

类蛋白反应的作用机制 及其对海洋源蛋白修饰的研究进展

朱磊,张馨心,谢艳英,王浩,夏秀芳*

(东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:类蛋白反应作为一种可以修饰生物活性肽的新方法,已经成为蛋白质食品研究的热点。海洋生物含有丰富的生物活性成分,其含有的蛋白肽具有多种人体代谢和生理调节功能。然而蛋白肽存在生物利用度有限、酶解液味苦等问题。本文在阐述类蛋白反应过程和机制的基础上,对类蛋白反应修饰提高海洋源活性蛋白肽的生物活性、改善蛋白的加工特性及减少蛋白酶解液苦味等研究进展进行了详细的介绍,以期对海洋源蛋白的深度利用以及高值化研究提供理论参考。

关键词:类蛋白反应,作用机制,海洋源蛋白,修饰作用

Research Progress on Mechanism of Plastein Reactions and Its Modification Function of Marine Proteins

ZHU Lei, ZHANG Xin-xin, XIE Yan-ying, WANG Hao, XIA Xiu-fang*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Plastein reaction provides a novel method for modification of bioactive peptides, and has gained extensive attention in the protein food field. Marine organisms contain abundant bioactive components, and their peptides have many functions in human metabolism and physiological regulation. However, the problems, such as limited bioavailability and bitter taste of enzymatic hydrolysate, are found in bioactive peptides. Hence, on the basis of explaining the process and mechanism of plastein reaction, the research progress of plastein reaction modification in improving the bioactivity of active peptides from marine proteins and functional properties of proteins is introduced in the paper. In addition, the effect of reducing the bitterness of hydrolysates of proteins is also reviewed. The results may provide a theoretical reference for promoting the further utilization and high-value research of marine proteins.

Key words: plastein reaction; mechanism; marine protein; modification

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)09-0362-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.058

引文格式:朱磊,张馨心,谢艳英,等.类蛋白反应的作用机制及其对海洋源蛋白修饰的研究进展[J].食品工业科技, 2020, 41(9): 362-367.

多肽的氨基酸残基和链构型在物理因素(如热、射线、机械振荡等)或生化因素(如酶制剂、化学试剂等)的诱导下发生改变,导致蛋白分子的空间结构和理化性质相应变化,被称为蛋白质结构修饰。其中,蛋白质在蛋白酶作用下结构发生改变的酶法修饰,可能赋予蛋白质更好的功能和营养特性^[1]。酶法修饰主要分为酶解修饰和聚合酶法修饰,而类蛋白反应(Plastein reaction)属于后者,是指在合适的条件下,蛋白酶诱导高浓度的蛋白水解物通过缩合、转肽和物理聚集等作用,形成新蛋白(沉淀或凝胶状物质)的反应,其中凝胶状物质被称为类蛋白物

(Plastein)。在 Plastein 反应过程中,还可以在酶促胁迫的作用下,添加理想的外源性氨基酸使其合成到新蛋白质中,以提高蛋白质的营养价值。此外,蛋白水解物中的疏水性氨基酸残基可以在 Plastein 反应中被包埋聚集,从而减少蛋白质水解物的苦味^[2]。

海洋生物蛋白资源作为一种新型蛋白质资源,在活性肽开发方面具有广阔的前景^[3]。已有研究将 Plastein 反应应用在海洋源蛋白生产加工上。许多海洋生物包括罗非鱼^[4]、海地瓜^[5]、沙蚕^[6]等蛋白可以通过 Plastein 反应修饰来进行改善。目前,Plastein 反应在海洋源蛋白应用方面鲜有综述性报道。

收稿日期: 2019-09-09

作者简介: 朱磊(1994-),男,硕士,研究方向:食品科学, E-mail: zll775867098@163.com。

* 通讯作者: 夏秀芳(1973-),女,教授,博士,研究方向:食品科学, E-mail: Xxfang524@163.com。

基金项目: 2017 年东农学者计划“青年才俊”项目(17QC17)。

本文综述了 Plastein 反应的过程和机制,并着重阐述了 Plastein 反应在提高海洋源蛋白的活性肽生物活性、改善蛋白的功能性质、减少酶解液的苦味等方面的应用。

1 Plastein 反应

1.1 Plastein 反应过程

Plastein 反应基本过程可分为三个反应阶段:
a.水解,原料蛋白经酶水解成浓度较低的蛋白水解物,一般为 3%~5%;b.浓缩,将第一阶段的蛋白水解物浓缩成较高浓度 30%~50% 的蛋白浓缩物,该过程通常使用喷雾干燥、冷冻干燥或蒸发等物理方法;
c.合成反应,调节一定的 pH、温度,蛋白浓缩物在酶的诱导下形成类蛋白产物,其合成反应中也可加入外源氨基酸进行反应合成。合成反应所用的酶可以与水解过程的酶相同或者不同,且 Plastein 反应的条件不同,所得到的类蛋白产物也会不同。

1.2 Plastein 反应的作用机制

Plastein 反应过程十分复杂,到目前为止类蛋白形成机制尚未完全阐明,初步形成的三种解释 Plastein 反应的机理包括:缩合反应、转肽作用以及物理聚集。

1.2.1 缩合反应 缩合反应是指通过共价键,蛋白水解物中肽和/或氨基酸形成肽键,故该反应涉及到化学变化。小肽和氨基酸在酶的催化下, α -羧基和 α -氨基通过脱水发生缩合反应,伴随着反应体系中游离氨基酸含量的下降,生成了新的高分子量的蛋白质或肽^[7]。周春霞等^[8]以罗非鱼下脚料水解物为原料,在胃蛋白酶诱导作用下进行 Plastein 反应,高效液相色谱和凝胶电泳分析表明类蛋白的合成是一个提高体系分子量的过程,小分子的多肽和氨基酸缩合形成大分子量的蛋白质;因此,缩合作用在 Plastein 反应中起到一定的作用。通过核磁共振技术和质谱技术,也能证明 Plastein 反应中较小疏水肽在蛋白酶的作用下缩合形成肽键,产生类蛋白物寡肽^[9]。有研究显示,在底物浓度较高时,Plastein 反应主要依赖于缩合反应,而在底物浓度较低时,缩合作用明显减弱。此外也有研究表明,阻断 Plastein 反应前底物肽的氨基和羧基末端,仅略微降低了 Plastein 反应物产率^[10],说明肽缩合是次要作用,可能存在其他的 Plastein 形成机制。

1.2.2 转肽作用 转肽作用过程中有肽键断裂与形成,导致氨基酸残基的重新排列,氨基酸残基从一个肽序列转移到另一个肽序列,可能导致一些肽中疏水性氨基酸残基的积累,并随后形成聚集肽。因此,转肽作用也涉及到肽链一级结构的改变。如果 Plastein 反应仅发生缩合反应,则反应体系中游离氨基总数应呈现减少的趋势。然而,1959 年 Horowitz 等^[11]研究发现在类蛋白物形成过程中,使用三种不同的方法测得的游离氨基含量变化不大,但合成反应并未终止。这也从侧面证明了除了缩合反应之外,Plastein 反应还存在着其它机制。1972 年, Hofsten 等^[12]研究得出结论:Plastein 反应是一种分子重排过程,其中转肽和水解比缩合反应起更重要的

作用,Plastein 反应趋向于形成不溶性复合物。Lozano 等^[13]用胃蛋白酶酶解白蛋白得到的水解物为底物,再加入胰凝乳蛋白酶催化合成类蛋白,在产物中发现不同分子量的肽片段均有增加,故该反应中起主导作用可能是转肽机制。而将外源性氨基酸添加到 Plastein 反应中,主要也是通过转肽作用即通过将氨基酰基残基从供体肽转移到受体肽而形成类蛋白产物。

1.2.3 物理聚集作用 除了缩合反应和转肽作用,类蛋白的形成也可能与非共价键参与的物理聚集作用包括疏水相互作用、氢键等有关,而且疏水相互作用在类蛋白形成中至关重要,酶解产物中的疏水性氨基酸在疏水相互作用下被包埋在蛋白质内部,疏水相互作用越强则越有利于 Plastein 反应的进行^[14]。在 Andrews 等^[10]通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和中子小角散射实验,证明了酪蛋白水解物的 Plastein 反应是一个可逆熵驱动的物理聚合反应。Eriksen 等^[15]也认为熵驱动的物理聚合在 Plastein 反应中起主导作用,由疏水相互作用导致不溶性凝胶产物类蛋白形成。也有研究表明由碱性蛋白酶酶解乳清分离蛋白得到的酶解产物,主要也是通过疏水相互作用诱导底物形成凝胶状物质^[16]。Jiang 等^[17]对海地瓜酶解液进行 Plastein 反应,通过加入十二烷基硫酸钠破坏底物分子的疏水相互作用,结果类蛋白产率降低,再次说明疏水相互作用对于 Plastein 反应产物的形成起着至关重要的作用。此外,又通过加入尿素破坏反应底物中的氢键,结果类蛋白物产量减少,表明氢键也在某种程度上影响类蛋白物的形成。

总之,Plastein 反应机制比较复杂,目前主要为缩合反应、转肽作用和物理聚集这三种机制,由于 Plastein 反应的底物是蛋白水解物,故也有学者将酶解反应归为 Plastein 反应机制中。而至于哪一种反应机制在合成 Plastein 反应中占主导作用则由参与反应的底物^[18]、温度^[19]、pH^[10]、酶等条件决定。有研究表明 Plastein 反应需要在多种反应共同作用下生成类蛋白产物,Liu 等^[20]研究了碱性蛋白酶诱导乳清蛋白水解物进行 Plastein 反应的过程,表明该条件下的肽聚集遵循两步机制,如图 1 所示。

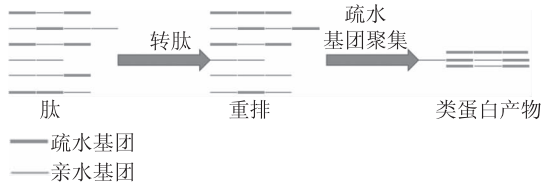


图 1 转肽和疏水性诱导形成类蛋白示意图^[2]

Fig.1 The schematic diagram of plastein formation involving transpeptidation and hydrophobicity-induced peptide aggregation^[2]

2 Plastein 反应修饰在海洋源蛋白中的应用

海洋生物蛋白资源丰富,而其副产物加工利用也越来越引起广泛的关注。海洋源蛋白是理想蛋白的原料来源,其制备的生物活性肽具有安全性高、无

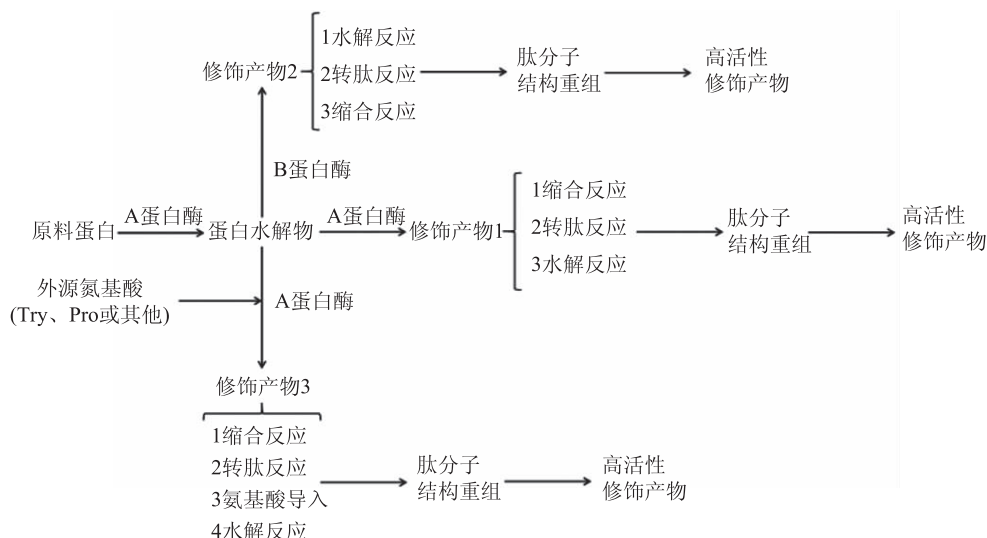


图2 类蛋白反应修饰提高蛋白质水解物 ACE 抑制活性和抗氧化活性的分子机制——肽分子结构重组^[29]

Fig.2 Suggested molecular mechanism for plastein reaction to enhance the ACE inhibitory or antioxidant activities of protein hydrolysates——Structural reconstruction of peptide molecules^[29]

毒、无副作用等优点。但也存在着一定的不足之处,如活性肽生物活性不强、蛋白功能性质不理想、酶解液有明显的苦味等。而 Plastein 反应能够提高活性肽的生物活性、改善蛋白质的功能特性、去除水解物苦味等。若能将 Plastein 反应修饰技术运用到海洋源蛋白加工上,将会给海洋蛋白资源利用带来新的前景。

2.1 Plastein 反应修饰提高海洋蛋白源活性肽的生物活性

制备海洋生物活性肽的主要方法是酶解法,是因为酶解条件温和、水解过程易控、安全性高且能定位水解产生特定的肽^[21]。然而,酶解不能产生新的氨基酸序列,所得多肽序列来源于蛋白质的一级结构,是原蛋白质氨基酸序列中肽片段的一部分。因此,肽的活性受到原蛋白序列的限制。在 Plastein 反应合成过程中,转肽和缩合涉及到蛋白质一级结构的变化,会导致肽序列改变,可能改变多肽的生物活性。因 Plastein 反应修饰技术在改善蛋白肽生物活性方面具有潜在的价值^[2],赵新淮课题组对乳铁蛋白^[22-23]、酪蛋白^[24-26]和大豆蛋白^[27-28]等水解物进行了 Plastein 反应修饰研究,发现经过 Plastein 反应修饰后,蛋白肽在抗癌活性、抑菌性、抗氧化活性以及降血压活性等方面得到提高。而且,酶解产物进行 Plastein 反应过程中,可以添加某些外源氨基酸合成到类蛋白中,在一定程度上改善修饰产物的活性。据此,其提出了 Plastein 反应修饰改善蛋白质水解物活性的反应机制——肽分子结构重组机制,如图 2 所示。通过 Plastein 反应修饰海洋源蛋白以提高 ACE 抑制肽的活性以及增强抗氧化肽的活性等研究已有报道。

2.1.1 Plastein 反应在改善海洋源蛋白 ACE 抑制肽活性中的应用

ACE 作为一种含锌肽酰二肽酶,是含一条肽链,受氯离子和锌离子影响活性的糖蛋白^[30]。ACE 在人体当中主要起到升高血压的作用,

一方面 ACE 可催化血管紧张素 I (十肽) 水解成八肽的血管紧张素 II,使血管进一步收缩,血压升高;另一方面 ACE 也可催化水解缓激肽而使其失去降压活性。而 ACE 抑制肽是一类能够抑制 ACE 活性的多肽,在人体中起到降血压作用^[31]。ACE 抑制肽的 C-端氨基酸和 N-端氨基酸都会对 ACE 活性造成影响。N-端氨基酸性质不明显,而 C-端氨基酸的性质较明显,主要为疏水氨基酸,且 C-端氨基酸对 ACE 抑制肽的活性影响最大^[32]。有研究表明从海参性腺中提取并纯化得到的 ACE 抑制肽 (NAPHMR) 通过氢键或 π 键与 ACE 活性中心 S2' 结合位点或 Zn^{2+} 的结合位点相互作用,从而达到了抑制 ACE 的效果^[33]。

已有多项研究报道利用 Plastein 反应修饰的方法改变海洋蛋白源多肽的序列结构以增强多肽的 ACE 抑制活性,为寻找降血压药物替代品提供了新的思路。Li 等^[5]使用海地瓜蛋白酶解物做为原料,以蛋白水解物中游离氨基酸减少量为指标,探究 Plastein 反应修饰对相应 ACE 抑制肽的活性影响,并且通过添加外源氨基酸 Tyr、Pro、Trp、Phe 和 Leu 进行 Plastein 反应修饰,发现添加 Pro 效果最佳,能显著提高 ACE 抑制活性。体系中游离 Pro 含量在反应后显著降低,说明 Pro 有可能结合到肽链中,将 Plastein 反应修饰物纯化后进行质谱检测以及 ACE 抑制肽数据库分析,得出肽的 N-端 Pro 可能影响 ACE 结合位点,从而降低 ACE 的活性。Jiang 等^[17]在此基础上对海地瓜酶解液的 Plastein 反应修饰机理进行了探究,认为疏水作用和氢键对类蛋白的形成起到了关键作用,这也为 Plastein 反应应用于提高蛋白质或肽的 ACE 抑制活性提供了理论依据。用 Plastein 反应改性 ACE 抑制肽过程中,其酶解底物所用的酶可以与 Plastein 反应合成中的酶不同,韩青等^[34]用木瓜蛋白酶酶解牡蛎,得到的牡蛎酶解产物后,在中性蛋白酶诱导下发生 Plastein 反应,最佳反应条件为底物质量分数为 40%、加酶量 1.0%、反应时间 2.5 h、反应温度

30 ℃、pH7.0,反应体系的游离氨基酸含量下降,得到的类蛋白产物 ACE 抑制率比修饰前提高了 19%。原料蛋白种类不同,用于 Plastein 反应合成的酶也不同。车丽辉^[6]以大连沙蚕为研究对象,通过添加碱性蛋白酶对沙蚕物酶解的产物进行 6 h 的 Plastein 合成反应,其反应体系中游离氨基酸含量下降,经 Plastein 反应修饰后的沙蚕肽体外 ACE 抑制率显著提高。

2.1.2 Plastein 反应在改善海洋源蛋白抗氧化肽活性中的应用 自由基是人体进行新陈代谢时必不可少产生的一种氧化产物。一旦体内自由基过多,则会损伤机体的组织细胞,从而促进衰老或引起其他各种疾病。抗氧化肽是具有较强抑制、延缓脂质氧化和免除自由基侵害的功能的肽类。根据所涉及的化学反应,抗氧化肽主要通过两种主要机制发挥其活性:氢原子转移和电子供给^[35]。

许多研究结果表明,Plastein 反应能够增加抗氧化肽的活性,而且添加的酶的种类与外源性氨基酸对其结果都有着一定的影响。高丹丹等^[36]用中性蛋白酶酶解泥鳅蛋白,在此基础上用木瓜蛋白酶对得到的酶解产物抗氧化肽进行 Plastein 反应修饰,通过响应面优化筛选出在酶添加量为 1782.49 U/g、底物浓度为 40%、His 添加量为 0.5 mmol/g、pH9.0、温度 35 ℃、时间 3 h 的条件下,酶解产物反应体系中游离氨基酸含量下降,Plastein 反应修饰产物对 DPPH 自由基的清除率高达 77.98%。王朋^[37]的研究也表明,经 Plastein 反应修饰的蛋白具有较好的抗氧化性,在加入 1% 的胃蛋白酶(按底物重量计)的条件下,金枪鱼酶解液在 60 ℃ 反应 24 h 后,合成的类蛋白溶液的 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率以及铁还原能力都明显增强。而在 Plastein 反应过程中添加的外源性氨基酸种类,对类蛋白修饰产物的抗氧化性有一定的影响。刘扬^[38]以低廉花甲螺波纹巴非蛤为原料对其酶解,得到的酶解液可以通过添加不同外源性氨基酸进行 Plastein 反应修饰,发现按重量比 3:7 加入 Cys 和 Lys,Plastein 反应产物的羟自由基和 DPPH 自由基清除率有了显著的提高。有研究发现沙蚕蛋白酶解液在 20 ℃、酶加量 2.5 kU/g、底物浓度 35% 的条件下,使用碱性蛋白酶进行 Plastein 反应修饰后,其抗氧化活性明显提高;在此基础上,添加两种外源氨基酸即 Pro 和 Arg 酸对沙蚕酶解肽进行 Plastein 反应改性,Plastein 反应修饰物的 DPPH 的清除率和羟基自由基清除率都有提高^[6]。

2.2 Plastein 反应改善海洋源蛋白的食品加工性能

蛋白质水解产物具有凝胶性、热稳定性、溶解性、抗冻结性和乳化性等性质,可以赋予它们作为食品成分的多种用途。在 Plastein 反应过程中蛋白质在酶促胁迫的作用下产生交联,从而增加了溶液的粘稠度,提高了产物的流变学性质,这在生产质构化食品中具有应用价值。在一定 pH 范围内,由 Plastein 反应产生的粘稠溶液具有良好的稳定性,可作为食品凝胶。有研究者利用 Plastein 反应修饰海参蛋白水解物合成类蛋白物,通过差式扫描量热法发现在 Plastein 反应修饰后蛋白的热稳定性增强,并

且其热变性温度从 120 ℃ 增加到 134 ℃^[17]。而 Ono 等^[39]使用碱性蛋白酶催化鲑鱼内脏蛋白水解物进行 Plastein 反应制备的类蛋白物,热稳定性提高的同时,溶解性也得到了一定的提升。Kolakowski 等^[40]使用胰蛋白酶催化欧鳊鱼的酶解物,合成的类蛋白物具有凝胶能力以及良好的抗冻性等特点。蛋白质水解产物用作沙拉酱、涂抹酱、冰淇淋、咖啡增白剂和肉制品中的乳化剂,而 Plastein 反应是一种蛋白酶催化过程,能够改善蛋白水解产物的乳化能力^[41]。Kim 等^[42]以沙丁鱼为研究对象,在沙丁鱼水解物中添加外源性氨基酸异亮氨酸,通过木瓜蛋白酶的催化下进行 Plastein 反应,得到的类蛋白其乳化活性显著提高。此外,在 Plastein 反应中通过添加谷氨酸二乙酯,可以提高蛋白水解物的水分散能力和持水能力。

2.3 Plastein 反应减少海洋源蛋白酶解液的苦味

海洋生物蛋白质水解成小分子多肽,而得到的酶解产物产生的苦味对加工食品风味影响很大,会降低消费者对食品的接受度。目前蛋白质水解产物脱苦的方法,包括外肽酶处理、美拉德反应、Plastein 反应和包埋^[43]。蛋白水解物肽会在 Plastein 反应中通过物理聚合作用下发生聚集,在疏水性诱导下疏水性氨基酸富集在一起以构建“疏水核”。疏水性残基与味蕾上的味觉接收器在空间上存在一定距离,从而达到了脱苦的效果。Plastein 反应可以有效减少蛋白水解产物的苦味,且不会对蛋白结构和功能造成破坏。Sukarno 等^[44]研究发现虎虾副产物水解物通过天然酶催化进行 Plastein 反应,作为引起肽苦味的苯丙氨酸含量从蛋白质水解产物的 22.5% 下降到 14.9%,另外,在固定化酶催化进行 Plastein 反应后蛋白产物苯丙氨酸含量极低。周春霞等^[8]以罗非鱼副产物用碱性蛋白酶酶解,得到的酶解液为底物,在胃蛋白酶的作用下进行 Plastein 反应修饰后,得到的类蛋白产物与未修饰的酶解液相比,风味得到了明显改善,基本没有苦味。Suh 等^[45]将链霉菌蛋白酶水解阿拉斯加鳕鱼作为底物,再利用菠萝蛋白酶催化进行 Plastein 反应合成,结果显示 Plastein 合成反应显著降低了链霉菌蛋白酶水解产物的苦味。在底物浓度为 30%、pH 为 6~9 范围内,鲑鱼肝胰腺内脏蛋白水解物在碱性蛋白酶催化下进行 Plastein 合成反应修饰后苦味减少,而且不影响乌贼蛋白水解液原有的抗氧化能力^[39]。此外,Zhao 等^[46]在单因素实验的基础上运用正交试验优化确定不同的 Plastein 反应条件对黄鳍金枪鱼内脏蛋白的苦味影响,确定最佳条件为 pH5、底物浓度 40%、温度为 42 ℃,黄鳍金枪鱼内脏蛋白的苦味值显著降低,并且电子鼻系统测试发现 Plastein 反应修饰也能在一定程度上去除腥味。因此,Plastein 反应可以用来去除蛋白质水解物苦味。

2.4 Plastein 反应的其他作用

Plastein 反应还具有从渔业废物中回收蛋白质的潜力。Madzlan 等^[47]以对虾加工厂废水为原料,经菠萝蛋白酶水解 24 h 后,再经 Plastein 反应合成蛋白产品。以三氯乙酸为沉淀剂时,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的类蛋白生成率分别为 27.35% 和 26.77%;而以

乙醇沉淀后,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的类蛋白率分别为 47.46% 和 45.19%,说明用乙醇沉淀得到的类蛋白率更高。Raghunath 等^[48]对鱼制品废弃物的进行 Plastein 反应,用胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和糜蛋白酶分别在 pH5.0、6~7 和 8.0 下合成类蛋白,其中胃蛋白酶生产类蛋白效率最高,产率可达 19.88%。Ooshiro 等^[49]将 Plastein 反应应用于沙丁鱼的副产物中,对蛋白质资源进行回收,其废弃蛋白回收率为 28%,且类蛋白产物经乙醇和正己烷处理烘干后,具有良好的蛋白质消化率。在 Plastein 反应中也可添加其他的氨基酸酯,从而改善类蛋白物的氨基酸组成成分,提高食物蛋白质的营养价值。

3 总结与展望

Plastein 反应是蛋白质修饰中一种重要的酶促反应,主要通过缩合反应、转肽作用和物理聚集作用对蛋白质进行改造。Plastein 反应最早是应用于提高食品营养价值和减少酶解液苦味方面,近年来,利用 Plastein 反应修饰活性肽改善蛋白功能特性的研究兴起。Plastein 反应过程中需要的温度和能量比较低,所用试剂都是食品级,因此要优于其他蛋白质化学改性方法。

海洋功能性多肽食品的发展,可以提高海洋来源蛋白质产品的附加值,并带动新兴功能保健品快速发展。Plastein 反应作为绿色酶法修饰技术,可以应用到海洋功能性多肽食品加工生产中,在功能性食品方面具有良好的应用前景。然而,目前仍然需要对于 Plastein 反应修饰机理等问题进行深入研究和补充,以期制备理想型生物活性肽的工业化生产提供依据。其次,Plastein 反应投入高,但产量低,限制了 Plastein 反应的商业应用。需要在工业规模上控制该过程,以降低类蛋白的商业生产应用成本。如了解蛋白酶在 Plastein 反应形成过程中的特殊作用,设计更有效的蛋白酶(通过改造其结构的特定功能区域),不仅可以提高 Plastein 反应产物的产量、降低生产成本,也为固定化蛋白酶进行蛋白质水解和类蛋白产物工业化生产提供依据。

参考文献

- [1] Krall N, Da C F P, Boutureira O, et al. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development [J]. *Nature Chemistry*, 2016, 8(2): 103-113.
- [2] Udenigwe C C, Rajendran S R C K. Old products, new applications? Considering the multiple bioactivities of plastein in peptide-based functional food design [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 8: 8-13.
- [3] Homaei A, Lavajoo F, Sariri R. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 88: 542-552.
- [4] 任增超, 周春霞, 洪鹏志, 等. 罗非鱼下脚料蛋白合成类蛋白反应的工艺优化 [J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(3): 75-80.
- [5] Li J P, Liu Z Y, Zhao Y H, et al. Novel natural angiotensin converting enzyme (ACE) - inhibitory peptides derived from sea

cucumber-modified hydrolysates by adding exogenous proline and a study of their structure-activity relationship [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(8): 217.

- [6] 车丽辉. 沙蜚蛋白酶解肽的制备及其生物活性研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2015.
- [7] Fujimaki M, Kato H, Arai S, et al. Application of microbial proteases to soybean and other materials to improve acceptability, especially through the formation of plastein [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1971, 34(1): 119-131.
- [8] 周春霞, 任增超, 许佳琳, 等. 罗非鱼下脚料蛋白合成类蛋白反应的研究 [J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(11): 14-19.
- [9] Stevenson D E, Morgan K R, Fenton G A, et al. Use of NMR and mass spectrometry to detect and quantify protease-catalyzed peptide bond formation in complex mixtures [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1999, 25(3-5): 357-363.
- [10] Andrews A T, Alichanidis E. The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism [J]. *Food Chemistry*, 1990, 35(4): 243-261.
- [11] Horowitz J, Haurowitz F. Mechanism of plastein formation [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1959, 33(1): 231-237.
- [12] Hofsten V B, Lalasidis G. Protease-catalyzed formation of plastein products and some of their properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976, 24(3): 460-465.
- [13] Lozano P, Combes D, José L I. Food protein nutrient improvement by protease at reduced water activity [J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(4): 876-880.
- [14] Williams R J H, Brownsell V L, Andrews A T. Application of the plastein reaction to mycoprotein; I Plastein synthesis [J]. *Food Chemistry*, 2001, 72(3): 329-335.
- [15] Eriksen S, Fagerson I S. The plastein reaction and its application: a review [J]. *Journal of Food Science*, 1976, 41(3): 490-493.
- [16] Doucet D, Gauthier S F, Otter D E, et al. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Comparison with the plastein reaction and characterization of interaction [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(21): 6036-6042.
- [17] Jiang S S, Zhao Y H, Shen Q Q, et al. Modification of ACE-inhibitory peptides from *Acaudina molpadioides* using the plastein reaction and examination of its mechanism [J]. *Food Bioscience*, 2018, 26: 1-7.
- [18] Lozano P, Combes D. Alpha-chymotrypsin in plastein synthesis: influence of substrate concentration on enzyme activity [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1991, 14(2): 212-221.
- [19] Pripp A H, Isaksson T, Stepniak L, et al. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins [J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 219(6): 579-583.
- [20] Liu C H, Liu W, Feng Z B, et al. Aggregation of whey protein hydrolysate using alcalase 2.4 L [J]. *Plos One*, 2014, 9(10): 436-439.
- [21] Marciniak A, Suwal S, Naderi N, et al. Enhancing enzymatic

hydrolysis of food proteins and—production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 80: 187–198.

[22] Ma C M, Li T J, Zhao X H. Pepsin—catalyzed plastein reaction with tryptophan increases the *in vitro* activity of lactoferrin hydrolysates with BGC-823 cells [J]. Food Bioscience 2019, 28: 109–115.

[23] 孙玥. 乳铁蛋白水解物的制备及其修饰物的抑菌作用研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.

[24] Zhao X H, Fu Y, Yue N. *In vitro* cytoprotection of modified casein hydrolysates by plastein reaction on rat hepatocyte cells [J]. CyTA—Journal of Food, 2014, 12(1): 40–47.

[25] Zhao X H, Wu D, Li T J. Preparation and radical scavenging activity of papain—catalyzed casein plasteins [J]. Dairy Science and Technology, 2010, 90(5): 521–535.

[26] Xu W, Kong B H, Zhao X H. Optimization of some conditions of neutrase catalyzed plastein reaction to mediate ACE—inhibitory activity *in vitro* of casein hydrolysate prepared by neutrase [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(2): 276–284.

[27] Zhao X H, Song J T. Evaluation of antioxidant properties *in vitro* of plastein—reaction—stressed soybean protein hydrolysate [J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(1): 152–162.

[28] Gao B, Zhao X H. Modification of soybean protein hydrolysates by alcalase—catalyzed plastein reaction and the ACE—inhibitory activity of the modified product *in vitro* [J]. International Journal of Food Properties, 2012, 15(5): 982–996.

[29] 赵新淮, 孙辉. 类蛋白反应在食品蛋白质和活性肽研究中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(11): 1–8.

[30] Lee S H, Qian Z J, Kim S K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2010, 118(1): 96–102.

[31] 林凯, 韩雪, 张兰威, 等. ACE 抑制肽构效关系及其酶法制备的研究进展 [J]. 食品科学, 2017(3): 279–288.

[32] 贾俊强. 超声对酶法制备小麦胚芽 ACE 抑制肽的影响及其作用机理 [D]. 镇江: 江苏大学, 2009.

[33] Zhong C, Sun L C, Yan L J, et al. Production, optimisation and characterisation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) gonad. [J]. Food and Function, 2017, 9(1): 594–603.

[34] 韩青, 周丽杰, 李智博, 等. 酶法制备联合 Plastein 反应修饰牡蛎 ACE 抑制肽工艺优化 [J]. 食品科学, 2017, 38(6): 104–110.

[35] Jose M. Lorenzo, Paulo E. S, Munekata, Belen Gómez, et al. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 79:

136–147.

[36] 高丹丹, 程浩, 马忠仁, 等. 泥鳅蛋白抗氧化肽的 Plastein 反应修饰研究 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(8): 1312–1320.

[37] 王朋. 金枪鱼营养活性肽风味改善技术及活性的研究 [D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2012.

[38] 刘扬. 波纹巴非蛤抗氧化寡肽的酶法制备及其外源氨基酸修饰的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.

[39] Ono S, Kasai D, Sugano T. Production of water soluble antioxidative plastein from squid hepatopancreas [J]. Journal of Oleo Science, 2004, 53(5): 267–273.

[40] Kolakowski E, Wiancki M, Bortnowska G, et al. Trypsin treatment to improve freeze texturization of minced bream [J]. Journal of Food Science, 1997, 62(4): 737–752.

[41] Gong M, Mohan A, Gibson A, et al. Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates [J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 63–69.

[42] Kim S K, Kwak D C, Cho D J, et al. Studies on the improvements of functional properties of sardine protein by plastein reaction [J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 1988, 17(4): 312–319.

[43] Fu Y, Chen J R, Bak K H, et al. Valorisation of protein hydrolysates from animal by—products: perspectives on bitter taste and debittering methods: A review [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 54(4): 978–986.

[44] Sukarno, Lia Marlia, Deli Yusnita, et al. Studies on protease from the digestive tract of tiger shrimp: production of fish protein concentrate through plastein reaction [J]. Fisheries Science, 2002, 68(2): 1335–1338.

[45] Suh H J, Lee H, Cho H Y, et al. Production of protein hydrolysate and plastein from alaska—pollack [J]. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, 1992, 35(5): 339–345.

[46] Zhao Y J, Ye H, Luo H Y. Optimization of conditions for plastein reaction and its application in improving the flavor of protein hydrolyzates from yellowfin tuna [J]. Journal of Food Engineering and Technology, 2015, 4(1): 1–8.

[47] Madzlan K, Mamot S, Osman H, et al. Synthesis of plastein from prawn processing plant wastewater [J]. Journal of Tropical Agriculture & Food Science, 2006, 34(2): 277–287.

[48] Raghunath M R, McCurdy A R. Synthesis of plastein from fish silage [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 54: 655–658.

[49] Ooshiro Z, Mario P W, Nakagawa S, et al. Approaches to the use of plastein reaction in oily fish: preparation and characterization of plastein products [J]. Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University, 1981, 30: 369–382.

订阅《食品工业科技》期刊，
知晓食品科技最新进展