

过氧化物酶在食品分子及其胶体体系 修饰中的应用进展

锁博海¹, 辛嘉英^{1,2*}, 宋增武¹, 刘思淼¹, 葛怿泽¹, 夏春谷², 李越¹

(1. 哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076; 2. 中国科学院兰州物理化学研究所羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 过氧化物酶是一类大量存在于自然界及生物体内的氧化还原酶。其家族成员众多, 但都可以催化以过氧化氢(H_2O_2)作为底物的氧化反应。现有研究表明可以通过利用过氧化物酶的氧化特性, 来提高功能食品的质量属性和营养特性。而辣根过氧化物酶作为过氧化物酶家族的一员, 近些年来被大量研究。尤其是在食品研究开发中, 有很多研究通过使用辣根过氧化物酶去催化蛋白质或淀粉等食品分子来改善食品本身的性质或获得更合适的食品胶体, 因此值得更深层次的挖掘其应用价值及市场。本文在介绍过氧化物酶的结构、催化机制及影响其催化的关键因素基础上, 分析了过氧化物酶催化对食品分子结构和性质的影响, 综述了近年来过氧化物酶在食品分子及其胶体体系修饰中的一些应用, 以期今后过氧化物酶的研究提供一定的理论参考和新思路。

关键词: 过氧化物酶; 辣根过氧化物酶; 交联; 胶体系统

Application of peroxidase in the modification of food molecules and their colloidal systems

SUO Bo-Hai¹, XIN Jia-Ying^{1,2*}, SONG Zeng-Wu¹, LIU Si-Miao¹,
GE Yi-Ze¹, XIA Chun-Gu², LI Yue¹

(1. Key Laboratory for Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. State Key Laboratory for Oxo Synthesis & Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Peroxidase is a class of oxidoreductases that occur abundantly in nature and organisms. There are many family members, and they can all catalyze oxidation reactions with hydrogen peroxide (H_2O_2) as a substrate. Existing studies have shown that the quality and nutritional properties of functional foods can be improved by harnessing the oxidative properties of peroxidase. As a member of the peroxidase family, horseradish peroxidase has been studied a lot in recent years. Especially in food research and development, there are many researchers who use horseradish peroxidase to catalyze food molecules such as protein or starch to improve the properties of the food itself or obtain more suitable food colloids, so it is worth exploring its application value and market at a deeper level.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C063)、中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目(高水平人才)(304017)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province Natural Science Foundation (LH2020C063), and the Central Support to Local Colleges and Universities Reform and Development Fund Talent Training Support Program (the Higher Talents) (304017)

*通信作者: 辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化。E-mail: xinjiayingvip@163.com

*Corresponding author: XIN Jia-Ying, Ph.D, Professor, Harbin University of Commerce, No.1, Xuehai Road, Songbei District, Harbin 150076, China. E-mail: xinjiayingvip@163.com

On the basis of introducing the structure, catalytic mechanism and key factors affecting the catalysis of peroxidase, this paper analyzed the effect of peroxidase catalysis on the molecular structure and properties of food, and reviewed some applications of peroxidase in modifying food molecules and their colloid systems in recent years, in order to provide some theoretical references and new ideas for the future study of peroxidase.

KEY WORDS: peroxidase; horseradish peroxidase; crosslinking; colloidal system

0 引言

过氧化物酶(EC 1.11.1.x)是一类大量存在于众多生命领域的氧化还原酶,包括微生物、植物和动物。主要还是在微生物或植物体内产生,其家族成员众多,每个成员具有不同的 EC 编号,功能、性质和调控机制也不尽相同^[1-2]。过氧化物酶一般都包含血红素辅因子,部分也会有非血红素酶。但都能催化由过氧化氢(H₂O₂)为底物所参与的氧化反应,尤其是酚类化合物或胺类化合物为氢供体时,H₂O₂会被选择为电子受体。

天然过氧化物酶被广泛应用且不限于废水处理、生物染色、生化检验、食品中酚的分析和酚类聚合物合成等领域^[3-6]。其中辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是被研究最多的,也是被广泛应用的。尤其是近年来,如何提高功能食品的质量属性和营养特性越来越成为了研究的热点。其中就有研究者通过辣根过氧化物酶修饰食物分子,来增强目标食物分子在食物中的功能,并以此来增强食物的结构特性。证明过氧化物酶不仅可以催化蛋白质、多糖和多酚的氧化,而且在构建食品胶体方面也有很大的应用潜力^[7-10]。目前关于过氧化物酶的综述大多是食品检测分析类的^[11-16],鲜有关于其在食品分子及其胶体体系修饰中的综述。故本文针对过氧化物酶,在介绍过氧化物酶的结构、催化机制及影响其催化的关键因素基础之上,分析了过氧化物酶催化对食品分子结构和性质的影响,综述了近年来过氧化物酶在食品分子及其胶体体系修饰中的一些应用,为后来的研究者提供一定的理论参考。

1 过氧化物酶

传统意义上的过氧化物酶就是天然过氧化物酶,可以依靠获取来源将其细分为三类过氧化物酶^[17],分别是真菌类、植物类、动物类。由于各种过氧化物酶获得的来源不同,其用途也不完全相同。例如,来自真菌的氯过氧化物酶主要用于有毒物质检测^[18],来自植物的辣根过氧化物酶主要用于酚类物质的研究^[5-6,19],来自动物的乳过氧化物酶主要用于动物性食品的保存和检测^[20-21]。随着研究的深入,有研究者发现很多纳米材料和小分子肽也具有一定的过氧化物酶活性,因此把这些具有过氧化物酶活性的物质统称为类过氧化物酶,也就是人工过氧化物酶,常用来弥补天然酶在特殊环境下的不足之处^[22-23]。

尽管过氧化物酶种类繁多,其结构和催化机制也大同小异,但考虑到酶的特异性和安全性等诸多问题,目前在食品研究中用到的过氧化物酶大多是辣根过氧化物酶^[24-25]。

1.1 过氧化物酶的结构及催化机制

大多数过氧化物酶是血红素蛋白,活性部位含有铁原卟啉 IX^[26]。还有一些过氧化物酶活性位点含有镁、钒、硒或黄素基团。过氧化物酶的晶体结构如图 1 所示。过氧化物酶还具有广泛的催化底物,但主要是芳香族化合物。在氧化过程中,过氧化物酶对电子供体具有广泛的特异性,当酚类化合物或胺类化合物是氢供体时,H₂O₂被优先选择为电子受体^[28]。在 H₂O₂ 存在的情况下,酶提取底物中的单个电子形成自由基,同时 H₂O₂ 被还原为 H₂O^[29]。生成的苯氧自由基可引起偶联反应生成醌,醌可与含有氨基和硫醇残基的各种食品原料或配料发生非酶聚合。这促进了一些化学键的生成,例如多糖的二酪氨酸键^[30]。过氧化物酶催化的反应一般用 H₂O₂ + 2AH₂ $\xrightarrow{\text{过氧化物酶}}$ 2H₂O + 2AH⁺ 表示,其中 AH₂ 为底物,AH⁺ 为其自由基产物。

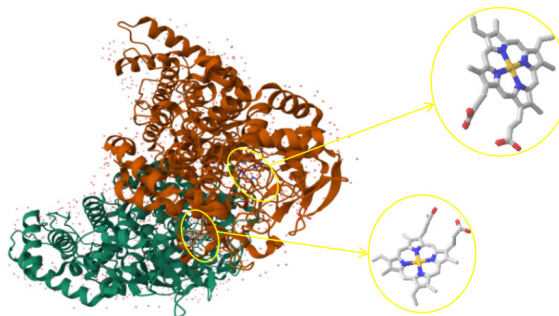


图 1 来自假马来双歧杆菌处理过氧化物酶 W153F 变体的晶体结构及铁原卟啉 IX 位置(PDB ID: 5KQQ)^[27]

Fig.1 Crystal structure and location of ferroporphyrin IX of the W153F variant of catalase-peroxidase from *B. pseudomallei* treated (PDB ID: 5KQQ)^[27]

1.2 辣根过氧化物酶

HRP (EC 1.11.1.7)是食品胶体应用中应用最广泛的酶之一。它是从辣根中提取的,辣根的根中含有许多过氧化物酶同工酶。最丰富的是 C 同工酶(HRP-C),它由一个包含 308 个氨基酸残基的多肽组成,包含两种不同类型的金属中心:铁(III)原卟啉 IX 与两个钙原子。铁(III)原卟啉 IX 通过组氨酸侧链 Nε2 原子与血红素铁原子之间的配位键衔

接到 His170(近端组氨酸残基)上。铁(III)原卟啉 IX 位于远端和近端结构域之间, 每个结构域包含一个钙原子^[31-32]。酶催化的循环可分为 3 个阶段。第一个阶段是 H_2O_2 和酶的 Fe(III)平静状态之间的化合反应, 生成化合物 I, 这是一种高度氧化的中间体。第二个阶段是单电子还原步骤, 需要还原底物, 生成化合物 II, 即 Fe(IV)氧自由基。化合物 III 在第三阶段中回到酶的静息状态。HRP 的催化中心和使用阿魏酸作为还原底物的催化循环如图 2 所示^[31-32]。

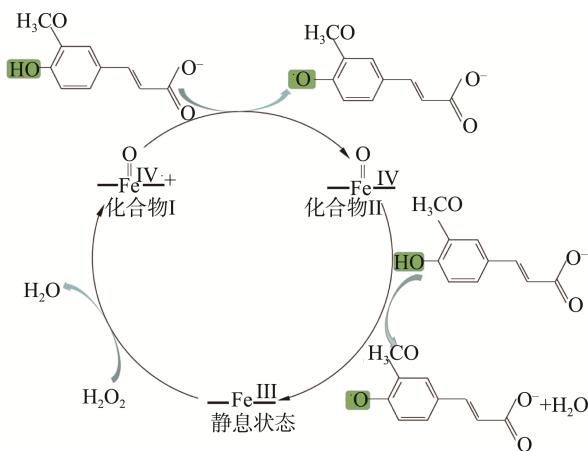


图 2 以阿魏酸为还原底物的 HRP 催化循环^[31-32]

Fig.2 HRP catalytic cycle with ferulate as reducing substrate^[31-32]

HRP 介导的反应易于控制, 这对制备功能性增强的食品胶体很有帮助。HRP 的主要优点有: (1)过氧化物酶介导的反应依赖于共底 H_2O_2 的供应, 其优点是 H_2O_2 的浓度比溶解氧的浓度更容易控制。通过改变 H_2O_2 的加入时间和总剂量, 交联反应可以相对容易地控制^[33]。(2) HRP 介导的交联反应增强了产物的抗氧化、抗菌活性和热敏性, 提高了乳液和纳米颗粒的稳定性。(3) HRP 自身高度稳定^[34]。(4) HRP 介导的凝胶形成具有良好的细胞相容性, 适用于胶体体系^[35]。然而, 虽然有很多关于 HRP 潜在应用的报道, 但在实际应用中却很少。主要原因在于大规模提取高纯度的 HRP 造价不菲, 应用成本过高。

1.3 影响过氧化物酶催化的关键因素

影响过氧化物酶催化的关键因素可以简单概括为以下 3 点。首先, H_2O_2 的加入速率和总用量。 H_2O_2 加入速率过快或过慢都不利于反应的进行。值得注意的是 H_2O_2 的总用量也很关键, 过量的 H_2O_2 会导致各种副反应和酶失活^[36], 包括但不限于过氧化修饰酶活性位点内的氨基酸和类似 Haber-Weiss 的反应导致血红素基团的氧化失活。其次, 底物分子的结构。HRP 底物主要是芳香族的, 所以带有苯环或酚基的底物更容易发生反应。第三, 外部反应条件。反应需要在适当的条件下进行, 如酶的最适温度、pH 和酶与底物浓度比。

2 过氧化物酶催化对食品分子结构和性质的影响

在食品分子中, 过氧化物酶主要以 H_2O_2 作为共底物启动食品分子的交联, 达到修饰蛋白质分子结构和促进网络结构形成以改善性能的目的。例如, 催化载脂蛋白- α -乳清蛋白交联来改变其表面疏水性^[37]。HRP (H_2O_2 存在)还可以作用于 β -乳球蛋白来诱导乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)中低聚物和聚合物的形成^[38]。另外, 由于牛乳蛋白之间形成共价键, 过氧化物酶处理后的全牛乳酸奶的黏度、弹性和黏性模量更高, 触变环面积更大^[39]。甚至与漆酶相比, HRP 是马铃薯蛋白交联的最佳试剂。其在马铃薯粉中的交联作用比漆酶更显著^[40]。壳聚糖与酚类化合物也可以通过过氧化物酶进行共价改性以提高其性能^[41-42]。在 HRP 的帮助下, 没食子酸辛酯(一种食品级抗氧化剂)被接枝到壳聚糖分子上, 在一定程度上提高了壳聚糖的抗菌、抗氧化和机械性能^[43-44]。

JIANG 等^[9]用 HRP、葡萄糖氧化酶和葡萄糖在 37°C 下通过诱导大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)分子中形成二酪氨酸, 通过一步和两步处理将大豆分离蛋白交联。与 SPI 相比, 由此制备的两种交联 SPI 产物表现出相似的吸油能力, 表面疏水性略高(约 5%~11%), 但在 pH 为 4.5 时溶解度降低了 14%~30%。两种交联 SPI 产品的乳化稳定性指数(约 26%~71%)也比 SPI 有所提高。因此可以肯定, 这种酶交联可以有效地改变 SPI 的一些物理化学性质。

根据 HRP 的催化过程, 有研究者研究了以对苯二酚为穿梭氧化剂的 HRP(H_2O_2)对(+)-儿茶素的氧化作用。HRP 催化(+)-儿茶素的氧化偶联可以形成 3 种不同的联苯 C-C 二聚体^[45-46]。此外, GRÖNQVIST 等^[47]研究了漆酶、酪氨酸酶和 HRP 对木质素的催化作用。主要有以下 4 个结果。首先, 漆酶和 HRP 都能有效氧化木质素, 且 HRP 对木质素的修饰比漆酶更有效。但酪氨酸酶的氧化作用可以忽略不计。其次, HRP 处理降低了木质素中酚羟基的含量, 而漆酶处理的木质素中没有发现这种作用。同时漆酶和 HRP 处理都增加了木质素中共轭结构的数量。第三, 漆酶和 HRP 处理的样品中都检测到苯氧基。在检测时间内(即加酶后 20~120 min), 形成的苯氧基数量基本不变。第四, 对木质素酚类结构的分析进一步揭示了这两种酶的不同作用方式。漆酶和 HRP 都与酚羟基发生初步反应, 形成相应的自由基, 以此降低酚羟基的数量。另外, 由于木质素的高分子量, 形成的自由基可能发生离域。

在过氧化物酶的催化中, 酚类或胺类可作为氢供体, 促进过氧化反应, 依赖 H_2O_2 生成醌类^[48], 因此与漆酶相比, 在适当的介质存在的情况下, HRP 还可以催化漆酶单独不能催化的底物。例如, 在 H_2O_2 存在的情况下, HRP 既可以催化含酪氨酸的三肽, 也可以催化 FA, 三肽和 FA 可能发

生异质均相偶联^[49]。此外, HRP 还可以催化漆酶不能催化的单酚类和单胺类化合物, 然而, HRP 不能氧化具有大块取代基的酚衍生物的聚合反应^[50]。但总的来说, 过氧化物酶催化的底物似乎是比较广泛的。需要注意的是, 由于酶催化机制的复杂性, 甚至不同来源的酶存在差异, 在具体应用中需要进行分析。

综上所述, 过氧化物酶催化的交联反应可以不同程度地改善食物分子的性质和结构。但酶的交联效果和应用范围有限。另外, 过氧化物酶的活性也非常重要, 尤其是应用于食品后, 如果不及时灭活, 会导致食品产生酶促褐变等食品质量属性损失的反应。因此, 酶的失活对于保持产品的物理和化学性质、提高保色性和延长其保质期至关重要^[10]。

3 过氧化物酶在食品胶体体系修饰中的应用

许多来自动物、植物或微生物的生物活性物质被用作食品中的功能性成分。但将这些生物活性物质添加到食物中往往存在一些挑战, 如水溶性差, 对光、热和氧敏感, 加工和储存过程中的不稳定性, 以及摄入后的生物利用度低^[51-52]。构建胶体载体是一种广泛用于提高生物活性物质的分散性、稳定性和生物利用度的方法^[53-54]。这些载体包括由食物脂类、蛋白质、多糖、表面活性剂和/或矿物质组装而成的各种纳米颗粒或微粒^[55-56]。由于每种生物活性物质和食品都有其独特的特性, 因此有必要针对每种特定的应用定制胶体载体的设计。但食品中法律允许的物质数量有限, 以及批准新成分既昂贵又耗时的事实, 人们越来越强调通过控制现有成分的相互作用和结构组织在食品胶体中创造新的功能属性^[57]。

在胶体食物系统中, 最主要的功能成分是蛋白质、多糖、多酚及其复合物。许多食物蛋白质和多糖具有良好的增稠、胶凝、乳化和起泡性能^[58]。因此, 它们可以用来改善食物的外观、质地、稳定性和口感。多酚还表现出许多重要的功能属性, 如抗氧化、抗菌、抗突变和抗癌活性^[59-61]。然而, 天然产生的食物分子的性质和应用范围往往相当有限, 不能满足商业食品胶体的所有要求。因此, 有必要采用绿色、安全、有效的方法对这些食物分子进行修饰, 以扩展它们的功能性能。

目前的修饰方法包括物理、化学、酶和基因工程方法^[62]。物理改性方法是高度安全的, 经常与其他改性方法结合使用。在这种方法中, 通过物理手段, 如加热、冷却、高压处理、机械作用、超声处理或应用电磁场, 来改变食物分子的结构或聚集状态的变化。化学修饰则需要利用化学试剂来改变分子结构及特性。例如戊二醛作为一种化学药品, 在食品中常被用作交联剂, 但研究者们对其潜在毒性有一些担忧^[63]。另外, 随着转基因技术的发展, 转基因食物也越来越多, 但在食品中使用转基因成分仍然存在争议, 限

制了这种技术在创造新的和改进的功能成分中的应用。因此, 酶技术因其高生物降解性、特异性、催化速率、产率和效率而受到青睐。经过几十年的发展, 一系列商业酶已经开发出来, 这些酶具有优异的功能特性, 包括对 pH、盐和温度变化的高抗性、快速反应速率和高底物利用率^[64]。此外, 酶可以在温和的反应条件下使用^[32], 这使得它们特别适合于食品中应用。

过氧化物酶和其他氧化酶已广泛应用于食品胶体的构建, 例如, 形成和稳定乳剂、纳米颗粒和凝胶^[65-66]。食品中最常见的乳剂是水包油、油包水和双乳剂^[67]。纳米颗粒由于比表面积大、体积小, 在食品中往往表现出独特的功能属性。它们可用于改善营养物质和营养药品的分散性、稳定性和释放^[55]。食物凝胶通常是由分散在水中的生物聚合物分子或胶体粒子相互作用的网络构成的, 也可以用来封装和释放生物活性物质。酶可以单独使用或在通过将生物聚合物或胶体颗粒交联在一起增强食品凝胶的性能^[68-69]。

3.1 凝胶方面的应用

SKAPA 等^[70]报道 HRP 的加入促进了用酚羟基(phenolic hydroxyl, PH)修饰的壳聚糖的快速凝胶化。凝胶化时间随酚羟基含量、温度、HRP 和 H_2O_2 浓度的增加而减少。制备的壳聚糖-PH 凝胶对哺乳动物细胞无伤害作用, 表明酶催化壳聚糖-PH 凝胶具有应用于食品胶体的潜力。

(-)表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)具有抗癌、抗炎和抗氧化的特性, 是各种绿茶中含量最多的儿茶素^[71]。PETKOVA 等^[72]通过 HRP 催化的硫代壳聚糖和超声波处理的 EGCG 纳米颗粒来形成水凝胶。EGCG 纳米球的性质和由此产生的水凝胶治疗慢性伤口的潜力被发掘出来。结果表明, 与游离 EGCG 相比, EGCG 纳米球具有更好的抗菌性能和对髓过氧化物酶和胶原酶的抑制作用。此外, 该水凝胶与人成纤维细胞具有良好的相容性。HRP 还被用于形成透明质酸(hyaluronic acid, HA)-EGCG 水凝胶^[73]和 α -乳清蛋白聚合物^[74], 前者可以在体内长时间停留, 后者能在相当低的蛋白质浓度下产生可逆的剪切稀化蛋白质水凝胶。这对于精确定制新型食品配方中蛋白质的结构至关重要。

MARTÍNEZ-LÓPEZ 等^[75-76]以过氧化物酶/ H_2O_2 体系为自由基生成剂, 诱导玉米麸皮阿拉伯木聚糖(maize bran arabinoxylans, MBAX)的氧化凝胶化。发现过氧化物酶/ H_2O_2 体系可以使阿魏酸在 MBAX 网络中形成共价交联结构的二聚体和三聚体, 并以此来提高 MBAX 凝胶本身的弹性。他们还通过原子力显微镜和拉曼光谱分析表明, 过氧化物酶催化可能有利于链内相互作用, 降低 AX 网络的连通性。

ZHU 等^[40]的研究清楚地表明过氧化物酶处理后马铃薯蛋白的二级结构发生了改变。经过过氧化物酶处理的马

铃薯淀粉(蛋白质含量约 14%)凝胶与天然马铃薯淀粉凝胶相比, 具有更强的抗剪切能力、热稳定性和更强的三维网络结构。马铃薯粉经过氧化物酶处理后更容易形成蛋白质网状结构。交联形成的网状结构包裹淀粉颗粒, 防止膨胀, 降低糊化黏度。与过氧化物酶处理的马铃薯蛋白质(蛋白质含量约 67%)凝胶相比, 过氧化物酶处理的马铃薯淀粉凝胶具有更强的黏弹性和结构稳定性。更强的凝胶性质表明蛋白质网络结构的形成以及蛋白质和淀粉的协同作用。总之, 酶处理可以在马铃薯粉中形成蛋白质-蛋白质以及蛋白质-淀粉交联网络, 从而形成凝胶。且蛋白质-淀粉形成的凝胶要明显强于蛋白质-蛋白质形成的凝胶。该结果能够为设计和开发基于马铃薯粉的新型功能食品奠定更有力的理论基础。此外, HRP 也能被用于通过交联 α -LA 分子来形成蛋白质基食品凝胶^[77-78]。尽管形成的交联蛋白质结构相对稀薄, 但也足以证明 HRP 在食品凝胶方面的催化交联潜力。

3.2 乳液方面的应用

虽然通过静电相互作用形成蛋白质-多糖络合物可以提高乳剂的稳定性, 但 pH 和离子强度的变化会减弱静电效应, 导致液滴聚集。在 H_2O_2 存在的情况下, HRP 修饰蛋白-多糖络合物已被证明可以提高 WPI-甜菜果胶(sugar beet pectin, SBP)乳剂的稳定性^[79-80]。天然多糖亲水性强, 亲脂性低, 一般不能单独稳定乳剂。然而, 研究表明通过 HRP 交联 SBP 分子可以提高乳剂的抗聚结和絮凝能力^[81]。

近年来, 研究人员关注的是 HRP 介导的玉米纤维胶(corn fiber gum, CFG)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)结合物的修饰。在 H_2O_2 存在的情况下, CFG 和 BSA 与 HRP 交联, 之后用于稳定乳液^[82]。结果表明, 与单一的 CFG 或 BSA 稳定乳状液相比, CFG-BSA 共轭乳液对 pH 变化具有更好的稳定能力, 具有较高的离子强度和冻融循环能力。值得注意的是, CFG/BSA 的质量比影响交联反应和最终体系性能。尤其是当 CFG 和 BSA 以适当的比例通过过氧化物酶交联时, 油滴周围可以形成厚的涂层^[83]。

3.3 纳米粒子方面的应用

无机和有机胶体颗粒比蛋白质、热诱导蛋白质聚集体或低摩尔质量表面活性剂具有更高的稳定性。这种由粒子增强的界面稳定现象被称为 Pickering-Ramsden 型稳定。其中, 纳米颗粒的形状对乳液的稳定性及其潜在利用率有很大的影响。DHAYAL 等^[33]研究了这种现象后, 发现过氧化物酶介导的交联可用于生产尺寸和介观结构可控的蛋白质纳米颗粒, 与传统的热诱导蛋白聚合物相比, 过氧化物酶交联蛋白纳米颗粒的形成受离子强度的影响较小。还有研究者可以通过改变添加速率和 H_2O_2 浓度, 控制 HRP 交联形成的 α -LA 纳米颗粒的大小^[77-78]。因此, 过氧化物酶交联的蛋白纳米颗粒在食品稳定性方面可以认为是

具有一定用途的理想成分。

PYLYPCHUK 等^[84]利用过氧化物酶和纳米粒子, 开发了用于药物降解的纳米复合材料。通过将 HRP 和木质素过氧化物酶(lignin peroxidase LIP)吸附在氧化铁纳米颗粒上, 达到有效固定的目的。其中重点在于吸附时需要尽可能保留酶分子的有利构型, 保持其活性构象。在此之后, 通过添加二氧化硅涂层来实现复合材料的永久固定, 使其耐“冲刷”, 二氧化硅包覆的酶复合材料在高温下显示出更高的稳定性, 一定程度上增强了复合材料的抗高温、耐酸性和可持续性。合成好的复合材料对双氯芬酸、卡马西平和扑热息痛具有较好的降解活性, 比单一酶的活性更高。

3.4 过氧化物酶与其他酶在胶体体系中的联合应用

尽管使用单一酶构建胶体体系的优势明显, 但随着近年来关于双酶交联的报道的发表, 在某些应用中, 几种酶的组合比单一酶交联的效果更好。

有研究表明, 在 H_2O_2 存在的情况下, HRP 促进羟基苯丙酸和明胶中的游离胺快速交联^[60]。基于该研究, 最近的一项研究利用明胶良好的生物相容性, 开发了一种由 HRP 和酪氨酸酶双酶交联系统诱导的明胶基质黏合剂水凝胶^[85]。添加酪氨酸酶的作用是将明胶衍生物中的酚基转化为邻醌, 其产物易于与组织中的胺等亲核试剂发生反应, 从而使水凝胶与组织具有良好的黏附性。结果表明, 酪氨酸酶的加入对水凝胶的成胶时间和机械强度没有影响。与 HRP 交联水凝胶相比, 双酶交联水凝胶具有更好的粘接强度。

此外, 过氧化物酶常与转谷氨酰胺酶(TGase)结合使用, 这是一种食品级蛋白质交联酶, 已被允许用于商业, 它可以催化邻近蛋白质或多肽链上谷氨酰胺和赖氨酸残基之间的化学反应。已有研究表明, 漆酶和 TGase 形成的双网络凝胶相比于单独 TGase 诱导的单网络凝胶具有更高的机械韧性和层次结构^[68]。同样, HRP 和 TGase 诱导的水凝胶表现出更好的力学性能和良好的生物相容性^[86-87]。

4 结束语

目前, 过氧化物酶在食品分子及其胶体体系修饰中的应用研究还相当有限。一系列食品分子的酶交联反应条件有待进一步探索。之前的研究大多集中在食物中的蛋白质、食物凝胶或胶体颗粒的形成上, 鲜少有关于过氧化物酶在脂类、纳米粒子等方面的应用。至于更多种类的过氧化物酶投入到食品开发研究中来, 可能还需要进一步的实验, 如体外消化、细胞培养和动物饲养实验, 这对于评估它们作为食品胶体体系的潜在有效性和安全性至关重要。此外, 酶的成本和循环利用也限制了酶交联技术的发展。酶固定化也许可以解决这个问题, 因此在这方面还需要更多的工作。

参考文献

- [1] BUCHERT J, ERCILI-CURA D, MA H, *et al.* Crosslinking food proteins for improved functionality [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2010, 1: 113–138.
- [2] ISASCHAR-OVDAT S, FISHMAN A. Crosslinking of food proteins mediated by oxidative enzymes—A review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 72: 134–143.
- [3] 冯超群. 大肠杆菌中血红素合成调控及血红素过氧化物酶的异源表达[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- FENG CQ. Regulation of heme synthesis and heterologous expression of heme peroxidase in *Escherichia coli* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [4] Na-won Baek. 辣根过氧化物酶催化天然酚类聚合及其对蚕丝织物染色[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- NA-WON B. Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of natural phenols for the dyeing of silk fabrics [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [5] PANDEY VP, AWASTHI M, SINGH S, *et al.* A comprehensive review on function and application of plant peroxidases [J]. *Biochem Anal Biochem*, 2017, 6(1): 308.
- [6] MEDINA JDC, WOICIECHOWSKI AL, GUIMARÃES LRC, *et al.* Peroxidases [Z]. 2017.
- [7] 王丽丽. 异淀粉酶/辣根过氧化物酶改性淀粉对其结构和上浆性能的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- WANG LL. Structure and sizing properties of starch modified by isoamylase/horseradish peroxidase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [8] 刘延照, 李想, 刘功继, 等. 辣根过氧化物酶催化阿魏酸交联果胶物化特性[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 9–14.
- LIU YZ, LI X, LIU GJ, *et al.* Physicochemical properties of pectin modified by cross-linking with ferulic acid under the catalysis of horseradish peroxidase [J]. *Food Sci*, 2020, 41(14): 9–14.
- [9] JIANG P, LIU HF, ZHAO XH, *et al.* Physicochemical properties of soybean protein isolate affected by the cross-linking with horseradish peroxidase, glucose oxidase and glucose [J]. *J Food Meas Charact*, 2017, 11: 1196–1202.
- [10] CAO X, CAI C, WANG Y, *et al.* The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments [J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2018, 45: 169–178.
- [11] 冯月月, 张丹枫, 付廷锐, 等. 适配体增强金纳米粒子类过氧化物酶活性快速检测鸡蛋中的恩诺沙星[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(7): 266–271.
- FENG YY, ZHANG DF, FU TR, *et al.* Aptamer enhanced gold nanoparticle peroxidase activity for enrofloxacin rapid detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(7): 266–271.
- [12] 方祁利, 路雪纯, 李慧敏, 等. 金属卟啉和甲烷氧化菌素-铜过氧化物模拟酶在食品安全检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(8): 2497–2504.
- FANG QL, LU XC, LI HM, *et al.* Application of metalloporphyrin and methanobactin-Cu peroxidase mimic enzyme in food safety detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(8): 2497–2504.
- [13] 张锋华. 巴氏杀菌牛乳中免疫球蛋白 G 含量和乳过氧化物酶活性[J]. *乳业科学与技术*, 2022, 45(5): 6–10.
- ZHANG FH. Immunoglobulin G content and lactoperoxidase activity in milk during pasteurization and storage [J]. *Dairy Sci Technol*, 2022, 45(5): 6–10.
- [14] ZHU Y, ZHOU K, SHENG R, *et al.* A novel biosensor utilizing the peroxidase-like activity of bovine spleen ferritin for highly sensitive detection of tetracycline antibiotics [J]. *J Food Compost Anal*, 2023, 119: 105277.
- [15] LIU X, ZHAO F, CHITRAKAR B, *et al.* Three recombinant peroxidases as a degradation agent of aflatoxin M₁ applied in milk and beer [J]. *Food Res Int*, 2023, 166: 112352.
- [16] ZHOU W, WEN H, HAO G, *et al.* Surface engineering of magnetic peroxidase mimic using bacteriophage for high-sensitivity/specificity colorimetric determination of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Food Chem*, 2023, 426: 136611.
- [17] 陈建波, 夏春谷, 尉迟力, 等. 过氧化物酶催化反应机理和动力学研究进展[J]. *分子催化*, 1999, (4): 312–320.
- CHEN JB, XIA CG, WEI CL, *et al.* Research progress on the mechanism and kinetics of peroxidase catalytic reaction [J]. *J Mol Catal*, 1999, (4): 312–320.
- [18] ZHU X, XIAO L, DING Y, *et al.* The chloroperoxidase immobilized on porous carbon nanobowls for the detection of trichloroacetic acid by electroenzymatic synergistic catalysis [J]. *Environ Res*, 2023, 234: 116590.
- [19] WU C, DING X, DING Z, *et al.* The class III peroxidase (POD) gene family in cassava: Identification, phylogeny, duplication, and expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2730.
- [20] AWOL K, TAYE M, KASSA B. Activation of lactoperoxidase system and its potential for microbial inhibition and preservation of milk in the great African rift valley climate [J]. *Cogent Food Agric*, 2023, 9(1): 2247691.
- [21] LINEHAN K, ROSS RP, STANTON C. Bovine colostrum for veterinary and human health applications: A critical review [J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2023, 14: 387–410.
- [22] 徐阳, 辛嘉英, 王雨晴, 等. 过氧化物酶及其模拟物在食品分析中的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(21): 8494–8500.
- XU Y, XIN JY, WANG YQ, *et al.* Research progress on the application of peroxidase and its mimetic enzyme in food analysis [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(21): 8494–8500.
- [23] 吴硕, 罗圆圆, 王永辉, 等. 基于纳米金类过氧化物酶活性构建 RGB 可视化检测体系的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(6): 54–60.
- WU S, LUO YY, WANG YH, *et al.* Study on the construction of RGB visual detection system based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(6): 54–60.
- [24] AKBAR H, SEDZRO DM, KHAN M, *et al.* Structure, function and applications of a classic enzyme: Horseradish peroxidase [J]. *J Chem Environ Biol Eng*, 2018, 2(2): 52–59.
- [25] KRÄINER FW, GLIEDER A. An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 1611–1625.
- [26] HOFRICHTER M, ULLRICH R, PECYNA MJ, *et al.* New and classic

- families of secreted fungal heme peroxidases [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 871–897
- [27] LOEWEN PC. Structure of the W153F variant of catalase-peroxidase of *B. pseudomallei* at 1.87 Angstroms [EB/OL] [2017-07-12]. <http://www.rcsb.org/structure/5KQQ> [2023-12-21].
- [28] MATHEIS G, WHITAKER JR. Peroxidase-catalyzed cross linking of proteins [J]. *J Protein Chem*, 1984, 3(1): 35–48.
- [29] HECK T, FACCIIO G, RICHTER M, *et al.* Enzyme-catalyzed protein crosslinking [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 461–475.
- [30] ZEEB B, FISCHER L, WEISS J. Stabilization of food dispersions by enzymes [J]. *Food Funct*, 2014, 5(2): 198–213.
- [31] VEITCH NC. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(3): 249–259.
- [32] WANG X, CHEN S, WU D, *et al.* Oxidoreductase-initiated radical polymerizations to design hydrogels and micro/nanogels: Mechanism, molding, and applications [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(17): 1705668.
- [33] DHAYAL SK, GRUPPEN H, DE-VRIES R, *et al.* Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of α -lactalbumin with horseradish peroxidase [J]. *Food Hydrocolld*, 2014, 36: 53–59.
- [34] TEIXEIRA LSM, FEIJEN J, BLITTERSWIJK CA, *et al.* Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1281–1290.
- [35] JIN R, TEIXEIRA LSM, DIJKSTRA PJ, *et al.* Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran–hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(11): 3103–3113.
- [36] BUREK BO, BORMANN S, HOLLMANN F, *et al.* Hydrogen peroxide driven biocatalysis [J]. *Green Chem*, 2019, 21(12): 3232–3249.
- [37] SARICAY Y, WIERENGA PA, DEVRIES R. Changes in protein conformation and surface hydrophobicity upon peroxidase-catalyzed cross-linking of apo- α -lactalbumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(38): 9345–9352.
- [38] FÆRGEMAND M, OTTE J, QVIST KB. Cross-linking of whey proteins by enzymatic oxidation [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(4): 1326–1333.
- [39] CHANG CH, KONG BH, ZHAO XH. Quality attributes of the set-style yoghurt from whole bovine milk as affected by an enzymatic oxidative cross-linking [J]. *CYTA J Food*, 2014, 12(3): 249–255.
- [40] ZHU Y, TAO H, JANASWAMY S, *et al.* The functionality of laccase-or peroxidase-treated potato flour: Role of interactions between protein and protein/starch [J]. *Food Chem*, 2021, 341: 128082.
- [41] JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, REIS RL, *et al.* Graft copolymerized chitosan—present status and applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2005, 62(2): 142–158.
- [42] MOURYA VK, INAMDAR NN. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore [J]. *React Funct Polym*, 2008, 68(6): 1013–1051.
- [43] ITZINCAB-MEJÍA L, LÓPEZ-LUNA A, GIMENO M, *et al.* Enzymatic grafting of gallate ester onto chitosan: Evaluation of antioxidant and antibacterial activities [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2013, 48(10): 2034–2041.
- [44] ZAVALETA-AVEJAR L, BOSQUEZ-MOLINA E, GIMENO M, *et al.* Rheological and antioxidant power studies of enzymatically grafted chitosan with a hydrophobic alkyl side chain [J]. *Food Hydrocolld*, 2014, 39: 113–119.
- [45] HOSNY M, ROSAZZA JPN. Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(20): 5539–5545.
- [46] JUS S, STACHEL I, FAIRHEAD M, *et al.* Enzymatic cross-linking of gelatine with laccase and tyrosinase [J]. *Biocatal Biotrans*, 2012, 30(1): 86–95.
- [47] GRÖNQVIST S, VIKARI L, NIKU-PAAVOLA ML, *et al.* Oxidation of milled wood lignin with laccase, tyrosinase and horseradish peroxidase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67: 489–494.
- [48] ZEEB B, SALMINEN H, FISCHER L, *et al.* Impact of heat and laccase on the pH and freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions stabilized by adsorbed biopolymer nanoparticles [J]. *Food Biophys*, 2014, 9: 125–137.
- [49] OUDGENOEG G, HILHORST R, PIERSMA SR, *et al.* Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(5): 2503–2510.
- [50] WON K, KIM YH, AN ES, *et al.* Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of cardanol in the presence of redox mediators [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(1): 1–4.
- [51] LIU Y, YADAV MP, CHAU HK, *et al.* Peroxidase-mediated formation of corn fiber gum-bovine serum albumin conjugates: Molecular and structural characterization [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 166: 114–122.
- [52] MCCLEMENTS DJ. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems [J]. *Adv Colloid Interf Sci*, 2015, 219: 27–53.
- [53] EZHILARASI PN, KARTHIK P, CHHANWAL N, *et al.* Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review [J]. *Food Bioproc Technol*, 2013, 6: 628–647.
- [54] LIU F, ZHANG S, LI J, *et al.* Recent development of lactoferrin-based vehicles for the delivery of bioactive compounds: Complexes, emulsions, and nanoparticles [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2018, 79: 67–77.
- [55] MCCLEMENTS DJ. Recent developments in encapsulation and release of functional food ingredients: Delivery by design [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 23: 80–84.
- [56] MCCLEMENTS DJ. The future of food colloids: Next-generation nanoparticle delivery systems [J]. *Curr Opin Colloid Interf Sci*, 2017, 28: 7–14.
- [57] JONES OG, MCCLEMENTS DJ. Functional biopolymer particles: Design, fabrication, and applications [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2010, 9(4): 374–397.
- [58] FOEGEDING EA, DAVIS JP. Food protein functionality: A comprehensive approach [J]. *Food Hydrocolld*, 2011, 25(8): 1853–1864.
- [59] JABERIAN H, PIRI K, NAZARI J. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 237–244.
- [60] LEE Y, BAE JW, OH DH, *et al.* In situ forming gelatin-based tissue adhesives and their phenolic content-driven properties [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(18): 2407–2414.
- [61] STAGOS D, PORTESIS N, SPANOUC, *et al.* Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24

- extracts from Greek domestic Lamiaceae species [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4115–4124.
- [62] KUMAR R, CHOUDHARY V, MISHRA S, *et al.* Adhesives and plastics based on soy protein products [J]. *Ind Crops Prod*, 2002, 16(3): 155–172.
- [63] CHIOU BS, AVENA-BUSTILLOS RJ, SHEY J, *et al.* Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins [J]. *Polymer*, 2006, 47(18): 6379–6386.
- [64] PATEL AK, SINGHANIA RR, PANDEY A. Novel enzymatic processes applied to the food industry [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2016, 7: 64–72.
- [65] LIVNEY YD. Nanostructured delivery systems in food: Latest developments and potential future directions [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2015, 3: 125–135.
- [66] ZAIDEL DNA, CHRONAKIS IS, MEYER AS. Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology [J]. *Food Hydrocolld*, 2012, 28(1): 130–140.
- [67] ZAIDEL DNA, CHRONAKIS IS, MEYER AS. Stabilization of oil-in-water emulsions by enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin [J]. *Food Hydrocolld*, 2013, 30(1): 19–25.
- [68] HOU JJ, GUO J, WANG JM, *et al.* Edible double-network gels based on soy protein and sugar beet pectin with hierarchical microstructure [J]. *Food Hydrocolld*, 2015, 50: 94–101.
- [69] ZHANG Y, FAN Z, XU C, *et al.* Tough biohydrogels with interpenetrating network structure by bienzymatic crosslinking approach [J]. *Eur Polym J*, 2015, 72: 717–725.
- [70] SKAPA P, ZAMECNIK J, HAMSIKOVA E, *et al.* Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: Possible implications for the classification of vulvar squamous cell carcinoma precursors and for the efficacy of prophylactic HPV vaccination [J]. *Am J Surg pathol*, 2007, 31(12): 1834–1843.
- [71] KHAN N, MUKHTAR H. Tea polyphenols for health promotion [J]. *Life Sci*, 2007, 81(7): 519–533.
- [72] PETKOVA P, FRANCESKO A, TZANOV T. Enzyme-assisted formation of hybrid biopolymer hydrogels incorporating active phenolic nanospheres [J]. *Eng Life Sci*, 2015, 15(4): 416–424.
- [73] LEE F, CHUNG JE, XU K, *et al.* Injectable degradation-resistant hyaluronic acid hydrogels cross-linked via the oxidative coupling of green tea catechin [J]. *ACS Macro Letters*, 2015, 4(9): 957–960.
- [74] SARICAY Y, WIERENGA PA, DE-VRIES R. Rheological properties of dispersions of enzymatically cross-linked apo- α -lactalbumin [J]. *Food Hydrocolld*, 2016, 56: 344–351.
- [75] MARTÍNEZ-LÓPEZ AL, CARVAJAL-MILLAN E, LIZARDI-MENDOZA J, *et al.* The peroxidase/H₂O₂ system as a free radical-generating agent for gelling maize bran arabinoxylans: Rheological and structural properties [J]. *Molecules*, 2011, 16(10): 8410–8418.
- [76] MARTÍNEZ-LÓPEZ AL, CARVAJAL-MILLAN E, MARQUEZ-ESCALANTE J, *et al.* Enzymatic cross-linking of ferulated arabinoxylan: Effect of laccase or peroxidase catalysis on the gel characteristics [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2019, 28: 311–318.
- [77] SARICAY Y, WIERENGA P, DE VRIES R. Nanostructure development during peroxidase catalyzed cross-linking of α -lactalbumin [J]. *Food Hydrocolld*, 2013, 33(2): 280–288.
- [78] SARICAY Y, WIERENGA PA, DEVRIES R. Limited changes in physical and rheological properties of peroxidase-cross-linked apo- α -lactalbumin after heat treatment [J]. *Food Hydrocolld*, 2017, 66: 326–333.
- [79] LI JL, CHENG YQ, WANG P, *et al.* A novel improvement in whey protein isolate emulsion stability: Generation of an enzymatically cross-linked beet pectin layer using horseradish peroxidase [J]. *Food Hydrocolld*, 2012, 26(2): 448–455.
- [80] ZAIDEL DNA, CHRONAKIS IS, MEYER AS. Stabilization of oil-in-water emulsions by enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin [J]. *Food Hydrocolld*, 2013, 30(1): 19–25.
- [81] ZHANG L, SHI Z, SHANGGUAN W, *et al.* Emulsification properties of sugar beet pectin after modification with horseradish peroxidase [J]. *Food Hydrocolld*, 2015, 43: 107–113.
- [82] LIU Y, QIU S, LI J, *et al.* Peroxidase-mediated conjugation of corn fiber gum and bovine serum albumin to improve emulsifying properties [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 118: 70–78.
- [83] LIU Y, YADAV MP, YIN L. Enzymatic catalyzed corn fiber gum-bovine serum albumin conjugates: Their interfacial adsorption behaviors in oil-in-water emulsions [J]. *Food Hydrocolld*, 2018, 77: 986–994.
- [84] PYLYPCHUK IV, DANIEL G, KESSLER VG, *et al.* Removal of diclofenac, paracetamol, and carbamazepine from model aqueous solutions by magnetic sol-gel encapsulated horseradish peroxidase and lignin peroxidase composites [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(2): 282.
- [85] LETHI P, LEE Y, NGUYEN DH, *et al.* In situ forming gelatin hydrogels by dual-enzymatic cross-linking for enhanced tissue adhesiveness [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(4): 757–764.
- [86] FAN Z, ZHANG Y, FANG S, *et al.* Bienzymatically crosslinked gelatin/hyaluronic acid interpenetrating network hydrogels: Preparation and characterization [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(3): 1929–1936.
- [87] ZHANG Y, FAN Z, XU C, *et al.* Tough biohydrogels with interpenetrating network structure by bienzymatic crosslinking approach [J]. *Eur Polym J*, 2015, 72: 717–725.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



锁博海, 硕士研究生, 主要研究方向为生物催化。

E-mail: suobohai@163.com



辛嘉英, 博士, 教授, 主要研究方向为生物催化。

E-mail: xinjiayingvip@163.com