

柠檬烯微生物转化的研究进展

台亚楠, 董 曼, 任婧楠, 潘思轶, 王可兴, 范 刚*
(环境食品学教育部重点实验室, 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 柠檬烯是一种重要的功能性单萜, 在食品中作为香精香料添加剂被广泛使用, 其含氧衍生物具更高经济价值。与传统化学方法相比, 微生物转化反应条件温和, 区域和立体选择性好, 环境友好且获得的为“天然”产品。本文介绍柠檬烯的微生物转化产物, 分析柠檬烯的主要转化途径以及转化途径中的关键酶, 并系统地综述影响生物转化的因素。

关键词: 柠檬烯; 生物转化; 代谢途径; 酶

Recent Advances in Biotransformation of Limonene

TAI Ya-nan, DONG Man, REN Jing-nan, PAN Si-yi, WANG Ke-xing, FAN Gang*
(Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Limonene is one of the most widely distributed terpenes in nature, and is widely used as a flavor and fragrance additive in food products. The biotransformation of limonene to more valuable oxygenated derivatives has emerged as an attractive alternative. The reaction proceeds under mild conditions without generating toxic wastes, and the products obtained with better regio- and enantioselectivity can be labeled as “natural”. Biotransformation products of limonene are described in this paper. Meanwhile, the major biotransformation pathways and some enzymes involved are elucidated. Furthermore, this paper provides a systematic review of the factors affecting the biotransformation of limonene.

Key words: limonene; biotransformation; metabolic pathway; enzyme

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 17-0272-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201417052

柠檬烯 (limonene) 又称苧烯, 学名为1-甲基-4-(1-甲基乙基) 环己烯, 分子式 $C_{10}H_{16}$ (图1), 是除蒎烯外, 最重要和分布最广的萜烯, 被发现存在于300多种植物中。在柑橘类水果 (特别是其果皮) 的精油中含量较高, 在橙皮精油中的含量高达90%~95%^[1]。

柠檬烯属单环单萜, 是一种无色至淡黄色液体, 具有令人愉快的柠檬样香气, 不溶于水, 溶于乙醇、丙酮等有机溶剂。柠檬烯有D和L两种构型, 但主要以D-异构体形式存在^[2]。它们在外观上没有什么区别, 都是无色至淡黄色液体, 都有新鲜柠檬样香气, 从不同的原料获取的柠檬烯的气味可能有差异, 这是由其中的杂质引起的^[3]。柠檬烯是一种化学性质非常活泼的化合物, 在光照和空气接触的条件下, 柠檬烯可自动氧化成一系列的氧化单环单萜。

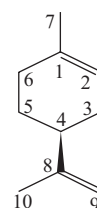


图1 D-柠檬烯的结构式
Fig.1 Structure of D-limonene

微生物转化是通过微生物细胞或酶对外源性底物进行结构修饰, 也就是利用微生物代谢过程中产生的某个或某一系列酶对底物进行的催化反应。与化学转化相比, 微生物转化具有高度专一性、反应条件温和、反应速率快、收率高、成本低及反应步骤少等优点, 目前已被广泛用于有机合成、新药开发、体外代谢产物预测、香料生产等方面^[4]。据报道, 每年柑橘加工业会产生约

收稿日期: 2013-07-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31101239); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2013PY097); 湖北省研究与开发计划项目 (2011BBB045)

作者简介: 台亚楠 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为风味化学。E-mail: 824364166@qq.com

*通信作者: 范刚 (1982—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为风味化学。E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

36 000 t副产物D-柠檬烯,其价廉易得,是微生物转化理想的起始物料^[5]。

单萜类化合物是目前用得最多的香料。含氧单萜类有比萜烯更强的香味,但其在自然界中资源很少。用微生物转化生产出来的香料化合物已被欧洲和美国食品法界定为“天然的”,而天然香料在价格上要比合成香料贵很多。因此,通过微生物转化来制备单萜芳香产品,是新产品开发的新的思路和方法^[6]。通过微生物的生物转化,可以有效地将D-柠檬烯转化为香气更浓、应用更为广泛、商业价值更高的 α -松油醇、紫苏酸等物质。

1 柠檬烯的微生物转化产物

亲脂性的单萜类化合物与微生物细胞膜磷脂疏水端有亲合作用,对细胞产生毒性,而引起细胞膜的过氧化应激反应,结合在膜上的多种酶,其活性得到提高或者抑制,但部分氧化酶活性提高,导致产生丰富的氧化单萜。单萜的生物转化是细胞为维持自身稳定结构的一种动态调节。真菌、细菌、酵母以及微藻都可对柠檬烯进行生物转化。在研究过的微生物菌株中,真菌为主,细菌次之,而酵母和微藻只有少量研究。

柠檬烯的微生物转化主要产物有1、2位环氧化产物和其水解产物柠檬烯-1,2-二醇;3位羟基化产物异薄荷烯醇,羧基化产物异薄荷烯酮;6位羟基化产物香芹酮,羧基化产物香芹醇;7位甲基的羟基化产物紫苏醇,进一步羧基化产物紫苏酸;8位氧化产物松油醇;8,9位环氧化产物等^[7]。紫苏酸是一种无气味的固体,对细菌和真菌具有强烈的抑制活性,可以作为天然防腐剂;其对恶性黑色素瘤细胞的转移具有抑制作用,与紫苏醇联合使用,可以作为非小细胞肺癌增殖的化学治疗剂,具有很高的药用价值。香芹系列香料可用于酒类、糖果、软饮料、烘烤食品加香用香精的调配,也是高级香精的重要原料。*R*-(+)- α -松油醇具有优雅的紫丁香香气,广泛用于配制紫丁香型、柑橘型香精及香水中,亦可用于生产乙酸 α -松油酯、二氢 α -松油醇及其他合成香料。

2 柠檬烯的代谢途径及代谢途径中的关键酶

2.1 柠檬烯的代谢途径

微生物对柠檬烯的代谢途径主要有6种,见图1,分别是:1) C7位氧化为紫苏基化合物。2) 1,2位双键的环氧化和相应二醇及其氧化产物的生成。3) C6位氧化生成香芹醇(carveol)、香芹酮(carvone)以及二氢香芹酮(dihydrocarvone)。4) C8位羟基化直接生成 α -松油醇。5) C3位羟基化生成异薄荷烯醇(isopiperitenol)和异薄荷烯酮(isopiperitenone)。6) 8,9位环氧化生成柠檬烯-8,9-环氧化物^[8]。

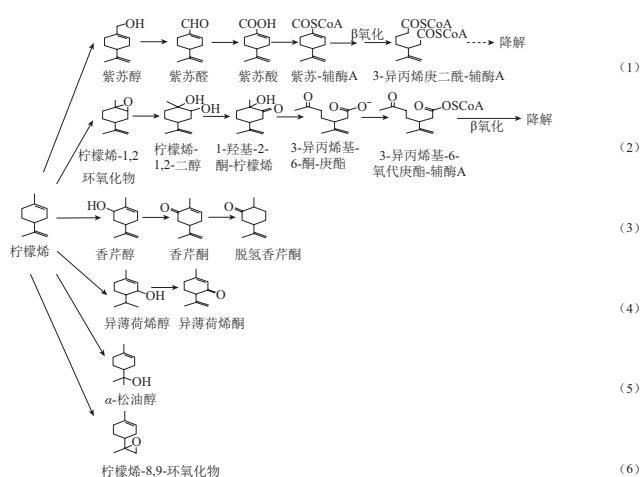


图2 柠檬烯的6种主要代谢途径

Fig.2 Six major metabolic pathways for limonene

Dhavalikar于1966年首次报道了柠檬烯的生物降解途径,他们分离出一株以D-柠檬烯做唯一碳源和能源的*Pseudomonas putida*,从培养基中提取并分析,显示产物有二氢香芹酮、香芹酮、香芹醇、柠檬烯-1,2-*cis*-二醇、柠檬烯-1,2-*trans*-二醇、柠檬烯-6,9-二醇、紫苏酸、 β -异丙基庚二酸、2-羟基-8-对-异丙基环己基甲酸和6,9-二羟基紫苏酸。根据转化产物的结构,他们认为该株假单胞菌*Pseudomonas putida*转化柠檬烯的主要途径是先对C7进行羟基化得到紫苏醇,进一步氧化为紫苏醛和紫苏酸,然后发生类似 β 氧化的过程完全降解(途径1)^[8]。

Werf等^[9]用D-柠檬烯做唯一碳源和能源,从120个菌株里面筛选出一株红平红球菌*Rhodococcus erythropolis* DCL14。该菌株对柠檬烯存在一个完全不同的代谢途径:首先引发柠檬烯1、2位C=C的环氧化得到柠檬烯-1,2-环氧化物,然后水解为相应二醇,接着被氧化为羟基酮,然后Baeyer-Villiger加氧酶催化(途径2)。

*O. pusilla*通过烯丙基氧化,将(+)-柠檬烯转化为*trans*-香芹醇和香芹酮(途径3),通过内环C=C双键1,2位的环氧化转化为*trans*-柠檬烯-1,2-环氧化物(途径2)。Ghasemi等^[10]研究表明卵囊藻*Oocystis pullisa*生物转化D-柠檬烯24 h后可以得到反式香芹醇,少量的香芹酮(途径3)及反式柠檬烯氧化物。Rasoul-Amini等^[11]对4株微藻用海藻酸盐固定化后发现其中3株:*Chlorella* sp. MCCS030, *Chlorella* sp. MCCS031, *Chlorella* sp. MCCS031可以氧化柠檬烯的C6位得到*cis*-香芹醇、*trans*-香芹醇和香芹酮(途径3)。其中*Chlorella* sp. MCCS 030可立体选择性地柠檬烯转化为*trans*-香芹醇而不生成*cis*-香芹醇。

Adams等^[12]报道指状青霉*Penicillium digitatum* CMC可以将*R*-(+)-柠檬烯转化为纯*R*-(+)- α -松油醇(途径4),8 h后产率达到93%。指状青霉*Penicillium digitatum* DSM12840在柠檬烯浓度为14.7 mmol/L的麦

芽酵母培养基上 (pH 3.5) 接种对数早期诱导孢子, 转化产物 *R*-(+)- α -松油醇最高浓度达到 1 864 mg/L。Rottava 等^[13]用早前被其团队分离的酵母菌株 05.01.35、03.03.03、01.04.02 和 01.04.03 转化 *R*-(+)-柠檬烯, 先用 0.1 g/100 mL 的底物进行细胞诱导, 通过中心复合旋转设计优化后 (底物质量浓度 1.75 g/100 mL, 接种量 2 g, 底物与乙醇体积比 1:1) 使得 α -松油醇的产量达到 1.74 g/L。*Hormonema* sp. UOFS Y-0067 可以转化 *D*-柠檬烯并得到唯一产物 *trans*-异薄荷萜醇 (途径 5)^[14]。

Werf 等^[15]用环己烷分离出 1 株黄色杆菌 *Xanthobacter* sp. C20, 该菌株环氧化柠檬烯的 8,9 位生成唯一产物 (4*R*,8*R*)-柠檬烯-8,9-环氧化物 (途径 6)。显然, 催化环己烷羟基化的单加氧酶并不能催化柠檬烯上的环己烯环, 而是发生环氧化。

2.2 柠檬烯代谢途径中的关键酶

2.2.1 P450 单加氧酶

最初 Abraham 等^[16]认为指状青霉 *Penicillium digitatum* DSM62840 转化柠檬烯为松油醇的过程由水合酶催化, 后来 Tan 等^[17]发现加入铁螯合剂邻二氮杂菲和降低氧气浓度, 松油醇的产率下降, 但氰化物并没有抑制作用, 表明不是水合酶而是 P450 单加氧酶在起作用: 8,9 位 C=C 环氧化, 然后环氧化物“还原裂解”。环氧化反应通常由 P450 依赖单加氧酶催化, 柠檬烯-8,9-环氧化物被认为是 *Penicillium digitatum* 生物转化柠檬烯为松油醇的一个中间物^[15]。

Gloria 等^[18]报道 *P. digitatum* DSM62840 生物转化柠檬烯的酶是可诱导的, 当用 1.47 mmol/L (*R*)-(+) -limonene 诱导后, 松油醇的产量增加了 14.58%。据报道^[16]*P. digitatum* NRRL1202、枝孢菌 *Cladosporium* 和 *P. gladioli* 都有羟基化酶系的底物诱导效应。指状青霉的诱导系统可能和其他真菌和酵母的羟基化系统一样为 P450 单加氧酶系。Maróstica 等^[19]用 0.1% 柑橘精油试图诱导尖孢镰刀菌 152B 的酶系, 但 152B 相关酶没有表现出可诱导性。

2.2.2 脱氢酶

Speelmans 等^[20]于 1998 年分离出一株恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* DSM 12264, 该菌株能以 *D*-柠檬烯做唯一的碳源和能源, 得到 (+)-紫苏酸 (酶活力为 10 U/g)。Eaton^[21]报道 *P. putida* F1 对伞花烃降解是通过对异丙基苯甲酸途径: 单加氧酶先氧化甲基, 然后在两个脱氢酶作用下生成对枯茗酸。*P. putida* DSM12264 和 *P. putida* F1 一样, 降解对伞花烃是通过对异丙基苯甲酸途径, 并能以对伞花烃为唯一碳源。柠檬烯转化为紫苏酸同样涉及两个脱氢酶氧化中间物紫苏醇和紫苏醛, 当 *P. putida* DSM 12264 生长在含有柠檬烯或者对伞花烃的培养基上时, 脱氢酶均被诱导, 所以 *P. putida* DSM12264 转化柠檬烯为紫

苏酸可能属于对伞花烃的降解途径。一株携带 *P. putida* F1 上转化对伞花烃为对枯茗酸相关基因的大肠杆菌能将柠檬烯转化为紫苏酸, 证实这一假设^[20]。

2.2.3 水合酶

对烯烃非共轭双键 (与酮或者酯共轭的 α,β 不饱和系统的一部分) 作用的水合酶很少。很少的微生物水合酶被分离出来, Cadwallader 等^[22]1992 年从 *Pseudomonas* 分离出的水合酶为一个跨膜蛋白。尖孢镰刀菌 152B 转化 (*R*)-(+) -limonene 为松油醇的酶为水合酶, 不可诱导, 胞内酶且厌氧, 转化 (*S*)-(+) -limonene 的酶为柠檬烯-1,2-环氧化水解酶, 不可诱导, 胞内酶且需氧, 因为绝氧体系下没有产物生成^[23]。Chang 等^[24]报道 *Bacillus stearothermophilus* BR388 可将 *D*-柠檬烯转化为紫苏醇、 α -松油醇及香芹酮。携带该菌株 9.6 kb 染色体片段的大肠杆菌能以柠檬烯为唯一碳源, 并生成相同的产物。随后研究发现 3.6 kb 的亚片段可以编码一个柠檬烯羟化酶, 该酶在柠檬烯的 6 和 7 位作用生成紫苏醇和香芹酮 (由香芹酮通过受体菌的非特异性脱氢酶得到) 的混合物。与携带 9.6 kb 的菌株相比, 产物中并没有 α -松油醇, 表明松油醇生成的相关酶是在 9.6 kb 染色体片段中除了 3.6 kb 这一亚片段中的其他片段编码^[25]。

2.2.4 环氧化物水解酶

Carla 等^[26]发现 *Rhodococcus erythropolis* DCL14 环氧化物水解酶不属于 α/β 折叠水解酶家族, 该酶具有高的对映体选择性, 只有 *cis*-柠檬烯-1,2-环氧化物被转化为柠檬烯-1,2-二醇, 而 *trans*-柠檬烯-1,2-环氧化物不被转化。

3 影响柠檬烯微生物转化的因素及优化

3.1 底物

3.1.1 底物毒性

亲脂性单萜, 对微生物细胞来说, 有一定毒性, 它能够引起过氧化应激反应。细胞膜上的磷脂在氧自由基的作用下, 会发生降解反应, 引起膜磷脂层的结构改变, 渗透性、运输能力和流动性都受到影响, 这些变化能进一步影响到一些结合在膜上的酶的活性, 严重的甚至可使细胞膜功能丧失。Gloria 等^[18]发现不同的柠檬烯浓度会影响 *Penicillium digitatum* 生物转化的选择性及效率, 柠檬烯浓度在 10~15 mmol/L 之间, 产物为 (*R*)-(+) - α -松油醇; 浓度继续升高 (>30 mmol/L) 会生成其他氧化产物如 *cis/trans* 香芹醇、香芹酮、柠檬烯-1,2-二醇、苯乙醇、 β -蒎烯、桉萜和冬青油烯及两种不确定化合物; 柠檬烯浓度为 15 mmol/L 时, 生物转化率最高为 75.21%, 但当浓度从 30~100 mmol/L 增加时, 生物转化的效率下降。小被孢霉 *Mortierella minutissima* 生物转化柠檬烯的主要产物为紫苏醛和紫苏醇, 当柠檬烯体积分数为 0.5%,

紫苏醇产量209.5 mg/L, 此后若继续增加底物浓度, 产量会下降^[27]。Adams等^[12]报道在底物总添加量一定的情况下, 分批多次加样可以减小柠檬烯对微生物细胞的毒性。

Penicillium digitatum DSM62840可以区域选择性转化(+) - 柠檬烯为 α -松油醇, 但是当柠檬烯的初始浓度超过1.9 mmol/L时, 即出现明显的生长抑制。研究表明, 15 mmol/L的柠檬烯可以使90%以上的真菌致死。采用封闭气体循环生物反应器, 193 h后 α -松油醇的产量可达1 009 mg/L, 平均生产力8~9 mg/(L·h), 为传统摇床培养的8倍。与开放的生物反应器相比, 该生物转化过程分为两步: 真菌先在传统开放废气生物反应器中生长至稳定期, 再开始封闭气体循环, 通过气相连续补充合适剂量的柠檬烯可有效防止底物的毒害作用^[28]。

3.1.2 底物低溶解性

萜类在水相中溶解性低, 化学稳定性差易发生自动氧化^[15]。柠檬烯在水中的溶解度很低(0.015 mmol/L), 为增加柠檬烯的溶解度可采用共溶剂。但很多有机溶剂对微生物有毒害作用, 可用lgP值来表示其毒性大小, lgP值在1~5之间的有机溶剂具有强毒性。Adams等^[12]比较在指状青霉转化柠檬烯为松油醇的过程中, 不同共溶剂(不同lgP值: 甲醇0.77、乙醇0.31和丙酮0.24)及体积分数(0.6%、0.9%、1.4%)的影响时发现, 乙醇作为共溶剂且在体积分数为0.6%时产率略高, 8 h后产率可达93%。Tan等^[17]发现乙醇体积分数2%时, 即对*P. digitatum*生物转化(R) - (+) - 柠檬烯为(R) - (+) - α -松油醇有抑制作用。目前研究表明甲醇、乙醇、丙酮体积分数在0.5%~1.5%之间有利于生物转化。Trytek等^[27]报道使用0.3%的甲醇作为共溶剂, 小被孢霉*Mortierella minutissima*生物转化柠檬烯主要产物紫苏醛和紫苏醇的产量增加1.25倍, 当甲醇体积分数大于25%时, 就无产物生成; 加入十二烷和十六烷后只有痕量紫苏醇生成, 但紫苏醛的产量却增加。

3.1.3 共底物

Bicas等^[29]运用响应面法优化了用尖孢镰刀菌生物转化D-柠檬烯为R- (+) - α -松油醇的条件, 优化后产量达到2.4 g/L, 为之前报道的6倍多。他们首次尝试利用生物表面活性剂*Bacillus subtilis*作为共底物, 生物表面活性剂可以降低界面张力, 增加微生物对疏水性底物的利用。遗憾的是Plackett-Burman筛选设计表示该生物表面活性剂对生物转化并无统计效应。

3.2 产物

3.2.1 产物的抑制作用

产物会抑制微生物的生长和生物转化。*Pseudomonas putida* DSM 12264的最大生长速率随紫苏酸的浓度增加线性降低, 当紫苏酸浓度为(165±7) mmol/L时, 菌体

生长完全抑制; 紫苏酸浓度很低(2 mmol/L)即抑制该生物转化, 当紫苏酸浓度>25 mmol/L时, 静息细胞转化柠檬烯为紫苏酸的酶活从没有紫苏酸时的8 U/g细胞干质量下降为<0.5 U/g细胞干质量。为降低产物的抑制作用Mirata将ISPR与馈料式生物反应器相结合, 用阴离子交换树脂Amberlite IRA 410 Cl进行ISPR, 选用馈料式生物反应器, 连接一个Amberlite IRA 410 Cl组成的流化床组成一个外循环管路, 通过连续循环未过滤的液体培养基, 使产物去除, 降低产物抑制。7 d后紫苏酸累积浓度达到187 mmol/L(31 g/L), 是目前微生物氧化单萜的最高产量^[30]。

3.2.2 产物不同萃取方法

Maróstica等^[19]在用*Fusarium oxysporum*生物转化柠檬烯为松油醇的过程中, 用固相微萃取(solid phase micro-extraction, SPME)进行萃取, 培养72 h后产量为2.4 g/L, 但Bicas采用相同实验条件用乙酸乙酯萃取后产量达到4 g/L^[29]。

3.3 培养条件

3.3.1 培养基

培养基对生物转化的选择性和产物质量浓度有很大影响^[17]。Gloria等^[18]研究YMPG(酵母提取物5 g/L、麦芽浸粉10 g/L、葡萄糖10 g/L、细菌蛋白胨5 g/L)、MYB(酵母提取物3 g/L、麦芽浸粉20 g/L、葡萄糖10 g/L、细菌蛋白胨10 g/L)和YG(酵母提取物3 g/L、麦芽浸粉20 g/L、葡萄糖20 g/L、细菌蛋白胨1 g/L)培养基对*Penicillium digitatum* DSM62840生物转化柠檬烯的影响发现, 在MYB和YG培养基上, 柠檬烯被转化为(R) - (+) - α -松油醇, 该转化有高度的对映选择性(enantioselective): (R) - (+) - 柠檬烯被转化为纯(R) - (+) - α -松油醇(对映体过量百分数>99%), 而(S) - (-) - 柠檬烯转化量很小。转化48 h后, MYB培养基松油醇的质量浓度为(1 585±19) mg/L, 是YG培养基的3倍; 而在YMPG培养基上96 h后柠檬烯则转化为trans-香芹醇。YG培养基的低生物转化率可能是由于其葡萄糖含量过高, 降低了微生物使用柠檬烯作为碳源和能源的机会。

Adams等^[12]比较MEB和MYB培养基对3株*Penicillium digitatum*菌株CLE、CMC和PDD生物转化柠檬烯的影响, 发现MYB培养基松油醇产量(63.3±2.3)%高于MEB(46.7±0.1)%。

Badee等^[31]发现*Penicillium digitatum* (NRRL1202)可将橘皮精油转化为 α -松油醇, MYB培养基(酵母提取物3 g/L、麦芽浸粉20 g/L、葡萄糖10 g/L、细菌蛋白胨10 g/L, pH 6.1)生物转化率高于MEB培养基(麦芽浸粉20 g/L、葡萄糖20 g/L、细菌蛋白胨1 g/L, pH 5.4), 可能是由于MEB低的pH值影响了生物转化; Bowen^[32]报道

添加多余的葡萄糖会降低柠檬烯转化为松油醇的产量, MEB的高葡萄糖含量可能也影响了其生物转化。

木薯废液由于其高有机质含量, 且含有氰化物, 被认为“有害”。Maróstica等^[19]用农业残留物木薯渣液做培养基, 研究3种菌株*Penicillium* sp. 2025, *Aspergillus* sp. 2038和*Fusarium oxysporum* 152B对柑橘精油 (orange essential oil, OEO) 的生物转化。发现木薯废液培养基上菌丝生长良好, 菌株先在木薯培养基CM (cassava medium) 上生长, 然后将菌丝移到另一个以柑橘精油为唯一碳源和能源 (sole carbon resource, SCS) 的矿质培养基MM上, 所得松油醇的产量最高。3 d后, *Fusarium oxysporum* 152B产松油醇达450 mg/L, 与只在木薯培养基CM上培养提高了2倍。

3.3.2 接种物

Bicas等^[33]用*Fusarium oxysporum*生物转化柠檬烯为松油醇时, 将接种物分别冻融和冻干。发现冻融后生物转化速率加快, 冻干后松油醇产量减少40% (酶被破坏)。使用传统方法 (新鲜生物质) 和冻融 (速率加快) 松油醇最大产量都能达到4 g/L, 此后继续添加底物柠檬烯产物也不增加, 可见这并不是因为酶活降低, 而要改进培养基或使用两相系统来增加产量。

Tan等^[34]用海藻酸钙水凝胶固定化指状青霉*Penicillium digitatum*菌丝, 使得 α -松油醇产量达到12.83 mg/(g·d)。

Gloria等^[18]报道当柠檬烯在*Penicillium digitatum* DSM 62840的对数早期 (72 h) 加入时, 松油醇的产量最高为1 667 mg/L, 其他时期加入则产量会下降50%~60%。

3.3.3 pH值

Gloria等^[18]报道在pH值为3.0和3.5时, *Penicillium digitatum* DSM62840特异性生产松油醇, 当pH 3.5时, 松油醇产量最高为(1 537±34) mg/L; 当pH>3.5时, 由于分子内重排产生柠檬烯其他的氧化产物。他还首次发现在pH值为4.5和6.0时, 柠檬烯的氧化产物出现了沉香醇 (linalool) 和正/反式-薄荷基-2,8-二烯-1-醇 (*cis/trans-p*-menth-2,8-dien-1-ol), 可能是因为弱酸性环境使*Penicillium digitatum* DSM62840细胞产生了一个新的代谢柠檬烯的途径。

3.3.4 时间

小被孢霉*Mortierella minutissima*生物转化柠檬烯产物紫苏醇在24~48 h内大量积累^[27], Tan等^[17]报道指状青霉转化柠檬烯为松油醇的过程中也有类似现象, 但*Pseudomonas putida*在120 h才有大量产物积累^[27]。Gloria等^[18]报道指状青霉*Penicillium digitatum* DSM62840在最初的24 h积累松油醇, 48 h后松油醇的产量即保持不变。Tan等^[17]报道指状青霉*Penicillium digitatum* NRRL1202在pH 5.4的MYB培养基中, 生物转化只在对数早期和中期之间进行。Jan等^[35]报道指状青霉8 h即可将柠檬烯转化

为 α -松油醇, 而茎枯菌*Corynespora cassicola* 5 d后才可将R-(+)-柠檬烯转化为(1S,2S,4R)-柠檬烯-1,2-二醇^[36]。

3.3.5 溶氧量

液相中的溶解氧显著影响细菌和真菌对于萜类的生物转化。传统的搅拌通氧, 因为氧气溶解性低以及汽液传质阻力高使得氧供应不足。Trytek等^[27]报道在小被孢霉*Mortierella minutissima*生物转化柠檬烯的过程中, 加入H₂O₂到生物反应器中, 与传统的磁力搅拌通氧相比, 主要产物紫苏醇48 h后达到105 mg/L, 比普通搅拌同样增产2倍多。但H₂O₂的浓度增大产量会下降, 选择1%为佳。

4 结 语

面对全球人口健康、资源紧缺、环境污染、粮食危机等问题, 从天然植物中提取和化学合成香料已经不能满足社会发展和消费者的需求。生物转化生产天然香料以其效率高、反应温和及无污染等优点日益成为研究的热点。利用廉价而有效的原料来生物转化合成天然香料是最有前途的发展方向^[28]。

目前, 国内外研究学者已经进行了较多的生物转化法合成天然香料的研究, 然而, 有关柠檬烯生物转化条件优化、定向转化机制及调控方面的研究却鲜有报道。对于微生物转化柠檬烯过程的关键酶基因的分离、克隆、表达和调控已成为研究热点。通过转基因技术和基因工程, 可望实现有用目标化合物的工业化高效生产。此外, 分离纯化的酶制剂在有机合成化学中也具有重要的应用前景。

参考文献:

- [1] 王雪梅. 天然活性单萜-柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 24-28.
- [2] 李厚金. 天然单萜柠檬烯的微生物转化[J]. 化学进展, 2011, 23(11): 2318-2325.
- [3] 王伟江. 天然活性单萜-柠檬烯的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(11): 33-37.
- [4] LI H, LAN W, CAI C, et al. Biotransformation of limonene by marine bacteria[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(7): 946-950.
- [5] THOMPSON M L, MARRIOTT R, DOWLE A, et al. Biotransformation of beta-myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 721-730.
- [6] 李厚金. 海洋细菌对柠檬烯的生物转化及萜类产物鉴定[J]. 分析化学, 2006, 34(7): 946-950.
- [7] MOLINA G, MARROTTICA M R, PASTORE G M. *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 1851-1864.
- [8] DUETZ W A, BOUWMEESTER H, van BEILEN J B, et al. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61: 269-277.

- [9] van der WERF M J, SWARTS H J, de BONT J A M. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 65: 2092-2102.
- [10] GHASEMI Y, MOHAGHEGHZADEH A, MOSHAVASH M, et al. Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(7): 1301-1304.
- [11] SARA R A, ELHAM F, YOUNES G. Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae[J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 23(6): 975-981.
- [12] ADAMS A, DEMYTTENAERE J C R, KIMPE D N. Biotransformation of limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum*-investigation of the culture conditions[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 525-534.
- [13] ROTTAVA I, CORTINA P F, MARTELLO E, et al. Optimization of alpha-terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene and (-)-beta-pinene[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(4): 514-523.
- [14] van DYK M S, van RENSBURG E, MOLEKI N. Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp.[J]. Biotechnology Letters, 1998, 20: 431-436.
- [15] van der WERF M J, KEIJZER P M, van der SCHAFT P H. *Xanthobacter* sp. C20 contains a novel bioconversion pathway for limonene[J]. Biotechnology, 2000, 84: 133-143.
- [16] ABRAHAM W R, HOFFMANN H M R, KIESLICH K. Microbial transformation of some monoterpenoids and sesquiterpenoids[M]. Toronto, Canada: John Wiley & Sons., 1985: 160.
- [17] TAN Q, DAY D F, CADWALLAER K R. Bioconversion of (*R*)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL1202)[J]. Process Biochemistry, 1998, 33(1): 29-37.
- [18] GLORIA A, PRIETO V, JANETH A, et al. Microbial biotransformation of (*R*)-(+)-limonene by *Penicillium digitatum* DSM 62840 for producing (*R*)-(+)-terpineol[J]. Vitae, 2011, 18(2): 163-172.
- [19] MARÓSTICA M R, PASTORE G M. Production of *R*-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium[J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 345-350.
- [20] SPEELMANS G, BIJLSMA A, EGGINK G. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillaldehyde, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50: 538-544.
- [21] EATON R W. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 1351-1362.
- [22] CADWALLADER K R, BRADDOCK R J. Enzymatic hydration of (4*R*)-(+)-limonene to (4*R*)-(+)- α -terpineol[J]. Developments in Food Science, 1992, 29: 571-584.
- [23] MOLINA G, MAROSTICA M R, PASTORE G M. Pseudomonas: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 1851-1864.
- [24] CHANG H C, ORIEL P. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*[J]. Journal of Food Science, 1994, 59: 660-662.
- [25] SAVITHIRY N, CHEONG T K, ORIEL P. Production of α -terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 213: 63-65.
- [26] CARLA C C R, de CARVALHO M, MANUELA R, et al. Biotransformation of terpenes[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24: 134-142.
- [27] TRYTEK M, FIEDUREK J, SKOWRONEK M. Biotransformation of (*R*)-(+)-limonene by the psychrotrophic fungus *Mortierella minutissima* in H₂O₂ oxygenated[J]. Food Technology and Biotechnology, 2009, 47(2): 131-136.
- [28] PESCHECK M, MIRATA M A, BRAUER B, et al. Improved monoterpene biotransformation with *Penicillium* sp. by use of a closed gas loop bioreactor[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(6): 827-836.
- [29] BICAS J L, BARROS F F, WAGNER R, et al. Optimization of *R*-(+)-alpha-terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(9): 1061-1070.
- [30] MIRATA M A, HEERD D, SCHRADER J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillaldehyde with *Pseudomonas putida* DSM12264[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 764-771.
- [31] BADEE A Z M, HELMY S A, MORSY N F S. Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202)[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 849-854.
- [32] BOWEN E R. Potential by-products from the microbial transformation of *D*-limonene[J]. Florida State Horticultural Society, 1975, 88: 304-308.
- [33] BICAS J L, de QUADROS C P, NÉRI-NUMA I A, et al. Integrated process for co-production of alkaline lipase and *R*-(+)- α -terpineol by *Fusarium oxysporum*[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 452-456.
- [34] TAN Q, DAY D F. Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49: 96-101.
- [35] JAN C R, DEMYTTENAERE K V B, NORBERT D K. Biotransformation of (*R*) and (*S*) limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening[J]. Phytochemistry, 2001, 57: 199-208.
- [36] KIESLICH K, ABRAHAM W R, STUMPF B, et al. Transformation of terpenoids[M]// BRUNKE E J. Progress in essential oil research. Berlin: Walter de Gruyter, 1986: 367-394.