

微生物来源柚苷酶的研究进展及应用

张林河¹, 方柏山^{1,2}

(¹华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; ²厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 柚皮苷是影响柚子汁品味的最主要因素, 柚苷酶具有将柚皮苷分解为普鲁宁、鼠李糖、葡萄糖和柚皮素等物质的功能, 并且这些物质已广泛用于制药和饮料行业。本文介绍了近年来国内外微生物来源的柚苷酶的研究、酶学特性、酶活测定、结构与功能等, 表明细菌来源的柚苷酶最适温度为 37~70, 最始 pH 值为 4.5~8.0; 真菌来源的柚苷酶最适温度为 30~75, 最始 pH 值为 4.0~11.0。介绍了柚苷酶及其相关产物在食品、饮料和制药工业中的应用进展, 发现柚苷酶不仅具有脱苦的作用, 还对人类的身体健康具有重要作用。展望了今后的研究方向, 应该从柚苷酶高产菌株的选育、发酵产酶的工艺优化和酶的应用等方面开展工作, 大幅度提高柚苷酶的产酶水平。

关键词: 柚苷酶; 柚皮苷; 酶学性质; α -L-鼠李糖苷酶; β -D-葡萄糖苷酶

中图分类号: TS 201.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-6613 (2013) 05-1108-08

DOI: 10.3969/j.issn.1000-6613.2013.05.025

Research progress and application of microbial origin naringinase

ZHANG Linhe¹, FANG Baishan^{1,2}

(¹College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China; ²College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Naringin is the principal factor which bitters the taste of grapefruit juice. Naringin could be hydrolyzed by naringinase into prunin, rhamnose, glucose, and naringenin, which have wide applications in the pharmaceutical and beverage industry. This paper provides an overview of the studies on microbial origin naringinase, purification, characterization and determination of enzyme activity as well as protein structure and function. The optimum temperature of naringinase from bacteria is from 37 to 70 while the optimal pH is in the range of 4.5 to 8.0; the optimum temperature of naringinase from fungal is from 30 to 75 while the optimal pH is in the range of 4.0 to 11.0. The applications of naringinase and its various products in food, beverage, and pharmaceutical are also presented, showing that naringinase could not only debitter the fruit juice but also play an important role in human health. In addition, the development trends and potential applications of naringinase are also prospected. The research emphasis should be placed on screening ideal microbe strains and fermentation process optimization to enhance naringinase.

Key words: naringinase; naringin; enzymatic properties; α -L-rhamnosidase; β -D-glucosidase

柚皮苷是蜜柚深加工中最主要的影响因素之一, 不管在蜜柚汁的生产还是柚皮蜜饯加工都要涉及去除苦味物质的重要工序, 而柚皮苷是最主要的苦味物质。柚皮苷水解的中间产物为普鲁宁, 其苦味只有柚皮苷的三分之一^[1]。柚皮素为柚皮苷水解的终产物之一, 是基本无苦味的物质, 当柚皮苷被水解为此物质时, 蜜柚的苦味基本清除。第 16 届中

国国际投资贸易洽谈会就为蜜柚的深加工项目总投资超过 1 亿美元^[2], 希望能够提高蜜柚价值, 也为蜜柚脱苦等带来了巨大商机。

收稿日期: 2012-11-28; 修改稿日期: 2012-12-23。

第一作者: 张林河 (1986—), 男, 硕士研究生。联系人: 方柏山, 教授, 博士生导师, 主要从事生物催化与生物转化方面的研究。E-mail: fbs@xmu.edu.cn。

柚苷酶，由 α -L-鼠李糖苷酶 (E.C. 3.2.1.40) 和 β -D-葡萄糖苷酶 (E.C. 3.2.1.21) 组成的复合酶，在酶解柚皮苷过程中，首先 α -L-鼠李糖苷酶将柚皮苷 (4,5,7-三羟基二氢黄酮-7-鼠李葡萄糖苷) 水解为 L-鼠李糖和普鲁宁，然后 β -D-葡萄糖苷酶将普鲁宁水解为葡萄糖和柚皮素 (4,5,7-三羟基二氢黄酮)，该水解过程如图 1 所示^[3]。柚苷酶水解的第一步反应为脱苦的关键步骤，因此很多学者在研究柚苷酶的时候将 α -L-鼠李糖苷酶的酶活性等同于柚苷酶的酶活性进行研究。

柚苷酶的来源广泛，植物、动物和微生物均有之，首次发现的柚苷酶来源于芹菜籽^[4]。目前柚苷酶的主要来源为微生物，含有柚苷酶的微生物有细菌、真菌和酵母等。真菌主要集中在黑曲霉和青霉菌两种类型；到目前为止，细菌来源的柚苷酶种类较少，有木糖葡萄球菌^[5]；而酵母来源的柚苷酶则是罗伦隐球酵母^[6]。另外，柚苷酶的应用也非常广泛，主要集中在食品工业和制药工业，目前主要用于蜜柚果汁的制备。

本文主要综述微生物来源的柚苷酶及其酶学特性的研究进展，并简述柚苷酶以及相关的底物和产物的应用。

1 柚苷酶的来源及性质

1.1 细菌来源的柚苷酶及其酶学性质

迄今为止，细菌来源的柚苷酶报道较少，但有研究指出细菌来源的柚苷酶比真菌来源的应用范围

要广^[7]，已经引起人们对细菌产柚苷酶研究的重视。

Miyata 等^[8]将 *Sphingomonas paucimobilis* 菌株中编码 *rhaM* 的基因克隆，于 *E.coli* 中表达。Cardona 等^[9-10]提出了一种基于严格调控鼠李糖-诱导启动子 *P_{rhaB}* 从而在 *Burkholderia cenocepacia* 中达到识别必需基因和操作子的作用，证实了通过制备不同 *P_{rhaB}* 的载体在两个不同的感染位点能够获得不同水平的基因表达。Birgisson 等^[11-12]从新型嗜热细菌中克隆出两种热稳定性的 α -L-鼠李糖苷酶基因，*rhmA* 和 *rhmB*，在大肠杆菌中表达柚苷酶。Hashimoto 等^[13]从 *Bacillus* sp. 中获得 *rhaA* 和 *rhaB* 两种 α -L-鼠李糖苷酶，并于大肠杆菌克隆表达，相对分子质量分别为 98 280 kDa 和 106 049 kDa 柚苷酶 pH 值为 6.5 ~ 7.0、*t*=40 时具有最好的活性。以上均通过基因工程手段对 α -L-鼠李糖苷酶进行研究，获得了较好的成果。

以下例子对产 α -L-鼠李糖苷酶的菌株进行研究，但这些菌株并非均可降解柚皮苷。Mazzaferro 等^[14]发现耐寒的 *Pseudoalteromonas* sp. 可产胞内鼠李糖苷酶。Avila 等^[15]报道了乳酸菌的 α -L-鼠李糖苷酶生理生化特性结果，并对 37 种 216 株乳酸菌株进行筛选，其中 *Lactobacillus plantarum* 产鼠李糖苷酶活性最高。Beekwilder 等^[16]发现 *Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus acidophilus* 可分别水解柚皮苷、芦丁和其它芦丁糖苷，前者具有鼠李糖苷酶 A_{La} 酶活性，后者有鼠李糖苷酶 1_{LP} 和鼠李糖苷酶 2_{LP} 酶活性。Michlmayr 等^[17]对 *Pediococcus*

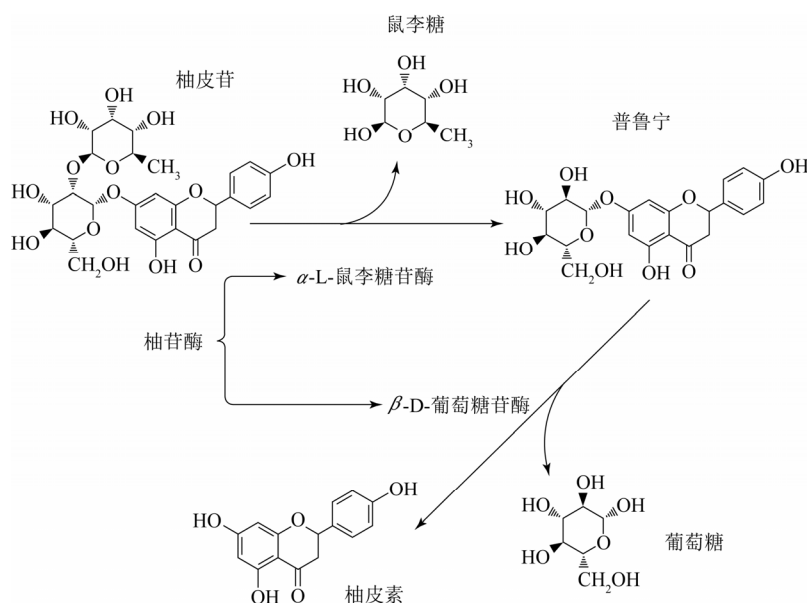


图 1 柚苷酶分解柚皮苷为鼠李糖、普鲁宁、葡萄糖和柚皮素的过程示意图

acidilactici 中的两种 α -L-鼠李糖苷酶进行鉴定, 结果显示均属于糖基水解酶家族 78 (GH78), 其中鼠李糖苷酶可以水解对二硝基- α -L-吡喃鼠李糖苷。Puri 等^[18-19]通过土壤分离出一株产柚苷酶的非致病性菌株 *Staphylococcus xylosus*, 但此前报道认为 *Staphylococcus xylosus* 菌体有潜在致病性^[20]。表 1 列举了几种细菌所产 α -L-鼠李糖苷酶酶学性质。可发现并非所有的柚苷酶都能降解柚皮苷, 说明不同来源柚苷酶底物专一性是不一致的。

本文作者课题组从福建平和蜜柚果园中采样, 经分离鉴定获得一株新型产柚苷酶 *Phyllobacterium* sp. Wb51b 菌株。

1.2 真菌来源的柚苷酶及酶学性质

丝状真菌产酶可应用于食品及饮料工业, 也是柚苷酶的主要来源, 目前对产柚苷酶的真菌主要有黑曲霉、青霉和米曲霉等。

Manzanares 等^[21]以 L-鼠李糖为主要碳源, 用 *Aspergillus nidulans* 生产 α -L-鼠李糖苷酶。Barrio 等^[22]从 *Aspergillus aculeatus* 中发现了 α -L-鼠李糖苷酶, 该酶可提高黄酮的生物利用率。Puri 等^[23]通过硫酸铵盐析、离子交换凝胶柱分离等方法纯化 *Aspergillus niger* 产的柚苷酶, 纯化倍数 38 倍, 酶比活力为 867 U/mg。Koseki 等^[24]以 L-鼠李糖为主要碳源培养 *Aspergillus kawachii* 菌株, 纯化获得 α -L-鼠李糖苷酶。Thammawat 等^[25]采集 128 个土样进行试验, 分离获得 348 种产柚苷酶的真菌, 经筛选, *Aspergillus niger* BCC25166 被鉴定并应用于后期实验, 研究表明该菌种可产柚苷酶、 α -L-鼠李糖

苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶等。以上 3 种酶的最适 pH 值均为 4.0, 最优温度前两者是 60, 后者 60~70。Mendoza-Cal 等^[26]用 12 种真菌进行固态发酵, 以橙子和葡萄柚的果皮为培养基, 柚皮苷为诱导剂, 诱导产酶, 研究发现 *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* 和 *Aspergillus niger* HPD-2 三个菌株对葡萄柚果皮的分解率分别为 81%、80%和 79%。Chang 等^[27]从发酵的大豆制品中分离获得一株产柚苷酶的 *Aspergillus sojae* 菌株, 所获得的柚苷酶的相对分子质量为 70 kDa, α -L-鼠李糖苷酶最优 pH 值为 6.0, 稳定 pH 值范围为 5.5~8.0, 并发现该菌株具有 β -D-葡萄糖苷酶活性, 此外该菌株产的柚苷酶活性比青霉产的柚苷酶酶活低很多。Yadav 等^[28]从腐败的柠檬汁中分离出一株产 α -L-鼠李糖苷酶真菌 *Aspergillus flavus*。Ni 等^[29-31]从 *Aspergillus niger* 中纯化出 α -L-鼠李糖苷酶, 该酶可将柚皮苷转化成普鲁宁, 转化率为 97%, 可应用于食品和制药工业。上述菌株所产柚苷酶可运用于食品, 但需提防黄曲霉的潜在危险性。

Mamma 等^[32]以芦丁为主要碳源, 发现 *Penicillium decumbens* 菌株可产生两种胞内的 β -葡萄糖苷酶 G_I 和 G_{II}。Rajal 等^[33]从植物致病菌 *Penicillium ulaiense* 中获得 α -L-鼠李糖苷酶, 该酶分解对硝基苯基- α -L-鼠李糖苷的能力比分解柚皮苷强, 该菌株不产霉菌毒素, 因此其柚苷酶可用于食品和制药工业。Yadav 等^[34]用 *Penicillium citrinum* 菌株生产 α -L-鼠李糖苷酶, 经过多次纯化获得鼠李糖苷酶。表 2 为一些真菌来源的柚苷酶及其相关性质。

表 1 几种细菌产 α -L-鼠李糖苷酶酶学性质

来源	作用基质	最适温度/ 度	最适 pH 值	等电点 <i>pI</i>	分子量 /kDa	V_{max} /U·mg ⁻¹	K_m /mmol·L ⁻¹
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ^[8]	L-鼠李糖	70	5.0~6.9	4.5	107	—	—
<i>Thermomicrobium</i> sp. ^[11-12]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷	70	7.9	4.6	104	134 ; 352	0.46 ; 0.66
<i>Bacillus</i> sp. ^[13]	—	40	6.5~7.0	—	106	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^[15]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷, 橙皮苷, 芦丁	50	5	—	—	76 ; 167 ; 24	0.57 ; 0.78 ; 1.06 ^c
<i>Lactobacillus plantarum</i> ^[16]	芦丁	0	4.5~8.0	—	—	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^[16]	柚皮苷	—	4.5~6.5	—	—	—	—
<i>Pediococcus acidilactici</i> ^[17]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷, 橙皮苷, 芦丁	60	5.5	—	74	243 ; 34 ; 1200	16.2 ; 7.0 ; 2.54
<i>Staphylococcus xylosus</i> ^[18-19]	柚皮苷	37	5.6	—	—	—	—

鼠李糖苷酶 A 对同一种底物作用结果; 鼠李糖苷酶 B 对同一种底物的作用结果; 鼠李糖苷酶对 *p*-NPR 的作用结果; 鼠李糖苷酶对 Hesperidin 的作用结果; 鼠李糖苷酶对 rutin 的作用结果。

表 2 真菌来源的柚苷酶及其相关性质

来源	作用基质	最适温度/ 度/	最适 pH 值	相对分子 质量/kDa	K_m /mmol·L ⁻¹	V_{max} /U·mg ⁻¹	备注
<i>Aspergillus nidulans</i> ^[21]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠 李糖苷	60	4.5 ~ 6	102	0.27	64.6	a : L-鼠李糖, Mg ²⁺ ; b : Ca ²⁺
<i>Aspergillus aculeatus</i> ^[22]	芸香糖甙	30	4.5 ~ 5	—	—	—	—
<i>Aspergillus niger</i> ^[23]	柚皮苷, 芦丁	50	4.0	168	1.9	21	a : Hg ²⁺ , SDS, 对氧汞苯甲酸, Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , 鼠李 糖; b : Mg ²⁺
<i>Aspergillus kawachii</i> ^[24]	柚皮苷, 橙皮苷	50	4.0	90	—	—	—
<i>Aspergillus niger</i> ^[25]	柚皮苷	60	4.0	—	—	—	—
<i>Aspergillus foetidus</i> ^[26]	橙子, 葡萄柚	35	5.4	—	—	—	—
<i>Aspergillus niger</i> ^[26]	橙子, 葡萄柚	35	5.4	—	—	—	—
<i>Aspergillus niger</i> HPD-2 ^[26]	橙子, 葡萄柚	40	5.4	—	—	—	—
<i>Aspergillus sojae</i> ^[27]	柚皮苷	37	5.5 ~ 8	70	1.79	—	—
<i>Aspergillus flavus</i> ^[28]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠 李糖苷, 柚皮苷	50	11.0	41	$K_{m1}=1.89$ $K_{m2}=1.6$	—	—
<i>Aspergillus niger</i> ^[29-31]	柚皮苷	50 ~ 60	4.5 ~ 5	87	0.27	9805.15	a : Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Al ³⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ²⁺ , SDS; b : K ⁺ , Ba ²⁺
<i>Penicillium decumbens</i> ^[32]	芦丁	65 ~ 75	7.0	56 460	—	—	—
<i>Penicillium ulaiense</i> ^[33]	鼠李糖	60	5.0	—	11±2	26±4	a : EDTA, Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , 二硫苏糖醇; b : Co ²⁺
<i>Penicillium citrinum</i> ^[34]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠 李糖苷	60	7.0	51	0.36	22.54	a : Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ ; b : Mn ²⁺ , Ca ²⁺

注：“ K_{m1} ”指对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷的米氏常数；“ K_{m2} ”指柚皮苷的米氏常数；备注中“a”指抑制作用，“b”指促进作用。

1.3 酵母产柚苷酶

Yanai 等^[35]从 *Pichia angusta* 中纯化获得胞内 α -L-鼠李糖苷酶，其对 α -L-吡喃鼠李糖苷具有较高的分解活性并可从柚皮苷、芦丁、橙皮苷和 3-槲皮苷的分解中获得鼠李糖；分离获得的 α -L-鼠李糖苷酶相对分子质量为 90 kDa 的一个单体的蛋白质，等电点 $pI=4.9$ ，最适温度和 pH 值分别为 40 和 6.0，受 Cu²⁺、Hg²⁺、对氯高汞苯甲酸的抑制，底物 L-鼠李糖的抑制系数 $K_i=25$ mmol/L。Ni 等^[36]分离获得新的产柚苷酶菌株 *Williopsis californica* Jmudeb007；李利君等^[6]报道了 *Cryptococcus* sp. Jmudeb007 具有产柚苷酶的能力，*Williopsis californica* 和 *Cryptococcus* sp. 两个菌株的产柚苷酶时均受葡萄糖分解代谢调节。酵母菌为柚苷酶的新型微生物资源，这些菌株具有较高的安全性，值得深入研究。

2 柚苷酶酶活测定方法

柚苷酶的来源很多，不同来源的柚苷酶所需要的反应条件是不同的，包括酸碱度、温度等。目前，柚苷酶酶活力的测定方法主要有两种，分别是分光光度计法和高效液相色谱法。

2.1 分光光度计法

分光光度计法的原理^[37]是柚皮苷可与 90% 一缩二乙二醇（二甘醇）在弱碱性的环境下发生颜色反应，生成黄色柚皮苷查尔酮。该查尔酮在波长 420 nm 处具有吸光度值。通过酶解反应后，测定柚皮苷的残余量，可知柚皮苷被消耗情况，计算出柚苷酶活力值，酶活定义为每分钟每毫升酶液消耗柚皮苷的微克数或者微摩尔数为一个酶活单位。

Bram 等^[38]使用 Davis 法^[39]研究几种因素对柚苷酶酶活力的影响；根据不同来源的柚苷酶，研究

表 3 柚苷酶的不同反应条件

文献	底物	缓冲体系	反应温 度/	反应时间 /min	测定波 长/nm	摩尔消光系数 /L·mmol ⁻¹ ·cm ⁻¹
[10]	对硝基苯酚	乙酸缓冲液 (50 mmol/L, pH4.0)	40	20	400	—
[13]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷	乙酸缓冲液 (50 mmol/L, pH6.0)	25	每隔 2 min 取样测定 OD 值	400	—
[19]	柚皮苷	乙酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH4.5)	50	60	420	—
[21]	柚皮苷	乙酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH4.0)	50	60	420	—
[23]	柚皮苷	乙酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH4.0)	40	60	420	—
[28]	柚皮苷	乙酸钠/乙酸缓冲液 (0.2 mol/L, pH4.5)	60	每隔 5 min 取样测定 OD 值	420	—
[33]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷	柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH5.0)	50	—	400	21.44
[34]	对硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷	磷酸钠缓冲液 (0.5 mol/L, pH7.2)	60	—	400	21.44

者对该方法进行修正。近年来该方法仍然适用于柚苷酶活性的测定。虽然使用的方法同为分光光度计法,但是酶解反应的条件或者颜色反应的条件却各不相同,缺乏可比性。表 3 为各种不同的酶反应条件。

此外由于柚皮苷分解的终产物含有葡萄糖, Ribeiro 等^[40]利用测定还原糖的 DNS 方法测定柚苷酶的酶活性。

分光光度计法测定的是总黄酮的含量,由对底物柚皮苷的含量测定,从而获得柚苷酶的酶活力大小,无法知道复合酶中其它酶的酶活力情况。除外,底物柚皮苷为黄色溶液,可能影响柚皮苷含量的测定。

2.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法可以同时测定柚皮苷和柚皮素。其测定柚苷酶的酶活原理为经过高效液相色谱法分析获得柚皮苷的消耗量和柚皮素的生成量来确定柚苷酶的酶活性。液相色谱分析的波长均为 280 nm。酶活定义有两种:一种是每分钟每毫升酶液消耗柚皮苷的微摩尔数为鼠李糖苷酶的一个酶活单位;另一种是每分钟每毫升酶液生成的柚皮素的微摩尔数为柚苷酶的一个酶活单位。

Ribeiro 等^[41]用高效液相色谱法检测葡萄柚汁被柚苷酶作用后,反应液所含柚皮苷和柚皮素含量,获得柚苷酶活力值。Ni 等^[31]也运用了高效液相色谱法检测酶解作用后,酶解液中柚皮苷含量和柚皮素含量,从而分别获得鼠李糖苷酶和柚苷酶的酶活力值。但对于不同的柚苷酶,高效液相色谱法检测分析的条件是不同的。表 4 是几种高效液相色谱法分析的条件。高效液相色谱法测定柚皮苷含量的优点是直接反映酶解作用的各种产物含量,可获得复合酶所包含的各种酶的酶活力大小。

3 柚苷酶的编码基因及结构

3.1 柚苷酶的编码基因

目前为止,编码柚苷酶活性的基因较少。*C.stercorarium* 菌株编码柚苷酶基因命名为 *ramA*, 包含有 874 个密码子,酶相对分子质量为 100 kDa,光谱测定含有 27%的 α -螺旋和 50%的 β -折叠^[42]。*Sphingomonas paucimobilis* 编码 α -L-鼠李糖苷酶基因命名为 *rham*,含 3354 个核苷酸、1117 个氨基酸^[8]。*Pediococcus acidilactici* 编码柚苷酶基因命名为 *ram* 和 *ram2*,分别由 653 个和 525 个氨基酸构成^[17]。

3.2 柚苷酶的结构

Cui 等^[43]报道了来源于 *Bacillus* sp.GL1 的 α -L-鼠李糖苷酶的晶体结构 (PDB 号为 2OKX)。该酶为一个二聚体,含 1908 个氨基酸、43 个甘油分子、4 个 Ca^{2+} 、1755 个水分子。

整个结构包含 5 个区域,其中 4 个区域为 β -折叠结构,分别是 N 域、D1、D2 和 C 域;A 域为一个 (α/α) 的 6 个管状结构 (图 2)。N 域 (第 3~141 和 157~192 位氨基酸残基) 由 13 个 β 折叠组成。D1 域 (第 219~403 位氨基酸残基) 由 6 个 α -螺旋和 15 个 β -折叠组成。D2 域 (第 406~528、153~155 和 201~215 位氨基酸残基) 为一个 β -三明治夹心结构由 13 个 β -折叠和 2 个短的 α -螺旋组成。域 A (第 543~875 位氨基酸残基) 有一个 (α/α)₆-桶装结构和 4 个 β -折叠组成,域 A 是 5 个结构域中最大的,超过 90%的 α -螺旋在此区域,该桶装结构含有 15 个 α -螺旋。C 域含有 7 个 β -折叠在 C 末端,同时这 7 个 β -折叠在到达 (α/α)₆-桶装结构之前与 1 个 β -折叠相连接。

Asp567、Glu572、Asp579 和 Glu841 等带阴离子的氨基酸残基可与鼠李糖相互作用 (图 3),当

表 4 高效液相色谱法测定柚苷酶活力的条件

文献	缓冲体系	反应温度/ /min	反应时间 /min	流动相比例	流速 /mL·min ⁻¹	液相分析时间 /min
[41]	乙酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH4.0)	4	30	乙腈 水=25 75	1	22
[31]	柠檬酸缓冲液 (10 mmol/L, pH5.0)	40	15	甲醇 乙腈 水=11.4 26.6 62	0.4	28

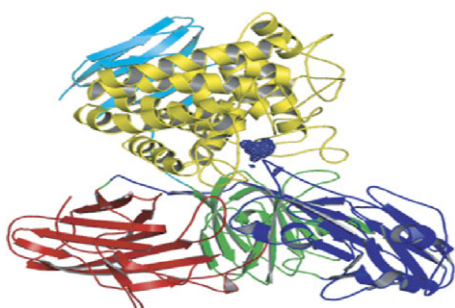


图 2 柚苷酶的三级结构图 (PDB 号 2OKX, 图中红色为 N 端域, 蓝色为 D1 域, 绿色为 D2 域, 黄色为 A 域, 浅蓝色为 C 端域)^[43]

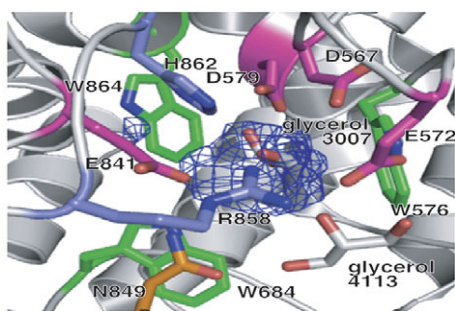


图 3 A 域的氨基酸残基对鼠李糖分子的包裹作用^[43]

这些残基发生突变时, 酶活力会明显地降低, 说明这些氨基酸残基是酶催化的活性位点。此外, 位于 D2 域的 Val423 和 C 端域的 Lys953 附近各有一个钙离子活性位点。

4 柚苷酶及其相关产物的应用

4.1 脱苦的作用

柚皮苷是柚子汁中最主要的苦味物质, 柚苷酶可以水解柚皮苷, 达到脱苦效果。Lei 等^[44]通过固定化柚苷酶于多孔介质, 用于白葡萄柚汁的脱苦, 柚皮苷的降解率达 95%, 具有很好的效果。黄高凌等^[45]以琯溪蜜柚果汁为对象, 研究在不同条件下柚苷酶对蜜柚果汁的脱苦效果, 在酶解温度 60、酶活 7.4 U/mL 柚汁、酶解时间 100 min、pH 值为 3.6 的条件下, 琯溪蜜柚果汁的柚皮苷脱除率达 97% 以上。曾霖霖等^[46]以柚苷酶对金桔汁的脱苦率为指

标, 在酶活性为 414 U/g、酶用量 1.4 g/L、酶解温度 41、酶解时间 101 min、金桔原汁 pH 值条件下, 脱苦率达 48.23%。

4.2 改善酒的风味和香味

研究表明, 单萜类对酒的风味的提升具有明显的作用^[47]。此外 α -鼠李糖苷酶与 β -葡萄糖苷酶和阿拉伯糖苷酶相互作用有利于酒中含有的挥发性的单萜类物质的含量增加, 有助于提高酒的香味。另外由于酒中含有一些非挥发性化合物, 这些化合物聚集一起可降低葡萄糖苷酶活性, 导致酒的风味较差。Manzanares 等^[48]利用 *Aspergillus aculeatus* 编码的鼠李糖苷酶基因 *rhaA* 于酒酵母中克隆表达, 与其它菌株表达的 β -葡萄糖苷酶相互作用, 使得酒中的芳香化合物香叶醇、芳樟醇和 α -松油醇含量明显增加, 达到提高风味的效果。

4.3 番茄浆消解 (tomato pulp digestion)

Beekwilder 等^[16]报道 *Lactobacillus plantarum* 产的鼠李糖苷酶可将云香苷中的鼠李糖除去。pH 值为 6.0 时芦丁可几乎完全转化成易于人体吸收的糖苷类物质。同时为了提高番茄制品制备过程中黄酮的生物转化率, 对番茄浆进行发酵研究, 研究结果表明可将番茄浆中的鼠李糖移除, 提高了黄酮类的生物转化作用, 达到番茄浆的消解效果, 暗示该乳酸菌在体内可以促进人体消化系统对黄酮类的转化率。

4.4 去糖基化作用

Michlmayr 等^[17]报道 *Pediococcus acidilactici* 产鼠李糖苷酶和葡萄糖苷酶共同作用于芳香化合物, 可释放出芳樟醇和顺式氧化芳樟醇, 可发挥去 N-端糖基化作用; Koseki 等^[24]从 *Aspergillus kawachii* 纯化出的 α -L-鼠李糖苷酶具有对 N-糖基化的去除作用。

4.5 具有抗菌作用

依赖于鼠李糖启动子是细菌的主要基因和操纵子完整表达的起始位点, 有助于识别新的抗菌药物。Gardona 等^[9]利用监测鼠李糖诱导启动子监测 *Burkholderia cenocepacia* 中主要的基因和操纵子, 证实了不同水平的基因表达通过不同的感染位点是可以获得的, 并最终达到抗菌的作用。

4.6 获得普鲁宁

Roitner 等^[49]在碱性条件下,固定化柚苷酶可获得较高得率的普鲁宁,所获得的普鲁宁具有对 RNA/DNA 病毒的抗病毒活性,同时具有抗炎活性,可作为病人的代甜食;普鲁宁还可治疗胃溃疡并对胃黏膜有防护作用。对致病性病毒菌具有抗病毒活性。Yadav 等^[28]报道 pH 值为 11.0 时, α -L-鼠李糖苷酶可以将柚皮苷水解为普鲁宁,又因柚苷酶中含有的 β -D-葡萄糖苷酶在此 pH 值条件下活性较低,防止普鲁宁的降解。Vila-Real 等^[50]构建一种方法可使 β -葡萄糖苷酶失活,可使普鲁宁的生产得率达到 92%。

4.7 抗炎作用

柚皮苷显示出多种生物学活性和药理作用。苏玲等^[51]报道柚皮苷可通过抑制体内参与胆固醇合成酶的活性,减少胆固醇在体内的合成,促进胆固醇的分解。覃青云等^[52]将柚皮苷添加到牙膏中,可发现含有柚皮苷的牙膏有较好的消炎和止血作用。

此外,柚皮苷水解的产物柚苷配基-7-O-葡萄糖苷、柚皮素、鼠李糖、葡萄糖等重要的医药化工中间体,以上这些物质是医药界公认的抗氧化剂、抗炎药物、防止溃烂以及降低胆固醇含量的作用,其中柚皮素还具有抗诱变和保护神经的作用^[53]。

5 展 望

柚苷酶能将柚类果汁的苦味物质分解为无苦味物质,具有非常重要的经济价值。同时柚皮苷及其分解产物作为重要医药化工的中间体,具有抗炎、抗癌、抗菌等功能,在医药领域具有潜在价值。然而作为一种具有重要应用价值的酶,有以下问题有待于解决。

(1) 现有的柚苷酶产生菌的产酶水平较低,生产成本过高,今后应从柚苷酶高产菌株的选育、产酶基因工程菌株的构建以及发酵工艺的优化方面展开研究,其中方法有包含等离子体诱变菌株、代谢进化研究、基因工程改造等方式提高产酶水平。

(2) 目前对柚苷酶的结构、功能和分子生物学方面的研究较少,对于影响柚苷酶性质的关键区域及其反应机制仍需进一步探索。可通过分子改造技术改善其催化特性,如提高热稳定性、探索其最适温度、底物特异性等。

(3) 结合微胶囊颗粒、磁性纳米粒子、类弹性蛋白等固定化材料,进行酶的固定化研究,使酶得到重复利用,降低其工业应用成本。

参 考 文 献

- [1] 雷生姣,潘思轶. 柚(皮)苷酶的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 314-318.
- [2] 漳州政府网. 投洽会平和现场签约两项目,总投资超过 1 亿美元[J/OL].[2012-09-11].http://www.zhangzhou.gov.cn/cms/html/zszsf/2012-09-11/507201197.html.
- [3] Puri M, Kaur A. Molecular identification of *Staphylococcus xylosus* MAK2, a new α -L-rhamnosidase producer[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26: 963-968.
- [4] Hall D. A new enzyme of the glycosidase type[J]. *Chem. Ind.*, 1938, 57: 473.
- [5] Puri M, Kaur A. Molecular identification of *Staphylococcus xylosus* MAK2, a new α -L-rhamnosidase producer[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26: 963-968.
- [6] 李利君,倪辉,肖安风,等. 一株产柚苷酶的罗伦隐球酵母的鉴定及柚苷酶表达[J]. 微生物学报, 2010, 50: 1202-1207.
- [7] Puri M. Updates on Naringinase: Structural and biotechnological aspects[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93: 49-60.
- [8] Miyata T, Kashige N, Sato T, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding *Sphingomonas paucimobilis* FP2001 α -L-rhamnosidases[J]. *Current Microbiology*, 2005, 51: 105-109.
- [9] Cardona S T, Mueller C L, Valvano M A. Identification of essential operons with a rhamnose-inducible promoter in *Burkholderia cenocepacia*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2547-2555.
- [10] Cardona S T, Valvano M A. An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*[J]. *Plasmid*, 2005, 54: 219-228.
- [11] Birgisson H, Hreggvidsson G O, Fridjonsson O H, et al. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34: 561-571.
- [12] Birgisson H, Wheat J O, Hreggvidsson G O, et al. Immobilization of a recombinant *Escherichia coli* producing a thermostable α -L-rhamnosidase: Creation of a bioreactor for hydrolyses of naringin[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1182-1187.
- [13] Hashimoto W, Miyake O, Nankai H, et al. Molecular identification of an α -L-rhamnosidases from *Bacillus* sp. Strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 415: 235-244.
- [14] Mazzaferro L S, Orrillo G A, et al. Dose-dependent signification of monosaccharides on intercellular α -L-Rhamnosidases activity from *Pseudoalteromonas* sp.[J]. *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30: 2147-2150.
- [15] Avila M, Jaquet M, Moine D, et al. Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245[J]. *Microbiology*, 2009, 155: 2739-2749.
- [16] Beekwilder J, Marcozzi D, Vecchi S, et al. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3447-3454.
- [17] Michlmayr H, Brandes W, Eder R, et al. Characterization of two distinct glycosyl hydrolase family 78 α -L-Rhamnosidases from *Pediococcus acidilactici*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6524-6530.
- [18] Puri M, Kaur A, Singh R S, et al. Response surface optimization of

- medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, 162: 181-191.
- [19] Puri M, Kaur A, Barrow C J, et al. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 89: 715-722.
- [20] Tselenis-Kotsowilis A D, Koliomichalis M P, Papavassiliou J T. Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 16 (3): 593-594.
- [21] Manzanares P, Orejas M, Ibanez E, et al. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31: 198-202.
- [22] Gonzalez-Barrio R, Trindade L M, Manzanares P, et al. Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 6163-6142.
- [23] Puri M, Kalra S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21: 753-758.
- [24] Koseki T, Mese Y, Nishibori N, et al. Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 80: 1007-1013.
- [25] Thammawat K, Pongtanya P, Juntharasri V, et al. Isolation, preliminary enzyme characterization and optimization of culture parameters for production of naringinase isolated from *Aspergillus niger* BCC 25166[J]. *Nat. Sci.*, 2008, 42: 61-72.
- [26] Mendoza-Cal A, Cuevas-Glory L, et al. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(19):1964-1969.
- [27] Chang H Y, Lee Y B, Bae H A, et al. Purification and characterization of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of pruning exhibiting markedly enhanced solubility with *in vitro* inhibition of HMG-CoA reductase[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 234-241.
- [28] Yadav V, Yadav S, Yadava S, et al. α -L-rhamnosidase from *Aspergillus flavus* MTCC-9606 isolated from lemon fruit peel[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, 46: 350-357.
- [29] Ni H, Xiao A F, Cai H N, et al. Purification and characterization of *Aspergillus niger* α -L-rhamnosidase for the biotransformation of naringin to pruning[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (24): 5276-5284.
- [30] Ni H, Chen F, Cai H N, et al. Characterization and preparation of *Aspergillus niger* Naringinase for debittering citrus juice[J]. *Journal of Food Science*. 2011, 71 (1): C1-C7.
- [31] Ni H, Cai H N, Xiao A F, et al. Improved purification of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* Naringinase[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 27: 2539-2544.
- [32] Mamma D, G. Hatzinikolaou D, Christakopoulos P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 27: 183-190.
- [33] Rajal VB, Cid AG, Ellenrieder G, et al. Production, partial purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Penicillium ulaiense*[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25: 1025-1033.
- [34] Yadav Sa, Yadav V, Yadav Su, et al. Purification, characterization and application of α -L-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC-8897[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2012, 47: 290-298.
- [35] Yanai T, Sato M. Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, 64 (10): 2179-2185.
- [36] Ni H, Li L J, Xiao A F, et al. Identification and characterization of a new naringinase-producing strain *Williopsis californica* Jmudeb007[J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 27: 2857-2862.
- [37] 元晓梅, 刘贵贤, 胡正芝. 比色法测定饮料及橘皮中总黄酮含量[J]. *食品与发酵工业*, 1996 (3): 13-21.
- [38] Bram B, Solomons G L. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*[J]. *Applied Microbiology*, 1965, 13(6):842-845.
- [39] Davis W B. Determination of flavanones in citrus fruits[J]. *Anal. Chem.*, 1947, 19: 476-478.
- [40] Ribeiro M H L, Afonso C, Vial-Real H J, et al. Contribution of response surface methodology to the modeling of naringin hydrolysis by Naringinase Ca-alginate beads under high pressure[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43: 482-487.
- [41] Ribeiro I A, Ribeiro M H L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method[J]. *Food Control*, 2008, 19: 432-438.
- [42] Zverlov V V, Hertel C, Bronnermeier K, et al. The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoarum*: Biochemical characterization and primary structure of bacterial α -L-rhamnose hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase[J]. *Mol. Microbiol.*, 2000, 35: 173-179.
- [43] Cui Z L, Maruyama Y, Mikami B, et al. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78 α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL[J]. *J. Mol. Biol.*, 2007, 374: 284-398.
- [44] Lei S J, Xu Y X, Fan G, et al. Immobilization of Naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit[J]. *Applied Surface Science*, 2011, 257: 4096-4099.
- [45] 黄高凌, 倪辉, 胡阳, 等. 柚皮苷酶对瑯溪蜜柚果汁脱苦效果工艺优化[J]. *食品科学*, 2010, 31 (8): 70-73
- [46] 曾霖霖, 黄惠华. 响应面法优化柚皮苷酶对金桔汁的脱苦工艺[J]. *食品工业科技*, 2011, 32 (5): 315-318.
- [47] Gunata Y Z, Bayonove C L, Baumes R L, et al. Stability of free and bound fractions on some aroma components of grape *c.v.* Muscat during the wine processing: Preliminary results[J]. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1986, 37: 112-114.
- [48] Manzanares P, Orejas M, Gil J V, et al. Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an α -L-Rhamnosidase of enological interest[J]. *Applied and Environmental microbiology*, 2003, 69(12):7558-7562.
- [49] Roitner M, Schalkhammer T H, Pittner F. Preparation of prunin with the help of immobilized Naringinase pretreated with alkaline buffer[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1984, 9: 483-488.
- [50] Vila-Real H, Alfaia A J, Rosa M E, et al. An innovative sol-gel naringinase bioencapsulation process for glycosides hydrolysis[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45: 841-850.
- [51] 苏玲, 刘启德. 柚皮苷生物活性和药代动力学研究新进展[J]. *中国医药技术经济与管理*, 2008, 2 (10): 74-80.
- [52] 覃青云, 卢凯玲, 许静, 等. 柚皮苷在口腔护理用品中的应用研究[J]. *牙膏工业*, 2009, 19 (2): 25-29.
- [53] Ribeiro M H. Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90: 1883-1895.