

香芹酚对鲁氏接合酵母的抗菌活性及其机制

王虎玄, 彭中花, 王 聪, 朱亚南, 孙宏民
(陕西科技大学食品科学与工程学院 西安 710021)

摘要 为研究植物源活性物质香芹酚对食品腐败菌鲁氏接合酵母的抗菌活性,首次从细胞凋亡角度解析其潜在的抑菌机制。采用牛津杯抑菌圈法和双倍稀释法分别测定抑菌圈直径(DIZ)、最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC),扫描电镜观察酵母细胞形态变化。采用流式细胞仪和酶标仪检测细胞凋亡系列典型生化和形态特征,并通过 qRT-PCR 检测凋亡关键调控因子转录水平的变化。香芹酚处理后鲁氏接合酵母的 DIZ、MIC 和 MFC 分别为 (13.67 ± 0.58) mm, 0.156 mg/mL 和 0.3125 mg/mL, MIC 和 MFC 香芹酚处理后鲁氏接合酵母细胞表面产生褶皱; MIC 香芹酚处理后鲁氏接合酵母胞内活性氧迸发, Ca^{2+} 浓度升高, 线粒体膜电位去极化, 半胱氨酸蛋白酶活化, 磷脂酰丝氨酸外翻及 DNA 断裂, 且促凋亡因子 *Yca1*、*Dnm1*、*Cyc1*、*Nuc1* 及 *Ndi1* 转录水平上调 1~4 倍。上述结果表明香芹酚可能通过依赖半胱氨酸蛋白酶的线粒体途径诱导鲁氏接合酵母凋亡,从而发挥抗菌活性。研究结果对解析香芹酚的抑菌机制提供了新思路,也为绿色、高效食品防腐剂的开发应用奠定了理论基础。

关键词 鲁氏接合酵母; 香芹酚; 抑菌活性; 凋亡; 食品防腐保鲜

文章编号 1009-7848(2023)02-0027-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.003

鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 是一种常见的食品腐败酵母,具有嗜糖、耐酸等生理特性,可引起浓缩水果汁、蜂蜜、果酱等腐败变质^[1]。团队前期从浓缩苹果汁 (70 °Brix, pH 3.5) 和浓缩海红果汁 (68 °Brix, pH 3.4) 中均分离出鲁氏接合酵母,并证实该菌能够在两种浓缩汁中生长,可见其污染能力极强,危害较大^[2-3]。鲁氏接合酵母污染,不仅改变食品外观,影响风味,降低营养价值,而且能代谢食品中糖分产气,造成食品胀包。尤其是玻璃、金属等密封包装,严重胀包会导致包装爆裂,对消费者安全危害极大。基于此,开发高效、安全的控制方法,及时预防、消除食品加工与贮存中鲁氏接合酵母污染,具有重要的意义。

食品加工与贮存中主要通过添加食品防腐剂控制微生物污染,然而,当前应用广泛的食品防腐剂大多是化学合成品,具有抗菌效果差,可被微生物降解以及对人体具有潜在毒性等应用弊端。随着人们对食品营养健康与质量安全要求的提高,

开发天然、高效的新型食品防腐剂引起全球相关科研工作者的广泛关注^[4-5]。香芹酚(图 1)是牛至、百里香等植物精油中的活性成分,已被美国食品药品监督管理局批准为“公认安全”的抗菌物质,也被列入我国 GB 2760-2014《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》,作为香精香料允许在食品中添加。研究表明,香芹酚对微生物具有高效抗菌活性,这种高效抗菌作用与香芹酚的疏水性及其结构中酚羟基的亲水性有关^[6]。团队前期以山梨酸钾、苯甲酸钠等传统食品防腐剂为参比,从多酚类、黄酮类、醌类等数十种植物源天然化合物中筛选对鲁氏接合酵母具有高效抗菌活性的化合物,发现香芹酚具有强大的抗菌作用^[7]。此外,团队前期研究发现香芹酚对苹果汁 (30 °Brix, pH 3.5) 中高污染量鲁氏接合酵母【约 6.3 lg(CFU/mL)】的生长表现出比山梨酸钾、苯甲酸钠、多羟基肉桂酸等更强的抑制活性^[8]。可以看出,香芹酚作为一种潜

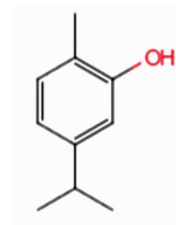


图 1 香芹酚结构式

Fig.1 Structure of carvacrol

收稿日期: 2022-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801506); 陕西省教育厅专项科研计划项目(20JK0550); 陕西科技大学人才引进项目(2016BJ-39)

第一作者: 王虎玄,男,博士,副教授

E-mail: wanghuxuan@sust.edu.cn

在的天然食品防腐剂,在高效控制鲁氏接合酵母污染方面具有广阔的应用前景。然而,香芹酚具体通过何种途径对鲁氏接合酵母发挥高效抗菌活性,尚不完全清楚。

细胞死亡包括程序性死亡(细胞凋亡)和非程序死亡(细胞坏死)。目前有关香芹酚抗菌机制的研究主要聚焦在微生物细胞坏死方面,包括香芹酚损伤微生物细胞屏障结构与功能,破坏核酸和蛋白质合成与功能,干扰细胞能量代谢等^[8-9]。近年来,研究发现一些天然物质如壳聚糖、聚赖氨酸、姜黄素等可通过诱导微生物细胞凋亡发挥抗菌活性^[10-11]。那么,在香芹酚对鲁氏接合酵母发挥抗菌活性的过程中,是否存在程序性死亡(细胞凋亡)尚不清楚。

本文通过测定抑菌圈直径、最小抑菌浓度和最小杀菌浓度,并采用扫描电镜观察鲁氏接合酵母细胞形态变化,明确香芹酚对鲁氏接合酵母的抗菌活性。通过检测细胞凋亡系列典型生化和形态特征以及凋亡关键调控因子转录水平变化,揭示香芹酚诱导鲁氏接合酵母凋亡的抗菌机制。研究结果旨在为充分解析香芹酚的抗菌机制提供新思路,也为新型食品防腐剂的开发应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌株 鲁氏接合酵母模式菌株 ATCC 2623, 购买于美国模式培养物集存库(ATCC), 保存于-70℃。

1.1.2 试剂 二甲基亚砜(DMSO)、氯化钠、D-山梨醇、戊二醛、无水乙醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、葡萄糖,均为分析纯级,天津市科密化学试剂有限公司;蛋白胨、酵母浸粉、琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;香芹酚(≥99.9%)、溶壁酶、两性霉素 B,上海源叶生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒、活性氧试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、Fluo-3AM 钙离子荧光探针、BeyoFastTMSYBR Green One-Step qRT-PCR Kit, 碧云天生物技术有限公司;香芹酚母液(10 mg/mL):取香芹酚原液溶于

DMSO 中,稀释定容至 20 mL,0.22 μm 有机滤膜过滤,4℃保存待用。

1.1.3 仪器 Beckmancoulter-xl.mcl 流式细胞仪,美国 Thermo 公司;Victor Nivo 酶标仪,芬兰 PerkinElmer 公司;Phenom Pro-台式扫描电镜,飞纳科学仪器(上海)有限公司;Mygo Pro-实时荧光定量 PCR,美国 BioRad 公司;TGL-16B 离心机,上海安亭科学仪器厂;PL-203 电子天平,梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司;XFH-50CA 灭菌锅,浙江新丰医疗器械有限公司;PWSIO-002 恒温培养箱,重庆试验设备厂;Vortex-2 涡旋混匀仪,上海沪析实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种复苏 将冻存的鲁氏接合酵母 ATCC 2623 从-70℃冰箱中取出,融化后将菌液转移至 YPD 液体培养基中,28℃,200 r/min 培养 24 h。取微量培养液接种于 YPD 平板进行培养,确认无杂菌后挑单菌落接种于 YPD 液体培养基,28℃培养 24 h 后,再次转接于 YPD 液体培养基,28℃培养至对数生长期(细胞浓度约 1.0×10^6 CFU/mL)后用于后续试验。

1.2.2 抑菌圈测定 使用牛津杯进行抑菌圈测定^[12]。向平板中倒入一层 YPD 半固体培养基,待其凝固后,用无菌镊子将牛津杯($d = 8$ mm)垂直放在培养基表面。YPD 固体培养基降至 35℃左右,加入酵母菌液(终浓度约 2×10^4 CFU/mL),混匀后倒入平板。待 YPD 固体培养基凝固后拔出牛津杯,向牛津杯孔中加入 100 μL 香芹酚溶液(10 mg/mL)。28℃培养 48 h 后测量抑菌圈直径。

1.2.3 MIC 及 MFC 测定 采用双倍稀释法测定 MIC 和 MFC^[13]。用 YPD 培养液将香芹酚母液(10 mg/mL)连续双倍稀释至不同质量浓度(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 mg/mL)。向 96 孔板中分别加入 100 μL 不同质量浓度香芹酚溶液和 100 μL 菌液(终浓度约 5×10^5 CFU/mL),香芹酚终质量浓度分别为 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078, 0.039 mg/mL。28℃培养 48 h 后,每孔加入 10 μL MTT(5 mg/mL)溶液,继续培养 4 h。观察孔中溶液颜色,无颜色变化孔所对应的香芹酚最低质量浓度为香芹酚对鲁氏接合酵母的 MIC 值。吸取 MIC 以上质量浓度处理的菌液进行 YPD 平板

涂布,28 ℃培养 48 h 后观察有无菌落形成, 无菌落形成的最低质量浓度为 MFC。

1.2.4 鲁氏接合酵母形态观察 收集对数生长期鲁氏接合酵母细胞,PBS 洗涤 3 次,离心(8 000 r/min,5 min)收集细胞。不同浓度(0、MIC、MFC)香芹酚处理鲁氏接合酵母细胞 4 h 后,离心收集细胞。戊二醛(2.5%)固定过夜,PBS 洗涤 3 次后进行乙醇梯度脱水(30%、50%、70%、90%、100%),离心收集细胞,自然风干后扫描电镜观察。

1.2.5 鲁氏接合酵母脱壁处理 由于荧光探针不能透过酵母细胞壁进入胞内,后续细胞凋亡系列典型生化 and 形态特征检测前需进行酵母脱壁处理。参考蔡瑾^[14]的方法进行鲁氏接合酵母脱壁处理。收集对数生长期鲁氏接合酵母细胞,PBS 洗涤 3 次后重悬于 PBS 中。酵母悬液加入香芹酚(终浓度分别为 0、1/4 MIC、1/2 MIC、MIC),处理(28 ℃,200 r/min)4 h,离心收集细胞(8 000 r/min,5 min)。PBS 洗涤 3 次后加入溶壁酶(终浓度为 200 U/mL),28 ℃处理 45 min 后离心收集细胞。PBS 洗涤后离心得到鲁氏接合酵母原生质体细胞。

1.2.6 胞内活性氧(ROS)水平检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 探针,涡旋混匀,28 ℃振荡孵育 30 min 后离心收集细胞。PBS 洗涤并重悬鲁氏接合酵母细胞,采用流式细胞仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)检测 DCF 荧光细胞的百分比和荧光强度。设置两性霉素 B 处理组(0.1 mg/mL)为阳性对照。

1.2.7 胞内钙浓度检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3AM 探针,涡旋混匀,28 ℃振荡孵育 60 min 后离心收集细胞。PBS 洗涤并重悬鲁氏接合酵母细胞,继续孵育 30 min 以确保 Fluo-3AM 在胞内完全转化成 Fluo-3。采用酶标仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)检测荧光强度。设置两性霉素 B 处理组(0.1 mg/mL)为阳性对照。

1.2.8 线粒体膜电位(MMP)检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,涡旋混匀,28 ℃振荡孵育 20 min 后离心收集细胞。JC-1 染色

缓冲液(1 \times)洗涤并重悬鲁氏接合酵母细胞,流式细胞仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)检测线粒体膜电位水平。设置两性霉素 B 处理组(0.1 mg/mL)为阳性对照。

1.2.9 半胱氨酸蛋白酶活性检测 参考蔡瑾的方法^[14]进行半胱氨酸蛋白酶活性检测。采用半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Z-VAD-FMK,终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$)预处理对数生长期鲁氏接合酵母细胞(约 1.0×10^6 CFU)1 h,PBS 洗涤后离心收集细胞。MIC 浓度香芹酚处理鲁氏接合酵母细胞 4 h,PBS 洗涤 3 次后将细胞重悬于生理盐水(0.9%)中,连续 10 倍梯度稀释,取 10 μL 不同稀释度细胞悬液点接于 YPD 平板。28 ℃培养 48 h,观察鲁氏接合酵母生长情况。

1.2.10 磷脂酰丝氨酸(PS)外翻检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),加入 195 μL AnnexinV-FITC 结合液重悬细胞,再加入 5 μL AnnexinV-FITC 工作液,最后加入 10 μL 碘化丙啶(PI)工作液,涡旋混匀后室温避光孵育 30 min。采用流式细胞仪检测(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)FITC 荧光细胞百分比和荧光强度。设置两性霉素 B 处理组(0.1 mg/mL)为阳性对照。

1.2.11 细胞核 DNA 片段化检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),将细胞用免疫染色固定液在 20 ℃固定 30 min,PBS 洗涤后离心收集细胞。采用免疫染色通透液重悬细胞,4 ℃孵育 10 min,PBS 洗涤后离心收集细胞。加入 50 μL TUNEL 检测液(5 μL TdT 酶和 45 μL 荧光标记物),28 ℃避光孵育 60 min,PBS 洗涤并重悬细胞。采用流式细胞仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)检测绿色荧光细胞的百分比和荧光强度。设置两性霉素 B 处理组(0.1 mg/mL)为阳性对照。

1.2.12 凋亡关键调控因子转录水平检测 取 1.2.5 节处理好的鲁氏接合酵母原生质体细胞(约 1.0×10^6 CFU),按照试剂盒说明书提取总 RNA,并采用 BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit 进行 cDNA 合成和 qRT-PCR 检测。PCR 体系为 20 μL (10 μL PCR 缓冲液、2 μL 聚合酶混合物、2 μL 正向引物、2 μL 反向引物、2 μL 模板、2

μL 去离子水)。首先进行 cDNA 合成 (50 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), 随后进行 qRT-PCR 检测 (95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 17 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 1 min)。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对转录水平。用于 qRT-PCR 的引物由上海碧云天生物科技有限公司设计并合成, 引物序列如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 引物的序列

Table 1 Sequence of primers used for qRT-PCR

基因	正向引物(F)/反向引物(R)	引物序列(5'-3')
<i>Mmi1</i>	F	AGGTGCTGAGGAAGGTGTTG
	R	AGCTTGAGCACCCCTTTTCAA
<i>Yca1</i>	F	TGGTGATGAGGTTGACGGTA
	R	ACCGCTTGAAAACCATCTTG
<i>Dnm1</i>	F	ACCAGGTCGTCGTTTTTACG
	R	TTCACCAATCGGGACCTTAG
<i>Cyc1</i>	F	TTTGAACCACTTTTGCCACA
	R	CATTCACGCCTTCTTTGAGG
<i>Nuc1</i>	F	CACCTCCTCCAGTTGTTGGT
	R	TCGACGACCCAATATGGATT
<i>Ndi1</i>	F	TTCTCCGGTTTACCACCAAC
	R	AATATGCCAAGGCACCCTAG
<i>18s rDNA</i>	F	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT
	R	ATTGCCTCAAACCTTCCATCG

1.3 数据处理

每组试验均重复 3 次, 数据以均值 \pm 标准差 ($n = 3$) 表示。采用 SPSS 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著 (Duncan's 多重比较)。

2 结果与讨论

2.1 香芹酚对鲁氏接合酵母的抑菌活性

香芹酚对鲁氏接合酵母的抑菌圈直径为 (13.67 ± 0.58) mm (图 2), MIC 和 MFC 分别为 0.156 mg/mL 和 0.3125 mg/mL, 说明香芹酚对食品腐败酵母鲁氏接合酵母具有一定抑菌活性。基于该试验结果, 与其它植物源活性物质如阿魏酸 (MIC = 17 mg/mL)、对香豆酸 (MIC = 1.23 mg/mL)、肉桂酸 (MIC = 0.35 mg/mL)、香草醛 (MIC > 2.28 mg/mL)、柠檬醛 (MIC = 0.17 mg/mL, MFC = 0.34 mg/mL)、柠檬烯 (MIC = 0.66 mg/mL, MFC = 2.64 mg/mL) 以及丁香酚 (MIC = 0.43 mg/mL, MFC = 0.86 mg/mL) 等相比^[15-16], 香芹酚对鲁氏接合酵母具有较强的抑菌活性。团队前期研究也发现香芹酚对苹果汁 (30 $^{\circ}\text{Brix}$, pH 3.5) 中高污染量鲁氏接合酵母【约 6.3 lg (CFU/mL)】的生长表现出比山梨酸



图 2 香芹酚对鲁氏接合酵母生长的影响

Fig.2 Effect of carvacrol on the growth of *Z. rouxii*

钾、苯甲酸钠、多羟基肉桂酸等更强的抑制活性^[1]。香芹酚是牛至、百里香等植物精油中的活性成分, 对微生物具有高效抗菌活性, 这种高效抗菌作用与香芹酚的疏水性及其结构中酚羟基的亲水性有关^[6]。因此, 香芹酚在高效防控食品中鲁氏接合酵母污染方面具有重要的应用价值。在后续实际应用中, 以聚乳酸、聚乙烯醇等可降解材料为基材, 以香芹酚为抗真菌剂, 制备食品活性包装膜。通过香芹酚的缓释持续抑制鲁氏接合酵母在浓缩果汁等食品表面的生长, 不仅可解决香芹酚水溶性差、易挥发等应用弊端, 还可避免香芹酚无法在高黏

度浓缩果汁等食品表面有效分散的问题。

2.2 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞形态的影响

如图 3 所示,空白对照组(图 3a)中鲁氏接合酵母细胞形态为典型的出芽酵母,外观椭圆形、饱满、表面光滑无凹陷;MIC(图 3b)或 MFC(图 3c)香芹酚处理后,鲁氏接合酵母细胞形态产生褶皱,

表明香芹酚影响鲁氏接合酵母细胞壁和细胞膜结构,也进一步证明香芹酚对鲁氏接合酵母具有抗菌活性。此外,MFC 香芹酚处理后鲁氏接合酵母细胞完整性良好,未出现明显细胞破裂,初步推断香芹酚可能并不通过诱导鲁氏接合酵母细胞坏死发挥抗菌活性。

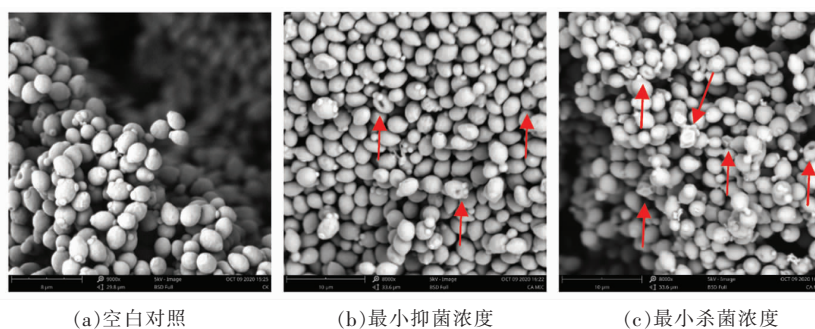


图 3 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞形态的影响

Fig.3 Effect of carvacrol on the cell morphology of *Z. rouxii*

2.3 香芹酚对鲁氏接合酵母胞内 ROS 含量的影响

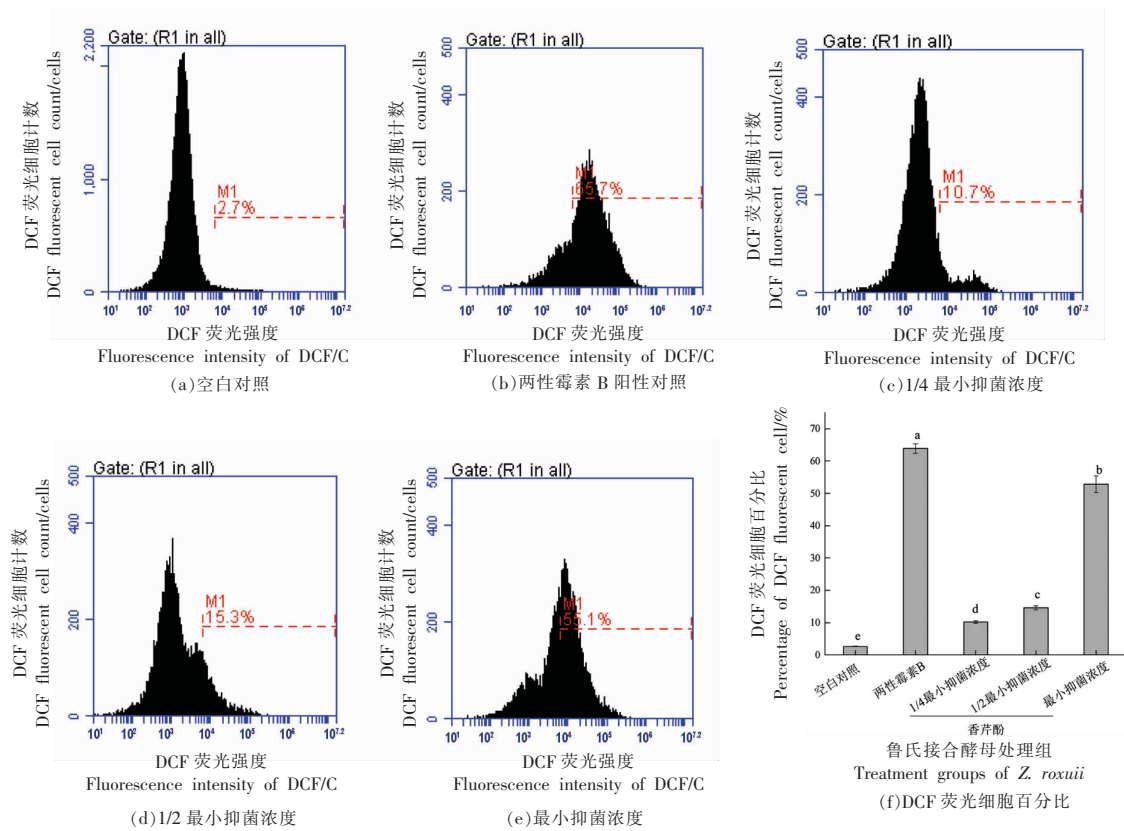
采用荧光探针(DCFH-DA)检测胞内活性氧水平。DCFH-DA 本身没有荧光,进入细胞后被胞内酯酶水解生成 DCFH,DCFH 可被胞内 ROS 氧化生成 DCF。DCF 具有荧光,通过流式细胞仪可对 DCF 荧光细胞的百分比及荧光强度进行检测。如图 4 所示,空白对照及阳性对照组中 DCF 荧光细胞的百分比分别为 $(2.68 \pm 0.03)\%$ 、 $(63.87 \pm 1.89)\%$;经 1/4MIC、1/2MIC 和 MIC 香芹酚处理后,DCF 荧光细胞的百分比分别显著提高至 $(10.27 \pm 0.48)\%$ 、 $(14.60 \pm 0.76)\%$ 和 $(52.77 \pm 2.58)\%$ ($P < 0.05$);并且 DCF 荧光强度随着香芹酚质量浓度升高逐渐升高(图谱逐渐右移)。上述结果表明香芹酚可通过浓度依赖的方式促进鲁氏接合酵母胞内活性氧的累积。

线粒体是产生 ROS 等启动细胞凋亡信号分子的主要细胞器,在细胞凋亡途径中发挥重要作用。ROS,尤其是羟自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-),被广泛认为是真菌细胞中与许多凋亡途径相关的关键细胞死亡调节因子^[14]。系统生物学和细胞调控通路分析发现大多数抗真菌药物在不同药物靶标相互作用的模式下均能触发羟自由基的形成,最终引发细胞凋亡^[17]。胞内

ROS 过量累积被认为是最早参与细胞凋亡的生理变化之一,其通过氧化核酸、蛋白质、脂质等生物大分子对细胞活力产生不利影响,导致一系列的凋亡反应^[18]。ROS 诱导的细胞损伤已被证明是天然活性物质(槲皮素、姜黄素、壳聚糖等)对霉菌(黄曲霉、毛状角囊菌等)和酵母菌(白色念珠菌、酿酒酵母等)发挥抗菌活性过程中常见的生化现象和主要的抗菌方式^[11,19-21]。本研究发现香芹酚以剂量依赖的方式诱导鲁氏接合酵母胞内 ROS 水平显著增加。基于此,ROS 水平升高是否引发鲁氏接合酵母细胞氧化应激并触发凋亡尚待进一步确认。后续通过测定 MMP 去极化、PS 外翻、DNA 片段化等系列典型凋亡特征,进一步探讨香芹酚对鲁氏接合酵母的抗菌机制。

2.4 香芹酚对鲁氏接合酵母胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

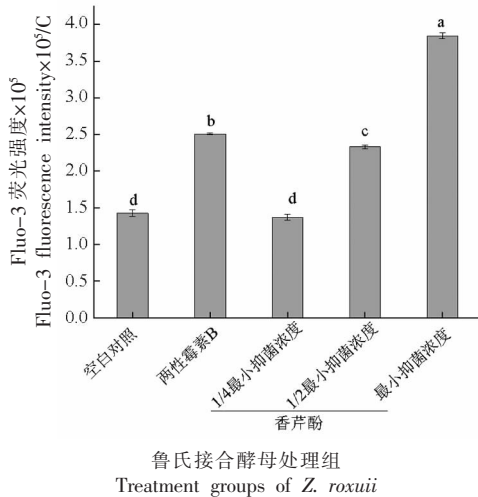
Fluo-3AM 是最常用的检测胞内 Ca^{2+} 浓度的荧光探针之一。Fluo-3AM 进入细胞后,被胞内酯酶裂解形成 Fluo-3,与胞质 Ca^{2+} 结合产生荧光,采用酶标仪检测其荧光强度即可表征胞内 Ca^{2+} 浓度。如图 5 所示,与空白对照组相比,经 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 香芹酚处理后,鲁氏接合酵母细胞荧光强度随着香芹酚浓度的增加而显著升高($P < 0.05$),表明香芹酚可促进鲁氏接合酵母胞内



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图4 香芹酚对鲁氏接合酵母胞内活性氧的影响

Fig.4 Effect of carvacrol on the intracellular ROS in *Z. rouxii*



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图5 香芹酚对鲁氏接合酵母胞内钙离子浓度的影响

Fig.5 Effect of carvacrol on the level of intracellular calcium in *Z. rouxii*

Ca²⁺浓度升高。

胞内 Ca²⁺在调控细胞凋亡中发挥重要作用。在正常细胞中,约 80%的 Ca²⁺储存在液泡、溶酶体、内质网等钙库中。当细胞受到外源性凋亡刺激后, Ca²⁺从钙库释放到细胞质中,导致胞内 Ca²⁺水平升高。此时线粒体依赖其膜电位的变化吸收胞质 Ca²⁺,导致线粒体 Ca²⁺超载,继而扰乱线粒体内氧化还原反应和 ATP 合成,引发 MMP 去极化、线粒体通透性转换孔(MPTP)的形成与开放、线粒体细胞色素C(cyt c)释放、基因调控的信号级联反应的发生以及最终的细胞凋亡^[21-22]。哺乳动物细胞内质网中 Ca²⁺可通过兰尼碱受体(内质网 Ca²⁺通道)泄漏,导致线粒体 Ca²⁺超载和细胞凋亡^[23]。外源性刺激构巢曲霉细胞后引发内质网应激,导致 Ca²⁺通过钙通道从内质网腔释放到胞质中,最终造成凋亡^[24]。在酵母细胞中,液泡中 Ca²⁺储量相对较高,液泡被认为是酵母胞内主要钙库。因此,液泡钙通道可能在调控胞质和线

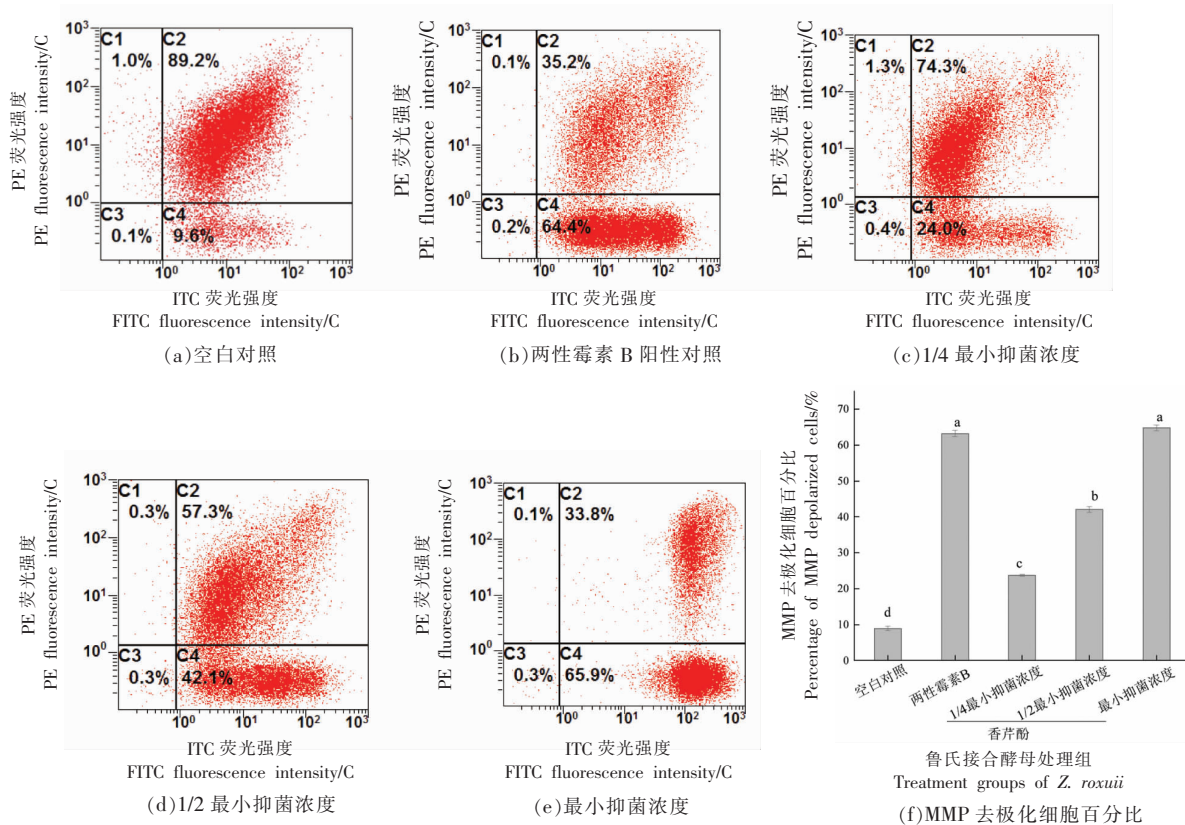
粒体 Ca^{2+} 紊乱引发的凋亡中扮演重要角色。此外,胞内 Ca^{2+} 超载也可能与 ROS 增加有关。ROS 氧化脂质后,细胞膜通透性增强,引发胞外 Ca^{2+} 内流^[25]。目前, Ca^{2+} 在天然活性物质诱导酿酒酵母、黄曲霉、灰葡萄孢等微生物凋亡研究中受到越来越多的关注^[19,24]。本研究发现香芹酚以剂量依赖的方式引发胞内 Ca^{2+} 浓度升高,提示胞内 Ca^{2+} 超载可能是香芹酚诱导鲁氏接合酵母凋亡的早期信号。

2.5 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞 MMP 的影响

荧光探针 JC-1 被广泛用于线粒体膜电位水平的检测。对正常细胞而言,JC-1 进入细胞后聚集在线粒体基质中,形成红色荧光 J-聚合物(图 6 流式细胞图 C2 象限);当 MMP 去极化引发细胞凋亡时,J-聚合物从线粒体释放到细胞质中,形成绿色荧光 JC-1 单体(图 6 流式细胞图 C4 象限);通过检测 J-聚合物与 JC-1 单体荧光细胞数比值 (FL2/FL1) 的变化趋势可表征 MMP 是否发生去极化。如图 6 所示,空白对照及阳性对照组 MMP 去

极化细胞的百分比分别为 $(9.37 \pm 0.71)\%$ 和 $(64.4 \pm 1.06)\%$;经 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 香芹酚处理后,MMP 去极化细胞百分比分别显著提高至 $(23.20 \pm 0.85)\%$ 、 $(42.17 \pm 0.82)\%$ 和 $(65.03 \pm 1.37)\%$ ($P < 0.05$);并且 JC-1 单体荧光强度随着香芹酚质量浓度升高逐渐升高(图谱逐渐右移)。对 FL2/FL1 进行计算,如图 6f 所示,空白对照及阳性对照组 FL2/FL1 分别为 9.58 ± 0.85 和 0.49 ± 0.05 ;经香芹酚处理后,FL2/FL1 分别显著降低至 3.25 ± 0.12 、 1.36 ± 0.05 和 0.52 ± 0.03 ($P < 0.05$)。上述结果表明香芹酚可通过质量浓度依赖的方式促进鲁氏接合酵母 MMP 去极化。

MMP 通常是表征线粒体能量偶联状况的敏感指标,凋亡细胞胞内 ROS 水平升高和 Ca^{2+} 紊乱可触发 MMP 去极化^[25]。MMP 去极化表明线粒体功能出现障碍,通常伴有线粒体肿胀、线粒体脊线缺失、氧化磷酸化链解偶联、胞内 ATP 合成受到抑制等^[11,26]。此外,MMP 去极化促进线粒体 MPTP



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图 6 香芹酚对鲁氏接合酵母线粒体膜电位的影响

Fig.6 Effects of carvacrol on the MMP in *Z. rouxii*

形成和开放,引发促凋亡因子如 *cyt c*、*Aif1p*(凋亡诱导因子)等释放到细胞质中,导致蛋白质、DNA等生物大分子损伤,最终造成细胞凋亡^[18]。因此,MMP去极化被认为是最早的细胞凋亡事件之一。本研究发现香芹酚通过降低MMP引发鲁氏接合酵母线粒体不可逆去极化,这可能是由于线粒体中ROS过度积累和线粒体Ca²⁺超载,启动线粒体线性过度和去能,最终导致MMP崩溃^[14]。

2.6 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞半胱氨酸蛋白酶活性的影响

采用泛半胱氨酸蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK检测半胱氨酸蛋白酶活性。Z-VAD-FMK穿透细胞膜进入胞内后可抑制由半胱氨酸蛋白酶激活导致的细胞凋亡。结果如图7所示,与空白对照组相比,MIC香芹酚虽可显著抑制鲁氏接合酵母生长,但Z-VAD-FMK预处理可减弱香芹酚的抑菌活性,说明香芹酚可激活鲁氏接合酵母细胞半胱氨酸蛋白酶,也表明香芹酚可能依赖半胱氨酸蛋白酶诱导鲁氏接合酵母凋亡。

半胱氨酸蛋白酶是细胞质中一类结构相似的家庭蛋白,其重要的共同特征是活性位点都含有半胱氨酸,因此被称为半胱氨酸蛋白酶。该酶保守的半胱氨酸侧链通过特异性裂解与天冬氨酸接触的蛋白底物驱动催化反应,一些半胱氨酸蛋白酶的活化被认为是参与哺乳动物细胞凋亡的关键过程之一^[27]。虽然在真菌细胞中未发现半胱氨酸蛋白酶,但其结构同源物已被发现在真菌、原生动物和植物细胞中具有触发凋亡的作用^[28]。半胱氨酸蛋白酶的激活可开启多种凋亡现象,包括凋亡蛋白酶水解信号的级联触发、细胞骨架坍塌和DNA片段化等,因此被认为是早期凋亡的典型生化标志之一^[21]。通过序列比对,团队前期在鲁氏接合酵母ATCC 2623基因组中发现一个编码序列(ZY-ROOF10802g)与酿酒酵母中编码半胱氨酸蛋白酶的*Yca1*基因序列高度相似,提示鲁氏接合酵母中可能也存在半胱氨酸蛋白酶(未发表)。本研究发现,香芹酚影响鲁氏接合酵母线粒体稳态,导致胞内ROS和Ca²⁺水平升高以及线粒体MMP去极化。因此,推测线粒体紊乱引发线粒体*cyt c*释放到细胞质中与半胱氨酸蛋白酶结合,继而激活半胱氨酸蛋白酶,开启凋亡进程,最终导致鲁氏接合

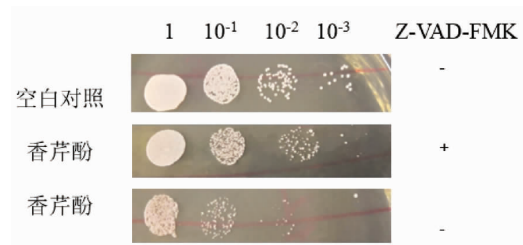


图7 香芹酚对鲁氏接合酵母半胱氨酸蛋白酶活性的影响

Fig.7 Effect of carvacrol on the action of metacaspase in *Z. rouxii*

酵母凋亡。

2.7 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞PS的影响

采用Annexin V-FITC和PI双染法检测PS外翻。当细胞发生早期凋亡时,细胞膜上的PS由质膜内侧翻到外侧,可通过检测胞外PS暴露表征早期凋亡。Annexin V-FITC是一种用荧光基团FITC标记的磷脂结合蛋白,对PS具有很强的亲和力。PI染料不能透过正常细胞的完整细胞膜,然而当细胞坏死后发生破裂,PI进入胞内使细胞染色。采用Annexin V-FITC和PI对细胞进行双染,通过流式细胞仪可区分正常细胞(图8流式细胞图B3象限)、凋亡细胞(图8流式细胞图B4象限)和坏死细胞(图8流式细胞图B2象限)。如图8所示,空白对照及阳性对照组FITC荧光细胞的百分比分别为(2.6 ± 0.08)%、(78.90 ± 0.65)%;经1/4MIC、1/2MIC和MIC香芹酚处理后,FITC荧光细胞百分比分别显著提高至(16.17 ± 0.25)%、(69.17 ± 0.74)%和(83.47 ± 0.82)%($P < 0.05$),说明香芹酚可通过质量浓度依赖的方式引发鲁氏接合酵母细胞PS外翻。此外,不同质量浓度香芹酚处理后PI荧光细胞百分比显著低于阳性对照组(图8f),说明香芹酚主要引起鲁氏接合酵母凋亡,并未导致细胞坏死(细胞破裂)。

哺乳动物和真菌细胞早期凋亡时,细胞膜磷脂双分子层的结构会发生变化。正常生理条件下,磷脂不对称分布于细胞膜内外侧,PS主要分布于细胞膜内侧。磷脂的不对称分布主要由细胞膜上的两种酶维持。ATP依赖的氨基磷脂转位酶(Translocase)特异性将PS和磷脂酰乙醇酰胺(PE)转运到细胞膜内小叶,同时ATP依赖的转位

酶(Floppase)则将 PS 和磷脂酰胆碱(PC)转运到质膜外小叶,然而转位酶的转运速率比氨基磷脂转位酶慢 10 倍,导致细胞膜磷脂的不对称分布^[29]。由于细胞凋亡过程中氨基磷脂转位酶活性大幅下降,膜脂的不对称性被破坏,造成 PS 外翻^[21]。因

此,PS 外翻已成为凋亡细胞的重要形态标志之一。本研究通过 Annexin V-FITC 和 PI 双染检测发现香芹酚诱导 PS 暴露于鲁氏接合酵母细胞膜外小叶,表明香芹酚可能引发鲁氏接合酵母细胞早期凋亡。

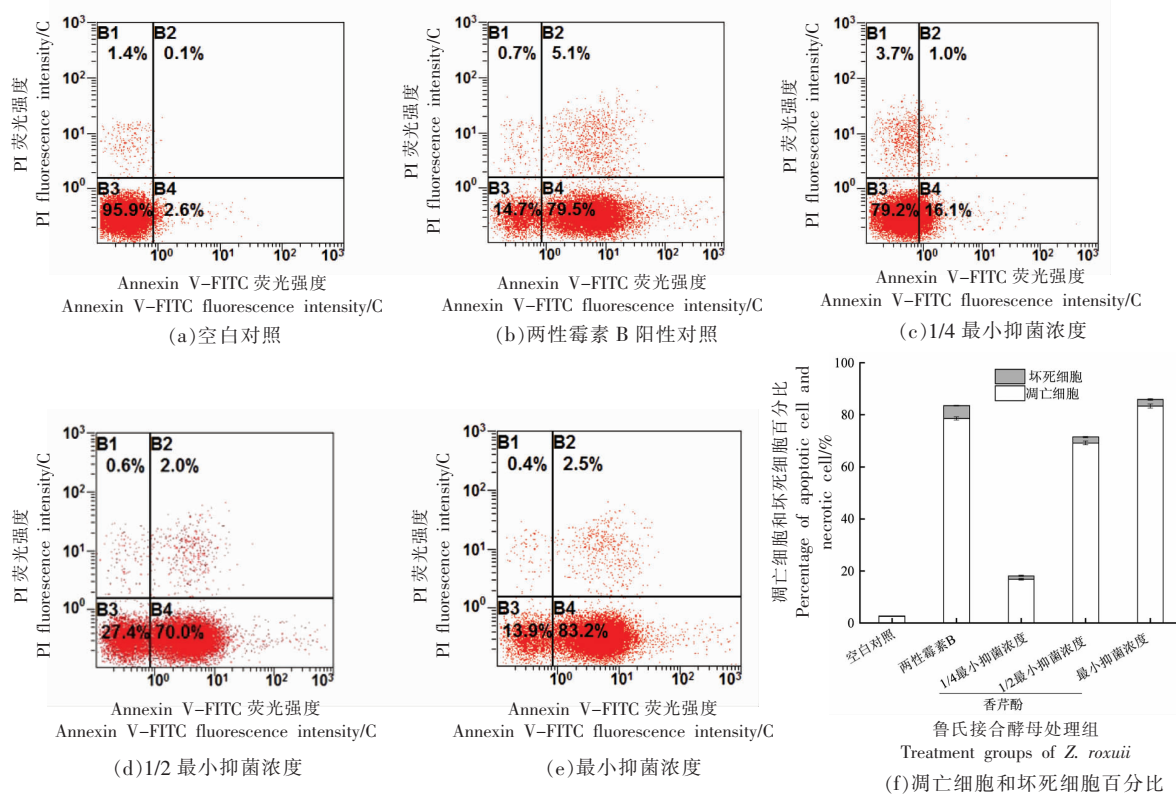


图 8 香芹酚对鲁氏接合酵母磷脂酰丝氨酸的影响

Fig.8 Effects of carvacrol on the PS in *Z. rouxii*

2.8 香芹酚对鲁氏接合酵母细胞 DNA 的影响

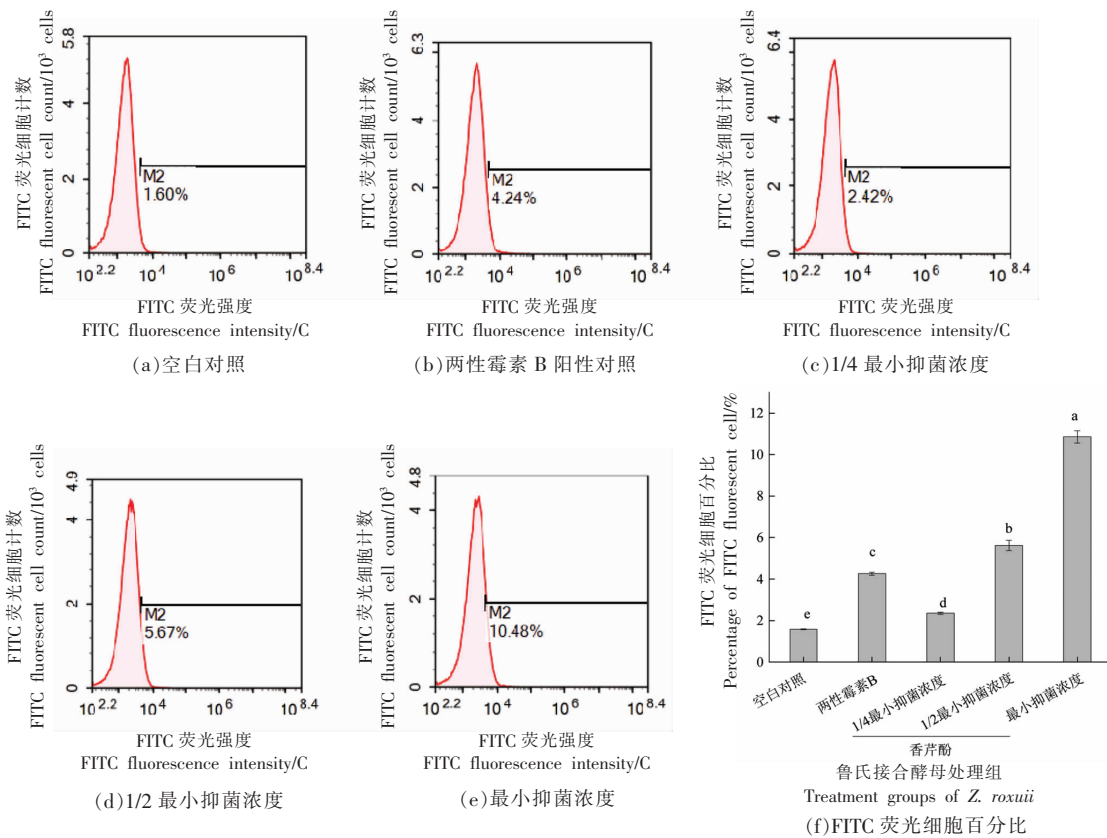
采用 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) 法进行 DNA 断裂检测。细胞发生凋亡时,胞内一些 DNA 内切酶被激活,剪断基因组 DNA,导致大量的 DNA 断裂。暴露的 3'-OH 在末端脱氧核糖核酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 的催化下加上绿色荧光探针荧光素(FITC)标记的 dUTP(Fluorescein-dUTP),从而通过流式细胞仪检测发生 DNA 断裂细胞的百分比。如图 9 所示,空白对照及阳性对照组 FITC 荧光细胞的百分比分别为 $(1.60 \pm 0.03)\%$ 和 $(4.26 \pm 0.07)\%$; 经 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 香芹酚处理后, FITC 荧光细胞的百分比显著提高至 $(2.44 \pm$

$0.06)\%$, $(5.66 \pm 0.05)\%$ 和 $(10.44 \pm 0.08)\%$ ($P < 0.05$),说明香芹酚通过浓度依赖的方式诱导鲁氏接合酵母细胞 DNA 断裂。

细胞受到凋亡诱导信号刺激时,线粒体 MPTP 打开并释放凋亡诱导因子 Aif1p。在易位到细胞核后, Aif1p 通过其 DNA 结合域直接作用于基因组 DNA,与来自线粒体的另一种细胞死亡诱导因子 Nuc1p 协同导致 DNA 片段化^[30]。在酵母细胞中, Aif1p 不仅诱导不依赖半胱氨酸蛋白酶的凋亡,而且还与半胱氨酸蛋白酶和 cyt c 协同作用诱导凋亡。DNA 损伤还与胞内 ROS 积累有关,ROS 通过诱导生成丙二醛损伤 DNA^[21]。此外,一些植物源化合物通过类似于 EB 插入 DNA 的方式影响 DNA

结构,或通过静电作用与DNA相互作用,造成DNA损伤^[31]。DNA损伤进一步导致凋亡小体的形成和细胞体积的减小,最终引发凋亡。因此,DNA片段化被认为是晚期细胞凋亡的细胞学标志。本研究发现香芹酚可导致鲁氏接合酵母胞内ROS水平升高,线粒体紊乱以及半胱氨酸蛋白酶激活,提示鲁氏接合酵母DNA片段化可能是由ROS氧

化、线粒体凋亡诱导因子切割以及半胱氨酸蛋白酶激活核酸内切酶共同作用的结果。整体来看,本研究表明香芹酚在鲁氏接合酵母早期和晚期凋亡中对细胞生化和形态变化有显著影响,香芹酚通过半胱氨酸蛋白酶依赖的线粒体途径诱导鲁氏接合酵母凋亡。



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图9 香芹酚对鲁氏接合酵母DNA的影响

Fig.9 Effects of carvacrol on DNA in *Z. rouxii*

2.9 香芹酚对鲁氏接合酵母凋亡关键调控因子转录的影响

以18S rDNA为内参,采用qRT-PCR检测香芹酚对鲁氏接合酵母凋亡关键调控因子转录的影响。结果如图10所示,与空白对照相比,MIC香芹酚处理导致促凋亡因子Yca1、Dnm1、Cyc1、Nuc1与Ndi1相对表达量上调1~4倍,进一步证实香芹酚可诱导鲁氏接合酵母凋亡。

酵母细胞凋亡不仅表现出与哺乳动物细胞相似的形态和生化特征,而且具有相似的关键调控

因子。YOR197W蛋白Yca1p被认为是酿酒酵母中哺乳动物半胱氨酸蛋白酶的同源蛋白,在诱导细胞凋亡中发挥关键作用^[32]。AMID是一种位于哺乳动物细胞线粒体外膜的凋亡诱导蛋白,可在细胞核周围聚集并引发染色体收缩。位于线粒体膜内的NADH脱氢酶Ndi1p是AMID的酵母同源物,具有促进酵母凋亡的功能^[33]。EndoG是哺乳动物细胞编码核基因的一种DNA酶,参与线粒体DNA复制。凋亡刺激时,EndoG从线粒体转移到细胞核,导致DNA片段化。Nuc1p是EndoG的酵

母同源物,是位于线粒体上的细胞死亡诱导因子。与 EndoG 类似,在凋亡过程中,Nuc1p 转移到细胞核中切割 DNA,引起 DNA 断裂^[34]。线粒体分裂是哺乳动物细胞凋亡的原因之一,受线粒体分裂蛋白 Drp1p 的调控。在不同死亡因素的刺激下,Drp1 的酵母同源物 Dnm1 在线粒体破裂和降解之前可诱导凋亡^[14]。在本研究中,MIC 香芹酚处理导致 *Yca1*、*Dnm1*、*Nuc1*、*Ndi1* 和 *Cyc1* 转录上调,进一步证实香芹酚通过半胱氨酸蛋白酶依赖的线粒体途径诱导鲁氏接合酵母凋亡。

3 结论

本文系统研究了植物源活性物质香芹酚对食品腐败酵母鲁氏接合酵母的抗菌活性,并首次从细胞凋亡的角度深入解析了其潜在的抗菌机制。结果表明,香芹酚可能通过半胱氨酸蛋白酶依赖的线粒体途径诱导鲁氏接合酵母凋亡(图 11),从而发挥高效抗菌活性:香芹酚诱导鲁氏接合酵母胞内 ROS 和 Ca^{2+} 水平升高,是鲁氏接合酵母细胞凋亡的早期信号;香芹酚诱导胞内 ROS 和 Ca^{2+} 水平升高可能直接影响线粒体稳态并损伤 DNA,导致 MMP 去极化;MMP 去极化可能促进线粒体 *cyt c* 释放到细胞质中,导致半胱氨酸蛋白酶激活,从而触发细胞凋亡进程,包括 PS 外翻和 DNA 片段化等。本研究表明香芹酚在食品防腐保鲜方面具有重要的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 王虎玄, 岳田利, 胡仲秋, 等. 陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定[J]. 农业机械学报, 2015, 46 (4): 246-251.
- [3] WANG H X, YUE T L, HU Z Q, et al. Identification of osmotolerant yeast in apple juice concentrate from Shaanxi [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46 (4): 246-251.
- [3] 王虎玄, 刘婷, 马原, 等. 陕西浓缩海红果汁中高

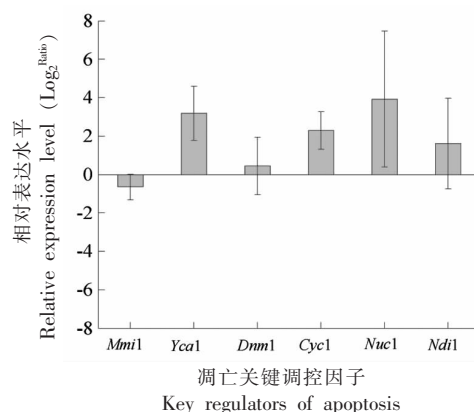


图 10 香芹酚对鲁氏接合酵母凋亡关键调控因子转录的影响

Fig.10 Effects of carvacrol on the transcription level of key regulators of apoptosis in *Z. rouxii*

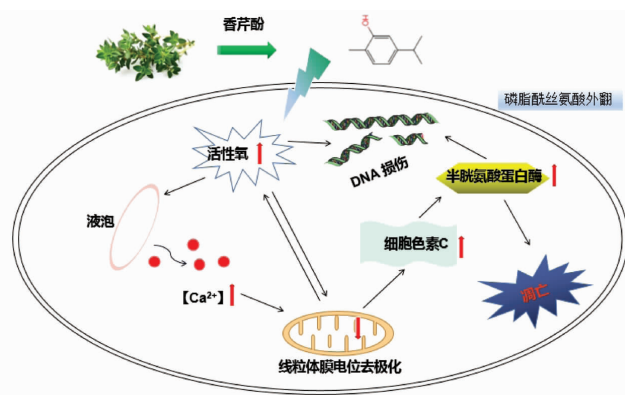


图 11 香芹酚诱导鲁氏接合酵母凋亡的潜在机制

Fig.11 The potential mechanism of carvacrol-induced apoptosis in *Z. rouxii*

渗酵母的分离鉴定[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(6): 114-119.

WANG H X, LIU T, MA Y, et al. Identification of osmotolerant yeast in sea red juice concentrate from Shaanxi [J]. Journal of Shaanxi University of Science and Technology, 2017, 35(6): 114-119.

- [4] MUNEKATA P E S, ROCCHETTI G, PATEIRO M, et al. Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: An overview [J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 31: 81-87.
- [5] JU J, XU X M, XIE Y F, et al. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth

of *Aspergillus niger* on bread [J]. Food Science and Technology, 2018, 33(1): 114-119.

- on baked foods[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 850–855.
- [6] PASTORKOVA E, ZAKOVA T, LANDA P, et al. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 161(3): 209–213.
- [7] 王虎玄, 张淑晴, 廖川, 等. 植物源活性物质对鲁氏接合酵母抑菌活性评价及抑菌机制研究[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(6): 114–119.
- WANG H X, ZHANG S Q, LIAO C, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of plant-derived active substances against *Zygosaccharomyces rouxii* and study on the antimicrobial mechanism[J]. Journal of Shaanxi University of Science and Technology, 2017, 35(6): 114–119.
- [8] BURT S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223–253.
- [9] KONG J, ZHANG Y, JU J, et al. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 380–388.
- [10] 侯颖, 马文瑞, 程雅文, 等. 聚赖氨酸偶联活性氧诱导酿酒酵母细胞凋亡[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 81–87.
- HOU Y, MA W R, CHENG Y W, et al. Polylysine coupled with reactive oxygen species induces cell apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2020, 41(10): 81–87.
- [11] LI T J, ZHANG Y, XU M J, et al. Novel antifungal mechanism of oligochitosan by triggering apoptosis through a metacaspase-dependent mitochondrial pathway in *Ceratocystis fimbriata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 245: 116574.
- [12] 王梦如, 王雨佳, 陈金虎, 等. 3种茶树精油的GC-MS分析及体外抑菌研究[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 291–296.
- WANG M R, WANG Y J, CHEN J H, et al. Analysis of three essential oils of tea tree by GC-MS and study on antibacterial activity[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(4): 291–296.
- [13] QU S, YANG K L, LEI C, et al. Cinnamaldehyde, a promising natural preservative against *Aspergillus flavus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2895 – 2895.
- [14] 蔡瑾. 白桦脂酸对酿酒酵母凋亡的调控及与酵母液泡蛋白酶 Pep4p 的关联研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- CAI J. Betulinic acid mediates apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* and the association study of vacuolar protease Pep4p[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [15] CAI R, HU M, ZHANG Y, et al. Antifungal activity and mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 106: 50–56.
- [16] WANG H X, HU Z Q, LONG F Y, et al. The effects of stress factors on the growth of spoilage yeasts isolated from apple-related environments in apple juice[J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(2): 162–171.
- [17] KOHANSKI M A, DWYER D J, WIERZBOWSKI J, et al. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death[J]. Cell, 2012, 135(4): 679–690.
- [18] TIAN J, LU Z, WANG Y, et al. Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca²⁺ and ROS in *Candida albicans*[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017, 85: 114–122.
- [19] HU L B, BAN F F, LI H B, et al. Thymol induces conidial apoptosis in *Aspergillus flavus* via stimulating K⁺ eruption[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2018, 66(32): 8530–8536.
- [20] KWUN M S, LEE D G. An insight on the role of nitric oxide in yeast apoptosis of curcumin-treated *Candida albicans*[J]. Current Microbiology, 2020, 77(10): 3104–3113.
- [21] YUN D G, LEE D G. Silibinin triggers yeast apoptosis related to mitochondrial Ca²⁺ influx in *Candida albicans*[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2016, 80: 1–9.
- [22] GAO J, CHEN J, TANG X, et al. Mechanism underlying mitochondrial protection of asiatic acid against hepatotoxicity in mice[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006, 58(2): 227–233.
- [23] SANTULLI G, MARKS A R. Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain

- metabolism, and aging[J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2015, 8(2): 206–222.
- [24] COLABARDINI A C, DE CASTRO P A, DE GOUVEA P F, et al. Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(5): 1259–1279.
- [25] 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.
- [26] AWASTHI B P, MITRA K. *In vitro* leishmanicidal effects of the anti-fungal drug natamycin are mediated through disruption of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(7/8): 420–435.
- [27] BOOJAR M M A, BOOJAR M M A, GOLMOHAMMAD S. Overview of silibinin anti-tumor effects [J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2020, 23: 100375.
- [28] HAMANN A, BRUST D, OSIEWACZ H D. Apoptosis pathways in fungal growth development and ageing [J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(6): 276–283.
- [29] SHIN H W, TAKATSU H. Phosphatidylserine exposure in living cells[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 55(2): 166–178.
- [30] LIANG Q L, LI W, ZHOU B. Caspase-independent apoptosis in yeast[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2008, 1783(7): 1311–1319.
- [31] LIU T, KANG J M, LIU L. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 136(2): 110354.
- [32] MAZZONI C, FALCONE C. Caspase-dependent apoptosis in yeast[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008, 1783(7): 1320–1327.
- [33] LI W, SUN L, LIANG Q, et al. Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(4): 1802–1811.
- [34] LI J C, ZHOU J, LI Y R, et al. Mitochondrial fission controls DNA fragmentation by regulating endonuclease G[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(4): 622–631.

The Antifungal Activity and Mechanism of Carvacrol against *Zygosaccharomyces rouxii*

Wang Huxuan, Peng Zhonghua, Wang Cong, Zhu Yanan, Sun Hongmin

(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021)

Abstract The antifungal activity of carvacrol against food-spoilage yeast *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. rouxii*) was studied, and the potential antifungal mechanism was analyzed from the perspective of apoptosis for the first time. The diameter of inhibition zone (DIZ), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined by oxford cup method and double dilution method. The morphological changes of *Z. rouxii* cells were observed by scanning electron microscope. Then, a series of the biochemical and morphological characteristics of typical apoptosis was detected using flow cytometer or microplate reader, and the transcription levels of key apoptosis regulatory factors were measured by qRT-PCR. The DIZ, MIC and MFC of carvacrol against *Z. rouxii* were (13.67 ± 0.58) mm, 0.156 mg/mL and 0.3125 mg/mL, respectively. The cell surface wrinkled under the MIC and MFC of carvacrol. Under MIC carvacrol treatment, increased intracellular reactive oxygen species level, elevated intracellular Ca^{2+} concentration, decreased mitochondrial membrane potential, metacaspase activation, phosphatidylserine exposure and DNA fragmentation were observed in *Z. rouxii* cells. Moreover, the transcription levels of pro-apoptotic factors including *Yca1*, *Dnm1*, *Cyc1*, *Nuc1* and *Ndi1* were up-regulated by 1–4 fold. Carvacrol seemed to induce *Z. rouxii* apoptosis through a metacaspase-dependent mitochondrial pathway. The results can provide new insights into the antifungal mechanism of carvacrol, and propose a theoretic basis for the development of green and efficient food preservatives.

Keywords *Zygosaccharomyces rouxii*; carvacrol; antifungal activity; apoptosis; food preservation