

漆酶在食品领域的应用研究进展

张 昱,赵 倩,李冠华*

(内蒙古大学生命科学学院,内蒙古呼和浩特 010021)

摘要:漆酶在食品领域的应用日渐深入而广泛。论文介绍漆酶催化特征及优点;综述漆酶在果汁加工、葡萄酒酿造、面粉改良、食用菌栽培、食品检测、食品废水处理、牛奶凝胶化方面的研究概况;展望漆酶食品工业的发展前景。

关键词:漆酶,食品领域,应用,催化

Research progress in applications of laccase in food

ZHANG Yu, ZHAO Qian, LI Guan-hua*

(School of life science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: Application of laccase in food is drawing more and more attention. In this paper, catalytic characteristic, the findings of laccase used in beverage procession, wine making, flour modification, edible fungi production, food online detecting, food wastewater treatment and milk gelation were reviewed in detailed. At last the prospects of laccase in food were also put forward.

Key words: laccase; food; application; catalyze

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)17-0385-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.068

1883年日本学者Yoshida在紫胶漆树(*Rhus verniciflua*)汁液中发现一种能够催化酚类物质的蛋白质,1884年Bertrand将这种蛋白质命名为漆酶(laccase)^[1]。漆酶在高等植物、真菌、昆虫和细菌中均有发现,真菌是漆酶的重要生产者,特别是大型担子菌和子囊菌,已报道数量达120多种^[2]。工业用漆酶通过发酵获得,包括固态发酵和液态发酵,液态发酵是漆酶的主要生产方式,菌种涉及细菌和真菌。细菌发酵周期短,表达量高,但漆酶氧化还原电势较低故应用范围有限。真菌漆酶氧化还原电势高,但生长缓慢,表达量低。构建工程菌株,实现真菌漆酶基因在米曲霉、里氏木霉、酿酒酵母等生物中异源表达是解决上述问题的重要途径。漆酶已有一百多年的研究应用历史,由于其独特的催化特性,被称为绿色化学中的蓝色酶,在生物、食品、环境、能源、材料等领域^[3-4]具有潜在应用价值。1996年Novozymes推出第一个商品化漆酶DeniLite® I应用于纺织和造纸行业,随后推出Suberase®应用于食品行业^[5]。本文将就漆酶的催化特征及在食品领域的应用进展进行综述。

1 漆酶的催化特征

1.1 漆酶的结构

漆酶是一种糖蛋白,由肽链、糖配基和 Cu^{2+} 组成,属蓝色多铜氧化酶家族(blue multi-copper

oxidase),在氧气参与下可催化多酚、多氨基苯等物质,使之生成相应的苯醌和水。 Cu^{2+} 是漆酶催化活性中心,根据磁学和光谱性质差异,漆酶的 Cu^{2+} 分为三类:I型 Cu^{2+} 呈顺磁性,是单电子受体,与半胱氨酸的S结合形成共价键,在600 nm处有较强吸收峰,呈蓝色;II型 Cu^{2+} 各一个,呈顺磁性,是单电子受体,可与两个组氨酸(His)和一个水分子配位形成松散的T型结构,在600 nm处无较强吸收峰,不显蓝色;III型 Cu^{2+} ,是双电子受体,以耦合离子对($\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^{2+}$)的形式存在,与3个组氨酸(His)和一个氢氧桥配位形成四面扭曲的四方立体结构。典型的漆酶中三种类型的 Cu^{2+} 都存在,漆酶呈蓝色,常被称为“蓝色漆酶”。随着研究的深入,发现部分漆酶中缺少I型 Cu^{2+} ,这类漆酶呈白色,被称为“白色漆酶”,有些漆酶中 Cu^{2+} 在600 nm处无显著吸收峰,而在300 nm处有显著吸收峰,呈黄色,被称为“黄色漆酶”^[6]。蓝色漆酶需要有小分子介体物质协助参与催化氧化非酚型化合物,而黄色漆酶则能够在无外源介体的情况下催化氧化非酚型化合物。

1.2 漆酶的催化过程

漆酶催化属于双底物的酶促反应,在氧分子参与条件下,利用 Cu^{2+} 的氧化能力对还原性底物进行氧化^[7],即漆酶催化底物将单电子传递给分子氧,氧气得电子被还原生成水,底物失去一个电子,形成

收稿日期:2016-03-23

作者简介:张昱(1994-),男,在读本科生,研究方向:食品科学与工程,E-mail:18848119746@163.com。

*通讯作者:李冠华(1984-),男,博士,讲师,研究方向:漆酶发酵,漆酶催化体系构建,E-mail:liguamhua1984@126.com。

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2015BS0201);内蒙古大学2014年博士引进科研启动经费(21400-5145138)。

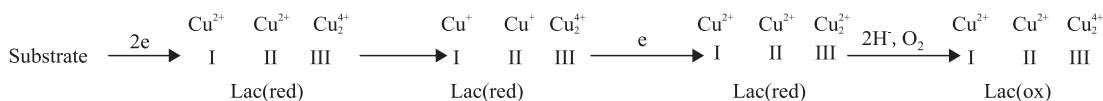


图1 漆酶催化电子转移示意图

Fig.1 Map of electron transport during laccase catalyzed process

自由基,自由基不稳定,进一步发生聚合或解聚等非酶催化反应,机制为乒乓反应,基本过程如图1所示。漆酶催化过程比较复杂,可分为3种方式:漆酶将底物分子直接氧化形成带自由基的化合物;通过介体参与完成对具有高氧化还原电势底物的催化;漆酶氧化介体,进一步氧化黄素酶,由氧化的黄素酶完成对底物催化,而氧化的黄素酶通过脱氢酶系以实现再生。介体的参与可以扩展漆酶的应用范围,漆酶介体的催化反应途径受到漆酶氧化还原电势、介体与底物分子结构的影响^[8],不同介体可以参与漆酶多种氧化途径,生成不同的产物。已报道介体达100多种,如紫脲酸、1-羟基苯并三唑等,上述介体价格昂贵且具有潜在的毒性,寻找天然、廉价、无毒介体是当前漆酶研究的重要方面。

1.3 漆酶催化的优越性

漆酶多为糖基化酶,不易结晶,稳定性好;氧化还原电位高(780 mV),作用底物范围广,可氧化多酚、二元胺、芳香胺、对苯二酚、氨基酚、芳香硫醇等,通过介体参与还可氧化非酚类物质^[9];在氧分子参与下可直接氧化底物,不需要H₂O₂和其他次级代谢产物参与,反应条件简单^[10];副产物只有水,对环境无污染;此外漆酶还具有分布范围广,属胞外酶易于提取,作用条件温和,安全无毒性等特性。由于上述优越性,漆酶在食品领域具有重要的应用前景。

2 漆酶在食品领域的应用

漆酶在果汁澄清、面粉烘焙、食品在线检测、葡萄酒酿造、食品感官改善、高附加值食品添加物生产等方面具有重要作用。表1列举了近几年漆酶在食品应用的相关文献报道,由表1可知漆酶来源广,在食品领域发挥重要作用。

2.1 漆酶在果汁加工的应用

果汁中含有单宁、花青素等酚类物质,使果汁浑浊度增加、颜色加深、出现沉淀,高浓度单宁具有苦味,影响果汁品质。果汁澄清可利用物理化学吸附剂,过滤技术及添加抗氧化剂等方法。明胶和膨润土是两种最常见的吸附剂,使用过程中破坏果汁品质;膜过滤技术在渗透过程中发生膜污染以及过滤速度的降低,影响效率^[33];抗坏血酸和亚硝酸盐作用效率低,且具有潜在危害。漆酶能够专一、高效地去除果汁中大多数酚类物质,一方面可使酚类物质形成自由基,自由基形成醌类化合物,进一步反应形成多聚物而沉淀;另一方面漆酶并不会氧化破坏人体必需酪氨酸,避免果汁营养受到影响^[34]。Lettera研究表明固定化的漆酶可以选择性除去桔子、石榴、杏仁、桃子、樱桃和苹果汁中多酚物质,去除率在45%以上,而对人体有益的黄酮物质得以保存,去除乙烯基愈创木酚的果汁具有更好口感^[13]。新型高分子材料具有使结构设计灵活、高效等优点,作为漆酶固定

表1 漆酶在食品工业的应用进展

Table 1 Progress in application of laccase for food industry

应用领域	食品	漆酶来源微生物	参考文献
果汁澄清	浆果果汁	<i>Phanerochaetechrysosporium</i>	[11]
	苹果汁	<i>Trametes versicolor</i>	[12]
	橙汁	<i>Pleurotostreatus</i>	[13]
	葡萄酒	<i>Trametes versicolor</i>	[14]
酒稳定性	白葡萄酒	<i>Trametes versicolor</i>	[15]
	啤酒	<i>Trametes versicolor</i>	[16]
	木塞	<i>Myceliophthorathermophila</i>	[17]
面粉改性	燕麦粉	<i>Trametes hirsuta</i>	[18]
	燕麦粉	<i>Myceliophthorathermophila</i>	[19]
食用菌栽培	生理代谢	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	
		<i>Pleurotostreatus</i>	
		<i>Pleurotuseryngii</i> var. <i>nebrodensis</i>	[20]
		<i>Pleurotus tuber-regium</i>	
		<i>Pleurotuseryngii</i>	
		<i>Coprinus comatus</i>	
		多酚	<i>Trametes versicolor</i> [21]
		多酚和二氧化硫	<i>Trametes versicolor</i> [22]
		在线检测 多酚物质	<i>Coriolopsis gallica</i> [23]
			<i>Trametes versicolor</i> [24]
食品废水处理	橄榄压榨废水	<i>Ganoderma sp</i>	[25]
		伐虫脔	<i>Trametes versicolor</i> [26]
		多酚	<i>Trametes versicolor</i> [27]
		玉米加工废水	<i>Coriolopsis gallica</i> [28]
			<i>Agrocybe cylindracea</i>
			<i>Inonotus andersonii</i>
			<i>Trametes versicolor</i>
			<i>Pleurotostreatus</i>
			<i>Stereum hirsutum</i>
			<i>Tyromyces lacteus</i>
		橄榄压榨废水	<i>Trametes sp</i> [30]
		酸奶、奶酪	<i>Trametes versicolor</i> [31]
乳制品交联	脱脂酸乳	<i>Pleurotuseryngii</i>	[32]

化载体的研究越来越多。Gassara - Chatti 将 *Phanerochaetechrysosporium* 固态发酵产物漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶,利用丙烯酰胺-果胶固定化,考查上述酶对石榴汁和番茄汁中多酚物质的作用效果,结果表明三种酶协同作用能显著去除果汁的多酚物质,提高澄清度^[11],但高分子材料价格昂贵,规模应用受到限制。de Souza Bezerra 等采用热降压、酸、碱协同处理后的椰皮纤维素为载体,以乙醛酞或戊二醛为支持物固定漆酶用于苹果汁澄

清,结果表明漆酶可以脱去果汁 $61\% \pm 1\%$ 的颜色,降低 $29\% \pm 1\%$ 的浑浊度,重复利用 10 次后,漆酶还保留全部初始活性,实现了利用廉价支持物固定漆酶用于果汁澄清^[12]。实验并未对经过两步预处理的纤维进行更好的物理化学特征描述,也未对在苹果汁澄清中实现温和氧化、保持氧化活性的最适参数进行研究。

2.2 漆酶在葡萄酒酿造的应用

葡萄酒中含有多种酚类物质,如单宁、苯乙烯酸、儿茶酚、花色素及香豆酸衍生物等影响葡萄酒稳定性和感官性质。葡萄酒中的多酚物质主要来源于葡萄皮和葡萄籽,特别是葡萄籽中的单宁会直接影响感官品质。Czyzowska 等发现多酚物质的含量随着葡萄酒酿造或储存时间的延长而减少,从而改变葡萄酒的色泽^[35]。传统葡萄酒酚类物质去除的工艺有添加聚乙烯吡咯烷酮、二氧化硫、氧化剂、蛋白质等,但上述方法不能很好地保护酒的感官特性,而且有些添加剂不易分解,会造成废水处理困难和环境污染。漆酶可以实现温和条件下去除葡萄酒中的酚类物质,同时保持葡萄酒的感官特性不变^[36]。漆酶直接氧化葡萄酒中酚类物质,后者聚合后,可通过澄清工艺除去。Chawla 等将漆酶通过共价键固定在银/氧化锌纳米材料上,除去葡萄酒中的多酚物质,同时在线测定多酚含量变化,其具有工作电势低、反应速度快、灵敏性高、可利用时间长且稳定性好的优点^[25]。Juan 等构建了 Lac/SNGC 漆酶传感器在线测定葡萄酒中多酚物质含量变化,提出葡萄酒中酚类与二氧化硫的比率可作为判断葡萄酒营养价值的新的参数指标^[22]。Conrad 等人还发现漆酶处理葡萄酒瓶木塞,产生酚类物质具有抗菌作用,可以有效减少木塞污染^[17]。由于漆酶不属于食品添加剂,固定化漆酶必须从葡萄汁中除去并回收利用,提高固定化漆酶活性与稳定性,实现无残留催化是漆酶葡萄酒酿造应用的重要研究方向。

2.3 漆酶在面粉改良的应用

提高面粉制品品质是当前研究的重要方面,面粉蛋白改性还处于起步阶段。传统改性方法是加入过氧化苯甲酰、过氧化钙、溴酸钾等化学改良剂,但其安全性一直备受关注,如研究发现溴酸钾具有潜在致癌性。漆酶能提高面团机械强度和稳定性,降低粘性,改善机械加工性能。Labat 等首次报道漆酶通过酯化阿魏酸的二聚作用交联阿糖基木聚糖,可以增强面团的强度和稳定性,降低粘性,改善机械加工性能^[37],进而可以有效增大面包蛋糕的体积,提高均一性,防止烘焙面包塌陷。Selinheimo 研究了漆酶,木聚糖酶以及二者协同联合对面团伸展性和抗拉伸性的影响,结果表明漆酶可以使面团变硬,抗拉伸性增强,延展性减弱^[38]。Cura 研究认为面粉中阿魏酸可以被漆酶氧化成小分子酚类化合物,漆酶和阿魏酸组合有助于增强蛋白质分子间交联^[39]。Flander 研究了酪氨酸酶、漆酶和木聚糖酶对面筋蛋白的改性作用,结果发现酪氨酸酶催化小分子蛋白发生交联,形成大分子蛋白质,面团硬度增大,漆酶

改变面团体积,但不影响硬度^[18]。Brinch 等曾对食品用漆酶进行毒理学研究,结果表明漆酶不会引起基因突变,没有皮肤毒性和吸入毒性,以一定比例饲喂小鼠 13 周,小鼠未表现出不适症状^[40]。作为添加剂用于食品工业,还需对漆酶进行更全面的毒理学实验,特别是漆酶遗传毒性,催化产物的潜在毒性等方面。

2.4 漆酶在食用菌栽培的应用

漆酶是食用菌生活史中必不可少的一个酶分子,对子实体的生长、发育、分化、防御,缩短食用菌生产周期,降低生产成本,提高抗菌能力等方面具有重要的意义。De Souza 研究表明 *Pleurotus pulmonarius* 在其菌丝生长时向胞外分泌漆酶参与菌丝体发育^[41],Sun 对 15 种食用菌不同生长阶段漆酶活性检测发现食用菌的漆酶分泌与生长密切相关^[20]。Montoya 研究发现 *Grifola frondosa* 在菌丝体增殖阶段漆酶等活性迅速增加,达到最高,随着子实体形成开始下降^[42]。上述研究表明食用菌漆酶活性的增加与菌丝的快速生长以及原基的形成密切相关,菌丝在漆酶参与下扭结形成原基,并进一步发育形成。Munk 研究了真菌中漆酶氧化过程的电子受体、作用底物、反应的环境,以及氧化还原电位差,通过建立木质素模型,讨论了真菌木质化与漆酶的相关性,证明了漆酶参与木质素降解,为食用菌生长提供营养^[43]。因此食用菌栽培过程中添加漆酶制剂可促进菌丝生长、原基形成,缩短生产周期、提高产量。漆酶能氧化催化低分子量酚类化合物,参与细胞壁形成,在食用菌子实体防御中发挥作用,如可以降解植物中的鞣质等化合物,在含单宁和有毒植物抗毒素的环境下保护食用菌自身,避免植物自身化合物对菌体的毒害^[44],食用菌栽培时添加漆酶制剂,能够有效抑制杂菌污染。漆酶还与真菌的色素形成有关,通过催化反应参与分生孢子色素的合成。虽然漆酶与食用菌生长正相关,通过筛选食用菌漆酶高产菌株、基因工程技术构建表达载体等可达到缩短食用菌生产周期、提高产量等效果,但目前食用菌生理功能及遗传特性对其分泌漆酶水平的影响尚不明确。

2.5 漆酶在食品检测传感器的应用

漆酶作用底物广泛、专一性强,是制备生物传感器的良好原料,根据漆酶对酚类物质的催化作用可制备出灵敏且稳定的传感器用于食品在线检测。Vianello 用碳二胺化学共价固定漆酶,建立了漆酶和玻碳电极的在线检测系统,用于检测橄榄油磨坊废水中的多酚物质含量^[45]。Leite 通过化学修饰,利用漆酶和过氧化物酶构建了具有协同效应的双酶生物传感器,可在线检测儿茶酚胺^[46]。Godoy-Navajas 研究了一种利用漆酶与氧化钨纳米颗粒 (Tb_4O_7 NPs) 结合的传感器,能够有效自动测定葡萄酒中多酚的含量^[21]。Gomes 等人将漆酶固定在聚醚砜膜上构建生物传感器,通过测定漆酶对底物的氧化催化速率实现对多酚类化合物的检测^[47]。Dulce 建立了以咖啡酸、没食子酸为标准物的漆酶生物传感器对红葡

萄酒、桃红葡萄酒、白葡萄酒中的多酚物质含量进行在线测定,发现三种葡萄酒中的多酚物质含量由红葡萄酒到白葡萄酒的顺序依次减少,且咖啡酸比没食子酸表现出更高的灵敏度^[48]。Ribeiro 等以金作为电极,电沉积纳米金修饰的漆酶作为生物传感器,对水果中的伐虫脒进行测量,现已成功应用于芒果和葡萄中伐虫脒的测定^[26]。Tortolini 等人发现改良漆酶多壁碳纳米管电极传感器测定葡萄酒多酚物质具有最高性能的亲和力和敏感点,用没食子酸为标准物可以检测商业白葡萄酒和红葡萄酒^[49]。漆酶生物传感器受到稳定性和重现性较差、使用寿命短等因素制约,高效漆酶固定方法的使用、高催化性能材料的开发以及与微电子技术的联用将会使漆酶生物传感器在食品检测方面发挥更重要的作用。

2.6 漆酶在食品工业废水处理的应用

漆酶能去除废水中的酚类、非酚类物质,降解有毒性的污染物,作用条件温和,对环境不造成二次污染。食品废水常含有高浓度有机酚类、小分子有机酸和盐,是工农业污染物的重要来源之一,危害植物生长,影响土壤微生物。Mann 研究发现橄榄压榨废水中小分子有机物可以作为漆酶底物,或漆酶介体,通过漆酶氧化作用为微生物生长提供营养的同时被除去^[50]。Garcia-Zamora 以壳聚糖为吸附剂,漆酶为催化剂组成废水催化体系处理玉米粉工厂废水,结果表明上述体系可以去除 70% 以上的阿魏酸及其衍生物,废水 COD 降低 78% 以上^[28]。Daassi 等从腐烂的皂荚木中分离纯化得到一种碱稳定漆酶,以 HBT 为介体,用于处理橄榄油厂的废水,酚类去除率和脱色率分别提高了 39% 和 35.1%^[30]。Ntougias 等人从 39 种白腐真菌中筛选出 *Ganoderma austral*、*G.carnosum*、*Pleurotuseryngii*、*P.ostreatus*, 4 种对橄榄废水中酚类物质有很强降解能力的菌株,进一步研究发现漆酶和过氧化物酶协同作用可以显著去除橄榄废水的酚类物质,脱除颜色,降低废水毒性。不同菌种对食品废水脱色作用机理不完全相同,*Ganoderma* 通过去除酚类物质实现对橄榄废水的脱色作用,而 *P.eryngii* 是在漆酶参与下完成废水褪色^[32]。目前漆酶应用于食品工业废水处理的瓶颈包括合成介体(如 HBT、硅胶、氧化铝)价格昂贵,漆酶工业产量低,漆酶-介体催化活性易受废水极端 pH、高离子强度、表面活性剂影响等。生物反应器的研制是漆酶应用于食品废水处理的必要步骤,包括固定床反应器,流化床反应器,搅拌式反应器和膜反应器。流化床漆酶反应器操作简单,但运行成本高且易造成固定化酶破碎;膜反应器易堵塞、影响处理效率。此外,上述生物反应器仍处于实验室研制或中式阶段,规模化应用报道较少。

2.7 漆酶在牛奶凝胶化的应用

漆酶能使牛奶中的蛋白质发生氧化交联,使牛奶凝胶化,改变牛奶品质,形成新的风味。Mokoonlall 研究了漆酶对酸奶和奶酪蛋白质的氧化作用,结果表明漆酶可使酸奶凝胶化,孔隙增多,黏度和保质期不受影响^[31]。Qu 认为剂量是影响漆酶对牛奶氧化

作用的重要因素,低剂量条件下漆酶可使蛋白发生有效交联,转化为更高分子量的蛋白质聚合物,蛋白质流变学特性增强;但高剂量漆酶会使蛋白质发生降解,破坏牛奶品质^[32]。Struch 研究认为以咖啡酸为介体,漆酶使酸奶蛋白凝胶化,能有效避免加工过程中机械搅拌对酸奶质地的破坏^[51]。但目前漆酶对牛奶蛋白的氧化机理及过程尚不明确,氧化代谢产物及其安全性也有待于深入研究。

3 展望

漆酶以其反应条件温和,无毒副产物,作用范围广等优越性引起越来越多的研究,随着“绿色工业,食品安全”等理念深入人心,漆酶将在食品领域发挥越来越重要的作用。但部分漆酶为生物次级代谢产物,受菌株遗传背景等因素限制,酶活力较低;产漆酶生物常含有多种氧化酶,分离纯化步骤繁琐;工业产量低,发酵周期长,生产成本低;催化机理及产物不明确;水溶性高,回收利用难;催化体系效率有待提高;介体或催化产物可能具有潜在毒性,作为食品添加剂使用受到限制。针对上述问题,未来应进一步筛选漆酶高产菌株,利用基因工程技术构建工程菌,优化发酵条件,开发漆酶反应器强化发酵过程,提高酶产量,降低生产成本;借鉴现代物理、化学分析手段,研究漆酶结构,阐明催化机理,解析催化过程;深入认知自然界漆酶催化过程,筛选天然、绿色、无毒性介体;挖掘新型天然材料,开发固定化技术,利用蛋白质工程技术提高酶的活力和稳定性,提高利用率,降低催化成本;研究漆酶催化与光化学、电化学等的耦合技术,探究协同作用机理,构建新型、绿色、高效的催化体系;进行漆酶毒理学评价及其作为食品添加剂的安全性研究,实现无残留催化。

参考文献

- [1] Giardina P, Sannia G. Laccases: old enzymes with a promising future[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(5): 855-856.
- [2] W Du, C Sun, J Liang, et al. Improvement of Laccase Production and its Characterization by Mutagenesis[J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 39(1): 101-108.
- [3] K Chaurasia P, L Bharati S, Sharma M, et al. Fungal Laccases and their Biotechnological Significances in the Current Perspective: A Review[J]. Current Organic Chemistry, 2015, 19(19): 1916-1934.
- [4] 李冠华, 陈洪章. 汽爆秸秆漆酶协同作用提取木质素[J]. 生物工程学报, 2014, 30(6): 911-919.
- [5] 赖超凤, 李爽, 彭丽丽, 等. 漆酶及其在有机合成中的应用的研究进展[J]. 化工进展, 2010(7): 1300-1308.
- [6] Leontievsky A, Myasoedova N, Pozdnyakova N, et al. 'Yellow' laccase of *Panustigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators[J]. FEBS Letters, 1997, 413(3): 446-448.
- [7] Jones S M, Solomon E I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(5): 869-883.

- [8] Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 16(5): 231-240.
- [9] Bourbonnais R, Paice M G. Oxidation of non-phenolic substrates[J]. *FEBS letters*, 1990, 267(1): 99-102.
- [10] Weirick T, Sahu S S, Mahalingam R, et al. LacSubPred: predicting subtypes of Laccases, an important lignin metabolism-related enzyme class, using in silico approaches[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(11): S15.
- [11] Gassara-Chatti F, Brar S K, Ajila C M, et al. Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice[J]. *Food Chemistry*, 2013, 137(1): 18-24.
- [12] de Souza Bezerra T M, Bassan J C, de Oliveira Santos V T, et al. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(3): 417-423.
- [13] Lettera V, Pezzella C, Cicatiello P, et al. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 1272-1278.
- [14] Zinnai A, Venturi F, Sanmartin C, et al. Chemical and Laccase catalysed oxidation of gallic acid: Determination of kinetic parameters[J]. *Research Journal of Biotechnology*, 2013, 8(7): 62-65.
- [15] Minussi R C, Rossi M, Bologna L, et al. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 45(3): 102-107.
- [16] Martinez-Periñan E, Hernández-Artiga M P, Palacios-Santander J M, et al. Estimation of beer stability by sulphur dioxide and polyphenol determination. Evaluation of a Laccase-Sonogel-Carbon biosensor[J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(1): 234-239.
- [17] Conrad L S, Sponholz W R, Berker O. Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme: U.S. Patent 6,152,966[P]. 2000-11-28.
- [18] Flander L, Holopainen U, Kruus K, et al. Effects of tyrosinase and laccase on oat proteins and quality parameters of gluten-free oat breads[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(15): 8385-8390.
- [19] Renzetti S, Courtin C M, Delcour J A, et al. Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: rheological, biochemical and microstructural background[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(4): 1465-1473.
- [20] Sun S J, Liu J Z, Hu K H, et al. The level of secreted laccase activity in the edible fungi and their growing cycles are closely related[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 871-875.
- [21] Godoy-Navajas J, Aguilar-Caballeros M P, Gómez-Hens A. Automatic determination of polyphenols in wines using laccase and terbium oxide nanoparticles[J]. *Food Chemistry*, 2015, 166: 29-34.
- [22] García-Guzmán J J, Hernández-Artiga M P, de León L P, et al. Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines[J]. *Food Chemistry*, 2015, 182: 47-54.
- [23] Aguila S A, Shimamoto D, Ipinza F, et al. A biosensor based on *Coriopsis gallica* laccase immobilized on nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes and graphene oxide for polyphenol detection[J]. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015, 16(5): 1-8.
- [24] Lanzellotto C, Favero G, Antonelli M L, et al. Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical applications[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55: 430-437.
- [25] Chawla S, Rawal R, Kumar D, et al. Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 430(1): 16-23.
- [26] Ribeiro F W P, Barroso M F, Morais S, et al. Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits[J]. *Bioelectrochemistry*, 2014, 95: 7-14.
- [27] Andreu-Navarro A, Fernández-Romero J M, Gómez-Hens A. Determination of polyphenolic content in beverages using laccase, gold nanoparticles and long wavelength fluorimetry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 713: 1-6.
- [28] García-Zamora J L, Sánchez-González M, Lozano J A, et al. Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(1): 125-133.
- [29] Ntougias S, Baldrian P, Ehalotis C, et al. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi—Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 189: 121-130.
- [30] Daassi D, Zouari-Mechichi H, Prieto A, et al. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(11): 2145-2155.
- [31] Mokoonlall A, Pfannstiel J, Struch M, et al. Structure modification of stirred fermented milk gel due to laccase-catalysed protein crosslinking in a post-processing step[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2015, 33: 563-570.
- [32] Qu J, Lou T, Wang Y, et al. Determination of Catechol by a Novel Laccase Biosensor Based on Zinc-Oxide Sol-Gel[J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(12): 1842-1853.
- [33] Bagei P O. Effective clarification of pomegranate juice: A comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flux[J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 141: 58-64.
- [34] Kumar S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement[J]. *Health*, 2015, 6(6): 114-124.
- [35] Czyzowska A, Klewicka E, Pogorzelski E, et al. Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* Thunb[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 39: 62-68.
- [36] Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A. How to enjoy laccases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(5):

(下转第394页)

antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications[J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3: 229–254.

[27] Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11: 347–56.

[28] Zou Y, Wang W, Li Q, et al. Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing[J]. *Process Biochemistry*, 2015: 431–443.

[29] Sila A, Bougatef A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21: 10–26.

[30] Je JY, Qian ZJ, Byun HG, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 840–846.

[31] Kim S, Je J, Kim S. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18: 31–38.

[32] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 2619–2623.

[33] Chi C F, Wang B, Hu F, et al. Purification and identification

of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin[J]. *Food Research International*, 2015, 73(a): 124–139.

[34] Saito K, Jin DH, Ogawa T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 3668–3674.

[35] Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, 225: 29–34.

[36] Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review[J]. *Peptides*, 2010, 31: 1949–1956.

[37] Yang B, Yang HS, Li J, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 551–555.

[38] 薛照辉. 菜籽肽的制备及其生物活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[39] Hwang JY, Shyu YS, Chang HM. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels[J]. *Food Research International*, 2001, 34: 639–647.

[40] 陈贵堂, 赵立艳, 李博, 等. 花生肽对衰老模型大鼠血清和心、脑组织抗氧化效果的影响[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(1): 34–38.

[41] 金晶. 菜籽蛋白酶解及产物抗氧化活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

(上接第 389 页)

923–940.

[37] Labat E, Morel M H, Rouau X. Effects of Laccase and Ferulic Acid on Wheat Flour Doughs 1[J]. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(6): 823–828.

[38] Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, et al. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs[J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43(2): 152–159.

[39] Cura D E, Lantto R, Lille M, et al. Laccase-aided protein modification: effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels[J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19(12): 737–745.

[40] Brinch D S, Pedersen P B. Toxicological studies on Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2002, 35(3): 296–307.

[41] Marques de Souza C G, Peralta R M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2003, 43(4): 278–286.

[42] Montoya S, Orrego C E, Levin L. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake)[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1533–1541.

[43] Munk L, Sitarz A K, Kalyani D C, et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 13–24.

[44] Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(2): 215–242.

[45] Vianello F, Cambria A, Ragusa S, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(2): 315–321.

[46] Leite O D, Lupetti K O, Fatibello-Filho O, et al. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines[J]. *Talanta*, 2003, 59(5): 889–896.

[47] Gomes S, Rebelo M J F. A new laccase biosensor for polyphenols determination[J]. *Sensors*, 2003, 3(6): 166–175.

[48] Gil D M A, Rebelo M J F. Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(2): 303–308.

[49] Tortolini C, Di Fusco M, Frasconi M, et al. Laccase-polyazetidine prepolymer-MWCNT integrated system: Biochemical properties and application to analytical determinations in real samples[J]. *Microchemical Journal*, 2010, 96(2): 301–307.

[50] Mann J, Markham J L, Peiris P, et al. Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrenaconsors*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 99: 138–145.

[51] Struch M, Linke D, Mookoonlall A, et al. Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 89–94.