

· 食品生物技术 ·

发酵乳杆菌多铜氧化酶的异源表达及酶学性质

徐洁¹, 方芳^{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 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

徐洁, 方芳. 发酵乳杆菌多铜氧化酶的异源表达及酶学性质. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1286-1294.

Xu J, Fang F. Expression and characterization of a multicopper oxidase from *Lactobacillus fermentum*. Chin J Biotech, 2019, 35(7): 1286-1294.

摘要: 生物胺是一种存在于发酵食品中的含氮小分子有机化合物, 过量摄入可能引起过敏或其他不良反应。利用酶法降解是减少发酵食品中生物胺含量从而保障食品安全的有效方法之一。文中成功克隆了来源于发酵乳杆菌的多铜氧化酶基因, 在大肠杆菌中表达的酶活水平为 484 U/L。通过镍柱亲和层析方法获得了此多铜氧化酶的纯酶。该多铜氧化酶的最适反应温度为 50 °C, 最适反应 pH 为 3.5, 其 K_m 为 1.3 mmol/L, V_{max} 为 7.67×10^{-2} mmol/(L·min)。对酶的应用特性研究表明, 来源于发酵乳杆菌的多铜氧化酶对 18% (W/V) NaCl 有一定的耐受性, 并可降解包括色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺和亚精胺在内的 7 种生物胺。其中它对组胺和酪胺的降解能力最高, 分别为 51.6% 和 40.9%。此外, 该酶对酱油中的生物胺也有普遍降解作用, 使用较低酶量 (500 U/L) 时, 对酱油中总胺的降解率达到 10.6%。多铜氧化酶具备降解发酵食品中生物胺的潜力, 为进一步实现这类食品酶的实际应用奠定基础。

关键词: 多铜氧化酶, 生物胺, 克隆表达, 酶学性质, 发酵乳杆菌

Expression and characterization of a multicopper oxidase from *Lactobacillus fermentum*

Jie Xu¹, and Fang Fang^{1,2}

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

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Biogenic amines (BAs) are low molecular weight organic compounds that present in fermented foods. Large amount of ingested biogenic amines can cause allergy or significant symptoms. Reduction of BAs by enzymatic reaction in fermented foods is one of the most efficient methods for removal of biohazard compounds and assurance food safety. In this

Received: December 24, 2018; **Accepted:** February 9, 2019

Supported by: National Key R&D Program of China (No. 2018YFC1604102), National Natural Science Foundation of China (No. 31771955), National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-08).

Corresponding author: Fang Fang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划项目 (No. 2018YFC1604102), 国家自然科学基金 (No. 31771955), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题 (No. LITE2018-08) 资助。

study, the multicopper oxidase (MCO) gene in the genome of *Lactobacillus fermentum* was successfully cloned in *Escherichia coli* BL21 and expressed at 484 U/L. The recombinant MCO was purified by the immobilized metal affinity chromatography method. The optimal reaction temperature and pH for this enzyme was detected to be 50 °C and 3.5. The K_m and V_{max} values of the recombinant MCO was determined to be 1.30 mmol/L and 7.67×10^{-2} mmol/(L·min). Moreover, this MCO dramatically degrades histamine and tyramine by 51.6% and 40.9%, and can degrade other BAs including tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine and spermidine, and was found to be tolerant to 18% (W/V) NaCl. The recombinant MCO is also capable of degrading BAs in soy sauce. The degradation rate of total BAs in soy sauce reaches 10.6% though a relatively low level of enzyme (500 U/L) is used. Multicopper oxidase has the potential to degrade biogenic amines in fermented foods, which lays a foundation for the further application of this kind of food enzymes.

Keywords: multicopper oxidase, biogenic amines, cloning and expression, enzymatic properties, *Lactobacillus fermentum*

生物胺(Biogenic amines, BAs)是生物体内产生的一类低分子量含氮有机化合物的总称,是合成核酸、蛋白质、生物碱等的前体物质^[1]。人体自身合成的生物胺可促进正常生理活动,而通过食物摄入过量生物胺会引起头疼、心悸、腹泻呕吐等不良反应,严重时可能危及生命^[2-4]。生物胺的潜在毒性作用对人体健康构成的危害不容小觑,而发酵食品与发酵酒精饮料中普遍存在生物胺,因此应采取有效措施进行控制和减少^[5-7]。

目前用于控制和减少发酵产品中的生物胺的方法,主要有对生产原料进行优化、减少发酵体系中产生物胺的微生物以及酶法降解这三种。前两种方法对加工设备的要求较高,很大可能会影响产品的风味,因此在实际生产中使用存在一定的局限性^[8]。利用酶法降解生物胺,基本不影响发酵食品生产工艺,对食品营养和风味的影响也较小^[9-11]。已报道的可以降解生物胺的酶有胺氧化酶(Amine oxidases, AOs)、组胺脱氢酶(Histamine dehydrogenase, HADH)和多铜氧化酶(Multicopper oxidase, MCO)^[12-14]。胺氧化酶和组胺脱氢酶只特异性作用于某个或某几个生物胺,它们的活性也分别受乙醇和羰基化合物的抑制,且最适pH多为中性,因此这两类酶的实际应用还存在较多问题^[15]。多铜氧化酶催化生物胺氧化生成对应的醛、氨和水,从而达到分解生物胺的效果^[16-19]。虽然现在已报道的多铜氧化酶能降解一种或多种生物胺^[9,20-21],但是尚

缺少对这些多铜氧化酶酶学性质和应用特性的深入研究。

因此,寻找可用于降解发酵食品中生物胺的多铜氧化酶并对其酶学和应用特性进行研究,对于建立发酵食品中生物胺的酶法减控方法具有重要的意义。本研究旨在筛选获得具有降解生物胺能力的多铜氧化酶,并对其最适反应pH、温度等酶学性质及酶降解生物胺的能力进行探究。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用细菌菌株以及质粒均为本实验室保藏(表1)。

1.2 试剂及仪器

试剂:1,7-二氨基庚烷、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;生物胺标准品购自美国Sigma公司;限制性内切酶、DNA聚合酶、DNA连接酶均为TaKaRa产品,其他试剂为分析纯试剂。

仪器:Gel Doc凝胶成像系统以及AKTA蛋白纯化仪购自美国Bio-Rad公司;安捷伦1260高效液相色谱(HPLC)购自美国安捷伦公司。

1.3 产生物胺降解酶菌株的筛选

将分离自各类发酵食品中的6株细菌在MRS培养基中37 °C静置培养20 h后,8 000 r/min离

1.6 重组多铜氧化酶酶学性质研究

1.6.1 重组酶的最适反应温度及 pH

测定酶的最适反应温度和 pH 时,除了反应温度和 pH 外,其他条件与测定多铜氧化酶酶活的反应条件相同。考察温度为 25–70 °C, pH 为 2.5–5.0 (50 mmol/L 乙酸钠缓冲液), 5.5–7.0 (50 mmol/L PBS 缓冲液), 7.5–8.5 (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液)。

1.6.2 金属离子和盐对重组多铜氧化酶酶活的影响

金属离子对酶活的影响:将酶液与 1 mmol/L 的金属离子缓冲液混合,保温 10 min 后测定酶活力,以未加金属离子的为对照。

NaCl 对重组多铜氧化酶稳定性的影响:将酶液在含有 10%、15%、18% 和 20% (W/V) 的 NaCl 缓冲液中放置 1 h 后测定酶活力,以未加 NaCl 的为对照。

1.6.3 酶反应动力学参数测定

在最适反应条件下,分别测定体系中含有 0.1–1.0 mmol/L ABTS 时的酶活,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算得到重组多铜氧化酶的 K_m 、 V_{max} 值。

1.6.4 重组多铜氧化酶对单个生物胺的降解能力分析

将 100 U/L 多铜氧化酶分别与浓度为 50 mg/L 的组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺、精胺和亚精胺溶液混合,于 37 °C 静置 48 h 后测定生物胺的含量,对照组为不加酶的生物胺溶液,分析重组多铜氧化酶对不同底物的降解能力。

1.7 重组多铜氧化酶对混合生物胺的降解

将 500 U/L 多铜氧化酶分别加入生物胺溶液和市售酱油中,于 37 °C 静置 24 h 后测定生物胺的含量,对照组为不加酶的生物胺溶液或市售酱油。生物胺溶液中各生物胺的浓度依据市售酱油中生物胺含量配置,其组成为:色胺 20 mg/L,腐胺、尸胺和亚精胺 50 mg/L,苯乙胺 150 mg/L,组胺和酪胺 200 mg/L。

2 结果与分析

2.1 降生物胺菌株的选择

为了筛选一种可以用于降解发酵食品中生物胺的酶,本研究考察了 6 株来源于发酵食品的生物菌降解酱油中生物胺的能力。由图 1 可以看出,发酵乳杆菌对总胺的降解率最高,为 16.1%;此外,它对酪胺、组胺的降解作用最强,降解率分别为 23.0% 和 10.0%。发酵食品中酪胺和组胺含量相对比较高,而且组胺由于其危害性较大是食品中限量规定的代表性生物胺^[23]。在考察的 6 株细菌中,发酵乳杆菌是最具降解发酵食品中生物胺潜力的菌株。因此,选择它用于生物胺降解酶的相关研究。

2.2 多铜氧化酶的异源表达与纯化

通过在 NCBI 数据库中寻找发酵乳杆菌基因组中编码多铜氧化酶基因的同源序列,设计了用于扩增的引物 (MCOR 和 MCOF)。以发酵乳杆菌 Y29 基因组 DNA 为模板,成功扩增了发酵乳杆菌 Y29 基因组中编码多铜氧化酶的基因 (图 2)。将此 PCR 产物与载体 pET28a 经酶切连接后,转化

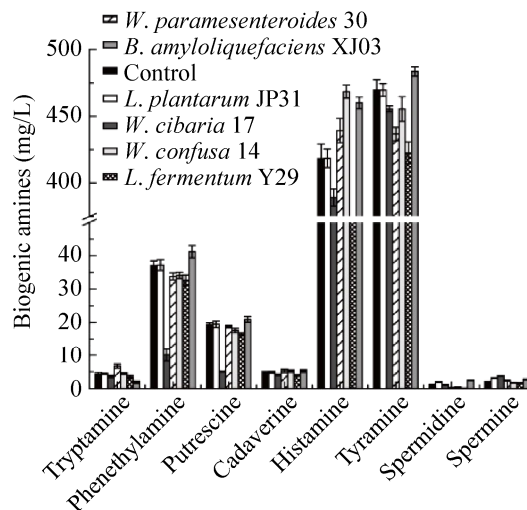


图 1 菌株降解酱油中生物胺能力的比较

Fig. 1 Comparison of degradation of biogenic amines in soy source by microbial strains.

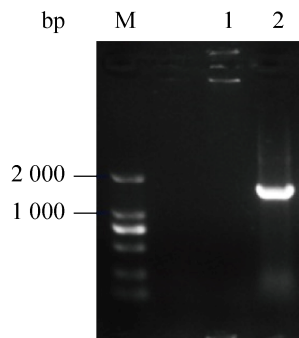


图2 发酵乳杆菌 Y29 中编码多铜氧化酶基因的扩增
Fig. 2 Amplification of gene encoding multicopper oxidase in the genome of *L. fermentum* Y29. M: marker; 1: negative control; 2: amplification of gene encoding multicopper oxidase.

大肠杆菌, 成功构建了表达重组多铜氧化酶的 *E. coli* BL21 pET28a-MCO。

重组菌 *E. coli* BL21 pET28a-MCO 表达重组多铜氧化酶的情况见图 3A。经测定, 重组多铜氧化酶在大肠杆菌中的表达水平为 484 U/L, 其分子量约为 58 kDa。将此粗酶液通过镍柱亲和层析, 得到了重组多铜氧化酶纯酶 (图 3B)。

2.3 MCO 的酶学性质研究

2.3.1 多铜氧化酶的最适反应 pH 及温度

通过考察发现, 重组多铜氧化酶的最适反应 pH 为 3.5, 当反应 pH 为 3.0–4.5 时, 酶的活性大

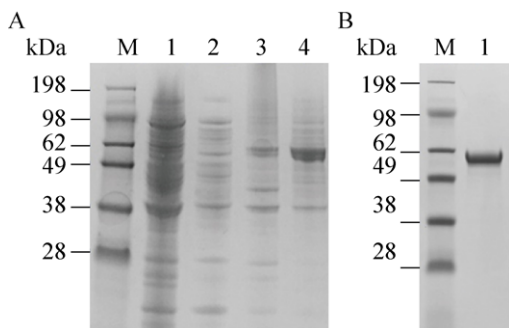


图3 重组多铜氧化酶的表达与纯化
Fig. 3 Expression and purification of recombinant MCO. (A) Expression of MCO in *E. coli* BL21. M: marker; 1–2: insoluble and soluble fractions of *E. coli* BL21 pET28a; 3–4: insoluble and soluble fractions of *E. coli* BL21 pET28a-MCO. (B) Purification of MCO. 1: purified MCO.

于 50% (图 4A)。该重组多铜氧化酶的最适反应 pH 值与植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 来源的多铜氧化酶相同^[21], 而来源于地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 和假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 593 的多铜氧化酶最适反应 pH 则略高^[24-25]。对来源于发酵乳杆菌的 MCO 的最适反应 pH 研究表明, 该 MCO 为酸性酶, 因此具有应用于发酵食品潜力。

由图 4B 可知, 重组多铜氧化酶的最适反应温度为 50 °C, 50 °C 时重组酶的活性是 30 °C 时的 1.7 倍。

2.3.2 金属离子和盐对多铜氧化酶酶活的影响

由于金属离子与多铜氧化酶的催化氧化反应之间有一定关系, 因此本研究考察了金属离子对

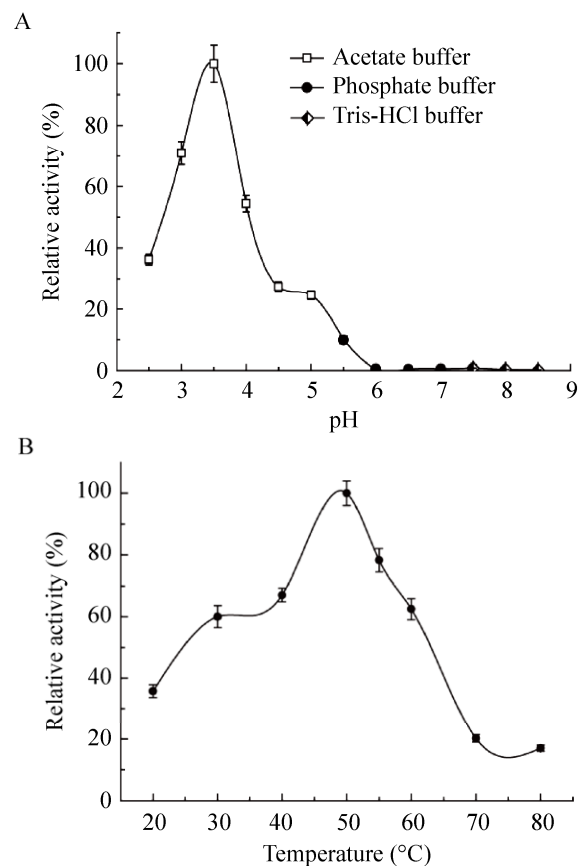


图4 重组多铜氧化酶的最适反应 pH 和温度
Fig. 4 Detection of the optimal pH (A) and temperature (B) of the recombinant MCO for enzymatic reaction.

重组多铜氧化酶酶活的影响。由图 5A 可知, Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mg^{2+} 对重组多铜氧化酶均有激活作用, 其中 Cu^{2+} 对重组多铜氧化酶的激活作用最大, 使酶活提高了 1.89 倍。 Cu^{2+} 对重组多铜氧化酶的激活作用, 可能与多铜氧化酶含有 4 个铜离子结合位点相关^[26]。 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶有抑制作用, Fe^{2+} 对酶活的抑制作用最明显, 在其存在下酶活仅为对照的 57.7%。

酱油是一个高盐食品体系, NaCl 浓度约为 18% (W/V)。考察多铜氧化酶对盐的耐受性, 有助于为该酶在高盐发酵食品中的应用提供参考。由图 5B 可以看出, 重组多铜氧化酶在 NaCl 存在的条件下, 酶活均受到一定程度的抑制, 但在

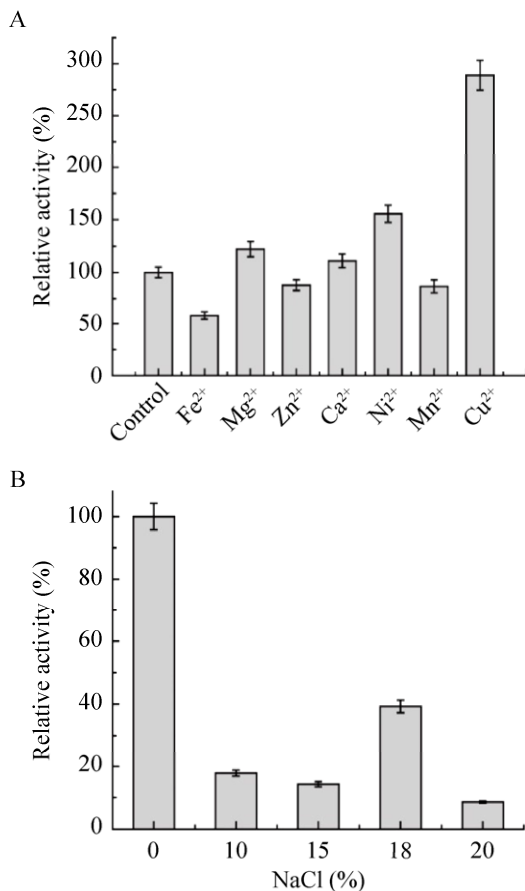


图 5 金属离子和 NaCl 对重组多铜氧化酶酶活的影响
Fig. 5 Effect of mental ions and NaCl on activity of recombinant MCO.

18% (W/V) NaCl 中其活性仍有 39.3%。该重组酶与漆酶同属于多铜氧化酶家族, 漆酶在低 pH 环境中酶活受到阴离子的抑制同时可以被 NaCl 激活, 因此 10% 与 15% 的 NaCl 对酶活的抑制高于 18% 的 NaCl , 可能与 pH 和 NaCl 对酶的协同作用相关^[27-29]。

2.3.3 多铜氧化酶反应动力学参数测定

以 ABTS 为底物, 通过测定最适反应条件下反应体系中含有不同浓度底物时的酶活性, 得到用于分析 MCO 酶反应动力学参数的 Lineweaver-Burk 双倒数图 (图 6)。由图 6 求得的重组发酵乳杆菌 MCO 的 K_m 值为 1.3 mmol/L, V_{\max} 为 7.67×10^{-2} mmol/(L·min)。该重组多铜氧化酶的 K_m 低于克雷白氏杆菌 *Klebsiella* sp. 来源的多铜氧化酶 ($K_m=5.63$ mmol/(L·min))^[26], 略高于苍白杆菌 *Ochrobactrum* sp. 来源的多铜氧化酶 ($K_m=0.072$ mmol/(L·min))^[30]。

2.4 多铜氧化酶对单个生物胺的降解能力

为研究重组多铜氧化酶可降解生物胺的种类和能力, 考察了重组多铜氧化酶对单个生物胺的降解情况。由图 7 可以看出, 除精胺外, 重组多铜氧化酶对考察的 8 种生物胺中的 7 种生物胺均有降解效果。其中对组胺、酪胺、腐胺、亚精胺

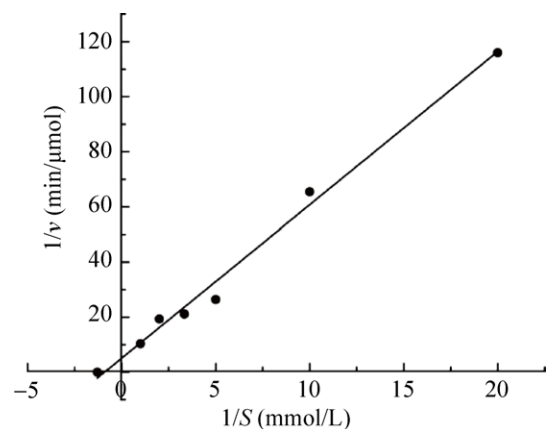


图 6 双倒数作图法测定 MCO 酶反应动力学参数
Fig. 6 Analysis of enzyme kinetics of MCO by Lineweaver-Burk plotting.

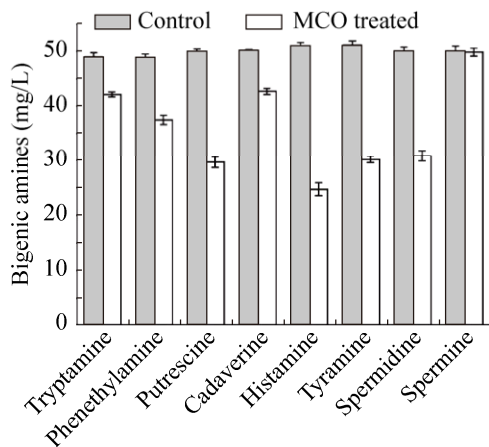


图7 重组多铜氧化酶对单个生物胺的降解
Fig. 7 Degradation of individual biogenic amine by MCO.

的降解效果最显著,分别降低了51.6%、40.9%、40.7%和38.2%。与来源于植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 的多铜氧化酶和来源于金黄节杆菌 *Arthrobacter aurescens* 的胺氧化酶相比^[13],该重组酶降解组胺、酪胺的能力高,且降解谱广。

2.5 多铜氧化酶降解生物胺特性研究

为进一步揭示来源于发酵乳杆菌 Y29 的多铜氧化酶降解生物胺的能力,考察了其在对混合生物胺溶液(根据市售酱油中各类生物胺的含量范围配置,生物胺总量为 $(720 \pm 15 \text{ mg/L})$ 和市售酱油中生物胺的降解效果。在混合生物胺体系中,多铜氧化酶可以降解除精胺外的色胺、尸胺、苯乙胺、腐胺、酪胺、亚精胺和组胺7种生物胺,其中对组胺的降解率最高,达到81.5%,对总胺的降解率为41.7%(图8A)。与来源于 *Lactobacillus plantarum* J16 和乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 的多铜氧化酶相比,该重组酶降解组胺的能力高,且降解谱广,来源于 *Lactobacillus plantarum* J16 的多铜氧化酶对组胺的降解率为36%且仅能降解3种生物胺,来源于 *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 的多铜氧化酶不能降解组胺且仅能降解酪胺这一种生物胺^[21,31]。由图8B可以看出,本研究所用市售酱油中生物胺总量为

$881 \pm 13 \text{ mg/L}$,多铜氧化酶在此体系中可以降解除精胺外的7种生物胺,它对组胺和酪胺的降解效果较好,降解率分别为11.3%和6.8%,对总胺的降解率为10.6%(图8B)。目前尚未有关于重组多铜氧化酶应用于酱油降解生物胺的报道,但 Rosa Guarcell 等的研究表明 *Lactobacillus paracasei* CB9CT、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* CACIO6CT、戊糖片球菌 *Pediococcus pentosaceus* M1 能降解奶酪中生物胺都与其含有多铜氧化酶相关,因此本研究的重组多铜氧化酶具备降解发酵食品中生物胺的应用潜力^[32]。

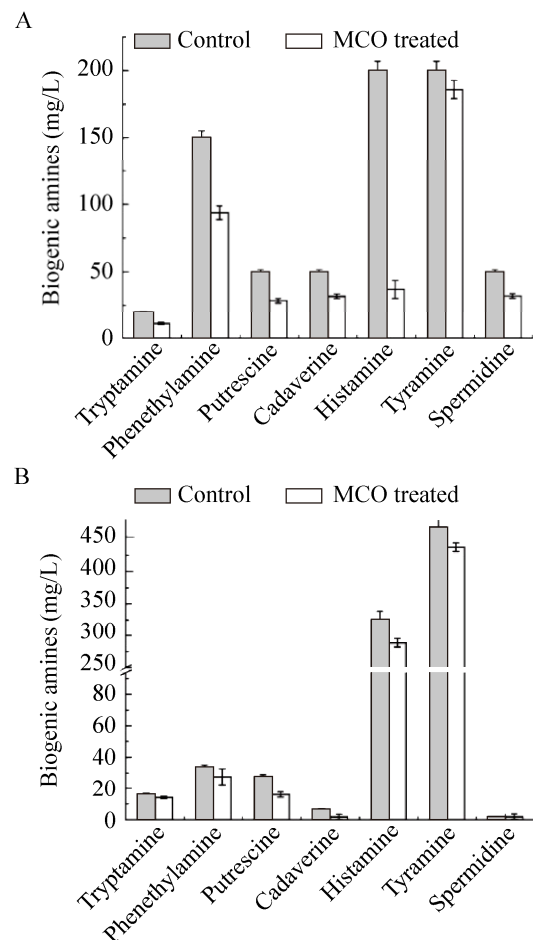


图8 重组多铜氧化酶对混合生物胺和酱油中生物胺的降解

Fig. 8 Degradation of biogenic amines in mixed biogenic amines solution (A) or soy sauce (B) by MCO.

3 结论

利用生物酶法减少发酵食品中的生物胺是目前控制食品中生物胺最有前景的途径。但目前用于降解生物胺的酶种类少、降解谱窄、降解率低,尚不能满足实际应用的需求。本研究通过分析来源于发酵乳杆菌的多铜氧化酶的酶学性质以及降解生物胺能力发现,该重组多铜氧化酶可降解包括色胺、尸胺、苯乙胺、腐胺、酪胺、亚精胺和组胺在内的7种生物胺,并且可显著降低酱油中含量最高的两种生物胺^[33]——组胺和酪胺。此重组多铜氧化酶为酸性酶,对18%的NaCl有一定的耐受性,在高温50℃时酶的催化活性显著提高。此外,该多铜氧化酶具有降解酱油中生物胺的能力,对总胺降解率达到了10.6%。本研究初步评估了来源于发酵乳杆菌的多铜氧化酶在发酵食品体系中降解生物胺的能力,今后通过构建酶的食品级表达体系以及优化提高酶的表达水平,有望进一步挖掘多铜氧化酶在降解发酵食品中生物胺的应用潜力,为进一步实现这类食品酶的实际应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Meat Res*, 2005, 29(7): 675–690.
- [2] Feng TT, Fang F, Yang J, et al. Formation and removal of biogenic amines in food bioprocessing. *Food Sci*, 2013, 34(19): 360–366 (in Chinese).
冯婷婷, 方芳, 杨娟, 等. 食品生物制造过程中生物胺的形成与消除. *食品科学*, 2013, 34(19): 360–366.
- [3] Shah P, Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 2008, 68(1): 4–16.
- [4] Tofalo R, Perpetuini G, Schirone M, et al. Biogenic amines: toxicology and health effect. *Enc Food Heal*, 2016: 424–429, doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4.
- [5] Kim MK, Mah JH, Hwang HJ. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem*, 2009, 116(1): 87–95.
- [6] Zou Y. Study on formation mechanism and control of biogenic amines during the process of high-salt diluted soy sauce[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012 (in Chinese).
邹阳. 高盐稀态酱油生产过程中生物胺的形成机制及发酵调控研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [7] Koral S, Tufan B, Ščavničar A, et al. Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products. *Food Contr*, 2013, 32(2): 597–606.
- [8] Yang LK, Fu XJ, Hu YB, et al. Screening of strains with degradation activity for biogenic amines in fish sauce. *Food Sci*, 2012, 33(11): 158–162 (in Chinese).
杨利昆, 付湘晋, 胡叶碧, 等. 鱼露中生物胺降解菌的筛选及其特性. *食品科学*, 2012, 33(11): 158–162.
- [9] Callejon S, Sendra R, Ferrer S, et al. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186019.
- [10] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, et al. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 185–198.
- [11] Fadda S, Vignolo G, Oliver G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(24): 2015–2019.
- [12] Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, et al. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 2000, 57(1/2): 107–114.
- [13] Lee JI, Kim YW. Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aureescens* and application for determination of biogenic amines. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(4): 673–682.
- [14] Siddiqui JA, Shoeb SM, Takayama S, et al. Purification and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex* IFO 12069. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 189(2): 183–187.
- [15] Sattler J, Hesterberg R, Lorenz W, et al. Inhibition of human and canine diamine oxidase by drugs used in an intensive care unit: relevance for clinical side effects. *Agents Actions*, 1985, 16(3/4): 91–94.
- [16] Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related

- multicopper oxidase protein sequences. FEBS J, 2006, 273(10): 2308–2326.
- [17] Askwith C, Eide D, van Ho A, et al. The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. Cell, 1994, 76(2): 403–410.
- [18] Madhavi V, Lele SS. Laccase: properties and applications. Bioresources, 2009, 4(4): 1694–1717.
- [19] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem Rev, 1996, 96(7): 2563–2606.
- [20] Sheng Y, Yan L, Hong Y, et al. Gene cloning, identification, and characterization of the multicopper oxidase CumA from *Pseudomonas* sp. 593. Biotechnol Appl Biochem, 2017, 64(3): 345–355.
- [21] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(7): 3113–3124.
- [22] Li ZJ. Methods for determination of genetic amines in food and amine-producing bacteria and its application[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007 (in Chinese).
李志军. 食品中生物胺及其产生菌株检测方法研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [23] Del Rio B, Redruello B, Linares DM, et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. Food Chem, 2017, 218: 249–255.
- [24] Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79(2): 217–224.
- [25] Yang S, Long Y, Yan H, et al. Gene cloning, identification, and characterization of the multicopper oxidase CumA from *Pseudomonas* sp. 593. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 64(3): 345–355.
- [26] Li Y, Yin J, Qu G, et al. Gene cloning, protein purification, and enzymatic properties of multicopper oxidase, from *Klebsiella* sp. 601. Can J Microbiol, 2008, 54(9): 725–733.
- [27] Brander S, Mikkelsen JD, Kepp KP. Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. PLoS ONE, 2014, 9(6): e99402.
- [28] Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, et al. Laccases and their applications: a patent review. Recent Pat Biotechnol, 2008, 2(1): 10–24.
- [29] Ruijsenaars HJ, Hartmans S. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65(2): 177–182.
- [30] Yang L, Zuo WF, Li YD, et al. Cloning of multicopper oxidase gene from *Ochrobactrum* sp. 531 and characterization of its alkaline laccase activity towards phenolic substrates. Adv Biol Chem, 2012, 2(3): 248–255.
- [31] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, et al. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. PLoS ONE, 2017, 12(10): e0186019.
- [32] Guarcello R, De Angelis M, Settanni L, et al. Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(23): 6870–6880.
- [33] Yu JZ, Xu F, Xu Y. Analysis on the change rule of biogenic amines during the process of high-salt diluted soy sauce. Food Ferment Ind, 2016, 42(10): 44–49 (in Chinese).
于金芝, 徐峰, 徐莹. 高盐稀态酱油生产过程中的生物胺变化规律. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 44–49.

(本文责编 陈宏宇)