



曲霉属 α -L-鼠李糖苷酶的挖掘、酶学性质表征与应用

夏婷, 舒涛, 王兰英, 陈林浩, 班雅丽, 吕波*

北京理工大学 化学与化工学院, 生物化工研究所, 北京 102488

夏婷, 舒涛, 王兰英, 陈林浩, 班雅丽, 吕波. 曲霉属 α -L-鼠李糖苷酶的挖掘、酶学性质表征与应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3474-3488.

XIA Ting, SHU Tao, WANG Lanying, CHEN Linhao, BAN Yali, LÜ Bo. Mining, enzymatic characterization, and application of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus* sp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3474-3488.

摘要: 异槲皮素是一种黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎和免疫调节等多种生理活性。然而, 由于其含量很低, 传统的提取方法难以大规模制备。【目的】 α -L-鼠李糖苷酶可特异性水解天然糖苷的末端 L-鼠李糖残基。本研究筛选可高效且特异性转化芦丁生产异槲皮素的菌株, 并从中挖掘新型 α -L-鼠李糖苷酶且应用于异槲皮素的生产, 为后续规模化生产异槲皮素提供新元件。【方法】通过芦丁唯一碳源的选择培养法筛选和鉴定可特异性水解芦丁为异槲皮素的菌株; 利用转录组分析, 获得高效且特异性强的 α -L-鼠李糖苷酶, 通过结构模拟确定其结构域组成, 并对其酶学性质和底物特异性进行研究; 通过毕赤酵母异源表达, 在 5 L 发酵罐中对其水解效果进行验证。【结果】通过结构模拟确定 AfRhase 具有 5 个结构域, 包括 1 个 α -结构域(结构域 A)和 4 个 β -结构域(结构域 N、结构域 E、结构域 F 和结构域 C)。以芦丁为底物, 重组酶 AfRhase 的最适温度和最适 pH 分别为 55 °C 和 4.5。重组酶 AfRhase 底物特异性研究表明, 其具有广泛的底物特异性, 可以水解芦丁、橙皮苷、柚皮苷和朝藿定 C 的鼠李糖基。通过 5 L 发酵罐体系的水解芦丁生产异槲皮素的放大验证, 其可将 120 g 芦丁粗品(纯度 70%)水解生成 61 g 异槲皮素, 摩尔转化率为 95.4%, 生产效率为 2.0 mmol/(L·h)。【结论】本研究成功从曲霉(*Aspergillus* sp.) XT-1 中挖掘到一种能够高效且特异性水解芦丁生成异槲皮素的 α -L-鼠李糖苷酶, 在毕赤酵母中异源表达, 对该酶进行结构域分析和酶学性质研究, 测试底物特异性, 并进行 5 L 发酵罐的水解效果验证。综上所述, 本研究拓宽了真菌来源的 α -L-鼠李糖苷酶用于黄酮类化合物芦丁生物转化法的功能研究, 也为异槲皮素的工业化生产奠定了基础。

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2102800)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2102800).

*Corresponding author. E-mail: lv-b@bit.edu.cn

Received: 2024-03-11; Accepted: 2024-04-26; Published online: 2024-04-30

关键词: α -L-鼠李糖苷酶; 异槲皮素; 转录组分析; 新酶挖掘; 曲霉属

Mining, enzymatic characterization, and application of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus* sp.

XIA Ting, SHU Tao, WANG Lanying, CHEN Linhao, BAN Yali, LÜ Bo*

Institute of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 102488, China

Abstract: Isoquercetin is a flavonoid with antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities. However, the low content in plants poses a challenge to the large-scale production of isoquercetin by the extraction method. **[Objective]** α -L-rhamnosidase can specifically hydrolyze the terminal L-rhamnose residues of natural glycosides. In this study, we screened the strains capable of efficiently and specifically transforming rutin to produce isoquercetin with rutin as the sole carbon source and applied the α -L-rhamnosidase to the production of isoquercetin, aiming to provide new elements for the large-scale production of isoquercetin. **[Methods]** The selective culture medium with rutin as the sole carbon source was used to screen and identify the strains that can specifically hydrolyze rutin into isoquercetin. The transcriptome analysis was carried out to obtain highly efficient and specific α -L-rhamnosidase, the domain composition of which was determined by structural simulation. The enzymatic properties and substrate specificity of the α -L-rhamnosidase were studied. Furthermore, the hydrolysis effect of the enzyme heterologously expressed in *Pichia pastoris* in a 5 L fermenter was determined. **[Results]** AfRhase had five domains, including one α -domain (domain A) and four β -domains (domains N, E, F, and C). With rutin as the substrate, the recombinant enzyme AfRhase showcased the best performance at 55 °C and pH 4.5. AfRhase had a wide range of substrates including rutin, hesperidin, naringin, and epimedin C. In a 5 L fermenter for scaled-up production of isoquercetin, *P. pastoris* expressing AfRhase generated 61 g isoquercetin by hydrolyzing 120 g crude rutin (purity of 70%), with the molar conversion rate of 95.4% and production efficiency of 2.0 mmol/(L·h). **[Conclusion]** This study for the first time discovered a highly efficient and specific α -L-rhamnosidase from *Aspergillus* sp. XT-1 for the production of isoquercetin from rutin and heterologously expressed this enzyme in *P. pastoris*. The domain composition, enzymatic properties, substrate specificity, and hydrolysis efficiency in a 5 L fermenter of this enzyme were determined. In conclusion, this study broadened the function of a fungus-derived α -L-rhamnosidase for the transformation of rutin and laid a foundation for the industrial production of isoquercetin.

Keywords: α -L-rhamnosidase; isoquercetin; transcriptome analysis; enzyme discovery; *Aspergillus* sp.

芦丁又称芸香苷,是一种常见的黄酮类化合物,广泛存在于槐米、芸香、沙棘、银杏、枸杞等植物中,具有抗氧化和抗炎等多种生物活性,是我国中药的重要原料之一。然而,由于芦丁水溶性低、稳定性差,导致芦丁的生物利用度降低。异槲皮素也称作异槲皮苷,由芦丁脱去一分子鼠李糖形成,具有抗氧化^[1]、抗肿瘤^[2]、免疫调节^[3]、降血糖血脂^[4]等药理作用,与芦丁相比具有更高的药理活性和生物利用度,也是目前药学界的热点新药化合物。相关药理实验结果表明,异槲皮苷具有清热解暑、降压强心的作用,还可有效地用于防治糖尿病^[5-6]、卒中^[7]、脑损伤^[8]及严重急性呼吸综合征^[9]等疾病。目前,异槲皮素在自然界中的含量低,传统的提取方法难以实现大规模生产^[10]。传统化学法水解芦丁生产异槲皮素存在选择性差、无法控制糖苷键断裂的位置等缺点,水解得到的异槲皮素会进一步被水解生成槲皮素,从而降低异槲皮素产率和质量^[11]。

生物酶法水解具有副产物少、选择性强、转化率高及环境污染小等优点,是极具潜力的天然产物改性增效的生产方法^[12]。 α -L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)是一类能从各种天然糖苷化合物中释放末端 α -L-鼠李糖苷的糖苷水解酶,可特异性水解芦丁为异槲皮素。卢珊等^[13]对嗜热菌冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)中筛选得到的 α -L-鼠李糖苷酶 SisRha 进行大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达,以芦丁作为底物用于生产异槲皮素,重组酶 SisRha 的芦丁转化率为 1.2 mmol/(L·h); Beekwilder 等^[14]从嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)中挖掘得到 α -L-鼠李糖苷酶 RamA (La)并在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达,通过底物特异性测试显示重组酶 RamA (La)可以将芦丁特异性水解为异槲皮素,该酶对芦丁的转化率为 1 mmol/(L·h); Li 等^[15]基于高通量测序技术从新型细菌 Rha78s 中筛选得到 GH78 家族 α -L-鼠

李糖苷酶 HFM-RhaA 并用于水解芦丁生产异槲皮素,在最适 pH 6.0、温度为 40 °C 下,该酶水解芦丁生产异槲皮素的转化率为 1.8 mmol/(L·h)。 α -L-鼠李糖苷酶广泛分布于自然界,在细菌、真菌、植物和动物中均有发现,其中动物和植物源的 α -L-鼠李糖苷酶报道较少,微生物源的 α -L-鼠李糖苷酶是主要来源^[16-17]。传统的 α -L-鼠李糖苷酶表征策略中蛋白纯化鉴定存在成本较高、酶容易变性失活、周期长和步骤繁杂等缺点。利用 DNA、RNA 和蛋白质序列的数据驱动技术可以快速、准确地分析大量数据,以高通量方式提高目标基因筛选的准确度与效率^[18]。本研究期望通过以芦丁为唯一碳源,筛选可特异性水解芦丁生成异槲皮素的菌株,进而利用组学数据驱动挖掘并表征新型的鼠李糖苷酶,通过异源表达、结构分析和放大验证等策略,提供了一种切实可行的生物法转化芦丁高效制备异槲皮素的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Aspergillus sp. XT-1 等 22 株菌株由本实验室分离保存。克隆宿主大肠杆菌 Top10 购自北京博迈德基因技术有限公司,毕赤酵母 GS115 为本实验室保存。大肠杆菌重组质粒 Top10/pGAPZ α A-DN6144、Top10/pGAPZ α A-DN8610、Top10/pGAPZ α A-DN7311、Top10/pGAPZ α A-DN3993、Top10/pGAPZ α A-DN10886 均为本研究构建保存。

酵母提取物、胰蛋白胨及抗生素 Zeocin 均购自北京索莱宝科技有限公司,Phanta[®] Max DNA 聚合酶和 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,质粒小提试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,芦丁、异槲皮素、槲皮素、橙皮苷、柚

皮苷、朝霍定 C、淫羊藿苷和杨梅苷等 HPLC 级标准品均购自成都埃法生物科技有限公司,其他相关试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株挖掘及鉴定

在以芦丁为唯一碳源的产酶基础培养基中观察 22 株菌株的生长与水解情况,在菌体培养每隔 24 h 取样进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测,筛选得到可以水解芦丁生成异槲皮素的菌株 XT-1,基于 HPLC 检测结果确定菌株的水解模式。将菌株 XT-1 接种到产酶基础固体培养基上,通过表观形态初步判定种属信息。对菌株进行真菌 ITS 和 18S rRNA 基因保守序列的扩增和测序,PCR 引物为 ITS 基因通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),以及真菌 18S rRNA 基因通用引物 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTCCACTACGGA-3')。PCR 反应体系(15 μ L):2 \times TaqMix 6.5 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 6.5 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,31 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。在 NCBI 中比对测序结果,根据比对结果构建菌株分子进化树,分析进化分支情况与菌株的种属信息。

1.3 转录组样品分析

在以芦丁为唯一碳源的培养基中对芦丁水解菌株 *Aspergillus* sp. XT-1 进行培养,设置对照组。每间隔 12 h 取样检测,根据 HPLC 检测菌株中关键水解基因的表达水平变化。分别将水解率为 10%和 60%的样品设置为对照组和实验组,收集培养对应时间后的菌体,送至北京博云华康基因科技有限公司进行转录组测序分析。基于 *Aspergillus* sp. XT-1 菌株转录组分析中水解前后

水解酶基因表达水平的差异,对潜在的 α -L-鼠李糖苷酶基因进行高效筛选。

1.4 基因克隆、载体构建与毕赤酵母的异源表达

采用 OMEGA 公司的真菌 RNA 提取试剂盒对菌株 *Aspergillus* sp. XT-1 进行 RNA 提取,采用 PrimeScript^{RT} Master Mix 进行反转录 cDNA,反转录体系(10 μ L): Total RNA (5 μ mol/L) 2 μ L, 5 \times PrimeScript^{RT} Master Mix 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 下反应 15 min、85 $^{\circ}$ C 下反应 5 s,让反转录酶失活结束反应从而得到菌株 *Aspergillus* sp. XT-1 的 cDNA。基于转录组分析数据库中核苷酸序列,以 *Aspergillus* sp. XT-1 菌的 cDNA 为模板,使用 Phanta[®] Max DNA 聚合酶扩增得到目的条带,纯化回收基因片段,扩增所需 PCR 引物如表 1 所示。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Phanta Buffer 25 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, Phanta[®] Max DNA 聚合酶 1 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,31 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 将纯化后的基因片段 DN6144、DN8610、DN7311、DN3993 和 DN10886 连入 pGAPZ α A 载体中,将连接后的重组质粒转化进大肠杆菌 Top10 中。挑选大肠杆菌 pGAPZ α A 载体的阳性克隆培养后进行菌液 PCR 鉴定,选取鉴定正确的阳性单克隆送至安升达(天津)生物科技有限公司测序。

测序正确的大肠杆菌质粒使用 *Bln* I (*Avr* II)酶进行线性化,参照毕赤酵母表达操作手册转化,成功的毕赤酵母重组菌分别命名为 GS115/pGAPZ α A-DN6144、GS115/pGAPZ α A-DN8610、GS115/pGAPZ α A-DN7311、GS115/pGAPZ α A-DN3993 和 GS115/pGAPZ α A-DN10886。

表 1 构建载体的 PCR 引物

Table 1 Constructing PCR primers for vector construction

Primers name	Primer sequences (5'→3')
PGAP-6144-F	GAGGCTGAAGCTGAATTCACGTGACTTTGCTGGCAATGGCTTCACAGGCCACT
PGAP-6144-R	TTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCGTCGGGTCTGATAGCTCATGGGAAGTCACACAGG
PGAP-8610-F	GAGGCTGAAGCTGAATTCACGATGGAGGTTATACGCACTGGTATTACGGCATTGATG
PGAP-8610-R	TTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCGAGGAAACATACAGCGCATCCCCAGGTGATG
PGAP-10886-F	GAGGCTGAAGCTGAATTCACGATTTTGTAGTGCCCTGGCCTGTGTGACTACCG
PGAP-10886-R	TTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCACACTCTCCTGTAGAACTTCCCCAACACACGGAG
PGAP-7311-F	GAGGCTGAAGCTGAATTCACGTGCAATTTGTTTCAGGCTCCGGCTTCCGCATG
PGAP-7311-R	TTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCCTTGCCTAGCGAGATTTACGACGGCGAAATCTAC
PGAP-3993-F	GAGGCTGAAGCTGAATTCACGATGGCTCTCTCCATCTCCCAGGTGTCTTTC
PGAP-3993-R	TTTTGTTCTAGAAAAGCTGGCTCAGTCCACCTGCAAACACTCGACATGGTAC

将毕赤酵母阳性克隆子接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 活化培养 24 h, 按照体积分数为 1% 的接种量转接至 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 16–18 h, 得到粗酶液。每 1 mL 粗酶液中加入终浓度为 2 g/L 的芦丁, 在恒温振荡培养器中 30 °C 反应 10 min, 用等比例甲醇终止反应, 使用 HPLC 检测底物消耗和产物生成量。

1.5 酶学性质表征

每 1 mL 粗酶液中加入终浓度为 2 g/L 的芦丁, 在不同温度和 pH 下反应 10 min, 用等比例甲醇终止反应, 分别测定重组酶 AfRhase 在不同温度和 pH 下的活性。

1.5.1 最适温度和温度热稳定性的测定

在相同 pH 条件下, 分别于 40–65 °C 测定重组酶 AfRhase 的酶活, 计算不同温度下重组酶 AfRhase 的相对酶活力。将测得的最高酶活定义为 100%。将重组酶 AfRhase 在一系列不同温度 (45–65 °C) 下保存 1 h, 计算不同温度下重组酶 AfRhase 的相对酶活力。

1.5.2 最适 pH 的测定

在最适温度条件下, 分别于 pH 值 3.5–8.0 (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液) 测定重组酶 AfRhase 的酶活, 计算不同 pH 下重组酶 AfRhase

的相对酶活力。

1.6 底物特异性测试

不同的 α -L-鼠李糖苷酶底物特异性有很大差异, 不同的糖苷键类型以及与母核连接位置均会对酶的催化活性产生影响^[19]。探究重组酶 AfRhase 的最适催化底物, 在最适条件下, 将 AfRhase 分别与芦丁、橙皮苷、柚皮苷、朝藿定 C、淫羊藿苷和杨梅苷反应 10 min 后加入等体积的甲醇终止反应, 12 000 r/min 离心 10 min 后使用 HPLC 进行分析。

芦丁、异槲皮素和杨梅苷的 HPLC 检测条件: Kromasil EternityXT-5-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 进样量: 5 μ L; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 260 nm; 柱箱温度: 40 °C; 乙腈(A):0.4% 乙酸(B)为流动相, 梯度洗脱: 0–7 min, 20% A; 7–9 min, 20%–36% A; 9–11 min, 36%–90% A; 11–12 min, 90%–20% A; 12–17 min, 20% A。

橙皮苷和柚皮苷的 HPLC 检测条件相同, 进样量: 10 μ L; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C; 乙腈(A):0.1% 磷酸水溶液 (B)为流动相, 梯度洗脱: 0–28 min, 5%–26% A; 28–36 min, 26% A; 36–48 min, 26%–40% A; 48–57 min, 40%–5% A。

朝藿定 C 和淫羊藿苷的 HPLC 检测条件相

同, 进样量: 10 μ L; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 乙腈(A):磷酸(B)为流动相, 梯度洗脱: 0–14 min, 18% A; 14–20 min, 18%–26% A; 20–48 min, 26%–52% A; 48–64 min, 52%–77% A; 64–75 min, 77%–18% A。

1.7 AfRhase 的序列分析、同源建模及分子对接

使用 NCBI 对 AfRhase 的核酸序列和氨基酸序列进行比对, 基于氨基酸序列比对结果使用 MEGA 11 软件制作分子进化树。利用 AlphaFold 对 α -L-鼠李糖酶 AfRhase 进行蛋白结构模拟, 分析结构域组织分布, 并基于 CAZy 数据库中已报道晶体结构的 GH78 家族 α -L-鼠李糖酶 6GSZ 进行结构域组织差异比对。

在 NCBI 的 PubChem 中搜索底物芦丁的 3D 结构, 使用 AutoDock Vina 分子对接软件进行芦丁与 AfRhase 蛋白的分子对接, 选择能量最低的模型, 确定 AfRhase 与芦丁结合口袋位置以及底物分子 4 \AA 范围内的关键氨基酸, 并与 α -L-鼠李糖酶 6GSZ 进行结合口袋位置以及关键氨基酸的比对, 分析催化关键氨基酸。

1.8 5 L 发酵罐放大

对重组菌 GS115-AfRhase 进行 5 L 发酵罐培养。发酵罐培养使用补料分批发酵方式, 菌体生长过程中补加 2 次葡萄糖, 待菌体生长稳定后, 投入芦丁进行生物催化反应。每小时取样对发酵罐内芦丁的消耗进行检测, 当罐内芦丁消耗率达到投料量的 90% 时, 进行下一次投料。

2 结果与分析

2.1 芦丁水解菌的挖掘和鉴定

以课题组保藏的 22 株真菌为研究对象, 通过对菌体培养 0、24、48 h 的 HPLC 检测结果进行分析, 发现大部分菌株无法实现利用芦丁生成异槲皮素, 而菌株 XT-1 可以水解芦丁生成异槲

皮素。将菌株 XT-1 接种到以芦丁为唯一碳源的产酶基础固体培养基上进行验证, 菌落围绕中心接种点呈圆形向培养基四周规律性生长, 生长过程中产生黄色粉末状孢子, 并在菌落最外围出现明显的水解圈(图 1A), 初步判定该菌株为曲霉属。

HPLC 检测 XT-1 菌株发酵液样品, 结果显示, XT-1 菌株在 5.2 min 芦丁出峰位置和 7.2 min 异槲皮素出峰位置均检测到出峰, 与混合标品中芦丁和异槲皮素的出峰时间一致。然而在 13.5 min 槲皮素出峰位置未检测到出峰, 表明 XT-1 不具备继续水解异槲皮素生成槲皮素的能力(图 1B)。对样品进行液相色谱质谱联用仪(LC-MS)检测, 从 LC-MS 结果中检测到分子量为 608.2 m/z 和 464.3 m/z 的 2 种化合物(图 1C), 分别与芦丁(分子量 610.5 m/z)和异槲皮素(分子量 464.4 m/z)相对应, 未检测到槲皮素生成。以上结果表明, 菌株 XT-1 具有水解芦丁生成异槲皮素的能力, 但不会进一步水解生成槲皮素, 具有良好的底物特异性。

以菌株 XT-1 的基因组为模板扩增其 ITS 和 18S rRNA 基因序列, 根据测序结果在 NCBI 上进行序列比对, 构建 XT-1 菌株的 DNA 分子进化树。菌株 XT-1 与曲霉属中的黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)进化关系相近(图 1D), 属于同一个进化分支, 因此确定菌株 XT-1 属于曲霉属, 重新命名为 *Aspergillus* sp. XT-1。

2.2 α -L-鼠李糖苷酶的基因挖掘、载体构建和异源表达

2.2.1 基于转录组差异和结构域相似性的 α -L-鼠李糖苷酶基因挖掘

传统的基因挖掘方式集中于蛋白纯化鉴定, 鉴于野生菌株曲霉属在生长和繁殖过程中可能产生曲霉毒素, 具有潜在的安全隐患, 期望开发异源表达系统增加酶的表达和减少毒素风险。基

于转录组差异分析可快速准确获取目标基因,提高酶挖掘的准确度与效率。通过不同培养时间下 *Aspergillus* sp. XT-1 的转录组水解差异,以芦丁转化率为指标,通过基因的转录组差异展开 α -L-鼠李糖苷酶基因的筛选与挖掘。根据菌株的转录组测序结果进行筛选分析,水解率为 60% 的样品相对于水解率为 10% 的样品有 764 个上调基因(图 2A)。以代谢过程(metabolic process)、催化活性(catalytic activity)、碳利用(carbon

utilization)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)等相关生理功能分类缩小筛选范围至 413 个,其中,上调基因中与代谢过程相关的基因数量为 213 个,催化活性相关的基因数量为 87 个,碳利用相关的基因数量为 25 个,碳水化合物代谢相关的基因数量为 88 个。已知的 α -L-鼠李糖苷酶归属为糖苷水解酶,以注释信息中包含糖苷水解酶相关信息为筛选条件,进一步将 413 个基因缩小至 60 个潜在的糖苷水解酶基因。

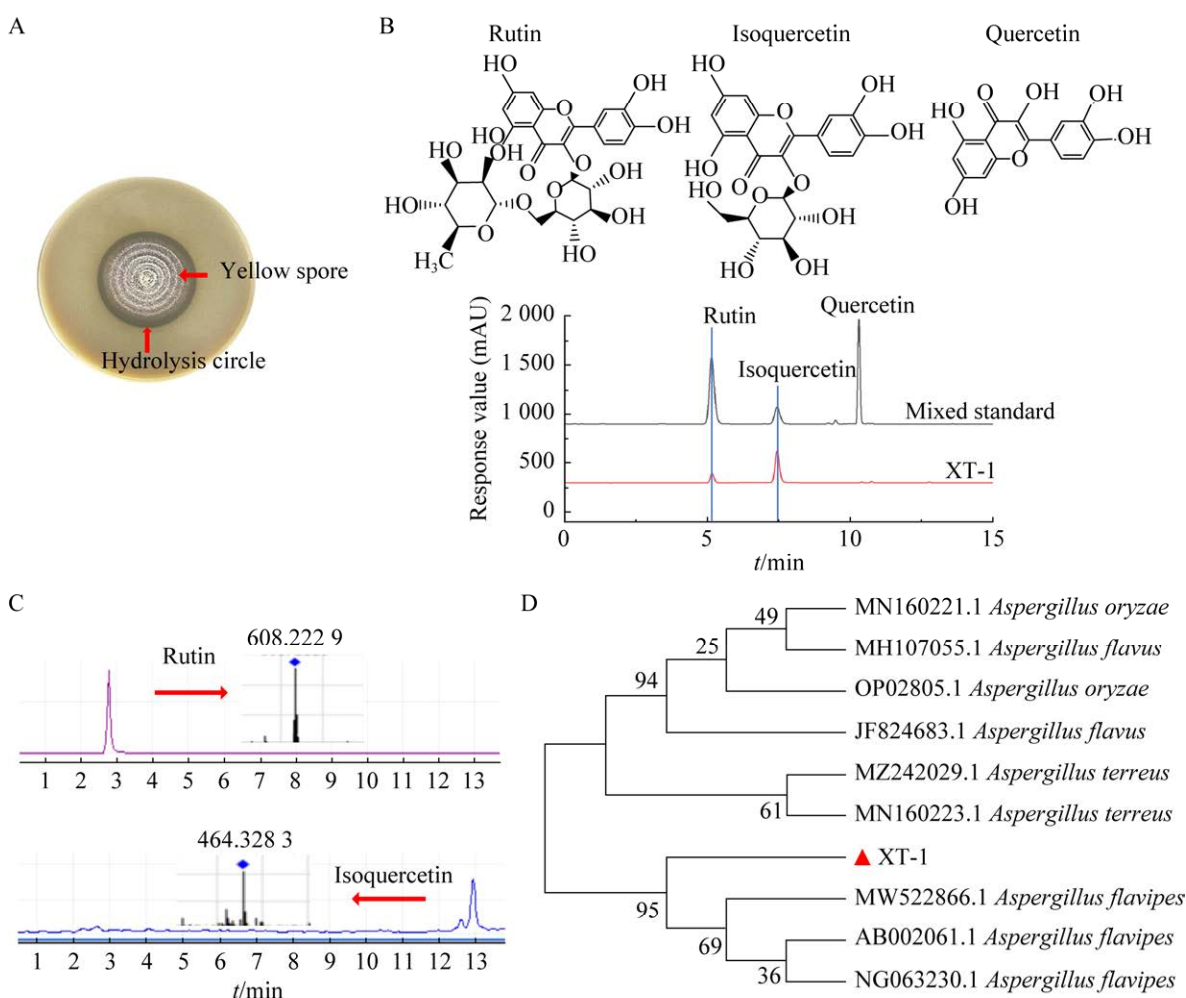


图 1 菌株 XT-1 的菌落形态、产物的 HPLC 谱图、LC-MS 谱图和菌株分子进化树 A: 菌株 XT-1 菌落形态. B: 菌株 XT-1 产物的 HPLC 谱图. C: 菌株 XT-1 产物的 LC-MS 谱图. D: 菌株 XT-1 的分子进化树

Figure 1 Colony morphology, product HPLC and LC-MS spectra and strain molecular evolution tree. A: Colony morphology of strain XT-1. B: HPLC spectrum of the product of strain XT-1. C: LC-MS spectrum of the product of strain XT-1. D: Molecular evolution tree of strain XT-1.

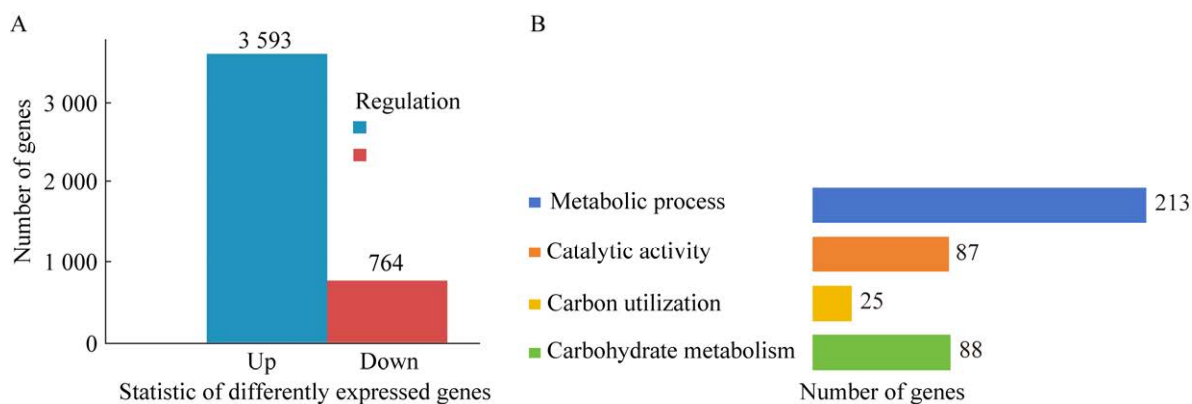


图 2 *Aspergillus* sp. XT-1 菌株的转录组差异基因数量统计(A)与差异基因功能分类(B)

Figure 2 Statistical analysis of the number of differentially expressed genes (A) and functional classification of differentially expressed genes (B) in the transcriptome of *Aspergillus* sp. XT-1 strain.

根据糖苷水解酶基因的 KEGG、GO 和表达量分析, 结合注释信息中水解酶种类与表达差异, 最终从 60 个潜在的糖苷水解酶基因中筛选出 5 个潜在的 α -L-鼠李糖苷酶基因, 分别为 DN6144、DN8610、DN7311、DN3993 和 DN10886。DN6144 基因编码序列全长 947 bp, 实验组与对照组的 \log_2 fold change 倍数为 2.2, KEGG 和 GO 注释均为 α -L-鼠李糖苷酶; DN8610 基因编码序列全长 2 765 bp, \log_2 fold change 倍数为 0.4, KEGG 注释为 α -L-鼠李糖苷酶, GO 注释其具有催化活性; DN7311 基因编码序列全长 2 753 bp, \log_2 fold change 倍数为 0.2, KEGG 注释为 α -L-鼠李糖苷酶; DN3993 基因编码序列全长 2 615 bp, \log_2 fold change 倍数为 4.3, KEGG 和 GO 注释均为 α -L-鼠李糖苷酶; DN19886 基因编码序列全长 1 253 bp, \log_2 fold change 倍数为 3.2, KEGG 注释为 α -L-鼠李糖苷酶, GO 注释其属于碳代谢过程。

将候选的 α -L-鼠李糖苷酶的序列进行 NCBI 数据的 Nr 比对, 确定 DN6144、DN8610、DN7311、DN3993 和 DN10886 基因与已报道基因的相似度最高均为未鉴定功能蛋白, 序列相似

度分别为 73.4%、77.9%、69.2%、77.6%和 82.6% (表 2)。后续将通过异源表达对以上 5 个 α -L-鼠李糖苷酶进行功能验证。

2.2.2 α -L-鼠李糖苷酶载体构建和异源表达

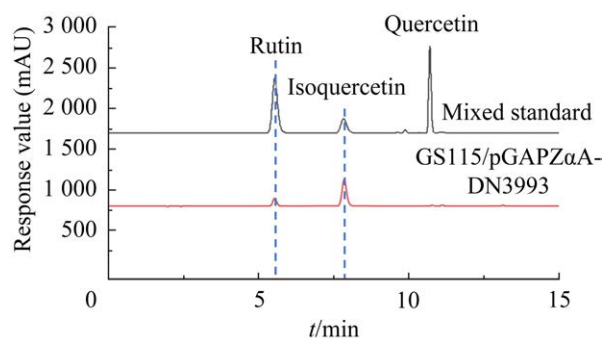
基于转录组差异分析和功能注释, 以 *Aspergillus* sp. XT-1 菌的 cDNA 为模板, 构建 5 个候选 α -L-鼠李糖苷酶基因的毕赤酵母异源表达系统并测定水解芦丁的情况。结果显示, 基因 DN6144、DN8610、DN7311 和 DN10886 的毕赤酵母异源表达均无法水解芦丁生成异槲皮素, 而 DN3993 基因的样品在 5.4 min 和 8.1 min 处均有一个峰(图 3), 与混合标品中芦丁和异槲皮素的出峰位置对应, 证明 DN3993 表达的蛋白具有水解芦丁生成异槲皮素的能力, 不会进一步水解生成槲皮素。根据功能注释将 α -L-鼠李糖苷酶基因 DN3993 命名为 AfRhase。

2.3 AfRhase 的氨基酸序列和结构分析

经 NCBI 中氨基酸序列比对得到与 AfRhase 相似度最高的蛋白为土曲霉(*Aspergillus terreus*) 来源的未知蛋白 HFD88_001559, 相似度为 77.6%。为了进一步确定 AfRhase 的功能与催化特性, 选择鼠李糖苷酶 GH28 家族(红色)、GH78

表 2 潜在 α -L-鼠李糖苷酶基因信息Table 2 Potential α -L-rhamnosidase gene information

Gene number	Length (bp)	Early expression level	Post expression level	\log_2 fold change	KEGG explanatory note	GO explanatory note	Nr comparison
DN6144	947	69	285	2.2	α -L-rhamnosidase	α -L-rhamnosidase	Uncharacterized protein CDV56, XP_026614490.1 (73.4%)
DN8610	2 765	3 922	4 851	0.4	α -L-rhamnosidase	Catalytic activity	Uncharacterized protein APUU XP_041560449.1 (77.9%)
DN7311	2 753	578	656	0.2	α -L-rhamnosidase		Hypothetical protein LIPSTDRAFT ODQ73385.1 (69.2%)
DN3993	2 615	68	1 325	4.3	α -L-rhamnosidase	α -L-rhamnosidase	Hypothetical protein HFD88 KAG2418458.1 (77.6%)
DN10886	1 253	33	295	3.2	α -L-rhamnosidase	Carbon metabolism process	Hypothetical protein HFD88 KAG2414607.1 (82.6%)

图 3 重组菌 GS115/pGAPZ α A-DN3993 水解芦丁的 HPLC 检测Figure 3 HPLC detection of rutin hydrolysis by recombinant GS115/pGAPZ α A-DN3993.

家族(蓝色)和 GH106 家族(绿色)的 57 条 α -L-鼠李糖苷酶, 构建 α -L-鼠李糖苷酶的系统发育树。AfRhase (黄色)与进化树中多数 GH78 家族来源的 α -L-鼠李糖苷酶的亲缘关系较近, AfRhase 与 GH78 家族中土曲霉(*Aspergillus terreus*)来源的 AFH54529.1 和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)来源的 EAA61403.1 在一个分支上, 说明它们的亲缘关系较近, AfRhase 与 AFH54529.1 的

Bootstrap value 为 99, 可信度较高, 表明 *Aspergillus* sp. XT-1 来源的 α -L-鼠李糖苷酶 AfRhase 也属于 GH78 家族(图 4A)。

利用 AlphaFold 模拟 AfRhase 的蛋白结构, AfRhase 蛋白是由 1 个 α -结构域(结构域 A)和 4 个 β -结构域组成的多结构域结构, 结构域 A (残基 439–763)是催化模块, 具有 GH78 家族典型的(α/α)₆桶结构, 4 个 β -结构域分别为结构域 N (残基 3–120)、结构域 E (残基 133–301)、结构域 F (残基 310–420)和结构域 C (残基 779–870) (图 4B)。基于与已报道晶体结构的 GH78 家族 α -L-鼠李糖苷酶的氨基酸序列比对结果显示, AfRhase 与阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) MA-4680 NBRC 14893 来源的 3W5N 相似度为 31.3%; 与多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*) VPI-548 来源的 3CIH 相似度为 12.2%; 与密歇根克雷伯氏菌(*Klebsiella michiganensis*) KCTC 1686 来源的 4XHC 相似度为 9.9%; 与土曲霉(*Aspergillus terreus*) CCF 3059 来源的 6GSZ 的氨基酸序列相似度为 77.4%, 6GSZ 也是由 1 个 α -

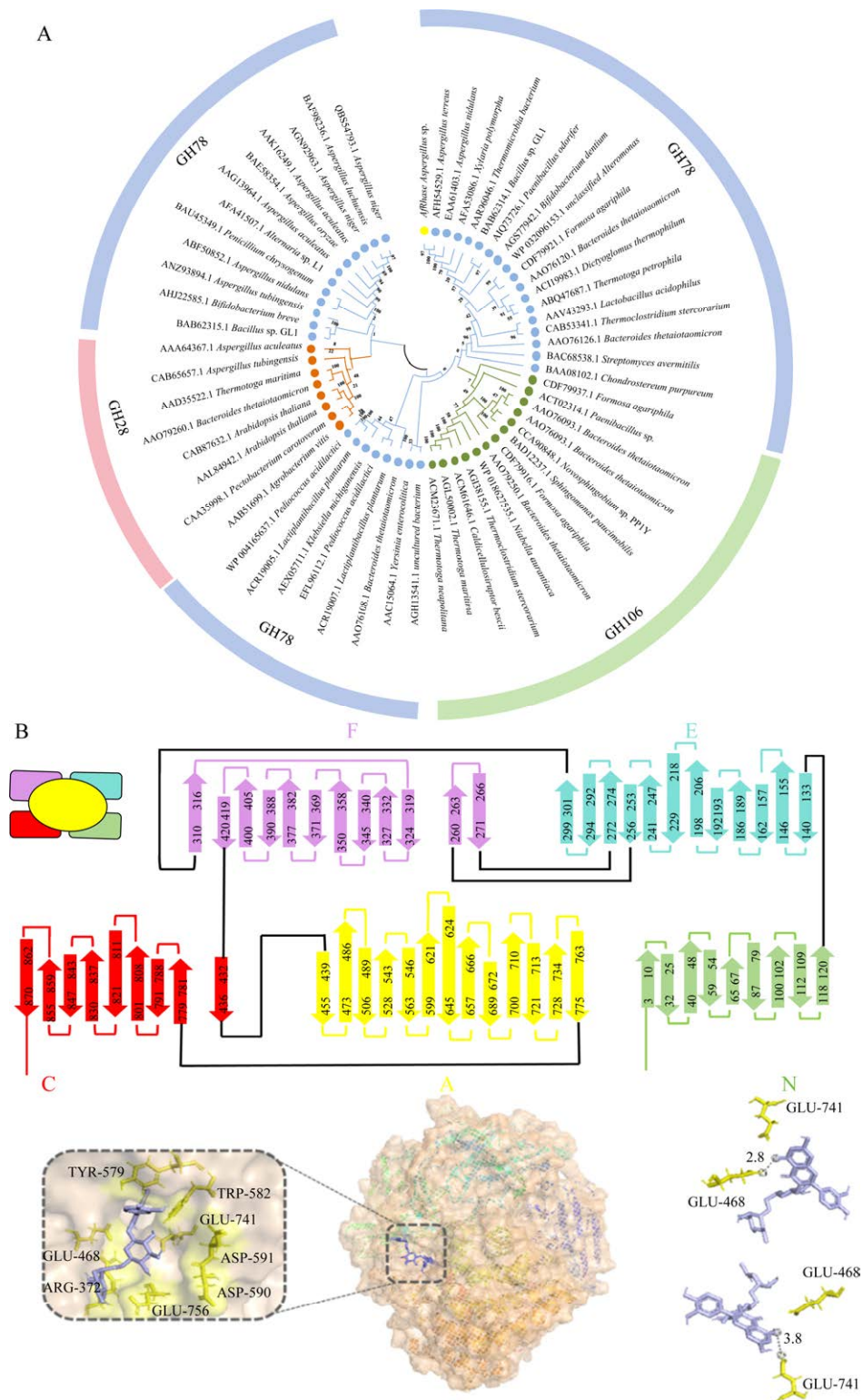


图 4 α -L-鼠李糖苷酶序列和结构特征 A: 氨基酸序列分子进化树. B: AfRfase 蛋白拓扑、活性口袋和活性催化位点示意图

Figure 4 The sequences and structure information of α -L-rhamnosidase. A: Amino acid sequences phylogenetic tree. B: Schematic diagram of AfRfase protein topology, active pockets, and active catalytic sites.

结构域(结构域 A)和 4 个 β -结构域(结构域 N、结构域 E、结构域 F 和结构域 C)组成^[20], 通过蛋白结构域相似性分析, 进一步确定 α -L-鼠李糖苷酶 AfRhase 属于 GH78 家族。通过分子对接和结合口袋分析, AfRhase 的活性口袋位置与 6GSZ 的活性口袋位置一致, 均位于催化模块结构域 A 中, 进一步分析 AfRhase 活性口袋 4 Å 范围内的关键氨基酸时, 确定 GLU468 和 GLU741 为 AfRhase 的活性催化位点, GLU468 与芦丁的空间距离为 2.8 Å, GLU741 与芦丁的空间距离为 3.8 Å (图 4B), 符合 α -L-鼠李糖苷酶的催化特性。

2.4 重组酶 AfRhase 酶学性质表征和放大应用

2.4.1 最适温度和 pH 的测定

为了进一步确定 AfRhase 的酶学特征, 以芦丁为底物, 测定温度和 pH 对 AfRhase 酶活的影响。AfRhase 反应温度在 40–65 °C 之间, 最适反应温度为 55 °C, 反应高于 55 °C 之后 AfRhase 酶活损失迅速, 60 °C 时酶活下降 40% 以上(图 5A); 催化反应 pH 在 3.5–8.0 之间, 其最适反应 pH 为 4.5, 在 pH 为 3.5–7.0 的偏酸性条件下具有良好酶活, 催化活力能够保持 70% 以上, 而 pH 大于 7.5 后酶活损失 80% 左右(图 5B)。热稳定性结果表示, AfRhase 在温度 ≤ 55 °C 时保存 1 h, 对 AfRhase

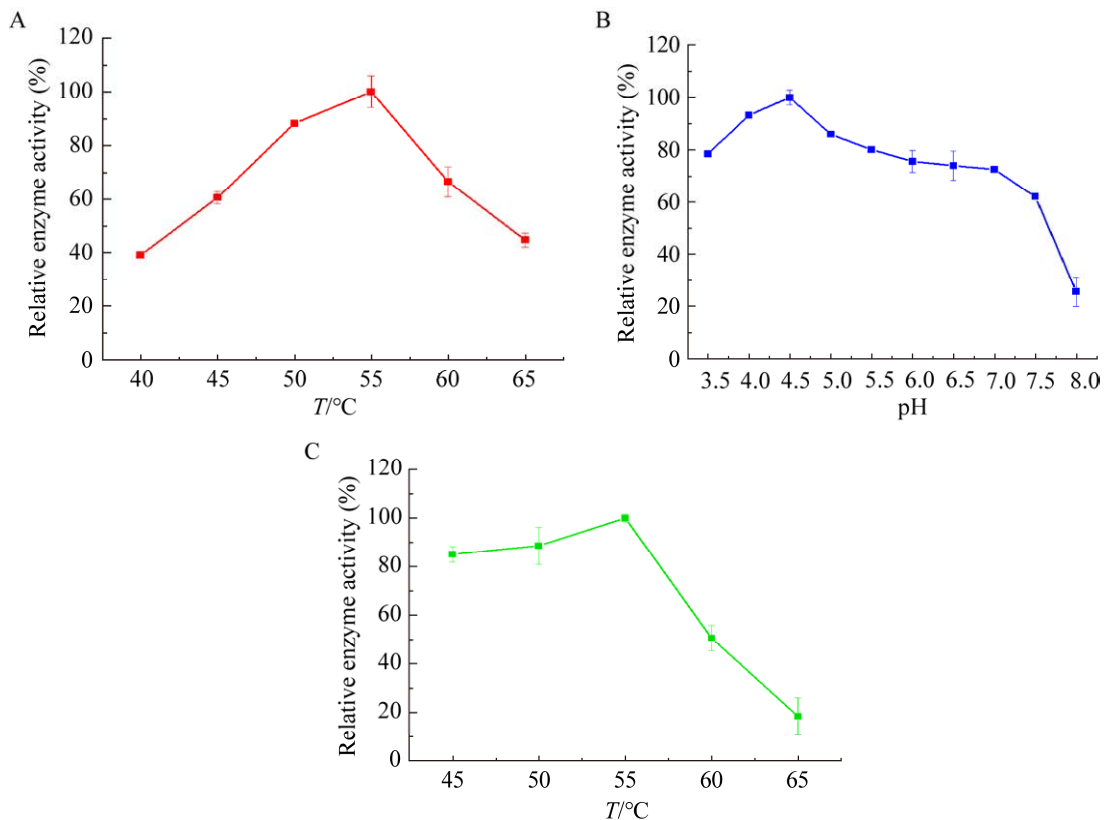


图 5 重组 α -L-鼠李糖苷酶 AfRhase 的酶学性质 A: 最适反应温度. B: 最适反应 pH. C: 热稳定性

Figure 5 Enzymatic properties of recombinant α -L-rhamnosidase AfRhase. A: The optimal reaction temperature. B: The optimal reaction pH. C: Thermal stability.

酶活基本无影响,但是当温度 $\geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,该酶将丧失大部分的酶活(图 5C)。通过 AfRfase 的酶学性质探究确定酶催化的最适条件,为后续 5 L 体系放大催化反应条件提供理论基础。

2.4.2 AfRfase 的底物特异性和 5 L 体系放大催化

选取芦丁、柚皮苷、橙皮苷、杨梅苷、淫羊

藿苷、朝霍定 C 作为底物,测试重组酶 AfRfase 的底物特异性。结果如图 6A 所示, AfRfase 可以水解芦丁、橙皮苷、柚皮苷和朝霍定 C,但是不能水解杨梅苷与淫羊藿苷,不同底物的摩尔转化率分别为 97.0%、2.3%、80.1%和 29.5%,具有广泛的底物识别能力。通过糖苷键的类型和苷元分析表明, AfRfase 对葡萄糖上连接的鼠李糖

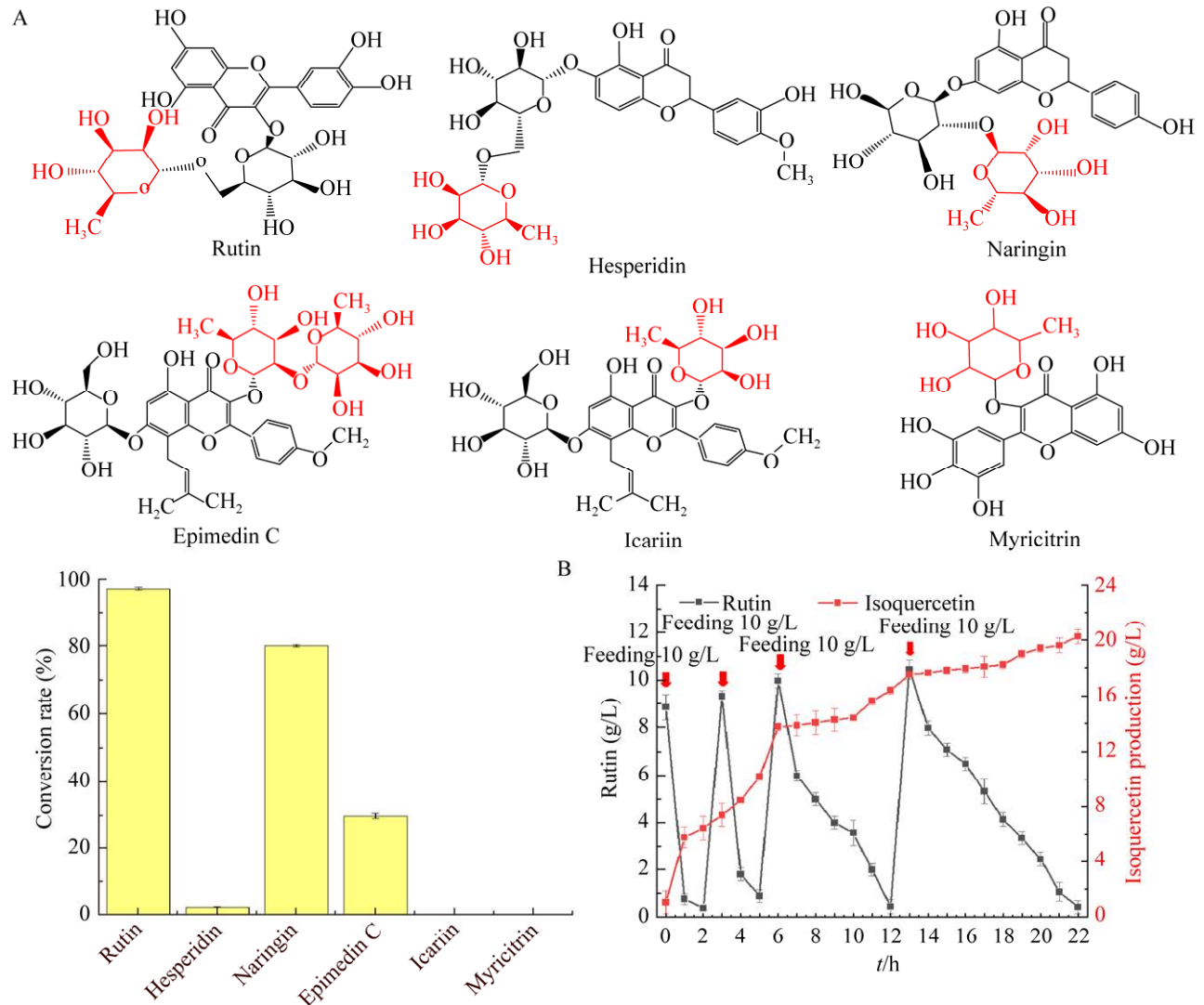


图 6 重组酶 AfRfase 的水解底物特异性和 5 L 反应体系芦丁水解应用

A: 重组酶 AfRfase 的水解底物特异性. B: 重组酶 AfRfase 5 L 反应体系芦丁水解应用

Figure 6 The substrate specificity of recombinant enzyme AfRfase and its application in the 5 L reaction system for rutin hydrolysis. A: Substrate specificity of recombinant enzyme AfRfase hydrolysis. B: Using of AfRfase in 5 L reaction for rutin hydrolysis application.

具有一定的水解能力,更偏好 α -1,6键连接的芦丁,但是无法水解苷元与糖基之间直接相连的底物。基于底物特异性探究,筛选 AfRhase 的最适催化底物,并拓宽曲霉属来源的 α -L-鼠李糖苷酶可催化的底物范围。

对重组菌 GS115-AfRhase 进行 5 L 体系的放大测试。共进行 4 次芦丁补料,总投入粗品芦丁 120 g (纯度为 70%),反应 22 h 后,最终异槲皮素的浓度达到 20.3 g/L (图 6B),摩尔转化率达到 95.4%,总生产效率为 2.0 mmol/(L·h),AfRhase 重组酶是目前已报道的最高水平,具有良好的工业生产应用价值和市场化前景。

3 讨论与结论

本研究通过芦丁水解菌株的筛选、鉴定与转译组分析, α -L-鼠李糖苷酶基因挖掘、克隆与载体构建等工作,成功获得并表征特异性水解芦丁生成异槲皮素的 α -L-鼠李糖苷酶 AfRhase。通过分子进化树与结构域相似性分析确定 AfRhase 属于鼠李糖苷水解酶 GH78 家族,基于蛋白结构模拟确定 AfRhase 由 1 个 α -结构域(结构域 A)和 4 个 β -结构域(结构域 N、结构域 E、结构域 F 和结构域 C)组成,结构域 A 为催化模块,具有 GH78 家族典型的 $(\alpha/\alpha)_6$ 桶结构。CAZy 数据库中已报道晶体结构的 GH78 家族 α -L-鼠李糖酶的结构域组成也不尽相同,阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) MA-4680 NBRC 14893 来源的 α -L-鼠李糖苷酶 3W5N 也具有 1 个 α -结构域(结构域 A)和 4 个 β -结构域(结构域 N、结构域 E、结构域 F 和结构域 C),但是 3W5N 比 AfRhase 和 6GSZ 多 1 个附加域,碳水化合物结合模块 CBM67^[21];密歇根克雷伯氏菌(*Klebsiella michiganensis*) KCTC 1686 来源的 α -L-鼠李糖苷酶 4XHC 仅含有 1 个 α -结构域(结构域 A)和 1 个 β -结构域(结构域 F)^[22]。

α -L-鼠李糖苷酶的底物特异性较强,不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶催化活性的位置也存在差异。嗜热细菌(Thermophilic bacterium) PRI-1686 来源的 α -L-鼠李糖苷酶对柚皮苷和橙皮苷具有相似的酶活性,但是不能水解芦丁^[23];灰玫瑰青霉(*Penicillium griseoroseum*) MTCC 9224 来源的 α -L-鼠李糖苷酶可以水解芦丁,但是不能水解柚皮苷和橙皮苷^[24]。底物特异性测试显示 AfRhase 具有水解葡萄糖上连接鼠李糖苷底物的能力(芦丁、橙皮苷、柚皮苷和朝霍定 C),而且更偏好于 α -1,6键连接的底物,在天然产物之间的转化具有较好的应用潜力。Li 等^[25]通过使用黑曲霉(*Aspergillus niger*) JMU-TS528 来源 GH13 家族的 α -L-鼠李糖苷酶 r-Rha1 与高速逆流色谱(HSCCC)纯化,通过芦丁的生物转化制备异槲皮苷,在最适 pH 值为 5.0、温度为 60 °C 下,该酶对芦丁的转化率为 2.2 mmol/(L·h);Liu 等^[26]对黑曲霉(*Aspergillus niger*) DLFCC-90 来源的 α -L-鼠李糖苷酶进行纯化后用于水解芦丁制备异槲皮素,在最适 pH 值为 5.0、温度为 50 °C 下,该酶对芦丁转化率为 0.2 mmol/(L·h);Ferreira-Lazarte 等^[27]通过使用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)来源的 GH78 家族的 α -L-鼠李糖苷酶 Ram2 水解芦丁生成异槲皮素,在最适 pH 值为 5.5、温度为 50 °C 下,该酶对芦丁的转化率为 2.2 mmol/(L·h)。通过 5 L 反应体系的验证,重组酶 AfRhase 成功将 120 g 芦丁(纯度 70%)转化为异槲皮素,通过批次底物补料,异槲皮素的生产效率能维持在 2.0–5.4 mmol/(L·h)之间,摩尔转化率达到 95.4%,具有良好的工业化应用价值和市场前景。本研究通过对曲霉属来源的新型 α -L-鼠李糖苷酶 AfRhase 进行酶学性质表征、底物特异性测试以及黄酮类化合物的生物转化研究,为酶法生物转化天然黄酮类化合物提供理论基础和指导作用。

参考文献

- [1] NILE A, GANSUKH E, PARK GS, KIM DH, HARIRAM NILE S. Novel insights on the multi-functional properties of flavonol glucosides from red onion (*Allium cepa* L.) solid waste: *in vitro* and *in silico* approach[J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127650.
- [2] SAHREEN S, KHAN MR, KHAN RA, SHAH NA. Estimation of flavonoids, antimicrobial, antitumor and anticancer activity of *Carissa opaca* fruits[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13: 372.
- [3] SHI YW, CHEN XY, LIU JX, FAN XJ, JIN Y, GU JX, LIANG JL, LIANG XM, WANG CP. Isoquercetin improves inflammatory response in rats following ischemic stroke[J]. Frontiers in Neuroscience, 2021, 15: 555543.
- [4] ZHANG R, YAO Y, WANG YP, REN GX. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-Ay mice[J]. Nutrition & Metabolism, 2011, 8: 85.
- [5] JAYACHANDRAN M, ZHANG TZ, GANESAN K, XU BJ, CHUNG SSM. Isoquercetin ameliorates hyperglycemia and regulates key enzymes of glucose metabolism *via* insulin signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2018, 829: 112-120.
- [6] REY D, FERNANDES TA, SULIS PM, GONÇALVES R, SEPÚLVEDA RM, SILVA FREDERICO MJ, ARAGON M, OSPINA LF, COSTA GM, SILVA FRMB. Cellular target of isoquercetin from *Passiflora ligularis* Juss for glucose uptake in rat soleus muscle[J]. Chemico-Biological Interactions, 2020, 330: 109198.
- [7] CHEN M, DAI LH, FEI AH, PAN SM, WANG HR. Isoquercetin activates the ERK1/2-Nrf2 pathway and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 13(4): 1353-1359.
- [8] WANG CP, SHI YW, TANG M, ZHANG XC, GU Y, LIANG XM, WANG ZW, DING F. Isoquercetin ameliorates cerebral impairment in focal ischemia through anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects in primary culture of rat hippocampal neurons and hippocampal CA1 region of rats[J]. Molecular Neurobiology, 2017, 54(3): 2126-2142.
- [9] MBIKAY M, CHRÉTIEN M. Isoquercetin as an anti-covid-19 medication: a potential to realize[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 830205.
- [10] NAVEEN P, LINGARAJU HB, ANITHA, PRASAD KS. Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method[J]. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2017, 7(2): 94-100.
- [11] YANG J, LEE HN, SUNG J, KIM Y, JEONG HS, LEE J. Conversion of rutin to quercetin by acid treatment in relation to biological activities[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2019, 24(3): 313-320.
- [12] CHENG LY, ZHANG H, CUI HY, CHENG JM, WANG WY, WEI B, LIU F, LIANG H, SHEN XL, YUAN QP. A novel α -L-rhamnosidase renders efficient and clean production of icaritin[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 341: 130903.
- [13] 卢姗, 张珊珊, 邹康, 卢昌宁, 赵林果. 极耐热 α -L-鼠李糖苷酶的性质及其在异槲皮素制备中的应用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(1): 102-111.
- LU S, ZHANG SS, ZOU K, LU CN, ZHAO LG. Characterization of an extremely thermostable α -L-rhamnosidase and its applications in preparation of isoquercetin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(1): 102-111 (in Chinese).
- [14] BEEKWILDER J, MARCOZZI D, VECCHI S, de VOS R, JANSSEN P, FRANCKE C, van HYLCKAMA VLIEG J, HALL RD. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3447-3454.
- [15] LI BC, ZHANG T, LI YQ, DING GB. Target discovery of novel α -L-rhamnosidases from human fecal metagenome and application for biotransformation of natural flavonoid glycosides[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(4): 1245-1261.
- [16] WU T, PEI JJ, GE L, WANG ZZ, DING G, XIAO W, ZHAO LG. Characterization of a α -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* with high catalytic efficiency of epimedin C[J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 81: 461-467.
- [17] LI LJ, GONG JY, WANG S, LI GL, GAO T, JIANG ZD, CHENG YS, NI H, LI QB. Heterologous expression and characterization of a new clade of *Aspergillus* α -L-rhamnosidase suitable for *Citrus* juice processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2926-2935.

- [18] HRDLICKOVA R, TOLOUE M, TIAN B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2017, 8(1): e1364.
- [19] SZEJA W, GRYNKIEWICZ G, RUSIN A. Isoflavones, their glycosides and glycoconjugates. Synthesis and biological activity[J]. *Current Organic Chemistry*, 2017, 21(3): 218-235.
- [20] GERSTORFEROVÁ D, FLIEDROVÁ B, HALADA P, MARHOL P, KŘEN V, WEIGNEROVÁ L. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(5): 828-835.
- [21] OMURA S, IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, TAKAHASHI C, SHINOSE M, TAKAHASHI Y, HORIKAWA H, NAKAZAWA H, OSONOE T, KIKUCHI H, SHIBA T, SAKAKI Y, HATTORI M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(21): 12215-12220.
- [22] SHIN SH, KIM S, KIM JY, LEE S, UM Y, OH MK, KIM YR, LEE J, YANG KS. Complete genome sequence of *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686, used in production of 2,3-butanediol[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(9): 2371-2372.
- [23] BIRGISSON H, HREGGVIDSSON GO, FRIDJÓNSSON OH, MORT A, KRISTJÁNSSON JK, MATTIASSON B. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(6): 561-571.
- [24] YADAV S, YADAVA S, YADAV KDS. α -L-rhamnosidase selective for rutin to isoquercitrin transformation from *Penicillium griseoroseum* MTCC-9224[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2017, 70: 222-228.
- [25] LI LJ, LIU XQ, DU XP, WU L, JIANG ZD, NI H, LI QB, CHEN F. Preparation of isoquercitrin by biotransformation of rutin using α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* JMU-TS528 and HSCCC purification[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2020, 50(1): 1-9.
- [26] LIU TQ, YU HS, ZHANG CZ, LU MC, PIAO YZ, OHBA M, TANG MQ, YUAN XD, WEI SH, WANG K, MA AZ, FENG X, QIN SQ, MUKAI C, TSUJI A, JIN FX. *Aspergillus niger* DLFC-90 rhamnoside hydrolase, a new type of flavonoid glycoside hydrolase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(13): 4752-4754.
- [27] FERREIRA-LAZARTE A, PLAZA-VINUESA L, de LAS RIVAS B, VILLAMIEL M, MUÑOZ R, MORENO FJ. Production of α -rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and their role in deglycosylation of dietary flavonoids naringin and rutin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193(Pt B): 1093-1102.