

利用 DNS 法快速分析及优化柚皮苷的酶解过程

蒋超¹ 蔡慧农^{1,2,3,4} 倪辉^{1,2,3,4} 朱艳冰^{1,2,3,4} 杨秋明^{1,2,3,4} 肖安风^{1,2,3,4*}

(1. 集美大学 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. 福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

(4. 厦门市食品与生物工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

摘要:【目的】建立采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法快速测定柚皮苷水解率的方法,并利用该方法对柚苷酶催化水解柚皮苷生成柚皮素的反应过程进行优化研究。【方法】利用棘孢曲霉 JMUb058 发酵得到的柚苷酶催化水解柚皮苷,采用 DNS 法对柚皮苷酶解过程中还原糖的生成量进行分析,经过换算得到柚皮苷的水解率,并在此基础上通过单因素实验优化柚皮苷的酶解过程。【结果】在柚皮苷的水解过程中,还原糖的生成量与柚皮苷的水解量及柚皮素的生成量均呈现出良好的线性关系,因此可利用 DNS 法测定体系中还原糖的生成量,并通过换算得到柚皮素的生成量。利用该方法优化柚皮苷的酶解过程得到柚苷酶转化柚皮苷的最适温度为 50 °C、pH 为 5.0、酶用量为 8 U/mL、底物浓度为 0.2 g/100 mL。在此条件下,柚皮苷酶解 150 min 后可达到平衡,此时其水解率为 85%。通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测得 K_m 为 413.44 mg/L, V_{max} 为 0.022 g/(min·L)。【结论】采用 DNS 法分析柚苷酶酶解柚皮苷的过程,具有方便快捷的特点,为柚皮苷的生物转化生成柚皮素的研究提供了新方法。

关键词: 柚皮苷, 柚苷酶, 生物转化, 柚皮素

Rapid analysis and optimization of naringin enzymolysis by means of DNS method

JIANG Chao¹ CAI Hui-Nong^{1,2,3,4} NI Hui^{1,2,3,4} ZHU Yan-Bing^{1,2,3,4}
YANG Qiu-Ming^{1,2,3,4} XIAO An-Feng^{1,2,3,4*}

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

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

(3. Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology of Fujian Province, Xiamen, Fujian 361021, China)

(4. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: [Objective] 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) assay, a rapid detection method of naringin

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31271914); 福建省科技计划重点项目(No. 2011N1008); 福建省自然科学基金项目(No. 2011J01225)

*通讯作者: Tel: 86-592-6183832; 信箱: xxaaffeng@jmu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-13; 接受日期: 2013-06-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

conversion rate established and used to analyze the dynamic process of naringin conversion into naringenin catalyzed by naringinase. **[Methods]** Naringinase was obtained from *Aspergillus aculeatus* JMUdb058 under solid-state fermentation. The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to determine the yields of reducing sugars to calculate the conversion rate of naringin via a certain way. Then the conditions of naringin enzymolysis were optimized by traditional “one-variable-at-a-time” strategy. **[Results]** Good linear relationships were showed among the yields of reducing sugars and hydrolysis of naringin as well as the yields of naringenin in the process of naringin enzymolysis. Therefore, the DNS method that was used to determine the yields of reducing sugars can be applied to analyze the process of naringin bioconversion into naringenin by naringinase. The optimum operating conditions obtained from the “one-variable-at-a-time” design were temperature of 50 °C, pH value of 5.0, enzyme dosage of 8 U/mL, and substrate concentration of 0.2 g/100 mL. Under the optimal condition, the conversion rate of naringin reached 85% after 150 min. Then $K_m=413.44$ mg/L and $V_{max}=0.022$ g/(min·L) were got by the double reciprocal plot of Lineweaver-Burk. **[Conclusion]** The DNS assay can be used to analyze the process of naringin bioconversion into naringenin by naringinase, which provided a new convenient and simple method for study on naringin enzymolysis into naringenin.

Keywords: Naringin, Naringinase, Bioconversion, Naringenin

柚皮苷 (4',5,7-trihydroxy flavanone-7- β -L-rhamnoglycoside-(1,2)- α -D-glucopyranoside) 是一种二氢黄酮糖苷类化合物, 它是芸香科植物, 如葡萄柚、蜜柚、酸橙等的主要苦味物质。柚皮苷具有抗溃疡、消炎、抗氧化及抑菌等一系列的生物活性^[1]。因此, 在食品、药品及化妆品等领域具有很好的应用前景。

为改善柚皮苷的水溶性或脂溶性, 或提高其生理活性、增加新的功能等, 进而提高其生物利用度, 目前国内外主要采用化学法^[2]和酶法^[3-7]对柚皮苷进行改性。相比于化学改性法, 酶法改性柚皮苷具有选择性强, 反应条件温和, 产物易分离及对环境危害小等优点, 因而具有更好的研究意义和价值。当前研究酶法水解柚皮苷使用较多的酶为柚苷酶, 该酶是一种由 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶组成的复合酶。其催化柚皮苷水解的作用机理为: 柚皮苷首先在 α -L-鼠李糖苷酶的作用下分解成鼠李糖和苦味只有其 1/3 的普鲁宁; 同时, 普鲁宁又在 β -D-葡萄糖苷酶的作用下分解成葡萄糖和无苦味的柚皮素^[8]。

在以往的研究中, 通常采用高效液相色谱法检测柚皮苷的减少量或柚皮素的生成量, 来分析柚皮苷的水解过程, 然而这种方法较为繁琐耗时^[9-10]。

鉴于柚苷酶催化柚皮苷生成柚皮素的过程同时也是还原糖生成的过程, 且在此过程中还原糖的生成应与柚皮苷的水解和柚皮素的生成具有相关性。因此, 本文首先采用高效液相色谱法和 DNS 法对柚皮苷酶解过程中柚皮苷、普鲁宁、柚皮素和还原糖含量的变化关系进行了分析, 并在此基础上探索了仅用 DNS 法分析柚皮苷酶解过程的可行性, 继而利用该方法, 分析了不同工艺参数对柚皮苷转化过程的影响, 为利用柚苷酶改性柚皮苷获得特定生物活性的改性产物提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药品

棘孢曲霉 JMUdb058 (*Aspergillus aculeatus* JMUdb058) 产柚苷酶粗酶液, 本实验室发酵所得; 柚皮苷 ($\geq 98\%$) 购自西安小草植物科技有限责任公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自 Tedia Company Inc., Fairfield, Ohio, USA; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 分析方法

1.2.1 柚苷酶粗酶液酶活力的测定^[8]: 取 1.9 mL 柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0, 0.02 mol/L) 与 2 mL 300 mg/L 的柚皮苷溶液混合, 50 °C 保温 5 min 后, 再加入 0.1 mL 柚苷酶粗酶液, 混匀, 50 °C 水浴

15 min, 随即 100 °C 水浴 20 min 终止反应, 13 000×g 离心 20 min, 利用 HPLC 法检测反应体系中的柚皮苷和柚皮素含量; 对照组为将粗酶液先灭活后再加入底物, 其余步骤与实验组一致。

酶活力单位的定义: 在 50 °C、pH 5.0 的条件下, 每分钟生成 1 μg 柚皮素所需的酶量定义为一个柚苷酶活力单位。

1.2.2 柚皮苷酶解过程中还原糖生成量的测定: 参考 Nunes 等^[11]建立的方法, 采用 2,4-二硝基水杨酸(DNS)法测定酶解过程的还原糖生成量: 取 0.2 mL 反应液与 0.6 mL DNS 溶液混合, 摇匀, 100 °C 水浴 15 min, 随即取出用自来水冷却, 再用蒸馏水定容至 5 mL, 于 520 nm 波长下测定吸光值, 依据标准曲线来计算反应液中还原糖的生成量。其中, 绘制标准曲线时, 以等摩尔比的鼠李糖和葡萄糖组成的混合溶液为标准溶液, 其浓度范围为 0–2 g/L。

1.2.3 柚皮苷水解率的计算: HPLC 法: 柚皮苷水解率(%)=柚皮苷的水解量(mg)×100/酶解反应前柚皮苷的总量(mg)

DNS 法: 柚皮苷水解率(%)=酶解反应中还原糖的生成量(mg)×100/柚皮苷完全水解时还原糖的生成量(mg)

1.3 柚苷酶催化柚皮苷水解过程分析

在 50 mL 的反应体系中柚皮苷浓度为 0.2 g/100 mL, 酶用量为 8 U/mL, 以醋酸-醋酸钠溶液为缓冲液(pH 5.0, 0.02 mol/L), 置于 50 °C 的恒温振荡水槽中, 振荡反应 4 h, 振荡为 80 次/min, 从加入酶液开始计时, 每 30 min 取样一次, 沸水灭活后, 冷却至室温, 采用 DNS 法和 HPLC 法测定反应体系中还原糖、柚皮苷、普鲁宁及柚皮素的含量随时间的变化情况, 并在此基础上, 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、温度及振荡速度等因素对柚皮苷酶解作用的影响。

1.4 柚苷酶水解柚皮苷的动力学分析

参考 Vila-Real 等^[12]的方法并稍作修改, 以柚皮苷为底物, 柚苷酶粗酶液为催化剂, 在不同的底

物浓度 0.08–0.24 g/100 mL 下, 于 50 °C 反应 20 min, 从加入酶液开始计时, 每 4 min 取样 1 次, 沸水水浴 15 min 终止反应, 通过 DNS 法测定酶解液中还原糖的生成量, 并运用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出 K_m 值和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 柚苷酶催化柚皮苷水解过程分析

在 1.3 所述的实验条件下, 柚苷酶催化柚皮苷水解过程中柚皮苷、普鲁宁、柚皮素及还原糖含量的变化情况如图 1 所示。

从图 1 中可以看出, 柚皮苷先是在 α -L-鼠李糖苷酶的作用下迅速发生水解, 以致中间产物普鲁宁迅速生成, 与此同时普鲁宁又在 β -D-葡萄糖苷酶的作用下发生水解, 其产物柚皮素含量则开始逐渐积累, 相应地, 伴随着柚皮苷的水解, 体系中还原糖含量也在不断地增加, 且其增加趋势与柚皮素十分相似。当酶解反应进行 150 min 后, 体系中生成的中间产物普鲁宁已基本被完全分解为柚皮素, 而柚皮素和还原糖含量的变化也已不再明显, 此时体系中的还原糖包含鼠李糖和葡萄糖两种, 而且摩尔数相同。纵观柚皮苷酶解的全过程, 体系中柚皮素和还原糖含量的变化趋势基本一致。以还原糖的生成量为横坐标, 对柚皮苷的水解量和柚皮素的生成量作图(图 2)。

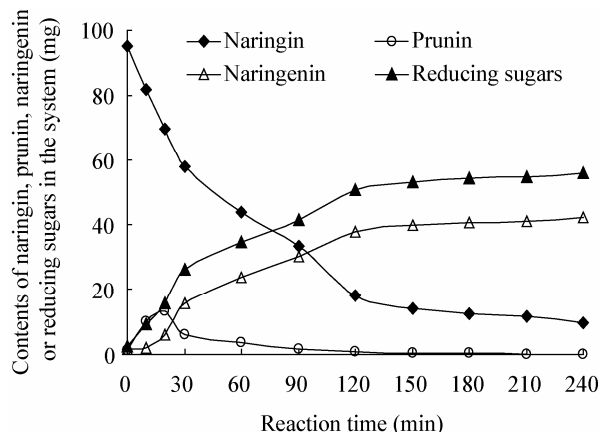


图 1 柚苷酶催化柚皮苷的水解过程

Figure 1 Time course of naringin hydrolysis with naringinase

由图 2 可知,反应体系中还原糖的生成量与柚皮苷的水解量及柚皮素的生成量均呈现出良好的线性关系。因此,可以根据上述线性关系及由 DNS 法测得的还原糖生成量计算柚皮苷的水解量和水解率,进而对柚皮苷酶解生成柚皮素的动态过程进行分析。

由图 3 可知,柚皮苷的水解量和柚皮素的生成量之间也呈现良好的线性关系,因此,也可以采用检测柚皮素生成量的方法来计算柚皮苷的水解量,但是,目前对柚皮苷酶解过程中柚皮素生成量的测定还是采用高效液相色谱法^[10],因此相对于测

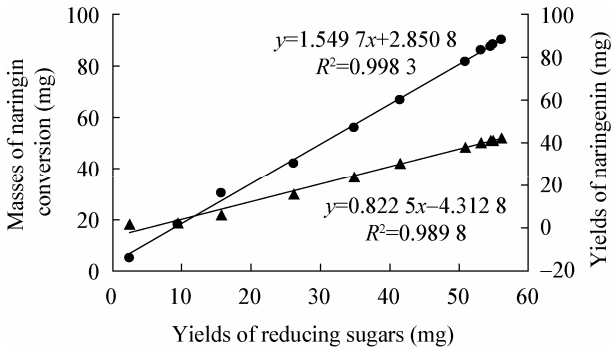


图 2 反应体系中还原糖的生成量与柚皮苷的水解量及柚皮素的生成量之间变化关系的拟合曲线

Figure 2 Fit curve of changes in the relationship among yields of reducing sugars, masses of naringin conversion and yields of naringenin in the reaction system

注: ●: 柚皮苷; ▲: 柚皮素.

Note: ●: Naringin; ▲: Naringenin.

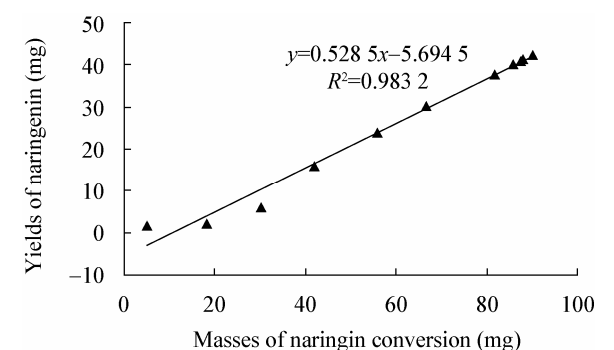


图 3 反应体系中柚皮苷的水解量与柚皮素的生成量之间的变化关系拟合曲线

Figure 3 Fit curve of changes in the relationship between masses of naringin conversion and yields of naringenin in the reaction system

还原糖生成量的 DNS 法,检测柚皮素生成量的 HPLC 法较为繁琐耗时。

分别采用 HPLC 法和 DNS 法对柚皮苷的酶解反应进行分析,在两种情况下测得的柚皮苷的水解率随酶解时间的变化关系如图 4A 所示。

由图 4A 可知,由 DNS 法和 HPLC 法测得的柚皮苷的水解率随酶解时间的变化曲线基本重合。通过对两种方法测得的柚皮苷的水解率进行线性拟合可得知,两种方法测得的柚皮苷水解率具有良好的线性关系(图 4B),也就是说由 DNS 测得的柚皮苷水解率与 HPLC 法测定的结果一致,因此采用 DNS 法对柚皮苷的酶解过程进行分析,其结果准确可靠。

2.2 加酶量对柚皮苷酶解过程的影响

在 2 mL 反应体系中,其它条件不变的情况下,以柚苷酶粗酶液(酶活为 100 U/mL)用量分别为 4、6、8、10、12 U/mL 酶解反应 210 min,测定酶解液中还原糖生成量及柚皮苷的水解率随时间的变化情况,其结果分别如图 5 所示。

从图 5 中可以看出,在不同的酶用量下,反应終了时柚皮苷的水解率基本上是一致的。而在 8 U/mL 的酶用量下,反应进行 150 min 时基本达到了平衡,此时柚皮苷的水解率达 85%。而当酶用量超过 8 U/mL 后,酶反应达到平衡所需的时间虽有所缩短,但从经济的角度考虑,选择 8 U/mL 作为最适酶用量。

2.3 底物浓度对柚皮苷酶解作用的影响

在不同底物浓度下,体系中还原糖的生成量及柚皮苷水解率的变化情况如图 6 所示。

从图 6 中可以看出,当其它条件固定时,柚皮苷的酶解反应达到平衡所需时间随着柚皮苷浓度的增加而延长,体系中还原糖的生成量相应增加,而柚皮苷的水解率则随之下降。由图 6B 可知,当底物浓度为 0.04 g/100 mL,反应平衡时柚皮苷水解率达到 94.5%,随着底物浓度的增加,柚皮苷的水解率呈现持续下降趋势。柚苷酶催化柚皮苷是一个可逆过程,产物对反应的进行具有一定的抑制作

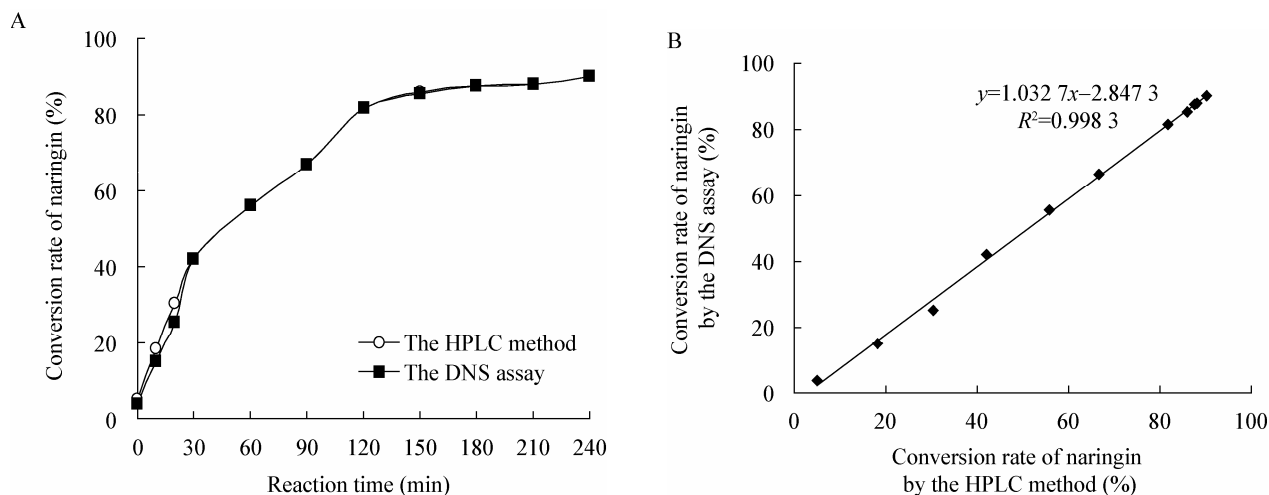


图4 HPLC法和DNS法测得的柚皮苷水解率的关系

Figure 4 The relationship between conversion of naringin measured by the HPLC assay and DNS method

注: A: 分别由 HPLC 法和 DNS 法测得的柚皮苷水解率随酶解时间的变化关系; B: 分别由 HPLC 法和 DNS 法测得的柚皮苷水解率的拟合关系曲线。

Note: A: The changes in the relationship of conversion rate of naringin measured by the HPLC method and DNS assay; B: Fit curve of conversion rate of naringin measured by the HPLC method and DNS assay.

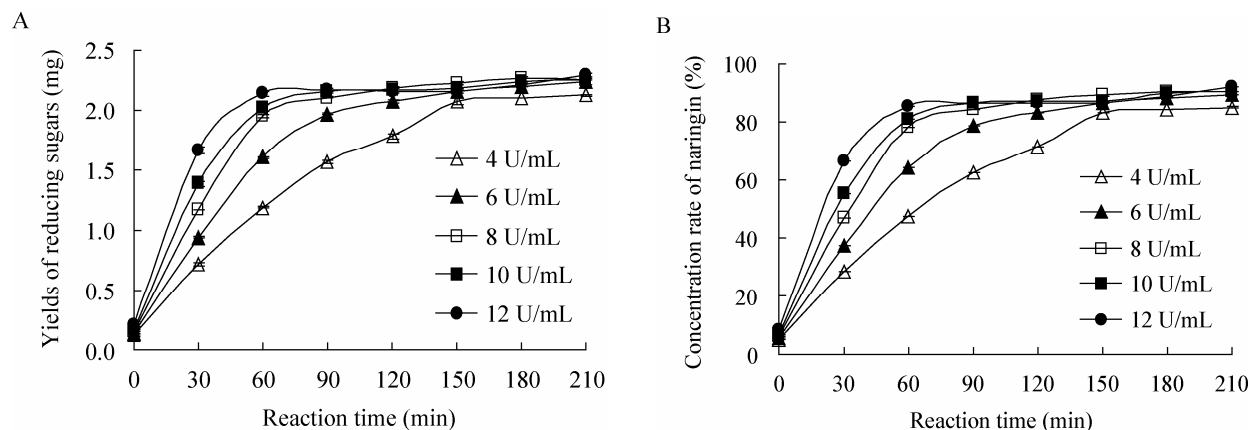


图5 酶用量对柚皮苷酶解作用的影响

Figure 5 Effects of enzyme dosages on hydrolysis of naringin

注: A: 不同酶用量时的还原糖生成量变化曲线; B: 不同酶用量时的柚皮苷水解率变化曲线。

Note: A: Change curves of yields of reducing sugars under different enzyme dosages; B: Change curves of conversion rate of naringin under different enzyme dosages.

用, 因此, 随着底物柚皮苷浓度增加, 反应得到的产物浓度也增加, 抑制作用增强, 从而导致柚皮苷的水解率随底物浓度增加而下降。为尽可能多的获得酶解产物柚皮素, 故选择柚皮苷在本实验条件下能达到的最大浓度 0.2 g/100 mL 作为底物浓度来进行后续的酶解反应。

2.4 pH 值对柚皮苷酶解作用的影响

当体系的 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 时, 酶解反应体系中还原糖生成量及柚皮苷的水解率随时间的变化曲线如图 7 所示。

由图 7 可知, pH 值对酶反应的初始速率、还原糖的生成量及柚皮苷的水解率均有着显著的影

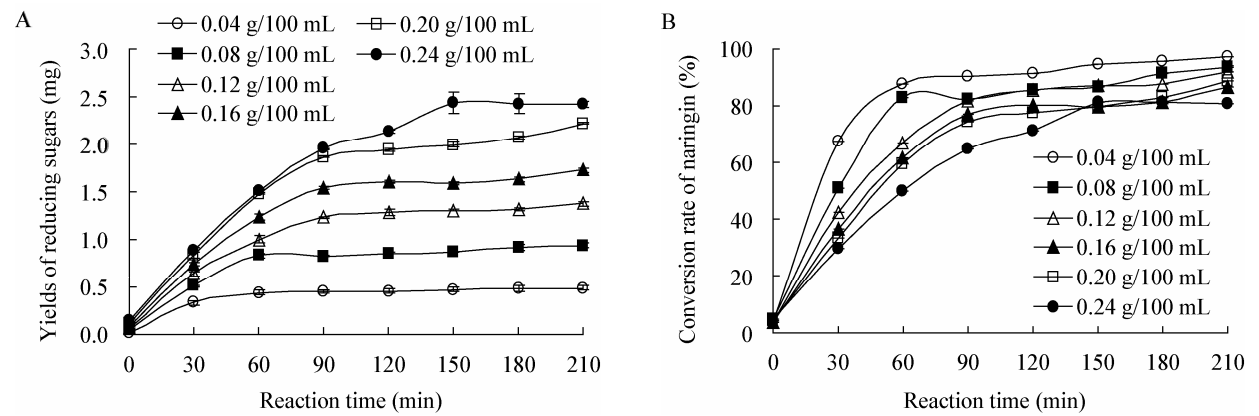


图 6 底物浓度对柚皮苷酶解作用的影响

Figure 6 Effects of substrate concentration on hydrolysis of naringin

注：A：不同底物浓度下的还原糖生成量变化曲线；B：不同底物浓度下的柚皮苷水解率变化曲线。
Note: A: Change curves of yields of reducing sugars under different substrate concentration; B: Change curves of conversion rate of naringin under different substrate concentration.

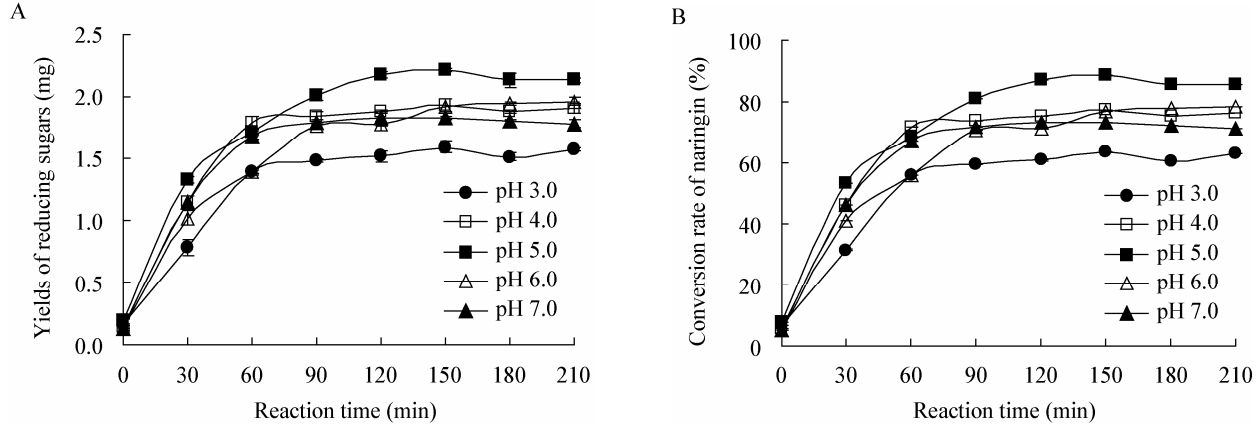


图 7 pH 值对柚皮苷酶解作用的影响

Figure 7 Effects of pH values on hydrolysis of naringin

注：A：不同 pH 值时的还原糖生成量变化曲线；B：不同 pH 值时的柚皮苷水解率变化曲线。
Note: A: Change curves of yields of reducing sugars under different pH values; B: Change curves of conversion rate of naringin under different pH values.

响。当 pH 值为 5.0 时，酶反应的初始速率、达到平衡时还原糖的生成量及柚皮苷的水解率均为最大。而当 pH 值增大或减小时，酶反应的初始反应速率、达到平衡时还原糖的生成量及柚皮苷的水解率都会出现不同程度的减小。

2.5 温度对柚皮苷酶解作用的影响

如图 8 所示，在其它条件不变时，不同温度下，测定酶解液中还原糖含量及柚皮苷的水解率随时间的动态变化情况。

从图 8 中可以看出，当温度由 30 °C 增至 50 °C

时，随着温度的升高，酶反应初始速率随之加快，达到平衡所需的时间变短，而柚皮苷的水解率也随之增高。60 °C 时的初始酶反应速率虽略高于 50 °C，但随着反应时间的延长，酶反应速率显著下降，生成的还原糖量和柚皮苷水解率也随之下降。因此，该柚苷酶转化柚皮苷的最适温度是 50 °C，在此条件下，柚皮苷水解率达到 85%。

2.6 振荡速率对柚皮苷酶解作用的影响

考察不同振荡速率下还原糖含量及柚皮苷水解率随时间的变化情况，其结果如图 9 所示。

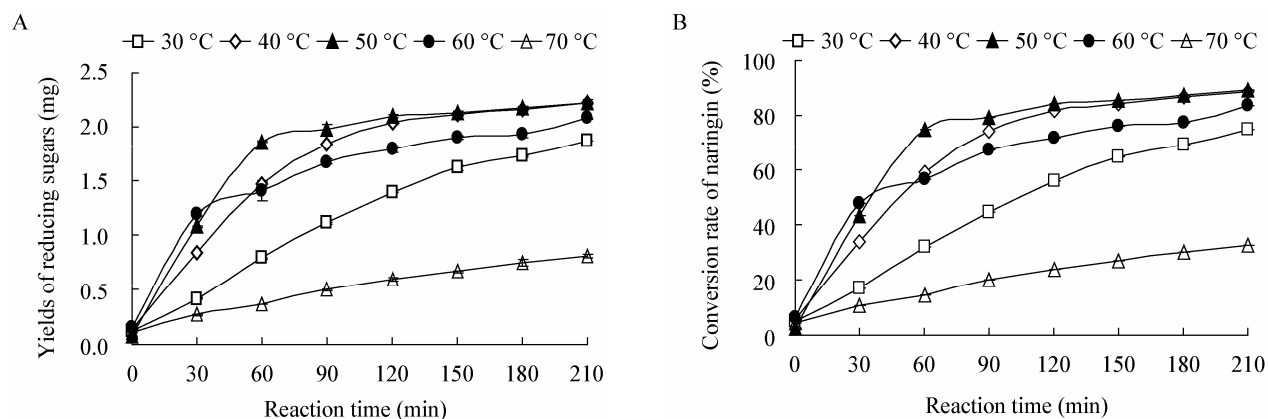


图8 温度对柚皮苷酶解作用的影响

Figure 8 Effects of temperatures on hydrolysis of naringin

注: A: 不同温度下的还原糖生成量变化曲线; B: 不同温度下的柚皮苷水解率变化曲线.

Note: A: Change curves of yields of reducing sugars under different temperatures; B: Change curves of conversion rate of naringin under different temperatures.

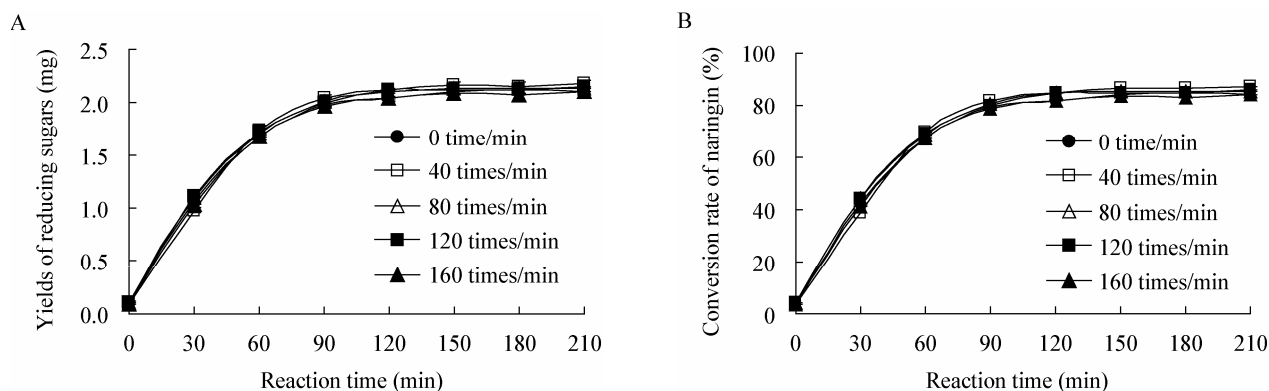


图9 振荡速率对柚皮苷酶解作用的影响

Figure 9 Effects of vibration rate on hydrolysis of naringin

注: A: 不同振荡速率下的还原糖生成量变化曲线; B: 不同振荡速率下的柚皮苷水解率变化曲线.

Note: A: Change curves of yields of reducing sugars under different vibration rates; B: Change curves of conversion rate of naringin under different vibration rates.

由图9可知,当水槽的振荡速率由0次/min增至160次/min时,酶解反应的速率、酶解反应达到平衡的时间、还原糖的生成量及柚皮苷的水解率均基本未发生变化。

2.7 动力学参数的测定及分析

根据前面的试验结果,在酶用量为8 U/mL,底物浓度为0.2 g/100 mL, pH值为5.0,温度为

50 °C的条件下,测定不同底物浓度下的反应初速率,分别以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/[v]$ 为纵坐标作图,得反应初速率与底物浓度的Lineweaver-Burk双倒数拟合曲线,其结果如图10所示。

由图10可知,反应初速率与底物浓度的Lineweaver-Burk双倒数拟合方程为: $y=0.0094x+22.736$,同时算得 $K_m=413.44$ mg/L, $V_{max}=0.022$ g/(min·L)。

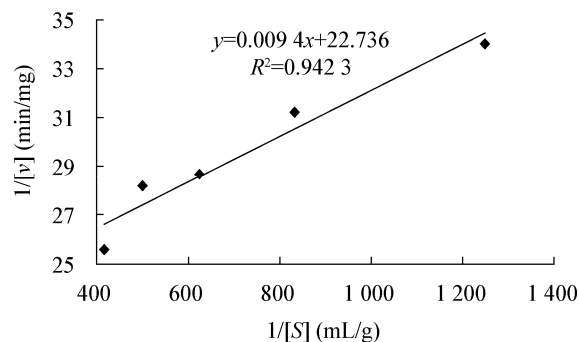


图 10 反应初速率与底物浓度的 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线

Figure 10 Fit curve of Lineweaver-Burk plot between initial rate and substrate concentration

3 结论

柚皮苷在柚苷酶的作用下, 水解生成柚皮素、鼠李糖和葡萄糖, 反应体系中还原糖的生成量与柚皮苷的水解量及柚皮素的生成量均呈现出良好的线性关系, 因此, 可由 DNS 法测得的还原糖生成量计算出柚皮苷的水解量和水解率, 进而对柚皮苷酶解生成柚皮素的动态过程进行分析。利用 DNS 法优化柚皮苷的酶解过程, 得到最适酶用量为 8 U/mL, 底物浓度为 0.2 g/100 mL, pH 值为 5.0, 温度为 50 °C。在此条件下, 柚皮苷酶解 150 min 后可达到平衡, 柚皮苷水解率达到 85%。通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测得柚苷酶催化柚皮苷生成柚皮素反应的米氏常数 K_m 为 413.44 mg/L, 最大反应速率 V_{max} 为 0.022 g/(min·L)。

参考文献

[1] Chang HY, Lee YB, Bae HA, 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: 234-241.

- [2] 刘亚萍. 柚皮素的制备方法研究[J]. 光谱实验室, 2008, 25(6): 1292-1294.
- [3] 崔莉, 张振海, 孙娥, 等. 聚山梨酯80辅助酶法制备柚皮素的研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2412-2416.
- [4] 黄建蓉. 磁场影响有机介质中酶促合成柚皮苷酯机理及其特性研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2010.
- [5] Youn SH, Kim HJ, Kim TH, et al. Lipase-catalyzed acylation of naringin with palmitic acid in highly concentrated homogeneous solutions[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 46: 26-31.
- [6] Lee SJ, Kim JC, Kim MJ, et al. Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearotherophilus* maltogenic amylase to give glycosylated naringin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47: 3669-3674.
- [7] Kometani T, Nishimura T, Nakae T, et al. Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(4): 645-649.
- [8] Ni H, Cai HN, Xiao AF, et al. Improved purification of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* naringinase[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27: 2539-2544.
- [9] Ribeiro IA, Rocha J, Sepodes B, et al. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 52/53: 13-18.
- [10] Ribeiro IAC, Ribeiro MHL. Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet α -rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008, 51(1/2): 10-18.
- [11] Nunes MAP, Vila-Real H, Fernandes PCB, et al. Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(7): 2129-2147.
- [12] Vila-Real HJ, Alfaia AJ, Calado ART, et al. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion[J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 565-570.