

# 黑曲霉N5-5 产单宁酶的酶学性质与固定化

何泽琪, 刘果, 阚启鑫, 杨国航, 曹庸

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本实验室自主分离的黑曲霉N5-5 所产单宁酶已发现对没食子酸丙酯具有良好酶解效果。为了单宁酶的工业化应用, 本次研究大批量培养单宁酶, 探究其对单宁酸的酶解效果及酶的固定化效果。发酵采用先液体扩培后固体发酵的形式, 提酶后利用陶瓷膜过滤技术纯化、浓缩酶液, 并对比冷冻干燥和喷雾干燥两种不同干燥方式, 还使用树脂载体对酶进行固定化。实验表明, 纯化后单宁酶酶活达 258.53 U/mL, 可水解 10%至 50%浓度的单宁酸, 其中 30%以下底物浓度酶解效果较好; 冷冻干燥对酶活影响不大而喷雾干燥使酶活降为 174.02 U/mL; 另外, 单宁酶通过树脂载体固定化后, 在实验条件下可重复使用至少 4 次。研究为提高黑曲霉N5-5 发酵所产单宁酶的媒介效率、降低酶解反应成本、实现商业化生产建立了理论基础。

**关键词:** 黑曲霉N5-5; 单宁酶; 酶固定化

文章编号: 1673-9078(2021)08-91-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0633

## Kinetic Characterization and Immobilization of Tannase Produced by *Aspergillus niger* N5-5

HE Ze-qi, LIU Guo, KAN Qi-xin, YANG Guo-hang, CAO Yong

(College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Tannase produced by *Aspergillus niger* N5-5 has been independently isolated in our laboratory, and proven to efficiently hydrolyze propyl gallate. To explore industrial applications for tannase, we cultivated large quantities of tannase and investigated the kinetics of its hydrolysis of tannin, and the effects of immobilization on its enzymatic activity. Fermentation began with growth in liquid media, followed by fermentation on solid media. After enzyme extraction, ceramic membrane filtration was used to purify and concentrate the enzyme. Two different drying methods, (lyophilization and spray drying) were adopted. Activated resins were used to immobilize tannase. The purified tannase solution has an enzymatic activity of 258.53 U/mL. It can hydrolyze 10%~50% tannic acid solutions, and its performance is better when substrate concentrations are less than 30%. Lyophilization has little effect on enzyme activity, while spray drying decreases enzyme activity to 174.02 U/mL. In addition, tannase immobilized on resin can be reused at least 4 times under experimental conditions. This research has established a theoretical basis for improving production efficiency of tannase from *Aspergillus niger* N5-5, reducing the cost of enzymatic hydrolysis, and realizing commercial enzyme production.

**Key words:** *Aspergillus niger* N5-5; tannase; enzyme immobilization

引文格式:

何泽琪,刘果,阚启鑫,等.黑曲霉 N5-5 产单宁酶的酶学性质与固定化[J].现代食品科技,2021,37(8):91-96,+274

HE Ze-qi, LIU Guo, KAN Qi-xin, et al. Kinetic characterization and immobilization of tannase produced by *Aspergillus niger* N5-5 [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 91-96, +274

单宁是仅次于木质素的第二大植物多酚, 被认为是难降解、难消化且对机体有毒害的物质<sup>[1]</sup>。单宁酶作为单宁酸分解技术相关的重要酶类, 因其安全性

收稿日期: 2020-07-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972078); 广东省功能食品活性物质重点实验室(2018B030322010); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2020KJ117); 广东高校国际科技合作创新平台项目(2013gjh0003)

作者简介: 何泽琪(1996-), 女, 硕士, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品

较高而被广泛研究。单宁酶(EC, 3.1.1.20)是一种广泛存在于微生物和植物中的诱导酶, 尤其是在以单宁酸为原料的丝状真菌中可以大量生产<sup>[2]</sup>。单宁酶的主要特征是它对复杂的多酚具有活性, 如可水解没食子酸单宁中的酯键和缩酚羧键, 生成没食子酸和葡萄糖<sup>[3]</sup>, 还能够水解复合型单宁、没食子酸烷基酯以及绿原酸等物质<sup>[4]</sup>。因此单宁酶已被广泛应用于食品、饮料, 酿造, 医药, 化工等行业<sup>[5]</sup>。

目前单宁酶生产的主要方法为微生物发酵法, 对

曲霉属、青霉属、根霉属的真菌及乳杆菌等细菌发酵生产单宁酶的报道较多。液体深层发酵和固态发酵是生产单宁酶的主要方式，它们各有利弊：固态发酵生产的单宁酶主要是胞外酶，具有易回收、酶活高、稳定性好等优点，但不利于均匀调控；液体发酵虽代谢参数易于调控，但发酵所得单宁酶酶活不高且回收成本较高<sup>[6]</sup>。故本研究以液体扩培形成菌丝体，结合常规固体发酵的方式，对黑曲霉进行培养。

游离单宁酶在使用过程中存在热稳定性差、使用寿命短、回收重复利用难等缺点，这极大地限制了单宁酶的工业运用<sup>[7]</sup>。常规的喷雾干燥、冷冻干燥等手段，能使酶延长存储时间。除此之外，采用有效的固定化技术制备固定化单宁酶，可以将单宁酶多次循环使用从而降低单宁酶使用成本，还可以提高单宁酶的理化性质及生物稳定性<sup>[8]</sup>，人们将单宁酶固定到载体上来改善其使用性能，常使用的固定化载体有壳聚糖、玉米芯等<sup>[9,10]</sup>。树脂材料由于类型多、成本低且具有稳定的理化性质，也被用作为酶的固定化载体<sup>[10]</sup>，且很多已实现了商业化生产。黑曲霉 N5-5 为本课题组自行筛选和诱变选育的一种单宁酶高产菌株，前期均以小规模进行实验，研究发现具有良好的水解没食子酸丙酯能力<sup>[11]</sup>。为了黑曲霉 N5-5 发酵产单宁酶的进一步研究与推广，本研究对酶进行扩培，研究其酶学性质，并进行纯化、干燥、固定化等步骤的试验，以期 N5-5 所产单宁酶的工业化应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原料

黑曲霉 N5-5 (保藏号: CCTCC M 2014051): 华南农业大学食品学院广东省天然活性物食品实验室 -80 °C 冻存; 树脂: 购自杭州科创有限公司; 麸皮: 购自永和饲料厂。

#### 1.1.2 主要仪器设备

UV-VIS 紫外分光光度计, 日本岛津; TUS-200 型振荡型恒温金属浴, 上海一恒科学有限公司; DHZ-C 型恒温振荡器, 太仓市强乐实验设备有限公司; FD-1PF 型立式冷冻干燥机, 北京德天佑科技发展有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 液相色谱、DHG-970 电热恒温鼓风干燥箱, 上海齐心科学仪器有限公司; LC-10Avp plus 分析型高效液相色谱, 日本岛津。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基配制

斜面培养基: 取 2 g PDA 成品培养基, 自然 pH, 定容至 50 mL, 加热溶解分装于试管中, 121 °C 灭菌 20 min。

液体培养基: 称取单宁酸 20 g, 蔗糖 10 g, 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸铁 0.01 g, 硫酸镁 0.5 g, 定容至 1 L。50 mL 每瓶分装于 200 mL 培养瓶中, 121 °C 灭菌 20 min。

固体培养基: 称取麸皮 450 g, 硝酸铵 5 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 磷酸二氢钾 4 g, 单宁酸 460 g, 加蒸馏水 500 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液配制: 称取柠檬酸 2.10 g 和柠檬酸三钠 2.94 g, 分别溶解并于 100 mL 容量瓶中定容, 二者浓度均为 0.1 mol/L。将柠檬酸与柠檬酸三钠溶液 1:2 体积比混合, 得柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液 (下简称柠檬酸缓冲液)。

#### 1.2.2 黑曲霉 N5-5 发酵培养

##### 1.2.2.1 液体扩培

参考 Jana<sup>[12]</sup> 等方法, 略有修改。将黑曲霉 N5-5 接种于 PDA 斜面, 30 °C 培养 54 h 进行活化。用 15 mL 已灭菌的 0.9% 生理盐水将孢子洗下, 形成孢子悬浮液。每瓶液体培养基中加入 1 mL 孢子悬浮液, 置于 30 °C 摇床中震荡培养 72 h。

##### 1.2.2.2 固体发酵

将液体培养所得菌丝体溶液, 以 100 mL/kg 比例加入固体培养基中, 翻拌均匀。30 °C 发酵 6 d。

#### 1.2.3 单宁酶酶液制备

##### 1.2.3.1 粗酶液的制备

固体发酵结束后, 参照张帅<sup>[13]</sup> 等方法进行提酶, 略有修改。固体培养基中加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 培养基与缓冲液按质量比 1:1 混合, 并充分搅拌浸提 1 h。得到的混合物先用四层纱布过滤去除大颗粒杂质, 再用 150 目滤布过滤, 所得滤液即为粗酶液。

##### 1.2.3.2 酶液的纯化

将粗酶液用截留分子量为 60 ku 的陶瓷膜进行过滤浓缩, 得到陶瓷膜过滤液和截留液, 并检测理化性质及酶活。

#### 1.2.4 单宁酶理化性质的研究

##### 1.2.4.1 固形物含量

取洁净的培养皿, 置烘箱内 105 °C 干燥后冷却至室温称重, 重复此过程至连续两次干燥后称重差异在 0.5 mg 以下。取 1 mL 搅拌均匀的酶液于培养皿中, 105 °C 烘箱干燥 5 h。5 h 后迅速取出放入干燥器中, 冷却至室温后称重。同样重复此干燥过程至样品连续

两次干燥后称重差异在 0.3 mg 以下。

#### 1.2.4.2 蛋白含量

采用考马斯亮蓝法<sup>[14]</sup>。以BSA为标准蛋白，与考马斯亮蓝G-250试剂作用后，在 595 nm 波长处测定吸光度。以标准蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标，吸光度为纵坐标，建立标准曲线。1 mL 样品溶液按上述步骤操作，蛋白质质量浓度可由标准曲线求出。得到回归方程  $Y=0.0057X$ ,  $R^2=0.9859$ ，可见该曲线拟合良好，可作为样品中蛋白质量浓度计算的方程模型。

#### 1.2.5 酶活的测定

酶解反应体系：500  $\mu\text{L}$  酶液+500  $\mu\text{L}$  10% 单宁酸，45  $^{\circ}\text{C}$  反应 12 或 24 h。后以 100  $^{\circ}\text{C}$ ，20 min 灭活。（另做空白扣除单宁酸自身分解的影响：酶液先以 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 20 min 灭活，然后迅速冰浴降温，再加入 500  $\mu\text{L}$  的 10% 单宁酸进行反应），反应一定时间后测定酶活。

##### 1.2.5.1 薄层层析快速检测酶活

展开剂：甲苯:乙酸乙酯:甲酸=10:18:2；显色剂：0.1% 的氯化铁溶液（无水乙醇定容）；将硅胶板于 105  $^{\circ}\text{C}$ ，活化 0.5 h 后冷却至室温。样品点样量为 2  $\mu\text{L}$ ，于层析缸中展开。展开到 3/4 高度左右，取出硅胶板，晾干，喷显色剂或紫外下显色。

##### 1.2.5.2 高效液相色谱定量检测

参照张迎杰<sup>[15]</sup>的检测方法，略有改动。样品统一稀释 100 倍，过膜后进液相检测；流动相为 0.1% 磷酸水与甲醇，检测波长为 275 nm，进样量 10  $\mu\text{L}$ ，流速 1 mL/min；洗脱程序为 0~10 min，甲醇浓度 10%；10~20 min，甲醇浓度 10%~90%；20~25 min，甲醇浓度 90%。

##### 1.2.5.3 没食子酸标曲的制作

选取 5 个浓度的没食子酸溶液，按 2.3.2 条件进行液相色谱分析。以进样浓度为横坐标，峰面积为纵坐标得到标准曲线，计算得到回归方程  $Y=3 \times 10^7 X - 542909$ ,  $R^2=0.995$ ，可见该曲线拟合良好，可作为样品中蛋白质量浓度计算的方程模型。

#### 1.2.6 单宁酶活力的研究

##### 1.2.6.1 酶解能力与底物浓度的探索

将纯化后酶液冻干，复溶后配置成冻干前蛋白浓度，分别与 10%、20%、30%、40%、50% 浓度的单宁酸反应。检测方法同 2.4。

##### 1.2.6.2 干燥方式对酶活的影响

为考察不同干燥方式对酶活力的影响，本实验选用喷雾干燥及冷冻干燥两种方式进行试验。酶的喷雾干燥方法为，使用 3 L 陶瓷膜截留液，按固形物含量配比 20% 添加 558 g 麦芽糊精。使用高压均质机 15~20 kPa 均质后进行喷雾干燥。喷雾干燥条件为进风温度 98  $^{\circ}\text{C}$ ，出风温度 50  $^{\circ}\text{C}$ ，雾化器 40 Hz，恒流泵 50 r/min。

酶的冷冻干燥则使用冻干机-40  $^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥，直至酶液完全冻干。将酶粉分别复溶至与粗酶液相同蛋白浓度，按方法 2.4 检测酶活

##### 1.2.6.3 酶的固定化

将冻干酶粉复溶成 0.1 g/mL，取 10 mL 加入 10 g 树脂，搅拌均匀放入 40  $^{\circ}\text{C}$  鼓风干燥机，后每小时搅拌一次，确保树脂与酶液混合均匀。测定酶活时取 0.5 g 固定化酶加入 500  $\mu\text{L}$  10% 的单宁酸；另为了测试固定化的稳定性及重复利用率，在反应后过滤出树脂，重复使用 1 周测定其活力。

##### 1.2.7 酶活力定义

单位体积粗酶液每分钟水解底物单宁酸产生 1  $\mu\text{mol}$  没食子酸所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U/mL)。

##### 1.2.8 数据处理

各试验均进行 3 次平行测定，结果用“均值 $\pm$ 标准偏差”表示。用 SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY) 软件进行数据拟合以及回归分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单宁酶的纯化

#### 2.1.1 酶液理化性质的检测

对纯化前后酶液进行研究，为了对其进行定量，测定固形物含量及蛋白质含量，结果如表 1。陶瓷膜截留液固形物含量为 49.34 mg/mL、蛋白含量 1.35 mg/mL，与粗酶液相比两项指标皆增长；而陶瓷膜滤液两项指标较粗酶液均有下降，初步推测所需单宁酶大多于截留液中（表 1）。后续实验均根据蛋白含量进行统一定量后，对比酶活。

表 1 纯化前后酶液固形物及蛋白质含量对比 (mg/mL)

Table 1 Comparison of solid content and protein content of

enzyme solution before and after purification		
样品	固形物含量	蛋白质含量
粗酶液	41.38 $\pm$ 1.92	1.29 $\pm$ 0.21
陶瓷膜滤液	35.46 $\pm$ 1.47	1.12 $\pm$ 0.06
陶瓷膜截留液	49.34 $\pm$ 1.38	1.35 $\pm$ 0.20

#### 2.1.2 薄层色谱层析检测纯化效果

为了测定单宁酶活力及纯化效果，将单宁酶粗酶液、单宁酶滤液、单宁酶截留液统一配制成蛋白浓度为 0.7 mg/mL 的酶液，分别与单宁酸反应 12 h 后，薄层层析检测结果图 1。样品从左至右分别为：10% 的单宁酸标品，1 mg/mL 的没食子酸标品；灭活粗酶液反应体系（空白）；陶瓷膜滤液反应体系；陶瓷膜截留液反应体系；粗酶液反应体系。由图 1 可看出，在

相同反应条件下，过滤液与截留液都能分解单宁酸生成没食子酸，但截留液比过滤液没食子酸特征点颜色更深，酶活更高。另外截留液酶解效果比粗酶液更佳，说明用陶瓷膜对粗酶液进行纯化达到一定的效果。陶瓷膜截留液的没食子酸特征点颜色最深，也说明转化生成没食子酸最多，即单宁酶主要在 60 ku陶瓷膜截留液组分中。这与前期实验结果中，黑曲霉N5-5 所产单宁酶为分子质量 64.2 ku的单肽链蛋白相符合<sup>[16]</sup>。

单宁酶分子质量在 31~320 ku之间，由单个或多个亚基组成<sup>[17]</sup>，不同来源的单宁酶分子质量差异较大。真菌单宁酶均为糖蛋白，存在同源或异源低聚体，有两个以上亚基<sup>[18]</sup>，故真菌单宁酶分子质量较细菌单宁酶偏大，在 45~320 ku之间<sup>[19]</sup>。实验所得结果与这些结论一致，故后续实验均选择含有大量单宁酶的陶瓷膜截留液，即纯化的酶液，作为研究对象。

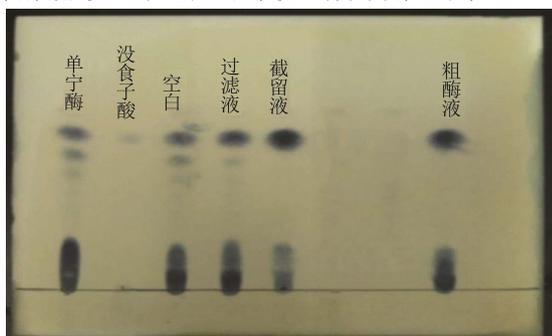


图1 单宁酶酶活初步检测薄层层析图

Fig.1 TLC diagram of preliminary detection of tannase activity

### 2.1.3 HPLC测定纯化后酶液活性

金属浴 45 °C 反应 24 h后，通过HPLC准确测定酶活。

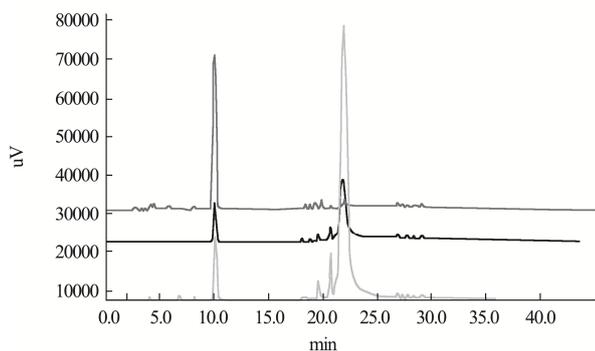


图2 纯化后酶液活性检测

Fig.2 Activity detection of purified enzyme solution

注：从上至下样品分别为：陶瓷膜截留液、灭活酶液、单宁酸。

图2可看出，陶瓷膜截留液的组分没食子酸特征峰响应值高，通过计算峰面积发现，纯化后蛋白含量为 0.7 mg/mL的酶液与 10%的单宁酸反应 24 h，单宁酸分解率可达到 95%以上。

## 2.2 单宁酶活力的探索

### 2.2.1 不同干燥方式对单宁酶活性的影响

酶作为生物催化剂，优点是具有针对性，效率高。但缺点是处于游离状态的酶对环境很敏感，如在强酸、强碱、高温等情况中不稳定，酶蛋白变性导致活性降低甚至失活<sup>[7]</sup>。本研究分别用两种不同干燥方式干燥单宁酶截留液，使其易于保存。将干燥样品统一复溶成与粗酶截留液相同的蛋白浓度 1.35 mg/mL后分别与 10%单宁酸反应，对其进行酶活检测，具体结果如图3。

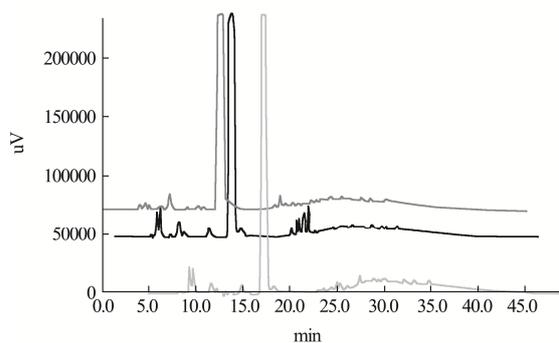


图3 不同干燥方式的单宁酶活力对比图

Fig.3 Comparison of tannase activity of different drying methods

注：从上至下反应体系分别为：冻干酶粉、喷干酶粉、截留液。

由图3可知，两种干燥方式干燥后的酶与单宁酸反应后，没食子酸生成量均较高，单宁酸含量变低，说明不同干燥方式的样品都具有较好的酶活。通过对比单宁酸减少量发现，冻干酶比喷干酶反应体系的单宁酸特征峰小；另外，冻干酶与未经干燥处理的纯化酶液都可将 10%单宁酸基本反应完全，说明冻干对酶液活力影响较小。通过计算酶活，得喷干酶液酶活为 174.02 U，而冻干酶液酶活为 266.07 U，与纯化酶液的酶活相近。对每一处理步骤进行固形物、蛋白含量、酶活力等指标的测定，总结如表2。

表2 各步骤蛋白含量及酶活总结

Table 2 Summary of protein content and enzyme activity in each step

样品	固形物含量/(mg/mL)	蛋白含量	酶活/U
粗酶液	41.38±1.92	1.29±0.21 mg/mL	108.66±6.34
陶瓷膜截留液	35.46±1.47	1.35±0.20 mg/mL	258.53±7.91
陶瓷膜滤液	49.34±1.38	1.12±0.06 mg/mL	4.58±1.38
喷雾干燥酶粉	/	1.00±0.21 mg/g	174.02±4.43
冻干酶粉	/	5.34±0.39 mg/g	266.07±9.25

此次大批量发酵所测酶活与实验室前期小批量发酵所测酶活 471.35 U/mL<sup>[13]</sup>有差距, 分析原因主要有两个。一是前期使用没食子酸丙酯作为酶解底物标定酶活, 而本次为了解决生产实际问题, 使用构成更为复杂的单宁酸作为底物, 故酶活力定义的标准不同, 前期酶活只作为参考值; 二是由于发酵量大, 实际发酵过程中培养基有部分结团, 故对浸提酶液这一步产生影响, 酶未能提取完全, 后期可采用先机械打散再浸提, 或二次浸提的方式改善。

### 2.2.2 酶活与底物浓度

由上述结果可知, 冻干对酶活影响小, 故使用冻干酶探究单宁酸浓度对酶活的影响。将冻干后的纯化酶液配置成 1.35 mg/mL 蛋白浓度分别与 10%、20%至 50%的单宁酸反应(图 4)。根据单宁酸的减少量可以看出, 酶与底物 1:1 的条件下反应 24 h, 可催化 10%、20%的单宁酸完全转化成没食子酸; 对 30%浓度的单宁酸, 单宁酸几乎被完全酶解解, 但中间产物并未完全转化成没食子酸; 而对于 40%、50%的单宁酸, 单宁酶酶解大部分单宁酸, 但依旧剩下少量单宁酸未被酶解。有研究表明, 单宁酶的反应速度与底物呈线性关系, 低浓度时表现为一级反应; 当到达一定浓度时, 速度增加缓慢并趋于最大值, 呈零级反应<sup>[20]</sup>。结论与本次实验结果相似, 从 30%底物浓度开始, 没食子酸生成量变化不明显, 酶解过程的零级反应拐点应处于 30%附近, 即 30%单宁酸为合适的底物浓度。

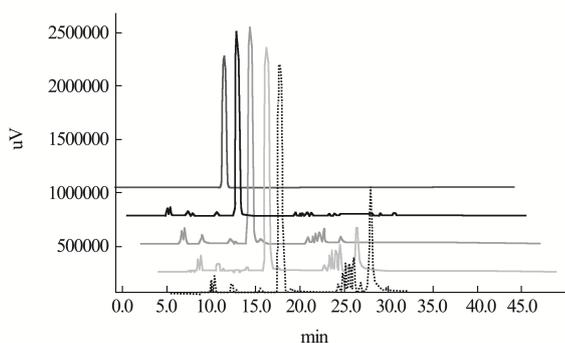


图 4 酶与不同浓度单宁酸反应HPLC对比图

Fig.4 HPLC comparison chart of the reaction between enzyme and different concentrations of tannic acid

注: 从上至下底物浓度分别为 10%、20%、30%、40%、50%。

### 2.3 固定化酶的循环使用

为了对固定化酶的效果进行更准确的定性, 对其使用时间及重复使用次数进行探究。每次 0.5 g 固定化酶与 10%单宁酸反应 24 h, 重复使用 6 次, 使用时长 7 d, 酶活检测结果如图 5。

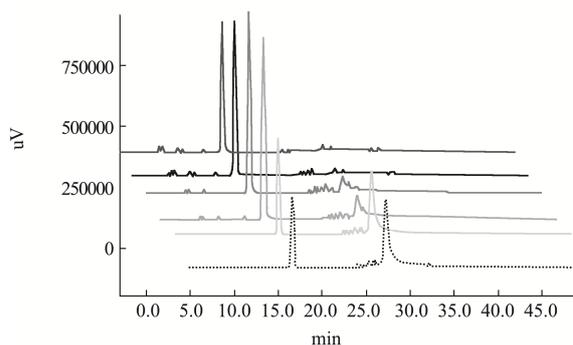


图 5 固定化酶使用次数活性检测图

Fig.5 Activity detection diagram of the number of times the immobilized enzyme is used

注: 从上到下分别是固定化酶循环使用的第 1 至 6 次反应体系。

由图 5 可知, 经过固定化后的酶, 随时间延长, 未被酶解的底物单宁酸含量逐渐增多。循环使用的前四次单宁酸基本反应完全, 第 5 次检测结果中单宁酸剩余量明显增多, 酶活降低 70%左右。具体酶活变化总结见表 3。固定化酶循环使用次数与底物浓度、作用时间和其他反应条件有很大关系, 在实际应用过程中, 根据生产情况减少底物浓度及作用时间, 可增加固定化酶的循环使用次数。

表 3 固定化酶活力循环使用次数与酶活

Table 3 Number of cycles of immobilized enzyme activity and enzyme activity

固定化酶循环使用次数	酶活力/(U/g)
1	16.02±0.64
2	14.76±1.76
3	11.13±1.56
4	8.38±0.61
5	4.75±1.15
6	1.97±0.46

### 3 结论

本研究对黑曲霉 N5-5 固态发酵产单宁酶的条件进行优化, 提酶后利用膜过滤技术纯化粗酶液, 纯化后 49.34 mg 酶液干基含有 1.35 mg 单宁酶, 酶活为 258.53 U/mL, 比活力为 191.57 U/mg, 所得单宁酶在 1.35 mg/mL 蛋白浓度下具有酶解 10%至 50%浓度单宁酸的能力; 对比不同干燥方式对单宁酶活力的影响发现, 冷冻干燥比喷雾干燥酶活损失少, 从保证酶活的角度, 可选择冻干的方式对单宁酶进行干燥保存; 固定化后的单宁酶在实验条件下, 可重复使用至少 4 次, 第 5 次酶活损失达 70%。本文所提供的单宁酶提取等工艺, 为单宁的绿色分解及没食子酸的绿色生产

奠定基础,同时固体发酵所使用的材料利用了人类生产生活中的农林业废弃物,有利于环境和能源的可持续发展。为了更好地进行商业化应用,今后的研究可继续从发酵后酶的提取及固定化两方面入手,使单宁酶更高效更充分地发挥作用。

### 参考文献

- [1] Yao J, Guo G S, Ren G H, et al. Production, characterization and applications of tannase [J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2014, 101: 137-147
- [2] Battestin V, Macedo G A, De Freitas V a P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces variotii* [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 228-233
- [3] Gao W, Wang Y, Basavanagoud B, et al. Characteristics studies of molecular structures in drugs [J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2017, 25(4): 580-586
- [4] Kumar S S, Sreekumar R, Sabu A. Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing [M]. Singapore: Springer Singapore, 2019
- [5] Govindarajan R K, Revathi S, Rameshkumar N, et al. Microbial tannase: current perspectives and biotechnological advances [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 6: 168-175
- [6] Renovato J, Gutierrez-Sanchez G, Rodriguez-Duran L V, et al. Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165(1): 382-395
- [7] 王挥.黑曲霉产单宁酶与固定化酶制备没食子酸及其丙酯的研究[D].长沙:中南林业科技大学,2012  
WANG Hui. Studies on Tannase produced by *Aspergillus niger* and immobilized tannase preraration of gallic acid and proryl gallate [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2012
- [8] 张帅,程昊,许子婷.ECR-1030M 树脂固定化单宁酶[J].食品工业,2020,41(4):118-122  
ZHANG Shuai, CHENG Hao, XU Zi-ting. Tannase immobilization by ECR-1030 resin [J]. The Food Industry, 2020, 41(4): 118-122
- [9] Jana A, Halder S K, Ghosh K, et al. Tannase immobilization by chitin-alginate based adsorption-entrapment technique and its exploitation in fruit juice clarification [J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(11): 2319-2329
- [10] De Lima J S, Cabrera M P, Casazza A A, et al. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 1989-1994
- [11] 张帅,朱华伟,农嘉仪,等.均匀设计优化黑曲霉 N5-5 固态发酵生产单宁酶[J].食品科技,2016,41(9):14-17  
ZHANG Shuai, ZHU Hua-wei, NONG Jia-yi, et al. Optimization of tannase production by solid state fermentation from *Aspergillus niger* N5-5 using uniform design [J]. Food Science and Technology, 2016, 41(9): 14-17
- [12] Jana A, Maity C, Halder S K, et al. Tannase production by *Penicillium purpurogenum* PAF6 in solid state fermentation of tannin-rich plant residues following OVAT and RSM [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(5): 1254-1269
- [13] 张帅,刘飞,朱华伟,等.Plackett-Burman 设计和响应面法优化单宁酶固态发酵培养基[J].广东农业科学,2015,42(12): 91-96  
ZHANG Shuai, LIU Fei, ZHU Hua-wei, et al. Optimization of solid state fermentation medium for tannase by Plackett-Burman design and response surface methodology [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(12): 91-96
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [15] 张迎杰.单宁提纯及其酸催化水解反应动力学[D].杭州:浙江大学,2013  
ZHANG Ying-jie. Isolation and purification of tannin and its acid-catalyzed hydrolysis kinetics [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [16] 张帅,曹庸,梁晓莹,等.黑曲霉 N5-5 单宁酶的纯化及酶学性质测定[J].食品科学,2017,38(6):142-146  
ZHANG Shuai, CAO Yong, LIANG Xiao-ying, et al. Purification and enzymatic properties of tannase from *Aspergillus niger* N5-5 [J]. Food Science, 2017, 38(6), 142-146
- [17] Vajrala N, Sayavedra-Soto L A, Bottomley P J, et al. Role of a fur homolog in iron metabolism in *Nitrosomonas europaea* [J]. Bmc Microbiology, 2011, 11: 37
- [18] Jana A, Maity C, Halder S K, et al. Structural characterization of thermostable, solvent tolerant, cytosafe tannase from *Bacillus subtilis* PAB2 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 77: 161-70

(下转第 274 页)