

异硫氰酸酯的活性功能与生物合成研究进展

郭紫玉^{1,2}, 戴辰^{1,2}, 解静^{1,2}, 田洋^{2,3*}, 刘佳^{1,2*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 食药同源资源开发与利用教育部工程研究中心, 国家辣木加工技术研发专业中心, 云南省精准营养与个性化食品制造重点实验室, 云南昆明 650201)
(3. 普洱学院理工学院, 云南普洱 665000)

摘要: 异硫氰酸酯 (Isothiocyanates) 是一类主要来源于十字花科植物的次生代谢产物, 不仅具有食品的特殊风味, 还在抗肿瘤、改善糖尿病、神经保护、抗菌、抗炎、抗氧化等方面具有丰富的生物活性, 被广泛应用于食品、医药以及农业等领域。由于异硫氰酸酯天然来源含量低, 化学合成制备污染较大等问题, 而随着合成生物学的发展, 为绿色、高效、稳定的获取异硫氰酸酯提供了新方法。该文详细从异硫氰酸酯的分类、生物活性、生物利用度、生物合成途径及提高物种中异硫氰酸酯产量的分子生物学方法的研究进展进行系统地阐述, 旨在加深对异硫氰酸酯的作用价值认识, 为异硫氰酸酯进一步的开发利用提供技术支撑, 有望为功能性食品领域的开发提供理论依据, 并为异硫氰酸酯类化合物的高产量制备提供思路。

关键词: 异硫氰酸酯; 生物活性; 生物合成; 产量

文章编号: 1673-9078(2025)07-418-431

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.7.0482

Research Progress on the Bioactive Functions and Biosynthesis of Isothiocyanates

GUO Ziyu^{1,2}, DAI Chen^{1,2}, XIE Jing^{1,2}, TIAN Yang^{2,3*}, LIU Jia^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)
(2. Engineering Research Center of Development and Utilization of Food and Drug Homologous Resources, Ministry of Education, National Research and Development Professional Center for Moringa Processing Technology, Yunnan Key Laboratory of Precision Nutrition and Personalized Food Manufacturing, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China) (3. College of Technology, Pu'er University, Pu'er 665000, China)

Abstract: Isothiocyanates are a class of secondary metabolites mainly derived from cruciferous plants. They give food a unique flavor and exhibit a variety of biological activities, such as anticancer, antidiabetic, neuroprotective, antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. They are widely used in food, medicine, and agriculture. The yields of isothiocyanates from natural sources are generally low, while chemical synthesis often leads to significantly contaminated

引文格式:

郭紫玉,戴辰,解静,等.异硫氰酸酯的活性功能与生物合成研究进展[J].现代食品科技,2025,41(7):418-431.

GUO Ziyu, DAI Chen, XIE Jing, et al. Research progress on the bioactive functions and biosynthesis of isothiocyanates [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 418-431.

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2023J0430); 云南省绿色健康食品中泰双边国际联合实验室 (202203AP140011); 云南省省市一体化专项 (202302AN360002); 高层次科技人才及创新团队选拔专项 (202305AS350025)

作者简介: 郭紫玉 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食药同源植物中活性成分的生物合成, E-mail: 2814746735@qq.com

通讯作者: 刘佳 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物合成, E-mail: lhc712@126.com; 共同通讯作者: 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: tianyang1208@163.com

isothiocyanates. In the meantime, with the development of synthetic biology, new methods have emerged for the green, efficient, and stable production of isothiocyanates. In this review, the classification, biological activities, bioavailability, biosynthesis pathways, and molecular biology methods that improve the yields of isothiocyanates in species are systematically expounded in detail. The aim is to deepen the understanding of the role and value of isothiocyanates and to provide technical support for their further development and utilization. This study is expected to provide a theoretical basis for the development of functional foods as well as insights into the high-yield preparation of isothiocyanates.

Key words: isothiocyanates; biological activity; biosynthesis; yields

异硫氰酸酯 (Isothiocyanates, ITCs) 具有 $R-N=C=S$ 结构通式, 与硫氰酸酯互为同分异构体, 属于异核累积双烯烃, 是一类含硫、含氮化合物。天然 ITCs 主要来源于十字花科植物, 是当植物遭受生物胁迫时, 由处于细胞中的黑芥子酶 (EC3.2.1.147) 直接接触并催化液泡中的硫代葡萄糖苷水解而产生的一类次级代谢产物^[1], 主要包括莱菔硫烷 (Sulforaphane, SFN)、异硫氰酸烯丙酯 (Allyl Isothiocyanate, AITC)、异硫氰酸苄酯 (Benzyl Isosulfocyanide, BITC) 和异硫氰酸苯乙酯 (Phenethyl Isothiocyanate, PEITC) 等^[2]。ITCs 不仅赋予食物独特的风味, 而且还展现出多方面的生物活性, 包括抑制肿瘤、缓解糖尿病症状、保护神经组织、抑制细菌生长以及发挥强大的抗氧化作用。

这些特性使得 ITCs 在食品工业、人类医疗保健及农业生产中具有广泛的实用潜力和应用范围^[1,3,4]。

天然来源的 ITCs 含量有限, 提取难度大。ITCs 的化学合成一般依赖于硫代磷或 CS_2 与胺的反应, 因此需要使用官能团相容性较窄的高毒性试剂^[5-8], 但高度危险化学品的使用, 不利于安全操作与生产^[9]。另外, 传统的 ITCs 合成工艺普遍存在多个技术瓶颈, 例如过程繁琐导致制备周期冗长, 产物收率偏低, 整体生产成本高昂, 伴随产生的副产品较多, 以及毒性试剂的使用对环境造成较大的潜在污染, 这无疑与现代社会追求可持续发展和绿色环保的要求相悖^[10]。因此, 科研人员正急切寻求并开发一种更为环保、高效且稳定的新型制备策略来替代现有 ITCs 合成工艺, 这一目标在当前研究领域备受关注。

表 1 异硫氰酸酯的主要分类及天然来源
Table 1 The main classifications, natural sources of isothiocyanate compounds

前体氨基酸	类别	名称	天然来源
甲硫氨酸	脂肪族异硫氰酸酯类	异硫氰酸甲酯	萝卜 ^[19] 、大蒜 ^[20] 、山葵 ^[21] 、辣根 ^[22]
		异硫氰酸乙酯	山葵 ^[21] 、芥末 ^[23]
		异硫氰酸异丙酯	芥末 ^[23] 、刺山柑果实 ^[24] 、卷心菜 ^[25] 、山葵 ^[21]
		莱菔硫烷	西兰花 ^[19] 、羽衣甘蓝 ^[26] 、卷心菜 ^[25] 、豆瓣菜 ^[27] 、花椰菜 ^[28] 、萝卜 ^[19] 、辣木 ^[29]
		异硫氰酸烯丙酯	黄芥子 ^[30] 、山葵 ^[21] 、辣根 ^[22] 、芥末 ^[23] 、芜菁 ^[31] 、卷心菜 ^[25] 、洋葱 ^[32] 、花椰菜 ^[28] 、羽衣甘蓝 ^[26]
苯丙氨酸、酪氨酸	芳香族异硫氰酸酯类	异硫氰酸苄酯	辣根 ^[22] 、山葵 ^[21]
		异硫氰酸苄酯	山葵 ^[21] 、独行菜 ^[33] 、番木瓜 ^[34] 、辣根 ^[22] 、水芹 ^[35] 、旱金莲 ^[36] 、辣木 ^[29]
		异硫氰酸酚乙酯	卷心菜 ^[35] 、花椰菜 ^[28] 、西兰花 ^[19] 、芥末 ^[23] 、萝卜 ^[19]
		异硫氰酸苯乙酯	卷心菜 ^[37] 、芜菁 ^[31] 、花椰菜 ^[28] 、山葵 ^[21] 、西兰花 ^[19] 、芥末 ^[23] 、萝卜 ^[19] 、西洋菜 ^[38] 、芥菜 ^[30]
色氨酸	吲哚族异硫氰酸酯类	3-甲基吲哚基异硫氰酸酯	辣根 ^[22]
		4-羟基-3-甲基吲哚基异硫氰酸酯	辣根 ^[22]
		4-甲氧基-3-甲基吲哚基异硫氰酸酯	辣根 ^[22]

近年来，通过发掘药用活性成分生物合成关键酶基因，以合成生物学为基础，设计和改造微生物菌株来发酵生产天然药物的方法已被广泛认可，所以合成生物学有望成为获取 ITCs 更加便捷有效的新途径。本文就 ITCs 的分类、生物活性、生物利用度与生物合成途径及提高 ITCs 含量的分子生物学方法进行了阐述，旨在为高产 ITCs 及其现代工业化应用提供思路。

1 ITCs的主要分类及天然来源

ITCs 通常以硫代葡萄糖苷的形式储存在细胞液泡里^[11]。到目前为止，已经鉴定出超过 154 种不同的硫代葡萄糖苷^[11,12]，这些硫代葡萄糖苷可分为 4 类：脂肪族、芳香族、吲哚族和糖基化^[13,14]。硫代葡萄糖苷的水解产物包括多种含氮化合物，如 ITCs、硫氰酸盐、腈和硫腈，具体取决于反应条件（pH 值、

温度和亚铁离子、抗坏血酸等还原剂）^[15,16]。例如，在中性 pH 值下，硫代羟基酸盐 -O- 硫酸盐被重排成 ITCs，并分别经黑芥子酶催化后形成结构功能各异的 ITCs^[17]。根据前体氨基酸种类的不同即硫代葡萄糖苷的种类不同，导致其 ITCs 的 R- 侧链的不同，ITCs 可分为脂肪族、芳香族和吲哚族异硫氰酸酯^[18]。ITCs 主要分类的代表物质及天然来源具体见表 1。

2 生物活性与应用

上世纪 50 年代起，ITCs 由于具有的特殊气味和生化特性，尤其在抗癌和植物防御方面的功能^[39]，引起各界学者的高度关注。截止目前为止，已有多篇关于 ITCs 干预各种疾病的报道，对人类医学领域的发展奠定重要基础。ITCs 在人类医学领域的生物活性与相关机制如图 1 所示。ITCs 的生物活性与功能应用主要体现在以下三个领域。

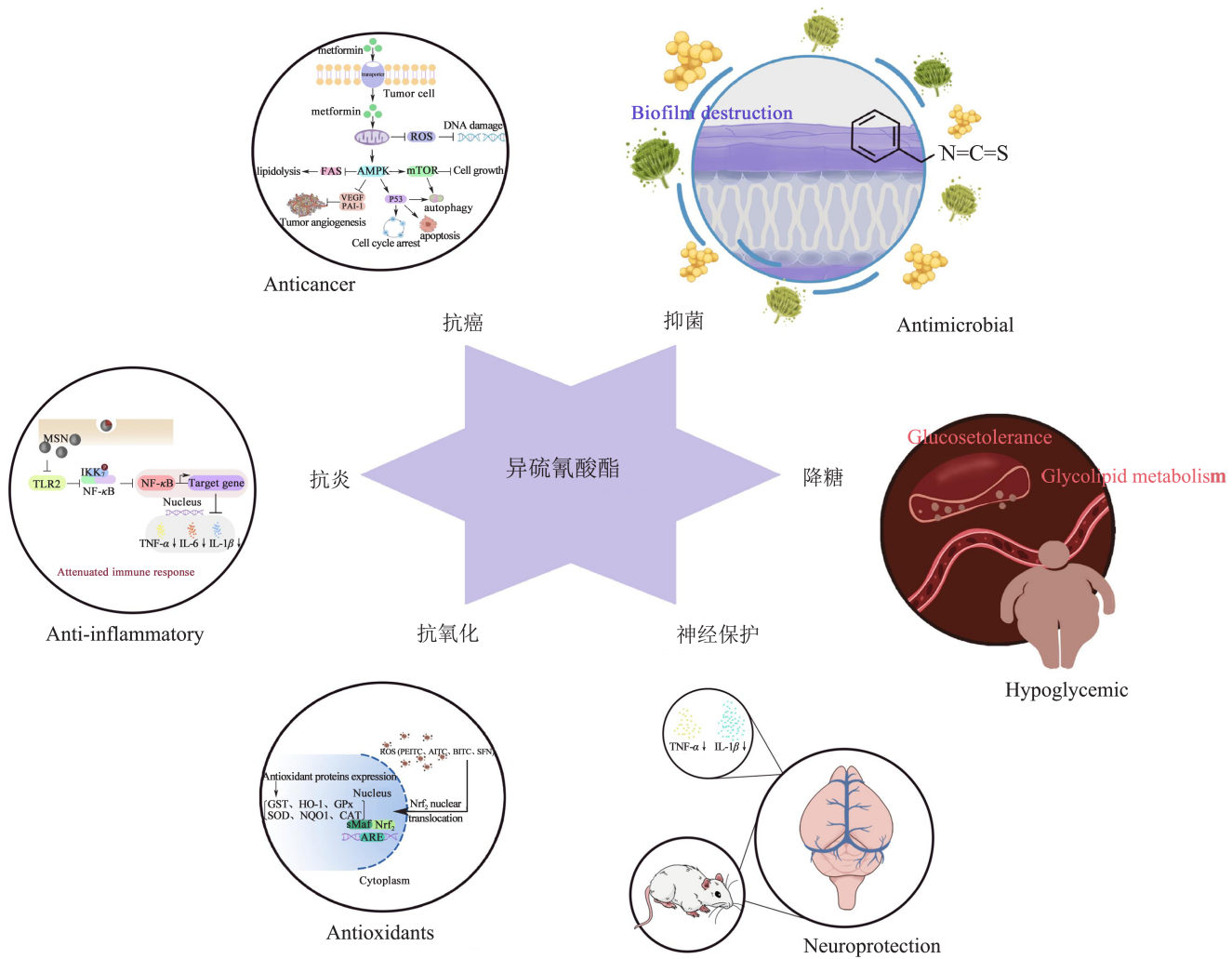


图 1 异硫氰酸酯在人类医学领域的生物活性与相关机制

Fig.1 The special biological activities and related mechanisms of Isothiocyanates in human medicine

2.1 食品领域

2.1.1 食品风味

ITCs 是形成食品辛辣风味的主要成分之一^[40]。比如,芥末和辣根的辣味以及腌制雪菜的典型风味都是源于 ITCs,它具有强烈的辛辣味和催泪性,同时也具有芳香味^[41]。还有,在四川榨菜复杂的香味组成中,经检测确认的香味物质多达近百种,其中,腈类化合物、异硫氰酸酯类化合物以及甲基三硫醚等主要成分共同构建了榨菜特有的香气,这些香气同样是通过硫代葡萄糖苷经黑芥子酶降解催化后所产生的物质^[42,43]。此外,研究发现,酸萝卜泡菜在发酵 3 天后,它原本强烈的辛辣感会显著减少,主要原因在于其所含的黑芥子酶在酸性条件下(pH 值<4)条件下会失活,酶催化形成的 4-甲硫基-3-丁烯基异硫氰酸酯浓度降低,故辛辣味也就变淡了^[44]。

2.1.2 防腐与保鲜

经研究发现,ITCs 中 PEITC、BITC 主要通过破坏真菌的菌丝体结构、细胞壁及细胞膜的完整性和下调赭曲霉毒素 A 合成基因表达的方式来抑制寄生曲霉、黄曲霉毒素等真菌的生长及产毒^[45,46]。ITCs 常被当作食品防腐剂,用于酒水、果汁等饮品中,表现出了显著的保鲜作用,故其在食品保鲜领域有较大的应用前景^[47]。

2.2 人类医学领域

2.2.1 抗肿瘤作用

花椰菜、西兰花作为国际公认的防癌抗癌蔬菜,其功能主要体现在它所含有的 SFN。流行病学研究表明,具有丰富来源的 ITCs 已被研究证明对乳腺癌^[48]、前列腺癌^[49,50]、结肠癌^[51]、皮肤癌^[52-54]和胰腺癌^[55]有干预作用。近期研究发现,恰玛古 ITCs 中 BITC、PEITC 可通过诱导宫颈癌细胞 Hela 细胞核 DNA 凝聚,有效抑制 Hela 细胞的迁移和失控性增殖,具有抗宫颈癌活性,是最有效的肿瘤预防因子之一^[56]。从机制上来讲,PEITC 可呈剂量性地抑制小鼠骨肉瘤细胞 K7M2 的增殖,并能引起 G2/M 细胞周期的停滞以及细胞的凋亡^[57];BITC 通过降低胃腺癌细胞 AGS 的细胞活力来引起肿瘤细胞的凋亡和自噬^[58];BITC 可通过调节细胞凋亡、细胞增殖、细胞周期阻滞、转移、血管生成、自噬等多种信号通路以及与其他药物联合使用来表现出较强的抗癌

作用^[59]。虽然 ITCs 在抗癌研究方面已取得了很好的临床前数据,但鲜有报道 ITCs 临床抗癌测试效果,根据目前报道的 PEITC 转入临床试验的研究,结果表明,口服橄榄油溶解的 PEITC (10 mg/mL),每天 4 次,明显抑制了烟草致癌物 4-甲基亚硝胺-1 (3 吡啶基)-1-丁酮 (NNK) 的代谢,并抑制吸烟者的肺癌发生^[60]。

2.2.2 改善糖尿病与降脂作用

研究发现,ITCs 可以改善 2 型糖尿病患者的胰岛素抵抗和甘油三酯水平,并降低患心血管疾病的风险^[61]。研究表明,天然化合物辣木中 BITC 可通过活化腺苷酸活化蛋白激酶通路从而抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达的机制来调控脂肪的合成及储存,并发现辣木 BITC 对来源于小鼠胚胎的 3T3-L1 脂肪细胞的脂质积累具有显著抑制作用^[62]。另外,辣木主要成分提取物 Moringin (GMG-ITC) 可通过清除活性氧、阻止高级糖化终产物 (AGE) 和低密度脂蛋白的形成,抑制糖尿病导致的动脉粥样硬化的情况发生^[63]。

2.2.3 神经保护作用

研究发现,在诱导脊髓损伤前 7 d,辣木 GMG-ITC 由于抑制了人核因子 κ B 抑制蛋白 α ($I\kappa\beta$ - α) 的降解,减少诱导型一氧化氮合酶的表达,证明了辣木 GMG-ITC 对 CD1 雄性小鼠的神经保护作用^[64]。还有学者给患有亚急性帕金森病的雄性 C57BL/6 小鼠灌胃了同样的化合物 GMG-ITC。ITCs 预处理后发现,小鼠大脑中促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平降低,表明 GMG-ITC 对神经元损伤具有保护作用^[65]。SFN 的神经保护作用以激活 Nrf2 抗氧化通路和上调 I 相酶和 II 相酶以及激活 ERK1/2 和 Akt 激酶级联信号通路的机制^[66]来实现缺血性脑损伤^[67]、脑出血损伤^[68]、脑外伤^[69]等急性和阿尔兹海默症^[70]、帕金森病症^[71]等慢性脑损伤中的神经保护作用。另外,研究表明 SFN 代谢物通过参与氧化应激、氨基酸/肠道菌群、神经递质、激素和鞘磷脂代谢等通路在缓解自闭症方面也有很好的干预效果^[72]。

2.2.4 抗氧化作用

氧化应激通常与许多疾病的发生有关。研究发现,挥发性甲基磺酰烷基类 ITCs 的抗氧化潜能通过有机氢过氧化物和过氧化氢的有效猝灭得以实现^[73],这两种物质通常被归类为活性氧 (ROS),是

体内氧化应激的重要因素。氧化应激是由活性氧的产生与细胞抗氧化防御之间的不平衡引起的,这对细胞功能既有有益的影响,也有不利的影响。在这种情况下,ITCs如PEITC、SFN、AITC和BITC发挥着双重作用,既是抗氧化剂,也是促氧化剂^[74]。研究发现,SFN通过诱导II期解毒酶作为间接抗氧化剂,从而保护细胞免受氧化损伤。这对非传染性慢性疾病,如某些类型的癌症^[75-77]、神经退行性疾病^[78]、胃溃疡^[79]、心脏病^[80]等具有预防作用,在某些情况下具有缓解作用。

2.2.5 抗菌作用

由于ITCs对细菌病原体和真菌的生物活性潜力,在生物医学研究中备受关注^[81]。研究证明,PEITC、AITC和BITC对一系列革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌都有有效的抗菌作用,包括主要病原体,如粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、肺炎克雷伯菌和大肠杆菌^[82-84]。这些作用是通过多种机制促进的,包括细菌膜破坏、应激反应的诱导以及通过激活严格的控制途径而产生的代谢改变^[85]。PEITC有效地抑制了霍乱弧菌的生长和生物膜的形成,减少了毒素的产生,从而保护哺乳动物细胞免受其毒性的影响^[86]。在不同的生理条件下,SFN可能在体外或体内对细菌具有特定的抗菌作用。最新研究表明,SFN可以抑制细菌的毒力从而抵御植物中病原菌的入侵,在植物防御机制中发挥重要作用^[87]。另外,十字花科中的“芥子油苷-黑芥子酶”防御系统产生的ITCs也对各种真菌病原体具有广泛的拮抗活性^[2,88]。一项研究探讨了PEITC、AITC和BITC对寄生曲霉的抑制作用^[45]。研究发现,真菌生长和黄曲霉毒素的产生与ITC浓度相关:抑菌活力随着ITCs浓度的增加而降低。当使用质量浓度为0.5 mg/L或更高时,AITC、BITC或PEITC的抑制活力下降到质量分数50%以下。其中AITC和BITC的抑菌活性最高,最低抑制浓度(MIC)最低,质量浓度为20 mg/L,而PEITC的MIC质量浓度为50 mg/L。相反,BITC是达到最低最小杀真菌质量浓度(MFC)为20 mg/L的最有效化合物,而AITC和PEITC的MFC质量浓度均为50 mg/L^[45]。ITCs的抗菌功效已在体外和各种临床试验中得到证实。

2.2.6 抗炎作用

ITCs还可以预防许多炎症疾患及慢性疾病,如结肠炎、关节炎和包括哮喘、慢性阻塞性肺疾病在

内的呼吸系统相关问题。研究发现,PEITC在调节炎症细胞因子,如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子(TNF)- α 中起关键作用,这些细胞因子在协调对外来抗原的炎症反应中起核心作用^[89]。在与AITC相关的研究中,研究人员观察到,在结肠炎小鼠中,使用AITC治疗可显著降低过氧化物酶活性和巨噬细胞的数量,从而达到减轻炎症的目的^[90]。BITC的抗炎作用则是通过抑制核因子- κ B信号传导通路(NF- κ B)活性和a23187诱导的嗜碱性细胞中IL-13基因的表达来实现的^[91]。另外,市面上一种由辣根和旱金莲配合组成的药物ANGOCIN® Anti-Infekt N的活性成分为ITCs,目前已被授权用于治疗影响呼吸道和尿道^[92]的炎症性疾病。

2.3 新农业领域

近年来,科学家们在ITCs的杀菌、杀虫作用方面做了大量研究,并表明BITC、PEITC具有良好的杀菌、杀虫效果,可作为杀菌剂、杀虫剂、除草剂的有机合成中间体使用^[93-95]。ITCs在低浓度下(质量浓度<100 μ g/mL)对人体安全,在环境中易于降解,符合理想农药化合物的特性,极具有开发为新农药的潜质,对其进行系统而深入的研究有望开发出新型的无公害农药。

3 生物利用度与稳定性

3.1 生物利用度

事实上,有关ITCs生物利用度的研究也是对其实际应用过程中非常重要的一环。ITCs的生物利用度取决于食用十字花科蔬菜后,硫代葡萄糖苷水解过程中植物黑芥子酶和肠道微生物群之间的相互作用^[96]。由于ITCs的亲脂性以及硫代葡萄糖苷的降解转化,直接摄入ITCs比直接摄入硫代葡萄糖苷可确保机体更高的吸收效率^[97],而蔬菜本身烹饪方式的不同也影响其在体内的生物利用度^[98]。

一项体外研究发现,SFN的转运主要通过肠道内紧密连接受控的细胞旁途径以及跨细胞途径,这说明SFN很容易被吸收^[99],经机体吸收的SFN和其他ITCs将会通过巯基途径进行代谢。对啮齿动物和人类的几项研究表明,SFN及其代谢物在血浆中的峰值浓度出现在给药后1~3 h内^[100]。Gasper等^[101]给小鼠注射SFN,发现在给药后2 h和6 h,所有器官中都检测到代谢物,并且SFN在小肠、前列腺、肾脏和肺部的浓度最高,表明SFN具有生物

可利用性。同时这也证明了 ITCs 可能是一种有效的器官组织抗癌剂或其他生物活性剂。

3.2 稳定性

研究表明,通过包埋技术能够有效提升 ITCs 的稳定性。采用悬浮液法制备 AITC 与 β -环糊精复合而成的微胶囊产品时,经光度法测得微胶囊中 AITC 的质量浓度为 43.8 mg/g。被包埋后,由于 β -环糊精外壳的空间阻碍,微胶囊中的 AITC 在 85 °C 条件下贮藏 48 h 保留率的质量分数为 17.0%,而对照组在 3 h 后即挥发完全。室温条件下贮藏 14 d 微胶囊中 AITC 的含量几乎无变化^[102]。使用超声方法将 BITC 包裹在环糊精中,也可增强其在生物应用中的稳定性^[103]。采用壳聚糖-橄榄油-PEITC 复合而成的聚合物微粒表明,PEITC 被胶囊化后提高了其稳定性与生物利用度。最佳复合条件是橄榄油与壳聚糖和 PEITC 与壳聚糖的比例分别为 1.46 和 0.25。复合而成微粒的大小为 629 nm, zeta 电位为 32.3 mV,多分散指数为 0.329,截留效率质量分数为 98.49%^[104]。另外,除分子包埋的方法外,膜乳化法也是制备微胶囊的一种有效途径。一项分别采用海藻酸钠复合及膜乳化法包埋制备的微胶囊研究显示,膜乳化法制备的微胶囊对 SFN 具有更好的保护效果,增加其热稳定性和抗氧化稳定性。对 SFN 及相应的微胶囊在加热条件下和 H_2O_2 存在的条件下进行了研究,试验验证在温度大于 60 °C 时, SFN 变得极其不稳定,而微胶囊显示出良好的保护效果;在 H_2O_2 的质量分数大于 20% 时, SFN 由于受到外界氧化剂的作用而发生一定程度的降解,其保留率的质量分数仅有 45.7%,而微胶囊中 SFN 保留率的质量分数却有 81%^[105]。还有研究采用鱼皮明胶作为乳化剂,利用吐温为基础的乳液作为对照,以 BITC 为营养素输送模型,构建了稳定的乳状液。脂质在胃内消化之后,通过电子显微镜扫描发现,乳化剂有明显的聚集现象。在小肠消化过程中鱼皮明胶乳状液的游离脂肪酸释放量的质量分数达到 87.5%。以鱼皮明胶为基础的乳化剂中 BITC 生物利用度的质量分数为 80.77%,比对照组提高的质量分数近 27%。结果表明,以鱼皮明胶为基础的乳液传递系统提高了 BITC 在生物体内的稳定性,对其具有缓释及保护作用^[106]。

此外,ITCs 在特定的有机溶剂环境中表现出较好的稳定性,这些溶剂包括正己烷、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯以及某些酸性溶液。在食品体系中,可通

过添加植物油、特定的抗氧化剂或者酸味调节剂等成分增强 ITCs 的稳定性^[45]。这些发现为深入探讨 ITCs 在研发、生产和实际应用过程中的稳定性保障提供理论基础。

4 ITCs的生物合成

4.1 ITCs的合成途径

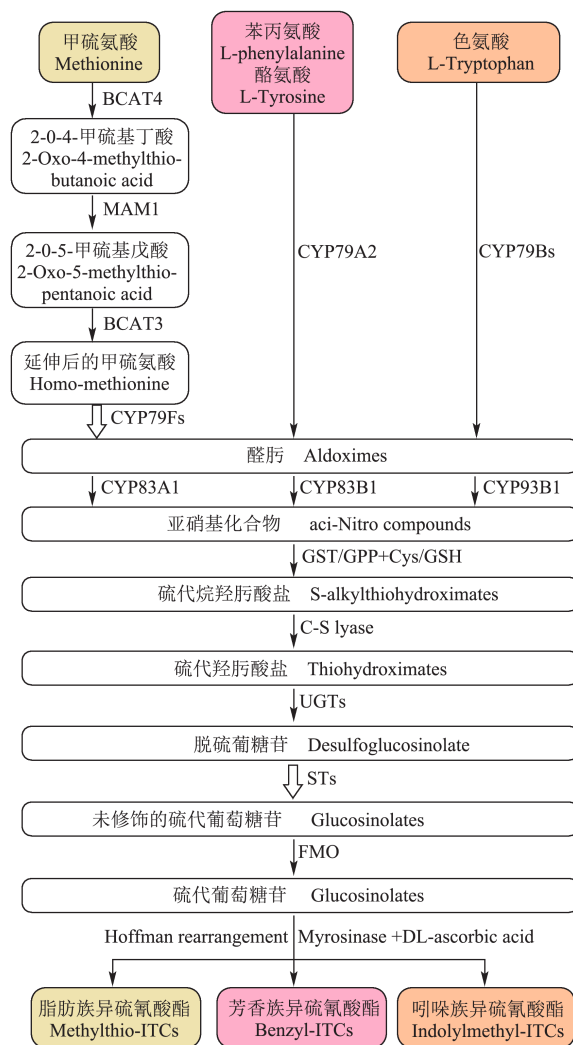


图 2 三类异硫氰酸酯的生物合成及代谢途径

Fig.2 Biosynthesis and metabolism of three isothiocyanates

注: BCAT4、BCAT3, 转氨酶; MAM1, 苹果酸合成酶; CYP79Fs、CYP79A2、CYP79Bs、CYP83A1、CYP83B1, 氧化酶; GST, 谷胱甘肽硫转移酶; C-S lyase, C-S 裂解酶; UGTs, 葡萄糖基转移酶; STs, 磺基转移酶; FMO, 黄素单加氧酶; Myrosinase, 黑芥子酶。

目前对于 ITCs 的生物合成研究,主要集中在对 ITCs 的生物合成与代谢途径中关键酶基因的挖掘与功能验证等方面。根据 KEGG 数据库中硫代葡

葡萄糖苷的生物合成与代谢途径, 总结出 ITCs 的生物合成途径如图 2 所示。基于前体氨基酸种类的不同, 前期生物合成硫代葡萄糖苷途径中的酶稍有差异。甲硫氨酸代表的脂肪族异硫氰酸酯经侧链延伸后进入核心生成部分, 而以苯丙氨酸、酪氨酸衍生的芳香族异硫氰酸酯和色氨酸衍生的吲哚族异硫氰酸酯则直接进入核心生成部分, 最后核心步骤获得的硫代葡萄糖苷经过相关酶完成侧链的二次修饰, 之后遇黑芥子酶(组织损伤等)在一定条件下降解代谢合成各类 ITCs^[107]。

4.2 合成途径中涉及的反应与酶

在多个植物尤其拟南芥中^[108], ITCs 的生物合成结构基因都已经被鉴定, 其生物合成主要由 3 个合成阶段完成^[109]。(1) 侧链延伸, 由 5 个酶催化生成双亚甲基甲硫氨酸^[110]。ITCs 的合成先以各类氨基酸为起始反应物经过转氨酶(Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase, BCAT)、苹果酸合酶(Mmethylthioalkylmalate Synthase, MAM)、异丙基苹果酸异构酶(Isopropylmalate Isomerase, IPMI)、异丙基苹果酸脱氢酶(Isopropylmalate Dehydrogenase, IPMDH)再经过转氨酶进行一系列转氨、缩合、异构化、氧化脱羧反应形成长链氨基酸^[111,112]。(2) 核心生成, 有 7 个酶参与反应。甲硫氨酸衍生的长链氨基酸只通过细胞色素氧化酶(Homomethionine N-monooxygenase, CYP79F1)被催化生成相应的醛肟, 再通过 CYP83A1((Methylthio) Alkanaldoxime N-monooxygenase)生成亚硝基化合物; 而苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸则直接只通过 CYP79A2(Phenylalanine N-monooxygenase)和 CYP79Bs(Tryptophan N-monooxygenase)分别被氧化, 然后都被 CYP83B1 催化生成亚硝基化合物。之后的步骤中三种氨基酸反应的酶都相同, 即亚硝基化合物依次经过谷胱甘肽-S-转移酶(S-alkyl-thiohydroximate Lyase, GST)、C-S 裂解酶(C-S lyase)、葡萄糖基转移酶(N-hydroxythioamide S-beta-glucosyltransferase, UGT)和磺基转移酶(Aliphatic Desulfoglucosinolate Sulfotransferase, ST)分别经氧化反应后发生共轭结合、C-S 键断裂、葡萄糖基化和硫酸化等反应生成硫代葡萄糖苷^[113]。(3) 侧链修饰及黑芥子酶催化, 由两个酶参与该过程。上步获得的硫代葡萄糖苷被黄素单加氧酶(Flavin-containing Monooxygenases, FMO)发生硫氧化反应对硫代葡萄糖苷侧链的修饰^[114], 后经黑芥

子酶(Myrosinase, MYR)在催化下水解生成不稳定的糖苷配基和葡萄糖, 不稳定的糖苷配基依赖其结构、pH 值、Fe²⁺ 浓度和表皮特异硫蛋白重排形成不同的产物。通常在中性 pH 值条件下, 糖苷配基经 Hoffman 重排形成 ITCs^[115,116]。

5 提高 ITCs 产量的分子生物学方法

为了进一步提高植物中天然活性成分的生物积累量, 转基因超量表达和提高生物合成途径中相关酶的活性等合成生物学技术已成为一种新的解决趋势。提高其前体物质含量或发现高酶活性的黑芥子酶来源是提高 ITCs 产量的有效方法^[117,118]。

5.1 单基因过表达

多项研究报道表明, 通过单一的基因改造会对植物中 ITCs 的含量产生一定的影响。Wu 等^[119]将黑芥子酶基因 MYR 导入到西兰花植株中, 相较于野生型, 转基因植株的 SFN 含量是其 1.92 倍之多; Huang 等^[120]则是在拟南芥中导入了上皮磺基转移酶编码基因 SMT, 而对于实验植株中的 SFN 质量分数达到了野生型的 1.52 倍。另外, 王红波^[121]以西兰花为研究对象, 重点将短链脂肪族 ITCs 生物合成中的关键基因 CYP79F1 在西兰花中实现超量表达, 获得以农杆菌介导的西兰花遗传转化体系, 并利用高效液相色谱技术对转基因西兰花植株中 ITCs 的合成前体硫代葡萄糖苷的含量进行测定。结果表明, 转基因植株中硫代葡萄糖苷的含量较野生型有显著增加^[121], 该转基因植株中硫代葡萄糖苷经酶解后产生的 ITCs 的含量也相应提高。但总结发现, 通过调控生物合成途径中单基因的表达来提升植物中 ITCs 含量的方法, 效果并不理想。

5.2 多基因共表达

考虑到 ITCs 生物合成的复杂性, 其途径可能涉及多个关键基因间的协同作用, 故采用多基因共改造策略可能是一种更为有效的途径。Zang 等^[122]通过在中国白菜中协同共表达了 ITCs 生物合成的其中三个关键酶基因 MAM1、CYP79F1、CYP83A1, 可在一定程度上促进白菜中总体硫代葡萄糖苷含量的增加, 不仅实现了白菜风味品质的不断优化, 也使得其具有更好的抗癌功效。张佑齐^[123]重点通过同源重组原理的利用, 实现了三基因串联共表达载体 XF350-B-C-E(BCAT4、CYP79F1、ESM1) 的构建, 并充分地借助于农杆菌介导的转化技术, 使得重组

载体进一步地导入到西兰花细胞中,通过抗生素的筛选,得到携带三基因共表达的转基因西兰花细胞系。这种类型的三基因串联共表达细胞系中,和野生型的相比,最后得到的 SFN 质量浓度甚至达到了 171.4 $\mu\text{g/g}$,质量分数增加比例为 119%;相对于仅仅过表达单个 *BCAT4-2* 基因,转基因植株中 SFN 质量分数增加了 23% 的^[123]。这一结果有力证实了多基因串联共表达相较于单个基因过表达在提升 ITCs 含量方面具有更大潜力。总结来说,相较于单一基因的过表达,采用多基因在植物体内共同过表达的策略对于提高植物中 ITCs 的含量展现出更大的可能性和优越性,但目前相关研究较少。

5.3 黑芥子酶异源表达

通常来说,一个物种内黑芥子酶的活性水平直接影响着其催化产生的 ITCs 的总量。然而,直接从天然材料中提取足够量的高活性黑芥子酶并不实际可行。由于目前合成生物学发展迅速,可选择通过异源表达技术,在其它适合表达的宿主系统中异源生产不同物种来源的、具有较高活性的黑芥子酶。鉴于不同物种所含的黑芥子酶活性差异显著,需要针对各个物种的酶在特定反应条件下进行多次优化实验来确定其最佳酶活性状态。由于黑芥子酶可催化不同侧链基团的硫代葡萄糖苷,但各类物种的黑芥子酶对于底物的选择性各异,继而生成侧链构型不同的 ITCs 产物。这意味着研究人员需要细致探究不同来源的黑芥子酶与底物的相互作用特性,才能有效实现目标 ITCs 的高产量异源生物合成。

1999 年,Chen 等^[124]首次实现在酿酒酵母 *S. cerevisiae* I NVSc1 宿主体内中异源表达了来自芸薹属油菜的黑芥子酶基因 *MYR1*,这也是首个不与天然凝集素类蛋白质相结合的黑芥子酶的实例。但是通过研究分析表明,黑芥子酶的表达会对宿主产生一定的毒性影响^[124]。针对这一问题,Härtel 等^[125]将同个黑芥子酶基因在巴斯德毕赤酵母 GS115 中实现了分泌表达,这使得先前存在的宿主毒性问题得到有效解决,并且纯化之后酶活的质量浓度甚至上升至 175 U/mg;谢丽雪^[126]通过研究,使得芥蓝来源的黑芥子酶基因实现了在大肠杆菌中的成功表达,这在一定程度上反映出这种来源的黑芥子酶可以实现在大肠杆菌中的表达,但学者并没有对其酶活性开展测定;肖海燕^[127]通过试验尝试在大肠杆菌中表达油菜来源的黑芥子酶基因 *MYR1*,发现有蛋白表达却没有酶活性。之后,通过优化诱导培养

条件,可在细胞破碎液浓缩之后发现酶活质量浓度为 3.1×10^{-3} U/mg^[127];张盛敏^[128]通过相关的试验研究,利用拟南芥来源的黑芥子酶 *TGG1* 基因在毕赤酵母中完成胞内表达。研究表明,在酵母培养基中可检测到质量分数为 25% 左右的酶活性,研究者将这一结果归因于拟南芥 *TGG1* 基因编码蛋白中信号肽的存在^[128];Rosenbergová 等^[129]对拟南芥 *TGG1* 基因进行改造,删除了其 57 bp 的天然信号肽并在毕赤酵母中表达,结果酶活性及生产率均得到显著提高,其中生产效率增加 40 倍之多,黑芥子酶活性质量浓度达 27 U/mL。同时这也说明,植物来源黑芥子酶异源表达活性的提高对获得更高产量的 ITCs 具有重要意义。Curiqueo 等^[130]从大肠杆菌和酿酒酵母中克隆了青花菜来源的黑芥子酶。结果表明,酿酒酵母菌中产生的黑芥子酶比大肠杆菌中产生的黑芥子酶热稳定性高 10 $^{\circ}\text{C}$ 左右。两种酶的动力学行为均为 Michaelis-Menten 模型。与在大肠杆菌中产生的黑芥子酶相比,酿酒酵母中黑芥子酶的催化效率高达 4 倍以上^[130]。最近,黄河欧等^[131]利用真核、原核生物对 SFN 进行异源生物合成并实现了高产量的制备。学者针对编码甘蓝蚜虫来源的黑芥子酶基因 (*BMYP*) 和西兰花来源黑芥子酶基因 (*BoTGG1*) 进行克隆,随后分别在毕赤酵母和大肠杆菌中进行异源表达并通过重组酶降解催化,最终合成得到的 SFN 质量浓度可达到 1.21 g/L,对 SFN 质量分数的摩尔转化率为 99.6%,为目前 ITCs 制备最高水平。

目前植物是黑芥子酶表达研究的主要来源,在诸多植株中,西兰花、拟南芥、甘蓝、芥蓝、油菜、番木瓜等来源的黑芥子酶都已成功实现在大肠杆菌或者酵母中的科学表达,且大多为细胞内表达。但是在工业应用过程中,更青睐于利用蛋白分泌表达的方式,因为这可以简化下游处理过程,使纯化操作更加简便。多项研究后发现原核表达存在一个问题是,植物源的黑芥子酶在大肠杆菌中所表现出的酶活力相对较低,而来自于甘蓝蚜虫和柠檬酸杆菌中的酶却表现出良好的黑芥子酶活性。现有植物源的黑芥子酶都被认为是糖基化蛋白,对于这种来源引起的表达差异,最根本原因在于原核生物表达系统不存在糖基化修饰。目前对于黑芥子酶异源表达的研究,实验中大多采用脂肪族硫代葡萄糖苷 Sinigrin 和萝卜硫苷作为底物来测定酶活,较为单一,未来可对脂肪族 GRE (Glucoraphenin) 以及芳香族、

吲哚族硫代葡萄糖苷作为底物展开更多的研究,以展现黑芥子酶的催化多样性并获得结构更加丰富的ITCs。

5.4 微生物底盘细胞改造

黄河欧等^[131]对大肠杆菌进行改造,全细胞催化西兰花种子提取液生成SFN。结果表明,重组大肠杆菌全细胞催化产SFN的反应条件为底物萝卜硫苷质量浓度为4 g/L,以质量分数为5%的生物量在温度45℃、pH值为4.5的条件下进行时,催化得到SFN的质量浓度为1.62 g/L,转化率质量分数达到99.2%,底物几乎完全转化,但操作稳定性不足。随后利用卡拉胶作为载体固定化E.coli BL21(DE3)/pET-28a(+)-bmyr菌株细胞后成功提高其操作稳定性^[131]。

Ho等^[132]研究表明,工程化的共生微生物可以产生活性小分子物质,达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。该研究对大肠杆菌进行工程化改造,并与结直肠癌细胞上的硫酸乙酰肝素蛋白多糖特异结合,并分泌黑芥子酶,成功将宿主摄取的硫代葡萄糖苷转化为具有抗癌活性的有机小分子SFN。该工程菌与硫代葡萄糖苷联用,在体外对小鼠、人类和结直肠癌细胞系的增殖抑制率质量分数大于95%^[132]。

微生物底盘的工程化改造,包括基因编辑、转录调控、蛋白表达、翻译后修饰、代谢工程调节等方面,使大肠杆菌、酿酒酵母以及毕赤酵母等成为蛋白生产和天然产物合成的优质底盘宿主或工程菌。然而目前针对产ITCs的微生物底盘细胞的改造研究较少,未来仍需更为深入的探索和研究。

6 结论与展望

自ITCs被发现具有特殊气味和生化特性以来,研究人员致力将其在食品、人类医学及农业等领域得到积极应用。但由于天然来源ITCs含量较低,化学合成存在诸多弊端,故寻求绿色、高效、稳定、可控的获取ITCs的新途径成为研究人员迫切希望解决的问题。未来希望在对ITCs生物合成关键酶基因鉴定及其途径深刻解析的基础上,对植物活性成分的固有途径进行转移、重构与工程化。通过获得具特定功能的氨基酸或核苷酸序列、构建目的基因重组质粒、选择大肠杆菌或酵母菌等作为底盘细胞、得到产目标产物的工程菌并对其进行发酵和工艺优化,最终期望得到高产ITCs的工程菌株,这

为利用合成生物学实现ITCs的高产开辟了新途径,为其实现完整生物合成与规模化奠定理论基础,推动未来实现ITCs的工业化生产。

参考文献

- [1] WU J, CUI S, LIU J, et al. The recent advances of glucosinolates and their metabolites: metabolism, physiological functions and potential application strategies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(20): 4217-4234.
- [2] CHEN J, ULLAH C, REICHELT M, et al. The phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* detoxifies plant glucosinolate hydrolysis products via an isothiocyanate hydrolase [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3090.
- [3] MAEDA B, MURAKAMI K. Recent advancement in the synthesis of isothiocyanates [J]. Chemical Communications, 2024, 60(21): 2839-2864.
- [4] CHANG S K, ALASALVAR C, SHAHIDI F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects-A comprehensive review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59: 1580-1604.
- [5] JANCZEWSKI L, GAJDA A, GAJDA T. Direct, microwave-assisted synthesis of isothiocyanates [J]. European Journal of Organic Chemistry, 2019, 2019: 2528-2532.
- [6] MUNCH H, HANSEN J S, PITTLERL KOW M, et al. A new efficient synthesis of isothiocyanates from amines using di-tert-butyl dicarbonate [J]. Tetrahedron Letters, 2008, 49: 3117-3119.
- [7] SUN N, LI B, SHAO J, et al. A general and facile one-pot process of isothiocyanates from amines under aqueous conditions [J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2012, 8: 61-70.
- [8] FU Z, YUAN W, CHEN N, et al. Na₂S₂O₈-mediated efficient synthesis of isothiocyanates from primary amines in water [J]. Green Chemistry, 2018, 20: 4484-4491.
- [9] ESCHLIMAN K, BOSSMANN S H. Synthesis of isothiocyanates: An update [J]. Synthesis, 2019, 51: 1746-1752.
- [10] SRIVASTAVA K, BHATT A, SINGH N, et al. Synthesis of isothiocyanates: A review [J]. Chemical Biology, 2014, 4: 1-22.
- [11] HUANG X, CHENG B, WANG Y, et al. Effects of fresh-cut and storage on glucosinolates profile using broccoli as a case study [J]. Horticultural Plant Journal, 2023, 9(2): 8.
- [12] KYRIAKOU S, TRAFALIS D T, DELIGIORGI M V, et al. Assessment of methodological pipelines for the determination of isothiocyanates derived from natural sources [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(4): 642.
- [13] BHAT R, VYAS D. Myrosinase: Insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions [J].

- Critical Reviews in Biotechnology, 2019, 39: 508-523.
- [14] CHHAJED S, MISRA B B, TELLO N, et al. Chemodiversity of the glucosinolate-myrosinase system at the single cell type resolution [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 618.
- [15] WANG J, YU H, ZHAO Z, et al. Natural variation of glucosinolates and their breakdown products in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) seeds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67: 12528-12537.
- [16] GUERRERO-ALONSO A, ANTUNEZ-MOJICA M, MEDINA-FRANCO J L. Chemoinformatic analysis of isothiocyanates: Their impact in nature and medicine [J]. *Molecular Informatics*, 2021, 40: 2411-2502.
- [17] XIE C, LI W, GAO R, et al. Determination of glucosinolates in rapeseed meal and their degradation by myrosinase from rapeseed sprouts [J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132316.
- [18] FÖRSTER N, ULRICH S, SCHREINER M, et al. Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringa oleifera* [J]. *Food Chemistry*, 2015, 166: 456-464.
- [19] YAMAGUCHI Y, SUGIKI M, SHIMIZU M, et al. Comparative analysis of isothiocyanates in eight cruciferous vegetables and evaluation of the hepatoprotective effects of 4-(methylsulfinyl)-3-butenyl isothiocyanate (sulforaphene) from daikon radish (*Raphanus sativus* L.) sprouts [J]. *Food & Function*, 2024, 15(9): 4894-4904.
- [20] ARAÚJO M K, GUMIELA A M, BORDIN K, et al. Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage [J]. *Meat Science*, 2018, 143: 177-183.
- [21] YAMANE K, YAMADA-KATO T, HAGA N, et al. Allyl isothiocyanate and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate contents vary among wild and cultivated wasabi (*Eutrema japonicum*) [J]. *Breed Science*, 2023, 73(3): 237-245.
- [22] REN J J, ZHANG D, HOU P X, et al. Effects of horseradish oil and eight isothiocyanates vapour treatment on postharvest disease control and their efficacy as preservatives of mature green tomato [J]. *Plant Disease*, 2020, 104(10): 2688-2695.
- [23] EIB S, SCHNEIDER D J, HENSEL O, et al. Relationship between mustard pungency and allyl-isothiocyanate content: a comparison of sensory and chemical evaluations [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(9): 2728-2736.
- [24] ALKHAIBARI A M, ALANAZI A D. Chemical composition and insecticidal, antiplasmodial, and anti-leishmanial activity of *Capparis spinosa* essential oil and its main constituents [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 2022: 6371274.
- [25] CHI D T, THI H L, VANG L V, et al. Mass trapping of the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) by a combination of its sex pheromone and allyl isothiocyanate in cabbage fields in southern Vietnam [J]. *Journal of Pesticide Science*, 2024, 49(1): 15-21.
- [26] MIAO H, XIA C, YU S, et al. Enhancing health-promoting isothiocyanates in Chinese kale sprouts via manipulating *BoESP* [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(4): uhad029.
- [27] GETAHUN S M, CHUNG F L. Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1999, 8(5): 447-451.
- [28] GUO Q, GUO L, WANG Z, et al. Response surface optimization and identification of isothiocyanates produced from broccoli sprouts [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 1580-1586.
- [29] JAJA-CHIMEDZA A, GRAF B L, SIMMLER C, et al. Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182658.
- [30] FRAZIE M D, KIM M J, KU K M. Health-promoting phytochemicals from 11 mustard cultivars at baby leaf and mature stages [J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1749.
- [31] ROBIN, ARORA R, ARORA S, et al. Development of validated high-temperature reverse-phase UHPLC-PDA analytical method for simultaneous analysis of five natural isothiocyanates in cruciferous vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 1085-1089.
- [32] PIERCEY M J, MAZZANTI G, BUDGE S M, et al. Antimicrobial activity of cyclodextrin entrapped allyl isothiocyanate in a model system and packaged fresh-cut onions [J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(1): 213-218.
- [33] SANSOM C E, JONES V S, JOYCE N I, et al. Flavor, glucosinolates, and isothiocyanates of nau (Cook's scurvy grass, *Lepidium oleraceum*) and other rare New Zealand *Lepidium* species [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(6): 1833-1838.
- [34] NAKAMURA Y, YOSHIMOTO M, MURATA Y, et al. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(11): 4407-4413.
- [35] KASSIE F, LAKY B, GMINSKI R, et al. Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 142(3): 285-296.
- [36] KRELL M, HANSCHEN F S, ROHN S. Formation and stability of isothiocyanate protein conjugates at different pH values and bread types enriched with nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) [J]. *Food Research International*, 2022, 158: 111492.
- [37] OLOYEDE O O, WAGSTAFF C, METHVEN L. Influence of

- cabbage (*Brassica oleracea*) accession and growing conditions on myrosinase activity, glucosinolates and their hydrolysis products [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 2903.
- [38] KYRIAKOU S, MICHAILEDIOU K, AMERY T, et al. Polyphenolics, glucosinolates and isothiocyanates profiling of aerial parts of *Nasturtium officinale* (Watercress) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 998755.
- [39] KLIEBENATEIN D J, KROYMANN J, MITCHELL-OLDS T. The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(3): 264-271.
- [40] BELL L, OLOYEDE O O, LIGNOU S, et al. Taste and flavor perceptions of glucosinolates, isothiocyanates, and related compounds [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2018, 62(18): e1700990.
- [41] 赵大云,杨方琪.雪里蕻腌菜风味的研究[J].食品与发酵工业,1998,24(1):34-41.
- [42] 林旭辉,李荣,姜子涛.辣根挥发油化学成分的研究[J].食品科学,2001,22(3):73-75.
- [43] 姜子涛,吴月英.哌啶非水滴定法快速测定芥末油中的异硫氰酸酯[J].食品科学,1995,16(6):59-62.
- [44] KIM M R, RHEE H S. Decrease of pungency in “Radish Kimchi” during fermentation [J]. *Journal of Food Science*, 1993, 58(1): 128-131.
- [45] FEDERICA S, JUAN M Q, FERNANDO B, et al. Shelf life improvement of the loaf bread using allyl, phenyl and benzyl isothiocyanates against *Aspergillus parasiticus* [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 78: 208-214.
- [46] HAREYAMA Y, TARAO M, TOYOTA K, et al. Effects of four isothiocyanates in dissolved and gaseous states on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in vitro [J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(11): 756.
- [47] 杜喜玲.山葵精油的提取工艺、香气成分及稳定性与抑菌作用研究[D].雅安:四川农业大学,2008.
- [48] ATWELL L L, ZHANG Z, MORI M, et al. Sulforaphane bioavailability and chemopreventive activity in women scheduled for breast biopsy [J]. *Cancer Prevention Research*, 2015, 8(12): 1184-1191.
- [49] ALUMKAL J J, SLOTTKE R, SCHWARTZMAN J, et al. A phase II study of sulforaphane-rich broccoli sprout extracts in men with recurrent prostate cancer [J]. *Investigational New Drugs*, 2015, 33(2): 480-489.
- [50] CIPOLLA B G, MANDRON E, LEFORT J M, et al. Effect of sulforaphane in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy [J]. *Cancer Prevention Research*, 2015, 8(8): 712-719.
- [51] 杨茗茸,杨扬,彭麟杰,等.辣木籽异硫氰酸酯衍生物抑制结肠癌HCT-116细胞的生长和迁移[J].现代食品科技, 2021,37(10):46-54.
- [52] TAHATA S, SINGH S V, LIN Y, et al. Evaluation of biodistribution of sulforaphane after administration of oral broccoli sprout extract in melanoma patients with multiple atypical nevi [J]. *Cancer Prevention Research*, 2018, 11(7): 429-438.
- [53] KIRKWOOD J M, SINGH S, LIN Y, et al. Dose-response evaluation of broccoli sprout extract sulforaphane (BSE-SFN) in melanoma patients (Pts) with atypical/dysplastic nevi (A/DN)[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, 34(15): e21022.
- [54] 钱颖艳,杨茗茸,罗凤仙,等.辣木籽异硫氰酸酯抑制皮肤鳞状癌A431细胞的生长[J].现代食品科技,2020,36(8):8-14.
- [55] LOZANOVSKI V J, HOUBEN P, HINZ U, et al. Pilot study evaluating broccoli sprouts in advanced pancreatic cancer (POUDER trial)-study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2014, 15(1): 204.
- [56] 解帼轩,塔玛莎·库尔曼江,王昊等.恰玛古异硫氰酸酯的酶解制备及抗宫颈癌活性[J].天然产物研究与开发, 2024,36(6):1032-1044.
- [57] LV H H, ZHEN C X, LIU J Y, et al. PEITC triggers multiple forms of cell death by GSH-iron-ROS regulation in K7M2 murine osteosarcoma cells [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(8): 1119-1132.
- [58] HAN KWW, PO WW, SOHN UD, et al. Benzyl isothiocyanate induces apoptosis via reactive oxygen species-initiated mitochondrial dysfunction and DR4 and DR5 death receptor activation in gastric adenocarcinoma cells [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 839.
- [59] DINH T N, PARAT M O, ONG Y S, et al. Anticancer activities of dietary benzyl isothiocyanate: A comprehensive review [J]. *Pharmacological Research*, 2021, 169: 105666.
- [60] YUAN J M, STEPANOV I, MURPHY S E, et al. Clinical trial of 2-phenethyl isothiocyanate as an inhibitor of metabolic activation of a tobacco-specific lung carcinogen in cigarette smokers [J]. *Cancer Prevention Research*, 2016, 9(5): 396-405.
- [61] BAHADORAN Z, TOHIDI M, NAZERI P, et al. Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind clinical trial [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2012, 63(7): 767-771.
- [62] 毛家英,白玉英,彭麟杰,等.辣木异硫氰酸酯通过活化AMPK抑制3T3-L1脂肪细胞脂质积累[J].现代食品科技, 2022,38(10):27-32.
- [63] GOPALAKRISHNAN L, DORIYA K, KUMAR D S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2016, 5(2): 49-56.
- [64] GIACOPPO S, GALUPPO M, NICOLA GR, et al. 4(α -l-rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive

- phytochemical that attenuates secondary damage in an experimental model of spinal cord injury [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 23(1): 80-88.
- [65] GIACOPPO S, RAJAN TS, NICOLA GR, et al. The isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* shows potent anti-inflammatory activity in the treatment of murine subacute parkinson's disease [J]. *Rejuvenation Research*, 2017, 20(1): 50-63.
- [66] VAUZOUR D, BUONFIGLIO M, CORONA G, et al. Sulforaphane protects cortical neurons against 5-S-cysteinyl-dopamine-induced toxicity through the activation of ERK1/2, Nrf-2 and the upregulation of detoxification enzymes [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(4): 532-542.
- [67] PING Z, LU W, KANG Z, et al. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme [J]. *Brain Research*, 2010, 1343(1): 178-185.
- [68] ZHAO X, SUN G, ZHANG J, et al. Transcription factor Nrf2 protects the brain from damage produced by intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2007, 38(12): 3280-3286.
- [69] ZHAO J, MOORE A N, REDELLJB, et al. Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2007, 27(38): 10240-10248.
- [70] LEE C, PARK G H, EES R, et al. Attenuation of β -amyloid-induced oxidative cell death by sulforaphane via activation of NF-E2-related factor 2 [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013: 313510.
- [71] DENG C, TAO R, YUSZ, et al. Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K/Akt-dependent manner [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 5(3): 847-851.
- [72] BENT S, LAWTON B, WARREN T, et al. Identification of urinary metabolites that correlate with clinical improvements in children with autism treated with sulforaphane from broccoli [J]. *Molecular Autism*, 2018, 9: 35.
- [73] PAPI A, ORLANDI M, BARTOLINI G, et al. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L.(Kaiware Daikon) sprouts [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(3): 875-883.
- [74] FORRESTER S J, KIKUCHI D S, HERNANDES M S, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. *Circulation Research*, 2018, 122(6): 877-902.
- [75] HOSSAIN S, LIU Z, WOOD RJ. Histone deacetylase activity and vitamin D-dependent gene expressions in relation to sulforaphane in human breast cancer cells [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(2): e13114.
- [76] GEORGIKOU C, YIN L, GLADKICH J, et al. Inhibition of miR30a-3p by sulforaphane enhances gap junction intercellular communication in pancreatic cancer [J]. *Cancer Letters*, 2020, 469(1): 238-245.
- [77] ROSENBERGOVÁ Z, KÁNTOROVÁ K, ŠIMKOVIČ M, et al. Optimisation of recombinant myrosinase production in *Pichia pastoris* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3677.
- [78] SANTÍN-MÁRQUEZ R, ALARCÓN-AGUILAR A, LÓPEZ-DIAZGUERRERO N E, et al. Sulforaphane-role in aging and neurodegeneration [J]. *Geroscience*, 2019, 41(5): 655-670.
- [79] ZEREN S, BAYHAN Z, KOC AK FE, et al. Gastroprotective effects of sulforaphane and thymoquinone against acetylsalicylic acid-induced gastric ulcer in rats [J]. *Journal of Surgical Research*, 2016, 203(2): 348-359.
- [80] PEREYRA K V, ANDRADE D C, TOLEDO C, et al. Dietary supplementation of a sulforaphane-enriched broccoli extract protects the heart from acute cardiac stress [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75(1): 104267.
- [81] WANG W, YANG J, ZHANG J, et al. An *Arabidopsis* secondary metabolite directly targets expression of the bacterial type III secretion system to inhibit bacterial virulence [J]. *Cell Host & Microbe*, 2020, 27(4): 601-613.
- [82] NOWICKI D, MACIĄG-DORSZYŃSKA M, BOGUĆKA K, et al. Various modes of action of dietary phytochemicals, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, on pathogenic bacteria [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 13677.
- [83] NOWICKI D, KRAUSE K, KARCZEWSKA M, et al. Evaluation of the anti-shigellosis activity of dietary isothiocyanates in *Galleria mellonella* larvae [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3967.
- [84] EIVHEL V, SCHÜLLER A, BIEHLER K, et al. Antimicrobial effects of mustard oil-containing plants against oral pathogens: An *in vitro* study [J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2020, 20(1): 156.
- [85] NOWICKI D, MACIĄG-DORSZYŃSKA M, KOBIELA W, et al. Phenethyl isothiocyanate inhibits shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by stringent response induction [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(4): 2304-2315.
- [86] KRAUSE K, PYRCZAK-FELCZYKOWSKA A, KARACZEWSKA M, et al. Dietary isothiocyanates, sulforaphane and 2-phenethyl isothiocyanate, effectively impair vibrio cholerae virulence [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10187.
- [87] ANDERSSON M X, NILSSON A K, JOHANSSON O N, et al. Involvement of the electrophilic isothiocyanate sulforaphane in *Arabidopsis* local defense responses [J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(1): 251-261.
- [88] YU H, JIA W, ZHAO M, et al. Antifungal mechanism of

- isothiocyanates against *Cochliobolus heterostrophus* [J]. Pest Management Science, 2022, 78(12): 5133-5141.
- [89] COSCUETA E R, SOUSA A S, REIS C A, et al. Phenylethyl isothiocyanate: A bioactive agent for gastrointestinal health [J]. Molecules, 2022, 27(3): 794.
- [90] DAVAATSEREN M, HWANG J T, PARK J H, et al. Allyl isothiocyanate ameliorates angiogenesis and inflammation in dextran sulfate sodium-induced acute colitis [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102975.
- [91] TANG Y, ABE N, YOSHIMOTO M, et al. Benzyl isothiocyanate inhibits IL-13 expression in human basophilic KU812 cells[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(1): 159-163.
- [92] LAU I, ALBRECHT U, KIRSCHNER-HERMANN S R, et al. Phytotherapy in catheter-associated urinary tract infection: Observational study recording the efficacy and safety of a fixed herbal combination containing *Tropaeoli majoris herba* and *Armoraciae rusticanae radix* [J]. Urologe-Ausgabe A, 2018, 57(12): 1472-1480.
- [93] LI D, WEN Y, OU Z, et al. Inhibitor of glucosinolate sulfatases as a potential friendly insecticide to control *Plutella xylostella* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(42): 13528-13537.
- [94] LAMBERTH C. Organic isocyanates and isothiocyanates: versatile intermediates in agrochemistry [J]. Synthesis (Stuttgart), 2022, 54(5): 1250-1260.
- [95] NÉMETH A, ÁBRÁNYI-BALOGH P. Recent advances in the synthesis of isothiocyanates using elemental sulfur [J]. Catalysts, 2021, 11(9): 1081.
- [96] MITHEN R F, DEKKER M, VERKERK R, et al. The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods [J]. Journal of Science and Food Agricultural, 2000, 80(7): 973-974.
- [97] SHAPIRO T A, FAHEY J W, WADE K L, et al. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2001, 10(5): 501-508.
- [98] ORLANDO P, NARTEA A, SILVESTRI S, et al. Bioavailability study of isothiocyanates and other bioactive compounds of *Brassica oleracea* L. var. italica boiled or steamed: functional food or dietary supplement? [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(2): 209.
- [99] USHIDA Y, BOONYAPICHEST C, SUGANUMA H, et al. Paracellular transport of sulforaphane across Caco-2 cell monolayers [J]. Food Science and Technology Research, 2016, 22(1): 127-134.
- [100] HANLON N, COLDHAM N, GIELBERT A, et al. Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat [J]. British Journal of Nutrition, 2008, 99(3): 559-564.
- [101] GASPER A V, AL-JANOBI A, SMITH J A, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2005, 82(6): 1283-1291.
- [102] 张清峰,姜子涛,郑国栋.烯丙基异硫氰酸酯- β -环糊精微胶囊的制备及其稳定性研究[J].现代食品科技,2012, 28(8):979-981.
- [103] UPPAL S, KAUR K, KUMAR R, et al. Encompassment of benzyl isothiocyanate in cyclodextrin using ultrasonication methodology to enhance its stability for biological applications [J]. Ultrason Sonochem, 2017, 39: 25-33.
- [104] COSCUETA E R, SOUSA A S, REIS C A, et al. Chitosan-olive oil microparticles for phenylethyl isothiocyanate delivery: Optimal formulation [J]. PLoS One, 2021, 16(5): e0248257.
- [105] 张金虎.硫苷及其降解产物异硫氰酸酯的微胶囊化研究[D].北京:北京化工大学,2013.
- [106] ZHANG X, LIU Z, WANG A, et al. Influence of fish skin gelatin-sodium alginate complex stabilized emulsion on benzyl isothiocyanate stability and digestibility *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(13): 5680-5689.
- [107] LIOU C S, SIRK S J, DIAZ CAC, et al. A metabolic pathway for activation of dietary glucosinolates by a human gut symbiont [J]. Cell, 2020, 180(4): 717-728. e19.
- [108] GRASER G, OLDHAM N J, BROWN P D, et al. The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 2001, 57(1): 23-32.
- [109] 阮颖,周朴华,刘春林.硫代葡萄糖苷合成核心途径与植物生长素微调[J].生命科学研究,2006,S3:5.
- [110] 肖灵晨.大肠杆菌异源生物合成硫代葡萄糖苷[D].北京:北京化工大学,2016.
- [111] LI Z, ZHANG C, CAI Q, et al. Identification of *MAM1s* in regulation of 3C glucosinolates accumulation in allopolyploid *Brassica juncea* [J]. Horticultural Plant Journal, 2020, 6(6): 10.
- [112] KITAINDA V, JEZ JM. Structural studies of aliphatic glucosinolate chain-elongation enzymes [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(9): 1500.
- [113] LIU Z, HAMMERLINDL J, KELLER W, et al. *MAM* gene silencing leads to the induction of C3 and reduction of C4 and C5 side-chain aliphatic glucosinolates in *Brassica napus* [J]. Molecular breeding, 2011, 27(4): 467-478.
- [114] BONES A M, ROSSITER J T. The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(1): 204-205.
- [115] 李娟,朱祝军.植物中硫代葡萄糖苷生物代谢的分子机制

- [J].细胞生物学杂志,2005,27(5):519-524.
- [116] YAGISHITA Y, FAHEY J W, DINKOVA-KOSTOVA A T, et al. Broccoli or sulforaphane: is it the source or dose that matters? [J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 35-93.
- [117] WANG L, JIANG H, LIANG X, et al. Preparation of sulforaphane from radish seed extracts with recombinant food-grade *Yarrowia lipolytica* harboring high myrosinase activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(18): 5363-5371.
- [118] ZHUANG L, XU K, ZHU Y, et al. Calcium affects glucoraphanin metabolism in broccoli sprouts under ZnSO_4 stress [J]. *Food Chemistry*, 2021, 334(1): 127-520.
- [119] WU Q Y, LIN J C, HUANG K, et al. Characterization and expression analysis of myrosinase for sulforaphane synthesis in broccoli [J]. *International Journal of Agricultural and Biology*, 2013, 15(1): 83-89.
- [120] HUANG K, LIN C J, WU Q Y, et al. Changes in sulforaphane and selenocysteine methyltransferase transcript levels in broccoli treated with sodium selenite [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(4): 807-814.
- [121] 王红波. *CYP79F1* 基因对西兰花的遗传转化及转基因植株的培育[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [122] ZANG Y X, KIM J H, PARK Y D, et al. Metabolic engineering of aliphatic glucosinolates in Chinese cabbage plants expressing *Arabidopsis MAM1*, *CYP79F1*, and *CYP83A1* [J]. *BMB Reports*, 2008, 41(6): 472-478.
- [123] 张佑齐. *BCAT4*、*CYP79F1* 和 *ESM1* 过表达提高西兰花细胞萝卜硫素含量的研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [124] CHEN S, HALKIER B A. Functional expression and characterization of the myrosinase *MYR1* from *Brassica napus* in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Protein Expression and Purification*, 1999, 17(3): 414-420.
- [125] Härtel F V, BRANDT A. Characterization of a *Brassica napus* myrosinase expressed and secreted by *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2002, 24(2): 221-226.
- [126] 谢丽雪. 芥蓝黑芥子酶基因的克隆与原核表达[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [127] 肖海燕. 油菜黑芥子酶基因的大肠杆菌工程菌构建和表达研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.
- [128] 张盛敏. 拟南芥芥子酶基因 *TGG1* 的克隆、表达和酶学特性研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [129] ROSENBERGOVÁ Z, HEGYI Z, FERKO M, et al. Improved production of recombinant myrosinase in *Pichia pastoris* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11889.
- [130] CURIQUEO C, MAHN A, CASTILLO A. Broccoli myrosinase cDNA expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 233.
- [131] 黄河鸥, 郑璞, 吴丹, 等. 异源表达黑芥子酶及其用于制备萝卜硫素的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(22): 76-81.
- [132] HO C L, TAN H Q, CHUA K J, et al. Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(1): 27-37.