

原创研究型文章

基于高压液相色谱法通过检测没食子酸测定奇异链霉菌 TBGS10 的单宁酰基水解酶活性

Shiburaj Sugathan^{1*}, Soumya Koippully Manikandan², Sajna Salim³, Sabu Abdulhameed⁴¹ Department of Botany, University of Kerala, Karyavattom Campus, Thiruvananthapuram, Kerala 695581, India² Division of Microbiology, Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute, Palode, Thiruvananthapuram, Kerala 695562, India³ Department of Biotechnology, University of Kerala, Karyavattom Campus, Thiruvananthapuram, Kerala 695581, India⁴ Department of Biotechnology and Microbiology, School of Life Sciences, Kannur University, Dr. E K Janaki Ammal Campus, Thalassery, Kannur, Kerala 670661, India

* 通讯作者: Shiburaj Sugathan, drshiburaj@keralauniversity.ac.in

摘要: 单宁酶是一种水解酶, 被称为单宁酰基水解酶, 可作用于可水解单宁的酯键并产生没食子酸。单宁酶有多种来源。来自微生物, 特别是曲霉属真菌的单宁酶已被用于食品、酿造和制药行业。尽管众所周知放线菌能产生多种工业酶, 但放线菌的单宁酰基水解酶活性鲜有报道。这篇文章论述了从喀拉拉邦西高止山脉慕那尔的娑罗森林中分离出的链霉菌的单宁酰基水解酶活性。根据形态特征和 16s rDNA 同源性分析, 该分离物被鉴定为奇异链霉菌 TBGS10。该分离物在平板试验、深层和固态发酵条件下均表现出良好的单宁酶活性。高压液相色谱法测定了以腰果苹果渣为基质通过固态发酵产生的具有重要工业价值的中间产物没食子酸。提取物观察到没食子酸 (gallic acid, GA) 含量为 142.624 g/mL, 保留时间为 2.506 min。利用根据 NCBI-GenBank 中类似链霉菌序列设计的特异引物, 对菌株 TBGS10 的单宁酶基因进行了 PCR 扩增。

关键词: 奇异链霉菌; 单宁酶; 高效液相色谱法; 没食子酸生产; 固态发酵

1. 引言

单宁酰基水解酶, 通常称为单宁酶 (Tannin acyl hydrolase, TAH, EC.3.1.1.20), 是一种常用于降解单宁的生物催化剂^[1]。这些多功能酶广泛应用于食品工业、化妆品、制药、制革、动物饲料和环境污染控制^[2]。单宁酶广泛用于速溶茶、果汁、啤酒和椰子酒的生产中^[3]。单宁酸是许多植物和食品 (如茶叶、水果、坚果等) 中天然存在的多酚化合物。这种酶催化复合单宁、没食子丹宁、鞣花酸和没食子酸酯中的酯键和缩酚键的水解, 该反应释放没食子酸和葡萄糖作为副产物。没食子酸具有广泛的应用, 例如可用作摄影和印刷油墨中的显影剂、商业化生产抗微生物药物甲氧苄啶的前体分子以及食品防腐剂。此外, 没食子酸具有广泛的生物活性, 如抗氧化、抗菌、抗病毒、镇痛等^[4]。单宁酶的巨大生物催化潜力主要用于生产没食子酸, 其工业需求量估计为每年 8000 t^[5]。

单宁酶广泛应用于食品工业, 用于生产速溶茶以及改善果汁、啤酒和葡萄酒等饮料的口味和外观。通过施用单宁酶可以减少果汁的苦味和浑浊的形成。用这种酶对饲料进行脱鞣可以提高动物饲料的质量。最近, 乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 已被用来利用富含多酚化合物的农业废物作为深层发酵中的营养物和能量来源来生产单宁酶^[6]。利用这些生物资源生产单宁酶在食品工业中具有潜

在的应用价值^[7]。为了通过发酵经济高效地生产单宁酶，基质是最重要的考虑因素。腰果苹果渣是热带地区最普遍的农业废物之一，可用作单宁酶生产的廉价基质。

单宁酶主要由微生物通过固态发酵 (solid-state fermentation, SSF) 或深层发酵 (submerged fermentation, SmF) 产生。固态发酵比深层发酵成本低、产量高、酶活性高、操作简便、耗水量低，因此更受青睐^[8]。低价值的农用工业废料被广泛用作单宁酶生产的基质。由于下游工艺简单，酶产量稳定，微生物比其他来源更多地被用于单宁酶的工业生产^[9]。单宁酶是一种重要的酶，但由于对生产培养基、基质利用和下游加工缺乏足够的了解，尚未对其进行太多探索。识别潜在的产生单宁酶的微生物和具有成本效益的基质将降低市场上酶的成本。在所有其他微生物中，真菌是这种酶最主要的生产者，尤其是曲霉属和青霉属^[10]。除真菌外，许多细菌种类也被报道能产生这种酶，但产生单宁酶的放线菌却鲜有报道。本研究强调从印度喀拉拉邦慕那尔的娑罗森林中分离出的产生单宁酶的链霉菌。

2. 材料和方法

2.1. 单宁酶产生的筛选

土壤样本采集自印度喀拉拉邦慕那尔的娑罗森林的不同地点。通过系列稀释和使用 ISP2 培养基的展板法，从土壤样本中分离出放线菌。在含有 1% 单宁酸作为基质的淀粉酪蛋白琼脂 (starch casein agar, SCA) 培养基上，对分离出的培养物进行单宁酰水解酶活性筛选。培养物在 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 天^[11]。使用在含 1% 单宁酸的淀粉酪蛋白琼脂培养基上培养五天的孢子悬浮液 (1×10^8 个 spores/mL) 制备诱导接种物，并接种到 200 mL 含 1% 单宁酸的淀粉酪蛋白肉汤 (starch casein broth, SCB) 中，以评估深层分批发酵下单宁酶的产量。烧瓶在 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养七天，并以 120 rpm 的转速持续搅拌。每隔 24 h 取样 1 mL，在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 10,000 rpm 离心 15 min，获得无细胞上清液。使用罗丹明分光光度法测定细胞外单宁酶活性^[12]。

2.2. 菌株的鉴定

根据细胞形态、孢子方向、培养特征、生化分析和 16S rDNA 同源分析，对分离出的菌株 TBGS10 进行了鉴定。菌落特征和碳水化合物利用在 ISP 培养基上进行：ISP1、ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6、YEME、燕麦琼脂和蛋白胨-酵母-铁琼脂^[13]。使用扫描电子显微镜分析菌株的孢子方向。图像由 Carl Zeiss EVO 18 扫描电子显微镜记录，放大 4600 倍，加速电压为 5 kV。使用倾斜盖玻片培养法^[14]检查孢子链形态，并在倒置相衬显微镜 (Nikon Optophot) 下观察。使用通用引物 8-27F 和 1495R 扩增 16S rDNA 基因，以基因组 DNA 为模板进行分子鉴定。使用 Murray 和 Thomson 于 1980 年描述的苯酚-氯仿方法提取基因组 DNA^[15]。扩增的基因经过纯化和测序。利用 BLAST 搜索程序在 NCBI 中搜索序列相似性。最大似然法根据泊松校正距离模型^[16]，使用 MEGA6 软件^[17]分析系统发生关系。系统发生树中特定支系的可靠性是通过 1000 次重复的引导分析确定的。

2.3. 单宁酶基因的扩增

从 NCBI 数据库中检索链霉菌属的单宁酶基因序列；从保守区域挑选特异引物，并通过外包给 Integrated DNA Technologies 公司 (IDT, 加拿大) 来合成。设计了四种引物用于扩增单宁酶基因 (表 1)。PCR 使用 Bio-Rad 热循环仪 (S 1000™) 按以下方案进行： $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环： $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 90 s, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延长 10 min。扩增产物在 1% EtBr-琼脂糖凝胶中分离。按照生产商的说明，使用 Nucleospin PCR 清理试剂盒 (Macherey-Nagel, 德国) 对 PCR 产物进行纯化，并在 ABI

Prism DNA 分析仪上按照 Sanger 测序协议使用相同的 PCR 引物进行测序。核苷酸序列使用 ExPASy 翻译工具 (<https://web.expasy.org/translate/>) 进行翻译。系统发生关系分析如前所述。

表 1. 用引物 primer 3 软件设计的正向和反向引物清单。

Table 1. List of forward and reverse primers designed with primer 3 software.

Primer	Sequence
STANF1	5'-ACACCTCCTTCTTCGATGGG-3'
STANR1	5'-GTAAGTGCACAGGTCGCG-3'
STANF2	5'-ATGGGAAAGCAATGAGACGG-3'
STANR2	5'-CGGCTGTAGGTGATCTTCGA-3'
STANF3	5'-GGAAAGCAATGAGACGGCCT-3'
STANR3	5'-CTGGGTGGGATGTACTGG-3'

2.4. 腰果苹果渣固态发酵生产单宁酶

将 5 g 干燥的腰果苹果渣粉末放入 250 mL 的锥形烧瓶中, 用矿物盐溶液 (0.5% w/v NH_4Cl 、0.1% w/v $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1% w/v NaNO_3) 浸润, 初始 pH 值为 5。烧瓶经 121 °C 高压灭菌器灭菌 20 min 后冷却至室温。将 *奇异链霉菌* TBGS10 的种子接种物 (1×10^7 spores/mL 的孢子悬浮液) 加入基质中, 在 30 °C 下培养 5 天。

2.5. 使用高压液相色谱法检测单宁酶

通过 HPLC 分析了 *奇异链霉菌* TBGS10 从腰果苹果渣中生产没食子酸的效率。用于 HPLC 分析的样品是按照 El Sohafy 等^[18]的方法制备的。将发酵后的腰果苹果渣过滤以分离菌丝, 煮沸 5 min, 然后用 5 mL 25% 的盐酸在水浴中处理 25 min。混合物用正丁醇萃取, 减压干燥, 溶于甲醇^[18]。用甲醇配制没食子酸 (Sigma) 标准溶液, 浓度为 1 mg/mL^[19]。使用 HPLC (岛津, 日本) 和 UV/VIS 检测器 (Prominace SPD M20 A 二极管阵列检测器) 对没食子酸进行定量。数据采集和仪器控制使用岛津实验室解决方案 5.73 版。化合物在岛津 C-18 通用色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 上分离。流动相为 70:30 水和 1 mL/min (Spectrochem, 印度, HPLC 级)。流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μL 。泵由 LC 6 AD 系统接口 (CBM-20A) 和高压可调体积动态混合器组成。分析在室温 (25 °C) 下进行, 化合物的检测波长为 280 nm。分析样品在进样前分别用 0.22 μm 过滤器 (密理博) 过滤。在与标准没食子酸 (Sigma-Aldrich) 相同的保留时间内, 测量样品的峰面积。

3. 结果

3.1. 粗单宁酶产生的筛选

在 ISP2 培养基上, 采用展板法从土壤样本中分离出 105 个放线菌。在对单宁酶进行筛选时, 在含有 1% 单宁酸的淀粉酪蛋白琼脂平板上, 分离菌 TBGS10 的菌落周围形成了一个清晰的区域, 表明由于水解单宁酸而产生了阳性单宁酶 (图 1)。培养时间对细胞外单宁酶的产生起着至关重要的作用。单宁酶产生的时间历程观察表明, 菌株 TBGS10 在培养 48 h 时单宁酶产生量最大 (7.26 U/mL) (图 2)。在细菌的对数生长阶段, 酶的产量最大。



图 1. SCA 板显示菌落周围的水解区域。

Figure 1. SCA plate showing the zone of hydrolysis around the colony.

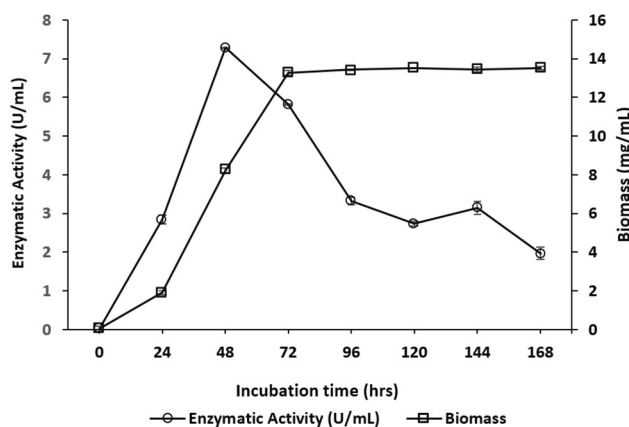


图 2. TBGS10 分离株在深层分批发酵下产生胞外单宁酶。

Figure 2. Extracellular tannase production by the isolate TBGS10 under submerged batch fermentation.

烧瓶在 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养七天，并以 120 rpm 的转速不断搅拌，每隔 24 h 抽取 1 mL 样品，测定单宁酶活性。

3.2. 放线菌分离株的鉴定

根据显微形态观察表明，该菌株为革兰氏阳性、含芽孢的放线菌。TBGS10 菌株的形态和生化特征见表 2。在倒置相差显微镜 (Nikon Optiphot) 下使用倾斜盖玻片培养法观察孢子链形态，如图 3(A) 所示。扫描电子显微镜下的孢子链呈螺旋状，一条链上有 20 多个孢子，孢子表面光滑 (图 3(B))。在大多数 ISP 培养基中，气团颜色呈灰褐色至灰褐色 (图 3(C))，反面菌落颜色呈灰黄色，而在燕麦琼脂中，菌落呈深褐色。该分离菌在蛋白胨-酵母-铁琼脂中产生黑色素。该分离菌利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、中肌醇、D-甘露糖醇和蔗糖等碳水化合物，但只在纤维素、L-鼠李糖和 D-木糖中观察到微量生长。该分离物在蛋白胨-酵母-铁琼脂中产生黑色素。16s rDNA 测序结果为 1417 bp 的核苷酸，已存入核酸数据库 (登录号: OK445685.1)。BLAST 相似性检索显示，该菌株与不同的 *奇异链霉菌* 株的同源性为 99.15% 至 99.88%。图 4 是利用 MEGA6 软件的 Tamura-Nei 模型和最大似然法构建的系统发育树。根据多相法，该分离物被鉴定为 *奇异变形链霉菌*。

表 2. 分离株 TBGS10 的形态和生化特性。

Table 2. The morphological and biochemical characters of isolate TBGS10.

Morphological characters	
Colonies	Grey rough colonies
Aerial mass color	Greyish-to-greyish brown
Reverse colony color	Greyish-yellow
Melanin pigments	Positive
Spore chain	Spirals with more than 20 spores
Spore surface morphology	Smooth
Biochemical characters	
Gram staining	Gram-positive
Carbohydrate utilization	
D-glucose	+++
L-arabinose	+++
D-fructose	++
Meso-inositol	+++
D-mannitol	+++
Sucrose	+++
Cellulose	+
L-rhamnose	+
D-xylose	+

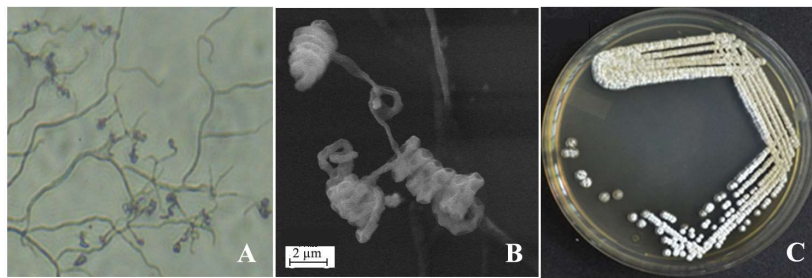


图 3. 照片显示了奇异链霉菌 TBGS10 的微观和培养特征。(A)显示奇异链霉菌 TBGS10 孢子链形态的显微照片；(B)扫描电子显微镜显示孢子表面形态；(C)在 ISP 培养基上生长 (7 天)。

Figure 3. The photographs show the microscopic and cultural characteristics of *Streptomyces mirabilis* TBGS10. (A) Microphotograph showing spore chain morphology of *S. mirabilis* TBGS10; (B) Scanning Electron Microscopy showing Spore surface morphology; and (C) Growth (7 days) on ISP medium.

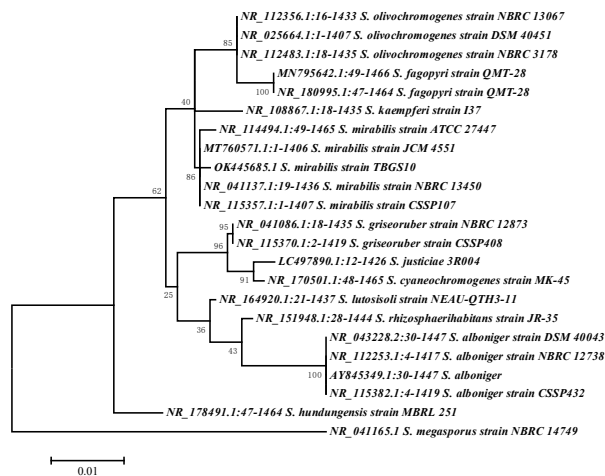


图 4. 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树，显示分离物 TBGS10 的关系 (构建于 2023 年 8 月 30 日)。

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing relationships of isolate TBGS10 (constructed on 30 August 2023).

进化历史是 Tamura-Nei 模型的最大似然法推断的^[20]。图中显示的是具有最高对数似然 (-3049.3097) 的树。分支旁显示了相关类群聚类的树的百分比。启发式搜索的初始树是通过将 Neighbor-Join 和 BioNJ 算法应用于使用最大复合似然法 (Maximum Composite Likelihood, MCL) 估算的成对距离矩阵, 并选择具有较高对数似然值的拓扑结构而自动获得的。该树是按比例绘制的, 分支长度以每个位点的取代数来衡量。分析涉及 23 个核苷酸序列。该树以 *巨孢子虫菌株* NBRC 14749 (NR_041165.1) 为根。所有含有空白和缺失数据的位置都被剔除。最终数据集中共有 1392 个位置。进化分析在 MEGA6 中进行^[17]。

3.3. 单宁酶基因的扩增和鉴定

引物 STANF1 5'-ATGAGACGACTTCTGACTGTCCT-3'和 STANR1 5'-TCAGTGCCGGGACGGG-3'在 PCR 反应中的扩增效果较好, 并进行了测序。对得到的核苷酸序列 (1404 bp) 进行了翻译 (图 5), 并进行了同源性检索。*奇异链霉菌* TBGS10 单宁酶与 *奇异变形链霉菌* 菌株 NBC_01472 的单宁酶/阿魏酰酯酶家族 α/β 水解酶 (核酸数据库: MCX4615223.1) 和 *链霉菌* S1D4-20 的单宁酶/阿魏酰酯酶家族 α/β 水解酶 (核酸数据库: QDN54811.1) 具有高度相似性 (99.78%)。在用最大似然法构建的系统发育树中, 这些单宁酶也与 *奇异链霉菌* TBGS10 聚类 (图 6)。

```
>S. mirabilis TBGS10 Tannase
MRRPLTVLAAGVPLAAAVYLPASAEPENGSSASASFACSAWSVKAPAGTEVESVTAVRQAGGTIIGTALGGS
VSGVPAYCEVTVTLTHPGDDHAEVRTWLPVSGWNGRFQAIGGAAAYLAGDNGVGLGTAVKNGYAAVSTDAGVG
DALDSTDWALNSNGQVNTALLKNFASRSQHEAAVVGKEVVDGVYGKRPAYSYFNGCSTGGRQGYMEAQRYPDDY
DGILANAPAVNWDEFEVATLWPQVVMNNEKTYPSKCEFDAFTNAAVKACDSLGDGKDLVNDLSRCDFFDPRTL
IGTKVVDGKELTITAADAAVRKIWDGPRRTASGKLLWSGVPVADLSALAGLTPDADGNVAGAFPVPAAW
VKLWVAKDPSLDISKITYSRFTQLFKQSQAEDYDKVIGTDDPDLSGFRRSGGKLLTWHGLADQYIPTQGTVQYR
ERVEREMGGAKRVDDFYRLFL
```

图 5. *奇异链霉菌* TBGS10 单宁酶的氨基酸翻译序列。

Figure 5. Translated amino-acid sequences of *Streptomyces mirabilis* TBGS10 tannase.

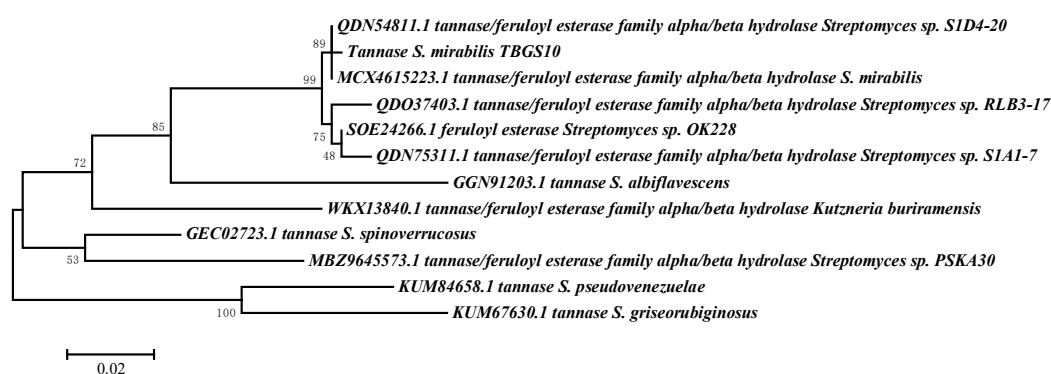


图 6. 显示与 *奇异链霉菌* TBGS10 相似的不同单宁酶氨基酸序列的最大似然树 (构建于 2023 年 8 月 30 日)。

Figure 6. Maximum likelihood tree showing phylogenetic amino acid sequences of different tannases similar to *S. mirabilis* TBGS10 (constructed on 30 August 2023).

采用基于泊松校正模型的最大似然法推断了进化历史^[16]。图中显示的是具有最高对数似然 (-2690.2172) 的树。分支旁显示了相关类群聚类的树的百分比。启发式搜索的初始树是通过将 Neighbor-Join 和 BioNJ 算法应用于使用 JTT 模型估算的成对距离矩阵, 然后选择对数似然值较高的拓扑结构自动获得的。该树是按比例绘制的, 分支长度以每个位点的取代数来衡量。分析涉及 12 个氨基酸序列。所有含有空白和缺失数据的位置都被剔除。最终数据集中共有 447 个位置。进化分析在 MEGA6 中进行^[17]。

3.4. 使用高压液相色谱法检测单宁酶

高压液相色谱分析显示, 在所述条件下分离效果良好, 在标准没食子酸中观察到了清晰的峰值。对发酵腰果苹果渣的乙醇提取物进行了分析, 并与标准品进行了比较。结果发现, 提取物中的没食子酸含量为 142.624 $\mu\text{g/mL}$ (保留时间为 2.506 min), 而标准品的含量为 1000 $\mu\text{g/mL}$ (保留时间为 2.506 min)。GA 的色谱图见图 7。结果证实了 *奇异链霉菌* TBGS10 培养物从干腰果苹果渣中生产没食子酸的效率。

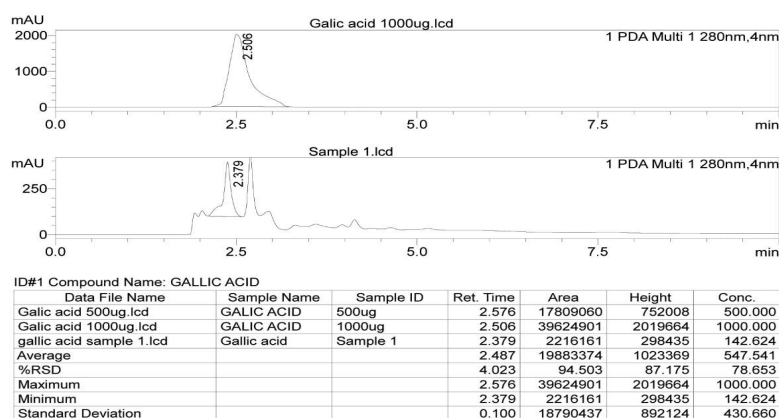


图 7. 发酵腰果苹果渣的标准没食子酸和乙醇提取物的 HPLC 分析。

Figure 7. HPLC analysis of standard gallic acid and ethanol extracts of fermented cashew apple bagasse.

4. 讨论

单宁酸是植物合成的多酚类次级代谢产物, 在植物生长调节和抵御昆虫、微生物和螨虫攻击方面发挥着重要作用^[21]。相反, 单宁酶会沉淀土壤中的酶, 从而延迟土壤腐殖质的形成^[22]。它还是一种抗营养因子, 会降低动物食物的消化率^[23]。单宁酶是属于酯酶家族的一种酶, 可催化水解单宁的没食子酰酯键, 并产生没食子酸这一重要副产品。没食子酸在食品中被广泛用于合成食品防腐剂, 在制药业中被广泛用于合成抗菌药物^[24]。

微生物是单宁酶最重要的来源, 因为它们能持续产生稳定的酶。青霉^[25]和曲霉^[26]等真菌被证明是单宁酶的潜在来源。在过去的几年里, 大多数具有单宁酶活性的微生物筛选计划主要局限于真菌。寻找新的、不同的单宁酶降解微生物的工作日益增多。放线菌是众所周知的酶生产源。最近, 从放线菌中获得高产有商业价值的单宁酶的可能性引起了研究人员的注意; 然而, 这方面的研究报道很少。在本研究中, 从慕那尔的娑罗森林中分离出的 *奇异链霉菌* TBGS10 是单宁酶的有效来源。在指数生长阶段产生最多的酶是非常有利的。内生 *链霉菌* AL1L 的单宁酶产量在培养 48 h 时为 6.96 U/mL^[21], 与我们的结果几乎相似。而 *链霉菌* 属 SKA1 在培养第 5 天可产生 8.50 U/mL 单宁酶^[9], *链霉菌* 属 AT13 在使用统计实验设计的优化条件下, 培养第 5 天可产生 18.12 U/mL 单宁酶^[27]。单宁酶是一种可诱导的酶; 单宁酶的特性会因分离来源、物种和生产基质的不同而不同。翻译后修饰仅限于细菌单宁酶, 但真菌和酵母也会发生糖基化。微生物产生的单宁酶的特性因培养环境和糖基化模式而异^[28]。

农工部门的废品可用作各种药用和工业用酶的生物合成介质^[29]。选择合适的生物质来生产单宁酶至关重要。在喀拉拉邦, 腰果农用工业在当地经济中发挥着重要作用。大部分腰果苹果会在地里变质, 或者饮料行业会丢弃 40% (重量比) 的腰果苹果渣作为最终产品^[30], 这是一种廉价的固态发

醇基质来源。选定的农业废弃物可添加或不添加各种矿物质源,用于酶的生产。在不添加矿物质的实验中,酶的产量微乎其微。添加矿物质可增加固体培养基的含水量,这对控制酶的产生也至关重要。离子和辅助因子对单宁酶活性的影响已有报道。Kar 等在 2003 年指出了二价金属离子可增强**根瘤菌单宁酶**活性的情况^[31]。

没食子酸是单宁酶水解单宁酸产生的一种重要工业中间体^[32]。以前曾有报道称, *曲霉菌*属可将单宁酸水解为没食子酸^[33]。其他细菌,如**肺炎克雷伯氏菌**和**棒状杆菌**属本研究采用选择性和间接方法—HPLC—测定了固态发酵产生的单宁酸酶^[34]。将单宁酸作为基质注入 HPLC^[35],发现其中含有 142.624 $\mu\text{g/mL}$ 的 GA。从单宁酸中水解出的 GA 必须等于与单宁酶活性相对应的 GA。

奇异链霉菌 TBGS10 的单宁酶基因与其他**链霉菌**株的单宁酶/阿魏酰酯酶家族 $\alpha\beta$ 水解酶有相似之处。关于**链霉菌单宁酶**基因的基因组数据很少见报道,也没有人关注过。单宁酶基因的分子分析为单宁酶的分子克隆和大规模生产开辟了道路。它有助于指导单宁酶的应用,并可作为基因修饰的基础理论。

5. 结论

本研究表明**奇异链霉菌** TBGS10 是单宁酶的有效来源。在最佳培养条件下,该菌株大量产生酶。通过测量中间产物没食子酸来测定单宁酶是一种简单而有效的方法。利用现有技术纯化单宁酶是繁琐且耗能的;因此,这种酶尚未得到充分开发。腰果苹果渣是通过固态发酵生产单宁酶的合适且廉价的基质。

作者贡献

概念化, SS (Shiburaj Sugathan) 和 SA; 方法学, SS (Shiburaj Sugathan); 软件, SKM; 验证, SS (Shiburaj Sugathan)、SKM 和 SS (Sajna Salim); 形式分析, SKM; 调查, SS (Shiburaj Sugathan) 和 SKM; 资源, SS (Shiburaj Sugathan); 数据整理, SKM; 写作—原稿准备, SS (Sajna Salim); 写作—审阅和编辑, SS (Shiburaj Sugathan); 可视化, SS (Shiburaj Sugathan); 监督, SS (Shiburaj Sugathan); 项目管理, SS (Shiburaj Sugathan); 经费获取, SS (Shiburaj Sugathan) 和 SA。所有作者均已阅读并同意手稿的出版版本。

致谢

感谢印度政府生物技术部 (Department of Biotechnology, DBT) 的资金支持 (编号 BT/PR26709/AAQ/3/889/2017, 日期为 2018 年 3 月 22 日)。

利益冲突

作者申明,没有任何已知的经济或人际冲突,且不会对本研究报告中的研究产生影响。

参考文献

1. Chávez-González M, Rodríguez-Durán LV, Balagurusamy N. Biotechnological advances and challenges of tannase: An overview. *Food Bioprocess Technology* 2012; 5(2): 445–459. doi: 10.1007/s11947-011-0608-5
2. Wu C, Zhang F, Li L, et al. Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2018; 11: 92. doi: 10.1186/s13068-018-1093-0
3. Jana A, Halder SK, Ghosh K, et al. Tannase immobilization by chitin-alginate based adsorption entrapment technique and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Bioprocess Technology* 2015; 8: 2319–2329. doi: 10.1007/s11947-015-1586-9

4. Beniwal V, Kumar A, Sharma J, Chhokar V. Recent advances in industrial application of tannases: A review. *Recent Patents on Biotechnology* 2013; 7(3): 228–233. doi: 10.2174/18722083113076660013
5. Dhiman S, Mukherjee G, Singh AK. Recent trends and advancements in microbial tannase-catalyzed biotransformation of tannins: A review. *International Microbiology* 2018; 21(4): 175–195. doi: 10.1007/s10123-018-0027-9
6. Farha AK, Yang QQ, Kim G, et al. Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience* 2020; 38: 100751. doi: 10.1016/j.fbio.2020.100751
7. García Méndez MG, Morales Martínez TK, Ascacio Valdés JA, et al. Application of lactic acid bacteria in fermentation processes to obtain tannases using agro-industrial wastes. *Fermentation* 2021; 7(2): 48. doi: 10.3390/fermentation7020048
8. Barrios-González J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry* 2012; 47(2): 175–185. doi: 10.1016/j.procbio.2011.11.016
9. Aharwar A, Parihar DK. Tannases: Production, properties, applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2018; 15: 322–334. doi: 10.1016/j.bcab.2018.07.005
10. Nishitani Y, Osawa R. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 2003; 54(2): 281–284. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00063-0
11. Girdhari SN, Peshwe SA. Screening of agro-residues for the production of microbial tannase. *International Journal of Advanced Research* 2017; 5: 625–631. doi: 10.21474/IJAR01/2790
12. Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry* 2000; 279(1): 85–89. doi: 10.1006/abio.1999.4405
13. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1966; 16(3): 313–340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313
14. Chakrabarti T. *Detection of Polyene Class of Antifungal Antibiotics. Actinomycetes-Isolation, Screening, Identification and Gene Cloning in Streptomyces. Laboratory Manual.* Institute of Microbial Technology (IMTECH); 1998.
15. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 1980; 8(19): 4321–4326. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
16. Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ (editors). *Evolving Genes and Proteins.* Academic Press; 1965. pp. 97–166.
17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30(12): 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
18. El Sohafy SM, Metwalli AM, Harraz FM, Omar AA. Quantification of flavonoids of *Psidium guajava* L. preparations by Planar Chromatography (HPTLC). *Pharmacognosy Magazine* 2009; 4(17): 61–66.
19. Samee W, Vorarat S. Simultaneous determination of gallic acid, catechin, rutin, ellagic acid, and quercetin in flower extracts of *Michelia alba*, *Caesalpinia pulcherrima*, and *Nelumbo nucifera* by HPLC. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal* 2007; 2: 131–137.
20. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10(3): 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
21. Roy S, Parvin R, Ghosh S, et al. Occurrence of a novel tannase (*tan B_{LP}*) in endophytic *Streptomyces* sp. AL1L from the leaf of *Ailanthus excelsa* Roxb. *3 Biotech* 2018; 8: 33. doi: 10.1007/s13205-017-1055-4
22. Mueller-Harvey I, Parkes RJ. Measurement of volatile fatty acids in pore water from marine sediments by HPLC. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 1987; 25(5): 567–579. doi: 10.1016/0272-7714(87)90115-6
23. Kumar SS, Sreekumar R, Sabu A. Tannase and its applications in food processing. In: Parameswaran B, Varjani S, Raveendran S (editors). *Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability.* Springer; 2019. pp. 357–381. doi: 10.1007/978-981-13-3263-0_19
24. Sharma S, Gupta MN. Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Tiegham in nonaqueous media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13(3): 395–397. doi: 10.1016/S0960-894X(02)00977-0
25. de Lima JS, Cruz R, Fonseca JC, et al. Production, characterization of tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). *The Scientific World Journal* 2014; 2014: 182025. doi: 10.1155/2014/182025
26. Neethu RS, Pradeep NS. Isolation and characterization of potential tannase-producing fungi from mangroves and tanneries. *Indian Journal of Applied Microbiology* 2018; 21(3): 1–13.
27. Tripathi AD, Lakshmi B. Statistical optimization of extracellular tannase production by *Streptomyces* sp. AT 13 using response surface methodology and Plackett-Burman design. *Bioscience Biotechnology Research Communications* 2018; 11(4): 691–698. doi: 10.21786/bbrc/11.4/21

28. Böer E, Bode R, Mock HP, et al. Atan1p—An extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: Molecular cloning of the *ATAN1* gene and characterization of the recombinant enzyme. *Yeast* 2009; 26(6): 323–337. doi: 10.1002/yea.1669
29. Lekshmi R, Nisha SA, Vasani PT, Kaleeswaran B. A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference to its potential environmental and industrial applications. *Environmental Research* 2021; 201: 111625. doi: 10.1016/j.envres.2021.111625
30. Podrigues THS, Dantas MAA, Pinto GAS, Gonçalves LRB. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. In: Mielenz JR, Klasson KT, Adney WS, McMillan JD (editors). *Applied Biochemistry and Biotechnology. ABAB Symposium*. Humana Press; 2007. pp. 675–688. doi: 10.1007/978-1-60327-181-3_55
31. Kar B, Banerjee R, Bhattacharyya BC. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. *Process Biochemistry* 2003; 38(9): 1285–1293. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00329-1
32. Pinto GAS, Leite SGF, Terzi SC, Couri S. Selection of tannase-producing *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 2001; 32: 24–26. doi: 10.1590/S1517-83822001000100006
33. Seth M, Chand S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori*—Optimisation of process parameters. *Process Biochemistry* 2000; 36(1–2): 39–44. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00179-5
34. Deschamps AM, Lebeault JM. Production of gallic acid from tara tannin by bacterial strains. *Biotechnology Letters* 1984; 6: 237–242. doi: 10.1007/BF00140043
35. Nalan Yılmaz S, Erdoğan Ç, Merih K, Muzaffer T. A method for the determination of tannase activity based on gallic acid measurement by high-performance liquid chromatography (HPLC). *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5(2): 158–163. doi: 10.5897/AJMR10.548

Original Research Article

Determination of tannin acyl hydrolase activity of *Streptomyces mirabilis* TBGS10 by measuring gallic acid using high-pressure liquid chromatography

Shiburaj Sugathan^{1,*}, Soumya Koippully Manikandan², Sajna Salim³, Sabu Abdulhameed⁴

¹ *Department of Botany, University of Kerala, Karyavattom Campus, Thiruvananthapuram, Kerala 695581, India*

² *Division of Microbiology, Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute, Palode, Thiruvananthapuram, Kerala 695562, India*

³ *Department of Biotechnology, University of Kerala, Karyavattom Campus, Thiruvananthapuram, Kerala 695581, India*

⁴ *Department of Biotechnology and Microbiology, School of Life Sciences, Kannur University, Dr. E K Janaki Ammal Campus, Thalassery, Kannur, Kerala 670661, India*

*** Corresponding author:** Shiburaj Sugathan, drshiburaj@keralauniversity.ac.in
