

固定化柚皮苷酶解转化制备普鲁宁

焦超¹, 李婧雅¹, 李利君^{1,2}, 杨秋明^{1,2}, 翁惠芬^{1,3}, 肖安风^{1,2,3}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 选择 D101-1 大孔吸附树脂固定化反应底物柚皮苷, 考察 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶水解柚皮苷转化普鲁宁的工艺条件, 结果表明, 其最适条件为: $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶用量 30 U/mL, 最适酶反应温度 60 °C, pH=4.0, 底物质量浓度 2.4 g/L, 振荡速率 80 r/min。在此条件下酶解反应 420 min, 柚皮苷转化率达到 78%。此外, 研究发现, 高浓度的 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶解反应有极强的促进作用。Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线的 $K_m=5.12$ g/L, $V_{max}=0.013$ g/(L·min)。利用薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC) 和高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对酶解产物进行分析, 并验证得出, 反应完全后可得到纯的反应产物普鲁宁。

[关键词] 普鲁宁; 底物固定化; 柚皮苷; 酶法转化

[中图分类号] Q 819

Preparation of Pruning by Immobilized Naringin

JIAO Chao¹, LI Jingya¹, LI Lijun^{1,2}, YANG Qiuming^{1,2}, WENG Huifen^{1,3}, XIAO Anfeng^{1,2,3}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: Naringin immobilized with D101-1 macroporous resin was used as the reaction substrate, the process conditions of $\alpha-L$ -rhamnosidase hydrolysis of naringin to convert pruning were investigated. The conditions for pruning transformation were optimized as $\alpha-L$ -rhamnosidase dosage 30 U/mL, reaction temperature 60 °C, pH=4.0, substrate concentration 2.4 g/L, shaking rate 80 r/min. Under the optimal conditions, the conversion of naringin reached 78% after enzymatic hydrolysis for 420 min. In addition, it was found that high concentration of Mn^{2+} , Fe^{2+} could significantly promote the enzymatic reaction. The K_m and V_{max} of Lineweaver-Burk fitted curve were 5.12 g/L and 0.013 g/(L·min), respectively. The analysis of the hydrolyzate by TLC and HPLC showed that pure pruning could be obtained after the reaction was completed.

Keywords: pruning; substrate immobilization; naringin; enzymatic transformation

0 引言

普鲁宁是一种具有降低胆固醇、抗氧化及抗病毒等功效的黄酮苷类物质, 在食品和药物方面有很好的应用前景^[1-3]。但是, 普鲁宁在自然界中的丰度较低, 难以从生物组织中提取制备。因此, 研究

[收稿日期] 2018-03-05

[基金项目] 福建省科技计划项目 (2016N0021)

[作者简介] 焦超 (1995—), 男, 硕士生, 从事食品生物技术方向研究。通信作者: 肖安风 (1973—), 男, 教授, 博士, 从事食品生物技术方向研究。E-mail:xxaaffeng@jmu.edu.cn

人员将目光转向了可以制备普鲁宁的柚皮苷(4'-5, 7'-三羟基二氢黄酮-7-鼠李糖葡萄糖苷),它是一类二氢黄酮类化合物,是枳实、化橘红等几味中药的主要有效成分^[4]。柚皮苷在 α -L-鼠李糖苷酶的催化作用下可发生特异性水解反应脱掉 α -L-鼠李糖,生成普鲁宁。

相关研究表明^[5-6],以柚皮苷为底物,利用 α -L-鼠李糖苷酶生物转化是制备普鲁宁的有效手段。但是由于柚皮苷是一种极性化合物,不但难溶于油脂^[7],而且在水溶液中以游离状态存在时溶解性也很差。虽然柚皮苷易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,但是使用有机溶剂代替水溶液进行酶解反应时,又会破坏酶的蛋白质结构,酶的活性和稳定性受到影响。因此,研究增大酶与柚皮苷的接触,提高柚皮苷作为酶解底物的利用度是非常有必要的。

酶催化固相底物反应是一种将底物固定在固相载体上,然后溶解在溶液中的酶扩散到底物附近与之接触,发生反应的反应形式^[8]。根据此反应机制,利用可以特异性吸附黄酮类化合物的大孔吸附树脂,将柚皮苷固定在树脂载体上,之后游离酶扩散到固定化的柚皮苷附近而与之发生反应,可以很好改善底物溶解性。有关酶催化固相底物反应的应用研究很多,Ulijn等^[9]报道了一种蛋白酶催化的多肽合成,将底物氨基酸固定在 PEGA₁₉₀₀载体上,而后再在水溶液中用嗜热菌蛋白酶将氨基酸直接合成二肽,产量高达99%。Wang等^[10]利用可控多孔玻璃(controlled pore glass, CPG)固定核苷,制备出含有二硫键单元的肽-寡核苷酸偶联物。本文选择了几种大孔吸附树脂对柚皮苷进行固定化,选择出满足条件的最优树脂,对酶催化固相底物反应进行初步研究,反应条件温和,选择性高,产物容易分离,符合绿色化学的发展方向,为柚皮苷的生物转化提供一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 重组 α -L-鼠李糖苷酶的制备

将含有重组质粒 pPIC9K-rha 的毕赤酵母 GS115 菌株进行活化,活化后的菌液转接至 BMGY 液体培养基中继续培养,收集 $A_{600} \geq 3.0$ 的菌体,根据毕胜^[11]细胞重悬方法重悬后,置于摇床在 30 ℃、220 r/min 条件下诱导表达重组 α -L-鼠李糖苷酶,发酵 72 h 后,室温 3500 r/min 离心 10 min,收集上清液。

1.2 α -L-鼠李糖苷酶活力的测定

采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12-13],以柚皮苷为底物进行酶活力的测定,测定的反应体系为:950 μ L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH=5.0)加入 1 mL 300 mg/L 的底物和 50 μ L 的酶液,50 ℃反应 15 min 后,过 0.22 μ m 滤膜后利用 HPLC 测定反应液中柚皮苷和普鲁宁的含量。在 50 ℃、pH=5.0 的条件下反应 1 min,消耗 1 μ g 柚皮苷所需的 α -L-鼠李糖苷酶的量定义为一个 α -L-鼠李糖苷酶活力单位。

1.3 大孔吸附树脂的预处理

具体流程如下:漂浮筛选→95% (体积分数)乙醇泡 24 h→湿法上柱→95% (体积分数)乙醇洗→蒸馏水洗→2% (质量分数)盐酸泡 3 h→蒸馏水洗→2% (质量分数)氢氧化钠泡 3 h→蒸馏水洗。

1.4 柚皮苷的固定化

分别将 0.5 g 湿重的 5 种大孔吸附树脂加入到 50 mL 0.2% (g/mL) 的柚皮苷溶液中,置于 50 ℃ 的恒温振荡水浴中充分振荡固定,至上清液中柚皮苷浓度不再发生变化为止。

1.5 柚皮苷吸附量的测定

HPLC 法检测树脂吸附前后柚皮苷溶液中柚皮苷浓度的变化,并根据下式计算出树脂对柚皮苷的饱和吸附量:树脂对柚皮苷的饱和吸附量(mg/g) = $(C_0 - C_1) \times V / m$,式中: C_0 、 C_1 分别表示柚皮苷溶液在树脂吸附前后的浓度(g/L); V 表示柚皮苷溶液的体积(mL); m 表示树脂的用量(g,湿重)。

1.6 α -L-鼠李糖苷酶催化固定化柚皮苷水解过程分析

取 0.4 g 预处理好的树脂加入到 0.002 g/mL 的柚皮苷溶液中,缓冲液 pH=5.0,置于 50 ℃ 水浴中恒温振荡固定,同时加入 α -L-鼠李糖苷酶酶液,反应体系的总体积为 20 mL。在振速为 120 r/min 下酶催化固

定化柚皮苷反应 360 min，每隔一段时间取样一次，沸水灭活 10 min 后，冷却至室温，测定反应体系中还原糖、柚皮苷及普鲁宁的含量随时间的变化情况。在此基础上，通过柚皮苷酶解过程中还原糖的生成量，来考察酶用量、底物浓度、pH 值、温度、振荡速度及金属离子等对固定化柚皮苷酶解作用的影响。

1.7 柚皮苷转化率的计算

柚皮苷转化率/% = [还原糖生成量/182.11 × 580.53] / 柚皮苷总质量 × 100，其中，182.11 为鼠李糖相对分子质量，580.53 为柚皮苷相对分子质量。

1.8 α-L-鼠李糖苷酶水解固定柚皮苷的动力学分析

以固定化柚皮苷为底物，α-L-鼠李糖苷酶粗酶液为催化剂，在不同的底物浓度下，于 60 ℃，120 r/min 振荡器中反应 360 min，每 60 min 取样一次，沸水水浴 15 min 灭活后测定酶解液中还原糖的生成量，制作 α-L-鼠李糖苷酶水解固定化柚皮苷的动力学模型并计算参数 K_m 和 V_{max} [14-15]。

2 结果与分析

2.1 固定化柚皮苷树脂载体的选择

选择 5 种国产大孔吸附树脂作为固定化柚皮苷的载体，通过研究树脂对柚皮苷的吸附量，以及各树脂固定化的柚皮苷在 α-L-鼠李糖苷酶催化作用下的酶解反应效果，得出最佳的树脂载体。采用 HPLC 法测定 5 种树脂对柚皮苷的吸附量，其结果如图 1 所示。

由图 1 可见，5 种树脂载体对柚皮苷饱和吸附量大小为 D4020 > D101-1 > AB-8 > D101 > DM130。而从图 2 中可以明显看出，反应 2 h 各树脂固定化柚皮苷的酶解作用差异不大，但是 2 h 后 D101-1 树脂固定化柚皮苷后酶解作用明显强于其他树脂，与图 1 中 5 种树脂对柚皮苷的饱和吸附量结果结合可得出，D101-1 树脂对柚皮苷的吸附效果及酶解反应效果最好。因此综合树脂载体对柚皮苷的吸附量以及酶解催化反应效果，选择 D101-1 大孔吸附树脂做后续试验。

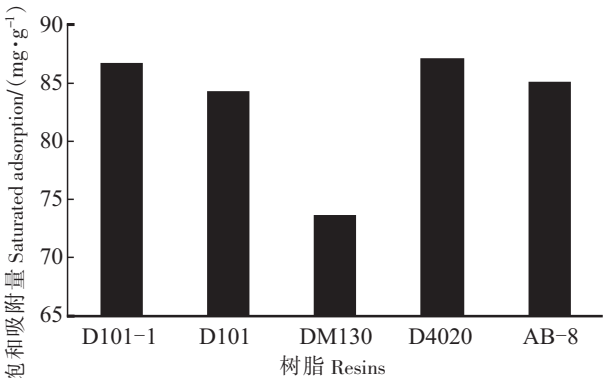


图 1 不同大孔吸附树脂对柚皮苷的饱和吸附量

Fig.1 The saturated adsorption capacity of naringin in different macroporous resins

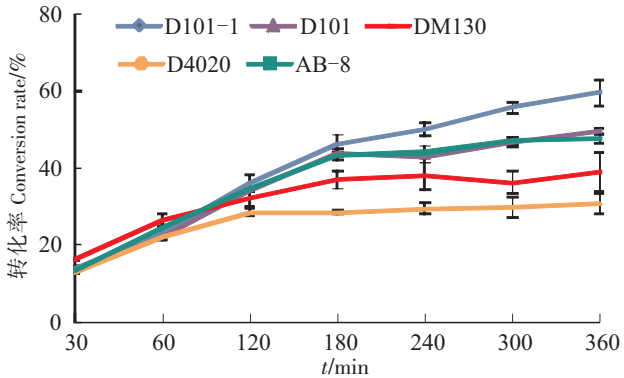


图 2 不同树脂固定化柚皮苷的酶解作用

Fig.2 Enzymolysis of naringin immobilized in different types of resins

2.2 α-L-鼠李糖苷酶催化固定化柚皮苷水解过程分析

在 20 mL 反应体系中，固定其他条件不变，改变 α-L-鼠李糖苷酶的加酶量，催化柚皮苷进行酶解反应 6 h，测定反应液中还原糖生成量，计算柚皮苷的转化率随时间的变化情况，其结果如图 3a 所示。从图 3a 中可以看出，随着加酶量的增加，柚皮苷转化率明显增加，反应初速率也相应增大。这是由于增加了加酶量使反应液中浓度一定的底物在单位体积、单位时间内接触酶的机率增大，所以催化反应初速率会增大，转化率也增加。当加酶量增大到 30 U/mL，继续增加加酶量，柚皮苷的转化率变化不大，反应到 3 h 后基本一致，对酶解反应的促进作用不大。因此，选择加酶量为 30 U/mL。然而与游离酶催化柚皮苷的酶解转化相比，将柚皮苷固定化后酶解速率有所减慢，所用酶量增加而且反应时间变长，这可能是由于树脂载体的存在阻碍了酶与底物的接触所致。

从图 3b 中可以看出, 其他反应条件固定, 随着底物浓度增大, 酶解反应达到平衡所需时间延长, 还原糖生成量变大, 但是增加量越来越少。当柚皮苷浓度较低时, 酶相对过量, 酶反应很快达到平衡。而当柚皮苷浓度较高时, 酶与底物接触机会增大, 酶反应初速率有一定加快, 还原糖的生成量相应增加, 但是反应达到平衡的时间也会增加。反应生成的还原糖对反应有一定的抑制作用, 因此随着底物浓度的增大, 还原糖的增加量越来越少。柚皮苷的转化率计算时是以底物浓度为分母, 所以底物浓度变大, 分母不变时所得转化率会小。因此, 要综合考虑还原糖生成量和柚皮苷转化率来确定最适底物浓度。当底物质量浓度为 2.4 g/L 时, 柚皮苷转化率最高, 底物质量浓度大于 2.4 g/L 时, 转化率反而减小, 所以最后选择底物质量浓度为 2.4 g/L。

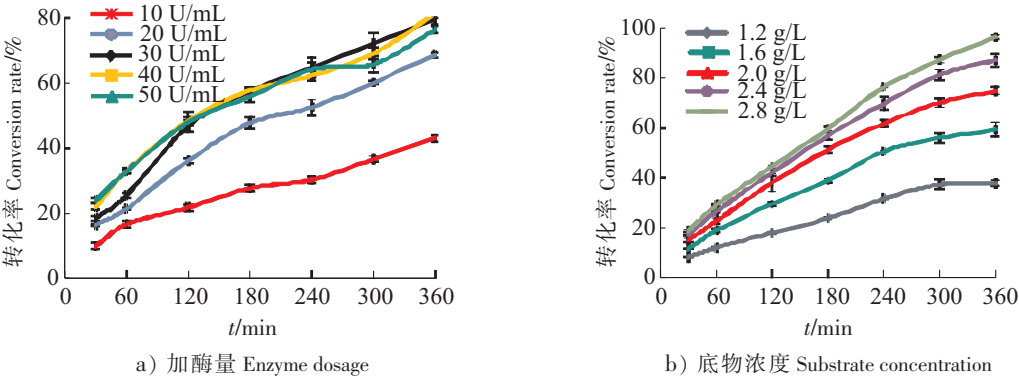


图 3 加酶量和底物浓度对柚皮苷酶解作用的影响

Fig.3 Effects of enzyme dosage and substrate concentration on hydrolysis of naringin

pH 值对酶活力有很大的影响, 过酸或过碱等不适宜的条件都会使酶活力降低甚至丧失, 只有在最适 pH 值的条件下才可以显现出其最大活力。因此, 考察 pH 值对柚皮苷酶解作用的影响十分有必要。改变反应体系中缓冲液的 pH 值, 考察柚皮苷的转化率随时间的变化曲线, 其变化趋势如图 4a 所示。pH 值对酶反应的初始速率、还原糖生成量以及柚皮苷转化率都有一定影响。由图 4a 可知, pH = 3.5 ~ 4.5, 转化率差别不大, 但是相对其他 pH 值范围的转化率要高, pH 值继续增大, 转化率反而减小, 说明该酶适应酸性环境, 在 pH = 4 时酶解反应稳定增加且效果相对较好, 与游离酶催化柚皮苷水解反应的最适 pH 值一致, 因此在酶解反应中选择缓冲液 pH = 4.0。

酶催化反应的速率与反应温度有很大的关系, 在最适温度条件下酶才可以表现出最大酶活力, 但生物酶作为一种蛋白质, 当温度超过其可接受范围时, 易变性而失活。由图 4b 可知, 随着温度升高, 酶解反应初速率相应增大, 柚皮苷转化率也随之增高。当温度达到 60 ℃ 时酶反应的初速率最大, 柚皮苷转化率最高, 但是当温度达到 70 ℃ 后 0.5 h 内酶已基本失活, 酶蛋白的变性是随时间的延长而累加的。所以选择酶反应的最适温度为 60 ℃。

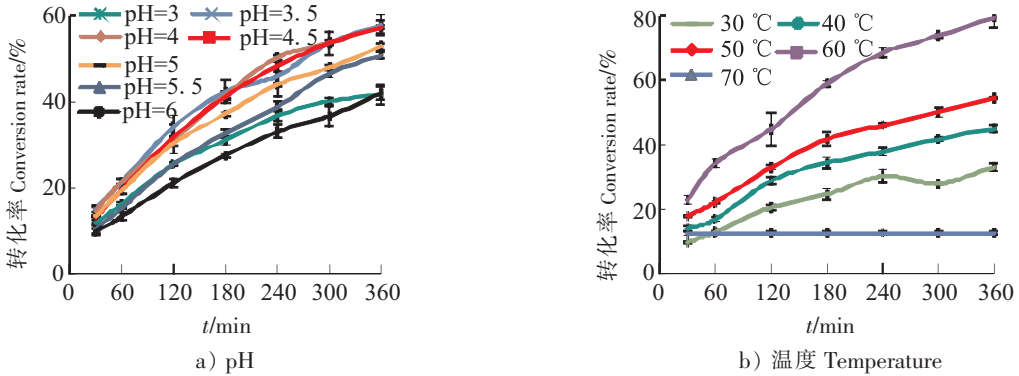


图 4 pH 值和温度对柚皮苷酶解作用的影响

Fig.4 Effects of pH and temperature on hydrolysis of naringin

固定其他反应条件不变，分别加入浓度为 5 mmol/L 的不同金属离子，酶解反应 1 h 后取样测定金属离子对酶解反应的影响，所得结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出，金属离子可参与催化反应，与空白组相比较， Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Co^{2+} 对酶活力有促进作用，其中 5 mmol/L 的 Fe^{2+} 促进作用最强； Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶活力影响不大； Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对酶活力有明显的抑制作用，其中 Fe^{3+} 的抑制作用最强。

进一步考察不同浓度的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶反应的促进作用，结果见图 6。由图 6a 可知，与空白组相比较，低浓度的 Mn^{2+} 对酶解反应的影响不大，反应初速率以及反应初期柚皮苷转化率都几乎相同，到反应后期显示出一些促进作用，但是作用不大。高浓度的 Mn^{2+} 对酶解反应具有很强的促进作用， Mn^{2+} 可能作为生物转化反应的促进剂。由图 6b 可知，低浓度的 Fe^{2+} 对酶解反应几乎没有促进作用，当 Fe^{2+} 浓度为 0.1，0.5，1 mmol/L 时初始反应速率和柚皮苷转化率都没有明显的变化，当 Fe^{2+} 浓度达到 10 mmol/L 时，初始反应速率很快，但是后来由于反应温度高，在反应液中的 Fe^{2+} 被氧化，颜色变成棕色，柚皮苷转化率不再增加，说明高浓度的 Fe^{2+} 对酶解反应有极强的促进作用。

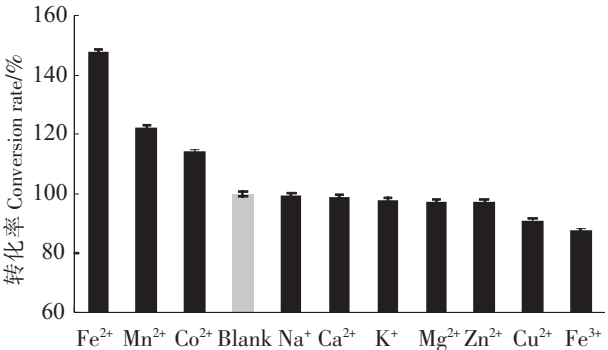


图 5 5 mmol/L 金属离子对酶解反应的影响

Fig.5 Effects of 5 mmol/L metal ion on enzymatic hydrolysis reaction

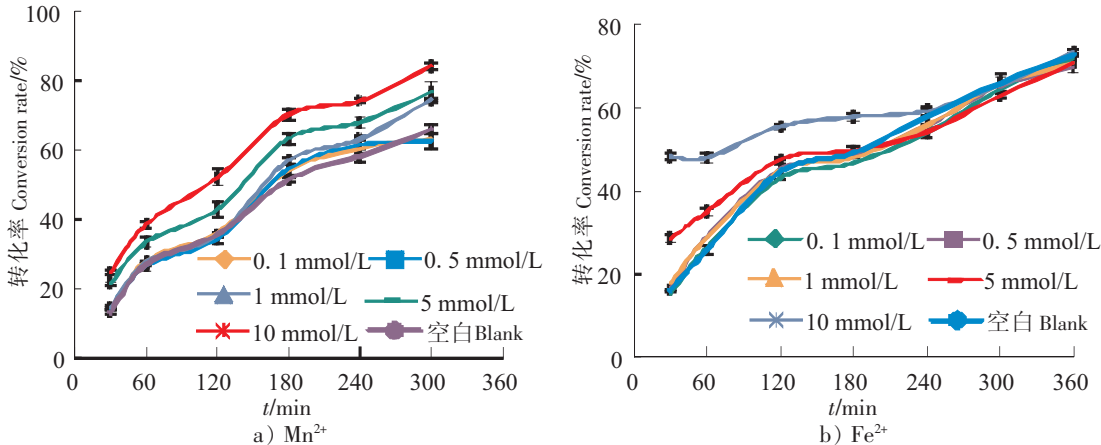


图 6 不同浓度的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶解反应的影响

Fig.6 The influence of different concentration of Mn^{2+} and Fe^{2+} on enzymatic hydrolysis reaction

2.3 最优工艺验证和 1 L 放大试验

根据前面的试验结果，在加酶量为 30 U/mL、pH=4.0、温度为 60 ℃、振荡速率为 80 r/min、底物质量浓度为 2.4 g/L 的条件下进行最优工艺验证和 1 L 放大试验，结果见图 7。由图 7 可以看出，

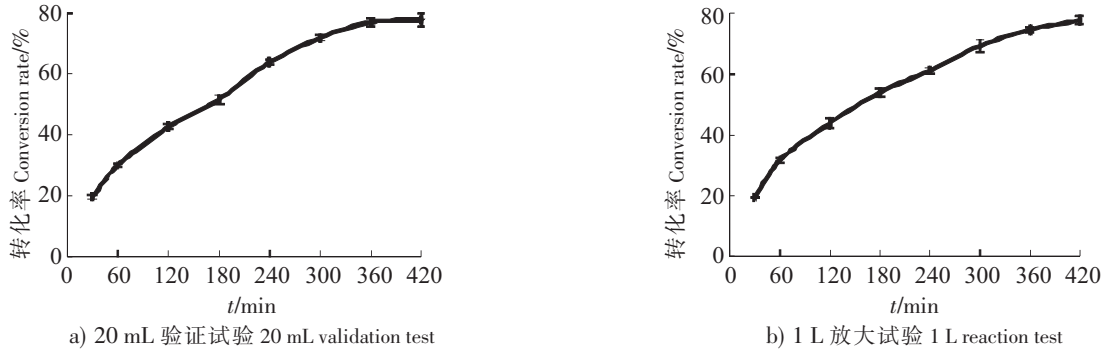


图 7 20 mL 反应体系最优工艺验证试验和 1 L 放大试验

Fig.7 The optimal process validation test 20 mL reaction system and 1 L reaction system

采用最优条件进行酶解反应时, 初速率大于未优化前, 柚皮苷转化率在 420 min 时可达到 78%, 最终产物生成量也有所提高。但是, 与游离柚皮苷的酶解反应相比, 柚皮苷的转化率有所下降, 而且酶解反应达到平衡所用的时间大大延长。这可能是由于柚皮苷与载体树脂结合后形成了空间位阻, 在一定程度上阻止了柚皮苷与酶分子的接触反应。反应体系放大到 1 L 后, 随着反应时间的延长, 还原糖生成量不断增加, 柚皮苷转化率也不断增大, 酶解反应 420 min 后基本达到平衡, 柚皮苷转化率约为 75%, 这与 20 mL 反应体系的实验结果基本一致。

2.4 酶解反应动力学

由图 8 可知, 反应初速率 - 底物浓度的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合方程为 $y = 38.929x + 1.9074$, 计算酶解反应的 K_m 值和最大反应速率 V_{max} 值, 得到: $K_m = 5.12\text{ g/L}$, $V_{max} = 0.013\text{ g/(L}\cdot\text{min)}$ 。而游离柚皮苷酶解反应动力学的米氏常数 $K_m = 0.588\text{ g/L}$, $V_{max} = 0.011\text{ g/(L}\cdot\text{min)}$ 。对比固定化柚皮苷前后的 K_m 值可以看出, 柚皮苷经固定化后 K_m 增大很多, 说明底物固定化以后, 由于树脂载体内部的空间位阻和扩散效应造成酶与底物的亲和性降低, 反应初速率下降。

2.5 TLC 和 HPLC 法分析反应产物

在最优工艺验证试验时, 固定化的柚皮苷在 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶的催化作用下进行酶法转化, 可以得到反应产物鼠李糖和普鲁宁。分别在反应前和反应后取样检测验证其中的反应产物, 薄层层析结果可直观反映出酶解反应的反应产物, 结果如图 9 所示。对照薄层层析图中柚皮苷、普鲁宁以及鼠李糖的颜色和位置可以看出, 反应前反应液中只有柚皮苷, 加入 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶反应一段时间后, 柚皮苷逐渐水解转化成普鲁宁和鼠李糖, 反应 7 h 达到平衡后柚皮苷转化率为 80%, 反应液中产物为普鲁宁和鼠李糖, 还有些残余的柚皮苷。说明该重组的 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶与柚皮苷特异性反应的产物中不会含有柚皮素, 省去了用柚苷酶水解柚皮苷生成柚皮素的干扰, 使产物普鲁宁分离纯化变得简单。

在最优工艺验证试验时, 固定化的柚皮苷在 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶的催化作用下进行酶法转化, 可以得到反应产物鼠李糖和普鲁宁。分别在反应前、反应中间和反应后取样留待检测验证其中的反应产物, HPLC 结果如图 10 所示。由图 10 可见, 加酶液前反应液中只含有柚皮苷, 加入酶液反应后, 柚皮苷在 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶的催化作用下逐渐反应转化成了普鲁宁, 随着反应时间的延长, 反应液中柚皮苷量逐渐减少, 普鲁宁的生成量逐渐增多, 反应 7 h 后反应基本达到平衡, 反应液中含有产物普鲁宁和少量未转化完全的柚皮苷。该检测方法检测不出还原糖的生成, 但是可以确定反应产物中没有柚皮素的生成。

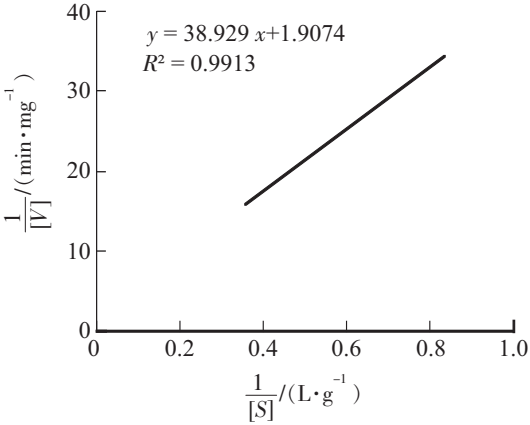
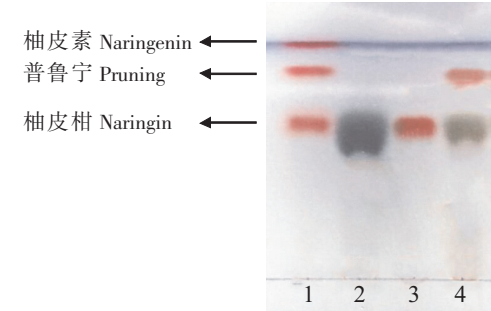


图 8 反应初速率-底物浓度的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线
Fig.8 Lineweaver-Burk plots to determine the kinetic parameters



说明: 1—柚皮素、普鲁宁、柚皮苷混标; 2—鼠李糖标品; 3—加酶前反应液; 4—反应 7 h 反应液
Notes: 1—naringenin, prunin g, naringin mixed standard; 2—rhamnose standard; 3—pre-enzyme reaction solution; 4—reaction 7 h reaction solution

图 9 $V(\text{丙酮}):V(\text{氯仿}):V(\text{水})=80:20:4.8$ 展开反应混合物的 TLC 图

Fig.9 TLC of reaction mixture separated by $V(\text{ethyl acetone}):V(\text{chloroform}):V(\text{water})=80:20:4.8$

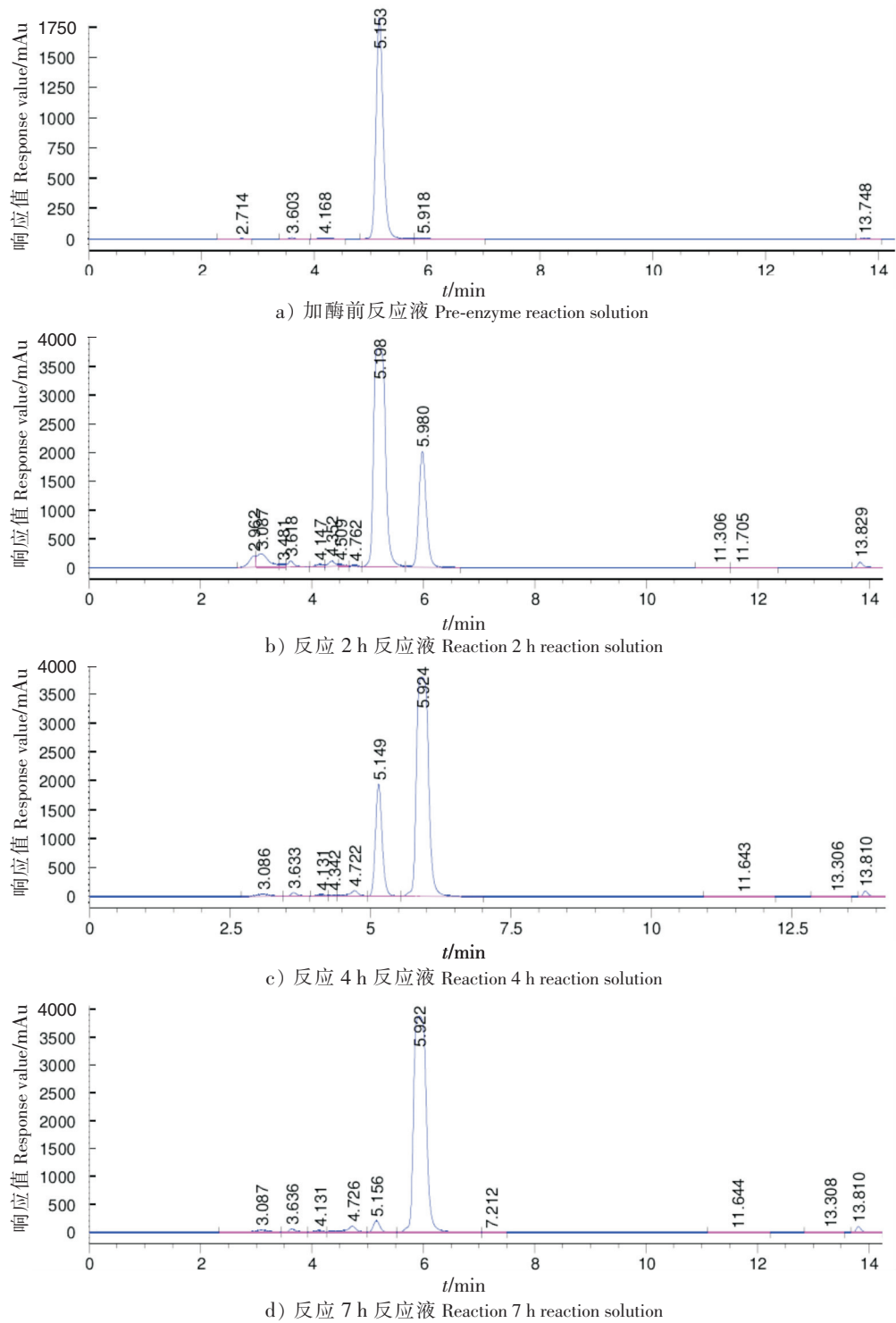


图 10 酶解反应各阶段反应产物的 HPLC 图

Fig.10 HPLC of the reaction product reaction in different stages of enzymatic hydrolysis

3 结论

对 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶催化固定化柚皮苷水解条件进行考察，在所考察的 5 种大孔吸附树脂中，最适用作载体的树脂为 D101-1 大孔吸附树脂。 $\alpha-L$ -鼠李糖苷酶催化固定化柚皮苷水解的最适反应条件为：酶用量 30 U/mL，反应温度 60 ℃，pH = 4.0，底物质量浓度 2.4 g/L，振荡速率 80 r/min。

在此条件下反应 420 min, 柚皮苷转化率达到 78%。高浓度的 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶解反应有极强的促进作用。通过最优工艺验证试验及 1 L 放大试验证明了该优化工艺具有良好的重现性。最后利用 TLC 法和 HPLC 验证得出, 反应完全后可得到纯的普鲁宁。

[参考文献]

- [1] CHANG H Y, LEE Y B, BAE H A, et al. Purification and characterisation of *Aspergillus sojae* naringinase: the production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with *in vitro* inhibition of HMG - CoA reductase [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 234-241. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.06.024.
- [2] SALAS M P, CELIZ G, GERONAZZO H, et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species [J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1411-1415. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.07.100.
- [3] CELIZ G, ALFARO F F, CAPPELLEVI C, et al. Prunin- and hesperetin glucoside-alkyl (C4-C18) esters interaction with Jurkat cells plasma membrane: consequences on membrane physical properties and antioxidant capacity [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 55: 411-423. DOI:10.1016/j.fct.2013.01.011.
- [4] 林国荣. 文旦柚柚皮中柚皮苷的富集及其活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(10): 1197-1202.
- [5] NI H, XIAO A F, CAI H N, et al. Purification and characterization of *Aspergillus niger* alpha-L-rhamnosidase for the bio-transformation of naringin to prunin [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(24): 5276-5284. DOI:10.5897/AJMR12.1229.
- [6] 陈俊, 李利君, 倪辉, 等. 重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(8): 1025-1030.
- [7] 许鹭, 蓝木香, 杨继国, 等. 柚皮苷 - 卵磷脂包合物的制备及其理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 237-241, 279.
- [8] 刘瑞璨. 固定化底物催化合成 α -熊果苷 [D]. 北京: 北京化工大学, 2017.
- [9] ULIJN R V, BARAGANA B, HALLING P J, et al. Protease-catalyzed peptide synthesis on solid support [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(37): 10988-10989. DOI:10.1021/ja026912d.
- [10] WANG X F, YANG X T, CHEN Y, et al. Solid phase synthesis of peptide-siRNA conjugates containing disulfide bond unit [J]. Chinese Chemical Letters, 2013, 24(10): 873-876. DOI:10.1016/j.cclet.2013.06.010.
- [11] 毕胜. miR-29 及其靶基因 COL1 在增生性瘢痕形成中的作用及机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [12] 肖安凤, 倪辉, 吴升山, 等. 黑曲霉产柚皮苷酶的发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(6): 89-97.
- [13] 胡群芳, 李利君, 陈艳红, 等. 从黑曲霉固态发酵产物中纯化 α -L-鼠李糖苷酶及酶法制备普鲁宁 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 107-114.
- [14] PARI L, AMUDHA K. Antioxidant effect of naringin on nickel-induced toxicity in rats: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. Int J Pharm Sci Res, 2011, 2(1): 151-158.
- [15] ALAM M A, KAUTER K, BROWN L. Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats [J]. Nutrients, 2013, 5(3): 637-650. DOI:10.3390/nu5030637.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)