

姜黄素与根皮素联合作用对大肠杆菌的抑菌效果

刘 锋, 陆殷明, 陶文静, 王攀林, 宋 丹*, 李向臣

(浙江农林大学动物科技学院、动物医学院 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术重点实验室 杭州 311300)

摘要 为研究姜黄素和根皮素联合使用对大肠杆菌的抑菌作用,采用微量肉汤稀释法测定姜黄素、根皮素的亚抑菌浓度;细菌培养测定各药物在亚抑菌浓度剂量下,对大肠杆菌的生长曲线、胞外核酸蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)以及总蛋白含量的影响;牛津杯法分析各药物亚抑菌浓度剂量下,姜黄素与根皮素的联合抑菌效果。结果表明:1)姜黄素与根皮素在质量浓度均为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时,对大肠杆菌的生长具有显著的抑制作用,此质量浓度确定为姜黄素与根皮素的亚抑菌浓度;2)亚抑菌浓度的姜黄素和根皮素联合作用,能够有效抑制大肠杆菌的生长,抑菌效果优于姜黄素与根皮素单独处理组($P<0.05$);3)亚抑菌浓度的姜黄素和根皮素联合使用对大肠杆菌的细胞壁和细胞膜有很强的破坏性,导致菌液上清中核酸、蛋白质以及 AKP 指数均升高。同时,亚抑菌浓度的姜黄素和根皮素联合使用减少了菌体内总蛋白(包括 LDH)的表达量,效果显著优于姜黄素与根皮素单独处理组($P<0.05$)。由此可见,姜黄素和根皮素联合作用大肠杆菌时,抑菌效果优于姜黄素与根皮素单独使用。

关键词 姜黄素; 根皮素; 联合作用; 大肠杆菌; 抑菌

文章编号 1009-7848(2023)08-0075-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.009

姜黄素(Curcumin)是姜黄提取物中主要植物成分,其含量可达到提取物总量的 60%~70%^[1]。在传统中医以及印度医药中认为姜黄可治疗多种疾病,例如姜黄试剂用于新鲜伤口杀菌和瘀伤恢复,并作为昆虫叮咬的抗刺激剂,姜黄糊可用于促进水痘和天花的结痂,同时也可用于泌尿系统疾病、肝胆疾病或作为驱虫药^[2]。现代医学研究发现,姜黄素具有抗炎、抗菌、抗寄生虫、抗诱变、抗糖尿病、放射防护、促进伤口愈合、降脂、解痉、抗氧化、免疫调节、抗癌和预防阿尔茨海默病等作用^[3]。根皮素(Phloretin)是一种二氢查耳酮类化合物,主要存在于苹果皮中^[4]。有研究表明根皮素的功效包括抗癌、抗氧化、抗菌、抗糖尿病、抗炎、抗血栓形成、抗病毒、神经保护和免疫调节特性^[5]。由于其良好的抗菌和抗炎活性,根皮素被考虑为预防细菌感染另一种有效防治方法^[6]。目前,在畜牧生产中过量使用抗生素治疗动物大肠杆菌病会引起动物的免疫力降低和畜产品质量不合格的问题^[7]。张欣^[8]的研究发现,姜黄素对大肠杆菌有较好地抑制作

用。Chauhan 等^[9]报道称根皮素在分子水平上通过 TLR4 信号通路保护巨噬细胞免受大肠杆菌诱导的炎症。姜黄素和根皮素单独使用,均具有良好的抑菌消炎效果,而二者联合使用对大肠杆菌的抑制作用未见报道。本研究通过体外试验探究姜黄素和根皮素联合使用对大肠杆菌的抑菌作用及机理,对于科学研究以及实践生产中治疗大肠杆菌引起的疾病具有很好的指导意义。此外,姜黄素和根皮素具有一定的食用安全性,对人和动物不会造成危害,可作为防腐剂替代品添加于不同食品加工中,减少生产中食品防腐剂的使用,改善食品的口味,延长食品的货架期。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

受试菌大肠杆菌(MG1655),山东青岛海博生物技术有限公司;姜黄素和根皮素,上海源叶生物科技有限公司;大豆蛋白胨和酵母粉,OXOID 生物公司;氯化钠,国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝染色试剂,武汉赛维尔生物科技有限公司;碱性磷酸酶(AKP)和乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 试验仪器

BSA 分析天平(BSA124S),赛多利斯(上海)

收稿日期: 2022-08-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32202752);
浙江省自然科学基金项目(LQ22C170001)

第一作者: 刘锋,男,硕士生

通信作者: 宋丹 E-mail: songdan2020@zafu.edu.cn

贸易有限公司;ZEALWAY 高压灭菌器(GI54D),上海甄明科学仪器有限公司;恒温振荡器(HZ-9211K),太仓市科教器材厂;电热鼓风干燥箱(101-3型),上海锦屏仪器仪表有限公司;垂直层流洁净工作台(HCB-1300V),上海勇诺生物科技有限公司;智能生化培养箱(SPX-150),宁波海曙赛福实验仪器厂;全自动菌落分析仪(G6),杭州迅数科技有限公司;超声波细胞粉碎机(KS-450F),宁波海曙科生超声设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基配制

1.3.1.1 LB 液体培养基的配制 按照 2:1:2 质量比例分别准确称取大豆蛋白胨、酵母粉、氯化钠, ddH₂O 溶解, 121 °C 灭菌 30 min, 备用。

1.3.1.2 LB 固体培养基的配制 按照 2:1:2:3 质量比例分别准确称取大豆蛋白胨、酵母粉、氯化钠、琼脂粉, 定容灭菌备用。

1.3.2 样品配制 由于姜黄素和根皮素微溶于水且易析出, 本试验采用二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂。准确称取 40 mg 各样品, 用 DMSO 溶解至无沉淀溶液并定容至 1 mL, 使姜黄素、根皮素、姜黄素+根皮素溶液的终质量浓度均为 40 mg/mL。

1.3.3 菌种活化与菌液制备 于垂直层流洁净工作台用灭菌接种环蘸取少量大肠杆菌菌液, 划线接种于 LB 固体培养基平板中, 生化培养箱培养 16 h, 挑取单菌落于 LB 液体培养基, 恒温摇床培养至菌液 OD_{600nm}=1, 使用 LB 液体培养基将菌液稀释至 OD_{600nm}=0.1, 用于后续试验。

1.3.4 亚抑菌浓度和抑制率的测定 采用 96 孔板微量肉汤稀释法测定亚抑菌浓度和抑制率。将质量浓度为 40 mg/mL 的姜黄素溶液、根皮素溶液、姜黄素+根皮素溶液依次倍比稀释得到 1 000~0.9765625 μg/mL 共 11 份不同质量浓度的含样培养基, 在 96 孔板 A~H 行中的第 1 至第 11 个孔分别加入上述不同质量浓度的含样培养基 200 μL, 第 12 个孔加入相同体积不含样品的 LB 培养基作为阴性对照, 在 A~F 行每个孔加入已稀释好的菌液 10 μL, 作为试验组, G~H 行均不加入菌液, 作为空白组, 恒温生化培养箱中培养 16 h, 酶标仪读取 OD_{600nm} 值。根据式(1)和式(2)计算样品对大肠杆菌的影响。

$$\text{大肠杆菌 OD}_{600\text{nm}} = A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白对照组}} \quad (1)$$

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{阴性对照} - (\text{试验组} - \text{空白对照组})}{\text{阴性对照} - \text{空白对照组}} \times 100 \quad (2)$$

结果判定: 使用 Graphpad prism 软件进行数据分析, 以出现显著性差异的组别确定为样品的亚抑菌浓度, 并根据 OD_{600nm} 值计算抑制率, 每组试验至少重复 3 次。

1.3.5 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌生长曲线的影响 根据 1.3.4 节确定的根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌的亚抑菌浓度, 配制含有亚抑菌浓度样品的培养基 15 mL, 加入等量稀释好的大肠杆菌菌液, 设置空白对照组。于恒温振荡器中振荡培养, 分别在培养 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h 时使用移液枪吸出 1 mL 培养基, 加入 96 孔板中, 每孔 200 μL, 酶标仪读取 OD_{600nm} 值。根据各处理组的 OD_{600nm} 值, 以时间为横坐标, OD_{600nm} 值为纵坐标, 画出生长曲线。每组试验至少重复 3 次, 以多次试验数据平均值绘制生长曲线。

1.3.6 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌生长的影响 试验采用牛津杯抑菌法, 将稀释好的菌液接种于灭菌后冷却至 40 °C 左右的 LB 固体培养基中, 混匀后迅速将其转移至 90 mm 无菌培养皿中, 每个皿 10 mL。在洁净工作台中待其凝固, 用镊子夹取牛津杯呈品字形放置于培养皿上, 于牛津杯中分别加入 200 μL 不同样品, 在固体培养皿中心位置放置一牛津杯, 加入含有相同体积的 DMSO 作为阴性对照。恒温生化培养箱培养 16 h, 全自动菌落分析仪测量药物抑菌直径并拍照。

1.3.7 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌菌液上清 DNA 和蛋白质的影响 按照 1.3.5 节所述方法对大肠杆菌进行培养, 并于恒温振荡器培养 16 h 后将大肠杆菌菌悬液以 5 000 r/min 离心 10 min, 移液枪吸取 200 μL 上清置于 96 孔板中, 酶标仪测定 OD_{260nm} 和 OD_{280nm}。

1.3.8 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌 AKP 的影响 按照 1.3.5 节所述方法对大肠杆菌进行培养, 并于恒温振荡器培养 16 h 后将大肠杆菌菌悬液以 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 参照 AKP 试剂盒说明书测定波长 520 nm 处各处理组培养液的吸光度, 确定 AKP 活力, 每组试验至少重复 3 次。

1.3.9 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌菌体 LDH 的影响 按照 1.3.5 节所述方法对大肠杆菌进行培养,于恒温振荡器培养 16 h 后将大肠杆菌菌悬液以 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留沉淀,加入 1 mL PBS 以混匀菌体,超声波细胞粉碎机粉碎大肠杆菌细胞壁,5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,参照 LDH 试剂盒说明书测定波长 450 nm 处各处理组大肠杆菌的吸光度,确定 LDH 活性,每组试验至少重复 3 次。

1.3.10 根皮素与姜黄素联合作用对大肠杆菌菌体总蛋白的影响 按照 1.3.5 节所述方法对大肠杆菌进行培养,并于恒温振荡器培养 16 h 后将大肠杆菌菌悬液以 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留沉淀,加入 750 μ L PBS 以混匀菌体,超声波细胞粉碎机粉碎大肠杆菌细胞壁,5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,加入 250 μ L 4 \times 上样缓冲液进行混匀,利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,按照考马斯亮蓝说明书进行染色、脱色,最后拍照比

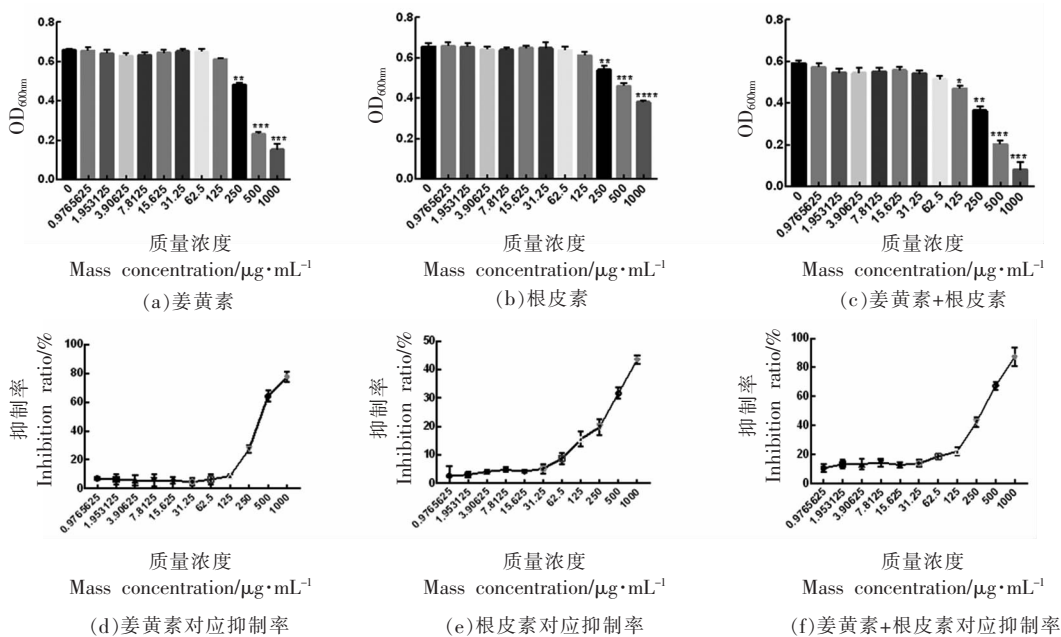
对。

1.3.11 数据处理 试验所有数据于 Excel 进行初步整理,采用 Graphpad prism 软件对试验数据进行差异性分析,试验结果用“平均数 \pm 标准差”表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 姜黄素与根皮素亚抑菌浓度测定与分析

细菌悬液浊度与细菌计数存在一定线性关系,细菌悬液浊度可通过 OD_{600nm} 进行测定^[10]。由图 1 可知,姜黄素与根皮素分别在 250 μ g/mL 时出现了对大肠杆菌的显著性抑制,联合用药时在 125 μ g/mL 时出现了对大肠杆菌显著性抑制;姜黄素与根皮素单独使用时,250 μ g/mL 对大肠杆菌的抑制率分别为 27.31% 和 19.78%,联合作用时达到 43.59%,说明联合使用后姜黄素与根皮素的抑菌效果增强。



注:*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$; ***表示 $P<0.001$ 。

图 1 不同质量浓度的姜黄素、根皮素以及姜黄素+根皮素对大肠杆菌生长的影响以及抑制率

Fig.1 Effects of different mass concentrations of curcumin, phloretin, curcumin+phloretin on *Escherichia coli* growth and inhibition ratio

2.2 姜黄素与根皮素对大肠杆菌生长曲线的影响

由图 2 可知,姜黄素与根皮素在最初 3 h 内对大肠杆菌的生长没有明显影响,在第 6 小时出

现对大肠杆菌生长的抑制,随着样品作用时间延长,姜黄素与根皮素对大肠杆菌的抑制效果逐渐明显增强,在 12~24 h 根皮素与姜黄素显著抑制

大肠杆菌的数量增长。综合大肠杆菌的生长曲线与培养基中营养物质的消耗,同时参考 Packia-vathy 等^[11]的研究:姜黄素在处理弧菌 16 h 后对细菌的数量及菌体形态产生明显的影响作用,因此

后续本研究选取 250 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素与根皮素联合处理 16 h 探究姜黄素与根皮素联合作用的抑菌机理。

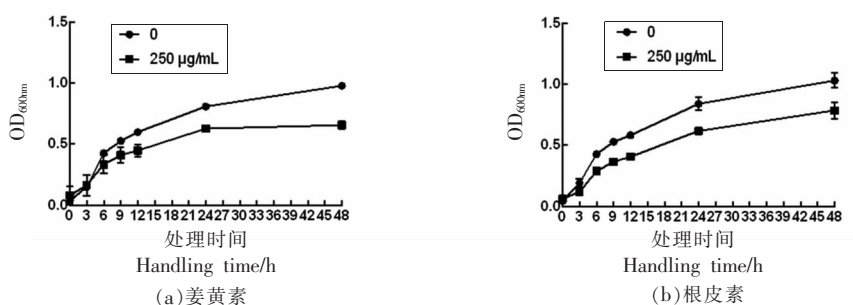


图 2 姜黄素(a)与根皮素(b)对大肠杆菌生长曲线的影响

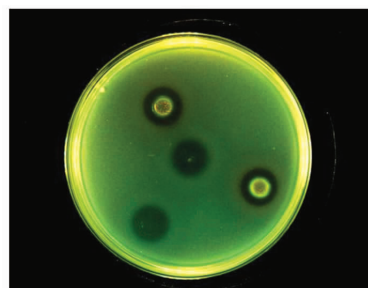
Fig.2 The effect of curcumin (a) and phloretin (b) on the growth curve of *Escherichia coli*

2.3 姜黄素与根皮素联合作用对大肠杆菌生长的影响

由图 3 和表 1 可知,与对照组相比,姜黄素和根皮素单独处理大肠杆菌 16 h 时,对大肠杆菌均有一定的抑制性,当姜黄素与根皮素联合处理时,其抑菌效果均显著强于对照组和姜黄素、根皮素单独处理组($P < 0.05$)。

2.4 姜黄素与根皮素联合作用对菌液上清中核酸和蛋白质的影响

接下来探究了姜黄素与根皮素联合作用抑制大肠杆菌生长的可能机制。在菌体细胞膜完整性受到破坏时,菌体蛋白和核酸等内容物会释放出来^[12]。核酸和蛋白质分别在波长 260 nm 和波长 OD_{280nm} 处有吸光值,因此可以根据数值的变化计算上清液中核酸与蛋白质的含量变化,进而反映细胞膜的破损程度^[13]。由图 4 可知,正常情况下,对照组上清中核酸和蛋白质含量很少,姜黄素与根皮素单独处理大肠杆菌后,菌液上清中核酸与蛋白质含量显著增加,说明姜黄素与根皮素对大肠杆菌的细胞膜有一定的影响。Lee 等^[14]研究证明苹果黄酮类提取物可以通过破坏大肠杆菌的细胞膜而抑制细菌生长,这与本文的结果一致。此外,姜黄素和根皮素联合处理组上清中的核酸与蛋白质含量较单独处理显著增多,说明二者联合处理进一步破坏了细菌的细胞膜。



注:左上:姜黄素+根皮素;左下:根皮素;中间:对照;右下:姜黄素。

图 3 姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌的抑菌效果

Fig.3 Inhibition effect of curcumin combined with phloretin against *Escherichia coli*

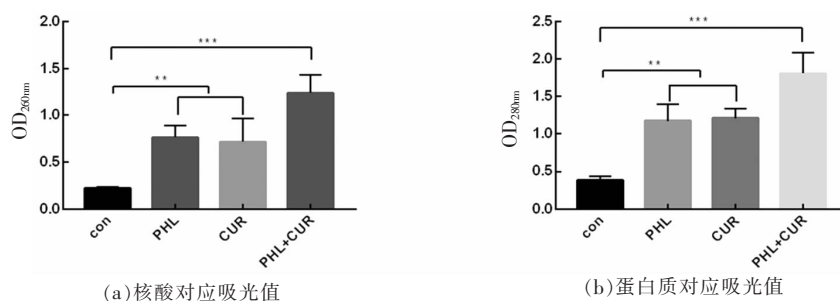
表 1 姜黄素与根皮素联合处理对抑菌圈直径的影响

Table 1 The effect of curcumin combined with phloretin on inhibition circle diameters

处理组	直径/mm
con	9.61 \pm 0.32 ^a , n=6
PHL	10.32 \pm 0.33 ^b , n=6
CUR	12.04 \pm 0.47 ^b , n=6
PHL+CUR	13.22 \pm 0.40 ^b , n=6

2.5 姜黄素与根皮素联合作用对菌液上清中 AKP 的影响

正常情况下 AKP 存在于细菌细胞壁与细胞



注:con 表示对照组;**表示 $P<0.01$;** $P<0.001$ 。

图 4 姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌细胞膜的影响

Fig.4 The effect of curcumin combined with phloretin on cell membrane of *Escherichia coli*

膜之间,当细菌受到不良刺激时,细胞壁被破坏,AKP 溢出胞外^[15]。可通过检测培养液上清中 AKP 的活力变化来反映样品对大肠杆菌细胞壁的影响。姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌 AKP 的影响如图 5 所示:与对照组相比,姜黄素与根皮素单独处理时能够增加 AKP 的外泄,姜黄素与根皮素联合处理时,其外泄效果显著加强,说明姜黄素与根皮素联合处理时对细菌细胞壁损伤严重。

2.6 姜黄素与根皮素联合作用对菌体 LDH 的影响

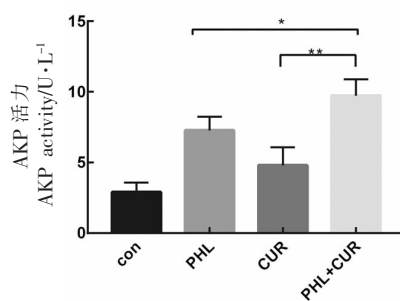
LDH 在大肠杆菌胞内以一种可溶性蛋白方式存在,在菌体应对不良刺激中发挥重要作用^[16],可通过 LDH 活性变化来反映样品对细菌代谢的影响。由图 6 可知,与对照组相比,姜黄素与根皮素联合处理显著降低细胞内 LDH 的活性,说明姜黄素与根皮素联合处理降低 LDH 的生成,进而影响了细菌生物膜的生成,从而起到抑菌效果。

2.7 姜黄素与根皮素联合作用对菌体总蛋白的影响

姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌细胞内总蛋白的影响如图 7 所示。与对照组相比,姜黄素与根皮素单独处理组的细菌菌体总蛋白表达明显减少,二者联合作用后进一步减少大肠杆菌内总蛋白。有研究^[17-18]表明,植物源性的抑菌剂可能是通过减少细菌内相关酶的表达量和活性来抑制细菌的增殖,这与本试验的结果一致。

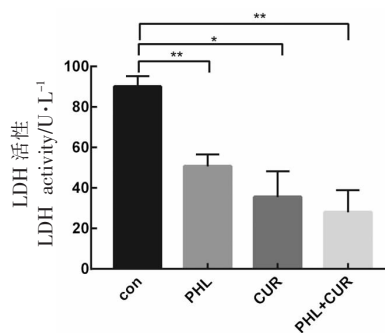
3 讨论

大肠杆菌作为革兰氏阴性菌典型代表菌,在生活中常因食品或水源的不洁引起人大肠杆菌病^[19]。目前在食品的抑菌中,多采用防腐剂或者塑



注:con 表示对照组;*表示 $P<0.05$;**表示 $P<0.01$ 。

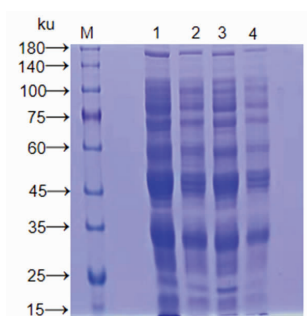
图 5 姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌 AKP 的影响
Fig.5 The effect of curcumin combined with phloretin on AKP of *Escherichia coli*



注:con 表示对照组;*表示 $P<0.05$;**表示 $P<0.01$ 。

图 6 姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌 LDH 的影响
Fig.6 The effect of curcumin combined with phloretin on LDH of *Escherichia coli*

料真空包装的方法抑菌,这些方法均有一定的局限性^[20]。在过去动物性食品的生产过程中,往往采用抗生素的方法预防和治疗动物大肠杆菌病。然而随着抗生素的大量使用,细菌耐药性问题也变得越来越突出^[21],迫切需要寻找抗生素的替代品,



注: M. 蛋白 Marker, 1. 对照组, 2. 姜黄素组, 3. 根皮素组, 4. 姜黄素与根皮素联合处理组。

图7 姜黄素与根皮素联合处理对大肠杆菌细胞内总蛋白的影响

Fig.7 The effect of curcumin combined with phloretin on the total protein in *Escherichia coli* cells

以此减少抗生素的使用。天然植物提取物对细菌具有一定的抑制作用,同时可以减弱细菌的耐药性^[22]。植物提取物对细菌的抑制性主要取决于细菌对其敏感性以及植物提取物的浓度。为了提高植物提取物的生物功能,目前多采用不同物质联合使用增加生理活性。De Oliveira等^[23]研究发现,姜黄素与光照联合后对大肠杆菌 O157: h7a 和李斯特菌的抑菌性明显增加,在生鲜食品卫生中的应用具有重要指导意义。史长政^[24]将根皮素与超声技术结合,能够有效协同杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,在苹果浊汁中应用延长了苹果浊汁的货架期。周沫等^[25]研究发现,根皮素与姜黄素联合作用后能够显著抑制癌细胞的增殖,对人体的健康具有重要意义。在本研究中,将姜黄素与根皮素联合作用发现,两者联合作用对大肠杆菌的抑制性均强于单一物质的抑菌效果。

细菌细胞质膜是细菌进行物质交换的重要通道,维持细胞的正常生理功能,其对物质的渗透作用还受控于细胞膜的结构和组成成分^[26]。在 Esmaeelzadeh 等^[27]的研究中,发现姜黄素主要是使细菌细胞膜去极化,同时破坏细菌的细胞膜结构达到抑菌效果。本研究中发现,姜黄素与根皮素联合作用后,致使细菌的细胞膜损坏程度加深,细胞内核酸与蛋白质大量流出,从而达到抑菌效果。AKP 是存在于细胞壁与细胞膜中一种重要的酶,一旦细菌细胞壁受损,会使 AKP 泄出胞外而影响细菌增殖^[28-29]。有研究^[30]发现,姜黄素能通过干扰细菌

正常代谢活动,达到抑菌效果。在本研究中,姜黄素联合根皮素后,胞外 AKP 活力显著上升,说明姜黄素与根皮素联合作用后,细胞壁受到损伤加重。张欣^[8]试验发现,姜黄素对奶牛常见致病菌的抑菌性也是通过破坏细菌细胞壁和细胞膜的通透性等途径来起到抑菌作用。LDH 是细菌无氧代谢过程中的一种重要酶,李京洋等^[31]研究发现姜黄素可能通过有效抑制 LDH 的活性,降低变异链球菌的产酸能力。在缪玉佳等^[32]研究中,冬凌草甲素可干扰嗜水气单胞菌的 LDH 合成来达到抑菌的效果。本研究发现,姜黄素与根皮素联合使用可降低大肠杆菌细胞内 LDH 活性,该结果与 SDS-PAGE 结果变化相一致,说明姜黄素与根皮素联合作用后,能够干扰细菌细胞内蛋白质正常代谢活动。

本试验探究了姜黄素与根皮素联合作用对大肠杆菌的抑制效果,证明二者联合作用能显著增强对大肠杆菌的抑制作用。然而,本试验也存在以下的不足之处:一是本试验按照 1:1 质量浓度比配制姜黄素与根皮素溶液,未探究其它最适配比;二是本试验主要是在实验室中探究姜黄素与根皮素对大肠杆菌的影响,未从实际食品添加中探究抑菌效果,而这两个问题有待试验进一步探究。

4 结论

姜黄素与根皮素联合作用可减少细胞内蛋白的表达量,降低有关酶的活性,同时破坏菌体的细胞膜,从而达到抑菌作用,这为食品添加剂的开发与应用提供了理论数据指导。

参 考 文 献

- [1] PRIYADARSINI K I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 20091-20112.
- [2] KUTTAN R, BHANUMATHY P, NIRMALA K, et al. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*)[J]. *Cancer Lett*, 1985, 29(2): 197-202.
- [3] NELSON K M, DAHLIN J L, BISSON J, et al. The essential medicinal chemistry of curcumin [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(5): 1620-1637.
- [4] 肖小年, 王凡, 周洁, 等. 甜菊糖苷改善根皮素溶

- 解性及体外释放的研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 11–21.
- XIAO X N, WANG F, ZHOU J, et al. Improving of solubilization and *in vitro* release enhancement of phloretin by steviol glycosides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 11–21.
- [5] STOMPOR M, BRODA D, BAJEK–BIL A. Dihydrochalcones: Methods of acquisition and pharmacological properties – A first systematic review [J]. Molecules, 2019, 24(24): 4468.
- [6] BEHZAD S, SUREDA A, BARRECA D, et al. Health effects of phloretin: From chemistry to medicine[J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(3): 527–533.
- [7] 方慧颖, 张弓. 基于翻译调控的细菌耐药研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2767–2777.
- FANG H Y, ZHANG G. Drug resistance of bacteria based on translation regulation: A review[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2767–2777.
- [8] 张欣. 姜黄素对子宫内膜炎致病菌抑菌活性及抗炎机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- ZHANG X. Curcumin for endometritis pathogenic bacteria the researches on the antibacterial activity and the mechanism of anti-inflammatory[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [9] CHAUHAN A, JANG M, KIM Y. Phloretin protects macrophages from *E. coli* -induced inflammation through the TLR4 signaling pathway[J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30(3): 333–340.
- [10] 吴海燕, 谢应桂, 何雄斌, 等. 快速准确制备大肠杆菌高效感受态细胞中有关 OD₆₀₀ 值的探讨[J]. 湘南学院学报, 2006, 8(3): 13–15.
- WU H Y, XIE Y G, HE X B, et al. Study of OD₆₀₀ in the process of quickly and accurately producing the high efficient competent cells of the *E. coli* [J]. Journal of Xiangnan University, 2006, 8(3): 13–15.
- [11] PACKIAVATHY I A, SASIKUMAR P, PANDIAN S K, et al. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(23): 10177–10187.
- [12] 高永生, 金斐, 朱丽云, 等. 植物精油及其活性成分的抗菌机理[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 376–388.
- GAO Y S, JIN F, ZHU L Y, et al. Antimicrobial mechanism of plant essential oils and its active ingredients [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 376–388.
- [13] HANCOCK R, ROZEK A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides [J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 206(2): 143–149.
- [14] LEE J H, REGMI S C, KIM J A, et al. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats [J]. Infect Immun, 2011, 79(12): 4819–4827.
- [15] CAO J R, FU H J, GAO L H, et al. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Staphylococcus aureus* [J]. Folia Microbiol (Praha), 2019, 64(6): 899–906.
- [16] RICHARDSON A R, LIBBY S J, FANG F C. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity [J]. Science, 2008, 319(5870): 1672–1676.
- [17] 张梅, 李晓君, 成悦, 等. 植物源防腐剂的制备及抑菌机理研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(1): 139–145.
- ZHANG M, LI X J, CHENG Y, et al. A Study on the preparation and antibacteria mechanism of plant-derived preservatives [J]. Food Research and Development, 2022, 43(1): 139–145.
- [18] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) [J]. Food Control, 2014, 35(1): 109–116.
- [19] 邵志勇, 陈夏冰, 何斌, 等. 大肠杆菌病的研究进展[J]. 养殖与饲料, 2021, 20(8): 5–7.
- SHAO Z Y, CHEN X B, HE B, et al. Research on the advance of *E. coli* bacillosis [J]. Animals Breeding and Feed, 2021, 20(8): 5–7.
- [20] 杨福馨, 丁晓彤, 邱艳娜, 等. 抑菌包装塑料薄膜的研究与应用进展及展望[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 1–5.
- YANG F X, DING X T, QIU Y N, et al. Research on the advances and prospects application of antibacterial packaging plastic film [J]. Food and Machinery, 2019, 35(1): 1–5.
- [21] 褚玲. 大肠杆菌耐药机制初探[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.

- CHU L. A preliminary study on drug resistance mechanism in *Escherichia coli*[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2021.
- [22] 李栋. 禽源大肠杆菌质粒介导氟喹诺酮类耐药基因的检测及中药消除耐药性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- LI D. Study on the detection of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes in avian *Escherichia coli* isolates and the drug-resistance eliminating effect of traditional Chinese medicine[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
- [23] DE OLIVEIRA E F, TOSATI J V, TIKEKAR R V, et al. Antimicrobial activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation[J]. Postharvest Biol Technol, 2018, 137(11): 86-94.
- [24] 史长政. 根皮素抑制单增李斯特菌生物膜机理及联合超声杀菌技术研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- SHI C Z. The mechanism of phloretin inhibits *Listeria monocytogenes*' biofilm and the study of sterilization combining with ultrasound technique [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2021.
- [25] 周沫, 毕金峰, 韩丹丹, 等. 提升苹果二氢查尔酮对结肠癌细胞抑制功效的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(3): 1-6, 23.
- ZHOU M, BI J F, HAN D D, et al. Improving the inhibitory effects of apple dihydrochalcones on colon cancer cells[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(3): 1-6, 23.
- [26] COX S D, MANN C M, MARKHAM J L, et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil [J]. Molecules, 2001, 6(2): 87-91.
- [27] ESMAEELZADEH M, SALEHI P, BARARJANIAN M, et al. Synthesis of new triazole tethered derivatives of curcumin and their antibacterial and antifungal properties[J]. Journal the Iranian Chemical Society, 2019, 16(3): 465-477.
- [28] 蔡晓军, 孙杨赢, 潘道东, 等. 迷迭香主要组分对沙门氏菌的抑制机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 134-140.
- CAI X J, SUN Y Y, PAN D D, et al. Antibacterial mechanism of rosemary's main component against *salmonella*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(3): 134-140.
- [29] ZHOU Z X, WEI D F, GUAN Y, et al. Damage of *Escherichia coli*, membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: Micrographic evidences[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 112(3): 898-907.
- [30] SHARMA A, VIVEK K, BAJPAI, BAEK K H. Determination of antibacterial mode of action of *Allium sativum* essential oil against foodborne pathogens using membrane permeability and surface characteristic parameters[J]. Journal of Food Safety, 2013, 33(2): 197-208.
- [31] 李京洋, 姚毅章, 赵国廷. 姜黄素对变异链球菌产酸、耐酸能力的影响[J]. 口腔医学, 2020, 40(8): 707-710.
- LI J Y, YAO Y Z, ZHAO G T. Effect of curcumin on acid production and acid resistance of *Streptococcus mutans*[J]. Stomatology, 2020, 40(8): 707-710.
- [32] 缪玉佳, 陈杰豪, 梁天雨, 等. 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌体外抑菌效果及作用机制[J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1899-1908.
- MIAO Y J, CHEN J H, LIANG T Y, et al. Bacteriostatic effect and mechanism of rubescensine A on *Aeromonas hydrophila* in vitro[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(11): 1899-1908.

Inhibition of Curcumin Combined with Phloretin against *Escherichia coli*

Liu Feng, Lu Yinming, Tao Wenjing, Wang Panlin, Song Dan*, Li Xiangchen

(College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Hangzhou 311300)

Abstract In order to study the antibacterial effect of curcumin combined with phloretin against *Escherichia coli* and explore the antibacterial mechanism, the sub-inhibitory concentrations of curcumin and phloretin were determined by the micro broth dilution method. The effects of each drug on the growth curve, extracellular nucleic acid protein, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP) and total protein content of *Escherichia coli* were determined by bacterial culture at sub-inhibitory concentration doses. The Oxford cup method was used to analyze the combined antibacterial effect of curcumin and phloretin at the sub-inhibitory concentration of each drug. These results showed that: 1) Curcumin and phloretin had a significant inhibitory effect on the growth of *Escherichia coli* when both concentrations were 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and this concentration was determined as the sub-inhibitory concentration of curcumin and phloretin. 2) The combined action of curcumin and phloretin at sub-inhibitory concentrations could effectively inhibit the growth of *Escherichia coli*, and the antibacterial effect was better than that of curcumin and phloretin alone ($P<0.05$). 3) The combined use of curcumin and phloretin at sub-inhibitory concentrations has a strong destructive effect on the cell wall and cell membrane of *Escherichia coli*, resulting in the increase of nucleic acid, protein and AKP index in the supernatant of bacterial liquid. At the same time, the combined use of sub-inhibitory concentrations of curcumin and phloretin reduced the expression of total proteins (including LDH) in bacteria, and the effect was significantly better than that of curcumin and phloretin alone ($P<0.05$). It can be seen that the antibacterial effect of curcumin and phloretin is better than that of curcumin and phloretin alone.

Keywords curcumin; phloretin; combined action; *Escherichia coli*; bacteriostasis