

抗冻蛋白在食品工业中的应用现状及前景

张 晖, 张艳杰, 王 立, 郭晓娜

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 抗冻蛋白具有特殊的功能和热滞性质,能够降低冰点、抑制冰晶的生长和重结晶,修饰冰晶的形态。作者回顾了近年来抗冻蛋白的研究进展,对目前已知的抗冻蛋白的种类、结构特点、功能性质及抗冻机理做了介绍,并阐述了抗冻蛋白在食品工业中的应用现状和前景。

关键词: 抗冻蛋白;食品工业;分类;抗冻机理

中图分类号:TS 201.21

文献标志码:A

文章编号:1673—1689(2012)09—0897—07

Applications and Prospect of Antifreeze Proteins in Food Industry

ZHANG Hui, ZHANG Yan-jie, WANG Li, GUO Xiao-na

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

Abstract: Antifreeze proteins have special functions and characteristics of thermal hysteresis. They can lower the freezing point, inhibit ice growing and recrystallization, and modify ice morphology. The article reviewed the recent advance in antifreeze protein, and introduced its types, structure properties, functional characteristics and antifreeze mechanisms as well as their applications and prospect in food industry.

Keywords: antifreeze proteins, food industry, classification, antifreeze mechanisms

抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是一类抑制冰晶生长的蛋白质,它能以非依数性形式降低水溶液的冰点而对其熔点影响甚微,从而导致水溶液的熔点(melting point, MP)和冰点(freezing point, FP)之间出现差值,这种差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA),因而抗冻蛋白亦称为热滞蛋白或温度迟滞蛋白(thermal hysteresis proteins, THPs)^[1]。1969年,Devries 在南极 Mcmurdo 海峡的一种 *Notothereniid* 鱼的血液中首先发现了具有这

种性质的抗冻蛋白。其后 30 多年里,人们又先后从极区鱼类、昆虫、植物及真菌和细菌中发现了抗冻蛋白。抗冻蛋白通过吸附到冰晶表面,由于 Kelvin 效应使冰晶的生长处于热力学上不利的状态,从而抑制冰晶的生长,保护避免结冰或者对结冰敏感的生命有机体免受结冰引起的伤害。由于抗冻蛋白具有阻止冰晶生长而不破坏细胞的特点,因而有望在食品原料的冷处理、冷冻食品的保鲜等方面发挥重大作用^[2]。

收稿日期:2012-07-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31171637)。

作者简介:张晖(1966—),女,上海人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事谷物功能成分的研究。E-mail:zhanghui@jiangnan.edu.cn

1 抗冻蛋白的研究现状

1.1 抗冻蛋白的特性

AFP降低鱼血清、植物体液或水溶液冰点的效率比一般溶质要高。按质量浓度算,比NaCl的效率要高2倍;按摩尔浓度算,比NaCl的效率要高200~500倍。显然这不能用一般的溶液理论来解释。一般溶液(如NaCl,蔗糖溶液等)的冰点是固、液两相蒸气压平衡时的温度,因而冰点等于熔点。而AFP在其溶液中只影响结冰过程,几乎不影响融化过程,所以使冰点低于熔点。例如,2%抗冻糖蛋白溶液-0.9℃结冰,而结的冰直至温度上升到-0.02℃也不融化。这种现象叫做热滞(thromal hysteresis)效应,是AFP的第一个显著特性。热滞是一种非理想溶液的行为,溶液的冰点不由溶液的依数性决定,而其熔点却由溶液的依数性决定,故两者出现差值。冰点和熔点的差值称为热滞值^[3-4]。

AFP有抑制冰晶生长的作用,而且这种作用在不同的方向上有强弱之分,因而引起冰晶形态的改变。在纯水中,冰通常以平行于晶格基面(a轴)的方式生长,而在垂直于基面的方向(C轴)很少生长,故冰晶格看起来呈扁圆状。低浓度AFP($\mu\text{mol/L}$)优先抑制冰晶沿a轴的生长,因此冰晶格的六边柱表面变得明显。高浓度AFP条件下冰晶主要沿C轴生长而形成六边双棱锥及针形晶体。这就是AFP的另一个特性——冰晶形态效应^[3]。AFP的第三个特性即重结晶抑制作用(recrystallization inhibition)。所谓重结晶是指在已经形成的晶体颗粒之间进行生长重分配,有的增大,有的减小;大的愈大,小的愈小。这种情形多发生在温度波动之时,往往对植物组织造成致命伤害。而AFP具有抑制重结晶发生的作用,所形成的晶粒体积小而比较均匀^[3,5-6]。

1.2 抗冻蛋白的分类及结构分析

按抗冻蛋白的来源分,主要有鱼类抗冻蛋白、植物抗冻蛋白、昆虫抗冻蛋白以及细菌抗冻蛋白。

1.2.1 鱼类抗冻蛋白 迄今为止在鱼类中共发现了5种抗冻蛋白,分别是抗冻糖蛋白(AFGPs)、I型抗冻蛋白(AFPI)、II型抗冻蛋白(AFP II)、III型抗冻蛋白(AFP III)和IV型抗冻蛋白(AIP IV)。

AFGPs于1969年首先由DeVeries在鱼(*Trematomus borohgrevinki*)的血液中发现,肽链是由Ala—Ala—Thr三肽单位重复组成,相对分子质

量从2700~32000,活性随相对分子质量的增加及重复数的增多而提高。

AFP I由Duman和DeVries于1974年在北大西洋沿海的美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*)(俗称冬鲈)的血清中发现,相对分子质量为3300~4500,其二级结构全为 α 螺旋。

AFP II仅发现于少数几种鱼类(如海渡鸦、胡瓜鱼和鲱鱼等)的血清中,其重要特征在于富含半胱氨酸(海渡鸦中8.3%、大西洋鲱中9.3%)。在大洋条鳕(*Macrozoarces americanus*)中发现的AFP III既不富含丙氨酸,也没有半胱氨酸,相对分子质量约6000。用NMR和X-射线衍射技术分析表明:其二级结构主要由9个 β 折叠组成,其中8个 β 折叠组成三明治夹心结构,另一个 β 折叠则游离在其外。

AFP IV是从长角杜文鱼(*Longhornosculpin, myoxocephalus octodecimspinosus*)血清中分离到的一种新型抗冻蛋白(LS-12),该抗冻蛋白含有108个氨基酸,相对分子质量约为12300,并且含有高达17%的Glu^[2]。

1.2.2 昆虫抗冻蛋白 一些越冬的昆虫体内存在超活性的AFP,维持其体液的过冷(Supercooling)状态。目前昆虫中抗冻蛋白的分离纯化主要在4种昆虫中开展,分别为黄粉虫(*Tenebrio molitor*)、美洲脊胸长椿(*Oncopeltus fasciatus*)、枞色卷蛾(*Choristoneura fumiferana*)和*Dendroides canadensis*。昆虫抗冻蛋白的相对分子质量一般为8000~9000,无糖基,与鱼类AFP I型相似,含有较多的亲水性氨基酸(例如Thr, Ser, Asx, Glx, Lys, Arg),有40%~59%的氨基酸残基能形成氢键^[7]。有些昆虫AFP类类似于鱼类AFP II,含有一定数量的半胱氨酸^[8]。一般来讲,昆虫抗冻蛋白抑制冰晶生长的活性高于鱼类或植物抗冻蛋白^[9]。它的最大活性可能达到鱼类抗冻蛋白最大活性的3~4倍,而且在毫摩尔浓度其活性会比鱼类抗冻蛋白的活性高出10~100倍^[10],分子结构也大不一样,这可能与冬季陆地的温度更低有关^[11]。

1.2.3 植物抗冻蛋白 植物AFP的研究起步较晚,目前已被研究的植物材料多达40余种,如从冬黑麦中提取并纯化了AFP。进一步的研究表明:冬黑麦AFP的7个多肽组分(相对分子质量从11000~36000)都表现出明显的抗冻活性,并且具有相似的氨基酸组成,均富含Asp、Glu、Ser、m、Gly、Ala等,不

含His,Cys含量在5%以上。从强抗冻植物沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)叶片中分离得到热稳定的 AFPs,其中有一种相对分子质量约为 40 000 的抗冻糖蛋白,其 pI 为 9.0。胡萝卜 AFPs 是一种相对分子质量为 36 000 的抗冻糖蛋白,pI 为 5.0。但真正被分离纯化的 AFPs 并不多,且这些 AFPs 的热滞活性或抗冻活性大大低于鱼类和昆虫的 AFPs。因此,推测 AFPs 在提高植物抗冻性方面的主要途径不是阻止冰晶的形成,而是调控胞外冰晶的增长及抑制冰的重结晶和降低过冷点^[12-13]。

1.2.4 细菌抗冻蛋白 在加拿大北极地区的植物根际中发现一种根瘤菌(*Pseudomonas otae* GR12-2),能耐受-20℃和-50℃的冰冻温度而存活下来,在 5℃生长温度下,会合成和分泌一种具有抗冻活性的蛋白质。这种蛋白质相对分子质量为 164 000 的糖脂蛋白,实验证实了这种菌抗冻的机制之一是 AFP 的聚集^[14-15]。来源于南极洲的细菌中有 6 种可以产生抗冻蛋白,其中热滞活性最高的一种 AFP 是由 82 号菌株(*Moraxella*)产生的一类脂蛋白(AFLP),N 一端氨基酸顺序与该菌的外膜蛋白有很高的相似性,这是首次报道的第一类抗冻脂蛋白^[16]。

1.3 冻蛋白的抗冻机理及作用模型

水溶液中的溶质能够降低冰点和熔点,如生理盐水的冰点为-0.539℃。但只靠这种作用,还不足以使生物体适应低温环境。极地鱼类能够在-1.9℃的海水中生存,单纯溶质的作用只能把冰点降低到-0.8℃。在降低冰点方面,起主要作用的是抗冻蛋白。抗冻蛋白是一种有冰核剂活性的蛋白质,当温度降低时,它能诱发细胞周围结冰,从而避免细胞内结冰造成致死性伤害。

抗冻蛋白抗冻机理目前尚不完全清楚,普遍认为:1)抗冻蛋白通过结合到冰晶的表面抑制其生长,从而改变冰晶的形态。2)抗冻蛋白具有抑制重结晶发生的作用,防止小的冰晶凝结成更大的冰晶,使形成的晶粒体积小且均匀。AFPs 的上述特性都是通过 AFPs 与冰晶的表面相互作用而实现的^[17]。

随着人们对抗冻蛋白分子机理理解的深入,人们先后提出了一序列的模型来解释这一特殊机理。1)1977年 Raymond 等^[18]首先提出“吸附-抑制”模型来解释 AFP 的作用机理,认为 AFP 通过自身吸附到冰晶表面从而抑制冰晶生长,而不是通过把水与冰进行隔离,使得水不再结冰。Du 等将小冰晶成核

技术应用于 AFP 的抗冻机制研究。发现 AFP 可以吸附到小晶核和尘埃颗粒上,从而阻碍冰晶的成核作用,首次从数量上来研究了 AFP 的抗冻机制^[19]。2)1983年 DeViles 提出了“晶格匹配”模型^[20]。在“晶格匹配”模型中,冬季比目鱼(*Pleuronectes americanus*)AFP 的两亲性 α 螺旋通过规律排布,突出螺旋外的 Thr 和 Asx 残基与冰晶棱面相结合。3)1988年 Yang 等^[21]提出“偶极子-偶极子”模型,认为 AFP 有显著平行于其螺旋轴亲水基团和疏水基团的偶极子(Dipole)。4)1993年 Knight 等^[22]提出了“晶格占有”模型,该模型是在“晶格匹配”模型的基础上演变而来的。“晶格占有”模型中,AFP 中部分氢键基团通过“占有”冰晶表面上氧原子的位置,从而与临近的氧原子同时形成了多个氧键,这样就使得氢键数量增加了几倍,最终导致 AFP 冰晶之间形成不可逆结合。5)2002年 Jia 等^[23]提出了一个可适用于目前已经发现的抗冻蛋白的“表面互补”模型。这个模型也被称为“受体-配体”模型,在该模型中 AFP 是受体,冰是配体,AFP 与冰晶之间所形成的表面互补与多种相互作用力有关,互补的表面越大则相互作用力越强,AFP 如果从冰晶上脱离下来,则必须同时断裂这些相互作用力,而这在动力学上几乎是不可可能的,因而导致了 AFP 与冰晶之间结合的不可逆性。

1.4 抗冻蛋白的功能

对于 AFP 的功能及特性可概括为以下几点:1)尽管发现抗冻蛋白可降低凝固点,但其熔点却接近于 0℃。热熵的存在表明其活性机制是非依数性的。2)抗冻蛋白的非依数性大约为具有依数活性物质的 500 倍左右。但是,却存在一个极限浓度点其活性趋于饱和。3)抗冻蛋白以极低质量浓度(<0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在时即可抑制冻结溶液的重结晶现象。4)当溶液的过冷温度稍低于其凝固点时,冰晶的成长结构就与其在水中截然不同。首先,冰结晶在鱼糖蛋白上从基面沿 C-轴方向呈针状生长,而不是集中地呈树枝状生长(即 a 轴不在基面上)。随着溶液温度的进一步降低,冰结晶的生长结构与其在水中基本相同。以上研究表明,特异位点与基面吸附的亲合力低于与棱形界面的亲合力^[24]。

2 抗冻蛋白在食品工业中的应用现状

从食品工业的发展趋势来看,冷冻食品业在食

品工业中所占的份额越来越大,尽管冷冻加工和贮藏室保证食品品质较好的方法之一,但是低温冷链中众多食品发生结晶和重结晶现象对细胞组织结构发生破坏作用,造成细胞内汁液流失。水的结晶导致溶液的局部浓缩现象又促使细胞内组分的性质发生改变,发生蛋白质变性、淀粉回生等现象,这些现象最终使产品品质受到严重破坏^[25]。作为一类新型的食品添加剂,抗冻蛋白可以有效减少冷冻贮藏的食品中冰晶的形成和重结晶,而提高低温冷链系列食品的质量。

2.1 在食品原料中的应用

抗冻蛋白的特性被报道后,各国很多学者纷纷寻找它的应用,但抗冻蛋白只能很小限度的降低冰点,与常用的可食用的抗冻剂相比,效果不显著,且自然生产量很小,因此充分运用到食品中去条件不成熟。基因工程的发展为抗冻蛋白的应用提供了良好的条件,即运用基因过程的方法把异源的高活性的 AFP 的基因转移到目标食品原料上,使之表达。这种遗传特性的改良,从根本上增强食品原料在田间的抗寒能力,而且会改善食品原料采后的贮藏加工特性^[26]。在 1984 年, Pickett 等报道了从美洲拟蝶中提取的 AFPI 型抗冻蛋白的 DNA 序列密码。Devies 报道了把抗冻基因转移到果蝇,并提出把抗冻基因转移到鲑鱼、烟草、和胡萝卜中的方案,此后的大多数工作是直接针对转基因品种的生产,来增进它对冷或霜冻的抗性,如 Georeges 等把抗冻蛋白基因转移到玉米中。这些工作本身是食品技术的一部分,使品种和生长条件更加广泛,从而使原料更加便宜。Warren 等进行了大量的研究,把抗冻基因接到载体中并在细菌、酵母菌和植物中表达,还进行了用发酵工程制备抗冻蛋白的方法,然后提纯抗冻多肽。将抗冻蛋白应用到食品模型中都显示了改变冰晶生长的活性。美国 DNA 工程公司在番茄中导入抗冻蛋白基因,降低了细胞内水分的凝固,培育出的耐寒番茄,在 -6 °C 能生存几个小时,果实冷藏后不变形^[27]。

2.2 在食品加工及贮运过程中的应用

在食品冷冻时,抗冻蛋白可抑制重晶化保持食品柔软的质地。在冷冻贮藏食品中,抗冻蛋白在食品的冰冻、贮藏、运输和解冻过程抑制重晶化,减少细胞损伤以保持食品质地,还可减少滴液以降低营养成分的损失。果蔬贮藏时的温度越低,品质保持

越好,大部分果蔬可以在 -18 °C 实现跨季节冻藏。但果蔬质膜均由弹性较差的细胞壁包裹,冻结过程对细胞的机械损伤和溶质损伤较为突出,因此适宜低温点的选择往往取决于贮藏对象的耐低温能力,由于果蔬品种、组织成分、成熟度等多种因素不同,对低温冻结的承受能力差别很大。食品在解冻过程中常出现的问题是汁液流失、软烂、失去原有的形态。造成汁液流失的原因与食品的原料、冻结方式、冻藏条件以及解冻方式有关。能表达抗冻蛋白的转基因蔬菜可改善这种状况,提高速冻品的质量。这是因为转基因蔬菜在冻结与冻藏中冰晶对细胞和蛋白质的破坏很小,合理解冻后,部分融化的冰晶也会缓慢渗透到细胞内,在蛋白质颗粒周围重新形成水化层,使汁液流失减少,保持了解冻食品的营养成分和原有风味^[2]。

2.3 作为食品添加剂的应用

其中一项研究是洛杉矶的 Tomorrow Products 研究的 Eskimo 品牌的 Twin 香槟酒。经过 -8~-6 °C 1 h 的贮藏后,对照样品产生了大量的冰结晶,而加入抗冻蛋白的样品却未见有冰结晶出现。冰淇淋在贮存、运输过程易受升温或温度波动的影响,温度波动对冰晶的影响更大。因为当温度升高时,冰淇淋中的未冻水分增多,而且温度降低时,未冻水分重新凝结,使原来细小的冰晶长大。可见,在贮存、运输过程中冰晶的再结晶使冰淇淋的质地粗糙,失去了原有的细腻口感。把少量的抗冻蛋白加入到已融化的冰淇淋样品中,于 -80 °C 下迅速冷冻,然后在 -8~-6 °C 下放置不同的时间,用显微镜观察重结晶的变化。在 -8~-6 °C 下放置 1 h 后,同对照相比冰晶明显变小^[28]。肉制品的冷冻、冷藏中,加入 AFPs 可以有效地减少渗水和抑制冰晶的形成,保持原来的组织结构,减少营养流失^[15]。据报道,将 AFPG 于屠宰前注入羔羊体内,宰后肉体经真空包装,在 -20 °C 冻藏 2~16 周,然后解冻,观察肉的冷冻质量。结果发现,无论在屠宰前 1 h 或 24 h 注射 AFPG,均可有效降低冰晶体的体积和液滴的数量。AFPG 终注射浓度达到 0.01 mg/kg 时,特别是在宰前 24 h 注射时,可以获得最小的冰晶体^[29]。Zhang^[30]等研究了抗冻蛋白对冷冻面团质地特性的影响,结果发现,添加抗冻蛋白的实验组冷冻面团的硬度比对照组更加柔软和稳定,这主要是因为较低的结冰水含量。

3 抗冻蛋白在食品工业中的应用前景

抗冻蛋白在食品中的应用前景非常广阔,尤其在发酵菌种的改进及保藏方面将取得不可替代的作用。通过原核生物 *E.coli* 诱导表达 AFPs,分离纯化出 AFPs,可以作为一种防冻剂,对菌种保藏及果蔬的贮藏和保鲜有重要的价值。对于果蔬的贮藏,如果贮藏温度能降低 1 °C,就可以明显延长贮藏寿命。抗冻蛋白及其模拟物将被认为是很有潜力的食品添加剂。

然而抗冻蛋白在食品中的应用依赖于它的成本,目前抗冻糖蛋白和冬蝶蛋白已有商品出售,价格与纯度有关,基本售价为 500 美元/g。如此昂贵的价格在食品中的应用还不现实,目前仅适用于特殊研究项目上。也有一些抗冻蛋白不再从鱼的血液中提取,而是通过化学合成或基因工程方法生产,但是成本仍未降到可以在食品中使用的水平。不过,相信不久,合成抗冻蛋白的价格会随着生物合成水平的迅速发展而大幅下降。另外,从分子生物学的角度来分析,在某些鱼类和作物中植入合适的抗冻基因,生产出含有抗冻蛋白的食品原料(如鲑鱼、草莓、柑桔等),加工得到的产品成本可能会更低^[25]。

3.1 抗冻蛋白在果蔬保鲜中的应用前景

新鲜果蔬贮藏时均需有适宜的最低温度,低于此温度常造成果蔬的冰害和冻害。适宜低温点的选择往往取决于贮藏对象的耐低温能力。贮藏温度若能降低 1 °C 就可以明显延长某些果蔬的贮藏寿命^[31]。速冻果蔬在冻藏解冻过程中常出现的主要问题是汁液流失(drip loss)、软烂、失去原有的形态。造成汁液流失的原因与食品的原料处理、冻结方式、包装、冻藏条件以及解冻方式有关,最关键的因素是冻藏过程中的温度波动导致重结晶。能表达 AFPs 的转基因蔬菜可改善这种状况,提高速冻品的质量。这是因为转基因蔬菜在冻结与冻藏中冰晶对细胞和蛋白质的破坏很小,合理解冻后,部分融化的冰晶也会缓慢渗透到细胞内,在蛋白质颗粒周围重新形成水化层,使汁液流失减少,保持了解冻食品的营养成分和原有风味。人们将鱼的 AFPI 抗冻蛋白渗入到植物叶和茎的组织中,使其冰点降低了 1.8 °C 以上,在植物悬浮培养细胞低温保存时,抗冻

蛋白可起到冰冻保护剂的作用,而抗冻蛋白也能降低植物细胞内冰晶形成速度,这表明鱼抗冻蛋白在植物中具有抗冻活性。

3.2 抗冻蛋白在水产行业中的应用前景

水体温度低对很多水产生物都会造成相当大的应激,因此在温和气候里生活的敏感水产生物在遇到罕见的低温时,甚至可能会全部死亡。例如一些亚热带鱼类和虾类,如果在其收获前期遇到较强冷空气侵袭,超过其适应能力,就会被冻死而减产。低温对水产生物的影响,限制了养殖业的发展。然而抗冻蛋白的发现和生物技术的发展为水产养殖业提供了广阔的发展前景。杨晓蓓首次将目前已知具有最强抗冻活性的云杉卷叶蛾(*spruce budworm*, *Choristoneura fumiferana*)抗冻蛋白(*sbw* AFP)基因,通过精子介导的转基因技术整合到罗氏沼虾的胚胎中,获得了具有 *sbw* AFP 基因整合的虾胚胎^[32]。Fletcher 等将北美黄盖蝶抗冻蛋白基因微量注入鲑鱼的受精卵内,获得了遗传表达 AFP 的转基因鲑鱼。

在水产品冷冻加工的过程中,冷冻的温度及速度会引起冷冻产品的组成成分及产品的质量发生变化。如冷冻鱼糜,在冷冻过程中,如果冷冻速度过慢,产生的冰晶过大,就会导致蛋白冷冻变性,降低产品的质量。由于抗冻蛋白具有非依数性的降低冰点,抑制冰晶生长速度的独特特性,可以将抗冻蛋白通过物理手段如直接混合、浸泡、真空渗透等应用于水产品的冷冻加工过程中,改善冷冻产品的质量^[33]。

4 结语

以上是抗冻蛋白的特性、分类、结构分析、作用机理、功能及其在食品工业中的应用现状和作用前景,尽管对抗冻蛋白有了不少的认识,但抗冻蛋白还留下很多需要研究的课题,尤其是抗冻蛋白结构与功能之间的关系及如何有效地应用到食品工业中,作为已经改变了基因的原料或在食品中应用的基因工程抗冻剂如何降低成本等都是迫切需要解决的课题。随着研究工作的进行,抗冻蛋白作用机理会变得更为明显,其在食品工业中的应用将会有广阔的前景。

参考文献:

- [1] 费云标,魏令波,高素琴,等. 沙冬青抗冻蛋白的分离、纯化及其理化特性分析[J]. 科学通报,2000,45(20):2185-2189.
FEI Yun-biao, WEI Ling-bo, GAO Su-qin, et al. Separation, purification and its characteristic analysis of antifreeze protein in *Ammopiptanthus nanus*[J]. **Chinese Science Bulletin**, 2000, 45(20):2185-2189. (in Chinese)
- [2] 闫清华,杨理,邵强. 抗冻蛋白及其在食品领域中的应用[J]. 山东农业科学,2010,11:89-92.
YAN Qing-hua, YANG lin, SHAO Qiang. Antifreeze proteins and their application in food field[J]. **Shandong Agricultural Science**, 2010, 11:89-92. (in Chinese)
- [3] 卢存福,王红,简令成,等. 植物抗冻蛋白研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,1998,25(3):210-216.
LU Cun-fu, WANG Hong, TONG Ling-cheng, et al. Progress in study of plant antifreeze proteins[J]. **Prog Biochem Biophys**, 1998, 25(3):210-216. (in Chinese)
- [4] 费云标. 抗冻蛋白基因结构与基因工程[J]. 生物工程进展,1992,12(3):33-36.
FEI Yun-biao. Genetic structure and genetic engineering of antifreeze proteins[J]. **Process in Biotechnology**, 1992, 12(3):33-36. (in Chinese)
- [5] Charles A K, Arthur L D V, Laarry D O. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice[J]. **Nature**, 1984, (308):295-596.
- [6] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization [J]. **Science**, 1998, 282(5386):115-117.
- [7] 李芳,王博,艾秀莲,等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 新疆农业科学,2003,40(6):349-352.
LI Ai, WANG Bo, AI Xiu-lian, et al. Advance in the antifreeze proteins [J]. **Xinjiang Agricultural Science**, 2003, 40 (6):349-352. (in Chinese)
- [8] 费云标,江勇,赵淑慧,等. 昆虫抗冻蛋白的研究进展[J]. 昆虫学报,2000,43(1):98-102.
FEI Yun-biao, JIANG Yong, ZHAO Shu-hui, et al. Advances in insect antifreeze protein research [J]. **Acta Entomologica Sinica**, 2000, 43(1):98-102. (in Chinese)
- [9] Mao X F, Liu Z Y, Ma J, et al. Characterization of a novel β -helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita*[J]. **Cryobiology**, 2011, 62:91-99.
- [10] Yue C W, Zhang Y Z. Cloning and expression of *Tenebrio molitor* antifreeze protein in *Escherichia coli*[J]. **Mol Bio Rep**, 2009, 36:529-536.
- [11] 田云,卢向阳,张海文,等. 抗冻蛋白研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2002,22(6):48-53.
TIAN Yun, LU Xiang-yang, ZHANG Hai-wen, et al. Advance in the antifreeze proteins[J]. **Journal of Chinese Biotechnology**, 2002, 22(6):48-53. (in Chinese)
- [12] 邵强,闫清华,徐存拴,等. 植物抗冻蛋白研究新进展[J]. 河南农业科学,2005,9:12-15.
SHAO Qiang, RUN Qing-hua, XU Cun-shuan, et al. New research advances in plant antifreeze protein [J]. **Henan Agricultural Science**, 2005, 9:12-15. (in Chinese)
- [13] 陈晓光,王巍. 抗冻蛋白[J]. 生物学教学,2008,33(7):11-13.
CHEN Xiao-guang, WANG Wei. Antifreeze proteins[J]. **Biology Teaching**, 2008, 33(7):11-13. (in Chinese)
- [14] 刘晨临,黄晓航,李光友. 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(3):102-109.
LIU Chen-lin, HUANG Xiao-hang, LI Guang-you. Advances in antifreeze protein research and its application in biotechnology [J]. **Journal of Oceanography of Huanghai & Bohal Seas**, 2002, 20(3):102-109. (in Chinese)
- [15] 孙琳杰. 新疆荒漠昆虫抗冻蛋白在酿酒酵母低温保存中的应用[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2008:9-12.
- [16] Yamashita Y, Nakamuta N, Omiya K, et al. Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxeu* sp. of Antarctic origin[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2002, 66(2):239-247.
- [17] 彭淑红,姚鹏程,徐宁迎. 抗冻蛋白的特性和作用机制[J]. 生理科学进展,2003,34(3):238-240.
PENG Shu-hong, YAO Peng-cheng, XU Ning-ying. Characteristics and mechanism of the antifreeze protein [J]. **Progress in Physiological Science**, 2003, 34(3):238-240. (in Chinese)
- [18] Raymond J A, Devriesal. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1977, 74(6):2589-2593.

- [19] DU N, LIU X Y, HEW C L. Ice nucleation inhibition: mechanism of antifreeze by antifreeze protein [J]. **J Biol Chem**, 2003, 278 (38): 36000–36004.
- [20] Devries A L. Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes [J]. **Anna Rev Physiol**, 1983, 45: 245–260.
- [21] Yang D S, Sax M, Chakrabarty A, et al. Crystal structure of all antifreeze polypeptide and its mechanistic implications [J]. **Nature**, 1988, 333(6170): 232–237.
- [22] Knight C A, Driggers E, Devries A L. Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8 [J]. **Biophys J**, 1993, 64(1): 252–259.
- [23] Jia Z, Davies P L. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction [J]. **Trends Biochem Sci**, 2002, 27(2): 101–106.
- [24] 林淑英, 孔保华, 郭清泉. 抗冻蛋白及其在食品工业中的应用现状 [J]. **食品工业**, 2001, 3: 13–15.
LIN Shu-ying, KONG Bao-hua, GUO Qing-quan. Antifreeze proteins and their application in food industry [J]. **Food Industry**, 2001, 3: 13–15. (in Chinese)
- [25] 周素梅, 廖红. 未来的食品原料—抗冻蛋白 [J]. **冷饮与速冻食品工业**, 2011, 7(4): 37–38.
ZHOU Su-mei, LIAO Hong. Antifreeze protein: Future food raw material [J]. **Beverage and Fast Frozen Food Industry**, 2011, 7(4): 37–38. (in Chinese)
- [26] 韩永斌, 刘桂玲. 抗冻蛋白及其在果蔬保鲜中的应用前景 [J]. **天然产物研究与开发**, 2003, 15(4): 373–378.
HAN Yong-bin, LIU Gui-ling. Antifreeze proteins and their potential application in fruits and vegetables fresh keeping [J]. **Natural Product Research and Development**, 2003, 15(4): 373–378. (in Chinese)
- [27] 胡爱军, 郑捷, 丘泰球. 抗冻蛋白及其在食品中的应用 [J]. **西部粮油科技**, 2002, 27(2): 28–31.
HU Ai-jun, ZHENG Jie, QIU Tai-qiu. Antifreeze proteins and its applications in food [J]. **China Western Cereals and Oils Technology**, 2002, 27(2): 28–31. (in Chinese)
- [28] 尹明安, 崔鸿文. 抗冻蛋白及其在竹屋抗冻基因工程中的应用 [J]. **西北植物学报**, 2001, 21(1): 8–13.
YI Ming-an, CUI Hong-wen. Antifreeze protein and their application in plant antifreeze genetic engineering [J]. **Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica**, 2001, 21(1): 8–13. (in Chinese)
- [29] Jia Z C, Davies P L. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction [J]. **Trends in Biochemical Sciences**, 2002, 27: 101–106.
- [30] Zhang C, Zhang H, Wang L. Effect of carrot (*Daucus carota*) antifreeze proteins on texture properties of frozen dough and volatile compounds of crumb [J]. **LWT**, 2008, 41: 1029–1036.
- [31] 代焕琴, 郭索娟, 卢存福. 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(12): 44–49.
DAI Huan-qin, GUO Suo-juan, LU Cun-fu. Antifreeze proteins and their application in food industry [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2001, 27(12): 44–49. (in Chinese)
- [32] 杨晓菁. 抗冻蛋白基因的克隆及其在罗氏沼虾中的整合 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2004: 1–2.
- [33] Marilyn Griffith, K Vanya Ewart. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods [J]. **Biotechnology Advances**, 2007, 13(3): 375–420.