单独使用0.4mM的BIT溶液或者16mM的苦楝素溶液相比,抑制效果更好。