

邻苯二酚对酿酒酵母理化特性的影响

黄锦翔, 易弋, 梁君夏, 丰丕雪, 马振花, 严寅琿, 龙秀锋*

(广西科技大学生物与化学工程学院 广西糖资源绿色加工重点实验室

广西高校糖资源加工重点实验室 广西柳州 545006)

摘要 邻苯二酚是木质纤维素水解液中一种主要的细胞生长抑制物,毒性作用较强,能抑制后续酒精发酵过程中酿酒酵母的生长和发酵性能。本文研究邻苯二酚对酿酒酵母 GGSF16 理化特性的影响,结果表明,邻苯二酚质量浓度为 1.2 g/L 时,明显抑制酿酒酵母细胞的生长和代谢,导致消耗葡萄糖的时间变慢和乙醇发酵周期变长,降低乙醇生成率;明显改变酵母细胞的膜通透性,使胞内核酸和蛋白质发生内漏,含量分别是对照组的 2.50,2.01 倍;细胞内的应激代谢物海藻糖含量显著升高 2.89 倍;此外,为了抵抗细胞的氧化损伤,胞内 GSH 含量显著降低 70.63%。扫描电子显微镜显示:用邻苯二酚处理后,表面光滑、饱满的酵母细胞的细胞壁和细胞膜被破坏,出现空洞、大量撕裂碎片和彼此之间粘黏等现象,细胞失去保护作用而死亡。本研究初步明确了酚类物质对酿酒酵母的损伤和毒性机制,为进一步揭示木质纤维素水解液对酿酒酵母的抑制作用提供参考。

关键词 邻苯二酚;酿酒酵母;理化特性;谷胱甘肽;氧化胁迫

文章编号 1009-7848(2023)03-0130-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.014

生物质燃料乙醇通常以淀粉类农作物(如玉米、木薯)、糖类作物(如甘蔗)以及木质纤维素类作物(如各类秸秆)为原料进行生产,已发展成为全球可再生能源领域的战略性新兴产业之一^[1]。其中,以农作物秸秆等木质纤维素为原料的燃料乙醇最具有发展潜力^[2-3]。这是因为木质纤维素是一种分布广、储量最丰富、可再生利用的绿色生物质资源^[4-5],有利于节约生产成本,实现可持续发展。

酿酒酵母是一种最为常见的生产乙醇的发酵微生物,目前以木质纤维素为原料发酵生产生物燃料乙醇的研究已有报道,然而,工业化应用还没有大面积开展,主要原因在于木质纤维素的降解成本还比较高,达不到工业化生产的需求^[6]。除此之外,木质纤维素在降解的过程中也会产生多种细胞抑制物,不利于后续发酵过程中酿酒酵母的生长。这些细胞抑制物中,酚类物质是最重要且毒性最大的一种^[7-9]。有研究表明,酚类化合物可渗透到微生物的细胞膜内,引起细胞内活性氧(Reac-

tive oxygen species,ROS)的积累,而且可通过改变细胞膜蛋白和脂质的比例,引起细胞膜的不可逆损伤来影响细胞正常的生长^[10-11]。如何消除酚类物质对酿酒酵母的抑制,是木质纤维燃料乙醇发酵需要解决的一个难题。

本研究选择邻苯二酚为研究对象,通过测定邻苯二酚处理后酿酒酵母的生长情况、葡萄糖消耗量、乙醇产量、细胞膜通透性、细胞内海藻糖、还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione,GSH)和氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione,GSSG)的含量,并结合扫描电镜观察(Scanning electron microscope,SEM)进行综合分析,初步明确酚类物质对酿酒酵母的损伤和毒性机制,为进一步揭示木质纤维素水解液对酿酒酵母的抑制作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)GGSF16,由广西科技大学发酵工程研究所提供。

主要试剂:邻苯二酚(AR),天津市大茂化学试剂厂;丙酮(AR),西陇科学股份有限公司;戊二醛(AR),天津市科密欧化学试剂有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量检测试剂盒,北京索莱宝科技有

收稿日期:2022-03-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31560728);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA050116)

第一作者:黄锦翔,男,硕士生

通信作者:龙秀锋 E-mail: longxiuf@163.com

限公司。

1.2 培养基与试剂配方

YPD 培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母粉 10 g/L,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基:葡萄糖 180 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母粉 10 g/L,121 °C 灭菌 20 min。

PBS 溶液:氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,磷酸二氢钾 0.24 g,十二水合磷酸氢二钠 3.58 g,加入 ddH₂O 定容 1 L,调节 pH 值至 7.4,4 °C 备用。

1.3 主要仪器与设备

UV-8000S 紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;Phenom 飞纳台式扫描电镜,复纳科学仪器(上海)有限公司;456-GC 气相色谱仪,天美创科仪器(北京)有限公司;Alphal-2LDplus 真空冷冻干燥机,德国 CHRIST;ZHJH-C1112C 超净台、ZWYD-2402 叠式恒温调速摇床,上海智诚分析仪器制造有限公司;LDZH-100KBS 立式蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;JY91-IN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.4 方法

1.4.1 酵母细胞培养 斜面活化:无菌操作将保存的酿酒酵母 GGSF16 接种到 YPD 斜面培养基上,30 °C 培养 24 h。

种子培养:取 YPD 斜面培养基中的单菌落,接种到 YPD 培养基中,30 °C、170 r/min 培养 14 h,调整菌液浓度为 10⁸ CFU/mL,备用。

1.4.2 邻苯二酚对酵母细胞生长的影响 取活化后的酿酒酵母菌株,以 2 % 接种量转至 YPD 培养基中,30 °C、170 r/min 培养 8 h,以 10% 的接种量接种于质量浓度为 0.5,1.0,1.2,1.5,2.0 g/L 邻苯二酚的发酵培养基中,以未添加邻苯二酚的发酵培养基为对照组,30 °C、170 r/min 培养 24 h,期间每隔 2 h 取样 1 次,使用分光光度计测定样品 OD_{600nm} 值。

1.4.3 邻苯二酚对酵母细胞糖代谢和乙醇发酵的影响 按照 1.4.2 节方法,取菌液 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用高效液相色谱仪检测发酵液中的葡萄糖含量,适当稀释后,同一高效气相色谱仪检测发酵液中的乙醇产量。

1.4.4 邻苯二酚对酵母细胞形态的影响 按照 1.4.2 节方法,取 4 h 的发酵液,参考曾令杰等^[12]描

述酵母细胞形态方法进行观察。

1.4.5 邻苯二酚对酵母细胞膜通透性的影响 按照 1.4.2 节方法,取 4 h 发酵液,80 °C 水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,分别在波长 260 nm 和 280 nm 处测定上清液中核酸和蛋白质的吸光度值。

1.4.6 邻苯二酚对酵母细胞内海藻糖含量的影响

1.4.6.1 海藻糖标准曲线的绘制 采用硫酸蒽酮比色法^[13]测定细胞内海藻糖含量。配制 0.1 mg/mL 的海藻糖母液,稀释成 0.01~0.09 mg/mL 9 个质量浓度的海藻糖标准液,以 ddH₂O 为空白对照。每个浓度的样品取 1 mL 于 25 mL 比色管中,加入 5 mL 硫酸蒽酮试剂,小心混匀后置 100 °C 沸水中,水浴 10 min,立即放入冰水浴中冷却 30 min,然后在波长 620 nm 处测定样品的吸光度值。以海藻糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制海藻糖标准曲线。

1.4.6.2 胞内海藻糖含量的测定 按照 1.4.2 节方法,取 4 h 发酵液,参考安佳星等^[14]的方法测定胞内海藻糖含量。

1.4.7 邻苯二酚对酵母细胞内 GSH 和 GSSG 含量的影响 按照 1.4.2 节方法,取 0,6,12 h 的发酵液。GSH 和 GSSG 含量的测定选用 GSH 和 GSSG 含量检测试剂盒。

1.5 数据统计与分析

每个样品生物学测定重复 3 次,采用 Origin Pro 9.1 软件和 GraphPad Prism 8.0.1 软件(单因素方差分析)绘制图表。

2 结果与分析

2.1 邻苯二酚对酵母细胞生长的影响

为了找到邻苯二酚对酿酒酵母的半致死量,测定了不同质量浓度(0~2.0 g/L)的邻苯二酚对酿酒酵母细胞生长的影响。图 1 结果显示,随着邻苯二酚质量浓度的增加,对酿酒酵母生长的抑制作用越来越明显。对照组在培养酵母过程中 2 h 进入对数生长期,10 h 进入稳定期。添加 1.0 g/L 邻苯二酚的处理组也在 2 h 进入对数生长期,12 h 进入稳定期,与对照组相比,稳定期迟滞了 2 h。添加 1.2 g/L 邻苯二酚的处理组在 4 h 开始进入对数生长期,14 h 后进入稳定期,与对照组相比,稳定

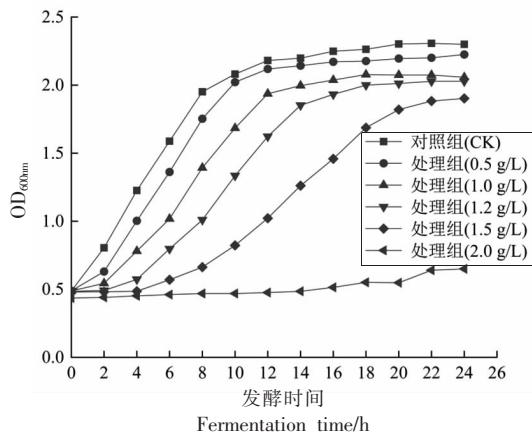


图1 邻苯二酚对酵母细胞生长的影响

Fig.1 The effect of catechol on the growth of yeast cells

期延迟4 h。添加邻苯二酚的质量浓度为2.0 g/L时,酿酒酵母的生长基本被抑制。添加邻苯二酚的质量浓度为1.5 g/L时,对数生长期出现延长现象,20 h进入稳定期,与对照组相比,稳定期延迟14 h。为了保证后续研究,选择邻苯二酚质量浓度为1.2 g/L对酿酒酵母进行处理。

2.2 邻苯二酚对酵母细胞糖代谢和乙醇发酵的影响

酿酒酵母 GGSF16 利用葡萄糖进行发酵生成乙醇,而添加邻苯二酚会抑制酿酒酵母细胞的生长,从而抑制葡萄糖消耗量和乙醇生成量。如图2显示,对照组在0~6 h葡萄糖消耗速率较慢,可能是酵母细胞正在大量的繁殖;在6~16 h葡萄糖消耗较快,可能是酵母细胞进入对数生长后期;在18 h葡萄糖基本消耗完全;而对应的乙醇生成量在0~8 h较少,在8~14 h产量较多,之后乙醇生成量缓慢增长。与对照组相比,经邻苯二酚处理的酿酒酵母,在0~6 h,葡萄糖的消耗量减缓,产乙醇量较少;在6~24 h,6~22 h为葡萄糖快速消耗期,并在24 h基本消耗完全;而对应的乙醇生成量的快速生成延迟为10~20 h,之后基本平稳。推测可能是邻苯二酚破坏酿酒酵母的细胞膜,导致细胞无法正常生长和代谢。

2.3 邻苯二酚对酵母细胞形态的影响

为了观察邻苯二酚处理后酿酒酵母细胞形态的变化,进行扫描电镜试验,结果如图3显示。对照组酿酒酵母表面光滑饱满,外形呈椭圆形,细胞边缘平坦整齐,能清晰看到酵母菌出芽形成子细

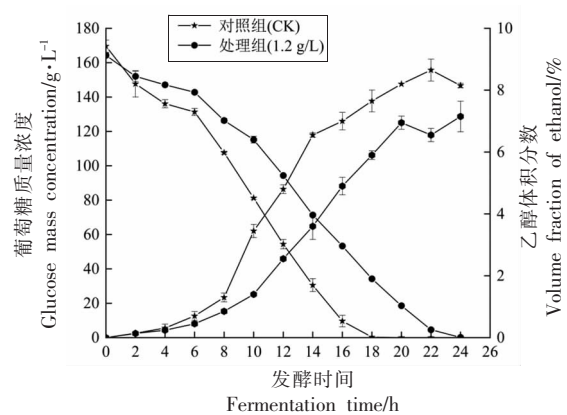


图2 邻苯二酚对酵母细胞糖代谢和乙醇发酵的影响

Fig.2 The effects of catechol on sugar metabolism and ethanol fermentation of yeast cells

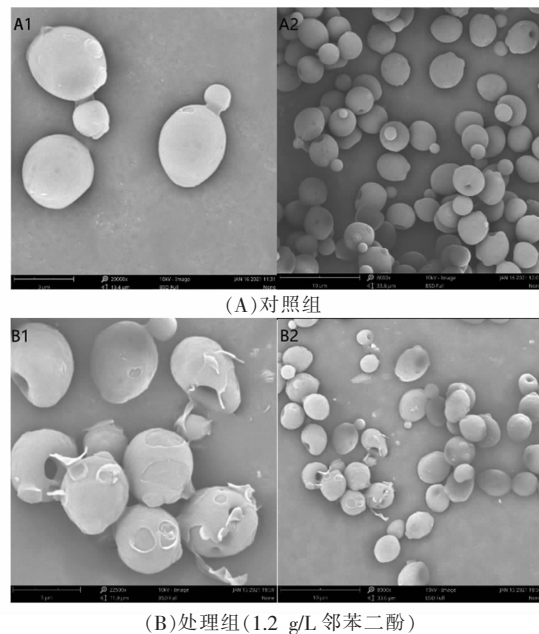


图3 邻苯二酚处理酵母细胞前、后形态变化

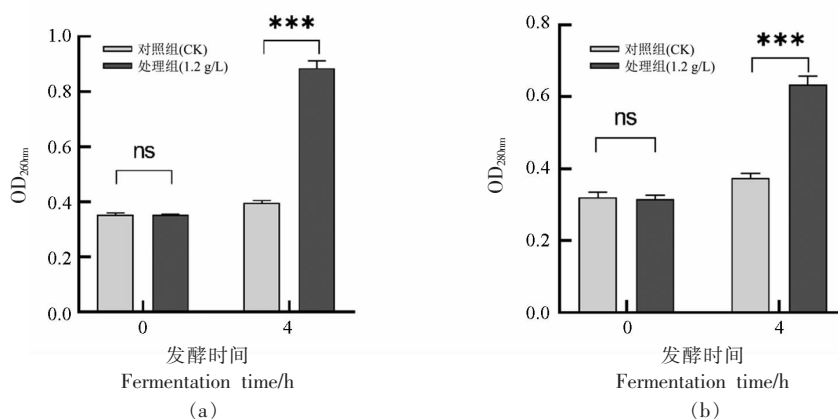
Fig.3 Morphological changes of yeast cells before and after catechol treatment

胞,有双层结构的细胞壁,酵母细胞生命力旺盛,且细胞宽度和长度比约1:2。经邻苯二酚处理后,酿酒酵母细胞表面变得粗糙,出现撕裂和空洞,边缘产生皱褶和碎片,细胞壁遭到破坏,酵母细胞开始变形,这可能是酵母细胞遭受到邻苯二酚胁迫后细胞壁和细胞膜破损,细胞就无法进行正常的生理代谢和生长,使物质进、出细胞困难,细胞死亡和损伤。

2.4 邻苯二酚对酵母细胞膜通透性的影响

细胞膜是分隔细胞内、外物质的天然保护屏障,当细胞膜的通透性增加时,对细胞至关重要的蛋白质和核酸等物质就会泄露到胞外,使细胞功能受到影响^[15]。用紫外-可见分光光度计检测波长 260 nm 和 280 nm 处发酵液的上清,分析邻苯二酚

对细胞膜的破坏程度。如图 4 显示,邻苯二酚处理后,酵母细胞的核酸和蛋白质释放量显著增加,分别增加了 2.50,2.01 倍,核酸的释放量比蛋白质的释放量更加明显。由此推测邻苯二酚破坏了酵母细胞的细胞壁和细胞膜,使其通透性增强,细胞内核酸和蛋白质的流失。



注:ns 表示组间无显著性差异;*** 表示组间存在显著性差异($P<0.01$)。

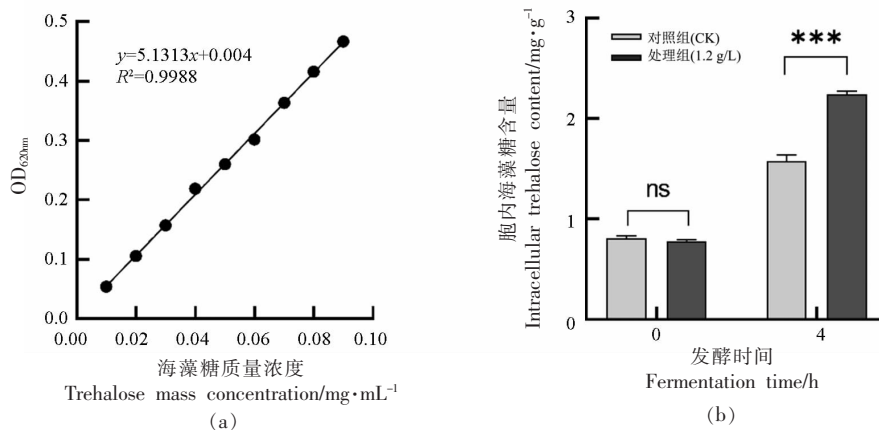
图 4 邻苯二酚对酵母细胞膜通透性的影响

Fig.4 The effect of catechol on cell membrane permeability of yeast cell membrane

2.5 邻苯二酚对酵母细胞内海藻糖含量的影响

按照硫酸蒽酮比色法,绘制海藻糖标准曲线,见图 5a,线性回归方程: $y=5.1313x+0.004$, $R^2=0.9988$ 。海藻糖是一种应激代谢物,充当酿酒酵母细胞的保护剂,在外界不利条件胁迫酵母细胞时,其能维持细胞膜的完整性,保证细胞内环境的相对稳定,也保护了细胞内的核酸和蛋白质等物质,

增强了酿酒酵母乙醇耐受性,从而维持生命体的生命过程和生物特征^[16]。由图 5b 可知,随着发酵时间的延长,对照组和处理组酿酒酵母的胞内海藻糖含量均增加,1.2 g/L 邻苯二酚组在 4 h 时胞内海藻糖含量为 2.24 g/L,是对照组的 2.89 倍,表明酿酒酵母在 1.2 g/L 邻苯二酚胁迫下,细胞产生大量的海藻糖。



注:ns 表示组间无显著性差异;*** 表示组间存在显著性差异($P<0.01$)。

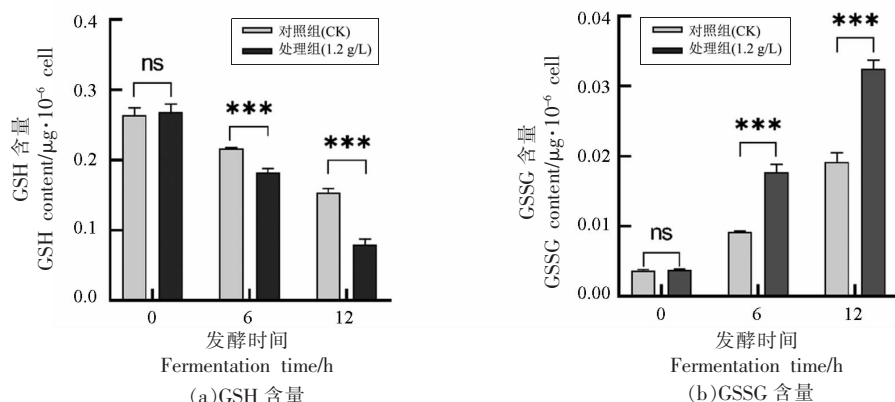
图 5 海藻糖的标准曲线(a)和邻苯二酚(b)对酵母细胞内海藻糖含量的影响

Fig.5 Standard curve of trehalose (a) and the effect of catechol (b) on trehalose content in yeast cells

2.6 邻苯二酚对酵母细胞内 GSH 和 GSSG 含量的影响

有研究表明,一般在生物体中都含有 GSSG 和 GSH,起主要作用的是 GSH,而多数生物细胞中 GSSG 和 GSH 的比例约为 1:100^[17]。一个 GSSG 是由两个 GSH 硫基氧化成二硫键缩合而成^[18]。GSH 是最主要非蛋白巯基化合物,谷胱甘肽多种生理功能的主要结构基础是 γ -谷氨酰胺键和活性巯基,能直接或间接参与 DNA 和蛋白质的合成,促进新陈代谢以及清除自由基,保护细胞^[19]。为了验证谷胱甘肽在酿酒酵母中的作用,测定了 GSH 和 GSSG 含量。如图 6a 显示,随着发酵时间延长,对照组和处理组细胞中 GSH 含量都逐渐下

降,对照组的 GSH 含量在 0 h 时为 0.264 $\mu\text{g}/10^6$ cell,当发酵 12 h 时,其含量为 0.154 $\mu\text{g}/10^6$ cell,比对照组降低了 41.67%,而 1.2 g/L 邻苯二酚组的 GSH 含量在 0 h 时为 0.269 $\mu\text{g}/10^6$ cell,到 12 h 时含量降到 0.079 $\mu\text{g}/10^6$ cell,降低了 70.63%。图 6b 显示,在 0 h 时细胞中的 GSSG 含量为 0.0036 $\mu\text{g}/10^6$ cell,并随发酵时间的延长而增加。对照组的 GSSG 含量在 6 h 时为 0.009 $\mu\text{g}/10^6$ cell,当发酵 12 h 时,其含量为 0.019 $\mu\text{g}/10^6$ cell,而 1.2 g/L 邻苯二酚组的 GSSG 含量在 12 h 时为 0.0323 $\mu\text{g}/10^6$ cell,与对照组相比,分别增加了 5.28 倍和 8.97 倍。结果表明,酿酒酵母经 1.2 g/L 邻苯二酚胁迫后,胞内的 GSH 含量下降,GSSG 含量上升。



注:ns 表示组间无显著性差异;*** 表示组间存在显著性差异($P<0.01$)。

图 6 邻苯二酚对酵母细胞内 GSH 和 GSSG 含量的影响

Fig.6 The effect of catechol on GSH and GSSG content in yeast cells

3 讨论

木质纤维素在物理、化学和生物法的预处理过程中,会产生许多弱酸类、呋喃醛类和酚类等细胞抑制物,它们会对酵母细胞的生长繁殖产生一定的毒害作用,导致乙醇生成量变低。邻苯二酚是木质纤维素在预处理过程中水解产生的一种毒性较强的酚类物质,主要由愈创木基产生。本研究发现,添加邻苯二酚可以明显抑制酵母细胞(图 1),使酿酒酵母细胞的生长繁殖和乙醇发酵的周期变长,降低乙醇的生成量(图 2)。

细胞膜是细胞与外界环境的一个选择性的屏障,它可以维持细胞膜内环境的稳态,也可选择性地控制物质进、出细胞,对信息传递及能量流动都

有着重要的作用^[20]。本试验中,通过扫描电子显微镜可以观察到邻苯二酚处理后,原来光滑的酿酒酵母细胞表面出现空洞,边缘被撕裂产生皱褶和碎片,细胞壁结构遭到严重破坏,酵母细胞变形(图 3);酿酒酵母细胞上清液中核酸和蛋白质含量均显著上升(图 4),说明酵母细胞的细胞膜通透性增大。综上,酿酒酵母细胞膜在邻苯二酚的胁迫下受到严重破坏。

谷胱甘肽(GSH)是生物体内一种含有活性巯基的三肽化合物,具有较强的抗氧化能力,能维持和调节细胞的氧化-还原环境,同时具有提高免疫力、解毒等功能^[21]。细胞受到抑制物、高渗、pH 等胁迫因素时,发生氧化胁迫,容易出现 GSH 含量

降低和 GSSG 含量升高的情况。王立梅等^[22]研究表明,酿酒酵母受到过氧化氢胁迫后,GSH 含量随发酵时间的延长而降低。杨钰昆等^[23]发现酿酒酵母通过增加细胞内 GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶)的活性来应对金属镉的氧化胁迫作用。张燕等^[24]研究表明,过氧化氢诱导的 HEK293 细胞氧化损伤模型组中 GSH 的含量显著降低,GSSG 含量明显升高。杨敏等^[25]使用烟嘧磺隆胁迫玉米细胞后 GSH 含量先增加后减少,GSSG 含量持续增加,说明细胞通过 GSH 的氧化来应对烟嘧磺隆引起的氧化应激。本研究中,邻苯二酚处理酵母细胞 12 h 后,GSH 含量比 0 h 时降低了 70.63%。此外,GSSG 含量也随着发酵时间的延长而增加(图 6),说明在邻苯二酚的胁迫下,酵母细胞发生了氧化损伤,细胞启动 GSH-GSSG 反应来抵抗氧化损伤。

海藻糖是酿酒酵母在不利条件下产生的一种重要应激产物,它对酵母细胞内的蛋白质、生物膜和核酸等大分子具有保护作用。李莹等^[26]研究表明,在 8%乙醇胁迫下,粉状米勒酵母(*Millerozyza farinosa*)NCUF304.1-1 细胞内的海藻糖含量在 36 h 内逐渐升高,使菌株抵抗氧化损伤能力有所增加。王宪斌等^[27]发现,海藻糖含量增加使酵母存活率提高。本研究发现,酿酒酵母在邻苯二酚的胁迫下,海藻糖含量显著增加(图 5)。结合前以上结果,酵母细胞在邻苯二酚胁迫下,产生大量的海藻糖来保护蛋白质,避免其发生氧化损伤、变性,同时起到稳定酵母细胞膜的作用。

4 结论

研究了添加 1.2 g/L 邻苯二酚对酿酒酵母 GSSF16 生长繁殖的影响,结果表明邻苯二酚可以明显抑制酿酒酵母细胞的生长和代谢,导致消耗葡萄糖的时间变慢和乙醇发酵周期变长,降低了乙醇生成率。邻苯二酚处理后不仅破坏了酿酒酵母细胞的双层细胞壁结构,也破坏了细胞膜,导致酿酒酵母细胞内核酸和蛋白质等物质发生泄漏,酿酒酵母细胞受损伤,而无法生长代谢,最终死亡。此外,为了应对邻苯二酚对酿酒酵母细胞的影响,细胞内的应激代谢物海藻糖含量明显升高。通过测定细胞内 GSH 和 GSSG 含量,发现胞内 GSH

含量逐渐降低,GSSG 含量逐渐上升,说明酿酒酵母细胞发生氧化胁迫,酵母细胞启动了 GSH-GSSG 反应来抵抗氧化损伤。通过扫描电子显微镜观察邻苯二酚处理前、后的图像可知,表面光滑饱满的酵母细胞的细胞壁和细胞膜被破坏,出现空洞、大量撕裂碎片和彼此之间粘黏等现象,使细胞没有得到保护而死亡。

参 考 文 献

- [1] 秦汉俊,徐建东,开金龙,等. 中国燃料乙醇的应用现状及推广建议[J]. 化工管理, 2021, 4(4): 3-4. QIN H J, XU J D, KAI J L, et al. Application status and promotion suggestions of fuel ethanol in China[J]. Chemical Management, 2021, 4(4): 3-4.
- [2] 曹运齐,刘云云,胡南江,等. 燃料乙醇的发展现状分析及前景展望[J]. 生物技术通报, 2019, 35(4): 163-169. CAO Y Q, LIU Y Y, HU N J, et al. Current status and prospects of fuel ethanol production [J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(4): 163-169.
- [3] THOMPSON W, MEYER S, WESTHOFF P. How does petroleum price and corn yield volatility affect ethanol markets with and without an ethanol use mandate?[J]. Energy Policy, 2009, 37(2): 745-749.
- [4] 张毅,张宏,刘云云,等. 纤维素燃料乙醇预处理技术研究进展[J]. 可再生能源, 2021, 39(2): 148-155. ZHANG Y, ZHANG H, LIU Y Y, et al. Research progress of cellulosic fuel ethanol pretreatment technology [J]. Renewable Energy Resources, 2021, 39(2): 148-155.
- [5] LIU H, SUN J L, CHANG J S, et al. Engineering microbes for direct fermentation of cellulose to bioethanol [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(7): 1089-1105.
- [6] 傅新凯,周子轩,季泽涛,等. 秸秆类生物质预处理技术研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(1): 36-38. FU X K, ZHOU Z X, JI Z T, et al. Advances in pretreatment technology of straw biomass [J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(1): 36-38.
- [7] 雷志鹏,孙晓仲,王撼宇,等. 酿酒酵母对木质纤维素水解液抑制物耐受性的研究进展[J]. 中国酿造,

- 2021, 40(4): 1-5.
- LEI Z P, SUN X Z, WANG H Y, et al. Research progress on the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to inhibitors of lignocellulose hydrolysate[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 1-5.
- [8] PALMQVIST E, HAHN-HAGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25-33.
- [9] 何北海, 林鹿, 孙润仓, 等. 木质纤维素化学水解产生可发酵糖研究[J]. 化学进展, 2007, 19(7): 1141-1146.
- HE B H, LIN L, SUN R C, et al. Chemical hydrolysis of lignocellulosics into fermentable sugars[J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(7): 1141-1146.
- [10] QIN L, LI W C, LIU L, et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1): 70-80.
- [11] RISL Á, MORGAN T, SANTOS A, et al. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 109(1): 25-30.
- [12] 曾令杰, 黄锦翔, 丰丕雪, 等. 甲酸对酿酒酵母的细胞毒性[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 125-131.
- ZENG L J, HUANG J X, FENG P X, et al. Cytotoxicity of Formic Acid to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Science, 2022, 43(6): 125-131.
- [13] 谭海刚, 梅英杰, 关凤梅, 等. 蕙酮-硫酸法测定酵母中海藻糖的含量[J]. 现代食品科技, 2006, 4(1): 125-126, 128.
- TAN H G, MEI Y J, GUAN F M, et al. Determination of trehalose content by anthrone-sulphuric acid colorimetric method[J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 4(1): 125-126+128.
- [14] 安佳星, 龙秀锋, 伍时华, 等. 对羟基苯甲醛和阿魏酸对酿酒酵母理化特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 125-130.
- AN J X, LONG X F, WU S H, et al. Effects of p-hydroxybenzaldehyde and ferulic acid on physicochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Science, 2021, 42(22): 125-130.
- [15] 顾翰琦, 邵玲智, 刘冉, 等. 酿酒酵母酚类抑制物耐受性脂质组学研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(1): 15-23.
- GU H Q, SHAO L Z, LIU R, et al. Lipidomics analysis of *Saccharomyces cerevisiae* with tolerance to phenolic inhibitors [J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(1): 15-23.
- [16] 何迎粉, 何荣荣, 刘敦华, 等. 海藻糖与酿酒酵母乙醇耐受性相关性的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(11): 1-4.
- HE Y F, HE R R, LIU D H, et al. Correlation between trehalose and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2020, 39(11): 1-4.
- [17] 张恩芬. 高通量选育谷胱甘肽高产菌株及胞外分泌特性的研究[D]. 芜湖: 安徽工程大学, 2019: 1-14.
- ZHANG E F. High-throughput breeding of glutathione-producing strains and extracellular secretion characteristics[D]. Wuhu: Anhui Polytechnic University, 2019: 1-14.
- [18] JYUMPEI K, SASAKI D, HARA K Y, et al. Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase Erv1 for oxidized glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 44-52.
- [19] YANG Y, XIANG J H, ZHANG Z L, et al. Stimulation of in situ low intensity ultrasound on batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the GSH yield[J]. Journal of Food Process Engineering, 2020, 43(1): 65-75.
- [20] 张苗苗, 陆栋, 剡倩, 等. 细胞膜对酿酒酵母乙醇耐受性影响的研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(9): 16-19.
- ZHANG M M, LU D, YAN Q, et al. Research progress on effect of cell membrane on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2016, 35(9): 16-19.
- [21] 朱健, 胥京京, 汪成富, 等. 产假丝酵母全细胞转化合成谷胱甘肽的营养条件[J]. 生物加工过程, 2014, 12(5): 23-28.
- ZHU J, XU J J, WANG C F, et al. Media optimization for glutathione production by bioconversion using *Candida utilis* as whole-cell catalyst[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2014, 12(5): 23-28.
- [22] 王立梅, 任清华, 郑丽雪, 等. 内源性氧化胁迫促进酿酒酵母合成谷胱甘肽的潜在机制分析[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 26-31.
- WANG L M, REN Q H, ZHENG L X, et al. Elucidation of the underlying mechanism by which endogenous oxidative stress promotes glutathione syn-

- thesis of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2017, 38(4): 26–31.
- [23] 杨钰昆, 杨文飞, 常媛媛, 等. 硒对镉胁迫下酿酒酵母抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 129–134.
- YANG Y K, YANG W F, CHANG Y Y, et al. Effects of selenium on antioxidant activity of *Saccharomyces cerevisiae* under cadmium stress[J]. Food Science, 2018, 39(22): 129–134.
- [24] 张燕, 魏汝君, 马中苏, 等. 蛋清源活性肽对过氧化氢诱导的 HEK293 细胞谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 79–86.
- ZHANG Y, WEI R J, MA Z S, et al. The effect of bioactive peptides from egg white on glutathione anti-oxidant system against oxidative stress injury in human embryonic kidney 293 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 79–86.
- [25] 杨敏, 李向岭, 韩金玲, 等. 烟嘧磺隆胁迫对甜玉米幼苗活性氧积累、抗氧化系统及相关基因表达的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(9): 2182–2193.
- YANG M, LI X L, HAN J L, et al. Nicosulfuron stress on active oxygen accumulation, antioxidant system and related gene expression in sweet maize seedlings[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(9): 2182–2193.
- [26] 李莹, 陈延儒, 吴晓江, 等. 适应性进化技术选育优良乙醇耐受性能 *Millerozyma farinosa*[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 1–6.
- LI Y, CHEN Y R, WU X J, et al. Breeding of excellent ethanol-tolerant *Millerozyma farinosa* by adaptive evolution[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 1–6.
- [27] 王宪斌, 冯霞, 张蓓蓓, 等. 一株生香酵母冻干菌剂的制备研究[J]. 食品与发酵科技, 2019, 55(6): 9–12.
- WANG X B, FENG X, ZHANG B B, et al. Study on the freeze-drying microbial agent preparation of an aroma-producing yeast[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2019, 55(6): 9–12.

Effects of Catechol on Physicochemical Properties of *Saccharomyces cerevisiae*

Huang Jinxiang, Yi Yi, Liang Junxia, Feng Pixue, Ma Zhenhua, Yan Yinhui, Long Xiufeng*

(College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Key Laboratory for Processing of Sugar Resources of Guangxi Higher Education Institutes, Liuzhou 545006, Guangxi)

Abstract Catechol is a major cell growth inhibitor in lignocellulose hydrolysate, with strong toxicity, and can inhibit the growth and fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* during subsequent alcohol fermentation. The effects of catechol on the physical and chemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* GGSF 16 were studied. The results showed that when the concentration of catechol was 1.2 g/L, the growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* cells were significantly inhibited, resulting in slower glucose consumption time and longer ethanol fermentation cycle, and lower ethanol production rate. The membrane permeability of yeast cells was significantly changed, and the content of nucleic acid and protein in the cells was 2.50 and 2.01 times higher than that in the control group. The content of trehalose, a stress metabolite in cells, increased significantly by 2.89 times. In addition, in order to resist the oxidative damage of cells, the content of intracellular GSH decreased significantly by 70.63%. Scanning electron microscope showed that after treatment with catechol, the cell wall and cell membrane of smooth and full yeast cells were damaged, and there were cavities, a large number of torn fragments and adhesion between them. The cells lost their protective effect and died. This study preliminarily clarified the damage and toxicity mechanism of phenols on *Saccharomyces cerevisiae*, and provided a reference for further revealing the inhibitory effect of lignocellulose hydrolysate on *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords catechol; *Saccharomyces cerevisiae*; physicochemical properties; glutathione; oxidative stress