杨淼, 马志远, 李延啸, 等. 大曲中拜赖青霉发酵产单宁酶条件优化、纯化及酶学性质分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(8): 212−220. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030409

YANG Miao, MA Zhiyuan, LI Yanxiao, et al. Optimization of Fermentation Conditions for Tannase Production by *Penicillium bilaiae* from Daqu, and Its Purification and Analysis of Enzymatic Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(8): 212−220. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030409

·生物工程·

大曲中拜赖青霉发酵产单宁酶条件优化、纯化及酶学性质分析

杨　淼[1], 马志远[1], 李延啸[1,2], 江正强[3], 王旭亮[4,5], 闫巧娟[1,*]

（1.中国农业大学工学院, 北京 100083;
2.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏南京 210023;
3.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;
4.江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122;
5.贵州茅台集团, 贵州遵义 564501）

摘　要: 目的：为开发酶学性质优良的单宁酶资源。方法：采用透明圈平板筛选法初筛和甲醇罗丹宁比色法复筛，从大曲样品中筛选得到一株单宁酶活力最高的真菌，通过形态学观察和 ITS 序列测定进行菌种鉴定。优化了该菌株液体发酵产单宁酶的条件，经硫酸铵沉淀和 DEAE 弱阴离子交换层析两步纯化，得到电泳级纯酶 *Pb*TanA。进一步探究 *Pb*TanA 的酶学性质，最后评价了 *Pb*TanA 在水解单宁酸生成没食子酸中的应用效果。结果：筛选出的菌株经鉴定为拜赖青霉（*Penicillium bilaise*），命名为拜赖青霉 CAU46-1。以 3% 单宁酸为诱导物，4% 小麦麸皮为碳源，0.2% 氯化铵为氮源，30 ℃、pH5.5 条件下发酵 4 d，发酵液单宁酶活力达 28.7 U/mL，较优化前提高了 3.3 倍。*Pb*TanA 的分子量为 79.0 kDa。该酶具有良好的耐酸性和热稳定性，最适 pH 为 5.0，在 pH2.0~7.0 范围内稳定；最适温度为 60 ℃，50 ℃ 下具有良好的温度稳定性。单宁酶 *Pb*TanA 水解 20 g/L 单宁酸底物 8 h，没食子酸浓度达 18.4 g/L，得率为 91.8%。结论：拜赖青霉 CAU46-1 所产的单宁酶 *Pb*TanA 表现出优良的酶学特性，能够高效水解单宁酸生成没食子酸，具有良好的应用潜力。

关键词: 拜赖青霉, 单宁酶, 发酵条件, 酶学性质, 没食子酸

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)08−0212−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030409

本文网刊:

Optimization of Fermentation Conditions for Tannase Production by *Penicillium bilaiae* from Daqu, and Its Purification and Analysis of Enzymatic Properties

YANG Miao[1], MA Zhiyuan[1], LI Yanxiao[1,2], JIANG Zhengqiang[3], WANG Xuliang[4,5], YAN Qiaojuan[1,*]

（1.College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2.College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210023, China;
3.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
4.School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
5.Kweichow Moutai Group, Zunyi 564501, China）

Abstract: Objective: To develop tannases resources with excellent enzymatic properties. Methods: Primary screening was

收稿日期: 2025−04−01

基金项目: 国家重点研发计划项目（2021YFC2103004）。

作者简介: 杨淼（2000−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏工程, E-mail: myang@cau.edu.cn。

*** 通信作者:** 闫巧娟（1971−）, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: yanqj@cau.edu.cn。

performed using the clear zone plate method, followed by a secondary screening using the methanol rhodanine colorimetric assay. A fungal strain with the highest tannase activity was isolated from the Daqu samples. The strain was identified through morphological observation and ITS sequence analysis. The liquid fermentation conditions for tannase production were optimized. The enzyme (*Pb*TanA) was purified through ammonium sulfate precipitation and DEAE weak anion-exchange chromatography, obtaining electrophoretic-grade pure enzyme. The enzymatic properties of *Pb*TanA were further investigated, and its application in hydrolyzing tannic acid to produce gallic acid was evaluated. Results: The strain was identified as *Penicillium bilaiae* and named *Penicillium bilaiae* CAU46-1. After fermentation at 30 ℃ and pH5.5 for 4 days, a tannase activity of 28.7 U/mL was produced. This was achieved under conditions where 3% tannic acid served as inducer, 4% wheat bran as carbon source, and 0.2% ammonium chloride as nitrogen source, resulting in a tannase activity 3.3 times higher than the initial level. The tannase (*Pb*TanA) was purified using ammonium sulfate precipitation followed by DEAE weak anion exchange chromatography. Its molecular weight was 79.0 kDa. The enzyme exhibited good acid tolerance and thermal stability, with an optimal pH of 5.0 and good stability within the pH range of 2.0~7.0. Its optimal temperature was 60 ℃, and it remained stable up to 50 ℃. *Pb*TanA hydrolyzed 20 g/L tannic acid for 8 h, producing a gallic acid concentration of 18.4 g/L with a yield of 91.8%. Conclusion: Tannase *Pb*TanA from *Penicillium bilaiae* CAU46-1 showed excellent enzymatic properties and efficiently hydrolyzed tannic acid to produce gallic acid, demonstrating its potential for application.

Key words: *Penicillium bilaiae*; tannase; fermentation conditions; enzymatic properties; gallic acid

单宁广泛分布于植物的叶、皮、根及果实等组织中，其分子中含有大量的酚羟基，能够与金属离子和蛋白质形成稳定的络合物[1]。单宁酶（EC 3.1.1.20）可以催化单宁中酯键的水解，生成没食子酸和其它酚类物质，在植物的代谢调控中具有重要作用，同时在工业领域中也具有广泛应用，例如用于高效制备没食子酸等[2]。单宁酶在动物、植物和微生物中普遍存在，其中微生物是单宁酶最主要的来源，如细菌、酵母菌和丝状真菌（如曲霉属和青霉属）均存在单宁酶[3]。野生型微生物发酵产单宁酶的生产水平通常较低，如烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）AN1 和皮壳青霉（*Penicillium crustosum*）AN3 的产酶水平分别为 4.3 U/mL 和 8.4 U/mL[4]。优化野生型微生物的发酵条件可显著提高产单宁酶水平，例如通过优化黑曲霉（*Aspergillus niger*）J-T18 和灰绿青霉（*Aspergillus glaucus*）的发酵产单宁酶条件，产单宁酶水平得到明显提升[5−6]。多数单宁酶在高温和酸性环境下的稳定性差，难以满足不同的应用需求，如地丝菌属酵母（*Geotrichum cucujoidarum*）来源单宁酶在 40 ℃ 下处理 30 min，残留酶活力低于 40%[7]；黑绿青霉（*Penicillium atramentosum*）EZ-ZH190 来源单宁酶在 pH3.5 下处理 30 min，残留酶活力小于 35%[8]。因此，发掘产酶水平高、酶学性质好的野生型微生物是目前研究单宁酶的重点之一。

大曲是中国白酒酿造过程中不可或缺的传统发酵剂，其核心功能源于复杂的微生物群落及酶系协同作用。微生物通过分泌酶类将原料中的淀粉、蛋白质、脂肪和单宁等大分子物质降解为氨基酸、脂肪酸及酚类化合物等风味前体物质[9]。酿酒原料高粱中丰富的单宁底物可在单宁酶的酶促作用下转化为酚类化合物，如愈创木酚（水果香）、4-乙烯基愈创木酚（花香）和 4-甲基愈创木酚（烟熏风味），从而赋予白酒独特的风味特征[10]。已有研究报道，从大曲中分离出产单宁酶菌株烟曲霉 HBHF5[11]。大曲中筛选微生物，利用其丰富的微生物资源，为产单宁酶菌株的挖掘开辟了新的方向。

没食子酸是一种天然酚类化合物，存在于多种水果和药用植物中，具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等特性，在食品和制药工业中具有广泛的应用[12]。相比传统化学方法，生物酶法制备没食子酸因其反应条件温和、产物纯度高和产率高以及对环境友好等优势，普遍认为是替代传统化学方法的绿色工艺，成为研究热点[13]。不同底物浓度对酶法制备没食子酸的生成量和产率影响显著，黑曲霉 B1401 来源的单宁酶水解单宁酸生成的没食子酸浓度随底物量增加先上升后下降，没食子酸产率则呈现下降趋势[14]。汉森隐球菌（*Debaryomyces hansenii*）来源单宁酶以 10 和 20 g/L 单宁酸为底物的没食子酸产率分别为 97% 和 92%，而 30 g/L 单宁酸为底物的没食子酸产率则降至 81%[15]。因此，研究底物浓度对没食子酸生成量和产率的影响，有助于优化酶法制备工艺，提升产物生成量。

本研究旨在从大曲样品中筛选得到一株高产单宁酶的微生物，优化其发酵产酶条件，并评估该酶的酶学性质、水解特性及其在酶法制备没食子酸中的应用潜力。研究充分挖掘了大曲微生物资源，拓宽了产单宁酶的微生物来源，并提供了一种酶学性质优良并能够高效水解单宁酸生成没食子酸的新型单宁酶资源。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大曲样品　来自某酒厂，并保存于本实验室；没食子酸丙酯、单宁酸　上海源叶生物科技有限公司；蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、甘氨酸　美国 Sigma 公司；酵母提取物、蛋白胨、马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基　英国 Oxoid 公司；真菌基因组 DNA 提取试

剂盒　北京百泰克生物技术有限公司；其它试剂如无特殊说明均为国产分析纯。

OPTEC BK5000 奥特光学生物显微镜　重庆奥特光学仪器有限公司；Power Pac Basic TM 型电泳仪　美国 BIO-RAD 公司；纤维素 DEAE-52 柱料　北京索莱宝科技有限公司；ÄKTA explorer 100 System 蛋白纯化系统　美国 GE Healthcare 公司；Gel Plate F254 薄层层析　德国 Merck 公司；GL-20B 高速冷冻离心机　上海安亭科学仪器厂。

1.2　实验方法

1.2.1　培养基制备　平板筛选培养基(w/v)：单宁酸 1%，$NaNO_3$ 0.3%，KCl 0.05%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%，$FeSO_4·7H_2O$ 0.001%，琼脂 3%。

摇瓶复筛培养基(w/v)：单宁酸 3%，麸皮 4%，氯化铵 0.2%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.1%，NaCl 0.05%。

液体发酵培养基(w/v)：单宁酸 1%，蔗糖 1%，$NaNO_3$ 0.2%，KCl 0.05%，$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%，KH_2PO_4 0.1%，$FeSO_4$ 0.001%。

1.2.2　产单宁酶菌株的筛选　大曲样品粉碎后取 5 g 放入 250 mL 锥形瓶中，加入 45 mL 无菌水 30 ℃、200 r/min 下振荡培养 24 h。吸取 100 μL 涂布于不同 pH 的平板筛选培养基，在不同温度下培养 3~4 d，通过产单宁酶的真菌能够利用单宁酸为唯一碳源生长并形成透明圈的特性，进行初步筛选。用牙签挑取平板筛选培养基上产生透明圈的菌落，接种于 PDA 培养基中，得到纯化菌株。刮取 PDA 培养基的菌落孢子制成悬浮液，接种于 50 mL 复筛培养基中，调节 pH 为 5.0，30 ℃、200 r/min 下培养 3 d。发酵液在 4 ℃、12000 r/min 下离心 10 min，收集上清液为粗酶液，使用甲醇罗丹宁比色法测定其单宁酶活力，进行复筛。

1.2.3　菌种鉴定　菌株接种到 PDA 培养基上，置于 30 ℃ 培养箱中培养 7 d，观察记录菌落的形态特征。乳酸酚棉蓝染液染色，制片，用光学显微镜(200×)观察。参考《真菌鉴定手册》[16] 对菌株进行初步分类鉴定。

使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA，采用 rDNA ITS 基因序列鉴定，通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。扩增的 ITS 基因区域包括 ITS1、5.8S rRNA 基因和 ITS2。PCR 反应条件为：95 ℃，3 min；94 ℃，25 s，55 ℃，25 s，72 ℃，45 s，34 个循环；72 ℃，5 min。PCR 扩增产物委托北京擎科生物科技股份有限公司测序，将测序结果在 NCBI 网站利用 BLAST 程序(http://www.ncbi.nlm.gov/blast/)进行对比，选取其中得分较高的菌株序列，使用 MEGA 11.0 软件基于最大似然法构建菌株系统发育树。

1.2.4　单宁酶活力和蛋白含量测定　采用甲醇罗丹宁比色法测定单宁酶活力[17]。取适当稀释的酶液 250 μL 与 250 μL 没食子酸丙酯溶液(100 mmol/L 柠檬酸缓冲液 pH5.0)混匀，60 ℃ 下反应 5 min 后加入 300 μL 甲醇-罗丹宁溶液(0.667%)终止反应，反应液中加入 200 μL KOH 溶液(700 mmol/L)显色，再加入 4 mL 纯水，在 520 nm 波长下测定吸光度。以同等稀释倍数下沸水灭活的酶液作对照组，实验组平行测定 3 次，结果取平均值。单宁酶活力定义为以每分钟水解没食子酸丙酯底物生成 1 μmol 没食子酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。蛋白含量参照 Lowry 法测定，以牛血清蛋白作为标准蛋白[18]。

1.2.5　拜赖青霉发酵产单宁酶条件优化　发酵产单宁酶条件优化在 250 mL 三角瓶中进行，装液量 20%，拜赖青霉的孢子浓度稀释为 10^7 个/mL，接种量为 1%，转速为 200 r/min。在液体发酵培养基的基础上，采用单因素优化的方法，依次对诱导物种类(单宁酸、没食子酸、没食子酸丙酯、石榴皮粉)和浓度(0%、0.5%、1%、2%、3% 和 4%，w/v)、发酵培养基的碳源种类(可溶性淀粉、小麦麸皮、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖)和浓度(0.5%、1%、2%、3%、4% 和 5%，w/v)、氮源种类(酵母提取物、胰蛋白胨、玉米浆、硫酸铵、亚硝酸钠、磷酸氢二铵、氯化铵、硝酸钠)和浓度(0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 和 0.5%，w/v)、发酵温度(25、30、35、40、45 和 50 ℃)、发酵 pH(3.0、3.5、4、4.5、5.0、5.5 和 6.0)和发酵时间(1、2、3、4 和 5 d)进行优化。发酵结束后，收集发酵液，测定单宁酶活力。

1.2.6　单宁酶的纯化　发酵液置于冰水浴中进行 80% 硫酸铵沉淀，12000 r/min 离心 10 min 收集上清液。上清液在 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)中 4 ℃ 透析过夜，上样于 DEAE-52 阴离子交换层析柱，用 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)洗涤未结合蛋白，用 0~100% 的含 500 mmol/L NaCl 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)线性梯度洗脱 90 min，分步收集洗脱液。使用ÄKTA explorer 100 System 蛋白纯化系统进行纯化，流速为 1 mL/min。收集有单宁酶活力的洗脱液，在 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)中 4 ℃ 透析过夜，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测单宁酶纯度。

1.2.7　SDS-PAGE 及酶谱分析　常规 SDS-PAGE 电泳的分离胶浓度为 12.5%，浓缩胶为 4.5%，在样品中加入还原性 5×蛋白上样缓冲液，煮沸 10 min，上样量 20 μL，120 V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂到达凝胶底部。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色。酶谱方法除在样品中加入非还原性 5×蛋白上样缓冲液直接上样外，电泳条件同常规 SDS-PAGE 电泳条件。电泳结束后，取一半分离胶进行常规 SDS-PAGE 分析，另一半分离胶在 100 mL 的曲拉通 X-100(1%，v/v)中浸泡 1 h，用 100 mL 乙酸盐缓冲液(500 mmol/L，pH5.5)浸泡 30 min。处理后的分离胶置于 50 mL 含有 0.5%(w/v)单宁酸的乙酸盐缓冲液(500 mmol/L，

pH5.5）中，于 45 ℃ 孵育 15 min。用不含单宁酸的乙酸缓冲液清洗凝胶，在 25 ℃ 用 0.5%(w/v)盐酸奎宁溶液浸泡分离胶直至显色，两块胶进行对比分析。

1.2.8　单宁酶 *Pb*TanA 的酶学性质

1.2.8.1　最适 pH 测定　用不同 pH 缓冲液（50 mmol/L）稀释酶液，在 60 ℃ 下按照方法 1.2.4测定酶活力，以最大值为 100%，分别计算各 pH 下的相对酶活力。所用缓冲液及 pH 范围分别为：甘氨酸-盐酸缓冲液（pH2.0、2.5 和 3.0）、柠檬酸缓冲液（pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0）、MES 缓冲液（pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0）、磷酸缓冲液（pH6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0）和 MOPS 缓冲液（pH8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0）。

1.2.8.2　pH 稳定性测定　分别用上述不同 pH 缓冲液（50 mmol/L）稀释酶液，在 40 ℃ 下处理 30 min，立即冰水浴 30 min，按照方法 1.2.4 测定酶活力，以未处理的酶液为对照，计算不同处理后的相对酶活力。

1.2.8.3　最适温度测定　用 pH5.0 的柠檬酸缓冲液（50 mmol/L）稀释酶液，在不同温度（20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 和 80 ℃）下按照方法 1.2.4 测定酶活力，以最大值为 100%，分别计算各温度下的相对酶活力。

1.2.8.4　温度稳定性测定　用 pH5.0 的柠檬酸缓冲液（50 mmol/L）稀释酶液，分别在不同温度（20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 和 80 ℃）下处理 30 min，立即冰水浴 30 min，按照方法 1.2.4 测定酶活力，以未经热处理的酶液为对照，计算不同处理后的相对酶活力。

1.2.8.5　金属离子和化合物对酶活力的影响　酶反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的金属离子（Fe^{3+}、Fe^{2+}、Cr^{3+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Ba^{2+}、Ag^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Sr^{2+}、Mg^{2+}、Cu^{2+}）和化合物（曲拉通 X-100、EDTA、SDS、β-巯基乙醇）处理 30 min，立即冰水浴 30 min，按照方法 1.2.4 测定酶活力，以未添加任何金属离子和化合物的反应为对照组，计算不同处理后的相对酶活力。

1.2.9　单宁酶 *Pb*TanA 的水解特性和水解单宁酸制备没食子酸　水解特性：用柠檬酸缓冲液（50 mmol/L，pH5.0）配制单宁酸溶液（1 g/L），加入 1 U/mL 的单宁酶 *Pb*TanA，在 40 ℃ 下反应，分别于 0、15、30 min 和 1、2、4、8、12 h 取样，沸水浴 5 min 终止酶反应。使用 TLC 层析法定性检测水解效果，TLC 方法：展开剂为乙酸乙酯∶三氯甲烷∶甲酸=4∶4∶1，显色剂为 0.1%(w/v)$FeCl_3$ 溶液（溶剂为甲醇）。利用高效液相色谱测定没食子酸（GA）生成量，计算没食子酸的得率。高效液相色谱条件为：C_{18} 色谱柱，柱温箱 35 ℃，紫外检测器 $OD_{278\ nm}$，进样量 10 μL，流动相 A 为 1%(v/v)乙酸，B 为 100% 乙腈，流速为 1 mL/min。洗脱过程为：1% B 平衡 10 min，在 0~5 min 内 B 从 1% 增加到 10%，在 5~20 min 内 B 从 10% 增加到 35%，在 20~21 min 内 B 从 35% 减少到 10%，在 21~23 min 内 B 从 10% 减少到 1%，在 23~25 min 内，保持 1% B。没食子酸得率计算见下式。

$$\text{没食子酸得率}(\%)=\frac{\text{样品中没食子酸浓度}(g/L)}{\text{反应前单宁酸浓度}(g/L)}\times 100$$

1.3　数据处理

所有实验重复三次，数据为平均值±标准差。采用 SPSS 16.0 软件进行方差和显著性分析，采用 Tukey's HSD 检验，显著性水平 $P<0.05$。采用 Prism 9.5 和 Origin 2023 进行绘图。

2　结果与分析

2.1　大曲中高产单宁酶拜赖青霉的筛选和鉴定

采用透明圈平板筛选法初筛和甲醇罗丹宁比色法复筛，总计筛选出 5 株产单宁酶的菌株。其中一株产生较大透明圈的真菌 CAU46-1，甲醇罗丹宁比色法复筛的发酵液酶活力为 6.2 U/mL，酶活力最高，选定该菌株进行后续研究。

该真菌在 PDA 培养基上初期为白色绒状菌丝，后期产孢区渐变为青绿色，边缘保留白色菌丝带（图 1A）。显微镜（200×）显示该菌菌丝体细长、透明、有隔，分生孢子梗直立，顶端形成典型帚状枝，具单轮生分枝，分生孢子呈球形至亚球形，表面光滑，呈链状排列（图 1B）。对照真菌鉴定手册，初步确定该菌株为青霉属。

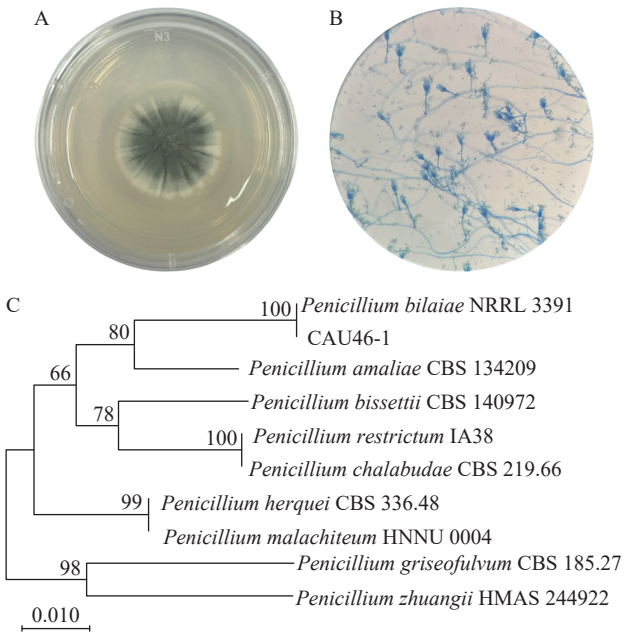


图 1　菌株 CAU46-1 菌落形态（A）、显微特征（B）和 ITS 序列系统发育树（C）

Fig.1　Colony morphology (A), microscopic characteristics (B) and phylogenetic tree of ITS sequences (C) for strain CAU46-1

对菌株 CAU46-1 进行 ITS 基因序列扩增，得到长度为 560 bp 的 ITS 区域序列，系统发育树分析表明，该菌 ITS 序列与拜赖青霉 NRRL 3391 聚于同一

进化支，相似度为 100%，与其他青霉物种明显分化，相似度均不高于 80%（图 1C）。综合菌落形态、显微特征和 ITS 序列，鉴定该菌为拜赖青霉，命名为拜赖青霉 CAU46-1。

2.2　拜赖青霉发酵产单宁酶条件优化

通过单因素实验对拜赖青霉 CAU46-1 液体发酵产单宁酶的条件进行优化。培养基组分优化结果表明（图 2），以单宁酸为诱导物时，拜赖青霉 CAU46-1 的产酶水平最高，为 6.2 U/mL，显著高于没食子酸丙酯和石榴皮粉（P<0.05），无诱导物或以没食子酸为诱导物时该菌不产单宁酶（图 2A）。诱导物浓度优化结果表明，发酵液中单宁酸浓度为 3% 时，菌株产酶水平显著高于其他浓度水平（P<0.05），为 10.2 U/mL（图 2B）。发酵碳源优化结果表明，以小麦麸皮为碳源时，菌株产酶水平最高，为 12.4 U/mL，显著高于其他四种碳源（P<0.05）（图 2C）。小麦麸皮浓度为 4%时菌株产酶水平最高，达 16.2 U/mL，显著高于其他浓度水平（P<0.05），继续提高小麦麸皮浓度，酶活水平显著下降（P<0.05）（图 2D）。发酵氮源优化结果表明，无机氮源比有机氮源更利于菌株产酶，其中以氯化铵为氮源时菌株产酶水平最高，为 16.9 U/mL（图 2E）。氯化铵浓度为 0.2% 时菌株产酶水平最高（17.0 U/mL），继续提高氯化铵浓度，产酶水平显著下降（P<0.05）（图 2F）。发酵参数优化结果如图 3 所示，该菌最适发酵温度为 30 ℃，在此温度下培养 3 d，菌株产酶水平为 17.3 U/mL，显著高于其他温度水平（P<0.05）（图 3A）。不同 pH 对拜赖青霉 CAU46-1 液体发酵产单宁酶的影响如图 3B，该菌最适发酵 pH 为 5.5，在此 pH 下培养 3 d，菌株产酶水平为 20.8 U/mL，显著高于其他 pH 水平（P<0.05）。在上述优化条件下，拜赖青霉 CAU46-1 液体发酵产单宁酶历程如图 3C，发酵 1~4 d 时，产酶水平持续提高，发酵 4 d 后，产酶水平达到最高值（28.7 U/mL）。综上，拜赖青霉 CAU46-1 液体发酵产单宁酶的最适条件为以 3% 单宁酸为诱导物、4% 小麦麸皮为碳源、0.2% 氯化铵为氮源，在 30 ℃、pH5.5 下发酵 4 d，产酶水平达 28.7 U/mL，较优化前提高了 3.3 倍。

单宁酶是一种诱导酶，野生型微生物发酵时需要添加单宁或含有单宁的其他物质作为诱导物诱导菌株产酶，多数野生型微生物的最适诱导物为单宁酸[3,19−20]。培养基中高浓度单宁酸会导致野生型微生物细胞表面蛋白质变性，损害野生型微生物的新陈代谢和生长，因此多数野生型微生物发酵产单宁酶时单宁酸的浓度在 0.5%~3.5% 范围内[3]，如黑曲霉 AUMC 5614 和黄曲霉（*Aspergillus flavus*）MTCC 3783 发酵产单宁酶时，分别以 2% 和 3.2% 单宁酸为最适诱导物[19−20]。小麦麸皮不仅可以作为碳源提供能量，还含有一些单宁和多酚类化合物，促进单宁酶的合成和分泌。除小麦麸皮外，其他富含单宁的农业副产物也常作为野生菌发酵的碳源，如虹色曲

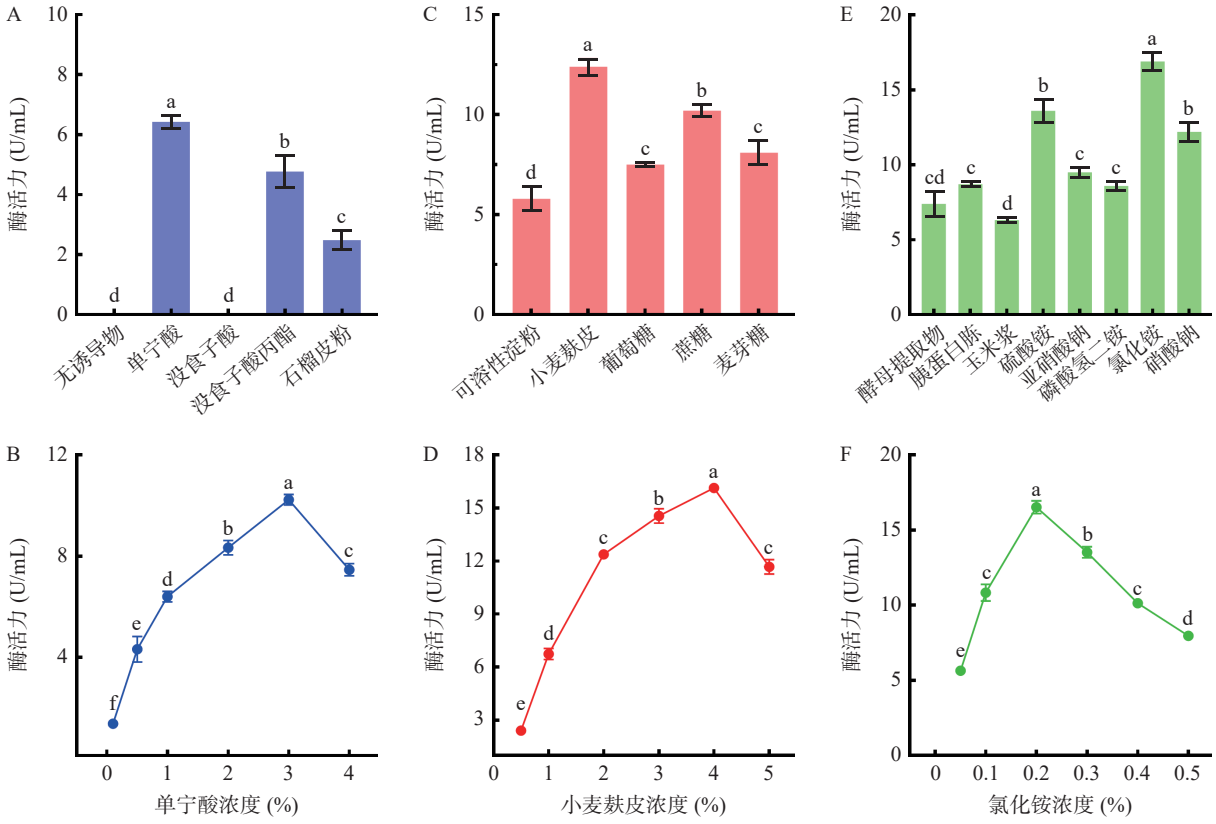


图 2　培养基组分对拜赖青霉 CAU46-1 发酵产酶的影响

Fig.2　Effect of culture medium components on enzyme production of *Penicillium bilaiae* CAU46-1

注：A: 诱导物筛选；B: 诱导物浓度优化；C: 碳源筛选；D: 碳源浓度优化；E: 氮源筛选；F: 氮源浓度优化；不同小写字母表示有显著性差异，P<0.05，图 3 同。

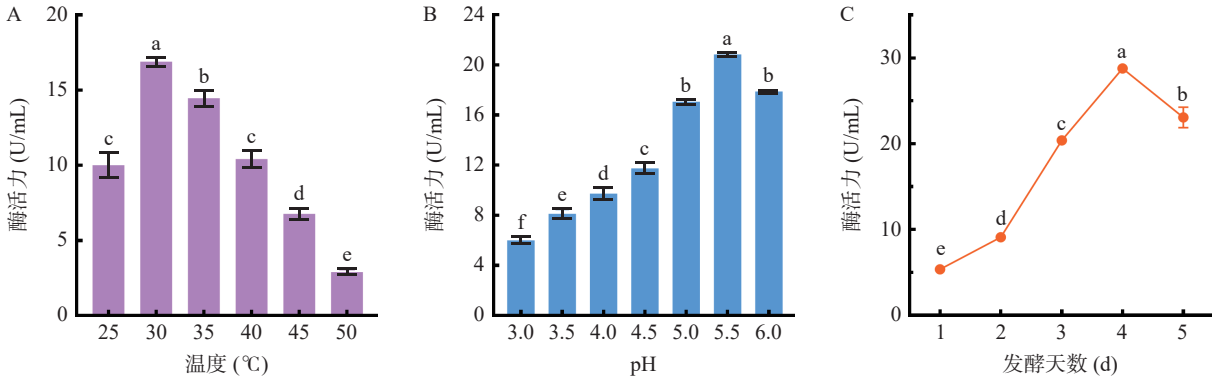


图 3　发酵参数对拜赖青霉 CAU46-1 发酵产酶的影响

Fig.3　Effect of fermentation parameters on enzyme production of *Penicillium bilaiae* CAU46-1

注：A：发酵温度优化；B：发酵 pH 优化；C：发酵时间优化。

霉（*Aspergillus versicolor*）、木贼镰刀菌（*Fusarium equiseti*）和桔青霉（*Penicillium citrinum*）能够利用菠萝皮和金合欢果实作为碳源发酵产单宁酶[21]。氮源是影响野生型微生物产单宁酶的另一关键因素。无机氮源更适合真菌发酵产单宁酶，如黑曲霉 J-T18 和黑曲霉 AUMC 5614 分别以硫酸铵和硝酸钠为氮源达到最高产酶水平[5,19]。产单宁酶野生型微生物的最适发酵温度与菌株的生长环境密切相关，大多在 25~40 ℃ 范围内，如灰绿青霉（*Aspergillus glaucus*）和罗尔夫青霉（*Penicillium rolfsii*）CCMB 714 发酵产单宁酶的最适温度分别为 40 ℃ 和 30 ℃[6,22]。不同野生型微生物发酵产单宁酶的最适 pH 不同，大多数野生型微生物发酵产单宁酶的最适 pH 为酸性至中性范围。野生型丝状真菌发酵产单宁酶的最适 pH 则偏酸性，如黑曲霉 AUMC 5614 和泡盛曲霉（*Aspergillus awamori*）BTMFW 032 发酵产酶的最适 pH 为 4.0 和 5.0[18,23]。不同类型的野生型微生物的产单宁酶水平存在差异，野生型细菌和野生型酵母菌的产酶水平较低，而野生型丝状真菌产酶水平较高。地丝菌属酵母和肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）YL-1 经发酵优化后产酶水平分别为 4.4 U/mL 和 0.8 U/mL [7,24]。黑曲霉 AUMC 5614 和泡盛曲霉 BTMFW 032 经发酵优化后产酶水平分别为 11.6 U/mL 和 26.2 U/mL [18,23]。青霉属液体发酵产单宁酶水平通常在 5~40 U/mL 之间。经发酵优化后，拜赖青霉 CAU46-1 产单宁酶水平达 28.7 U/mL，高于皮壳青霉 AN3 和罗尔夫青霉 CCMB 714 发酵优化后的产单宁酶水平，分别为 8.4 U/mL 和 25.6 U/mL[4,22]，仅次于产紫青霉（*Penicillium purpurogenum*）产单宁酶水平（40.0 U/mL）[25]。

2.3　单宁酶 *Pb*TanA 的纯化

经硫酸铵沉淀和阴离子交换层析纯化得到单宁酶 *Pb*TanA 的电泳级纯酶，比酶活力为 34.2 U/mg，酶活力回收率为 19%，纯化倍数为 8.9（表 1）。SDS-PAGE 和酶谱对照确定其具有单宁酶活性，该酶呈单一蛋白条带，分子量为 79.0 kDa（图 4）。

不同来源单宁酶的分子量存在显著差异，细菌来源单宁酶一般分子量较小（31~90 kDa），而真菌来源单宁酶通常在 45~320 kDa 范围内[2]。*Pb*TanA 的分子量高于地丝菌属酵母来源单宁酶（63 kDa）[7] 和黑曲霉 NL112 来源单宁酶（45 kDa）[26]，但低于黑曲霉 LCF 8 来源单宁酶（168 kDa）[27] 和米曲霉（*Aspergillus oryzae*）来源单宁酶（106 kDa）[28]。

表 1　拜赖青霉 CAU46-1 单宁酶纯化

Table 1　Purification summary of tannase from *Penicillium bilaiae* CAU46-1

纯化步骤	总酶活力（U）	总蛋白含量（mg）	比酶活力（U/mg）	纯化倍数	回收率（%）
粗酶液	902.4	235	3.8	1	100
硫酸铵沉淀	478.3	40.8	11.7	3.1	53
DEAE-52	171.4	5.0	34.2	8.9	19

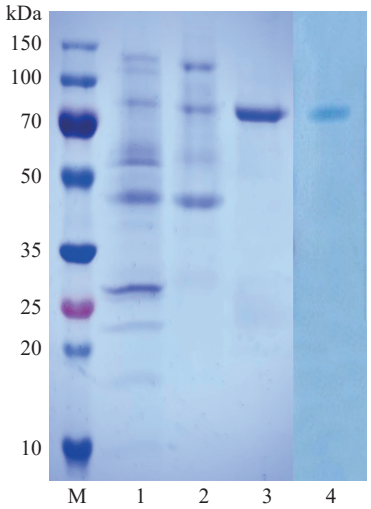


图 4　拜赖青霉 CAU46-1 单宁酶 *Pb*TanA 的纯化和酶谱分析

Fig.4　Purification and zymogram analysis of tannase (*Pb*TanA) from *Penicillium bilaiae* CAU46-1

注：M：Marker；1：粗酶液；2：80% 硫酸铵沉淀后；3：DEAE 柱纯化后；4：酶谱分析。

2.4　单宁酶 *Pb*TanA 的酶学性质

*Pb*TanA 的最适 pH 为 5.0（图 5A），在 pH2.0~7.0 下处理 30 min 仍能保留 80% 以上的酶活力（图 5B）。*Pb*TanA 的最适温度为 60 ℃（图 5C），在

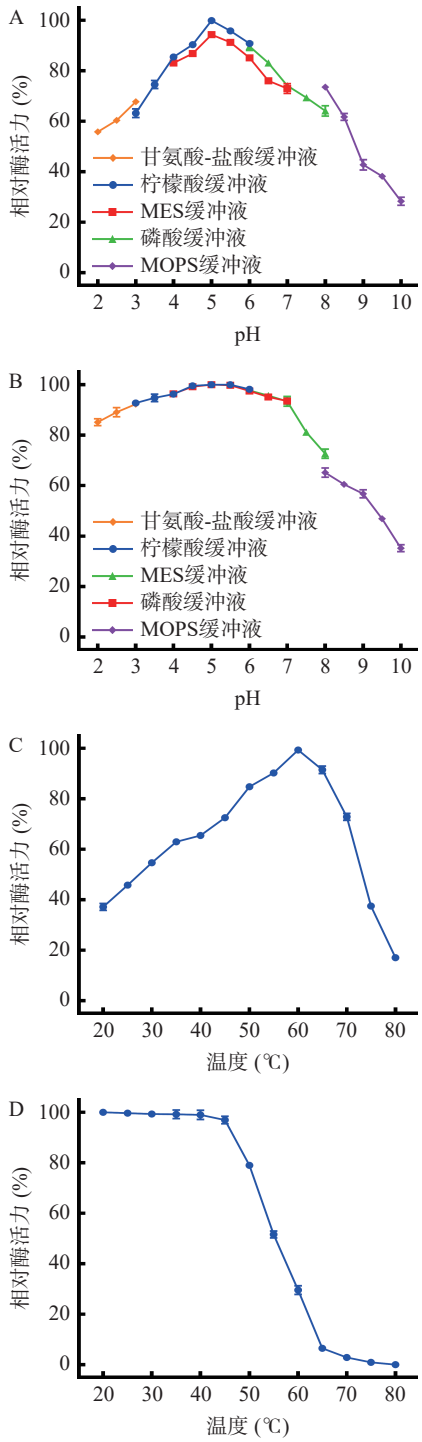


图 5　*Pb*tanA 的最适 pH(A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)

Fig.5　Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C), and temperature stability (D) of *Pb*tanA

45 ℃ 以下处理 30 min 能够保留 90% 以上的酶活力，在 50 ℃ 下处理 30 mim 仍保留 70% 以上的酶活力，具有良好的热稳定性(图 5D)。不同金属离子及化合物对 *Pb*TanA 酶活力影响不同(表 2)，金属离子 Ag^{+}、Cu^{2+}对 *Pb*TanA 的酶活力有明显抑制作用，酶活力分别下降至 66.5% 和 61.4%；Co^{2+}、Mn^{2+}和 Fe^{2+}对酶活力有明显促进作用，酶活力分别提高至 116.5%、112.5% 和 111.5%。EDTA 处理对 *Pb*TanA 酶活力影响较小，而 SDS 和 *β*-巯基乙醇几乎完全抑制 *Pb*TanA 的活性。

表 2　金属离子和化合物对单宁酶 *Pb*tanA 酶活力的影响

Table 2　Effects of metal ions and compounds on the enzymatic activity of *Pb*tanA

金属离子及化合物(1 mmol/L)	比酶活(U/mg)	相对酶活力(%)
对照	34.2±0.7	100.0
Fe^{3+}	38.0±0.3	111.0
Fe^{2+}	38.1±0.2	111.5
Cr^{3+}	32.0±0.2	93.5
Ni^{2+}	35.6±0.3	104.0
Zn^{2+}	31.1±0.3	91.0
Mn^{2+}	38.5±0.2	112.5
Co^{2+}	39.8±0.2	116.5
Ba^{2+}	34.5±0.3	101.0
Ag^{+}	22.7±0.5	66.5
K^{+}	37.4±0.2	109.5
Ca^{2+}	33.7±0.2	98.5
Sr^{2+}	33.9±0.7	99.0
Mg^{2+}	34.2±0.3	100.0
Cu^{2+}	21.0±0.5	61.4
Triton X-100	33.7±0.2	98.5
EDTA	25.0±0.7	73.0
SDS	4.4±0.3	13.0
β-巯基乙醇	1.9±0.2	5.5

真菌来源单宁酶通常在酸性条件下具有较高的催化活性，如黑绿青霉 EZ-ZH190 和黑曲霉 NL112 来源的单宁酶，最适 pH 分别为 5.5 和 5.0[8,26]。*Pb*TanA 在酸性环境下具有良好的稳定性，在 pH3.0 下处理 30 min 仍保留 80% 以上的酶活力，优于黑绿青霉 EZ-ZH190 来源单宁酶(在 pH3.5 下处理 30 min 残留酶活力小于 35%)和红绶曲霉(*Aspergillus nomius*) GWA5 来源单宁酶(在 pH4.0下处理 30 min 残留酶活力小于 50%)[8,29]。单宁酶 *Pb*TanA 最适温度为 60 ℃，明显高于地丝菌属酵母来源单宁酶(30 ℃)和青绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)来源单宁酶(40 ℃)[7,30]。此外，单宁酶 *Pb*TanA 具有良好的热稳定性，高于黄曲霉 TF-8 来源的单宁酶(在 50 ℃ 下处理 30 mim，残留酶活力小于 40%)[31]，但低于黑叶短梗霉(*Aureobasidium melanogenum*)T9 来源单宁酶(55 ℃ 下处理 12 h，能保留 60% 以上的酶活力)[32]。不同金属离子对单宁酶的影响不同，如 Mn^{2+}可以抑制路黑曲霉 ATCC 16620 来源单宁酶的酶活力，却促进单宁酶 *Pb*TanA 的酶活力[33]。EDTA 处理后，单宁酶 *Pb*TanA 的残留酶活力为 73%，表明 EDTA 抑制对 *Pb*TanA 产生了一定的抑制作用，这与罗尔夫青霉 CCMB 714 来源单宁酶的酶学性质一致[34]。SDS 和 *β*-巯基乙醇显著抑制 *Pb*TanA 的酶活力，表明该酶的催化功能依赖于分子内二硫键的稳定[35]。*Pb*TanA 具有良好的耐酸性和热稳定性，且对多种金属离子具有良好的耐受性，具备良好的应用潜力。

2.5　单宁酶的水解特性和水解单宁酸制备没食子酸

单宁酶 *Pb*TanA 水解单宁酸历程如图 6 所示。

*Pb*TanA 能够高效水解单宁酸，随着反应进行，产物没食子酸的生成量逐渐增多，以 10、20 和 30 g/L 单宁酸为底物，利用 *Pb*TanA 反应 8 h 后没食子酸的浓度分别为 9.3 g/L、18.4 g/L 和 24.5 g/L，得率分别为 93.1%、91.8%、81.7%（图 7）。

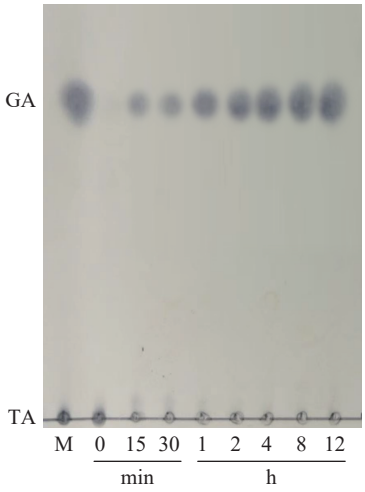


图 6　单宁酶 *Pb*tanA 水解单宁酸的 TLC 图

Fig.6　TLC for hydrolysis of tannic acid by *Pb*TanA

注：M：标准品；GA：没食子酸；TA：单宁酸。

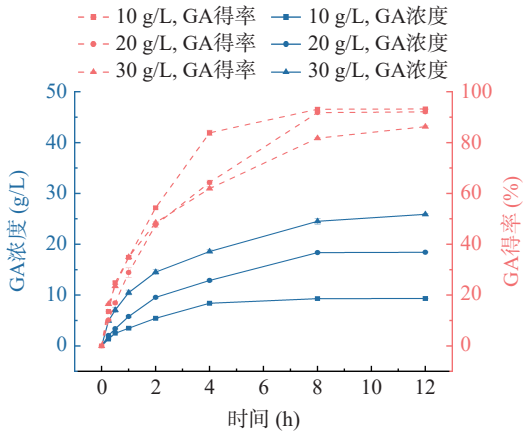


图 7　单宁酶 *Pb*tanA 水解不同浓度单宁酸生成没食子酸

Fig.7　Hydrolysis of gallic acid production from various concentrations of tannic acid by *Pb*tanA

注：GA：没食子酸；TA：单宁酸；图例 10、20、30g/L 为 TA 浓度。

酶法制备没食子酸中，单宁酶作为关键催化剂，其水解特性和催化效率对生产效益具有决定性影响[13]。球形芽孢杆菌（*Bacillus sphaericus*）来源单宁酶以 50 g/L 单宁酸为底物反应 24 h，最终没食子酸得率为 90.8%[36]。汉森隐球菌来源单宁酶以 20 g/L 单宁酸为底物反应 10 h，最终没食子酸得率 91.6%[15]。*Pb*TanA 水解 20 g/L 单宁酸底物 8 h，没食子酸得率为 91.8%，具有更高的生成量和得率，且反应时间更短，在水解单宁酸制备没食子酸中表现出很大的应用潜力。

3　结论

本研究从大曲中分离出一株高产单宁酶的拜赖青霉 CAU46-1。确定了拜赖青霉 CAU46-1 液体发酵产单宁酶的最适发酵产酶条件，产单宁酶水平（28.7 U/mL），较优化前提高了 3.3 倍。两步纯化得到电泳级纯酶 *Pb*TanA，该单宁酶具有良好的耐酸性和热稳定性，能高效水解单宁酸生成没食子酸，水解 20 g/L 单宁酸底物 8 h，没食子酸得率为 91.8%，在水解单宁酸制备没食子酸中展现出很大的应用潜力。本研究充分利用大曲微生物资源，拓展了单宁酶来源，为酶法制备没食子酸提供了理论指导。后续研究将结合质谱分析和基因组学分析，鉴定单宁酶 *Pb*TanA 的基因序列，并实现其高效异源表达。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] ZHANG Liangliang, GUAN Qinhao, JIANG Jianchun, et al. Tannin complexation with metal ions and its implication on human health, environment and industry: An overview[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 127485.

[2] 詹晶晶, 潘虎, 杨辉, 等. 微生物源单宁酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 15−19. [ZHAN Jingjing, PAN Hu, YANG Hui, et al. Research progress on the tannase from microorganisms [J]. China Brewing, 2020, 39(12): 15−19.]

[3] LEKSHMI R, ARIF N S, THIRUMALAI V P, et al. 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[J]. Environmental Research, 2021, 201: 111625.

[4] THAKUR N, NATH A K, SHARMA A. Optimization of production conditions, isolation, purification, and characterization of tannase from filamentous fungi[J]. Folia Microbiologica, 2024, 69(5): 1123−1135.

[5] NIE Guangjun, YANG Xiaoran, LIU Hui, et al. N^+ ion beam implantation of tannase-producing *Aspergillus niger* and optimization of its process parameters under submerged fermentation[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 279−287.

[6] SAAD M M, SAAD A M, HASSAN H M, et al. Optimization of tannase production by *Aspergillus glaucus* in solid-state fermentation of black tea waste[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2023, 10(1): 73.

[7] THANGAVELU N, HUGAR P, BELUR P D. Production, purification and characterization of extracellular tannase from a newly isolated yeast, *Geotrichum cucujoidarum*[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2022, 16(4): 2557−2567.

[8] ZAKIPOUR-MOLKABADI E, HAMIDI-ESFAHANI Z, SAHARI M A, et al. Improvement of strain *Penicillium* sp. EZ-ZH190 for tannase production by induced mutation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(6): 1376−1389.

[9] TANG Jie, WEI Junlin, YANG Yong, et al. Spatio-temporal scales of the Chinese Daqu microbiome: Heterogeneity, niche differentiation, and assembly mechanisms[J]. Trends in Food Science & Technology, 2025, 156: 104832.

[10] 蒋力力, 尹艳艳, 杨军林, 等. 酿酒原料高粱对白酒品质影响的研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(8): 6−11. [JIANG Lili, YIN Yanyan, YANG Junlin, et al. Research progress on the effect of sorghum as brewing material on Baijiu quality[J]. China Brewing,

2022, 41(8): 6−11.]
[11] 谷新晰, 卢海强, 刘亚娟, 等. 1 株产单宁酶嗜热真菌的鉴定、酶学性质分析及碳水化合物活性酶表达[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 88−93. [GU Xinxi, LU Haiqiang, LIU Yajuan, et al. Identification, properties and carbohydrate-active eenzymes (CAZymes) expression analysis of a thermophilic fungal strain producing tannase[J]. Food Science, 2018, 39(18): 88−93.]
[12] HADIDI M, LIÑÁN-ATERO R, TARAHI M, et al. The potential health benefits of gallic acid: Therapeutic and food applications[J]. Antioxidants, 2024, 13(8): 1001.
[13] KANPIENGJAI A, KHANONGNUCH C, LUMYONG S, et al. Co-production of gallic acid and a novel cell-associated tannase by a pigment-producing yeast, *Sporidiobolus ruineniae* A45.2[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 95.
[14] 简辉, 吴鑫颖, 邱树毅, 等. 黑曲霉 B1401 生物法转化单宁酸制备没食子酸的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 24−28. [JIAN Hui, WU Xinying, QIU Shuyi, et al. Preparation of gallic acid from tannic acid by *Aspergillus niger* B1401[J]. China Brewing, 2016, 35(4): 24−28.]
[15] SONG Lei, WANG Xiaochen, FENG Zhenquan, et al. Biotransformation of gallate esters by a pH-stable tannase of mangrove-derived yeast *Debaryomyces hansenii*[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2023, 10: 1211621.
[16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. [WEI Jingchao. Handbook of fungal identification[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979.]
[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, ROSEBROUGH N, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265−275.
[19] ABOU-BAKR H, EL-SAHN M A. Optimization of extracellular tannase production by *Aspergillus niger* van tieghem using response surface methodology[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2013.
[20] MOHAN S K, VIRUTHAGIRI T, ARUNKUMAR C. Statistical optimization of process parameters for the production of tannase by *Aspergillus flavus* under submerged fermentation[J]. 3 Biotech, 2014, 4(2): 159−166.
[21] OLALEYE O N, OMOTAYO M A. Production of tannase and Gallic acid by three fungal strains under submerged fermentation using agricultural waste[J]. World Journal of Advanced Research and Reviews, 2022, 15(3): 176−181.
[22] ANDRADE P M L, BAPTISTA L, BRITTO J S, et al. Co-production of tannase and gallic acid by a novel *Penicillium rolfsii* (CCMB 714)[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2018, 48(8): 700−706.
[23] BEENA S P, BASHEER S M, BHAT S G, et al. Garcina cambogia leaf and seawater for tannase production by marine *Aspergillus awamori* BTMFW032 under slurry state fermentation[J]. Natural Product Communications, 2011, 6(12): 1933−1938.
[24] 杨露, 王姣姣, 李进, 等. 1 株产单宁酶细菌的分离鉴定及产酶条件研究[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(6): 32−36. [YANG Lu, WANG Jiaojiao, LI Jin, et al. Isolation of a tannase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain & its fermentation conditions optimization [J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(6): 32−36.]
[25] RAAMAN N, MAHENDRAN B, JAGANATHAN C, et al. Optimisation of extracellular tannase production from *Paecilomyces variotii*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(6): 1033−1039.
[26] WAN Yin, FAN Haowei, GAO Lin, et al. The change mechanism of structural characterization and thermodynamic properties of tannase from *Aspergillus niger* NL112 under high temperature[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(7): 2225−2244.
[27] BARTHOMEUF C, REGERAT F, POURRAT H. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(3): 320−323.
[28] 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.
[29] FARAG A M, HASSAN S W, EL-SAYS A M, et al. Purification, characterization and application of tannase enzyme isolated from marine *Aspergillus nomius* GWA5[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2018, 12(4): 1939−1949.
[30] SAAD M M, SAAD A M, HASSAN H M, et al. Bioremoval of tannins and heavy metals using immobilized tannase and biomass of *Aspergillus glaucus*[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 209.
[31] SINGH S, KAUR A, GUPTA A. Tannase production through solid-state fermentation of *Shorea robusta* deoiled seed cake: An industrial biomass using *Aspergillus flavus* TF-8 for potential application in gallic acid synthesis[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13(8): 6663−6673.
[32] LIU Lu, GUO Jing, ZHOU Xuefeng, et al. Characterization and secretory expression of a thermostable tannase from *Aureobasidium melanogenum* T9: Potential candidate for food and agricultural industries[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 9: 769816.
[33] SABU A, KIRAN G S, PANDEY A. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620[J]. Food Technology and Biotechnology, 2005, 43(2): 133−138.
[34] ANDRADE P M L, BAPTISTA L, BEZERRA C O, et al. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolfsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15(2): 1005−1013.
[35] ALKA K, KAUSHAL L, ARTI, et al. Impact of metal ions on catalytic kinetics, stability, and reactivation of purified tannase from *Aspergillus niger*[J]. Catalysis Letters, 2024, 154(9): 4981−4992.
[36] 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.