

蛋白质交联用酶的作用机制及研究进展

龙梦飞^{1,2#}, 郑楠^{1,2#}, 张泽华^{1,2}, 高玲^{1,2}, 王颖好^{1,2}, 夏小乐^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

龙梦飞, 郑楠, 张泽华, 高玲, 王颖好, 夏小乐. 蛋白质交联用酶的作用机制及研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2499-2512.

LONG MF, ZHENG N, ZHANG ZH, GAO L, WANG YY, XIA XL. Mechanisms and applications of enzyme-catalyzed protein cross-linking. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2499-2512.

摘 要: 蛋白质交联在食品、化工和医药等领域发挥重要的作用。利用酶催化蛋白质交联是一种可替代物理和化学交联的高效经济的方法。然而, 目前仍缺乏详细的酶促蛋白质交联分子层面的解析。本文综述了酶催化的蛋白质交联反应机制及其对蛋白质结构的影响, 以及在食品、化工和医药领域的应用, 并展望了酶促交联的发展。

关键词: 蛋白质交联; 谷氨酰胺转氨酶; 氧化酶; 脂氧合酶; 谷氨酰内肽酶; 工业应用

Mechanisms and applications of enzyme-catalyzed protein cross-linking

LONG Mengfei^{1,2#}, ZHENG Nan^{1,2#}, ZHANG Zehua^{1,2}, GAO Ling^{1,2}, WANG Yingyu^{1,2}, XIA Xiaole^{1,2}

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Protein cross-linking plays important roles in food, chemical, medicine and other fields. Enzyme-catalyzed protein cross-linking is an efficient and economically viable alternative to physical and chemical cross-linking. However, detailed analysis of enzyme-catalyzed protein cross-linking at molecular

Received: November 24, 2021; **Accepted:** April 7, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101402); Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP121016)

[#]These authors contributed equally to this study

Corresponding author: XIA Xiaole. E-mail: xiaolexia@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2101402); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP121016)

level is still lacking. This review summarized the mechanisms of enzyme-catalyzed protein cross-linking, its effects on protein structure, and its applications in food, chemical and pharmaceutical fields.

Keywords: protein cross-linking; transglutaminase; oxidase; lipoxygenase; glutamyl endoproteinase; industrial application

蛋白质是人体必需的营养物质之一, 作为生物大分子在维持人体正常的生长发育、新陈代谢、免疫调节等生命活动中发挥重要作用。蛋白质的构象变化和蛋白质间的相互作用影响着生命活动的整个过程, 是当前生命科学领域的研究热点之一。随着国民健康意识的提高, 人们对蛋白质的重视程度逐渐得到提高, 蛋白质的加工技术也逐步得到关注。

蛋白质交联是指蛋白质内的多肽链之间 (分子内交联) 或者蛋白质分子间 (分子间交联) 形成共价键的过程, 可显著改善蛋白类食品的功能特性。目前, 蛋白质交联的方法包括物理、化学和酶法^[1]。其中, 物理交联主要通过加热、高压处理和超声波等手段来改变蛋白质分子的结构和聚集状态。化学交联则需要使用化学试剂来改变分子特性, 如目前食品中广泛使用的化学交联剂戊二醛^[2]。与物理交联和化学交联相比, 酶法交联因具有反应条件温和、不产生副产物、高特异性以及高催化效率和产率等特点而备受青睐。经过几十年的发展, 已经开发出一系列具有优异功能特性 (包括耐 pH、耐高温、耐盐、高活性和高底物利用率) 的商用酶^[3]。此外, 酶温和的反应条件减少了加工过程中营养物质的损失, 使其非常适合应用于食品工业。

目前, 蛋白质的酶法交联分为转酰基交联和氧化交联。其中, 对谷氨酰胺转氨酶进行蛋白质交联的研究较系统全面, 而利用氧化酶进行蛋白质氧化交联的研究也逐步引起人们的关注^[4-5]。本文综述和比较了谷氨酰胺转氨酶、

氧化酶、脂氧合酶和谷氨酰内肽酶的催化机理, 及其在食品、化工和医药方面的应用。

1 交联酶的性质及作用方式

酶促蛋白质交联技术在工业中应用广泛, 能有效改善蛋白质的结构和功能。目前常用的交联酶包括谷氨酰胺转氨酶、氧化酶 (酪氨酸酶、漆酶、过氧化物酶、巯基氧化酶)、脂氧合酶和谷氨酰内肽酶等, 其性质、晶体结构和催化机制见表 1 和图 1。

1.1 谷氨酰胺转氨酶

谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, EC 2.3.2.13), 简称 TG 酶, 属于酰基转移酶。谷氨酰胺转氨酶催化蛋白质中谷氨酰胺残基的 γ -羟胺基团与伯胺化合物 (酰基受体) 之间发生酰基转移反应, 生成异肽键, 从而使蛋白质发生共价交联。在反应过程中, 每个交联释放一个氨分子。如果胺基底物不能作为酰基受体, TG 酶可利用水作为酰基受体催化谷氨酰胺残基的脱胺化。TG 酶对酰基受体底物具有宽泛性, 这是最早在豚鼠的肝脏中发现的, 随后又在动植物和微生物中发现。TG 酶的性质因来源不同而具有很大差别, 哺乳动物的 TG 酶通常依赖于 Ca^{2+} 的存在, 而来自链霉菌的 TG 酶不依赖 Ca^{2+} 因子^[6]。在细菌来源的 TG 酶中, 来自茂源链霉菌 (*Streptomyces mobaraensis*) 的微生物谷氨酰胺转氨酶 (microbial transglutaminase, mTG) 是一种由 331 个氨基酸残基组成、分子量为 38 kDa 的分泌蛋白单体, 其翻译加工后在细胞质膜外被激活。mTG 酶的催化活性依赖于

表 1 蛋白质交联酶的概述

Table 1 Overviews of enzymes catalyzing protein cross-linking

Enzymes	Cofactors	Substrate proteins	Application
Transglutaminase	Ca ²⁺	Myosin; actinin; wheat protein; soy protein; collagen; casein	Seafood; surimi products; meat products; wheat products; dairy products; baked food manufacturing
Tyrosinase	Cu ²⁺	Casein; collagen; β -lactoglobulin; oat protein; gelatin; soy glycinin; actomyosin	Protein network formation; hydrogel formation; bread making; emulsion stabilization; production of protein nanoparticles
Laccases	Cu ²⁺	Whey protein isolate; collagen; oat protein; gelatin; β -lactoglobulin; bovine serum albumin; bovine skim milk; stirred fermented milk	Protein network formation; hydrogel formation; bread making; emulsion stabilization; production of protein nanoparticles
Peroxidase	Heme	α -lactoalbumin; bovine serum albumin; gelatin; whole bovine milk	Protein network formation
Sulfhydryl oxidases	FAD, FMN	Wheat protein	Protein network formation
Lipoxygenase	Fe ²⁺	Wheat protein	Protein network formation
Glutamyl endoproteinase	Ca ²⁺	Soy protein	Protein condensation

半胱氨酸残基 (Cys64), 该残基与邻近的 Asp255 和 His274 构成催化三联体^[6]。mTG 酶的最佳反应 pH 为 5.0–8.0, 最适反应温度为 40 °C, 但在 70 °C 下迅速失活^[7]。自 1980 年开始, TG 酶就已被引入到食品加工领域中的动植物蛋白质加工过程。TG 酶介导的分子交联能够提高蛋白质的热稳定性和持水力等特性, 有助于形成强有力的凝胶, 改善蛋白制品的品质^[8-9]。此外, TG 酶还可催化蛋白质发生脱酰胺反应, 改善蛋白质的起泡性和乳化性^[10]。蛋白质谷氨酰胺酶 (protein-glutaminase, EC 3.5.1.44) 也能够脱去多种蛋白质、多肽或者短肽的氨基, 特异地作用于蛋白质或多肽的谷氨酰胺基团, 产生谷氨酸并释放氨, 由此改善蛋白质的特性, 从而拓展了植物蛋白在食品工业中的应用^[11-12]。

1.2 氧化酶

氧化酶如酪氨酸酶、漆酶、过氧化物酶和硫基氧化酶也可催化蛋白质的交联^[13]。酪氨酸酶和漆酶均属于多酚氧化酶类, 但它们的催化方式有所不同。在氧气存在的情况下, 漆酶并不氧化酪氨酸, 而是氧化对二酚。酪氨酸酶则

具有双功能, 它既氧化邻二酚, 也氧化一元酚。漆酶通过形成自由基来催化交联, 而酪氨酸酶催化形成醌中间体。

1.2.1 酪氨酸酶

酪氨酸酶 (tyrosinase, EC 1.14.18.1) 是含铜氧化还原酶, 其属于铜Ⅲ型蛋白家族。酪氨酸酶的每个亚基含 2 个铜离子, 2 个铜离子分别与蛋白质分子上的 3 个高度保守的组氨酸分子相结合, 另外 2 个内源的氧原子则将 2 个铜离子联系在一起, 构成了酪氨酸酶的催化中心^[14]。酪氨酸酶具有独特的双重催化功能, 其能够催化一元酚氧化成邻位的二元酚, 并进一步将二元酚氧化成邻苯醌。在整个催化过程中, 氧分子作为电子受体, 被还原为水而不是形成过氧化氢, 且氧化 1 mol/L 一元酚需要 1 mol/L 氧分子, 而氧化 1 mol/L 二元酚需要 0.5 mol/L 氧分子。这 2 种催化过程中最终释放的产物都是醌, 它是构成黑色素的前体^[15]。因此, 酪氨酸酶可将蛋白质侧链中的酪氨酸氧化为醌, 从而进一步与蛋白质中存在的赖氨酸、酪氨酸和半胱氨酸残基交联。

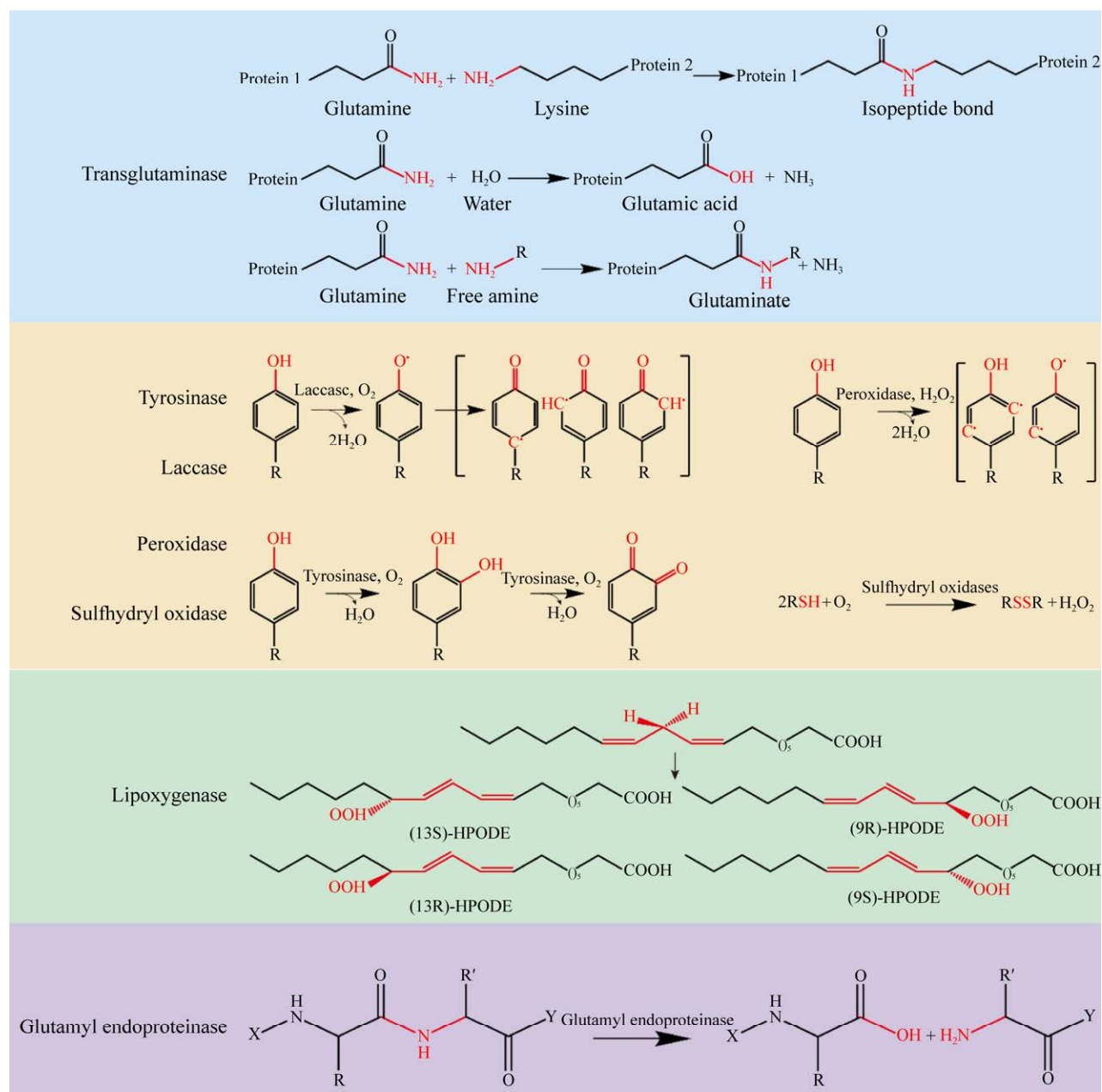


图1 蛋白质交联酶的催化机制

Figure 1 Catalytic mechanisms underlying enzyme-catalyzed protein cross-linking.

酪氨酸酶在自然界中普遍存在，它们存在于哺乳动物、植物和微生物中^[5]。在植物中，酪氨酸酶与黄酮、生物碱、酚类和木质素等的合成代谢有关。在真菌中，酪氨酸酶主要位于细胞质中，参与孢子的形成与稳定，包括抵抗

脱水、紫外线和 γ 射线的辐射。大多数真菌的酪氨酸酶是多聚体，而细菌酪氨酸酶通常是单体或者二聚体。人体内的酪氨酸酶位于皮肤的黑色素细胞中，其催化合成的黑色素被分泌到表皮和毛发的角质细胞中，使体表着色，从而

起到保护皮肤和眼睛免受紫外线的辐射以及避免内部组织过热等作用^[16-17]。许多微生物和植物的酪氨酸酶在微酸性 pH 范围内有最适的反应 pH 值,通常在高于 70 °C 的温度下几分钟内失去活性。

1.2.2 漆酶

漆酶 (laccase, EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶,其能催化氧化酚类和芳香类化合物生成相应的苯醌,同时伴随着电子的转移将分子氧还原成水。漆酶具有较宽的底物特异性,其底物包括单酚、二元酚、多酚类、苯硫醇、氨基酚、苯胺、多胺和木质素芳香二胺等^[18]。漆酶通常以单体形式存在,其分子量通常在 40–100 kDa 之间。氧化还原电势是漆酶的一个重要特性,其变化范围为 0.3–0.8 V,其中,真菌漆酶的氧化还原电势比其他漆酶更高^[19]。许多真菌来源的漆酶在酸性 pH 范围内具有最适的反应 pH 值,但也有中性和碱性漆酶的报道。漆酶的最适 pH 值不仅受酶本身的影响,还受底物的影响。pH 值的增加降低了酚类底物的氧化还原电势,使底物更容易被氧化。不同来源漆酶的温度稳定性有很大差异,一般来说,真菌漆酶在 30–60 °C 时最稳定,而最耐热的漆酶来源于细菌^[20]。漆酶与酪氨酸酶的区别在于,漆酶不催化酪氨酸酶催化反应中典型的羟基化反应。此外,酪氨酸酶催化的交联是基于醌的形成,而漆酶催化的交联反应是基于自由基及其进一步的反应。

1.2.3 过氧化物酶

过氧化物酶 (peroxidase, EC 1.11.1.x) 是一系列不同的氧化还原酶,利用过氧化氢作为电子受体氧化各种有机和无机底物,如酪氨酸残基上的酚,从而形成二酪氨酸和寡酪氨酸交联^[21]。过氧化物酶也是一种广泛存在的酶,存在于各种植物、原核和真核微生物以及哺乳动

物中^[4]。植物过氧化物酶与细胞壁木质素的生物合成和降解有关,参与病原体的抵御和生长素的代谢,涉及免疫系统调节等生理反应。根据过氧化物酶有无结合血红素辅基,将过氧化物酶分为血红素过氧化物酶 (heme peroxidase) 和非血红素过氧化物酶 (non-heme peroxidases)^[22]。多数过氧化物酶将血红素作为辅基,且大多数过氧化物酶中的血红素含铁离子,小部分含锰、铜、硒或钒等离子。

1.2.4 巯基氧化酶

巯基氧化酶 (sulfhydryl oxidase, EC 1.8.3.3) 是一类由一条多肽链结合一个辅基构成的黄素蛋白。该类酶结合的辅基通常为维生素 B₂ 的衍生物黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 或核黄素-5-磷酸 (flavin mononucleotide, FMN)。巯基氧化酶的催化机理与葡萄糖氧化酶大致相同,但具有更高的底物特异性。在分子氧的存在下,巯基氧化酶特异性地将二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、谷胱甘肽或多肽链的半胱氨酸残基的巯基 (-SH) 氧化为二硫键 (-S-S-),同时产生过氧化氢。过氧化氢作为一种强氧化剂,可继续氧化剩余的巯基 (-SH) 转化为二硫键 (-S-S-)。巯基氧化酶广泛存在于哺乳动物的器官中以及某些微生物细胞内,例如人的皮肤、牛的肾脏、黑曲霉、酱油曲霉等。其中,微生物来源的巯基氧化酶可作为面粉的改良剂添加至面粉中。在小麦面团中,巯基氧化酶作用于谷蛋白的半胱氨酸残基,在蛋白质网络中形成额外的二硫键,从而增强基质。此外,作用过程中产生的过氧化氢可非交联小麦聚合物,从而增强面筋蛋白的网络结构,改善面粉的粉质特性,提高面包老化性,延长货架期^[23]。

1.3 脂氧合酶

脂氧合酶 (lipoxygenase, EC 1.13.11.12)

是一种含非血红素铁的蛋白, 每个多肽中含有 1 个铁原子。该类酶蛋白由单肽链组成, 分子量范围一般在 90–100 kDa。脂氧合酶广泛存在于植物、动物、藻类和真菌中。脂氧合酶并不直接与蛋白质发生反应, 但会催化氧分子与具有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸发生分子内加氧, 从而产生脂肪酸过氧化物。这些过氧化物自由基与小麦蛋白质的巯基发生反应, 进而产生分子间二硫键。二硫键的形成可增加小麦面粉中的麸质网络, 提高抗拉伸阻力, 改善面包纹理结构, 增强面包的烘焙特性^[24]。此外, 脂氧合酶催化亚麻酸和亚油酸形成氢过氧化物, 随后经过氢过氧化物裂解酶 (hydroperoxide lyase, HPL) 途径、二乙烯醚合酶 (divinyl ether synthase, DES) 途径和丙二烯氧合酶 (allene oxide synthase, AOS) 途径等形成一系列活性物质, 从而调控植物生长发育以及防御各种生物和非生物胁迫^[25]。

1.4 谷氨酰内肽酶

谷氨酰内肽酶 (glutamyl endoproteinase, EC 3.4.21.19) 是一种活性中心为丝氨酸残基的类胰凝乳蛋白酶。该酶专一性酶切蛋白质多肽链 C-末端的谷氨酸与天冬氨酸残基 α 羧基形成的肽键, 对大豆蛋白起到疏水性修饰作用, 从而促进大豆蛋白凝聚。谷氨酰内肽酶的活性可被丝氨酸蛋白酶专一性抑制剂苯甲基磺酰氟化物抑制, 其激活剂是 Ca^{2+} 。谷氨酰内肽酶存在于多种细菌中, 包括地衣芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌、枯草芽孢杆菌等, 其分子量约为 12–31 kDa^[26]。谷氨酰内肽酶的底物特异性使其非常有利于蛋白结构分析和固定相肽段的合成, 可选择性地酶切 7S 球蛋白 α 和 α' 亚基的延展区, 从而释放出分子量为 47 kDa 的疏水性核心区。此外, 谷氨酰内肽酶水解大豆蛋白形成的凝胶具有更高的白度。在盐离子存在

时, 形成的凝胶具有更高的持水性和黏度, 可应用于奶酪、酸奶、布丁等食品中。

2 蛋白质交联酶的应用及改造

蛋白质交联是蛋白质改性修饰的重要部分, 是重组食品和新型食品制造的重要内容。与物理交联、化学交联相比, 酶法交联因其反应条件温和、不产生副产物、交联效果好等优点成为最受欢迎的一种蛋白质交联方式, 在很多领域发挥着重要作用。

2.1 蛋白质交联酶在食品工业中的应用

2.1.1 蛋白质交联酶在谷物中的应用

谷物蛋白质的交联在提高谷物产品的感官质量方面发挥重要作用, 而 TG 酶是在谷物蛋白交联中研究最多的酶。据报道, TG 酶的添加可以增加面包屑的硬度, 改善谷蛋白网络的特性, 进而提高低质量谷蛋白的烘焙质量^[27]。在冷冻面团烘焙中, 谷蛋白的质量往往会因冷冻而降低, TG 酶催化的蛋白质交联可提高面包质量和冷冻面团面质网络的冻融稳定性^[28]。研究表明, TG 酶可显著提高由冷冻面团制作的面包的质感, 如烤面包的面包屑强度和面团的吸水性^[29]。TG 酶也对糕点和羊角面包面团的冷冻储存稳定性有积极的影响。

此外, 过氧化物酶也被认为影响麸筋的巯基和面团中阿拉伯聚糖的阿魏酸。据报道, 在面包制作中使用过氧化物酶可改善面团耐受性、面包屑结构和面包体积^[30]。酪氨酸酶和漆酶也被应用于面包制作^[23], 酪氨酸酶可有效交联小麦谷蛋白, 随后面包制作质量发生积极变化。另一方面, 漆酶可在一定程度上交联谷蛋白, 其主要作用于阿拉伯聚糖的交联。

2.1.2 蛋白质交联酶在乳制品中的应用

乳蛋白制品在食品中的应用取决于其理化和功能性质。通过创建分子间或分子内共价键

来修饰乳蛋白的纹理和水结合特性的酶可用来制造具有可接受质地的奶制品。据报道, TG 酶处理牛奶后共价交联数量小幅增加, 从而增加牛奶蛋白凝胶硬度, 乳清分离显著降低, 并因持水能力的改善而增加其弹性。蛋白质交联在牛奶凝胶中的另一个有前途的应用是在酸奶生产中用液体乳清代替牛奶。在酸奶生产中, 酶交联主要用于在不改变最终产品质地性质的情况下, 对添加的脱脂干物质和稳定剂的替代或减少干物质含量^[31]。

氧化酶(酪氨酸酶、漆酶和过氧化物酶等)也是不同牛奶蛋白交联的替代品。目前, 有关氧化酶产生的交联对酸奶凝胶结构改性影响的报道很少。对 2 种不同来源的酪氨酸酶, 即里氏木霉和双孢曲霉的酪氨酸酶对生奶和热处理奶交联能力的研究发现, 双孢曲霉的酪氨酸酶不能催化生奶或热处理奶中的交联, 而里氏酪氨酸酶在这 2 种情况下均能催化其形成交联, 从而增加生奶凝胶中凝胶硬度^[32]。乳清蛋白经过漆酶处理后黏度增加, 凝胶能力增强。然而, 漆酶单独处理不影响酸诱导酪蛋白凝胶的强度, 而在漆酶和阿魏酸的存在下, 凝胶的硬度则显著增加^[33]。

2.1.3 蛋白质交联酶在肉制品中的应用

通过使用交联酶, 可改变肉或鱼产品的功能特性, 如质地和保水性。在这 2 种产品中, 交联的主要目标分子是肌原纤维蛋白及肌球蛋白。到目前为止, TG 酶一直是肉类应用研究的主要交联酶, 在肉类加工中也有应用^[12]。

谷氨酰胺转氨酶应用于高档肉丸、贡丸、火腿、培根及肉肠。肌球蛋白和肌动蛋白是肉制品的重要组成成分, 具有维持肌肉的保水性和粘合力的作用。在加热过程中, 肌球蛋白分子以及肌动蛋白分子之间形成复杂的凝胶空间网络结构, 从而使肉制品具有弹性、切片性和

保水性等品质特征。将 TG 酶加入到肉制品中, 除了可形成空间网络结构外, 还可在肌肉蛋白分子之间形成另一种共价键, 即蛋白质交联。蛋白质交联使蛋白分子结合更紧密, 从而可提高肉制品品质, 增加肉制品弹性、凝胶强度, 提高质地、外观和口感^[34-35]。TG 酶可应用于牛排、猪排、鸡排和巴西烤肉等肉排块, 也可用于涮羊肉、牛肉和火锅肉片等碎肉块重组。肉块重组可充分利用肉制品加工中的副产品(如小肉块、脱骨碎肉和肥肉等下脚料), 在合适的条件下发生交联反应, 使其重组成大肉块, 增加副产品的利用价值和提高经济效益。用 TG 酶生产重组肉制品时, 不仅可以碎肉黏结在一起, 还可将各种非肉蛋白(例如植物蛋白)交联到肌肉蛋白上, 从而实现肉制品的结构重塑, 改善肉制品的口感、风味和营养^[36]。

蛋白质交联酶属于食品添加剂, 在食品工业应用中涉及使用安全的问题。我国食品安全国家标准《食品添加剂使用标准》(GB 2760—2014)中批准的酶制剂品种只有 50 多种, 批准使用的蛋白质交联酶包括谷氨酰胺转氨酶、漆酶和过氧化氢酶^[37]。该标准中规定了酶制剂的使用原则、允许使用的品种、使用范围和使用量。此外, 食品生产加工过程使用的酶制剂应符合食品安全国家标准《食品添加剂食品工业用酶制剂》(GB1886.174—2016)的要求, 该标准规定了食品工业用酶制剂的原料需求和产品要求^[38]。国际食品法典委员会对包括食品工业用酶制剂在内的加工助剂制定了使用指南(《加工助剂物质使用指南》(CAC/GL75—2010)), 规定了加工助剂物质的使用原则^[39]。目前, 欧盟统一的食物工业酶制剂列表还在制定中^[40]。综上所述, 对于在食品生产加工过程中使用的酶制剂, 各国际组织、国家和地区都有较明确

的使用标准,以及较完善的新品种酶制剂的审批制度和安全性评价流程。

2.2 蛋白质交联酶在工业催化中的应用

近年来,酶介导的生物催化在工业催化中的应用不断发展。TG 酶作为生物催化剂的一个主要应用是在皮肤组织工程,能够聚合胶原蛋白用于生产水凝胶和支架^[41]。胶原蛋白是脊椎动物天然存在的结构蛋白,具有维持结缔组织特性和完整性的重要生理功能。同时,胶原蛋白具有低免疫原性、向微生物再形成性、强的机械性能和生物可降解性等特点,这使其成为皮肤工程领域最理想的生物材料。此外,胶原蛋白还是伤口愈合的理想材料^[42]。然而,胶原蛋白在体内也容易被胶原酶快速降解,在高温或溶解于水介质时缺乏机械强度,故其需通过共价交联来稳定。不同的化学交联剂如戊二醛,已被证明在体外和体内可显著降低胶原基质的溶解性、抗原性和生物降解性^[43]。然而,戊二醛表现出一定的细胞毒性。TG 酶可诱导胶原纤维分子间交联,并使胶原纤维分子与其他细胞外基质蛋白共价结合,由此形成胶原支架。TG 酶交联得到的胶原支架表现出更高的收缩温度,将其植入细胞后可使细胞再现其自然状态,故被广泛应用于组织工程领域^[41]。此外,作为无毒交联剂,TG 酶可取代通常用于生产支架生物材料的化学试剂(如戊二醛和甲醛),成为化学生产胶原水凝胶的替代品^[44]。

TG 酶可用于制备食品包装薄膜,制备的薄膜具有高拉伸强度、不溶于水及其他溶剂的优点,可替代由高分子合成材料制造的薄膜^[45]。目前工业应用的明胶主要来自于牛或猪等哺乳动物,成本较高^[46]。其中,鱼明胶是一种具有潜在应用价值的替代品,但较差的物理性能限制了其在工业领域的应用^[47]。利用 TG 酶对鱼明胶进行改性,改善其物理性质,可扩大鱼明胶

薄膜的应用范围。利用 TG 酶处理过的鱼明胶,其黏度、抗拉伸强度、熔点、氧阻隔性能及薄膜分子量都显著增加,从而有助于形成耐热、耐水性的薄膜。经 TG 酶交联过的酪蛋白脱水后,可得到不溶于水的薄膜。该薄膜是一种可食用的膜,能够被胰凝乳蛋白酶分解,故能够用作食品包装材料来包埋脂类或脂溶性物质,提高食品的弹性和持水能力。

2.3 蛋白质交联酶在医药领域中的应用

乳糜泻是一种慢性炎症性肠道疾病,其病因是人体对麦胶不耐受而引起的原发肠源性吸收不良综合征。治疗乳糜泻的方式主要为消除饮食中有害的麸质肽和钝化免疫刺激作用,其中最有效的控制方式是日常摄取无麸质的食品。利用 TG 酶处理小麦制品可降低面包中免疫刺激性麸质肽的含量,进而可用于治疗乳糜泻^[48]。研究表明,TG 酶可在体外解毒麸质肽,使麸质转酰胺基化,从而减少麦醇溶蛋白和麦谷蛋白对肠道的刺激,以及在不影响食品感官性质的同时减少 T 细胞诱导的 γ 干扰素(interferon- γ , INF- γ) 的产生。然而,其普适性还有待探究^[49]。

食品过敏是过敏性疾病的一种,而 TG 酶可降低某些蛋白质的致敏性^[50]。TG 酶处理提高糖基化反应,可有效地降低虾类产品的致敏性。据报道,TG 酶处理提高糖基化反应可改变虾原肌球蛋白的结构,导致其免疫球蛋白的结合能力下降,破坏致敏性表位,从而降低虾类产品的致敏性^[51]。通过 mTG 酶修饰异源聚合物的支链可有效地破坏大豆分离蛋白的结构,掩盖或破坏线性抗原表位^[52]。虽然大豆分离蛋白对乳清分离蛋白和酪蛋白的异源聚合有限地降低了免疫球蛋白的反应活性,但具有低活性免疫球蛋白的异源蛋白聚合物可适用于对牛奶蛋白过敏的群体。

3 蛋白质交联酶的挖掘与改造

3.1 蛋白质交联酶的挖掘

蛋白质交联酶在原料种类繁多、环境复杂的工业应用中可能会出现催化效率不高、稳定性差的问题,因而难以适应高生产强度、高集约化程度的现代工业。具有高活性同时具备优异适应性的蛋白质交联酶可与复杂的工业生产环境相匹配,是实现酶促蛋白质交联产业化的基础及关键。目前,工业应用中最常见的蛋白质交联酶为谷氨酰胺转氨酶。谷氨酰胺转氨酶具有非常特殊的结构和强交联能力,故其作为一种新型的食品添加剂已经实现商业化生产。谷氨酰胺转氨酶可由微生物发酵生产制备,市场价格约为 8.5–26.0 万元/t,而其他类型的氧化酶如漆酶和酪氨酸酶的市场价格在 20 万元/t 左右。故有必要挖掘和开发具有高活性的蛋白质交联酶,研究其在工业环境下的催化行为变化,并建立相应的改造策略,为酶促蛋白质交联产业提供催化效率更快、适应性更强的生物催化剂,降低应用成本,促进减污降碳,推进生物制造高质量绿色可持续发展。

未来对蛋白质交联酶的稳定性和活性等性能的提高策略有 2 大主流方向:一是利用基因挖掘技术筛选高活性的新酶,主要包括传统方法、宏基因组方法和蛋白质组方法(图 2)。传统方法依赖于微生物的富集与分离,结合分子生物学或计算方法鉴定新酶。宏基因组方法是从宏基因组文库中搜索所需功能的酶。蛋白质组方法通过提取微生物产生酶,消化成短肽,进行测序,结合生物信息学分析鉴定新酶。深入挖掘其他类型的交联酶,丰富食品的感官品质。最近从南极磷虾中纯化出了一种最适温度为 0–10 °C 的嗜冷 TG 酶,并证明它能够增强鱼明胶的冷固化胶凝作用^[53]; Ceresino 等分离出

一株高产谷氨酰胺转氨酶菌株,产率高达 (6.074 ± 0.019) U/mL^[54];要进一步提高 TG 酶的产量还需要对其生物合成机理进行解析,通过对 TG 酶生产菌株茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraensis*) 进行蛋白质组学分析, TG 酶在细胞分化过程中表达,在细胞受到不利环境胁迫时上调,在培养早期 $MgCl_2$ 胁迫促进 TG 酶的生物合成^[55]。对于氧化酶的基因挖掘也有相关的报道, Glazunova 等利用基因挖掘技术从隔孢伏革菌 (*Peniophora lycii*) 中得到 2 种新的具有较好耐热性的漆酶 Lac5 和 LacA, 70 °C 的半衰期分别为 10 min 和 8 min,酶活高达 97 U/mg 和 121 U/mg^[56]; Dandare 等对土壤中细菌漆酶的宏基因组分析揭示了土壤水平的特异性分布,通过基因挖掘,可以直接从土壤中获得新的细菌漆酶^[57];另一项研究中,研究者比较 2 种酪氨酸酶 TyrAb (来自双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)) 和 TyrBo2 (来自葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria obtuse*)), 结果发现这 2 种酪氨酸酶都能通过胶原蛋白交联形成高分子聚合物^[58]。

3.2 蛋白质交联酶的改造

另一主流方向是利用酶工程技术改造现有的交联酶,包括定向进化、理性设计和半理性设计(图 2)。定向进化是指在实验室中模拟自然界中随机突变的进化过程:首先,通过特定的诱变或重组技术(易错聚合酶链式反应(error-prone polymerase chain reaction, error-prone PCR)、脱氧核糖核酸改组(deoxyribonucleic acid shuffling, DNA shuffling)等)对酶蛋白的基因进行改造,以构建突变体文库;然后,建立高通量筛选方法以考察突变体文库中各个突变体的热稳定性状况,最终筛选出阳性突变体。理性设计通过计算机辅助,利用分子动力学模拟、量子力学、分子对接、机器学习等手段实现对关键位点的精准设计,从而得到目标酶。半理性设计则是

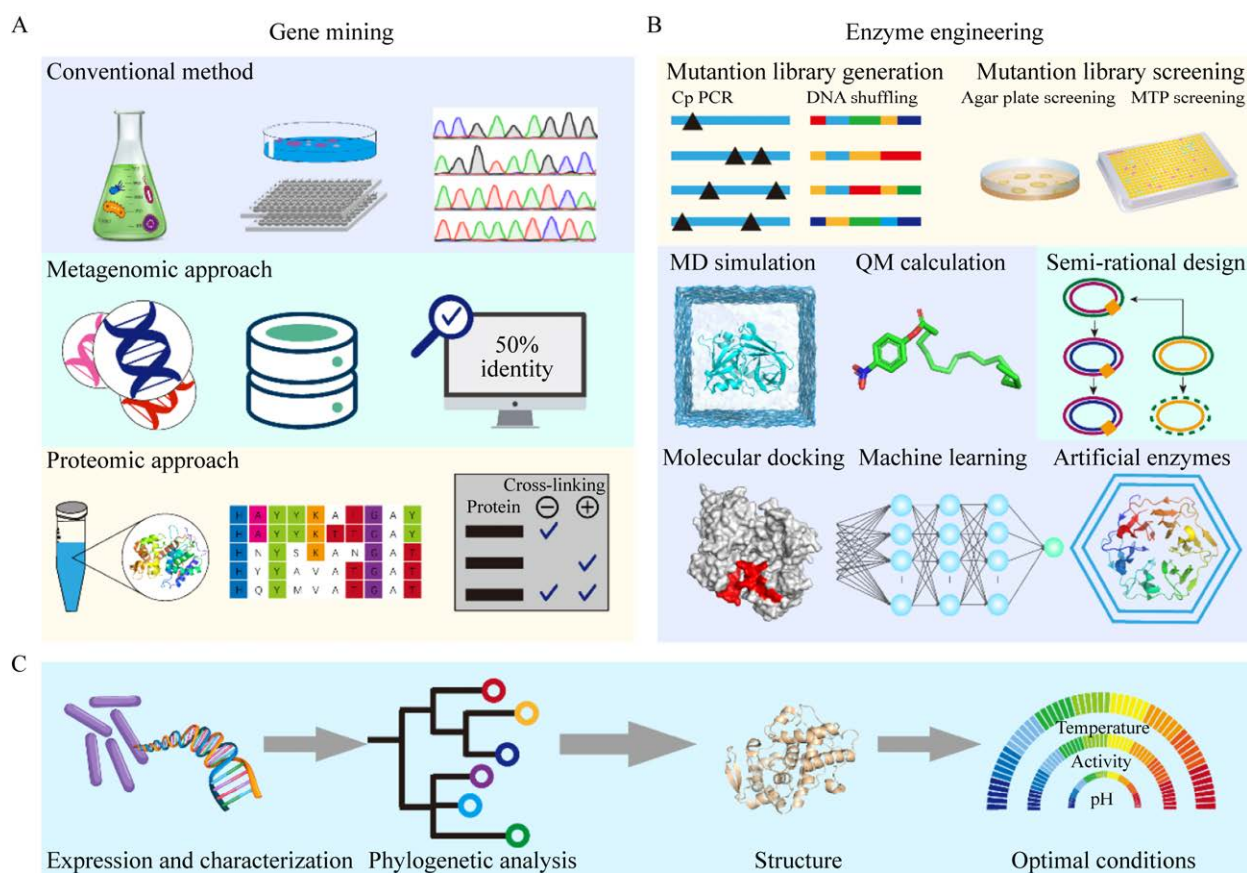


图2 蛋白质交联酶挖掘和改造策略

Figure 2 Strategies for mining and engineering of protein cross-linking enzymes.

通过对酶蛋白中较灵活的位点或区域进行迭代饱和和突变等，来改造蛋白的热稳定性。

在第三次生物催化浪潮中，大量的蛋白质结构分析数据和生物信息学等工具的开发推动了理性设计来实现蛋白质热稳定化的进程。目前，热稳定性改造的最新动态已经发展到计算机辅助的理性设计，即数字驱动下的理性改造。与非理性的随机突变和半理性的位点定向饱和和突变相比，理性设计更快速、更具针对性。对TG酶热稳定性的改造研究中，在稳定性较高的TG酶突变体MS (S2P-S23V-Y24N-S199A-K294L) 的基础上进一步提高热稳定性，得到的最优突变体P22C-Q328C的残余酶活比MS提高了91.06%^[59]。Mu等对mTG进行5个位点

的突变，最优突变体DM01 (S2P-S23V-Y24N-S199A-K294L) 的酶活达到 (55.7 ± 1.4) U/mg，50 °C下的半衰期为418.2 min^[60]；在氧化酶的功能改造研究中，Nikolaivits等表征了一种新型多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO)，与野生型相比，重组酶G292N/Y296V的酶活增加了5.3倍^[61]；Shahrisa等通过定点突变获得具有增强儿茶酚酶活性的重组酪氨酸酶，其中突变体M374D的儿茶酚酶活性显著提高，提高了13.2倍^[62]；辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 是一种被广泛研究的酶，传统上HRP是从植物中提取的，但重组HRP (recombinant HRP, rHRP) 生产是一种很有前途的替代方法。四个糖基化位点的氨基酸，即N13、N57、N255和

N268, 可通过定点突变进行突变并结合成双酶、三酶和四酶变体。研究表明, 与未突变的 rHRP 基准酶相比, 以 ABTS 为还原底物的四突变体 rHRP N13D/N57S/N255D/N268D 的热稳定性提高了 2 倍, 催化活性提高了 8 倍^[63]; 对于漆酶活性的改造研究, 湛江波研究了来源于嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) SG0.5JP17-16 漆酶的酶活, 利用定点突变技术得到突变体 D193M, 比酶活较野生型提高了 30%^[64]。Wang 等在大肠杆菌中过表达了一种淀粉液化芽孢杆菌漆酶突变体 D501G, 其发酵液上清中的酶活达到 3 374 U/L^[65]。许开忠则筛选出了对底物 2,2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐的催化活性提高 4.13 倍的漆酶突变体 S208G/F227A (SF)^[66]。对蛋白质交联酶的改造研究取得了一定的成果, 但开发高活性和环境适应性的蛋白质交联酶仍是长期的研究目标。

4 展望

食品质构对食品稳定性和消费者感知起着重要作用。随着低脂、低热量产品发展趋势的不断上升, 食品的质构进一步得到重视。蛋白质交联, 尤其是酶法交联, 在为调整食物结构提供特定和自然的手段方面有很大的潜力。潜在的蛋白质交联酶包括 TG 酶和各种氧化酶的反应机制不同, 需要不同的工艺特性。目前的商业应用均是基于 TG 酶的, TG 酶已广泛用于肉类、乳制品、鱼类和烘焙中。然而, 交联酶的生产成本较高, 限制了其在工业上的大规模应用。因此, 有必要提高酶的稳定性和催化活性, 从而降低其应用成本。此外, 酶法交联反应过程中产生的自由基在反应体系中的消减与残留, 以及对人体健康有无潜在的危害, 也值得深入研究。目前, 酶催化的蛋白质交联主要应用于食品化工领域, 在其他领域应用较少。

因此, 有必要丰富和拓展酶催化的蛋白质交联技术在其他相关领域的应用。

REFERENCES

- [1] Domeradzka NE, Werten MW, Wolf FA, et al. Protein cross-linking tools for the construction of nanomaterials. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 39: 61-67.
- [2] Arora B, Tandon R, Attri P, et al. Chemical crosslinking: role in protein and peptide science. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18(9): 946-955.
- [3] McKerchar HJ, Clerens S, Dobson RCJ, et al. Protein-protein crosslinking in food: proteomic characterisation methods, consequences and applications. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 86: 217-229.
- [4] Isaschar-Ovdat S, Fishman A. Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes-a review. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 72: 134-143.
- [5] Li XQ, Li SQ, Liang XP, et al. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: laccase, peroxidase and tyrosinase. *Trends Food Sci Technol*, 2020, 103: 78-93.
- [6] Chan SK, Lim TS. Bioengineering of microbial transglutaminase for biomedical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(7): 2973-2984.
- [7] Chen CC, Chen LY, Chan DS, et al. Influence of microbial transglutaminase on physicochemical and cross-linking characteristics of individual caseins. *Molecules*, 2020, 25(17): 3992.
- [8] Duarte L, Matte CR, Bizarro CV, et al. Transglutaminases: part I-origins, sources, and biotechnological characteristics. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36(1): 15.
- [9] Liu YX, Zhang YF, Guo ZH, et al. Enhancing the functional characteristics of soy protein isolate via cross-linking catalyzed by *Bacillus subtilis* transglutaminase. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(10): 4154-4160.
- [10] Savoca MP, Tonoli E, Atobatele AG, et al. Biocatalysis by transglutaminases: a review of biotechnological applications. *Micromachines*, 2018, 9(11): 562.
- [11] Chen X, Fu WY, Luo YC, et al. Protein deamidation to produce processable ingredients and engineered colloids for emerging food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 20(4): 3788-3817.

- [12] Zhang GQ, Ma SJ, Liu X, et al. Protein-glutaminase: research progress and prospect in food manufacturing. *Food Biosci*, 2021, 43: 101314.
- [13] Heck T, Faccio G, Richter M, et al. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 461-475.
- [14] Matoba Y, Kihara S, Bando N, et al. Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein. *PLoS Biol*, 2018, 16(12): e3000077.
- [15] Fujieda N, Umakoshi K, Ochi Y, et al. Copper-oxygen dynamics in the tyrosinase mechanism. *Angewandte Chemie Int Ed*, 2020, 59(32): 13385-13390.
- [16] Gąsowska-Bajger B, Wojtasek H. Reactions of flavonoids with o-quinones interfere with the spectrophotometric assay of tyrosinase activity. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(26): 5417-5427.
- [17] Park J, Jung H, Kim K, et al. D-tyrosine negatively regulates melanin synthesis by competitively inhibiting tyrosinase activity. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2018, 31(3): 374-383.
- [18] Chen MY, Waigi MG, Li SY, et al. Fungal laccase-mediated humification of estrogens in aquatic ecosystems. *Water Res*, 2019, 166: 115040.
- [19] Du YW, Ma H, Huang LP, et al. Electrochemical characteristics of the decolorization of three dyes by laccase mediator system (LMS) with synthetic and natural mediators. *Chemosphere*, 2020, 239: 124779.
- [20] Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 200.
- [21] Le Bourvellec C, Renard CMGC. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52(3): 213-248.
- [22] Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, et al. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(3): 871-897.
- [23] Pourmohammadi K, Abedi E. Enzymatic modifications of gluten protein: oxidative enzymes. *Food Chem*, 2021, 356: 129679.
- [24] Permiakova MD, Trufanov VA. Effect of soybean lipoxygenase on baking properties of wheat flour. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2011, 47(3): 348-354.
- [25] Babenko LM, Shcherbatiuk MM, Skaterna TD, et al. Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *Ukr Biochem J*, 2017, 89(1): 5-21.
- [26] Kawalec M, Potempa J, Moon JL, et al. Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. *J Bacteriol*, 2005, 187(1): 266-275.
- [27] Ogilvie O, Roberts S, Sutton K, et al. The use of microbial transglutaminase in a bread system: a study of gluten protein structure, deamidation state and protein digestion. *Food Chem*, 2021, 340: 127903.
- [28] Hejrani T, Sheikholeslami Z, Mortazavi SA, et al. The evaluation of part-baked frozen bread produced from wheat flour and guar gum in the diet of celiac patients. *J Food Sci Technol*, 2021, 58(7): 2507-2515.
- [29] Gerrard JA, Fayle SE, Wilson AJ, et al. Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. *J Food Sci*, 1998, 63(3): 472-475.
- [30] Zhang YP, Chen MR, Chen Y, et al. Characterization and exploration of recombinant wheat catalase for improvement of wheat-flour-processing quality. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(9): 2660-2669.
- [31] Gharibzadeh SMT, Chronakis IS. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: utilization in functional yogurt products. *Food Chem*, 2018, 245: 620-632.
- [32] Khan U, Selamoglu Z. Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Arch Razi Inst*, 2020, 75(1): 131-136.
- [33] Ercili Cura D, Lantto R, Lille M, et al. Laccase-aided protein modification: effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels. *Int Dairy J*, 2009, 19(12): 737-745.
- [34] Yang XQ, Zhang YM. Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products. *Food Chem*, 2019, 291: 245-252.
- [35] Santhi D, Kalaikannan A, Malairaj P, et al. Application of microbial transglutaminase in meat foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(10): 2071-2076.
- [36] Zinina O, Merenkova S, Galimov D, et al. Effects of microbial transglutaminase on technological, rheological, and microstructural indicators of minced meat with the addition of plant raw materials. *Int J Food Sci*, 2020, 2020: 8869401.
- [37] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission of

- the People's Republic of China. National food safety standard for food additives use: GB2760—2014. Beijing: Standards Press of China, 2015 (in Chinese).
- [38] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂: GB1886.174—2016. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard-food additives-enzyme preparation for food industry: GB1886.174—2016. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [39] Codex Alimentarius Commission. Guidelines on substances used as processing aids: CAC/GL 75—2010. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/http://www.fao.org/faowho-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>.
- [40] 张俭波. 食品工业用酶制剂的管理. 生物产业技术, 2019(3): 83-90.
Zhang JB. Regulatory management of enzyme preparation for food industry. Biotechnol Bus, 2019(3): 83-90 (in Chinese).
- [41] Cheng S, Wang WH, Li Y, et al. Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. Food Chem, 2019, 271: 527-535.
- [42] Avila Rodríguez MI, Rodríguez Barroso LG, Sánchez ML. Collagen: a review on its sources and potential cosmetic applications. J Cosmet Dermatol, 2018, 17(1): 20-26.
- [43] Chen C, Liu F, Yu Z, et al. Improvement in physicochemical properties of collagen casings by glutaraldehyde cross-linking and drying temperature regulating. Food Chem, 2020, 318: 126404.
- [44] Avendano A, Chang JJ, Cortes-Medina MG, et al. Integrated biophysical characterization of fibrillar collagen-based hydrogels. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(3): 1408-1417.
- [45] Rosseto M, Rigueto CVT, Krein DDC, et al. Accelerated aging of starch-gelatin films with enzymatic treatment. J Polym Environ, 2021, 29(4): 1063-1075.
- [46] Sultana S, Ali ME, Ahamad MNU. Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods. Amsterdam: Elsevier, 2018: 215-239.
- [47] Derkach SR, Voron'ko NG, Kuchina YA, et al. Modified fish gelatin as an alternative to mammalian gelatin in modern food technologies. Polymers, 2020, 12(12): 3051.
- [48] Silva HA, Paiva EG, Lisboa HM, et al. Role of chitosan and transglutaminase on the elaboration of gluten-free bread. J Food Sci Technol, 2020, 57(5): 1877-1886.
- [49] Miró M, Alonso-Garrido M, Lozano M, et al. Adherence to dietary treatment and clinical factors associated with anti-transglutaminase antibodies in celiac disease during the follow-up. Heliyon, 2021, 7(4): e06642.
- [50] Zhu JR, Deng H, Yang AS, et al. Effect of microbial transglutaminase cross-linking on the quality characteristics and potential allergenicity of tofu. Food Funct, 2019, 10(9): 5485-5497.
- [51] Wang YB, Ni SQ, Wang C, et al. Cross-linking of shrimp tropomyosin catalyzed by transglutaminase and tyrosinase produces hypoallergens for potential immunotherapy. Food Funct, 2019, 10(3): 1609-1618.
- [52] Luo KY, Liu ST, Miao S, et al. Effects of transglutaminase pre-crosslinking on salt-induced gelation of soy protein isolate emulsion. J Food Eng, 2019, 263: 280-287.
- [53] Zhang Y, He SD, Simpson BK. A cold active transglutaminase from Antarctic krill (*Euphausia superba*): purification, characterization and application in the modification of cold-set gelatin gel. Food Chem, 2017, 232: 155-162.
- [54] Ceresino EB, De Melo RR, Kuktaite R, et al. Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. Food Chem, 2018, 241: 403-410.
- [55] Zhang LL, Sun L, Yi HX, et al. Comparative proteome analysis of *Streptomyces mobaraensis* under $MgCl_2$ stress shows proteins modulating differentiation and transglutaminase biosynthesis. Food Res Int, 2019, 121: 622-632.
- [56] Glazunova OA, Moiseenko KV, Savinova OS, et al. Purification and characterization of two novel laccases from *Peniophora lycii*. J Fungi (Basel), 2020, 6(4): 340.
- [57] Dandare SU, Young JM, Kelleher BP, et al. The distribution of novel bacterial laccases in alpine paleosols is directly related to soil stratigraphy. Sci Total Environ, 2019, 671: 19-27.
- [58] Isaschar-Ovdat S, Fishman A. Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes-a review. Trends Food Sci Technol, 2018, 72: 134-143.

- [59] 杜建辉. 谷氨酰胺转氨酶高效表达及热稳定性改造[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
Du JH. High-level expression and thermostability modification of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [60] Mu DD, Lu JJ, Shu C, et al. Improvement of the activity and thermostability of microbial transglutaminase by multiple-site mutagenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(1): 106-109.
- [61] Nikolaivits E, Dimarogona M, Karagiannaki I, et al. Versatile fungal polyphenol oxidase with chlorophenol bioremediation potential: characterization and protein engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(23): e01628-e01618.
- [62] Shahrissa A, Nikkhah M, Shirzad H, et al. Enhancing catecholase activity of a recombinant human tyrosinase through multiple strategies. *Iran J Biotechnol*, 2020, 18(2): e2310.
- [63] Humer D, Spadiut O. Improving the performance of horseradish peroxidase by site-directed mutagenesis. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 916.
- [64] 湛江波. 漆酶 lacTT 底物结合域中关键氨基酸功能的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
Zhan JB. Study on function of amino acids in substrate binding domain in *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 laccase[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [65] Wang JY, Lu L, Feng FJ. Improving the indigo carmine decolorization ability of a *Bacillus amyloliquefaciens* laccase by site-directed mutagenesis. *Catalysts*, 2017, 7(9): 275.
- [66] 许开忠. 定点突变提高 CotA 漆酶活性及其对孔雀石绿的降解作用机理[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
Xu KZ. Enhancing *CotA*-laccase activity via site-directed mutagenesis and its degradation mechanism to malachite green[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)