

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202302003



假臭草来源植物内生真菌生物转化(+) - 柠檬烯产物分析

杨道茂

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为了筛选能够生物转化(+) - 柠檬烯的微生物, 将 7 株假臭草内生真菌作为生物催化剂, 在 30 °C, 150 r · min⁻¹ 下发酵 6 d 后, 添加体积分数为 0.5% 的(+) - 柠檬烯继续转化 4 d, 并采用薄层层析、气相色谱-质谱联用和核磁共振技术分析产物。结果表明: 各真菌生物转化(+) - 柠檬烯的主要产物为 (1S, 2S, 4R) - 柠檬烯-1, 2-二醇、环氧柠檬烯、(1S, 2R, 4R) - 柠檬烯-1, 2-二醇等; 菌株 *Alternaria Nees* PS08 生成唯一产物 (1S, 2S, 4R) - 柠檬烯-1, 2-二醇, 质量浓度达到 (2.46 ± 0.16) g · L⁻¹。

关键词: (+) - 柠檬烯; 假臭草; 植物内生真菌; (1S, 2S, 4R) - 柠檬烯-1, 2-二醇

中图分类号: Q 53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2023)04-0495-07

Analysis of Biotransformation Products of (+)-Limonene by Plant Endophytic Fungi From *Praxelis clematidea*

YANG Daomao

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to screen microorganisms of biotransformation of (+)-limonene, seven endophytic fungi from *Praxelis clematidea* were used as biocatalysts. After 6 days of fermentation under 30 °C and 150 r · min⁻¹, 0.5% volume fraction of (+)-limonene was added for further 4 days, the products were analyzed by Thin Layer Chromatography, Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance technology. The results showed that the main products of biotransformation of (+)-limonene by various fungi were (1S, 2S, 4R)-limonene-1, 2-diol, limonene epoxide, (1S, 2R, 4R)-limonene-1, 2-diol, etc.. The strain *Alternaria Nees* PS08 produced only product (1S, 2S, 4R)-limonene-1, 2-diol, and its mass concentration reached (2.46 ± 0.16) g · L⁻¹.

Keywords: (+)-limonene; *Praxelis clematidea*; plant endophytic fungi; (1S, 2S, 4R)-limonene-1, 2-diol

(+) - 柠檬烯为柠檬精油的主要成分, 属于柑橘加工过程中的副产物。由于结构简单、价格低廉, 有多个可以催化的位点^[1], (+) - 柠檬烯一直是理想的生物转化底物模型。能转化(+) - 柠檬烯的微生物种类多样, 如假单胞属细菌(*Pseudomonas* sp.)^[2-3], 尖孢镰刀菌 152b^[4]、指状青霉菌^[5-6]、黑曲霉^[7]、解脂耶氏酵母^[8-9]。虽然在生物催化剂的筛选领域取得了巨大的进展, 但微生物的低转化效率^[10]和巨大的筛选工作量严重影响生物转化的推广与应用, 如 ROTTAVA 等^[11]从 405 株菌株中只发现 8 株菌株能够转化(+) - 柠檬烯。针对该问题, 有学者指出植物内生真菌是一个很有发展前景的筛选来源。植物内生真

收稿日期: 2023-02-03

通信作者: 杨道茂(1975-), 男, 讲师, 博士, 主要从事微生物生物转化的研究。E-mail: ydmao@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家级大学生科创项目(202110385039); 福建省个人和团队科技员项目(2022 年度); 华侨大学高层次人才科研启动资金资助项目(Z15X0004)

菌因为需要与宿主植物一起共进化来适应环境的变化,使其可能会产生丰富的酶来适应宿主^[12],如海藻来源内生真菌 *Botryosphaeria* sp.^[13] 能将外消旋樟脑转化为 6-endo-羟基樟脑、6-exo-羟基樟脑等产物,火炬松来源内生真菌 *Phomopsis* sp. 能转化(+) - 柠檬烯合成香芹酮和柠檬烯-1,2-二醇,如果底物为柑橘皮提取物,则生成单一产物柠檬烯-1,2-二醇^[14],内生真菌 *Aspergillus fumigatus*^[15] 能转化硫利达嗪. 因此,利用植物内生真菌进行生物转化是可行的^[16].

假臭草(*Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Rob.) 属于菊科植物,原产南美,现入侵亚洲和大洋州等地. 由于假臭草对土壤肥力吸收力强,严重影响果树的生长,此外,它能分泌一种有毒的恶臭味,影响家畜觅食,属于入侵植物. 研究发现假臭草花精油对柑橘木虱具有驱避和致死活性^[17],且其总黄酮类化合物对金黄葡萄球菌有抑菌活性^[18]. 目前,尚未见到假臭草内生真菌用于生物转化(+) - 柠檬烯的相关报道. 基于此,本文以分离自假臭草内生真菌为生物转化剂,考察其生物转化产物.

1 材料与方法

1.1 药品与仪器

(+) - 柠檬烯(日本东京化成工业株式会社);石油醚(60~90 ℃)、无水乙醇、乙酸乙酯(上海市国药试剂有限公司);(1S, 2S, 4R) - (+) - 二戊烯-1, 2-二醇((1S, 2S, 4R) - 柠檬烯-1, 2-二醇, CAS 号: 38630-75-0, 美国 Sigma-Aldrich 公司);氘代甲醇(广东省广州赛迪菲生物科技有限公司). 以上试剂均为分析纯. 0.22 μm 滤膜(天津市津腾实验设备有限公司);100 目硅胶、GF₂₅₄ 型薄层层析硅胶板(50 mm×200 mm, 山东省青岛海洋化工厂分厂).

ZQZY-75CN 型振荡培养箱(上海支楚仪器有限公司);XH-C 型旋涡混合器(江苏省金坛市白塔新宝仪器厂);SW-CJ-1FD 型洁净工作台(江苏省苏州安泰空气技术有限公司);H1650 型医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Agilent 8860 GC System-5977B 型气质联用仪器(带 G4513A 自动进样器,美国安捷伦科技有限公司);EYELA N-1100 型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社);Bruker-500 MHz 型核磁共振谱仪(瑞士布鲁克公司,由华侨大学分析测试中心提供).

1.2 微生物与培养基

7 株植物内生真菌(*Alternaria* Nees PS01, *Alternaria* Nees PS06, *Alternaria* Nees PS07, *Alternaria* Nees PS09, *Alternaria* Nees PS10, *Alternaria* Nees PS18, *Diaporthe amygdali* PS08) 由华侨大学化工学院王奇志博士馈赠.

培养基均采用沙保氏培养基:蛋白胨 10 g · L⁻¹, 葡萄糖 40 g · L⁻¹ (pH 值为 4.0~6.0).

1.3 检测方法

薄层层析(TLC)方法:展开剂为 V(石油醚) : V(乙酸乙酯) = 7 : 3,显色剂采用体积分数为 1% 的香草醛浓硫酸溶液.

气相色谱-质谱联用(GC-MS):Agilent HP-5 ms 型色谱柱(30 m×250 μm ×0.25 μm),载气为氦气,进样量为 1 μL. 温度程序:60 ℃保持 1 min,20 ℃ · min⁻¹ 升温到 300 ℃,保持 13 min. MS 离子源温度为 230 ℃,MS 四极杆温度为 150 ℃,质谱扫描范围(*m/z*)为 60~800.

2 实验步骤

2.1 菌株活化与发酵

各测试菌株接种于装有马铃薯葡萄糖琼脂培养基的培养皿(直径为 90 mm)上,在 30 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d 后,存于 4 ℃ 冰箱中备用. 每株菌挑取一接种环菌丝接种于装有 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 28 ℃,150 r · min⁻¹ 条件下培养 6 d.

2.2 生物转化(+) - 柠檬烯及产物分析

生物转化流程参考海洋真菌的生物转化流程并做细微调整^[19],具体流程为:在每株菌培养了 6 d 的 100 mL 发酵液中,加入 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的(+) - 柠檬烯-乙醇溶液(柠檬烯溶于等体积乙醇,柠檬烯的最终体积分数为 0.5%),在 28 ℃,150 r · min⁻¹ 条件下继续培养 4 d.

转化结束,发酵液用布氏漏斗过滤后,取 3 mL 滤液转移到 150 mm×15 mm 的试管中,用等体积乙酸乙酯萃取;然后,将萃取相转移到干燥的 150 mm×15 mm 的试管中,并用无水硫酸钠脱水;最后,取萃取相进行 TLC 和 GC-MS 检测。

2.3 菌株 PS18 转化产物结构鉴定

鉴于 TLC 检测结果,选取包含 2 个转化产物的菌株 PS18,按照节 2.2 的生物转化流程制备转化产物。具体流程为:配制 2.5 L 发酵培养基,分装于 25 瓶 250 mL 锥形瓶中。后续的发酵与转化步骤参考节 2.1,2.2。转化结束,将发酵液用布氏漏斗过滤,等体积乙酸乙酯萃取滤液 2 次后,合并萃取液,用旋转蒸发仪于 40 ℃,真空度 -0.1 MPa 下蒸发有机溶剂,最终获得转化产物 3.33 g。

取少量乙酸乙酯完全溶解转化产物后,用 100 目硅胶拌样阴干,随后采用干法上玻璃色谱柱 (300 mm×25 mm),洗脱剂体系采用 V(石油醚):V(乙酸乙酯)为 14:2~14:4 进行洗脱,每个梯度洗脱体积为 200 mL 以上,并用 TLC 跟踪洗脱结果。最终获得化合物 PS18-1(1.56 g),PS18-2(0.87 g),用氘代甲醇溶解后进行核磁共振检测。

2.4 各菌株转化产物的质量浓度检测

建立柠檬烯-1,2-二醇标准曲线。实验步骤为:用乙酸乙酯溶解标准品并配制 8.600 0 g·L⁻¹母液,采用逐步稀释的方法,将母液稀释成不同质量浓度,随后采用节 1.3 的方法获得柠檬烯-1,2-二醇的峰面积-质量浓度的关系图。

挑取各菌株的菌丝接种于装有 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中,每株菌重复 3 次,后续发酵和生物转化步骤参考节 2.1,2.2。最后,依据标准曲线求出各菌株转化产物的平均质量浓度。

3 实验结果与讨论

3.1 各菌萃取液 TLC 分析

将各真菌的萃取相进行 TLC 检测,结果如图 1 所示。由图 1 可知:菌株 PS01,PS06 和 PS08 的条带仅发现 1 个主要斑点,且比移值(R_f)与标准品((1S,2S,4R)-柠檬烯-1,2-二醇)一致;菌株 PS07,PS18 的条带明显多出 1 个斑点。从真菌测序结果可知,除了菌株 PS08 归属于扁桃腐皮壳菌(*D. amygdali*),其余菌株归属于链格孢属(*A. Nees*),但转化产物却不相同,说明转化产物与种属之间不存在必然的联系。

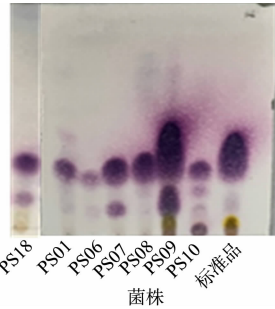
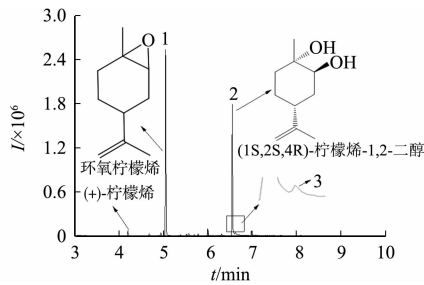


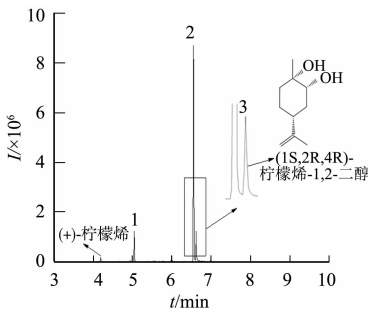
图 1 各真菌萃取相 TLC 图
Fig. 1 TLC diagram of extraction phase of various fungi

3.2 转化产物 GC-MS 检测

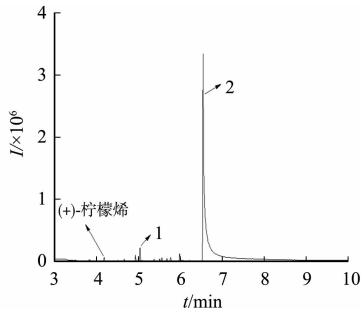
各菌株转化产物总离子色谱(TIC)图,如图 2 所示。图 2 中:I 为强度;t 为时间。检索 NIST 17.0 数据库可知,峰 1 匹配环氧柠檬烯(limonene oxide),属于柠檬烯-1,2-二醇前体物质^[20-22];峰 2 匹配化合物柠檬烯-1,2-二醇,保留时间与标准品一致;峰 3 匹配结果与峰 2 一致,推测为峰 2 的同分异构体;峰 4 未检索到匹配的化合物。



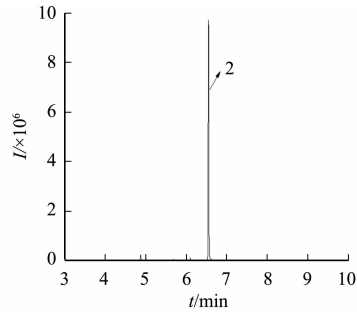
(a) 菌株 PS01



(b) 菌株 PS06



(c) 菌株 PS07



(d) 菌株 PS08

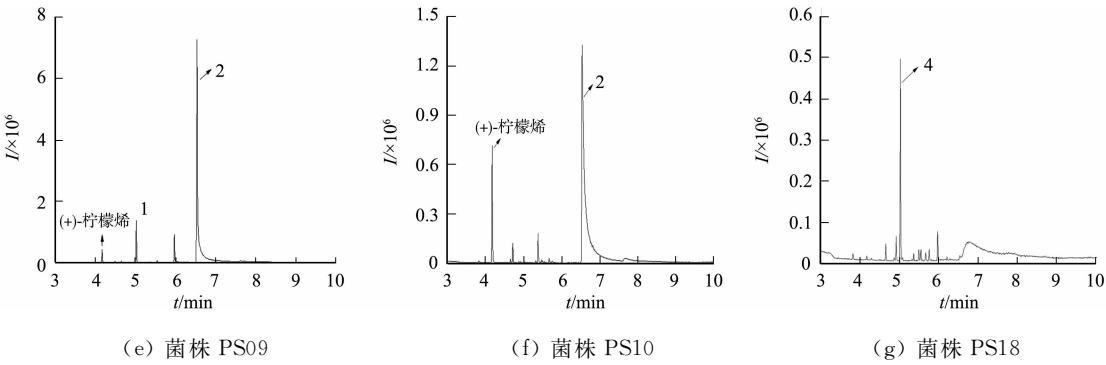


图 2 各菌株转化产物的 TIC 图

Fig. 2 TIC diagram of transformation products of various strains

3.3 转化产物结构鉴定

化合物 PS18-1,PS18-2 的 TLC 图和 TIC 图,如图 3 所示.

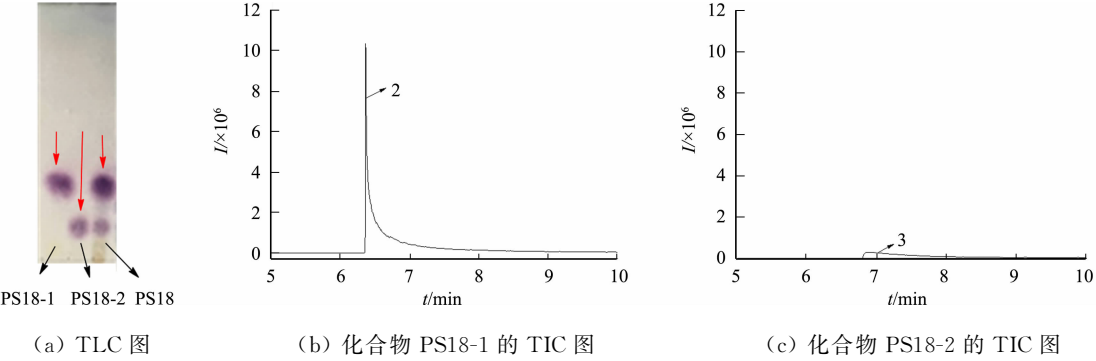


图 3 化合物 PS18-1,PS18-2 的 TLC 图和 TIC 图

Fig. 3 TLC and TIC diagrams of compound PS18-1, PS18-2

经数据库检索,化合物 PS18-1,PS18-2 均匹配为柠檬烯-1,2-二醇,结合 TLC 结果,推测二者为同分异构体. 化合物 PS18-1 碳谱¹³C NMR(500 MHz,CD₃OD)的化学位移(δ)为 151.44,108.98,74.41,71.70,38.79,35.13,34.38,27.63,27.41,21.08. 该碳谱化学位移与文献报道的化合物 2((1S,2S,4R)-柠檬烯-1,2-二醇)完全一致^[23],也与化合物 2a 的碳谱化学位移相同^[24]. 化合物 PS18-1 的氢谱¹H NMR(500 MHz,CD₃OD)的化学位移(δ)为 3.55(dd, $J = 2.3,2.0,1\text{H},\text{H-2}$),1.63(m,H-3),1.91(ddd,1Heq,13.2,13.2,2.6,H-3),2.27(m,1H,H-4),1.48(m,Hax-5),1.60(m,Heq-5),1.49(m,1Hax,H-6),1.73(m,1Heq,H-6),1.20(s,3H,H-7),4.71(bs,1H,H-9),4.68(bs,1H,H-9),1.72(s,3H,H-10). 该数据与化合物 2 的氢谱数据一致^[23]. 综上,化合物 PS18-1 归属于(1S,2S,4R)-柠檬烯-1,2-二醇. 化合物 PS18-1 和化合物 2 的碳谱图和氢谱图,如图 4 所示.

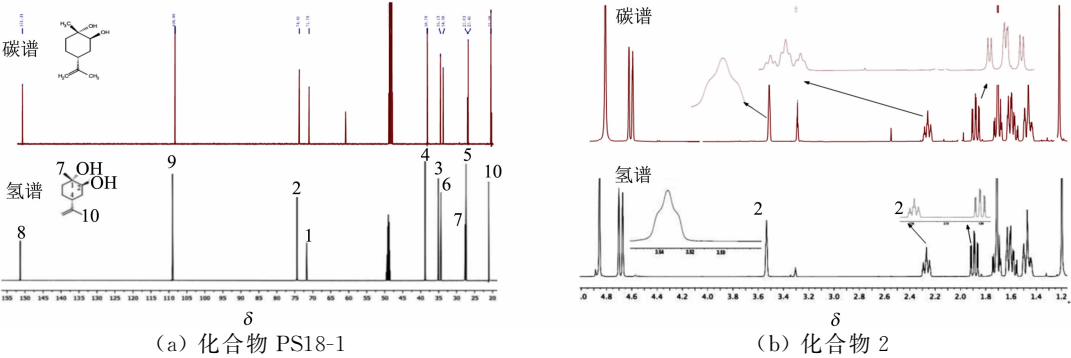


图 4 化合物 PS18-1 和化合物 2 的碳谱图和氢谱图

Fig. 4 ¹³C and ¹H NMR of compound PS18-1 and compound 2

化合物 PS18-2 碳谱¹³C NMR(500 MHz,CD₃OD)的化学位移(δ)为 150.11,109.39,77.83,74.45,45.23,39.79,37.87,29.77,21.02,18.91. 该碳谱数据与化合物 1((1S,2R,4R)-柠檬烯-1,2-二醇)数据

完全相同^[23]. 化合物 PS18-2 的氢谱¹H NMR(500 MHz, CD₃OD)的化学位移(δ)为 3.50(dd, $J = 4.6, 11.8, 1\text{H}, \text{H}-2$), 1.30(m, H_{ax}-3), 1.83(m, 1Heq, H-3), 2.06(dddd, 1H, 12.4, 12.4, 3.5, 3.4, H-4), 1.47(dddd, 17.5, 14.8, 14.8, 3.5, H_{ax}-5), 1.75(m, Heq-5), 1.25(m, 1H_{ax}, H-6), 1.63(m, 1Heq, H-6), 1.15(s, 3H, H-7), 4.71(bs, 1H, H-9), 4.69(bs, 1H, H-9), 1.72(s, 3H, H-10), 该数据与化合物 1 的氢谱数据一致^[23]. 综上, PS18-2 归属为(1S, 2R, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇. PS18-2 与化合物 1 的碳谱图和氢谱图, 如图 5 所示.

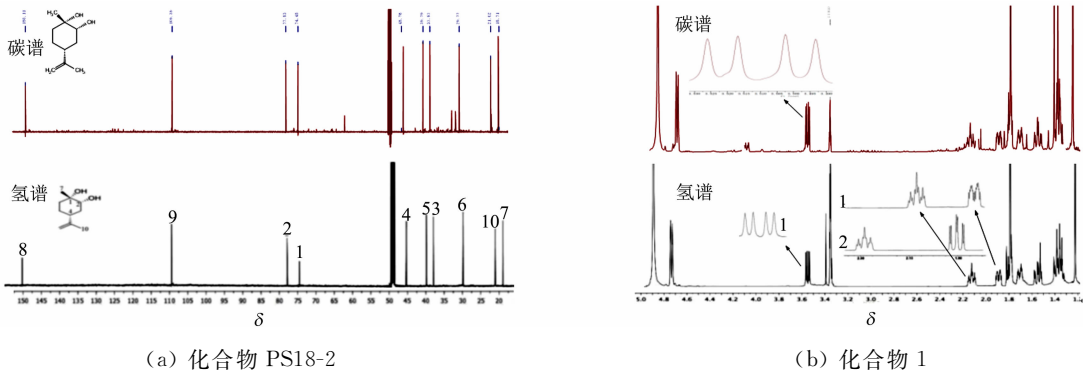


图 5 化合物 PS18-2 和化合物 1 的碳谱图和氢谱图

Fig. 5 ¹³C and ¹H NMR of compound PS18-2 and compound 1

由图 3, 4, 5 可知: R_f 较高的斑点为(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇, R_f 较低的斑点为(1S, 2R, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇. 文献[25]报道柠檬烯转化为柠檬烯-1, 2-二醇时, 需要通过 FAD 结合单加氧酶(FAD-binding monooxygenase)生成柠檬烯环氧化物(limonene-1, 2-epoxide), 再通过环氧化物水解酶(epoxide hydrolase)生成柠檬烯-1, 2-二醇. 通过比较 7 株植物内生真菌的转化产物, 可得以下 2 个结论. 1) 来源于不同种属植物内生真菌的环氧化物水解酶存在差异, 如 *D. amygdali* PS08 和 *A. Nees* PS18, 前者生成(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇, 后者额外生成(1S, 2R, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇, 与文献[26]报道的氯过氧化物酶转化(+) - 柠檬烯生成柠檬烯-1, 2-二醇类似, 该酶在氯离子存在下生成 2 种手性产物. 2) 即使是来源于同一种属植物内生真菌的环氧化物水解酶也可能存在差异, 如 *A. Nees* PS01 与 *A. Nees* PS06 生成(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇, 而 *A. Nees* PS07, *A. Nees* PS09 和 *A. Nees* PS18 则额外生成(1S, 2R, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇. 因此, 该转化机制可能需要进一步完善.

3.4 产物的测量

柠檬烯-1, 2-二醇标准曲线, 如图 6 所示. 图 6 中: S 为峰面积; ρ 为柠檬烯-1, 2-二醇的质量浓度. 由图 6 可得标准曲线方程为 $S = 129\,971.734\,13\rho - 15\,963.437\,46$, $R^2 = 0.993$. 依此标准曲线, 各菌株产(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇的质量浓度, 如图 7 所示.

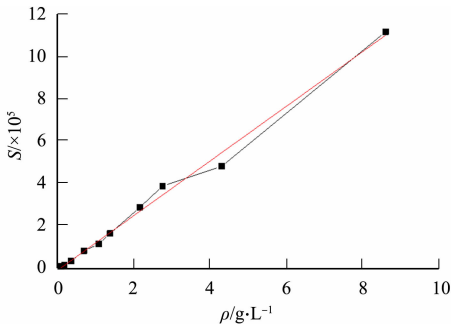


图 6 柠檬烯-1, 2-二醇标准曲线

Fig. 6 Standard curves of limonene-1,2-diol

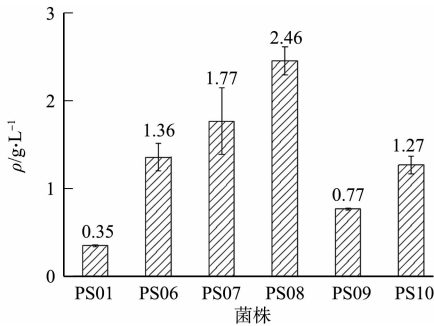


图 7 各菌株产(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇的质量浓度

Fig. 7 Mass concentration of (1S, 2S, 4R)-limonene-1,2-diol produced by various fungi

由图 7 可知: 各菌株产(1S, 2S, 4R)-柠檬烯-1, 2-二醇的质量浓度为 $0.36 \sim 2.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 其中, 菌株 PS08 产量最高, 达到 $(2.46 \pm 0.16) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验结果与文献[14]吻合.

4 结 束 语

转化产物柠檬烯-1,2-二醇(柠檬甘油)属于一种比较重要的柠檬烯含氧衍生物. 研究表明,该化合物具有抗癌^[27-29]和抗炎活性^[28],也可作为合成其他生物活性物质前体^[30-32]. 由于该化合物存在 4 种立体构型^[24],手性不同的纯萜类对映体其药理活性(抗微生物活性、毒性或气味特性)存在差异^[33],如(1S,2R,4R)-柠檬烯-1,2-二醇和(1S,2S,4R)-柠檬烯-1,2-二醇对新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的最小抑制浓度分别为 184,1 470 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[23]. 因此,4 种构型的化合物生物活性数据有待进一步挖掘. 采用假臭草来源植物内生真菌转化(+) -柠檬烯,转化单一且产量达克级,转化效果较理想.

参考文献:

[1] 台亚楠,董曼,任婧楠,等. 柠檬烯微生物转化的研究进展[J]. 食品科学,2014,35(17):272-277. DOI:10.7506/sp-kx1002-6630-201417052.

[2] SPEELMANS G,BIJLSMA A,EGGINK G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,1998,50(5):538-544. DOI:10.1007/s002530051331.

[3] MIRATA M A,HEERD D,SCHRADER J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264[J]. Process Biochemistry,2009,44(7):764-771. DOI:10.1016/j.procbio.2009.03.013.

[4] MOLINA G,BUTION M L,BICAS J L,*et al.* Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B[J]. Food Chemistry,2015,174(1):606-613. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.059.

[5] ADAMS A,DEMYTTENAERE J C R,DE KIMPE N. Biotransformation of (R)-(+) - and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*: Investigation of the culture conditions[J]. Food Chemistry,2003,80(4):525-534. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00322-9.

[6] DEMYTTENAERE J C R,VANOVERSCHELDE J,DE KIMPE N. Biotransformation of (R)-(+) - and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. , and the use of solid-phase microextraction for screening[J]. Journal of Chromatography A,2004,1027(1/2):137-146. DOI:10.1016/j.chroma.2003.08.090.

[7] PARSHIKOV I A,SUTHERLAND J B. The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids [J]. Process Biochemistry,2014,49(12):2086-2100. DOI:10.1016/j.procbio.2014.09.005.

[8] FERRARA M A,ALMEIDA D S,SIANI A. *et al.* Bioconversion of R-(+) -limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. Brazilian Journal of Microbiology,2013,44(4):1075-1080. DOI:10.1590/S1517-83822014050000008.

[9] VESPERMANN K A C,PAULINO B N,BARCELOS M C S,*et al.* Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2017,101(5):1805-1817. DOI:10.1007/s00253-016-8066-7.

[10] BICAS J L,FONTANILLE P,PASTORE G M,*et al.* A bioprocess for the production of high concentrations of R-(+) - α -terpineol from R-(+) -limonene[J]. Process Biochemistry,2010,45(4):481-486. DOI:10.1016/j.procbio.2009.11.007.

[11] ROTTAVA I,CORTINA P F,GRANDO C E,*et al.* Isolation and screening of microorganisms for R-(+) -limonene and (-)- β -pinene biotransformation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2010,162(3):719-732. DOI:10.1007/s12010-009-8872-9.

[12] RODRIGUEZ P,GONZALEZ D,GIORDANO S R. Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2016,133(1):S569-S581. DOI:10.1016/j.molcatb.2017.02.013.

[13] DE JESUS H C R,JELLER A H,DEBONSI H M,*et al.* Multiple monohydroxylation products from rac-camphor by marine fungus *Botryosphaeria* sp. isolated from marine alga *Bostrychia radicans* [J]. Journal of the Brazilian Chemical Society,2017,28(3):498-504. DOI:10.21577/0103-5053.20160262.

[14] BIER M C,MEDEIROS A B,SOCCOL C R. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media[J]. Fungal Biology,2017,121(2):137-144.

- [15] BORGES K B, BORGES W D E S, PUPO M T, *et al.* Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine[J]. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 2007, 77(3): 669-674. DOI: 10.1007/s00253-007-1171-x.
- [16] DEMYTTEAERE J C R, WILLEMEN H M. Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*[J]. *Phytochemistry*, 1997, 47(6): 1029-1036. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)80066-6.
- [17] 王奇志, 刘育梅, 李书明, 等. 假臭草花精油的化学组成及对柑橘木虱的驱避和致死活性[J]. *昆虫知识*, 2018, 55(1): 117-125.
- [18] 王伟, 代光明, 李书明, 等. 假臭草总黄酮超声波辅助提取工艺优化及抑菌活性[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(8): 1343-1361.
- [19] 杨道茂, 陈煌. 近海海洋真菌生物转化(+) - 柠檬烯[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2020, 41(1): 67-71. DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.201904020.
- [20] MAROSTICA M R, PASTORE G M. Biotransformation of limonene: A review of the main metabolic pathways[J]. *Quimica Nova*, 2007, 30(2): 382-387. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200027.
- [21] 张璐璐, 范刚, 何进, 等. 柠檬烯微生物转化及其相关酶的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(12): 317-326. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.051.
- [22] FONTANILLE P, GROS J B, LARROCHE C. Biotransformations with crude enzymes and whole cells[M]// Pandey A, *et al.* *Enzyme Technology*. New York: Asiatech Publishers Inc, 2006.
- [23] LEITÃO S G, MARTINS G R, MARTÍNEZ-FRUCTUOSO L, *et al.* Absolute stereochemistry of antifungal limonene-1,2-diols from *Lippia rubella*[J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30(4): 537-543. DOI: 10.1007/s43450-020-00081-x.
- [24] MORIKAWA H, YAMAGUCHI J I, SUGIMURA S I, *et al.* Systematic synthetic study of four diastereomerically distinct limonene-1,2-diols and their corresponding cyclic carbonates[J]. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2019, 15: 130-136. DOI: 10.3762/bjoc.15.13.
- [25] SALES A, MOREIRA R C, PASTORE G M, *et al.* Establishment of culture conditions for biotransformation of R-(+)-limonene to limonene-1,2-diol by *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 78: 8-14. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.022.
- [26] ÁGUILA S, VAZQUEZ-DUHALT R, TINOCO R, *et al.* Stereoselective oxidation of R-(+)-limonene by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*[J]. *Green Chemistry*, 2008, 10(6): 647-653. DOI: 10.1039/B719992A.
- [27] LEE T K, ROH H S, YU J S, *et al.* Pinecone of pinus koraiensis inducing apoptosis in human lung cancer cells by activating caspase-3 and its chemical constituents[J]. *Chemical Biodiversity*, 2016, 14(4): e1600412. DOI: 10.1002/cbdv.201600412.
- [28] LAPPAS C M, LAPPAS N T. D-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability[J]. *Cellular Immunology*, 2012, 279(1): 30-41. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.09.002.
- [29] ALEXANDRINO T D, DE MEDEIROS T D M, RUIZ A L T G, *et al.* Structural properties and evaluation of the antiproliferative activity of limonene-1,2-diol obtained by the fungal biotransformation of R-(+)- and S(-)-limonene[J]. *Chirality*, 2022, 34(6): 887-893. DOI: 10.1002/chir.23439.
- [30] BLAIR M, TUCK K L. A new diastereoselective entry to the (1S,4R)- and (1S,4S)-isomers of 4-isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol, aggregation pheromones of the ambrosia beetle *Platypus quercivorus*[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, 20(18): 2149-2153. DOI: 10.1016/j.tetasy.2009.08.009.
- [31] LEUNG A E, RUBBIANI R, GASSER G, *et al.* Enantioselective total syntheses of the proposed structures of prevazol B and evaluation of anti-cancer activity[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2014, 12(41): 8239-8246. DOI: 10.1039/C4OB01662A.
- [32] LEUNG A E, BLAIR M, FORSYTH C M, *et al.* Synthesis of the proposed structures of Prevezol C[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(9): 2198-2201.
- [33] SILVA A C R D, LOPES P M, AZEVEDO M M B D, *et al.* Biological activities of α -pinene and β -pinene Enantiomers[J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 6305-6316. DOI: 10.3390/molecules17066305.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)