

doi: 10.11857/j.issn.1674-5124.2018.09.012



# 路邓葡萄球菌单宁酶基因的克隆、表达、 纯化与改造

刘 瑶, 胡雪丽, 钟秋梅, 吕 蝶, 吴明波

(成都医学院, 四川 成都 610500)

**摘要:** 为提高路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*) 单宁酶 (*SI-tan*) 的活性, 该文利用化学合成方法获得 *SI-tan* 基因, 将该基因连接到重组表达质粒 pET43.1-A, 再转化到大肠杆菌感受态细胞 BL21-DE3 中进行表达, 通过亲和层析柱纯化, 以没食子酸甲酯为底物进行酶活性测定以及酶学性质分析, 并基于生物信息学分析, 结合定点突变技术对 *SI-tan* 进行人工改造。结果显示, 获得的重组单宁酶产量明显增高, 最高可达 42 mg/L 发酵液; 酶学性质研究显示该酶在 pH 8.0, 温度 40 °C 时获得的活性最高 (40 U/mg); Ala460 突变为 Pro460 后的 *SI-tan* 活性可提高 82.5%。

**关键词:** 路邓葡萄球菌; 单宁酶; 三明治结构; 定点突变; 没食子酸甲酯

中图分类号: TQ925

文献标志码: A

文章编号: 1674-5124(2018)09-0063-06

## Cloning, expression, purification and modification of tannase gene from *Staphylococcus lugdunensis*

LIU Yao, HU Xueli, ZHONG Qiumei, LÜ Die, WU Mingbo

(Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

**Abstract:** In order to improve the activity of tannase (*SI-tan*) from *Staphylococcus lugdunensis*, *SI-tan* gene was chemically synthesized and constructed into protein expression vector pET43.1-A. The construct vector was expressed in *E. coli* BL21-DE3 cells and purified with affinity chromatography, and methyl gallate was used as the substrate to study the activity of tannase. Besides, artificial modification was carried out for *SI-tan* based on bioinformatics analysis and site-directed mutagenesis technique. Results show that production of obtained recombinant tannase is obviously increased (reaching 42 mg/L fermentation liquor at most). Research on enzymatic properties show that activity of the enzyme is the highest (40 U/mg) when pH value is 8.0 and temperature is 40 °C, and the activity of *SI-tan* after Ala460 mutates into Pro460 can be improved for 82.5%.

**Keywords:** *Staphylococcus lugdunensis*; tannase; sandwich structure; site-directed mutagenesis; methyl gallate

收稿日期: 2018-05-11; 收到修改稿日期: 2018-06-09

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目 (2016GZ0364, 2018JY0208); 四川省教育厅科研项目 (16ZA0287, 18ZB0152); 四川省卫计委项目 (18PJ586, 18PJ006); 成都医学院科研创新团队项目 (CYTD16-04); 成都医学院校基金 (15Z106)

作者简介: 刘 瑶 (1988-), 女, 四川绵阳市人, 助理实验师, 硕士, 研究方向为微生物学。

通信作者: 吴明波 (1985-), 男, 山东潍坊市人, 讲师, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。

## 0 引言

单宁是一种水溶性多酚化合物,在植物界中广泛存在<sup>[1]</sup>。单宁中含有丰富的碳源,但由于其含有大量的芳香环类结构,易于螯合金属离子,并与蛋白聚合形成不可溶性沉淀,导致单宁难以被降解利用<sup>[2-5]</sup>。一些微生物能够表达单宁酶,将单宁水解为五倍子酸与葡萄糖,为微生物生长提供碳源以及能源物质<sup>[6-7]</sup>。单宁酶是已知的唯一能够降解单宁的生物酶类,因此被广泛应用于食品行业、制药行业以及动物饲料的生产中<sup>[8-13]</sup>。

目前,单宁酶的生产主要通过产单宁酶菌株的液态深层发酵以及固体发酵两种方法,耗时长、产量低、成本高、难以纯化,且生产的单宁酶通常以粗酶或者菌体形式应用,不利于单宁酶的应用<sup>[14-15]</sup>。随着基因工程技术的发展,将单宁酶基因克隆,构建表达质粒,利用表达宿主进行表达的方法也已经取得初步成效。Iwamoto等<sup>[16]</sup>,首次将乳酸杆菌单宁酶(*Lp-tan*)基因通过基因扩增构建*Lp-tan*重组表达质粒,并在大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中成功表达,但是纯化后酶的产量与活性较低。在此基础上,Wu等<sup>[17]</sup>通过LIC-PCR的方式构建了*Lp-tan*的重组表达质粒,并优化表达用宿主细胞,最终在大肠杆菌BL21-DE3中实现了*Lp-tan*的高产量表达,并保持了较高的酶活性。目前为止,已经从米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus plantarum*)以及链霉菌(*Streptomyces sviveus*)中克隆了单宁酶基因,通过异源重组表达的方法生产单宁酶,取得了较好的结果<sup>[16-19]</sup>。

本文通过化学合成获得了路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)的单宁酶基因*Sl-tan*,构建原核表达质粒,使其在大肠杆菌宿主中进行表达,并通过与*Lp-tan*的氨基酸序列比对分析,结合已经报道的*Lp-tan*的结构(PDB序列号:4J0C)、*Lp-tan*与底物没食子酸乙酯的结构(PDB序列号:4J0K)、*Lp-tan*与产物五倍子酸的结构(PDB序列号:4J0H)对*Sl-tan*进行定点改造<sup>[20]</sup>。改造后获得的重组*Sl-tan*活性较改造之前提高了82.5%。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、BL21-DE3菌株以及质粒pET-43.1-A均为实验室保存;限制性内切酶BamHI和XhoI、T4 DNA连接酶购买自Thermo-Fisher;DNA

聚合酶购买自TaKaRa;DNA胶回收试剂盒购买自QIAGEN;定点突变试剂盒购买自北京全式金;商品化米曲霉单宁酶(Wako, Japan);没食子酸甲酯、单宁酸、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购买自Sigma;咪唑购买自科龙(成都);10 KD浓缩管购买自Millipore。

### 1.2 仪器

超净工作台(苏净集团安泰公司SW-CZ-1F);蛋白纯化仪(苏州利穗);全自动高压蒸汽消毒器(上海三申医疗器械有限公司YX280A);摇床(上海智诚);10 mL HisTrap HP亲和层析柱(博格隆);超声破碎仪(宁波新芝);高速冷冻离心机(贝克曼,美国)。

## 2 方法

### 2.1 目的基因获取

在NCBI数据库中查找*Sl-tan*基因(GenBank: KU882097.1),通过化学合成的方法获得完整的基因序列(擎科生物,成都)。

### 2.2 重组载体的构建

本文中利用的重组表达载体为改造后的pET43.1-A(仅保留N端His-tag,并在His-tag后引入烟草花叶病毒酶(TEV)的酶切位点,去除了原先质粒上的S-tag以及NusA-tag),以合成的*Sl-tan*基因为模板,设计引物序列进行PCR扩增,上游引物序列为CGGATCC-ATGAAAAGACTTTCATATC-ACTCT,下游引物序列为CCTCGAG-CTATTTTTT-ATTAATACTTTCTACC(斜体为BamHI和XhoI的酶切位点及保护碱基),扩增条件为95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35个循环。扩增后的PCR产物与pET43.1-A质粒同时用限制性内切酶BamHI和XhoI进行双酶切,酶切后用胶回收试剂盒纯化。将纯化后的双酶切质粒与PCR产物按照1:3的比例混合后,用T4 DNA连接酶在室温下连接1 h,转化DH5 $\alpha$ ,涂含有卡那霉素的LB平板,37℃培养过夜后,挑取单克隆提质粒,并送公司(擎科生物,成都)测序。

### 2.3 诱导表达与纯化

将测序正确的重组质粒转化表达用大肠杆菌感受态细胞BL21-DE3,涂含有卡那霉素的LB平板,37℃培养过夜后挑取单克隆接种于含有卡那霉素的LB液体培养基中,于37℃,220 r/min培养至OD<sub>600</sub>值为0.6左右时,加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG继续诱导培养4 h,6 000 r/min离心30 min,弃上清,收集菌体。

将收集的菌体用平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬, 超声破碎 15 min, 离心后收集上清并过 5  $\mu\text{m}$  孔径滤膜, 收集上清并用蛋白纯化仪过 10 mL HisTrap HP 亲和层析柱, 用洗脱缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl+100 mmol/L NaCl+300 mmol/L 咪唑, pH 8.0)梯度洗脱。

#### 2.4 TEV 酶切去除 N 末端组氨酸标签

载体 pET43.1-A 自身带有 18 个氨基酸的组氨酸标签, 在组氨酸标签后带有烟草花叶病毒酶 (TEV) 的酶切位点。为了去除组氨酸标签对 *Sl-tan* 活性的影响, 用 TEV 酶切去除组氨酸标签。将亲和层析后的 *Sl-tan*, 用透析缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl+100 mmol/L NaCl, pH 8.0)透析, 去除咪唑, 然后与 TEV 按照 100:1 的比例混合, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件酶切过夜。经酶切后的 *Sl-tan* (加入 20 mmol/L 咪唑)再次过组氨酸亲和层析柱纯化, 收集穿透峰样品。

#### 2.5 酶活性的测定

酶活性单位 U 的定义: 在温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ , pH 为 8.0 的条件下, 每分钟内水解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  产物五倍子酸所需要的酶量, 定义为一个酶活性单位 U。

单宁酶可以水解没食子酸甲酯以及单宁酸, 释放出五倍子酸。通过绕单宁和五倍子酸的特异反应, 可以测定单宁酶的活性。以 25 mmol/L 没食子酸甲酯作为底物, 单宁酶可以水解没食子酸甲酯 (MG), 生成五倍子酸, 五倍子酸 (GA) 可以与绕单宁反应, 用 NaOH 终止反应, 测 520 nm 的吸光度, 显色强度与五倍子酸的量成正比。在 700  $\mu\text{L}$  的反应缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl +100 mmol/L NaCl, pH 8.0)中加入 0.1  $\mu\text{g}$  的单宁酶与 40  $\mu\text{L}$  摩尔浓度为 25 mmol/L 的没食子酸甲酯在 40  $^{\circ}\text{C}$  条件下温育 5 min, 然后加入 150  $\mu\text{L}$  质量浓度为 0.667% 的绕单宁溶液再次在 40  $^{\circ}\text{C}$  下温育 5 min, 随后加入 100  $\mu\text{L}$  摩尔浓度为 500 mmol/L 的 NaOH 溶液反应 5 min 终止反应, 用分光光度计检测酶解液在 520 nm 下的吸光度值。

标准曲线制备: 以 0.125~1 mmol/L 的五倍子酸系列标准溶液与绕单宁反应, 测 520 nm 的吸光度, 以五倍子酸的浓度为横坐标对纵坐标吸光度值作出标准曲线。

#### 2.6 温度与 pH 对酶活性的影响

为了研究酶的最适反应温度与 pH, 将纯化的

单宁酶在 10~80  $^{\circ}\text{C}$  条件下以没食子酸甲酯为底物, 在 pH 值为 8.0 的条件测定酶的活性, 以测得的最高活性值为 100% 作图。在温度为 37  $^{\circ}\text{C}$  时, 配制 pH 值为 3.0~10.0 的缓冲液, 以没食子酸甲酯为底物检测酶的活性, 以测得最高活性数值为 100% 作图。

#### 2.7 单宁酶的序列分析及定点突变

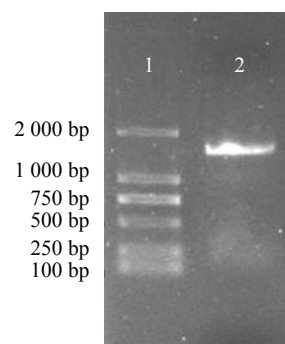
乳酸杆菌单宁酶具有较高的生物活性, 且其三维结构已经被解析, 并且根据其结构阐明了单宁酶的水解机制<sup>[20]</sup>。通过 ExPasy Align 比对分析 *Lp-tan* 与 *Sl-tan* 单宁酶的差异, 并结合已报到的乳酸杆菌单宁酶的结构与水解机制, 对差异位点进行定点突变, 具体突变方法如下:

通过 PCR 的方法, 以包含 *Sl-tan* 基因的质粒为模板, 按照定点突变试剂盒试剂盒要求, 设计引物 (上游引物: TTTAAAACGTAGCCAA-CAG-GAAA-ATGAAGT; 下游引物: CTG-TTGGCTACGTTTAA-ATCATC, 斜体表示突变位点), 进行 PCR 扩增(94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  8 min, 20 个循环)。将获得的 PCR 产物用 DpnI 酶处理, 消化掉模板质粒。将酶切后的 PCR 产物跑 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 切胶后回收 PCR 产物, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂平板后于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后, 挑取单克隆于 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min, 过夜培养。提质粒, 送测序, 将测序结果正确的质粒转化大肠杆菌 BL21-DE3 感受态细胞, 进行诱导, 表达、纯化及活性测定, 方法同前。

### 3 结果

#### 3.1 目的基因 PCR 扩增及酶切鉴定结果

以合成的 *Sl-tan* 基因为模板, 进行 PCR, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见 1 800 bp 左右的 DNA 片段, 与预期一致 (见图 1)。构建好的重组质粒进行测序, 测序结果与 NCBI 数据库登陆序列一致。



1. DNA marker; 2. PCR 产物。

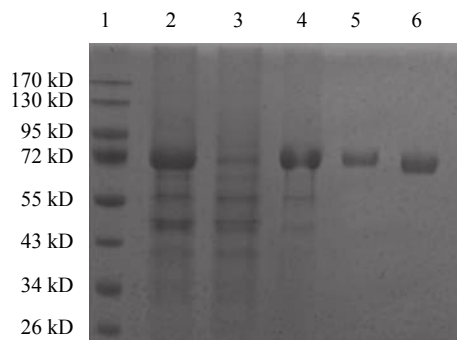
图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

### 3.2 蛋白表达与纯化

用大肠杆菌 BL21-DE3 作为宿主表达蛋白并于 20 °C 过夜诱导。收菌后, 超声破碎, 将上清用蛋白纯化仪进行纯化。表达载体 pET43.1-A, 带有 N 末端组氨酸标签, 表达的目的蛋白前端含有 MG-HHHHHHGTENLYFQGS 氨基酸序列。破碎后上清过组氨酸亲和层析柱, 用高浓度咪唑梯度洗脱, 在咪唑浓度为 80~170 mmol/L 之间出峰。酶切去除 N 末端组氨酸标签后, 再次用镍柱亲和纯化后得到纯度 95% 以上的单宁酶。10% SDS-PAGE 电泳验证(见图 2), 在分子量 67 kD 左右有明显的单一目的条带, 与 *Sl-tan* 中单宁酶分子量大小相符, 纯化后, 重组单宁酶的产量为 42 mg/L 菌液。

### 3.3 温度和 pH 值对酶活性的影响

在不同 pH 值和不同温度条件下, 测定纯化后



1. 蛋白 marker; 2. 均质机破碎后上清; 3. 过 Ni 柱后的穿透样品; 4. Ni 柱纯化后洗脱蛋白; 5. TEV 酶切前蛋白; 6. TEV 酶切去除 His 标签后纯化蛋白。

图 2 10% SDS-PAGE 电泳分析单宁酶纯化结果

单宁酶的活性, 如图 3(a) 所示, 在 pH7~9 时, 酶可以保持相对较高的活性, 在 pH 值 8 附近, 酶的活性最高; 如图 3(b) 所示, 在温度 30~60 °C 时, 酶可以保持相对较高的活性, 在 40 °C 附近, 酶的活性最高。

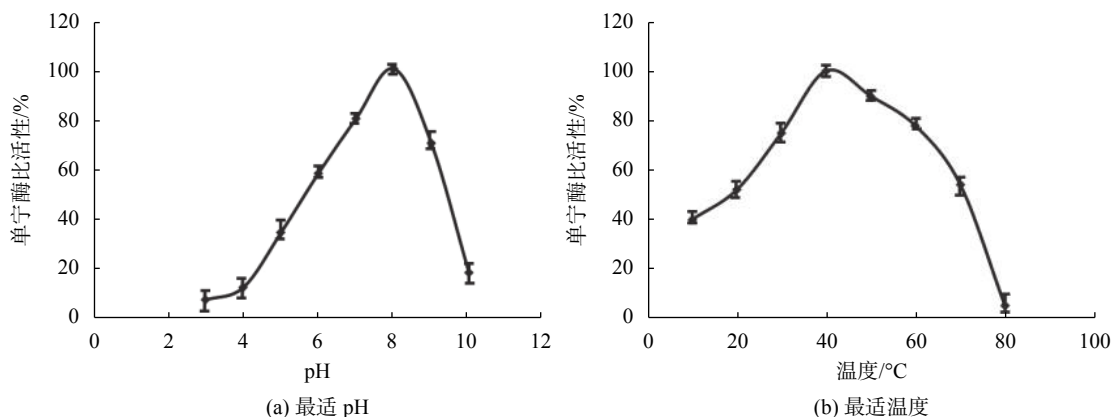


图 3 单宁酶最适反应条件优化

将纯化后的 *Sl-tan* 在 40 °C, pH 8.0 的最适条件下, 以没食子酸甲酯为底物进行活性测定, 结果显示带有 N 端组氨酸标签的单宁酶活性为 40 U/mg, 去除标签后的单宁酶活性并未有明显变化。

### 3.4 *Sl-tan* 的改造

*Sl-tan* 与 *Lp-tan* 的氨基酸序列比对结果显示两者只有 21.9% 的序列同源性, 但在 *Sl-tan* 中具有与 *Lp-tan* 相同的单宁酶活性中心保守序列 G-X-S-X-G-G<sup>[20]</sup> (X 代表任意氨基酸, 见图 4)。在 *Lp-tan* 中 Pro356-底物-Ile206 形成类似于三明治的结构, Pro356 的苯环结构能够稳定底物结合, 但是在 *Sl-tan* 中, 用于形成三明治结构的 Pro 被 Ala 取代, 从而破坏了三明治结构。通过定点突变的方法在 *Sl-tan* 中重建三明治结构 (Ala460 突变为 Pro460), 活性测定结果显示重建三明治结构后的 *Sl-tan* 活性为 73 U/mg,

与野生 *Sl-tan* 相比, 酶活性提高 82.5% (见表 1)。

## 4 讨论

现阶段, 我国单宁酶的研究主要集中在产单宁酶的菌株筛选上, 对产单宁酶的菌株进行诱变以获取高产菌株。另外, 对单宁酶的应用也主要是以粗酶形式, 或者直接以发酵后的菌体作为单宁酶使用, 由于粗酶或者菌体直接作用可能存在细菌污染, 限制了单宁酶的应用。

前期研究中, 本课题组通过基因重组表达的方式将乳酸杆菌中的单宁酶基因以及链霉菌中的单宁酶的基因进行克隆, 并用大肠杆菌 BL21-DE3 进行表达, 最终获得高产量的单宁酶, 并且保持了较高的酶活性<sup>[17,19]</sup>。与传统的单宁酶生产方式相比, 更易于获得高纯度的单一的单宁酶, 有利于单宁酶的工业化应用, 但是能够用于重组表达的单宁酶仍然很少。



黑色下划线表示单宁酶的活性中心保守序列; 黑色矩形表示三明治结构及存在的差异位点。

图 4 乳酸杆菌单宁酶 (*Lp-tan*) 与路邓葡萄球菌单宁酶 (*Sl-tan*) 的氨基酸序列比对分析

表 1 突变前后 *Sl-tan* 的活性比较

酶构型	酶比活力/(U·mg <sup>-1</sup> )	百分比/%
<i>Sl-tan</i>	40	100.00
<i>Sl-tan</i> (A460P)	73	182.50

本文通过基因工程方法将 *Sl-tan* 基因进行克隆, 并在大肠杆菌 BL21-DE3 中进行成功表达, 获得了高产量的 *Sl-tan* (42 mg/L 菌液)。对 *Sl-tan* 的活性研究显示, 其在 pH 8.0, 温度 40 °C 的条件下具有最高活性, 但进一步的活性测定结果显示其活性较低 (40 U/mg)。在之前的研究中, 我们报道了 *Lp-tan* 的晶体结构, 并对单宁酶的水解机制进行了解析<sup>[20]</sup>。通过对 *Sl-tan* 与 *Lp-tan* 的氨基酸序列比对发现, 两种单宁酶的序列相似度只有 21.9%, 但是两种

单宁酶具有相同的活性中心序列, 进一步比对发现, 在 *Lp-tan* 中形成的有利于底物结合的 Pro356-底物-Ile206 三明治的结构, 在 *Sl-tan* 中被 Ala460-底物-Ile271 所替代 (见图 4)。因此, 本文利用定点突变技术在 *Sl-tan* 中将 Ala460 突变为 Pro460, 重建三明治结构, 活性测定结果显示突变后的 *Sl-tan* 活性提高了 82.5%, 研究结果也进一步说明了在单宁酶中形成的三明治结构有利于底物没食子酸甲酯的结合。

## 5 结束语

本研究通过化学合成的方法获得了 *Sl-tan* 的基因, 并构建原核表达质粒使其在大肠杆菌中表达, 获得了高产量、高纯度的 *Sl-tan*。对 *Sl-tan* 定点突变 (Ala460 突变为 Pro460) 重建三明治结构后, 使

SI-tan 的活性提高了 82.5%，使其能够更好地应用于工业化生产实际。

### 参考文献

- [1] WHITE T. Tannins—their occurrence and significance[J]. *J Sci Food Agric*, 1957, 8(7): 377-385.
- [2] BAXTER N J, LILLEY T H, HASLAM E, et al. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(18): 5566-5577.
- [3] BELUR P D, MUGERAYA G, NIRMALA K R, et al. Production of novel cell-associated tannase from newly isolated *Serratia ficaria* DTC[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(4): 732-736.
- [4] BLTLER L G. Anti-nutritional effects of condensed and hydrolysable tannins[J]. *Basic Life Sci*, 1992, 59: 693-698.
- [5] SHARMA S, BHAT T K, DAWRA R K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodamine[J]. *Anal Biochem*, 2000, 279(1): 85-89.
- [6] AGUILAR C N, RODRIGUEZ R, GUTIERREZ-SANCHEZ G, et al. Microbial tannases: advances and perspectives[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(1): 47-59.
- [7] HASLAM E, STANGROOM J E. The esterase and depsidase activities of tannase[J]. *Biochem J*, 1966, 99(1): 28-31.
- [8] LOPES L, COSTA B, GOUVEIA M J, et al. Kinetic and thermodynamic parameters, and partial characterization of the crude extract of tannase produced by *Saccharomyces cerevisiae* CCMB 520[J]. *Nat Prod Res*, 2018, 32(9): 1068-1075.
- [9] TSAI C L, CHIU Y M, HO T Y, et al. Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(4): 2057-2067.
- [10] LI R, FU F G, LIU C, et al. Tannase immobilisation by amino-functionalised magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles and its application in tea infusion[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, Mar 16, 114: 1134-1143.
- [11] 宁井铭, 方世辉, 夏涛, 等. 酶澄清绿茶饮料研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(9): 122-124.
- [12] LEKHA P K, LONSANE B K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art[J]. *Adv Appl Microbiol*, 1997, 44: 215-260.
- [13] RODRIGUEZ-DURAN L V, VALDIVIA-URDIALES B, CONTRERAS-ESQUIVEL J C, et al. Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase[J]. *Enzyme Res*, 2011, 2011(1): 823619.
- [14] WU C, ZHANG F, LI L, et al. Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11(1): 92.
- [15] VARADHARAJAN V, VADIVEL S S, RAMASWAMY A, et al. Modeling and verification of process parameters for the production of tannase by *Aspergillus oryzae* under submerged fermentation using agro-wastes[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 64(1): 100-109.
- [16] IWAMOTO K, TSURUTA H, NISHITAINI Y, et al. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (T)[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2008, 31(4): 269-277.
- [17] WU M, PENG X, WEN H, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of tannase from *Lactobacillus plantarum*[J]. *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(Pt4): 456-459.
- [18] SUZUKI K, HORI A, KAWAMOTO K, et al. Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad[J]. *Proteins*, 2014, 82: 2857-2867.
- [19] WU M, WANG Q, MCKINSTRY WJ, et al. Characterization of a tannin acyl hydrolase from *Streptomyces sviveus* with substrate preference for digalloyl ester bonds[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(6): 2663-72.
- [20] REN B, WU M, WANG Q, et al. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(15): 2737-2751.

(编辑:莫婕)