DOI:10.12441/spyswjs.20240126002 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0031-08

植物乳杆菌单宁酶的定向进化及应用

马志远[1] 江正强[2,3] 李延啸[1] 吕 昂[2,3] 闫巧娟[1*]

(1. 中国农业大学工学院,北京 100083; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京 100083; 3. 中原食品实验室,河南 漯河 462300)

摘要:通过对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum)*单宁酶(Lptan1)的定向进化可提高其热稳定性和比酶活,进一步研究正向突变体(mLptan1)对绿茶茶汤中酯类儿茶素的降解效果。通过易错PCR构建Lptan1的突变文库,采用高通量筛选耐热性和比酶活提高的突变体并在大肠杆菌中表达,评价其在水解绿茶中酯类儿茶素方面的应用。筛选得到一个mLptan1,其最适反应温度(45 ℃)比Lptan1(40 ℃)提高了5 ℃。比酶活(425.6 U/mg)是Lptan1(312.3 U/mg)的1.36倍。将mLptan1应用于绿茶茶汤,在加酶量1 U/mL和最适反应温度下水解120 min,茶汤中酯类儿茶素降解率达85%,而Lptan1降解率仅为65%。结果表明,定向进化明显提高了Lptan1的最适反应温度和茶汤中酯类儿茶素的降解率,在茶类饮料中具有很好的应用前景。

关键词:植物乳杆菌;单宁酶;定向进化;酯类儿茶素

Directed Evolution and Application of the Tannase from *Lactobacillus plantarum*

MA Zhiyuan[1] *JIANG Zhengqiang*[2,3] *LI Yanxiao*[1] *LYU Ang*[2,3] *YAN Qiaojuan*[1*]

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China)

Abstract: To study the effect of positive mutant on the degradation of ester catechins in green tea, the thermal stability and specific enzyme activity of *Lactobacillus plantarum* tannase (Lptan1) were improved through directed evolution.. A mutant library of Lptan1 was constructed by error-prone PCR, and the mutants with enhanced thermostability and specific enzyme activity were screened and expressed in *Escherichia coli*. The application of these mutants in hydrolyzing ester catechins in green tea was further evaluated. A positive mutant (mLptan1) was selected with an optimal temperature (45 ℃) that was 5 ℃ higher than that of Lptan1 (40 ℃). Its specific enzyme activity (425.6 U/mg) was 1.36 times higher than that of Lptan1 (312.3 U/mg). When mLptan1 was applied to degrade green tea soup, the degradation rate of ester catechins reached 85% after hydrolysis at 1 U/mL and the optimal reaction temperature for 120 min, while the degradation rate of Lptan1 was only 65%. Directed evolution significantly improved both the optimal temperature of Lptan1 and the degradation rate of ester catechins in tea soup, which has a good application prospect in tea beverages.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; tannase; directed evolution; ester catechins

单宁是一类多酚化合物的总称,存在于多种植物中,主要分为两类,即缩合单宁和可水解单宁[1]。单宁酶(EC 3.1.1.20)是目前已知唯一能够水解单宁的酶。通过催化没食子酸酯、表没食子

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2103004)。

通信作者:闫巧娟(1971—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:yanqj@cau.edu.cn

收稿日期:2024-01-26 **修回日期:**2024-02-15

儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin gallate，EGCG）、表儿茶素没食子酸酯（epicatechin gallate，ECG）中酯键的水解，释放没食子酸（GA）和葡萄糖[2]。单宁酶属于酯酶超家族，广泛应用于茶叶加工中[3]，茶汤中的涩味是由酯类儿茶素引起的，单宁酶通过水解酯类儿茶素生成非酯类儿茶素与GA，可有效去除茶汤的涩味。李梦迪等[4]利用黑曲霉单宁酶处理茶汤，降低了茶汤中酯类儿茶素含量。Liu等[5]在绿茶中添加菲尼克斯曲霉单宁酶，将绿茶茶汤抗氧化能力提高了85%。

目前，主要通过微生物液态深层发酵和固体发酵两种方法生产单宁酶[6]。随着基因工程技术的发展，将单宁酶的基因克隆并构建表达质粒，通过在宿主中表达来生产更多单宁酶。Hatamoto等[7]首次报道了米曲霉单宁酶的克隆和表达，迄今已有许多不同来源的单宁酶得到了表达，来源包括植物乳杆菌、溶血性链球菌和路邓葡萄球菌等[8]。其中大多数植物乳杆菌单宁酶具有较高的比酶活和酯类儿茶素水解活性。Iwamoto等[9]从植物乳杆菌ATCC14917T中克隆一种新的单宁酶基因*tanLpl*，并进行了纯化和性质研究。Wu等[10]首次报道了Lptan1的晶体结构。Pan等[11]利用生物信息学分析了单宁酶TanBLp的催化位点和稳定性，通过定点突变提高了植物乳杆菌单宁酶TanBLp（AB379685）的耐酸性。

分子改造单宁酶能够改善其酶学性质，提高其适应性。Koseki等[12]利用定点突变对米曲霉单宁酶进行分子改造，得到了具有更高比酶活的突变体DKR。卢海强等[13]利用定点突变技术对烟曲霉单宁酶（AfTanA）进行分子改造，得到了温度稳定性明显提升的突变体。刘鳐等[14]利用定点突变技术将Ala460突变为Pro460，突变体的比酶活较野生型提高了82.5%。定向进化作为一种蛋白质非理性设计手段，因不需要事先了解酶分子结构、功能等信息而广泛应用于许多酶的分子改造。李延啸等[15]利用定向进化技术对来自黑根毛霉的甘露聚糖酶进行分子改造，得到了催化效率显著提升的突变体。李晨霞等[16]通过定向进化技术筛选得到了一株正向突变体，与野生型相比，其最适pH提高0.5，最适温度降低了5 ℃，并明显提高了米曲霉β-半乳糖苷酶水解乳糖的效率。目前鲜少见到有关Lptan1定向进化的报道。作者从植物乳杆菌中克隆单宁酶基因并在大肠杆菌中异源表达。通过定向进化筛选出一株热稳定性及比酶活同时提高的突变体，并评价了其对绿茶茶汤中酯类儿茶素的水解效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌QJP85921.1：作者所在课题组保存；载有植物乳杆菌来源单宁酶基因的重组质粒pET32a-Tan：作者所在课题组构建并保存；宿主大肠杆菌工程菌株DH5α和BL21（DE3）：北京全式金技术有限公司；罗丹宁、没食子酸甲酯、没食子酸丙酯、表儿茶素（epicatechin，EC）、没食子儿茶素（gallocatechin，GC）、表没食子儿茶素（epigallocatechin，EGC）、ECG、没食子儿茶素没食子酸酯（gallocatechin gallate，GCG）、EGCG：上海源叶生物有限公司。其他试剂均为分析纯。

凝胶成像分析系统：CBIO-GelPro型，北京赛百奥科技有限公司；蛋白质纯化系统：MA99-1型，上海青浦沪西仪器厂；金属亲和层析柱料：Ni-NTA agarose型，德国Qiagen公司；紫外可见分光光度计：TU-1800PC型，北京普析通用仪器设备有限责任公司；高效液相色谱（HPLC）系统：1260 Infinity II Bio-SEC型，美国AgilentTechnologies公司。

1.2 Lptan1随机突变文库的构建及高通量筛选

1.2.1 Lptan1随机突变文库的建立

以载有植物乳杆菌来源单宁酶基因的重组质粒pET32a-Tan作为易错PCR模板。设计特异性引物5921-F（5′-ATGAGTAACCGATTGATTTTTGATGCTGAC-3′）和5921-R（5′-CTGGATTGATGGCTTGTGCCAATGA-3′）。采用不同浓度的Mg^{2+}和Mn^{2+}对Lptan1的基因*QJP85921.1*进行易错PCR扩增。PCR产物利用质量分数1%的琼脂糖凝胶进行纯化，得到易错PCR扩增产物。凝胶回收产物与pET32a质粒用相同的限制性酶*Bam*H I和*Eco*R I在37 ℃下进行双酶切处理，并在T4 DNA连接酶的作用下于16 ℃过夜连接，连接产物转至大肠杆菌DH5α感受态细胞。从平板刮取所有单菌落至新鲜LB培养基中，将质粒转化至大肠杆菌BL21（DE3），收集所有转化子，即为随机突变文库。随机对10个转化子进行测序分析，计算突变文库的文库容量和突变量。

1.2.2 突变文库的初筛

96孔板中加入100 μL含氨苄霉素（100 μg/mL）的LB培养基，用牙签挑取突变体接种至96孔板，同时接种Lptan1作为对照，37 ℃培养4 h，作为种子液。将96孔板中的菌液取20 μL转接至装有180 μL新鲜LB培养基（含100 μg/mL氨苄霉素）的96孔板中，37 ℃培养3 h后加入10 μL IPTG，使其终浓度为0.5 mmol/L，16 ℃、180 r/min下诱导16 h。4 ℃下以3 000 r/min离心20 min获得菌体，加入100 μL溶菌酶（10 mg/mL），调节pH为8.0，37 ℃处理30 min，于4 ℃下以3 000 r/min离心20 min，所得上清液即为粗酶液。

在96孔的深孔板中加入50 μL质量分数1%的没食子酸甲酯（用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液溶解，pH 8.0）和50 μL粗酶液，于45 ℃反应5 min，加入60 μL甲醇-罗单宁终止反应，之后加入40 μL KOH溶液（70 mmol/L）静置5 min，3 000 r/min离心10 min，吸取上清液用于测定酶活。选择初筛中酶活较高的突变株用于复筛。

1.2.3 突变文库的复筛

选取初筛为阳性的克隆体接种于LB液体培养基中，37 ℃下培养，取1 mL菌液在600 nm处测吸光度。当OD_{600}值为0.6~0.8时，加入10 μL IPTG使其终浓度为0.5 mmol/L，之后进行重组酶的诱导表达。分别测定不同菌株粗酶液的酶学性质。以比酶活升高的突变体作为mLptan1，对筛选出的mLptan1进行基因测序，与Lptan1的基因进行序列比对分析，确定mLptan1的突变位点。

1.3 mLptan1的纯化和酶学性质测定

1.3.1 单宁酶的纯化

粗酶液使用Ni-IDA柱（1 cm×5 cm）纯化。先用10个柱体积的缓冲液A（20 mmol/L磷酸盐缓冲液、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L咪唑，pH 8.0）以1.0 mL/min的流量平衡柱子，粗酶液以0.5 mL/min流量上样；用1.0 mL/min流量的缓冲液A洗涤至OD_{280}值<0.05，除去杂蛋白质，然后分别用缓冲液B（20 mmol/LPB、500 mmol/L NaCl、50 mmol/L咪唑，pH 8.0）和缓冲液C（20 mmol/L PB、500 mmol/L NaCl、100 mmol/L咪唑，pH 8.0）以1.0 mL/min的流量洗脱并收集目的蛋白质。洗脱后通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测其纯度。

1.3.2 酶活力和蛋白质质量浓度的测定

参考Sharma等[17]的方法测定单宁酶的酶活力。取适当稀释的250 μL酶液与250 μL没食子酸甲酯溶液（10 mmol/L，pH 8.0）混匀，40 ℃反应5 min后加入300 μL甲醇-罗丹宁溶液（50 mmol/L）终止反应，加入200 μL KOH溶液（0.5 mol/L）进行显色反应，随后在520 nm波长处测定吸光度。定义每分钟生成1 μmol GA所需的酶量为1个酶活力单位（U）。

蛋白质质量浓度参考Lowry等[18]的方法测定，以牛血清蛋白作为标准蛋白质。

1.3.3 酶学性质测定

1）最适反应pH测定：采用50 mmol/L不同pH的缓冲溶液，测定不同pH下的酶活力，设定未经处理的纯酶液酶活力为100%，分别计算不同pH下的相对酶活力。

2）pH稳定性测定：用上述不同体系的缓冲液适当稀释酶液，40 ℃保温处理30 min，然后迅速将样品置于冰水浴中冷却30 min，在最适pH条件下，按照标准方法测定残余酶活力，设未经处理的纯酶液酶活力为100%，计算相对酶活力。

3）最适反应温度测定：分别在20~70 ℃的Tris-HCl缓冲液（pH 7.0）中测定酶反应最适温度。设未经处理的纯酶液酶活力为100%，分别计算不同温度下的相对酶活力。

4）温度稳定性测定：酶液用Tris-HCl缓冲液（pH 7.0）稀释至1 mg/mL后，置于20~70 ℃下保温30 min，然后迅速将样品置于冰水浴中冷却30 min，测定残余酶活力，设未经处理的纯酶液酶活力为100%，计算相对酶活力。

5）底物特异性测定：分别以10 mmol/L的没食子酸丙酯、没食子酸甲酯、单宁酸、ECG、GCG及EGCG为底物，测定Lptan1和突变体的底物特异性。Lptan1在40 ℃（Lptan1最适反应温度）和pH 7.0条件下反应5 min；mLptan1在45 ℃（mLptan1最适反应温度）和pH 8.0的条件下反应5 min。采用1.3.2的方法测定酶活力，以没食子酸甲酯为底物时，测得的酶活力设定为100%。

1.4 Lptan1水解活性的测定

为了进一步确定Lptan1对酯类儿茶素的水解活性，利用Tris-HCl缓冲液（pH 7.0）分别配制1 mg/mL EGCG溶液、ECG溶液和GCG溶液，在

45 ℃、酶量为 5 U/mL 的条件下水浴保温，通过 HPLC 分析酶解产物，检测方法参照文献[19]。

1.5 采用 mLptan1 处理绿茶茶汤

绿茶茶汤的制作参考 Ong 等[20]的方法。将绿茶干粉在研钵中研磨后过筛，按茶水比 1 g∶50 mL 加入纯水，置 90 ℃水浴锅浸提 30 min 并不断搅拌，浸提结束后通过离心过滤得到澄清的绿茶茶汤。在 40 ℃下，分别用 0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 U 的 Lptan1 处理绿茶茶汤（反应体系 1 mL），分别在 30、60、90、120 min 时取样，将样品煮沸 5 min 灭酶，用 HPLC 检测样品中儿茶素浓度的变化。

1.6 数据处理

数据统计采用 Excel，每组样品设 3 次平行，采用 Graphpad Prism 9.5 绘图。

2 结果与讨论

2.1 单宁酶基因的表达和随机突变文库的筛选

通过易错 PCR 对植物乳杆菌来源的单宁酶基因 *QJP85921.1* 进行随机突变，调整易错 PCR 体系中 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的浓度，使碱基随机错配，从而构建了随机突变文库。结果表明，当 Mg^{2+} 浓度为 5 mmol/L、Mn^{2+} 浓度为 0.3 mmol/L 时，氨基酸突变率为 0.639%，为合适突变率。平板初筛 10 000 个突变体，在 96 孔板中筛选到 135 个具有单宁酶活性的突变体。在不同温度下完成定向进化筛选，复筛后获得一个温度稳定性及水解能力提高的突变体，命名为 mLptan1。经序列比对，获得了 mLptanG239E。

2.2 mLptan1 的纯化结果

mLptan1 纯化后的回收率为 71.5%（见表 1）。SDS-PAGE 分析结果表明，目的蛋白质条带均一（见图 1），相对分子质量为 65 200，与预测的相对分子质量及 Lptan1 的相对分子质量一致。纯化后测定该突变体的比酶活为 425.6 U/mg，较 Lptan1（312.3 U/mg）提高 1.36 倍，高于大多数其他来源的单宁酶，如来源于黑曲霉 CICIM F0510（11.5 U/mg）[4]、黑曲霉 SH-2（40.7 U/mg）[21]、植物乳杆菌 JDM1（25 U/mg）[22]的单宁酶。

2.3 酶学性质比较

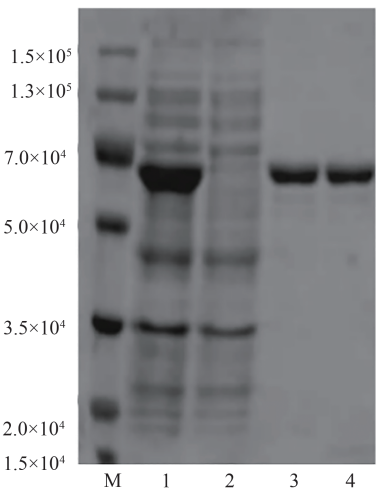
如图 2 所示，mLptan1 的最适反应 pH 为 7，Lptan1 的最适反应 pH 为 8，mLptan1 和 Lptan1 的 pH 稳定性无明显差异。mLptan1 的最适反应温度为 45 ℃，比 Lptan1 的最适反应温度提高了 5 ℃。mLptan1 在 45 ℃处理 30 min 后仍保留 70% 以上的活性，而 Lptan1 仅保留 20% 的活性。mLptan1 的最适反应温度高于大多数细菌和植物来源的单宁酶，如枯草芽孢杆菌来源的单宁酶（37 ℃）[23]、柿子来源的单宁酶（40 ℃）[24]、肺炎克雷伯菌来源的单宁酶（40 ℃）[25]。mLptan1 的温度稳定性高于 Lptan1，在 45 ℃保持稳定，与球形芽孢杆菌[26]来源的单宁酶的温度稳定性（45 ℃）相近，优于链霉菌来源的单宁酶（30~40 ℃）[27]。

如表 2 所示，Lptan1 和 mLptan1 对多种底物均有水解活性，两者均对没食子酸丙酯的水解能力最强，其次是没食子酸乙酯和没食子酸甲酯。特别是 mLptan1，最高比酶活可达到 554.4 U/mg，且 mLptan1 对不同底物的比酶活均有明显提高，这与相关报道[28]中同样来自植物乳杆菌的单宁酶（TanALp）相近。其对单宁酸这类复杂底物的水解活性不高，推测原因是单宁酸聚合度较高，相对分子质量为 1 701.2，单宁酶与大分子化合物单宁

表 1 mLptan1 的纯化表

Table 1 Purification table of mLptan1

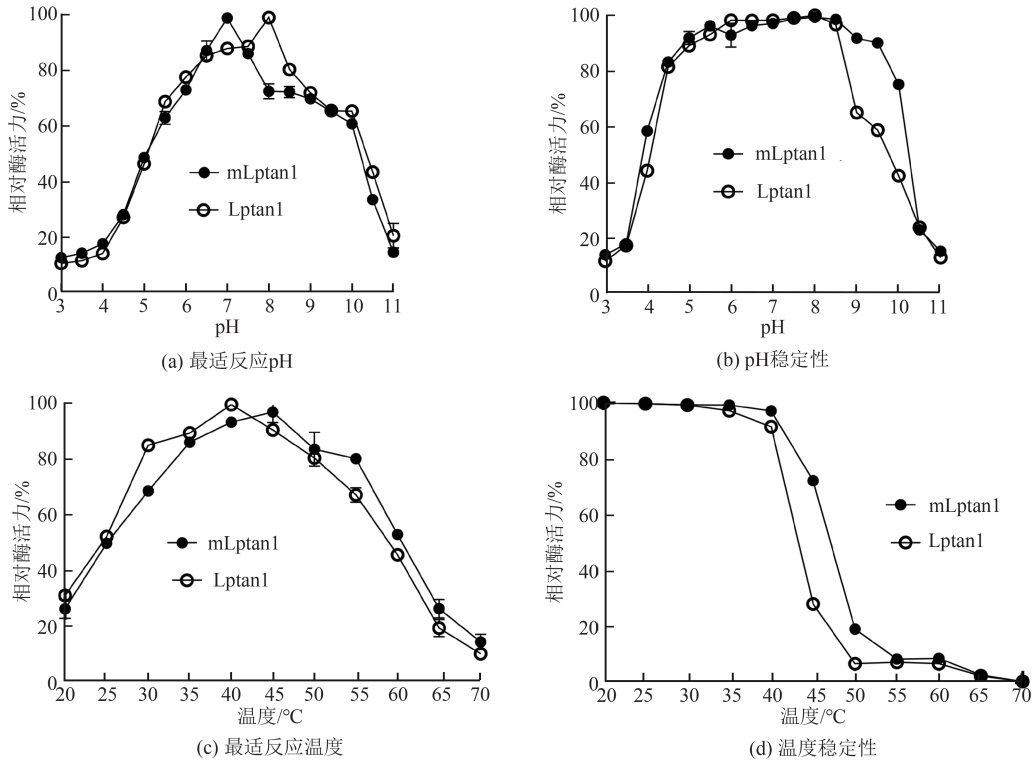
纯化阶段	总蛋白质质量/mg	酶活力/U	比酶活/（U/mg）	纯化倍数	回收率/%
粗酶液阶段	202.4	16 410.6	81.1	1.0	100.0
Ni-IDA阶段	27.6	11 738.3	425.6	5.2	71.5



M—Marker；1—粗酶液；2—洗涤液；3—Ni 柱纯化后的 mLptan1；4—Lp tan1。

图 1 Lptan1 和 mLptan1 纯化后的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE of Lptan1 and mLptan1 after purification



(a) 最适反应pH　(b) pH稳定性

(c) 最适反应温度　(d) 温度稳定性

图 2　Lptan1 和 mLptan1 的酶学性质

Fig. 2　Enzymatic properties of Lptan1 and mLptan1

酸的结合受到底物中其他没食子酸酰基的阻碍[29]，使酶与底物的结合效率下降。

表 2　Lptan1 和 mLptan1 的底物特异性

Table 2　Substrate specificity of Lptan1 and mLptan1

底物	比酶活/(U/mg)		mLptan1 与 Lptan1 比酶活的倍数关系
	mLptan1	Lptan1	
没食子酸丙酯	554.4±3.5^{a}	410.3±4.2^{b}	1.35
没食子酸甲酯	425.6±2.6^{a}	312.3±3.3^{b}	1.36
没食子酸乙酯	463.4±4.1^{a}	390.4±2.9^{b}	1.18
单宁酸	149.1±1.3^{a}	119.9±2.1^{b}	1.24

注：比酶活用平均值±标准差表示；每行的不同上标字母表示差异显著（P<0.05）。

序列分析表明，mLptan1 与植物乳杆菌来源的单宁酶（TanLp1，PDB：4j0k.2.A）有 99% 的同源性。TanLp1 呈现 α/β 结构，其特征是在经典的丝氨酸水解酶折叠中插入一个大帽结构域，该结构由 Ser163、His451 和 Asp419 组成，为催化三联体[10]。mLptan1 结构特征的分析结果见图 3，mLptan1 中突变的氨基酸 Glu239 位于 Loop 环上，位于活性位点上方的移动盖结构域是酶激活和底物特异性结合的重要结构，LID 结构域的差异可能会导致底物识别和酶效率的差异。在 LID 结构域中，单宁酶有一个柔性环，位于催化结构域和催化三联体所在的 LID 结构域交界处形成的表面凹槽上，其灵活度可能促进或阻碍底物访问结合位点。由不带电荷的极性氨基酸甘氨酸突变为带电荷的极性氨基酸谷氨酸，改变了其表面的电荷分布，可能是最适 pH 变化的原因之一[30]。Loop 区因其灵活性可影响酶与底物结合的能力，酶的进化会导致 Loop 区氨基酸变化，进而对催化效率产生影响[31]。另外，甘氨酸突变为谷氨酸后，稳定了底物结合区的空间结构，有利

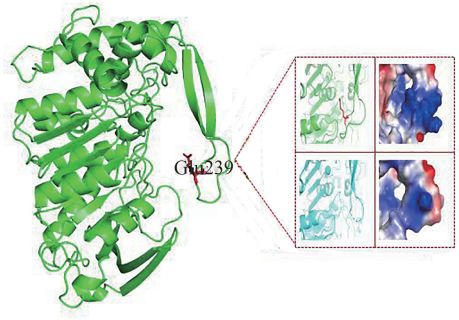


图 3　mLptan1 的结构、改变位点、作用力及表面电荷分布

Fig. 3　Structure, mutation site, force and surface charge distribution of mLptan1

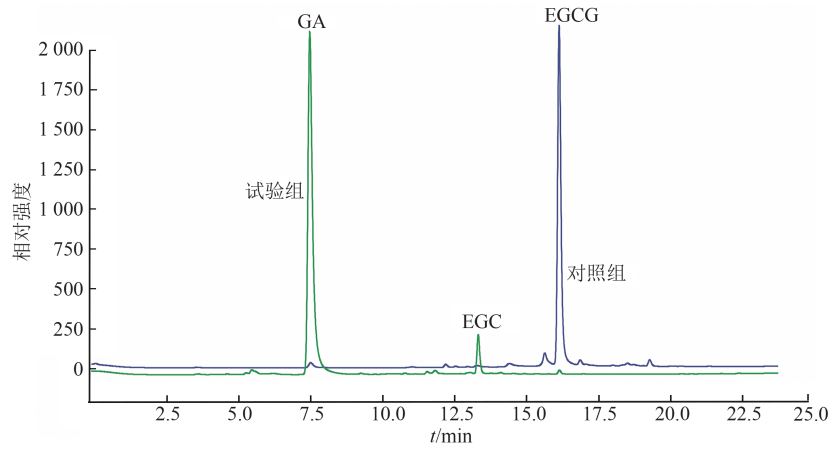
于底物结合，既提高了酶活力，也提高了热稳定性[32]。

2.4 酯类儿茶素的水解产物分析

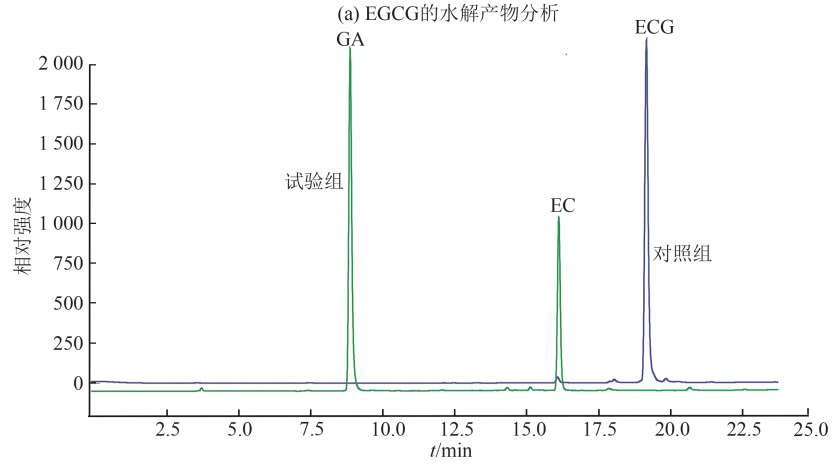
通过分析不同酯类儿茶素以及非酯类儿茶素标准品，确定其出峰时间，并对绿茶茶汤水解液进行鉴定，结果见图4。单宁酶可以水解酯类儿茶素的酯键，分别将EGCG、ECG和GCG水解为非酯类儿茶素（EGC、EC、GC）和GA。酯类儿茶素是导致茶汤产生苦味和涩味的主要物质，它会与口腔中的脯氨酸等物质形成络合物并引起不适的口感[33]，将其水解为非酯类儿茶素能有效降低苦涩味的形成。

2.5 mLptan1对绿茶茶汤的影响

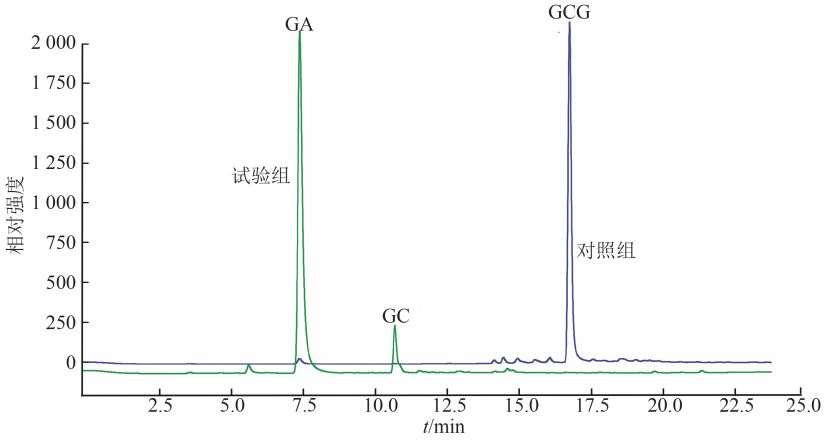
加酶量对绿茶茶汤的影响见表3。酯类儿茶



(a) EGCG的水解产物分析



(b) ECG的水解产物分析



(c) GCG的水解产物分析

图4 Lptan1和mLptan1水解酯类儿茶素的产物分析

Fig. 4 Product analysis of ester catechins hydrolyzed by Lptan1 and mLptan1

素EGCG、ECG和GCG的浓度随mLptan1添加量的增加而明显降低，而EGC、EC、GC和GA的浓度则随着mLptan1添加量的增加而增加。当加酶量为1.0 U/mL处理2 h时，对酯类儿茶素的降解效果明显优于对照组。反应时间对绿茶茶汤的影响见表4。EGC、EC、GC和GA的浓度随着时间的增加而增加。在反应120 min时，mLptan1对绿茶茶汤中酯类儿茶素的总体降解效果最好，EGCG、ECG和GCG分别水解了85%以上。

绿茶的pH为5.5，mLptan1在pH 5.5时仍能保持80%以上的酶活力，适合水解茶汤中的酯类儿茶素。mLptan1在45 ℃及加酶量为1.0 U/mL的条件下水解2 h时，最高可水解绿茶茶汤中85%的酯类儿茶素，而Lptan1仅可水解绿茶茶汤中55%的酯类儿茶素（见表4）。Kim等[34]以绿茶叶为原料，粉碎后与单宁酶溶液混合处理24 h后，其酯类儿茶素浓度降低80%。可见mLptan1具有很高的酯类儿茶素水解效率。

表3 加酶量对绿茶茶汤的影响

Table 3 Effects of enzyme dosage on green tea soup

加酶量/（U/mL）	儿茶素浓度/（mmol/L）						
	EGCG	ECG	GCG	EGC	GC	EC	GA
0	1.505±0.102	0.583±0.024	1.522±0.154	0.120±0.088	0.016±0.001	0.010±0.002	2.347±0.329
0.1	1.325±0.098	0.531±0.033	1.436±0.147	0.241±0.082	0.064±0.002	0.013±0.001	6.526±0.189
0.5	1.094±0.113	0.408±0.025	1.043±0.110	0.326±0.095	0.072±0.001	0.028±0.008	12.587±0.485
1.0	0.991±0.101	0.364±0.021	0.891±0.102	0.345±0.043	0.078±0.002	0.030±0.004	15.725±0.509
2.0	0.554±0.082	0.164±0.020	0.423±0.110	0.364±0.015	0.091±0.002	0.046±0.002	20.964±0.196

表4 反应时间对绿茶茶汤的影响

Table 4 Effects of different reaction time on green tea soup

时间/min	儿茶素浓度/（mmol/L）						
	EGCG	ECG	GCG	EGC	GC	EC	GA
0	1.505±0.102	0.583±0.024	1.522±0.154	0.120±0.088	0.016±0.001	0.010±0.002	2.347±0.329
30	0.988±0.121	0.329±0.102	0.950±0.121	0.312±0.004	0.072±0.002	0.030±0.003	13.140±0.239
60	0.783±0.112	0.212±0.101	0.645±0.087	0.385±0.032	0.075±0.003	0.050±0.002	17.794±0.159
90	0.572±0.106	0.108±0.098	0.343±0.036	0.466±0.066	0.086±0.001	0.062±0.001	24.175±0.453
120	0.177±0.086	0.026±0.025	0.211±0.090	0.485±0.064	0.088±0.002	0.080±0.001	31.451±0.297

3 结论

通过对Lptan1进行定向进化，筛选到正向突变体mLptan1，比酶活达425.6 U/mg，最适反应温度（45 ℃）较Lptan1（40 ℃）提高了5 ℃，为单宁酶的分子改造提供了理论依据。同时定向进化明显提高了Lptan1对绿茶茶汤水中酯类儿茶素的水解效率，在提升茶饮料品质方面具有潜在的应用价值。

参考文献

[1] SHARMA K，KUMAR V，KAUR J，et al. Health effects，sources，utilization and safety of tannins：a critical review [J]. Toxin Reviews，2021，40（4）：432-444.

[2] BELMARES R，CONTRERAS-ESQUIVEL J C，RODRíGUEZ-HERRERA R，et al. Microbial production of tannase：an enzyme with potential use in food industry [J]. LWT-Food Science and Technology，2004，37（8）：857-864.

[3] AGUILAR C N，GUTIERREZ-SANCHEZ G. Review：sources，properties，applications and potential uses of tannin acyl hydrolase [J]. Food Science and Technology International，2001，7（5）：373-382.

[4] 李梦迪，张志萌，董自星，等. 黑曲霉单宁酶TahA的克隆表达和酶学特性解析[J]. 食品与发酵工业，2018，44（11）：15-21.
LI M D，ZHANG Z M，DONG Z X，et al. Cloning，expression and biochemical characterization of tannase TahA from *Aspergillus niger*[J]. Food and Fermentation Industries，2018，44（11）：15-21.（in Chinese）

[5] LIU T P S L，BRANDÃO C R M P，VASCONCELOS D J，et al. Tannase from *Aspergillus melleus* improves the antioxidant activity of green tea：purification and

biochemical characterisation[J]. International Journal of Food Science & Technology,2017,52(3):652-661.

[6] JANA A, HALDER S K, BANERJEE A, et al. Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential of bacterial tannase:a molecular advancement[J]. Bioresource Technology,2014,157:327-340.

[7] 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):215-221.

[8] LASRIVAS B, RODRÍGUEZ H, ANGUITA J, et al. Bacterial tannases:classification and biochemical properties [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2019,103(2):603-623.

[9] IWAMOTO K, TSURUTA H, NISHITAINI Y, et al. 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.

[10] WU M B, PENG X H, WEN H, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of tannase from *Lactobacillus plantarum* [J]. Acta Crystallographica. Section F: Structural Biology and Crystallization Communications,2013,69(4):456-459.

[11] PAN H, ZHAN J J, YANG H, et al. Improving the acid resistance of tannase TanBLp (AB379685) from *Lactobacillus plantarum* ATCC14917^{T} by site-specific mutagenesis[J]. Indian Journal of Microbiology, 2022, 62(1):96-102.

[12] KOSEKI T, OTSUKA M, MIZUNO T, et al. Mutational analysis of Kex2 recognition sites and a disulfide bond in tannase from *Aspergillus oryzae*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 482(4): 1165-1169.

[13] 卢海强,陈伟,黄蕾,等. 烟曲霉单宁酶Kex2位点突变及酶学特性表征[J]. 食品科学,2020,41(14):124-130.
LU H Q, CHEN W, HUANG L, et al. Mutational analysis of Kex2 sites and characterization of tannase from *Aspergillus fumigatus*[J]. Food Science, 2020, 41(14):124-130.(in Chinese)

[14] 刘鳐,胡雪丽,钟秋梅,等. 路邓葡萄球菌单宁酶基因的克隆、表达、纯化与改造[J]. 中国测试,2018,44(9):63-68.
LIU Y, HU X L, ZHONG Q M, et al. Cloning, expression, purification and modification of tannase gene from *Staphylococcus lugdunensis*[J]. China Measurement & Test,2018,44(9):63-68.(in Chinese)

[15] 李延啸,马俊文,闫巧娟,等. 米黑根毛霉甘露聚糖酶的定向进化、高效表达与应用[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(7):120-129.
LI Y X, MA J W, YAN Q J, et al. Directed evolution, high level expression and application of mannanase from *Rhizomucor miehei*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2022,41(7):120-129.(in Chinese)

[16] 李晨霞,向芷璇,李敬,等. 米曲霉β-半乳糖苷酶的定向进化、高效表达及应用[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(10):49-57.
LI C X, XIANG Z X, LI J, et al. Directed Evolution, efficient expression and application of β-galactosidase in *Aspergillus oryzae* [J]. Chinese Journal of Food and Biotechnology,2022,41(10):49-57.

[17] SHARMA S, BHAT T K, DAWRA R K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 279(1): 85-89.

[18] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry,1951,193(1):265-275.

[19] DAI X L, LIU Y J, ZHUANG J H, et al. Discovery and characterization of tannase genes in plants: roles in hydrolysis of tannins[J]. New Phytologist, 2020, 226(4):1104-1116.

[20] ONG C B, ANNUAR M S M. Polyphenolic composition and *in vitro* antioxidant activities of native- and tannase-treated green tea extracts[J]. International Journal of Food Science & Technology,2017,52(3):748-756.

[21] LIU F L, WANG B, YE Y R, et al. 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.

[22] ESTEBAN-TORRES M, LANDETE J M, REVERÓN I, et al. A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters [J]. Applied and Environmental Microbiology,2015,81(9):3235-3242.

[23] JANA A, MAITY C, KUMAR HALDER S, et al. Enhanced tannase production by *Bacillus subtilis* PAB2 with concomitant antioxidant production [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,2013,2(4):363-371.

[24] 卢海强,陈伟,田洪涛,等. 柿单宁酶PsnTanA异源表达及酶学特性表征[J]. 河北农业大学学报,2022,45(3):69-74.
LU H Q, CHEN W, TIAN H T, et al. Exogenous expression and characterization of a novel tannase PsnTanA from persimmon [J]. Journal of Hebei Agricultural University,2022,45(3):69-74.(in Chinese)

(下转第 115 页)