

微生物转化法生产没食子酸的研究进展

闵凡芹¹, 王成章^{1,2*}

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 南京 210042;
2. 中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091)

[摘要] 研究微生物转化法生产没食子酸的国内外进展情况。查阅、整理了微生物转化法生产没食子酸的历史文献资料,从原料、作用机制、发酵条件、生产方式4个方面进行了归纳总结。微生物转化法生产没食子酸具有传统酸碱法所不可比拟的优点,围绕高转化率菌种的选育、培养条件的优化等方面的研究为进一步提高没食子酸的产率提供了依据。微生物转化法生产没食子酸是具有开发和应用潜力的方法。

[关键词] 单宁酸; 没食子酸; 微生物转化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0236-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170236

Advance on Gallic Acid Production by Microbial Transformation

MIN Fan-qin¹, WANG Cheng-zhang^{1,2*}

(1. Institute of Chemical Industry of Forestry Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization, Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province; Nanjing 210042, China;
2. Institute New Technology of Forest, CAF, Beijing 100091, China)

[Abstract] This article was too review the research progress in the production of gallic acid using microbial

[收稿日期] 20130905004

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(SS2014AA021802)

[第一作者] 闵凡芹, 硕士, 从事天然产物化学研究, Tel:025-85482421, E-mail: minfanqin19@163.com

[通讯作者] * 王成章, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事天然产物研究与利用, Tel:025-85482421, E-mail: wangczlzs@sina.com

- [23] 陈建英, 宋海波. 交联透明质酸凝胶膜的制备及其生物相容性的研究[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(2):104.
- [24] 肖荣冬, 翁国星. 胶原/透明质酸膜与明胶海绵支架材料力学及组织相容性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(25):1123.
- [25] 范宏斌, 蕴玉. 明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠作为组织工程软骨支架的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(6):473.
- [26] Chou C L, Li H W, Lee S H, et al. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid in rheumatoid arthritis patients with knee osteoarthritis[J]. J Chin Med Assoc, 2008, 71(8):411.
- [27] Lee H, Lee K, Park T G. Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization, and antitumor activity [J]. Bioconj Chem, 2008, 19(6):1319.
- [28] Benjamin Y S O, Ranganath S H, Lee L Y, et al. Paclitaxel delivery from PLGA foams for controlled release in post-surgical chemotherapy against glioblastoma multiforma [J]. Biomaterial, 2009, 30(12):3189.
- [29] Park K, Lee M Y, Kim K S, et al. Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethylene ermine hyaluronic acid conjugate [J]. Biomaterial, 2010, 31(19):5258.
- [30] Sudhir H, Yilong F, Davis Y, et al. The use of submicro nano scale PLGA implants to deliver paclitaxel with enhanced pharmacokinetics and therapeutic efficacy in intracranial glioblastoma in mice [J]. Biomaterial, 2010, 31(3):5199.

[责任编辑 邹晓翠]

transformation method. Literatures on microbial transformation in gallic acid production were summarized, including material, mechanism, fermentation condition and production mode. Microbial transformation method has incomparable advantages over traditional alkali and acid catalysis methods in production of gallic acid. Research focusing on the breeding of strains with high conversion rate and the optimization of culture conditions laid the foundation for the further research in the improvement of the yield of gallic acid. Microbial transformation method was a good way to the development and application potential in gallic acid production.

[**Key words**] tannic acid; gallic acid; microbial transformation

微生物转化法(microbial transformation)是通过微生物细胞将复杂的底物进行结构修饰,也就是利用微生物代谢过程中产生的某个或某一系列的酶对底物特定部位进行的催化作用。微生物转化研究始于1864年巴斯德利用乙酸杆菌将乙醇氧化为乙酸,目前微生物转化已应用于多种天然产物如醌类、黄酮类、萜类、甾体类、生物碱类、苷类化合物的合成与开发^[1]。

没食子酸(GA),又称倍酸,五倍子酸,广泛应用于有机合成、涂料、染料、医药、食品、化工、制革、日化、农业、矿产等方面,主要用于药物、染料、墨水制造,也用做食品抗氧化剂、防腐剂、金属提取剂、紫外线吸收剂、消毒剂、止血收敛剂、显影剂、化学试剂、泥浆流化剂和葡萄生长剂等^[2]。以没食子酸为原料,合成的主要产品及中间体有焦性没食子酸、没食子酸酯类化合物、三羟基苯甲酰胺、三甲氧基苯甲醛和三甲氧基苯胺嘧啶等^[3]。近年来,美国微电子工业采用电子化学品级的高纯度没食子酸洗涤大规模集成电路板^[4]。目前,没食子酸全国年产量约为2 000吨,产品除满足国内需求外,还销往国外。当前主要以五倍子、塔拉中提取的单宁酸为原料采用酸法和碱法水解制取,具有污染严重、设备易腐蚀等缺点,急需开发绿色环保的生物方法。围绕单宁酶的研究进展,国内外学者开展了一系列的研究,取得了相应的研究进展,Belur等从产单宁酶的菌株高效分离、单宁酶活力的测定方法、单宁酶的生产方式、发酵条件等多个方面进行了阐述,并对单宁酶的研究进展情况进行了概述^[5],Cristóbal等则从单宁酶作用的底物、单宁酶的分子生物学进展及其在食品、化工中应用等方面进行了系统的综述^[6],此外,Mónica等^[7]还就单宁酶降解单宁酸的作用机制、单宁酶的分离纯化及单宁酶的固定化等方面进行了讨论。采用微生物转化法降解单宁酸制备没食子酸的方法具有环境污染小,产出高等传统的化学法所不可比拟的优点,已经成为国内外学者的研究热点问题,并取得了一定的进展,然而这一领域却尚未见系统总结性的文献报道,本文对微生物转化法生产没食子酸的研究成果进行了归纳和总结,以期以后相应的研究工作提供指导。

1 原料

利用微生物转化法生产没食子酸所用的原料主要为中国五倍子、塔拉以及土耳其倍子,其中都富含没食子单宁酸。没食子单宁酸为普遍存在于植物的叶、皮和果实中的4大类单宁酸的一类,是由没食子酸与多羟基醇形成的酯^[8]。另外国内有学者对国产肉荚云实作为工业化生产没食子酸的

原料进行了研究,结果表明其单宁酸含量、纯度及水解没食子酸产率均优于进口塔拉^[9]。

中国五倍子为倍蚜类昆虫在漆树科Anacardiaceae植物盐肤木*Rhus chinensis* Mill.、青麸杨*Rhus potaninii* Maxim.或红麸木复叶主轴两侧上形成的虫瘿,为重要的中药材。其主要药效成分五倍子单宁酸为没食子酸与不同构型的葡萄糖结合的混合物,以五倍酰葡萄糖为核心,在C2,C3,C4位以缩酚键连接不同数目的倍酰基结构^[10]。

塔拉是西班牙文Tara的译音,按中文名可称为刺云实、刺豆,为云实科云实属的一种带刺常绿灌木或小乔木,是分布于南美洲秘鲁、智利、玻利维亚、厄瓜多尔等国家的一种珍贵经济植物。塔拉果荚中富含塔拉单宁,系聚倍酰奎尼酸的混合物,由1个分子奎尼酸与平均4~5个倍酰基组合而成^[11]。

土耳其倍子又称没食子,为没食子蜂幼虫寄生在没食子树幼枝所产生的虫瘿,它是植物体受到昆虫的刺激而生成的不正常构造。土耳其倍子富含没食子单宁酸,结构上与中国五倍子单宁酸类似。

2 作用机制

一些微生物可连续或在底物诱导下产生单宁酶。单宁酶(EC3.1.1.20)是一种水解酶,它在植物体内复杂单宁酸形成中起重要作用,其具有缩酚羧酶和酯酶的活性,可降解单宁酸中没食子酸与多羟基醇之间形成的酯键以及2个没食子酸之间形成的缩酚羧键产生没食子酸和葡萄糖^[12]。其中间产物为1,2,3,4,6-黄倍酰单宁和2,3,4,6-四倍酰单宁以及2种寡没食子酰葡萄糖。当底物为没食子酸甲酯时,单宁酶可催化形成没食子酸和甲醇^[13]。

单宁酶具有基团专一性,只能水解没食子酸化合物中的酯键,不对底物类似物如甲基二羟甲酸盐起作用,对键另一端的醇则没有要求。含酚羟基的底物类似物可与酶的活性中心结合起竞争性抑制作用,但2,6-二羟基苯甲酸是非竞争性抑制。这表明尽管底物与酶结合的复合物为没食子酸化合物,但因酶与底物结合的位点不同,它对一些酚羟基底物起作用,而对另一些底物类似物又不起作用^[14]。

目前,单宁酶的调节机制尚不明确,一些化合物在单宁酶的诱导与抑制中所起的作用存在相互矛盾的结论。Knudson报道单宁酶仅在培养基中添加单宁酸的情况下产生,即单宁酸诱导微生物产单宁酶^[15],随后有学者在葡萄糖作为微生物生长的唯一碳源时,任观察到单宁酶的产生^[16]。Bradoo等的研究则表明*Aspergillus japonicus*在添加简单或复

杂糖类的基础培养基上可连续产生单宁酶,但当培养基中单宁酸作为唯一碳源时,单宁酶产量加倍^[17]。然而,通常认为,单宁酸并不能作为单宁酶的直接诱导剂,因为其相对分子质量较大,并能与微生物细胞膜反应。

3 发酵条件

3.1 菌种 140 多年的科学研究发现,能降解单宁酸产没食子酸的单宁酶来源丰富,可由植物、动物以及微生物获得,主要来源于后者,包括细菌、真菌以及酵母。微生物产单宁酶较其他来源的单宁酶性质更加稳定,并且可以采用基因工程技术改造,从而获得具有较高单宁酶活性的工程菌。曲霉和青霉是研究最为深入的单宁酶产生菌,已被广泛应用于微生物转化法生产没食子酸的研究中,其中黑曲霉具有工业化生产没食子酸的开发潜力,其可在培养基中不存在单宁酸的情况下连续产生单宁酶,并可以耐受高达 20% 的单宁酸而不影响酶的产生和菌株的生长^[18]。微生物转化法生产没食子酸常用的菌株如表 1 所示。

表 1 微生物转化法生产没食子酸所用菌株

菌种	参考文献
丝状真菌	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	[26]
<i>A. candidus</i>	[27]
<i>A. ficuum</i>	[28]
<i>A. foetidus</i>	[29]
<i>A. heteromorphus</i>	[30]
<i>A. tamarii</i>	[31]
<i>Cylindrocadiella peruviana</i>	[32]
<i>Penicillium atramentosum</i>	[33]
<i>P. canescens</i>	[34]
<i>P. concentricum</i>	[32]
<i>P. frequentans</i>	[34]
<i>P. purpurogenum</i>	[34]
<i>P. zacinthae</i>	[34]
<i>Verticillium sp.</i>	[35]
酵母	
<i>Arxula adenivorans</i>	[36]
<i>Candida utilis</i>	[37]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[38]
细菌	
<i>Citrobacter freundii</i>	[38]
<i>Enterobacter sp.</i>	[39]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	[40]
<i>Leuconostoc fallax</i>	[40]
<i>L. mesenteroides</i>	[40]
<i>Microbacterium terregens</i>	[41]
<i>Pantonea sp.</i>	[42]
<i>Providencia rettgeri</i>	[41]
<i>Serratia ficaria</i>	[41]
<i>S. marcescens</i>	[41]

S. Bradoo 等建立了利用平板筛选单宁酶高产菌的简单方法。在平板培养基加入 1% 的单宁,将要筛选的菌种接种于平板上适宜温度下培养 48 h,以菌落周围的透明圈直径与菌落直径的比值作为筛选标志^[19]。后来的学者 Rakesh Kumar 对这一方法进行了改进,在平板中加入指示剂溴酚蓝,通过平板培养基颜色的变化达到高效准确分离产单宁酶菌株的目的^[20]。

Purohit 等采用紫外线及甲基硝基胍诱变处理共培养的产单宁酶菌株 *Aspergillus foetidus* (米根霉) 及 *Rhizopus* (恶臭曲霉),使其产酶活力达到 $53.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,没食子酸生物转化率高达 95.2%^[21];成都生物研究所用黑曲霉 NO. 13 为出发菌株,经紫外线诱变处理等获得一株具有稳定遗传性状的高产单宁酶菌株,利用该菌株发酵,在摇瓶培养范围内,发酵液中没食子酸的浓度可维持在 $22.8 \sim 23.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,生物转化能力是出发菌株的 2 倍,以单宁酸计的产率高达 41.3% ~ 42.6%^[22]。1997 年,Hatamoto 等克隆并测序了米曲霉内编码单宁酶的基因,并研究了单宁酶的亚基结构。发现编码单宁酶的基因不含内含子,单宁酶亚基相对分子质量为 64 000 Da,由通过二硫键连接的 2 个分子相对质量为 3 000 Da 和 33 000 Da 的肽链组成,包含 588 个氨基酸残基,其中 18 个氨基酸为信号肽^[23]。这一研究为通过基因操纵提高单宁酶的活力开启了一扇大门,随后国内外学者进行了很多相关尝试:Albertse 将黑曲霉内编码单宁酶的基因通过基因工程手段成功导入酿酒酵母,但其单宁酶表达水平较低,并且单宁酶催化活性与天然存在的单宁酶也存在区别^[24];Cerde 等则报道了以 5 种黑曲霉内单宁酶的基因序列为依据设计出一系列引物,随后通过 PCR 扩增,成功获得 435 bp 基因片段^[25]。

3.2 培养基优化 采用微生物法生产没食子酸的关键是要获得具有高产酶能力的菌株。近年来,国内外学者围绕这一目标,对菌株培养时间、温度、pH、碳源、氮源等培养条件的优化进行了探讨。

Hadi 对恶臭曲霉的产单宁酶条件进行了优化,发现菌株在察氏培养基中培养时单宁酶活力可达 $6.12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,该培养基含 2% 单宁酸,1% 葡萄糖,0.05% 硝酸钠,初始 pH 5.0,培养时间为 4 d^[43];同样,Bradoo 等发现培养基中添加初始质量浓度为 $10 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的额外碳源如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖能提高 *A. japonicus* 的产酶水平,随后,Bradoo 对 *A. japonicus* 的培养条件进行了优化,结果表明,当培养温度为 30 ℃,pH 为 6.6,培养基中添加 0.2% 葡萄糖和 1% 单宁酸时,菌株产酶活力提高 13%^[17];Pinto 等分别测定了单宁酸与麦麸不同配比、含水率、补加氮源、磷酸盐以及氮源和磷酸盐浓度对黑曲霉产酶活力的影响,结果表明最佳培养条件为:培养基中添加 15% 单宁酸,1.7% 硫酸铵及 2.0% 磷酸钠,初始含水率为 37.5%。磷酸盐的添加对最优条件的获取具有重要意义,因其促进了单宁酶的合成并使最佳培养时间从 72 h 降低到 48 h,这对工业生产没食子酸意义显著^[44]。王挥等采用响应面法中心组合设计,对一株黑曲霉

的产酶条件进行了优化。发现对产酶影响最大的因素依次为:单宁浓度、培养温度、培养时间。其最适产酶条件为:31.7 °C,转速 180 r·min⁻¹,单宁酸浓度 1.5%,初始 pH 6.0,接种量 10%,装液量 20%,培养时间 72 h。在此条件下,发酵单宁酶活力可达 1 141.82 U·mL⁻¹[45]。由上述研究可见,培养基不同配比及培养条件的优化是提高微生物转化法生产没食子酸的单宁酶活力及和底物转化率的重要途径。

3.3 转化率 微生物转化法生产没食子酸的转化率通常以菌株产单宁酶活力的大小体现。其中单宁酶活力的快速高效测定是微生物法转化法生产没食子酸的关键问题。迄今为止,文献报道的测定单宁酶活力的方法有很多种,如滴定法、紫外分光光度法、可见分光光度法、视读法、气相色谱法、高效液相色谱法等。

日本 Sadaaki Iibuchi 等于 1967 年建立了单宁酶活力测定的经典方法,即紫外分光光度法。原理为底物单宁酸在 310 nm 处存在紫外吸收,通过测定反应前后 310 nm 下紫外吸收的变化可求得单宁酶活力^[46]。此法简便快捷,且误差较小,但对底物单宁酸纯度要求非常高。王征等采用没食子酸丙酯(PG)作为单宁酶活力测定的底物,在 270 nm 波长下通过紫外吸收值的变化测定单宁酶活力,不仅避免了产物没食子酸光吸收的干扰,而且对底物浓度允许范围较广,从而使单宁酶活力的测定更加灵敏^[47]。1994 年法国的 Chantal Barthelemy 等建立了高效液相色谱法连续测定反应过程中产物没食子酸变化量,从而直接测定出酶反应的初速度的酶活力测定。此法迅速准确,但对仪器要求较高^[48]。Jean D 等则以没食子酸甲酯为底物,采用气相色谱法测定酶促反应的初速度,该方法同样具有准确等优点,但操作繁琐,为非常规测定方法^[49]。

Aguilar 等比较了 6 种不同的测定方法在黑曲霉 Aa-20 固体发酵产单宁酶活力测定中的区别,结果发现并不是所有的测定方法都可用于胞外单宁酶活力的测定,比如色谱方法及修正的紫外分光光度法,另外,他们还发现,当单宁酶提取 pH 低于 5.5 或高于 6.0 时,单宁酶活力的测定值低于实际值^[50]。

4 生产方式

微生物转化法生产没食子酸可采用丝状真菌的液体表层发酵、液体深层发酵以及固体发酵 3 种方式进行,对于细菌及酵母多采用液态深层发酵的方法。目前的研究来看微生物转化法生产没食子酸多采用液体发酵方法,但固态发酵的优势日益显现。

4.1 液体发酵法 液体发酵法包括液体深层发酵及液体表层发酵法。液体深层发酵以液体培养基为原料进行微生物的培养及底物转化,是微生物转化法生产没食子酸的常用方法,而液体表层发酵是指微生物在液态培养基的浅层生长及进行底物转化的方法,应用于早期微生物代谢产品的生产中,如葡萄糖酸,但在没食子酸生产中的应用较少有报道。日本学者 Iibuchi S 等优化了米曲霉菌株液态深层发酵产单宁酶的最适培养条件并对该单宁酶进行了分离纯化,是较早报

道液态深层发酵法制备单宁酶的研究者之一^[51]。王蔚文采用倍花上分离的一株黑曲霉液态深层发酵五倍子单宁制备没食子酸,结果表明,在 15 L 的发酵罐中倍花的没食子酸转化率为 78.5%,角倍料的没食子酸转化率约为 89.5%^[52];杨顺楷等采用黑曲霉转化五倍子单宁酸生产没食子酸,发酵液中没食子酸的累积质量浓度达到 50~67 g·L⁻¹,对五倍子单宁酸的转化率为 92.1%,接近定量转化,后期发酵液经大孔吸附树脂分离精制,产率达 85.6%^[3]。

液体发酵法生产没食子酸具有条件控制简单,不易污染等优点,但菌株所产单宁酶往往为胞内酶,因而没食子酸产量较低。Rajkumar 等研究发现液态深层发酵法中单宁酶位置随培养时间而变化:在发酵开始阶段多为胞内,随后慢慢渗入培养基中,然而当单宁酶总活性达到最大值时,有 80% 单宁酶仍与菌丝体连接^[53]。另外引起液态深层发酵法生产没食子酸较低酶活和产率的原因可能为相伴而生的蛋白酶活性,其降解了部分单宁酶,Aguilar 等报道黑曲霉的蛋白酶活性在液态深层发酵中是固态发酵的 10 倍之多,此外该酶的活性还与初始单宁酸浓度有关^[54]。

4.2 固态发酵法 多年来,微生物转化法生产没食子酸主要通过液态深层发酵的方法,然而,研究发现固态发酵法与液态深层发酵法相比具有以下优点:单宁酶为胞外酶,因为底物转化率高;对 pH 和温度的稳定性高;固态发酵装填紧密因而相对能耗及用水量低;设备简单,易于扩大化生产。

Cruz 等比较了黑曲霉 GH1 在固态发酵及液态深层发酵中的效率,结果发现固态发酵法中单宁酶活性为液态深层发酵法的 4 倍^[55],这与 Aguilar 之前报道的黑曲霉固态发酵中单宁酶的活性及产量为液态深层发酵法的 2.5 倍多的结果相似^[56-57]。Lekha 等比较了液态深层发酵、液态表层发酵及固态发酵法在黑曲霉 PKL 104 产单宁酶中的区别,结果发现,固态发酵所产单宁酶的活性分别为液态深层发酵及液态表层发酵的 2.5 及 4.8 倍^[13]。除了较高的单宁酶产率及活性,固态发酵达到最高产酶活性所需的时间大约为液态发酵的 1/2。Rana 等则表明固态发酵法对不同的黑曲霉菌种都为产单宁酶的最好方法,据他们报道,固态发酵法单宁酶产量约为液态发酵法的 1.6 倍。固态发酵法所产单宁酶也具有更高的温度及 pH 稳定性^[58]。Kar 等采用 *R. oryzae* 修正固态发酵法生产没食子酸和单宁酶,所得单宁酶产量及没食子酸得率分别为传统的固态发酵法的 1.7 及 3 倍^[59]。Van de Lagemaat 和 Pyle 研究了真菌连续固态发酵生产单宁酶的方法,所用的生物反应器允许连续操作,并无需反复接种,但与静态固态发酵法相比,无论是在生物量、单宁酶产量,还是孢子形成速率方面都较低,原因可能是剪切力的有害影响^[60]。

4.3 固定化单宁酶 与采用液态与固态发酵法生产没食子酸相比,采用固定化单宁酶生产没食子酸的方法具有以下优点:酶的稳定性大大提高;酶可反复利用;产物的分离纯化更容易^[61]。

国内外学者报道的固定化单宁酶的载体包括:琼脂糖、

壳聚糖、离子交换树脂、海藻酸钙及含硅的多孔材料等。Abdel-Naby 等比较了不同的固定载体及不同固定化方法对单宁酶活性的影响,包括物理吸附于氧化铝、胶体几丁质;离子键键合于大孔吸附树脂 50 W、DEAE-Sephadex;共价键键合于壳聚糖及几丁质;微胶囊包埋于聚丙烯酰胺及海藻酸钙颗粒等,结果发现,共价键键合于壳聚糖的方法具有最高的单宁酶活性及固定化产率,酶的催化活性显示,固定化能显著提高酶的热稳定性及其在低 pH 下的稳定性^[62]。郭鲁宏等采用海藻酸钙包埋来源于黑曲霉的单宁酶,并将此固定化单宁酶应用于制备没食子酸,3 次实验中没食子酸产品的平均产率达到 61%^[63]。Hota 等采用同样的方法固定 *R. oryzae* 单宁酶用于没食子酸的生产,发现生物转化率接近 92%,该固定化单宁酶重复利用 7 次,底物的生物转化率仍达 60%~80%^[64]。

此外,利用自身固定的单宁酶生产没食子酸的方法是当前研究的一个新的方向。在特定的生产条件下,单宁酶与细胞结合紧密,因而细胞或者细胞碎片可作为单宁酶固定的天然载体。例如,Belur 等报道利用 *S. ficaria* 细胞结合的单宁酶水解单宁酸,结果显示了对温度和 pH 的较高的稳定性^[65]。利用自身固定的单宁酶生产没食子酸的方法不仅可以降低固定化过程产生的费用,还可节省分离纯化单宁酶所需的时间。

5 展望

没食子酸作为重要的化工原料,需求量日益增大,微生物转化法生产没食子酸具有其他方法不可比拟的优点。在过去的 20~30 年围绕这一研究热点,国内外学者从高转化率菌种的筛选及诱变选育、培养基条件的优化、采用不同的发酵系统等多个方面进行了不同的尝试,取得了一定了进展。当前研究的趋势是应用分子生物学技术增加产量并降低微生物转化法生产没食子酸的成本,初步的研究结果已证明这一思路是可行的,但在宏观基因组学;表达系统的构建;设计可用于大规模培养的生物加工过程以及高效、经济的下游加工技术的应用等方面仍需大量的研究工作。

[参考文献]

[1] 刘庆鑫,李慧梁,柳润辉. 微生物转化在天然产物研究中的应用[J]. 药学实践杂志, 2012, 30(5):321.
[2] Karunanayake L C, Adikaram N, Kumarihamy B M, et al. Role of antifungal gallotannins, resorcinols and chitinases in the constitutive defence of immature mango [J]. J Phytopathol, 2011, 159(10):657.
[3] 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, 5(13):12.
[4] 张薇,朱建国,徐景轶. 电子级高纯没食子酸的中试工艺研究[J]. 现代化工, 2005, 29(5):80.
[5] Belur P D, Mugeraya G. Microbial production of tannase;state of the art [J]. Res J Microbiol, 2011, 6(1):25.

[6] Aguilar C N, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, et al. Microbial tannase:advances and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(1):47.
[7] Mónica C G, Luis V, Rodríguez-Durán, et al, Biotechnological advances and challenges of tannase:an overview[J]. Food Biopro Technol, 2012, 5(2):445.
[8] Khanbabaee K, Ree T. Tannins: classification and definition [J]. Nat Prod Rep, 2001, 18(6):641.
[9] 代欣,叶世芸,何顺志,等. 用肉茱云实代替进口塔拉工业化生产没食子酸的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(1):16.
[10] 张宗和. 五倍子加工及应用[M]. 北京:中国林业出版社, 1991.
[11] Natalia B, Beatriz D A, Roberto R. Tara tannin a natural product with antifouling coating application[J]. Prog Org Coat, 2012, 74(3):411.
[12] Aguilar C N, Gutiérrez-Sánchez G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase [J]. Food Sci Technol Inter, 2001, 7(5):373.
[13] Lekha P K, Lonsane B K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface an submerged fermentations[J]. Pro Biochem, 1994, 29(6):497.
[14] Ruth B, Juan carlos C E, Raúl R H, et al. Microbial production of tannase:an enzyme with potential use in food industry [J]. Food Sci Technol, 2004, 37(8):857.
[15] Knudson L. Tannic acid fermentation[J]. J Biol Chem, 1986, 14(2):159.
[16] Doi S, Shinmyo A, Enatsu T. Growth associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae* [J]. J Ferment Technol, 1973, 51(11):768.
[17] Bradoo S, Gupta R, Saxena R K, et al. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus* [J]. Proc Biochem, 1997, 32(2):135.
[18] Van Diepeningen A D, Debets A J M, Varga J. Efficient degradation of tannic acid by black *Aspergillus* species[J]. Mycolog Res, 2004, 108(3):919.
[19] Bradoo S, Gupta R, Saxena R K, et al. Screening of extracellular tannase producing fungi; development of a rapid and simple plate assay[J]. J Gen Appl Microbiol, 1996, 42(4):325.
[20] Rakesh K, Ashwani K, Ravinder N, et al. A novel and sensitive plate assay for screening of tannase-producing bacteria[J]. Ann Microbiol, 2010, 60(1):177.

- [21] Purohit J S, Dutta J R, Nanda R K, et al. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*[J]. *Bioresource Technol*, 2006, 97(6):795.
- [22] 郭鲁宏, 杨顺楷. 黑曲霉单宁酶高活性菌株的诱变选育[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(2):105.
- [23] Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*[J]. *Gene*, 1996, 175(1/2):215.
- [24] Albertse E H. Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* species [D]. South Africa: University of the Free State Bloenfontein, 2002.
- [25] Cerda-Gómez A, Contreras-Esquivel J C, Reyes-Valdes H, et al. Molecular characterization of *Aspergillus* strains producers of tannase [C]. Coahuila; In Second International Congress on Food Science and Technology in Developing Countries, 2006.
- [26] Banerjee D, Mondal K C, Pati B R. Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation [J]. *Hungarian Acad Sci*, 2007, 54(2):159.
- [27] Murugan K, Al-sohaibani S A. Biocompatible removal of tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase (E. C. 3. 1. 1. 20) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTTC 9628 [J]. *Res J Microbiol*, 2010, 5(4):262.
- [28] Lu M J, Chu S C, Yan L, et al. Effect of tannase treatment on protein-tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion[J]. *Food Sci Technol*, 2009, 42(1):338.
- [29] Naidu R B, Saisubramanian N, Selyakumar D, et al. Partial purification of tannase from *Aspergillus foetidus* by aqueous two phase extraction and its characterization [J]. *Social Neurosci*, 2008, 2(1):201.
- [30] Chhokar V, Seema B V, Sallar R, et al. Purification and characterization of extracellular tannin acyl hydrolase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818 [J]. *Biotechnol Biopro Engineer*, 2010, 15(5):793.
- [31] Costa A M, Ribeiro W X, Kato E, et al. Production of tannase by *Aspergillus tamarii* in submerged cultures [J]. *Brazilian Arch Biol Technol*, 2008, 51(2):399.
- [32] Peterson R A, Bradner J R, Roberts T H, et al. Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 48(2):218.
- [33] Selwal M K. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization [J]. *Brazil J Microbiol*, 2011, 42(1):374.
- [34] Sariozlu N Y, Kivan M. Isolation of gallic acid-producing microorganisms and their use in the production of gallic acid from gall nuts and sumac [J]. *African J Biotechnol*, 2009, 8(6):1110.
- [35] Kasieczka-burnecka M, Kuc K, Kalinowska H, et al. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an antarctic strain *Verticillium* sp. P9 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(1):77.
- [36] Böer E, Bode R, Mock H P, et al. Atan1p-an extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adeninivorans*; molecular cloning of the ATAN1 gene and characterization of the recombinant enzyme [J]. *Yeast*, 2009, 26(6):323.
- [37] Shi B, He Q, Yao K, et al. Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis* [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80(10):1154.
- [38] Zhong X, Peng L, Zheng S. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris* [J]. *Pro Expr Purific*, 2004, 36(2):165.
- [39] Sharma K P, John P J. Purification and characterization of tannase and tannase gene from *Enterobacter* sp. [J]. *Process Biochem*, 2011, 46(1):240.
- [40] Kostinek M, Specht I, Edward V A, et al. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures [J]. *Inter J Food Microbiol*, 2007, 114(3):342.
- [41] Belur P D, Gopal M, Nirmala K R, et al. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(4):732.
- [42] Pepi M, Lampariello L R, Altieri R, et al. Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive mill waste mixtures [J]. *Inter Biodeterior Biodegrad*, 2010, 64(1):73.
- [43] Hadi T A, Banerjee R, Bhattacharyya B C. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae* [J]. *Biopro Biosys Engineer*, 1994, 11(6):239.
- [44] Pinto G, Bruno L, Hamacher M, et al. Increase of tannase production in solid state fermentation by

- Aspergillus niger* 3T5B8 [M]. Breckenridge: 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Poster Presentation, 2010.
- [45] 王挥, 张蕾, 黎继烈, 等. 响应面法优化黑曲霉发酵产单宁酶条件[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(10):122.
- [46] Libuchi S, Minoda Y, Yanaada K. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms part II; A new method determining the enzyme activity using the change of ultraviolet absorption [J]. Agr Biol Chem, 1967, 31(5):513.
- [47] 王征, 谢达平, 杨虹琦, 等. 单宁酶活力测定方法的研究[J]. 生物技术, 2000, 10(6):40.
- [48] Chantal B, Francoise R, Henri P. Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction [J]. Blotechnol Tech, 1994, 8(2):137.
- [49] Jean D, Pourrat H, Pourrat A, et al. Assay of tannase (tannin acyl hydrolase EC 3.1.1.20) by gas chromatography [J]. Anal Biochem, 1981, 110(2):369.
- [50] Aguilar C N, Augur C, Gustavo V G, et al. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity[J]. Bra Arch Biol Technol, 1999, 42(3):355.
- [51] Libuchi S, Minoda Y, Yanaada K. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms part III: purification of the enzyme and some properties of it [J]. Agr Biol Chem, 1967, 32(7):803.
- [52] 王蔚文. 高转化率生物法制没食子酸研究[J]. 林产化工通讯, 1996, 30(1):3.
- [53] Rajakumar G S, Nandy S C. Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46(2):525.
- [54] Aguilar C N, Favela-Torres E, Viniegra-González G, et al. Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20 [J]. App Biochem Biotechnol, 2002, 103(1/3):407.
- [55] Cruz-hernández M, Augur C, Rodríguez R, et al. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1 [J]. Food Technol Biotechnol, 2006, 4(2):541.
- [56] Aguilar C N, Augur C, Favela-Torres E, et al. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation; influence of glucose and tannic acid [J]. J Ind Microbiol Biot, 2001, 26(5):296.
- [57] Aguilar C N, Augur C, Favela-Torres E, et al. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures [J]. Process Biochemistry, 2001, 36(6):565.
- [58] Rana N K, Bhat T K. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van tieghem MTCC 2425 [J]. J Gen Appl Microbiol, 2005, 51(4):203.
- [59] Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya B C. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation [J]. J Ind Microbiol Biot, 1999, 23(3):173.
- [60] Van Lagemaat J, Pyle D L. Solid-state fermentation and bioremediation; development of a continuous process for the production of fungal tannase [J]. Chem Engin J, 2001, 84(2):115.
- [61] Schons P F, Lopes F R, Ballestin V, et al. Immobilization of *paecilomyces variotii* tannase and properties of the immobilized enzyme [J]. J Microencapsul, 2011, 28(3):211.
- [62] Abdel-Naby M A, Sherif, A A, El-Tanash A B, et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme [J]. J Appl Microbiol, 1999, 87(1):108.
- [63] 郭鲁宏, 杨顺楷. 利用固定化黑曲霉单宁酶制备没食子酸的研究 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(5):614.
- [64] Hota S K, Dutta J R, Banerjee R. Immobilization of tannase from *Rhizopus oryzae* and its efficiency to produce gallic acid from tannin rich agro-residues [J]. Indian J Biotech, 2007, 6(2):200.
- [65] Belur P D, Goud R, Goudar D C. Optimization of culture medium for novel cell-associated tannase production from *Bacillus massiliensis* using response surface methodology [J]. J Microbiol Biotechnol, 2012, 22(2):199.

[责任编辑 邹晓翠]