

一株产柚苷酶的罗伦隐球酵母的鉴定及柚苷酶表达

李利君,倪辉^{1,2},肖安风¹,蔡慧农^{1,2*}

(¹集美大学生物工程学院,厦门 361021)

(²厦门市食品生物工程技术研究中心,厦门 361021)

摘要:【目的】对一株新分离的、产生柚苷酶的疑似酵母菌株 Jmudeb008 进行鉴定,确定其分类的种属关系,阐明葡萄糖对该菌株表达柚苷酶的影响。【方法】利用形态观察、核酸分析及生理生化实验对 Jmudeb008 进行种属鉴定;用含有 0.5 g/L 柚皮苷及不同浓度葡萄糖的培养基培养 Jmudeb008,通过检测培养过程柚皮苷、柚皮素及葡萄糖浓度的变化研究葡萄糖对 Jmudeb008 表达柚苷酶的影响。【结果】Jmudeb008 的菌落形态及个体形态都与典型的酵母相似,其 26S rDNA D1/D2 区域和 5.8S rDNA-ITS 区域的序列与罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 的同源性为 99%,葡萄糖发酵试验阴性,尿酶试验阳性,重氮基蓝 B 试验阳性、硝酸盐还原试验阴性符合该菌种特性,因此鉴定为罗伦隐球酵母。Jmudeb008 在以柚皮苷为唯一碳源的培养基中或当培养基中葡萄糖消耗完以后会分泌柚苷酶,而有葡萄糖存在时不分泌柚苷酶。【结论】分离得到了能产柚苷酶的罗伦隐球酵母,该酵母产柚苷酶受葡萄糖分解代谢调节。

关键词: 柚苷酶; 罗伦隐球酵母; 鉴定; 葡萄糖

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1202-06

柚苷酶是由 α -L-鼠李糖苷酶 (α -L-rhamnosidase) 和 β -D-葡萄糖苷酶 (β -D-glucosidase) 组成的复合酶^[1-3],它在柑桔类果汁脱苦^[4]、鼠李糖生产^[5]、食品增香^[6-7]、制药工业^[8]等方面具有重要的应用价值。

虽然人们对柚苷酶的生产进行了大量的研究,如, Bram^[9]、汪钊等^[10]、Puri 等^[1]、赖崇德等^[11]、郭倩^[12]、张嘉林等^[13]对黑曲霉发酵柚苷酶进行了研究, Norouziyan 等^[14]对青霉产柚苷酶进行了研究,但商品柚苷酶的价格仍然十分昂贵,其应用成本远远高于工业产品生产所能承受的范围,如,2009 年美国 Sigma 公司商品中柚苷酶制剂 (N1385 Naringinase from *Penicillium decumbens*, 酶活力约为 300 U/g) 的价格为 1623.9 元/kg,日本田边制药生产的活力为

150 U/g 柚苷酶制剂的售价约为 2600 元/kg,用该柚苷酶对柚子果汁脱苦,其用酶成本高达 4.1 元/L 果汁。因此,提高柚苷酶的发酶生产水平,使柚苷酶的使用成本降低到工业应用所能承受的范围具有重要意义。

选育优良的柚苷酶生产菌株是降低柚苷酶生产成本的重要途径,虽然许多学者用黑曲霉、青霉作为出发菌株选育获得了柚苷酶高产菌株,但用霉菌发酵柚苷酶存在菌种选育困难、发酵周期长、发酵耗氧量高、发酵液粘稠等缺陷;最近, Puri 等分离得到了产柚苷酶的 *Staphylococcus xylosum* MAK2^[15],但相关研究表明该菌存在潜在的致病性^[16],不符合工业发酵的要求。因此,发现新的柚苷酶资源,分离获得生长快、安全性高、易实现工业发酵的柚苷酶产生菌株

基金项目:福建省科技计划重点项目 (2009N0044); 科技人员服务企业行动项目 (2009GJC40050); 集美大学中青年创新团队专项基金 (2008A002); 厦门市科技项目 (3502Z20093023)

* 通信作者。Tel: +86-592-6181764; E-mail: chn@jmu.edu.cn

作者简介:李利君 (1973-), 女, 河北人, 博士, 主要从事微生物菌种选育工作研究。E-mail: ljli@jmu.edu.cn

收稿日期:2010-02-03; **修回日期:**2010-05-05

对于降低柚苷酶的生产成本、拓展其应用具有重要的意义。

在前期研究中,我们从腐烂蜜柚堆集地的土壤中采样,以柚皮苷为唯一碳源配制培养基对菌种进行富集后分离出了一株疑似酵母菌、实验室编号为 Jmudeb008 的菌株。本研究通过形态观察、26S rDNA D1/D2 区域和 5.8S rDNA-ITS 区域的序列分析及理化试验对菌株 Jmudeb008 进行鉴定;用含有柚皮苷及不同浓度葡萄糖的培养基培养 Jmudeb008,研究葡萄糖浓度对 Jmudeb008 分泌柚苷酶的影响,为后续对该菌株的应用研究提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:菌株 Jmudeb008 由集美大学生物工程学院发酵工程研究室分离获得。分离过程简述如下:(1)从福建省平和县 10 个堆放腐烂蜜柚的地点采集土壤样品,混合均匀后取土壤样品 3 g 接入 50 mL 富集培养基中,在 28℃、180 r/min 的摇床上富集培养 5 d;再取富集的培养液 5 mL 接入 50 mL 新鲜富集培养基中,在 28℃、180 r/min 的摇床上富集培养 4 d。(2)取富集所得培养液 1 mL,稀释后各取 0.1 mL 涂布于选择培养基上,在 28℃ 的培养箱中培养 3-5 d。选择涂布培养后的平板上产生水解圈的菌株进行平板划线分离,并纯化得纯种,进行斜面保种。

1.1.2 培养基:① 富集培养基:柚皮苷 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, CaCl_2 0.2 g, 酵母膏 0.3 g, 牛肉膏 0.3 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.0;② 分离培养基:柚皮苷 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, CaCl_2 0.2 g, 酵母膏 0.3 g, 牛肉膏 0.3 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.0;③ 无糖培养基:柚皮苷 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.2 g, CaCl_2 0.2 g, 酵母膏 0.3 g, 牛肉膏 0.1 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.0;④ 低糖培养基:葡萄糖 2 g, 柚皮苷 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.2 g, CaCl_2 0.2 g, 酵母膏 0.3 g, 牛肉膏 0.1 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.0;⑤ 高糖培养基:葡萄糖 10 g, 柚皮苷 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.2 g, CaCl_2 0.2 g, 酵母膏 0.3 g, 牛肉膏 0.1 g, 蒸馏水 1 L, pH 4.0;⑥ 完全培养基、YPD 培养基、糖发酵培养基、酵母含氮基础培养基(YNB)

和硝酸盐还原实验培养基参照文献[17]配制;⑦ 尿素琼脂培养基参照文献[18]配制。

1.1.3 主要试剂: K_2HPO_4 (AR)、 CaCl_2 (AR)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AR)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AR)、葡萄糖(AR)、NaOH(AR)、冰醋酸(AR)、无水乙醇(AR)、一缩二乙二醇(CP)、酵母浸膏、蛋白胨、牛肉浸膏等购于国药集团化学试剂有限公司;柚皮苷(标准品)及柚苷素(标准品)购于 Sigma-Aldrich, Inc.;甲醇(色谱纯)购于 TEDIA company Inc.;酵母基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技(北京)有限公司、DNA 凝胶回收试剂盒 DW02-2、dNTPs、Taq 酶、10 × PCR buffer 均购自广州东盛生物科技有限公司;GoldView 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.1.4 本实验所用引物如表 1 所示,引物由上海鼎安生物科技有限公司合成。

表 1 分子鉴定所用引物

Table 1 The primers for molecular identification	
Primer	Sequence (5'→3')
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATGATATGC

1.2 形态观察

菌落形态及个体形态观察参见沈萍等^[18]提供的方法,细胞核染色参见李明霞等^[19]提供的方法。

1.3 26S rDNA 的 D1/D2 区及 ITS 序列的 PCR 扩增及序列比对分析

用完全培养基培养 Jmudeb008,收集对数生长期的菌体,按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒的说明书步骤提取 Jmudeb008 菌株的基因组总 DNA,并以此为模板采用 26S rDNA 的通用引物 NL1 和 NL4^[20-21],ITS 的通用引物 ITS1 和 ITS4^[21] 对其进行扩增。PCR 条件为:95℃ 5 min;94℃ 40 s,57℃ 40 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min。回收 PCR 产物交由英俊(Invitrogen)生物技术有限公司测序,测序结果在 GenBank 上进行同源比对。

1.4 生理生化反应

糖发酵实验、重氮基蓝 B 试验和硝酸盐还原实验参照文献[17]提供的方法,尿酶实验参照文献[18]提供的方法进行。

1.5 Jmudeb008 的培养及分析测定

在 7 L NBS 罐中配制 5 L 的无糖、低糖和高糖培养基,灭菌后冷却至室温,接入 250 mL Jmudeb008 的种子液,在 28℃、700 r/min 的摇床上培养,每隔

8 h取样一次,测定相应发酵液中的残糖量、柚皮苷含量、柚皮素含量。

1.6 残糖的测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法^[22]。

1.7 柚皮苷、柚皮素的测定

高效液相色谱法:液相色谱仪为 Waters 1525 型色谱仪,检测器为 Waters 2487 紫外检测器,流动相组成为 60%的甲醇和 40%的超纯水;测定时进样量为 20 μL ,等度洗脱,流速为 1 mL/min,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,测量波长为 280 nm。

2 结果

2.1 Jmudeb008 的及形态观察

图 1 为 Jmudeb008 的菌落及细胞形态,由图 1-A 可知,Jmudeb008 的菌落乳白偏黄,表面光滑,不透明,边缘整齐,菌落隆起,菌落中间凸起,与酵母菌的菌落形态相符合;由图 1-B 可知,Jmudeb008 的细胞呈椭圆形,用显微镜测量大小,结果表明菌体为近圆形,直径为 2-3 μm \times 3-4 μm ;用 YPD 培养基培养 Jmudeb008 至对数期,进行细胞核染色,结果如图 1-B 所示,Jmudeb008 的细胞具有细胞核;根据菌株 Jmudeb008 的菌落和个体形态可初步判断该菌株为酵母菌。

2.2 Jmudeb008 的 26S rDNA D1/D2 区域和 5.8S rDNA-ITS 区域的序列分析

提取 Jmudeb008 的 DNA 为模板,用酵母 26S rDNA D1/D2 区域的通用引物 NL1 和 NL4 及酵母 ITS 区域通用引物 ITS1 和 ITS4 为引物,进行 PCR

表 2 Jmudeb008 的 26S rDNA D1/D2 和 5.8S rDNA-ITS 序列同源性分析结果

Table 2 The homology analysis results of the sequences of the D1/D2 region of 26S rDNA and 5.8S-ITS of Jmudeb008

Identify items	Homology/%	GenBank accession No.	Identify results
Sequences of 26S rDNA D1/D2	99	GU369970	<i>Cryptococcus laurentii</i>
Sequences of 5.8S rDNA-ITS	99	GU369971	<i>Cryptococcus laurentii</i>

表 3 Jmudeb008 生理生化实验结果

Table 3 The results of physiological and biochemical experiments of Jmudeb008

Names	Glucose fermentation test	Urease tests	DBB test	Nitrate reduction test
Jmudeb008	-	+	+	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	+	+	-

2.3 Jmudeb008 的生理生化鉴定

为了进一步验证核酸序列分析的结果,根据文献[18],选择葡萄糖发酵,尿酶实验,重氮基蓝 B (DBB) 实验和硝酸盐还原实验等生理生化实验验证 Jmudeb008 是否是罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*),结果显示(表 3),Jmudeb008 的葡萄糖发

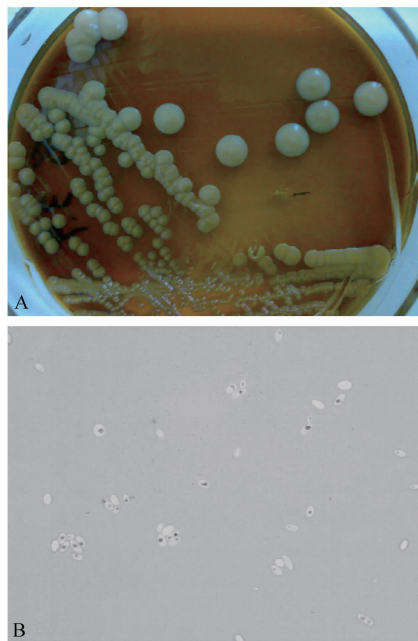


图 1 Jmudeb008 的菌落形态、个体形态及核染色

Fig.1 The colony morphology and individual form & nuclear staining. A: Colony characteristics; B: Individual form and nuclear staining (400 \times).

反应。对相应 PCR 产物进行测序,利用 BLAST 软件将所得基因序列与 GenBank 数据库的序列进行同源性分析。结果表明 Jmudeb008 的 26S rDNA D1/D2 和 5.8S rDNA-ITS 两个区域的序列与罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 的同源性均为 99%。根据种内差异小于 1%,不同种的菌株差异一般大于 1% 的基本原则可以确定 Jmudeb008 为罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) (表 2)。

酵试验,尿酶试验,重氮基蓝 B (DBB) 试验和硝酸盐还原试验的结果都与罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 的特征一致。

2.4 以柚皮苷为唯一碳源培养 Jmudeb008 的柚苷酶表达规律

在以柚皮苷为唯一碳源的无糖培养基中接种

Jmudeb008 菌株,每隔 8 h 取样一次,测定柚皮苷及柚苷素浓度的变化,结果显示(图 2),接种后 8 h 以内,柚皮苷的浓度下降的幅度较小,8-16 h 柚皮苷浓度呈现快速下降的趋势,同时柚皮素的浓度快速增加,说明此时 Jmudeb008 已分泌产生柚苷酶,将柚皮苷分解成柚皮素;16 h 后柚皮苷基本消耗殆尽,而柚皮素的浓度基本不变化。

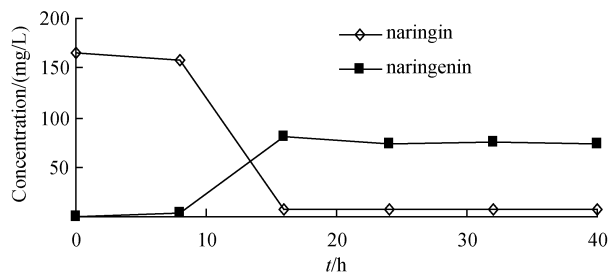


图 2 用无糖培养基培养 Jmudeb008 的基本特征

Fig. 2 The basic characteristics of Jmudeb008 cultured with medium without glucose.

2.5 用低糖培养基培养 Jmudeb008 的柚苷酶表达规律

将 Jmudeb008 接种在柚皮苷含量为 0.5 g/L,葡萄糖含量为 2 g/L 的低糖培养基中进行培养,每隔 8 h 取样一次,测定糖浓度、柚皮苷及柚苷素浓度的变化,结果如图 3 所示。由图 3 可知,在 0-4 h 这个阶段, Jmudeb008 培养液中的葡萄糖快速消耗,至 24 h 时,葡萄糖的浓度基本降至 0,而此阶段柚皮苷的含量几乎不变,也未检测到柚皮素含量的变化,说明未分泌柚苷酶;从 24 h 开始,柚皮苷的浓度快速降低,柚苷素的浓度缓慢上升,说明此阶段 Jmudeb008 菌株分泌了柚苷酶,将柚皮苷分解成柚皮素。

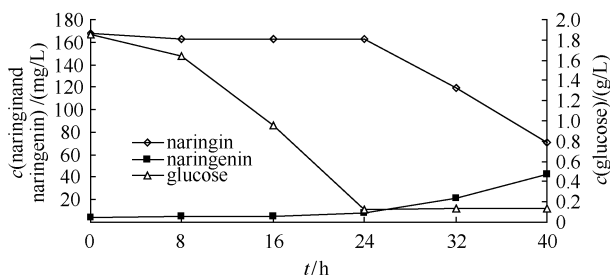


图 3 用低糖培养基培养 Jmudeb008 的基本特征

Fig. 3 The basic characteristics of Jmudeb008 cultured with low glucose medium.

2.6 用高糖培养基培养 Jmudeb008 的柚苷酶表达规律

在柚皮苷含量为 0.5 g/L,葡萄糖含量为 10 g/L

的高糖培养基中接种 Jmudeb008 进行培养,每隔 8 h 取样一次,测定糖浓度、柚皮苷及柚苷素浓度的变化,结果如图 4 所示。由图 4 可知,在整个培养过程中,葡萄糖的浓度不断在下降,至发酵结束时仍然没降至 0;接种后的前 8 h,由于糖浓度较高,直到培养结束时(40 h)仍有部分葡萄糖没消耗完;而在该过程中,柚皮苷的含量几乎没有变化,同时也未发现柚皮素积累,这说明在此期间 Jmudeb008 并没有分泌柚苷酶。

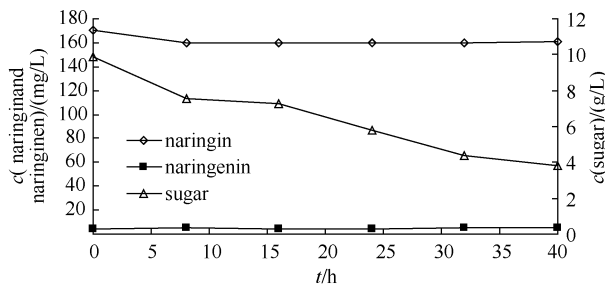


图 4 用高糖培养基培养 Jmudeb008 的基本特征

Fig. 4 The basic characteristics of Jmudeb008 cultured with high glucose medium.

3 讨论和结论

以柚皮苷为唯一碳源配制培养基,分离获得了一株能利用柚皮苷的酵母 Jmudeb008;本研究综合运用了形态特征、核酸序列分析和生理生化试验等方法对菌株 Jmudeb008 进行了菌种鉴定。形态学观察及核染色结果表明 Jmudeb008 是酵母菌;26S rDNA D1/D2 区域和 5.8S rDNA-ITS 区域的序列分析表明该菌株为罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*);菌株 Jmudeb008 的葡萄糖发酵试验,尿酶试验,DBB 试验以及硝酸盐还原试验的结果均与权威鉴定手册所提供的罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 的种属特性一致;这些结果说明新分离的菌株 Jmudeb008 是罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*)。

柚苷酶是一种由两种酶活性构成的复合酶,其中, α -L-鼠李糖苷酶的功能是将柚皮苷(naringin)水解成普鲁宁(pruin)和鼠李糖(rhamnose), β -D-葡萄糖苷酶的功能是将普鲁宁水解成柚皮素和葡萄糖(glucose)^[1]。表征柚苷酶活力最经典的方法是检测能否将柚皮苷水解成柚皮素^[1-3],目前有 2 种方法可用于检测柚苷酶的总活力,一种是用 DAVIS 法检测柚皮苷是否被分解成柚皮素^[23],另一种是用液相色谱法检测柚皮苷是否被分解成柚皮素^[24-25];此

外,如果针对 α -L-鼠李糖苷酶及 β -D-葡萄糖苷酶当中的一种酶,则可用对硝基苯酚法检测酶活力;与其他 2 类柚苷酶活性测定方法相比,用液相色谱检测柚皮苷向柚皮素转化的方法表征柚苷酶活性具有不需要进行复杂的前处理、检测结果不受普鲁宁含量影响、底物特异高等优点。用无糖培养基和低糖培养基培养罗伦隐球酵母 Jmudeb008,在培养过程中检测到了柚皮苷被分解成柚皮素,表明在这两种培养条件下罗伦隐球酵母 Jmudeb008 产生了柚苷酶;而用低糖培养基及高糖培养基培养罗伦隐球酵母 Jmudeb008 的过程中,当培养基中葡萄糖未消耗完时,未检测出柚苷酶向柚皮素转化的生化过程,表明在这两种条件下罗伦隐球酵母 Jmudeb008 未分泌受柚苷酶。这些结果说明罗伦隐球酵母 Jmudeb008 具有合成柚苷酶的能力,但其柚苷酶的表达受到葡萄糖分解代谢调节。

国内外有许多柚苷酶产生菌的报导,如曲霉和青霉, *Staphylococcus xylosus*, 但未见任何有关酵母菌产生柚苷酶的研究报导。本文第一次报导了罗伦隐球酵母可产生柚苷酶,相比黑曲霉和青霉,罗伦隐球酵母为单细胞酵母,具有生长快速、在培养过程中不形成菌丝团、发酵液粘度低等优点。相关研究证实,罗伦隐球酵母是果树及其它果树根系及叶片的正常真菌区系的组成成分^[17],也是许多成熟水果表面菌落的组成成分;而且,张红印^[27]用罗伦隐球酵母干粉制剂经小鼠急性经口毒性实验证实罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 属于实际无毒类微生物,具有较高的生物安全性。罗伦隐球酵母 Jmudeb008 产柚苷酶受到葡萄糖分解代谢的调节,可通过选育抗葡萄糖分解代谢菌株及控制发酵过程中葡萄糖浓度的方式来解除葡萄糖分解代谢调节,提高柚苷酶的发醇产量。因此,本研究提供了一种新的柚苷酶微生物资源——罗伦隐球酵母,用该菌株生产柚苷酶具有易培养、发酵周期短、发酵液粘度低、安全性高、酶产量易提高等优点,如对其进行深入的研究,提高柚苷酶的产量,建立产业化生产工艺,由于可缩短柚苷酶的发醇周期、降低发酵液的粘度、减少溶氧所必须的动力消耗,因此可降低柚苷酶的生产成本,具有良好的后续研究参考价值。

参考文献

[1] Puri M, Banerjee A, Banerjee UC. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. *Process Biochemistry*, 2005, 40(1): 195-201.

[2] Sekeroglu G, Fadloglu S, Gogus F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *European Food Research and Technology*, 2006, 224(1): 55-60.

[3] Puri M, Banerjee UC. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(3): 207-217.

[4] Thomas DW, Smythe CV, Labbee MD. Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. *Food Research*, 1958, 23: 591-598.

[5] Daniels L, Linhardt R, Bryan B, Mayerl F, Pickenhagen M. Methods for producing rhamnose. US Patent, 1990, 4, 933, 281.

[6] Caldini C, Bonomi F, Pifferi P, Lanzarani G, Galente Y. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidase for aroma enhancement in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 1994, 16(4): 286-291.

[7] 黄顺利, 刘夏峰, 李玉娥, 陈永森, 杨峰. 糖苷酶在食品风味改良上的应用研究. *食品科技 (Food Science and Technology)*, 2007, (11): 138-141.

[8] 刘欣, 崔昱, 杨凌. 糖苷酶与药物研发. *天然产物研究与开发 (Natural Product Research and Development)*, 2005, 17(2): 223-228.

[9] Bram B, Solomons GL. Production of the enzyme naringinase by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology*, 1965, 13(6): 842-845.

[10] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶产生菌的选育及发酵条件研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1995, 22(1): 18-22.

[11] 赖崇德, 蔡华静, 夏海林, 施孝活, 刘金国, 涂国全. 一株产柚苷酶菌株黑曲霉的分离及菌种鉴定的初步研究. *江西农业大学学报 (Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis)*, 2005, 27(5): 759-763.

[12] 郭倩. 产柚苷酶高产菌株的筛选、鉴定及产酶特性研究. 四川农业大学硕士毕业论文, 2008.

[13] 张嘉林, 谈小芳, 孙君社, 刘萍. 黑曲霉 S-05 产柚苷酶液态发酵培养条件的优化. *中国酿造 (China Brewing)*, 2008, (15): 19-23.

[14] Norouzian D, Hosseinzadeh A, Nouri Inanlou D, Moazami N. Production and partial purification of naringinase by *penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(5): 471-473.

[15] Puri M, Kaur A, Singh RS, Singh A. Response surface optimization of medium components for naringinase production from *Staphylococcus xylosus* MAK2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(1): 181-191.

- [16] Tselenis-Kotsowilis AD, Koliomichalis MP, Papavassiliou JT. Acute pyelonephritis caused by *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 16(3): 593-594.
- [17] Barnett JA, Payne A, Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 17-192.
- [18] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [19] 李明霞, 唐荣观. 酵母的不同显色法的研究. 菌物学报(*Mycosystema*), 1986, 5(1): 30-36.
- [20] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统(*Mycosystema*), 2002, 21(1): 27-32.
- [21] 惠丰立, 柯涛, 褚学英, 张彩莹, 陶爱丽. 大曲中酵母菌种群结构及多样性分析(*Journal of Food Science and Biotechnology*), 2009, 28(1): 102-106.
- [22] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 2002.
- [23] Puri M, Kalra S. Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21(5): 753-758.
- [24] Chien PJ, Sheu F, Shyu YT. Monitoring enzymatic debittering in grapefruit juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2001, 9(2): 115-120.
- [25] Ribeiro IAC, Ribeiro MHL. Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. 2008, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1): 10-18.
- [26] 张红印. 罗伦隐球酵母对水果采后病害的生物防治及其防治机理研究. 浙江大学博士毕业论文, 2004.

Characterization of *Cryptococcus* sp. Jmudeb008 and regulation of naringinase activity by glucose

Lijun Li¹, Hui Ni^{1,2}, Anfeng Xiao¹, Huinong Cai^{1,2*}

(¹ School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(² Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: [**Objective**] We identified a new isolated naringinase-producing yeast strain named as Jmudeb008, and analyzed its naringinase-producing ability cultured with different composition and concentration of carbon sources. [**Methods**] The strain was identified based on conventional phenotypic methods and sequences of the D1/D2 region of 26S rDNA and 5.8S-ITS. Media with different composition and concentration of carbon sources were used in shaking culture of Jmudeb008. The activity of naringinase was evaluated by analyzing the concentration of naringin, naringenin and glucose during 48 h culture. [**Results**] The Jmudeb008's sequences of the D1/D2 region of 26S rDNA and 5.8S-ITS were 99% identical with *Cryptococcus laurentii*. Further glucose fermentation test, urease test, DBB (diazotization based blue) test and nitrate reduction test were coincided with results of DNA sequencing. Therefore, Jmudeb008 was identified as *Cryptococcus laurentii*. When Jmudeb008 was cultured in the medium with naringin as the only carbon source, it could synthesize naringinase. However, when glucose was available, the synthesis of naringinase was repressed. [**Conclusion**] The new isolated naringinase-producing yeast strain Jmudeb008 was identified as *Cryptococcus laurentii*. The glucose in medium repressed naringinase expression.

Keywords: naringinase; *Cryptococcus laurentii*; identification; regulation of naringinase producing

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key projects of Science and Technology Program of Fujian Province (2009N0044), the Scientific and Technical Services for Enterprise Projects (2009GJC40050), the Foundation for Innovative Research Team of Jimei University (2008A002) and the Key projects of Science and Technology Program of Xiamen city (3502Z20093023)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6181764; E-mail: chn@jmu.edu.cn

Received: 3 February 2010/Revised: 5 May 2010