

黑曲霉 T3-5-1 高活力单宁酶的制备及其性质研究

张帅^{1,2}, 陈遂³, 黄景晟³, 林健辉¹, 农嘉仪¹, 朱华伟¹, 曹庸¹

(1 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2 肇庆学院化学化工学院, 广东肇庆 526061)

(3 广州市质量监督检测研究院, 广东广州 510110)

摘要: 用黑曲霉 T3-5-1 生产单宁酶, 将粗酶液分别采用硫酸铵沉淀法和透析法初步纯化, 结果表明, 使用截留分子量 12 kDa 的透析袋对粗酶液透析后的比活力(3108.58 U/mg), 高于硫酸铵沉淀法处理后的比活力(2939.38 U/mg)。然后对透析样品用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析法进一步纯化, 得到纯度较高的单宁酶, 通过与单宁酶 A 及单宁酶 B 进行 GPC 色谱图比较发现, 其分子量基本一致, 但黑曲霉 T3-5-1 单宁酶的比活力(5304.78 U/mg), 远高于单宁酶 A(1788.15 U/mg)和单宁酶 B(935.07 U/mg)的比活力。该单宁酶性质研究表明: 其最适 pH 值为 5.0, 最适反应温度为 40 °C, 且其酸碱稳定性和热稳定性良好。当底物为没食子酸丙酯时, 最大酶促反应速率 V_{max} 为 81.96 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 米氏常数 K_m 为 0.85 mmol/L。最后考察了该单宁酶的催化合成能力, 结果表明, 在 AOT 异辛烷反胶束体系中, 该单宁酶可催化没食子酸和丙醇反应合成没食子酸丙酯。

关键词: 黑曲霉 T3-5-1; 单宁酶; 纯化; 酶学性质; 反胶束

文章编号: 1673-9078(2014)3-137-143

Preparation and Properties of High Activity Tannase with *Aspergillus niger* T3-5-1

ZHANG Shuai^{1,2}, CHEN Sui³, HUANG Jing-sheng³, LIN Jian-hui¹, NONG Jia-yi¹, ZHU Hua-wei¹, CAO Yong¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

(3. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: Tannase was produced by *Aspergillus niger* T3-5-1, then the crude enzyme was preliminary purified by ammonium sulfate precipitation and dialysis respectively. The results showed that, specific activity of the crude enzyme dealt with dialysis sack of 12 kDa MWCO was higher than that of ammonium sulfate precipitation. Further purification was performed by Sephadex G-100 dextran gel chromatography, and then high purity tannase was obtained. Compared the tannase with Tannase A and Tannase B by GPC chromatogram, it was found that their molecular weight were generally consistent. However, specific activity of the tannase(5304.78 U/mg) was far higher than those of Tannase A (1788.15 U/mg) and Tannase B (935.07 U/mg). The optimum pH and reaction temperature of the tannase were 5.0 and 45 °C, respectively, with favorable pH and thermal stability. When the substrate, the V_{max} and K_m were were propyl gallate (PG), 81.96 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ and 0.85 mmol/L, respectively. At last, the catalytic synthesis ability of the tannase was investigated, which suggested that the enzyme could catalyze the reaction between gallic acid and propyl alcohol to synthesise PG in the reverse micelle of AOT- isooctane.

Key words: *Aspergillus niger* T3-5-1; tannase; purification; enzymatic properties; reverse micelle

单宁酶(Tannase, E.C. 3.1.1.20), 是一种广泛存在于微生物、植物及动物中的诱导酶, 尤其是在丝状真菌中, 以单宁酸、没食子酸等作为诱导物时可大量产生, 属于细胞膜结合酶, 可分泌到胞外^[1-2]。单宁酶可专一性水解水解型单宁、复合型单宁以及没食子酸酯

收稿日期: 2013-08-20

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2011B090400183)

作者简介: 张帅(1978-), 男, 副教授, 研究方向为食品化学

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然活性产物及功能性食品

基酯中的酯键和缩酚羧键, 生成没食子酸、葡萄糖及相应的醇类等物质^[3]。单宁酶目前已应用于饮料、酿酒、食品、医药、化工、制革及化妆品等多个领域, 尤其在制备抗疟疾药物甲氧苄啶中间体没食子酸、食品抗氧化剂没食子酸丙酯及处理茶汁“冷后浑”和啤酒沉淀等方面应用广泛^[4-6]。

目前单宁酶生产的主要方法还是通过微生物发酵制备, 尤其对曲霉属、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^[7-10]。黑曲霉 T3-5-1 是我们课题组自行筛选和诱变选育的一种单宁

酶高产菌株, 目前已在中科院微生物研究所的普通微生物中心 (CGMCC) 进行保藏。林健辉等 (2010)^[11] 对黑曲霉 T3-5-1 产单宁酶的培养条件进行了优化, 使所产单宁酶的比活力达到 202.16 U/mL, 农嘉仪等 (2012)^[12] 则对黑曲霉 T3-5-1 所产单宁酶进行了交联酶聚集体法固定化研究, 但上述文献仅局限于黑曲霉 T3-5-1 单宁酶粗酶液的报道, 酶比活力不高, 且均未对此种单宁酶的酶学性质进行公开报道。

没食子酸烷基酯是没食子酸与烷基醇类化合物的酯化反应产物, 在化工、医药及食品等领域有着广泛应用, 如没食子酸丙酯 (propyl gallate, PG)、没食子酸辛酯 (octane gallate, OG) 及没食子酸月桂酯 (deceyl gallate, DG) 等经 WHO 和 FAO 组织批准已用作食品抗氧化剂, 其抗氧化性能优于目前食品中常使用的抗氧化剂叔丁基对羟基茴香醚 (BHA) 和 2,6-二叔丁基对甲酚 (BHT) 等^[2]。目前没食子酸烷基酯工业制备仍采用传统的化学合成法。但由于化学合成法存在步骤复杂, 副产物多及得率低等缺点, 而酶法合成则具有反应条件温和, 步骤简单及副产物少等优点, 因此, 研究单宁酶对没食子酸烷基酯的催化合成能力, 具有重要意义。本实验采用硫酸铵沉淀法、透析法及葡聚糖凝胶层析法对黑曲霉 T3-5-1 单宁酶进行纯化, 然后进行酶学性质测定, 并考察了单宁酶在反胶束体系中对没食子酸丙酯的催化合成能力, 旨在为黑曲霉 T3-5-1 所产单宁酶的进一步研究和应用打下基础, 也为这种单宁酶未来实现商业化生产提供理论指导和数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

黑曲霉 T3-5-1, 华南农业大学食品学院萃取分离实验室保藏, CGMCC No.7423。

1.1.2 试剂

单宁酶 A, 美国 Sigma 公司; 单宁酶 B, 湖南农业大学提供; 没食子酸丙酯及没食子酸, 纯度 $\geq 99\%$, 湖南省林产化工工程重点实验室提供; 2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠 (AOT), 美国 Sigma 公司; 透析袋 (截留分子量 12 kDa), 广州威佳生物科技有限公司; 聚乙二醇 20000, 广州齐云生物科技有限公司; Sephadex G-100, 上海索莱宝生物科技有限公司; 牛血清蛋白 (BSA), 上海索莱宝生物科技有限公司; Bradford 试剂, 上海索莱宝生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯), 美国 Fisher 公司。

叠氮化钠、单宁酸、蔗糖、硝酸钠、磷酸氢二钾、氯化钾、硫酸亚铁、硫酸镁、柠檬酸、柠檬酸钠、氯化钡、异辛烷均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

察氏培养基: 蔗糖 30 g, 硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 氯化钾 0.50 g, 硫酸铁 0.01 g, 硫酸镁 0.50 g, 蒸馏水溶解并定容至 1 L。

发酵培养基: 单宁酸 35 g, β -环糊精 10 g, 蛋白胨 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 氯化钾 0.50 g, 硫酸铁 0.01 g, 硫酸镁 0.50 g, 蒸馏水溶解并定容至 1 L。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉 T3-5-1 生产单宁酶

将黑曲霉 T3-5-1 接种于察氏培养基斜面, 30 °C 培养活化, 待孢子成熟后, 用适量生理盐水将孢子洗至装有玻璃珠的锥形瓶中, 30 °C 振荡培养 1 h, 使孢子充分分散。取 1 mL 孢子悬液进行梯度稀释并镜检计数, 调整孢子浓度至 10^6 个/mL。在 250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 发酵培养基, 接种 1 mL 孢子悬液, 30 °C, 120 r/min 振荡培养 72 h。

1.2.2 单宁酶粗酶液的提取

发酵液经纱布过滤得到菌丝体, 蒸馏水洗至 pH 值中性, 于冰箱中预冷。将菌丝体、石英砂、0.10 mol/L pH 值 5.00 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (以下简称缓冲液) 按 1:1:4 (m/m/V) 的比例在冰浴下研磨成浆, 0~4 °C 下 10000 r/min 离心 30 min。取上清液, 用缓冲液定容至 10 mL, 即得单宁酶粗酶液。

1.2.3 单宁酶活力测定

准备 1 支对照管、1 支空白管和 3 支测定平行管。首先在每支试管中各加入 0.20 mL 酶液, 然后在测定管中各加入 0.20 mL 底物 PG 标准溶液 (2×10^{-3} mol/L), 在空白管中加入 0.20 mL 0.10 mol/L pH 5.0 缓冲液, 在对照管中加入 0.60 mL 无水乙醇, 准确反应 20 min 后, 分别在测定管和空白管中加入 0.60 mL 的无水乙醇 (终止测定管中的反应), 在对照管中加入 0.20 mL PG 标准溶液。待反应液冷却后, 再分别在各支试管中加入 9 mL 缓冲液稀释, 测定波长 270 nm 下吸光度。单宁酶酶活力的定义: 反应温度 45 °C, pH 5.00 的条件下, 酶液每小时水解减少 0.01 μ mol 底物没食子酸定义为一个酶活力单位 (U)^[11]。

1.2.4 硫酸铵沉淀

将粗酶液移入多支离心管中, 加硫酸铵使其饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 及 90%。操作于冰浴上进行, 缓慢添加硫酸铵, 并轻轻摇匀, 使硫酸铵充分溶解, 4 °C 静置沉淀过夜。然后

10000 r/min 离心, 分离上清液和沉淀, 沉淀用与样品等体积的缓冲液溶解后, 测定沉淀的酶活和蛋白质含量。

1.2.5 透析

将酶液装入截留分子量 12 kDa 的透析袋, 然后置于超纯水中, 4 °C 透析, 每 4 h 更换一次超纯水, 直至 BaCl₂ 检测无 SO₄²⁻ 为止, 透析袋中的酶液用聚乙二醇 20000 包埋浓缩。

1.2.6 葡聚糖凝胶层析

取 Sephadex G-100 5 g, 加 200 mL 0.05 % 的叠氮化钠置室温溶胀 3 d。待溶胀平衡后, 准备装柱。取 12×120 mm 层析柱一根, 将柱垂直置于铁架上, 在柱中加水或洗脱液, 并赶净滤板下方气泡, 使支持滤板底部完全充满液体, 然后将柱出口关闭。把已溶胀好的凝胶调成薄浆倒入柱内。以蒸馏水平衡柱层, 直至层析的胶床高度不变为止, 此时柱已装好, 可以上样。先打开柱出口, 待柱中洗脱液流至距床表面 1~2 mm 时, 关闭出口, 用滴管将样品缓慢加至柱床表面, 打开出口, 当样品渗入床中接近床表面 1 mm 时, 关闭出口, 小心加入少量洗脱液, 再打开柱出口, 使床表面的样品也全部渗入柱内。这时样品已加好, 在床的表面再小心加洗脱液, 使高出床表面 3~5 cm, 接上恒压洗脱瓶, 控制流速在 0.50 mL/min。层析开始, 每 0.50 mL 一管, 在柱出口处分管收集流出液, 将收集液在紫外检测仪 280 nm 波长处测吸光值。

1.2.7 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford 法)^[13]。以 BSA 做标准蛋白, 与 Bradford 试剂作用, 用可见分光光度计在 595 nm 波长处测吸光值, 通过标准曲线求出样品蛋白质含量。

1.2.7.1 标准曲线的建立

准确配制 1.00 mg/mL 的 BSA 标液(准确称取 0.10 g BSA, 蒸馏水定容于 100 mL 容量瓶中, 具塞摇匀), 取 7 支试管编号 1~7, 分别加 BSA 标液 0 mL、0.01 mL、0.02 mL、0.04 mL、0.06 mL、0.08 mL、0.10 mL, 分别加蒸馏水 0.10 mL、0.09 mL、0.08 mL、0.06 mL、0.04 mL、0.02 mL、0 mL, 并各加 5 mL G-250 试剂。具塞摇匀, 放置 2 min 后于 595 nm 波长下测吸光值, 以 BSA 浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 作高浓度标准曲线。

准确配制 0.10 mg/mL 的 BSA 标液(准确称取 0.01 g BSA, 蒸馏水定容于 100 mL 容量瓶中, 具塞摇匀), 取 6 支试管编号 1~6, 分别加 BSA 标液 0 mL、0.02 mL、0.04 mL、0.06 mL、0.08 mL、0.10 mL, 分别加蒸馏水 0.10 mL、0.08 mL、0.06 mL、0.04 mL、0.02 mL、0 mL, 并各加 5 mL G-250 试剂。具塞摇匀, 放置 2 min

后于 595 nm 波长下测吸光值, 以 BSA 浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 作低浓度标准曲线。

经 Excel 软件拟合, BSA 高浓度标准曲线 $y=0.0007x+0.0184$, 决定系数 R^2 为 0.9985, BSA 低浓度标准曲线 $y=0.0007x+0.0049$, 决定系数 R^2 为 0.9994, 说明两条曲线均拟合较好, 可作为样品中蛋白质含量计算的方程模型。

1.2.7.2 酶液中蛋白质含量的测定

将 0.10 mL 酶液与 5 mL G-250 试剂置于同一试管中, 具塞摇匀。放置 2 min 后于 595 nm 波长下测吸光值, 以酶液提取试剂与考马斯亮蓝反应液作为空白对照。蛋白质含量计算公式如下:

$$\text{蛋白质含量}(\mu\text{g/mL}) = (A+B)/K$$

注: A-测得的吸光值; K、B-标准曲线系数, 根据吸光值大小选择: 低浓度标准曲线系数: $K=0.0007$, $B=0.0049$; 高浓度标准曲线系数: $K=0.0007$, $B=0.0184$ 。

1.2.8 凝胶排阻色谱法检测单宁酶纯度

色谱条件: Waters Ultrahydrogel 柱(300 mm×4.6 mm); 检测波长: 280 nm; 流动相: 水; 流速: 0.6 mL/min; 进样量 10 μL。

1.2.9 酶学性质测定

1.2.9.1 单宁酶最适 pH 值和酸碱稳定性

取纯化后的酶液, 用缓冲液分别调 pH 值至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 然后测定酶活力, 以酶活力最大者为 100%, 计算相对酶活力, 考察单宁酶的最适 pH 值。将酶液分别在上述 pH 值下保存 60 min, 然后取样与底物 PG 在 45 °C 下反应, 测定酶活力, 并同法计算相对酶活力, 考察单宁酶的酸碱稳定性。

1.2.9.2 单宁酶最适反应温度和热稳定性

取纯化后的酶液, 在 30~70 °C 范围内, 每隔 5 °C 测定酶活力, 以酶活力最大者为 100%, 计算相对酶活力, 考察单宁酶的最适反应温度。将酶液分别于上述温度下, 保温 30 min, 冷却后测定酶活力, 并同法计算相对酶活力, 考察单宁酶的热稳定性。

1.2.9.3 单宁酶动力学性质

配制 1 mmol/L、2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L、12 mmol/L、14 mmol/L 的 PG 溶液, 最适条件下进行酶促反应, 测定底物浓度不同时的酶活力, 然后计算底物浓度不同时的反应速率, 根据 Lineweaver-Burk 双倒数法^[14]得到回归方程, 并计算出最大反应速率 V_{\max} 及米氏常数 K_m 值。

1.2.10 单宁酶在反胶束体系中催化合成没食子酸丙酯

1.2.10.1 没食子酸与丙醇的反应

配置 0.10 mol/L 的 AOT 异辛烷溶液 A; 10 mg/mL

的没食子酸丙醇溶液 B; 25 mg/mL 单宁酶柠檬酸缓冲溶液(0.01 mol/L, pH=5)C, 取 A 5 mL, B 0.50 mL 混合均匀, 在旋涡振荡的条件下逐滴加入 C 120 μ L, 保持溶液澄清, 组成反胶束单宁酶催化体系, 置于磁力搅拌器中反应, 35 $^{\circ}$ C 恒温水浴。每间隔一定时间, 用高效液相色谱法(HPLC)检测反应情况。

1.2.10.2 反应体系样品的处理

取反应体系中反应了一定时间的样品 0.10 mL 置于 EP 管中, 然后加入 0.90 mL 的甲醇溶液, 在漩渦混合器上混匀, 5000 r/mim 离心 5 min, 用 0.22 μ m 尼龙过滤器过滤, HPLC 检测待用。

1.2.10.3 HPLC 色谱条件

迪马 C18 钻石柱 (250 mm \times 4.6 mm); 检测波长: 双波长, 270 nm, 300 nm; 流动相: A 相为 0.05% 磷酸水溶液, B 相为甲醇; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L; 30 $^{\circ}$ C 恒温;

梯度洗脱程序: 0~15 min, A:B=80:20 ~ A:B=10:90; 15~30 min, A:B=10:90。

2 结果与讨论

2.1 硫酸铵沉淀

由表 1 可知, 当硫酸铵浓度为 50% 时, 沉淀中开始检测到酶活力, 而达到 60% 时, 沉淀中的酶活力、酶活收率、比活力及比活收率均为最低, 因此可知硫酸铵浓度 60% 时, 沉淀中大多为杂蛋白。当硫酸铵浓度增至 80% 以后, 沉淀中的酶活力迅速升高, 但蛋白质含量并无明显变化, 可推断单宁酶含量只占粗酶液总蛋白含量很少一部分。此外, 当硫酸铵浓度 90% 时, 比活收率也只有 56.85%, 说明硫酸铵并不能完全沉淀单宁酶。故可采用硫酸铵一步沉淀法, 用 60% 硫酸铵沉淀杂蛋白, 然后取上清液。

表 1 不同浓度硫酸铵沉淀酶活收率与比活收率比较

Table 1 Comparison of enzyme activity yield and specific activity yield of ammonium sulfate precipitation with different

硫酸铵浓度	沉淀酶活/(U/mL)	沉淀蛋白含量/(μ g/mL)	比活力/(U/mg)	酶活收率/%	比活收率/%
0	188.07 \pm 6.12	499.82	367.27 \pm 12.24	100.00	100.00
20	0	188.72	0	0	0
30	0	209.11	0	0	0
40	0	246.76	0	0	0
50	5.60 \pm 1.63	364.92	15.35 \pm 4.47	2.98 \pm 0.87	4.08 \pm 1.19
60	4.67 \pm 0.88	386.88	12.07 \pm 2.28	2.48 \pm 0.47	3.21 \pm 0.61
70	6.53 \pm 1.45	383.74	17.03 \pm 3.79	3.47 \pm 0.77	4.52 \pm 1.01
80	30.57 \pm 2.86	388.97	78.58 \pm 7.35	16.25 \pm 1.52	20.88 \pm 1.95
90	80.97 \pm 0.95	378.52	213.91 \pm 2.51	43.05 \pm 0.51	56.85 \pm 0.67

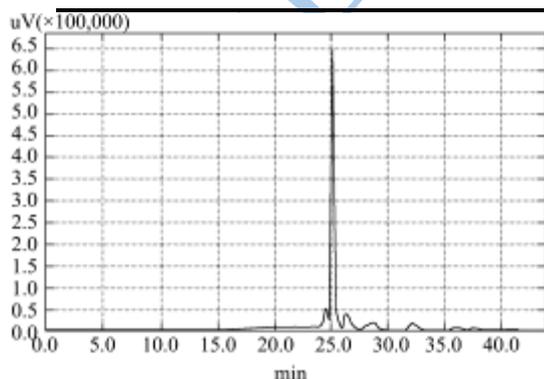


图 1 粗酶液 GPC 色谱图

Fig.1 GPC chromatogram of crude enzyme

对比图 1 和图 2 可知, 60% 硫酸铵沉淀后的上清液中的蛋白质只占粗酶液蛋白质很小的一部分, 另外, 图 2 中 25 min 后的物质都被除去了, 表明 60% 硫酸铵沉淀的杂蛋白都是在凝胶排阻色谱 (GPC) 中 25 min 后出峰的分子量较小的蛋白质, 因此可考虑采用透析法除去小分子蛋白质。

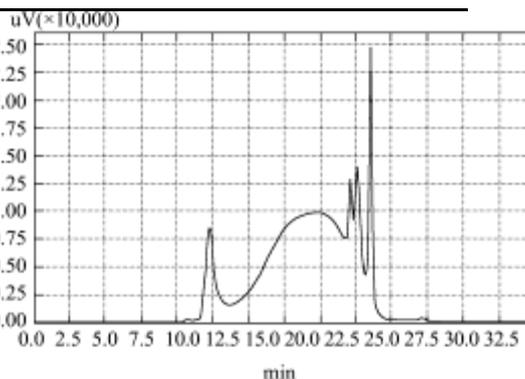


图 2 60%硫酸铵沉淀上清液 GPC 色谱图

Fig.2 GPC chromatogram of supernatant

2.2 透析

由图 3 可知, 用截留分子量 12 kDa 的透析袋透析粗酶液后的色谱图与 60% 硫酸铵沉淀后的上清液 (以下简称为上清液) 色谱图非常接近。因此可用透析法代替 60% 硫酸铵沉淀法, 以消除硫酸铵对酶活力的不

利影响。如表 2 所示，透析样品的比活力为 3108.58 U/mg，纯化倍数为 7.35，优于上清液。

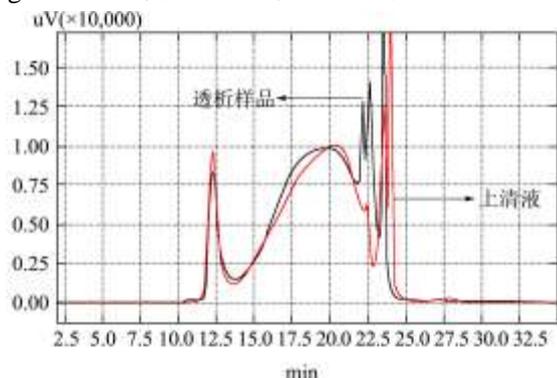


图 3 透析样品与上清液 GPC 色谱图比较

Fig.3 GPC chromatogram comparison between dialysis sample and supernatant

表 2 透析样品与上清液比较

Table 2 Comparison between dialysis sample and supernatant

样品	酶活力 / (U/mL)	蛋白含量 / (μg/mL)	比活力 / (U/mg)	纯化倍数
粗酶液	211.40±1.58	499.82	422.95±3.16	1
透析样品	221.30±0.63	71.19	3108.58±8.85	7.35
上清液	183.30±0.42	62.36	2939.38±6.73	6.95

2.3 葡聚糖凝胶层析

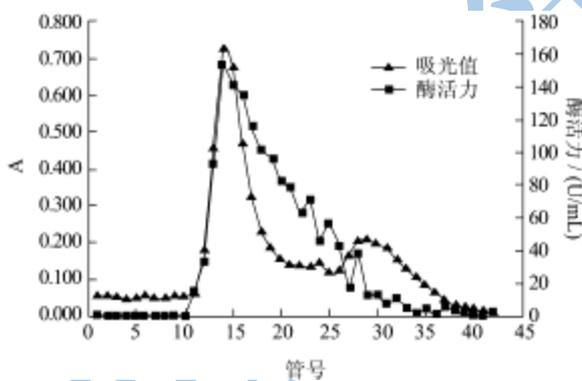


图 4 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of Sephadex G-100 dextran gel chromatography

如图 4 所示，蛋白质洗脱曲线主要有两个峰，其中第一个峰出现在 11~20 管，此时蛋白质含量很高；第二个峰出现在 26 管之后，该峰出峰时间较长，含量较第一个物质低。通过对各管酶活检测，单宁酶活力从第 11 管开始检测出，至第 14 管达到最高，随后缓慢下降，因此合并 11~20 管的成分，通过 GPC 色谱检测，得到一个较尖的色谱峰，如图 5 所示。

2.4 不同来源单宁酶的比较

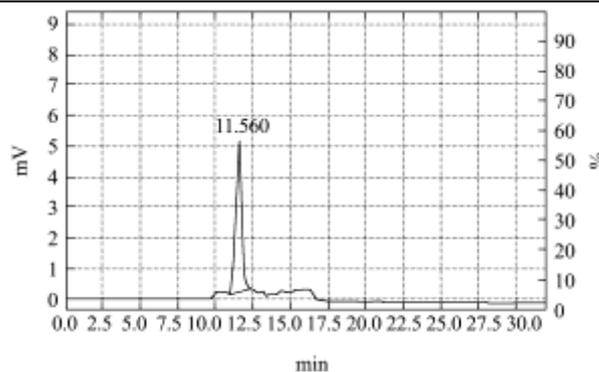


图 5 第 11~20 管合并液 GPC 色谱图

Fig.5 GPC chromatogram of combining solution from tube 11 to tube 20

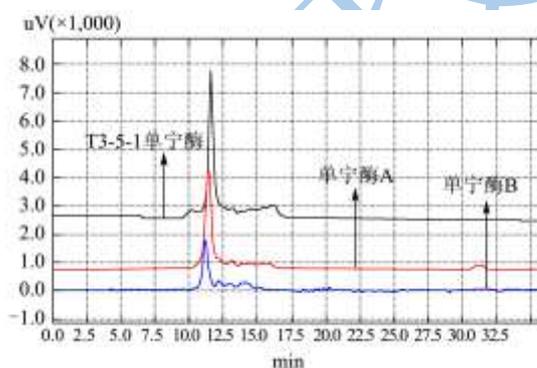


图 6 三种单宁酶 GPC 色谱图比较

Fig.6 GPC chromatogram comparison among three kinds of tannases

表 3 三种单宁酶的比较

Table 3 Comparison among three kinds of tannases

单宁酶	酶活力 / (U/mL)	沉淀蛋白含量 / (μg/mL)	比活力 / (U/mg)
T3-5-1 单宁酶	225.40	42.49	5304.78
单宁酶 A	81.20	45.41	1788.15
单宁酶 B	60.20	64.38	935.07

如图 6 所示，曲霉 T3-5-1 生产的单宁酶的保留时间为 11.560 min，单宁酶 A(Sigma)的保留时间为 11.63 min，单宁酶 B(湖南农业大学)的保留时间为 11.400 min，三者保留时间仅略有差别，即三者分子量基本一致。如表 3 所示，三种单宁酶，以 T3-5-1 所产单宁酶的比活力最高，达到 5304.78 U/mg。

2.5 酶学性质测定

2.5.1 单宁酶最适 pH 值和酸碱稳定性

如图 7 所示，纯化后的单宁酶最适 pH 值为 5.00，且具有较广的 pH 值稳定性，在 pH 值 3.00~7.00 之间都有较高酶活力。

2.5.2 单宁酶最适反应温度和热稳定性

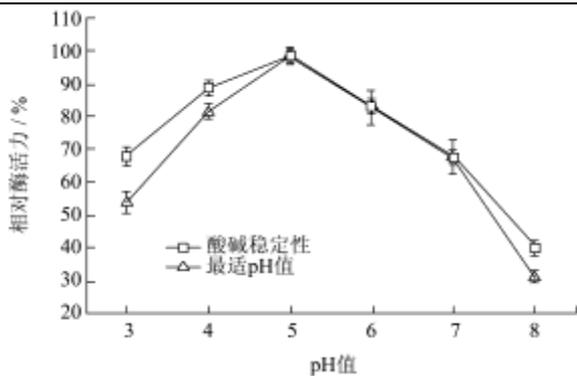


图7 单宁酶最适 pH 值和酸碱稳定性

Fig.7 Optimum pH and pH stability of tannase

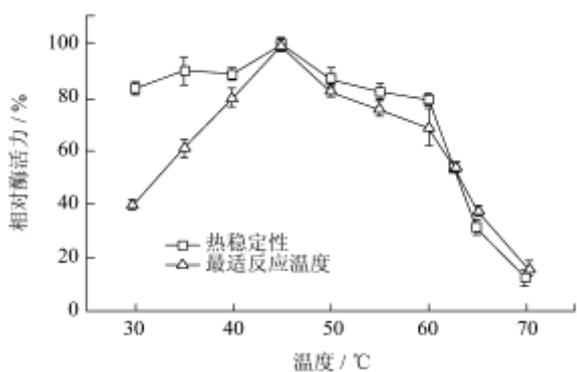


图8 单宁酶最适反应温度和热稳定性

Fig.8 Optimum reaction temperature and thermal stability of tannase

由图 8 可看出, 纯化后的单宁酶最适反应温度为 45 °C。在 30~60 °C 时, 单宁酶都有较高酶活力, 继续升温, 相对酶活力迅速降低。

2.5.3 单宁酶动力学性质

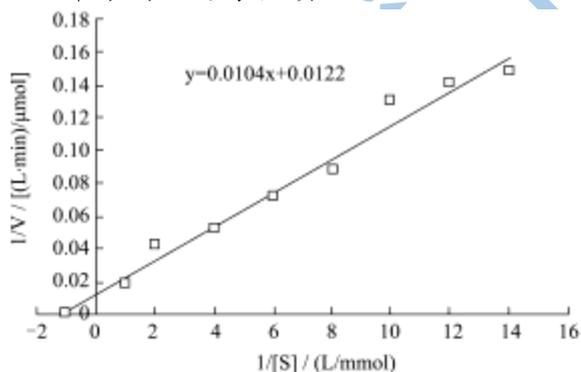


图9 单宁酶的双倒数图

Fig.9 Lineweaver-Burk plot of tannase

图 9 为 Lineweaver-Burk 双倒数图, $1/V$ 与 $1/[S]$ 呈线性关系, 直线方程为 $y=0.0104x+0.0122$, 从而得出最大反应速率 V_{max} 为 $81.96 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 米氏常数 K_m 为 $0.85 \text{ mmol}/\text{L}$ 。 K_m 值较小^[15], 说明黑曲霉 T3-5-1 所产单宁酶与底物 PG 的亲和力较大。

2.6 单宁酶催化合成没食子酸丙酯

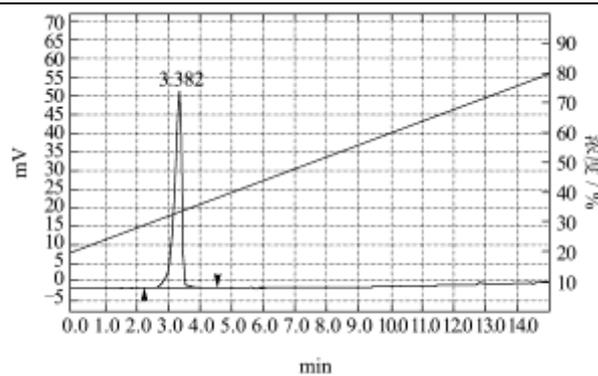


图10 反应 0 h HPLC 色谱图

Fig.10 HPLC chromatogram before reaction

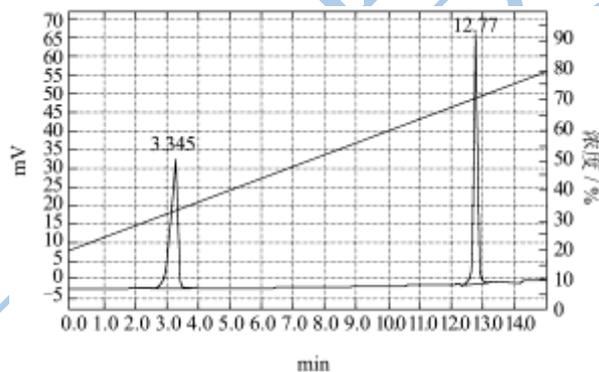


图11 反应 30 h HPLC 色谱图

Fig.11 HPLC chromatogram after reaction of 30 h

没食子酸与丙醇在 AOT 异辛烷反胶束单宁酶催化体系中反应, 其 HPLC 检测结果如图 10 和图 11 所示, 反应 0 h 时, 在 3.382 min 有一色谱峰, 为没食子酸, 反应 30 h 后, 在 12.771 min 有一个新的色谱峰出现, 并与没食子酸丙酯标样的保留时间 12.777 min (图 12) 基本一致, 证明在黑曲霉 T3-5-1 单宁酶催化下, 没食子酸与丙醇在反胶束体系中可发生酯化反应, 生成没食子酸丙酯。

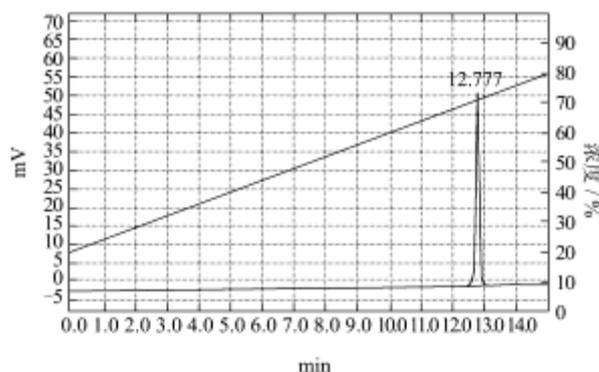


图12 没食子酸丙酯标样 HPLC 色谱图

Fig.12 HPLC chromatogram of PG standard sample

3 结论

3.1 以黑曲霉 T3-5-1 为生产菌株, 发酵生产单宁酶, 分别用硫酸铵沉淀法和透析法对粗酶液进行初步纯

化,结果表明使用截留分子量 12 kDa 的透析袋对粗酶液进行透析后,单宁酶比活力为 3108.58 U/mg,而硫酸铵沉淀法处理后单宁酶比活力为 2939.38 U/mg,故单宁酶粗酶液选择透析法进行初步纯化。

3.2 对透析样品进行 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析后可得到纯度较高的单宁酶,将其与单宁酶 A 和单宁酶 B 分别作 GPC 凝胶色谱分析,发现三者的保留时间非常接近,即三者分子量基本一致,而黑曲霉 T3-5-1 所产单宁酶的比活力最高,达到 5304.53 U/mg。

3.3 对纯化后的单宁酶进行酶学性质测定,结果表明:其最适 pH 值为 5.00,且在 pH 值 3.00~7.00 之间都有较高酶活力;其最适反应温度为 40 °C,且在 30-60 °C 之间都有较高酶活力;底物为 PG 时,最大反应速率 V_{\max} 为 81.96 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,米氏常数 K_m 为 0.85 mmol/L。

3.4 利用黑曲霉 T3-5-1 单宁酶在 AOT 异辛烷反胶束体系中催化没食子酸和丙醇反应,经 HPLC 检测表明,能够合成出没食子酸丙酯,此结论为此种单宁酶在非水相合成中的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Battestin V, Macedo G A. Tannase production by *Paecilomyces variotii* [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(9): 1832-1837
- [2] 喻晓蔚.有机介质体系单宁酶生物合成鞣酸酯键的研究[D].杭州:浙江大学,2006
Yu X W. Catalyzation of Gallic Acid Ester Bond by Tannase in Organic Solvents [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006
- [3] Riul A J, Goncalves H B, Jorge J A, et al. Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 85-86: 126-133
- [4] Chaacutecz-Gonzacutecz M, Rodriacuteguez-Duraacuten L V, Balagurusamy N, et al. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5(2): 445-459
- [5] 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 H. Study on Tannase Produce by *Aspergillus niger* and Immobilized Tannase Preparation of Gallic Acid and Proryl Gallate [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2012
- [6] Sharma S, Agarwal L, Saxena R K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(7): 2544-2551
- [7] Kannan N, Aravindan R, Viruthagiri T. Effect of culture conditions and kinetic studies on extracellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407 [J]. *Indian Journal of Biotechnology*, 2011, 10(3): 321-328
- [8] 保玉心,邱数毅.响应面法优化黑曲霉产单宁酶的固体发酵条件[J].现代食品科技,2012,28(8):986-989
Bao Y X, Qiu S Y. Optimization of the Solid State Fermentation Conditions for Tannase Production by *Aspergillus niger* using Response Surface Method [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(8): 986-989
- [9] Yu Q, Hai N, Wen H, et al. Properties and secondary structure of tannase from *Penicillium herquei* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(5): 858-866
- [10] Aguilar C N, Gutiérrez-Sánchez G. Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase [J]. *Food Science and Technology International*, 2001, 7(5): 373-382
- [11] 林健辉,黄曼曼,陈雪香,等.曲霉 T3-5-1 产单宁酶培养条件优化[J].食品科学,2010,31(19):245-249
Lin J H, Huang M M, Chen X X, et al. Optimization of Culture Conditions for Producing Tannase by *Aspergillus* sp. T3-5-1 [J]. *Food Science*, 2010, 31(19): 245-249
- [12] 农嘉仪,李敏英,叶剑威,等.交联酶聚集体制备单宁酶及固定化酶性质研究[J].食品与机械,2012,28(1): 154-158
Nong J Y, Li M Y, Ye J W, et al. Preparation and properties of cross-linked enzyme aggregates tannase [J]. *Food and Machinery*, 2012, 28(1): 154-158
- [13] 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(1/2): 248-254
- [14] Yu X W, Li Y Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2006, 40(1-2): 44-50
- [15] 王维维,邱树毅,谢晓莉,等.胞外单宁酶纯化及酶学性质的研究[J].食品科学,2011,32(13):239-243
Wang W W, Qiu S Y, Xie X L, et al. Purification and Enzymatic Properties of Extracellular Tannase from *Aspergillus niger* [J]. *Food Science*, 2011, 32(13): 239-243