

塔拉单宁酶解生产没食子酸的工艺优化

陈培旭^{1,2,3}, 刘春利¹, 王思渊⁴, 杨秋明^{1,2,3}, 张永辉^{1,2,3}, 肖安风^{1,2,3}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建厦门 361021) (3. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021)
(4. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏苏州 215000)

摘要: 没食子酸在食品、化工和医药领域具有广泛的应用。相比传统化学法生产, 酶法生产具有环境友好、副产物少的优点。本文利用前期开发的热稳定单宁酶 *Tan1*, 开发并优化塔拉单宁同步浸提-酶解工艺, 实现没食子酸的高效酶法生产。首先通过单因素试验确定了初步浸提-酶解条件为塔拉粉料液比 1:30、反应温度 60 ℃、加酶量 4 mL 和反应 pH=5。在此基础上, 采用 Plackett-Burman 试验设计, 考察不同因素对浸提-酶解反应条件的影响, 研究发现温度、pH 和料液比是影响提取过程的主要因素。进而, 通过响应面试验确定最佳酶解方案为塔拉粉料液比 1:40, 反应温度 65 ℃, pH=4, 在此条件下没食子酸得率达到 65.98%。此外还研究了在最佳浸提-酶解条件下的连续多次投料反应, 结果表明在六次连续投料过程中, 塔拉单宁均能被高效水解为没食子酸。此研究为塔拉单宁酶解生产没食子酸的工业化奠定基础。

关键词: 单宁酶; 塔拉单宁; 没食子酸; 酶解; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2020)12-60-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0582

Optimization of Gallic Acid Production by Enzymatic Hydrolysis of Tara Tannin

CHEN Pei-xu^{1,2,3}, LIU Chun-li¹, WANG Si-yuan⁴, YANG Qiu-ming^{1,2,3}, ZHANG Yong-hui^{1,2,3}, XIAO An-feng^{1,2,3}

(1.College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2.Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

(3.Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China)

(4.Suzhou Institute of Drug Control, Suzhou 215000, China)

Abstract: Gallic acid had wide application in food, chemistry and pharmaceutical industries. Compared with the traditional chemical production approach, the enzymatic hydrolysis had the advantages of environmental friendliness and fewer by-product. In this work, a previously developed thermal stable tannase *Tan1* was used for the simultaneous leaching-enzymolysis of Tara tannin and the hydrolysis conditions were optimized for the high efficiency enzymatic production of gallic acid. First, the preliminary hydrolysis conditions were optimized by single factor test as followed: Tara powder liquid ratio 1:30, reaction temperature 60 ℃, enzyme dosage 4 mL and reaction pH=5. Based on the single factor test, the Plackett-Burman design was performed to investigate the effects of different factors on the reaction conditions of tannase hydrolysis of Tara powder. It was found that temperature, pH and ratio of material to liquid were the significant factors that affect the hydrolysis process. Furthermore, the optimal hydrolysis conditions were optimized by response surface design as follows: Tara powder liquid ratio 1:40, reaction temperature 65 ℃, pH=4, the yield of gallic acid was 65.89%. The continuous feeding reaction was also investigated under the optimal hydrolysis conditions. The results indicated that Tara tannin could be hydrolyzed into gallic acid with high efficiency during six batch feeding

引文格式:

陈培旭,刘春利,王思渊,等.塔拉单宁酶解生产没食子酸的工艺优化[J].现代食品科技,2020,36(12):60-68

CHEN Pei-xu, LIU Chun-li, WANG Si-yuan, et al. Optimization of gallic acid production by enzymatic hydrolysis of Tara tannin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 60-68

收稿日期: 2020-06-23

基金项目: 福建省科技计划引导项目 (2016N0021)

作者简介: 陈培旭 (1994-), 女, 硕士生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 杨秋明 (1977-), 男, 高级实验员, 食品生物技术; 张永辉 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

process. This research laid the foundation for the industrialization of gallic acid produced by enzymatic hydrolysis of Tara tannin.

Key words: tannase; Tara tannin; gallic acid; enzymolysis; process optimization

微生物单宁酶（单宁酰基水解酶，*tannin acyl hydrolase*, EC.3.1.1.20）属于酯酶家族，是一种胞外诱导的酰基水解酶，具有高效、专一、定向裂解单宁分子中的酯键、缩酚键和糖苷键的特点，能催化单宁和没食子酸酯转化成没食子酸和葡萄糖^[1]。没食子酸深加工可制取焦性没食子酸、金属防腐漆、没食子酸甲酯、没食子酸丙酯、磺胺抗菌素增效剂等系列产品，具有重要的工业应用价值^[2]。没食子酸不仅具有产量大、价格低廉、易大规模生产的特点，还具有抗氧化、抗炎和抗微生物、抗突变和抗病毒等活性^[3-6]，因此被广泛应用于食品保鲜、制药和化妆品等领域^[7,8]。

没食子酸是以塔拉、五倍子等为原料，用酸或碱法、生物法水解制成的产品，提取物为白色或浅褐色的针状或棱状晶体^[9]。塔拉果荚富含单宁，塔拉单宁（*Tara tannin*）属水解类没食子单宁，是没食子酰及聚没食子酰的奎尼酸酯的混合物，完全水解后可得到没食子酸和奎尼酸^[10]。没食子酸在我国以酸法、碱法生产为主^[11]。酸水解反应温度较高，对环境污染较严重，此外对生产设备存在不同程度的腐蚀，影响设备的使用寿命，碱法相对工艺过程复杂，生产成本低，因此，为改善这一问题，生物法生产没食子酸受到更多研究者的关注，生物法生产没食子酸包括微生物发酵法和酶法，微生物发酵法是将单宁酸水溶液进行微生物发酵，水解过程中产生没食子酸^[12]，但主要问题是单宁的水解和生物酶的形成在同一反应容器中进行，难以达到最佳条件，致使反应周期延长3天；且单宁不能完全水解，残留量达15%~20%^[11]。酶法是筛选并且制得高效专一的单宁酶，水解单宁酸后得到没食子酸^[13]。酶法与发酵法相比，其优点在于酶法具有反应时间短和产物易分离，同时单宁水解率达98%^[14]，降低了消耗指标和生产成本^[15]。因此酶法水解单宁酸生产没食子酸具有更好的产业化应用前景。

在酶法水解单宁酸过程中，高浓度单宁酸易与单宁酶蛋白以沉淀形式结合^[16,17]，从而导致单宁酶酶活的严重降低，限制了酶法生产没食子酸的进一步推广与应用。本实验室前期从米曲霉基因组中克隆得到一个具有高热稳定性的单宁酶 *Tan1*，其可在塔拉粉高温浸提过程中进行同步酶解，避免高浓度单宁酸的积累，提高酶法生产没食子酸效率。本文首先对比了分步与同步浸提-酶解工艺对没食子酸得率的影响，接着以单因素实验优化塔拉粉料液比、反应温度、反应 pH 和加酶量等条件，再以 Plackett-Burman 实验筛选显著性

因素和响应面优化来探究塔拉单宁最佳水解工艺，最后应用单宁酶 *Tan1* 多次水解塔拉单宁产没食子酸，并用薄层色谱检测其塔拉单宁消耗和没食子酸生成情况，为塔拉单宁酶解生产没食子酸的工业化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

单宁酶生产菌株：*Pichia pastoris*GS115-*Tan1*（由本实验室前期构建）。

塔拉单宁由河北方锐生物科技有限公司提供；甲醇、甘油、乙酸乙酯、乙酸丁酯、磷酸、柠檬酸、硫酸钙、硫酸钾、氢氧化钾、硫酸镁、氯化铁、正己烷和乙酸购于西陇化工股份有限公司；没食子酸、没食子酸丙酯、单宁酸购于国药集团化学试剂有限公司，均为分析纯；蛋白胨、酵母膏、葡萄糖、YNB（无氨基酵母氮源）、消泡油购于广州川一化工有限公司；绕丹宁购自于东京化成工业株式会社。

1.2 仪器与设备

5 L 发酵罐（BIOTECH-5BG-7000A），上海保兴生物设备工程有限公司；旋转蒸发仪（RE100-Pro），北京澎昆博远商贸发展有限责任公司；高速冷冻离心机（AvantiTMJ-25），美国 Beckman 公司；加热磁力搅拌器（MS-H-Pro+），大龙兴创实验仪器（北京）有限公司；可见分光光度计（V-T3），屹谱仪器制造（上海）有限公司；数显恒温水浴锅（HH-4），国华电器有限公司；恒温震荡培养箱（IS-RDV1），美国精骐公司；酸度（pH）计（FE20K），梅特勒-托利多公司。

1.3 方法

1.3.1 单宁酶酶液制备

利用实验室前期构建的毕赤酵母工程菌株 *GS115-Tan1* 生产单宁酶 *Tan1*，将活化后的菌种按1%的接种量接种于 YPD 种子培养基，30 ℃，250 r/min 培养16~18 h。按5%接种量将种子液接种到5 L 发酵罐中（罐上发酵培养基：85%磷酸 80.1 mL，CaSO₄ 2.79 g，K₂SO₄ 54.6 g，KOH 12.39 g，MgSO₄·7H₂O 44.7 g，甘油 120 g，酵母膏 15 g，蛋白胨 15 g，消泡油 3 mL，溶解后定容至3 L，121 ℃灭菌20 min），利用甲醇诱导发酵得到单宁酶 *Tan1* 酶液。

参考吴昌正^[18]建立的方法测定单宁酶的活力：取

3 支试管分别标记为空白管、对照管、测试管,各加入 0.01 mol/L 没食子酸丙酯 0.25 mL 作为底物。空白管中加入 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液 0.25 mL,测试管中加入经稀释一定倍数的粗酶液 0.25 mL,对照管中加入经沸水浴灭活的酶液 0.25 mL,所有试管 30 ℃水浴 5 min。三支试管中均加入 6.67 g/L 甲醇绕丹宁溶液 0.3 mL,所有试管 30 ℃水浴 5 min。三支试管均加入 0.7 mol/L KOH 0.2 mL,所有试管 30 ℃水浴 5 min。所有试管中加入蒸馏水 4 mL,振荡均匀后 30 ℃水浴 10 min。所有试管在 520 nm 处以蒸馏水为空白测吸光值,测三组平行,结果取算术平均值。将 30 ℃条件下每分钟产生 1 μmol 没食子酸所需要的酶量定义为一个酶活单位 U。

1.3.2 塔拉单宁水解反应

1.3.2.1 制备塔拉粉浸提液

塔拉粉过 60 目筛除杂,按质量(g)与溶液(mL)的比值,即料液比为 1:20 的比例,称取 10 g 塔拉粉于 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 沸水与之混合,于沸水浴中浸提 30 min,每 10 min 摇动一次。减压抽滤,冷却后定容至 200 mL,备用。

1.3.2.2 Tan1 水解塔拉粉反应

同步浸提-酶解方案:按照料液比 1:20,称取 2 g 塔拉粉溶于 40 mL 蒸馏水中,并放在磁力搅拌器上加热至 50 ℃,向其中加入 2 mL 的单宁酶 Tan1 (500 U/mL),加入单宁酶液后开始计时,固定时间取样用于检测没食子酸的生成量,此过程中维持反应温度为 50 ℃。

先浸提后酶解方案:以 40 mL 塔拉粉浸提液进行此反应,其他条件与同步浸提-酶解方案一致。

1.3.3 分光光度法检测没食子酸

取少量反应液于烧杯中,稀释一定倍数。分别取 0.5 mL 稀释液于三个离心管中,加入 0.3 mL 的甲醇绕单宁,震荡混匀,在 30 ℃水浴锅中保温 5 min,再加入 0.2 mL 的 KOH 溶液,震荡混匀,在 30 ℃水浴锅中保温 5 min,再分别加入 4 mL 的蒸馏水,震荡混匀,在 30 ℃水浴锅中保温 5 min,用分光光度计检测 520 nm 处测吸光值,实验共测定三组平行,结果取算术平均值,并计算标准误差,结果表示为算术平均值 $\pm$ 标准误差。

$$\text{没食子酸得率}(\%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100\%$$

式中: M_1 =酶解液中没食子酸的生成量; M_2 =塔拉粉的质量。

1.3.4 薄层色谱(TLC)检测没食子酸

用毛细管吸取样品在硅胶板上点样,其中第一个

样为没食子酸和单宁酸的混合标品。然后将硅胶板置于含有展开剂(正丁醇:乙酸:水=2:2:1)的层析缸中进行展开。约 2 h 后取出,用电吹风吹干,然后均匀喷上 0.5% FeCl_3 溶液,放置 5 min 后拍照观察。

1.3.5 Tan1 水解塔拉单宁酸单因素条件优化

1.3.5.1 料液比对塔拉单宁转化率的影响

按照料液比 1:10、1:20、1:30、1:40 和 1:50 称取塔拉粉,溶于含有 40 mL 单宁酶活力为 37.5 U/mL 的水溶液中,从加入单宁酶液时开始计时,固定时间取样此过程中维持反应温度为 50 ℃,并不停搅拌。样品经 5000 r/min, 1 min 离心后取上清液,检测没食子酸的生成量,并计算没食子酸得率。

1.3.5.2 反应温度对塔拉单宁转化率的影响

按照料液比 1:30 称取塔拉粉,溶于含有 40 mL 单宁酶活力为 37.5 U/mL 的水溶液中,加入单宁酶液开始计时,固定时间取样。此过程中维持反应温度分别为 30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃和 70 ℃并不停搅拌。样品经 5000 r/min, 1 min 离心后取上清液,检测没食子酸的生成量,并计算没食子酸得率。

1.3.5.3 加酶量对塔拉单宁转化率的影响

按照料液比 1:30 称取塔拉粉,60 ℃继续优化反应所需单宁酶的量,配制 500 U/mL 的重组米曲霉单宁酶 Tan1 酶液,分别添加 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL 和 5 mL 的酶液,总反应体积为 40 mL,使得酶终浓度为 12.5 U/mL、25 U/mL、37.5 U/mL、50 U/mL、62.5 U/mL,从加入单宁酶液时开始计时,固定时间取样。此过程中维持反应温度为 60 ℃并不停搅拌。样品经 5000 r/min, 1 min 离心后取上清液,检测没食子酸的生成量,并计算没食子酸得率。

1.3.5.4 不同 pH 对塔拉单宁转化率的影响

按照料液比 1:30 称取塔拉粉,加酶量 5 mL 继续优化反应 pH。以不控反应过程中的 pH 为对照,以 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液控制反应 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 为实验组。总反应体积为 40 mL,加入单宁酶液后,酶终浓度为 50 U/mL,开始计时,固定时间取样。此过程中维持反应温度为 60 ℃。样品经 5000 r/min, 1 min 离心后取上清液,检测没食子酸的生成量,并计算没食子酸得率。

1.3.6 Plackett-Burman 实验设计因素及水平

根据单因素试验结果,选取各因素的最佳值运用 Minitab 17.0 软件来设计 Plackett-Burman (PB) 试验。每个因素取 2 个水平:低水平“-1”,高水平“+1”,两水平数值都是根据单因素试验结果确定,另外取 3 个空白项为虚拟变量,便于试验过程中的误差分析。各因素及水平设置见表 1。

表1 Plackett-Burman 实验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experimental

design			
因素	低水平(-1)	0	高水平(+1)
料液比/(g/mL)	1:40	1:30	1:20
反应温度/℃	50	60	70
加酶量/mL	3	4	5
反应 pH	4	5	6
虚拟项	-1	0	+1

1.3.7 响应面优化实验设计因素及水平

通过 PB 试验筛选出水解反应条件中有显著性影响的单因素是分别是温度、pH 和料液比,应用设计专家 Design-Expert 软件进行 (Box-Behnken Design, BBD) 试验设计,并对试验结果数据分析拟合出二阶响应面模型,得到最佳反应条件。试验因素与水平设计见表 2。

表2 响应面实验设计因素及水平

Table 2 Factors and levels of response surface experiment

design			
因素	低水平(-1)	0	高水平(+1)
料液比	1:20	1:30	1:40
反应温度/℃	45	55	65
反应 pH	3	4	5

1.3.8 Tan1 在多次投料反应中的应用

根据响应面优化结果,利用重组单宁酶 Tan1 在最佳水解条件下,进行多次投料反应。在 60 ℃ 的磁力搅拌器上,用 500 mL 蒸馏水溶解 16 g 塔拉粉,然后向溶液中加入酶活力为 20000 U 的重组单宁酶 Tan1,反应 20 min 之后取样,并在取样后立即向反应液中加入 16 g 塔拉粉,继续反应 20 min 之后取样,整个过程一共添加 6 次塔拉粉。最后终反应延长 1 h,反应过程中维持反应温度为 60 ℃。样品经过 5000 r/min 离心 1 min 分离上清液和固体残渣,应用薄层色谱检测上清液和塔拉残渣中塔拉单宁消耗和没食子酸生成情况,展开剂:正丁醇:乙酸:水=2:2:1,显色剂:3% FeCl₃。

1.3.9 数据统计分析

试验中所有数据都是三次测量的平均值,数据处理采用 Microsoft Excel 2016 和 Minitab 17.0 软件进行统计分析,绘图软件为 Origin 2019。

2 结果与分析

2.1 塔拉粉不同提取工艺比较

塔拉粉提取工艺可采取浸提和酶解分步或同步进

行,即先浸提后酶解方案和同步浸提-酶解方案,反应温度均为 50 ℃,每 5 min 取样检测没食子酸的得率。试验结果如图 1 所示,在先浸提后酶解方案中,没食子酸的得率最高值 16.40%,而在同步浸提-酶解方案中,酶解 90 min 时没食子酸的得率最高可达 29.16%。采取同步浸提-酶解工艺更能提高塔拉单宁酶解效率,其原因是先浸提后酶解方案中浸提出的高浓度单宁酸与酶蛋白结合并沉淀,从而导致单宁酶活性受到抑制^[17],影响酶解反应效率,而同步浸提-酶解工艺可避免单宁酸在反应体系的积累,有利于没食子酸的高效酶法生产,但塔拉单宁的酶解条件还需进一步优化。

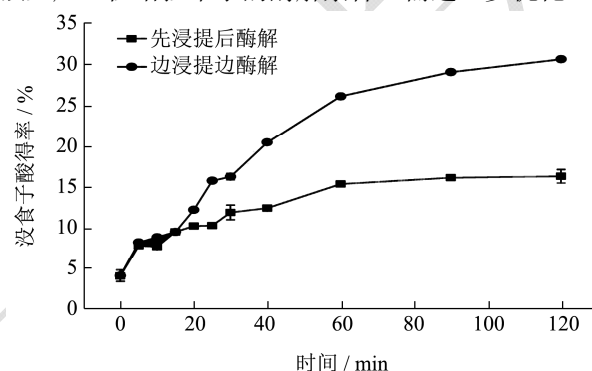


图1 塔拉粉不同提取工艺比较

Fig.1 Comparison of different methods for Tara powder extraction

2.2 单因素试验结果与分析

2.2.1 不同料液比对塔拉单宁转化率的影响

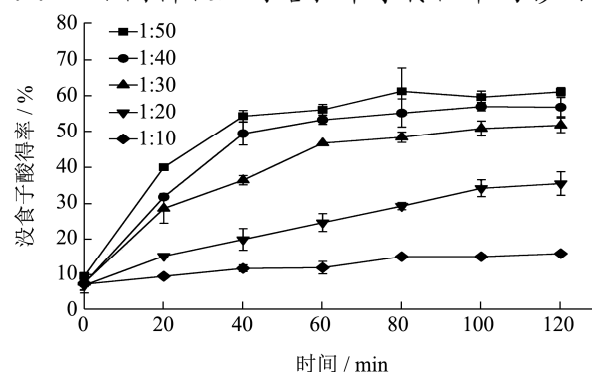


图2 料液比对没食子酸得率的影响

Fig.2 Effect of material-liquid ratio on the yield of gallic acid

用相同单宁酶液水解不同料液比的塔拉单宁,试验结果如图 1 可知,料液比 1:30, 1:40 和 1:50 的没食子酸得率分别是 51.45%, 56.69% 和 60.98%, 高于料液比 1:10 和 1:20 的得率,其中 1:50 的没食子酸得率比 1:20 增加了 25.98%,在水解反应进行一个小时候,1:30 和 1:40 的没食子酸得率分别比 1:20 增加了 22.36% 和 28.94%。推测后者产量低原因是低料液比使得单宁酸浸出浓度过高,抑制了单宁酶活性^[19]。在酶

解 40 min 后, 1:50 和 1:40 的体系中没食子酸的量基本保持微量变化, 而 1:30 体系中没食子酸的产量在整个反应过程中处于持续增加状态, 料液比 1:50、1:40 和 1:30 三者最终塔拉单宁转化率相近, 相同质量的塔拉粉, 体系 1:30 相对于 1:50 和 1:40 在工业生产时能显著节约用水, 所以选料液比 1:30 作为初步浸提-酶解料液比。

2.2.2 不同反应温度对塔拉单宁转化率的影响

在不同的温度下, 浸提塔拉粉中塔拉单宁具有不同的效果, 一般是温度越高, 所用的时间越少, 且浸提率高, 但是反应体系中的过高的温度会使单宁酶变性失活^[20]。将单宁酶水解塔拉单宁放置在不同温度的水浴锅中进行反应, 其他条件不变。试验结果如图 2 可知, 反应温度为 50 °C 和 60 °C 时的塔拉单宁转化率均为 50% 左右, 显著高于温度为 30 °C, 40 °C 和 70 °C 时 23.75%、34.77% 和 18.89% 的提取率。反应温度为 70 °C 时提取率最低, 主要因为温度高导致酶严重失活^[21], 使得塔拉单宁不能被有效降解为没食子酸和奎尼酸。反应温度 40 °C 和 30 °C 时, 因塔拉粉单宁酸浸提速率较慢与单宁酶活力低等因素, 使得没食子酸产量远低于 60 °C 和 50 °C。因 60 °C 时最终塔拉单宁转化率最高, 选择温度 60 °C 作为初步浸提-酶解温度。

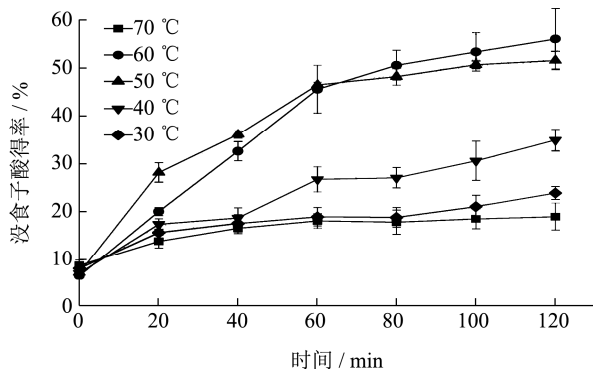


图3 反应温度对没食子酸得率的影响

Fig.3 Effect of reaction temperature on the yield of gallic acid

2.2.3 不同加酶量对塔拉单宁转化率的影响

反应体系中不同的加酶量会影响反应速度和时间, 酶用量少会延长水解时间, 并且塔拉单宁不能被完全水解, 酶用量多会减少塔拉单宁水解时间, 同时也会浪费酶资源。本部分中对加酶量进行优化, 以选出最佳值。应用反应料液比 1:30 和反应温度 60 °C, 进行单宁酶添加量优化, 其他条件不变。试验结果如图 3 可知, 在加酶液分别为 4 mL 和 5 mL 时, 重组米曲霉单宁酶 *Tan1* 酶液酶解塔拉单宁产生没食子酸的得率类似, 均在反应时间为 120 min 时达到 65%。而分别添加 1 mL、2 mL 和 3 mL 酶液时, 没食子酸得率随着添加酶液的量的减少而降低, 最终得率仅为

26.31%、46.23% 和 55.99%, 酶解塔拉单宁的速度明显慢于 4 mL 酶液的速度, 故选择 4 mL 酶液作为初步浸提-酶解的单宁酶用量。

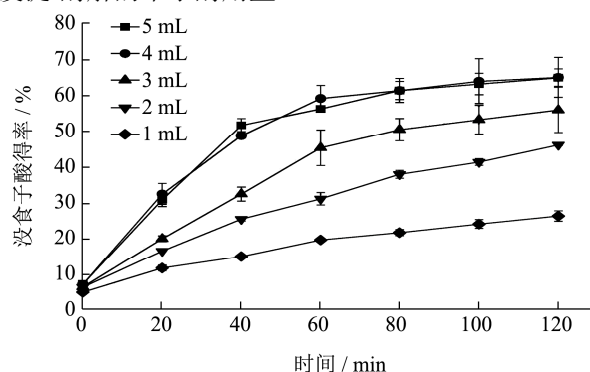


图4 加酶量对没食子酸得率的影响

Fig.4 Effect of enzyme quantity on the yield of gallic acid

2.2.4 不同反应 pH 对塔拉单宁转化率的影响

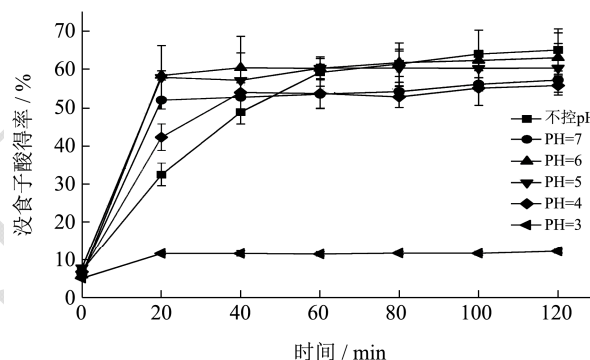


图5 反应 pH 对没食子酸得率的影响

Fig.5 Effect of reaction pH on the yield of gallic acid

塔拉单宁在被酶解过程中, 其酶液 pH 会随着酶解时间的延长和没食子酸的生成而降低^[22], 从而造成酶活降低, 影响没食子酸的生成。分别将此反应维持不同的 pH, 以找出最佳反应 pH。应用反应料液比 1:30 和反应温度 60 °C, 加酶量 4 mL (500 U/mL) 进行反应 pH 优化, 其他条件不变。试验结果如图 4 可知, 和不控制 pH 的对照相比, 控制 pH 为 3 时, 只产生少量的没食子酸, 推测原因是反应环境处于酸性^[23], 使得部分单宁酶失活而影响酶解过程; 控制反应 pH 为 4 到 7 之间, 在前 20 min 均可提高反应速度; 控制反应 pH 为 5 到 7 条件下反应 20 min 塔拉单宁的转化率达到 57.90%、58.38% 和 51.89%, 此后延长反应时间并不会过多提高没食子酸的生成量。将反应 pH 控制在 5 和 6 时比控制其他 pH 值没食子酸生成的速率更快且二者最终没食子酸的得率 60.32% 和 63.04% 与不控 pH 时的最终得率 65.03% 无较大差别, 曾维丽^[24]等研究塔拉单宁水解条件时发现 pH 为 5.5 时没食子酸产率最高 63.80%, 故选控制 pH=5 作为初步浸提-酶解 pH。

表3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Plackett-Burman design and results

序号	料液比	虚拟项 1	温度/℃	虚拟项 2	加酶量/mL	虚拟项 3	pH	得率/%
1	1:40	1	65	-1	5	-1	4	44.65±1.13
2	1:40	1	65	1	3	1	6	57.60±2.19
3	1:20	1	45	1	3	-1	4	12.17±0.16
4	1:40	-1	45	-1	3	-1	4	28.05±1.01
5	1:40	1	45	-1	3	1	6	26.85±0.82
6	1:20	1	65	-1	5	1	4	31.14±1.60
7	1:20	-1	45	-1	5	1	6	37.33±0.19
8	1:20	-1	65	-1	3	-1	6	28.97±2.44
9	1:20	-1	65	1	3	1	4	27.67±2.31
10	1:40	-1	65	1	5	-1	6	62.58±4.13
11	1:20	1	45	1	5	-1	6	32.78±1.09
12	1:40	-1	45	1	5	1	4	35.34±1.73

2.3 Plackett-Burman 实验结果与分析

根据 PB 设计的不同试验条件进行单宁酶 *Tan1* 水解塔拉粉, 如结果表 3 所示。

用 Minitab 17.0 软件对试验结果方差分析, 并筛选出对没食子酸的得率有显著影响 ($p \leq 0.05$) 的因素。由表 4 可知, 模型 p 值=0.046, 说明 PB 筛选模型具有显著性。温度、pH 和料液比的 p 值分别是 0.02、0.04 和 0.02, 均小于 0.05, 说明温度、pH 和料液比是对同步浸提-酶解反应具有显著性的因素。继续用温度、pH 和料液比进行响应面设计。

表4 Plackett-Burman 试验方差分析

Table 4 Analysis of variance for Plackett-Burman test

因素	T	p	显著性
模型		0.046	*
料液比/(g/mL)	-3.73	0.02	*
反应温度/℃	3.51	0.02	*
加酶量/mL	2.74	0.05	
pH	2.94	0.04	*
虚拟项 1	-0.65	0.55	
虚拟项 2	1.37	0.24	
虚拟项 3	0.29	0.78	

注: *表示显著 $p < 0.05$; **表示极显著 $p < 0.01$ 。下表 6 同。

2.4 响应面实验结果与分析

PB 筛选出对其有显著性影响的因素是温度、pH 和料液比。分别取各因素的低水平和高水平进行 BBD

设计响应面, 响应面设计和试验结果见下表 5。

采用 Design-Expert 软件进行方差分析, 如下表 6 所示, 模型 F 值=30.65, 意味着模型具有重要意义, $p < 0.0001$, 说明此模型极显著。失拟项 p 值为 0.0805, 不显著。在这种情况下, 模型中极显著性的因素是 A、B、C 和 BC, AC、 B^2 具有显著性, 非显著因素为 AB、 A^2 、 C^2 。综上所述此模型可用于设计响应面。舍掉非显著因素, 没食子酸得率公式为:

$$Y = -99.77 + 2.94A - 0.56B + 35.83C - 0.24AC - 0.45BC + 0.03B^2$$

表5 Box-Behnken Design 试验设计及其结果

Table 5 Box-Behnken design and results

序号	料液比	温度/℃	pH	得率/%
1	1:40	45	5	59.04±0.72
2	1:20	45	5	26.04±2.40
3	1:40	65	5	63.42±5.11
4	1:20	65	5	51.62±0.55
5	1:40	55	4	53.68±0.47
6	1:20	55	4	35.80±1.30
7	1:40	55	6	58.72±0.66
8	1:20	55	6	50.61±2.06
9	1:30	45	4	43.47±0.58
10	1:30	65	4	60.25±1.15
11	1:30	45	6	57.72±3.23
12	1:30	65	6	56.54±1.99
13	1:30	55	5	49.78±2.35
14	1:30	55	5	50.96±1.33
15	1:30	55	5	49.90±0.23

表 6 Box-Behnken Design 试验方差分析

Table 6 Box behnken design test variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	788.37	7	112.62	30.65	<0.0001	**
A-料液比/(g/mL)	327.33	1	327.33	89.10	<0.0001	**
B-反应温度/℃	192.61	1	192.61	52.43	0.0002	**
C-pH	115.39	1	115.39	31.41	0.0008	**
AC	23.88	1	23.88	6.50	0.0381	*
BC	80.69	1	80.69	21.96	0.0022	**
A ²	11.93	1	11.93	3.25	0.1145	
B ²	33.43	1	33.43	9.10	0.0195	*
失拟项	24.87	5	4.97	11.72	0.0805	
残差	25.72	7	3.67			
误差	0.85	2	0.42			
总和	814.08	14				

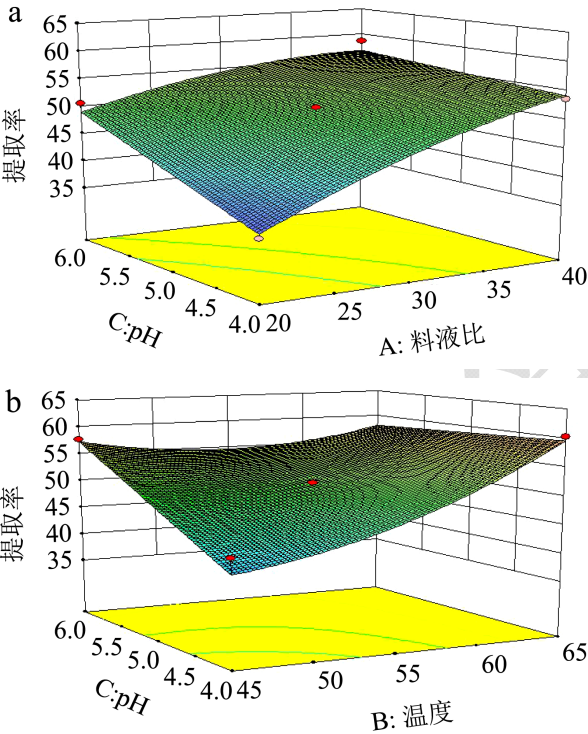


图 6 各因素对得率交互影响的响应面

Fig.6 Response surface of each factor to the interaction of yield

通过对此二次回归模型方程进行响应面分析，分别得到反应 pH 和塔拉粉料液比之间与 pH 和反应温度之间交互作用的立体分析。

Design-Expert 软件预测最佳酶解方案为料液比 1:40，反应温度 65 ℃，pH 保持为 4，如图 7 所示，验证实验反应一个小时后得出没食子酸得率 65.99%，与预测值 66.59%并无显著差异。

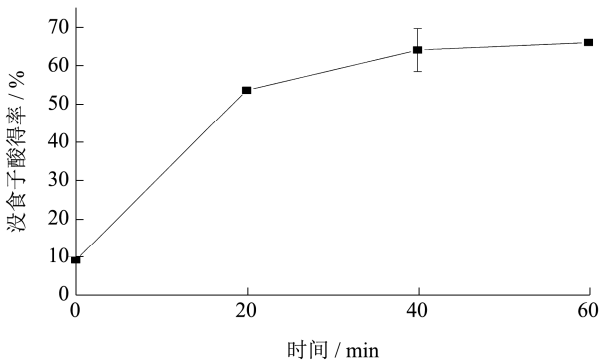


图 7 响应面预测最优方案验证结果

Fig.7 Verification for the predicted best extraction conditions

2.4 Tan1 多次酶解塔拉单宁结果与分析

根据 Tan1 的酶学性质研究结果可知，Tan1 的温度稳定性远高于其他同类单宁酶研究中所报道的结果。因此尝试多次向反应体系中补充塔拉粉以提高没食子酸产量。在反应过程中，固定时间取样，并对每个样品的上清液和固体残渣，用薄层色谱检测其塔拉单宁水解和没食子酸生成情况。结果如下图 8 所示，在六次塔拉粉投料酶解后的上清液和固体残渣，均没有检测出单宁酸，而上清液中均能检测到没食子酸，说明塔拉单宁被 Tan1 彻底水解为没食子酸。第一次投料和第二次投料反应后的固体残渣中没有检测到没食子酸，说明反应液中所生成的没食子酸都处于溶解状态，而其他投料反应后的固体残渣中均能检测出没食子酸，说明反应液中没食子酸浓度过高，已经被析出。Raghuwanshi 等^[25]报道球形芽孢杆菌单宁酶可以使

90.80%单宁酸转化为没食子酸, Abdel-Naby^[26]检测到在反应进行 35 min 后, 单宁酸被米曲霉单宁酶完全水解, 相比之下, 本研究中重组单宁酶 *Tan1* 具有高效酶解和转化能力, 可极大降低单宁酶在生产中的用量, *Tan1* 更适用于工业应用。

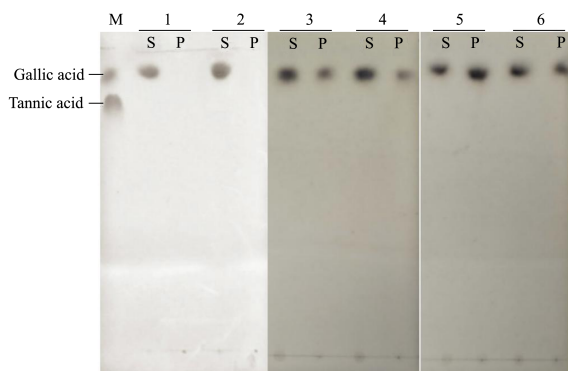


图8 *Tan1* 多次酶解塔拉单宁结果与分析

Fig.8 Results and analysis of multiple enzymatic hydrolysis of tara tannin with *Tan1*

注: S 表示上清液, P 表示固体残渣沉淀。

3 结论

本文采用单宁酶 *Tan1* 水解塔拉粉生产没食子酸, 实验结果表明同步浸提-酶解工艺更有利于酶解塔拉单宁生产没食子酸, 通过单因素试验探讨了塔拉粉料液比、反应温度、反应 pH 和加酶量对所制备塔拉单宁转化率的影响, 经 Plackett-Burman 试验设计并筛选出具有显著性影响的因素是温度、pH 和料液比; 利用 Box-Behnken Design 试验设计, 分析出模型中因素 A, B, C 和 BC 具有极显著性, 建立二次回归模型, 得到最佳酶解方案为料液比 1:40, 反应温度 65 °C, pH 保持为 4。验证试验结果塔拉单宁转化率达到 65.98%, 与预测值 66.59%并无显著差异。在最佳试验条件下, 利用单宁酶连续 6 次水解塔拉粉, 酶解后反应液中没有单宁酸残留, 表明塔拉单宁均能被高效水解为没食子酸。本文所研究的塔拉单宁酶解生产没食子酸工艺优化可为没食子酸的大规模酶法制备提供参考, 并为没食子酸的绿色生产奠定基础。

参考文献

- [1] 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
- [2] 路祺, 张莹, 祖元刚, 等. 塔拉没食子酸的研究进展[J]. 植物研究, 2014, 34(4): 572-576
LU Qi, ZHANG Ying, ZU Yuan-gang, et al. Research

- progress of taragallic acid [J]. Plant Research, 2014, 34 (4): 572-576
- [3] Badhani B, Sharma N, Kakkar R. et al. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications [J]. RSC Advances, 2015, 5(35): 27540-27557
- [4] Raspo M A, Gomez C G, Andreatta A E, et al. Optimization of antioxidant, mechanical and chemical physical properties of chitosan-sorbitol-gallic acid films by response surface methodology [J]. Polymer Testing, 2018, 70: 180-187
- [5] RUI L, XIE M, HU B, et al. A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173(1): 473-481
- [6] Choubey S, Varughese L R, Kumar V, et al. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review [J]. Pharmaceutical Patent Analyst, 2015, 4(4): 305-315
- [7] 张雅丽, 李建科, 刘柳, 等. 五倍子没食子酸研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34 (10): 345-349
ZHANG Ya-li, LI Jian-ke, LIU Liu, et al. Research progress of gallnut gallic acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34 (10): 345-349
- [8] Choubey S, Goyal S, Varughese L R, et al. Probing gallic acid for its broad spectrum applications [J]. Mini-reviews in Medicinal Chemistry, 2018, 18(15): 1283-1293
- [9] 方琳凯, 张盛贵, 汪月, 等. 没食子酸酯化淀粉的合成与特性研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(5): 41-45, 50
FANG Lin-kai, ZHANG Sheng-gui, WANG Yue, et al. Synthesis and characterization of gallic acid esterified starch [J]. Food and Fermentation Technology, 2018, 54 (5): 41-45, 50
- [10] CHEN JH, WU Z S, BI LW, et al. Development of research on chemical utilization of tara extractives [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 1996, 15(2): 79-86
- [11] 汪莹莹. 没食子酸、并没食子酸的分离、性能及应用研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2012
WANG Ying-ying. Separation, performance and application of gallic acid and gallic acid [D]. Hefei: Anhui University, 2012
- [12] 杨顺楷, 杨亚力. 酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸[J]. 精细与专用化学品, 2005, 13(5): 12-13, 15
YANG Shun-kai, YANG Ya-li. Enzymatic conversion of gallnut tannin to gallic acid [J]. Fine and Special Chemicals, 2005, 13 (5): 12-13, 15
- [13] 李秧针, 邱树毅, 保玉心, 等. 单宁酶发酵生产的研究进展[J].

- 中国酿造,2008,6:1-6
- LI Yang-zhen, QIU Shu-yi, BAO Yu-xin, et al. Research progress in tannase fermentation [J]. Chinese Brewing, 2008, 6: 1-6
- [14] 王啸,赵安婷,邱树毅.抗氧化剂没食子酸的酶法转化生产研究[J].中国食品添加剂,2010,4:161-163,210
- WANG Xiao, ZHAO An-ting, QIU Shu-yi. Study on enzymatic conversion of antioxidant gallic acid [J]. China Food Additive, 2010, 4: 161-163, 210
- [15] 王啸,李秧针,吴远根,等.利用微生物酶两步法生产没食子酸的初步研究[J].食品工业科技,2010,5:152-154
- WANG Xiao, LI Yang-zhen, WU Yuan-gen, et al. Preliminary study on two-step production of gallic acid by microbial enzyme [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 5: 152-154
- [16] 聂方园,马晓丰.单宁酸的生物活性研究进展[J].化学与生物工程,2015,1:16-18,22
- NIE Fang-yuan, MA Xiao-feng. Research progress in biological activity of tannic acid [J]. Chemistry and Bioengineering, 2015, 1: 16-18, 22
- [17] 石闪闪,何国庆.单宁酸及其应用研究进展[J].食品工业科技,2012,33(4):410-412,416
- SHI Shan-shan, HE Guo-qing. Research progress of tannic acid and its application [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33 (4): 410-412, 416
- [18] 吴昌正.黑曲霉固态发酵茶梗产单宁酶及利用磁性纳米粒子固定化单宁酶研究[D].厦门:集美大学,2014
- WU Chang-zheng. Research on the solid fermentation of tea stems by *Aspergillus niger* to produce tannase and immobilization of tannase using magnetic nanoparticles [D]. Xiamen: Jimei University, 2014
- [19] 邹苑.玉米醇溶蛋白-单宁酸复合颗粒对界面主导食品体系的调控研究[D].广州:华南理工大学,2018
- ZOU Yuan. Study on the regulation of zein-tannic acid composite particles on the interface-led food system [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [20] Sabu A, Augur C, Swatl C, et al. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(3): 575-580
- [21] Chaitanyakumar A, Anbalagan M. Expression, purification and immobilization of tannase from *Staphylococcus lugdunensis* MTCC 3614 [J]. AMB Express, 2016, 6(1): 89
- [22] Chávez-González M, Rodríguez-Durán L V, Balagurusamy N, et al. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(2): 445-459
- [23] Rodríguez-Durán, Luis V, Valdivia-Urdiales B, et al. Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase [J]. Enzyme Research, 2011(1): 1-20
- [24] 曾维丽,姚开,贾冬英,等.塔拉单宁水解酶产生条件的研究[J].天然产物研究与开发,2006,18(4):592-595
- ZENG Wei-li, YAO Kai, JIA Dong-ying, et al. Study on the production conditions of Taratannin hydrolase [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18(4): 592-595
- [25] Raghuwanshi S, Dutt K, Gupta P, et al. *Bacillus sphaericus*: the highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(6): 635-640
- [26] Abdel-Naby M A, El-Tanash A B, Sherief A D A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Aspergillus oryzae* tannase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 92: 803-811

(上接第 117 页)

- [17] 温玲蓉.北山楂和大果山楂的活性成分及其抗氧化与抗增殖活性研究[D].广州:华南理工大学,2016
- WEN Ling-rong. Study on the bioactive chemical constituents and their antioxidative and anti-proliferative activities of *Crataegus pinnatifida* and *Malus doumeri* fruits [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [18] Kuntal G, Mousumi R, Atanu A, et al. Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage [J]. Bioresource Technology, 2015, 188: 161-168