

抗冻蛋白在食品中应用研究进展及安全性分析

张 晖, 丁香丽

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 抗冻蛋白是一类具有提高生物抗冻能力的蛋白质类化合物的总称, 具有降低冰点、修饰冰晶形态、抑制重结晶等特性。对抗冻蛋白在食品原料生产及加工和贮藏中的应用研究进展进行简要的概述并对其安全性进行了简单分析, 以期对抗冻蛋白在食品领域的应用提供参考。

关键词: 抗冻蛋白; 食品; 应用; 转基因; 安全

中图分类号: Q 51 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)05-0455-07

Research Progress of Antifreeze Proteins Application in Food and Its Safty Analysis

ZHANG Hui, DING Xiang-li

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) is the general name of proteins which have the ability to enhance antifreeze capacity of organisms. They can lower the freezing point, modify morphology and inhibited the recrystallization of the ice, etal. In this article, applications of AFPs in food material production, processing and storage were outlined and its safty were analysed briefly in order to provide reference to future application of AFPs in food industry.

Key words: antifreeze proteins (AFPs), food, application, gene modification, safty

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFPs)亦称热滞蛋白(thermal hysteresis proteins, THPs)或冰结构蛋白(ice structuring proteins, ISPs), 是一类具有提高生物抗冻能力的蛋白质类化合物的总称。19 世纪 60 年代由 Devries 首次从南极鱼类的血液中发现, 现已证明 AFPs 普遍存在于鱼类、植物、昆虫、细菌和真菌中^[1-2]。AFPs 具有非依数性的降低冰点, 改变冰晶形态和抑制重结晶等主要特性, 使其具有潜在的商业价值和广泛的应用前景。2006 年, 中国卫生部已将 ISPs 列为可用于冷冻食品中的新型食品添加剂^[3]。本文拟对 AFPs 在食品原料生产

及加工和贮藏中的应用进行综述, 并对存在的安全问题进行分析, 以期 AFPs 在食品领域的应用提供参考。

1 在食品原料生产中的应用

低温及寒冷是影响果树、蔬菜作物和水产品生产的一种逆境因素, 也是某些农作物区域性和季节性的限定因素。通过基因工程将 AFPs 的基因转入到原来没有 AFPs 的动植物体内, 使其产生 AFPs, 不仅能增强其抗寒能力, 实现不同地区动植物的转移培养, 而且可以改善速冻产品在解冻过程中常出

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171637); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUDCF10060)。

作者简介: 张晖(1966—), 女, 上海人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事谷物功能性成分和健康食品的研究。

E-mail: zhanghui@jiangnan.edu.cn

现的汁液流汁、软烂,失去原有形态的问题,提高速冻品质量^[4]。虽然 AFPs 在动植物中均存在,到目前为止,只有鱼类 AFPs 基因的结构、表达调控机制有了系统的研究,因此通过 AFPs 基因改变动植物抗冻性的工作只限于鱼类 AFPs。

Fletcher, G. L. 等^[5]将美洲拟鲈 (*Pseudopleuronectes americanus*) 血淋巴 AFPs 直接注射入虹鳟鱼 (*Salmo gairdneri*) 体内,发现可在冻结温度下提供有效的保护。Davies 等^[6-7]将冬季牙鲆的 AFP 的线性 DNA 经显微注射转入大西洋鲑的受精卵。通过 PCR 和 Southern 印迹分析和 AFP 活性检测,表明 AFP 基因已成功转入并整合到鲑鱼基因组,在部分转基因鱼的 F3 代有 AFP 的持续表达,且检测到了 AFP 的活性。成功的实例还包括:罗非鱼,遮目鱼等。李晶等^[8]将 AFPs 的基因转移到热带罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 中,发现转基因鱼对低温有一定的抵抗能力,为在北方自然水域中培育罗非鱼提供了可能性。朱新平等^[9]采用显微注射的方法将美洲大绵鳊 (*Macrozoarces americanus*) 的抗冻蛋白基因转入鲮鱼 (*Cirrhina molitorcella*),获得转抗冻蛋白基因鲮鱼。

Cutler 等^[10]使用 AFPs 基因真空渗透马铃薯、油菜、拟南芥的叶片,证明 AFPs 可使这些叶片的冻结温度显著降低;悬浮培养暴露在 AFPs 中的雀麦,可降低在任何给定温度下可结冰水的冻结,证实了转 AFPs 基因可提高植物的抗寒性。李天然等^[11]将 AFPs 的 3 种抗冻肽基因分别转入甜菜中获得转基因工程植株,通过抗寒性试验,甜菜能耐 -6.5℃ 的低温。

Geroges 等^[12]合成了冬鲈 AFPs 基因,用电击法转入到玉米原生质体中,通过 CAT 活性、Western 杂交及免疫学检测,证实 AFPs 与 CAT 构成的钱和基因已经在玉米原生质体中表达。Niklas 等^[13]经过 RT-PCR 技术,在转基因马铃薯中检测到了转录的 AFPs 基因,在含有 AFPs 的组织提取液中,检测到了重结晶抑制效应。Khanna, H. K. 等^[14]将合成的重组美洲拟鲈 HPLC-6 α -螺旋 AFPs 基因在春小麦中进行表达,转基因春小麦表现出了最高的抗冻活性,在 -7℃ 下具有显著的冷冻保护作用。

Hightower 等^[15]将极区鱼的 Caf3AFPs 基因转化并获得转基因烟草和番茄,在含有融合蛋白的

组织中检测到了重结晶抑制作用。Mueller 等^[16]将合成的 AFPs 基因,采用叶盘法转化番茄,检测的转化植株的 AFPs 的表达量约占叶片中可溶性蛋白的 0.1%,并表现出重结晶抑制活力。黄永芬等^[17]将整合在 Ti 质粒上的 afp 基因作为供体 DNA,用花粉管通道和子房注射方法导入番茄品种“中蔬四号”中,田间抗寒性研究表明转基因植株生长势优于对照,表现了一定的抗寒能力。转基因各组的致死温度降低 1~2℃,耐低温时间也明显延长。孙瑞芬等^[18]以不同草莓品种叶柄基部为转化起始材料,通过农杆菌介导,获得了 AFPs 基因转化草莓的小植株,通过 PCR 扩增目的基因检测和离体叶片抗冻实验,证明 AFP 基因导入草莓基因组后,明显提高了植株的抗冻能力。

Panadero 等^[19]将来源于极地鱼 grubby sculpin (*Myoxocephalus aeneus*) 的重组抗冻肽 GS-5 在实验室和工业面包酵母菌株(酿酒酵母)中进行异源表达,产生的重组蛋白提高了所有试样的耐冻性。而且,GS-5 编码基因的表达显著提高了冷冻面团和冷冻甜面团的产气率和总产气量。

2 在食品加工和贮藏中的应用

AFPs 通过直接混合、浸泡、真空渗透等物理手段添加到食品中,可降低贮藏温度,减小冰晶形成和重结晶对冷冻食品质构的破坏,改善食品品质,延长货架期。

将 AFPs 直接作为食品添加剂,加入到香槟酒中,能够消除冰渣,改善质量和口味,低温贮藏后只有很少甚至没有冰晶生成,而不加 AFPs 的对照组却有大量冰晶生成^[20]。

在水产品冷冻加工的过程中,如冷冻鱼糜,加入一定量的 AFPs 就能够减缓冷冻速度,形成均匀的小冰晶,防止鱼肉蛋白质变性引起的肉质持水能力下降,提高产品质量^[21]。

Payne 等^[22]研究了南极鳕鱼和美洲拟鲈 AFPs 对冷却肉和冷冻肉的作用。SEM 研究表明,与空白相比添加 AFPs 能够减小冰晶的大小,减小的程度与冷冻前浸泡 AFPs 的浓度和浸泡时间相关。Payne 等^[23]还研究了屠宰前将抗冻糖蛋白 (AFGP) 注射到羊羔体内对冻融后羊肉的影响。通过解冻时的汁液损失及感官品质及部分冷冻样品冰升华后

扫描电镜发现宰前 1~24 h 注射 AFGP 能够降低汁液的流失和减小冰晶大小,终浓度 0.01 μ g/kg 时,羊羔肌肉中所形成的冰晶达到最小。

日本 Kansai 大学生物技术系的 Hidehisa Kawahara 领导的研究小组用根部吸收了从公鱼中提取出来的 AFPs 的樱桃番茄进行了一项实验。研究人员将樱桃番茄在 -20 $^{\circ}$ C 条件下冷冻 10 d 后解冻,他们发现樱桃番茄与没有吸收 AFPs 的普通樱桃番茄相比,更加新鲜,变性也小^[24]。

Cruz 等^[25]将 AFP I 通过真空浸渍法注入西洋菜中,通过 Hunter Lab 色差、扫描电镜及萎蔫度测试研究了对冷冻西洋菜的影响,结果表明,58KPa 下 5 min 能够将 AFP-I 真空浸渍到西洋菜中,与空白组比真空浸渍 AFP-I 的样品细胞壁有更好的清晰度,更圆润的细胞形状,添加 AFP-I 的叶子比对照组有更高的膨胀压,证实 AFP I 是一种有效的添加剂。

Kontogiorgos 等^[26-27]从冷诱导的冬麦草非原质体提取物中分离得到了一种热稳定的奇异果甜蛋白属 ISP,并研究了其对冷冻面团超微结构的影响。发现空白面团在温度波动条件下冻藏 30 d,会破坏面筋结构。而加入 0.1% ISP,可以减缓在冰重结晶阶段面筋-冰复合物的结构变化,使面筋网络中空洞相对变小,进而保护面筋结构。张超等^[28-30]将胡萝卜抗冻蛋白(DcAFP)添加到冷冻面团中,研究了 DcAFP 对冷冻面团发酵能力、质构和风味的影响。通过感官评定、差示扫描量热仪、质构分析仪及固相微萃取-气质联用对冷冻面团贮藏过程中可冻结水含量、及面包质构品质和香气成分进行了分析,发现添加 DcAFP 后酵母的死亡率明显降低,面团发酵能力增强,面团流变学特性提高,证明在冻藏过程中加入 DcAFP 能够降低可冻结水含量,保护酵母细胞,提高面团发酵能力,减小面包硬度,增加面包比容,烘烤后的面包中还引入了类似于十里香的宜人香气。

潘振兴等^[31]采用冷冻面团烘焙发酵法研究了冷冻保护剂对冷冻面团发酵与烘焙特性的影响,发现 ISP 预处理可以有效提高酵母冷冻存活率及产气力,显著缩短冷冻面团的醒发时间,增大面包比容,降低面包硬度,有效保护冷冻面团超微结构。强化 0.5% ISP 的面团体系的超微结构可以得到有效保护,可以显著提高冷冻面团的抗冻发酵特性。

夏露等^[32]将冬小麦麸皮 AFPs 粗品以不同的添加量添加到汤圆中,通过对汤圆的质构、外观、汤圆汤的浊度等因素的测定考察冬小麦麸皮 AFPs 对汤圆储存期间品质变化的影响。加入 AFPs 后汤圆的硬度减弱,弹性值增加。在 -60 $^{\circ}$ C 下速冻 24 h 后,未添加冬小麦麸皮 AFPs 的汤圆出现开裂现象,而添加 AFP 的汤圆则呈现较光滑的外观,煮熟后浑汤清晰透明,易被人们所接受。证明添加 2.5% 的冬小麦麸皮 AFPs 能明显改善汤圆品质。

据报道,美国的 DNAP 公司将 AFPs 添加于冰淇淋和冰奶中,消除了冰渣,改善了质量和口味。把少量的 AFPs 加入到已融化的冰淇淋样品中,于 -80 $^{\circ}$ C 下迅速冷冻,在 -6~-8 $^{\circ}$ C 下放置 1 h 后,用显微镜观察重结晶的变化,发现同对照相比,冰晶明显变小。Tomorrow Products (Los Angeles, CA)生产的 Eskimo 品牌的 Twin Pop(香蕉口味),在 -6~-8 $^{\circ}$ C 下放置 1 h 后,对照样品有显著的大冰晶,而添加 AFPs 的样品观察不到冰晶生长。Merit Foods(Kansas City, MO)生产的外覆根啤酒外壳的香草冰淇淋经 1h 的贮藏,添加 AFPs 的样品只有非常少的冰晶生成,而对照样品却有明显的冰晶增长^[33]。

Daniel 等^[34]将 AFP 添加到冷冻甜食中,研究 AFP 对冷冻甜食网络结构、机械性能、硬度及风味、色泽保持的影响。研究表明,将 AFP 添加到冷冻乳品如冰奶、冷冻酸奶(frozen yoghurt)、软香乳冻(frozen custard)、充气/不充气冰冻果子露(aerated and unaerated sherbet)以及充气或不充气的含奶的冷冻甜食,如冰糕或冰沙(sorbet)、格兰尼它冰糕(granitas)、冷冻果浆(frozen fruit purees)中,能够形成一种牢固的、密集连续的网络结构,使冷冻甜品的品质得到显著的改善。在未充气冰淇淋中添加 AFP Type III HPLC 12,通过四点弯曲测试测定其表面弹性模数和抗弯强度,证明其至少有 0.2 的接触度,具有低于 -150 mm. Sup. -2 的庞加莱(Euler-Poincare)特性;通过维氏硬度试验(Vickers Hardness)证明产品的硬度得到了提高。实验证明在生产具有特殊形状的冰糕时,未添加 AFP 时脱模发生断裂,而添加 AFP 后能够完整的脱模到一张纸上,即使是尖锐的部分也不会断裂。以溶质或分散相的方式加入冷冻甜食中能够控制风味、色泽、离子或大分子流失。由于各层之间的风味不会

发生流失和融合,所以能够生产每层具有不同风味的多层产品。对样品拍照发现,含 AFP 的样品在 -10°C 保存 7 周后只有少量或几乎没有颜色的转移,而未添加 AFP 的样品在 -10°C 保存 1 周后开始出现颜色的转移,7 周后整个样品成了单一的混合颜色。

Regand 等^[35-36]将冷诱导冬麦草水提物(AWWE)添加到冰淇淋中,在总蛋白添加量 0.003%时通过亮视野显微技术观察到显著的 ISP 活性。在 18°C 和温度波动条件下贮藏一个月,通过感官评定发现温度波动组冰淇淋口感明显比空白组滑腻,证实添加 ISP 能够显著降低冰晶生长。在热激处理冰淇淋中,添加蛋白总量 0.0025%和 0.0037%的 AWWE,能分别降低冰晶重结晶速率的 44%和 46%,且巴氏杀菌前添加到混合物中并不影响其 ISP 活性。当添加量为 0.13%时,重结晶抑制效果达到平衡。通过冷冻扫描电镜(Cro-SEM)观察发现,当添加量为高浓度时,由于冰晶体形态学的改变形成了非常粗糙、片状冰淇淋。

3 食品中应用的安全性分析

一种蛋白应用于食品中之前,必须评估它潜在的致敏性。科学家已经对 AFPs 在食品中应用的安全性和可行性进行过评估,认为 AFP 本身既无毒性,其功能特性也不与任何毒性蛋白相关联。联合利华的 ISP Type III HPLC 12 制剂已经在澳大利亚、新西兰、智利、印度尼西亚、墨西哥、美国以及菲律宾在当地监管规程下得到了授权。从 2003 年到 2007 年,在美国销售了大于 47 千万含 ISP 的食用冰产品,在澳大利亚/新西兰约 4 万 7 千升含 ISP 的冰淇淋,无安全事件报道^[37]。

R. Crevel, Fedyk 等^[38]认为,在美国食物中含有的 AFPs 约 1~10 mg/d,在冰岛达 50~500 mg/d。因此 AFPs 可被食用并没有长期或短期的不良健康影响。结合 AFPs 的结构多样性,从 AFPs 消费历史可以得到一个确定的结论-它们的功能特性并不会产生任何显著的毒理学作用,尤其是对消费数据已知的鱼类 AFPs,推断出其缺乏致敏性是合理的。

Baderschneider B 等^[39]测定了重组面包酵母发酵生产的 ISP Type III HPLC 12 及其糖复合物与已知致敏性蛋白氨基酸序列的相似性及抗胃蛋白酶

水解性。结果表明,重组面包酵母发酵生产的 ISP Type III HPLC 12 及其糖复合物与已知致敏性蛋白的氨基酸序列无相似性,在 pH 1.5 时 10min 内 50%能够被降解为小片段而不能产生致敏性或引发与 IgE 的交联。随后的研究证明,对鱼过敏个体的 IgE 并不结合 ISP Type III,得出 ISP Type III HPLC 12 及其糖复合物不可能具有潜在致命危害的结论。

Bindslev J 等^[40]采用 WHO/FAO 最新提出的决策体系来探讨北极鱼源(美洲大鲭鱼、大洋鳕鱼)ISP 潜在致敏性。方法包括对已知过敏原序列相似度的氨基酸序列分析、在标准化条件下的可降解性以及特定 IgE 与蛋白的结合和人类粒细胞中组胺的释放。表明该 ISP 与已知致敏物无序列相似性且在标准化条件下对蛋白酶水解具有不稳定性。采用 20 位有鱼敏感病史,对美洲大鲭鱼、冻绵鲑鱼和鳕鱼皮肤点刺实验呈阳性的患者血清,证实了对相同鱼证明了 ISP 对鱼敏感的患者及其他对可引起 IgE 响应蛋白敏感的个体的安全性。

Poulsen^[41]依据决策树方法的加权风险分析代替预测性分析,包括已知过敏原的序列同源性、特定 IgE 对已知过敏原的交叉反应的血清筛选、蛋白在模拟胃或肠液中的可消化性及动物实验。在大于 5 个连续氨基酸序列的致敏物中没有发现同源性,20 个鱼过敏史、皮肤点刺测试呈阳性的病人血清对同源鱼提取物均表现出体外 IgE 结合活性,体外血清实验中引起的组胺释放,而 ISP 在同样条件下的所有试验中呈阴性。ISP 可被胃蛋白酶在 10 min 内降解为小片段。因此,ISP 与已知鱼致敏物无交叉反应,也不会成为一种敏化蛋白。

Hall-Manning T 等^[42]通过一系列体内和体外基因毒性测定(细菌诱变、染色体畸变、哺乳动物基因突变和小鼠骨髓微核)以及为期 3 个月的重重复高剂量的饲喂小鼠重组面包酵母产生的 ISP Type III HPLC 12 制剂得到的数据表明,小鼠以 580 mg/kg/d(无明显副作用的最高剂量)口服服用 ISP Type III HPLC-12 3 个月没有得到表明潜在基因毒性(采用方法中可接受的极限浓度)或显著的亚慢性毒性的数据。

R. W. R. Crevel 等通过健康受试志愿者每周 5 d 分别摄入 ISP-III 制剂或安抚剂达 8 个周,在这个过程中,记录常规健康指标,监控 ISP-III 特定的

IgG 和 IgE 抗体水平评估其免疫原性。在测试及后续 4 周的随访期间,受试者血液中无 ISP-Ⅲ 特定的 IgG 和 IgE 抗体检出。强免疫原性蛋白会产生的响应的缺失与前人的研究结果一致,证实了 ISP-Ⅲ 制剂没有免疫原性^[43]。因此,专家组认为这些不良反应在摄入含 ISP 的产品后不会出现,严格按照质量指标和生产工艺所描述在冰产品生产中使用相当于 0.01% ISP type III HPLC 12 制剂的最大剂量是安全的^[37]。

但是,并不是所有用来评估致敏性的测试都有可靠的科学依据。环保激进分子、宗教团体、公益性团体、行业协会以及其他科学家及政府官员认为单盲安慰剂对照试验有很多不足之处,许多重要的问题未得到解决:①该实验只包括少数健康志愿者,其中实验组 23 个,对照组 9 个。②采用的制剂是包含酵母蛋白和糖的聚合物的未纯化 ISP,而这些会使免疫反应变得复杂。③受试时间太短可能不足以充分显示 ISP 潜在的免疫性。④ISP 制剂是通过一种调味饮料口服给受试者而非通过准备应用到其中的冰淇淋,引起的免疫反应是有区别的。另外,即使口服不会引起免疫反应,溃疡、擦伤、切口或以冰淇淋粉尘的形式通过呼吸道吸入等途径的动物试验无相关报道。联合利华和 2006 年 Food Standards Australia & New Zealand 的报告均以 ISP 的单克隆抗体做为分析方法来描述试验,表明 ISP 本身是免疫原性的。ACNFP 认为在评估 ISP

制剂潜在致敏性时使用鳕鱼敏感个体对鱼过敏人群具有代表性,该结论是不合理和不科学的,因为鳕鱼过敏症是由小清蛋白引起的,而 ISP 与小清蛋白无关且无相似性。在鳕鱼过敏人群中进行 ISP 的致敏性研究没有任何意义。委员会关于标签中注明产品中含有的 ISP 制剂是从酵母中获得的还不够,需要注明是从转基因酵母中获得的^[44]。

4 展 望

目前 AFPs 在食品领域还未得到广泛的应用中,一个原因是获得 AFPs 的成本和复杂工艺的限制,另一个原因是 AFPs 并不能纳入到标准混合工艺中,因为在加工过程尤其是巴氏杀菌过程中 AFPs 会由于变性变的不稳定。虽然抗冻糖蛋白和冬季比目鱼的 I 型抗冻蛋白已商业化生产,但产品主要用于研究或某些特殊领域^[45]。食品及保健行业巨头-联合利华已有含 ISPs 的产品出售,但是它们的 ISPs 是通过转基因酵母菌生产的,因此受到了一些反对转基因技术组织的关注。尽管近年来对 AFPs 研究越来越充分,但仍有很多需要研究的课题,尤其是开发新型高活性 AFPs 或通过分子生物学的手段提高蛋白含量;快速准确测定 AFPs 活性实验方法的建立;AFP 的合成及类似物、模拟物的应用;在食品体系中与冰、水、蛋白质及其他物质的相互作用以及进一步的安全性评价等^[46-48]。

参考文献(References):

- [1]熊小文,黄发泉,黎毛毛,等. 植物抗冻蛋白研究进展[J]. 江西农业学报,2009,21(10): 112-114.
XIONG Xiao-wen, HUANG Fa-quan, LI Mao-mao, et al. Research advances in plant antifreeze protein[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 21(10): 112-114. (in Chinese)
- [2]Crevel R W R, Fedyk J K, Spurgeon M. J. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40(7): 899-903.
- [3]刘晨临,黄晓航. 抗冻蛋白的研究及其在生物技术中的应用[J]. 海洋科学进展 2002, 20(003): 102-109.
LIU Chen-lin, HUANG Xiao-hang, LI Guang-you. Advances in antifreeze protein research and its application in biotechnology[J]. *Advances in Marine Science*, 2002, 20(003): 102-109. (in Chinese)
- [4]代焕琴,郭索娟. 抗冻蛋白及其在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业,2001, 27(012): 44-49.
DAI Huan-qin, GUO Su-juan, LU Cun-fu. Antifreeze proteins and their application in food industry[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2001, 27(012): 44-49. (in Chinese)
- [5]Fletcher G L, Kao M H, Fournery R M. Antifreeze peptides confer freezing resistance to fish[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1986, 64(9): 1897-1901.
- [6]Fletcher G L, Shears M A, King M J, et al. Evidence for antifreeze protein gene transfer in atlantic salmon (*salmo salar*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1988, 45(2): 352-357.
- [7]Hew C, Fletcher G, Davies P. Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production[J]. *Journal of Fish Biology*,

- 1995, 47: 1—19.
- [8] 李晶, 李荣萍. 低温对转抗冻蛋白基因罗非鱼影响的初步研究[J]. 生物技术, 1996, 6 (005): 9—10.
LI Jing, LI Rong-ping, ZHANG Shu-mei, et al. The influence of low temperature on tilapia of transferred antifreeze protein gene[J]. **Biotechnology**, 1996, 6 (005): 9—10. (in Chinese)
- [9] 朱新平, 夏仕玲, 张跃, 等. 转抗冻蛋白基因鲢鱼的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4 (2): 79—80.
ZHU Xin-ping, XIA Shi-ling, ZHANG Yue, et al. Preliminary study on transgenic mudcarp of antifreeze protein gene [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 1997, 4 (2): 79—80. (in Chinese)
- [10] Cutler A, Saleem M, Kendall E, et al. Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardiness of plant tissues[J]. **Journal of Plant Physiology**, 1989, 135 (3): 351—354.
- [11] 李天然, 张剑峰. 抗冷冻蛋白基因转化甜菜的研究[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 1998, 29 (001): 144—146.
LI Tian-ran, ZHANG Jian-feng, LI Xu-gang. Study on transgenic sugarbeet expressing antifreeze protein (AFP) gene[J]. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol**, 1998, 29 (001): 144—146. (in Chinese)
- [12] Georges F, Saleem M, Cutler A J. Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells[J]. **Gene**, 1990, 91 (2): 159—165.
- [13] Holmberg N, Farres J, Bailey J E, et al. Targeted expression of a synthetic codon optimized gene, encoding the spruce budworm antifreeze protein, leads to accumulation of antifreeze activity in the apoplasts of transgenic tobacco[J]. **Gene**, 2001, 275 (1): 115—124.
- [14] Khanna H K, Daggard G E. Targeted expression of redesigned and codon optimised synthetic gene leads to recrystallisation inhibition and reduced electrolyte leakage in spring wheat at sub-zero temperatures[J]. **Plant Cell Reports**, 2006, 25 (12): 1336—1346.
- [15] Hightower R, Baden C, Penzes E, et al. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants[J]. **Plant molecular biology**, 1991, 17 (5): 1013—1021.
- [16] 王锋. 植物抗寒基因工程研究进展[J]. 福建省农科院学报, 1996, 11 (4): 23—28.
WANG Feng. Advances in the studies of plant cold-resistant genetic engineering[J]. **Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences**, 1996, 11 (4): 23—28. (in Chinese)
- [17] 黄永芬, 汪清胤, 付桂荣, 等. 美洲拟鲈抗冻蛋白基因 (afp) 导入番茄的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13 (4): 418—422.
HUANG Yong-fen, WANG Qing-yin, FU Gui-yong, et al. The research on introducing flounder antifreeze protein gene (afp) into tomato[J]. **Chinese Biochemical Journal**, 1997, 13 (4): 418—422. (in Chinese)
- [18] 孙瑞芬. 草莓再生及抗冻蛋白基因的遗传转化[D]. 内蒙古大学, 2004.
- [19] Panadero J, Randez-Gil F, Prieto J A. Heterologous expression of type I antifreeze peptide gs-5 in baker's yeast increases freeze tolerance and provides enhanced gas production in frozen dough[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2005, 53 (26): 9966—9970.
- [20] Langellier F. Experiments on frost in 1990 in the champagne vineyard, France [air stirring, anti-freeze products][J]. **Vigneron Champenois**, 1991, 112.
- [21] 郭玉华, 曾名勇. 水产抗冻蛋白的研究进展及在水产行业的应用前景[J]. 中国食品添加剂, 2007, 2: 60—65.
GUO Yu-hua, ZENG Ming-yong. Application and research on antifreeze protein for aquatic product[J]. **China Food Additives**, 2007, 2: 60—65. (in Chinese)
- [22] S. R. Payne O A Y. Effects of pre-slaughter administration of antifreeze proteins on frozen meat quality[J]. **Meat Science**, 1995, 41 (2): 147—155.
- [23] Payne S, Sandford D, Harris A, et al. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat[J]. **Meat Science**, 1994, 37 (3): 429—438.
- [24] OSAKA. Scientists extract antifreeze protein from fish[DB/OL]. The free library, 2003-03-11 [2011-12-28]. <http://www.thefreelibrary.com/Scientists+extract+antifreeze+protein+from+fish.-a084336595>
- [25] Cruz R M S, Vieira M C, Silva C L M. The response of watercress (*nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I[J]. **Journal of Food Engineering**, 2009, 95 (2): 339—345.
- [26] V. Kontogiorgos A R, R. Y. Yada, et al. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2007, 31 (2):

139—160.

- [27]Kontogiorgos V, Goff H D, Kasapis S. Effect of aging and ice structuring proteins on the morphology of frozen hydrated gluten networks[J]. **Biomacromolecules**, 2007, 8 (4): 1293—1299.
- [28]C. Zhang H Z, L. Wang, et al. Improvement of texture properties and flavor of frozen dough by carrot (daucus carota) antifreeze protein supplementation[J]. **J Agric Food Chem**, 2007, 55 (23): 9620—9626.
- [29]Zhang C, Zhang H, Wang L. Effect of carrot (daucus carota) antifreeze proteins on the fermentation capacity of frozen dough[J]. **Food Research International**, 2007, 40 (6): 763—769.
- [30]Zhang C, Zhang H, Wang L, et al. Effect of carrot (daucus carota) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb[J]. **LWT - Food Science and Technology**, 2008, 41 (6): 1029—1036.
- [31]潘振兴, 邹奇波, 黄卫宁, 等. 冰结构蛋白对长期冻藏冷冻面团抗冻发酵特性与超微结构的影响[J]. **食品科学**, 2008, 29 (008): 39—42.
- PAN Zhen-xing, ZOU Qi-bo, HUANG Wei-ning, et al. Effects of ice structuring protein on fermentation characteristics and microstructure of frozen dough during long-term cold storage[J]. **Food Science**, 2008, 29 (008): 39—42. (in Chinese)
- [32]夏露, 张超, 王立, 等. 冬小麦抗冻蛋白制备及其在汤圆中的应用研究[J]. **食品工业科技**, 2009, (011): 241—243.
- Xia Lu, Zhang Chao, Wang Li, et al. Preparation and application of antifreeze proteins extracted from winter wheat bran [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, (011): 241—243. (in Chinese)
- [33]Warren G J, Mueller G M, McKown R L. Ice crystal growth suppression polypeptides and method of making[P]. US: 5, 118,792. 1992-06-02.
- [34]Daniel A, Fenn R A, Oldroyd J R. Ice confection[P]. US: 6,491,960 B1, 2002-12-10.
- [35]Regand A, Goff H D. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass[J]. **Journal of Dairy Science**, 2006, 89 (1): 49—57.
- [36]Regand A, Goff H D. Freezing and ice recrystallization properties of sucrose solutions containing ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract[J]. **Journal of Food Science**, 2005, 70 (9): E552-E556.
- [37]Safety of Ice Structuring Protein (ISP)-Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and allergies and of the panel on genetically modified organisms[J]. **The EFSA Journal**, 2008, 768, 1—18.
- [38]Crevel R, Fedyk J, Spurgeon M. Antifreeze proteins; Characteristics, occurrence and human exposure[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2002, 40 (7): 899—903.
- [39]Baderschneider B, Crevel R, Earl L, et al. Sequence analysis and resistance to pepsin hydrolysis as part of an assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type iii hplc 12[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2002, 40 (7): 965—978.
- [40]Bindslev-Jensen C, Sten E, Earl L, et al. Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type iii hplc 12 using the fao/who 2001 decision tree for novel foods[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2003, 41 (1): 81—87.
- [41]Poulsen L K. Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2004, 48 (6): 413—423.
- [42]Hall-Manning T, Spurgeon M, Wolfreys A, et al. Safety evaluation of ice-structuring protein (isp) type iii hplc 12 preparation. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2004, 42 (2): 321—333.
- [43]Crevel R W R, Cooper K J, Poulsen L K, et al. Lack of immunogenicity of ice structuring protein type iii hplc 12 preparation administered by the oral route to human volunteers[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2007, 45 (1): 79—87.
- [44]Cummins J, Ho M W. Gm protein for ice cream not ready for commercial use[R/OL]. Institute of Science in Society Report, 2007-04-16[2011-12-28]. <http://www.issis.org.uk/GMPProteinForIceCream.php> * [45] A/F Protein, 72 Bonad Road, West Newton, MA(1993). <http://www.afprotein.com/>
- [46]Peltier R, Evans C W, DeVries A L, et al. Growth habit modification of ice crystals using antifreeze glycoprotein (afgp) analogues[J]. **Crystal Growth & Design**, 2010, 10 (12): 5066—5077.
- [47]Peltier R, Brimble M A, Wojnar J M, et al. Synthesis and antifreeze activity of fish antifreeze glycoproteins and their analogues[J]. **Chemical Science**, 2010, 1 (5): 538—551.
- [48]Gibson M I. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: Beyond antifreeze(glyco) proteins[J]. **Polymer Chemistry**, 2010, 1 (8): 1141—1152.