

一株棘孢曲霉的鉴定及其柚苷酶合成规律

王迪¹, 倪辉^{1,2,3,*}, 李利君^{1,3,4}, 陈峰², 肖安风^{1,3,4}, 蔡慧农^{1,3,4}, 苏文金¹

¹集美大学生物工程学院, 厦门 361021

² Department of Food, Nutrition and Packaging Sciences, Clemson University, SC 29631, USA

³福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心, 厦门 361021

⁴厦门市食品与生物工程技术研究中心, 厦门 361021

摘要:【目的】对一株新分离的柚苷酶产生菌株 JMUdb058 进行鉴定, 并研究该菌株柚苷酶合成的基本规律。【方法】利用形态观察、28S rDNA 序列分析对 JMUdb058 进行鉴定; 通过反相高效液相色谱测定 JMUdb058 粗酶液对柚皮苷的水解作用, 鉴定其柚苷酶活性; 分别用 11 种碳源和 6 种氮源进行摇瓶发酵, 研究碳源、氮源对该菌株分泌柚苷酶的影响; 在固态和液态条件下分别进行发酵, 测定该菌株合成柚苷酶的能力。【结果】菌株 JMUdb058 的菌落形态和显微形态符合曲霉属黑色组的典型形态特征, 其 28S rDNA 序列与棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 的相似度达 100%; 用液态和固态两种发酵方法制得的粗酶液均可将标准溶液中的柚皮苷水解产生普鲁宁和柚皮素, 还可有效地水解琯溪蜜柚汁中的柚皮苷; 用橘皮苷、柚皮苷、芸香苷和鼠李糖为碳源, 胰蛋白胨和豆饼粉等有机物为氮源时可分泌柚苷酶; 该菌株在固态发酵中表现出很强的柚苷酶发酵能力, 用 HPLC 法测定的 α -L-鼠李糖苷酶和柚苷酶活力分别达到 5903 和 1939 U/gds, 用 Davis 法测定的柚苷酶活力达到 72232 U/gds。【结论】本研究首次发现棘孢曲霉能够分泌柚苷酶, 含鼠李糖基团的物质可作为其产柚苷酶的诱导物。棘孢曲霉 JMUdb058 固态发酵产柚苷酶的能力突出, 是一种高产柚苷酶的微生物新资源。

关键词:棘孢曲霉, 鉴定, 柚苷酶, 碳源, 氮源, 固态发酵

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)07-0691-11

柚苷酶 (naringinase) 同时具有 α -L-鼠李糖苷酶 (α -L-rhamnosidase, E. C. 3. 2. 1. 40) 和 β -D-葡萄糖苷酶 (β -D-glucosidase, E. C. 3. 2. 1. 21) 两种酶的活性, 可作用于柚皮苷、橘皮苷、芸香苷、槲皮素等结构末端连有 α -鼠李糖和 β -葡萄糖的糖苷类化合物^[1-2], 柚苷酶特殊的酶学活性使得其在食品和医药领域具有许多潜在的应用价值, 如柑橘果汁的脱

苦、改善葡萄酒和茶叶产品风味、普鲁宁和鼠李糖的生产、生物转化类固醇以及黄酮类物质的去糖基化等, 另外, 柚苷酶还可用于测定多糖、糖苷和糖脂类化合物的结构^[3]。柚苷酶可将柚皮苷水解成无苦味的柚皮素^[1], 可用于去除柑橘果汁中由柚皮苷引起的苦味。此方法操作简单、专一性强、营养成分损失少, 因此, 柚苷酶是一种重要的食品工业酶制剂。

基金项目:国家自然科学基金(31271914); 厦门市杰出青年科学基金(3502Z20126008); 集美大学科研创新团队基金(2010A006)

* 通信作者。Tel: +86-13015914929; Fax: +86-592-6181774; E-mail: nihui@jmu.edu.cn

作者简介:王迪(1988-), 女(满), 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 主要从事微生物酶与活性物质研究。E-mail: wangddmail@163.com

收稿日期:2012-12-04; **修回日期:**2013-02-21

柚苷酶的微生物来源主要包括细菌和真菌, Puri 等^[4]从土壤中分离得到产柚苷酶の木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*), Norouzian 等^[5]利用青霉 (*Penicillium*) 发酵生产柚苷酶, 一些学者^[6-9]对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 发酵制备柚苷酶的条件、工艺参数等进行了研究, 相关研究还报道了罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*)^[10]、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)^[11]、酱油曲霉 (*Aspergillus sojae*)^[12]等柚苷酶产生菌株; 目前, 由青霉发酵的柚苷酶已经实现产业化, 已有商品酶制剂上市销售^[13], 但价格昂贵, 如酶活力 300 U/g 的柚苷酶制剂每 250 g 售价 19427 元人民币, 难适应食品工业应用的需求。引起此问题的主要原因是缺少柚苷酶高产菌株及高效的发酵工艺。因此, 发现新的柚苷酶微生物来源, 并研究其发酵柚苷酶的条件仍然具有重要的科学研究及应用价值。

在前期研究中, 本实验室从堆放腐烂柚子的地点取样, 利用柚皮苷为选择性碳源配制培养基筛选得到一株深褐色丝状真菌 JMUdb058。本研究通过形态观察结合分子生物学技术对该菌株进行鉴定, 并研究其柚苷酶合成的基本规律, 为后续研究及应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 柚苷酶产生菌株 JMUdb058。由福建省平和县堆放腐烂蜜柚的地点采集土壤样品, 经富集培养后涂布于以柚皮苷为选择性碳源的培养基上, 根据水解圈挑取菌株进行平板划线分离, 并纯化得到纯培养物。

1.1.2 培养基: 斜面培养基采用 PDA 培养基^[14], 用于菌株的活化; 液体培养基采用 PDB 培养基 (PDA 培养基不加琼脂), 用于收集菌体; 查氏琼脂 (CA)、查氏酵母膏 (CYA)、麦芽汁琼脂 (MEA) 培养基^[15], 用于观察菌落形态; 摇瓶发酵基础培养基 (g/L) 为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0、 KH_2PO_4 1.0、 $(NH_4)_2SO_4$ 1.5、KCl 0.5、 KNO_3 1.5、无水 $CaCl_2$ 0.1、酵母膏 2.0、柚皮苷 2.69、乳化剂 Triton X-100 1.0% (V/V), 加水至 1 L, 初始 pH 6.0, 121℃ 灭菌 20 min; 固态发酵培养基 (g) 为柚皮粉 1000、豆饼粉 150、蒸馏水 1000。

1.1.3 主要试剂: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR)、 KH_2PO_4

(AR)、KCl (AR)、无水 $CaCl_2$ (AR)、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (AR)、NaOH (AR)、乳化剂 Triton X-100、酵母浸膏、胰蛋白胨、一缩二乙二醇等购于国药集团化学试剂有限公司; 柚皮苷、柚皮素、橘皮苷、芸香苷等 (纯度 $\geq 98\%$) 购于西安小草植物科技有限责任公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯) 购于 TEDIA company, Inc.; 酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 购于天根生化科技 (北京) 有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒 DW02-2、质粒小量提取试剂盒、dNTPs、Taq 酶、10 × PCR buffer 均购于广州东盛生物科技有限公司; GoldView 核酸染料购于北京赛百盛基因技术有限公司。引物为 NL1 5'-GCATATCAATAAGCGAGGAA AAG-3'; NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3', 由上海鼎安生物科技有限公司合成。

1.1.4 琯溪蜜柚汁: 购于福建省国农农业发展有限公司, 呈乳白色, 柚皮苷含量 466.9 $\mu g/mL$ 、pH 3.5、糖度 9.1%。

1.1.5 柚皮粉: 琯溪蜜柚果皮烘干至恒重, 粉碎至粉末状并过 60 目筛, 柚皮苷含量 41.2 mg/g。

1.2 形态鉴定

参照沈萍^[14]及 Hong^[16]提供的方法, 菌落形态观察采用三点点接法分别接种于 CA、CYA、PDA、MEA 培养基平板上, 于 28℃ 恒温培养 3-5 d 观察; 个体形态观察采用插片培养法接种于 PDA 培养基, 28℃ 恒温培养 3-5 d 观察。

1.3 28S rDNA 序列的 PCR 扩增、序列比对和系统发育分析

用 PDB 培养基摇瓶培养 JMUdb058, 收集对数生长期的菌体, 液氮研磨破壁, 按酵母基因组 DNA 提取试剂盒的说明书步骤提取 JMUdb058 菌株的基因组总 DNA, 并以此为模板采用 28S rDNA 的通用引物 NL1 和 NL4 对其进行扩增。PCR 条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 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, 运用 MEGA 4.0 中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统发育树。

1.4 柚苷酶活力的鉴定

1.4.1 液态发酵: 采用基础培养基, 装液量 30 mL、以 10% 接种量接种于 250 mL 三角瓶 (单孢子菌悬液 OD_{600} 为 0.2), 28℃、转速 190 r/min 摇瓶发酵 168 h^[7], 发酵液于 4℃、15000 × g 冷冻离心 10 min,

取上清液即液态发酵粗酶液。按 1.9 进行酶反应,用高效液相色谱法测定柚皮苷的分解情况。

1.4.2 固态发酵:采用固态发酵培养基,装料量 10 g、以 1 mL 接种量接种于 250 mL 三角瓶(单孢子菌悬液 OD_{600} 为 2.0), 30℃ 发酵 192 h^[17-18], 用 100 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)震荡浸提 24 h, 定性滤纸抽滤, 滤液于 4℃、15000 × g 冷冻离心 10 min, 取上清液即固态发酵粗酶液。按 1.9 进行酶反应, 用高效液相色谱法测定柚皮苷的分解情况。

1.5 柚苷酶水解瑄溪蜜柚汁中柚皮苷试验

按 1.4 的方法分别制备液态发酵粗酶液和固态发酵粗酶液。其中, 液态发酵粗酶液经浓缩后, 用 HPLC 法测定柚苷酶活力为 243.2 U/mL, 固态发酵粗酶液经 HPLC 法测定酶活力为 113.4 U/mL。取 0.2 mL 酶液、1.8 mL 瑄溪蜜柚汁混合, 50℃ 恒温水浴锅中保温反应 1 h, 按 1.9 所示的方法用高效液相色谱法测定柚皮苷的分解情况。

1.6 碳源对菌株 JMUdb058 分泌柚苷酶的影响研究

摇瓶发酵基础培养基其他成分不变, 保持碳

源质量浓度为 1.5 g/L, 分别以柚皮苷、葡萄糖、可溶性淀粉、纤维素、鼠李糖、甘油、柠檬酸、橘皮苷、芸香苷、果胶、柚皮素为唯一碳源, 按 1.4.1 条件发酵 72 h, 检测生物量、柚苷酶和 α -L-鼠李糖苷酶活力。

1.7 氮源对菌株 JMUdb058 分泌柚苷酶的影响研究

摇瓶发酵基础培养基其他成分不变, 保持氮源质量浓度为 2.0 g/L, 分别以酵母膏、胰蛋白胨、黄豆饼粉、玉米浆、硫酸铵、硝酸钠为唯一氮源, 条件及检测指标同 1.6。

1.8 菌株 JMUdb058 柚苷酶发酵生产能力研究

参照国内外有关柚苷发酵条件优化的文献^[4,17-20]选取 5 种高产柚苷酶的培养基, 按对应的培养条件及操作方式进行发酵(表 1), 其中, 液态发酵时间为 168 h, 固态发酵为 192 h; 发酵结束按 1.4 操作制备柚苷酶粗酶液, 分别采用高效液相色谱法(测定 α -L-鼠李糖苷酶、柚苷酶活力)和 Davis 分光光度法检测酶活力。

表 1. 用于测定柚苷酶发酵能力的培养基

Table 1. Media for investigating the naringinase-producing capacity of JMUdb058

No.	Reference	Medium composition (g/L)	Fermentation condition
1	Mendoza ^[17]	pomelo peel powder 1000, (NH ₄) ₂ SO ₄ 100	Solid-state fermentation at 30℃
2	Mendoza ^[17]	pomelo peel powder 1000, soybean meal 150	Solid-state fermentation at 30℃
3	Wu ^[19]	naringin 3.5, corn steep liquor 4.0, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.0, KH ₂ PO ₄ 1.0, KCl 0.5, CaCl ₂ 0.1, Triton X-100 10, pH 6.0, sterilized for 20 min at 121℃	submerged fermentation at 34℃, 190 r
4	Puri ^[4]	citrus peel powder 2.0, peptone 10.0, beef extract 5.0, NaCl 5.0, pH 5.5 sterilized for 15 min at 121℃	submerged fermentation at 30℃, 200 r
5	Kumar ^[20]	naringin 1.0, rhamnose 5.0, peptone 2.5, glycine 0.1 mol, pH 4.5, sterilized for 20 min at 121℃	submerged fermentation at 28℃, 180 r

1.9 柚苷酶活力的测定

用 HPLC 法和 Davis 法两种方法测定酶活力。其中, HPLC 方法可在测定柚苷酶活力的同时测定其 α -L-鼠李糖苷酶的活力。除 1.8 中同时用 HPLC 和 Davis 法测定酶活力外, 本研究中其它部分的酶活力均采用 HPLC 方法测定。

1.9.1 高效液相色谱法:准确量取 1.0 mL 柚皮苷标准溶液(250 μ g/mL)与 950 μ L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0)混合, 置于 50℃ 恒温箱保温 5 min, 迅速加入 50 μ L 酶溶液, 50℃ 恒温箱中反应 5 min 后立即于 100℃ 沸水浴中加热 20 min, 迅速冷却, 15000 × g 离心 10 min 后 0.45 μ m 滤膜过滤, 利用 HPLC 法测定柚皮苷、柚皮素的含量。空白对照以

灭活的酶液代替酶溶液, 按上述方法操作^[21]。

采用 Waters e2695 高效液相色谱仪(Waters e2695 Separations Module、Waters 2489 UV/Visible Detector)及 Symmetry 反相 C18 柱(3.0 mm × 250 mm, 5.0 μ m)测定反应液中柚皮苷和柚皮素的含量。流动相为水(A)、甲醇(B)、乙腈(C), 洗脱条件为 0-4 min A:B:C=95:1.5:3.5, 4-20 min A:B:C=5:28.5:66.5, 20-28 min A:B:C=95:1.5:3.5, 28-32 min=95:1.5:3.5, 检测波长 280 nm, 进样体积 20 μ L, 柱温 35℃。

酶活力单位定义: 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(U); 生成

1 μg 柚皮素所需的柚苷酶的量定义为一个柚苷酶活力单位(U)。

1.9.2 Davis 法:参照 Puri^[4] 等方法,取 0.9 mL 0.05% 柚皮苷标准溶液(W/V, pH4.0)与 100 μL 酶溶液混合均匀,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱保温 60 min,迅速吸取 100 μL 反应液并加入 90% 一缩二乙二醇 5 mL、4 mol/L NaOH 溶液 100 μL ,摇匀后于 28 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min,在 420 nm 波长下测定吸光度。酶活力单位定义为在此反应体系下,消耗 1 μg 柚皮苷所需的柚苷酶量。

1.10 生物量的测定

将摇瓶发酵液于 2500 $\times g$ 离心 10 min,取沉淀用蒸馏水洗涤 3 次,置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,冷却后称重。

1.11 统计分析

应用 SPSS17.0 软件(SPSS Inc. H, Chicago, IL)计算平均值和标准偏差,并对结果进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 菌株 JMUdb058 的形态观察

菌株 JMUdb058 在 PDA 培养基上生长迅速,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 菌落直径达 3.0–4.5 cm,质地紧密,呈丝绒状,气生菌丝较多,中心下凹、四周突起、边缘平坦、背面平坦呈放射状,中心呈黑色、边缘白色、背面白色,菌落表面有干粉,无渗出液;在 MEA 培养基上生长迅速,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 菌落直径达 3.0–4.0 cm,菌落质地紧密,呈丝绒状,中心下凹、四周突起、边缘平坦、背面平坦呈放射状,中心呈深褐色至黑色、边缘白色、背面中心呈黄色四周白色,菌落表面有干粉,无渗出液;在 CYA 培养基上生长迅速,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 菌落直径约 4.0 cm,菌落质地紧密平坦、呈丝绒状、无突起,菌落中心呈黑色、四周黄至深褐色、边缘白色、背面乳白色,菌落表面有干粉,无渗出液;在 CA 培养基上生长缓慢,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 菌落直径为 1.5–3.0 cm,菌落中心下凹、四周突起、边缘呈放射状,质地疏松,生长初期呈白色,后期表面产生深褐色干粉,菌落呈圆环状。

JMUdb058 顶囊初生时呈球形或辐射状,后呈球形或椭圆形,直径 50–65 μm ;孢梗茎无色或淡褐色,表面平滑;分生孢子圆或椭圆形淡褐色,表面粗

糙有刺突,直径约 5 μm ,串生于小梗顶端,小梗单层,全部表面可育。

菌株 JMUdb058 的菌落形态和显微形态符合曲霉属的特征^[15, 22],可确定该菌株为曲霉属(*Aspergillus*)。

2.2 菌株 JMUdb058 的 28S rDNA 序列分析及系统发育树

用引物 NL1 和 NL4 对菌株 DNA 模板进行 PCR 扩增,得到分子量约 600 bp 的扩增产物,回收测序发现其由 620 个碱基组成,利用 BLAST 软件将所得基因序列(登录号为 JQ301899)与 GenBank 中的序列进行同源性分析,结果显示菌株 JMUdb058 与棘孢曲霉的同源性达 100%,与黑曲霉、炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*)等菌株同源性为 97%。收集这些菌株序列进行多序列匹配比对,通过 MEGA 4.0 软件构建系统发育树(图 1),结果表明 JMUdb058 位于曲霉属的分枝下,与 *Aspergillus aculeatus* NRRL 360(EU381181)的系统发育关系最为密切,相似度达到 100%。

根据形态观察、28S rDNA 序列比对分析以及系统发育分析结果,可将菌株 JMUdb058 鉴定为曲霉属的棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*),命名为棘孢曲霉 JMUdb058。

2.3 棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶活力验证

柚苷酶是由 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶两种酶构成的酶复合体,能够特异性地将柚皮苷水解成柚皮素。首先在 α -L-鼠李糖苷酶的作用下柚皮苷水解生成普鲁宁和鼠李糖,普鲁宁在 β -D-葡萄糖苷酶的作用下进一步水解生成柚皮素和葡萄糖^[23]。根据此作用机理,可利用高效液相色谱法监测柚皮苷的分解和普鲁宁、柚皮素的生成,从而对柚苷酶的活力进行验证和测定^[24]。

由图 2 可知,液态发酵和固态发酵两种方法得到的粗酶液均可水解柚皮苷标准品并生成普鲁宁和柚皮素,说明对棘孢曲霉 JMUdb058 进行液态及固态发酵均可产生柚苷酶。另外,用 HPLC 法测定酶活性发现固态发酵和液态发酵的柚苷酶中 α -L-鼠李糖苷酶和柚苷酶的活性比例不同,液态发酵的粗酶液浓缩后其中 α -L-鼠李糖苷酶和柚苷酶的活力分别为 899.0 和 243.2 U/mL(两种酶活力的比值为 3.70),固态发酵粗酶液中 α -L-鼠李糖苷酶和柚苷酶的活力分别为 663.3 和 113.4 U/mL(两种酶活力

的比值为 5.84)。

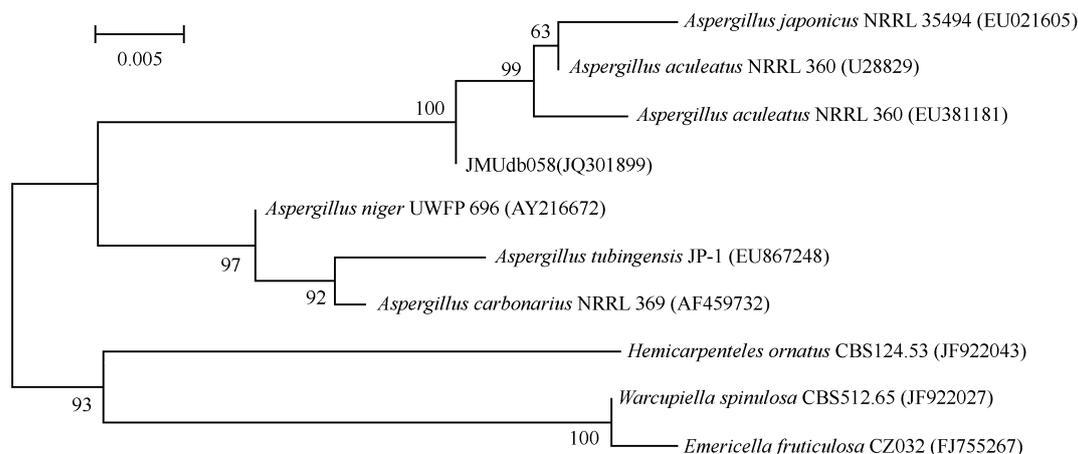


图 1. 菌株 JMUdb58 28s rDNA 序列系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree derived from 28S rDNA sequences of strain JMUdb058. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.5% sequence divergence.

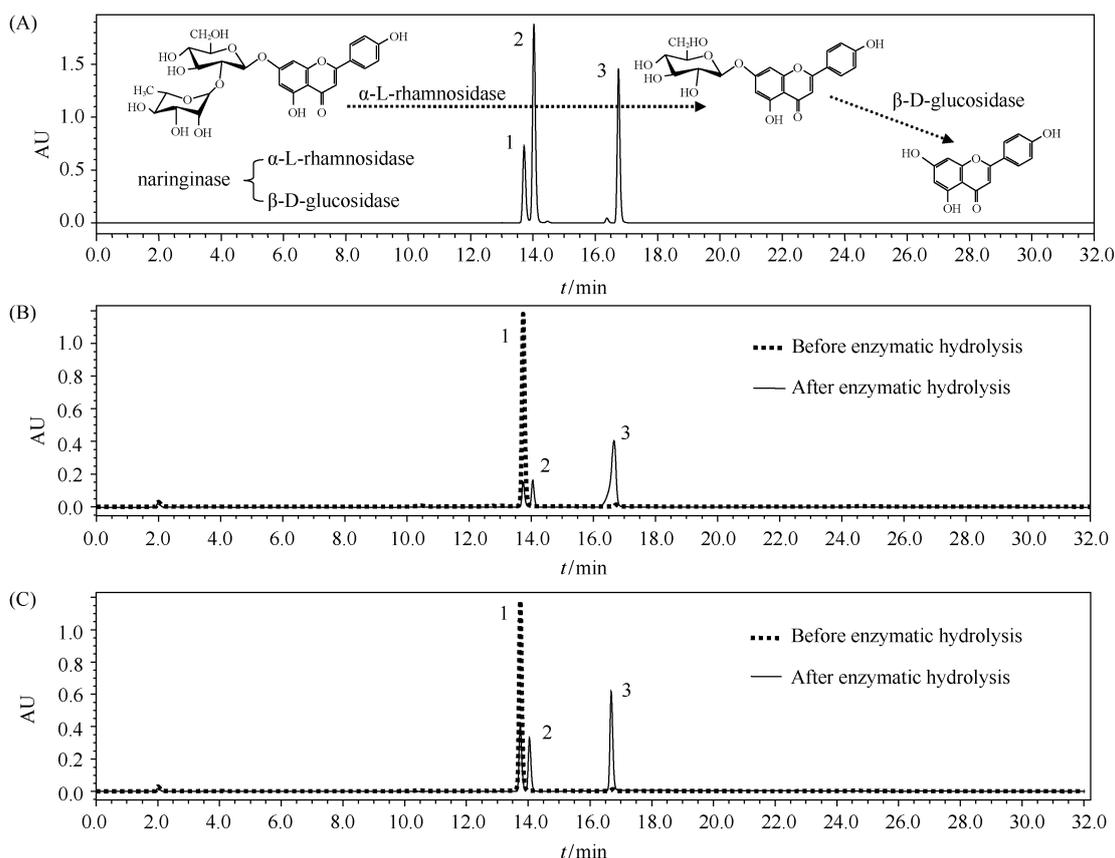


图 2. 棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶粗酶液水解柚皮苷 HPLC 图

Figure 2. HPLC chromatogram of enzymatic hydrolysis of standard naringin to prunin and naringenin by the crude naringinase from *Asperillus aculeatus* JMUdb058. A: standard naringin (1), prunin (2) and naringenin (3); B: naringinase of submerged-fermentation; C: naringinase of solid-state fermentation.

2.4 棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶水解琯溪蜜柚果汁中的柚皮苷

琯溪蜜柚是柑橘属水果中柚类的代表性水果,果大皮薄、肉嫩多汁,果实榨汁后含有高浓度的柚皮苷(466.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$),导致果汁具有明显的苦味。如图3所示,两种方法发酵得到的柚苷酶均可将琯溪蜜柚果汁中的柚皮苷水解成柚皮素,50 $^{\circ}\text{C}$ 下水解1 h

柚皮苷去除率均可达95%以上,且柚皮苷可完全转化为无苦味的柚皮素,残留的柚皮苷和中间产物(普鲁宁)的量很少。这说明菌株JMUdb058的柚苷酶为酸性柚苷酶,能够在酸性环境下(琯溪蜜柚果汁pH为3.5)有效地去除果汁中的柚皮苷,具有良好的应用价值。

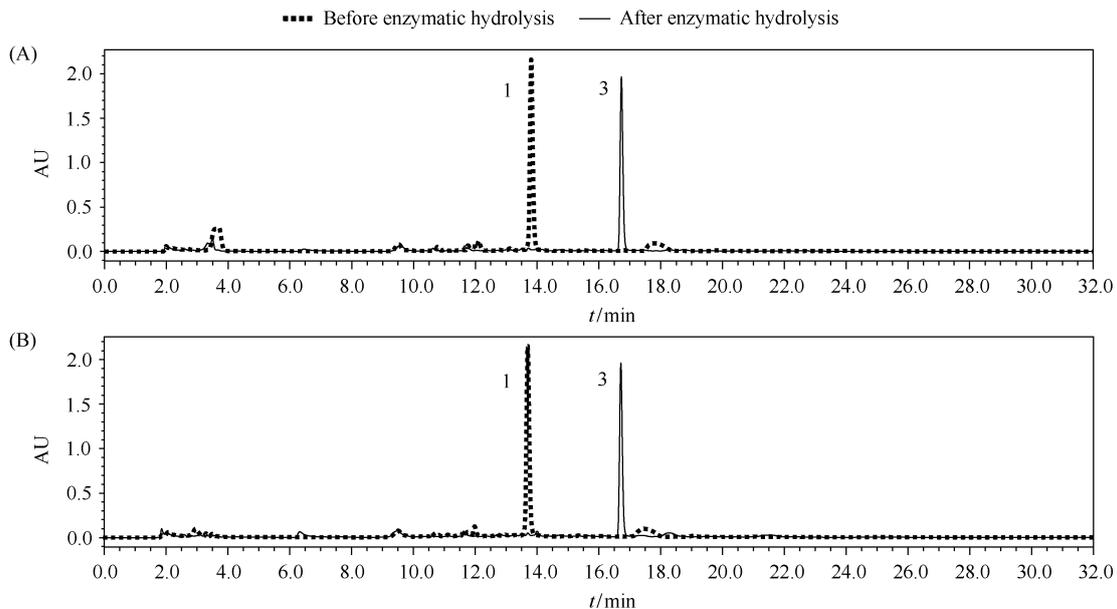


图3. 棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶粗酶液水解琯溪蜜柚果汁中的柚皮苷 HPLC 图

Figure 3. HPLC chromatogram of enzymatic hydrolysis of naringin in pomelo juice by the crude naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMUdb058. A: naringinase of submerged-fermentation; B: naringinase of solid-state fermentation.

2.5 碳源对棘孢曲霉 JMUdb058 产柚苷酶的影响

如表2所示,当以橘皮苷、柚皮苷、芸香苷、鼠李糖为唯一碳源时,棘孢曲霉 JMUdb058 可生长并分泌柚苷酶,橘皮苷更有利于其菌体生长,发酵所得 α -L-鼠李糖苷酶、柚苷酶酶活最高(分别为180.6 U/mL, 34.2 U/mL),以柚皮苷为唯一碳源时单位生物量所分泌的酶活力最高,芸香苷、鼠李糖为碳源产生的酶活较低;而以柚皮素、柠檬酸、果胶、纤维素、葡萄糖、可溶性淀粉、甘油为唯一碳源,棘孢曲霉 JMUdb058 可生长,但不能合成柚苷酶。

2.6 氮源对棘孢曲霉 JMUdb058 产柚苷酶的影响

如表3所示,棘孢曲霉 JMUdb058 在试验的6种氮源上均可生长,但仅在添加有机氮源时分泌柚苷酶,而以硫酸铵、硝酸钠两种无机化合物为氮源时不分泌柚苷酶;胰蛋白胨为氮源时酶活力最高, α -L-鼠李糖苷酶活力为191.1 U/mL,柚苷酶活力为31.9 U/mL。

表2. 碳源对棘孢曲霉 JMUdb058 产柚苷酶的影响

Table 2. Effect of carbon sources on the production of naringinase by *Aspergillus aculeatus* JMUdb058

Carbon sources	α -L-Rhamnosidase activity/(U/mL)	Naringinase activity/(U/mL)	Biomass/(g/L)
Hesperidin	180.6 \pm 21.9 ^a	34.2 \pm 1.1 ^a	2.04 \pm 0.27 ^b
Naringin	112.3 \pm 24.4 ^b	17.3 \pm 2.9 ^b	0.80 \pm 0.19 ^{ef}
Rutin	61.1 \pm 6.3 ^c	10.7 \pm 1.1 ^c	1.10 \pm 0.27 ^{de}
Rhamnose	68.9 \pm 10.2 ^c	3.6 \pm 0.3 ^d	1.01 \pm 0.10 ^{def}
Cellulose	0 ^d	0 ^e	3.20 \pm 0.12 ^a
Glucose	0 ^d	0 ^e	1.88 \pm 0.12 ^b
Pectin	0 ^d	0 ^e	1.36 \pm 0.42 ^{cd}
Naringenin	0 ^d	0 ^e	1.76 \pm 0.52 ^{bc}
Starch	0 ^d	0 ^e	1.64 \pm 0.14 ^{bc}
Glycerine	0 ^d	0 ^e	0.81 \pm 0.14 ^{ef}
Citric acid	0 ^d	0 ^e	0.62 \pm 0.22 ^f

Values are means \pm SD, $n = 4$. Means with different superscript letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. 氮源对棘孢曲霉 JMUdb058 产柚苷酶的影响

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of naringinase by *Aspergillus aculeatus* JMUdb058

Nitrogen source	α -L-Rhamnosidase activity/(U/mL)	Naringinase activity/(U/mL)	Biomass/(g/L)
Tryptone	191.1 \pm 11.5 ^a	31.9 \pm 3.6 ^a	1.36 \pm 0.12 ^a
Soybean meal	41.2 \pm 10.9 ^c	13.5 \pm 3.5 ^b	1.68 \pm 0.21 ^a
Yeast extract	81.2 \pm 18.4 ^b	11.0 \pm 1.3 ^b	1.48 \pm 0.17 ^a
Corn syrup	32.9 \pm 2.3 ^c	3.9 \pm 1.2 ^c	1.38 \pm 0.23 ^a
Ammonium sulphate	0 ^d	0 ^c	1.40 \pm 0.32 ^a
Sodium nitrate	0 ^d	0 ^c	1.50 \pm 0.42 ^a

Values are means \pm SD, $n = 4$. Means with different superscript letters within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

2.7 棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶发酵能力测定结果

目前,用于测定柚苷酶活力的方法主要有 Davis 分光光度法(Davis 法)^[4-9, 17-18, 20, 23, 25-26]和高效液相色谱法(HPLC 法)^[10, 19, 21, 24, 27],但二者对柚苷酶活力单位的定义不同,为将棘孢曲霉 JMUdb058 的发酵生产性能与国内外的报道进行比较,选取 5

种高产柚苷酶的培养基在相应的条件下进行发酵,并分别用 HPLC 法和 Davis 法测定柚苷酶活力。

棘孢曲霉 JMUdb058 固态发酵产酶能力如表 4 所示,用培养基 1 和培养基 2 进行固态发酵,用 HPLC 法测得 α -L-鼠李糖苷酶活力分别为 5903.1 U/gds 和 4450.5 U/gds,柚苷酶活力分别为 1939.3 U/gds 和 1753.4 U/gds;用 Davis 法测得柚苷酶活力分别为 72232.7 U/gds 和 65447.2 U/gds。Mendoza^[17]利用臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)以柚皮为基质固态发酵柚苷酶,Davis 法测得柚苷酶活力为 2.58 IU/mL(换算为本文酶活定义单位为 11233.2 U/gds),汪钊^[18]利用 *Aspergillus niger* ZG86 以豆饼粉固态发酵得到的柚苷酶活力换算后为 5000 U/gds;对比可知,棘孢曲霉 JMUdb058 固态发酵产柚苷酶的能力远远高于目前相关报道的菌株(产酶活力约是 *A. foetidus* 的 6 倍,是 *A. niger* ZG86 的 13 倍,)

表 4. 固态发酵柚苷酶能力试验结果

Table 4. α -L-Rhamnosidase, naringinase activities in different media and references by solid-state fermentation

Number of medium and reference	α -L-Rhamnosidase (U/gds)*		Naringinase (U/gds)		Conversion formula
	HPLC	Davis	HPLC	Davis	
1	5903.1 \pm 135.0	-	1939.3 \pm 9.1	72232.7 \pm 231.7	-
2	4450.5 \pm 54.0	-	1753.4 \pm 29.2	65447.2 \pm 100.8	-
Mendoza, 2010 ^[17]	-	-	-	11233.2	2.58 IU/mL \times 580.53 * \times 75 mL/10 g
Zhao Wang, 1996 ^[18]	-	-	-	5000	15000 U/g soybean meal \times 1/3

Values are means \pm SD, $n = 3$. * U/gds means one unit per gram of dry substrate. * 580.53 is the molecular weight of naringin.

棘孢曲霉 JMUdb058 液态发酵产酶能力的对比如表 5 所示,依照吴升山^[19]、Puri^[4]、Kumar^[20]优化的培养基及条件进行液态发酵时,棘孢曲霉 JMUdb058 发酵的 α -L-鼠李糖苷酶活力分别为 338.6、154.6、154.9 U/mL, HPLC 法测定的柚苷酶

活力分别为 82.0、39.8、17.1 U/mL,用 Davis 法测定的柚苷酶活力分别为 3811.0、3658.1 U/mL;与 Puri^[4]、肖安风^[33]等报道比较,棘孢曲霉 JMUdb058 液态发酵柚苷酶的产量稍低,但高于赖崇德^[29]、张晨^[31]、陈玲^[30]等报道的菌株。

表 5. 液态发酵柚苷酶能力试验结果

Table 5. α -L-Rhamnosidase, naringinase activities in different media and references by submerged fermentation

Number of medium and reference	α -L-Rhamnosidase (U/gds)		Naringinase (U/mL)		Conversion formula
	HPLC	Davis	HPLC	Davis	
3	338.6 \pm 7.1	-	82.0 \pm 1.6	-	-
4	154.6 \pm 3.3	-	39.8 \pm 3.2	3811.0 \pm 12.5	-
5	154.9 \pm 2.8	-	17.1 \pm 1.5	3658.1 \pm 76.1	-
Shengshan Wu, 2010 ^[19]	994.0	-	276.0	-	-
Puri, 2010 ^[4]	-	-	-	5166.7	8.9 IU/mL \times 580.53
Kumar, 2011 ^[20]	-	-	-	10031.6	17.28 IU/mL \times 580.53
Kui Hu, 2003 ^[28]	-	-	-	1282	-
Chongde Lai, 2005 ^[29]	-	-	-	955.6	-
Ling Chen, 2007 ^[30]	-	-	-	770.06	-
Chen Zhang, 2007 ^[31]	-	-	-	342	-
Jialin Zhang, 2008 ^[32]	-	-	-	429.09	-
Anfeng Xiao, 2010 ^[33]	1133.0	-	788.42	-	-

Values are means \pm SD, $n = 3$.

3 讨论

菌株 JMUdb058 经形态观察和核酸序列分析鉴定为棘孢曲霉 (*Asperillus aculeatus*)。虽然棘孢曲霉具有丰富的胞外酶,但目前国内外尚未见棘孢曲霉产柚苷酶的研究报道,本研究发现棘孢曲霉能够分泌柚苷酶,液态、固态发酵两种发酵方法均可用于此菌种发酵柚苷酶,且在固态发酵条件下其产柚苷酶能力与国内外报道相比具明显优势。

柚皮苷是柑橘果汁苦味的主要来源之一,其在水中的苦味阈值为20 mg/L,当果汁中的柚皮苷含量达到30 mg/L时,果汁即带有苦味^[26]。大多天然柑橘果汁中的柚皮苷含量都在50 mg/L以上,其强烈的苦味严重影响柑橘果汁的风味和口感^[27]。无论是对 JMUdb058 进行液态还是固态发酵,其产生的柚苷酶都能够有效地水解瑯溪蜜柚汁中的柚皮苷,该结果说明棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶和其它曲霉的柚苷酶相似,也是一种酸性酶^[2-3],能在果汁的酸性环境下高效地去除柑橘果汁中的柚皮苷。

柚皮苷、橘皮苷、芸香苷、 α -L-鼠李糖均可诱导棘孢曲霉 JMUdb058 分泌柚苷酶,而在碳源仅含有葡萄糖、纤维素、柠檬酸、果胶、柚皮素、可溶性淀粉、甘油的情况下发酵,菌体可生长但不分泌柚苷酶。此研究结果表明棘孢曲霉 JMUdb058 在柚苷酶发酵过程中对碳源具有特殊的要求,此特性与 Puri^[26]对柚苷酶是一种诱导酶的描述一致,其发酵需要添加柚苷酶水解产物或底物作为诱导物;对比柚皮苷、橘皮苷、芸香苷、 α -L-鼠李糖与其它碳源的结构差异可知,橘皮苷、芸香苷与柚皮苷具有相似的化学结构,三者分子结构末端都以 α -(1,2) 或 α -(1,6) 糖苷键连有 α -L-鼠李糖苷配体,这些物质与 α -L-鼠李糖的共同特征是都具有鼠李糖基,而柚皮素、葡萄糖、纤维素、柠檬酸和可溶性淀粉等碳源不具有鼠李糖基。由此可推测,在合成柚苷酶的过程中, α -L-鼠李糖及其糖苷配体是调控棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶基因表达的关键物质,能够解除柚苷酶基因的阻遏状态,在结构末端连有鼠李糖苷的碳源都能诱导柚苷酶基因表达。该推测在其它相关研究中得到了证实, Kumar^[20]报道了橘皮苷、芸香苷、鼠李糖能够诱导 *Aspergillus niger* VB07 产生柚苷酶, Miyata^[34]、Tamayo-Ramos^[35]证明鼠李糖对 α -L-鼠李糖苷酶的诱导作用发生在转录水平。另外,橘皮苷、柚皮苷、

芸香苷、鼠李糖对分泌柚苷酶的调控作用存在差异,本研究发现橘皮苷、柚皮苷对棘孢曲霉 JMUdb058 柚苷酶的诱导作用更强,而鼠李糖则更有利于 α -L-鼠李糖苷酶的产生,柚苷酶产量相对较低; Kumar^[25]在考察不同诱导物对 *Aspergillus niger* MTCC1344 柚苷酶产量的影响时发现柚皮苷诱导的柚苷酶产量最高,鼠李糖次之,橘皮苷最低。

氮源是微生物生长代谢的重要影响因素,有机氮源中含有丰富的氨基酸,在柚苷酶合成过程中能够及时提供合成酶所需的氨基酸,有利于柚苷酶的积累。本研究中采用胰蛋白胨为氮源发酵棘孢曲霉 JMUdb058 时柚苷酶的产量明显高于其他氮源(如豆饼粉),胰蛋白胨含有大量的氨基酸及小肽,有利于微生物吸收利用,该结果说明添加氨基酸丰富的有机氮源能促进柚苷酶的合成,此结果与 Puri^[7]的研究一致。本研究中采用的硫酸铵、硝酸钠两种无机氮源培养棘孢曲霉 JMUdb058 未检测到有柚苷酶或 α -L-鼠李糖苷酶的合成,与相关文献^[7]报道不同。其原因可能是此部分研究中的碳源浓度较低(1.5 g/L),仅能用于维持微生物必需的新陈代谢,且无机氮源转化为氨基酸需消耗大量的能量及碳链骨架,酶合成所需要的氨基酸供应不足,从而降低了柚苷酶的合成;当增大碳源的浓度时,液态发酵(3.5 g/L)的 α -L-鼠李糖苷酶(338.6 U/mL)及柚苷酶(82.0 U/mL)的酶活性会快速上升。该结果说明,适当提高碳氮源比例,有利于提高柚苷酶的产量。

碳源和氮源不仅对柚苷酶的活性具有调节作用,还会导致其 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶活力的比例发生变化。柚苷酶是由 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶两种酶组成的酶复合体,这两种酶的合成需要不同的诱导物, α -L-鼠李糖苷酶需要含有结构中含有鼠李糖基的物质为诱导物,而 β -D-葡萄糖苷酶的合成需要含有末端葡萄糖基的物质为基质^[2-3]。固态发酵和液态发酵由于培养基成分不同而会导致其中 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-葡萄糖苷酶活性比例发生变化,在本研究中就体现为 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶的活性比例不同。固态发酵的碳源成分复杂,不仅含有一定量的柚皮苷,还含有丰富的葡萄糖苷类物质,如淀粉、纤维素和半纤维素,这些成分会对酶活性比例产生重要影响。而液态发酵采用成分相对简单的柚皮苷为碳源,但由于氮源采用有机氮源,其成分也较复杂,也会导致发酵液中 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶的比例变化。如,采用固态

发酵培养基(柚皮粉1000 g、豆饼粉150 g、蒸馏水1000 g)所获的粗酶液中 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶活力的比值为5.84,而采用表1中的培养基1(柚皮粉1000 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 g、蒸馏水1000 g)所获的粗酶液中 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶活力的比值为3.04(由表4数值计算得到);液态发酵中,采用基础培养基及表1中培养基3和5虽然以柚皮苷为碳源,但由于它们有机氮源的种类及添加量不同,其粗酶液的 α -L-鼠李糖苷酶对柚苷酶的活性比值也不同,分别为3.70、4.13和9.06(表5数值计算得到)。

在液态发酵中,由于棘孢曲霉 JMUdb058 出现菌丝贴壁、菌丝成团、发酵液发粘等现象而导致菌丝体的营养吸收和酶的分泌受到抑制^[10],这是其柚苷酶发酵能力未完全显现的根本原因。因此,可通过防止其菌丝结团和降低发酵液粘度而提高其液态发酵柚苷酶的产量。大量研究证明,固态发酵产酶量常大于液态发酵,Viniegra-González^[36]利用黑曲霉发酵蔗糖酶、果胶酶和单宁酶,固态发酵酶产量均远远大于液态发酵;Asther^[37]利用黑曲霉发酵阿魏酸酯酶,也得到固态发酵产量高于液态的结论。与液态发酵相比,固态发酵常以农副产品下脚料(如柚皮)为原料,还具有培养基成本低、发酵废水排放少等优点^[38];因此,固态发酵是目前工业酶发酵生产的最常用方法。棘孢曲霉 JMUdb058 在固态发酵中柚苷酶产量远远高于目前相关文献报道的其他菌株,这一特性十分有利于工业化生产,说明利用棘孢曲霉 JMUdb058 固态发酵柚苷酶具有良好的应用前景。

综上所述,棘孢曲霉 JMUdb058 分泌的柚苷酶能够高效分解柑橘果汁中的柚皮苷,其固态发酵柚苷酶的能力强,因此,该菌株是一种高产柚苷酶的微生物新资源。本研究对促进柚苷酶的发酵生产和应用技术进步具有重要意义。

参考文献

- [1] Yadav V, Yadav PK, Yadav S, Yadav KDS. α -L-Rhamnosidase: A review. *Processing Biochemistry*, 2010, 45(8): 1226-1235.
- [2] Ribeiro H. Naringinase: occurrence, characteristics, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(6): 1883-1895.
- [3] Puri M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1):49-60.
- [4] Puri M, Kaur A, Barrow CJ, Singh RS. Citrus peel influences the production of an extracellular naringinase by *Staphylococcus xylosus* MAK2 in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 715-722.
- [5] Norouzian D, Hosseinzadeh A, Inanlou DN, Moazami N. Production and partial purification of naringinase by *Penicillium decumbens* PTCC 5248. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(5): 471-473.
- [6] Thammawat K, Pongtanya P, Juntharasri V, Wongvithoonyaporn P. Isolation, preliminary enzyme characterization and optimization of culture parameters for the production of naringinase isolated from *Aspergillus niger* BCC25166. *Kaestsart Journal (Natural Science)*, 2008, 42(1):61-72.
- [7] 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.
- [8] 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*, 1995, 22(1): 18-22.
- [9] Zhang Y, Zeng H, Yao H, Zheng B. Isolation and screening of naringinase producing strain and identification. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(2): 196-201. (in Chinese) 张怡,曾红亮,姚辉,郑宝东.柚苷酶产生菌的分离筛选及鉴定. *中国食品学报*, 2012, 12(2): 196-201.
- [10] Li L, Ni H, Xiao A, Cai H. Characterization of *Cryptococcus* sp. Jmudb008 and regulation of naringinase activity by glucose. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(9): 1202-1207. (in Chinese) 李利君,倪辉,肖安风,蔡慧农.一株产柚苷酶的罗伦隐球酵母的鉴定及柚苷酶表达. *微生物学报*, 2010, 50(9): 1202-1207.
- [11] Soria F, Ellenrieder G, Grasselli M, Navarro del Canizo A, Cascone O. Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(16): 1265-1268.
- [12] Chang HY, Lee YB, Bae HA, Huh JY, Nam SH, Sohn HS, Lee HJ, Lee SB. Purification and characterization of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with in vitro inhibition of HMG-CoA reductase. *Food Chemistry*, 2011, 124(1): 234-241.
- [13] Sigma-Aldrich. N1385 Naringinase from *Penicillium decumbens*: [http://www. sigmaaldrich. com/catalog/product/sigma/n1385? lang = zh®ion = CN](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1385?lang=zh®ion=CN).
- [14] 沈萍,陈向东.微生物学实验.第四版.北京:高等教育出版社,2007.
- [15] 齐祖同.中国真菌志(第五卷)曲霉属及其相关有性型.北京:科学出版社,1997.
- [16] Guan H, Yang L, Guo J, Ma X, Wang H, You S. Morphological and molecular identification of *Aspergillus*

- versicolor D-1 with selective reduction ability. *Journal of Traditional Medicines*, 2007, 2(1): 39-44.
- [17] Mendoza CA, Cuevas GL, Lizama UG, Ortiz VE. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(19): 1964-1969.
- [18] 汪钊, 毛富根. 柚苷酶固体发酵及消除橘子汁苦味的研究. *食品科学*, 1996, 6(17): 17-20.
- [19] Wu S, Cai H, Su W, Ni H, Li L, Xiao A. Optimization of culture medium for producing α -Rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus niger* DB056. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2010, 4(10): 193-201. (in Chinese)
吴升山, 蔡慧农, 苏文金, 倪辉, 李利君, 肖安风. 黑曲霉 DB056 发酵 α -鼠李糖苷酶和柚苷酶培养基的优化研究. *中国食品学报*, 2010, 4(10): 193-201.
- [20] Kumar VV, Babu PKSR. Optimization of fermentation parameters for enhanced production of naringinase by soil isolate *Aspergillus niger* VB07. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(3): 827-829.
- [21] Ni H, Chen F, Cai HN, Xiao AF, You Q, Lu YZ. Characterization and preparation of *Aspergillus niger* naringinase for debittering citrus juice. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): C1-7.
- [22] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科技技术出版社, 1976.
- [23] Puri M, Kaur A, Schwarz WH, Singh S, Kennedy J. Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48(1): 58-62.
- [24] Riberio IA, Ribeiro MH. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 2008, 19(4): 432-438.
- [25] Kumar VV. Comparative studies on inducers in the production of naringinase from *Aspergillus niger* MTCC 1344. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(45): 7683-7686.
- [26] Puri M, Banerjee UC. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advance*, 2000, 18(3): 207-217.
- [27] 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.
- [28] Hu K, Li B, Wu Z. Screening and cultivation of naringinase-producing fungus. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2003, 25(2): 141-143. (in Chinese)
胡奎, 李帮秀, 吴珍龄. 柚苷酶生成菌的选育. *西南农业大学学报*, 2003, 25(2): 141-143.
- [29] Lai C, Cai H, Xia H, Shi X, Liu J, Tu G. A study on screening, cultivation and identification of naringinase-producing strain of *Aspergillus niger* A166. *Acta Agricultural University Jiangxiensis*, 2005, 27(5): 759-763. (in Chinese)
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株鉴定的初步研究. *江西农业大学学报*, 2005, 27(5): 759-763.
- [30] Chen L, Tu X, Tu G. Screening of chemical resistant mutant strains with high naringinase-producing capacity by means of NTC induction. *Acta Agricultural University Jiangxiensis*, 2007, 29(4): 670-674. (in Chinese)
陈玲, 涂晓嵘, 涂国全. NTC 诱变筛选高产柚苷酶抗药性突变株. *江西农业大学学报*, 2007, 29(4): 670-674.
- [31] Zhang C, Liu Z, Zheng Y, Cai Z. Screening of naringinase producing strain B04 and its properties of enzyme production. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(5): 38-41. (in Chinese)
张晨, 刘志伟, 郑彦彤, 蔡植松. 产柚苷酶菌株 B04 的分离及产酶特性研究. *工业微生物*, 2007, 37(5): 38-41.
- [32] Zhang J, Tan X, Sun J, Liu P. Optimization of naringinase production by *Aspergillus niger* S-05 in liquid state fermentation. *China Brewing*, 2008, 15: 19-22. (in Chinese)
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基条件的优化. *中国酿造*, 2008, 15: 19-22.
- [33] Xiao A, Ni H, Wu S, Li L, Cai H. Optimization of fermentation conditions for producing naringinase by *Aspergillus niger*. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(6): 89-97. (in Chinese)
肖安风, 倪辉, 吴升山, 李利君, 蔡慧农. 黑曲霉产柚苷酶的发酵条件优化. *中国食品学报*, 2011, 11(6): 89-97.
- [34] Miyata T, Kashige N, Satho T, Yamaguchi T, Aso Y, Miake F. Cloning, sequence, analysis, and expression of the gene encoding *Spingomonas pancimobilis* FP2001 α -L-Rhamnosidase. *Current Microbiology*, 2005, 51(2): 105-109.
- [35] Tamayo-Ramos JA, Flippi M, Pardo E, Manzaneres P, Orejas M. L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 26-43.
- [36] Viniestra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez SdJ, Di 81301671 81301677, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering*

Journal, 2003, 13(2): 157-167.

- [37] Asther M, Haon M, Roussos S, Record E, Delattre M, Lesage-Meessen L, Labat M, Asther M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process*

Biochemistry, 2002, 38(5): 685-691.

- [38] Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 1999, 77(1): 149-163.

Identification and characterization of *Aspergillus aculeatus* JMUdb058 for naringinase production

Di Wang¹, Hui Ni^{1,2,3,*}, Lijun Li^{1,3,4}, Feng Chen², Anfeng Xiao^{1,3,4}, Huinong Cai^{1,3,4}, Wenjin Sun¹

¹College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China

²Department of Food, Nutrition and Packaging Sciences, Clemson University, SC 29631, USA

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

⁴Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China

Abstract: [**Objective**] A new naringinase-producing strain, JMUdb058 was identified and characterized. [**Methods**] The strain was identified by morphological observation and 28S rDNA homogeneous analysis. Naringinase was identified by monitoring the hydrolysis of naringin to prunin and naringenin using a reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The regulation of naringinase expression was studied by measuring naringinase activity of 11 different carbon sources and 7 nitrogen sources in shaking cultivation. The naringinase-producing capacity was investigated in both solid-state fermentation and submerged fermentation. [**Results**] The macro-morphology and micro-morphology of JMUdb058 corresponded to the characteristics of *Aspergillus* section Nigri Gams, and the 28S rDNA sequences showed homogeneity at 100% to *Aspergillus aculeatus*. Crude enzymes prepared by both submerged fermentation and solid-state fermentation could hydrolyze naringin to prunin and naringenin. In addition, the enzyme could remove naringin from citrus juice effectively. Carbon resources, including hesperidin, naringin, rutin and rhamnose, and organic nitrogen resources, i. e., tryptone, soybean meal, yeast extract and corn syrup were shown to express the naringinase. The strain had an outstanding ability to yield naringinase in the solid-state fermentation, which showed an α -L-rhamnosidase activity of 5903 U/gds by HPLC, and the naringinase of 1939U/gds by HPLC and 72232 U/gds by Davis method. [**Conclusion**] It is the first time to report a stain of *Aspergillus aculeatus* can produce naringinase, carbon source containing rhamnose groups are able to induce the enzyme expression. The stain JMUdb058 is a new microorganism source for high yield of naringinase, in particularly by the solid-state fermentation.

Keywords: *Aspergillus aculeatus*, identification, naringinase, carbon resources, nitrogen resources, solid-state fermentation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271914), by the Xiamen Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Xiamen (3502Z20126008) and by the Fund for Innovative Research Team of Jimei University (2010A006)

* Corresponding author. Tel: +86-13015914929; E-mail: nihui@jmu.edu.cn

Received: 4 December 2012/Revised: 21 February 2013