

漆酶在食品工业中的应用及其产生菌的研究

王岁楼, 王琼波

(郑州轻工业学院食品与生物工程系, 河南 郑州 450002)

摘 要: 漆酶是含铜的多酚氧化酶, 用途广泛。本文主要阐述它在食品工业中的应用及其安全性, 并介绍目前对其产生菌、菌种筛选、酶的诱导、抑制因素等方面的研究。

关键词: 漆酶; 食品; 真菌; 筛选; 诱导剂; 抑制剂

Application of Laccase in the Food Industry and Its Producer

WANG Sui-lou, WANG Qiong-bo

(Department of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Laccase is a kind of Cu-contained polyphenol oxidase. It was applied in many area. In this article, we primarily discuss its application and safety in the food, study its inducer and inhibitor and screen the fungi that secrete laccase.

Key words: laccase; food; fungi; screening; inducer; inhibitor

中图分类号: TQ926.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0260-04

漆酶(氧化还原酶, EC 1.10.3.2)是含铜的糖蛋白, 每个蛋白分子含有四个铜离子, 大多数蛋白呈蓝色。铜位于漆酶的活性中心, 在有氧情况下通过四个铜离子的协同作用氧化底物, 同时把氧还原成水。漆酶的作用底物广泛, 除了可催化氧化酚和芳胺类化合物及其衍生物外, 还可催化甾体激素、金属有机化合物、生物素和抗坏血酸等其他非酚类化合物。这些性质决定了漆酶在废水处理、造纸、食品工业等领域具有很大的应用潜力。漆酶广泛分布于植物、动物和微生物中, 特别是在白腐真菌中普遍存在。目前, 一些大型真菌的产酶条件、漆酶基因的异源表达及其所分泌的漆酶的性质、特点是国内外学者研究的热点。漆酶有多种同工酶, 来源不同, 同工酶的数量、种类、分子量、含糖量不同, 但是催化机理相同。漆酶漆酶的底物也是真菌漆酶的底物, 但真菌漆酶的催化活性较高^[1]。本文就漆酶在食品工业中的应用及其产生菌的筛选方法和诱导因素等进行讨论。

1 漆酶在食品工业中的应用

漆酶可用于饮料加工、食用菌及焙烤食品生产中。漆酶应用于食品加工中可提高食品生产的产量、效率和质量, 但并不明显增加投资和生产成本。漆酶在食品工业中的应用也不会产生有毒物质。

1.1 在饮料中的应用

果汁、果酒和啤酒的色泽和透明度是它们成品质量的重要指标。这些饮料在贮存期间由于一些酚类化合物的存在会再次发生混浊或色泽的变化, 影响它们的品质。漆酶可用于提高这些饮料的稳定性。但是由于漆酶可氧化抗坏血酸, 利用漆酶处理饮料时要考虑对VC的破坏。

水果在加工前, 在完整的植物细胞中水果自身含有的酚类氧化酶与酚类基质被隔离在不同的空间中, 当榨汁时细胞破碎, 在氧气存在下多酚氧化酶氧化酚类, 使儿茶酚、儿茶素等形成复杂的褐色聚合物, 果汁中的蛋白质和酚类也会结合成大分子聚合物发生沉淀。无论是酶促褐变还是蛋白质-酚类化合物的聚合都需要一定时间, 有些酚类物质在加工过程中没有发生反应, 色泽和透明度都满足要求, 而在贮存过程中继续反应产生了混浊。采用传统加工方法如吸附技术除去酚类物质可以控制果汁的褐变与二次混浊, 但由于吸附技术对酚类化合物无选择性, 使一些具有突出生理功效的小分子酚类化合物如类黄酮同样被从果汁中除去, 降低了果汁的风味及营养价值^[2]。利用酶的专一性可有效地避免这种损失。Maier和Dietrich利用漆酶代替传统的方法来稳定苹果汁和梨汁, 处理后的果汁不仅储存期延长而且使水果具有新鲜风味的挥发性酚类化合物仍保留在果汁中^[3]。

白葡萄酒中的酚类物质赋予葡萄酒的颜色和风味,

收稿日期: 2003-11-03

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0411021900)

作者简介: 王岁楼(1961-), 男, 教授, 在读博士, 主要从事食品与生物技术方面的研究。

但一些酚类化合物的氧化也是造成白葡萄酒褐变、混浊和风味改变的主要原因。用传统方法处理会导致葡萄酒酒体平淡、柔弱,而在酒精发酵前就使用酶法消除影响葡萄酒稳定性的多酚物质既可达到目的又可消除不利的影响因素^[4]。Cantarellit等人^[5]用单宁酶、酚氧化酶和漆酶处理的葡萄酒与非酶法处理的相比较,结果显示酶法处理的葡萄酒具有更好的抗氧化能力和色泽稳定性,且以漆酶效果最佳,这是因为漆酶的氧化活性比其它的氧化酶活性大。研究结果表明用漆酶处理后的葡萄酒的多酚类物质含量、色度、稳定性都较传统方法好。

啤酒中存在过量的多酚类物质是引起啤酒失光的常见原因之一。在啤酒生产的后期阶段添加漆酶不仅能够除去多酚还可除去啤酒中多余的氧气,因而啤酒的贮存期被延长。漆酶与多酚形成的沉淀通过过滤或其它方法除去^[6]。

由于食品添加剂专家联合委员会(JECFA)及粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)等组织仍未批准漆酶作为食品添加剂,但漆酶如以固定化酶的形式应用于饮料加工可确保饮料中不含漆酶。

漆酶还可用来提高红茶的品质。Murugesan等人^[7]用由红茶菌中分离出的纤维素酶、果胶酶和木聚糖酶与从 *Trametes versicolor* 中提纯的漆酶进行提高红茶品质的研究,发现纯化的纤维素酶和漆酶以 3:2(V/V)的比例混合发酵对红茶的一些质量参数如茶黄素(TF)、茶玉红精(TR)等方面影响最大,可最有效地提高红茶质量。

1.2 食用菌生产

木质素是一种高分子聚合物,在木材中约占 30%。食用菌在木材、木屑、棉籽壳等培养料上培养时,木质素是最主要的碳源。漆酶可降解木质素为小分子物质为食用菌生长利用。

漆酶可作为食用菌呼吸作用中的末端氧化酶之一,有利于食用菌呼吸过程中电子传递的正常运行,加大呼吸强度,为菌体的生命活动提供更多的可利用能量从而加速食用菌的生长发育。漆酶分解木质素为菌体生长提供养料的同时,会产生酚类或醌类化合物,而酚或醌是一种很好的杀虫剂,能够抑制杂菌生长,防止食用菌在制种和袋料栽培过程中的杂菌污染。漆酶在香菇袋料栽培过程中的转色阶段起着重要作用,影响香菇的产量和品质。

木质素是食用菌的主要有效营养物,由于漆酶可降解木质素,因此在木质素中添加漆酶作为培养食用菌的材料,从而使食用菌的液体培养成为可能^[8]。液体培养食用菌既可真正做到节约木材,又可更为方便地生产食用菌饮料。

1.3 焙烤食品

在面团中添加漆酶可以提高焙烤食品的体积和松软

性,改善面包心结构。漆酶添加于面团中,发生氧化反应,能够将面筋分子中的巯基氧化为二硫键,从而增强面筋强度,改善面团的拉伸特性、稳定性,减少粘连,因而提高面团的加工性能。漆酶添加于质量低的面粉中对于提高面团的加工性能方面的效果更为突出^[9,10]。Labat等人^[11]研究了漆酶和阿魏酸(FA)对小麦面粉的影响,发现当漆酶与阿魏酸混合添加时可缩短面团的制作时间,加快生面团的崩解,提高面团性能,但是当漆酶单独使用时会降低面团中阿拉伯木聚糖的可提取性。

1.4 其它相关领域

漆酶添加在漱口水、牙膏、口香糖、薄荷糖等各种口腔用品中可起到抑制口臭的作用^[12]。固定化漆酶可除去饮用水和灌溉水中的有毒酚类化合物,净化生活和工业用水,减少环境污染。因为漆酶在氧化-还原过程中消耗氧气,添加于含油食品中可去除其中的氧气,防止食品氧化变质。漆酶可促使制糖甜菜中的果胶发生交联,生成食用凝胶。Lacki和Duvnjak^[13]用来源于 *Frametes versicolor* 的漆酶处理低芥酸菜籽产品(通常用作饲料饲养家畜家禽),3h 酚含量降低约 90%,如果降低低芥酸菜籽中酚的浓度,那么它可完全代替大豆蛋白用于食品和饲料的生产。

1.5 漆酶应用的安全性

漆酶在食品中具有很大的应用潜力,除上述用途外,许多应用还有待于开发。那么漆酶在食品中的应用的安全性如何呢?Brinch等人^[3,12]对此做了实验,所用的漆酶是由表达了 *Polyporus pinsutis* 漆酶基因的 *Aspergillus oryzae* 菌株深层发酵、纯化而来,按照一系列的毒理学测试证明漆酶在食品及相关领域中的应用是安全的。在致畸致突变的实验中没有引起鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)组氨酸缺陷菌株的回复突变,也没有引起培养的人淋巴细胞的染色体畸变。毒性研究实验证明没有吸入毒性,对皮肤和眼睛也无刺激,漆酶用量为 10%(W/V)也不会引起皮肤过敏。以 2601U/d·kg 体重的漆酶用量喂养小鼠 13 周没有引起任何有害的副作用。而漆酶在果汁中的最大用量是 50U/L 果汁。

由于漆酶的活性中心有 4 个铜离子,测试用的样品铜含量 40mg/L,浓度高于所推荐的重金属含量 30mg/L(假定一个最坏的情况是漆酶中与蛋白结合的铜在果汁中都是以自由态形式存在的),安全系数仍比饮用水中允许的大 100 倍。另一方面,铜也是人体所必须的微量营养元素,美国食品与药品管理局推荐成年人的日摄入铜量为 2mg/d (FDA, 1995),平均苹果汁消耗量中铜的含量只占这个标准的 0.013%^[12]。

综上所述漆酶在食品中的应用是安全的。

2 漆酶产生菌的研究

2.1 产漆酶菌种

漆酶分布广泛,但在微生物中最主要的产生者是白腐真菌,且为胞外酶。目前只在细菌生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)中发现有漆酶。由于漆酶具有降解木质素的能力,产漆酶菌的采集分离常从腐朽的树木、锯末、枯叶、稻草秸秆及棉籽壳中分离,也有从植物腐殖质丰富的土壤中分离。唐舜等人^[14]从中国采集的149株木腐菌中发现有30株具有漆酶活性,涉及13个属,皆为白腐菌。在添加了诱导剂阿魏酸后产量升高(漆酶含量在10000U/L以上)的菌株有9个,分别属于彩绒革盖菌(*Coriolus versicolor*)、相邻小孔菌(*Microporus affinis*)、血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus*)、香菇(*Lentinus edodes*)、鲑贝革盖菌(*Coriolus consors*)、和干酪菌(*Tyromyces sp.*)。他们还发现彩绒革盖菌、相邻小孔菌和血红密孔菌具有重要的生物工程研究价值。Saito等人^[15]从土壤中分离一株真菌(*Chaetomiaceae*)分泌胞外漆酶,并对其酶学性质进行了研究。对于漆酶的产生菌,国内外研究得较多较深入的是栓菌属(*Trametes*)、革盖菌属(*Coriolus*)、多孔菌属(*Polyporus*)。特别对于*Trametes versicolor*的研究更为深入。*T. versicolor*产生的胞外漆酶在纸浆漂白、降解污水中的有毒物质和在食品中的应用都有报道,并且对它分泌的漆酶同工酶种类、分子量、含糖量、cDNA克隆及异源表达等生理生化方面进行了较为深入的研究,并已建立了*T. versicolor*基因文库。在对栓菌、革盖菌和多孔菌的研究中发现栓菌产漆酶活性较高但培养达到产酶高峰所需的时间较长,因此用它作为漆酶基因的供体菌进行异源表达比较合适。通常情况下,漆酶基因实现异源表达并产生较高的活性是比较困难的,现已报道在酵母*Saccharomyces cerevisiae*和*Pichia pastoris*中,丝状真菌*Trichoderma reesei*和*Aspergillus oryzae*中成功实现了漆酶基因的异源表达。与酵母相比,丝状真菌是很好的漆酶基因受体菌,但是丝状真菌的生长和生产周期较长。为了实现高效、快速的异源表达,需对漆酶基因进行定点诱变。漆酶在酵母中的异源表达不仅能产生大量的某种单一的漆酶,还赋予酵母新的特性^[16,17]。

2.2 产漆酶菌株的筛选

从自然界采集或从其他地方收集到的菌株需经过初级的快速筛选鉴定,筛选出产漆酶活性较高的菌株,为进一步研究奠定基础。目前采用的初筛方法较多,但都以漆酶的作用底物为初筛试剂,现介绍几种常用的方法如下:

(1)综合马铃薯培养基中加入 α -萘酚,使其在培养基中的浓度为 5×10^{-4} mol/L,如果在此培养基上生长的菌落周围出现明显的紫色圈时说明有漆酶分泌^[18]。

(2)用浓度为0.04mmol/L的醇溶愈创木酚溶液滴定综合马铃薯培养基上的菌落边缘,有漆酶存在时滴定区变浅红色^[18]。

(3)在稀释到10~15°Bx, pH6.4的麦芽汁中加入2%的琼脂和0.2%的没食子酸制成Bavendam氏反应培养基,将此培养基倒平板,待测菌接种于平板中,菌落周围有褐色环带者为产漆酶菌株^[19]。

(4)待测菌在麦芽汁平板上长出单菌落后,用 10^{-3} mol/L的邻联茴香胺(70%醇溶)覆盖整个平板,24h后菌落周围和下面出现黑紫色变化的为产漆酶菌^[20]。

有些分泌漆酶菌株用某种筛选方法不呈阳性反应,当加入某种酚类诱导物或用另一种方法时呈阳性反应。这可能是由于漆酶来源不同,同工酶种类和含量不同,对某种酚类物质的降解能力不同,还可能是由于不同的菌株对各酚类诱导物的敏感程度不同,或者是因为酚类物质的取代基种类、数目、在芳环上的位置不同,漆酶的反应活性也有差异。

2.3 漆酶的诱导和抑制

许多与木质素相关的低分子化合物如酚类和芳香族化合物对漆酶的分泌有诱导作用。有些白腐真菌漆酶产量并不高,但在培养基中添加酚类或芳香族化合物可大大提高漆酶产量,如二甲代苯胺、茴香胺、阿魏酸、单宁酸、没食子酸、愈创木酚、儿茶酚、联苯胺、香兰素、咖啡酸等。其中对茴香胺、没食子酸和2,5-二甲代苯胺是公认的芳香族漆酶诱导物^[21]。Carbajo等人^[22]发现单宁酸诱导白腐真菌*Coriolopsis gallica*漆酶基因的转录,在补充了单宁酸的培养基上胞外漆酶活性有显著提高。这些化合物在一定浓度下对漆酶的分泌有诱导作用,浓度过低促进作用不明显,浓度过高反而会抑制漆酶的分泌。

重金属元素(Cu、Mn、Cd、Zn、Hg、Ni等)是真菌生长的痕量元素,但这些金属元素过量时会引起菌体生理、生态学的改变,影响到生长繁殖。真菌的种类和菌株不同对重金属的敏感性不同。另外重金属在菌株不同的生长时期添加对漆酶活力的影响不同。Baldrian等人^[23]用白腐菌*Pleurotus ostreatus*试验金属离子对漆酶活力的影响。在已培养了12d的限氮培养基中添加2mmol/L的铜,酶活提高8倍,加入2mmol/L的镉,酶活提高18.5倍。早在12d添加时,铜会延滞漆酶的活化,镉会降低漆酶的活性。Ag、Hg、Pb、Zn会降低该菌株的漆酶活力。对于纯化了漆酶,添加0.05~50mmol/L的Cu既会提高酶活也会增加酶的稳定性。添加Hg时漆酶的活力迅速降低,并会使酶暂时变得不稳定。Galhaup等人^[24]发现Cu和Mn对*Trametes pubescens*漆酶的分泌有促进作用,Ag、Cd、Hg、Zn都显著抑制该菌株漆酶的活力。铜的添加量和添加时间对该菌

株的影响很大,在对数生长期添加会显著提高漆酶活力(增加了23.5倍),在稳定期添加会降低酶活。由于Cu位于漆酶的活性中心,普遍认为如果培养基中缺乏铜,菌株产生无活性的酶蛋白。铜对大多数真菌的漆酶分泌都有很大的诱导作用。Faraco等人^[24]发现铜对真菌*Pleurotus ostreatus*漆酶基因转录的诱导作用很大。

盐酸、磷酸、砷酸、甲酸及 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等无机阴离子对漆酶的活性有抑制作用。由于漆酶是一种含铜的蛋白质,某些铜的螯合剂如氰化物、EDTA、二乙基二硫基代氨基甲酸盐等均可阻碍漆酶催化功能的发挥^[25]。

影响漆酶酶活的因素还有温度、pH、碳源、氮源及碳氮比,不同的菌株对这些因素的要求不同,生产时需要针对具体的菌株对这些因素进行优化组合,以提高产酶率。

3 结 论

漆酶不仅在食品加工中有很大的应用潜力,在纸浆漂白、废水和土壤的净化去毒、染料脱色、生物传感器、生物检测等方面都具有很大的开发潜力和应用前景,国内外学者还在不断开发和完善漆酶在各领域中的应用。由于漆酶的产生菌主要是大型真菌,对发酵条件要求高、发酵周期长(一般达到酶活高峰需要5~10d的时间,甚至更长),这将阻碍漆酶的工业化生产进程。实现真菌漆酶基因的高效异源表达,利用发酵条件要求低、生产周期短的低等真菌、酵母甚至细菌生产高酶活的漆酶是今后研究的方向和目标。

参考文献:

- [1] 季立才,胡培植.漆酶催化反应研究进展[J].林产化学工业,1997,17(1):79-83.
- [2] 葛毅强,蔡同一,胡小松.果汁二次混浊研究的新进展[J].食品与发酵工业,2002,28(9):46-50.
- [3] Brinch D S, Pedersen P B. Toxicological studies on *Polyporus pinsitus* laccase expressed by *Aspergillus oryzae* intended for use food[J]. Food Additives and contaminants, 2002, 19(4): 323-334.
- [4] 张春晖,张军翔.白葡萄酒的马德拉化与酶处理[J].酿酒科技,2001,(3):55-57.
- [5] Canterelli C, Brenna O, Rossi M. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics[J]. Food Biotechnol, 1989, (3): 203-213.
- [6] Mathiasen T E. Laccase and beer storage[J]. PCT Int Appl WO, 1995, 21240A2.
- [7] Murugesan G S, Angayarkanni J, Swaminathan K. Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea[J]. Food

Chemistry, 2002, 79(4): 411-418.

- [8] 周光龙,余大廷.漆酶与食用菌生产[J].中国生漆,1992,11(3):27-30.
- [9] Si J Q. Use of laccase in baking[J]. PCT Int Appl WO, 1994, 28728 A1.
- [10] 邱伟芬.酶制剂在面粉品质改良中的应用[J].食品科技,2002,(3):28-31.
- [11] Labat E. Effect of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77: 823-828.
- [12] Brinch D S, Pedersen P B. Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2002, 35(6): 296-308.
- [13] Rosana C, Minussi, Glaucia M. Pastore, Nelson Duran. Potential application of laccase in the food industry[J]. Trends in Food Science and Technology, 2002, 13(6): 205-217.
- [14] 唐舜, A. Lomascolo, 郭林, 等.从白腐菌中筛选漆酶高产菌株的初步研究[J].菌物系统,2001,20(4):520-525.
- [15] Saito Takao, Hong Peng, Kato Katsuya, et al. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(4): 520-527.
- [16] Leif J Jonsson, Markku Saloheimo, Merja Penttila. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*[J]. Curr Genet, 1997, 32: 425-430.
- [17] 王宜磊.不同真菌漆酶的性质研究[J].生物技术,2003,13(2):9-10.
- [18] 朱显峰,杨生玉,沈永红,等.漆酶检测方法的对比研究[J].河南大学学报,2002,32(3):41-43.
- [19] 王宜磊,朱陶.漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J].生态学杂志,2002,21(2):27-29.
- [20] 荚荣,肖亚中,王硕为,等.紫外、离子注入法对白腐真菌诱变效应的初步研究[J].激光生物学报,2002,11(3):212-215.
- [21] C Galhaup, D Haltrich. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 225-232.
- [22] Carbajo Jose M, Junca Howard, Terron Maria C, et al. Tannic acid induces transcription of laccase gene *cgclch* in the white-rot fungus *Coriopsis gallica*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(12).
- [23] Baldrian Petr, Gabriel Ji. Copper and cadmium increase activity in *Pleurotus ostreatus*[J]. Fems Microbiology Letters, 2002, 206(1): 69-75.
- [24] Faraco Vincenza, Giardina Paola, Sannia Giovanni. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters[J]. Microbiology, 2003, 149(8): 2155-2163.
- [25] 周易勇.漆酶的抑制剂[J].中国生漆,1992,11(1):19-20.