

丁捷, 刘春燕, 黄彭, 等. 天然抑菌成分麝香草酚防治果蔬采后病害的应用及作用机理研究进展[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 895-903.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.031

天然抑菌成分麝香草酚防治果蔬采后病害的应用及作用机理研究进展

丁捷^{1,2}, 刘春燕^{1,2}, 黄彭^{1,3}, 李红莹¹, 何嘉欣², 刘耀文¹, 秦文¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川旅游学院食品学院, 四川 成都 610100; 3. 宜宾学院质量管理与检验检测学部, 四川 宜宾 644000)

摘要: 采后病害造成了全球范围内果蔬的大量采后损失, 因此防治果蔬采后病害对生鲜物流行业具有极其重要的经济意义。与化学合成杀菌剂相比, 麝香草酚是一种有吸引力的生态替代品。本文旨在综述目前麝香草酚在果蔬采后领域应用中所取得的进展和必须克服的挑战, 以促进其作为抑菌剂更好地防治果蔬采后病原菌。另外, 从麝香草酚有效应用的角度强调了使用控释封装传递系统的重要性, 并进一步探讨了麝香草酚的抑菌机制, 以期未来新型果蔬采后病害防治技术的开发和应用提供思路。

关键词: 麝香草酚; 采后病害; 水果蔬菜

中图分类号: TS255.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0895-09

Recent advances on application and action mechanism of natural antibacterial ingredient thymol for controlling postharvest diseases of fruits and vegetables

DING Jie^{1,2}, LIU Chun-yan^{1,2}, HUANG Peng^{1,3}, LI Hong-ying¹, HE Jia-xin², LIU Yao-wen¹, QIN Wen¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. College of Food Science and Technology, Sichuan Tourism College, Chengdu 610100, China; 3. Department of Quality Management and Inspection and Detection, Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract: Substantial postharvest losses of fruits and vegetables have been caused by postharvest diseases worldwide, so the control of postharvest diseases of fruits and vegetables is of prime important economic significance to fresh logistics industry. Compared with chemical synthetic fungicides, thymol is an attractive ecological alternative in controlling pathogens. This article aimed to summarize the progress of thymol during postharvest application of fruits and vegetables and challenges that must be overcome to promote its application as antimicrobial agents against phytopathogens during postharvest stage. Besides, the importance of using controlled release encapsulated delivery systems was highlighted from the aspect of effective application of thymol, and the bacteriostatic and fungistatic mechanisms were further explored to provide ideas for the development and application of new postharvest disease control technologies in the future.

Key words: thymol; post-harvest disease; fruits and vegetables

收稿日期: 2022-08-24

基金项目: 四川省科技计划项目(2021JDRC0030, 2021YJ0262)

作者简介: 丁捷(1985-), 女, 重庆永川人, 博士研究生, 副教授, 主要从事园艺产品采后科学研究。(E-mail) dingjiedream@163.com

通讯作者: 秦文, qinwen@sicau.edu.cn

真菌和细菌侵染是导致果蔬采后病害及毒素污染的主要因素, 决定了新鲜果蔬的货架期和商业价值。当代农业面对的一个严峻现实是病原菌导致农产品采后品质下降, 而以防治果蔬采后病害为目的大量使用化学农药及保鲜剂的行为引发了一系列食

品安全问题^[1]。因此,需要新策略来控制果蔬采后病害。近年来,许多精油在抑制致病真菌生长方面的功效已得到证实,因此植物精油被提议作为杀菌剂的替代品^[2]。Inouye 等^[3]比较了百里香、柠檬草、胡椒、芫荽、肉桂、桉树、柠檬和薰衣草等植物精油对不同细菌的抑制功效后发现,以酚和醛为主要成分的肉桂、柠檬草和百里香精油抗菌活性最高。尤其是百里香精油,已被大量研究结果证明是最有效的天然微生物生长抑制剂之一^[4]。Combrinck 等^[2]研究发现,百里香精油在 1 000 $\mu\text{L/L}$ 甚至更低的用量下可以完全抑制 *Lasiodiplodia theobromae*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Alternaria citrii*、*Botrytis cinerea* 和 *Penicillium digitatum* 的生长。大量研究结果证实精油中主要化学成分与其抑菌活性之间存在直接关系,是精油具有抗菌效果的主要原因^[5]。麝香草酚(2-isopropyl-5-methylphenol, THY)是一种天然单萜苯酚,是百里香等植物精油中的主要有效成分。刘春燕等^[6]证实 THY 可显著抑制 *Aspergillus niger*、*Neopestalotiopsis* sp.、*Alternaria alternata*、*Penicillium* sp.、*Cladosporium xylophilum* 菌丝生长,比丁香酚、香芹酚、肉桂醛等 15 种精油成分具有更好的广谱抑菌活性。同时,THY 还具有较高的食品安全性,曾被美国食品和药物管理局(FDA)批准为低毒食品添加剂(GRAS),也是中国 GB2760-2014 规定允许使用的食用香料^[7]。因此,麝香草酚在果实采后病害防治领域具有巨大的开发潜力和广泛的应用前景。

1 麝香草酚在果蔬采后领域中的应用

1.1 气态熏蒸

THY 在常温下极易挥发,因此可以在密闭空间内通过分子态气体形式渗透到被熏蒸的物质中,实现杀菌抑菌功能。目前,以熏蒸方式将 THY 应用于果蔬采后防腐保鲜中的研究已有较多报道。以 THY 为主要有效成分的商业精油 X5 能显著抑制 *Colletotrichum gloeosporioides* 的菌丝生长和分生孢子萌发,可以通过 X5 熏蒸处理显著提高接种炭疽病原菌的芒果中酚类化合物和间苯二酚的含量^[8]。Shin 等^[9]将 30 $\mu\text{g/ml}$ THY 乙醇溶液滴到滤纸片上,放置在保存有 Campbell early、Muscat Bailey A、Sheridan 和 Geobong 等品种葡萄的密闭塑料容器中,在 24 $^{\circ}\text{C}$ 下熏蒸 7 d,研究该处理在 (1 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 下

长期贮藏期间减少因灰葡萄孢和其他真菌感染而导致的腐烂变质,结果表明,30 $\mu\text{g/ml}$ THY 乙醇溶液的防腐保鲜效果甚至优于 120 $\mu\text{g/ml}$ 芳香醇。Taghavi 等^[10]的一项关于草莓暴露于 THY 和香芹酚蒸气中反应的报道中也观察到了类似现象,该研究发现,将棉球在 30 mg/L 和 60 mg/L THY 乙醇溶液中浸湿后放置在装有新鲜草莓的密闭容器或开放式包装中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ (湿度为 95%) 条件下贮藏 4 周内均能有效抑制草莓霉变腐败,提高其贮藏品质。Ji 等^[11]研究发现,在低温贮藏 16 周内,30 mg/L THY 可以降低接种过 *Botrytis aclada* 孢子的洋葱 96% 以上的灰霉病发病率,首次在商业规模上验证了 THY 熏蒸对洋葱采后真菌性病害的防治效果。虽然目前大量研究结果已证实 THY 气态熏蒸处理具有良好的可操作性和环境适宜性,但熏蒸实际应用效果往往受到密闭空间的气密性、处理时间、压力和环境温度的影响,存在处理批次浓度差异、蒸气扩散不均匀且易燃易爆等局限性。

1.2 液态喷施

虽然 THY 具有良好的抑菌活性,但它的高植物毒性极易导致植物组织在接触高浓度 THY 后细胞膜发生严重氧化损伤等^[12]。事实上,如何减少 THY 处理过程中因药剂扩散不均匀所导致的药害,是 THY 天然抑菌剂开发所面临的共性难题。大量研究结果已证实,将 THY 制备成浓度恒定的稳定液态,在适宜浓度条件下采用喷施、浸淋等方式较气态熏蒸处理更有利于 THY 在果蔬表面均匀分布,保持良好抑菌活性的同时显著减轻其植物毒性。Ding 等^[13]研究发现,20 mg/L THY-吐温 80 水溶液处理可在 2 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏 28 d 内使接种黑曲霉后的蓝莓保持较高的硬度、总可溶性固形物含量和可接受性评分,以及相对完整的果皮细胞结构。虽然 THY 水乳液处理可以在较低浓度范围内有效抑制采后病害,但该类型处理往往无法有效控制采后果蔬旺盛的呼吸作用导致的质量损失。因此,将 THY 与可食性涂膜结合,已成为该领域的研究热点。Yan 等^[14]研究发现,10 g/L THY-商用紫胶涂膜能较单一的紫胶涂膜降低接种 *Lasiodiplodia theobromae* 的红宝石葡萄柚 37% 的蒂腐病发病率,且更有效抑制了葡萄柚茎段腐败病变。陈敬鑫等^[15]研究发现,40 mg/L THY-海藻酸钠涂膜处理能较好地阻止茄梨果实表面病原微生物的生长繁殖,延缓果实软化和衰老进程,可使茄

梨果实在 20 ℃ 下的贮藏期较空白对照组延长至 18 d,且果实硬度、可溶性固形物、抗坏血酸、总酚含量等品质指标在 15 d 内显著优于单一的海藻酸钠涂膜。Saki 等^[16]采用 200 mg/L THY-0.5%壳聚糖涂膜处理可以显著降低无花果在 6 ℃ 下的真菌性病害腐烂率,显著抑制果实呼吸速率和采后失质量,无花果处理后在贮藏 20 d 内依然保持较高的果实硬度和良好的外观色泽,该处理的保鲜效果显著优于单一的壳聚糖涂膜或 THY 喷淋处理。

1.3 抗菌活性包装

对于大多数新鲜果蔬而言,由于抑菌物质与果蔬成分间的化学反应以及采后处理过程中与微生物的相互作用,直接施用往往会导致抑菌物质活性降低或被抑制。大量研究结果证实,将抑菌成分添加到包装材料中制备成抗菌活性包装是一种控制果蔬采后品质劣变并显著延长其保质期的创新方法。赵亚珠等^[17]将以 THY 为主要成分的百里香精油、大豆分离蛋白质、吐温-80 制成纳米乳液涂布于楞纸板上,所制备的抗菌纸箱可有效降低草莓在室温贮藏条件下的腐烂率和菌落总数,保持果实良好的感官品质,较空白对照组延长货架寿命 1~2 d。Boonruang 等^[18]研究发现,含有 20% THY 的聚乳酸抗真菌薄膜能显著抑制鳄梨和柑橘炭疽病原菌丝生长,其抑菌效果与从薄膜中蒸发出的 THY 浓度成正比。Álvarez-Hernández 等^[19]研究证实含有 0.04~0.40 g THY 的活性包装可以显著抑制在常温贮藏过程中灰葡萄孢对新鲜小番茄的感染,在模拟零售过程中未检测到该包装对感官品质的显著影响。

尽管 THY 在果蔬采后处理领域的研究取得了较多成果,但上述研究均发现 THY 的高挥发性导致体内抑菌效果不持久,长期贮藏后处理组与空白对照组真菌性病害导致的腐烂率及果实贮藏品质间无显著差异。事实上,THY 的高植物毒性、低溶解度、高挥发性以及应对环境因素(温度、水分、pH 值、O₂、光照等)的不稳定性极大地阻碍了其作为生物制剂在农业生产中的广泛应用^[12,20]。而且在非包埋状态下 THY 本身具有强烈的气味和较高的最低抑菌浓度要求,不适合直接添加到食品中。

2 麝香草酚控释封装传递系统

不同给药方式对 THY 抑菌活性的影响较大。Wang 等^[21]研究证实,模拟随着时间推移逐渐向肉

汤中添加抗菌剂(时间释放模式)后发现,时间释放模式在较低浓度即可达到与即时添加模式相同的抑菌效果;若采用初始阶段就加入即时添加模式一半的剂量,随后再按时间释放模式添加 THY,可将其最小抑制浓度降低至即时添加模式的 50%。而 Svircev 等^[22]在关于采用 THY 熏蒸方式防治李子褐腐病的研究报告中指出,由于果霉菌丝和分生孢子对 THY 高度敏感,只要该物质还存在于果实表面,就能在细胞水平上引起病原真菌细胞膜和细胞器的严重解体,抑制李子褐腐病的发病率。因此,只有实现 THY 在实际应用场景中持久且稳定地释放,才能有效防治果蔬采后病害。目前,将植物精油及其成分包埋多糖、蛋白质等载体中,控制其在应用过程中的释放行为,构建生物活性成分控释封装传递系统,已经成为研究者的共识^[23]。大量 THY 控释封装传递系统已被报道。例如 β -环糊精^[24-26]、酪蛋白酸钠纳米颗粒^[27]、聚乳酸微胶囊^[28]、琥珀酸辛烯基淀粉酯乳液^[29]、明胶-卵磷脂乳化剂组合^[30]、脂质体^[31]和卟啉金属有机框架^[32]都能对 THY 进行控释封装,可提高 THY 的水溶性和热稳定性,使其具有缓释特性而实现长效抑菌。根据最终包合物尺寸,THY 控释封装传递系统可以分为纳米技术和微胶囊两大类。

2.1 纳米技术

由美国纳米技术倡议定义的纳米技术是在原子水平上操纵或合成尺寸在 1~100 nm 范围内的新材料^[33]。目前,该技术在医学、药理学、工程、食品、农业和化学工业中获得了广泛的应用。尤其是在农业中,纳米技术作为新一代活性成分的载体,可以显著减少农用化学品的使用量,并通过更好的害虫和养分管理来提高农产品产量^[34]。Othman 等^[35]采用溶剂浇铸法制备了玉米淀粉/壳聚糖纳米粒子/THY (CS/CNP/Thy)生物纳米复合膜,发现 THY 的加入不会显著影响成品膜的拉升强度、断裂伸长率和杨氏模量,但水蒸气渗透率会随 THY 浓度增加而降低;其中在常温贮藏 7 d 内,CS/CNP/Thy-3%生物纳米复合膜与番茄直接接触的切片上未观察到霉菌生长,该生物纳米复合膜有效延长了樱桃番茄货架期,表现出作为潜在的食品包装材料的良好应用前景。Liu 等^[36]采用同轴电喷雾工艺将 THY 封装在玉米醇和虫胶的核壳中制备出核壳型 THY 负载玉米醇/紫胶纳米颗粒,将其溶于水后进行保鲜涂膜处

理时,可显著延长鲜切哈密瓜在 $(8\pm 1)^\circ\text{C}$ 下的货架期至 16 d。Gong 等^[37]采用抗溶剂沉淀法成功制备了负载 THY 的脱酰胺玉米醇纳米粒子(DZTNP),冷冻干燥后的 DATNP 具有良好的再分散性和物理稳定性,在较长时间内对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果优于未封装的 THY。但 Álvarez-Hernández 等^[19]研究发现壳聚糖封装 THY 虽然能抑制樱桃番茄采后灰霉病,但一定程度上限制了 THY 的抗真菌活性。纳米技术封装 THY 后抑菌活性的改变可能是由以下 2 个原因造成:第一,载体粒子的性质对 THY 抗菌活性产生了影响^[38];第二,纳米封装过程中采用的乳化剂与 THY 之间的潜在拮抗作用,最终导致包封状态下抗菌活性随表面活性剂含量的增加而降低^[39]。

尽管纳米技术可以在较低使用剂量下提供农用化学品的靶向/受控释放来获得其最大的生物功效,但关于纳米材料的生物安全性争议较多,且纳米材料在自然环境中大量扩散后生物反应性的研究非常有限。因此,目前仍需要进一步深入评估纳米技术在农业应用中的风险,通过毒理学研究确定纳米材料危害和纳米产品生命周期中的暴露水平,并评估影响纳米材料毒性与农业系统助剂间可能的相互作用^[34]。

2.2 微胶囊技术

微胶囊技术是一种利用天然或合成聚合物成膜材料将气体、液体或固体包合成粒径为 $1\sim 1\,000\,\mu\text{m}$ 微粒的包装技术^[40]。大量研究结果证实,使用微胶囊作为控释封装传递系统来稳定、增溶和传递活性成分,是替代天然形式 THY 直接用于果蔬保鲜的良好途径。Sun 等^[41]采用超声波技术快速合成了 THY 与 2-羟基丙基- β -环糊精 HP/ β -CD 的包合物,对灰葡萄球菌、指状青霉和交替链霉菌的体外抗真菌活性较纯 THY 显著提高,对番茄灰霉病有明显的抑制作用。Serna-Escolano 等^[42]研究发现与未包埋的 THY 相比,采用 HP/ β -CD 作为壁材制备的 THY 微胶囊能更持久地防治 *Geotrichum citri-aurantii* 引起的柑橘酸腐病。

但上述方法和包埋材料存在成本高、耗时长、制造工艺复杂等局限性,难以在农业领域大规模应用。 β -CD 是一种无毒且高度稳定的环状低聚糖,较其他壁材更廉价易得^[43]。常大伟等^[24]优化了 β -CD/THY 包合物饱和水溶液法制备工艺,当芯壁比(摩

尔比)为 $1:25$ 、搅拌时间为 2.6 h、搅拌温度为 50°C 时 THY 包埋率为 84.51%,该研究结果证实 β -CD 作为壁材包埋 THY 可较纯 THY 表现出更强的高温稳定性和水溶性。相对其他包埋方法,喷雾干燥法是食品行业制备微胶囊最常用的方法,具有成本低、操作简便、生产效率高且包埋效果好等优点^[44]。因此,对果蔬采后病害防治而言,喷雾干燥法制备以 β -CD 为壁材的麝香草酚微胶囊具有极大的成本优势。Frine 等^[45]通过喷雾干燥法获得 THY/ β -CD 微胶囊后,将其添加到 PLA 包装材料中,可以作增塑剂降低 PLA 聚合物链的分子间作用力,从而降低包装刚度;其中含有 5% THY/ β -CD 微胶囊的 PLA 复合包材在 25°C 下体外孵育 10 d 后依然能够显著抑制互生链格孢的生长繁殖。秦文等^[46]采用喷雾干燥法制备了一种缓释型 THY/ β -CD 微胶囊,将其添加到魔芋葡甘聚糖/低酰基结冷胶复合多糖水凝胶中后,可制备一种复合保鲜涂膜;低温贮藏试验结果表明,该处理可有效保持蓝莓表皮蜡质层完整和果实鲜活性,较空白处理延长有效货架期 1 倍以上。

值得注意的是,虽然 β -CD 具有良好的应用特性,但该聚合物内部空腔容量有限且水溶性相对较差。上述特性会极大影响喷雾干燥法制备的 β -CD/THY 微胶囊成品的实际载药量和包埋率。然而目前在果蔬采后领域,与之相关的技术优化报道还相对较少,廉价高效且适用于不同果蔬采后保鲜处理的 THY 微胶囊技术亟待进一步创新开发。

3 麝香草酚抑菌作用机制

3.1 造成细胞膜损伤

一些研究发现 THY 可以诱导 *Alicyclobacillus acidoterrestris*^[47]、*Botrytis cinerea*^[48]等病原菌菌丝塌陷分裂、细胞外电导率的增加、细胞外 pH 值下降、胞内物质大量外溢。有研究者认为 THY 是通过影响细胞膜的表面静电和细胞膜的完整性杀死耐药真菌的^[49]。这可能是由于 THY 分子同时拥有强疏水性苯环和强亲水性酚羟基,能顺利穿越病原菌的屏障结构,进入构成膜脂的双层脂肪酰基链之间^[50-51],影响细胞膜的结构和表面静电,改变细胞膜通透性,从而破坏脂质堆积,导致膜流动性和通透性改变^[52]。THY 作为一种活性小分子,可能存在多个造成真菌细胞膜损伤的作用靶点,例如钾离子通道 KCNAB、质膜 $\text{H}^+(\text{+})$ -ATPase、麦角甾醇等。Hu

等^[53]使用 K^+ 通用抑制剂 4-氨基吡啶阻断 K^+ 喷发,可以显著减轻 THY 介导的分生孢子凋亡,由此揭示了 THY 通过刺激 K^+ 喷发诱导黄曲霉分生孢子凋亡,细胞膜上钾离子通道 KCNAB 是 THY 抑制黄曲霉的潜在靶点。质膜 $H(+)$ -ATPase 是真菌细胞特有的关键酶,属于离子转运 ATP 酶的 P 型 ATP 酶家族的一种膜蛋白,在细胞膜上维持营养吸收所必需的电化学质子梯度,有效调节细胞内 pH 值^[54]。体外试验结果表明,百里酚可显著抑制酵母细胞质膜中的 $H(+)$ -ATPase 活性^[55],减少胞内葡萄糖代谢终产物 H^+ 泵出而引起细胞内酸化,最终导致菌丝生长受限甚至死亡。麦角甾醇是真菌细胞膜的重要组成部分,对质膜结构和功能以及质膜蛋白的定位非常重要,是抗真菌药物的重要生物学靶标^[56]。Gao 等^[57]研究发现 THY 处理可以通过减少 *Fusarium graminearum* 中麦角甾醇生物合成相关基因 *KES1* 的表达,显著降低菌体中麦角甾醇的含量,最终引起细胞膜损伤。前人研究已证实编码氧化甾醇结合蛋白的基因 *KES1* 不仅有助于麦角甾醇生物合成,还可维持细胞内甾醇-脂质分布,促进内吞作用的质膜脂质成分合成和调节高尔基体磷脂酰肌醇-4-磷酸功能^[56,58]。因此,未来进一步的研究可以通过靶向钾离子通道控制、麦角甾醇生物合成及编码质膜 $H(+)$ -ATPase 的相关基因来深入了解 THY 诱导细胞膜损伤的分子作用机制。

3.2 干扰生物膜形成

生物膜是附着在物品或宿主表面并被细胞外聚合物基质包围的微生物群落,属于微生物的一种聚集性行为^[59]。生物膜可以保持膜内环境稳定,保护内部细胞,并有利于微生物实现宿主定殖、防御竞争对手以及抵御恶劣环境^[60]。因此,打破生物膜是防治果蔬采后病害的难点之一。而 THY 能有效破坏微生物细胞完整性,并抑制其正常的代谢活动,从而干扰早期生物膜的形成,并通过自身疏水性阻碍细胞外聚合物基质形成致密网络结构,进而破坏成熟阶段的生物膜^[61]。存在于聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯和不锈钢等多种材质表面的 *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Staphylococcus aureus* 在 THY 中暴露 3 d 后生物膜数量分别减少 70%~77% 和 52%~75%;而暴露 10 d 后 *P. aeruginosa* 和 *S. aureus* 的生物膜几乎被完全破坏^[62]。THY 加入可抑制聚合物膜 (PLA、PBAT、PBS) 中病原菌形成生物膜,其抑制作用呈典

型剂量依赖模式^[63]。Hamzah 等^[64]研究证实 *P. aeruginosa*、*Escherichia coli*、*Candida albicans* 和 *S. aureus* 的单一物种或多物种生物膜形成率均随 THY 浓度的增加而下降,但破坏成熟期生物膜需要比抑制微菌落的黏附和形成更大的 THY 剂量。上述研究结果均证实 THY 可强烈干扰真菌从浮游型向固着型以及微生物群落的发展方向。但生物膜的形成受到多因素影响,未来需要继续探索 THY 抑菌作用不同靶点对生物膜形成过程的影响。

3.3 诱导活性氧积累

活性氧 (ROS) 作为细胞新陈代谢的副产物,存在超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、单线态氧 (1O_2)、羟基自由基 ($\cdot OH$) 等多种形态。研究结果证实生物细胞内一定的 ROS 水平可能有利于正常的生理功能,但过量的 ROS 积累会引发氧化应激,导致核酸、蛋白质和脂质的氧化损伤^[65]。ROS 过量是导致微生物细胞死亡的主要原因^[66]。THY 可引发 ROS 喷发,杀死耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌^[67]。杨康等^[68]在 THY 抑制 *Botrytis cinerea* 作用机理的研究中得到了类似的结果,即 THY 处理可能触发多胺氧化酶 (PAO) 介导的 H_2O_2 产生系统,造成 ROS 的被动累积,MDA 含量升高,引发菌丝严重的氧化损伤。Shen 等^[69]研究发现,ROS 通过诱导 NO 参与 THY 诱导的 *Aspergillus flavus* 孢子死亡,但 NO 介导的细胞死亡仅取决于 THY 是否存在,通过添加外源 NO 并不能抑制孢子的生长。因此,该级联中的效应因子可被视为果蔬采后曲霉病或其他真菌性病害防治开发的潜在靶点。然而,目前 THY 诱导真菌细胞死亡的 ROS-NO 信号级联尚不清楚,有待研究者进一步深入探索。

3.4 影响细胞能量稳态

前人在研究肉桂醛^[70]、滁州菊花精油^[71]等的抑菌活性及作用机制时发现植物精油 (PEOs) 及其组分可以通过干扰真菌能量代谢来抑制其生长繁殖。Wang 等^[72]利用转录组学揭示 THY 对 *F. graminearum* 生长和毒素产生影响的研究中发现:THY 可以通过抑制真菌的糖酵解过程来抑制毒素的产生和生长,在 THY 中暴露的菌体中许多与碳水化合物及蛋白质甲基化酶、乙酰化酶、氧化还原酶和水解酶相关单基因的表达水平均发生了显著变化。乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 是所有生命中枢代谢途径中的关键代谢产物,参与了细胞中几乎所有基本营养素

(糖、脂肪酸和蛋白质)的分解代谢和合成代谢^[73]。一些研究结果表明,THY 可抑制 *Acetyl-CoA* 羧化酶和脂肪酸合成酶的表达^[74],抑制三羧酸循环(TCA)关键酶的活性^[75],显著下调参与 TCA 循环代谢途径的蛋白质的表达水平^[76]。Zhou 等^[77]对 THY 潜在的抑菌靶点进行药物重新定位和反应分析发现,金黄色葡萄球菌 ATCC25923 中的羟酮还原酶(*IOL*)具有 3 个 THY 潜在结合位点,而体外结合试验和体内遗传及功能分析结果表明,百里酚通过靶向 *IOL* 消耗还原型辅酶 II (*NADPH*) 来介导其对金黄色葡萄球菌的杀菌活性。Ban 等^[78]研究发现 THY 可能通过调节糖酵解途径中的 *GPD-1*、*GPD-2*、*GPD-3*、*GPD-4*、*PK-2*、*1DH-1* 和 *1MOO* 的靶标来加速糖代谢,导致乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACC*)失活和丙二酰辅酶 A 减少,从而释放肉碱棕榈酰转移酶(*CPT*),导致脂肪酸转运到线粒体中进行 β -氧化,最终导致秀丽隐杆线虫体内脂肪积累被抑制。综上所述,THY 处理可以导致细胞的能量稳态显著改变,但 THY 诱导的真菌膜内能量稳态紊乱是否有特定的靶点尚未知。因此,未来还应对 THY 如何影响真菌能量代谢途径进一步研究,以推进对 THY 抑真菌作用机理的理解。

4 讨论与结论

近年来,麝香草酚因其抗氧化、广谱抑菌、食品安全性高等优点受到了研究者的关注。然而目前麝香草酚在果蔬采后病害防治中的应用研究尚处于起步阶段,其作用机理尚未阐明且缺乏商业规模生产实践。天然抑菌剂的标准化商业生产必须考虑以下因素:(1)果蔬品种、栽培条件、田间管理水平、种植时间和收获季节等可变性因素对该抑菌剂实际应用效果稳定性的影响;(2)是否可提供廉价且有效的长期保存抑菌剂中有效成分的贮藏方法;(3)是否能完善该抑菌剂相关的化学、毒理学、药效、残留及环境影响等测评,达到国家行政部门审批要求。尽管大量研究结果已证实 THY 的果蔬采后病害防治领域具有巨大的应用潜力,但目前实现 THY 果蔬采后病害防治技术规模生产和实际应用的可能性依然十分有限。目前,THY 在果蔬采后病害防治领域的研究和应用主要面临以下几点挑战。第一,要深入了解 THY 对病原菌的抑制作用机制,改进 THY 控释封装传递系统,并从代谢水平、转录水平等多角度

认识水果和蔬菜的生理变化以及植物表皮蜡质、病原菌生物膜等物理屏障对该系统抑菌活性的影响,从而优化 THY 处理控制采后腐烂的应用效果。第二,在实际生产条件下,增加 THY 的果蔬采后病害防治的体内试验,并使用宏基因组等先进技术来表征果蔬上微生物群落的组成及其动态变化,验证其对抗不同类型采后病害的有效性。第三,由于所研究的果蔬品种、采后病害病原菌和贮藏条件不同,现有研究报告在 THY 施用方式、剂量和频次等研究结论上往往存在较多意见分歧,需要积累更多确凿证据证明 THY 能在大规模实际应用过程中较好地替代现有保鲜技术。第四,研究者还应从法律、食品安全和技术优化 3 个层面综合考虑 THY 作为化学合成杀菌剂安全替代品的可能性,极有必要对 THY 开展更详细的毒理学研究,了解其在生物体中的代谢机制,以评估技术的健康风险。

参考文献:

- [1] KIM K H, KABIR E, JAHAN S A. Exposure to pesticides and the associated human health effects[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 575: 525-535.
- [2] COMBRINCK S, REGNIER T, KAMATOU G P P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit[J]. *Industrial Crops and Products*, 2011, 33(2): 344-349.
- [3] INOUE S, TAKIZAWA T, YAMAGUCHI H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 47(5): 565-573.
- [4] FENG W, CHEN J P, ZHENG X D, et al. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments[J]. *Food Control*, 2011, 22(1): 78-81.
- [5] FATIMA R J, RHODE N C A, ENRIQUE O V C, et al. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(10): 1641-1650.
- [6] 刘春燕,丁捷,邓尚贵,等. 四川产区蓝莓病原真菌的分离鉴定及精油成分对其的抑菌作用[J]. *食品与机械*, 2022, 38(4): 134-140.
- [7] MARCHESE A, ORHAN I E, DAGLIA M, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature[J]. *Food Chemistry*, 2016, 210: 402-414.
- [8] CHILLET M, MINIER J, DUCROQ M, et al. Postharvest treatment of mango: potential use of essential oil with thymol to control anthracnose development[J]. *Fruits*, 2018, 73(3): 153-157.
- [9] SHIN M H, KIM J H, CHOI H W, et al. Effect of thymol and

- linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes[J]. Mycobiology, 2014, 42(3): 262-268.
- [10] TAGHAVI T, BELL M, JAMES C, et al. Response of strawberries exposed to thymol and carvacrol vapours[J]. Indian Journal of Horticulture, 2020, 77(3): 541-547.
- [11] JI S H, KIM T K, KEUM Y S, et al. The major postharvest disease of onion and its control with thymol fumigation during low-temperature storage[J]. Mycobiology, 2018, 46(3): 242-253.
- [12] ARANTI F, MIRAS-MORENO B, LUCINI L, et al. Metabolomic, proteomic and physiological insights into the potential mode of action of thymol, a phytotoxic natural monoterpene phenol[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 153: 141-153.
- [13] DING J, LIU C Y, HUANG P, et al. Effects of thymol concentration on postharvest diseases and quality of blueberry fruit[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134227.
- [14] YAN J Q, ZHANG J X, HU C F, et al. Use of carvacrol and thymol in shellac coating to control stem-end rot on 'Ruby Red' grapefruit and maintain fruit quality during simulated storage and marketing[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 272: 139-153.
- [15] 陈敬鑫, 吴安康, 孟 坤, 等. 百里香酚/海藻酸钠膜对茄梨贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 229-233, 241.
- [16] SAKI M, VALIZADEHKAJI B, ABBASIFAR A, et al. Effect of chitosan coating combined with thymol essential oil on physico-chemical and qualitative properties of fresh fig (*Ficus carica* L.) fruit during cold storage[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(2): 1147-1158.
- [17] 赵亚珠, 郝晓秀, 孟 婕, 等. 百里香精油抗菌包装纸箱对草莓保鲜效果的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 258-263.
- [18] BOONRUANG K, KERDDONFAG N, CHINSIRIKUL W, et al. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R-(-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus[J]. Food Control, 2017, 78: 85-93.
- [19] ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ M H, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ G B, CASTILLEJO N, et al. Development of an antifungal active packaging containing thymol and an ethylene scavenger. Validation during storage of cherry tomatoes[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2021, 29: 100734.
- [20] AGUILAR-VELOZ L M, CALDERON-SANTOYO M, VAZQUEZ GONZALEZ Y, et al. Application of essential oils and polyphenols as natural antimicrobial agents in postharvest treatments: advances and challenges[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(6): 2555-2568.
- [21] WANG Y, YAM K L. Inhibitory effect of thymol via different modes of delivery on growth of *Escherichia coli* DH5 α [J]. Food Packaging and Shelf Life, 2018, 16: 92-96.
- [22] SVIRCEV A M, SMITH R J, ZHOU T, et al. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of monilinia fructicola[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 45(2): 228-233.
- [23] ABARCA R L, RODRIGUEZ F J, GUARDA A, et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 968-975.
- [24] 常大伟, 雷 琦, 闫 瑾, 等. 麝香草酚包合物的制备工艺优化及其评价[J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(6): 51-64.
- [25] TAO F F, HILL L E, PENG Y K, et al. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2014, 59(1): 247-255.
- [26] CELEBIOGLU A, YILDIZ Z I, UYAR T. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol[J]. Food Research International, 2018, 106: 280-290.
- [27] PAN K, CHEN H Q, DAVIDSON P M, et al. Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1649-16457.
- [28] MARTINS I M, RODRIGUES S N, BARREIRO M F, et al. Release studies of thymol and *p*-Cymene from polylactide microcapsules[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012, 51(35): 11565-11571.
- [29] SARKAR P, BHUNIA A K, YAO Y. Impact of starch-based emulsions on the antibacterial efficacies of nisin and thymol in cantaloupe juice[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 155-162.
- [30] XUE J, DAVIDSON P M, ZHONG Q X. Inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* growth in milk and cantaloupe juice by thymol nanoemulsions prepared with gelatin and lecithin[J]. Food Control, 2017, 73: 1499-1506.
- [31] 程映雪, 史 浩, 贺军波, 等. 1-月桂酸-3-棕榈酸甘油二酯纳米结构脂质载体对麝香草酚的包埋与缓释特性[J]. 中国油脂, 2021, 46(10): 37-46.
- [32] MIN T T, SUN X L, ZHOU L P, et al. Electrospun pullulan/PVA nanofibers integrated with thymol-loaded porphyrin metal-organic framework for antibacterial food packaging[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 270: 118391.
- [33] SIDDIQI K S, UR RAHMAN A, TAJUDDIN A H, et al. Properties of zinc oxide nanoparticles and their activity against microbes[J]. Nanoscale Res Lett, 2018, 13(1): 141.
- [34] IAVICOLI I, LESO V, BEEZHOLD D H, et al. Nanotechnology in agriculture: opportunities, toxicological implications, and occupational risks[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 329: 96-111.
- [35] OTHMAN S H, OTHMAN N F L, SHAPI' I R A, et al. Corn starch/chitosan nanoparticles/thymol bio-nanocomposite films for potential food packaging applications[J]. Polymers (Basel), 2021, 13(3): 390.
- [36] LIU Y W, LI S Q, LI H, et al. Synthesis and properties of core-shell thymol-loaded zein/shellac nanoparticles by coaxial electrospray as edible coatings[J]. Materials & Design, 2021, 212: 110214.
- [37] GONG S J, WANG D D, TAO S N, et al. Facile encapsulation of

- thymol within deamidated zein nanoparticles for enhanced stability and antibacterial properties[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2021, 626: 126940.
- [38] LI J, XU X, CHEN Z X, et al. Zein/gum arabic nanoparticle-stabilized pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 200: 416-426.
- [39] LI J M, CHANG J W, SAENGER M, et al. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: physical and antimicrobial properties[J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 191-197.
- [40] LIS ARIAS M J, CODERCH L, MARTI M, et al. Vehiculation of active principles as a way to create smart and biofunctional textiles [J]. *Materials (Basel)*, 2018, 11(11): 2152.
- [41] SUN C, CAO J P, WANG Y, et al. Ultrasound-mediated molecular self-assemble of thymol with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for fruit preservation[J]. *Food Chemistry*, 2021, 363: 130327.
- [42] SERNA-ESCOLANO V, SERRANO M, VALERO D, et al. Effect of thymol and carvacrol encapsulated in Hp- β -cyclodextrin by two inclusion methods against *Geotrichum citri-aurantii*[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(6): 1513-1521.
- [43] LV S Y, ZHANG X M, FENG Y, et al. Gut microbiota combined with metabolomics reveals the repeated dose oral toxicity of β -cyclodextrin in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 574607.
- [44] ULLAH R, NADEEM M, IMRAN M, et al. Effect of microcapsules of chia oil on Ω -3 fatty acids, antioxidant characteristics and oxidative stability of butter[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2020, 19(1): 10.
- [45] FRINE V C, HECTOR A P, MANUEL N S, et al. Development and characterization of a biodegradable PLA food packaging hold monoterpene-cyclodextrin complexes against alternaria alternata [J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(10): 1720.
- [46] 秦文, 丁捷, 李莹露, 等. 一种麝香草酚复合生物涂膜保鲜剂及其制备方法与应用; CN112136544B [P]. 2022-04-05.
- [47] CAI R, ZHANG M Q, CUI L, et al. Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2019, 105: 377-384.
- [48] ZHANG J H, MA S, DU S L, et al. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(5): 2611-2620.
- [49] AHMAD A, KHAN A, AKHTAR F, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2011, 30(1): 41-50.
- [50] FALCONE P, SPERANZA B, DEL NOBILE M A, et al. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(8): 1664-1670.
- [51] SÁNCHEZ M E, DEL V TURINA A, GARCIA D A, et al. Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 34(2): 77-86.
- [52] PINA-VAZ C, GONÇALVES RODRIGUES A, PINTO E, et al. Antifungal activity of thymus oils and their major compounds[J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2004, 18(1): 73-78.
- [53] 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 Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(32): 8530-8536.
- [54] PERLIN D S, SETO-YOUNG D, MONK B C. The plasma membrane H(+) -ATPase of fungi. A candidate drug target? [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 834: 609-617.
- [55] AHMAD A, KHAN A, YOUSUF S, et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol[J]. *Fito-terapia*, 2010, 81(8): 1157-1162.
- [56] FAIRN G D, CURWIN A J, STEFAN C J, et al. The oxysterol binding protein Kes1p regulates Golgi apparatus phosphatidylinositol-4-phosphate function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(39): 15352-15357.
- [57] GAO T, ZHOU H, ZHOU W, et al. The Fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis[J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 770.
- [58] BEH C T, RINE J. A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution[J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117(14): 2983-2996.
- [59] LI Y H, TIAN X L. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms [J]. *Sensors (Basel)*, 2012, 12(3): 2519-2538.
- [60] HAJIAN-MALEKI H, BAGHAEI-RAVARI S, MOGHADDAM M. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, 156: 110928.
- [61] BRAGA P C, ALFIERI M, CULICI M, et al. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae[J]. *Mycoses*, 2007, 50(6): 502-506.
- [62] WALCZAK M, MICHALSKA-SIONKOWSKA M, OLKIEWICZ D, et al. Potential of carvacrol and thymol in reducing biofilm formation on technical surfaces[J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2723.
- [63] PLEVA P, BARTOSOVA L, MACALOVA D, et al. Biofilm formation reduction by eugenol and thymol on biodegradable food packaging material[J]. *Foods*, 2021, 11(1): 2.
- [64] HAMZAH H, PRATIWI S U T, HERTIANI T. Efficacy of thymol and eugenol against polymicrobial biofilm[J]. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 2018, 29(4): 214-221.
- [65] ZEB A, CHOUBEY V, GUPTA R, et al. A novel role of KEAP1/PGAM5 complex: ROS sensor for inducing mitophagy[J]. *Redox*

- Biology, 2021, 48: 102186.
- [66] KOHANSKI M A, DWYER D J, HAYETE B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics [J]. Cell, 2007, 130(5): 797-810.
- [67] LI H, YANG T, LI F Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of monarda punctata essential oil and its main components against common bacterial pathogens in respiratory tract [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7(11): 7389.
- [68] 杨 康,陈 健,辛爱景,等. 麝香草酚抑制灰霉菌的作用机理: PAO-H₂O₂系统[J]. 应用生态学报, 2020, 31(7): 2441-2448.
- [69] SHEN Q S, ZHOU W, LI H B, et al. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of aspergillus flavus via the induction of nitric oxide[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155647.
- [70] ZHANG W Y, GAO J, SHEN F K, et al. Cinnamaldehyde changes the dynamic balance of glucose metabolism by targeting ENO1 [J]. Life Sciences, 2020, 258: 118151.
- [71] CUI H Y, BAI M, SUN Y H, et al. Antibacterial activity and mechanism of Chuzhou chrysanthemum essential oil[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 48: 159-166.
- [72] WANG L Q, WU K T, YANG P, et al. Transcriptomics reveals the effect of thymol on the growth and toxin production of *Fusarium graminearum*[J]. Toxins (Basel), 2022, 14(2): 142.
- [73] LU X Y, LIU Y W, YANG Y Q, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1378.
- [74] KANG D H, LEE Y S, OH S M, et al. Inhibitory effects of thymol isolated from *Curcuma longa* L. on adipogenesis in HepG2 cells [J]. Processes, 2020, 8(9): 1191.
- [75] 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.
- [76] ZHANG M, GE J, YU X Y. Transcriptome analysis reveals the mechanism of fungicidal of thymol against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum[J]. Current Microbiology, 2018, 75(4): 410-419.
- [77] ZHOU W, WANG Z, MO H Z, et al. Thymol mediates bactericidal activity against staphylococcus aureus by targeting an Aldo-Keto reductase and consequent depletion of *NADPH*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(30): 8382-8392.
- [78] BAN F F, HU L B, ZHOU X H, et al. Inverse molecular docking reveals a novel function of thymol: inhibition of fat deposition induced by high-dose glucose in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(8): 4243-4253.

(责任编辑:陈海霞)