



生物胺降解酶研究进展及其应用

倪秀梅^{1,2} 杨涛^{1,2} 方芳^{*1,2}

1 江南大学未来食品科学中心 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要: 生物胺是存在于发酵食品和酒精饮料中的潜在胺类危害物。如果人体摄入过量的生物胺,则会引起呼吸困难、呕吐和发烧等过敏反应。生物胺降解酶是通过将生物胺氧化成醛类物质来实现降解生物胺的一类酶。目前发现的具有降解生物胺能力的酶主要包括胺氧化酶、胺脱氢酶和多铜氧化酶。本文详细阐述了这3类主要生物胺降解酶的催化机理、底物特异性、酶学性质、应用特性和它们对生物胺的降解效果,归纳和总结了生物胺降解酶的异源表达和分子改造的研究进展,并对生物胺降解酶在基因挖掘、分子改造和表达等方面的研究趋势进行了展望,以期为研究和开发食品中生物胺的酶法降解策略提供参考。

关键词: 生物胺, 多铜氧化酶, 胺氧化酶, 胺脱氢酶, 降解

Biogenic amines-degrading enzymes and their applications: a review

NI Xiumei^{1,2} YANG Tao^{1,2} FANG Fang^{*1,2}

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: Biogenic amines (BAs), the potential health threats in fermented food and alcoholic beverage, bring about allergic reactions such as dyspnea, vomiting, and fever in the case of excessive intake. BAs-degrading enzymes, including amine oxidase, amine dehydrogenase, and multicopper oxidase, oxidize BAs to aldehydes. This review described the catalytic mechanism, substrate specificity, enzymatic properties, and applications of the three BAs-degrading enzymes and their capabilities of degrading BAs. The heterologous expression and molecular modification of them were also summarized. Furthermore, research trends of such enzymes in gene mining, molecular modification, and expression were summed up. The paper is expected to provide a reference for studying and developing strategies for degrading BAs in food with enzymes.

Keywords: biogenic amines, multicopper oxidase, amine oxidase, amine dehydrogenase, degradation

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600405); National Natural Science Foundation of China (31771955); National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-08)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918310; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 26-02-2021; **Accepted:** 03-06-2021; **Published online:** 18-06-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600405); 国家自然科学基金(31771955); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-08)

***通信作者:** Tel: 0510-85918310; E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-02-26; **接受日期:** 2021-06-03; **网络首发日期:** 2021-06-18

生物胺(Biogenic Amines, BAs)是一类含氮的小分子有机物,广泛存在于奶酪、泡菜、香肠、酱油、白酒和鱼制品等发酵食品中^[1]。发酵食品中的生物胺主要由微生物体内的氨基酸脱羧酶氧化氨基酸脱羧形成^[2-3]。不同食品中的生物胺种类和含量有一定的差异,其中最常见的主要有亚精胺、精胺、苯乙胺、色胺、尸胺、腐胺、酪胺和组胺^[4]。人体自身合成生物胺对维持正常生理功能必不可少,组胺和酪胺在人体血浆中的含量分别为 0.79 ng/mL 和 0.686 ng/mL^[5-6]。然而,通过食品摄入过量的生物胺会引起人体胃酸和肾上腺素分泌失调、心跳加快、血糖和血压增高,造成呼吸困难、呕吐和发烧等过敏反应^[7-8]。例如,摄入超过 8 mg 的组胺就可产生轻微中毒症状,摄入量超过 100 mg 时则会出现严重中毒症状,甚至危及生命^[8-9]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)对食品中的生物胺含量做出限量规定,食品中的组胺和酪胺含量分别不能超过 50 mg/kg 和 100 mg/kg^[10]。减少食品中生物胺的含量是降低其对人体造成急性过敏反应风险并保证食品安全的必要条件,虽然通过减少食品原料中游离氨基酸的含量、抑制食品加工过程中产胺微生物的生长、添加降解生物胺的微生物等可在一定程度上减少乳制品、肉制品、调味品等发酵食品以及含酒精饮料中的生物胺含量^[11-13],但这些方法对食品加工工艺和风味都有较显著的影响,不能减少已生成的生物胺含量,并且可能因加入的微生物不是食品安全菌而带来新的食品安全问题。因此,利用生物胺降解酶来减少食品中生物胺含量的减控方法具有更好的技术优势和更广泛的应用前景^[14]。

目前已报道的可催化生物胺降解的酶主要分为 3 类:胺氧化酶、胺脱氢酶和多铜氧化酶。这些生物胺降解酶大多数是来源于细菌的氧化酶,它们催化生物胺分解生成相应的醛。不同的生物胺降解酶对生物胺的特异性不同,而且催化效率也存在差异。胺氧化酶和胺脱氢酶可特异性催化某一种生物胺的分解,对非最适底物的生物胺催化效率极低或

没有催化活性。基于含黄素胺氧化酶超家族的反应机理和底物特异性,含黄素胺氧化酶超家族成员又分为 8 个亚组^[15]。微生物来源的胺氧化酶在降解食品中的生物胺和保障食品安全发挥重要的作用^[16]。与胺氧化酶和胺脱氢酶不同,多铜氧化酶对生物胺的底物特异性不强,可催化多种生物胺的氧化分解。例如乳酸菌通过合成多铜氧化酶能够降低葡萄酒中组胺、酪胺和腐胺等生物胺的含量^[17]。分离自熏肉的乳杆菌可以降解组胺、酪胺等常见的 6 种生物胺,通过证实是多铜氧化酶起到了降解生物胺的作用^[18]。

1 胺氧化酶

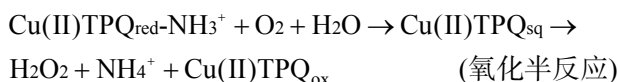
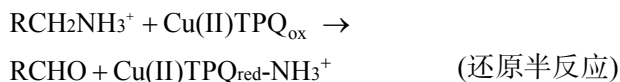
胺氧化酶(Amine Oxidase, AO)是一类能够催化胺类氧化脱氢的特殊蛋白质,可作用于单胺、二胺与多胺的伯胺基和仲胺基,将其氧化生成相应的醛、氨和过氧化氢^[19]。根据胺氧化酶含有辅基的不同,AO 又可以分为含铜胺氧化酶和含黄素胺氧化酶 2 种^[16]。

1.1 含铜胺氧化酶

含铜胺氧化酶(Copper-Containing Amine Oxidase, CAO)以 Cu^{2+} 为辅基,可催化伯胺氧化为醛,同时将双氧还原为过氧化氢,其广泛分布于细菌、酵母、霉菌、植物和动物中^[20]。辅基 Cu^{2+} 对含铜胺氧化酶的活性起着至关重要的作用。通过用其他二价阳离子(Co^{2+} 和 Ni^{2+})取代 Cu^{2+} ,发现球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)含铜胺氧化酶的活性仅为原酶的 2.2% 和 0.9%^[21]。CAO 通常是同型二聚体,由 2 个相同的亚基聚合而成,酶的催化中心附近是包括天冬氨酸、酪氨酸在内的 33 个保守氨基酸。CAO 的每个单体都包含一个通过非共价键结合的 Cu^{2+} 和一个 2,4,5-三羟基苯丙氨酸醌(2,4,5-Trihydroxyphenylalanine, TPQ)^[22]。Gaule 等证实球形节杆菌含铜胺氧化酶的 2 个亚基的催化具有独立性,二聚体形式可能赋予酶结构上的稳定性^[23]。CAO 在蛋白序列和空间结构上的差异可能影响酶对底物的偏好性和其催化功能的差异性^[24]。CAO

主要通过参与维持动植物和微生物体内胺水平的稳定影响其生长代谢^[25]。例如来源于白斑红球菌(*Rhodococcus opacus*)的铜依赖性二胺氧化酶(Copper Dependent Diamine Oxidase)可与另一种胺氧化酶——组成型黄素依赖性氧化酶(Constitutive Flavin Dependent Oxidase)共同维持细胞内多胺浓度或控制二胺水平^[26]。CAO催化胺降解的反应是乒乓反应(反应式1)^[27],分为还原半反应和氧化半反应。还原半反应是CAO将生物胺氧化成醛同时生成还原型的TPQ;氧化半反应是CAO将O₂还原成H₂O₂并生成氧化型的TPQ^[28]。还原半反应的电子流从胺流向TPQ,氧化半反应的电子流向有直接电子传递和间接电子传递2种方式。直接电子传递是指电子从TPQ直接流向O₂,间接电子传递是指电子从TPQ经过Cu²⁺流向O₂(图1)^[29]。根据作用底物的不同,CAO主要又可以分为二胺氧化酶(Diamine Oxidase, DAO)和伯胺氧化酶2种^[30]。

反应式1:



式1中: Cu(II)TPQ_{ox}为未结合底物的CAO,此时TPQ为氧化型; Cu(II)TPQ_{red}为结合底物的CAO,此时的TPQ为还原型; TPQ_{sq}是TPQ的半醌形式。

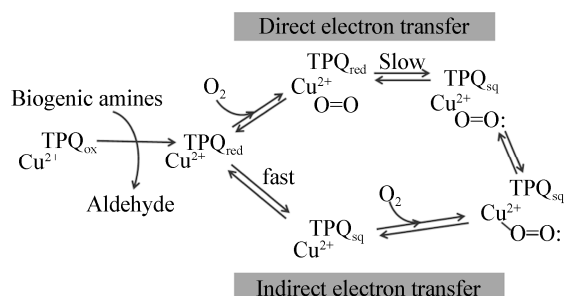


图1 胺氧化酶催化生物胺降解的电子传递途径(氧化半反应)

Figure 1 Electron transfer in the process of degradation of BAs catalyzed by amine oxidase (oxidative half-reaction)

1.1.1 二胺氧化酶

二胺氧化酶(Diamine Oxidase, DAO)主要作用于组胺,也可以氧化腐胺和尸胺^[31]。在人体与大多数哺乳动物体中DAO的表达主要与绒毛尖端成熟的肠上皮细胞相关,其活性在肾脏和胎盘中也能检测到^[32]。DAO也广泛分布于植物及微生物中,产二胺氧化酶的微生物主要有变异库克菌(*Kocuria varians*)、红色微球菌(*Micrococcus rubens*)、嗜酸乳酸足球菌(*Pediococcus acidilactici*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和节杆菌(*Arthrobacter*)等^[33-34]。节杆菌中的DAO主要氧化组胺,对腐胺和尸胺没有氧化能力;分离自成晶节杆菌(*A. crystallopoietes*) KAIT-B-007的DAO是一种热稳定性较强的碱性组胺氧化酶,研究表明该酶的最适反应pH为9.0,在pH 6.0-9.0范围内均具有很好的稳定性^[35]。向含有500 mg/L组胺的金枪鱼汤(pH 6.0, 1% NaCl)加入2 534 U/L的*A. crystallopoietes* DAO, 37 °C、100 r/min 孵育10 h,可将组胺浓度降低到无法检测的水平(<0.5 mg/L)^[36]。球形节杆菌中的DAO可以降解组胺、腐胺和亚精胺,以组胺为底物,其K_m值为0.274 mmol/L,该酶热稳定性较差,能表现出活性的最高温度为37 °C,在35 °C下孵育50 min其活性下降50%^[37]。已证实来源于干酪乳杆菌(*L. casei*) IFI-CA 52中的胺氧化酶可以降解葡萄酒中的组胺、腐胺和酪胺,其活性受到乙醇(12%)、酚类(75 mg/L)和SO₂ (30 mg/L)的影响,在pH 4.6、30 °C的条件下孵育12 h,与对照相比,其降解生物胺能力分别下降80%、85%和11%^[38]。以组胺氧化酶为代表的DAO底物特异性较强,通常只降解某种生物胺。此外,已发现的组胺氧化酶其最适反应pH>7.0且在酸性条件下酶的活性较低,这严重影响了它们在偏酸性的发酵食品(pH 4.5左右)中的应用^[39]。因此,通过改造或筛选获得在酸性条件下仍有较高活性的胺氧化酶是应用此类酶降解发酵食品中的生物胺迫切要解决的问题。

1.1.2 伯胺氧化酶

伯胺氧化酶(Primary Amine Oxidase, PrAO)又称

氨基脒敏感胺氧化酶, 主要氧化脂肪族和芳香族的伯胺基。伯胺氧化酶的活性受到含羰基试剂如氨基脒的抑制^[40]。目前已知酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)等微生物都产伯胺氧化酶。伯胺氧化酶最早从 *Escherichia coli* K-12 中鉴定出来, 该酶被称为 ECAO (*Escherichia coli* Copper-Amine Oxidase); 其由 *tynA* 基因编码, 是一种胞内同型二聚体蛋白^[41]。ECAO 可以较高速率氧化酪胺、苯乙胺和色胺, 但不氧化二胺(如腐胺)和多胺(如精胺), 因此也被称为酪胺氧化酶或 β -苯乙胺氧化酶^[41-42]。有些生物体内含有不止一种胺氧化酶, 它们在氨基酸序列上可能具有较高的同源性, 但功能却不一定相同。多形汉森酵母(*Hansenula polymorpha*)中存在 2 种 PrAO (HPAO-1 和 HPAO-2), 其序列相似性为 67%; HPAO-1 主要作用于小侧链脂肪胺(如甲胺和乙胺), 其对甲胺的催化效率比苄胺高 330 倍; HPAO-2 的最适底物则是苄胺^[43]。白斑红球菌中也存在 2 种序列相似性为 63% 的 PrAO (AO1 和 AO2), AO1 的底物主要为脂肪族生物胺和带短烷基链的芳香胺(如苄胺); AO2 则主要作用于带长烷基链的芳香胺(如酪胺和苯乙胺)^[44]。来源于 *A. niger* SPFJ05 的胺氧化酶能够降解发酵食品中常见的 8 种生物胺, 其最适反应 pH 和温度分别为 7.0 和 35 °C, 最佳底物为正己胺; 虽然目前还不清楚 *A. niger* SPFJ05 胺氧化酶的类型, 但发现 1.0 mmol/L Cu^{2+} 对该酶有激活作用; *A. niger* SPFJ05 胺氧化酶可降解酱油中的多种生物胺, 对腐胺、色胺、酪胺、精胺的降解率均高于 73%, 可使总生物胺含量从 2 064 $\mu\text{g/kg}$ 降低到 561.0 $\mu\text{g/kg}$, 降解率达到了 66.61%^[45]。目前报道的大多数伯胺氧化酶的最适底物是甲胺、苄胺和正己胺, 组胺、尸胺、苯乙胺等发酵食品中常见的生物胺则不是其最适底物^[43]。

1.2 含黄素胺氧化酶

含黄素胺氧化酶(Flavin-Containing Amine Oxidase, FAO)以黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin Adenine Dinucleotide, FAD)为辅基, 作用于伯胺和

仲胺, 其催化胺氧化的反应机理都是通过类似的乒乓反应(反应式 2)^[46], 在氧化生物胺生成醛的同时将 O_2 还原成 H_2O_2 (图 2)^[47]。FAO 中与黄素结合的核心结构域起催化作用, 由 2 个亚结构域组成的底物结合结构域则负责底物的识别^[15]。黄褐微球菌(*M. luteus*)中的酪胺氧化酶以 FAD 为辅基, 是分子量为 49 kD 的同型二聚体, 其能够氧化酪胺、肾上腺素、3-羟基酪胺、多巴胺和去甲肾上腺素, 受含 FAD 的单胺氧化酶特异性抑制剂抑制^[48]。芽孢杆菌胺氧化酶由 *yobN* 基因编码, 具有组胺和酪胺降解能力^[49-50]。盐反硝化枝芽孢杆菌(*Virgibacillus halodenitrificans*)和泛酸枝芽孢杆菌(*V. pantothenicus*)的细胞膜上的一种胺氧化酶可以降解组胺、酪胺、腐胺和尸胺^[51]。有研究表明黑曲霉的单胺氧化酶(MAO-N)是一种可以催化伯胺氧化脱氨的 FAO, 该酶以四聚体形式存在, 与人的单胺氧化酶(MAO-B)具有某些类似的结构特征^[52]。根据作用底物的不同, FAO 一般可分为单胺氧化酶和多胺氧化酶^[53]。

反应式 2:



式 2 中: R 和 R^* 代表侧链; RCH_2NH_2 代表伯胺;

$\text{RCH}_2\text{NHCH}_3\text{R}^*$ 代表仲胺。

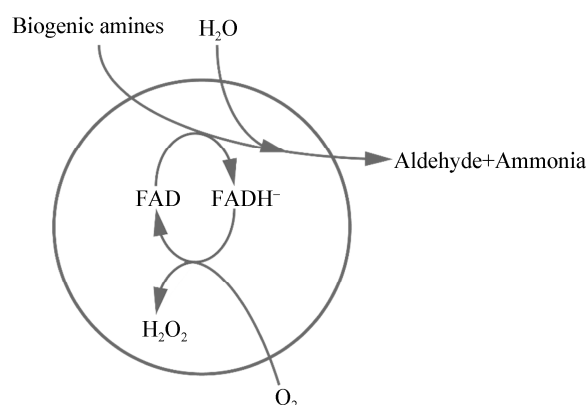


图 2 含黄素胺氧化酶降解生物胺反应机理

Figure 2 Catalytic mechanism of degrading BAs by flavin-containing amine oxidase

注: FAO 作用于仲胺时才有氨生成

Note: Ammonia is only generated when FAO acts on secondary amines

1.2.1 单胺氧化酶

单胺氧化酶(Monoamine Oxidase, MAO)可催化伯胺和某些仲胺的氧化脱氨反应,其主要位于哺乳动物线粒体外膜上^[54]。在哺乳动物的组织中存在2种MAO的同工酶,即MAO-A和MAO-B;2种同工酶分别由X染色体上的独立基因编码,表现出不同的底物特异性^[55]。MAO-A的最适底物是5-羟色胺,而MAO-B的最适底物是 β -苯乙胺,酪胺和色胺都可以作为2种酶的底物^[56]。哺乳动物的2种MAO拥有相似的三级结构,包括几乎一样的黄素结合位点和多变的底物结合位点,但是MAO-A有一个更开放的活性中心,使得2种酶的底物不同^[57]。另外,两者的抑制剂也不同,MAO-A的特异性抑制剂是氯吉林,MAO-B的特异性抑制剂是苄甲炔胺和巴吉林^[42]。黑曲霉、肠杆菌和铜绿假单胞菌等微生物也能合成单胺氧化酶^[58]。来源于黑曲霉的单胺氧化酶MAO-N既能氧化5-羟色胺,又可以氧化 β -苯乙胺^[59]。分离自黄酒发酵液的*L. plantarum* CAU 3823所产胺氧化酶也具有降解生物胺的能力,其最适反应温度为28℃,在15–80℃的温度范围内能够保持活性,将该酶在pH 4.0、33℃的条件下孵育2h后可降解混合胺溶液(50 mg/L)中40%以上的生物胺^[60]。胺氧化酶在降解配置溶液中的生物胺时有一定的效果,但用于发酵食品中生物胺的降解时则会出现酶活显著降低或失活等问题;目前,尚缺少单胺氧化酶用于降解发酵食品体系中组胺、酪胺、尸胺和腐胺等常见生物胺的报道,也无相关酶学性质的研究^[17,61]。

1.2.2 多胺氧化酶

生物体内的多胺氧化酶(Polyamine Oxidase, PAO)参与多胺的分解代谢,其以非共价键结合辅基FAD。根据作用底物的不同,PAO可以分为精胺氧化酶(Spermine Oxidase, SMO)和腐胺氧化酶(Putrescine Oxidase, PuO)。SMO常见于哺乳动物中,对底物具有高度特异性,可氧化精胺、亚精胺或其乙酰化衍生物的仲胺基,在调节机体生命活动中起重要作用^[62-63]。在酿酒酵母中也发现了一种作

用底物类似于SMO的黄酮蛋白氧化酶(Flavoprotein Oxidase) Fms1,其可以催化精胺、N1-乙酰精胺分别氧化生成亚精胺、3-氨基丙醛或N-乙酰基-3-氨基丙醛,Fms1对这2种生物胺的表观 K_m 值为 $118\pm 25\ \mu\text{mol/L}$ 和 $10.9\pm 1.8\ \mu\text{mol/L}$ ^[64]。

PuO是一种主要作用于腐胺的多胺氧化酶,其可以将腐胺氧化成4-氨基丁醛。此外,某些PuO还可以作用于尸胺、精胺和亚精胺。在黄褐微球菌、红色微球菌和红平红球菌(*R. erythropolis*)等微生物中均检测到PuO活性^[65-66]。*M. luteus*中PuO的主要作用底物是腐胺,也可以氧化尸胺,其氧化尸胺的速率是氧化腐胺速率的 $1/20$ ^[65]。*R. erythropolis*的腐胺氧化酶(PuORh)主要氧化腐胺,也氧化其他多胺,如精胺和亚精胺。PuORh的最适反应温度为30℃,最适反应pH为8.0,当反应pH低于6.4时PuORh无活性^[66-67]。*K. varians* LTH 1540中的PuO主要作用于腐胺和尸胺,还可以氧化多胺(例如亚精胺),但不氧化单胺,其最适反应pH和温度分别为8.5和45℃,对人类黄素依赖性胺氧化酶抑制剂和羧基修饰化合物敏感^[68]。蓝细菌*Synechocystis* sp. PCC 6803中的SynPAO能分别将精胺和亚精胺氧化成亚精胺和腐胺,其最适反应pH为8.5,最适反应温度为30℃^[69]。由表1可以看出,不同来源的多胺氧化酶对底物的亲和力有很大差异。变异库克菌和红平红球菌的多胺氧化酶更适用于腐胺的降解,蓝细菌中的多胺氧化酶在降解精胺方面具有更大的潜力。细菌来源的多胺氧化酶底物特异性较强,可氧化的生物胺种类非常有限,主要作用于腐胺或精胺。因此,多胺氧化酶在降解发酵食品中生物胺的应用潜力有限。

2 胺脱氢酶

胺脱氢酶(Amine Dehydrogenase, AmDH)大多数是以色氨酸-色氨酸醌(Tryptophan Tryptophylquinone, TTQ)为辅基,能够氧化胺脱氢生成相应的醛和氨,其氧化伯胺产生的电子从TTQ经过含铜蛋白辅基上的 Cu^{2+} 传递给最终电子受体(图3)^[70]。甲胺脱氢

表 1 多胺氧化酶的酶反应动力学参数
Table 1 Enzyme kinetic parameters of microbial polyamine oxidase

酶 Enzymes	来源 Sources	底物 Substrates	米氏常数 K_m ($\mu\text{mol/L}$)	参考文献 References
PuORh	<i>R. erythropolis</i> NCIMB 11540	Putrescine	8.2	[67]
PuO	<i>K. varians</i> LTH 1540	Putrescine	94.0 \pm 10.0	[68]
		Cadaverine	75.0 \pm 5.0	
SynPAO	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Spermine	456.0 \pm 33.0	[69]
		Spermidine	98.0 \pm 10.0	

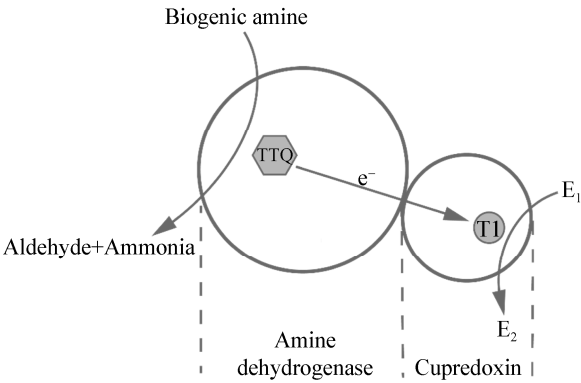


图 3 以 TTQ 为辅基的胺脱氢酶降解生物胺反应机理
Figure 3 Catalytic mechanism of degrading BAs by amine dehydrogenase containing TTQ

注: T1: I 型铜; E₁: 电子受体; E₂: 还原型电子受体
Note: T1: The type I copper; E₁: Electron acceptor; E₂: Reduced electron acceptor

酶(Methylamine Dehydrogenase, MADH)是最早发现的以 TTQ 为辅基的酶,其氧化甲胺产生的电子通过花青素(Anicyanin)传递给电子受体细胞色素 c^[71]。芳香胺脱氢酶(Aromatic Amine Dehydrogenase, AADH)是继 MADH 之后发现的第 2 种以 TTQ 为辅基的酶,其可以催化酪胺氧化脱氨,在结构上类似于 MADH^[72]。来自粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)的 AADH 能够作用于酪胺、 β -苯乙胺,该酶氧化伯胺时产生的电子需要通过天青蛋白(Blue Copper Protein)传递到电子受体上,胍、苯胍、羟胺、氨基脲和氨基胍不可逆地抑制 AADH 的活性^[73-74]。在木糖氧化产碱菌(*A. xylosoxidans*)中也发现了胺脱氢酶,该酶的最适反应 pH 为 8.0,热稳定性好,在 70 °C 下保持 40 min 活性不会降低,其可以氧化多种芳族胺和一些脂肪族胺,以组胺、酪胺和 β -苯乙

胺为底物的 K_m 值分别为 1.8、6.9 和 171 $\mu\text{mol/L}$,羰基试剂强烈抑制此酶的活性^[75]。

除了以 TTQ 为辅基的胺脱氢酶外,还存在不以 TTQ 为辅基的胺脱氢酶,其包含一个共价结合的 6-S-半胱氨酰黄素单核苷酸(6-S-Cys-FMN)和一个[4Fe-4S]簇作为氧化还原辅助因子,催化组胺氧化生成吲哚乙醛和氨离子,因此又被称为组胺脱氢酶^[76]。这类酶大多数含有 2 个亚基,如简单类诺卡氏菌(*Nocardioideis simplex*)中的组胺脱氢酶(MSMADH)是一种同型二聚体蛋白,其主要氧化组胺,也可以氧化腐胺,但是对腐胺的催化效率仅为组胺的 0.7%^[76]。根瘤菌(*Rhizobium* sp.)的组胺脱氢酶(HDH-R)也是同型二聚体,其最适底物是组胺,在 pH 9.0、70 °C 的条件下显示最高酶活性,被认为是胺氧化酶和胺脱氢酶中对组胺特异性最强的酶^[77]。还有一少部分此类酶含有 2 个以上的亚基,如嗜盐古生菌(*Natrinema gari*)中的组胺脱氢酶(HADH)是异型三聚体,该酶在 pH 6.5-8.5、40-60 °C 的高盐条件(3.5-5.0 mol/L NaCl)具有较高的溶解度和催化活性^[78]。此外,来自 *L. plantarum* SGJ-24 的 3-磷酸甘油醛脱氢酶也可以降解组胺,其最适反应 pH 和温度分别为 7.5 和 40 °C,在低于 55 °C、pH 6.5-8.5 的条件下能够稳定存在,其对组胺的降解率可达 52.2%^[79]。研究已证实胺脱氢酶是碱性氧化酶,最适反应 pH 在 7.5-9.0 范围内,不能在偏酸性发酵食品中有效发挥胺降解的作用,而且酶活易受到氨基脲和氨基胍等羰基试剂的强烈抑制,因此不适用于发酵食品中生物胺的降解^[79-80]。

3 多铜氧化酶

多铜氧化酶(Multicopper Oxidase, MCO)是一类广泛存在于动植物和微生物中的含铜氧化酶,包括胆红素氧化酶、血浆铜蓝蛋白和漆酶等多种类型^[81]。截至目前,广义上的漆酶(Laccase)是 MCO 家族中最大的亚组,其底物范围广泛,可氧化多种酚和非酚类底物,如多酚、抗坏血酸、芳族胺等,因此具有氧化某些生物胺的潜力^[82]。漆酶分子的典型结构中有 4 个铜离子,分别为 1 个 T1 铜、1 个 T2 铜和 2 个 T3 铜^[83]。漆酶催化生物胺氧化的反应机理是: T1 铜接受底物的电子将其氧化,电子通过一个完全保守的三肽 His-Cys-His 传递给三铜耦合中心(Trinuclear Cluster, TNC),接受电子后的 TNC 再将 O_2 还原成 H_2O (图 4)^[84]。

目前已经发现一些以漆酶为代表的多铜氧化酶能够降解生物胺,而且具有广谱降解的特性^[85-86]。对 2 株可降解生物胺乳酸菌的胞内酶的研究证实, *P. acidilactici* CECT 5930 和戊糖片球菌(*P. pentosaceus*) 4816 的胺降解酶都属于多铜氧化酶家族中的漆酶。2 株菌所产漆酶主要降解酪胺,这可能与漆酶能够氧化酪胺的酚类结构有关,编码该酶的基因为 *suf I*^[87]。来源于 *L. plantarum*

CP3 漆酶可使鱼肉香肠中的腐胺和尸胺含量在发酵 48 h 后分别下降 63.87%、80.61%,总胺含量减少 77%。利用含有该酶的 *L. plantarum* CP3 菌株可以显著抑制鱼肉香肠发酵过程中生物胺的积累^[88]。弯曲乳杆菌(*L. curvatus*) G-1 中的多铜氧化酶也具有降解生物胺的活性,该酶对组胺、酪胺等常见生物胺的降解率均大于 40%^[18]。此外,有研究证实发酵乳杆菌(*L. fermentum*)的多铜氧化酶对生物胺的降解具有广谱性,可以降解 7 种生物胺,分别为组胺、酪胺、腐胺、尸胺、色胺、苯乙胺、亚精胺;在 37 °C 的条件下添加较低水平(500 U/L)的 *L. fermentum* 多铜氧化酶,12 h 内酱油中总胺的降解率达到 10.6%^[89]。来源于肠杆菌属(*Enterococcus* spp.)的多铜氧化酶也可以降解生物胺,已证实粪肠球菌(*E. faecalis*) M5B 所产多铜氧化酶降解生物胺可使苯乙胺、腐胺、组胺和酪胺的降解率分别达到 54%、52%、70%和 40%^[90]。由此可见,细菌来源的多铜氧化酶具有降解食品中生物胺的应用潜力。但是由于生物胺并不是多铜氧化酶的天然底物,目前利用多铜氧化酶降解生物胺存在催化效率低、稳定性较差、生物胺降解率低、生产菌株产酶量低、尚未实现可降解生物胺多铜氧化酶的食品级表达等诸多问题。因此,通过研究不同策略提高多铜氧化酶的催化效率和稳定性、优化表达及改善其降解生物胺的应用特性,有望将其应用于真实的发酵食品工业领域。

4 生物胺降解酶的进化关系

为了解生物胺降解酶之间的亲缘和进化关系,根据已报道的生物胺降解酶信息从 NCBI 和 UniProtKB 数据库中获得了胺氧化酶、胺脱氢酶和多铜氧化酶的序列(表 2),并构建了系统发育进化树(图 5)。对具有降解生物胺活性的 3 类酶的系统发育和进化分析结果表明,它们被划分为 3 个分支,分别是含铜氧化酶、含黄素氧化酶和胺脱氢酶为代表的分支,这可能与生物胺降解酶的辅基类型有一

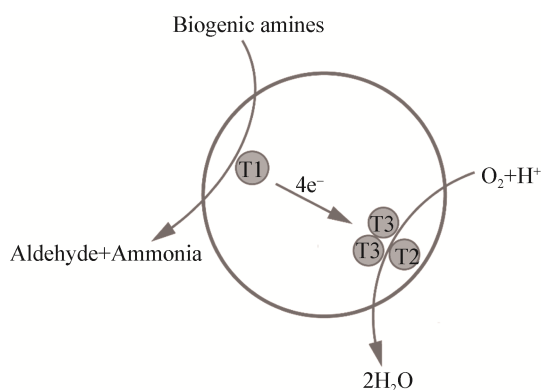


图 4 多铜氧化酶降解生物胺反应机理

Figure 4 Catalytic mechanism of degrading BAs by multicopper oxidase

注: T1: I 型铜; T2、T3: 三铜耦合中心

Note: T1: The type I copper; T2, T3: Trinuclear cluster

表 2 已报道的生物胺降解酶及其来源
Table 2 Reported biogenic amines oxidases and their sources

酶 Enzymes	来源 Sources	底物 Substrates	参考文献 References
AMAO1	<i>A. aurescens</i>	ND	[91]
AMAO2	<i>A. aurescens</i>	Histamine, tyramine, putrescine, spermidine, 2-phenethylamine	[91]
AMAO3	<i>A. aurescens</i>	Histamine, tyramine, putrescine, spermidine, 2-phenethylamine	[91]
PuORh	<i>R. erythropolis</i> NCIMB 11540	Putrescine	[67]
SynPAO	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Spermine, spermidine	[69]
PuO	<i>M. rubens</i>	Putrescine	[92]
HPAO-1	<i>H. polymorpha</i>	Methylamine, ethylamine	[43]
HPAO-2	<i>H. polymorpha</i>	Benzylamine	[43]
PAO	<i>S. cerevisiae</i>	Spermine, N1-acetylspermine	[64]
PrAO	<i>E. coli</i>	Tyramine, tryptamine, phenethylamine	[41]
PrAO	<i>R. opacus</i>	Benzylamine, tyramine, phenylethylamine	[44]
HDH-R	<i>Rhizobium</i> sp.	Histamine	[77]
AADH	<i>A. faecalis</i>	Tyramine, phenethylamine	[73]
MCO	<i>P. acidilactici</i> CECT 5930	Tyramine	[85]
MCO	<i>L. plantarum</i> J16 (CECT 8944)	Tyramine, histamine, putrescine	[86]
MCOW	<i>W. cibaria</i> 17	Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, tryptamine, phenethylamine, spermidine	[93]
MCOF	<i>L. fermentum</i> Y29	Histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, tryptamine, phenethylamine, spermidine	[93]
MCOB	<i>B. amyloliquefaciens</i> XJ03	Histamine, putrescine, cadaverine, tyramine, phenethylamine, tryptamine, spermidine	[93]

注: ND: 没有 BAs 催化活性
Note: ND: Catalytic activity for BAs was not detected

定的关系; 其中含铜氧化酶分支是最大的一个分支, 包括含铜氧化酶 MCO 和 AO 以及胺脱氢酶 AADH^[30,83]。与其他胺脱氢酶不同, 来源于粪产碱杆菌 AADH 辅基不是 TTQ, 而是含铜的天青蛋白, 因此其与含铜氧化酶尤其是胺氧化酶的亲缘关系更近^[74]。在 MCO 这个次级分支中, 来源于乳酸菌具有降解生物胺活性的 MCO 与芽孢杆菌的漆酶 (*Bacillus amyloliquefaciens* MCO、WP_088612302.1) 存在一定的差异^[93-94]。AO 次级分支中伯胺氧化酶 (PrAO、HPAO) 与其他胺氧化酶存在差异。含黄素氧化酶分支主要是以氧化脂肪族和芳香族的伯胺基为主的多胺氧化酶^[95]。

5 生物胺降解酶的表达与分子改造

野生菌株产酶能力有限, 可通过构建工程菌实现酶蛋白的异源表达来提高蛋白质的表达量、研究酶的生理学特性和应用性能。通过克隆表达来源于

金节杆菌(*A. aurescens*) TC-1 中的 3 种细菌胺氧化酶证实: AMAO1 不能氧化生物胺; AMAO2 能够利用多种生物胺作为底物, 而且对 2-苯基乙胺、酪胺和组胺表现出高活性, 其中以 2-苯基乙胺为底物时, 酶活可达到 400 U/mg。AMAO2 还可以利用腐胺和亚精胺作为底物, 但其催化效率远低于 2-苯乙胺, 底物抑制严重影响其活性; AMAO3 可以氧化 2-苯基乙胺、酪胺和组胺^[91]。*R. erythropolis* NCIMB 11540 编码的腐胺氧化酶已成功在大肠杆菌中高效表达, 经鉴定该酶为可溶性二聚体黄素蛋白, 由 50 kD 的亚基组成; 在所有底物中, 其对腐胺的催化效率最高^[67]。Callejón 等研究了来源于 *L. plantarum* 的重组漆酶, 结果发现异源表达多铜氧化酶时需要向培养基中补充铜离子才能获得活性较高的重组酶, 另外证实了该活性重组酶具有生物胺降解能力, 而且降解酪胺的能力最强^[86]。来源于 *P.*

acidilactici 的重组漆酶, 分子量大约为 60 kD, 在 pH 9.5 和 pH 4.0 下可以降解酪胺, ABTS 可作为氧化介体^[85]。徐洁通过表达来自 *L. fermentum* Y29、*Weissella cibaria* 17 和 *B. amyloliquefaciens* XJ03 的多铜氧化酶 MCOF、MCOV、MCOB, 发现它们对生物胺具有广谱降解作用; 通过优化表达条件, 成功实现了重组多铜氧化酶的高效表达, 表达水平最高可达到 3 545.7 U/L^[93]。在此基础之上, 其他研究人员还成功将胞内酶 MCOB 分泌到细胞外, 胞外酶活水平达到 238.1 U/L^[96]。尽管如此, 可降解生物胺的多铜氧化酶目前的表达水平仍不满足工业化应用的需求, 其应用到发酵食品还需要实现酶的

食品级表达。其中, 通过优化表达条件可以提高重组多铜氧化酶的活性, 如优化酶表达时铜离子的补充方式等^[85,97]。此外, 不同表达宿主对同一序列酶蛋白的表达和折叠速率有很大不同, 所产的酶蛋白在 pH 和温度稳定性等性质方面也会表现出一定的差异性^[98]。因此, 在异源表达生物胺降解酶时可以尝试不同的表达宿主, 进一步改善与多铜氧化酶应用相关的酶学特性和应用性能。

已有的研究结果表明, 大多数野生型生物胺降解酶的稳定性和耐盐性较差, 降解生物胺的能力有限, 分子改造技术作为一种有效的手段常用于研究酶的结构/功能关系、改善其酶学性质、提高酶的稳

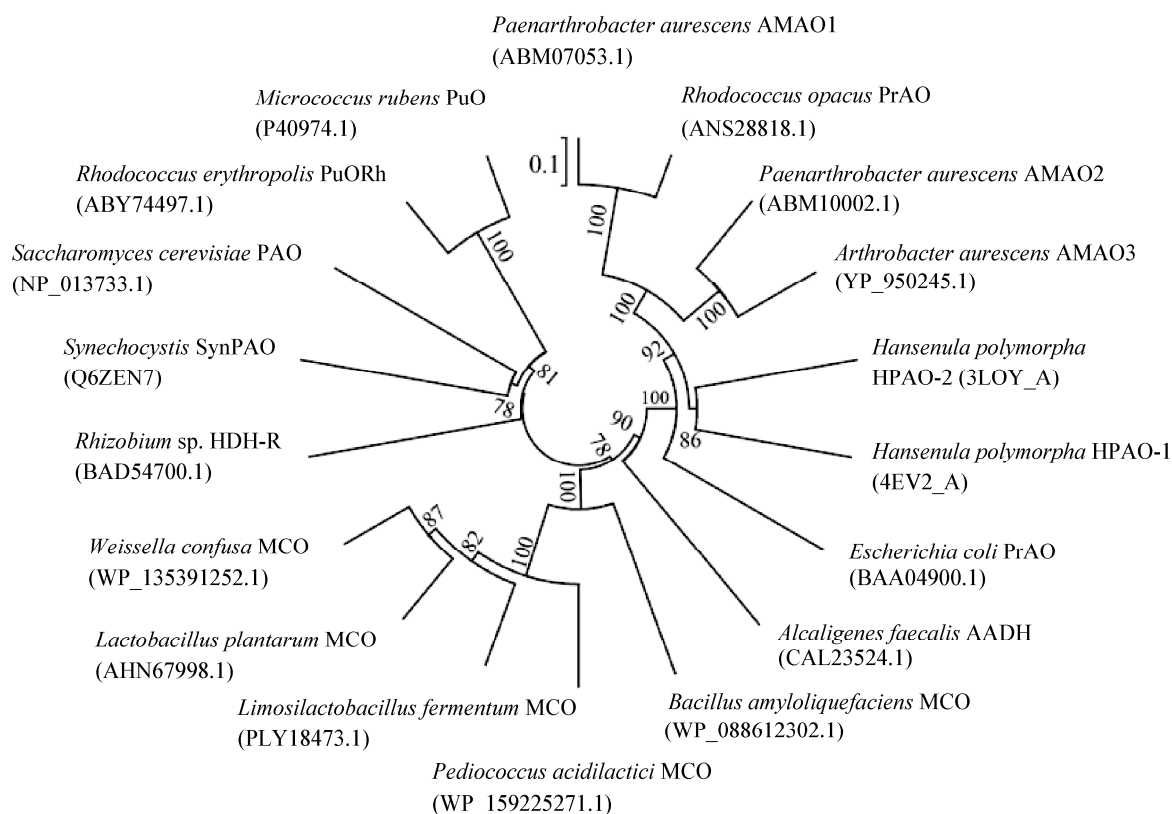


图 5 生物胺降解酶进化关系分析

Figure 5 Analysis of evolutionary relationship of biogenic amines degrading enzymes

注: 使用 MEGA 7.0.26 的 ClustalW 功能对 18 种生物胺降解酶进行多序列比对。然后根据 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统发育进化树。每种蛋白质亲缘关系的置信度通过重复抽样分析(Bootstrap Test) 1 000 次进行检验。括号里是各个蛋白质的 NCBI 或 UniProtKB 登录号

Note: The alignment of 18 biogenic amines degrading enzymes was done with the ClustalW of MEGA 7.0.26. The phylogenetic tree of was then constructed based on the Neighbor-Joining (NJ) method. The confidence interval of the genetic relationship of each protein was tested by 1 000 times of bootstrap. The accession number of each protein in brackets was obtained from NCBI or UniProtKB

定性和应用特性^[99]。Van Hellemond 等对一种腐胺氧化酶(PuORh)进行定点诱变时发现, 突变 Glu324 残基导致酶的催化效率显著下降, 而突变体获得了野生型 PuORh 不具有的氧化单胺的能力, 由此证明了该残基在底物结合中起关键作用^[67]。Trudeau 等通过分子建模和定点诱变证实 Glu216/Ser218 口袋是精胺氧化酶底物特异性的主要决定因素, 获得的双突变体 E216L/S218A 能使 SMO 的底物由单一的精胺变成精胺和 N1-乙酰精胺^[100]。陈雪君等利用随机突变获得的单胺氧化酶突变体 T162A, 其催化效率和酶的比活力分别提高了 91%和 89%^[101]。Razali 等通过同源建模将来源于 *A. globiformis* 的 DAO 重新设计成 mini DAO, 分子量由 74 kD 缩小为 24 kD, 底物由单一的组胺变成组胺和亚精胺, 催化效率提高了 1.2 倍, 稳定性也有所提高^[37]。杨涛通过定点突变改造了来源于 *B. amyloliquefaciens* 中的 MCO, 突变体 L386Y、T317N/L386Y 和 T317N/L386Y/S427E 的催化效率分别较野生型酶提高了 94%、116%和 95%;三突变体 T317N/L386Y/S427E 对 15% NaCl 的耐受性提高了 61.3%, 组胺降解能力提高了 40%^[102]。目前对生物胺降解酶的改造研究还处于初级阶段, 改造策略多是采用随机突变或依据漆酶、氧化酶等较为相似的酶的结构特点进行定点突变等^[102-103]。这主要是因为缺少以相应生物胺为最适底物的酶结构、功能和其催化生物胺氧化机制的相关信息。今后在获得这些酶的必需信息基础上, 有望通过同源建模、晶体结构解析等揭示酶氧化生物胺的反应机理, 寻找进化靶点或理论依据来改善酶的酶学性质和应用特性。

6 总结与展望

生物胺是发酵食品加工过程中由细菌代谢产生的潜在胺类危害物。酶法降解是减少发酵食品中生物胺的有效方法之一, 在食品工业具有良好的技术优势和应用前景。目前已分离到各类细菌产的胺氧化酶、胺脱氢酶和多铜氧化酶具有降解一种或多种生物胺的活性。虽然胺氧化酶和胺脱氢酶具有较

强底物特异性, 但将它们用于降解发酵食品中的生物胺时, 还存在总胺降解率不高、酶的最适反应 pH 与应用体系不相符、酶活易受抑制剂抑制等问题^[104-105]。多铜氧化酶可以催化多种生物胺的氧化, 具有较广的生物胺降解谱。此外, 具有降解生物胺能力的细菌多铜氧化酶最适反应 pH 在 3.0-5.5 之间, 适用于发酵食品偏酸性体系。因此, 多铜氧化酶可能是最具有减控发酵食品中生物胺含量潜力的酶。由于生物胺不是多铜氧化酶的天然底物, 酶对生物胺的催化效率和降解率均较低, 制约了多铜氧化酶的工业化应用。今后可在了解各类生物胺降解酶的酶学特性以及进化关系的基础上, 通过基因挖掘筛选获得催化性能更好的生物胺降解酶, 采用分子改造提高酶在应用体系(如酸性、高渗等)中的耐受性和稳定性, 并通过优化表达策略提高生物胺降解酶的表达水平和实现其食品级表达。

REFERENCES

- [1] Doeun D, Davaatseren M, Chung MS. Biogenic amines in foods[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(6): 1463-1474
- [2] Gardini F, Özogul Y, Suzzi G, Tabanelli G, Özogul F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1218-1236
- [3] Fang F, Feng TT, Du GC, Chen J. Evaluation of the impact on food safety of a *Lactobacillus coryniformis* strain from pickled vegetables with degradation activity against nitrite and other undesirable compounds[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2016, 33(4): 623-630
- [4] Frewin DB, Jonsson JR, Head RJ, Russell WJ, Beal RW. Histamine levels in stored human blood[J]. Transfusion, 1984, 24(6): 502-504
- [5] Khan MZ, Nawaz W. The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83: 439-449
- [6] Wójcik W, Łukasiewicz M, Puppel K. Biogenic amines: formation, action and toxicity: a review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2634-2640
- [7] Shukla S, Lee JS, Bajpai VK, Nile SH, Huh YS, Han YK, Kim M. Detection of biogenic amines and microbial safety assessment of novel Meju fermented with addition of *Nelumbo nucifera*, *Ginkgo biloba*, and *Allium sativum*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 119: 231-236
- [8] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690

- [9] Feddern V, Mazzuco H, Fonseca FN, De Lima GJMM. A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures[J]. *Animal Production Science*, 2019, 59(4): 608-618
- [10] Ruiz-Capillas C, Herrero AM. Impact of biogenic amines on food quality and safety[J]. *Foods: Basel, Switzerland*, 2019, 8(2): 62-78
- [11] Lorenzo C, Bordiga M, Pérez-Álvarez EP, Travaglia F, Arlorio M, Salinas MR, Coisson JD, Garde-Cerdán T. The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine[J]. *Food Research International*, 2017, 99: 328-335
- [12] Feng TT, Fang F, Du GC, Chen J. Inhibition of Gram-negative bacteria by *Lactobacillus coryniformis* isolated for safe fermented food[J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(11): 2-6 (in Chinese)
冯婷婷, 方芳, 堵国成, 陈坚. 抗革兰阴性菌的棒状乳杆菌分离及其生产安全性评价[J]. *食品科技*, 2012, 37(11): 2-6
- [13] Mah JH, Park Y, Jin Y, Lee JH, Hwang HJ. Bacterial production and control of biogenic amines in Asian fermented soybean foods[J]. *Foods*, 2019, 8(2): 85-100
- [14] Xu Y, Liu Y, Xu BH, Wang DF, Jiang W. Characterisation and application of *Halomonas shantousis* SWA25, a halotolerant bacterium with multiple biogenic amine degradation activity[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016, 33(4): 674-682
- [15] Tararina MA, Allen KN. Bioinformatic analysis of the flavin-dependent amine oxidase superfamily: adaptations for substrate specificity and catalytic diversity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(10): 3269-3288
- [16] Huang Y, Luo AL, Peng MY, Zhou MZ, Hu Y, Fu CX, Gao B, Xu N. Advance in amine oxidase from microorganisms[J]. *China Brewing*, 2016, 35(9): 24-27 (in Chinese)
黄瑶, 罗爱玲, 彭铭桦, 周梦舟, 胡勇, 付彩霞, 高冰, 徐宁. 微生物胺氧化酶研究进展[J]. *中国酿造*, 2016, 35(9): 24-27
- [17] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 185-198
- [18] Li L, Wen XX, Wen ZY, Chen SW, Wang L, Wei XT. Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1015-1024
- [19] Pintus F, Sabatucci A, Maccarrone M, Dainese E, Medda R. Amine oxidase from *Euphorbia characias*: kinetic and structural characterization[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2018, 65(1): 81-88
- [20] Lopes De Carvalho L, Bligt-Lindén E, Ramaiah A, Johnson MS, Salminen TA. Evolution and functional classification of mammalian copper amine oxidases[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, 139: 106571-106586
- [21] Kishishita S, Okajima T, Kim M, Yamaguchi H, Hirota S, Suzuki S, Kuroda S, Tanizawa K, Mure M. Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(4): 1041-1055
- [22] Gaule TG, Smith MA, Tych KM, Pirrat P, Trinh CH, Pearson AR, Knowles PF, McPherson MJ. Oxygen activation switch in the copper amine oxidase of *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(36): 5301-5314
- [23] Gaule TG, Smith MA, Pearson AR, Knowles PF, McPherson MJ. Probing the molecular mechanisms in copper amine oxidases by generating heterodimers[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(4): 559-564
- [24] Murakawa T, Hamaguchi A, Nakanishi S, Kataoka M, Nakai T, Kawano Y, Yamaguchi H, Hayashi H, Tanizawa K, Okajima T. Probing the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* with halide ions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(38): 23094-23109
- [25] Alharbi B, Hunt JD, Dimitrova S, Spadafora ND, Cort AP, Colombo D, Müller CT, Ghuge SA, Davoli D, Cona A, et al. Mutation of *Arabidopsis* copper-containing amine oxidase gene *AtCuAOδ* alters polyamines, reduces gibberellin content and affects development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7789-7807
- [26] Foster A, Barnes N, Speight R, Morris PC, Keane MA. Role of amine oxidase expression to maintain putrescine homeostasis in *Rhodococcus opacus*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(4/5): 286-295
- [27] Brazeau BJ, Johnson BJ, Wilmot CM. Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 428(1): 22-31
- [28] Murakawa T, Baba S, Kawano Y, Hayashi H, Yano T, Kumasaka T, Yamamoto M, Tanizawa K, Okajima T. *In crystallo* thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(1): 135-140
- [29] Mills SA, Gazica KE, Tierney DL. Co(II) is not oxidized during turnover in the copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*[J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2019, 24(1): 31-37
- [30] Vakal S, Jalkanen S, Dahlström KM, Salminen TA. Human copper-containing amine oxidases in drug design and development[J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1293-1322
- [31] Šebela M, Tylichová M, Peč P. Inhibition of diamine oxidases and polyamine oxidases by diamine-based compounds[J]. *Journal of Neural Transmission*, 2007, 114(6): 793-798
- [32] Velicky P, Windsperger K, Petroczi K, Pils S, Reiter B, Weiss T, Vondra S, Ristl R, Dekan S, Fiala C, et al. Pregnancy-associated diamine oxidase originates from extravillous trophoblasts and is decreased in early-onset

- preeclampsia[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 6342-6353
- [33] Cvetković BR, Pezo LL, Tasić T, Šarić L, Kevrešan Ž, Mastilović J. The optimisation of traditional fermentation process of white cabbage (in relation to biogenic amines and polyamines content and microbiological profile)[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 471-477
- [34] Kim YJ, Kim YW. Optimizing the preparation conditions and characterization of cross-linked enzyme aggregates of a monoamine oxidase[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(5): 1421-1425
- [35] Sekiguchi Y, Makita H, Yamamura A, Matsumoto K. A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 97(2): 104-110
- [36] Naila A, Flint S, Fletcher GC, Bremer PJ, Meerdink G, Morton RH. Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO)[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2650-2660
- [37] Razali NN, Hashim NH, Leow ATC, Salleh AB. Conformational design and characterisation of a truncated diamine oxidase from *Arthrobacter globiformis*[J]. High-throughput, 2018, 7(3): 21-37
- [38] García-Ruiz A, González-Rompinelli EM, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 115-120
- [39] Naila A, Flint S, Fletcher GC, Bremer PJ, Meerdink G. Emerging approach: reduce histamine poisoning with diamine oxidase[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(3): 225-230
- [40] Shanahan P, O'Sullivan J, Tipton KF, Kinsella GK, Ryan BJ, Henahan GTM. Theobromine and related methylxanthines as inhibitors of primary amine oxidase[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(2): e12697
- [41] Roh JH, Suzuki H, Azakami H, Yamashita M, Murooka Y, Kumagai H. Purification, characterization, and crystallization of monoamine oxidase from *Escherichia coli* K-12[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(9): 1652-1656
- [42] Elovaara H, Huusko T, Maksimow M, Elima K, Yegutkin GG, Skurnik M, Dobrindt U, Siitonen A, McPherson MJ, Salmi M, et al. Primary amine oxidase of *Escherichia coli* is a metabolic enzyme that can use a human leukocyte molecule as a substrate[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0142367
- [43] Chang CM, Klema VJ, Johnson BJ, Mure M, Klinman JP, Wilmot CM. Kinetic and structural analysis of substrate specificity in two copper amine oxidases from *Hansenula polymorpha*[J]. Biochemistry, 2010, 49(11): 2540-2550
- [44] Foster A, Barnes N, Speight R, Keane MA. Identification, functional expression and kinetic analysis of two primary amine oxidases from *Rhodococcus opacus*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 74(1/2): 73-82
- [45] Huang Y, Zhu X, Peng MY, Fu CX, Zhou MZ, Gao B, Li DS, Xu N. Characterization of crude enzyme from *Aspergillus niger* amine oxidase and study on its degradation of biogenic amines[J]. China Brewing, 2017, 36(3): 121-125 (in Chinese)
- 黄瑶, 朱霞, 彭铭烨, 付彩霞, 周梦舟, 高冰, 李冬生, 徐宁. 黑曲霉胺氧化酶的粗酶液酶学特性及降解生物胺的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(3): 121-125
- [46] Fitzpatrick PF. Oxidation of amines by flavoproteins[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2010, 493(1): 13-25
- [47] Gaweska H, Fitzpatrick PF. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family[J]. BioMolecular Concepts, 2011, 2(5): 365-377
- [48] Roh JH, Wouters J, Depiereux E, Yukawa H, Inui M, Minami H, Suzuki H, Kumagai H. Purification, cloning, and three-dimensional structure prediction of *Micrococcus luteus* FAD-containing tyramine oxidase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 268(2): 293-297
- [49] Eom JS, Seo BY, Choi HS. Biogenic amine degradation by *Bacillus* species isolated from traditional fermented soybean food and detection of decarboxylase-related genes[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(9): 1519-1527
- [50] Borriess R, Danchin A, Harwood CR, Médigue C, Rocha EPC, Sekowska A, Vallenet D. *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement[J]. Microbial Biotechnology, 2018, 11(1): 3-17
- [51] Zhao Y, Sang X, Hao H, Bi J, Zhang G, Hou H. Novel starter cultures *Virgibacillus* spp. selected from grasshopper sub shrimp paste to inhibit biogenic amines accumulation[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 25-36
- [52] Atkin KE, Reiss R, Koehler V, Bailey KR, Hart S, Turkenburg JP, Turner NJ, Brzozowski AM, Grogan G. The structure of monoamine oxidase from *Aspergillus niger* provides a molecular context for improvements in activity obtained by directed evolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 384(5): 1218-1231
- [53] Gong B, Boor PJ. The role of amine oxidases in xenobiotic metabolism[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2006, 2(4): 559-571
- [54] Tipton KF. 90 years of monoamine oxidase: some progress and some confusion[J]. Journal of Neural Transmission, 2018, 125(11): 1519-1551
- [55] Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(9): 3637-3641
- [56] Ramsay RR, Albrecht A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase[J]. Journal of Neural Transmission, 2018, 125(11): 1659-1683
- [57] Carradori S, Secci D, Petzer JP. MAO inhibitors and their wider applications: a patent review[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018, 28(3): 211-226
- [58] Curado-Carballada C, Feixas F, Iglesias-Fernández J, Osuna S. Hidden conformations in *Aspergillus niger* monoamine

- oxidase are key for catalytic efficiency[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(10): 3097-3101
- [59] Schilling B, Lerch K. Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 1995, 1243(3): 529-537
- [60] Niu TJ, Li X, Guo YJ, Ma Y. Identification of a lactic acid bacteria to degrade biogenic amines in Chinese rice wine and its enzymatic mechanism[J]. *Foods*, 2019, 8(8): 312-326
- [61] Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 57(1/2): 107-114
- [62] Hu TT, Sun DL, Zhang J, Xue RY, Janssen HLA, Tang WQ, Dong L. Spermine oxidase is upregulated and promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology Research*, 2018, 48(12): 967-977
- [63] Leonetti A, Baroli G, Fratini E, Pietropaoli S, Marcoli M, Mariottini P, Cervelli M. Epileptic seizures and oxidative stress in a mouse model over-expressing spermine oxidase[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(2): 129-139
- [64] Adachi MS, Torres JM, Fitzpatrick PF. Mechanistic studies of the yeast polyamine oxidase Fms1: kinetic mechanism, substrate specificity, and pH dependence[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(49): 10440-10448
- [65] Rokka R, Futamura N, Ishida A. Role of putrescine oxidase in the generation of hydrogen peroxide by *Micrococcus luteus*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1985, 31(5): 435-440
- [66] Van Hellemond EW, Mazon H, Heck AJ, Van Den Heuvel RHH, Heuts DPHM, Janssen DB, Fraaije MW. ADP competes with FAD binding in putrescine oxidase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(42): 28259-28264
- [67] Van Hellemond EW, Van Dijk M, Heuts DPHM, Janssen DB, Fraaije MW. Discovery and characterization of a putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(3): 455-463
- [68] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 to degrade putrescine: identification and characterization of a novel amine oxidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(16): 4170-4178
- [69] Samasil K, Lopes De Carvalho L, Mäenpää P, Salminen TA, Incharoensakdi A. Biochemical characterization and homology modeling of polyamine oxidase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 119: 159-169
- [70] Yukl ET, Davidson VL. Diversity of structures, catalytic mechanisms and processes of cofactor biosynthesis of tryptophylquinone-bearing enzymes[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 654: 40-46
- [71] Chen LY, Durley R, Poliks BJ, Hamada K, Chen ZW, Mathews FS, Davidson VL, Satow Y, Huizinga E, Vellieux FMD, et al. Crystal structure of an electron-transfer complex between methylamine dehydrogenase and amicyanin[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(21): 4959-4964
- [72] Govindaraj S, Eisenstein E, Jones LH, Sanders-Loehr J, Chistoserdov AY, Davidson VL, Edwards SL. Aromatic amine dehydrogenase, a second tryptophan tryptophylquinone enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(10): 2922-2929
- [73] Hyun YL, Davidson VL. Electron transfer reactions between aromatic amine dehydrogenase and azurin[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(38): 12249-12254
- [74] Hyun YL, Davidson VL. Mechanistic studies of aromatic amine dehydrogenase, a tryptophan tryptophylquinone enzyme[J]. *Biochemistry*, 1995, 34(3): 816-823
- [75] Kondo T, Kondo E, Maki H, Yasumoto K, Takagi K, Kano K, Ikeda T. Purification and characterization of aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes xylooxidans*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(9): 1921-1928
- [76] Limburg J, Mure M, Klinman JP. Cloning and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 436(1): 8-22
- [77] Bakke M, Sato T, Ichikawa K, Nishimura I. Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.: gene cloning, expression in *Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(3): 260-271
- [78] Zhou DW, Visessanguan W, Chaikaew S, Benjakul S, Oda K, Wlodawer A. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of histamine dehydrogenase from *Natrinema gari* BCC 24369[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications*, 2014, 70: 942-945
- [79] Zhang QF. Purification and characterization of an enzyme capable of histamine degradation from *Lactobacillus plantarum*[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2018 (in Chinese)
- 张沁芳. 植物乳杆菌组胺分解酶的分离纯化及性质研究[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2018
- [80] Lee YC, Lin CS, Liu FL, Huang TC, Tsai YH. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2015, 23(4): 836-844
- [81] Gräff M, Buchholz PCF, Le Roes-Hill M, Pleiss J. Multicopper oxidases: modular structure, sequence space, and evolutionary relationships[J]. *Proteins*, 2020, 88(10): 1329-1339
- [82] Guan ZB, Luo Q, Wang HR, Chen Y, Liao XR. Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, 75(19): 3569-3592
- [83] Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera De Los Santos M, Levin L, Rojo-Domínguez A, Romero-Martínez D, Saparrat MCN, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019,

- 18(1): 1-33
- [84] Su J, Fu JJ, Wang Q, Silva C, Cavaco-Paulo A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 294-307
- [85] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186019
- [86] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 3113-3124
- [87] Olmeda I, Casino P, Collins RE, Sendra R, Callejón S, Huesa J, Soares AS, Ferrer S, Pardo I. Structural analysis and biochemical properties of laccase enzymes from two *Pediococcus* species[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(3): 1026-1043
- [88] Xu N, Li TT, Jia RJ, Zhang H, Wang RF. Selection of nitrite and bioamine-degrading bacteria and its improvement of fish sausage quality[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(15): 304-312 (in Chinese)
许女, 李田田, 贾瑞娟, 张浩, 王如福. 降解亚硝酸盐和生物胺乳杆菌筛选及其改善鱼肉香肠品质效果[J]. 农业工程学报, 2018, 34(15): 304-312
- [89] Xu J, Fang F. Expression and characterization of a multicopper oxidase from *Lactobacillus fermentum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(7): 1286-1294 (in Chinese)
徐洁, 方芳. 发酵乳杆菌多铜氧化酶的异源表达及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1286-1294
- [90] Li BB, Wang Y, Xue LL, Lu SL. Heterologous expression and application of multicopper oxidases from *Enterococcus* spp. for degradation of biogenic amines[J]. Protein & Peptide Letters, 2021, 28(2), 63-74
- [91] Lee JI, Kim YW. Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aurescens* and application for determination of biogenic amines[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(4): 673-682
- [92] Ishizuka H, Horinouchi S, Beppu T. Putrescine oxidase of *Micrococcus rubens*: primary structure and *Escherichia coli*[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(3): 425-432
- [93] Xu J. Characterization and heterologous expression of multicopper oxidases for degradation of biogenic amines[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
徐洁. 降生物胺多铜氧化酶的异源表达及性质研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- [94] Mate DM, Alcalde M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 25-40
- [95] Polticelli F, Salvi D, Mariottini P, Amendola R, Cervelli M. Molecular evolution of the polyamine oxidase gene family in Metazoa[J]. BMC Evolutionary Biology, 2012, 12: 90-104
- [96] Yang T, Chen J, Fang F. Secretory expression of a multicopper oxidase in *Escherichia coli*[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2020, 20(10): 1210-1217 (in Chinese)
杨涛, 陈坚, 方芳. 多铜氧化酶在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 过程工程学报, 2020, 20(10): 1210-1217
- [97] Ma SX, Liu N, Jia H, Dai DQ, Zang JP, Cao ZY, Dong JG. Expression, purification, and characterization of a novel laccase from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2018, 58(1): 68-75
- [98] Morii H, Kasama K, Herrera-Espinoza R. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase gene from *Photobacterium phosphoreum* and its functional expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(8): 1768-1776
- [99] Di Paolo ML, Cervelli M, Mariottini P, Leonetti A, Polticelli F, Rosini M, Milelli A, Basagni F, Venerando R, Agostinelli E, et al. Exploring the activity of polyamine analogues on polyamine and spermine oxidase: methoctramine, a potent and selective inhibitor of polyamine oxidase[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2019, 34(1): 740-752
- [100] Trudeau DL, Tawfik DS. Protein engineers turned evolutionists: the quest for the optimal starting point[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 60: 46-52
- [101] Chen XJ, Ma YH, Shao JH, Lai DY, Wang ZG, Chen ZM. Increasing activity of a monoamine oxidase by random mutation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(1): 109-118 (in Chinese)
陈雪君, 马元慧, 邵建华, 赖敦岳, 王志国, 陈振明. 随机突变提高单胺氧化酶活性[J]. 生物工程学报, 2014, 30(1): 109-118
- [102] Yang T. Improving the application characteristics of multicopper oxidase through molecular modification[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in Chinese)
杨涛. 分子改造提高多铜氧化酶的应用特性[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020
- [103] Stanzione I, Pezzella C, Giardina P, Sannia G, Piscitelli A. Beyond natural laccases: extension of their potential applications by protein engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 915-924
- [104] Shepard EM, Dooley DM. Inhibition and oxygen activation in copper amine oxidases[J]. Accounts of Chemical Research, 2015, 48(5): 1218-1226
- [105] Cao ZH, Green-Johnson JM, Buckley ND, Lin QY. Bioactivity of soy-based fermented foods: a review[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 223-238