

香芹酚胁迫下酿酒酵母的生理特性和转录组分析

牛力源¹, 孙晓诚¹, 刘静飞¹, 吴梓浩¹, 白艳红¹, 张志坚^{2,*}

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 冷链食品加工与安全控制教育部重点实验室,

河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南 郑州 450000; 2. 商丘师范学院, 河南 商丘 476000)

摘要: 本研究以果蔬产品中常见的致腐菌酿酒酵母为对象, 探究香芹酚胁迫对酿酒酵母生理特性和转录组的影响。结果表明: 香芹酚对酿酒酵母的最小抑菌浓度为160 $\mu\text{g/mL}$; 随着环境温度的升高 (20~40 $^{\circ}\text{C}$), 香芹酚 (160 $\mu\text{g/mL}$) 对酿酒酵母的抑制作用逐渐增强, 环境pH 3~4.5对香芹酚的抗菌效果没有明显影响, 然而果糖的添加 (20~80 g/L) 可显著降低其抑菌活性; 经香芹酚处理后, 酿酒酵母细胞壁膜结构受损, 细胞膜通透性增加并发生去极化, 胞内物质泄漏, 线粒体膜电位降低, 胞内 Ca^{2+} 稳态失衡、ATP水平下降; 通过转录组测序分析发现, 香芹酚胁迫抑制线粒体呼吸链复合体、ATP合成酶以及线粒体核糖体结构蛋白的生物合成, 阻碍呼吸链电子传递和干扰线粒体核糖体相关的生命活动。

关键词: 香芹酚; 酿酒酵母; 生理特性; 转录组学分析; 抑菌机制

Physiological Characteristics and Transcriptomic Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under Carvacrol Stress

NIU Liyuan¹, SUN Xiaocheng¹, LIU Jingfei¹, WU Zihao¹, BAI Yanhong¹, ZHANG Zhijian^{2,*}

(1. Key Laboratory of Cold Chain Food Processing and Safety Control, Ministry of Education, Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450000, China; 2. Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China)

Abstract: This study investigated the effect of carvacrol stress on the physiological characteristics and transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*, a common spoilage yeast in fruit and vegetable products. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of carvacrol on *S. cerevisiae* was 160 $\mu\text{g/mL}$. With the increase in temperature (20–40 $^{\circ}\text{C}$), the inhibitory effect of carvacrol (160 $\mu\text{g/mL}$) on yeast growth gradually increased. Environmental pH (3–4.5) had no significant impact on the inhibitory effect of carvacrol. However, the addition of fructose (20–80 g/L) significantly reduced the antifungal activity. Carvacrol treatment damaged the structure of the cell envelope of *S. cerevisiae*, increased the plasma membrane permeability and caused plasma membrane depolarization, resulting in leakage of intracellular substances, a decrease in mitochondrial membrane potential, an imbalance in intracellular Ca^{2+} homeostasis, and a decrease in intracellular ATP content. The transcriptomic analysis revealed that carvacrol stress inhibited the biosynthesis of mitochondrial respiratory chain complexes, ATP synthase and mitochondrial ribosome (MR) proteins, which could block electron transport along the respiratory chain and interfere with life activities related to MR.

Keywords: carvacrol; *Saccharomyces cerevisiae*; physiological characteristics; transcriptomic analysis; antimicrobial mechanism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-170

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 09-0075-09

引文格式:

牛力源, 孙晓诚, 刘静飞, 等. 香芹酚胁迫下酿酒酵母的生理特性和转录组分析[J]. 食品科学, 2024, 45(9): 75-83.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-170. <http://www.spkx.net.cn>

NIU Liyuan, SUN Xiaocheng, LIU Jingfei, et al. Physiological characteristics and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under carvacrol stress[J]. Food Science, 2024, 45(9): 75-83. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230621-170. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-06-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32001801)

第一作者简介: 牛力源 (1987—) (ORCID: 0000-0003-2334-4001), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品非热安全控制。

E-mail: niuliyuan1228@163.com

*通信作者简介: 张志坚 (1967—) (ORCID: 0009-0004-3650-7214), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物与免疫学。

E-mail: zhangzhj@zzu.edu.cn

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种兼性厌氧的单细胞真核生物, 能够在低pH值、高渗透压、营养胁迫等严苛环境下生长, 是果蔬食品中常见的腐败菌之一^[1]。与细菌相比, 酵母更易于在果蔬食品中生长繁殖, 进而影响果蔬食品的货架期及安全性^[2-3]。因此, 在果蔬食品的加工、贮藏等过程中, 对酿酒酵母的控制措施必不可少。在食品工业中, 通常使用多种化学合成添加剂抑制有害微生物, 然而化学合成防腐剂的滥用会产生严重的健康风险和环境危害。近年来, 消费者对绿色、天然、安全的食品需求不断增加, 使用天然抑菌剂代替化学合成防腐剂防止食源性病原体的生长和控制食品腐败已经成为食品工业领域的研究热点。

香芹酚是一种普遍存在于牛至、百里香等唇形科植物中的天然单萜类苯酚化合物, 具有抗菌、抗氧化、抗炎等多种活性功能^[4-5]。目前, 香芹酚已被国家卫生健康委员会和美国食品药品监督管理局等批准用作食品添加剂^[6], 广泛应用于圣女果、苹果汁、鲜切苹果等多种食品的防腐保鲜研究中^[7-10], 具有提高易腐食品货架期和安全性潜力。王新伟等^[11]发现, 相比于肉桂醛和柠檬醛, 香芹酚具有较高的抗真菌活性。据Rao等^[12]报道, 香芹酚对酿酒酵母的抑制作用也显著强于其他萜酚类化合物(如百里香酚和丁香酚等)。这表明香芹酚在控制果蔬食品中酿酒酵母污染方面具有潜在的应用前景。

然而, 目前的研究主要集中于香芹酚对酿酒酵母的体外抗菌活性, 食品体系各因素对其抑菌效果的影响尚不清楚。此外, 香芹酚对酿酒酵母的抑菌机制也尚未完全阐明。因此, 本实验以酿酒酵母为对象, 研究温度、pH值、果糖等果蔬食品体系中常见的环境因素对香芹酚抑菌效果的影响规律, 并采用多种细胞生物学手段, 评估酿酒酵母细胞形态、细胞壁膜结构和功能等生理特性的变化, 同时利用转录组测序技术研究香芹酚对酿酒酵母细胞转录组的影响, 分别从细胞水平和分子水平探索香芹酚胁迫抑制酿酒酵母的作用机制, 以期在香芹酚在果蔬产品贮藏保鲜中的应用提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

本实验所用菌株酿酒酵母ATCC 204508购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; 香芹酚(纯度99%)上海麦克林生化科技有限公司; 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose, YEPD)青岛海博生物技术有限公司; 碘化丙啶(propidium iodide, PI)(纯度99%)上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 双(1,3-二巴比妥酸)-三次甲基氧烯洛尔(bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol, DiBAC₄(3))

(纯度99%)和TRIzol[®] reagent提取试剂盒赛默飞世尔科技(中国)有限公司; ATP检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、Fluo-3 AM钙离子荧光探针上海碧云天生物技术有限公司; 反转录试剂盒ReverTra Ace[®] RT-real-time PCR Master Mix日本东洋纺株式会社。

1.2 仪器与设备

3K15高速冷冻离心机德国Sigma公司; Bioscreen C全自动生长曲线仪芬兰Oy Growth Curves Ab公司; TU-1810超微量分光光度计北京普析通用仪器有限责任公司; Spark 20M多功能酶标仪瑞士Tecan公司; Cytoflex S流式细胞仪贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司; SU8100高分辨率发射扫描电子显微镜日本日立公司; YXQ-50A立式压力蒸汽灭菌器上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; Tiss-24高速组织研磨仪上海净信实业发展有限公司; ViiA[™] 7实时聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)仪美国ABI公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

将低温保藏的酿酒酵母接种在YEPD固体培养基上。随机挑取大小适中的单菌落接种在YEPD液体培养基中, 在25℃条件下以150 r/min振荡培养至对数期, 即OD_{600 nm}为0.8左右。将菌悬液于4℃、6 000 r/min离心15 min收集酵母细胞, 并用无菌生理盐水漂洗两次, 收集细胞并重悬于相同体积的无菌生理盐水中。

1.3.2 香芹酚溶液的制备

将香芹酚原液与吐温80按1:1(V/V)混合, 充分振荡混匀, 配制初始质量浓度为512 mg/mL的香芹酚溶液。采用二倍稀释法, 使用无菌生理盐水依次稀释, 获得质量浓度为40~1 280 μg/mL的香芹酚溶液。

1.3.3 香芹酚对酿酒酵母的抑菌作用分析

1.3.3.1 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

采用微量肉汤二倍稀释法对香芹酚的MIC进行测定^[13]。分别将酿酒酵母菌悬液(终浓度约为6 lg(CFU/mL))与1.3.2节中制备的等体积不同质量浓度香芹酚溶液(40~1 280 μg/mL)加入100孔微量滴定板中, 以未加香芹酚的菌悬液作为阳性对照。使用全自动生长曲线仪在25℃条件下间隔2 h测定菌液的OD_{600 nm}, 连续监测40 h。

1.3.3.2 不同条件下香芹酚对酿酒酵母的抑菌效果分析

为研究环境因素对香芹酚抑制酿酒酵母效果的影响, 设计3组抑菌实验: 1) 酿酒酵母菌悬液中加入终质量浓度160 μg/mL香芹酚溶液, 分别在20、30、40℃条件下处理30 min; 2) 使用柠檬酸缓冲液调节酿酒酵母菌悬液的pH值(3、3.5、4和4.5), 加入终质量浓度为160 μg/mL香芹酚溶液, 30℃处理30 min; 3) 添加

果糖至菌悬液, 菌悬液中果糖质量浓度分别为40、80、120 g/L和160 g/L, 同时加入等体积香芹酚溶液(终质量浓度160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理30 min, 果糖终质量浓度为20~80 g/L。酿酒酵母活菌数($\lg(\text{CFU}/\text{mL})$)由平板计数法确定。

1.3.4 香芹酚对酿酒酵母的抑菌机制分析

1.3.4.1 场发射扫描电镜(field emission-scanning electron microscopy, FE-SEM)观察

参考Niu Liyuan等^[14]的方法, 并略作修改。使用香芹酚(终质量浓度160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理酵母菌悬液30 min。在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用体积分数2.5%戊二醛溶液固定4 h, 然后使用不同体积分数乙醇溶液(10%、30%、50%、70%、80%、90%和100%)进行梯度脱水。将干燥后样品滴加至硅片, 过夜烘干, 喷金, 通过FE-SEM观察并采集图像。

1.3.4.2 细胞膜渗透性的测定

细胞内容物泄漏量常被用来评估细胞膜的渗透性^[15]。分别向酿酒酵母菌悬液中加入不同终质量浓度(20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的香芹酚, 在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理30 min, 收集上清液。使用Nanodrop 2000超微量紫外-可见分光光度计测定上清液的 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ 。

1.3.4.3 细胞质膜完整性的测定

参考Xiang Qisen等^[16]的方法评估细胞膜完整性。酿酒酵母经香芹酚处理后(处理方法同1.3.4.2节), 收集酵母细胞, 与终质量浓度3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PI溶液混合, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育15 min。漂洗2次后, 利用多功能酶标仪检测样品的荧光强度。结果用PI的相对荧光强度表示, 计算参考式(1):

$$\text{PI相对荧光强度}/\% = \frac{N_1}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: N_1 和 N_0 分别为处理组和未处理组酵母悬浮液的荧光强度。

1.3.4.4 细胞膜电位的测定

参考Wang Meng等^[17]的实验方法测定细胞膜电位。分别向酿酒酵母菌悬液中加入不同终质量浓度(80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的香芹酚, 在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理30 min, 收集酵母细胞, 与终质量浓度为1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DiBAC₄(3)探针振荡混匀, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育30 min。漂洗2次后, 使用流式细胞仪检测酿酒酵母悬浮液的荧光强度。

1.3.4.5 线粒体膜电位的测定

参考Niu Liyuan等^[18]的方法, 略作调整。酿酒酵母经香芹酚处理后(处理方法同1.3.4.2节), 收集菌体并与等体积JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidocarbocyanine iodide)染色工作液混合均匀, 在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育20 min。使用多功能酶标仪测定JC-1多聚

体(红色)和JC-1单体(绿色)的荧光强度, 激发/发射波长分别为525/590 nm和490/530 nm。结果用线粒体膜电位的相对荧光强度表示, 计算参考式(2):

$$\text{JC-1相对荧光强度}/\% = \frac{N_3}{N_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: N_3 和 N_2 分别为处理组和未处理组样品的红、绿荧光强度的比值。

1.3.4.6 细胞内ATP含量的测定

采用ATP检测试剂盒测定ATP含量。经香芹酚处理后(处理方法同1.3.4.2节), 收集酿酒酵母细胞并重悬于细胞裂解液中, 煮沸10 min后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心5 min, 收集上清液。取100 μL ATP检测工作液加入到96孔板中, 室温孵育5 min, 然后添加100 μL 酵母菌裂解液。采用多功能酶标仪检测10 000 ms的发光强度。

1.3.4.7 细胞内 Ca^{2+} 含量的测定

酿酒酵母经香芹酚处理后(处理方法同1.3.4.2节), 收集菌体重悬浮至Fluo-3 AM荧光染料(终质量浓度为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)中, 在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育30 min。使用无菌生理盐水漂洗2次并重悬浮, 然后再次孵育25 min。孵育结束后, 使用多功能酶标仪在激发/发射波长为488/530 nm处检测荧光强度。结果用 Ca^{2+} 相对荧光强度表示, 计算参考式(3):

$$\text{Ca}^{2+}\text{相对荧光强度}/\% = \frac{N_5}{N_4} \times 100 \quad (3)$$

式中: N_5 和 N_4 分别为处理组和未处理组样品的荧光强度。

1.3.5 转录组测序分析

使用终质量浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 香芹酚在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理依据方法1.3.1节制备的酿酒酵母菌悬液($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 为0.8左右)30 min, 对照组不做任何处理。对照组和实验组均设置3个生物学重复。委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行RNA提取和RNA-Seq测序。使用DESeq2软件进行差异表达分析, 以 $|\log_2$ 差异倍数 >1 且校正 P 值(P_{Adj})小于0.05作为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的筛选标准。利用clusterProfiler软件对DEGs进行基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析, 当 $P_{\text{Adj}} < 0.05$ 时, 认为DEGs在该子类中被显著富集。

1.3.6 real-time PCR验证

使用RNA提取试剂盒提取各处理组酵母细胞总RNA。使用反转录试剂盒合成cDNA, 以cDNA为模板, 使用real-time PCR仪进行实验。表1列出了所使用的引物信息, real-time PCR条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火15~30 s, 循环45次; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20 s。以 $ACT1$ 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 归一化法计算基因相对表达量。

表1 real-time PCR引物序列
Table 1 Primer sequences used for real-time PCR

基因	引物序列 (5'-3')
ACT1	F: ACCGCTGCTCAATCTCTTC
	R: ATGATGGAGTTGTAAGTAGTTTGG
ATP20	F: CCAGTGGGTTGGTTTCTAAAG
	R: ACTGAATACCATATGCGCCA
COX5A	F: AACACTTTTACTAGAGCTGGTGGACT
	R: ATTGGACCTGAGAATAACCACCCC
QCR7	F: TTTTGAAGTCACCCGTCCTC
	R: TCTTGGGCTTTGATCCATTC
RSM19	F: ACCGGCAGCTAGACTTTTATC
	R: ATTGGAGTGCCCTTAGTCATG

1.4 数据处理

所有实验均重复3次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用SPSS 25.0软件对实验结果进行单因素方差分析和Duncan多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。采用Origin 2022、Adobe Illustrator 2022软件绘图。

2 结果与分析

2.1 香芹酚对酿酒酵母MIC的影响

如图1所示, 当香芹酚质量浓度为80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 与未处理组相比, 酿酒酵母出现了生长抑制。当香芹酚质量浓度低于40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 未表现出对酵母菌生长的抑制作用。当香芹酚质量浓度为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 酵母细胞生长完全被抑制, 因此, 香芹酚的MIC为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Chavan等^[19]也报道了相似的结果, 香芹酚对分离自酿酒葡萄果表的天然酿酒酵母的MIC为128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 这可能是由于实验方法和使用的菌株不同, 导致MIC略有差异。将香芹酚对酿酒酵母的MIC (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 用于后续环境因素对香芹酚抑制酿酒酵母效果的影响研究。

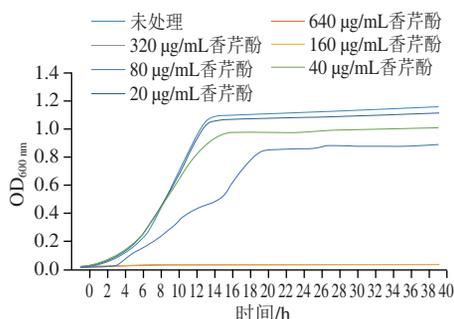
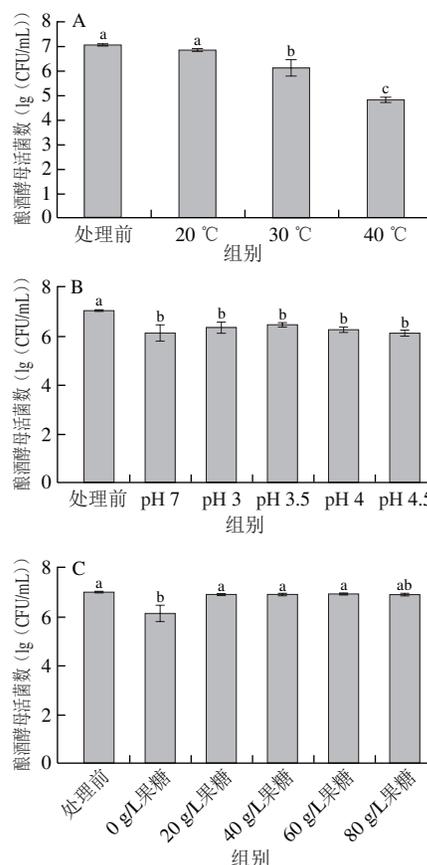


图1 不同质量浓度香芹酚作用下酿酒酵母的生长曲线
Fig. 1 Growth curves of *S. cerevisiae* cultivated with carvacrol at different concentrations

2.2 环境因素对香芹酚抑制酿酒酵母效果的影响

如图2A所示, 随着环境温度的升高, 香芹酚的抑菌效果不断增强, 在40 $^{\circ}\text{C}$ 时对酿酒酵母菌的抑制作用最强, 活菌数减少了2.23 ($\lg(\text{CFU}/\text{mL})$)。较高的温度可能增加细胞膜和线粒体膜的流动性, 并且能够

提高香芹酚的溶解度, 有助于增强酵母菌对香芹酚处理的敏感性^[20-21]。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图4、6、7同。
图2 温度(A)、pH值(B)、果糖(C)对香芹酚抑制酿酒酵母效果的影响

Fig. 2 Influence of temperature (A), pH (B) and fructose (C) on the inhibitory effect of carvacrol against *S. cerevisiae*

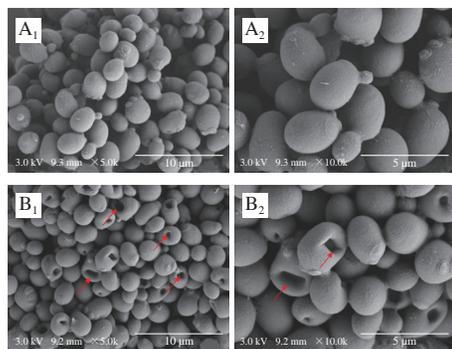
考虑到果蔬产品的pH值通常在3~4.5之间, 因此研究了该范围内pH值对香芹酚抑制酿酒酵母效果的影响。在不同pH值(7、3、3.5、4和4.5)条件下经香芹酚处理后, 酵母活菌数没有显著差异 ($P > 0.05$) (图2B)。以上结果表明, 低pH值环境(3~4.5)对香芹酚的抑菌效果没有显著影响, 符合酿酒酵母生长对环境pH值有较大适应性的特征^[22]。

果汁中的果糖是甜味与风味的重要来源, 是多数果汁中主要的糖类物质^[23-24]。如图2C所示, 果糖的添加降低了香芹酚对酿酒酵母的失活作用。果糖是细胞正常生长代谢所需的营养物质, 具有促进细胞能量代谢、稳定细胞膜等作用, 因此在环境胁迫下, 适当浓度的果糖有利于维持酵母细胞活性^[25]。

2.3 香芹酚对酿酒酵母细胞形态的影响

如图3A所示, 未经处理的酿酒酵母细胞表面完整, 呈规则的椭圆形或球形, 细胞表面没有明显的损伤。经终质量浓度为160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香芹酚在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件

下处理30 min后, 酵母细胞的表面出现不同程度的凹陷(图3B)。百里香酚为香芹酚的同分异构体, 区别在于羟基所在酚环上的位置不同。Wang Huxuan等^[26]发现62.5 μg/mL百里香酚在28 °C条件下处理鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*) 18 h会导致细胞表面出现明显皱缩。这表明细胞壁膜可能是香芹酚、百里香酚等单萜酚类化合物作用于酵母细胞的靶点之一。



A. 未处理组; B. 香芹酚处理组。下标1、2分别为放大5 000、10 000倍。

图3 香芹酚对酿酒酵母形态的影响

Fig. 3 Effect of carvacrol on the cellular morphology of *S. cerevisiae*

2.4 香芹酚对酿酒酵母细胞质膜通透性和完整性的影响

如图4A所示, 与未处理组相比, 香芹酚处理后酵母细胞内DNA泄漏量显著增加, 表明细胞膜通透性增加, 且与香芹酚质量浓度呈显著正相关。PI探针常被用于评估细胞膜的完整性^[27], 香芹酚处理导致酿酒酵母的PI相对荧光强度显著增加($P < 0.05$), 当香芹酚质量浓度为160 μg/mL时, PI相对荧光强度相对于未处理组增加了2.72倍(图4B)。Pei Shaopei等^[28]也报道了香芹酚处理会导致炭疽病菌的细胞质膜破裂。香芹酚具有较强的亲脂性, 可以与细胞膜相互作用, 溶解在磷脂双分子层中, 在脂肪酸链之间排列, 影响脂质分子间作用力, 导致细胞膜的膨胀和不稳定, 增加其流动性及渗透性, 甚至造成细胞膜破裂^[29-30]。百里香酚也能够改变鲁氏酵母细胞膜的通透性和完整性, 其可能通过氢键与膜蛋白疏水区域结合, 从而改变细胞膜结构^[26]。此外, 受损的细胞质膜可能允许香芹酚进入细胞内部, 破坏细胞内环境稳态, 如扰乱与能量产生和结构化合物合成有关的细胞酶系等, 从而增强其抗菌性^[31]。

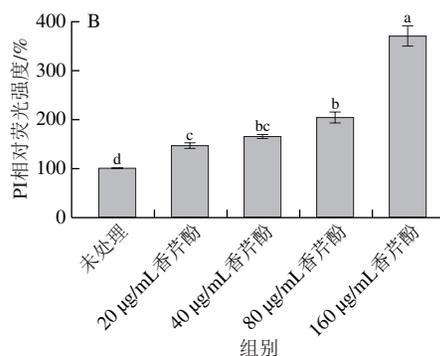
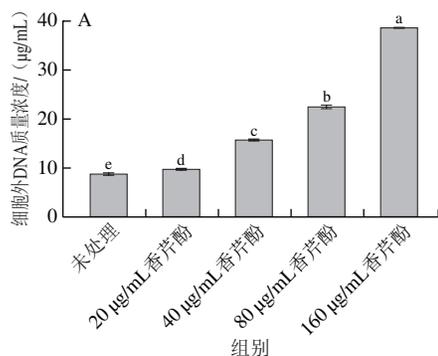
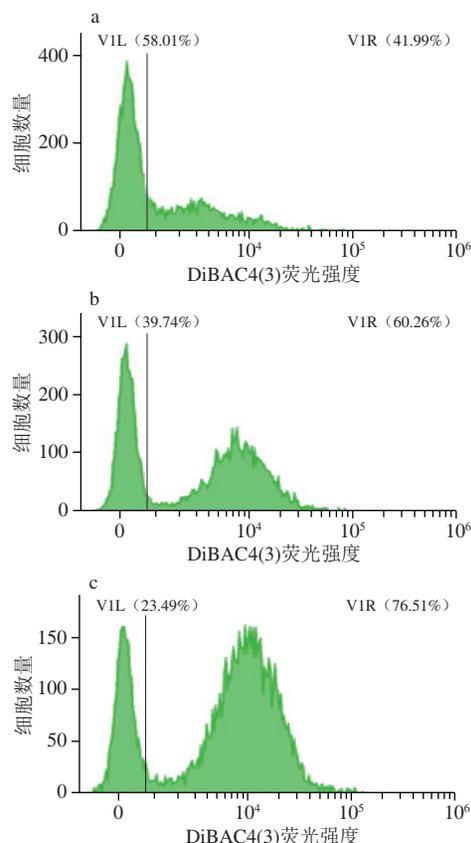


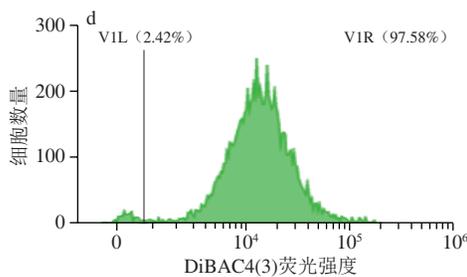
图4 香芹酚处理对酿酒酵母胞外DNA质量浓度(A)和PI相对荧光强度(B)的影响

Fig. 4 Effect of carvacrol treatment on extracellular DNA content (A) and relative PI fluorescence intensity (B) of *S. cerevisiae*

2.5 香芹酚对酿酒酵母细胞膜电位的影响

细胞膜电位在pH值稳态、物质转运等生理活动中起重要作用^[32]。DiBAC₄(3)染料可以进入去极化的细胞, 通过测定其荧光强度可以评估细胞膜的去极化程度^[17]。图5中左象限细胞亚群代表细胞膜电位正常的酵母细胞, 右象限细胞亚群代表细胞膜去极化的酵母细胞。经80、160、320 μg/mL香芹酚处理后DiBAC₄(3)阳性细胞数分别比未处理组(41.99%)显著增加了0.44、0.82、1.32倍。随着香芹酚处理浓度的增加, 酿酒酵母细胞膜去极化程度逐渐加重, 这可能与香芹酚的酚羟基有关。香芹酚含有的酚羟基可以作为单价阳离子载体, 释放H⁺, 结合胞内K⁺, 并将其转运至细胞外, 最终使细胞膜电位发生改变, 影响细胞正常的生命活动^[29-30]。





a~d.分别为未处理组和80、160、320 $\mu\text{g/mL}$ 香芹酚处理组。

图5 香芹酚处理对酿酒酵母细胞膜电位的影响

Fig. 5 Effect of carvacrol on the cell membrane potential of *S. cerevisiae*

2.6 香芹酚对酿酒酵母线粒体膜电位和胞内ATP含量的影响

线粒体膜电位具有合成ATP、驱动线粒体前体蛋白和代谢物的跨膜转运等重要生理功能^[33]。如图6A所示,经过不同质量浓度香芹酚处理后,酿酒酵母细胞的JC-1相对荧光强度显著降低。这表明香芹酚处理后酿酒酵母线粒体膜电位受到了破坏。线粒体膜电位降低会阻碍ATP的合成和膜电位依赖性运输,干扰细胞正常的代谢活动^[34-35]。经香芹酚处理后,酵母细胞内ATP含量显著降低(图6B)。研究表明,经62.5 $\mu\text{g/mL}$ 百里香酚处理后,鲁氏酵母细胞内ATP水平也出现明显下降^[26],线粒体膜去极化发生^[36],这与本研究的结果相一致。线粒体膜的去极化会造成能量的合成受阻。此外,处理后细胞膜完整性的丧失导致胞内ATP泄漏也可能是胞内ATP含量减少的另一个原因。

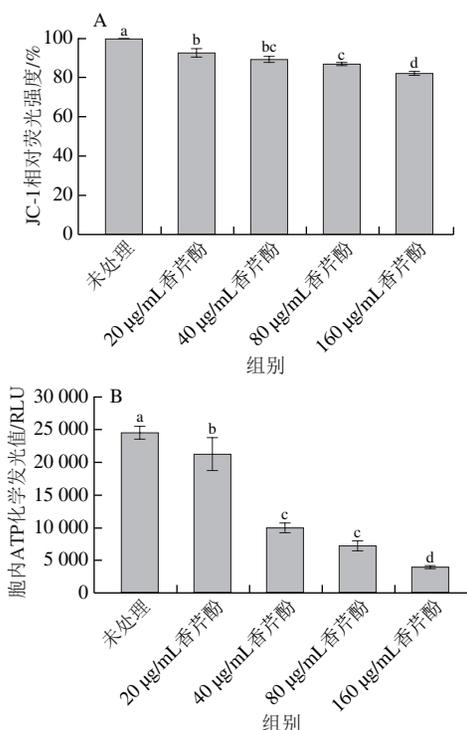


图6 香芹酚处理对酿酒酵母线粒体膜电位(A)和ATP含量(B)的影响

Fig. 6 Effect of carvacrol on the mitochondrial membrane potential (A) and ATP content (B) of *S. cerevisiae*

2.7 香芹酚对酿酒酵母细胞内 Ca^{2+} 含量的影响

在真核生物细胞中, Ca^{2+} 常作为第二信使,参与调控细胞的生理活动^[37]。正常情况下胞内 Ca^{2+} 含量较低,然而当受到外界环境胁迫刺激时,细胞可以通过多种途径使胞外 Ca^{2+} 内流,造成胞内 Ca^{2+} 含量增多,钙离子稳态失衡^[37]。经香芹酚处理后,酿酒酵母细胞内 Ca^{2+} 水平也发生了显著变化(图7)。当香芹酚质量浓度升高至80 $\mu\text{g/mL}$ 和160 $\mu\text{g/mL}$ 时,与未处理组相比,胞内 Ca^{2+} 含量分别显著增加了0.36倍和1.20倍($P < 0.05$)。百里香酚处理同样会诱导鲁氏酵母细胞内 Ca^{2+} 浓度呈剂量依赖性增加^[36]。高浓度的 Ca^{2+} 可以打开线粒体膜上的线粒体通透性转换孔,导致线粒体膜通透化的发生,诱发线粒体发生去极化以及氧化磷酸化解偶联,阻碍细胞的能量合成^[38-39]。香芹酚胁迫下钙离子内流现象可能与细胞膜膨胀及流动性变化导致钙离子通道打开有关^[12]。

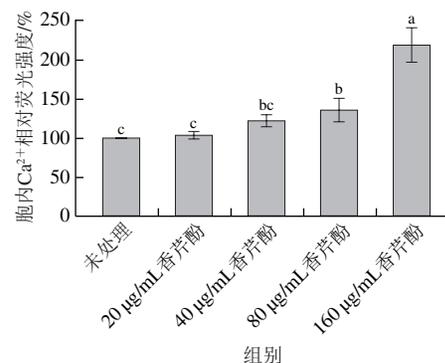


图7 香芹酚处理对酿酒酵母细胞内 Ca^{2+} 含量的影响

Fig. 7 Effect of carvacrol on the Ca^{2+} content in *S. cerevisiae*

2.8 差异表达基因分析

为了探究酿酒酵母对香芹酚胁迫的分子响应机制,将20 $\mu\text{g/mL}$ 香芹酚处理后酿酒酵母的基因表达谱与未处理组进行比较分析。结果发现经香芹酚处理后,酿酒酵母细胞中有16个基因表达上调,68个基因表达下调($P_{\text{Adj}} < 0.05$)。

2.9 DEGs的GO和KEGG富集分析

如图8所示,在生物过程方面,DEGs显著富集于ATP代谢、嘌呤核苷三磷酸代谢等过程中;在细胞组分方面,DEGs在细胞质、线粒体等子类中存在显著富集;在分子功能方面,DEGs则被显著富集于结构分子活性和核糖体的结构成分两类中($P_{\text{Adj}} < 0.05$)。

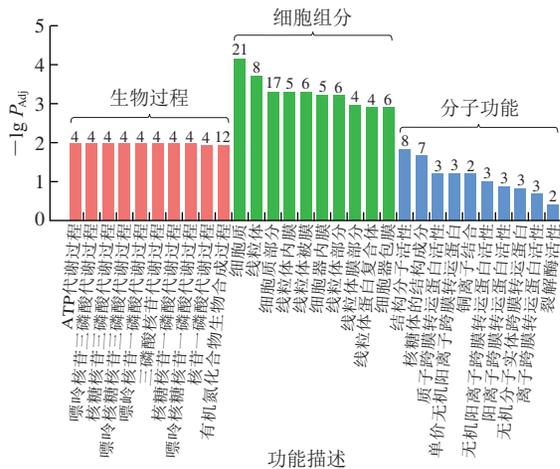


图8 香芹酚胁迫下酿酒酵母DEGs的GO功能富集分析

Fig. 8 GO functional enrichment analysis of DEGs in *S. cerevisiae* under carvacrol stress

此外, KEGG代谢通路富集分析结果显示, 香芹酚胁迫下DEGs显著富集于氧化磷酸化和核糖体两条通路中 ($P_{Adj} < 0.05$) (图9)。氧化磷酸化发生在真核生物细胞线粒体内膜上, 是细胞内合成ATP的重要途径。这与GO功能富集分析结果一致。

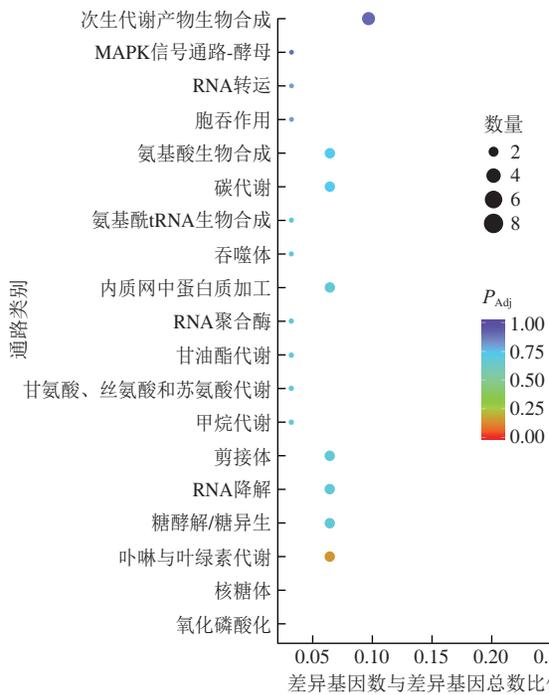


图9 香芹酚胁迫下酿酒酵母DEGs的KEGG代谢通路富集分析

Fig. 9 KEGG metabolic pathway enrichment analysis of DEGs in *S. cerevisiae* under carvacrol stress

2.10 部分重要基因的差异表达分析

表2为涉及ATP合成代谢(氧化磷酸化)和核糖体功能的差异表达大于2.0倍(即 $|\log_2$ 差异倍数 > 1)的基因信息。香芹酚处理导致酿酒酵母细胞中呼吸链复合体中细胞色素c还原酶、细胞色素c氧化酶和ATP合成酶相

关编码基因的表达水平显著下调 ($P_{Adj} < 0.05$)。此外, 编码线粒体核糖体(mitochondrial ribosome, MR)结构蛋白的相关基因转录水平也明显下调 ($P_{Adj} < 0.05$)。通过real-time PCR对关键基因(*ATP20*、*COX5A*、*QCR7*、*RSM19*)的表达进行验证, 结果如图10所示, real-time PCR结果与转录组测序结果趋势基本一致, 表明转录组测序结果具有较高的可信度。

表2 香芹酚胁迫下酿酒酵母部分关键DEGs

Table 2 Key DEGs in *S. cerevisiae* under carvacrol stress

基因编号	基因	\log_2 差异倍数	P_{Adj}	基因描述
氧化磷酸化相关				
YPR020W	<i>ATP20</i>	-2.651 27	0.000 0	ATP合成酶亚基g
YOL077W-A	<i>ATP19</i>	-2.141 14	0.012 1	ATP合成酶亚基k
YDL067C	<i>COX9</i>	-2.082 05	0.000 3	细胞色素c氧化酶亚基7A
YNL052W	<i>COX5A</i>	-1.740 55	0.003 0	细胞色素c氧化酶多肽5A
YDR322C-A	<i>TIM11</i>	-1.678 81	0.018 7	ATP合成酶亚基c
YLL009C	<i>COX17</i>	-1.620 50	0.048 5	细胞色素c氧化酶铜伴侣
YDR529C	<i>QCR7</i>	-1.562 94	0.038 7	细胞色素b-c1复合亚基7
MR相关				
YNR037C	<i>RSM19</i>	-2.264 08	0.019 5	37S核糖体蛋白质S19, 线粒体
YNL185C	<i>MRPL19</i>	-2.205 53	0.000 6	54S核糖体蛋白质L19, 线粒体
YML009C	<i>MRPL39</i>	-1.922 84	0.018 7	54S核糖体蛋白质L39, 线粒体
YPL183W-A	<i>RTC6</i>	-1.803 65	0.041 1	54S核糖体蛋白质RTC6, 线粒体
YCR071C	<i>IMG2</i>	-1.754 39	0.032 2	54S核糖体蛋白质IMG2, 线粒体
YNR036C	<i>MRPS12</i>	-1.692 21	0.005 2	37S核糖体蛋白质S12, 线粒体
YNL081C	<i>SWS2</i>	-1.445 07	0.049 1	37S核糖体蛋白质SWS2, 线粒体

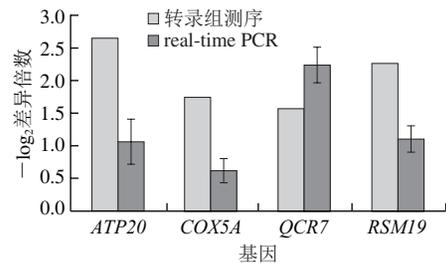


图10 基于real-time PCR验证香芹酚胁迫下酿酒酵母关键DEGs的表达水平

Fig. 10 Real-time PCR verification of expression levels of key DEGs in *S. cerevisiae* under carvacrol stress

2.11 香芹酚胁迫抑制酿酒酵母的分子机制

香芹酚胁迫下, 酿酒酵母细胞内线粒体呼吸链复合体相关编码基因的表达受到显著抑制, 表明电子传递受到抑制。真核细胞中线粒体膜电位的建立依赖于呼吸链中的电子传递^[40]。由于线粒体膜电位具有重要的生理功能, 包括合成ATP、代谢物的跨膜转运等, 因此, 当电子传递受到抑制时, 为了维持线粒体膜电位, 氧化磷酸化过程中ATP合成酶的功能会发生逆转, 由催化ATP形成转变为催化ATP分解, 同时将质子从线粒体内膜基质侧泵至内、外膜间隙^[33]。本研究中香芹酚胁迫下酵母细胞线粒体膜电位下降(图6A), 这可能与电子传递受阻有关, 这会导致ATP合成减少、消耗增多, 与胞内ATP含量

降低的结果一致(图6B)。然而,胞内ATP含量过低则会导致细胞坏死^[41]。香芹酚胁迫下ATP合成酶的编码基因显著下调,ATP合成酶的减少会降低胞内ATP的消耗。此外,香芹酚胁迫对MR结构蛋白合成的抑制作用也是阻碍呼吸链电子传递的原因之一。香芹酚胁迫下酿酒酵母DEGs显著富集于MR结构蛋白部分,涉及两个亚基合成的多个基因转录水平显著下降(表2),这表明MR蛋白质的生物合成受到抑制。MR蛋白参与MR组装和线粒体翻译,主要参与线粒体呼吸链复合体的生物合成^[42]。由此可见,香芹酚胁迫主要通过抑制线粒体呼吸链复合体编码基因的转录和翻译两种方式抑制电子传递,破坏线粒体膜电位,从而扰乱ATP代谢以及依赖线粒体膜电位的细胞活动。此外,作为许多药物的作用靶点,MR功能障碍还会影响线粒体稳态调节、细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等多种生命活动^[43-44]。以上转录组学分析表明,酿酒酵母细胞线粒体电子传递受阻与MR功能障碍可能是香芹酚胁迫酿酒酵母的重要机制。

3 结论

香芹酚能够抑制酿酒酵母的生长,随着处理温度的升高,香芹酚对酿酒酵母的抑制作用逐渐增强,pH值对其抑菌效果没有显著影响,然而果糖的添加则会显著降低其抗菌活性。香芹酚处理后,酿酒酵母细胞壁膜结构和功能紊乱,胞内物质泄漏,线粒体膜电位降低,胞内Ca²⁺浓度升高、ATP水平下降。基于转录组学分析发现,香芹酚胁迫抑制了线粒体呼吸链复合体、ATP合成酶以及MR结构蛋白的生物合成,这会阻碍呼吸链电子传递,干扰MR相关的生命活动。本研究明确了香芹酚胁迫下酿酒酵母生理特性和转录组水平的变化规律,揭示了香芹酚抑制酿酒酵母的潜在作用机制,可为天然防腐剂在果蔬汁产品中的开发和应用提供理论支持,对有效控制酿酒酵母在食品加工和贮藏过程中的腐败作用、保护消费者健康具有积极意义。同时,本研究也从分子水平上揭示了可以与香芹酚等类似单萜酚类化合物联合作用的其他真菌靶点,可为联合抑菌/杀菌技术的开发提供理论参考。

参考文献:

- [1] NIU L Y, WU Z H, YANG L R, et al. Antimicrobial effect of UVC light-emitting diodes against *Saccharomyces cerevisiae* and their application in orange juice decontamination[J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(1): 139-146. DOI:10.4315/JFP-20-200.
- [2] MA L, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 64: 23-38. DOI:10.1016/j.tifs.2017.03.005.
- [3] ZHAO P, NDAYAMBAJE J P, LIU X, et al. Microbial spoilage of fruits: a review on causes and prevention methods[J]. *Food Reviews International*, 2020, 38(Suppl 1): 225-246. DOI:10.1080/87559129.2020.1858859.
- [4] 王虎玄, 彭中花, 王聪, 等. 香芹酚对鲁氏接合酵母的抗菌活性及其机制[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(2): 27-39. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.02.003.
- [5] 韩维玲, 张冬城, 王江河, 等. 香芹酚及其衍生物的生物活性研究概述[J]. *化学试剂*, 2022, 44(11): 1551-1557. DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0263.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 135-138.
- [7] ULTEE A, BENNIK M H J, MOEZELAAR R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1561-1568. DOI:10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.
- [8] WANG H X, SUN H M. Assessment of different antimicrobials to inhibit the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* cocktail in concentrated apple juice[J]. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103549. DOI:10.1016/j.fm.2020.103549.
- [9] GUO Q, QING Y D, QIANG L Y, et al. Improving microbiological and physicochemical properties of fresh-cut apples using carvacrol emulsions[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102450. DOI:10.1016/j.fbio.2023.102450.
- [10] LU Y J, WU C Q. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment[J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(12): 2270-2275. DOI:10.4315/0362-028x-73.12.2270.
- [11] 王新伟, 社会云, 宋玉函, 等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抗真菌研究[J]. *食品科技*, 2011, 36(2): 193-196; 202. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2011.02.045.
- [12] RAO A, ZHANG Y Q, MUEND S, et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(12): 5062-5069. DOI:10.1128/AAC.01050-10.
- [13] 孙畅, 李湘, 王银红, 等. 山苍子精油对柑橘意大利青霉的抑菌活性及作用机制[J]. *食品科学*, 2023, 44(11): 17-25. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220722-253.
- [14] NIU L Y, ZHANG Y L, JIE M S, et al. Synergistic effect of *petit*-high pressure carbon dioxide combined with cinnamon (*Cinnamomum cassia*) essential oil against *Salmonella typhimurium*[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022, 57(5): 2954-2967. DOI:10.1111/ijfs.15613.
- [15] 谭婉静, 张笑薇, 白泓, 等. 丁香油与月桂酸对金黄色葡萄球菌的协同抑制作用[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(2): 278-285; 265. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0312.
- [16] XIANG Q S, WANG W J, ZHAO D B, et al. Synergistic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by plasma-activated water and mild heat[J]. *Food Control*, 2019, 106: 106741. DOI:10.1016/j.foodcont.2019.106741.
- [17] WANG M, BAI Z, LIU S, et al. Accurate quantification of total bacteria in raw milk by flow cytometry using membrane potential as a key viability parameter[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114315. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114315.
- [18] NIU L Y, LIU J F, WANG X P, et al. Effect of combined treatment with cinnamon oil and *petit*-high pressure CO₂ against *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Foods*, 2022, 11(21): 3474. DOI:10.3390/foods11213474.
- [19] CHAVAN P S, TUPE S G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine

- spoilage yeasts[J]. Food Control, 2014, 46: 115-120. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.05.007.
- [20] GILL A O, HOLLEY R A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(1): 1-9. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009.
- [21] MCELHANEY R N. Extreme environments[M]. California: Academic Press, 1976: 255-281. DOI:10.1016/B978-0-12-337850-7.50020-5.
- [22] 张倩雯, 王春霞, 杨丽芸, 等. 影响酿酒酵母发酵过程的因素分析[J]. 中国酿造, 2015, 34(12): 14-19.
- [23] MA B Q, CHEN J, ZHENG H Y, et al. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 86-91. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.09.032.
- [24] COELHO E M, PADILHA C V D, MISKINIS G A, et al. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: method validation and characterization of products from northeast Brazil[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 66: 160-167. DOI:10.1016/j.jfca.2017.12.017.
- [25] 王小彦, 董志, 路晓钦. 果糖对电离辐射诱发AHH-1细胞凋亡的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(7): 763-766. DOI:10.11699/cyxb20130724.
- [26] WANG H X, PENG Z H, SUN H M. Antifungal activities and mechanisms of *trans*-cinnamaldehyde and thymol against food-spoilage yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(3): 1197-1210. DOI:10.1111/1750-3841.16075.
- [27] ADDO K A, LI H, YU Y, et al. Unraveling the mechanism of the synergistic antimicrobial effect of cineole and carvacrol on *Escherichia coli* O157:H7 inhibition and its application on fresh-cut cucumbers[J]. Food Control, 2023, 144: 109339. DOI:10.1016/j.foodcont.2022.109339.
- [28] PEI S P, LIU R L, GAO H Y, et al. Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fructicola*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 163: 111126. DOI:10.1016/j.postharvbio.2020.111126.
- [29] BEN ARFA A, COMBES S, PREZIOSI-BELLOU L, et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(2): 149-154. DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x.
- [30] XU J, ZHOU F, JI B P, et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(3): 174-179. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x.
- [31] CONNER D E, BEUCHAT L R. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(2): 229-233. DOI:10.1128/AEM.47.2.229-233.1984.
- [32] KIM D K, KIM S J, KANG D H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts[J]. Food Research International, 2017, 97: 280-287. DOI:10.1016/j.foodres.2017.04.009.
- [33] 刘思琪. 氧化磷酸化缺陷激活适应性反应维持线粒体膜电位[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [34] CARRARO M, BERNARDI P. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast[J]. Cell Calcium, 2016, 60(2): 102-107. DOI:10.1016/j.ceca.2016.03.005.
- [35] GORLACH A, BERTRAM K, HUDECOVA S, et al. Calcium and ROS: a mutual interplay[J]. Redox Biology, 2015, 6: 260-271. DOI:10.1016/j.redox.2015.08.010.
- [36] WANG H X, PENG Z H, WANG C, et al. Thymol and *trans*-cinnamaldehyde induce apoptosis through a metacaspase-dependent mitochondrial pathway in food-spoilage yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(9): 4119-4136. DOI:10.1111/1750-3841.16285.
- [37] MA T Y, DEPRez M A, CALLEWAERT G, et al. Coordinated glucose-induced Ca²⁺ and pH responses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Cell Calcium, 2021, 100: 102479. DOI:10.1016/j.ceca.2021.102479.
- [38] 张瑞刚. 酵母对铅和铬胁迫的信号响应机制及吸附作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [39] CLAPHAM D E. Calcium signaling[J]. Cell, 2007, 131(6): 1047-1058. DOI:10.1016/j.cell.2007.11.028.
- [40] CHINOPOULOS C, ADAM-VIZI V J B E B A. Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2009, 1802(1): 221-227. DOI:10.1016/j.bbadis.2009.08.008.
- [41] EGUCHI Y, SHIMIZU S, TSUJIMOTO Y J C R. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis[J]. Cancer Research, 1997, 57(10): 1835-1840.
- [42] DESAI N, BROWN A, AMUNTS A, et al. The structure of the yeast mitochondrial ribosome[J]. Science, 2017, 355(6324): 528-531. DOI:10.1126/science.aal2415.
- [43] LI H B, WANG R X, JIANG H B, et al. Mitochondrial ribosomal protein L10 associates with cyclin B1/Cdk1 activity and mitochondrial function[J]. DNA and Cell Biology, 2016, 35(11): 680-690. DOI:10.1089/dna.2016.3271.
- [44] KARIM L, KOSMIDER B, BAHMED K. Mitochondrial ribosomal stress in lung diseases[J]. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2022, 322(4): L507-L517. DOI:10.1152/ajplung.00078.2021.