

研究报告

戊糖乳杆菌单宁酶的性质及其水解石榴皮提取鞣花酸

吕昂¹, 闫巧娟², 马志远², 杨绍青¹, 江正强^{*1,3}

1 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国农业大学 工学院, 北京 100083

3 中原食品实验室, 河南 漯河 450007

吕昂, 闫巧娟, 马志远, 杨绍青, 江正强. 戊糖乳杆菌单宁酶的性质及其水解石榴皮提取鞣花酸[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2694-2706.

LÜ Ang, YAN Qiaojuan, MA Zhiyuan, YANG Shaoqing, JIANG Zhengqiang. Characterization of a tannase from *Lactiplantibacillus pentosus* and application of this enzyme in extraction of ellagic acid from pomegranate peel[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2694-2706.

摘要:【背景】鞣花酸是一种天然多酚, 具有抗癌、抗氧化、抗病毒和降血压等功能, 在食品、饲料和制药等行业应用广泛, 市场需求量逐年增加。单宁酶能水解鞣花酸单宁生成小分子鞣花酸, 但现有的酶种少, 转化率低、生产成本高。【目的】从戊糖乳杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)中克隆一个新型单宁酶基因, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达, 研究其相关酶学性质及从石榴皮中提取鞣花酸。【方法】以戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)基因组 DNA 为模板, 克隆一个单宁酶基因(*LpeTanA*)。构建重组表达载体 pET32a-*LpeTanA*, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。Ni-NTA 亲和层析纯化后测定酶学性质及水解石榴皮提取鞣花酸。【结果】该酶与里昂葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)单宁酶同源性最高, 为 48.50%。纯化后重组单宁酶分子质量为 75 kDa, 最适 pH 和温度分别为 pH 7.0 和 25 °C, 在 pH 6.0–8.0 和 40 °C 以下稳定。该酶对没食子酸甲酯具有最高比酶活力, 为 137.7 U/mg。LpeTanA 以石榴皮粉为底物, 于 25 °C 水解 24 h 后鞣花酸提取率为 11.5%, 纯度达 28.0%。【结论】通过对单宁酶 LpeTanA 的酶学性质研究, 确定了 LpeTanA 对石榴皮的水解特性, 为单宁酶的开发和水解石榴皮提取鞣花酸提供了参考依据。

关键词: 戊糖乳杆菌; 单宁酶; 石榴皮; 鞣花酸

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103004); 中央高校基本科研业务费专项基金(2024TC040)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103004) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2024TC040).

*Corresponding author. E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 2024-09-12; Accepted: 2024-12-06; Published online: 2025-01-15

Characterization of a tannase from *Lactiplantibacillus pentosus* and application of this enzyme in extraction of ellagic acid from pomegranate peel

LÜ Ang¹, YAN Qiaojuan², MA Zhiyuan², YANG Shaoqing¹, JIANG Zhengqiang^{*1,3}

1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

3 Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 450007, Henan, China

Abstract: [Background] Ellagic acid, a natural polyphenol, has anticancer, antioxidant, antiviral, and blood pressure-lowering effects. Because of the wide applications in food, feed, and pharmaceutical industries, the demand for ellagic acid has been growing year by year. Tannases can catalyze the conversion of ellagitannins into ellagic acid. However, few tannases are available, and the application of these enzymes in production is limited due to the low conversion rate and the high production cost. [Objective] To clone a tannase gene from *Lactiplantibacillus pentosus* and express in *Escherichia coli*, characterize the enzymatic properties of the expressed protein, and use the protein for the extraction of ellagic acid from pomegranate peel. [Methods] The tannase gene (*LpeTanA*) was cloned from the genomic DNA of *L. pentosus*. The recombinant plasmid pET32a-*LpeTanA* was constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The enzyme purified by Ni-NTA affinity chromatography was characterized and used for the extraction of ellagic acid from pomegranate peel. [Results] The enzyme shared the highest amino acid sequence identity of 48.50% with the tannase from *Staphylococcus lugdunensis*. The molecular weight of the purified *LpeTanA* was about 75 kDa. The optimal pH and temperature of *LpeTanA* were pH 7.0 and 25 °C, respectively. The enzyme was stable up to 40 °C and within pH 6.0–8.0. It showed the highest specific activity (137.7 U/mg) towards methyl gallate. The extraction rate and purity of ellagic acid was 11.5% and 28.0%, respectively, after pomegranate peel powder was hydrolyzed by *LpeTanA* at 25 °C for 24 h. [Conclusion] *LpeTanA* is characterized and used to hydrolyze pomegranate peel. The results provide reference for the development of tannases and the extraction of ellagic acid by tannases from pomegranate peel.

Keywords: *Lactiplantibacillus pentosus*; tannase; pomegranate peel; ellagic acid

单宁酶(tannase, EC 3.1.1.20), 能够水解单宁酯键和缩酚酸键, 属于酯酶超家族^[1]。单宁酶在自然界中广泛存在, 尤其在黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和乳杆菌(*Lactobacillus*)中^[2]。单宁酶的分子量范围在 50–320 kDa, 由 2 个或者 2 个以上亚基组成。一些已报道的单宁酶最适 pH 值为 5.0–6.0, 最适温度为 30–60 °C, 在 pH 3.0–8.0 保持稳定^[3]。

单宁酶广泛应用于食品、轻工、饲料和制药等行业。Shao 等^[4]采用黑曲霉(*Aspergillus niger*)单宁酶同步浸提绿茶, 茶多酚的含量从 137 g/kg 提高至 291 g/kg, 酯儿茶素转化为非酯儿茶素, 解决饮料“冷后浊”的问题。Cavalcanti 等^[5]使用烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)单宁酶处理山羊皮革废水, 单宁含量降低了 89%。Lorusso 等^[6]利用变色栓菌(*Trametes versicolor*)单宁酶, 30 min

降解菜籽粕中 80%以上的单宁,加强了单宁酶在菜籽粕饲料中的应用。郭林新等^[7]利用单宁酶水解马桑皮制备没食子酸,提取率 10.79%,纯度达 96%。

单宁是一种独特的酚类代谢产物,广泛存在于植物中,分子量大多数在 500–3 000 Da 之间。单宁具有广谱抗菌性,能够抑制大部分微生物的生长,但仍有一些微生物能够降解单宁,主要包括黑曲霉(*A. niger*)^[8]、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)^[9]、日本曲霉(*Aspergillus Japonicus*)^[10]、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)^[11]、乳酸菌(*Lactobacilli*)^[12]和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[13]等。微生物降解单宁主要是通过其分泌的酶催化断裂单宁中的酯键或缩酚键,生成缩酚酸和多元醇,产物继续被多酚酶与脱羧酶等酶降解为间苯三酚和间苯二酚,最终转化为小分子的 3-羟基-5-氧-己酸、5-氧-6-己酸甲酯^[14]。不同来源的单宁酶性质差异较大,低温、高温和耐碱单宁酶相继被发现。Kasieczka-Burnecka 等^[15]从南极轮枝孢菌属(*Verticillium*) P9 分离到低温单宁酶 TAHI (25 °C)和 TAHII (20 °C)。

Ramírez-Coronel 等^[16]从黑曲霉(*A. niger*)中分离到了最适温度为 60–70 °C 的单宁酶。Kanpiengjai 等^[17]从戊糖乳杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)中得到了最适 pH 9.0 的单宁酶 LpTanQA1-5 和最适 pH 8.0 的单宁酶 LpTanBA-7。

真菌单宁酶在大肠杆菌中表达受限,而细菌单宁酶没有翻译后的修饰,可更好地表达^[18]。细菌单宁酶可以有效水解天然单宁和单宁酸,乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)是其重要来源。Iwamoto 等^[19]首次从植物乳杆菌(*L. plantarum*) ATCC 14917^T 中表达了单宁酶 TanBLp, 其最适 pH 值为 8.0, 最适温度为 40 °C, 在 25–45 °C 保持 60%的活性。Ueda 等^[20]比较了类植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus paraplantarum*)单宁酶 TanLpa、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)单宁酶 TanLpe 和植物乳杆菌(*L. plantarum*)单宁酶 TanLpl。TanLpa 和 TanLpl 在 40 °C 和 pH 8.5 酶活性最高,而 TanLpe 的最适反应条件为 35 °C 和 pH 8.0^[20]。TanLpl、TanLpe 和 TanLpa 对绿茶儿茶素的没食子酸酯表现出更高的活性^[20]。单宁酶性质的差异主要是由单宁酶基因的来源与培养条件决定(表 1),

表 1 一些单宁酶的主要理化性质

Table 1 Principal physicochemical properties of some tannases

来源 Source	分子量 Molecular weight (kDa)	最适 pH Optimal pH	pH 稳定性 pH stability	最适温度 Optimal temperature (°C)	温度稳定性 Temperature stability	参考文献 Reference
<i>Aspergillus niger</i>	62.7	7.0	6.0–7.5	40	Stable up to 40 °C	[2]
<i>Camellia sinensis</i>	35.0	7.0	6.0–8.0	45	Stable up to 60 °C	[3]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	60.0	5.0	5.0–6.0	30	Maintained over 80.0% of its initial activity when incubated below 30 °C	[5]
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	63.0	6.0	3.5–7.5	60	Maintained over 61.3% of its initial activity when incubated below 55 °C	[1]
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	66.0	7.0	3.0–9.0	40	–	[21]
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	50.0	7.0	6.0–8.0	50	Maintained 70.0% of its initial activity when incubated at 55 °C for 30 min	[22]
<i>Streptomyces sviveus</i>	54.0	8.0	6.0–9.0	50	Maintained over 50.0% of its initial activity when incubated at 20–70 °C	[23]
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	50.0	8.5	8.0–10.0	40	–	[19]
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	51.0	8.0	–	35	–	[20]

–: 文中未报道。

–: Not reported in the study.

目前,乳杆菌来源的单宁酶酶学性质单一,应用范围窄,挖掘新型乳杆菌来源的单宁酶并拓宽其应用范围,具有重要意义。

我国石榴正规化发展,石榴皮占石榴20%–30%尚未充分利用,大部分遗弃,造成资源浪费^[24]。石榴皮中的鞣花酸、安石榴苷、安石榴林和没食子酸都是多酚化合物,具有防止脂质氧化、延缓有毒物形成和延长食品保质期等功能^[25]。石榴皮多酚中的鞣花单宁,与糖苷相结合的鞣花酸和安石榴苷水解产生鞣花酸,是鞣花酸的主要来源^[26]。鞣花酸具有抗癌、抗氧化、抗病毒、美白、促凝血、降血压和抗菌等活性,在欧、美、日等发达国家和地区广泛应用于药品、保健品及化妆品行业^[25-27]。目前,鞣花酸生产以化学法和植物提取法为主。化学法主要以五倍子为原料,通过碱化、氧化和酸化处理得到鞣花酸。但五倍子是动物的虫瘿,属于中药且仅限于外用。植物提取法主要以酸水解为主,反应温度高,并且制备过程中会产生大量的废水和废盐^[27]。近年来,国内外相继开展了生物法制备鞣花酸的研究,主要以微生物法和酶法为主。微生物发酵周期长,水解不完全,并且后期纯化较为麻烦。酶法制备反应时间短,易于分离纯化^[28]。使用黑曲霉来源单宁酶水解石榴皮制备鞣花酸,30℃反应48h,提取率约13%,纯度29.08%^[28]。Huang等^[29]利用米曲霉来源单宁酶水解含60%鞣花酸单宁的橡子果实,反应84h时鞣花酸提取率达17.7%。

本研究从戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)中克隆其单宁酶基因(*LpeTanA*)并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中表达,进一步研究了重组单宁酶的酶学性质及其水解石榴皮的应用潜力,以期单宁酶开发和石榴皮利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品

戊糖乳杆菌为实验室筛选,菌种保藏号为CGMCC 1.7665;质粒pET32a保藏于本实验室;

大肠杆菌(*E. coli*)感受态细胞 Trans5 α 和 BL21,北京博迈德基因技术有限公司; *FastPfu* 快速高保真 DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司; *EcoR* I 和 *Hind* III 内切酶, New England Biolabs 公司;石榴皮粉,中国北京同仁堂(集团)有限责任公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0,调整 pH 值至 7.2,固体培养基加入 1.5%–2.0%的琼脂粉。Citrate (pH 3.5–6.0)、Sodium phosphate (pH 6.0–8.0)、Tris-HCl (pH 7.0–9.0)、CHES (pH 9.0–10.5)、Glycine-NaOH (pH 10.0–11.0),生工生物工程(上海)股份有限公司。

ClonExpress II One Step Cloning Kit (无缝克隆试剂盒),Vazyme 公司;细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;M5 Hiper Gel Extraction Kit,北京聚合美生物科技有限公司;Ni-NTA 亲和层析柱,北京索莱宝科技有限公司;没食子酸、安石榴苷、鞣花酸和石榴皮鞣素,上海源叶生物科技有限公司;乙腈(色谱级),赛默飞世尔科技公司。热循环仪, Bio-Rad 公司;高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪,岛津公司;C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Phenomenex 公司;旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂。

1.3 戊糖乳杆菌单宁酶基因克隆与序列分析

利用 NCBI 网站检索得到戊糖乳杆菌来源单宁酶 *LpeTanA* 的碱基序列,通过相关文献^[20]和 NCBI BLAST 比对初步确定了以单宁酶 *LpeTanA* (GenBank: UXI96086.1)为目的基因。根据单宁酶 *LpeTanA* 全长序列,设计上游引物 *LpeTanA*-F (5'-CCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCTGTGGTCAAACGAAGACCAAGAC-3')和下游引物 *LpeTanA*-R (5'-TGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTACTTCAA ACTCTTATTGA CCC-3'),以戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)基因组(细菌基因组提取试剂盒提取)为模板扩增单宁酶 *LpeTanA* 基因序列。PCR 反应体系:10 $\times$ TransStart *FastPfu* Buffer

5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL , LpeTanA-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , LpeTanA-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 模板 DNA 1 μL , *FastPfu* DNA 聚合酶 1 μL , 蒸馏水补足 50 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 M5 Hiper Gel Extraction Kit (with column)回收后, 与 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pET32a 质粒经无缝克隆试剂盒连接, 构建重组载体 pET32a-LpeTanA, 转化至大肠杆菌(*E. coli*) Trans5 α 感受态细胞中, 测序正确的阳性转化子进行质粒提取。

通过 NCBI 的 CD-Search 工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析 LpeTanA 结构域; 采用 DTU Health Tech 开发的 SignalP 6.0 (SignalP 6.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)预测信号肽序列; 利用 NCBI BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)检索其相似序列; 通过 ExPASy ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)解析蛋白质的氨基酸组成、分子量和等电点等理化参数; 使用 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对分析, 并使用 BoxShade 在线平台(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)生成序列比对图。使用在线软件 AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>)对蛋白质进行三级结构预测。使用在线软件 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)对蛋白质进行二级结构预测。使用在线软件 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得没食子酸甲酯、没食子酸乙酯和没食子酸丙酯的三维结构。利用 AutoDock4 将没食子酸甲酯、没食子酸乙酯和没食子酸丙酯对接到 LpeTanA 的活性中心。

1.4 戊糖乳杆菌单宁酶(LpeTanA)的表达与纯化

提取阳性转化子的质粒, 并转化至大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)感受态细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取单菌落于具有氨苄抗性(100 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 12 h

左右。取 1 mL 种子液于 100 mL LB 培养基中, 当 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L)开始诱导, 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 以上。

10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)重悬菌体, 300 W 超声破碎 3 s, 间歇 5 s, 破壁总时间为 30 min。细胞裂解液 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。利用 Ni-NTA 柱对重组蛋白进行纯化处理。层析柱预先用 10 个柱体积的缓冲液 A 平衡, 然后将粗酶液以 0.5 mL/min 的流速上样, 并收集蛋白流出液。使用缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 500 mmol/L NaCl, 50/100/200 mmol/L 咪唑)以 1 mL/min 流速线性洗脱目的蛋白, 分管收集流出液, 并测定 OD_{280} , 收集液经 SDS-PAGE 检测纯度。

1.5 单宁酶活力及蛋白浓度测定

参考 Sharma 等^[30]的方法进行单宁酶活力的测定: 250 μL 适当稀释酶液与 250 μL 没食子酸丙酯溶液(10 mmol/L, pH 7.0)混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。加入 300 μL 甲醇-罗丹宁溶液(0.667%)终止反应 5 min。加入 200 μL 700 mmol/L KOH 显色 5 min。最后加入 4 mL 去离子水, 测定 OD_{520} 。以每分钟生成 1 μmol 没食子酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

参考 Lowry 法^[31]测定蛋白的含量。

1.6 LpeTanA 的酶学性质测定

最适 pH 及 pH 稳定性: 在下述缓冲液(citrate, pH 3.5–6.0; sodium phosphate, pH 6.0–8.0; Tris-HCl, pH 7.0–9.0; CHES, pH 9.0–10.5; glycine-NaOH, pH 10.0–11.0)中配制 10 mmol/L 的没食子酸丙酯溶液。测定不同 pH 值下的酶活力, 以最高酶活力为 100.0%, 分别计算相对酶活力。pH 稳定性: 将纯酶液(1 mg/mL)于 25 $^{\circ}\text{C}$ 保温处理 30 min, 冰水浴 30 min, 测定其 pH 稳定性, 以未经处理的纯酶液作为对照。

最适温度及温度稳定性: 配制 10 mmol/L 的没食子酸丙酯溶液(pH 7.0), 分别在不同温度下(15–70 $^{\circ}\text{C}$)测定酶反应的最适温度。以最高酶

活力为 100.0%，分别计算相对酶活力。温度稳定性：将纯酶液(1 mg/mL)置于不同温度(15–70 °C)保温处理 30 min，冰水浴中 30 min，测定其温度稳定性，以未经处理的纯酶液作为对照。

金属离子及化合物对酶活力影响：分别向纯酶(1 mg/mL)中加入金属离子和化合物至终浓度为 1 mmol/L，25 °C保温 30 min，冰水浴 30 min。在最适反应条件下，测定金属离子及化合物对酶的影响。

底物特异性测定：用最适缓冲液分别配制 10 mmol/L 的没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、没食子酸丙酯和儿茶素没食子酸酯。参考上述酶活力测定方法，在最适条件下，考察酶对不同底物的特异性。

1.7 LpeTanA 水解石榴皮粉

称取 80 g 石榴皮粉，加入 60%乙醇 600 mL，在 40 °C下超声(功率 300 W)提取 30 min。冷却至室温后 8 000 r/min 离心 30 min 收集上清，滤渣再提取 1 次，重复上述操作 3 次。将上清液通过旋转蒸发仪浓缩去除挥发性溶液，用去离子水稀释至 300 mL。将粗酶液加入到石榴皮提取液中，加酶量为 2 U/mL，并用 NaOH 水溶液调节 pH 7.0。25 °C水浴反应 24 h。反应结束后 8 000 r/min 离心 10 min，沉淀用 40 °C烘箱烘干，得到鞣花酸粗品。鞣花酸粗品用甲醇超声(功率 300 W，工作 3 s，间歇 5 s，时间 20 min)溶解，过滤后利用高效液相分析。

HPLC^[32]分析酶解前后的上清和沉淀，以没食子酸、鞣花酸、石榴皮鞣素和安石榴林为标准品。流动相：10%乙腈与 0.1%的磷酸水溶液(A 相)，90%乙腈与 0.1%的磷酸水溶液(B 相)；检测器：紫外检测器，检测波长 254 nm；进样量：5 µL；流速：1 mL/min；柱温：30 °C。在 30 min 的运行时间内洗脱梯度为：0–30%流动相 B (0–15 min)；30%流动相 B (15–17 min)；35%–50%流动相 B (17–18 min)；50%流动相 B (18–22 min)；50%–0%流动相 B (22–23 min)；流动相 A (23–30 min)。参照 Lu 等^[33]测定鞣花酸

纯度的方法：精确称取鞣花酸标品/样品 0.005 g，用甲醇完全溶解待测。通过标品对照，根据样品中鞣花酸的峰面积与其浓度之间的正比关系，计算出样品的鞣花酸纯度。

1.8 数据处理及分析

采用 Origin 2022 软件对 3 次平行数据进行统计分析和图片处理。

2 结果与分析

2.1 LpeTanA 单宁酶基因的克隆及序列分析

从戊糖乳杆菌基因组克隆得到单宁酶(LpeTanA)基因序列。LpeTanA 基因序列全长为 1 884 bp，共编码 628 个氨基酸，N 端含有一个长度为 22 个氨基酸的信号肽。LpeTanA 的分子量为 65 kDa，等电点为 9.91。蛋白序列比对表明(图 1)，LpeTanA 与里昂葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)单宁酶 TanAsI (GenBank 登录号：AOV87064.1)同源性最高，为 48.50%^[21]。其次与解没食子酸盐链球菌(*Streptococcus gallolyticus*) UCN34 单宁酶 TanAsg (GenBank 登录号：CBI13425.1)相似性为 42.36%^[22]；与植物乳杆菌(*L. plantarum*)单宁酶 TanLpl (GenBank 登录号：WP_015640916.1)^[20]、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)单宁酶 TanLpe (GenBank 登录号：BAN10247.1)^[20]和类植物乳杆菌(*L. paraplantarum*)单宁酶 TanLpa (GenBank 登录号：BAN10246.1)^[20]相似性分别为 14.64%、12.85%和 11.57%。LpeTanA 是一种典型的丝氨酸水解酶，其保守的五肽序列 Gly-X-Ser-X-Gly 用黑色方框标记。

经 AlphaFold 服务器三维结构建模，获得 5 个模型，其中模型 1 的预测模板建模(predictive template modeling, PTM)和界面预测模板建模(interface predictive template modeling, iPTM)得分最高，均为 0.9，建模数据可用。LpeTanA 整体呈新月型结构，由 19 个 α 螺旋和 15 个 β 片层组成，其中催化三联体(G193, S195, G197)位于 β 8 和 α 5 之间(图 2)。通过 PSIPRED 软件

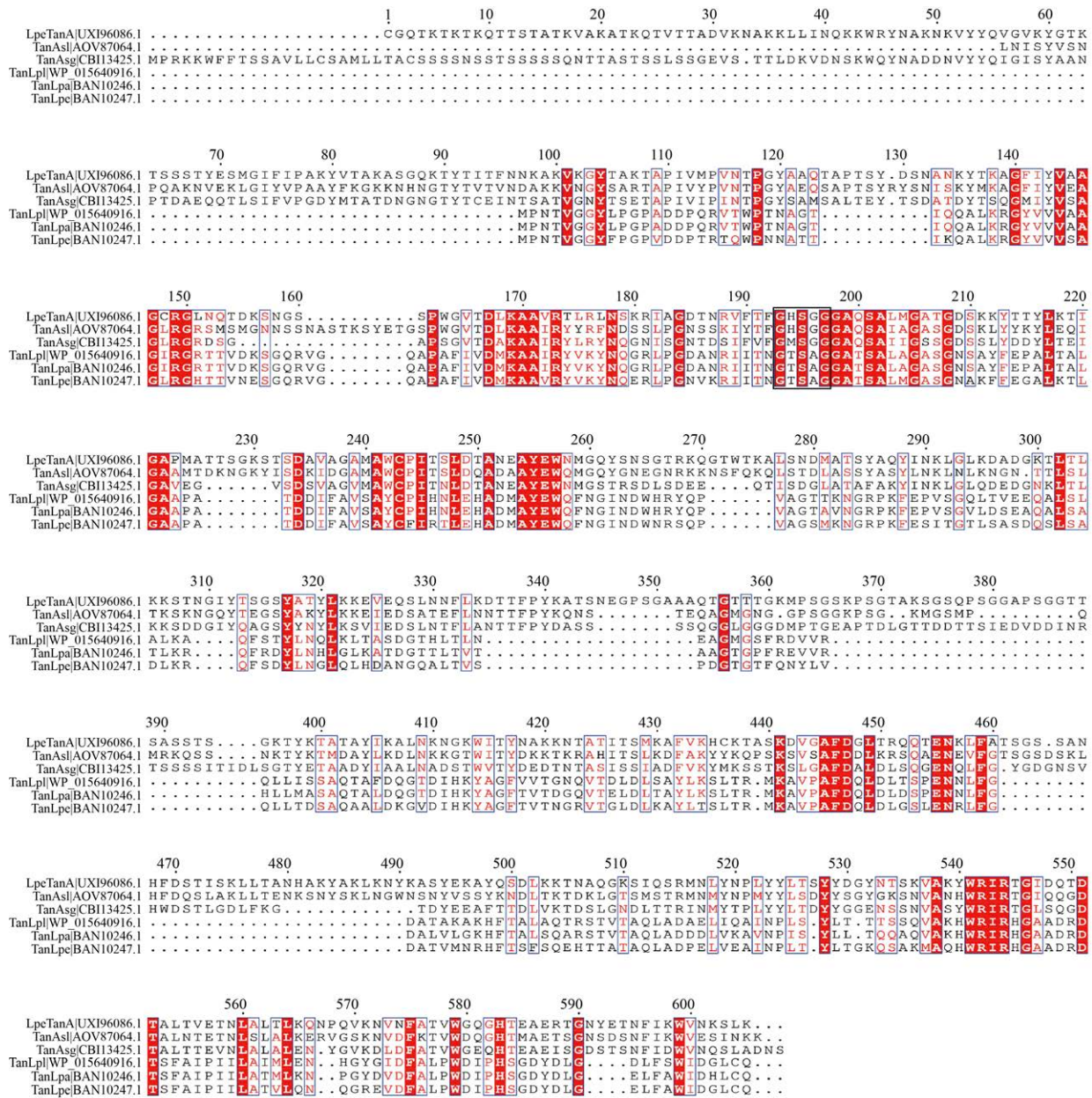


图1 LpeTanA 多重序列比对 LpeTanA 与其他单宁酶多重序列比对序列分别为: 里昂葡萄球菌单宁酶 TanAsI (GenBank 登录号: AOV87064.1); 解没食子酸盐链球菌 UCN34 单宁酶 TanAsG (GenBank 登录号: CBI13425.1); 植物乳杆菌单宁酶 TanLpI (GenBank 登录号: WP_015640916.1); 戊糖乳杆菌单宁酶 TanLpe (GenBank 登录号: BAN10247.1); 类植物乳杆菌单宁酶 TanLpa (GenBank 登录号: BAN10246.1)。

Figure 1 Multiple amino sequences alignment of LpeTanA. Multiple amino sequences alignment of LpeTanA with other characterized tannases: TanAsI (AOV87064.1) from *Staphylococcus lugdunensis*; Tannase TanAsG (CBI13425.1) from *Streptococcus gallolyticus* UCN34; Tannase TanLpI (WP_015640916.1) from *Lactiplantibacillus plantarum*; Tannase TanLpe (BAN10247.1) from *Lactiplantibacillus pentosus*; tannase TanLpa (BAN10246.1) from *Lactiplantibacillus paraplantarum*.

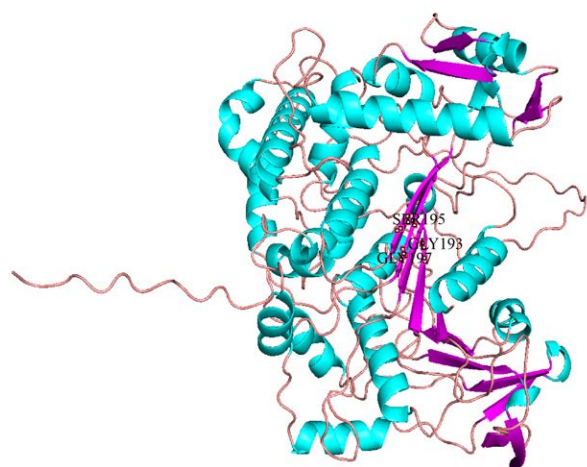


图2 LpeTanA 三维结构 蓝绿色: α 螺旋; 紫色: β 片层。

Figure 2 Overall structure of LpeTanA. Blue-green: α -helix; Purple: β -strand.

进行二级结构预测,结果显示: α -螺旋占 34.5%, β -折叠占 10.0%, 无规则卷曲占 50.2%。

2.2 重组单宁酶(LpeTanA)的表达及纯化

LpeTanA 在大肠杆菌中可溶表达,粗酶液经 Ni-NTA 亲和层析柱进行了纯化,达到电泳纯(图 3)。酶的回收率为 54.2%,比酶活力由 25.9 U/mg 提升至 59.5 U/mg,纯化倍数为 2.3 倍(表 2)。此外,通过 SDS-PAGE 分析,确定 LpeTanA 的分子量约为 75 kDa(图 3),与预测分子量相近。

2.3 LpeTanA 的酶学性质

LpeTanA 的基本酶学性质如图 4 所示。LpeTanA 最适 pH 值为 7.0(图 4A),最适温度为 25 °C(图 4B)。在 pH 6.0–8.0(图 4C)及 40 °C 以下(图 4D)处理 30 min 后,其酶活力仍能保持 80% 以上。分子对接的结果显示:LpeTanA 与没食子酸甲酯的结合能力最大,结合能为 -5.05 kJ/mol,与没食子酸乙酯和没食子酸丙酯的结合能分别为 -4.13 kJ/mol 和 -4.01 kJ/mol。

在 1 mmol/L 的浓度下,金属离子及化合物对 LpeTanA 酶活力具有显著影响, Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 对 LpeTanA 具有激活作用,分别使酶活力提升 12.1%、15.2%、8.2%和 19.8%(表 3)。而 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对 LpeTanA 产生了抑制效

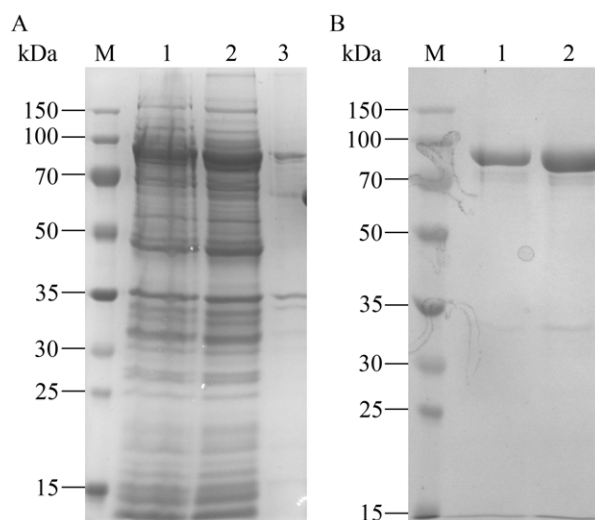


图3 单宁酶 LpeTanA 电泳图 A:单宁酶 LpeTanA 粗酶电泳图(M: 蛋白 marker; 1: 全细胞; 2: 上清; 3: 沉淀)。B: 单宁酶 LpeTanA 纯化图(M: 蛋白 marker; 1–2: Ni-NTA 纯化)。

Figure 3 SDS-PAGE analysis of tannase LpeTanA. A: SDS-PAGE analysis of crude enzyme LpeTanA (M: Marker precision plus protein standards; 1: Complete cell sample; 2: Cell supernatant; 3: Cell precipitation). B: SDS-PAGE analysis of purified tannase LpeTanA (M: Marker precision plus protein standards; 1–2: Purified by Ni-NTA).

表2 LpeTanA 纯化表

Table 2 Purification summary of LpeTanA

纯化步骤 Purification steps	粗酶液 Crude enzyme	亲和层析 Ni-NTA
总酶活 Total enzyme activity (U) ^a	1 296.5	703.0
总蛋白 Total protein (mg) ^b	50.1	11.8
比酶活力 Specific enzyme activity (U/mg)	25.9	59.5
纯化倍数 Fold purification	1.0	2.3
回收率 Recovery yield (%)	100.0	54.2

^a: 以 10 mmol/L 没食子酸丙酯(propyl gallate)为底物,在 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0 缓冲液体系下 25 °C 反应 5 min 后测定酶活力; ^b: 蛋白含量用 Lowry^[31]法测定。

^a: Enzyme activity was assessed in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0 at 25 °C for 5 min using 10 mmol/L propyl gallate as the sole substrate. ^b: Protein concentration was determined by the Lowry^[31] method.

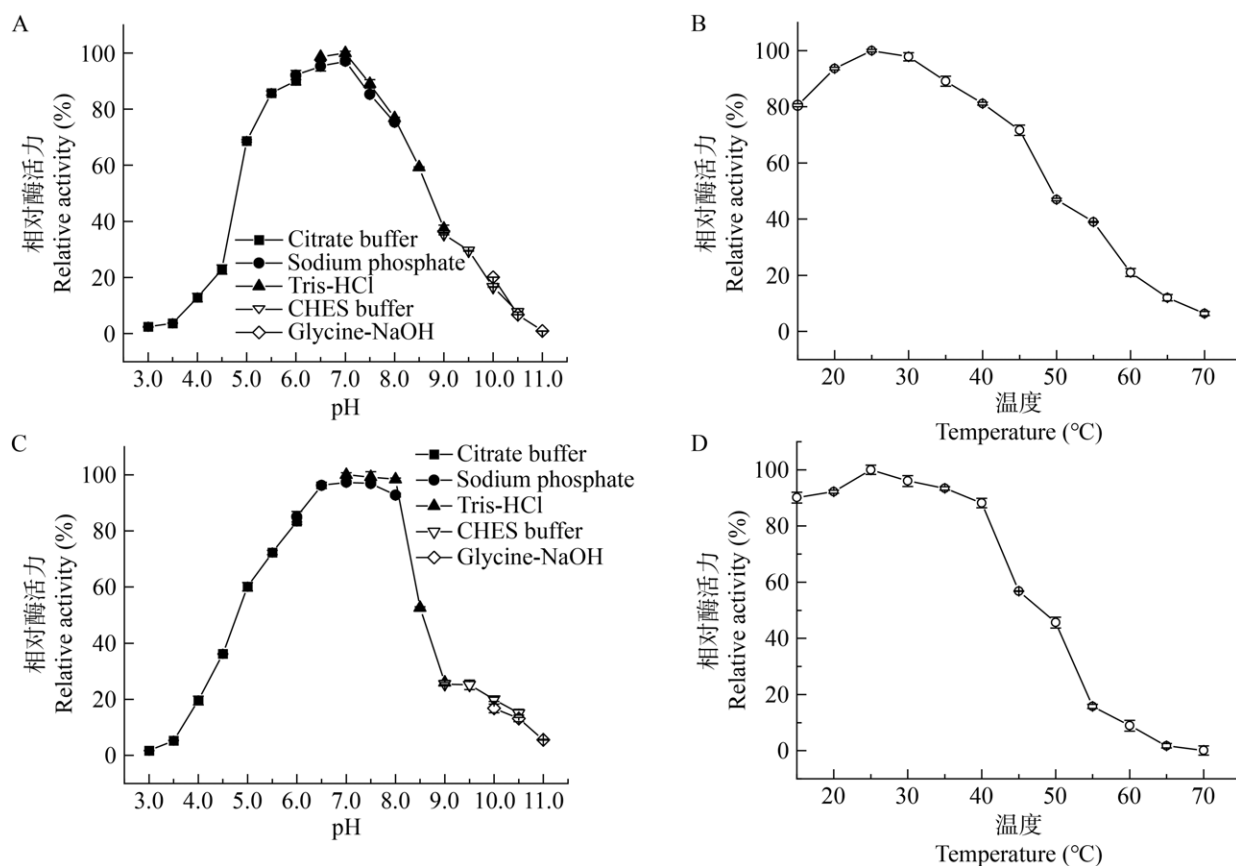


图4 LpeTanA 的最适 pH (A)、最适温度(B)、pH 稳定性(C)和温度稳定性(D)

Figure 4 Optimal reaction pH (A), optimal reaction temperature (B), pH stability (C) and thermal stability (D) of LpeTanA.

果, 酶活力分别下降 23.4%、15.8%和 21.2% (表 3)。LpeTanA 对不同底物的特异性如表 4 所示。LpeTanA 对没食子酸甲酯具有最高酶活力 (100.0%), 对没食子酸乙酯、没食子酸丙酯和儿茶素没食子酸酯的相对酶活力分别为 55.1%、43.2%和 45.1%。

2.4 LpeTanA 水解石榴皮粉提取鞣花酸

LpeTanA 水解石榴皮提取液后的鞣花酸粗品颜色为淡黄色, 提取率约为 11.5%, 纯度为 28.0%。HPLC 分析表明: 上清液中的鞣花酸浓度从 427.2 $\mu\text{g/mL}$ 下降至 172.4 $\mu\text{g/mL}$, 沉淀中鞣花酸浓度从 102.4 $\mu\text{g/mL}$ 上升至 220.0 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。

3 讨论

单宁酶在食品工业中应用广泛, 多被用于

脱除果实和饮品中的涩味或者作为澄清剂改善饮料储藏中的浑浊问题^[4]。同时, 单宁酶还会影响绿茶、柿子汁和核桃中酚类物质的含量及其生物活性^[4,34-35]。石榴皮是鞣花酸的重要来源, 可以通过酶解石榴皮提取鞣花酸, 所用酶主要为单宁酶^[36]。因此, 本文研究了戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)单宁酶 LpeTanA 的克隆表达、酶学性质及其水解石榴皮提取鞣花酸。

LpeTanA 与里昂葡萄球菌(*S. lugdunensis*)单宁酶 TanAS1 同源性最高(48.50%)^[21], 表明 LpeTanA 是一个新型单宁酶。LpeTanA 的最适 pH 值为 7.0 (图 4A), 与里昂葡萄球菌(*S. lugdunensis*)^[21]、黑曲霉(*A. niger*)^[2]和植物乳杆菌(*L. plantarum*)^[37]等单宁酶最适 pH 相同。该酶在 pH 6.0–8.0 稳定 (图 4B), 与解没食子酸盐链球菌(*S. gallolyticus*)

表 3 金属离子及化合物对 LpeTanA 的影响

Table 3 The role of different metal ions and compounds on the purified LpetanA

金属离子及化合物 Metal ions and compounds (1 mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%) ^a
Control	100.0±0.00
Ni ²⁺	119.8±0.21
Ca ²⁺	76.6±0.15
Zn ²⁺	108.2±0.49
Fe ²⁺	86.6±0.32
Fe ³⁺	78.8±0.15
Co ²⁺	94.7±0.30
Cu ²⁺	84.2±0.26
Mn ²⁺	112.1±0.08
Mg ²⁺	115.2±0.13
EDTA	95.7±0.11
SDS	80.1±0.21
DTT	82.6±0.55

^a: 酶活力测定以 10 mmol/L 没食子酸丙酯(propyl gallate)为底物, 在 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0 缓冲液体系下, 于 25 °C 反应 5 min, 以未加入金属离子及化合物的单宁酶活力为对照(100.0%)。

^a: Enzyme activity was determined in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0 at 25 °C for 5 min using 10 mmol/L propyl gallate as the substrate and without any addition was considered as 100.0%.

(pH 6.0–8.0)^[22]和斯维切斯链霉菌(*Streptomyces sviveus*) (pH 6.0–9.0)^[23]单宁酶 pH 稳定范围相近。LpeTanA 与轮枝孢菌(*Verticillium* sp.) P9 单宁酶 TAH I 最适温度均为 25 °C (图 4C), 且该酶在 40 °C 以下保持稳定, 超过 45 °C 时酶活力急剧下降(图 4D)^[15]。LpeTanA 具有在低温下保持稳定、对温度变化敏感以及在中高温时易变性失活的特性, 这些特性与适冷性单宁酶 TAH I 相似, 都表现出易热失活的特点^[15]。相较于其他乳杆菌来源的单宁酶 TanLpl (40 °C, pH 8.5)、TanLpa (40 °C, pH 8.5)和 TanLpe (35 °C, pH 8.0), LpeTanA 的最适温度和 pH 均有所下降, 分别为 25 °C 和 pH 7.0^[20]。TanLpl 和 TanLpa 在 pH 8.0–10.0 保持 80% 以上的酶活力, 而 TanLpe

表 4 LpeTanA 的底物特异性

Table 4 Substrate specificity of the purified LpeTanA

底物 Substrate	比酶活力 Specific enzyme activity (U/mg) ^a	相对酶活力 Relative enzyme activity (%) ^b
没食子酸甲酯 Methyl gallate	137.7	100.0
没食子酸乙酯 Ethyl gallate	75.9	55.1
没食子酸丙酯 Propyl gallate	59.5	43.2
儿茶素没食子酸酯 Catechin gallate	62.1	45.1

^a: 上述底物特异性在 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0 缓冲液体系下于 25 °C 反应 5 min; ^b: 没食子酸甲酯为底物的单宁酶活力为对照(100.0%)。

^a: Substrate specificity was assessed for the various substrates of above-mentioned at 25 °C in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0 for 5 min. ^b: The tannase activity determined using methyl gallate as the substrate was considered as 100.0%.

和 LpeTanA 在 pH 9.0 以上活力急剧下降^[20]。TanLpl、TanLpa 和 TanLpe 对绿茶儿茶素酯表现出更高的活性, 而 LpeTanA 对没食子酸酯具有底物偏好性(表 4), 靠近没食子酸的酯键易被水解, 这与丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)单宁酶 CbTan1 结果相似^[38]。

鞣花单宁在许多植物中都有发现, 树莓、刺梨、石榴皮和覆盆子等植物是其重要来源^[27]。郭林新等^[7]以马桑皮为底物, 加入 20 U/g 的单宁酶, 48 °C、pH 4.5 反应 4 h, 没食子酸含量达 10.79%。Rajak 等^[9]等利用泡盛曲霉(*A. awamori*)来源的单宁酶, 水解麦冬(*Madhuca india*)底物, 酶用量 56.16 IU/g, 35 °C、pH 5.5 转化 72 h 鞣花酸达 0.256 mg/g。本研究的 LpeTanA 能够水解石榴皮生成鞣花酸, 加入 2 U/mL 的 LpeTanA, 25 °C、pH 7.0 反应 24 h 鞣花酸提取率为 11.5%, 纯度达 28.0%。在 pH 5.5、30 °C 加入终浓度为 19.5 U/mL 黑曲霉来源的单宁酶反应 48 h, 鞣花酸提取率为 13%, 纯度为 29.08%^[28]。孙雨晴等^[36]以石榴皮多酚为底物, 在 pH 5.2、45 °C 和加酶量

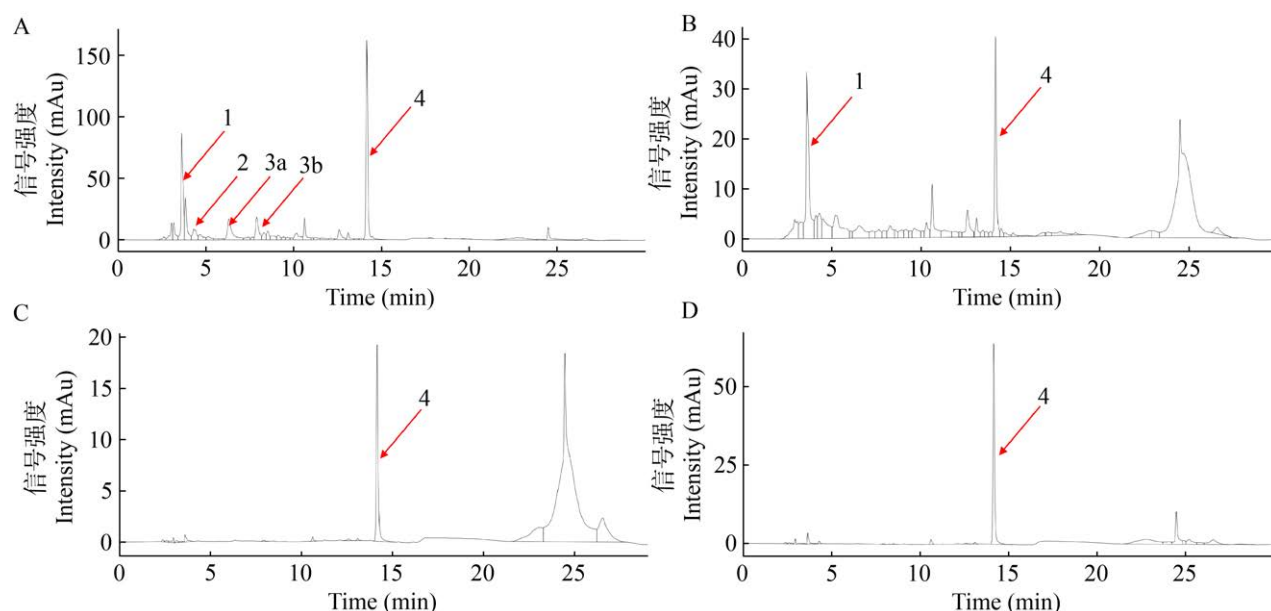


图 5 石榴皮多酚及其酶解产物的 HPLC 指纹图谱 A: 未酶解上清液; B: 酶水解后上清液; C: 未酶解沉淀; D: 酶水解后沉淀。1: 石榴皮鞣素; 2: 没食子酸; 3: 安石榴苷(3a: α -安石榴苷; 3b: β -安石榴苷)^a; 4: 鞣花酸。^a: 安石榴苷包括同分异构体 α -安石榴苷和 β -安石榴苷。

Figure 5 HPLC fingerprints of pomegranate peel polyphenols and their enzymatic hydrolysis products. A: HPLC fingerprint of supernatant before enzyme hydrolysis; B: HPLC fingerprint of supernatant after enzyme hydrolysis; C: HPLC fingerprint of precipitate before enzyme hydrolysis; D: HPLC fingerprint of precipitate after enzyme hydrolysis. 1: Punicalin; 2: Gallic acid; 3: Punicalagin (3a: α -punicalagin; 3b: β -punicalagin)^a; 4: Ellagic acid. ^a: Punicalagin including α -punicalagin and β -punicalagin.

30 mL/g 底物下反应 16 h 后, 鞣花酸得率为 24.73%。因此, LpeTanA 水解石榴皮提取鞣花酸具有加酶量少、反应温度低和反应时间短的特点。

LpeTanA 水解石榴皮后, 沉淀中的鞣花酸从 102.4 $\mu\text{g/mL}$ 上升至 220.0 $\mu\text{g/mL}$, 上清中的鞣花酸浓度从 427.2 $\mu\text{g/mL}$ 下降至 172.4 $\mu\text{g/mL}$ (图 5)。鞣花酸的亲水性和亲脂性均较差, 微溶于水, 溶于碱、吡啶, 不溶于醚, 在水溶液中稳定性较差, 溶解度随着温度的增加而增大^[39]。大多数从石榴皮中制取鞣花酸在高温下进行^[33], 而本实验中的提取温度较低(25 $^{\circ}\text{C}$), 可能会导致鞣花酸从上清中析出。

4 结论

从戊糖乳杆菌中克隆一个新型适冷单宁酶

基因 *LpeTanA*, 并在大肠杆菌中表达。该酶对没食子酸甲酯具有较高的比酶活力(137.7 U/mg), 其最适 pH 值和最适温度分别为 7.0 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 。该酶在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下保持 80% 以上的活性, 高于 45 $^{\circ}\text{C}$ 时会出现失活现象。LpeTanA 水解石榴皮生成鞣花酸的提取率为 11.5%, 纯度为 28.0%。本研究为酶法水解石榴皮生产鞣花酸提供了应用基础。

作者贡献声明

吕昂: 实验数据分析, 数据整理与管理, 实验结果可视化和论文初稿撰写; 闫巧娟: 研究课题监管与指导和实验方法设计; 马志远: 实验数据收集; 杨绍青: 研究项目管理和研究资源采集; 江正强: 研究概念生成、论文审阅与修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] LIU L, GUO J, ZHOU XF, LI Z, ZHOU HX, SONG WQ. Characterization and secretory expression of a thermostable tannase from *Aureobasidium melanogenum* T9: potential candidate for food and agricultural industries[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 9: 769816.
- [2] LIU FL, WANG B, YE YR, PAN L. High level expression and characterization of tannase Tan7 using *Aspergillus niger* SH-2 with low-background endogenous secretory proteins as the host[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 144: 71-75.
- [3] 陈一凡, 阚新意, 蒋晓岚, 高丽萍, 夏涛. 茶树单宁酶 CsTA 的理化性质及其在绿茶饮料中的应用[J]. *茶叶科学*, 2023, 43(1): 124-134.
- CHEN YF, KAN XY, JIANG XL, GAO LP, XIA T. Physicochemical properties of tannase in tea plants(*Camellia sinensis*) and its application on green tea beverages[J]. *Journal of Tea Science*, 2023, 43(1): 124-134 (in Chinese).
- [4] SHAO Y, ZHANG YH, ZHANG F, YANG QM, WENG HF, XIAO Q, XIAO AF. Thermostable tannase from *Aspergillus niger* and its application in the enzymatic extraction of green tea[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 952.
- [5] CAVALCANTI RMF, JORGE JA, GUIMARÃES LHS. Characterization of *Aspergillus fumigatus* CAS-21 tannase with potential for propyl gallate synthesis and treatment of tannery effluent from leather industry[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(6): 270.
- [6] LORUSSO L, LACKI K, DUVNJAK Z. Decrease of tannin content in canola meal by an enzyme preparation from *Trametes versicolor*[J]. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(3): 309-314.
- [7] 郭林新, 强涛涛, 马养民, 任龙芳. 响应面优化马桑皮没食子酸的酶法提取技术[J]. *精细化工*, 2021, 38(7): 1423-1429.
- GUO LX, QIANG TT, MA YM, REN LF. Enzymatic extraction of gallic acid from *Coriaria nepalensis* bark by response surface optimization[J]. *Fine Chemicals*, 2021, 38(7): 1423-1429 (in Chinese).
- [8] CHÁVEZ-GONZÁLEZ ML, GUYOT S, RODRÍGUEZ-HERRERA R, PRADO-BARRAGÁN A, AGUILAR CN. Production profiles of phenolics from fungal tannic acid biodegradation in submerged and solid-state fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(4): 541-546.
- [9] RAJAK RC, SINGH A, BANERJEE R. Biotransformation of hydrolysable tannin to ellagic acid by tannase from *Aspergillus awamori*[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2017, 35(1): 27-34.
- [10] MELO A, SOUZA PNDC, MAIA N, THOMAS AB, Da SILVA LBR, BATISTA L, FERREIRA R, CARDOSO P. Screening and identification of tannase-producing fungi isolated from Brazilian caves[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(6): 483-487.
- [11] RODRÍGUEZ H, de LAS RIVAS B, GÓMEZ-COROVÉS C, MUÑOZ R. Characterization of tannase activity in cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum* CECT 748T[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 121(1): 92-98.
- [12] OSAWA R, KUROIISO K, GOTO S, SHIMIZU A. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 3093-3097.
- [13] JANA A, MAITY C, KUMAR HALDER S, CHANDRA MONDAL K, RANJAN PATI B, DAS MOHAPATRA PK. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2013, 2(4): 363-371.
- [14] 申家豪, 郑娟善, 梁泽毅, 丁学智. 植物单宁的微生物降解及其调控反刍动物瘤胃发酵的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(5): 2798-2811.
- SHEN JH, ZHENG JS, LIANG ZY, DING XZ. Research progress on microbial degradation of plant tannins and their regulation of rumen fermentation in ruminants[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(5): 2798-2811 (in Chinese).
- [15] KASIECZKA-BURNECKA M, KUC K, KALINOWSKA H, KNAP M, TURKIEWICZ M. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1): 77-89.
- [16] RAMÍREZ-CORONEL MA, VINIEGRA-GONZÁLEZ G, DARVILL A, AUGUR C. A novel tannase from *Aspergillus niger* with beta-glucosidase activity[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 10): 2941-2946.
- [17] KANPIENGJAI A, UNBAN K, NGUYEN TH, HALTRICH D, KHANONGNUCH C. Expression and biochemical characterization of a new alkaline tannase from *Lactobacillus pentosus*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2019, 157: 36-41.
- [18] 詹晶晶, 潘虎, 杨辉, 王翀, 周辉, 卢向阳, 田云. 微生物源单宁酶的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 15-19.
- ZHAN JJ, PAN H, YANG H, LIU HH, WANG C, ZHOU H, LU XY, TIAN Y. Research progress on the tannase from microorganisms[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 15-19 (in Chinese).
- [19] IWAMOTO K, TSURUTA H, NISHITANI Y, OSAWA R. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(4): 269-277.
- [20] UEDA S, NOMOTO R, YOSHIDA KI, OSAWA R. Comparison of three tannases cloned from closely related *Lactobacillus* species: *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, and *L. pentosus*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 87.
- [21] CHAITANYAKUMAR A, ANBALAGAN M. Expression, purification and immobilization of tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 89.
- [22] JIMÉNEZ N, BARCENILLA JM, de FELIPE FL, de LAS RIVAS B, MUÑOZ R. Characterization of a bacterial tannase from *Streptococcus gallolyticus* UCN34 suitable for tannin biodegradation[J]. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(14): 6329-6337.
- [23] WU MB, WANG Q, McKINSTRY WJ, REN B. Characterization of a tannin acyl hydrolase from *Streptomyces sviveus* with substrate preference for digalloyl ester bonds[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2663-2672.
- [24] 高善行, 张瑞祎, 王毓甜, 李景明, 臧佳辰. 石榴皮多酚的提取工艺优化及其抗氧化研究[J]. 食品工业, 2023, 44(3): 55-60.
- GAO SX, ZHANG RY, WANG YT, LI JM, ZANG JC. Extraction technique optimization and study on antioxidant activity of pomegranate peel polyphenols[J]. The Food Industry, 2023, 44(3): 55-60 (in Chinese).
- [25] GULLON B, PINTADO ME, PÉREZ-ÁLVAREZ JA, VIUDA-MARTOS M. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction[J]. Food Control, 2016, 59: 94-98.
- [26] 张佳浩, 李道明, 钟小荣, 刘宁. 石榴皮多酚的提取、制备及其应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 204-211.
- ZHANG JH, LI DM, ZHONG XR, LIU N. Extraction, preparation, and application of pomegranate peel polyphenols: a review[J]. Food Research and Development, 2022, 43(14): 204-211 (in Chinese).
- [27] 屈艳君, 王文慧, 曹家南, 汪育文, 刘淼, 沈才洪, 宋萍. 鞣花酸的制备及应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2022, 28(6): 39-45.
- QU YJ, WANG WH, CAO JN, WANG YW, LIU M, SHEN CH, SONG P. Research progress on preparation and application of ellagic acid[J]. Food and Nutrition in China, 2022, 28(6): 39-45 (in Chinese).
- [28] 赵斌斌, 董欣, 李向勇. 鞣花酸制备工艺研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(10): 1827-1830, 1782.
- ZHAO BB, DONG X, LI XY. Research progress on technological development of ellagic acid preparation[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(10): 1827-1830, 1782 (in Chinese).
- [29] HUANG W, NIU H, GONG GH, LU YR, LI ZS, LI H. Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic acid production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2007, 30(4): 281-288.
- [30] SHARMA S, BHAT TK, DAWRA RK. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 279(1): 85-89.
- [31] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [32] PENG R, CHEN XN, GHOSH R. Preparation of graphene oxide-cotton fiber composite adsorbent and its application for the purification of polyphenols from pomegranate peel extract[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 174: 561-569.
- [33] LU JJ, YUAN QP. A new method for ellagic acid production from pomegranate husk[J]. Journal of Food Process Engineering, 2008, 31(4): 443-454.
- [34] 黄蕾, 卢海强, 谷新晰, 李晨, 康红艳, 王妙姝, 田洪涛. 嗜热真菌单宁酶的克隆表达及在柿子汁中的应用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(2): 120-126.
- HUANG L, LU HQ, GU XX, LI C, KANG HY, WANG MS, TIAN HT. Cloning and expression of tannase gene from thermophilic fungi and effect of recombinant tannase on antioxidant activity of persimmon juice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 120-126 (in Chinese).
- [35] 胡文朝, 刘雪薇, 郑雄, 姚佩, 史单华, 刘群龙, 张小军. 单宁酶对核桃内种皮酚类物质含量的影响[J]. 果树资源学报, 2024, 5(3): 36-41.
- HU WZ, LIU XW, ZHENG X, YAO P, SHI DH, LIU QL, ZHANG XJ. The effect of tannase on the content of phenolic substances in walnut kernel pellicle[J]. Journal of Fruit Resources, 2024, 5(3): 36-41 (in Chinese).
- [36] 孙雨晴, 陶新, 徐子伟. 单宁酶水解石榴皮多酚的工艺优化及酶解产物鉴定[J]. 动物营养学报, 2018, 30(1): 262-273.
- SUN YQ, TAO X, XU ZW. Process optimization of hydrolysis of pomegranate peel polyphenols by tannase and hydrolysates identification[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(1): 262-273 (in Chinese).
- [37] CURIEL JA, RODRÍGUEZ H, ACEBRÓN I, MANCHEÑO JM, de LAS RIVAS B, MUÑOZ R. Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(14): 6224-6230.
- [38] RISTINMAA AS, COLEMAN T, CESAR L, LANGBORG WEINMANN A, MAZURKEWICH S, BRÄNDÉN G, HASANI M, LARSBRINK J. Structural diversity and substrate preferences of three tannase enzymes encoded by the anaerobic bacterium *Clostridium butyricum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(4): 101758.
- [39] AGUILERA-CARBO A, AUGUR C, PRADO-BARRAGAN LA, FAVELA-TORRES E, AGUILAR CN. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 189-199.