

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202207028



胜红蓟内生真菌转化柠檬烯 产物的抑菌活性

裴真巧, 王奇志, 杨道茂, 于海玲

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为考察入侵植物胜红蓟内生真菌转化柠檬烯产物的抑菌活性,以柠檬烯二醇作为标品对照,采用薄层色谱法筛选具有转化柠檬烯能力的胜红蓟内生真菌.通过气相色谱-质谱法对菌株的转化产物进行分析,并对其生物转化柠檬烯发酵液乙酸乙酯粗提物的抑菌活性进行研究.从22株胜红蓟内生真菌中共筛选得到14株具有转化柠檬烯能力的菌株,其中有6个菌株的柠檬烯转化乙酸乙酯粗提物中含有柠檬烯-1,2-二醇;菌株 *Diaפורthe phaseolorum* (wl01)的柠檬烯转化产物中,柠檬烯-1,2-二醇的质量浓度最高($3.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);菌株 *Alternaria alternata* (wp06)生物转化柠檬烯发酵液的乙酸乙酯提取物对柑橘意大利青霉类致病菌有一定的抑制效果,对意大利青霉的抑菌效果为 $(40.03 \pm 3.58)\%$.

关键词: 胜红蓟; 内生真菌; 柠檬烯; 生物转化; 抑菌活性

中图分类号: O 657.6

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2023)01-0087-07

Antibacterial Activity of Limonene Product Transformed by *Ageratum conyzoides* Endophytic Fungi

PEI Zhenqiao, WANG Qizhi, YANG Daomao, YU Hailing

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

Abstract: In order to explore the antibacterial activity of limonene conversion by endophytic fungi from invasive plant *Ageratum conyzoides* L., using limonene-1,2-diol as the standard control, the endophytic fungi with the ability to transform limonene were screened by thin layer chromatography. The transformation products of the strain were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, and the antibacterial activity of the ethyl acetate extracts of the biotransformed limonene fermentation broth was studied. It was found that 14 strains with the ability to transform limonene were screened from 22 *Ageratum conyzoides* L. endophytic fungi, among them, 6 strains of limonene-converted ethyl acetate crude extracts contained limonene-1,2-diol. The mass concentration of limonene-1,2-diol in the limonene conversion product of strain *Diaפורthe phaseolorum* (wl01) was the highest ($3.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). The ethyl acetate extract of strain *Alternaria alternata* (wp06) biotransformed limonene fermentation broth had a certain inhibitory effect on *Penicillium italicum*, and the inhibitory effect on *Penicillium italicum* was $(40.03 \pm 3.58)\%$.

Keywords: *Ageratum conyzoides* L.; endophytic fungi; limonene; biotransformation; antibacterial activity

胜红蓟(*Ageratum conyzoides* L.)是菊科胜红蓟属一年生草本,具有清热解毒、消炎止血、抗菌及

收稿日期: 2022-07-25

通信作者: 王奇志(1976-),女,副教授,博士,主要从事入侵植物资源化利用的研究. E-mail: wqz@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省农业重点自然科学基金资助项目(2014N0026);福建省泉州市校(院)地协同创新专项(重点)项目(2014Z101);2018年中医药公共卫生服务补助专项(财社[2018]43)

抗胃溃疡等药效^[1-4]. 研究表明, 胜红蓟内生微生物易产生与宿主相同或相似的生物活性物质^[5]. 胜红蓟内生微生物的发酵液及菌体对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)具有较好的抑菌活性^[6-8]. 前期研究发现, 从胜红蓟中分离出来的内生真菌发酵液的粗提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)表现出良好的抑菌活性^[9].

目前, 利用微生物进行生物转化的研究逐渐引起人们的广泛关注, 该方法不仅对环境的影响小, 还可以将廉价的底物转变成高附加值的产物. 柠檬烯(limonene)又名苧烯, 属单萜类化合物, 是年产量大、价格低廉的农业和工业副产品, 将其作为转化前体用于生物转化, 获得的转化产物具有较高的经济价值^[10]. 研究学者发现真菌 *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864 转化柠檬烯的产物对病原真菌 *Cryptococcus neoformans* 具有较强的抑制作用^[11-13]. 对生物转化柠檬烯的转化产物分析发现, 紫苏醇、香芹酮、卡维醇、二氢香芹酮和 α -松油醇等生物活性丰富的产物^[14-15]具有深入研究的价值.

本文从 22 株胜红蓟内生真菌中筛选具有转化柠檬烯能力的菌株, 并考察其生物转化柠檬烯发酵液乙酸乙酯粗提取物对指状青霉(*Penicillium digitatum*)、柑橘炭疽病菌(*Gloeosporium frucrigenum*)、意大利青霉(*Penicillium italicum*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)和油茶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的抑菌活性.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 从外来入侵植物胜红蓟中分离出 22 株内生真菌^[9], 包括从根中分离的 5 株内生真菌 *Fusarium solani* (wp02), *Schizophyllum commune* (wp05), *Lasiodiplodia theobromae* (wp04), *Rhizomucor variabilis* (wp03), *Alternaria alternata* (wp06); 从花中分离的 7 株内生真菌 *Phyllosticta capitalensis* (wf06), *Fusarium striatum* (wf03), *Fusarium oxysporum* (wf04), *Curvularia chiangmaiensis* (wf01), *Diaporthe phaseolorum* (wf07), *Diaporthe longicolla* (wf02), *Fusarium striatum* (wf05), 从茎中分离的 5 株内生真菌 *Letendreaa* sp. (wz06), *Fusarium lateritium* (wz01), *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (wz05), *Bartalinia pondoensis* (wz03), *Paraconiothyrium cyclothyrioides* (wz02), 从叶中分离的 5 株内生真菌 *Colletotrichum cobbittiense* (wl05), *Botryosphaeria dothidea* (wl03), *Diaporthe phaseolorum* (wl01), *Cercospora kikuchii* (wl02), *Phyllosticta capitalensis* (wl04).

指状青霉(*Penicillium digitatum*)、意大利青霉(*Penicillium italicum*)和柑橘炭疽病菌(*Gloeosporium frucrigenum*)由华中农业大学龙超安教授提供; 油茶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)由华侨大学杨道茂博士提供; 香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)由华侨大学王明元副教授提供.

1.1.2 试剂 马铃薯葡萄糖(PDB)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、青霉素钾、硫酸链霉素、胰蛋白胨、葡萄糖水(深圳市晨泓科技有限公司); (+)-柠檬烯、柠檬烯-1,2-二醇标准品(纯度>97%, 美国 Sigma 有限公司); 无水乙醇、乙酸乙酯、石油醚(上海国药集团化学试剂有限公司); 其他试剂均为分析纯.

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖液体双抗培养基配方为 PDB 40.1 g, 蒸馏水 1 000 mL, 青霉素钾 150 mg, 硫酸链霉素 120 mg. 青霉素钾和硫酸链霉素用于抑制芽孢杆菌等细菌的生长, 对内生真菌的生物活性没有抑制作用, 二者均不能高压保温灭菌, 需待培养基冷却至 60 °C 过滤灭菌再加入.

试验所用物品的灭菌条件均为 0.1 MPa, 120 °C 灭菌 20 min.

1.2 仪器与设备

GF254 硅胶板(50 mm×100 mm, 山东省青岛海洋化工有限公司); 超净工作台(浙江苏净净化设备有限公司); GC-MS-QP2010 Ultra 型气质联用仪(日本 Shimadzu 公司); pH 计(深圳衡欣科技股份有限公司); 灭菌锅(上海申安医疗器械厂); 布氏漏斗、旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司).

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养及转化产物制备 将 22 株内生真菌分别接种至马铃薯葡萄糖液体双抗培养基中, 置 28 °C 恒温培养 48 h 活化; 取直径为 5 mm 的菌块接入装有 100 mL 液体培养液的锥形瓶中, 在 28 °C,

200 r·min⁻¹的摇床中培养 72 h 后,加入体积分数为 0.5% 的柠檬烯和无水乙醇的混合溶液;继续转化培养 96 h 后,将各菌株的发酵液用布氏漏斗抽滤,滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 2 次,合并萃取液,用旋转蒸发仪将有机溶剂蒸干并用甲醇复溶。经无水硫酸钠脱水后,将浓缩液置于 10 mL 的试管中,封闭保存于黑暗条件下,备用。对样品进行薄层色谱(TLC)分析,以柠檬烯-1,2-二醇标准品为对照,验证内生菌株转化柠檬烯是否生成柠檬烯-1,2-二醇。

TLC 检测条件:在硅胶板上,用毛细管(0.5 mm×10 mm)分别吸取上述制备的样品及底物对照组发酵液进行点样,并将其置于体积比为 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=15:4 的展开剂中展开;显色剂为香草醛-硫酸-乙醇溶液(15 g 香草醛溶于 250 mL 体积分数为 1% 的浓硫酸-乙醇溶液中)。

转化产物质量浓度的测定:根据预实验结果,转化的主要产物是柠檬烯-1,2-二醇,参考杜钢等^[16]的检测方法,称取柠檬烯-1,2-二醇标准品,用无水乙醇配制成不同质量浓度(0.625,1.25,2.5,5.0,10.0,20.0 mg·mL⁻¹)的溶液,根据标准品的质量浓度和气相色谱质谱测得的相应质量浓度的峰面积,使用 Origin 9.0 进行回归方程的拟合,最终得到回归方程 $Y=607\ 443.39x-228\ 129.17(R^2=0.996\ 7)$ 。将获得的主产物的峰面积代入回归方程中,可得内生真菌转化产物的质量浓度。

1.3.2 产物成分分析 气相色谱-质谱(GC-MS)参考杨道茂等^[17]的检测方法,设置检测条件如下:色谱柱为 Rxi-5sil MS(30.00 m×0.25 mm×0.25 μm),柱箱温度为 70 °C,进样口温度为 250 °C,柱流量 1 mL·min⁻¹,分流比 1:2,进样量 1 μL,升温程序为柱温 60 °C×3 min→升温速度 10 °C·min⁻¹→柱温 150 °C×5 min→升温速度 20 °C·min⁻¹→柱温 250 °C×3 min。质荷比(m/z)扫描范围为 40~200。将上述制备的样品及对照组发酵液用移液枪取 1.5 mL 置于色谱瓶中,用于产物成分分析。

1.3.3 菌株转化柠檬烯乙酸乙酯粗提物抑菌活性测定 利用菌丝生长速率法,测定样品对植物病原菌的抑制作用^[18]。取体积分数为 0.5%(100 μL)的样品加入体积为 20 mL 的 PDA 琼脂平板中,待凝固后,取直径为 5 mm 的病原菌块接种至平板中央,将添加等量乙酸乙酯、空白平板作为对照组。将接种后的平板置于 28 °C 的恒温培养箱中培养,待对照组长满平板时,计算抑菌率,其计算公式为

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照病原菌菌落半径} - \text{供试病原菌菌落半径}}{\text{对照病原菌菌落半径}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 数据处理

试验结果均以 3 次重复试验的平均值±标准偏差表示。采用 Origin 9.0 软件进行数据统计学意义分析并绘图。

2 试验结果与分析

2.1 柠檬烯生物转化菌株的筛选

将 22 个内生真菌转化柠檬烯发酵液乙酸乙酯粗提物在硅胶板上形成的点与转化产物柠檬烯-1,2-二醇形成的点进行比对。胜红蓟内生真菌生物转化柠檬烯薄层色谱图,如图 1 所示。图 1 中:编号 1~23 分别为 wp02,wp05,wp04,wp03,wp06,wf06,wf03,wf04,柠檬烯-1,2-二醇,wf01,wf07,wf02,wf05,wz06,wz01,wz05,wz03,wz02,wl05,wl03,wl01,wl02,wl04。结果发现,加入底物柠檬烯培养 4 d 后,菌株 wp02,wp03,wf03,wf01,wf05,wz01,wl05,wl02,wf07,wp06,wl01,wz03,wf06,wf04 具有转化柠檬烯的能力,其中,菌株 wp03,wp06,wf07,wf05,wz03 和 wl01(红色圆圈表示的菌株)与转化产物柠檬烯-

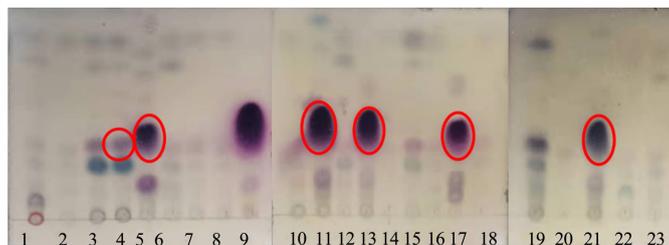


图 1 胜红蓟内生真菌生物转化柠檬烯薄层色谱图

Fig. 1 TLC of limonene biotransformation by endophytic fungi from *Ageratum conyzoides*

1,2-二醇形成的点的比移植(R_f)相同,因此,推测上述6个菌株具有生物转化(+)-柠檬烯生成柠檬烯-1,2-二醇的能力.将菌株 wp02, wf06, wf03, wf04, wz01, wl05 与转化产物柠檬烯-1,2-二醇对照组形成的斑点进行比对,发现它们的斑点较浅,证明这几个菌株生物转化(+)-柠檬烯的能力较弱,因此,在后续的试验中并未将其作为研究对象.

2.2 菌株转化柠檬烯产物分析

不同菌株的气相色谱-质谱总离子流图,如图2所示.图2中: t 为保留时间; δ 为绝对丰度.

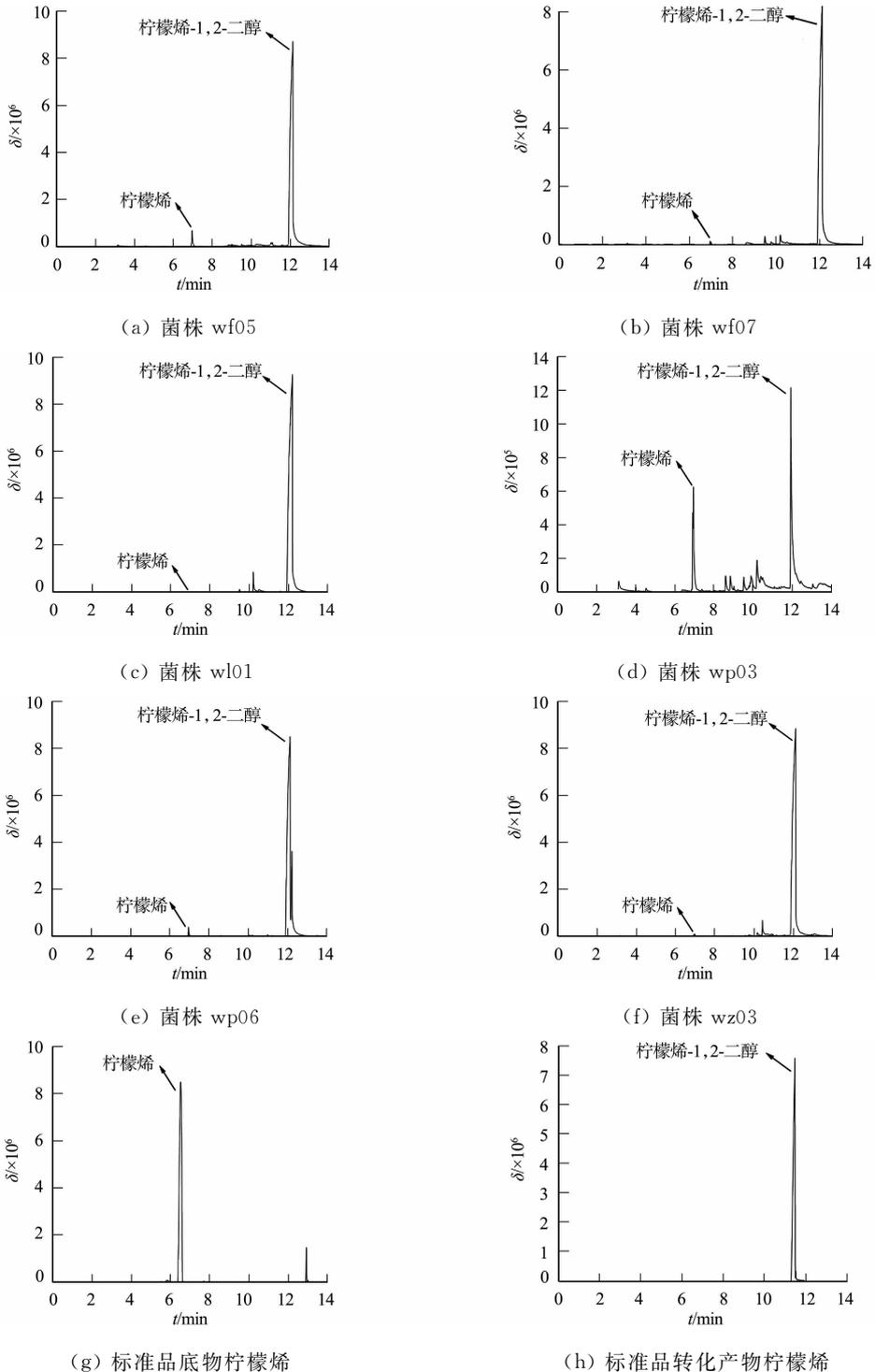


图2 不同菌株的气相色谱-质谱总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagrams of gas chromatography-mass spectrometry of different strains

将菌株 wp03, wp06, wf07, wf05, wz03, wl01 的生物转化的乙酸乙酯粗提物与底物柠檬烯和产物柠檬烯-1,2-二醇标准品的 GC-MS 图进行对比分析发现,菌株具有转化柠檬烯的能力,该结果与薄层色谱

的结果(图 1)一致,并且生成了柠檬烯-1,2-二醇. 其中,菌株 wf07, wp06, wl01, wz03 形成的转化产物(柠檬烯-1,2-二醇)峰信号不仅比菌株 wp03 和 wf05 强,而且对应的底物(柠檬烯)的峰信号也低,证明它们转化柠檬烯生成新物质的能力较强.

不同菌株转化产物的质量浓度,如图 3 所示. 图 3 中: ρ 为柠檬烯-1,2-二醇的质量浓度;相同字母表示数据之间的差异不具有统计学意义,不同字母(a, b, c)之间表示差异具有统计学意义, $P < 0.05$. 由图 3 可知:菌株 wl01, wp06, wz03 转化柠檬烯生成柠檬烯-1,2-二醇质量浓度的差异不具有统计学意义,其生物转化(+)柠檬烯生成柠檬烯-1,2-二醇的能力强于菌株 wf05, wf07, wp03,且菌株 wl01 转化柠檬烯生成的柠檬烯-1,2-二醇的质量浓度最高,为 $3.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;菌株 wf05 和 wf07 转化柠檬烯生成柠檬烯-1,2-二醇质量浓度的差异也不具有统计学意义.

2.3 菌株转化柠檬烯的乙酸乙酯粗提物的抑菌活性

胜红蓟内生真菌转化柠檬烯乙酸乙酯粗提物对柑橘炭疽病菌、意大利青霉和指状青霉等致病菌具有一定的抑菌活性. 不同菌株转化发酵液对 5 种植物病原真菌的抑菌活性,如表 1 所示. 表 1 中:“—”表示无抑菌活性. 由表 1 可知:菌株 wp06 转化柠檬烯的乙酸乙酯粗提物对意大利青霉的抑菌率最高,其值为 $(40.03 \pm 3.58)\%$ ($P < 0.05$);菌株 wz03 转化柠檬烯的乙酸乙酯粗提物对柑橘炭疽病菌的抑制率达到 $(28.69 \pm 1.03)\%$ ($P < 0.05$);菌株 wf05 对指状青霉的抑菌率为 $(27.17 \pm 1.75)\%$;而菌株 wz03 对香蕉枯萎病菌抑菌率仅有 $(2.36 \pm 0.68)\%$;内生真菌转化柠檬烯的乙酸乙酯粗提物对油茶炭疽病菌无抑菌活性.

表 1 不同菌株转化发酵液对 5 种植物病原真菌的抑菌活性

Tab. 1 Antifungal activity of fermentation broth transformed by different strains against five plant pathogenic fungi

菌株	抑菌率/%				
	香蕉枯萎病菌	柑橘炭疽病菌	意大利青霉	指状青霉	油茶炭疽病菌
wf05	—	20.61 ± 3.61^b	24.86 ± 2.03^b	27.17 ± 1.75^b	—
wf07	—	19.59 ± 4.35^b	21.58 ± 8.15^b	15.96 ± 1.70^b	—
wl01	—	22.87 ± 2.14^b	29.87 ± 4.07^b	13.48 ± 3.10^b	—
wp03	—	18.88 ± 0.74^b	20.72 ± 5.93^b	20.05 ± 5.29^b	—
wp06	—	25.38 ± 0.72^b	40.03 ± 3.58^a	20.27 ± 3.11^b	—
wz03	2.36 ± 0.68^c	28.69 ± 1.03^b	37.53 ± 1.11^a	25.12 ± 5.45^b	—
乙酸乙酯	—	—	—	—	—

3 结论

从 22 个胜红蓟内生真菌中共筛选得到 14 个具有转化柠檬烯能力的菌株,其中,菌株 *Fusarium striatum* (wf05), *Diaporthe phaseolorum* (wf07), *Diaporthe phaseolorum* (wl01), *Rhizomucor variabilis* (wp03), *Alternaria alternata* (wp06), *Bartalinia pondoensis* (wz03) 转化柠檬烯产物是柠檬烯-1,2-二醇. 菌株 wf05, wf07 和 wl01 同属的真菌也能转化生成柠檬烯-1,2-二醇^[19-21], 菌株 *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864^[11,22], *Phomopsis* sp.^[23], *Aspergillus cellulosa*^[24] 通过生物转化柠檬烯也可以生成柠檬烯-1,2-二醇. 间座壳属的 wl01 和 wf07、链格孢属的 wp06、顶多毛孢属的 wz03 菌株转化柠檬烯的能力较强. GC-MS 检测结果表明,菌株 wf05, wf07, wl01, wp03, wp06, wz03 转化柠檬烯的主要产物是柠檬烯-1,2-二醇,其中,菌株 wl01 转化柠檬烯的能力最强,转化产物柠檬烯-1,2-二醇的质量浓度为 $3.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,高于其同属(间座壳属)转化产物柠檬烯-1,2-二醇的质量浓度 ($3.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[14]. Sales 等^[11] 对生物转化柠檬烯工艺进行优化后发现,转化产物柠檬烯-1,2-二醇的最高质量浓

度为 $4.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 因此, 可以对菌株 w101 转化柠檬烯的工艺进行优化, 从而提高其转化生成柠檬烯-1, 2-二醇的能力.

研究表明: 萜类化合物具有抗菌和消炎等生物活性^[25-26], 而柠檬烯-1, 2-二醇作为其衍生物, 对新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*) 具有较好的抑制作用^[21, 27]. 此外, 抑菌活性测定结果表明, 菌株 wp06 转化柠檬烯的发酵液乙酸乙酯粗提物对意大利青霉的抑菌作用显著($40.03 \pm 3.58\%$), 菌株 wz03 对柑橘炭疽病菌的抑菌率较好($28.69 \pm 1.03\%$), 菌株 wf05 对指状青霉具有一定抑菌效果($27.17 \pm 1.75\%$); 仅有菌株 wz03 对香蕉枯萎病菌有微弱的抑菌作用($2.36 \pm 0.68\%$); 菌株转化柠檬烯发酵液的乙酸乙酯粗提物对油茶炭疽病菌没有抑菌作用.

综上所述, 从胜红蓟中分离出的内生真菌具有转化柠檬烯的能力, 且转化产物对意大利青霉类柑橘致病菌具有较好的抑菌活性. 然而, 具体发挥抑菌作用的是粗提物还是单体物质有待进一步深入研究.

参考文献:

- [1] SRIVASTAVA A K, GUPTA M, SINGH R P, *et al.* Analysis on inhibiting pathogenic activity of fungi *Curvularia lunata* by essential oils[J]. Bioscience Biotechnology Research Communications, 2020, 13(4): 2187-2192. DOI: 10.21786/bbrc/13.4/84.
- [2] YUSNAWAN E, INAYATI A. Antifungal activity of crude extracts of *Ageratum conyzoides*, *Cyperus rotundus*, and *Amaranthus spinosus* against rust disease[J]. Journal of Agricultural Science, 2018, 40(3): 403-414. DOI: 10.17503/agrivita.v40i0.1889.
- [3] KOUAME B K F P, TOURE D, KABLAN L, *et al.* Chemical constituents and antibacterial activity of essential oils from flowers and stems of *Ageratum conyzoides* from ivory coast[J]. Records of Natural Products, 2018, 12(2): 160-168. DOI: 10.25135/rnp.22.17.06.040.
- [4] TRINH P C, THAO L T T, HA H T V, *et al.* DPPH-Scavenging and antimicrobial activities of asteraceae medicinal plants on uropathogenic bacteria[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 2020: 1-9. DOI: 10.1155/2020/7807026.
- [5] 隋丽, 万婷玉, 路杨, 等. 内生真菌对植物促生、抗逆作用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1325-1331. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.06.024.
- [6] TANVIR R, SAJID I, HASNAIN S, *et al.* Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation[J]. Microbiological Research, 2016, 185: 22-35. DOI: 10.1016/j.micres.2016.01.003.
- [7] TANVIR R, SAJID I, HASNAIN S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with asteraceae plants: Isolation, biodiversity and bioactivities[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(4): 767-773. DOI: 10.1007/s10529-013-1430-0.
- [8] MOMIN M D, IBRAHIM K S. Endophytic bacteria isolated from *Ageratum conyzoides* L. and *Mikania micrantha kunth* of mizoram, Northeast India[J]. National Academy Science Letters, 2021, 44(4): 355-358. DOI: 10.1007/s40009-020-01013-y.
- [9] QIAO Zipeng, WANG Qizhi, LIU Jianfu, *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of the ethyl acetate extracts of endophytic fungi isolated from *Ageratum conyzoides* L. [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2021, 30(5): 421-433. DOI: 10.5246/jcps.2021.05.033.
- [10] ANANDAKUMAR P, KAMARAJ S, VANITHA M K. D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 45(1): 1-10. DOI: 10.1111/jfbc.13566.
- [11] SALES A, MOREIRA R C, PASTORE G M, *et al.* Establishment of culture conditions for bio-transformation of R-(+)-limonene to limonene-1, 2-diol by *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864[J]. Process Biochemistry, 2019, 78: 8-14. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.01.022.
- [12] LI Houjin, LAN Wenjian, CAI Chuanghua, *et al.* Biotransformation of limonene by marine bacteria[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(7): 946-950. DOI: 10.1016/S1872-2040(06)60046-7.
- [13] CHATTERJEE T, BHATTACHARYYA D K. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(5): 541-546. DOI: 10.1007/s002530000538.
- [14] BIER M C J, MEDEIROS A B P, KIMPE N D, *et al.* Evaluation of antioxidant activity of the fermented product

- from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. [J]. *Biotechnology Research and Innovation*, 2019, 3(1):168-176. DOI:10.1016/j.biori.2019.01.002.
- [15] KAROU I J, MARZOUK B. Characterization of bioactive compounds in tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities[J]. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 1-12. DOI:10.1155/2013/345415.
- [16] 杜钢, 钟慈平, 杨诗嘉, 等. 鲜藤椒中柠檬烯和芳樟醇测定方法研究及含量分析[J]. *食品科技*, 2020, 45(2): 324-328. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2020.02.052.
- [17] 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.
- [18] 尤佳琪, 李国庆. 拟康宁木霉 T-51 菌株发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性[J]. *植物保护*, 2021, 47(1): 74-78. DOI:10.16688/j.zwbh.2019560.
- [19] 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: 606-613. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.059.
- [20] BICAS J L, BARROS F F C, WAGNER R, *et al.* Optimization of R-(+)- α -terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(9): 1061-1070. DOI:10.1007/s10295-008-0383-0.
- [21] MEDEIROS T D M D, ALEXANDRINO T D, PASTORE G M, *et al.* Extraction and purification of limonene-1,2-diol obtained from the fungal biotransformation of limonene[J]. *Separation and Purification Technology*, 2021, 254: 1-6. DOI:10.1016/j.seppur.2020.117683.
- [22] SALES A, PASTORE G M, BICAS J L. Optimization of limonene biotransformation to limonene-1,2-diol by *Colletotrichum nymphaeae* CBMAI 0864[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 86: 25-31. DOI:10.1016/j.procbio.2019.07.022.
- [23] BIER M C J, MEDEIROS A B P, 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. DOI:10.1016/j.funbio.2016.11.003.
- [24] NOMA Y, YAMASAKI S, ASAKAWA Y. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(8): 2725-2727. DOI:10.1016/0031-9422(92)83619-A.
- [25] MURTHY K N C, JAYAPRAKASHA G K, MANTUR S M, *et al.* Citrus monoterpenes: Potential source of phytochemicals for cancer prevention[J]. *Emerging Trends in Dietary Components for Preventing and Combating Disease*, 2012, 1093: 545-558. DOI:10.1021/bk-2012-1093.ch031.
- [26] 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]. *Chemistry and Biodiversity*, 2017, 14(4): 1-24. DOI:10.1002/cbdv.201600412.
- [27] LEITAO S G, MARTINS G R, FRUCTUOSO L M, *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.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)