

黑曲霉 B0201 利用五倍子固体发酵 产单宁酶的条件研究

李秧针^{1,2} 邱树毅^{1,2*} 保玉心^{1,3} 吴鑫颖^{1,2}

(1. 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室 贵州 贵阳 550003)

(2. 贵州大学化工学院 贵州 贵阳 550003)

(3. 贵州大学生命科学学院 贵州 贵阳 550000)

摘要: 通过比较常规灭菌发酵和生料发酵, 研究黑曲霉 B0201 利用五倍子固体发酵产单宁酶的条件。结果表明, 在生料发酵过程中, 采用 20% 五倍子并且以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源制备单宁酶的最佳条件为: 液固比=1.6:1、温度 30°C、初始 pH 6.0。在该条件下通过 96 h 的培养, 单宁酶的活力可达 51.2 U/gds, 是常规灭菌发酵的 3.6 倍。以上结果显示, 生料发酵生产单宁酶是一种高效可行的方法。

关键词: 黑曲霉, 单宁酶, 生料发酵, 五倍子, 固体发酵

Research on Conditions of Tannase Production from *Aspergillus Niger* B0201 Under Solid-state Fermentation Using Gallnut

LI Yang-Zhen^{1,2} QIU Shu-Yi^{1,2*} BAO Yu-Xin^{1,3} Wu Xin-Ying^{1,2}

(1. Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guiyang, Guizhou 550003, China)

(2. Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003, China)

(3. Life Science College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550000, China)

Abstract: According to the comparative research of conventional sterile fermentation and uncooked material fermentation, the conditions of tannase production from *Aspergillus Niger* B0201 under solid-state fermentation using gallnut was studied. The results showed that the liquid–solid ratio of 1.6: 1, temperature of 30°C, initial pH of 6.0 were the optimal conditions for tannase production under uncooked material fermentation with gallnut content of 20% and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for nitrogen sources. Under this condition, tannase activity reached to 51.2 U/gds after 96 h of cultivation, which was 3.6 times as the conventional sterile fermentation. The results above revealed that under uncooked material fermentation for tannase production was a feasible method with high efficiency.

Keywords: *Aspergillus niger*, Tannase, Uncooked material fermentation, Gallnut, Solid-state fermentation

单宁酶,可水解没食子单宁中的酯键和缩酚羧键,生成没食子酸和葡萄糖^[1]。单宁酶可应用于制革、酿酒、医药、饮料等领域,具有广阔的应用前景。但是目前生产单宁酶的效率不高,市场价格昂贵,阻碍了单宁酶的应用。单宁酶是一种诱导酶,主要利用微生物发酵生产。目前国内主要采用液体发酵法生产单宁酶^[2,3],而国外近期的研究主要集中在固体发酵法^[4-6]。很多资料^[7-9]显示固体发酵主要产胞外单宁酶,容易提取,稳定性好,杂酶少,且设备比较简单,同时固体发酵有利于提高产酶活力。

本实验室筛选出的黑曲霉 B0201 菌株能利用中国特产五倍子作为诱导物固体发酵产单宁酶。但是在试验过程中发现原料五倍子在高压蒸汽灭菌时很容易焦化,变成褐色,粘稠。高温破坏了五倍子的结构,对黑曲霉菌株生长产生危害,严重影响单宁酶的产量。尤其当培养基中五倍子含量较大时,高温对培养基的破坏更明显,黑曲霉菌株完全不能生长。为解决这个问题,本文采用生料固体发酵的方法生产单宁酶。有资料^[10]显示五倍子具有抗菌消炎作用,五倍子粉、五倍子浸液等体外实验时对金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌以及伤寒、副伤寒、痢疾、炭疽、白喉、绿脓杆菌等均有明显的抑菌或杀菌作用,而且固体发酵过程中固态培养基水活度低,能降低染菌概率^[11],所以生料固体发酵在理论上是可行的。本文比较了常规灭菌发酵和生料发酵对黑曲霉利用五倍子固体发酵产单宁酶的影响,对发酵过程中的参数进行了比较研究,发现了生料发酵的优势,并优化了生料发酵的产酶条件,得到一种高效可行的产单宁酶的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:黑曲霉 B0201(*Aspergillus niger*),由贵州省发酵工程与生物制药重点实验室紫外诱变原始黑曲霉菌株筛选出来,菌种在 4℃ 条件下保存在马铃薯葡萄糖琼脂斜面培养基上。

1.1.2 基础发酵培养基:称取五倍子粉和麸皮共 5.0 g 装入 250 mL 的三角瓶作为培养基基础,其中五倍子含量为 8%,加入 1% (W/W) NH_4NO_3 , 0.1% (W/W) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (W/W) NaCl , 5 mL 蒸馏水,搅拌均匀。

1.1.3 主要仪器与设备:UV2550 紫外可见分光光度计,恒温培养箱。

1.1.4 主要试剂:没食子酸丙酯购于湖南省张家界贸源化工有限公司,绕单宁由上海君创化工有限公司生产,五倍子产于贵州省遵义市余庆县,试剂均为化学纯。

1.2 方法

1.2.1 固体发酵方法:1) 常规灭菌发酵。基础发酵培养基配好后,于 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后在 5 g 培养基中接种 1 mL 黑曲霉 B0201 孢子悬液(1×10^8 个孢子/mL),混匀后置于 30℃ 培养箱中静置培养 96 h。

2) 生料发酵。基础发酵培养基配好后,不经高压蒸汽灭菌,直接在 5 g 培养基中接种 1 mL 黑曲霉 B0201 孢子悬液(1×10^8 个孢子/mL),混匀后置于 30℃ 培养箱中静置培养 96 h。

1.2.2 粗酶液提取:取出培养 96 h 的三角瓶,在三角瓶中加入 100 mL pH 5.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,30℃ 条件下 150 r/min 振荡浸提 1 h,用定性滤纸过滤即得粗酶液。

1.2.3 酶活检测方法:根据文献^[12]的方法测定单宁酶活力。单宁酶在 pH 5.0、30℃ 条件下每分钟产生 1 μmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.2.4 常规灭菌发酵和生料发酵的比较:比较常规灭菌发酵和生料发酵对培养基和菌株生长的影响及对产单宁酶的影响。并优化在 2 种发酵条件下五倍子含量(4%~35%),初始加水量(液固比 0.6:1~2:1)对产单宁酶的影响。所有发酵都作 3 个平行。

1.2.5 五倍子生料发酵条件优化:在五倍子生料发酵的培养条件下,优化各个培养参数,采用不同的培养温度(25℃~40℃),不同的接种量(0.1 mL~2.5 mL),改变培养初始 pH 值(3~8),除诱导物之外添加额外碳源(葡萄糖,淀粉,玉米粉),选取不同氮源(NH_4Cl 、 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、黄豆粉、蛋白胨、尿素)取代 NH_4NO_3 ,添加不同的磷酸盐和钙盐,考察对该菌产酶的影响。所有发酵都作 3 个平行。

1.2.6 两种发酵条件下产单宁酶的时间曲线:在常规灭菌发酵和生料发酵单因素优化的基础上将该菌株培养(0~168 h),研究单宁酶活力随时间的变化情况,比较产单宁酶活力。所有发酵都作 3 个平行。

2 结果与讨论

2.1 两种发酵方法对培养基和菌株生长的影响

改变基础发酵培养基中五倍子含量, 分别按常规灭菌发酵和生料发酵生产单宁酶, 两种发酵方法对培养基性质和菌株生长的影响见表 1。从表中可以看出培养基中五倍子经高温灭菌容易焦化, 变性, 对黑曲霉菌株的生长产生危害, 在高浓度时导致黑曲霉不能生长。而未经高温灭菌时培养基没被破坏, 黑曲霉生长旺盛, 且无杂菌的生长痕迹。这说明了以中国特产五倍子为诱导物生产单宁酶时生料发酵更适合于黑曲霉生长。

表 1 常规灭菌发酵和生料发酵对培养基和菌株生长的影响

Table 1 Effect of conventional sterile fermentation and uncooked material fermentation to medium and growth of strains

五倍子含量 Content of gallnut	常规灭菌发酵 Conventional sterile fermentation	生料发酵 Uncooked material fermentation
8%	培养基经高温灭菌后有少量焦化颗粒; 培养 96 h 后黑曲霉生长旺盛	培养基无焦化无破坏; 黑曲霉生长旺盛, 无杂菌生长
25%	培养基部分焦化; 黑曲霉生长较好	同上
50%	培养基焦化严重; 黑曲霉部分生长	同上
75%	培养基完全焦化, 粘稠; 无黑曲霉生长	同上
100%	培养基完全焦化, 粘稠; 无黑曲霉生长	有点粘稠, 黑曲霉生长较好

2.2 两种发酵方法对产单宁酶的影响

基础发酵培养基中诱导物五倍子含量为 8%, 分别按常规灭菌发酵和生料发酵生产单宁酶, 两种发酵方法产单宁酶的活力如表 2。从表中可以看出, 采用生料发酵, 单宁酶活力从常规灭菌发酵的 14.0 U/gds (Gram dry substrate 每克培养基干重) 提高到了 18.2 U/gds。采用生料发酵新方法生产单宁酶, 培养基中无杂菌生长, 单宁酶活力有了较大的提高, 而且简化了生产流程, 说明黑曲霉 B0201 利用五倍子生料发酵产单宁酶在实践上也是可行的, 比常规灭菌发酵优越。

表 2 两种发酵方法对产单宁酶的影响

Table 2 Effect of the two methods to produce tannase

发酵方法 Methods of fermentation	酶活(U/gds) Enzyme activity (U/gds)
常规灭菌发酵 Conventional sterile fermentation	14.0
生料发酵 Uncooked material fermentation	18.2

2.3 两种发酵方法下五倍子含量对产单宁酶的影响

改变基础发酵培养基中五倍子含量, 分别按常规灭菌发酵和生料发酵生产单宁酶, 两种发酵方法下产单宁酶的活力如图 1 所示。图 1a 中采用常规灭菌发酵, 当五倍子含量为 8% 时单宁酶活力最高, 为 14.0 U/gds。随着五倍子含量的增加酶活力反而下降, 究其原因可能是由于随着五倍子含量的增加, pH 值减小, 培养基中 pH 值减少影响单宁酶的产生, 另一个原因是五倍子含量较大时, 高压蒸汽灭菌对五倍子的破坏程度越重, 对产单宁酶的影响也越大, 这

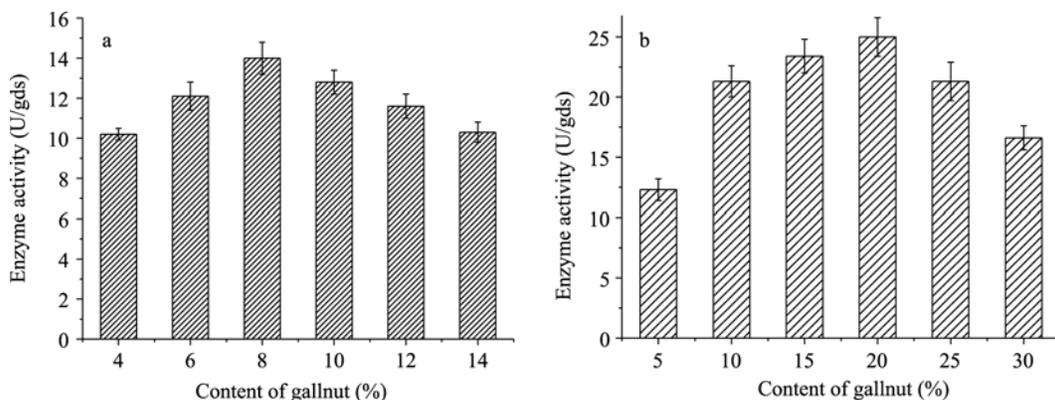


图 1 常规灭菌发酵和生料发酵时五倍子用量对产单宁酶的影响

Fig. 1 Effect of gallnut content on production of tannase under conventional sterile fermentation and uncooked material fermentation

注: a: 常规灭菌发酵; b: 生料发酵。

Note: a: Conventional sterile fermentation; b: Uncooked material fermentation.

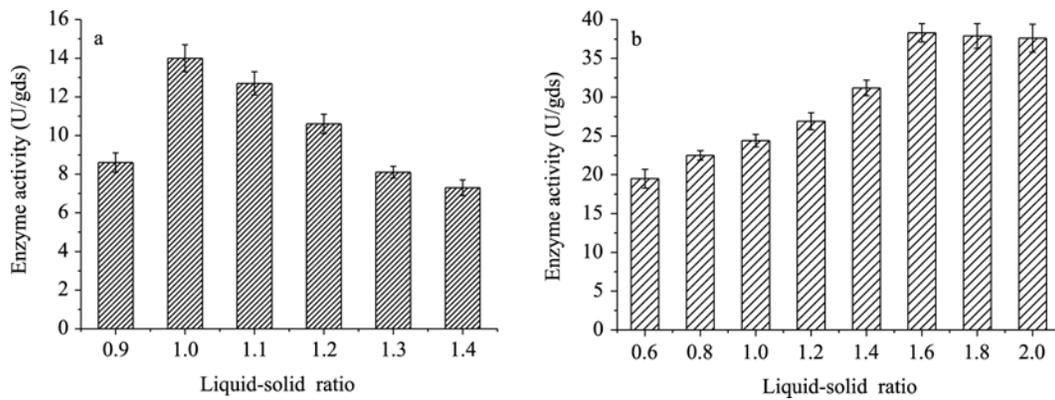


图 2 常规灭菌发酵和生料发酵时加水量对产单宁酶的影响

Fig. 2 Effect of initial moisture content on production of tannase under conventional sterile fermentation and uncooked material fermentation

注: a: 常规灭菌发酵; b: 生料发酵。

Note: a: Conventional sterile fermentation; b: Uncooked material fermentation.

点可以通过生料发酵新方法避免。图 1b 中采用生料发酵, 当五倍子添加量为 20% 时酶活力最高, 为 25.0 U/gds, 是灭菌条件的 1.8 倍。

2.4 两种发酵方法下初始加水量对产酶的影响

常规灭菌发酵基础发酵培养基中五倍子含量为 8%, 生料发酵五倍子含量为 20%, 改变初始加水量, 两种发酵方法下产单宁酶的活力如图 2 所示。图 2a 中采用常规灭菌发酵, 当液固比为 1:1 时单宁酶的活力最高, 为 14.0 U/gds。当加水量增大时, 酶活下降。五倍子灭菌时容易焦化, 生成褐色胶状物质, 容易使培养基粘成一团, 所以当水分含量太大时, 培养基成团现象很严重, 不利于培养基中的菌株吸取氧份, 从而降低了酶活。

图 2b 中采用生料发酵, 当液固比为 1.6:1 时单宁酶活力最高, 为 38.3 U/gds。这是因为生料发酵时五倍子不会焦化, 可很好的避免灭菌时因水分含量大易成团的现象, 最适液固比由 1:1 变成了 1.6:1。充足的加水量弥补了固体发酵过程中水分的损失, 促进了单宁酶生成。从图中可以看出液固比在 1.6:1~2:1 的范围内单宁酶活力相当, 说明生产过程应保证湿度足够大, 可以在培养过程中适度喷水, 保证固体发酵所需的水分。

2.5 培养温度对生料发酵产酶的影响

在优化的五倍子含量和加水量条件下, 生料发酵产单宁酶中培养温度对产酶的影响如图 3 所示。培养温度对产酶有较大影响, 当培养温度达到 30°C 时, 酶活力最高, 达到 38.8 U/gds。培养过程观察发现, 温度太低黑曲霉生长缓慢, 孢子不成熟; 30°C~

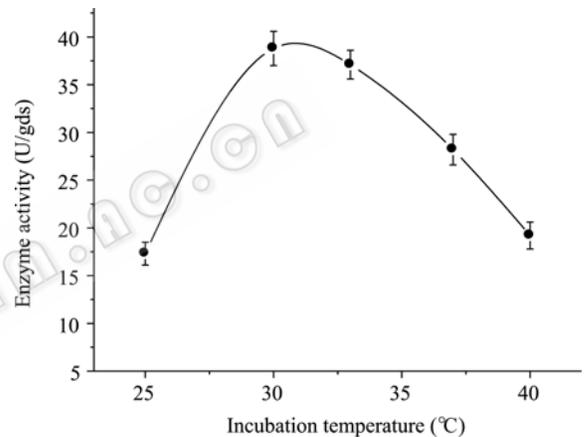


图 3 培养温度对产酶的影响

Fig. 3 Effect of incubation temperature on enzyme production

33°C 是最适产酶温度, 黑曲霉生长旺盛, 孢子成熟, 且无杂菌生长; 37°C~40°C 黑曲霉生长较好, 孢子成熟, 但可以看到有少量杂菌生长。所以控制在合适的温度范围内, 能抑制培养基中杂菌的生长, 提高单宁酶的活力。

2.6 装量对生料发酵产酶的影响

在 250 mL 三角瓶中分别装培养基 3 g、5 g、7 g、10 g、15 g 和 18 g, 按比例接种后置于 30°C 下培养, 由于料层太厚, 培养 2 d 天后翻样并喷水, 培养 4 d 后测定培养基中单宁酶的活力。由图 4 的结果可以看出, 装量对五倍子生料发酵产单宁酶有很显著的影响, 装量越少越有利于黑曲霉单宁酶的合成。这主要和培养基的氧的供应以及与培养基内部温度有关。对于黑曲霉来说, 充足的供氧有利于单宁酶的

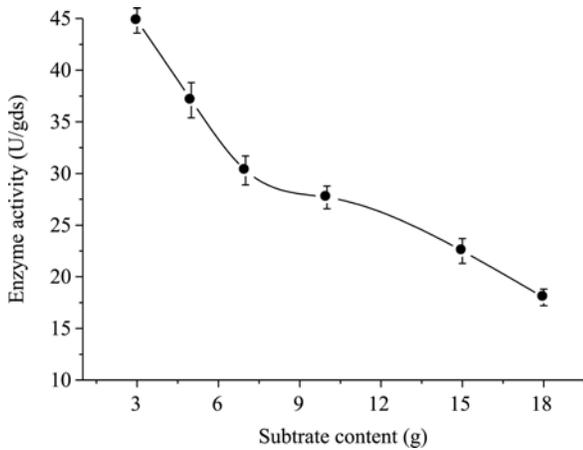


图4 装量对产酶的影响

Fig. 4 Effect of different medium contents on enzyme production

合成; 而少的装量则有利于培养基内部热量的散发, 防止温度过高而导致菌体生长不良以及影响产酶。但装量太小, 增大了固体发酵的面积, 不利于生产成本的降低。在生产过程中可以加强通风和补水。本实验仍然选装量在 5 g。

2.7 接种量对生料发酵产酶的影响

用蒸馏水把 PDA 斜面上的黑曲霉孢子洗下来制成浓度为 1×10^8 个/mL 的黑曲霉孢子悬液, 在 5 g 培养基中分别加入 0.1 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL 和 2.5 mL 孢子悬液。由图 5 可以看出, 接种 1 mL 黑曲霉孢子悬液时酶活力最高, 为 42.7 U/gds。加入孢子悬液较多时, 菌丝生长较快, 可能是代谢产物积累过多, 反而会抑制后期菌体的生长。接种量太小, 菌丝生长缓慢, 延长了生长周期。实验过程无杂菌生长。当稀释黑曲霉孢子悬液到一定倍数, 1×10^6 个/mL、 1×10^5 个/mL 和 1×10^4 个/mL, 各取 1 mL 接种培养, 4 d 后观察发现 1×10^6 个/mL 的培养基中有少量杂菌的生长, 1×10^5 个/mL 培养基中有较多杂菌的生长, 1×10^4 个/mL 培养基中有大量杂菌的生长, 和黑曲霉长势相当; 测酶活, 分别为 24.9 U/gds, 19.3 U/gds 和 16.8 U/gds。通过菌株形态观察这些杂菌是青霉和根霉。所以控制接种量在合适的范围, 能减少杂菌生长的机会。

2.8 初始 pH 对生料发酵产酶的影响

分别调节培养基的初始 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和自然 (pH=5.2), 接入孢子悬液 1 mL, 30°C 培养 96 h, 提取粗酶液, 测酶活力。结果见图 6,

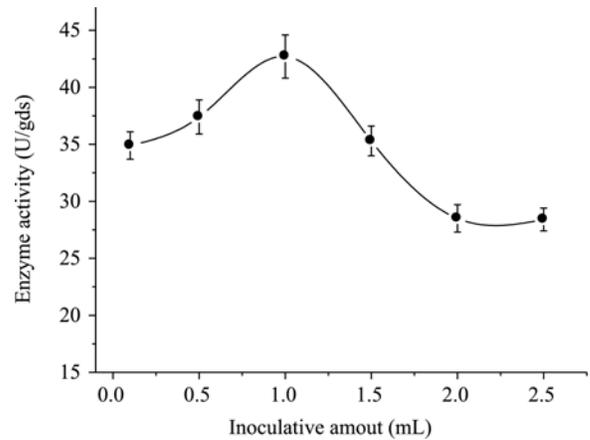


图5 接种量对产酶的影响

Fig. 5 Effect of inoculation amount on enzyme production

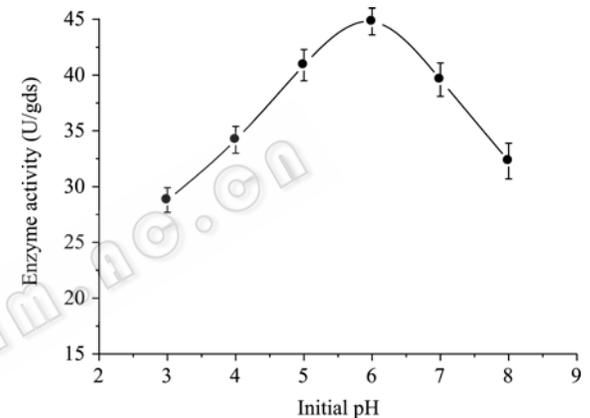


图6 初始 pH 对产酶的影响

Fig. 6 Effect of initial medium pH on enzyme production

以初始 pH 为 6 的培养基产酶活力最高, pH 5~7 是较适合产酶的初始 pH。

2.9 额外添加碳源对生料发酵产酶的影响

在诱导物五倍子作为碳源的情况下额外添加不同碳源, 分别为 1% 葡萄糖、1% 淀粉、1% 玉米粉, 对产酶情况进行研究, 每隔 24 h 测一次酶活, 得到产酶曲线如图 7 所示, 从图中可看出额外添加碳源, 单宁酶活力随时间发生了变化, 但对产酶提高作用不明显。碳源添加量的研究表明随着量的增加产酶反而受到抑制, 这是因为五倍子的一个单宁分子附有一个葡萄糖分子, 单宁酶水解五倍子单宁所生成的葡萄糖完全可以作为碳源, 供微生物生长繁殖。葡萄糖与麸皮中的碳源能够满足菌体生长和产酶的需要, 过多的碳源虽对菌丝生长有促进作用, 但不利于产酶, 因此在后续试验中培养基都不额外添加碳源。

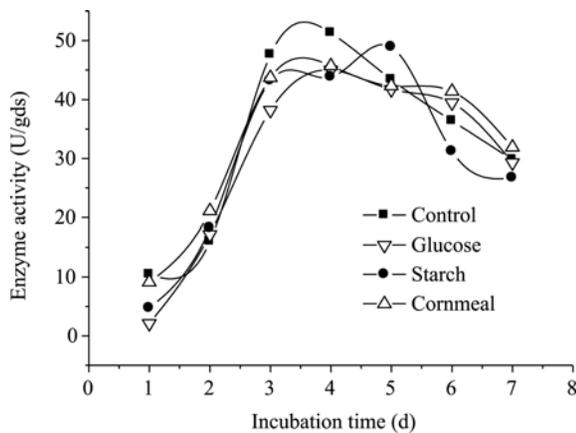


图7 额外碳源对产酶的影响

Fig. 7 Effect of additional carbon sources on enzyme production

2.10 不同氮源对生料发酵产酶的影响

分别在培养基中添加 1% 的不同氮源, NH_4Cl 、 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、黄豆粉、蛋白胨、尿素, 取代 NH_4NO_3 , 对产单宁酶的影响如图 6 所示。其中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的产酶情况最理想, NH_4Cl , 尿素也比 NH_4NO_3 有所提高。选用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源。进一步研究了氮源添加量对产单宁酶的影响, 实验证明随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量的增加, 酶活力没有提高。

2.11 磷酸盐和钙盐对生料发酵产酶的影响

有资料显示^[13]磷酸盐和钙盐的添加能促进酸性蛋白酶的生成, 本实验研究了在培养基中额外添加

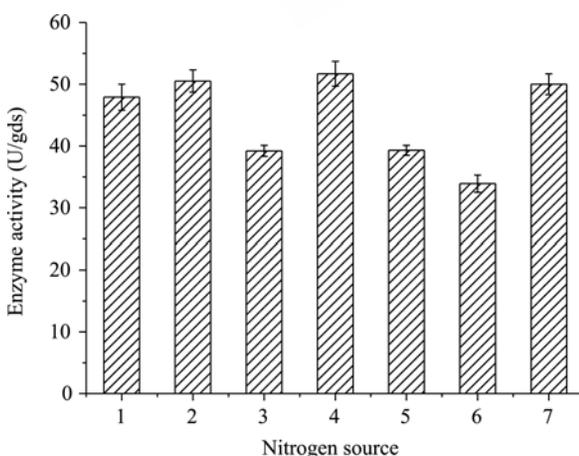


图8 不同氮源对产酶的影响

Fig. 8 Effect of different nitrogen sources on enzyme production

注: 1: NH_4NO_3 ; 2: NH_4Cl ; 3: NaNO_3 ; 4: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5: 黄豆粉; 6: 蛋白胨; 7: 尿素。

Note: 1: NH_4NO_3 ; 2: NH_4Cl ; 3: NaNO_3 ; 4: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5: Soybean flour; 6: Peptone; 7: Carbamide.

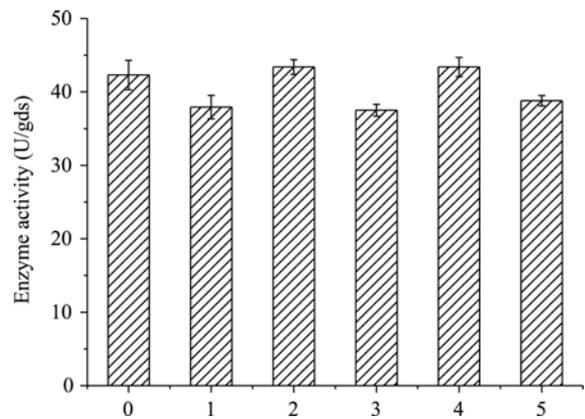


图9 磷酸盐和钙盐对产酶的影响

Fig. 9 Effect of additional phosphate and calcium on enzyme production

Note: 0: Control; 1: K_2HPO_4 ; 2: KH_2PO_4 ; 3: Na_2HPO_4 ; 4: NaH_2PO_4 ; 5: CaCl_2 .

0.5% 的磷酸盐和钙盐对产生单宁酶的影响。从图 9 所示, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 能稍微提高单宁酶的酶活。选取 KH_2PO_4 , 作不同浓度, 0.5%、1% 和 1.5% 酶活分别为 40.7 U/gds、43.4 U/gds 和 41.3 U/gds, 1% 时酶活力最高, 但考虑到磷酸盐用量大, 提高效果不显著, 培养过程不添加。

2.12 两种工艺产单宁酶的时间曲线

综合以上各项参数, 采用优化后的单因素对黑曲霉利用五倍子为诱导物进行常规灭菌发酵和生料发酵 168 h, 每隔 24 h 取样一次检测单宁酶活性, 时间曲线如图 10 所示。生料发酵以 5 g 五倍子和麸皮的混合物作为基础培养基, 其中五倍子含量为 20%, 液固比为 1.6:1, 加入 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 氮源, 接种量 1 mL, 调节培养基 pH 6.0, 由图可见酶活力的最高点出现在 96 h, 为 51.2 U/gds, 72 h 时酶活力基本接近最高点。常规灭菌发酵, 五倍子含量为 8%, 液固比为 1:1, 96 h 时单宁酶活力最高为 14 U/gds。A. Sabu^[4]用两种富含单宁酸的农作物废弃物 Tamarind seed powder 和 Palm kernel cake 由黑曲霉固态发酵生产单宁酶, 最高酶活分别为 6.44 U/gds 和 13.3 U/gds。本文也验证了常规灭菌发酵下得出的酶活力为 14 U/gds, 水平与之相当, 但采用生料发酵时酶活力有了大幅度的提高, 是常规灭菌发酵时的 3.6 倍。通过比较可以看出, 五倍子生料发酵跟常规灭菌发酵相比, 不仅大幅度的提高了单宁酶的酶活, 减少了工艺流程, 而且缩短了发酵周期。

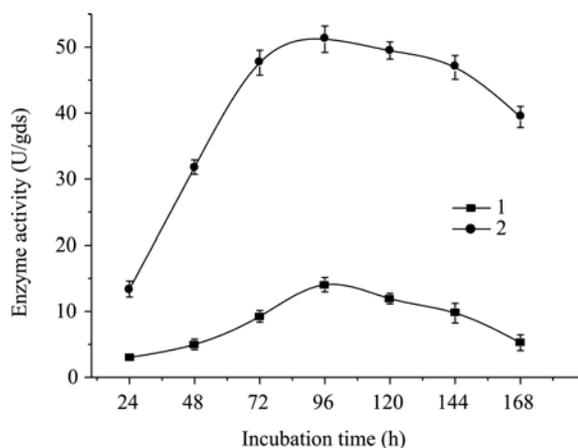


图 10 产单宁酶的时间曲线

Fig. 10 The time curves of producing tannase

注: 1: 常规灭菌发酵; 2: 生料发酵。

Note: 1: Conventional sterile fermentation; 2: Uncooked material fermentation.

3 结论

本文比较了常规灭菌发酵和生料发酵对黑曲霉 B0201 利用五倍子固体发酵产单宁酶的影响。通过对发酵过程中的参数进行比较实验, 证明五倍子生料发酵更适合单宁酶的生产。并优化了黑曲霉 B0201 利用五倍子生料固体发酵生产单宁酶的发酵条件。单因素优化实验表明: 液固比为 1.6: 1, 温度为 30°C 时, 接种量为 1 mL, pH 6.0 为最佳产酶条件; 并对产酶培养基进行了优化, 五倍子用量为 20%, 额外添加碳源, 磷酸盐和钙盐等均不能提高单宁酶产量, 最好的氮源是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。在优化的条件下, 培养 96 h 后产单宁酶酶活力达到了 51.2 U/gds, 是常规灭菌发酵的 3.6 倍。

中国特产五倍子具有自身的特性, 高温处理易焦化, 严重影响黑曲霉的生长。本文创新的采用了生料发酵新方法, 即黑曲霉利用五倍子生料固体发酵产单宁酶的方法, 该方法适应了五倍子的特性, 大幅度的提高了产单宁酶的水平, 且简化了设备和生产流程, 为单宁酶的发酵生产提供了一种高效可行的方法。五倍子生料发酵的方法运用于生产, 可大幅度降低生产成本, 产生很大的经济效益, 具有重要的研究意义和很强的实用价值。

参考文献

- [1] Kenji Aoki, Ryu Shlnke, Hiroshi Nishira. Purification and some properties of yeast tannase. *Agri Biol Chem*, 1976, **40**(1): 79–85.
- [2] 刘如石, 谢达平, 李清明, 等. *Asp. niger* No.3 液态发酵生产单宁酶条件的研究. *食品科学*, 2001, **22**(2): 28–32.
- [3] 游见明. 黑曲霉单宁酶发酵工艺. *现代食品科技*, 2005, **21**(3): 96–98.
- [4] A Sabu, A Pandey, M Jaafar Daud, *et al.* Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresource Technology*, 2005, **96**(11): 1223–1228.
- [5] Rakesh Kumar, Jitender Sharma, Randhir Singh. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. *Microbiological Research*, 2007, **167**(4): 384–390.
- [6] B Trevino-Cueto, M Luis, JC Contreras-Esquivel, *et al.* Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresource Technology*, 2007, **98**(26): 721–724.
- [7] Lekha PK, Lonsane BK. Comparative titres, locateon and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus Niger* PKL 104 in solid-state, liquid surfase and submerged fermentations. *Process Biochemistry*, 1994, **29**: 497.
- [8] Cruz Hernandez, M Augur. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food technology and biotechnology*, 2006, **44**(41): 330–9862.
- [9] Nisha K Rana, Tej K Bhat. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger van Tieghem* MTCC 2425. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2005, **51**(4): 203–212.
- [10] 朴春梅. 五倍子的近况研究. *中国民间疗法*, 2005, **13**(2): 63–65.
- [11] 陈洪章, 徐建. 现代固体发酵原理及应用. 北京: 化学工业出版社, 2004, p.49.
- [12] 保玉心, 邱树毅, 李秧针, 等. 一种胞外单宁酶的活力检测方法. *精细化工*, 2008, **25**(6): 621–624.
- [13] 王水顺, 袁彩, 陈静蓉, 等. 黑曲霉 SL2-111 复合酶固体发酵工艺研究. *工业微生物*, 2001, **31**(4): 26–30.